

· 基础研究 ·

Transwell 小室内建立小鼠成骨-破骨细胞共培养体系

莫国业¹, 张顺聪², 李永贤¹, 郭惠智¹, 郭丹青², 李大星¹, 唐永超², 莫凌³, 罗培杰¹, 马延怀¹

(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院脊柱骨科, 广东 广州 510405; 3. 广州中医药大学第三附属医院骨科, 广东 广州 510100)

【摘要】 目的: Transwell 小室内建立体外小鼠成骨-破骨细胞共培养体系, 并检测体系对成骨及破骨细胞活性的影响。**方法:** 体外培育小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 和小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7, RANKL 诱导小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 分化为成熟破骨细胞后, 于 Transwell 小室内建立成骨-破骨细胞共培养体系。通过 CCK-8 实验、茜素红染色、TRAP 染色检测细胞的成骨、破骨活性。采用 PCR、Western-Blot 方法检测成骨细胞 MC3T3-E1 中 OPG、ALP、RANKL、TGF- β 1 的基因表达以及 RANKL 的蛋白表达, 检测破骨细胞 RANK、NF- κ B 的基因表达和蛋白表达。**结果:** 小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 和小鼠破骨细胞可在 Transwell 小室内建立共培养体系; 共培养体系影响小鼠成骨细胞与破骨细胞的分化活性, 镜下可见成骨细胞分化增多, 破骨细胞分化稍减少。共培养体系中成骨细胞基因 OPG(0.65±0.08)、ALP(0.16±0.01) 较单独培养 OPG(1.00±0.08)、ALP(1.01±0.16) 表达下降, 而 TGF- β 1(4.42±0.21)、RANKL(4.12±1.04) 较单独培养组 TGF- β 1(1.00±0.10)、RANKL(1.00±0.09) 表达上升; 破骨细胞相关 RANK(0.63±0.06)、NF- κ B(0.64±0.08) 基因表达较单独培养组的 RANK(1.00±0.08)、NF- κ B(1.00±0.09) 下降, 差异均有统计学意义。同时共培养组的 OPG(0.43±0.05)、NF- κ B(0.59±0.05) 的蛋白表达较单独培养组的 OPG(0.84±0.06)、NF- κ B(1.13±0.03) 减少; 共培养组 RANKL(0.54±0.03) 的蛋白表达则较单独培养组的 RANKL(0.31±0.03) 增加, 差异有统计学意义, 均与基因表达变化趋势一致。**结论:** 小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 和小鼠破骨细胞可在 Transwell 小室内建立共培养体系, 共培养体系中成骨细胞活性高于破骨细胞活性。

【关键词】 成骨细胞; 破骨细胞; 基因表达

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2018.03.010

Establish mouse osteoblast -osteoclast cell co-culture system in a Transwell chamber MO Guo-ye, ZHANG Shun-cong, LI Yong-xian, GUO Hui-zhi, GUO Dan-qing, LI Da-xing, TANG Yong-chao, MO Ling, LUO Pei-jie, and MA Yan-huai. Department of Orthopaedics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of China Medicine, Guangzhou 510100, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To establish osteoblast -osteoclast cell co-culture system in a Transwell chamber, and detect cell viability of osteoblasts and osteoclasts in system. **Methods:** Osteoblast MC3T3-E1 and mouse monocytes RAW264.7 were cultivated in vitro. RANKL-induced mouse RAW264.7 monocytes differentiated into mature osteoclasts, osteoblast-osteoclast cell co-culture system was established in Transwell chamber. Cell activity of osteoblasts and osteoclasts were detected by CCK-8 experimenting, Alizarin Red staining, TRAP staining. The expression of OPG, ALP, RANKL, TGF- β 1 gene and RANKL protein in osteoblast MC3T3-E1 were detected by PCR, Western-Blot methods. Also, the expression of RANK, NF- κ B in gene and protein level in osteoclast were measured through the same method respectively. **Results:** The co-culture system of Mouse MC3T3-E1 cells and RAW264.7 cell were established in Transwell chamber. Co-culture system affected cell division activities of osteoblasts and osteoclasts. Differentiation of osteoblasts were increased, while differentiation of osteoclast division were slight decreased under microscope observation. OPG (0.65±0.08) and ALP (0.16±0.01) gene expression of co-culture system were less than single culture OPG (1.00±0.08) and ALP (1.01±0.16); TGF- β 1 (4.42±0.21) and RANKL (4.12±1.04) of osteoblasts in co-culture system were higher than TGF- β 1 (1.00±0.10) and RANKL (1.00±0.09) under single culture. However, gene expression of RANK (0.63±0.06) and NF- κ B (0.64±0.08) in co-culture system were decreased than RANK (1.00±0.08)

