

SD 大鼠髁突软骨下骨成骨细胞的原代培养与鉴定

曹小波, 罗应伟, 解保生, 陈旭

(昆明医科大学口腔医学院, 云南 昆明 650031)

[摘要] **目的** 建立新生 SD 大鼠髁突软骨下骨成骨细胞培养模型。 **方法** 用新生 24 h SD 大鼠, 分离获取髁突, 去尽软骨层, 获得纯尽软骨下骨。采用改良贴壁组织块反复消化法培养细胞。通过相差显微镜和 HE 染色观察其细胞形态, 并且用碱性磷酸酶染色和钙化结节染色方法进行细胞鉴定, 噻唑蓝 (MTT) 比色法检测其增值能力。 **结果** 细胞呈多种形态, 有三角形、梭形、不规则形。碱性磷酸酶染色和钙化结节染色均呈阳性, 细胞接种后 1~3 d 内细胞增殖缓慢, 第 8 天达到高峰, 以后增长速度逐渐减慢。 **结论** 该方法获得新生 SD 大鼠髁突软骨下骨成骨细胞能在体外稳定培养, 并且细胞具有典型的成骨细胞形态和功能。

[关键词] 软骨下骨; 成骨细胞; 细胞培养; 鉴定

[中图分类号] R782.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 01 - 0021 - 05

Primary Culture and Identification of Osteoblasts from Subchondral Bone of Neonatal SD Rat's Condylar Process

CAO Xiao-bo, LUO Ying-wei, XIE Bao-sheng, CHEN Xu

(School of Stomatology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** Establish an experimental model for primary subchondral bone osteoblasts culture of neonatal SD rat's condylar process. **Methods** Under the condition of sterile, 24-hour SD rat was executed and its condylar process was isolated. Removing cartilage layer, the subchondral bone was exposed obviously, then it was cultured with modified repeating enzymatic digestion-adherent explants method. The cellular morphology was identified with invert microscope and immunohistochemistry staining, the osteoblasts were identified by alkaline phosphorase (ALP) staining and calcified nodules staining, and the proliferation of the acquired cells was examined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. **Results** A variety of cell morphologies were observed, such as spindle-shaped, triangular and irregular-shape, and their cell processes were significant. The alkaline phosphatase staining and calcified nodules staining of cultured osteoblasts with mineralized nodules were positive. Cells grew slowly in 1-3 days, and the cells growth reached the highest level at the 8th day. The cells growth trend has gradually slowed down after 8 days. **Conclusion** The method is an efficient way to culture and obtain purified neonatal SD rat's subchondral bone osteoblasts with typical characteristics.

[Key words] Subchondral bone; Osteoblasts; Cell culture; Identification

下颌骨髁突是颞下颌关节的重要组成部分, 其表面覆盖有纤维软骨, 紧靠其下方的皮质终板以及血管、骨小梁和小梁间的腔隙作为关节软骨下骨, 在颞下颌关节 (temporomandibular joint, TMJ) 中皮质终板不是很明显。软骨下骨含有数量

众多的静脉、动脉和神经, 它们的细小分支分别进入钙化软骨层, 现在已经将软骨下骨和关节软骨看作是一个相互作用的功能单位。本实验中获得及体外培养新生 SD 大鼠髁突软骨下骨成骨细胞, 通过观察体外培养成骨细胞的生长特征, 并

[基金项目] 云南省应用基础研究面上基金资助项目 (2010ZC116)

[作者简介] 曹小波 (1984~), 男, 云南江川县人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事口腔临床医疗工作。

