

## · 基础研究 ·

# 不同胶原酶消化对原代成骨细胞获得率及活性的比较

李玲慧, 丁道芳, 杜国庆, 王辉昊, 詹红生

(上海中医药大学附属曙光医院石氏伤科医学中心, 上海 201203)

**【摘要】目的:**比较 I、II 型胶原酶对新生大鼠颅盖骨的消化效果, 选择效率较高的胶原酶, 为日后从细胞水平研究中药物治疗骨质疏松症的机制提供大量种子细胞。**方法:**新生 24 h SD 大鼠 10 只, 雌雄不限, 脱颈处死后取出颅盖骨, 剪成约 1 mm×1 mm 的碎片, 采用胰酶预消化 15 min 后将骨片按重量平分两份, 随机分为 I 型组、II 型组, 分别用 0.1% I 型、0.1% II 型胶原酶 37℃ 消化 1 h×2 次, 所得细胞置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37℃ 恒温培养。原代细胞分别于培养 0 h、72 h 时采用血球计数板进行计数, 第 2 代细胞于培养 48 h 后采用 NBT/BCIP 染色液进行染色, 并通过对硝基苯磷酸盐法(PNPP)进行 ALP 定量检测。**结果:**镜下观察所获得的细胞形态不规则, 细胞计数显示 I 型组细胞数量大于 II 型组; ALP 染色为阳性; PNPP 法测得两组吸光度均值分别为 0.427 和 0.262, I 型组显著高于 II 型组, 差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论:**两种胶原酶均适用于成骨细胞的原代消化, 但采用 I 型胶原酶获得的细胞数量更多、活性更好, 可为日后骨质疏松症的机制研究提供优质的种子细胞。

**【关键词】** 成骨细胞; 原代培养; 胶原酶类; 大鼠

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.04.016

**Comparison of the activity and yield rate of osteoblast obtained by different digestion methods** LI Ling-hui, DING Dao-fang, DU Guo-qing, WANG Hui-hao, and ZHAN Hong-sheng. Shi's Center of Orthopedics and Traumatology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China

**ABSTRACT Objective:** To compared the activity and yield rate of osteoblast obtained by different collagenase digestion methods, to find a better way to extract osteoblast for the experimental researches of osteoporosis. **Methods:** Ten 24-hour-old SD rats were euthanized. The cranium of rats were removed and cuted into blocks of 1 mm×1 mm size. After digested by trypsin for 15 min, all the cranium were divided into two equal parts, and randomly divided into two groups which would be digested by type I collagenase and type II collagenase separately for two times. The rat cells of the two groups were cultured in thermostat incubator with 5% CO<sub>2</sub> under the condition of 37℃. The primary culture osteoblasts were counted by using a haemocytometer after digestion and 72 hours later. The second generation osteoblasts cultured 48 h were dyed by NBT/BCIP staining solution, and were detected by quantitative measurement with PNPP. **Results:** The cells had irregular shapes. The results of cell counting showed that the cell number of type I group was larger than type II group. Alkaline phosphatase dyeing were positive. Detecting of alkaline phosphatase using the method of PNPP showed that the absorbance value in type I group were higher than type II group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Two types of collagenase are both suitable for the in vitro culture of rat osteoblasts. The activity and yield rate of osteoblasts in type I group are higher which could provide more stable seed cells for the treatment of osteoporosis.

**KEYWORDS** Osteoblasts; Primary culture; Collagenases; Rats

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(4): 328-331 www.zggszz.com

成骨细胞是参与骨形成的主要功能单位, 对骨的生长发育、代谢修复至关重要。随着细胞培养技术

的日益成熟, 人们已经能够利用多种方法从骨、骨膜、骨髓等不同组织中成功培养或诱导出具有成骨细胞表型的细胞<sup>[1]</sup>。酶消化法因其操作简便、获得细胞量大等优点得到广泛应用。研究中常用的消化酶主要是胰酶和胶原酶<sup>[2]</sup>, 消化酶的种类和作用时间是酶消化法成功与否的关键。目前, 绝大多数学者将胶原酶及胰蛋白酶联合应用于成骨细胞的原代培养中, 然而对于 I、II 型胶原酶的选择, 国内外学者各执一词<sup>[3-7]</sup>, 尚无统一标准。本实验分别应用 I、II 型

