

小鼠皮下和内脏前脂肪细胞原代培养模型的建立

俞 静,刘 娟,丁国宪*

(南京医科大学第一附属医院老年医学科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探索小鼠皮下和内脏前脂肪细胞的培养方法。方法:取 C57BL/6J 小鼠腹股沟皮下脂肪和附睾旁内脏脂肪组织,采用胶原酶消化过滤法获得梭形细胞,对培养的细胞进行形态学观察,诱导分化后用油红 O 染色法染色定性,荧光定量 PCR 检测成脂功能标志基因表达情况。结果:培养出的梭形细胞成分均一,增殖旺盛,诱导后分化率高,经油红 O 染色证实分离获得的前脂肪细胞可以分化为成熟脂肪细胞,荧光定量 PCR 检测成脂功能标志基因 Fabp4(fatty acid binding protein 4)的表达量明显升高。结论:从 C57BL/6J 小鼠腹股沟皮下和附睾旁内脏脂肪组织中可以分离出具有很强增殖、分化能力的皮下和内脏前脂肪细胞,这种前脂肪细胞原代培养模型的建立为在体外进一步研究皮下、内脏脂肪功能的差异提供了良好的基础。

[关键词] 皮下前脂肪细胞;内脏前脂肪细胞;原代培养;诱导分化

[中图分类号] R329.28

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1351-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20131004

Establishment of culture model for primary mouse subcutaneous and visceral adipocyte precursor cells

Yu Jing, Liu Juan, Ding Guoxian*

(Department of Geratology, the First Hospital Affiliated of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a culture method for primary mouse subcutaneous and visceral adipocyte precursor cells. **Methods:** Fibroblast-like cells were collected from C57BL/6J mice inguinal and epididymal adipose tissue. The morphological changes of the cultured cells were observed, the intracytoplasmic lipid of the culture cells was determined using oil red O staining, and the expression of the specific adipogenic gene was determined by real time PCR. **Results:** The cultured fibroblast-like cells showed highly homogeneous appearance with active proliferation and differentiate into mature adipocytes. Oil red O staining, morphological observation, and expression of specific adipogenic gene Fabp4 verified these cells as adipocyte. **Conclusion:** Adipocyte precursor cells are presented in C57BL/6J mice inguinal and epididymal adipose tissue and possess the potential to proliferate and differentiate into mature adipocyte. The establishment of primary culture of mouse subcutaneous and visceral adipocyte precursor cells is important for further studies of the differences between subcutaneous and visceral adipocyte *in vitro*.

[Key words] subcutaneous adipocyte; visceral adipocyte; primary cell culture; cell differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1351-1355]

随着社会经济的发展,肥胖已成为世界关注的热点问题。最新流行病学调查显示,目前美国已有高达三分之一以上的人群肥胖^[1]。在我国,肥胖患者数量也已急剧上升。2007年综合全国31个省、直辖市和自治区的统计数据发现,中国人口超重和肥胖的发生率也已高达29%^[2]。肥胖已成为全球流行性疾病。

随着肥胖发病率的增高,肥胖相关的疾病也相应增加,包括2型糖尿病、高血压、脂质代谢紊乱等,从而导致心脑血管疾病的显著增加。美国仅1年用于肥胖及其相关疾病的医疗费用就高达1170亿美元^[3]。肥胖带来了沉重的社会负担和经济负担。

虽然早就发现肥胖与胰岛素抵抗、心脑血管疾病关系密切,但是直到上世纪八十年代初,人们才认识到并非肥胖的程度越高,胰岛素抵抗、心脑血管疾病危害就越大,脂肪的分布差异才真正决定着肥胖并发症的发生发展。根据分布部位的不同,脂肪组织

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81170796)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: dinggx@njmu.edu.cn

可分为皮下脂肪组织和内脏脂肪组织。现在公认,与臀部脂肪蓄积(皮下肥胖)相比,内脏脂肪蓄积(内脏肥胖)与肥胖并发症关系更加密切^[4]。腹腔内脏脂肪的增多与胰岛素抵抗、2型糖尿病、血脂异常、高血压等一系列代谢紊乱相关^[5];与此相反,脂肪在臀部、腿部等外周组织堆积则发生代谢紊乱的风险比较小^[6]。但是,导致皮下和内脏脂肪之间产生这种差异的分子机制至今不明确。