[通讯作者] 罗应伟. E-mail: luoyingwei1967@hotmail.com

且鉴定。为在细胞水平上研究髌突改建的机制提供了成骨细胞群。

1 材料与方法

1.1 实验动物与仪器、试剂

实验动物：新生 24 h 的 SD 大鼠，雌雄不限，购自昆明医科大学动物实验中心。主要仪器：超净工作台 (AIRTECH)、CO₂ 培养箱 (美国 Thermo)、倒置相差显微镜 (德国 Leica 公司)、光学显微镜 (德国 Leica 公司)。主要试剂：DMEM/F12 培养基 (Hyclone)、胎牛血清 (天津 TBD 生物制品公司)、茜素红 S (分析纯) (天津市化学试剂研究所)、胰蛋白酶 (Amresco, USA)、碱性磷酸酶试剂盒 (南京建成生物工程研究所)、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、甲基亚砷 (DMSO, Sigma 公司)、酶标仪 (奥地利 ECAN 公司)。

1.2 改良贴壁组织块反复消化法分离培养

1.2.1 软骨下骨成骨细胞分离与原代培养 将新生 24 h 的 SD 大鼠置于 75% 乙醇中浸泡 5 min，在无菌超净工作台于外耳道部剪开大鼠皮肤，分离出髌突，用 PBS 冲洗 3 次，清除肌肉、筋膜及纤维结缔组织，暴露整个髌突，获取软骨下骨 (图 1)。将软骨下骨剪碎成大小约 1 mm³ 的碎块，PBS 冲洗，洗尽残余血液，加双抗 10 min，PBS 再次冲洗后加入适量含乙二胺四乙酸 (EDTA) 的 0.25% 胰酶，37 °C 下搅拌消化 15 min，去除消化液，无血清培养液反复清洗后，按照传统组织块培养法，把组织块均匀铺在 25 mL 培养瓶底，加 1 mL 左右含 20% 胎牛血清培养液，倒置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中培养，4 h 后小心将培养瓶转正，并加入培养液 3~4 mL，继续培养，第 2 天换液后，每 3 d 换液 1 次，并且观察。

1.2.2 软骨下骨成骨细胞接种、传代与纯化 从原代培养开始，每天在倒置显微镜下观察细胞从骨片中爬出数量、形态特征和生长情况。直到细胞爬满培养瓶底部大约 80% 后进行传代，传代前 1 d 换一次液体，传代时首先吸弃培养液，再用 PBS 冲洗 3 次，加入胰酶约 1~3 mL，以覆盖培养面为宜，放入培养箱消化，并不时在显微镜下观察，到多数细胞突起回缩、变圆时吸弃消化液，并加入含血清的培养液终止消化，消化时间大约为 0.5~2 min 左右。轻轻左右来回晃动培养瓶后用吸管轻柔地远距离吹打组织块，吸出上清液，离心速度为 1 000 r/min 离心时间约 3~5 min，弃上清，PBS 冲洗细胞团 3 次，重复上述离心过程，收集离

心细胞，加入含 20% 胎牛血清培养液重悬细胞，并计数，以 2×10^4 个 /mL 密度接种于培养瓶中，继续于恒温孵箱中培养，即可获得第 1 代细胞。原组织块贴壁的培养瓶再加培养基继续培养，再次可以获取第一代细胞。第 1 代细胞培养直到细胞爬满培养瓶底部大约 80% 后进行传代所获得细胞悬液，用差速吸附法进行成骨细胞的纯化^[1]。先将获得细胞悬液接种于 A 培养皿中，静置大约 20 min，显微镜下见部分细胞已经贴壁，轻轻吸取上层细胞悬液接种到新的 B 培养皿中，同样静置 20 min，重复上述过程 3 次，即可已去除成纤维细胞和软骨细胞，纯化成骨细胞。将纯化后的细胞悬液同样按 2×10^4 个 /mL 密度接种于培养瓶中，继续于恒温孵箱中培养即可获得第 2 代细胞。用此方法即可获得第 4 代成骨细胞。将第四代的细胞制作细胞悬液并爬片备用。

1.3 形态学观察

原代培养与传代后，每天用倒置显微镜观察培养细胞并拍照。取第 4 代成骨细胞，制成悬液后，取出以 5.0×10^4 个 /mL 接种于预置盖玻片继续培养，待细胞汇合时取出盖玻片，用 PBS 洗涤 3 次，用 95% 乙醇固定 10 min，按常规 HE 染色方法进行染色、封片、观察。

