

· 基础研究 ·

破骨细胞的传代、冻存与复苏

俞索静, 吴承亮, 金红婷, 胡雪琴, 肖鲁伟, 童培建
(浙江中医药大学 浙江省骨伤研究所, 浙江 杭州 310053)

【摘要】 目的: 探讨破骨细胞传代、冻存与复苏的可行性, 为开展破骨细胞的相关研究提供新的技术手段与方法。方法: 破骨细胞的传代: 取成年 SPF 级雄性 SD 大鼠 1 只, 体重 250 g, 腹主动脉采血, 分离周围血单个核细胞, 经 RANKL、M-CSF 诱导培养 2 周, 形成多核破骨细胞后, 采用胰蛋白酶消化、震荡、吹打法, 制成细胞悬液, 离心后用含 RANKL、M-CSF 的 α -MEM 完全培养基重悬, 接种至 6 孔培养板与直径 35 mm 培养皿中。破骨细胞的冻存: 取上述细胞悬液, 离心后用 DMSO、FBS、 α -MEM (1:2:7) 冻存液, 按常规程序将细胞冻存于 -196°C 液氮中。破骨细胞的复苏: 从液氮中取出冻存的破骨细胞, 37°C 水浴中快速解冻, 加 PBS 离心清洗后, 用含 RANKL、M-CSF 的 α -MEM 完全培养基重悬, 接种至 6 孔细胞培养板与直径 35 mm 培养皿中。同时对传代与复苏培养中破骨细胞的消化与贴壁过程, 采用倒置相差显微镜与活细胞工作站进行观察记录与动态成像, 3 d 后作 TRAP 染色。结果: 破骨细胞经胰蛋白酶消化、震荡、吹打后, 细胞基本上脱壁、悬浮, 可以制成细胞悬液, 用于传代与冻存。破骨细胞传代培养后, 大多在 2 h 内开始贴壁, 贴壁后胞内细胞核清晰可见。经液氮冻存的破骨细胞, 复苏培养后 2~3 h 开始贴壁, 胞质展开, 可见多个细胞核。传代与冻存复苏培养后的破骨细胞, TRAP 染色呈阳性反应。结论: 破骨细胞虽然贴壁比较牢固, 但经适当的消化、震荡及吹打, 多数可脱壁悬浮, 并能实现传代培养, 同时还可采用常规方法进行细胞冻存与复苏培养, 经传代与冻存的破骨细胞仍可保持破骨细胞的活性。破骨细胞的传代与冻存, 可以按实验计划与用量需求, 随时进行分量传代与复苏培养, 为开展破骨细胞的相关研究提供新的技术手段与方法。

【关键词】 破骨细胞; 培养; 传代; 冻存; 复苏

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2017.05.014

Subculture, cryopreservation and recovery of osteoclasts YU Suo-jing, WU Cheng-liang, JIN Hong-ting, HU Xue-qin, XIAO Lu-wei, and TONG Pei-jian. Institute of Orthopaedics and Traumatology, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT **Objective:** To explore the feasibility of passage, cryopreservation, and recovery of osteoclasts in order to develop new techniques facilitating osteoclast research. **Methods:** Passage of osteoclasts: adult male SD rat (SPF grade, weight of 250 g) was sacrificed and the abdominal aorta was exposed for blood draw. Monocytes isolated from peripheral circulation was treated with RANKL and M-CSF for 2 weeks. After formation of osteoclasts, they were trypsinized with pipetting, centrifuged, re-suspended with α -MEM containing RANKL and M-CSF, and cultured in 6 well-plates and 35 mm culture dishes. Freezing of osteoclasts: trypsinized osteoclasts were centrifuged and resuspended with DMSO, FBS, α -MEM (1:2:7), and were stored in liquid nitrogen (-196°C). Recovery of osteoclasts: frozen osteoclasts were taken out of liquid nitrogen tank and thawed quickly at 37°C in water bath. After wash with PBS, the cells were resuspended with α -MEM containing RANKL and M-CSF, and were cultured in 6 well dishes and 35 mm culture dishes. Meanwhile, cells were checked with inverted phase contrast microscope and observed in the live cell station for real time imaging. TRAP staining was performed 3 days after plating. **Results:** Trypsinization together with pipetting and shaking can detach the adherent osteoclasts, and the resuspended cells can be used for passage and storage in liquid nitrogen. The passaged cells became fully attached to the culture dishes in 2 hours, and the multinucleated feature could be clearly seen. The osteoclasts recovered from liquid nitrogen could completely spread out for 2 to 3 hours so that the multinucleated cells were clearly seen. These cells were still TRAP positive. **Conclusion:** Although osteoclasts strongly adhere to the bottom of culture dishes, a large majority of the osteoclasts can be detached after appropriate digestion with trypsin, pipetting and shaking. These cells can be used for passage and cryopreservation. After recovering from liquid nitrogen, these cells still preserve the viability and the feature of osteoclasts. The results provide a new and powerful tool for future study of osteoclast biology.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (编号: 81373669); 浙江省科技厅重大专项 (编号: 2014C03035)

Fund program: The National Natural Science Foundation of China (No.81373669)

通讯作者: 童培建 E-mail: tongpeijian@163.com

Corresponding author: TONG Pei-jian E-mail: tongpeijian@163.com

KEYWORDS Osteoclast; Culture techniques; Subculture; Cryopreservation; Recovery

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2017, 30(5): 463-469 www.zggszz.com

