

· 基础研究 ·

成熟SVFs细胞与Hepa1-6细胞共培养模型的建立及对肝细胞脂代谢的影响

王雨竹, 张 许, 李 仲*

南京医科大学罕见代谢性疾病研究重点实验室, 南京医科大学生物化学与分子生物学系, 江苏省人类功能基因组重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] **目的:**建立小鼠成熟脂肪细胞血管基质部分(stromal vascular fraction, SVF)与小鼠肝细胞(Hepa1-6)共培养模型, 研究成熟脂肪细胞对肝细胞脂质堆积以及代谢的影响。**方法:**从小鼠皮下脂肪分离提取原代SVF细胞, 经体外分化成熟后, 以Transwell小室建立成熟SVF细胞和Hepa1-6细胞间接共培养48 h体系。应用逆转录-聚合酶链反应法(RT-PCR法)检测SVF细胞PPAR γ 和PGC-1 α 等分化相关基因及Hepa1-6细胞CD36、FATP2、GPAT1等脂代谢相关基因的表达。酶法检测经共培养后的Hepa1-6细胞甘油三酯水平。**结果:**小鼠原代SVF细胞经诱导成熟后, 出现明显较大脂滴; 成熟SVF细胞中PPAR γ 和PGC-1 α 等分化标志物较未分化SVF细胞显著升高; Hepa1-6细胞甘油三酯水平明显高于未共培养组; Hepa1-6细胞GPAT1、CD36基因表达水平明显升高。**结论:**已成功建立成熟脂肪细胞与Hepa1-6细胞Transwell共培养模型。肝细胞与成熟脂肪细胞共培养可以诱导其脂质堆积增加, 该过程可能通过上调肝细胞中CD36和GPAT1的表达水平增加脂肪酸的吸收和甘油三酯的合成通路实现。

[关键词] SVF; 肝细胞; 细胞共培养; 脂代谢

[中图分类号] R329.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)05-603-07

doi:10.7655/NYDXBNS20220501

Establishment of co-culture of mature SVFs with Hepa1-6 as a model for studying effects on lipid metabolism of hepatocytes

WANG Yuzhu, ZHANG Xu, LI Zhong*

Key Laboratory of Rare Metabolic Disease, Department of Molecular Biology and Biochemistry, The Key Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to establish a co-culture system of matured stromal vascular fraction (SVF) with Hepa1-6 and study the effects on lipid metabolism of hepatocytes. **Method:** Primary SVF cells were isolated from mice subcutaneous fat and induced to matured SVF cells with differentiation medium. Matured SVF cells were co-cultured with Hepa1-6 by using Transwell system for 2 days. RT-PCR was applied to detect the expression of differentiation biomarker such as PPAR γ and PGC-1 α in SVF cells and lipid metabolism related genes such as CD36, FATP2 and GPAT1 in Hepa1-6. Cellular triglyceride level of co-cultured Hepa1-6 was detected by GPO Enzyme Method. **Results:** Isolated primary SVF cells were successfully differentiated to mature SVF cells with significantly large lipid droplets after treated with adipocytes differentiation medium for 6 days. The expression level of PPAR γ and PGC-1 α of SVF cells was significantly increased. The cellular triglyceride level of co-cultured Hepa1-6 was significantly higher than that of control group accompanied with increased expression level of GPAT1 and CD36. **Conclusion:** The co-cultured system of matured SVF cells with Hepa1-6 in Transwell insert has been successfully established. Co-culture with mature SVF cells induces lipid accumulation in Hepa1-6. This process may be maintained by the elevated expression level of CD36 and GPAT1, increasing fatty acid absorption and triglyceride synthesis.