本研究选取 C57BL/6J 小鼠作为前脂肪细胞原代培养的组织来源,成功地从小鼠腹股沟皮下脂肪和附睾旁内脏脂肪组织中分离、培养出小鼠前脂肪细胞,诱导前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化,建立了小鼠皮下和内脏前脂肪细胞原代培养模型,为进一步研究导致皮下和内脏脂肪产生差异的分子机制提供了简单有效的方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

C57BL/6J 雄性小鼠购于南京大学模式动物中心。DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)、青/链霉素(Gibco 公司,美国);胰岛素、地塞米松(DEX)、3-异丁基-1-甲基次黄嘌呤(IBMx)、II 型胶原酶、油红 O 染料(Sigma 公司,美国);牛血清白蛋白、HEPES(Biosharp 公司,美国);PBS 缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司);TRIzol Agent(Invitrogen 公司,美国);逆转录所用试剂(Promega 公司,美国);实时荧光定量 PCR 所用试剂 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)(Roche 公司,瑞士)。

1.2 方 法

1.2.1 小鼠皮下和内脏前脂肪细胞的分离、培养

取 3~4 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠,颈椎脱臼法处死后于 75%酒精浸泡 10 min,在超净工作台内小心取出小鼠腹股沟皮下脂肪组织和附睾旁内脏脂肪组织,去除腹股沟皮下脂肪中的淋巴结,去除附睾旁内脏脂肪旁的睾丸、附睾、输精管和淋巴结等组织。将取下的脂肪组织置于预冷的 PBS 缓冲液中。用眼科剪分别将各部位脂肪组织剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的脂肪块,将剪碎的组织转移到无菌 50 ml 离心管中,加入配好的组织消化液(II 型胶原酶 1.5 g/L、牛血清白蛋白 20 g/L、HEPES 1.2 g/L)后置于 37°C 水浴箱中摇晃消化 30 min,待脂肪组织消化完全后,300 目筛网过滤除去剩余残渣,将滤过的消化液转移至新的无菌 50 ml 离心管中置冰上静置 15 min,2 500 r/min 离心 10 min,去除上清,沉

淀中加入 PBS 缓冲液洗涤后 2 500 r/min 离心 10 min,用 DMEM 高糖完全培养液(DMEM 高糖培养基 + 10% FBS + 100 U/ml 青/链霉素)重悬沉淀后接种于 12 孔板中,置 37°C 5% CO₂ 细胞培养箱中培养,4~6 h 后 PBS 缓冲液冲洗未贴壁细胞并更换新鲜培养液后继续培养,以后每 3 d 更换培养液 1 次并在显微镜下观察细胞形态变化。

1.2.2 小鼠皮下和内脏前脂肪细胞的诱导分化

上述得到的皮下和内脏前脂肪细胞(皮下、附睾旁)生长在 DMEM 高糖完全培养液中,待细胞生长到单层融合后将培养液换成诱导液(完全培养液中再加入 0.5 mmol/L IBMx、1 μmol/L DEX、5 μg/ml 胰岛素)诱导,4 d 后换成完全培养液+5 μg/ml 胰岛素继续培养。细胞从开始诱导到分化成熟需要 6~8 d。

1.2.3 小鼠皮下和内脏成熟脂肪细胞油红 O 染色

皮下和内脏前脂肪细胞诱导分化成熟后,吸弃培养液,用 10%福尔马林室温固定细胞约 1 h,向固定好的细胞中加入配好的油红 O 应用液(0.5 g 油红 O 溶于 100 ml 异丙醇中)染色 30 min,清水冲洗掉多余染料后显微镜下观察。

1.2.4 细胞总 RNA 抽提及 cDNA 逆转录

12 孔板中细胞吸弃培养液后每孔加入 0.5 ml TRIzol Agent 充分裂解细胞后收集裂解液,按试剂盒方法进行细胞总 RNA 抽提及 cDNA 逆转录。