破骨细胞(Osteoclast, OC)是骨吸收的主要功能细胞,在骨发育、生长、修复、重建中具有重要的作用。破骨细胞起源于血系单核-巨噬细胞系统,是一种特殊的终末分化细胞,它可由其单核前体细胞通过多种方式融合形成巨大的多核细胞^[1-3]。破骨细胞的分离培养始于 20 世纪 80 年代,目前破骨细胞的培养方法主要有:骨髓机械分离法,骨髓细胞诱导法,脾干细胞诱导法,血液单核细胞诱导法,小鼠 RAW 264.7 细胞系诱导法及骨巨细胞瘤分离法^[4-12]。由于功能状态下的破骨细胞贴附性较强,一直以来人们认为破骨细胞不能传代,所以每次实验及各实验组都只能进行一次性原代培养,并且尚未见关于破骨细胞传代及冻存与复苏培养的研究报道。为了建立破骨细胞研究的新技术和新方法,探索破骨细胞传代与冻存的可能性,笔者对此进行了实验研究,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年 SPF 级雄性 SD 大鼠 1 只,体重 250 g,由浙江中医药大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

重组大鼠可溶性核因子 κ B 受体活化因子配体(recombinant rat soluble RANK ligand, RANKL)(美国 PeproTech 公司),重组大鼠巨噬细胞集落刺激因子(recombinant rat M-CSF)(美国 PeproTech 公司), α -MEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)(美国 ScienCell),大鼠外周血淋巴细胞分离液(北京索莱宝科技有限公司 Solarbio),抗酒石酸酸性磷酸酶染色试剂盒(Acid Phosphatase, Leukocyte Kit)(美国 Sigma 387A)。

1.3 主要仪器设备

IX71 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),IX81 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),活细胞成像系统(Live cell imaging system)(日本 Olympus 公司),DP72 CCD 成像系统(日本 Olympus 公司),EM-CCD Rolera(美国 QImaging 公司),Retiga 4000R CCD(美国 QImaging 公司),BCM-1000A 生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司 AIRTECH),Forma Series II CO₂ 培养箱(美国 Thermo Scientific 公司),MIU-IBC-IF 载物台 CO₂ 培养系统(Thermo Plate)(日本 TOKAIHIT 公司)。

1.4 主要软件

InVivo 3.2(美国 Media Cybernetics 公司),Im-

age-Pro Plus 6.2(美国 Media Cybernetics 公司),QCapture 6.0(美国 Media Cybernetics 公司),Adobe Premiere 6.0(美国 Adobe 公司),DP2-BSW(日本 Olympus 公司)。

1.5 实验方法及步骤

1.5.1 外周血单个核细胞分离 (1)标本采集:取 SPF 成年 SD 大鼠 1 只,3%戊巴比妥钠,按动物体重 0.15 ml/100 g,腹腔注射麻醉。无菌操作下腹主动脉采血 6 ml,注入肝素抗凝管中。(2)单个核细胞分离:采用密度梯度离心法,向采集的血标本内加入等量的 PBS,取 4 支 15 ml 离心管,分别加入大鼠淋巴细胞分离液各 3 ml,再缓缓向各离心管内加入上述含 PBS 血样各 3 ml,然后以 2 000 r/min,水平离心 20 min,取出后在絮状层小心吸取单个核细胞,分别收集到 2 支离心管中,PBS 清洗 2 次,备作重悬培养。

1.5.2 破骨细胞的诱导培养 将分离纯化的大鼠周围血单个核细胞,用含 10%FBS、50 ng/ml RANKL、20 ng/ml M-CSF、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 α -MEM 培养液重悬,调整细胞密度为 1×10^5 个/ml。再将配制好的细胞悬液接种到 6 孔培养板与直径 35 mm 培养皿中。直径 35 mm 培养皿用于活细胞工作站动态跟踪成像,6 孔培养板置于 CO₂ 培养箱内,在 37 °C、5%CO₂、饱和湿度下连续培养,用上述含 RANKL、M-CSF 的 α -MEM 培养液换液,每 3 日 1 次。同时对整个培养过程作相差显微镜观察与活细胞成像,培养 14 d 作抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色。

1.5.3 破骨细胞的传代 大鼠周围血单个核细胞经 RANKL、M-CSF 诱导培养 2 周,形成大量贴壁的多核破骨细胞后,从培养箱中取出,将培养液吸净,加入 37 °C 预温的 D-Hank's 液,冲洗 2 次,再滴加足量的 0.25%胰蛋白酶液,使其覆盖整个底面,置于 37 °C 培养箱中消化 5 min 后取出,震荡 1 min 左右,在倒置相差显微镜下观察,当大部分细胞收缩悬起后,加入 α -MEM 完全培养液终止消化,用吸管反复抽吸吹打,将细胞混匀后移入 15 ml 离心管,2 000 r/min,离心 5 min,去上清,用含 RANKL、M-CSF 的 α -MEM 完全培养液重悬细胞,调整浓度至 1×10^5 个/ml,接种细胞至 6 孔培养板与直径 35 mm 培养皿中。同时对消化与贴壁过程作活细胞成像观察,3 d 后作 TRAP 染色。

1.5.4 破骨细胞的冻存 按破骨细胞传代方法,将诱导培养的破骨细胞制成细胞悬液,2 000 r/min,离

心 5 min, 去上清, 用 DMSO、FBS、 α -MEM 按 1:2:7 比例配制的冻存液, 重悬细胞, 调整细胞浓度至 5×10^6 个/ml, 加入冻存管, 每支 1.5 ml, 用冻存罐在温度为 -80°C 冰箱中放置 24 h, 再移至 -196°C 液氮中冻存。

