

RAW264.7 细胞诱导分化和鉴定

白生宾¹, 钟近洁¹, 陈红香², 唐莉¹, 张亚楼¹, 刘开泰³, 罗学港⁴

1. 新疆医科大学组胚教研室, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆维吾尔自治区人民医院, 乌鲁木齐 830011
3. 中国疾病预防控制中心, 北京 100032
4. 中南大学湘雅医学院, 长沙 410078

摘要 为探讨 RAW264.7 诱导后分化的破骨细胞的鉴定方法, 选出了最优方案, 为破骨细胞的体外功能研究奠定了基础。通过将 RAW264.7 细胞以 5×10^4 接种在 96 孔板, 分别与骨磨片共培养和单独培养, 并取小鼠重组 sRANKL 因子以 100ng/mL 的浓度诱导 10d 后分别进行形态学和功能学鉴定和检测, HE、甲苯胺蓝、TRAP 染色和扫描电镜观察。结果显示, 随着诱导时间的延长, 多核细胞数量增多, 骨吸收陷窝数量增多; 各种方法均可鉴定, HE 染色、甲苯胺蓝染色鉴定方法简单但结果不可靠; 扫描电镜鉴定准确但操作繁琐; TRAP 染色价格较昂贵但结果特异性强、结果准确。研究表明, 从形态学角度鉴定 TRAP 染色为最优, 从功能学角度鉴定扫描电镜为最优。

关键词 RAW264.7; 诱导; 鉴定

中图分类号 Q132.8

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)01-0044-04

RAW264.7 Cell Induced Differentiation and Identification

BAI Shengbin¹, ZHONG Jinjie¹, CHEN Hongxiang², TANG Li¹, ZHANG Yalou¹, LIU Kaitai³, LUO Xuegang⁴

1. Department of Histology and Embryology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. The People's Hospital of Xinjiang Uigur Autonomous Region, Urumqi 830011, China
3. Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100032, China
4. Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China

Abstract This paper studies the identification method by inducing RAW264.7 into osteoclast, to find the best procedure, for in vitro functional researches, as a preferable preosteoclast model in respect of its osteoclast characteristic gene expression profile. The inoculate RAW264.7 in 96 well plates, cultured with the bone ground section, of a concentration of 100ng/mL, was used to induce mouse sRANKL for 10 days, which was then examined with respect to morphology and functional identification and detection, using HE staining, Toluidine Blue staining, TRAP staining and SEM observation. It is concluded that with the increase of the induced time, the number of polykaryocyte cells and the amount of Howship's lacuna increase. Among all kinds of methods of identification, HE staining and Toluidine Blue staining are simple but not reliable; the SEM observation is accurate, but complex; and TRAP staining is accurate and shows strong specificity, but is expensive. The results show that the TRAP staining is the best method in view of morphology identification, SEM observation is the best method in view of functional identification. RANKL can induce RAW264.7 cell into mature osteoclast for morphology and functional identification and detection, which can serve as a basis for our future experimental research about mature osteoclast.

Keywords RAW264.7; induction; identification

收稿日期: 2009-10-20

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30860249)

作者简介: 白生宾, 博士研究生, 研究方向为氟中毒与神经生物学, 电子信箱: bsbxx@126.com; 钟近洁 (通信作者), 副教授, 研究方向为环境与健康, 电子信箱: zhonger@sina.com

破骨细胞是人体生理性骨重建和病理性骨破坏过程中高度特异性且唯一具有骨质吸收功能的多核巨细胞,来源于骨髓单核巨噬细胞系。破骨细胞在骨发育、骨形成、骨吸收和骨量的调节方面起着关键作用。到目前为止,虽然还没有建立成熟的破骨细胞株,但近年来随着对破骨细胞分化调控机制的深入认识,破骨细胞的体外培养基础研究进展迅速,其前体细胞株已建立,需要进一步诱导分化。获得纯度高、分化程度好、有骨吸收功能的破骨细胞非常重要。所以,无论从功能学还是形态学的观察角度分析,成熟的破骨细胞鉴定尤为重要。本课题组应用多种方法客观地综合比较、探讨,期望扬长避短,找到经济、有效、快捷的鉴定方法,为破骨细胞的体外功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器

小鼠破骨前体细胞 RAW264.7(ATCC);抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(Sigma 公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青公司);Forma3131 型 CO₂ 培养箱(美国);倒置相差显微镜 CK×41(Olympus 公司);扫描电子显微镜;透射电子显微镜;超净工作台(上海博讯实业有限公司);小鼠重组细胞核因子 κB 体活化因子配基(sRANKL)(Sigma 公司);超纯水仪(Elix3+Mill-GB,法国 Milipo 二公司);座式自动电热压力蒸气灭菌器(ZDX-35BI 型,上海);电子分析天平(BP221S,美国);低温高速离心机(HC-3018R,中国)。

