

培养破骨细胞扫描电镜样本制备方法的探讨 *

白生宾^{1,2} 陈红香³ 钟近洁^{1△} 冯树梅¹ 李 甜¹ 罗学港²

(1 新疆医科大学基础医学院组胚教研室 新疆 乌鲁木齐 830011;

2 中南大学湘雅医学院人体解剖与神经生物学系 湖南 长沙 410013; 3 新疆维吾尔自治区人民医院妇科 新疆 乌鲁木齐 830001)

摘要 目的 探讨体外培养的破骨细胞在自制牛股骨磨片和细胞爬片中扫描电镜制备方法。方法 实验分两组,一组采用新鲜牛股骨制备成 5mm× 5mm 大小的薄片,作为共培养之需;另一组,采用盖玻片制成 5mm× 5mm 的细胞爬片。分别以 5×10^4 种植于骨磨片和爬片,培养 5 天后进行扫描电镜的制备并观察。结果 破骨细胞在牛骨磨片表面生长良好,充分伸展,有细胞突起伸入到实验组材料深部,并形成骨陷窝;在爬片表面生长的破骨细胞,细胞生长良好,粘附性强,细胞之间相互连接较紧密,细胞表面突起明显。结论 牛股骨磨片与破骨细胞在体外相容良好,材料有利于破骨细胞的生长及细胞功能的表达,而破骨细胞爬片更适于细胞外形的观察。将两种方法结合既能反映破骨细胞的形态结构又能展示其破骨功能。

关键词 破骨细胞 骨磨片 爬片 扫描电镜

中图分类号 R683 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 01-33-03

Discussion of growth of osteoclasts under scanning electron microscopy*

BAI Sheng-bin^{1,2}, CHEN Hong-xiang³, ZHONG Jin-jie¹, FENG Shu-mei¹, LI Tian¹, LUO Xue-gang²

(1 Department of Histology and Embryology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2 Department of Anatomy & Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University Changsha 410013 China;

3 Department of Gynecology, The People Hospital of Xinjiang Autonomous Region, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT **Objective:** to discuss scanning electron microscopy sample preparation of osteoclasts cultured in vitro in the self-made cell crawling and grinding beef femur. **Methods:** to discuss scanning electron microscopy sample preparation of osteoclasts cultured in vitro in the self-made cell crawling and grinding beef femur. was prepared with fresh bull stock size of 5 mm × 5 mm thin slices, as the need of co-culture. Another group, the use of 5mm × 5mm cover glass pieces made into cell growth, respectively, 5×10^4 cells bone grinding plant them. Cultured for 5 days for the preparation of scanning electron microscopy observed. **Results:** Osteoclasts are found in bone growth and a good grinding surface and fully extended, there are cell processes stretching deep into the study group materials and the formation of lacunae. Growth in the coverslip surface of osteoclasts, cells grew well and strong adhesion, closer connections between cells, cell surface protrusions evident. **Conclusions:** The grinding beef femur and osteoclasts have good compatibility in vitro. And the material is conducive to the growth of osteoclasts and the expression of cell function. The osteoclasts grown on coverslips are more suitable for observation of cell shape by scanning electron microscope. The combination of two methods not only reflects the morphology of osteoclasts but also demonstrates its Osteoclast function.

Key words: Osteoclast; Bone grinding; cells grown on coverslips; Scanning electron microscopy

Chinese Library Classification: R683 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)01-33-03

1 前言

近年来,随着地方性氟中毒机制与氟骨症研究的不断深入,从骨组织工程的角度探讨为氟骨症的研究提供了一定思路和途径。为了更好的从细胞和分子水平探讨氟骨症的发病机制,本课题组在前期工作中一直着力于破骨细胞和成骨细胞的相互作用研究。目前,对破骨细胞的形态学基础研究还不够完善,本研究以 RAW264.7 细胞株为研究对象,为破骨细胞株的选择提供一定的实验基础,并对该细胞的扫描电镜方法进一步探讨。为了能在扫描电镜下准确地反映出破骨细胞的生长情况

与形态变化,我们采用与牛股骨共培养和细胞爬片的方法,在扫描电镜下观察细胞的生长情况与形态变化,并对样品前的准备工作进行细节方面和经验总结,以期详尽探讨对这类样品的制备方法。

2 材料和方法

2.1 试剂和仪器

小鼠破骨细胞 RAW264.7 (ATCC) DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司) 胎牛血清 (杭州四季青公司) Form3131 型 CO₂ 培养箱 (美国) 倒置相差显微镜 CK× 41 (Olympus 公司) 扫描