基金项目: “中医骨伤科学”国家重点学科(编号: 100508); 上海领军人才项目(编号: 041); 上海市科委重点项目(编号: 09dZ1973800); 国家自然科学基金项目(编号: 81073114, 81001527, 81102603, 81173621); 上海市科委科技人才计划项目(编号: 11XD1404600)

Fund program: The National Natural Science Foundation of China (No. 81073114, 81001527, 81102603, 81173621)

通讯作者: 詹红生 E-mail: zhanhongsheng2010@163.com

胶原酶进行体外成骨细胞培养,并对传代细胞进行鉴定,旨在比较两种胶原酶对成骨细胞消化能力的差异,以期建立一种便捷、高效的成骨细胞培养方法,为日后的研究工作提供可靠的实验基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物、试剂及仪器** 新生 24 h 以内 SD 大鼠 10 只,清洁级,雌雄不限,由上海中医药大学实验动物中心提供。H-DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰酶均购自 Gibco 公司;Collagenase I、Collagenase II 均购自 Sigma 公司;RIPA (碧云天);NBT/BCIP 染色液、PNPP、PMSF (Pierce 公司);双抗 (Biowest 公司);倒置荧光显微镜 (Olympus-IX71);CO<sub>2</sub> 培养箱 (HERA cell 150);生物安全柜 (美国 Lab-conco 公司)。

### 1.2 成骨细胞的分离与培养

**1.2.1 取材及预消化** 新生 24 h SD 大鼠 10 只于 70%乙醇中浸泡 10 min 以清洁体表;颈椎脱臼处死后揭去头顶皮肤,取下颅盖骨,PBS 清洗 3 次以清除骨膜、血管等结缔组织。将洗净的颅盖骨剪成 1 mm×1 mm 的小碎片,0.25%胰蛋白酶溶液 37℃ 预消化 15 min 以清除骨膜、血管等纤维组织。

**1.2.2 分组消化分离** 吸弃消化液,将剩余骨片在电子天平上称重后分成 2 等分,各自净重为 0.4 g,采用随机数字表法将两组细胞随机分为 I 型组、II 型组,分别以 5 ml 0.1% I 型、0.1% II 型胶原酶 37℃ 消化 1 h。将含细胞的消化液在 1 000 r/min 下离心 8 min,弃掉上清液,沉淀的细胞团块用 H-DMEM 培养液 (含 10%FBS 及双抗)吹打混匀。剩余骨片加入 5 ml 新的胶原酶继续消化 1 h,重复以上步骤 1 次。

**1.2.3 培养与传代** 两次消化所得细胞混匀、计数,接种于 10 cm<sup>2</sup> 细胞培养皿中,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。24 h 后换液 1 次,此后隔天换液。倒置相差显微镜下观察细胞长至皿底的 80% 左右时以 0.25%胰蛋白酶消化细胞并传代培养。

### 1.3 细胞计数及活性鉴定

**1.3.1 细胞形态学观察** 原代细胞接种培养 0、24、48、72 h 在倒置显微镜下观察细胞形态变化,并摄片记录。

**1.3.2 细胞计数** 分别于原代消化后 0、72 h 进行细胞计数。将细胞吹打混匀,取 0.5 ml 细胞悬液、0.5 ml 4% 萘酚蓝染液,使二者混合均匀,将少量混合液滴于血球计数板上,静置 3 min。镜下清点未被染色的活细胞数目,并计算出细胞总数。

