

破骨细胞诱导实验方案

破骨细胞来源

破骨细胞是由骨髓中的髓系祖细胞(HSC)分化而成的单核巨噬细胞(Macrophage)相互融合,所形成的多核巨细胞(Osteoclast),直径 100 μ m, 含有 2~50 个紧密堆积的核。早期未成熟的增殖性单核吞噬细胞被称为破骨细胞前体, 在各种化学因子、转录因子、细胞因子等信号因子的刺激下融合为多核细胞并最终活化为破骨细胞。两个最主要的因子: M-CSF 和 RANKL。

目前, 破骨细胞的培养方法主要有: 骨髓机械分离法, 骨髓细胞诱导法, 脾干细胞诱导法, 血液单核细胞诱导法, 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 诱导法及骨巨细胞瘤分离法。

试剂配制

- 1) Raw264.7 细胞培养基: DMEM+10% FBS (Corning, 35-081-CV) +1% P/S。
- 2) 原代小鼠骨髓单核细胞培养基: 1640+20% FBS (Corning, 35-081-CV) +1% P/S+10 mM HEPES。
- 3) PNPP 母液 (0.1 g/mL) : 称 PNPP 1 g, 加入去离子水 10 mL, 分装-20 $^{\circ}$ C避光保存。
- 4) 2.5 M NaOH: NaOH 5 g, 加入去离子水定容至 50 mL, 常温保存。
- 5) 0.1 M 柠檬酸: 称取 0.96 g 柠檬酸 (WM 192.12) , 加去离子水定容至 50 mL。
- 6) 0.1 M 柠檬酸钠: 称取 1.29 g 柠檬酸 (WM 258.07) , 加去离子水定容至 50 mL。
- 7) 0.1 M 柠檬酸缓冲液 (pH4.6) : 18.4 mL 0.1 M 柠檬酸+21.6 mL 0.1 M 柠檬酸钠。
- 8) 裂解液 lysis buffer: 称取 0.62 g 酒石酸钠, 加入约 40 mL 0.1 M 柠檬酸缓冲液, 再加入 40 μ L Triton X-100, 溶解后 0.45 滤膜过滤后 4 $^{\circ}$ C保存 (0.1% Triton X-100+80 mM 酒石酸钠) 。

RAW264.7 诱导方法

- 1) RAW264.7 细胞铺板: 用吸管或移液管轻轻成片吹下, 无需胰酶消化 (胰酶会刺激分化) , 接种 2,000-5,000 个细胞到 24 孔板中 (细胞一定要吹散成单个细胞后再接种) , 代次小于 P10, 500 μ L/孔。注: 超过 3 天不传代细胞容易分化; 传代/接种密度要高, 密度低容易分化; 这个细胞增殖较快, 培养基消耗快容易变黄, 要勤换液。
- 2) 大概 4 h 后 (细胞基本完全贴壁) , 加入 50 ng/mL RANKL 的 DMEM 完全培养基, 每孔加入 500 μ L/24 孔板, 37 $^{\circ}$ C CO₂ 培养箱培养。
- 3) 隔天换液, 诱导 5-7 天观察, 并采用 TRACP 抗酒石酸酸性磷酸酶定量方法或 TRAP 染色试剂盒 (Solarbio, G1492) 验证破骨细胞诱导效果。

骨髓细胞诱导方法

- 1) BALB/C 小鼠, 6-8 周龄, 在无菌条件下, 取出大鼠大腿骨和胫骨, 去净骨表面的软组织, 用无菌 PBS 反复冲洗 2-3 次, 分别将大腿骨和小腿骨的两端剪掉, 用 2 mL 的注射器吸取提前预冷的 PBS, 对着一端冲洗出, 反复冲洗骨髓细胞, 直至骨头发白, 收集至 15 mL 离心管。
- 2) 过 40 μ m 的细胞滤网, 300 g 离心 5 min。

- 3) 用 200 μ L 预冷的 PBS 重悬细胞, 加入 1 mL 红细胞裂解液 (Solarbio, R1010), 轻轻吹打, 裂解 5 min。本步骤在 37 $^{\circ}$ C 或 4 $^{\circ}$ C 操作均可。
- 4) 加入 20 mL PBS 清洗一次。
- 5) 重复步骤 4。
- 6) 300 g 离心 5 min (4 $^{\circ}$ C 离心效果更佳), 弃上清, 加入 1 mL 完全培养基 (1640+20% FBS+1% P/S+10 mM HEPES) 重悬, 计数后接种至 6 孔板中, 每孔补充培养至 2 mL, 同时在培养基中加入 40 ng/mL 的 M-CSF(巨噬细胞集落刺激因子), 在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养过夜。
- 7) 第二天可观察到有大量未贴壁的悬浮细胞, 计数, 在 24 孔板中每个孔铺约 10,000 个细胞, 同时在培养基中加入 40 ng/mL 的 M-CSF 和 50 ng/mL 的 RANKL 进行破骨细胞诱导。
- 8) 隔天换液, 诱导 5-7 天观察, 并采用 TRACP 抗酒石酸酸性磷酸酶定量方法或 TRAP 染色试剂盒 (Solarbio, G1492) 验证破骨细胞诱导效果。