

人外周血CD68+单核细胞体外的分选及诱导分化为破骨细胞

破骨细胞(osteoclasts, OC)由造血前单核和巨噬细胞互相融合而成,属单核细胞/巨噬细胞谱系细胞。在体外对于人类OC实验研究中,多数应用外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)诱导分化成为OC作为原代OC的实验模型。有研究发现未经纯化的PBMC中除了OC前体细胞外,还有多种细胞通过这信息通道影响OC分化、成熟[1][2][3]。这对于PBMC中OC前体细胞分化及功能研究带来一定的偏倚因素。所以,有必要选择某种高纯度较为单一细胞作为OC前体细胞的研究对象,并且在混杂因素较少的培养环境中也能分化成为成熟OC。本文旨在探讨用简单有效方法纯化人PBMC中的破骨前体细胞并将之分化成为成熟OC,为进一步开展对人OC生物学特性的认识及相关研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源

本组13例均来自于健康志愿者,其中男8例,女5例,年龄26-35岁,均为早晨空腹抽血,每例抽取肘部头臂静脉全血23 ml。排除抽血前14 d内及去除抽血后14 d内有感染症状者。其中3 ml标本用于血常规分析仪检查,白细胞计数均在正常范围。

1.2 主要实验试剂及仪器

小鼠抗人CD68单克隆抗体、小鼠抗人降钙素受体一抗(Serotec, 英国),抗小鼠IgG的免疫磁珠(DYNAL, 挪威),奈酚 AS- BI磷酸、地塞米松醋酸酯(Sigma),重组人重组人巨细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)、重组人可溶性核因子 κ B受体活化子配体(soluble receptor activator of Nf- κ B ligand, s-RANKL)(PeproTech, 英国),免疫组化染色试剂盒(武汉博士德),流式细胞仪分析仪及抗体均为美国Becton Dickinson公司产品。

1.3 方法

1.3.1 人PBMC分离及细胞分选 将静脉血20 ml用ACD抗凝剂以容积比1:9抗凝处理,常规密度梯度离心分离PBMC,获得PBMC。细胞用PBS液洗涤2遍后,按说明书方法操作并稍加改良分选CD68⁺细胞:PBMC加入RPMI1640培养液1 ml及小鼠抗人CD68一抗6 μ g, 4 $^{\circ}$ C孵育60 min。用含1%胎牛血清RPMI 1640培养液20 ml洗涤2次,加入抗小鼠IgG的免疫磁珠75 μ l, 4 $^{\circ}$ C孵育20 min。其他步骤均按说明书操作方法进行。用于实验的细胞用DNase将结合在阳性选择细胞上的磁珠去除。

1.3.2 流式细胞仪分析 随机抽取4例标本用流式细胞仪分析分选前后细胞的CD68⁺细胞的比例,分选前和分选后的细胞分别加入带有FITC标记小鼠抗人CD68抗体,空白对照为仅加入鼠IgG1。

1.3.3 细胞培养和实验分组 将每例分选获得的细胞分为A₁、A₂、B₁和B₂组并分别接种在加有经多聚赖氨酸处理的盖玻片的6孔培养板中。A₁和A₂组分别接种CD68⁺细胞,B₁和B₂组分别接种CD68⁻细胞。在A₁和B₁组分别加入s-RANKL 16 μ g/L,A₂和B₂组未加入s-RANKL。各孔均加入含10%胎牛血清的 α -MEM(α -minimum essential medium)培养液及最终浓度为地塞米松10⁻⁸mol/L及M-CSF 25 μ g/L, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂环境中培

养。

1.3.4 免疫组化染色 上述细胞培养在2和7 d每组取出爬片4片，用丙酮固定8 min，加入小鼠抗人降钙素受体一抗孵育过夜，SABC免疫组化染色并用DAB显色，阳性细胞显色棕黄色。于倒置显微镜下观察。

1.3.5 抗酒石酸磷酸酶(TRAP)染色 在接种后7 d取出细胞爬片，置于37 °C烘箱中烘烤5min，用2.5%戊二醛4 °C固定10 min后加入孵育液（六偶氮副品红0.2 ml，0.1 mol/ L醋酸钠缓冲液38 ml，奈酚 AS-BI 磷酸盐溶液2 ml，酒石酸钾钠0.388 g，pH5.0）37 °C孵育40 min，双蒸水洗3次，二甲苯透明，光镜观察。