**1.3.3 碱性磷酸酶 (ALP) 染色** 第 2 代细胞以适当密度接种于 24 孔板,48 h 后取出孔板于镜下观察。4% 中性多聚甲醛固定 3 min,NBT/BCIP 染色液

于室温下避光孵育 30 min,PBS 清洗 2 遍,倒置相差显微镜下观察并摄片。

**1.3.4 碱性磷酸酶定量检测** 对硝基苯磷酸盐法 (PNPP) 测定两组细胞内碱性磷酸酶差异。第二代细胞培养 48 h 后分别消化至离心管中,PBS 清洗并离心,吸弃上清液,RIPA (含蛋白酶抑制剂) 裂解 20 min,以 12 000 r/min 4℃ 离心 15 min,吸取上清液至 EP 管中。取 96 孔板,两组各设置 6 个孔,每孔加入 20 μl 蛋白溶液、100 μl PNPP 反应液,室温下避光孵育 30 min,于波长 405 nm 处测定 OD 值。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,数据以均数±标准差表示,两组间数据比较采用两样本均数 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞形态学观察** 原代细胞培养 1 h 后在倒置相差显微镜下均呈亮球状悬浮于培养皿中,折光性良好,单位面积下 I 型组 (图 1a) 细胞数明显多于 II 型组 (图 2a)。24 h 后换液去除未贴壁细胞,镜下观察可见 I 型组 (图 1b) 细胞已贴壁展开,呈三角形或长梭形;II 型组细胞稀少,已贴壁生长,呈圆形或短线形 (图 2b)。48 h 后 I 型组细胞具有典型成骨细胞特征,呈三角形或多边形 (图 1c);II 型组细胞形态亦已展开,形态不规则 (图 2c)。72 h 观察显示 I 型组细胞已长满培养皿 90% 以上,呈鳞片状排列紧密 (图 1d),原代培养第 3 天即可传代;II 型组细胞仍呈梭形,密度约占培养皿的 30% (图 2d)。

**2.2 细胞计数** 分别于原代消化后 0、72 h 进行细胞计数,结果见表 1。I 型组细胞总量均比 II 型组高出 3 倍以上,本实验共重复 3 次,均得到类似结果。

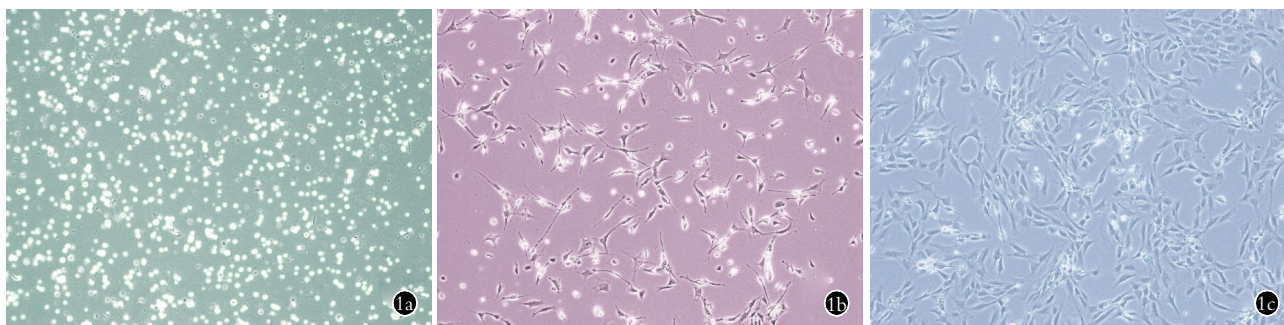
表 1 两组细胞培养 0 h 和 72 h 时的细胞计数以及 ALP 吸光度测定结果

Tab.1 Cells numbers in 0 and 72 hours and results of absorbance value of ALP in two groups

组别	孔数	细胞计数 (个)		吸光度 OD <sub>405</sub>
		0 h	72 h	
I 型组	6	3.29×10 <sup>6</sup>	1×10 <sup>7</sup>	0.427±0.020
II 型组	6	5.75×10 <sup>5</sup>	1.35×10 <sup>6</sup>	0.262±0.018