1.5.5 破骨细胞的复苏 从液氮中取出冻存的破骨细胞, 迅速在 37°C 水浴中震荡融解, 将融解的细胞悬液加入 15 ml 离心管中, 再加 6 ml α -MEM 完全培养液, 混匀, 2 000 r/min, 离心 5 min, 去上清, 用含 RANKL、M-CSF 的 α -MEM 完全培养液, 按 1×10^5 个/ml 的细胞浓度重悬后, 分别接种到 6 孔培养板与直径 35 mm 培养皿中。同时对接种后的贴壁过程作活细胞成像观察, 3 d 后作 TRAP 染色。

1.6 观察项目与方法

1.6.1 活细胞成像观察 (1)破骨细胞诱导培养的活细胞成像观察:取直径 35 mm 培养皿, 将其置于活细胞工作站倒置显微镜的培养室中, 在相差观察模式、20 倍物镜下, 以 1 f/6 s 的采集速度, 对整个培养过程作序列图像捕获, 进行单帧图像分析与缩时视频动态观察。(2)破骨细胞传代培养的活细胞成像观察:取直径 35 mm 培养皿培养的破骨细胞, 将其置于活细胞工作站倒置显微镜的培养室中, 在相差观察模式、20 倍物镜下, 选择贴壁良好, 胞质充分展开, 细胞核清晰可见的多核破骨细胞, 调整到视野中心, 然后将培养皿中的培养液吸净, 再用 37°C 预温的 D-hank's 液缓缓冲洗 2 遍, 吸干。以 1 f/s 的采集速度, 开始序列图像捕获, 同时向培养皿内加入 1 ml 0.25% 胰蛋白酶溶液, 记录破骨细胞在胰蛋白酶作用下的整个消化过程, 约 5 min。当细胞胞体收缩, 呈饱满圆亮、半悬浮状态时, 加入 2 ml α -MEM 完全培养液终止消化, 用吸管吹吸, 使其形成均匀的细胞悬液, 再移入 2 ml 灭菌 EP 管, 2 000 r/min 离心 3 min, 去上清, 用含 RANKL、M-CSF 的 α -MEM 完全培养

液重悬细胞, 接种到另一个直径 35 mm 培养皿, 放回活细胞工作站的培养室中, 再按上述方法选择圆亮饱满、体积较大的多核破骨细胞, 置于观察视野中心, 以 1f/6s 采集速度进行序列图像采集, 观察破骨细胞传代后的整个贴壁过程。(3)破骨细胞复苏培养的活细胞成像观察:破骨细胞复苏培养后, 立即取直径 35 mm 培养皿培养的破骨细胞置于活细胞工作站的培养室中, 按上述破骨细胞传代后的活细胞成像观察方法, 进行序列图像采集, 观察破骨细胞复苏培养后的整个贴壁过程。

1.6.2 TRAP 染色 取培养细胞, 吸净孔内培养液, 用 37°C 预温的 PBS 冲洗 2 次, 再用 2.5% 戊二醛常温下固定 2 min, 去离子水漂洗 3 次。取坚固石榴红 GBC 溶液 0.1 ml 和亚硝酸盐溶液 0.1 ml, 轻轻混合 30 s, 静止 2 min。将上液加入到 9 ml 预热至 37°C 的去离子水中, 再依次加入 0.1 ml 萘酚 AS-BI 磷酸盐溶液、0.4 ml 醋酸盐溶液、0.2 ml 酒石酸盐溶液, 制得染色液。将染色液加入培养孔内, 37°C 孵育, 注意避光。15 min 后观察染色效果, 呈最佳效果时即终止染色, 取出后去离子水冲洗, 晾干, 倒置显微镜下观察, DP-72 数字成像系统采集图像。

2 结果

2.1 破骨细胞诱导培养的活细胞成像观察与 TRAP 染色

大鼠周围血单个核细胞在 RANKL、M-CSF 诱导培养下, 前 3 d 活细胞成像观察外形呈小圆形或椭圆形颗粒状, 部分细胞开始贴壁。诱导培养 4~7 d, 可见一些细胞体积变大, 颜色变深, 少量单核细胞开始融合, 镜下可见多核细胞形成。其后 2~3 周, 多核细胞数量不断增加, 体积变大, 外观呈圆形、梭形、扇形、椭圆形及不规则突起状。多核细胞可不断融合周围的单核细胞或发生多核细胞之间的反复融合, 形成巨大的破骨细胞, 可见许多细胞核位于胞体内(图 1)。

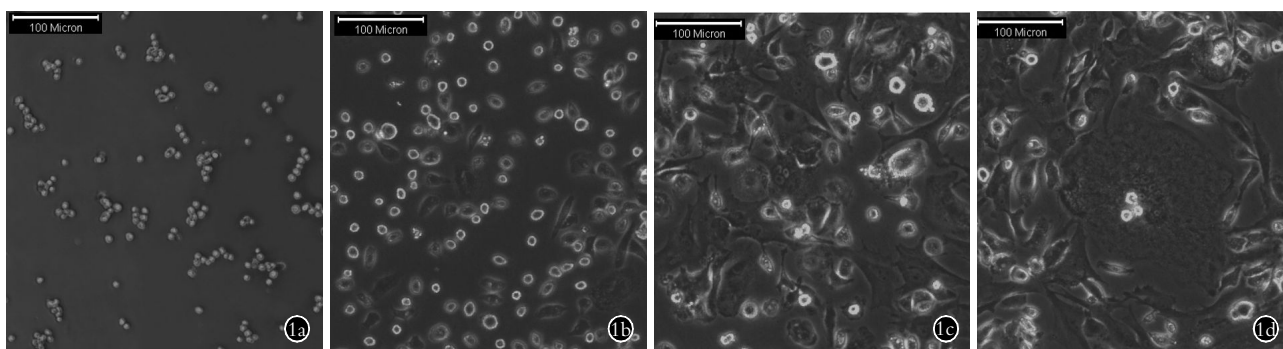


图 1 大鼠周围血单个核细胞在 RANKL、M-CSF 诱导下的活细胞成像观察(相差模式, 物镜 $\times 20$) 1a, 1b, 1c, 1d. 分别为培养 1、3、7、14 d 时的观察结果

