

骨细胞图谱

与骨细胞体外培养技术

AN ATLAS OF BONE CELLS

& CELL CULTURE TECHNIQUES

主编 王洪复

上海科学技术出版社

骨细胞图谱

与骨细胞体外培养技术

An Atlas of Bone Cells & Cell Culture Techniques

主 编	王洪复	
副 主 编	金慰芳	高建军
主 审	钟慈声	
作 者	王洪复	金慰芳
	高建军	于明香
	魏道林	李凌波
	高艳虹	

上海科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术 / 王洪复主编.

上海: 上海科学技术出版社, 2001.7

ISBN 7-5323-5926-3

I. 骨… II. 王… III. ①骨-细胞-图谱②骨-细胞-体外-细胞培养 IV. Q441-64

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 032076 号

上海科学技术出版社出版、发行

(上海瑞金二路 450 号 邮政编码 200020)

上海质胜印刷有限公司印刷

新华书店上海发行所经销

2001 年 7 月第 1 版 2001 年 7 月第 1 次印刷

开本 787 × 1092 1/16 印张 6

印数 1-3 000

定价: 48.00 元

本书如有缺页、错装或损坏等严重质量问题,
请向本社出版科联系调换

内 容 提 要

本书分三部分。第一部分为骨细胞图谱,包括成骨细胞和破骨细胞的活体观察、扫描电镜观察、超微结构、细胞化学染色和功能表达等形态照片,共80余幅。第二部分介绍骨细胞体外分离培养技术,如酶消化法、组织贴块法培养成骨细胞,机械分离法培养破骨细胞。第三部分介绍骨细胞鉴定与功能检测技术,除较为详细介绍应用形态观察、标志酶染色和受体检测等方法鉴定成骨细胞和破骨细胞外,着重介绍了成骨细胞骨形成功能和破骨细胞骨吸收功能以及凋亡的检测技术。

本书是作者多年来从事骨细胞生物学研究的经验积累,是实验中所拍摄骨细胞照片的精选。内容新颖,图象清晰,具有形态和功能相结合和全面、实用的特点。是细胞生物学、骨代谢相关学科基础研究工作者的参考工具书,亦可供骨科、骨质疏松症等代谢性骨病临床医师参考。



主 编 简 介

王洪复, 教授, 博士生导师。江苏武进人, 1936年生, 1961年毕业于上海第一医学院。1982~1983年和1992年分别赴美国和日本学习。曾任上海医科大学放射医学研究所所长, 上海市原子核学会副理事长, 中华医学会放射医学与防护分会常务委员, 上海医科大学专家委员会委员, 老年医学研究中心副主任。现任骨代谢研究室主任, 并担任中华医学会骨质疏松与骨矿盐疾病分会常务委员、中华医学会老年医学分会委员和代谢性骨病学组组长、上海市医学会老年医学与保健学会委员和上海市骨质疏松学会副主任、中国骨质疏松杂志副主编。多年来主要从事放射损伤病理生理、骨代谢基础与骨质疏松症诊断、防治研究, 在全国较早建立骨细胞生物学实验室, 先后主持国家自然科学基金等研究项目10余项, 获7项科技成果, 其中4项获国家教委和上海市科技进步奖。发表论文80余篇。培养硕士生和博士生20名。1992年10月授予国务院有突出贡献证书和享受政府特殊津贴, 1995年和1998年两次被评为上海医科大学优秀博士生导师, 并授予先进教育工作者称号。

序 一

5

骨质疏松症包括原发性骨质疏松症和继发性骨质疏松症,在中老年人群中的发生率很高。骨质疏松症,由于其相关的骨折并发症,对老年人的健康和生活造成严重威胁。随着社会老龄人口比例的日益增高,重视对老年人骨质疏松症与其骨折的防治是我们所面临的一项艰巨任务。建立骨细胞体外培养实验技术和生物学功能检测方法,对在细胞与分子水平上认识骨吸收与骨形成机制、骨质疏松症的病理生理、诊断和防治具有十分重要的意义。我国在这一领域中的研究起步较晚,与国外先进水平相比尚有较大差距。

本书作者在国内较早建立成骨细胞和破骨细胞体外培养的实验技术,并建立了较完整的细胞鉴定和生物学功能检测方法,收集了在基础研究中积累的成骨细胞和破骨细胞不同功能状态的照片。资料十分珍贵,值得基础研究和临床工作者一读。

健康长寿需要强壮的骨骼。希望我国骨代谢和代谢性骨病的基础与临床研究者在防治广大中老年人的骨质疏松症和面向国际先进水平中,不断创新,不断前进!