1.3.6 甲苯胺蓝染色 将分选获得的各组细胞重悬浮，经计数稀释至 5×10^4 /ml。接种在加入骨片的24孔培养板中，每孔加入细胞悬液1 ml，按各组加入相应条件培养液中培养，重复4孔。接种后12 h全量换液，换液2 d/次。于14 d后取出培养板中的骨片，2.5%戊二醛固定，超声震荡15 min \times 3次除贴壁细胞，1%甲苯胺蓝染液室温染色，用相差显微镜观察骨片上的吸收陷窝。

1.3.7 扫描电镜观察 接种在骨片上的细胞分别在7及14 d取出培养板中的骨片。用PBS洗涤，用上述方法超声震荡清洗。需要观察骨片上的细胞不作超声清洗处理。按常规方法固定、脱水、临界点干燥、喷金，扫描电镜观察。

2 结果

2.1 流式细胞仪分析结果

正常人PBMC中CD68⁺细胞为 $8.76\% \pm 0.36\%$ (n=4)，免疫磁珠法分选获得CD68⁺细胞流式细胞仪分析，CD68⁺细胞为 $93.06 \pm 0.61\%$ (n=4)。

2.2 细胞培养及TRAP染色结果

分选后获得的CD68⁺细胞如未将结合在细胞膜上的磁珠去除，可见细胞与磁珠结合(图1)。CD68⁺细胞为单核细胞及多核细胞，细胞之间互相融合形成多核细胞，A1组经s-RANKL诱导后形成多核巨噬样细胞，TRAP阳性率 $90.19\% \pm 1.12\%$ (n=13) (图2)；A2组也有多核巨噬样细胞形成，但TRAP染色阴性。上述两组细胞培养10~14 d后，均有部分贴壁细胞开始脱落、飘浮在培养液中，该类细胞用台盼蓝染色有显色，证实为死细胞。分选后获得的CD68⁻细胞主要为单核细胞，B₁和B₂组均没有多核巨噬样细胞形成，TRAP染色均阴性。

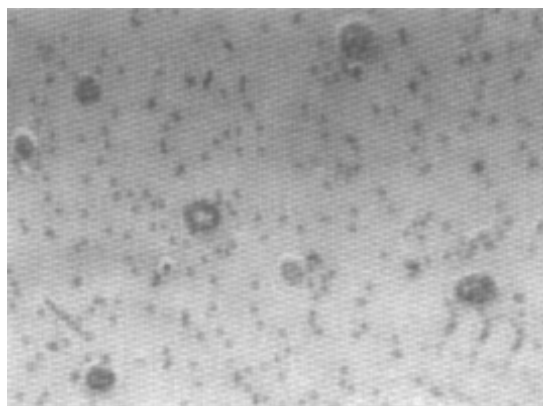


图1 分选后可见磁珠与CD68⁺细胞结合，存在有未与细胞结合的磁珠 (3.3×10^4)

Fig.1 After immunomagnetic sorting, the selected CD68⁺ cells are seen to bind to the magnet beads. Some beads are free of cell binding (3.3×10^4)

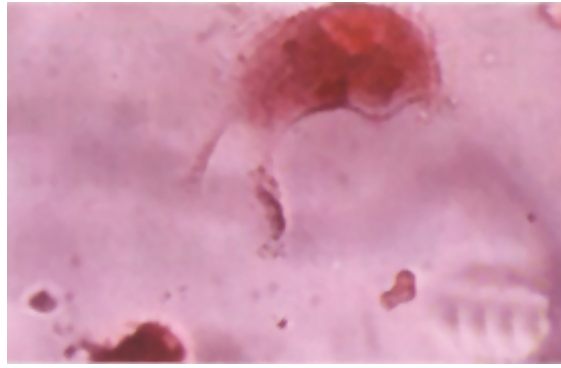


图2 CD68阳性选择细胞TRAP染色 (3.3×40)
Fig.2 Selected CD68⁺ cells after TRAP staining (3.3×40)