1.4 成骨细胞的鉴定

1.4.1 碱性磷酸酶染色 (alkaline phosphatase, ALP) 将原代组织块第 1~6 次爬出的第 4 代成骨细胞制成悬液接种在盖玻片上，细胞接种密度以 5×10^4 个 /mL，到细胞长至汇合后取出盖玻片，按常规 Gomori 钙-钴法^[2]进行 ALP 染色。采用 PBS 冲洗 2 次再用冷丙酮固定 10 min，用蒸馏水冲洗 3 次，入孵育液 (3% β -甘油磷酸钠 5 mL、2% 巴比妥钠 5 mL、蒸馏水 10 mL、2% CaCl₂ 10 mL、2% MgSO₄ 1 mL) 中 37 °C 孵育 4~6 h，用自来水冲洗数次，放入 2% 硝酸钴中浸 5 min，再用蒸馏水冲洗数次，放入 1% 硫化铵中浸 2 min，用自来水冲洗，自然干燥、封片、观察。对每张染色的爬片随机选取 5 个细胞分布均匀视野，每个视野计数 80 个细胞，共 400 个细胞。按公式计算阳性细胞所占的比例。

1.4.2 钙化结节染色 细胞接种方法同上，用条件培养基培养，条件培养基：原培养液基中补加 10 mmol/L B-甘油磷酸钠、10 nmol/L 地塞米松、50 μ g/mL 维生素 C，每 3 d 换液 1 次。当细胞生长汇合时，不传代继续培养，大约培养 18~25 d，细胞汇合并且局部聚集成灶，肉眼观察可见白色结节，即形成钙结节后，取出盖玻片，用 PBS 冲洗 2

次, 用 95%乙醇固定 10 min, 蒸馏水冲洗后, 加入新鲜配制 1%茜素红 S 溶液 (pH 8.3), 孵育染色 30 min, 蒸馏水冲洗数次, 自然干燥、封片、观察.

1.5 成骨细胞的生长曲线

将原代组织块第 1~6 次爬出的第 4 代对数生长期细胞, 胰蛋白酶消化, 将细胞接种于 96 孔板中, 接种密度以 1×10^4 个 /mL, 每孔接种 0.2 mL. 从第 1 天开始, 连续 11 d 用 MTT 法测定光密度值, 描记细胞的生长曲线, 每组设 60 个样本, 计算均数后绘制生长曲线.

2 结果

2.1 原代细胞和传代细胞的形态学观察

在倒置显微镜下观察, 原代组织块培养第 1 天~第 3 天经胰酶消化后的已贴壁, 少数骨块周围已经有细胞爬出, 贴壁生长, 由圆形逐渐转变为三角形、梭形或多边形, 细胞核呈椭圆形. 到第 3 天后, 爬出的细胞增多, 并以骨块为中心, 向周围呈鳞片样生长, 许多组织块爬出的细胞也可汇合成单层. 6~8 d, 几乎全部骨块周围均有细胞爬出, 多边形为主, 细胞形态多样化, 核明显增大, 胞浆丰富, 向外伸展出生长突, 生长突逐渐增多, 细胞借突起相互连接, 呈重叠生长 (图 2). 原代细胞及传代细胞均呈集落样生长, 细胞之间互相连接, 最终生长成片, 细胞可复层生长. 原代时就有集落化生长趋势, 并形成钙结节. 接种的传代细胞呈体积均一圆形细胞, 10~14 h 就开始贴壁, 接种 48 h 后, 大量细胞贴壁生长, 48~72 h 后完全贴壁, 显微镜观察展开后的细胞多呈三角形、多边形、梭形、立方体, 胞核呈圆形或椭圆形, 居中或偏于一侧, 轮廓清晰, 可见 1~3 个核仁, 胞质透亮、饱满、胞浆内可见黑色颗粒, 有 2~3 个突起. 大约 7 d 后细胞爬满整个培养瓶, 细胞突起增加为 3~4 个, 体积明显增大, 看似星形, 贴壁性良好, 并部分区域出现重叠生长以及辐射生长的现象 (图 3).