基金项目: 广东省自然科学基金项目(编号: 2016A030313641); 广州市科技计划项目(编号: 2017010460); 广东省中医药局科研项目(编号: 20172043); 广东省科技厅项目(编号: 2016A020215137)

Fund program: Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2016A030313641)

通讯作者: 莫凌 E-mail: spine2016@sina.com

Corresponding author: MO Ling E-mail: spine2016@sina.com

and NF-κB (1.00±0.09), in single culture, and had significant differences. Similarly, protein expression of OPG (0.43±0.05) and NF-κB(0.59±0.05) of co-culture system were less than OPG(0.84±0.06) and NF-κB(1.13±0.03) of single culture. While RANKL protein expression (0.54±0.03)of co-culture system was more than single culture RANKL(0.31±0.03), and had statistically differences, which was in agreement of the trend of gene expression change. **Conclusion:** Co-culture system of mouse MC3T3-E1 cells and RAW264.7 cell was viable in Transwell chamber, and the activity of osteoblasts is higher than osteoclasts in co-culture system.

KEYWORDS Osteoblast; Osteoclast; Gene expression

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2018, 31(3):241-247 www.zggszz.com

随着人口老年化,骨质疏松症的发病率越来越高,骨质疏松相关性的病理性骨折的发病率也不断上升^[1]。骨组织能维持正常的生理代谢需要破骨细胞和成骨细胞,并与骨组织内多种基础细胞相互协调来完成。其中,破骨细胞主导的骨吸收过程和成骨细胞参与的骨形成过程尤为关键^[2]。因此,研究成骨细胞和破骨细胞的相互作用机制对于探讨骨质疏松的病理改变有重要意义。单独培养的成骨细胞或破骨细胞的体外研究均有部分局限性,共培养细胞可更好地模拟骨组织内环境解决这一问题。本实验的目的是在 Transwell 小室内建立体外小鼠成骨-破骨细胞共培养体系,并检测体系对成骨及破骨细胞代谢的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验材料和仪器

主要细胞:小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 和小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7。仪器和试剂:超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),荧光定量 PCR 仪 ABI7500(美国 Applied Biosystems),6 孔 Transwell 小室(美国 Corning 公司),胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),DMEM 细胞高糖培养基(美国 Gibco 公司),重组小鼠 RANKL 试剂(Sinobiologix 公司),胎牛血清(澳洲 Gibco 公司),TRAP 染色试剂盒(美国 Sigma 公司),茜素红染色试剂盒(美国 Sigma 公司)。

1.2 小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 的培养

使用购买的小鼠成骨细胞 MC3T3-E1,将刚运输回培养基较满的培养瓶于孵箱内孵育 0.5 h,使用乙醇清洁无菌工作台后,放入含有小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 的培养瓶,完全弃去其中液体后,给予更换 4 ml 含有胎牛血清的培养基,进行细胞培养。每瓶细胞培养 3~4 d,更换培养基。当培养瓶中的细胞覆盖率为 80%~90%时,进行细胞传代,将原有培养基完全吸掉,加入 1~2 ml 的 PBS 溶液彻底清洗。之后加入 1 ml 含胰蛋白酶(含 0.25% EDTA)进行适度消化约 3 min。期间于显微镜下密切观察细胞形态改变,当细胞立体性增强或体积变化为圆形明显时候,加入含血清的培养基终止消化。之后用移液枪反复吹打并收集细胞。将细胞悬浮液吸入 15 ml 的小型

离心管内,1 000 r/min 速度离心 5 min,可见细胞沉淀。此时洗掉上清液,加 2 ml 培养基重悬细胞,通过细胞计数器计算细胞密度,经台盼蓝检测细胞活性后,适度接种于更多培养瓶或者 6 孔板内进行培养观察。

1.3 小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 的培养及破骨分化诱导

使用购买的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7,此细胞特点在于容易老化,生长迅速,需要生长空间。故相较于小鼠成骨 MC3T3-E1 的培养,此细胞根据显微镜观测其密度,当部分细胞不再为圆形,而出现梭形时,应及时传代予其更多空间。细胞传代方法与小鼠成骨 MC3T3-E1 相同,但当细胞贴壁明显难以消化时,需酌情增加细胞消化时间并反复吹打。每瓶细胞给予更换 4 ml 含有胎牛血清的培养基,进行细胞培养。每瓶细胞培养 1~2 d 后更换培养基。