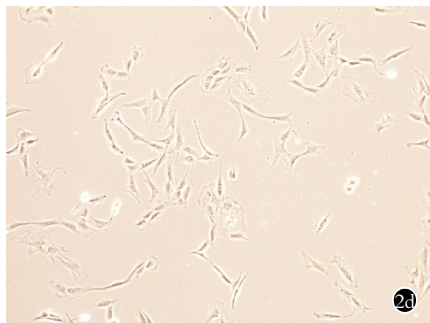
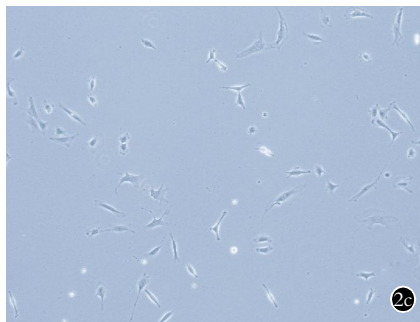
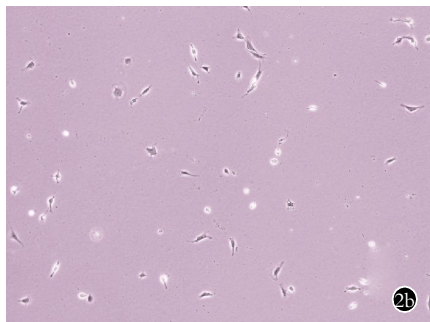
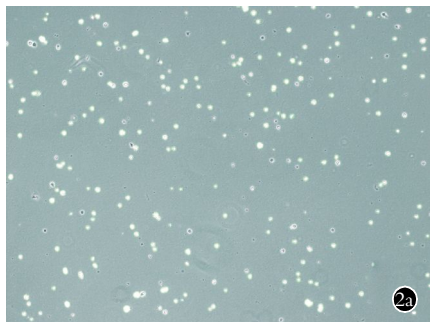
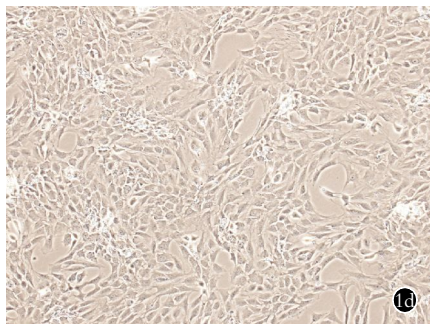
**2.3 碱性磷酸酶染色** 细胞采用 NBT/BCIP 染色液并对 ALP 含量进行测定。显微镜下观察显示 (图 3),两组细胞核均呈紫色,胞浆中亦有深染颗粒,显示为阳性,说明两组细胞均具有分泌 ALP 的功能,具有成骨细胞典型特性。镜下可见 I 型组 (图 3a) 的颜色较 II 型组 (图 3b) 稍深。

**2.4 碱性磷酸酶定量检测** ALP 吸光度 3 次测量结果: I 型组 0.427±0.020, II 型组 0.262±0.018, I 型组的碱性磷酸酶含量明显高于 II 型组,差异有统计



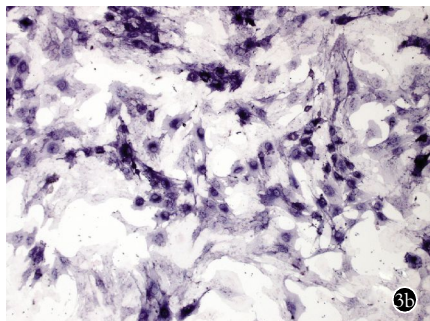
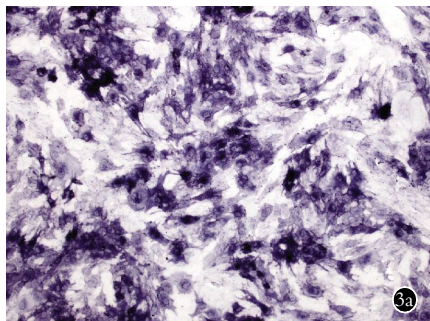
**图 1** I 型组成骨细胞形态学观察( $\times 100$ ) **1a.** I 型组细胞培养 1 h, 细胞数量较多, 呈圆形, 胞体光滑、折光性良好 **1b.** I 型组细胞培养 24 h, 细胞贴壁生长, 有长短不一的突起 **1c.** I 型组细胞培养 48 h, 细胞呈不规则的多边形, 已长满培养皿约 80% **1d.** I 型组细胞培养 72 h, 细胞已生长至融合状态

