

人外周血 CD68⁺ 单核细胞体外的分选及诱导分化为破骨细胞

曾润铭, 金大地, 张忠民(第一军医大学南方医院脊柱骨科, 广东 广州 510515)

摘要:目的 建立高纯度人活性破骨细胞方法,用于对破骨细胞生物化学和分子生物学的研究。方法 用免疫磁珠法在人类外周血单核细胞中分选出 CD68⁺ 细胞,用流式细胞仪分析分选效能,体外在 10⁻⁸ mol/L 地塞米松及 25 μg/L 巨噬细胞集落刺激因子的培养条件下用 16 μg/L 可溶性核因子 κB 受体活化子配体诱导(s-RANKL)分化,用降钙素受体抗体免疫组化染色及抗酒石酸磷酸酶染色鉴定,扫描电镜观察骨片贴壁细胞及骨吸收陷窝。结果 分选获得 CD68⁺ 单核细胞纯度为 (93.06±0.61)%(n=4),经核因子 κB 受体活化子配体诱导后降钙素受体抗体免疫组化染色阳性,抗酒石酸磷酸酶染色,扫描电镜观察有骨吸收陷窝形成。结论 人外周血单核细胞中 CD68⁺ 细胞是破骨前体细胞,在 RANKL 在诱导下分化为成熟破骨细胞。

关键词: CD68⁺ 细胞;单核细胞;破骨细胞;免疫磁珠

中图分类号:R392.11 文献标识码:A 文章编号:1000-2588(2004)05-0585-04

Induced differentiation of human peripheral blood CD68⁺ mononuclear cells into osteoclasts *in vitro*

ZENG Run-ming, JIN Da-di, ZHANG Zhong-min

Department of Orthopedics and Spine Surgery, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To establish a method for obtaining highly purified primary human osteoclast precursors for the biochemical and molecular biological research. **Methods** CD68⁺ mono/macrophages were separated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donors by means of immunomagnetic cell sorting for subsequent analysis with flow cytometry. The isolated cells were incubated on coverslips or bone slices in the presence of dexamethasone (10⁻⁸ mol/L), macrophage colony-stimulating factor (25 μg/L) and soluble receptor activator of nuclear factor (NF)-κB ligand (s-RANKL, 16 μg/L). Calcitonin receptor (CR) immunocytochemistry and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) histochemistry were employed. The bone slices were also studied by scanning electron microscopy (SEM). **Results** Fluorescence-activated cytometric analysis showed that 93.06%±0.61%(n=4) of the selected cells were CD68⁺ cells. After 7 days of culture of the CD68⁺ cells, VR⁺, TRAP⁺ multinucleated giant cells appeared, and resorption lacunae could be observed by SEM. **Conclusion** Highly purified CD68⁺ cells can be obtained from human PBMCs as the osteoclast precursors, and mature osteoclasts can be induced from CD68⁺ mono/macrophages by RANKL.

Key words: CD68-positive; mononuclear cell; osteoclast; immunomagnetic

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^[1-3]。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 例均来源于健康志愿者,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),重组人重组人巨噬细胞集落刺激因子(macrophage

收稿日期:2004-01-11

作者简介:曾润铭(1967-),男,1989年毕业于汕头大学医学院,主治医师,现为第一军医大学在读硕士研究生,电话:020-61641725, E-mail: hosward@21cn.com

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 $^{\circ}$ C 烘箱中烘烤 5 min, 用 2.5% 戊二醛 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 \times 10⁴/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。

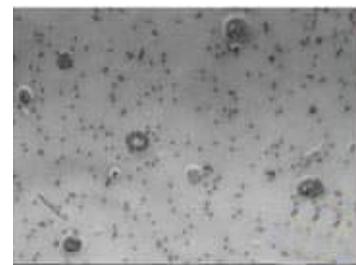


图 1 分选后可见磁珠与 CD68⁺ 细胞结合, 存在有未与细胞结合的磁珠 (3.3 \times 10)

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 \times 10)



图 2 CD68 阳性选择细胞 TRAP 染色 (3.3 \times 40)

Fig.2 Selected CD68⁺ cells after TRAP staining (3.3 \times 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。

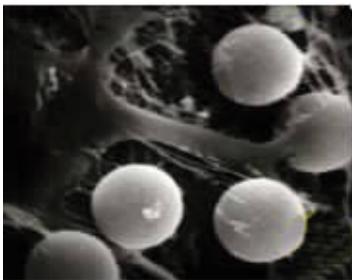


图 3 培养 7 d 后, 磁珠与阳性选择细胞膜连接 (扫描电镜, ×3 000)

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, ×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, ×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 TGFβ^[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 CD68⁺ 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^[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。

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.* OPG 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.

(责任编辑:吴锦雅)