RAW264.7 细胞的破骨诱导培养通过核因子 κB 受体活化因子配体(RANKL)来实现,RANKL 可以在 RAW264.7 细胞表面,与细胞核因子 κB 受体活化因子(RANK)相互结合,经肿瘤坏死因子受体连接因子(TRAF)介导,完成破骨细胞分化。本部分实验在适度获得表型良好的 RAW264.7 细胞后,更换含有 50 ng/ml RANKL 的培养基进行诱导,诱导第 3 天可出现 2~3 核破骨细胞样改变,之后通过 TRAP 染色鉴定。

1.4 小鼠成骨-破骨细胞共培养体系建立

本实验主要使用 Transwell 小室完成细胞共培养体系的建立。充分 PBS 清洗后,胰酶适度消化后将小鼠成骨细胞 MC3T3-E1,以 50 000/个密度接种于 6 孔 Transwell 小室的下培养室内进行培养;胰酶适度消化后将小鼠 RAW264.7 细胞,以 10 000/个密度接种在另置于 6 孔板上的 Transwell 上培养室内进行培养(图 1,Transwell 小室)。待细胞贴壁后,更换含有诱导因子(50 ng/ml 的 RANKL)的培养基进行培养,诱导 3 d 后将铺有 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞的 Transwell 上培养室移回铺有 MC3T3-E1 细胞的 6 孔 Transwell 板内,共培养 7 d 后进行鉴定和检测。细胞接种前需经过台盼蓝检测溶液测试证实

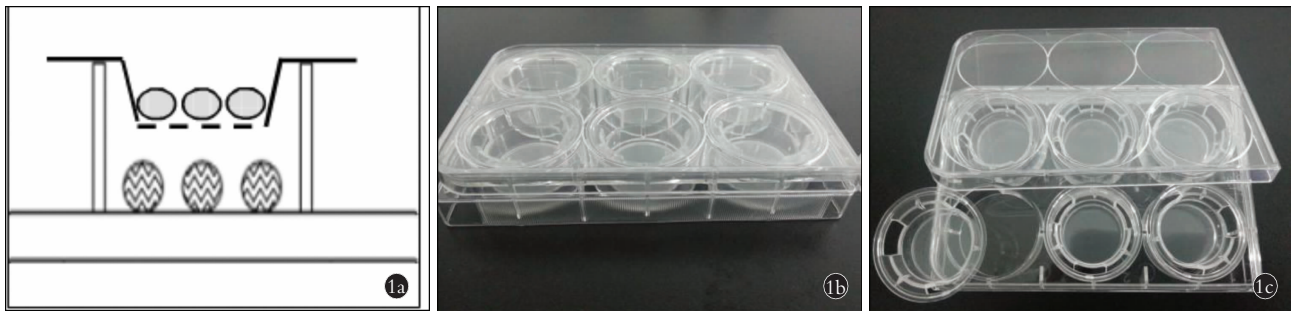


图 1 Transwell 小室 1a. Transwell 小室的原理图 1b, 1c. Transwell 小室的外观图

Fig.1 Transwell chamber 1a. Schematic diagram of transwell chamber 1b, 1c. Appearance drawing of transwell chamber

其活性高于 95%，称取台盼蓝粉剂 0.4 g，融入 100 ml PBS 溶液内溶解（最终浓度 0.4%），室温条件下内放置配合细胞悬浮液检测细胞活性。

1.5 观察项目与方法

1.5.1 成骨细胞活性检测 使用 CCK-8 实验检测成骨细胞活性：在成骨-破骨共培养 7 d 后于铺有成骨细胞的 Transwell 小室下室中加入 10 μl CCK-8 溶液，孵箱中继续孵育 4 h 后使用移液枪吸取 200 μl 溶解后的溶液加入 96 孔细胞培养板内，适度震荡后减少每孔内的气泡数量，如有明显气泡产生则使用枪头或者针头挑破，在酶标仪上于 450 nm 波长处测定各孔吸光度，每样本重复测量 3 次取平均值。

茜素红染色检测成骨细胞成骨结节大小：在共培养 7 d 后，充分吸取 Transwell 小室下室中的细胞培养液，使用 PBS 溶液充分清洗 3 次后，使用 4% 多聚甲醛固定细胞蛋白 15 min，使用蒸馏水浸洗，放入茜素红染色液 5~10 min 后染色充分后，再次使用蒸