Fig.1 Live cell imaging (phase contrast model, object lens $\times 20$) showed the formation of osteoclasts from monocytes after stimulation with RANKL and M-CSF 1a, 1b, 1c, 1d. The images at 1, 3, 7, 14 days after culture, respectively

诱导培养 14 d, TRAP 染色呈阳性反应(图 2)。

2.2 破骨细胞传代培养的活细胞成像观察与 TRAP 染色

破骨细胞传代时, 其中大多数未融合的单核细胞、破骨前体细胞及 1~2 个核的破骨细胞对胰蛋白酶的消化比较敏感, 脱壁悬浮较快。体积较大、核数较多的破骨细胞对胰蛋白酶消化不太敏感, 经 37 °C 孵育 5 min 及震荡后多数能够脱壁, 有的经吸管吹打后才能脱离, 但仍有少量贴壁较牢的细胞残留。脱落、悬浮的破骨细胞体积较大, 外观饱满, 镜下呈圆形或椭圆形油滴样的球状体。将消化脱壁的混合细

胞制成细胞悬液后, 接种到培养板与培养皿中, 多数细胞在 2 h 内开始贴壁, 6 h 达到完全贴壁状态, 其形态变化与传代前相似。传代后的细胞在 RANKL、M-CSF 诱导下, 可继续形成新的多核破骨细胞。

破骨细胞在胰蛋白酶作用下脱壁过程的活细胞成像显示, 加入胰蛋白酶 1 min 后细胞突起开始内收, 2 min 后整个胞体回缩, 并逐渐隆起变圆, 3 min 后呈半脱壁状态(图 3)。此时若进行震荡与吹打, 即可脱壁游离。

破骨细胞传代培养后再贴壁过程的活细胞成像显示, 接种后 30 min 细胞渐渐下沉, 30 min~1 h 开始

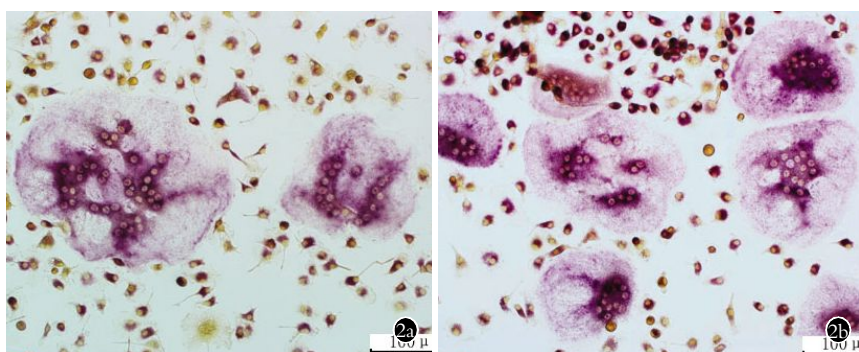


图 2 大鼠周围血单个核细胞经 RANKL、M-CSF 诱导培养 14 d, 图片显示多核破骨细胞 TRAP 染色呈阳性反应(倒置显微镜, 物镜×20, 数字成像)

Fig.2 Inverted microscopic observation showed the monocytes from peripheral blood became multinucleated osteoclasts with positive TRAP staining after stimulation with RANKL and M-CSF for 14 days (object lens ×20, digital imaging)