**Fig.1** Morphology observation of osteoblasts of type I ( $\times 100$ ) **1a.** The cell number of type I group cultured for 1 hour was large. Cells in this group were round, smooth and glossy with good stereo **1b.** Osteoblasts in type I group cultured for 24 h adhered to the plate with one or two neurites **1c.** Osteoblasts in type I group cultured for 48h showed irregular shape and grew to 80% adhesion to the bottom **1d.** Osteoblasts in type I group cultured for 72 h permeated the culture dish



**图 2** II 型组成骨细胞形态学观察( $\times 100$ ) **2a.** II 型组细胞培养 1h, 细胞数量稀少, 呈两球状、折光性良好 **2b.** II 型组细胞培养 24 h, 细胞贴壁生长, 呈短方形, 尚未见突起伸出 **2c.** II 型组细胞培养 48 h, 细胞有长短不一的突起 **2d.** II 型组细胞培养 72 h, 细胞数量较少, 占细胞培养皿 30%~40%

**Fig.2** Morphology observation of osteoblasts of type I ( $\times 100$ ) **2a.** Cells in type II group cultured for 1 hour was small in quantit and also had round and globular shapes **2b.** Cells in type II group cultured for 24 h adhered to the plate without neurite **2c.** Cells in type II group cultured for 48 h had one or two neurites **1d.** Cells in type II group cultured for 72 h grew to 30% to 40% adhesion to the bottom



**图 2** 碱性磷酸酶染色( $\times 100$ ) 两组细胞 ALP 染色均为阳性, 胞浆及胞膜中有蓝紫色颗粒, I 型组(2a)染色较 II 型组(2b)略深

**Fig.2** Alkaline phosphatase staining ( $\times 100$ ) ALP staining of the two groups were both positive, and blue-violet particles could be found in cytoplasm and envelope of positive cells

学意义( $P < 0.05$ , 见表 1)。

### 3 讨论

成骨细胞在骨重建中起着主导性作用。成骨细胞的体外培养技术在骨代谢疾病的研究中至关重要, 为研究药物作用的机制奠定了理论和实验基础。

新生乳鼠的颅盖骨为板层骨, 几乎没有髓腔和小血管, 混杂的内皮细胞数量相对较少。因此, 本实验选取新生大鼠的颅盖骨为取材对象。

分离成骨细胞的方法有多种, 如骨组织块法、酶消化法、骨膜培养法等。组织块法分离出的成骨细胞

量少,难以满足实验需要;酶消化法因其高效便捷而被研究者广泛地应用。胰蛋白酶活性强,但容易损伤细胞膜上的功能蛋白,影响细胞的活性和功能;胶原酶对细胞作用较缓和,但单独应用时细胞不易消化分离,获得的细胞数量较少。鉴于以上特点,笔者将胰酶和胶原酶联合应用于成骨细胞的体外分离培养,这样既可有效提高成骨细胞的获得率,又能尽量保持其原有活性。

胶原通常由成纤维细胞、骨细胞、软骨细胞、平滑肌细胞等产生,有学者认为多细胞动物的各种细胞都能分泌胶原,如大鼠胎儿的肺泡上皮细胞可同时分泌 I、II、III、IV 型胶原<sup>[8]</sup>。在同一组织中,常同时存在几种类型的胶原,但常有一种类型占优势,如成骨细胞分泌基质中主要成分是 I 型胶原,而软骨周围基质中则主要为 II 型胶原。胶原酶有多种同工酶(同工酶指催化相同的化学反应,但其蛋白质分子结构、理化性质和免疫性能等方面都有明显差异的一组酶),分为 I、II、III、IV、V 型及肝细胞专用酶<sup>[9]</sup>。本研究已鉴定两组细胞均为成骨细胞,据此笔者认为, I、II 型胶原酶属同工酶,均可消化各型胶原,但 I 型胶原酶对于以 I 型胶原为主的成骨细胞外基质更具有针对性,故消化效率高于 II 型胶原酶。