1.2.5 实时荧光定量 PCR

以上述细胞的 cDNA 为模板,用相关引物进行 RT-PCR 实时荧光定量 PCR 扩增。总反应体系为 20 μl,反应条件:95°C 预变性 10 min,95°C 变性 30 s,60°C 退火 30 s,40 个循环,72~94°C,每升高 0.5°C 读 1 次做出溶解曲线。以 β-actin 基因作为内参照,对目的基因的表达量进行分析。Fabp4 引物序列:上游 5'-ACACCGAGATTTTCCTCAAACACTG-3',下游 5'-CCATCTAGGGTTATGATGCTCTTCA-3';β-actin 引物序列:上游 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3',下游 5'-CACGATGGAGGGCCGGACTCATC-3'。

1.3 统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用 SPSS13.0 软件,两组间比较采用两样本 *t* 检验,三组整体比较采用多水平单因素方差分析。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠皮下和内脏前脂肪原代细胞形态学观察

接种细胞在 3~4 h 后贴壁,初为类圆形,细胞大

小不等,核/质比例不等。贴壁 2~4 d 逐渐伸展开,细胞呈梭形改变,即两端变尖细,立体感较强,核呈椭圆形,部分细胞处于有丝分裂期,细胞内可见双核,铺板后 3~4 d 细胞生长接近单层汇合,汇合后细胞由梭形逐渐变为椭圆形(图 1)。

2.2 小鼠皮下和内脏前脂肪细胞诱导分化成熟后的形态学改变

小鼠皮下和内脏前脂肪细胞生长至接触抑制,融合 2~3 d 后加入诱导分化液进入分化阶段,镜下细胞开始皱缩并逐渐出现脂滴,脂滴颗粒在细胞核周围出现,逐渐增多、增大,直至遍布细胞内,细胞核可被脂滴挤到周围。诱导分化后 6~8 d,皮下前脂肪细胞中 80% 的细胞产生脂滴,而内脏前脂肪细胞中则只有 40% 的细胞产生脂滴(图 2)。这与皮下和内脏脂肪细胞的储脂能力差异有关。油红 O 染色后脂肪细胞内出现红染颗粒,证明镜下所见细胞内颗粒为脂滴(图 3)。

2.3 小鼠皮下和内脏前脂肪细胞诱导分化过程中成脂标志基因 Fabp4 的表达变化

荧光定量 PCR 检测小鼠前脂肪细胞分化过程中第 0、4、8 天成脂标志基因 Fabp4 的表达情况,发现随着分化的进行 Fabp4 的表达呈明显升高趋势,持续至分化终点,进一步说明前脂肪细胞诱导分化

成功,并证实所得到的细胞为脂肪细胞(图 4)。

3 讨 论

皮下脂肪和内脏脂肪存在很大差异,包括解剖、细胞、分子、生理、临床和预后等多个方面。皮下脂肪的储脂能力明显强于内脏脂肪,对机体代谢的影响也截然不同^[7]。研究证实,手术去除腹腔内脏脂肪后,小鼠的胰岛素敏感性增加、肝脏的糖异生降低^[8-9]。将小鼠腹股沟皮下脂肪移植到腹腔,可以改善机体的代谢紊乱;而移植附睾旁内脏脂肪则不能^[10]。阐明皮下和内脏脂肪之间差异的分子机制,有助于肥胖及其并发症的治疗。特异性的脂肪细胞因子研究以及调控脂肪细胞生物学行为可能是治疗代谢性疾病的有效策略^[11]。因此,建立一个简便易行的皮下和内脏脂肪细胞原代培养方法就显得尤为重要。

目前用于功能研究的小鼠脂肪细胞株主要有 3T3-L1^[12]。但是,3T3-L1 作为成纤维细胞株,虽然具有向成熟脂肪细胞分化的能力,其性质和特点与原代脂肪细胞相去甚远,更不能代表皮下脂肪细胞或内脏脂肪细胞的功能,体现两者的差异性。而小鼠皮下和内脏脂肪细胞原代培养模型的建立,为脂肪细胞的功能以及皮下和内脏脂肪的差异研究提供了可能。