馏水浸洗，于光镜下观察拍照。

1.5.2 破骨细胞活性检测 TRAP 染色检测诱导后 RAW264.7 细胞的破骨分化程度：在共培养 3 d 后，用柠檬酸盐/丙酮溶液固定细胞 30 s，之后将细胞放置于在以萘酚 AS-BI 磷酸盐作为底物的孵育液中 30 °C 孵育 1 h，之后蒸馏水洗细胞 3 次，并用苏木素复染 2 min，干燥后用二甲苯透明，自然晾干，甘油明胶封片，显微镜观察 TRAP 阳性多核破骨细胞（≥3 个核）。

1.5.3 成骨细胞及破骨细胞基因及蛋白表达检测

本实验部分对共培养体系中的小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 细胞的 OPG、TGF-β1、ALP、RANKL 基因，以及破骨细胞的 RANK 和 NF-κB 基因，采用多聚酶链式反应（PCR）来体外特异性扩增 cDNA，qRT-PCR 的方法检测其 mRNA 的表达情况，并与单独培养的 MC3T3-E1 细胞和破骨细胞基因表达情况相对比，结果见表 1。

对共培养体系中的小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 的

表 1 PCR 实验引物设计选择
Tab.1 Design of primers for PCR experiment

基因名称	Gene ID	引物序列(5'-3')	扩增长度(bp)
GAPDH	14433	Forward: AGGTCGCTGTGAACCGATTTC	123
		Reverse: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTA	
TGF-β1	21803	Forward: CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	133
		Reverse: GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG	
NF-κB1	18033	Forward: GAGGTCTCTGGGGTACCAT	89
		Reverse: AAGGCTGCCTGGATCACTTC	
RANK	21934	Forward: TGGGTGATTTTTCTTTTGGTGGG	93
		Reverse: CCAAGAACCACTGCTCGTGA	
RANKL	21943	Forward: AGGCTGGGCCAAGATCTCTA	130
		Reverse: GTCTGTAGGTACGCTTCCCG	
ALP	11647	Forward: CCAACTCTTTTGTGCCAGAGA	110
		Reverse: GGCTACATFGCTGTTGAGCTTTT	
OPG	2072182	Forward: CCCTTGCCCTGACCACTCTT	150
		Reverse: AGGTAACGCCCTTCCTCAC	

OPG、RANKL 蛋白表达,以及破骨细胞的 NF- κ B 蛋白表达,用 Western-Blot 方法检测表达及变化情况。

1.6 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行统计分析。PCR、Western-Blot 检测的 OPG、TGF- β 1、ALP、NF- κ B 基因等计量资料结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,不同组间结果比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 的培养及形态

购买的小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 来自 Ba1b/C 乳鼠,经过高糖培养基培养后,其形态特点具有一般成骨细胞的形态特征:细胞形态拉长延伸,多数呈梭形,细胞两端尖端形态或者多尖端形态分布,原始骨细胞的圆形形态不再明显,MC3T3-E1 细胞可呈有序分布、旋涡状分布或者集落性分布。培养过程中调

整培养密度使其形态特点明显(图 2)。

2.2 小鼠破骨细胞的培养及形态

小鼠 RAW264.7 细胞经过 RANKL 诱导分化后,表现出不同的形态特征。如图 3 所示,原始 RAW264.7 细胞呈单核巨噬细胞样改变,小而呈圆形,增殖能力较强。随着 RANKL 诱导破骨分化培养基的加入,细胞逐渐呈不规则形态,外表有少许凸起呈三角形或正方形。诱导破骨分化第 2 天开始,明显观察到诱导后的 RAW264.7 细胞因其增殖力强,呈较大的菌落状分布;诱导后的 RAW264.7 细胞逐渐延伸,呈不规则形态,较多细胞呈梭形,有些细胞融合成较大的 2 核或 3 核细胞,呈破骨细胞样改变。

2.3 小鼠成骨-破骨共培养体系的建立

本实验建立了小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 和小鼠破骨细胞(由 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞形成)的共培养体系,光镜下显示小鼠成骨细胞 MC3T3-E1