1.2 骨磨片的制备

取新鲜牛股骨,用技工打磨机将骨皮质分切成约 6mm×6mm 大小,厚约 200μm 的骨片,再用金刚砂石将骨片磨至约 10μm,蒸馏水清洗后浸泡于 DMEM 培养基(含 1mg/mL 氨苄青霉素、1mg/mL 链霉素)中备用。破骨细胞与骨磨片共培养,取 24 孔培养板,每孔加入 1mL 完全 DMEM 培养液,再放入 1 个骨磨片,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 1h,加入 RAW264.7

细胞悬液,每孔加 0.5mL,继续培养。

1.3 RAW264.7 的培养和诱导分化

将 RAW264.7 复苏后,应用高糖 DMEM 进行培养,每隔 2~3d 细胞换液一次,换液之前观察细胞形态、贴壁和生长情况。7~10d 细胞铺满,贴壁完好,即可进行传代。当传代至所需的细胞数量后,将细胞以 5×10⁴/孔接种在 96 孔板,单独培养和与骨磨片共培养,并取小鼠重组 sRANKL 因子以 100ng/mL 的浓度诱导 10d 后,分别进行观察和鉴定。

1.4 RAW264.7 单独培养诱导后的破骨细胞形态观察

直接用倒置相差显微镜观察活细胞,比较细胞形态和数量的变化;其次,通过普通常规的组织学 HE 染色和甲苯胺蓝染色后细胞观察;最后,按照 TRAP 染色试剂盒的说明对诱导前后的细胞形态观察。

1.5 RAW264.7 与骨磨片共培养诱导后的破骨细胞鉴定

采取以下方式进行破骨细胞鉴定:①诱导前后无需染色直接观察;②诱导前后通过普通 HE 染色后细胞观察;③诱导前后通过甲苯胺蓝特殊染色细胞观察;④诱导前后通过扫描电镜细胞观察,把生长有破骨细胞的骨片以 0.25%氢氧化铵超声处理 15min,清除骨片上的破骨细胞,然后以 2.5%戊二醛固定,再经 1%锇酸固定,乙醇系列脱水,醋酸异戊酯置换乙醇,CO₂ 临界点干燥,镀金,观察并摄片。

2 结果与分析

2.1 单独培养诱导前后破骨细胞形态学观察

倒置相差显微镜观察 RAW264.7 细胞的一般特点,复苏后 7~10d 细胞形态呈星形、圆形或不规则形,细胞核 1~2 个,诱导 10d 后,细胞体积增大,细胞的外形仍然呈不规则形,但圆形细胞基本消失,细胞核为多个(图 1 和图 2)。通过常规 HE 染色和特殊甲苯胺蓝染色后观察,发现细胞形态发生了变化,细胞核的着色不清,细胞核与细胞质的界限不清楚,最终导致诱导后细胞观察不明显。但是,通过 TRAP 染色后,随着诱导时间的延长,细胞的体积变大,细胞核清楚,数量增多(图 3)。

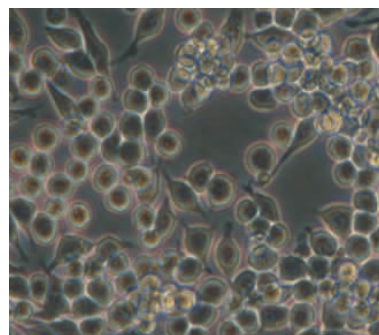


图 1 复苏后的 RAW264.7 细胞
Fig. 1 RAW264.7 cell shape is starlike

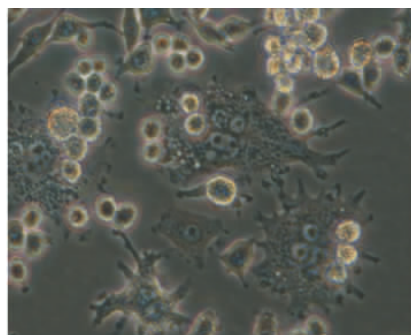


图 2 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞 10d 后
Fig. 2 After inducing RAW264.7 cell for 10 days

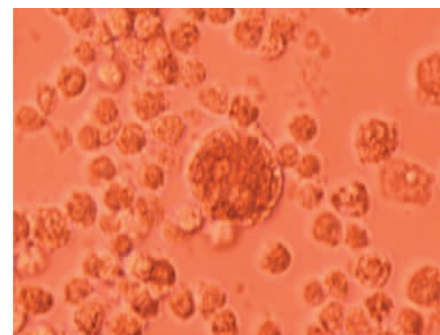


图 3 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞后的 TRAP 染色
Fig. 3 After inducing RAW264.7 cell, TRAP staining shows mature osteoclast