中国科学院院士
复旦大学医学院(原上海医科大学)附属中山医院骨科教授

陈中伟

2000年8月

序二

骨细胞生物学功能(破骨细胞骨吸收、成骨细胞骨形成)对人体骨代谢平衡和骨骼的健康发育至关重要。近20余年来,随着细胞体外培养实验技术和分子生物学实验技术的发展,骨细胞的体外培养技术也得到迅速发展,并应用于骨细胞生物学功能的分子机制研究,且取得长足进步。成骨细胞和破骨细胞是一类生物学功能很活跃的细胞,受全身骨代谢调节激素和局部因子的影响,并通过偶联机制相互调控。近年来研究的由成骨细胞合成分泌的破骨细胞分化因子和破骨细胞分化抑制因子就是骨重建细胞偶联分子机制的一种新发现,也是骨细胞分子生物学研究中的一大进展。在细胞和分子水平上的骨代谢基础研究同时大大促进了对一些代谢性骨病病理机制的认识和骨质疏松症防治药物的研究,新型有效防治骨质疏松症的药物不断出现,因而对此病的防治效果也有了明显提高。

综上所述,建立骨细胞体外培养技术是开展骨细胞生物学、骨代谢分子生物学机制和骨质疏松症防治药物研究的基础。复旦大学医学院(原上海医科大学)王洪复教授创建的骨代谢研究室是国内较早建立的骨细胞生物学实验室,长期不懈地开展骨细胞体外培养和生物学功能实验研究,获得了大量宝贵的资料,取得了一系列重要的科研成果。本书正是他们多年来在实验研究中所积累的经验 and 成果的一个缩影。

7

本书内容全面,图片清晰,通过这些图谱的示范,以及通过骨细胞体外培养技术的应用和发展,可以使人们不仅能直观、静态地从形态、生化特点和基因表达等表型及功能特点上了解各种骨细胞的特征并进行鉴别,更能动态地观察成骨细胞、破骨细胞在生理、病理过程中及药物处理后细胞数量、形态和代谢反应,尤其是功能活性上所发生的一系列改变。这对于了解成骨细胞和破骨细胞的分化、成熟、作用机制、相互之间的调控关系,在骨的正常发育及骨折愈合、代谢性骨病中的发病意义以及药物治疗的机制诸方面都有重要的价值。

该书还介绍骨细胞体外培养实验技术和常用试剂配制、骨片制作方法等内容,这对开展骨细胞体外培养工作的单位更具实用性。

本书对从事骨代谢基础研究的科研人员来说无疑是一本难得的参考工具书。希望此书的出版能对我国骨代谢基础研究和代谢性骨病的临床诊治起到积极的推动作用。

上海第二医科大学瑞金医院教授
上海市内分泌研究所名誉所长

陈家伟

2000年8月30日

前言

骨的机械功能和代谢功能在人的生命活动和健康长寿中的作用举足轻重。为适应骨的这种生物学功能,骨组织的细胞、基质结构及其联络和调控机制十分精细复杂,并通过不断地进行骨重建(remodeling)维护骨的坚韧性和代谢的平衡。骨重建是骨质不断地被吸收和形成的过程,包括基本多细胞单元(basic multicellular units, BMU)的激活(activation)、吸收(resorption)和形成(formation)等主要阶段。基本多细胞单元中的破骨细胞群(osteoclasts)负责骨吸收,成骨细胞群(osteoblasts)负责骨形成。许多生理、病理和环境因素可影响骨细胞的生物学功能和骨的组织结构。当骨吸收过分活跃或骨形成功能不良时,则造成骨量过度丢失,发生骨质疏松症。而破骨细胞骨吸收功能障碍,则可造成骨量过高,发生骨硬化症。然而骨重建失衡的细胞分子机制尚未清楚阐明。