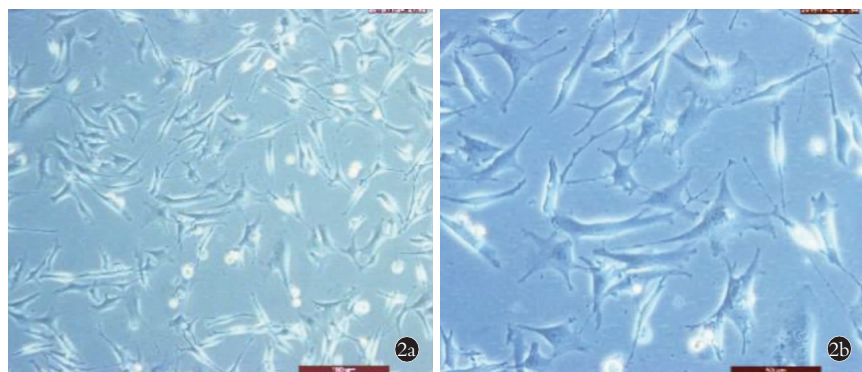


图 2 小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 示细胞形态不一,多数呈梭形分布

2a. $\times 100$ 2b. $\times 200$

Fig.2 Osteoblast MC3T3-E1 in rats showed formation of cell were irregular and large number of expressed spindle distribution 2a. $\times 100$ 2b. $\times 200$

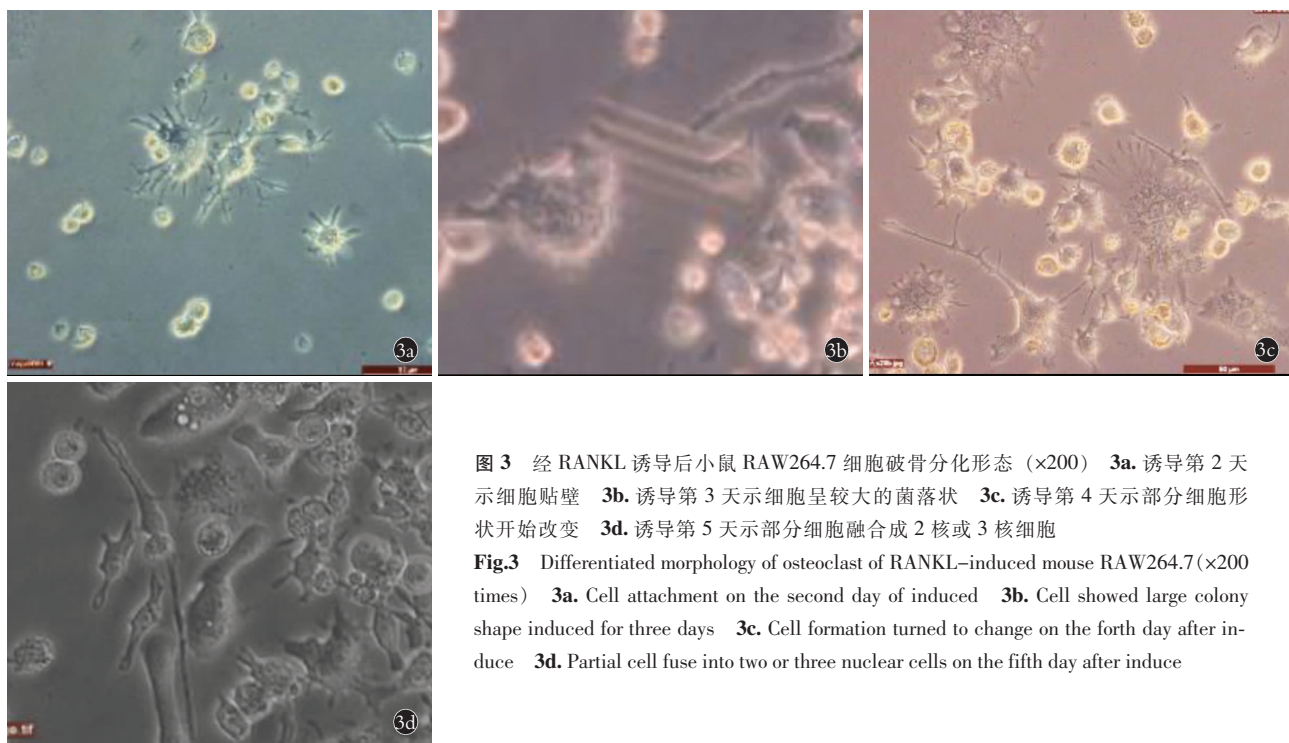


图 3 经 RANKL 诱导后小鼠 RAW264.7 细胞破骨分化形态($\times 200$) 3a. 诱导第 2 天示细胞贴壁 3b. 诱导第 3 天示细胞呈较大的菌落状 3c. 诱导第 4 天示部分细胞形状开始改变 3d. 诱导第 5 天示部分细胞融合成 2 核或 3 核细胞

Fig.3 Differentiated morphology of osteoclast of RANKL-induced mouse RAW264.7($\times 200$ times) 3a. Cell attachment on the second day of induced 3b. Cell showed large colony shape induced for three days 3c. Cell formation turned to change on the fourth day after induce 3d. Partial cell fuse into two or three nuclear cells on the fifth day after induce