HE 染色细胞密集生长, 体积较大, 多有突起, 胞质清晰嗜酸性, 呈均质状, 呈粉红色, 胞核较大, 呈深蓝色或紫蓝色, 大而圆, 位于中央或一侧, 嗜碱性, 核质疏松, 也可见到核仁 (图 4).

2.2 成骨细胞的鉴定

2.2.1 ALP 染色 细胞经 Gomori 钙-钴法 ALP 染色显示绝大部分细胞出现阳性反应, 显微镜下可

见细胞膜、胞浆内颗粒均呈阳性反应, 胞质呈灰黑色块状沉淀, 深浅不一, 以深色为主 (图 5). 强阳性细胞多为三角形或多边形, 梭形细胞染色略弱, 阳性反应率达 95% 以上.

2.2.2 钙化结节茜素红染色 当成骨细胞生长形成钙化结节, 采用茜素红染色法, 白色结节区反应呈阳性, 显微镜下见许多被染成红色的结节, 中央染色较深, 为深褐色, 向周围逐渐变浅, 呈淡红色 (图 6).

2.3 成骨细胞的生长曲线

生长曲线中可见, 接种第 1~3 天细胞数目比接种时少, 是细胞潜伏适应期, 第 4~8 天生长曲线表现为线性曲线, 表明这段时间为细胞的对数生长期, 第 8 天后曲线变得平缓, 细胞增殖明显减慢, 第 9~11 天细胞增殖数量逐渐减少 (图 7). 细胞生长曲线是观察细胞生长的重要方法, 较好地反映了成骨细胞的体外生长特征, 证实建立的细胞系生长稳定.



图 1 分离解剖 SD 大鼠髌突 (相机)

Fig. 1 The separation of anatomy SD rat's condylar process (camera)

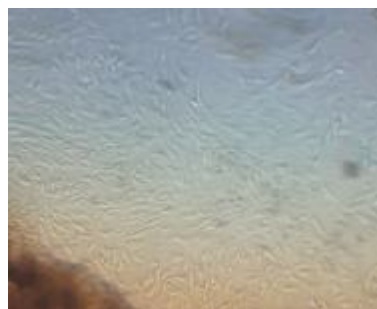


图 2 原代培养 7 d, 从贴壁组织块中爬出的新生 SD 大鼠软骨下骨成骨细胞 (倒置显微镜 $\times 40$)

Fig. 2 The primary neonatal SD rat's osteoblasts in subchondral bone explants at the 7th day of culture (inverted microscope $\times 40$)



图 3 第 4 代成骨细胞 (倒置显微镜 × 100)

Fig. 3 The fourth generation osteoblasts (inverted microscope × 100)

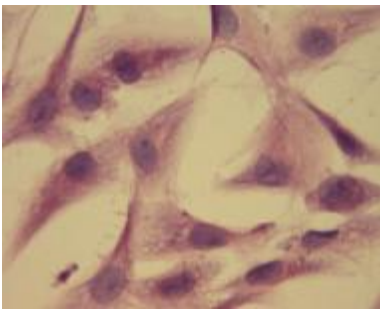


图 4 第 4 代成骨细胞 HE 染色 胞质清晰、丰富, 有 1~3 个核仁 (HE × 200)

Fig. 4 A light micrograph of the fourth generation osteoblasts showing obvious cytoplasm, large nuclei and 1-3 nucleolus (HE × 200)



图 5 第 4 代成骨细胞 ALP 阳性, 胞质呈灰黑色块状沉淀 (ALP × 200)

Fig. 5 The alkaline phosphatase staining (Gomori method) for the fourth generation osteoblasts showing black deposits in cytoplasm (ALP × 200)