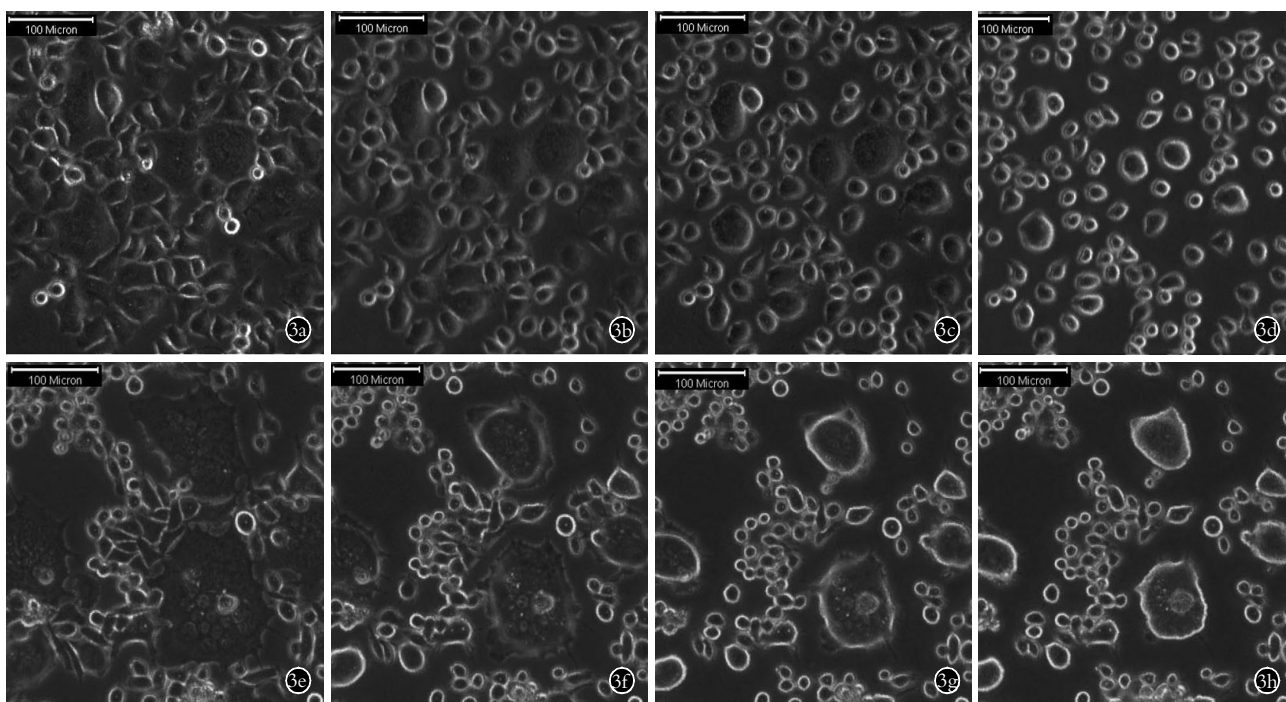


图 3 破骨细胞消化过程的活细胞成像观察(相差模式, 物镜×20) 3a, 3b, 3c, 3d. 分别为 30 s、1 min、2 min、3 min 时点活细胞成像序列图, 显示经诱导培养的破骨与破骨前体细胞在胰蛋白酶作用下胞体收缩和去贴壁过程 3e, 3f, 3g, 3h. 分别为 30 s、1 min、2 min、3 min 时点另一视野活细胞成像序列图, 显示巨大破骨细胞在胰蛋白酶作用下胞体收缩和去贴壁过程

Fig.3 Live cell image sequences showed the digestion process of the osteoclasts (phase contrast model, object lens×20) 3a, 3b, 3c, 3d. The live cell image sequences in 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, respectively after trypsin digestion showed that induced osteoclasts and their progenitors were shank and detached 3e, 3f, 3g, 3h. In 30 s, 1 min, 2 min, 3 min, respectively after trypsin digestion, the another visual field showed the processes of cell contraction and detachment of the giant multinucleated osteoclasts

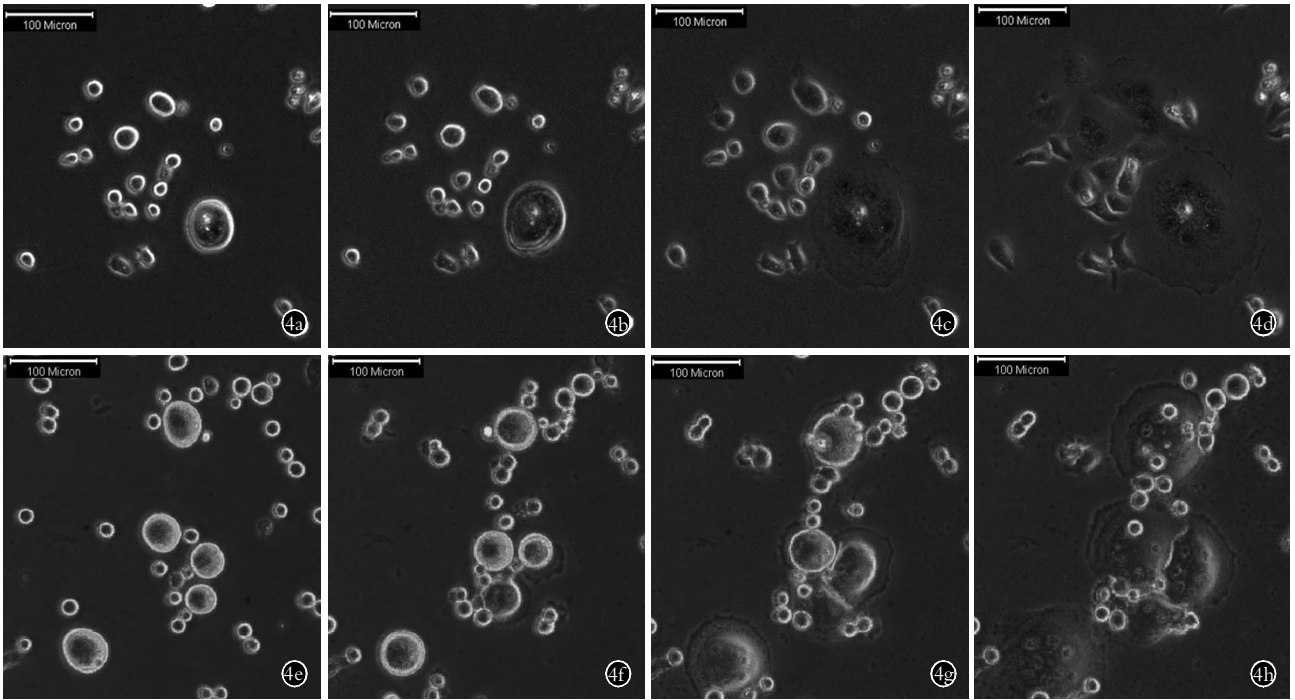


图 4 破骨细胞传代培养的活细胞成像观察(相差模式,物镜×20),活细胞成像序列图显示破骨与破骨前体细胞传代培养后的再贴壁生长过程 4a,4b,4c,4d 与 4e,4f,4g,4h 分别为 2 个观察视野在 10 min、30 min、1 h、2h 的序列成像