细胞形态良好,符合一般单独培养的 MC3T3-E1 细胞形态特征,破骨细胞在共培养体系中亦是如此。共培养期间,成骨细胞分化效果明显,细胞呈饱满梭形、三角形、鳞片形,部分细胞浆内有空泡;破骨细胞数量稍有减少,集落分布增强(图 4)。

2.4 小鼠成骨-破骨共培养体系的成骨活性及破骨活性的鉴定

CCK-8 检测结果显示:小鼠成骨细胞培养液体吸光度为 0.615、0.670、0.795、0.619、0.745、0.685,均值为 0.688 ± 0.071 ,提示成骨细胞其活性较好。茜素红染色结果显示,MC3T3-E1 细胞可形成深色茜素红染色改变,存在成骨活性。TRAP 染色结果显示,RAW264.7 细胞可诱导分化为较为成熟的破骨细胞,含有多个细胞核,呈空泡状改变(图 5)。

2.5 小鼠成骨-破骨共培养体系的基因表达检测

共培养体系中成骨细胞基因 OPG (0.65 ± 0.08)、

ALP (0.16 ± 0.01)较单独培养 OPG (1.00 ± 0.08)、ALP (1.01 ± 0.16)表达下降,而 TGF- β 1 (4.42 ± 0.21)、RANKL (4.12 ± 1.04)较单独培养组 TGF- β 1 (1.00 ± 0.10)、RANKL (1.00 ± 0.09)表达上升;破骨细胞相关 RANK (0.63 ± 0.06)、NF- κ B (0.64 ± 0.08)基因表达较单独培养组的 RANK (1.00 ± 0.08)、NF- κ B (1.00 ± 0.09)下降。结果见表 2。

2.6 小鼠成骨-破骨共培养体系的蛋白表达检测

对共培养体系中小鼠成骨细胞的 OPG、RANKL 蛋白表达,以及破骨细胞的 NF- κ B 蛋白表达进行检测,与单独培养的成骨细胞和破骨细胞作比较。共培养组的 OPG (0.43 ± 0.05)、NF- κ B (0.59 ± 0.05)的蛋白表达较单独培养组的 OPG (0.84 ± 0.06)、NF- κ B (1.13 ± 0.03)表达减少;共培养组 RANKL (0.54 ± 0.03)的蛋白表达则较单独培养组的 RANKL (0.31 ± 0.03)表达增加。结果见表 3。



图 4 小鼠成骨-破骨细胞共培养形态 (x50) **4a,4b.** 共培养第 1 天的成骨细胞和破骨细胞均正常贴壁 **4c,4d.** 共培养第 4 天的成骨细胞和破骨细胞形态正常,成骨细胞分化生长明显,破骨细胞数量稍减少

Fig.4 Morphology osteoblast-osteoclast cell co-culture system(x50) **4a,4b.** Osteoblast and osteoclast on the first day after co-culture showed normal cell attachment **4c,4d.** On the fourth day after co-culture showed formation of osteoblast and osteoclast were normal ,growth and differentiation of osteoblast obviously ,number of osteoclast decreased

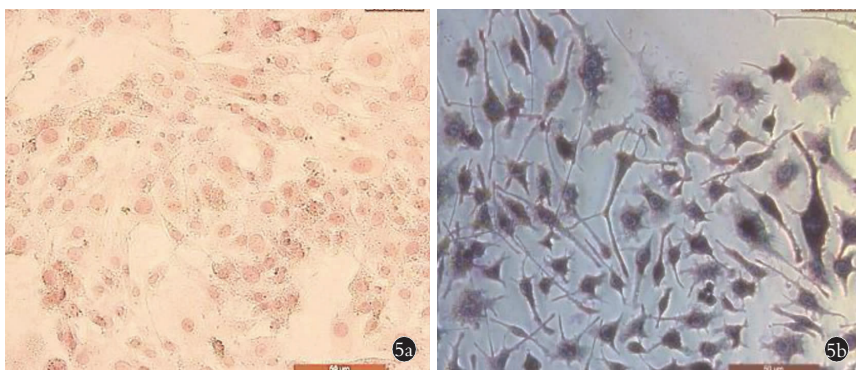


图 5 共培养体系中染色的成骨细胞及破骨细胞 (x200) **5a.** 共培养体系中成骨细胞茜素红染色,存在成骨细胞 **5b.** 破骨细胞 TRAP 染色形态,部细胞有多个细胞核,呈空泡状改变