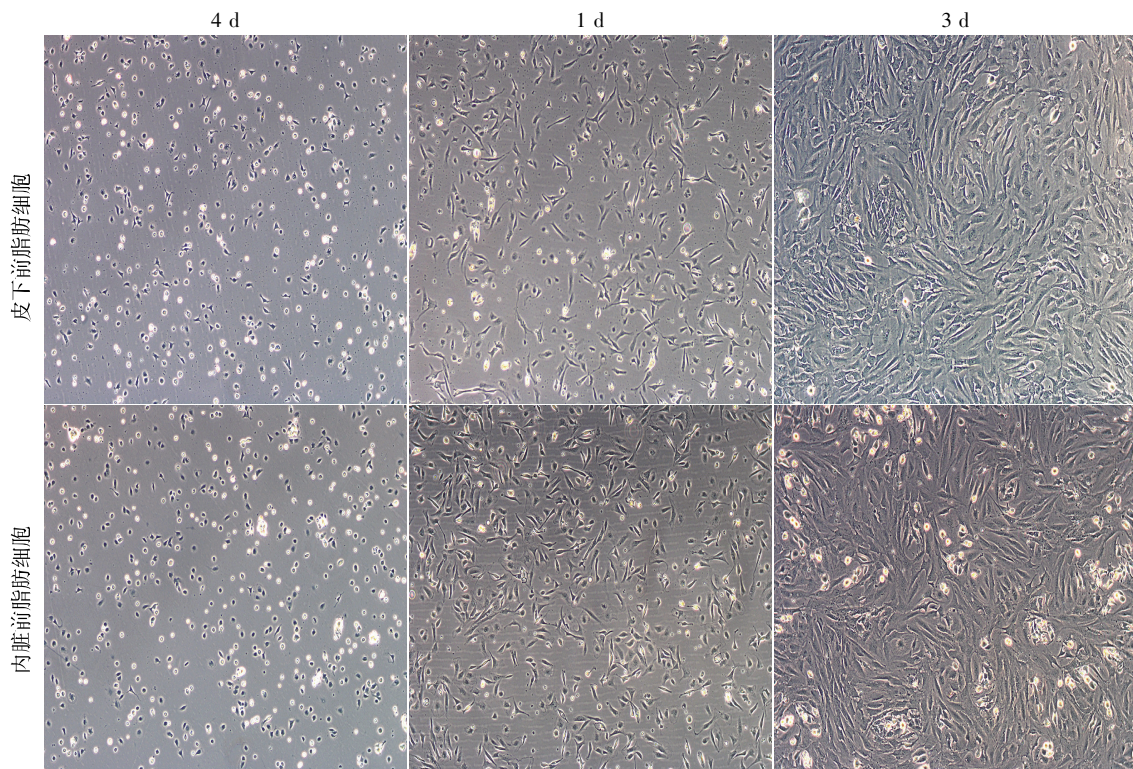


图 1 小鼠皮下和内脏前脂肪细胞形态($\times 100$)

Figure 1 Morphology of mouse subcutaneous and visceral preadipocytes($\times 100$)