Fig.4 Live cell image sequences showed the re-attaching process of the osteoclasts and their progenitors after passage (phase contrast model, object lens ×20) 4a, 4b, 4c, 4d and 4e, 4f, 4g, 4h were the images respectively at 10, 30, 60, 120 min after passage by two visual fields

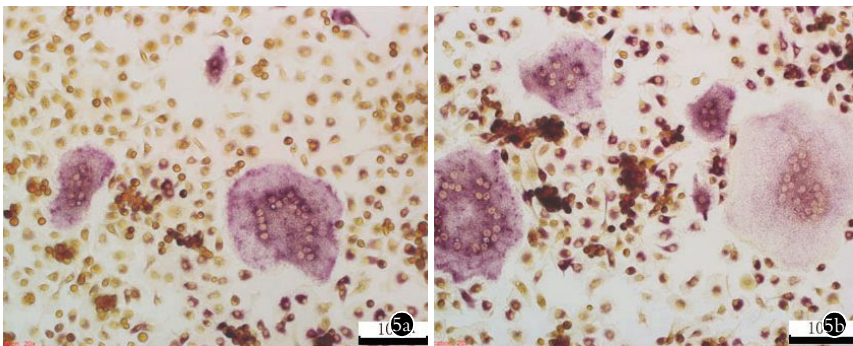


图 5 大鼠破骨细胞传代培养 3 d, 图片显示多核破骨细胞 TRAP 染色呈阳性反应(倒置显微镜,物镜×20,数字成像)

Fig.5 Three days after passage, the multinucleated cells were TRAP positive under inverted microscopy (object lens×20, digital imaging)

贴壁, 1 h 后逐渐变得平坦胞体呈圆形摊开, 2 h 后胞体向四周扩展, 胞内细胞核清晰可见, 其皱褶缘不断向外围作伸缩运动, 形态呈动态改变(图 4)。传代后 3 d, TRAP 染色呈阳性反应(图 5)。

2.3 破骨细胞复苏培养的活细胞成像观察与 TRAP 染色

破骨细胞复苏培养与传代培养相似, 贴壁速度较传代培养慢, 接种后大多在 2~3 h 开始贴壁, 12 h 达到完全贴壁, 其形态与冻存前相似, 可见体积较大的多核破骨细胞, 初次换液时可见少量悬浮的死亡细胞, 经换液后可被清除。

破骨细胞复苏培养后再贴壁过程的活细胞成像所见与破骨细胞传代后的再贴壁过程类似(图 6)。接种 3 d, TRAP 染色呈阳性反应(图 7), 复苏培养的

破骨细胞, 仍可保持其原有的破骨细胞活性, 可在 RANKL、M-CSF 诱导下继续作破骨细胞培养研究。

3 讨论

破骨细胞是体内具有骨吸收功能的细胞, 对骨的生理与病理代谢有着重要的作用, 建立破骨细胞的分离与培养方法, 有助于开展骨质疏松及其他骨代谢异常疾病的防治研究, 揭示骨吸收与骨破坏相关疾病的发病机制。

细胞传代是指将细胞从一个培养容器转移或移植到另一个培养容器中进行再培养的过程, 是细胞生物学研究中培养细胞的常规方法。破骨细胞由其前体细胞融合而成, 具有较强的贴附性, 且不能增殖, 其生物学特点一直以来被认为不能传代培养, 只能进行原代分离培养或原代诱导培养^[4]。破骨细胞