Fig.5 Osteoblasts and osteoclasts of co-culture system(x200) **5a.** Alizarin Red staining of osteoblasts exist osteoblasts in co-culture system **5b.** Formation of TRAP staining of osteoclasts in co-culture system and some cells had multiple nuclear with vacuolar change

表 2 成骨-破骨共培养体系中细胞的 qRT-PCR 结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 qRT-PCR results of osteoblast-osteoclast cell co-culture system ($\bar{x} \pm s$)

基因	单独培养组	共培养组	P 值	t 值
OPG	1.00±0.08	0.65±0.08	0.003	20.211
RANKL	1.00±0.09	4.12±1.04	0.007	-23.213
ALP	1.01±0.16	0.16±0.01	0.001	75.522
TGF- β 1	1.00±0.10	4.42±0.21	0.000	-42.487
RANK	1.00±0.08	0.63±0.06	0.003	22.946
NF- κ B	1.00±0.09	0.64±0.08	0.007	25.312

表 3 小鼠成骨-破骨共培养体系中细胞的 Western-Blot 结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Western-Blot results of osteoblast-osteoclast cell co-culture system ($\bar{x} \pm s$)

目的蛋白	单独培养组	共培养组	P 值	t 值
OPG	0.84±0.06	0.43±0.05	0.001	30.009
RANKL	0.31±0.03	0.54±0.03	0.001	-11.365
NF- κ B	1.13±0.03	0.59±0.05	0.000	24.325

3 讨论

3.1 建立成骨破骨细胞共育体系的意义

骨质疏松容易引起骨质疏松相关的病理性骨折, 容易造成老年人正常活动受限、增加致残率和死亡率的常见疾病^[3]。健康骨质的生理性功能维持需要破骨细胞和成骨细胞, 并与骨组织内多种基础细胞相互协调来完成。因而, 建立多种细胞共同培养的体系对于后续病理机制实验、药物实验等具有重要意义。目前已有多项实验针对成骨-破骨细胞共培养进行, 比如人的骨髓干细胞及关节软骨细胞共培养^[4]、小鼠颅骨成骨细胞与骨髓巨噬细胞共培养^[5]、肺癌细胞与骨髓干细胞共培养^[6]、动物脂肪细胞及肌肉细胞共培养^[7]等。但关于成骨细胞与破骨细胞共培养的文献有限, 在参考了多数采用共培养方法用于体外骨生理学研究的文献以及目前常用于实验研究的成骨类细胞和破骨类细胞的种类后^[8-10], 本实验采用了小鼠的成骨细胞系细胞 MC3T3-E1 和经 RANKL 破骨诱导后的小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7, 通过 Transwell 小室于体外共培育建立共育体系。该体系更好地模拟了成骨细胞及破骨细胞在体内共同生长、相互影响, 为以后研究骨质疏松的机理提供了一个良好的基础。

3.2 Transwell 小室内建立成骨破骨细胞共育体系

本部分实验采用的 MC3T3-E1 细胞属于成骨细胞前体细胞, 在成骨分化过程中可逐步表现出成骨细胞的形态功能特点; RAW264.7 细胞属于同骨组

织内破骨细胞相同起源的骨髓-巨噬细胞, 也经常于文献中应用, 通过 RANKL 诱导来体外模拟破骨细胞。Transwell 小室是常应用于组织工程学和细胞学的非直接接触性细胞培养膜, 可以较好地模拟体内多种细胞共存培养的条件。本部分共培养实验的科学性体现在: (1) 采用文献常用的具有代表性的成骨细胞 MC3T3-E1 及 RAW264.7 来诱导破骨细胞, 这 2 种细胞具有增值快、细胞表型稳定、易培养检测的特点; (2) Transwell 小室作为一种细胞支架, 通透性较好, 常用于组织学实验, 细胞间多种通信方式得以保存; (3) 由于单独培养的成骨细胞或破骨细胞的体外研究均有部分局限性, 共培养细胞可更好地模拟骨组织内环境来解决这一问题。以上特点说明, 本部分实验能够较好模拟体内成骨-破骨共培养环境。另外, 本部分结果通过 CCK-8 方法显示了共培养体系内成骨细胞活性较好, 通过茜素红染色证实共培养体系中成骨细胞的成骨分化改变明显, 通过 TRAP 染色显示破骨细胞在共培养过程中同样表现明显的破骨细胞改变, 以上结果更加证实了实验设计的科学性。