2.3 免疫组化及甲苯胺蓝染色结果

A₁和A₂组降钙素受体免疫组化染色均阳性，B₁和B₂组未见降钙素受体免疫组化染色阳性细胞。在A₁组可见在42.31%(22/52)骨片上有骨吸收陷窝形成，其余各组未见骨吸收陷窝。

2.4 扫描电镜观察结果

扫描电镜观察到A₁和A₂组磁珠与细胞之间有丝状连接(图3)。其中A₁组在接种7 d骨片上有骨吸收陷窝形成。如在分选过程中没有将结合在CD68⁺上的磁珠去除，细胞贴壁依然良好，在带有磁珠的CD68⁺细胞接种的骨片上也可见有骨吸收陷窝形成。虽然部分结合在细胞膜表面的磁珠脱落，但也形成骨吸收陷窝。接种14 d观察骨片上所形成骨吸收陷窝，与接种7 d相比骨吸收陷窝较大且深，细胞少，有固缩(凋亡形态改变)，磁珠与细胞之间丝状连接中断。固缩的细胞收缩后仍可见细胞陷入骨片的陷窝中，边缘有整齐的骨陷窝痕迹(图4)。细胞脱落后遗留骨吸收陷窝。除A₁组外，其余各组均没有观察到骨吸收陷窝形成。

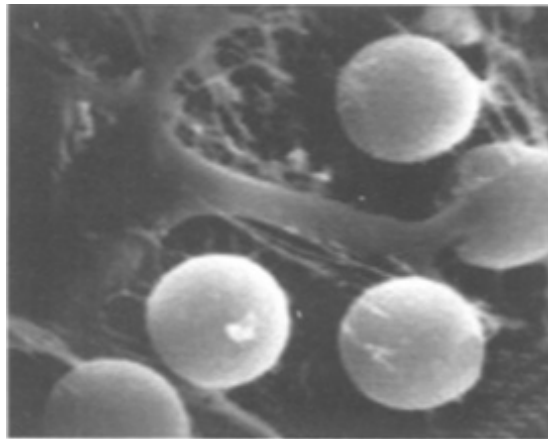


图3 培养7 d后，磁珠与阳性选择细胞膜连接
(扫描电镜，×3 000)

Fig.3 Magnet beads connecting to CD68⁺ cell membrane (scanning electron microscope, ×3 000)

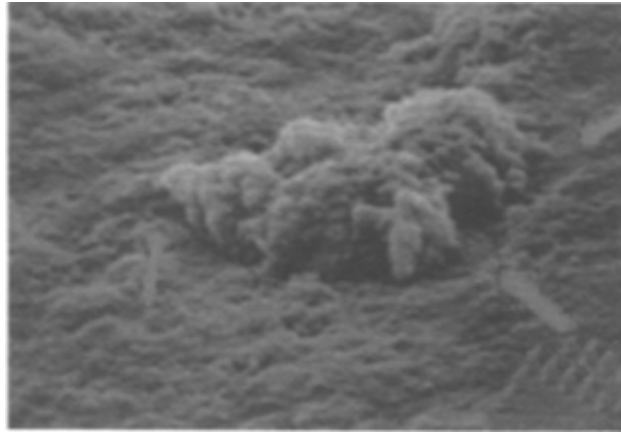


图4 细胞接种在骨片上14 d后可见形态固缩, 边缘可见有骨溶解痕 (扫描电镜, $\times 1\ 000$)
Fig.4 Cell pycnosis and resorption lacunae at the edge of the bone slice after 14 d of cell culture (scanning electron microscope, $\times 1\ 000$)

3 讨论

PBMC中存在OC前体细胞。由于PBMC中如淋巴细胞表达RANKL[2][3], 而CD8⁺淋巴细胞表达OPG[3], B淋巴细胞分泌TGFb[4]等干扰因素, 对于OC前体细胞分化及功能研究带来一定的偏倚。Julian[5]首先用人类PBMC在s-RANKL体外培养获得OC, 从而证实PBMC中的OC前体细胞是通过RANKL信息通道诱导分化成熟。其纯化OC前体细胞方法主要采用贴壁法, 即利用OC前体细胞贴壁快的生物学特性去除未贴壁细胞从而去除PBMC中的非OC前体细胞。这种方法能在一定程度上纯化了OC前体细胞。Nicholson [6]用免疫磁珠法分选PBMC中CD14⁺细胞并证实为OC前体细胞, 在体外培养21 d后有成熟OC细胞形成。这样进一步纯化了PBMC中的OC前体细胞。