为深入认识骨质疏松症等代谢性骨病病理生理的细胞分子机制和有效防治药物,建立骨细胞体外培养和生物学功能的检测实验技术十分重要。国外在该领域中的研究进展较快,近20多年来在骨吸收和骨形成的分子机制、骨质疏松症防治药物研究等方面取得了长足进步。我国在细胞分子水平上的骨代谢基础研究起步较晚,与发达国家比较尚有相当差距。本书作者致力于骨细胞生物学实验研究,先后建立了成骨细胞和破骨细胞体外培养实验技术及其生物学功能检测方法。应用骨细胞体外培养和生物学功能检测方法先后完成了国家自然科学基金、“九五”攻关项目、博士点基金和上海市科委、教委等十余项科研任务,同时培养了一批硕士生和博士生,使骨代谢基础研究和骨质疏松症防治药物的细胞药效研究大大向前迈进一步。

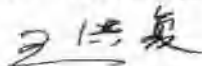
本书收集了本实验室在实验研究中拍摄的成骨细胞和破骨细胞不同功能状态的照片,共80余幅,并简要介绍骨细胞体外培养实验技术和生物学功能检测方法,以期对我国骨代谢基础研究和代谢性骨病的防治起到有益作用。在电镜标本制作和观察研究中得到复旦大学医学院(原上海医科大学)电镜中心老师的指导和帮助,特致深切感谢。

鉴于作者水平有限,本书不足之处在所难免,恳请专家和同道指正。

我们十分荣幸地特邀我国著名骨科专家、中国科学院院士陈中伟教授和我国著名内分泌学专家、上海第二医科大学陈家伦教授为本书作序。在初稿完成后,特聘请复旦大学医学院病理形态学专家钟慈声教授进行了仔细审阅和修改。在此特致诚挚谢意!

为本书的出版,日本帝人株式会社和旭化成株式会社热忱予以资助,一并表示感谢。

复旦大学医学院(原上海医科大学)老年医学研究中心副主任
骨代谢研究室主任



2000年8月18日

目 录

1. 骨细胞图谱	1
1.1 成骨细胞	2
成骨细胞组织切片染色(图1)	2
成骨细胞体外培养增殖矿化过程(图2)	3
成骨细胞扫描电镜图(图3)	4
重叠生长成骨细胞扫描电镜图(图4)	4
分裂相成骨细胞扫描电镜图(图5)	5
衰老成骨细胞扫描电镜图(图6)	5
大鼠骨细胞扫描电镜图(图7)	6
游离状态成骨细胞透射电镜图(大鼠,第2继代)(图8)	7
游离状态成骨细胞透射电镜图(图9)	8
贴壁状态成骨细胞透射电镜图(大鼠,第2继代)(图10)	9
诱导分化成骨细胞透射电镜图(图11)	10
衰老成骨细胞透射电镜图(图12)	11
人成骨细胞透射电镜图(49岁,男性)(图13)	12
人成骨细胞透射电镜图(49岁,男性)(图14)	13
成骨细胞细胞骨架激光共聚焦显微图(图15)	14
成骨细胞碱性磷酸酶染色(钙钴法)(图16)	14
成骨细胞碱性磷酸酶染色(偶氮偶联法)(图17)	15
成骨细胞基质前体PAS染色(图18)	15
矿化结节茜素红染色(图19)	16
矿化结节茜素红染色(图20)	16
矿化结节四环素染色(图21)	17
矿化结节药物诱导(图22)	17
矿化结节形成过程(图23)	18
1.2 破骨细胞	19
破骨细胞组织切片染色(图24)	19
破骨细胞活体动态观察(图25)	20
破骨细胞Giemsa染色(图26)	21
破骨细胞HE染色(图27)	21
破骨细胞甲苯胺蓝染色(图28)	22
破骨细胞酸性磷酸酶(ACP)染色(图29)	22
破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色(图30)	23
破骨细胞TRAP染色(图31)	24