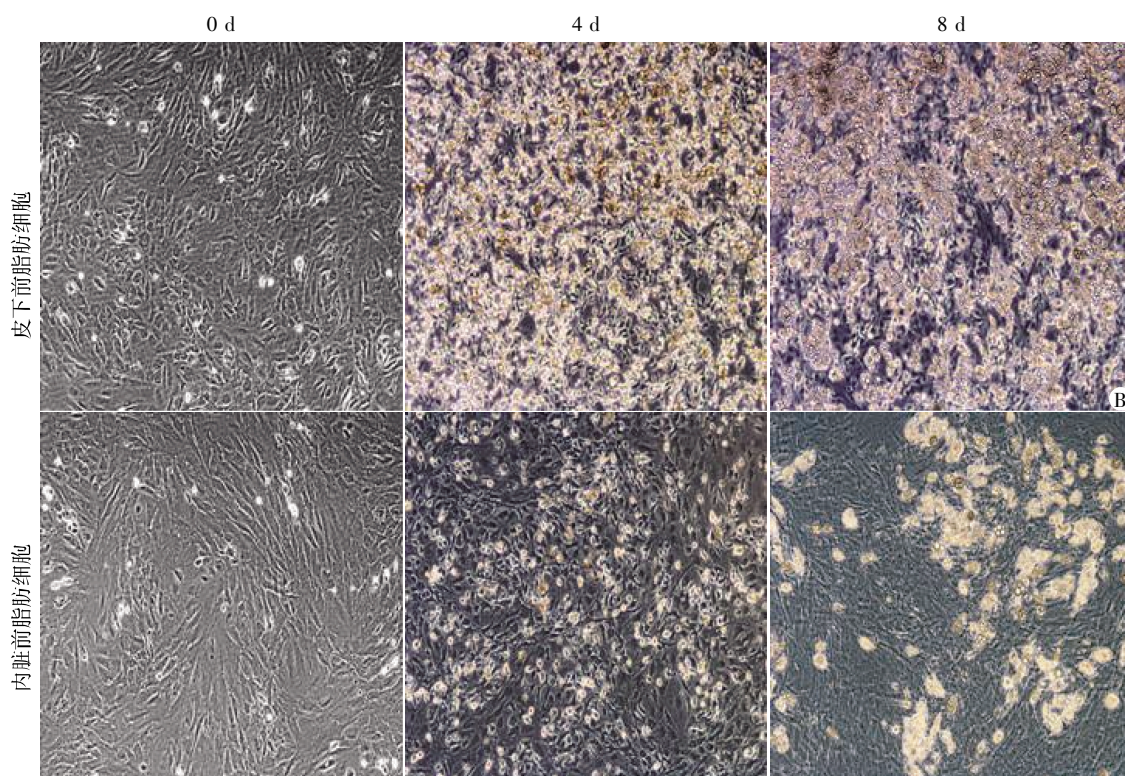


图2 小鼠皮下和内脏前脂肪细胞分化过程中的形态改变(×100)

Figure 2 Morphological change of subcutaneous and visceral preadipocytes during differentiation(×100)

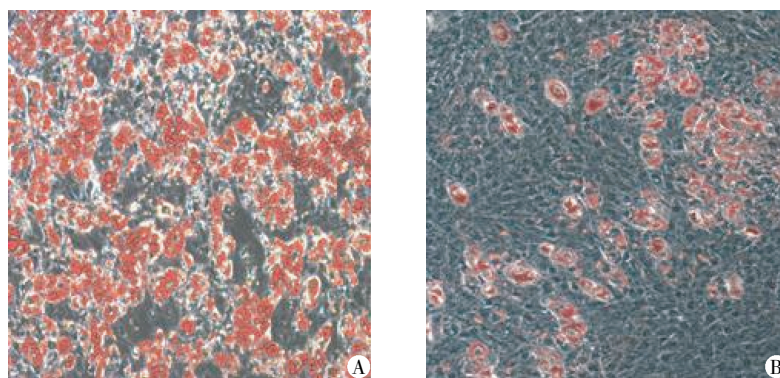
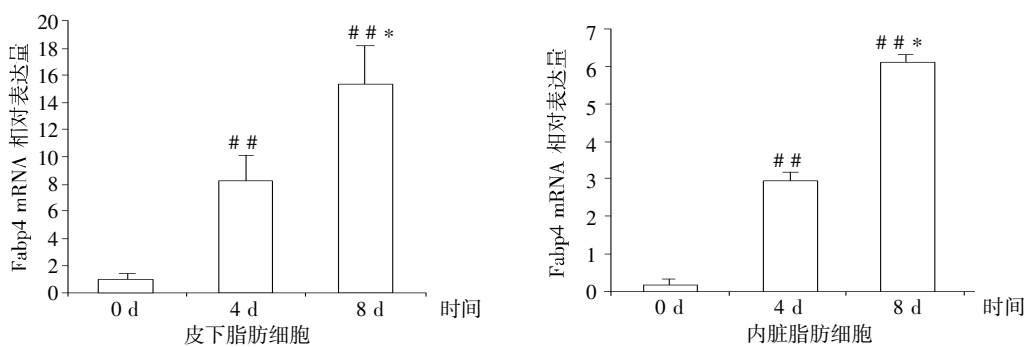