成骨细胞膜表面表达高强度的碱性磷酸酶,目前通常把它的这种生化特征作为鉴定成骨细胞的标志物<sup>[10]</sup>。BCIP 在碱性磷酸酶的作用下会被水解产生强反应性的产物,该产物会和 NBT 发生反应,生产紫色沉淀。两个实验组均采用 NBT/BCIP 染色液对碱性磷酸酶进行特异性染色,结果表明两组细胞均为阳性,证实其为成骨细胞。另外,笔者进一步用 PNPP 法对细胞内的 ALP 进行定量检测,结果显示 I 型组的 OD 值明显高于 II 型组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。此结果说明 I 型组细胞的成骨活性高于 II 型组,进一步证实 I 型胶原酶消化后的细胞纯度更高、活性更强。

本实验采用新生 24 h 以内的 SD 大鼠颅盖骨为取材对象,利用胰酶的消化效力高的特点预消化颅骨去除骨膜、血管等组织,同时减少胰酶的消化时间,降低胰酶对细胞的损伤。纯净后的骨片分别采用 I、II 型胶原酶进行消化,通过两组得率和活性的比较,笔者发现胶原酶对骨组织中的细胞间质有较好

的消化作用,应在细胞的消化分离中充当主要的消化酶,且针对以 I 型胶原为主要成分的成骨细胞外基质,选用 I 型胶原酶更具有特异性,消化后的细胞数量更多、成骨特性更强。

#### 参考文献

- [1] 徐杨俊,赵建宇. 体外培养成骨细胞的研究进展[J]. 中国骨伤, 2010, 23(7): 562-565.  
Xu YJ, Zhao JN. Progressing study in osteoblasts cultured in vitro [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2010, 23(7): 562-565. Chinese with abstract in English.
- [2] Sun DC, Li DH, Ji HC, et al. In vitro culture and characterization of alveolar bone osteoblasts isolated from type 2 diabetics[J]. Braz J Med Biol Res, 2012, 45(6): 502-509.
- [3] Hasegawa Y, Shimada K, Suzuki N, et al. The in vitro osteogenetic characteristics of primary osteoblastic cells from a rabbit calvarium [J]. J Oral Sci, 2008, 50(4): 427-434.
- [4] Liu S, Tang Z, Xiong T, et al. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2011, 9: 141.
- [5] 明磊国,葛宝丰,陈克明,等. 蛇床子素对体外培养成骨细胞增殖与分化成熟的影响[J]. 中国骨伤, 2010, 23(9): 688-691.  
Ming LG, Ge BF, Chen KM, et al. Effect of osthon on the proliferation and differentiate of osteoblasts in vitro [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2010, 23(9): 688-691. Chinese with abstract in English.
- [6] 吴锋,林日阳,何立群. 体外肾系膜细胞对成骨细胞增殖及功能的影响[J]. 中国骨伤, 2012, 25(4): 324-327.  
Wu F, Lin RY, He LQ. Effects of mesangial cell on proliferation and function of osteoblast in vitro [J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(4): 324-327. Chinese with abstract in English.
- [7] Orriss IR, Taylor SE, Arnett TR. Rat osteoblast cultures[J]. Methods Mol Biol, 2012, 816(1): 31-41.
- [8] Mancini L, Tamma R, Settanni MP, et al. Three 2 dimensional osteoblast cultures on synthetic hydroxyapatite support: Molecular characterization and vascularization study after implant on chick allantochoirial membrane[J]. Bone, 2006, 38(3): 19-20.
- [9] Leheup BP, Federspiel SJ, Guerry-Force ML, et al. Extracellular matrix biosynthesis by cultured fetal rat lung epithelial cells. I. Characterization of the clone and the major genetic types of collagen produced[J]. Lab Invest, 1989, 60(6): 791-807.
- [10] Collin P, Nefussi JR, Wetterwald A, et al. Expression of collagen, osteocalcin, and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture[J]. Calcif Tissue Int, 1992, 50(2): 175-183.

(收稿日期: 2012-07-17 本文编辑: 王玉蔓)