破骨细胞 TRAP 染色 (图 32)	25
破骨细胞 TRAP 染色 (图 33)	26
破骨细胞抗酒石酸酸性腺苷三磷酸酶 (TrATP) 染色 (图 34)	27
破骨细胞扫描电镜图 (图 35)	28
破骨细胞扫描电镜图 (图 36)	28
破骨细胞超微结构 (图 37)	29
破骨细胞超微结构 (图 38)	30
破骨细胞超微结构 (图 39)	31
破骨细胞超微结构 (图 40)	32
破骨细胞微管结构 (图 41)	33
破骨细胞 F-actin 分布 (图 42)	34
破骨细胞降钙素受体免疫组化染色 (图 43)	35
破骨细胞骨吸收状态 (图 44)	36
破骨细胞骨吸收状态 (图 45)	36
骨片吸收陷窝 (图 46)	37
骨片吸收陷窝 (图 47)	38
骨片吸收陷窝 (图 48)	39
骨片吸收陷窝 (图 49)	40
骨片吸收陷窝 (图 50)	41
骨片吸收陷窝 (图 51)	42
骨片吸收陷窝 (图 52)	43
破骨细胞降钙素反应 (细胞形态) (图 53)	44
破骨细胞降钙素反应 (细胞骨架) (图 54)	45
破骨细胞对双膦酸盐反应 (形态) (图 55)	46
破骨细胞对双膦酸盐反应 (凋亡) (图 56)	47
破骨细胞凋亡 (图 57)	48
破骨细胞 TUNEL 染色 (图 58)	49
破骨细胞凝胶纯化培养观察 (图 59)	50
破骨细胞诱导培养观察 (图 60)	51
2. 骨细胞体外培养技术	53
2.1 成骨细胞体外培养技术	54
2.1.1 酶消化法 (新生大鼠)	54
2.1.2 组织贴块法 (成人松质骨)	54
2.2 破骨细胞体外培养技术	55
2.2.1 机械分离培养法	55
2.2.2 骨髓诱导培养法	56
2.2.3 凝胶纯化培养法	57
3. 骨细胞鉴定与功能检测技术	59
3.1 成骨细胞鉴定与功能检测技术	60

3.1.1 形态观察	60
3.1.2 细胞骨架	61
3.1.3 碱性磷酸酶 (ALP) 染色	61
3.1.4 基质前体染色	62
3.1.5 矿化结节染色	62
3.1.6 雌激素受体测定	63
3.1.7 增殖率测定 (MTT 法)	63
3.1.8 碱性磷酸酶 (ALP) 活性定量检测 (PNPP 法)	63
3.1.9 分泌蛋白测定	64
3.1.10 相关基因 mRNA 测定	64
3.1.11 矿化结节计数	64
3.1.12 钙摄取功能测定	64
3.2 破骨细胞鉴定与功能检测技术	65
3.2.1 形态特征	65
3.2.2 细胞骨架	65
3.2.3 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色	66
3.2.4 抗酒石酸酸性三磷酸腺苷酶 (TrATP) 染色	66
3.2.5 降钙素受体染色	67
3.2.6 降钙素反应 (应答)	68
3.2.7 骨片 (象牙片) 吸收陷窝	68
3.2.8 抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) (+) 细胞计数	68
3.2.9 破骨细胞凋亡检测	69
3.2.10 骨片吸收陷窝分析	69
3.2.11 破骨细胞标志酶 mRNA 水平测定	69
主要参考文献	71
附录	75
1. 常用名词术语英汉对照	76
2. 常用试剂配制	80
3. 骨片 (象牙片) 和薄玻片制备	81
4. 实验室基本仪器	82