图3 小鼠皮下前脂肪细胞(A)和内脏前脂肪细胞(B)成熟后的形态(油红O染色,×100)

Figure 3 Morphology of mature subcutaneous and visceral adipocytes(oil red O staining,×100)



与0 d相比,## $P < 0.01$;与4 d相比,* $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图4 小鼠皮下和内脏前脂肪细胞分化过程中 Fabp4 的表达情况

Figure 4 Fabp4 mRNA expression during preadipocytes differentiation

原代培养的皮下和内脏脂肪细胞在性质和状态上最接近体内脂肪的原始状态,并且对药物有着良好的反应性,但是原代培养普遍存在着耗时费力、步骤较多容易污染、得到的细胞数量不足等缺点。本研究选用 C57BL/6J 小鼠作为皮下和内脏脂肪组织来源,采用 II 型胶原酶消化过滤法成功获得了数量充足的、增殖和分裂旺盛的梭形细胞,并通过以下几点证实得到的细胞为前脂肪细胞:①细胞来自小鼠腹股沟皮下脂肪组织和附睾旁内脏脂肪组织,成分均一,形态为梭形与成纤维细胞类似;②细胞增殖迅速,融合后经诱导液诱导胞质内出现脂滴,且经形态观察和油红 O 染色证实;③通过荧光定量 PCR 检测成脂标志基因 *Fabp4* 的表达情况,结果发现 *Fabp4* 基因的表达随着细胞分化天数的增加而明显升高。

为了得到数量充足、成分均一的前脂肪细胞,需要注意以下几点:①组织来源,尽量选取年轻小鼠,3~4 周内最佳,以保证细胞的增殖力和分化能力;②分离脂肪组织时动作轻柔,注意去除淋巴结、睾丸、附睾、输精管等组织;③组织消化液的用量要充足,皮下脂肪组织所用消化液的量为每只小鼠 1 ml,内脏脂肪组织则为每只小鼠 0.5 ml;④整个操作过程注意无菌操作。

本方法采用酶消化法、常规培养基进行培养,所需费用较低,获得细胞量多,易于推广,为进一步研究皮下和内脏脂肪的差异奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Flegal KM, Carroll MD, Kit BK, et al. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999–2010 [J]. *JAMA*, 2012, 307(5): 491–497
- [2] Reynolds K, Gu D, Whelton PK, et al. InterASIA Collaborative Group. Prevalence and risk factors of overweight and obesity in China [J]. *Obesity*, 2007, 15(1): 10–18
- [3] Ostchega Y, Hughes JP, Terry A, et al. Abdominal obesity, body mass index, and hypertension in US adults: NHANES 2007–2010 [J]. *Am J Hypertension*, 2012, 25(12): 1271–1278
- [4] Tchkonina T, Thomou T, Zhu Y, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots [J]. *Cell Metabolism*, 2013, 17(5): 644–656
- [5] Bergman RN, Kim SP, Catalano KJ, et al. Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome [J]. *Obesity*, 2006, 14(suppl 1): 16S–19S
- [6] Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonina T, et al. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(42): 18226–18231
- [7] Shuster A, Patlas M, Pinthus JH, et al. The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis [J]. *Br J Radiol*, 2012, 85(1009): 1–10
- [8] Lottati M, Kolka CM, Stefanovski D, et al. Greater omentectomy improves insulin sensitivity in nonobese dogs [J]. *Obesity*, 2009, 17(4): 674–680
- [9] Ben-Shlomo S, Einstein FH, Zvibel I, et al. Perinephric and epididymal fat affect hepatic metabolism in rats [J]. *Obesity*, 2012, 20(1): 151–156
- [10] Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, et al. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism [J]. *Cell Metabolism*, 2008, 7(5): 410–420
- [11] 马敬弟, 卢 珊, 马向华. 脂肪细胞因子与肥胖的关系 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2012, 32(12): 1743–1745
- [12] Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes [J]. *Exp Biol Med*, 2010, 235(10): 1185–1193

[收稿日期] 2013-06-28