2.2 共培养诱导前后破骨细胞形态学观察

2.2.1 诱导前后无需染色直接观察

诱导前对共培养过程中的贴附骨磨片生长的破骨前体细胞,附着在骨磨片上,细胞形态各异、大小不等,密度较高的是尚未分化为成熟破骨细胞的前体细胞,以至于骨磨片被覆盖,骨单位等结构不是很清楚(图4)。通过对骨磨片0.25%氢氧化铵处理后,无需染色直接进行观察,骨单位结构清楚,骨陷窝明显,并且能够看到吸收陷窝的结构,但特异性不强(图5)。

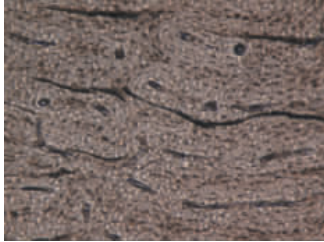


图4 RAW264.7 细胞与骨磨片共培养

Fig. 4 Co-culture: RAW264.7 cell cohere on the bone section

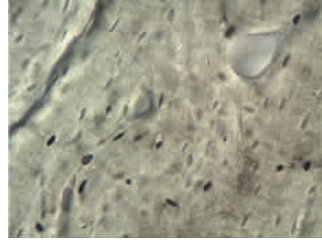


图5 0.25%氢氧化铵处理后的骨片

Fig. 5 After dealing with by 0.25% ammonium hydroxide

2.2.2 诱导后通过普通 HE 染色和甲苯胺蓝特殊染色后形态观察

HE 染色属于组织学普通染色,细胞被染色后,细胞核呈紫蓝色,细胞质为粉红色,中央管和骨陷窝包括骨吸收陷窝被苏木精或者是伊红这些染料所填充表现出紫色或者是红色(图6)。而甲苯胺蓝属特殊染色,也是一种非常简单易行的方法,最终目的也是将甲苯胺蓝这种染料填充于这些空隙之间,使中央管和骨陷窝包括骨吸收陷窝呈现淡蓝色(图7)。

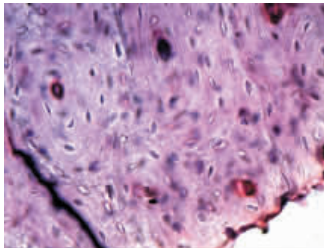


图6 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞后的 HE 染色

Fig. 6 After inducing RAW264.7 cell, HE staining shows Howship's lacuna

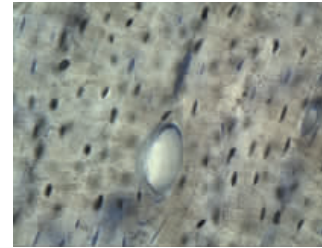


图7 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞后的甲苯胺蓝染色

Fig. 7 After inducing RAW264.7 cell, Toluidine Blue staining shows Howship's lacuna

2.2.3 诱导后通过扫描电镜细胞观察

通过扫描电镜观察,细胞边缘呈指状、刺状或不规则的突起,外形不规则,细胞密度较低是已分化成熟的破骨细胞,

能够形成吸收陷窝(图8)。去除骨片表面的细胞再次进行观察,吸收陷窝边界清楚(图9)。

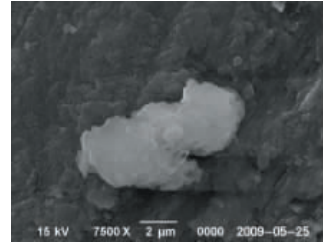


图8 电镜观察残留在骨片上的 RAW264.7 细胞
Fig. 8 RAW264.7 cell remains on the bone section by scanning electron microscope

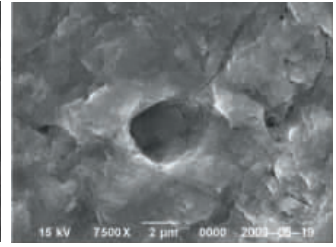


图9 RANKL 诱导 RAW264.7 细胞后电镜观察到的吸收陷窝
Fig. 9 After inducing RAW264.7 cell, observe Howship's lacuna by scanning electron microscope