1.骨细胞图谱

1.1 成骨细胞

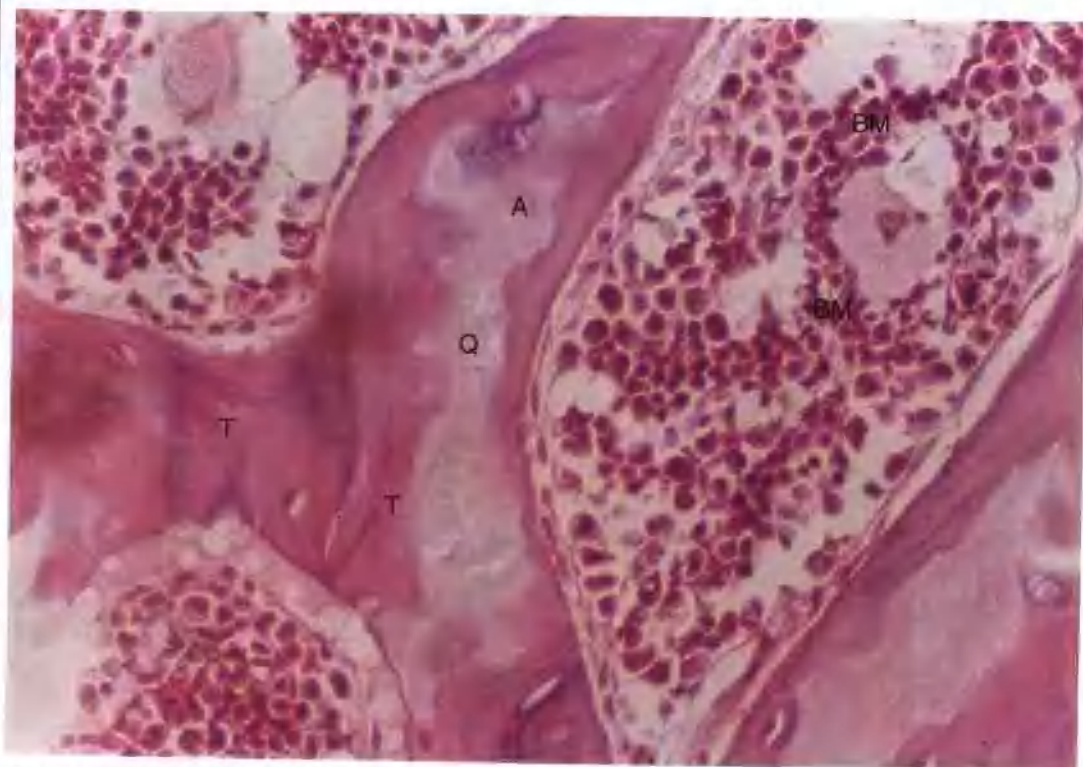


图1 成骨细胞组织切片染色

大鼠椎骨纵切面 HE 染色示组织中静息成骨细胞(Q)、活跃成骨细胞(A)、骨小梁(T)和骨髓(BM)(100 ×)

Fig.1 A histological section of a rat vertebra(HE stain) showing the quiescent(Q),the active(A) osteoblasts, the trabecula(T) and the bone marrow(BM)(100 ×).