3.3 共培养体系内成骨破骨细胞活性相互影响

以往研究发现共培养的细胞会影响相互之间的活性^[4,6], 本研究结果显示成骨-破骨细胞共培养可影响成骨细胞与破骨细胞生理活性的关联性。镜下观察发现成骨细胞生长分化要多于破骨细胞, 在共培养体系中成骨细胞的 OPG 基因和蛋白表达, 以及破骨细胞的 NF- κ B 基因和蛋白表达均有下降。同时, 成骨细胞的 ALP 基因, 破骨细胞的 RANK 基因表达亦下降, 但成骨细胞的 TGF- β 1、RANKL 基因表达显示为上升且较单独培养时明显上升。以往研究发现成骨细胞活性增强时, OPG 蛋白表达增多^[11]。以上结果说明了共培养体系中成骨细胞活性增强, 破骨细胞活性减弱, 这一点提示了成骨细胞和破骨细胞间相互通信作用的存在。总的来说, 可能存在以下原因: (1) 共培养整合了成骨细胞和破骨细胞共培养, 虽然成骨细胞总数增多, 破骨细胞总数稍减, 但其各自功能表达受到细胞间通信作用的影响, 并不是所有成骨细胞相关的基因表达均上升; (2) 成骨细胞数量增多后可能存在同种细胞间接性抑制的作用, 可能导致上述结果的发生; (3) MC3T3-E1 细胞和诱导后的 RAW264.7 细胞属于多代复制的细胞系, 其功能调控结构可能与实际中细胞通信有所差别。而 MC3T3-E1 和 RAW264.7 作为体外诱导后的成骨-破骨细胞, 其细胞间通信机制可能与已知的不尽相同。其中的具体机制有待进一步研究发现。

总之, 小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 和小鼠破骨细

胞可在 Transwell 小室内建立共培养体系,共培养体系中成骨细胞及破骨细胞活性相互影响,表现为成骨细胞活性增强,破骨细胞活性减弱。

参考文献

- [1] Melton LJ 3rd. The prevalence of osteoporosis: gender and racial comparison[J]. Calcif Tissue Int, 2001, 69(4): 179-181.
- [2] Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(24): 11924-11928.
- [3] Baek SW, Kim C, Chang H. The relationship between the spinopelvic balance and the incidence of adjacent vertebral fractures following percutaneous vertebroplasty[J]. Osteoporos Int, 2015, 26(5): 1507-1513.
- [4] Morita Y, Yamamoto S, Ju Y. Development of a new co-culture system, the "separable-close co-culture system," to enhance stem-cell-to-chondrocyte differentiation[J]. Biotechnol Lett, 2015, 37(9): 1911-1918.
- [5] Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development[J]. Genes Dev, 1999, 13(18): 2412-2424.
- [6] Zhang YM, Zhang ZM, Guan QL, et al. Co-culture with lung cancer A549 cells promotes the proliferation and migration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(4): 2983-2991.
- [7] Pandurangan M, Hwang I. Application of cell co-culture system to study fat and muscle cells[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(17): 7359-7364.
- [8] Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, et al. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease[J]. Eur J Clin Invest, 2012, 42(12): 1332-1341.
- [9] Indran IR, Liang RL, Min TE, Yong EL. Preclinical studies and clinical evaluation of compounds from the genus Epimedium for osteoporosis and bone health[J]. Pharmacol Ther, 2016, 162: 188-205.
- [10] Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, et al. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction[J]. Cell Metab, 2007, 5(6): 464-475.
- [11] 郭海玲, 赵咏芳, 王翔, 等. 淫羊藿苷对人成骨细胞增殖及 OPG 蛋白表达的实验研究[J]. 中国骨伤, 2011, 24(7): 585-588.

(收稿日期: 2017-10-25 本文编辑: 李宜)

·读者·作者·编者·

本刊关于一稿两投和一稿两用等现象的处理声明

文稿的一稿两投、一稿两用、抄袭、假署名、弄虚作假等现象属于科技领域的不正之风,我刊历来对此加以谴责和制止。为防止类似现象的发生,我刊一直严把投稿时的审核关,要求每篇文章必须经作者单位主管学术的机构审核,附单位推荐信(并注明资料属实、无一稿两投等事项)。希望引起广大作者的重视。为维护我刊的声誉和广大读者的利益,凡核实属于一稿两投和一稿两用等现象者,我刊将择期在杂志上提出批评,刊出其作者姓名和单位,并对该文的第一作者所撰写的一切文稿 2 年内拒绝在本刊发表,同时通知相关杂志。欢迎广大读者监督。

《中国骨伤》杂志社