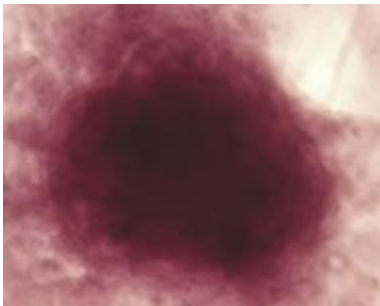


图 6 第 4 代成骨细胞茜素红染色钙化结节呈圆形、橘红色 (茜素红染色 × 400)

Fig. 6 The mineralized nodule staining for the fourth generation osteoblasts by alizarin red showing the red calcified extracellular matrix (ARS × 400)

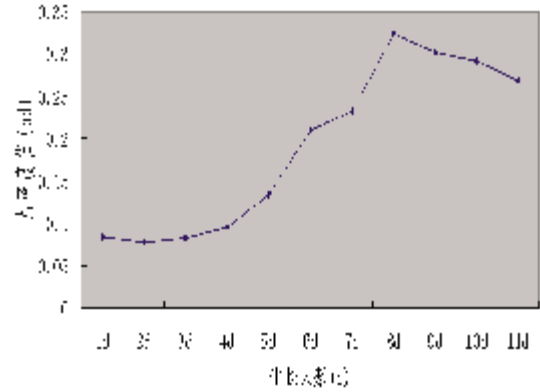


图 7 新生 SD 大鼠软骨下骨组织快第 1、6 次爬出的第四代成骨细胞生长曲线

Fig. 7 The growth curves of the fourth generation osteoblasts of neonatal rat's subchondral bone explant at the first and sixth time

3 讨论

1964 年, Peck 等^[1]开始从事动物胚胎骨成骨细胞培养研究工作, 1979 年 Mills 等^[4]首先报道用组织块培养法在体外成功培养了人成骨细胞, 后来学者对成骨细胞的培养进行了改良. 目前, 成骨细胞的培养方法主要有酶消化法^[5]和植块培养法^[2]. 酶消化法一般采用胰酶消化、胶原酶消化或胶原酶胰酶同时消化, 优点是一次可获得大量的细胞, 而且所需时间短, 缺点步骤复杂, 所得消化悬液比较浓稠, 细胞悬浮于消化液中, 以致难于离心沉淀; 其次分离的细胞含有其它细胞, 不易去除; 还有消化时间不好掌握, 掌握不好消化液对细胞会有损害, 影响细胞贴壁和成活. 植块培养法是将组织剪碎后贴壁, 利用成骨细胞的游走性能, 让细胞从植块周围爬出, 能获得比较纯净的细胞群, 不需要酶消化处理, 即可靠又简便. 缺点细胞爬出缓慢、量少和耗时. 成骨细胞运用改良酶消化组织块培养法^[6]取得较好的效果. 在实验中, 组织块较快地贴壁, 3 d 左右细胞就开始从组织块中爬出, 而且培养出的细胞相对较纯, 不但容易消化而且容易提纯, 并且消化后的组织块不易脱落下来, 可以培养出大量的细胞, 是一种较好的培养方法.

成骨细胞的表型鉴定主要是形态观察、碱性磷酸酶染色和钙化结节染色. 本试验中, 刚消化下来的细胞为圆形, 贴壁生长展开后呈三角形、多边形, 胞质透明, 有较多突起, 相互连接成网状. HE 染色可见胞质丰富、清晰, 胞核呈圆形或卵圆形, 单个核, 有 1~3 个核仁, 具有典型成骨细胞的形态特征. 成骨细胞的重要生物学行为功能之一

(下转第 31 页)