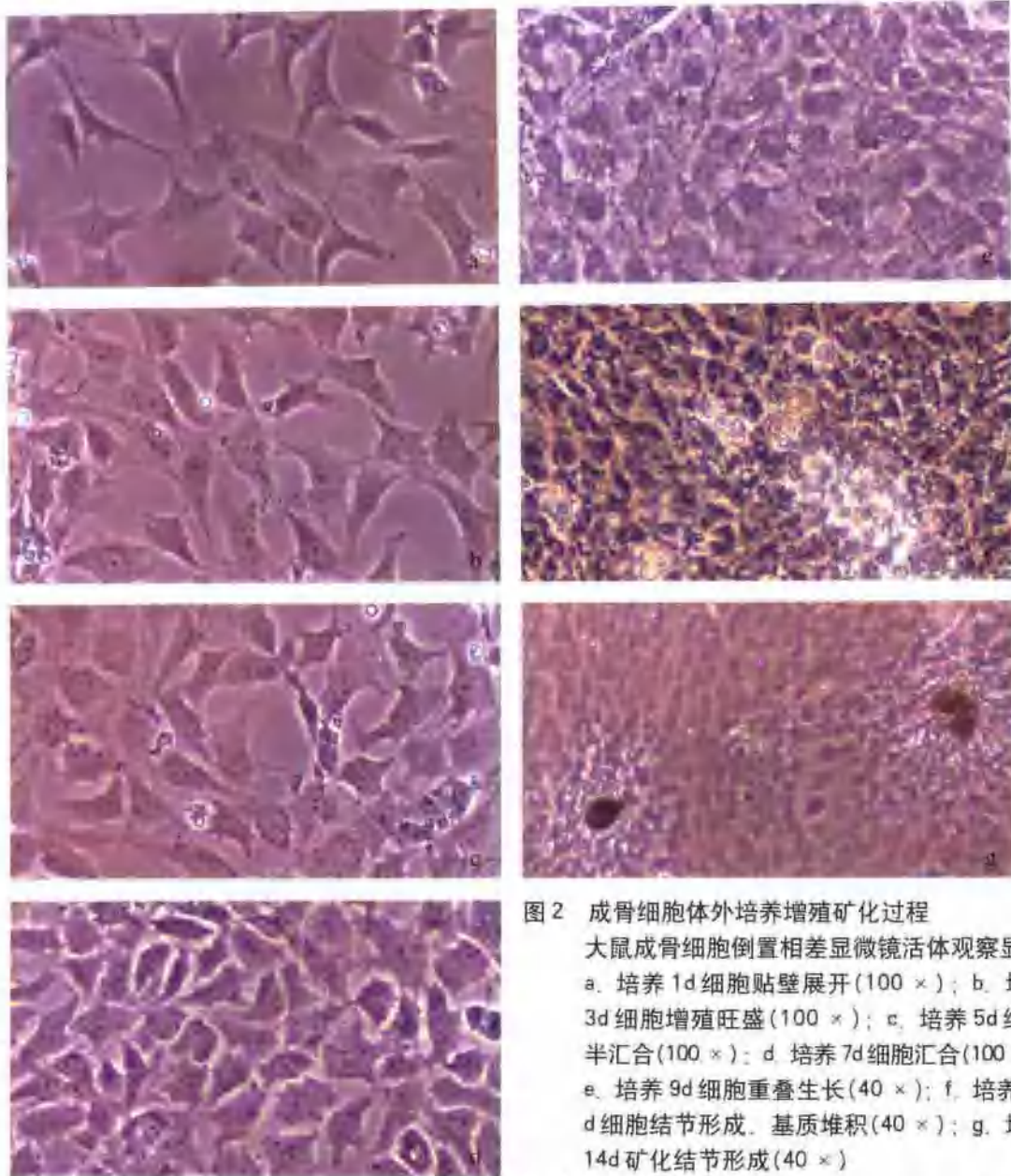


图2 成骨细胞体外培养增殖矿化过程
大鼠成骨细胞倒置相差显微镜活体观察显示：
a. 培养1d细胞贴壁展开(100×)；b. 培养3d细胞增殖旺盛(100×)；c. 培养5d细胞半汇合(100×)；d. 培养7d细胞汇合(100×)；e. 培养9d细胞重叠生长(40×)；f. 培养12d细胞结节形成，基质堆积(40×)；g. 培养14d矿化结节形成(40×)

Fig.2 Phase-contrast micrographs of rat calvaria-derived osteoblasts in vitro showing (a) attachment and spreading in 1day, (b) proliferation in 3days, (c) half-confluence in 5 days, (d) confluence in 7 days, (e) merging in 9days, (f) matrix deposit in 12days, (g) mineralization node formation in 14days

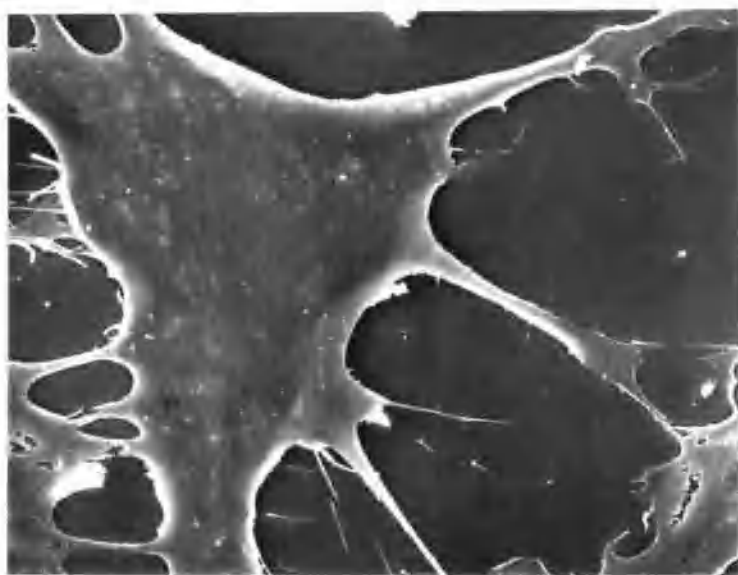


Fig.3 A scanning electron micrograph of a cultured rat osteoblast showing protrusions