3 讨论

破骨细胞是负责骨吸收功能的细胞。其前体细胞受多种基因调控的细胞因子直接或间接刺激作用,经增殖、分化、生存与融合发育为多核成熟的破骨细胞。但到目前为止,还没有成熟的破骨细胞株,原代培养比较困难。破骨样细胞 RAW264.7 是小鼠源性破骨前体细胞,来自 Abelson 小鼠白血病病毒所致的肿瘤,被认为代表了早期分化阶段的破骨前身细胞^[1]。所以,想要获得相当数量和纯度的破骨细胞,就需将 RAW264.7 细胞进一步诱导分化。Hsu 等^[2]报道,仅 sRANKL 即可诱导 RAW264.7 细胞成为成熟的破骨细胞。因此,本课题组选用 sRANKL 进行单独诱导。目前对破骨细胞的研究比较多,但对分化过程的各个阶段仍不确定^[3-5]。也有部分国内外专家认为,破骨细胞和成骨细胞是一对相互依存、相互作用的细胞,可进行联合培养,Takahashi 等^[6]、Sandra 等^[7]先后进行了联合培养,结果均表明联合培养后的破骨细胞和成骨细胞分泌的细胞因子可以相互作用,促进双方的生长。但是,分离纯化应用却显得较为困难。基于此,本课题小组应用较为经济、适用的 sRANKL 单独诱导,并对 RAW264.7 诱导后的鉴定方法进行了实验性探讨。

本课题小组主要进行了形态学和功能学两方面鉴定和检测,形态学方面的单独培养、诱导分化鉴定包括 HE 染色、甲苯胺蓝染色、TRAP 染色,而功能学指的是对骨的吸收后骨吸收陷窝的观察,实质也是形态学观察,但需要与骨片共培养。共培养诱导后进行 HE 染色、甲苯胺蓝染色和扫描电镜观察。HE 染色是一种形态学常规染色法,是由苏木精和伊红两种染料将细胞核与细胞质着色的一种方法,在组织学上被广泛使用,但相对来说特异性较差。而甲苯胺蓝染色法是一种特殊染色方法,虽然特殊,但经过试验发现,甲苯胺蓝染色法并不适用于 RAW264.7 细胞的鉴定。TRAP 染色是一种特异性较强染色法。

4 结论

通过综合评价分析,随着诱导时间的延长,多核细胞越明显,骨吸收陷窝越明显;各种方法基本可鉴定,HE染色、甲苯胺蓝染色鉴定简单但主观性比较强,结果不可靠;扫描电镜鉴定准确但操作繁琐;TRAP染色价格较昂贵但结果特异性强、结果准确。本研究结果表明,从形态学角度鉴定TRAP染色为最优;从功能学角度鉴定扫描电镜为较好,但也可在高倍光镜下观察,效果较好。通过对RAW264.7细胞的诱导分化和鉴定,本课题小组成功诱导出成熟的破骨细胞,并对破骨细胞的形态特征、数量及的吸收功能进行了观察,为进一步研究影响破骨细胞功能打下了一定的基础。

参考文献 (References)

- [1] Battaglini R, Kim D, Fu J, *et al.* c-myc is required for osteoclast differentiation[J]. *J Bone Miner Res*, 2002, 5: 763-773.
- [2] Hsu H, Lacey D L, Dunstan C R, *et al.* Tumor necrosis factor receptor

family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3540-3545.

- [3] 于世凤. 破骨细胞与骨吸收[J]. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3(2): 72-74.
Yu Shifeng. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 1997, 3(2): 72-74.
- [4] 文剑明, 郑铭豪. 破骨细胞的形成、功能及细胞因子的调节[J]. 中国骨质疏松杂志, 1998, 4(1): 64-68.
Wen Jianming, Zheng Minghao. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 1998, 4(1): 64-68.
- [5] Masuda K, Ikeuchi M, Koyama T, *et al.* Suppressive effects of anoectochilus formosanus extract on osteoclast formation in vitro and bone resorption in vivo[J]. *J Bone Miner Metab*, 2008, 26(2): 123-129.
- [6] Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, *et al.* Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation[J]. *Endocrinology*, 1998, 123: 2600-2602.
- [7] Orlandini S Z, Formigli L, Benvenuti S, *et al.* Functional and structural interactions between osteoblastic and preosteoclastic cells *in vitro*[J]. *Cell and Tissue Research*, 1995, 281(1): 33-42.

(责任编辑 王芷)

第五届国际先进光学制造 与检测学术会议 AOMATT CHINA 2010

时间: 2010年4月26-29日

地点: 辽宁·大连

主办单位: 中国光学学会(COS) 中国科学院光电技术研究所(IOE)

协办单位: 国家科学技术部 中国科学院等

承办单位: 中国光学学会光学制造技术专委会

联系电话: 028-85100583 电子信箱: yangli@ioe.ac.cn

通信地址: 四川成都双流350信箱(610209)

会议网站: <http://159.226.167.88/aomatt2010/english/index.htm>