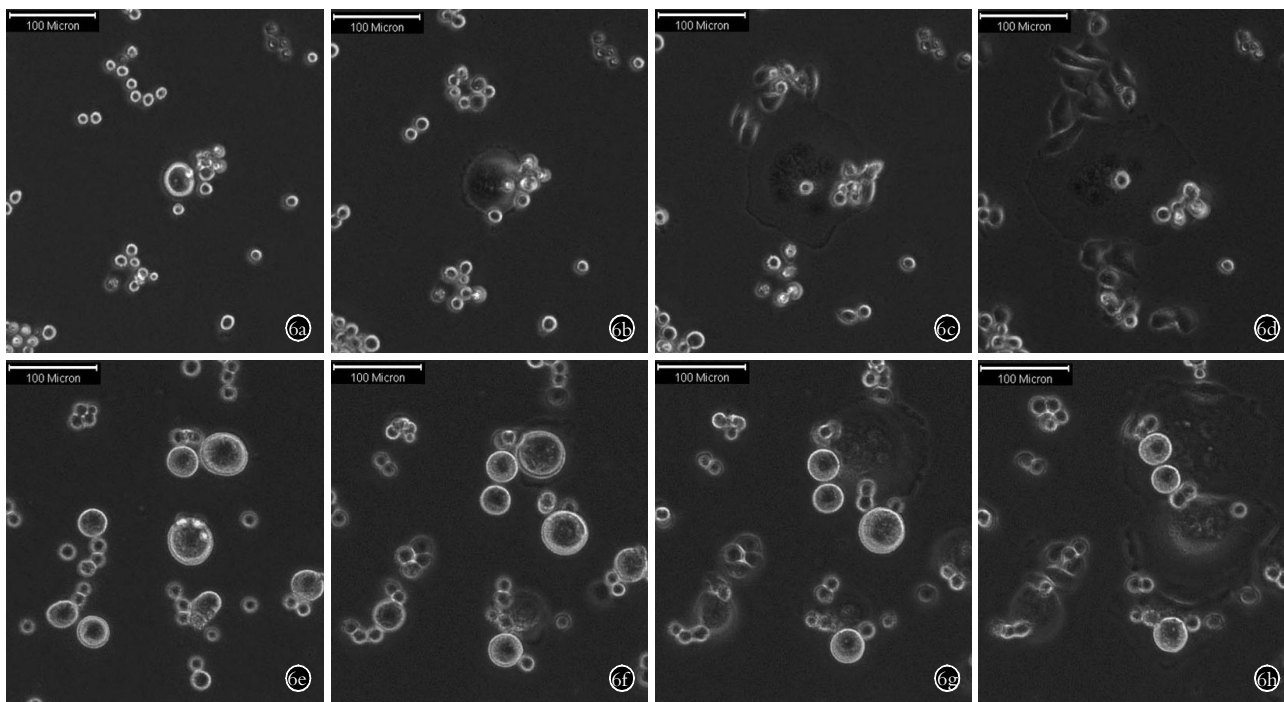


图 6 破骨细胞复苏培养的活细胞成像观察 (相差模式, 物镜×20), 活细胞成像序列图显示破骨与破骨前体细胞复苏培养后的再贴壁过程 6a, 6b, 6c, 6d 与 6e, 6f, 6g, 6h 分别为 2 个观察视野在 10 min, 30 min, 1 h, 2 h 的序列成像。

Fig.6 Live cell image sequences showed the re-attaching process of the recovered osteoclasts and their progenitors (phase contrast model, object lens×20) 6a, 6b, 6c, 6d and 6e, 6f, 6g, 6h were images at 30, 60, 120, 180 min after recovery by two visual fields

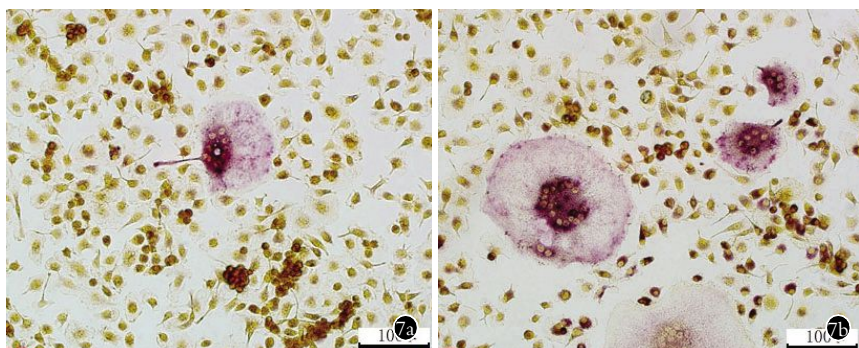


图 7 大鼠破骨细胞复苏培养 3 d, 图片显示多核破骨细胞 TRAP 染色呈阳性反应 (倒置显微镜, 物镜×20, 数字成像)。

Fig.7 Three days after the recovery from liquid nitrogen, multinucleated cells were TRAP positive under inverted microscopy (object lens×20, digital imaging).

作为终末分化细胞,在体内数量较少,原代分离培养不易获得足够的细胞用于分子细胞生物学实验。同时由于缺乏破骨细胞样细胞株,其研究仅限于破骨细胞的原代实验。因此探索一种适合破骨细胞传代与冻存的方法,对于开展破骨细胞的相关研究具有重要的意义。

为了建立一种破骨细胞研究的新技术与新方法,笔者根据实验观察,提出破骨细胞具有传代培养与冻存复苏培养的可能性,并对此进行了实验验证,结果表明破骨细胞的传代与冻存具有其可行性及应用价值。

有研究报道认为,破骨细胞的粘附特性对其存活与功能发挥至关重要,笔者先前的研究表明,多核破骨细胞是由单核细胞、多核细胞以及单核与多核

细胞之间在贴壁状态下反复融合而成,其贴壁比较牢固,不易消化脱落^[13-14]。破骨细胞的形成与功能活动表现出对贴壁的高度依赖性,其强贴附特性导致较难被消化分离,这是破骨细胞不易传代培养的主要原因。本实验观察表明,尽管经过较长时间消化、震荡,仍有一些细胞不能完全脱壁,但通过 37℃ 孵育,延长消化时间,再加上震荡、吹打,可使绝大部分破骨细胞消化脱落下来,从而使传代与冻存得以可能。

一直来人们在研究破骨细胞中,采取原代分离培养或诱导培养,这些方法培养的破骨细胞其组间差异较大,细胞同质性差,量化不准确,细胞数量难以控制,造成组间、批间、次间实验结果缺乏稳定性,影响结果的可比性。通过传代的方法,可以采用同一批诱导分化的破骨细胞,进行分组、分批、分次实验,

尽量保证细胞来源的一致性、均质性,从而提高组间、批间、次间对照研究的可比性。

由于破骨细胞的前期诱导分化,可因培养环境的差异,其数量、分化程度、分化速度都会有所不同。而采取集中诱导分化,形成足量的破骨细胞后,再按实验需要通过传代或复苏培养的方法,分别接种到多孔培养板或多个培养皿中进行实验,能够更好地保持组间、批间、次间细胞在数量与分化特征上的一致性。