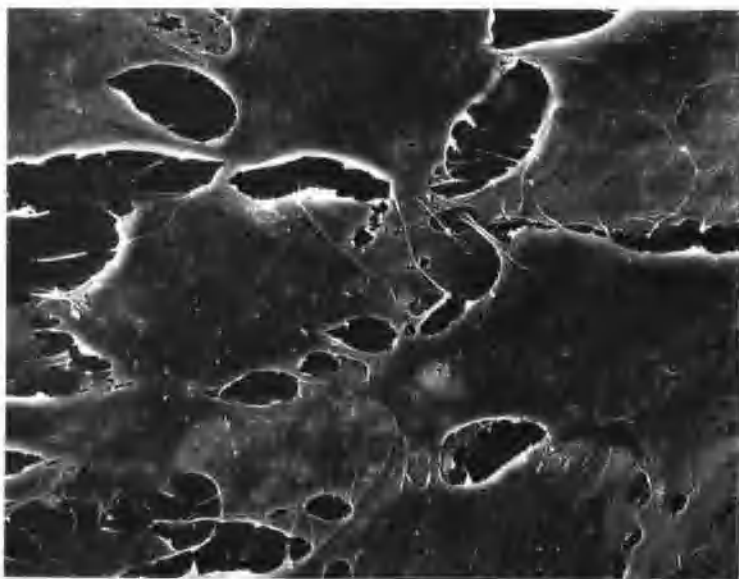


Fig.4 A scanning electron micrograph of merging osteoblasts showing the join of cell protrusions and the overlap of cells

图5 分裂相成骨细胞扫描电镜图
示大鼠成骨细胞表面大量针状突起

Fig.5 A scanning electron micrograph of a fissional osteoblast showing abundant microvilli

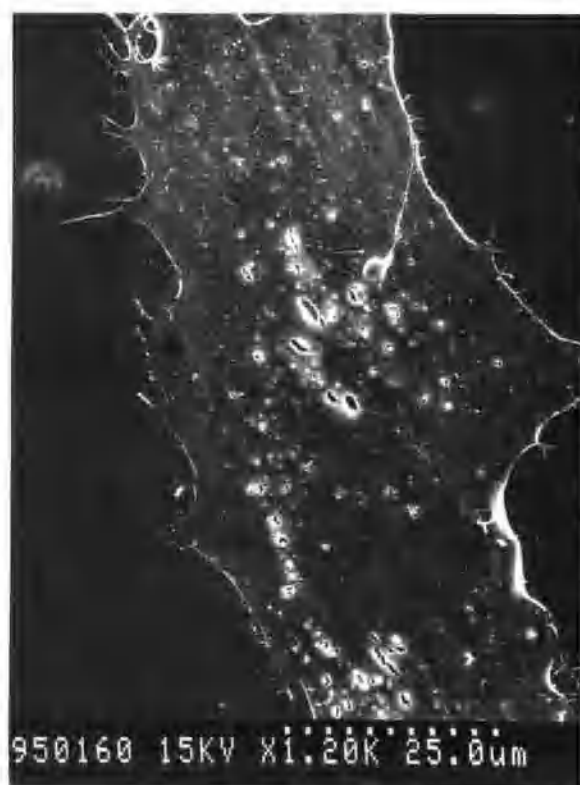
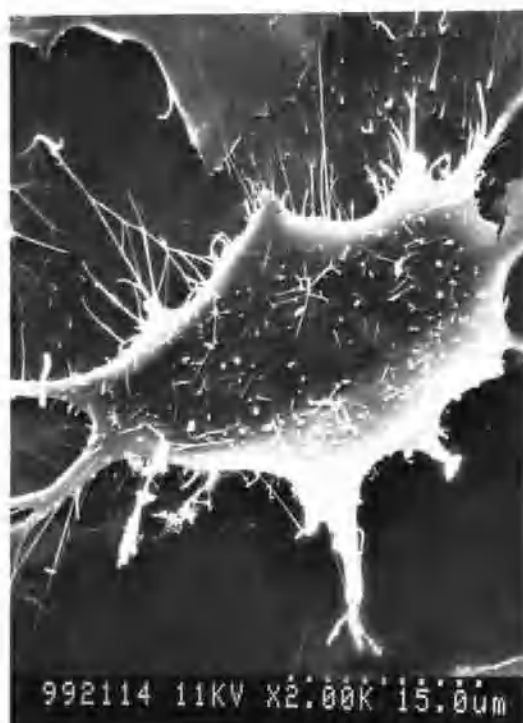