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目 (30860249)

作者简介:白生宾,男,博士研究生,研究方向 氟中毒与神经生物学, E-mail: bsbxx@126.com

△通讯作者 钟近洁,女,博士,硕士生导师,副教授,研究方向 环境与健康的关系, E-mail: zhongjinjie@sina.com

(收稿日期 2010-10-23 接受日期 2010-11-18)

电子显微镜(JSM-6380LV 日本) 超净工作台(上海博讯实业有限公司) 超纯水仪(Elix3+Mill-GB, 法国 Milipo 二公司) 痙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) 叔丁醇(上海三浦化工有限公司) 新鲜牛股骨。

2.2 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 5mm×5mm 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。

2.3 细胞爬片的制备

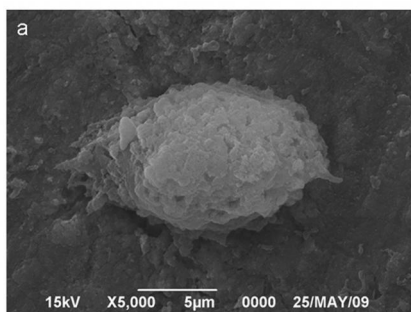
爬片制作步骤 1) 浓酸溶液浸泡 24 小时 2) 自来水冲洗 30 遍 3) 纯水冲洗 15 遍, 边洗边摇晃 4) 浸入无水酒精中先浸

泡 1-2 小时, 换液一次, 共四次, 后放在摇床过夜 5) 放入温箱烘干, 六小时或过夜, 取出放入细胞室备用 6) 用前紫外线消毒半小时后启用。细胞爬片之前, 用 PBS 或 D-Hanks 浸泡一下, 直接放入 24 孔板, 加入 RAW264.7 细胞悬液, 每孔加 0.5mL, 继续培养。

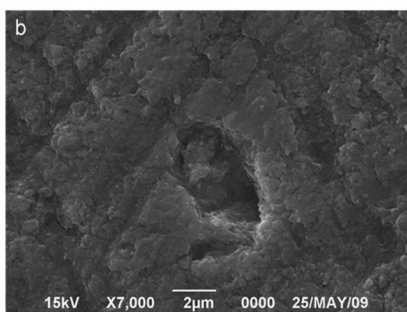
2.4 扫描电镜的制作

将 RAW264.7 分别与骨磨片和爬片应用高糖 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。将取好的骨磨片和爬片用生理盐水冲洗干净后, 迅速放入 4%戊二醛(美国 SPI-CHEM 公司产品)固定液中固定用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次, 每次用叔丁醇 50%、70%、80%、90%、100%逐级梯度脱水, 每次 5 min。放入 JEOL JFD-320 冷干燥仪中, 待干燥后的样品温度升到室温后取出, 用导电贴在样品托上用 JEOL JFCC-160 离子溅射仪镀膜^[1-3], 用 JSM-6380LV 扫描电镜观察并照相。

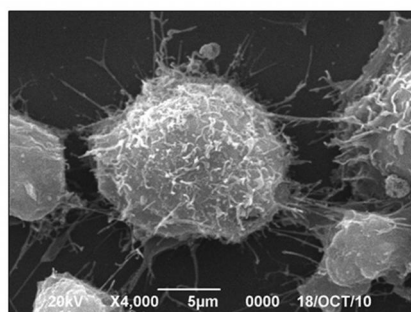
3 结果



骨磨片上培养的破骨细胞(× 5000)



在骨磨片上形成的吸收陷窝(× 7000)



盖玻片上的生长破骨细胞种(× 4000)

图 1 破骨细胞种植在骨磨片 5 天后, 观察到的破骨细胞生长情况及吸收陷窝形成的过程

Fig.1 Osteoclasts in bone grinding plant for 5 days, observed the growth of osteoclasts and the formation process of absorption lacuna.

图 2 破骨细胞种植在盖玻片 5 天后, 观察到的破骨细胞生长情况

Fig.2 Osteoclasts grown on glass coverslips for 5 days, observed the growth of osteoclasts.