应用破骨细胞传代与冻存技术,可根据实验计划与用量,随时进行分量传代与复苏培养,以满足规划性、大批量、阶段性实验的需求,保证实验细胞的一致性与稳定性。同时也为破骨细胞的相关研究,提供了商品化来源的可能性。因此破骨细胞的传代与冻存技术,在破骨细胞相关领域的研究中具有一定的应用价值。

本实验研究证明了破骨细胞可以传代与冻存复苏培养,但是鉴于细胞在传代与冻存中会发生丢失、损伤及死亡,尤其对于破骨细胞,因其贴壁性强,经较长时间的消化及震荡、吹打,会导致一部分细胞发生损伤与死亡,特别是体积较大的破骨细胞。从实验观察来看,传代与复苏培养后,以 2~4 个核的破骨细胞较为多见。另外破骨细胞在传代的同时也伴随着大量单核细胞与破骨前体细胞的传代,这些细胞具有分裂增殖能力,可被继续诱导形成新的破骨细胞。本实验尚未就传代与冻存复苏培养前后破骨细胞的数量进行分析,如何通过方法学上的改进来提高破骨细胞的传代效率和存活率,仍有待进一步的深入探讨与研究。

参考文献

- [1] Marino S, Logan JG, Mellis D, et al. Generation and culture of osteoclasts[J]. Bonekey Rep, 2014, 10(3): 570.
- [2] 宋才渊, 彭冰, 沈佳怡, 等. 破骨细胞分化调节机制的研究进展[J]. 中国骨伤, 2015, 28(6): 580-584.
SONG CY, PENG B, SHEN JY, et al. Research on regulation mechanism of osteoclast differentiation[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(6): 580-584. Chinese with abstract in English.
- [3] 云帆, 王瑞, 赵建宁. 破骨细胞的骨吸收机制[J]. 中国骨伤, 2014, 27(6): 529-532.
TI YF, WANG R, ZHAO JN. Mechanism of osteoclast in bone resorption[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2014, 27(6): 529-532. Chinese with abstract in English.
- [4] 王瀚, 曹新生, 张舒. 破骨细胞体外培养技术[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(11): 1284-1289.
WANG H, CAO XS, ZHANG S. The technique of osteoclast culture in vitro[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2014, 20(11): 1284-1289. Chinese.
- [5] Udagawa N, Yamashita T, Kobayashi Y, et al. Identification of osteoclasts in culture[J]. Methods Mol Biol, 2011, 690: 273-284.
- [6] Agrawal A, Gallagher JA, Gartland A. Human osteoclast culture and phenotypic characterization[J]. Methods Mol Biol, 2012, 806: 357-375.
- [7] Shafieyan Y, Tiedemann K, Goulet A. Monocyte proliferation and differentiation to osteoclasts is affected by density of collagen covalently bound to a poly (dimethyl siloxane) culture surface[J]. J Biomed Mater Res A, 2012, 100(6): 1573-1581.
- [8] 潘淳, 何波, 杨雪婷, 等. 诱导法与机械法体外培养破骨细胞的比较研究[J]. 昆明医科大学学报, 2012, 33(9): 1-7.
PAN C, HE B, YANG XT, et al. Comparison of the culturing methods of osteoclasts between induced and mechanical procedure[J]. Kun Ming Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2012, 33(9): 1-7. Chinese.
- [9] 董伟, 冯晓洁, 戚孟春, 等. 体外应用不同方法培养破骨细胞的实验对比研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2013, 33(4): 475-479.
DONG W, FENG XJ, QI MC, et al. The different methods of osteoclast culture in vitro[J]. Nan Jing Yi Ke Da Xue Xue Bao (Zi Ran Ke Xue Ban), 2013, 33(4): 475-479. Chinese.
- [10] 陈婧, 马纪, 孙奋勇. 骨髓贴壁细胞向破骨细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(7): 985-990.
CHEN J, MA J, SUN FY. Osteoclast differentiation of bone marrow adherent cells[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu, 2014, 18(7): 985-990. Chinese.
- [11] 周龙, 陈曦, 罗宗平, 等. C57BL/6 小鼠骨髓单核细胞分离、培养、纯化及向破骨细胞的分化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(6): 940-944.
ZHOU L, CHEN X, LUO ZP, et al. C57BL/6 mouse bone marrow monocytes: isolation, cultivation, purification and differentiation into osteoclasts[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu, 2015, 19(6): 940-944. Chinese.
- [12] 许丹, 律颖, 朱小语, 等. 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7)的培养及其在诱导破骨细胞中的应用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(10): 1355-1360.
XU D, LYU Y, ZHU XY, et al. Culture skill of RAW264.7 and its application in osteoclastic differentiation[J]. Zhongguo Gu Zhi Shu Song Za Zhi, 2016, 22(10): 1355-1360. Chinese.
- [13] 俞索静, 童培建, 吴承亮, 等. 破骨细胞形成过程中的融合与分裂[J]. 中华骨科杂志, 2013, 33(1): 82-88.
YU SJ, TONG PJ, WU CL, et al. The fusion and division during osteoclasts formation[J]. Zhonghua Gu Ke Za Zhi, 2013, 33(1): 82-88. Chinese.
- [14] 俞索静, 肖鲁伟, 吴承亮, 等. 破骨细胞血系起源的活细胞成像观察[J]. 中国骨伤, 2012, 25(4): 50-57.
YU SJ, XIAO LW, WU CL, et al. Imaging observation of live cells originating from osteoclasts of the blood system[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(4): 50-57. Chinese with abstract in English.

(收稿日期: 2017-02-07 本文编辑: 王宏)