图6 衰老成骨细胞扫描电镜图
显示25继代大鼠成骨细胞胞体扁平,
突起减少

Fig.6 A scanning electron micrograph of an aged osteoblast of rat in the 25th passage cultures. It shows flater cell body and fewer microvillus

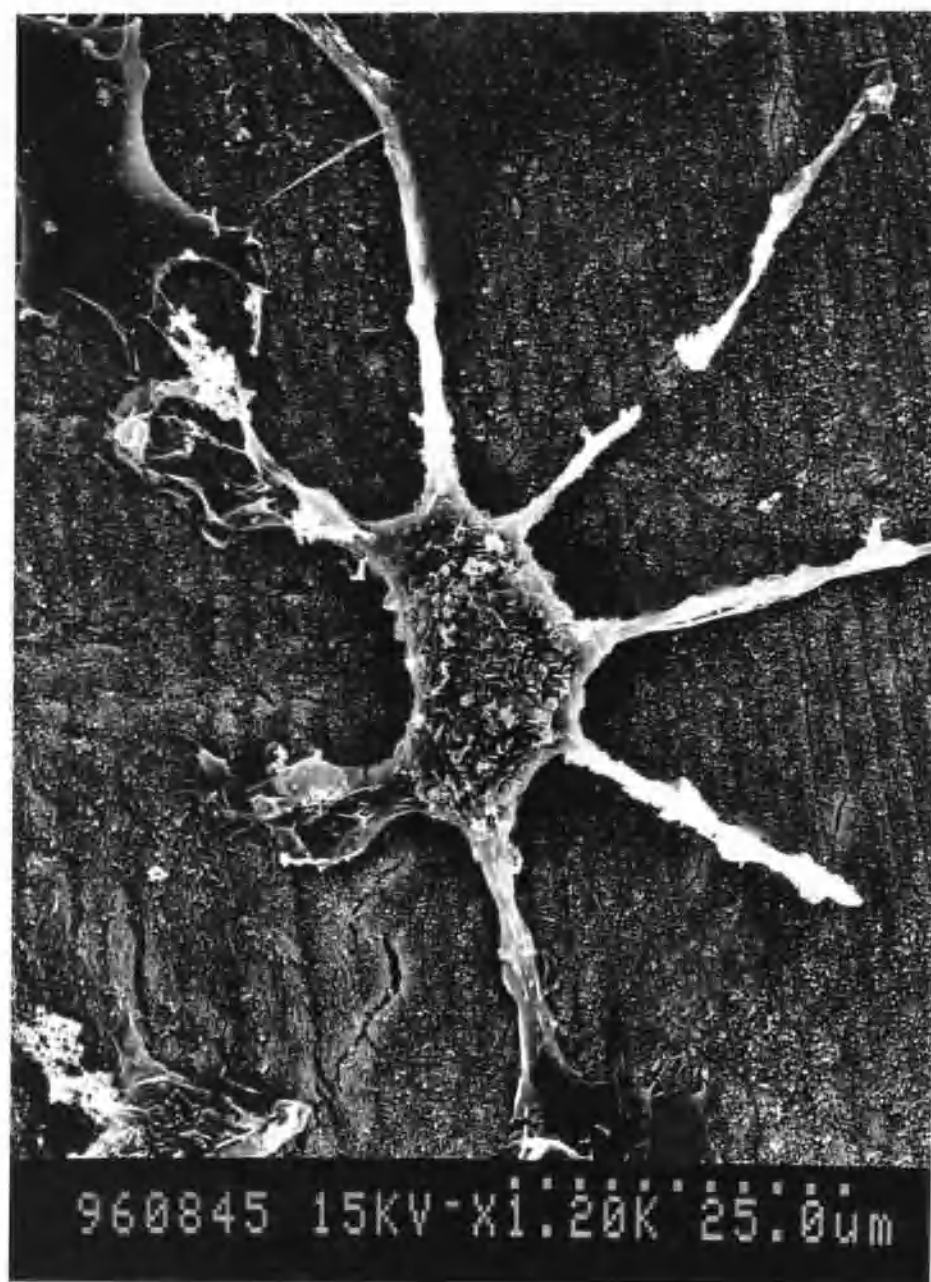


图7 大鼠骨细胞扫描电镜图

Fig.7 A scanning electron micrograph of a rat osteocyte