一般认为, OC的细胞膜表面的CD分子有CD11b、CD 14[7]与CD68[8]。但是, 在PBMC中表达CD11b⁺、CD14⁺细胞类型复杂, 这类细胞的膜表面上可能同时表达其他抗原。如T淋巴细胞[9]及树突状细胞[10]等表达CD11b⁺、CD14⁺。这类细胞还可能通过表达RANKL或OPG[11] 途径干预OC前体细胞而影响OC分化与成熟。所以, 在细胞分选时考虑这些因素对分选后细胞分化研究的影响, 我们采用CD68⁺细胞。CD68表达于OC, 是多核巨噬细胞共同的抗原[8], 细胞类型较为单一。相对而言, 在PBMC中选择CD 68⁺细胞作为前体细胞的研究可能是较理想方法。

在本研究中发现, PBMC中CD68⁺细胞具有OC前体细胞的特征, 如果没有s-RANKL的诱导不能成为成熟的OC, 即降钙素受体阳性、TRAP阴性、没有骨吸收陷窝形成。虽然地塞米松和M-CSF可促进OC成熟和功能, 但如果没有RANKL的存在OC前体细胞也不能成熟。降钙素受体在OC前体细胞和成熟的OC的细胞膜表面均有表达, 而TRAP、骨吸收陷窝形成是成熟OC标志。这些细胞通过s-RANKL体外诱导分化为抗酒石酸磷酸酶阳性、降钙素受体阳性、多核巨噬样形态并具有形成骨吸收陷窝功能的成熟OC, 具有完善的成熟OC标志。这说明在CD68⁺细胞向成熟的OC分化过程中需要RANKL的诱导作用。

在实验中我们发现到, 由于CD68主要在胞浆内表达, 细胞膜上的表达较弱, 分选时磁珠对细胞的捕获率并不高, 在图1中可见有大量未与细胞结合的磁珠。为此, 我们在多次预实验中摸索出提高抗体的比率及延长孵育时间方法来提高对目的细胞的捕获效能, 取得满意的效果。同时, 我们用该法所分选获得的PBMC的CD68⁺细胞纯度理想, 这与蒋建平等[12]用CD68免疫磁柱法分选人巨噬样滑膜细胞、Nicholson [6]分选PBMC中的CD14⁺细胞的分选效能相似。我们的实验结果显示, 人类PBMC中CD68⁺细胞在体外存活时间不长, 在体外培养10 d后开始出现部分贴壁细胞脱落, 台盼蓝染色显示为死细胞。在体外骨片上培养14 d后扫描电镜上也可见贴壁细胞固缩改变, 与Nicholson[6]用CD14⁺细胞体外诱导的时间不同。这可能是CD14和CD68抗原在向OC分化过程中出现的阶段不同, 即CD68⁺细胞比CD 14⁺细胞分化更为成熟、活力也较差。同时PBMC中某些表达

CD14⁺/CD68⁻的细胞并非OC前体细胞。

成熟OC被认为一种分化终末期的细胞，其活力差、体外培养成功率低。在我们的研究中接种CD68⁺细胞的骨片虽然只有42.3%骨片上有吸收陷窝形成，但在抗酒石酸磷酸酶染色及降钙素受体鉴定阳性率均在85%以上。这证实人PBMC中CD68⁺细胞是一类破骨前体细胞，用该法所获得的高纯度的外周血CD68⁺单核细胞可作为人类破骨前体细胞研究。

(责任编辑：吴锦雅)