- D, et al. The "Fas counterattack" is not an active mode of tumor immune evasion in colorectal cancer with high-level microsatellite instability [J]. *Hum Pathol*, 2007, 39(2): 243 - 250.
- [9] BULER L M, HEWETT P J, BUTLER W J, et al. Down-regulation of Fas expression in colon cancer is not a result of allelic loss or gene rearrangement [J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(9): 1454 - 1459.
- [10] STEINMAN R M, COHN Z A. Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organ of mice. V. Purification of spleen dendritic cells. New surface markers, and maintenance in vitro [J]. *Exp Med*, 1979, 149(1): 1 - 16.
- [11] FUKUNAGA A, MIYAMOTO M, CHO Y, et al. CD8⁺ Tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4⁺ Tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma [J]. *Pancreas*, 2004, 28(1): 26 - 31.
- [12] 徐芳英, 董健康, 朱益民, 等. 结直肠癌独立预后因素: TNM 分期、肿瘤芽、神经周围侵犯、癌旁淋巴细胞浸润和尿糖 [J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(5): 366 - 369.
- [13] 周坚, 杨清元, 罗小琴. HLA-DR 表达与卵巢癌临床病理及预后的关系 [J]. *海南医学院学报*, 2005, 11(3): 173 - 176.
- [14] 欧宗兴. 重组白介素-2 治疗恶性胸腔积液 [J]. *海南医学院学报*, 2000, 6(1): 10 - 11.

(2013 - 11 - 14 收稿)

(上接第 24 页)

是能合成和分泌 ALP, ALP 活性是成骨细胞的一个重要标志^[7]. 经 ALP 染色后呈阳性, 符合成骨细胞的生物学特性. 成骨细胞作为特殊钙化组织的主要功能细胞, 有别于其他类型细胞的生物学特性, 细胞汇合后细胞堆积生长, 发生胶原堆积和钙盐沉积, 能形成钙化结节, 经茜素红染色呈阳性, 符合成骨细胞的生物学特性. 所以, 钙化节结的形成是体外培养成骨细胞的又一个重要的生物学特性^[8]. 本实验的细胞 ALP 染色、钙化节结染色均呈阳性反应, 显示所培养细胞具有较强的 ALP 活性以及钙化能力. 以上证实, 本实验所获得的细胞具有体内成骨细胞的形态学特征、生物学行为和成骨潜能, 为进一步研究髌突改建的机制中成骨细胞的作用打下了良好的基础.

本实验成功培养出新生 SD 大鼠髌突软骨下骨成骨细胞, 为进一步研究成骨细胞在髌突改建中的作用机制, 从细胞水平上研究提供了充足、可靠的靶细胞.

[参考文献]

- [1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 第 2 版, 西安: 世界图书出版西安公司, 2007: 67.
- [2] 胡静, 郑洪新. 改良成骨细胞体外培养和鉴定方法 [J]. *中国老年学杂志*, 2006, 26(1): 76 - 78.
- [3] PECK W, BIRGE S J, FEDAK S A. Bone cells: biochemical and biological studies after enzymatic isolation [J]. *Science*, 1964, 14(6): 1476 - 1477.
- [4] MILLS B G, SINGER F R, WEINER L P, et al. Long-term culture of cells from bone affected by Paget's disease [J]. *Calcif Tissue Int*, 1979, 29(2): 79 - 87.
- [5] 钟近洁, 张东辉, 许永华, 等. 乳鼠成骨细胞的原代培养与鉴定 [J]. *新疆医科大学学报*, 2006, 29(8): 669 - 672.
- [6] 鄂玲玲, 刘洪臣, 吴霞, 等. 改良大鼠下颌骨成骨细胞原代培养与鉴定 [J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2007, 5(4): 226 - 229.
- [7] LIN Y, TANAKA N, OHKUMA S, et al. Applying an excessive mechanical stress alters the effect of subchondral osteoblasts on chondrocytes in a coculture system [J]. *Eur J Oral Sci*, 2010, 118(2): 151 - 158.
- [8] 李忠, 杨柳, 戴刚, 等. 关节镜下半月板部分切除制备骨关节炎动物模型 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(10): 919 - 921.

(2013 - 10 - 14 收稿)