使用该法制备的破骨细胞骨磨片的扫描电镜样品(图 1a 所示), 与破骨细胞共培养的样品, 图像层次清晰, 组织微细结构保存良好, 细胞表面结构光滑饱满, 边界完整, 无干瘪、皱缩、变形等现象, 人工变化少, 不仅能够满足破骨细胞的扫描电镜形态观察需要而且通过骨磨片可以观察破骨细胞的功能学变化, 能够清晰看到骨陷窝的存在(图 1b 所示)。同时, 爬片的扫描电镜(如图 2 所示), 细胞生长状态良好, 细胞之间相互连接较紧密细胞, 部分细胞膜和细胞质伸出大量的微绒毛, 成不规则形, 能够更很好的反应破骨细胞的形态学特征。但是, 唯一缺点就是不能够形成骨陷窝, 导致破骨细胞功能特性无法表现。

4 讨论

通过应用扫描电镜观察破骨细胞样品时, 不仅取决于电镜本身的工作状态, 而且取决于样品的前期准备。在这里强调样品的制作和前期准备过程中需要注意以下四个问题 1) 骨磨片样本应注意, 尽可能保证骨磨片中破骨细胞吸收骨质的功能表现, 就要很好的制作骨磨片, 完好地保持样品表面形貌。扫描电镜观察的是样品的表面形态学, 因而制备扫描电镜生物样品的第一个原则是尽可能完好地保持生活状态下表面形貌结构, 能

够真实地反映出样品的本来面貌^[4]。要求取材小心, 注意保护好所要观察的面使其不受损伤。取材时样品基底部应尽量切割平整, 以便于样品粘贴。(2) 种植细胞的应注意, 由于液体表面张力的作用, 在加样时, 往往含细胞的培养液都会流出来, 导致部分细胞种植在孔板里, 使贴在爬片上细胞数量减少。为了防止爬片以外的部位长满细胞, 先可以用加样枪在每个爬片上加样 50μl, 在培养箱中培养 2-4 小时后, 这时细胞基本贴壁, 就可以将培养液再加入, 就不至于两侧都长满细胞(有液体, 使爬片紧贴孔板底部)。(3) 样本的取出时应注意, 用一个注射器针头, 针头头部都会有一个斜面, 把针尖背对斜面的一方弯曲成 90 度, 记住只是针尖部位, 形成一个小倒刺状。取爬片或磨片的时候把培养板放倾斜, 可在板子下支一个东西, 左手拿小镊子, 右手拿针头。用针头头部弯好的倒刺, 去勾爬片, 很容易就会勾起来, 而且不会伤片子。再用镊子把片子夹出来。速度比原来提高很多, 简单易行。(4) 掌握好脱水时间。脱水时间过长, 样品在冷冻干燥前就可能产生较大的收缩变形, 对保存样品的结构不利^[5,6]。脱水时间过短, 则容易造成脱水不充分, 图像不清晰。样品的收缩率与脱水时间有很大关系, 脱水时间越长, 收缩越大, 反之则越小, 脱水时间一般为 5-10 min, 以接种细胞密度的多

少而定。

总之,在破骨细胞扫描电镜制作过程中,样品的准备和前期准备也同样重要。要通过扫描电镜观察破骨细胞形态结构,细胞爬片更适合。但要同时具有良好的反差,达到功能学特点理想效果,就需要骨磨片共培养或类似材料,对类似于细胞与生物材料共培养的样品制备具有一定的指导意义。

参考文献 (References)

- [1] Lu Ju, Ke Jin-xing. Suspended like material and scanning electron microscopy sample preparation [J]. Journal of Third Military Medical University, 2007, 29(4): 368-369
- [2] Li Guo-zheng, Zhang Yang-de, Li Jun et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles for medicine utilization: HRTEM, FTIR, NMR, XRD study of hydroxyapatite nanoparticles ultrastructure [J]. China Journal of Modern Medicine, 2007, 17(2):

257-260

- [3] Rossana C. N. Melo, Ann M. Dvorak, and Peter F. Weller. Electron tomography and immunogold electron microscopy for investigating intracellular trafficking and secretion in human eosinophils [J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(4): 1416-1419
- [4] Sammarco V J, Chang L. Modern issues in bone graft substitutes and advances in bone tissue technology [J]. Foot Ankle Clin, 2002, 7(1): 19-41
- [5] Xie Feng-lian, Tang Jian-an, Hu Han-hua. Tert-butyl alcohol and glutaraldehyde alone SEM sample preparation techniques [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2009, 32(12): 1735
- [6] Wu Xiao-ying, Zhu Xiao-jing, Zhu Shi-guo et al. Medical Nano materials and their markers in electron microscopy sample preparation [J]. China Journal of Modern Medicine, 2003, 13(20): 147-148

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001; 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法 and 应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供參考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。