参考文献：

- [1] Shinoda K, Sugiyama E, Taki H, et al. Resting T cells negatively regulate osteoclast generation from peripheral blood monocytes[J]. Bone, 2003, 33(4): 711-20.
 - [2] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis[J]. Nature, 1999, 397: 315-23.
 - [3] Choi Y, Woo K M, Ko S H, et al. Osteoclastogenesis enhanced by activated B cells but suppressed by CD8⁺ T cells[J]. Eur J Immunol, 2001, 31: 2179-88.
 - [4] Weitzmann MN, Cenci S, Haug J, et al. B lymphocytes inhibit human osteoclastogenesis by secretion of TGF-beta[J]. J Cell Biochem, 2000, 78(2): 318-24.
 - [5] Julian M W, Quinn JM, Elliott J, et al. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro[J]. Endocrinology, 1998, 139(10): 4424-7.
 - [6] Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, et al. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)[J]. Clin Sci (Lond), 2000 Aug, 99(2): 133-40.
 - [7] Shalhoub V, Elliott G, Chiu L, et al. Characterization of osteoclast precursors in human blood[J]. Br J Haematol, 2000, 111(2): 501-12.
 - [8] Athanasou NA, Quinn J. Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophage polykaryons: immunohistological distinction and implications for osteoclast ontogeny and function[J]. J Clin Pathol, 1990, 43: 997-1003.
 - [9] Fiorentini S, Licenziati S, Alessandri G, et al. CD11b expression identifies CD8⁺CD28⁺ T lymphocytes with phenotype and function of both naive/memory and effector cells[J]. J Immunol, 2001, 166(2): 900-7.
 - [10] Christensen JE, Andreasen SO, Christensen JP, et al. CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8⁺ T cells and memory cells[J]. Int Immunol, 2001, 13(4): 593-600.
 - [11] Kong Y Y, Feige U, Sarosi I, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand[J]. Nature, 1999, 402(18): 304-9.
 - [12] 蒋建平, 杨铁城, 侯凡凡, 等. 人类关节滑膜A型和B型细胞的分离和体外培养[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(1): 52-5.
- Jiang JP, Yang TC, Hou FF, et al. Isolation and culture of human joint type-A and type-B synovial cells. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(1):52-5.

参考文献：

- [1] Shinoda K, Sugiyama E, Taki H, et al. Resting T cells negatively regulate

osteoclast generation from peripheral blood monocytes[J]. *Bone*, 2003, 33(4): 711-20.

[2] Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis[J]. *Nature*, 1999, 397: 315-23.

[3] Choi Y, Woo KM, Ko SH, et al. Osteoclastogenesis enhanced by activated B cells but suppressed by CD8+ T cells[J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31: 2179-88.

[4] Weitzmann MN, Cenci S, Haug J, et al. B lymphocytes inhibit human osteoclastogenesis by secretion of TGF-beta[J]. *J Cell Biochem*, 2000, 78(2): 318-24.

[5] Julian MW, Quinn JM, Elliott J, et al. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(10): 4424-7.

[6] Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, et al. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2000 Aug, 99(2): 133-40.

[7] Shalhoub V, Elliott G, Chiu L, et al. Characterization of osteoclast precursors in human blood[J]. *Br J Haematol*, 2000, 111(2): 501-12.

[8] Athanasou NA, Quinn J. Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophage polykaryons: immunohistological distinction and implications for osteoclast ontogeny and function[J]. *J Clin Pathol*, 1990, 43: 997-1003.

[9] Fiorentini S, Licenziati S, Alessandri G, et al. CD11b expression identifies CD8+CD28+ T lymphocytes with phenotype and function of both naive/memory and effector cells[J]. *J Immunol*, 2001, 166(2): 900-7.

[10] Christensen JE, Andreasen SO, Christensen JP, et al. CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8+ T cells and memory cells[J]. *Int Immunol*, 2001, 13(4): 593-600.

[11] Kong YY, Feige U, Sarosi I, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand[J]. *Nature*, 1999, 402(18): 304-9.

[12] 蒋建平, 杨铁城, 侯凡凡, 等. 人类关节滑膜A型和B型细胞的分离和体外培养[J]. *第一军医大学学报*, 2001, 21(1): 52-5.

Jiang JP, Yang TC, Hou FF, et al. Isolation and culture of human joint type-A and type-B synovial cells. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2001, 21(1): 52-5.