[Key words] SVF; hepatocytes; co-culture, lipid metabolism

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(05):603-609]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(91957115);南京医科大学科技发展基金-面上项目(2016NJMU004)

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

随着生活水平的提高,肥胖作为一种全球性流行病,已逐渐成为人们不容忽视的健康问题^[1-3]。肥胖是由于能量的摄入超过消耗所导致的能量过剩,造成脂肪组织过度扩增引起。由于脂肪组织扩增能力有限,无法有效储存脂质^[4],同时伴随脂肪组织分泌功能的渐进紊乱,诱导产生大量的促炎抗炎因子、趋化因子、生长因子等^[5]。脂质的溢出以及这些脂肪因子循环浓度的升高可诱导全身慢性炎症和胰岛素抵抗等代谢紊乱,从而导致一系列包括非酒精性脂肪肝等肥胖相关并发症^[4,6-8]。肥胖诱导非酒精性脂肪肝发生的分子机制,一方面在于因能量进一步失衡,所引起的脂质从循环中溢出,并随后在非脂肪组织(如肝脏)中堆积的现象,即发生异位脂肪储存^[9];另一方面,脂肪以及肝脏都具有内分泌的功能^[10-11],二者之间也存在相应的激素调节^[12],以上两方面共同构成脂肪-肝脏交流^[13]。探讨病理条件下的脂肪-肝脏交流机制,有利于进一步理解肥胖导致非酒精性脂肪肝的病理生理机制。因此,寻找到能够有效研究脂肪-肝脏交流的模式已刻不容缓。脂肪组织血管基质部分(stromal vascular fraction, SVF)在体内不仅具有强大的抗炎、免疫调节和修复作用,还具有参与血管生成以及干细胞储存等功能^[14-15],其含有丰富的、可塑性极强的脂肪组织来源的间充质干细胞(adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ASC),具有体外分化为成熟脂肪细胞的潜能^[16]。小鼠肝癌细胞(mouse hepatocarcinoma cells, Hepa1-6)是一种常用的鼠源肝癌细胞系,能够响应外界刺激并发生变化。

本研究致力于构建适合研究成熟脂肪细胞与肝细胞交流的细胞模型,通过选用原代提取培养SVF细胞,在体外进行成熟分化后,与Hepa1-6细胞进行共培养,观察脂肪细胞对肝细胞的影响,从而为研究两种细胞间的相互作用提供可靠的脂肪细胞-肝细胞共培养模型,在细胞层面提供一种研究脂肪-肝脏交流的可能。

1 材料和方法

1.1 材料

DMEM/F12培养基、DMEM/H+培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco公司,美国);磷酸缓冲盐溶液(武汉赛维尔);I型胶原酶(Sigma-Aldrich公司,美国);TRIzol Reagent总RNA提取剂、胰岛素(Invitrogen公司,美国);3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、地塞米松、罗格列酮(MCE公司,美国);SYBR Green I

(SYBR Green qPCR Master Mix,南京诺唯赞公司);0.4 μm Transwell小室(跨细胞小室)以及细胞培养皿、细胞培养孔板(Corning公司,美国);70 μm 滤器(Fisherbrand公司,美国);组织细胞甘油三酯测定试剂盒(北京普利莱公司);总胆固醇测试盒(南京建成生物工程研究所);反转录试剂盒(TaKaRa公司,日本);引物由上海捷瑞基因有限公司合成;C57BL/6J小鼠(南京大学模式动物研究所);生物安全柜、CO₂细胞培养箱(Thermo公司,美国);普通倒置光学显微镜(Olympus公司,美国);LightCycler480型Real-time PCR仪(Roche公司,瑞士)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠SVF细胞提取

4~6周C57BL/6J雄性小鼠(动物试验伦理编号IACUC-1601170-4),脱颈处死后,在超净工作台中取出小鼠皮下脂肪(白色脂肪),在PBS中漂洗沥干后,放入2 mL离心管中,加入1.5倍胶原酶,用无菌剪刀将组织剪成1 mm³小块。离心管封口后放入37 °C水浴锅消化1 h,每5 min颠倒混匀1次。待细胞被消化成乳糜状时取出,于超净工作台中用70 μm 筛网过滤。取滤液于20 °C,1 500 r/min,离心10 min,弃上清。使用PBS重悬洗涤,重复上述离心条件得到含SVF细胞沉淀。在生物安全柜中,使用DMEM/F12完全培养基(DMEM/F12 90%,澳洲胎牛血清10%,三抗1%)重悬细胞后,种入6孔板中,置于5% CO₂培养箱中培养,每2 d换1次液。

1.2.2 小鼠SVF细胞分化

生长至100%的SVF细胞,接触抑制2 d后^[17],加入分化液I(含有5 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松,0.5 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素,0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤,1 $\mu\text{mol/L}$ 罗格列酮的DMEM/F12完全培养基)。2 d后换分化液I。第4天加入分化液II(含有0.5 $\mu\text{g/mL}$ 胰岛素的DMEM/F12完全培养基),第6天镜下可见明显脂滴分化,即为成熟脂肪细胞。

1.2.3 Transwell共培养方式的建立

0.4 μm 共培养小室能够允许上下层细胞的细胞因子、营养物质等自由通过,而细胞无法从中通过,从而达到使2种细胞间接接触培养的目的。将Hepa1-6细胞种入0.4 μm 小室,在DMEM/H+完全培养基中生长1 d,待终密度达到50%时,使用PBS洗涤小室,将其置入已使用PBS洗涤2遍后的分化成熟的脂肪细胞上,并更换使用无血清DMEM/F12培养基培养48 h,收集Hepa1-6细胞进行下一步检测。采用同时种入小室但不与成熟脂肪细胞共培

养的Hepa1-6细胞作为对照,培养条件为无血清DMEM/F12培养基。

1.2.4 Hepa1-6细胞甘油三酯水平及总胆固醇水平检测

按照每 1×10^6 个细胞加入100 μ L细胞裂解液,混匀后室温静置10 min充分裂解细胞。所得裂解物,取一半于70 $^{\circ}$ C加热10 min,完毕后进行涡旋混匀。20 $^{\circ}$ C 2 000 *g*离心10 min后,取上清液进行酶学测定。另一半于4 $^{\circ}$ C 16 000 *g*离心30 min后,进行蛋白浓度测定。酶学测定方法:按照试剂盒A液和B液4:1的比例配制反应液,每孔10 μ L上清液加入190 μ L反应液。于37 $^{\circ}$ C反应15 min,550 nm酶标仪读数,依照标准曲线计算甘油三酯含量。标准曲线绘制方法:使用ddH₂O,将4 mmol/L甘油标准品倍比稀释为1 000.0、500.0、250.0、125.0、62.5 μ mol/L,与酶学样本同时测定即可。蛋白浓度测定方法:取蛋白测定样本稀释50倍后进行测定。将蛋白浓度测定试剂盒A液和B液以1:1混合即得反应液。取10 μ L稀释后的蛋白样本加入100 μ L反应液,于37 $^{\circ}$ C反应30 min,562 nm酶标仪读数,依照标准曲线计算蛋白浓度。标准曲线绘制方法:使用ddH₂O,将0.5 mg/mL牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)标准品倍比稀释为0.500 0、0.250 0、0.125 0、0.062 5、0 mg/mL,与蛋白样本同时测定即可。使用蛋白浓度校正甘油三酯含量。

使用生理盐水收集细胞,超声破碎后,取2.5 μ L清液(无需离心)添加250 μ L反应液,于37 $^{\circ}$ C反应10 min,510 nm酶标仪读数,依照标准曲线计算总胆固醇含量。标准曲线绘制方法:使用ddH₂O,将5.17 mmol/L胆固醇标准品倍比稀释为2.59、1.29、0.65、0.32、0.16、0.08 μ mol/L,与样本同时测定即可。蛋白浓度测定方法同甘油三酯测定。使用蛋白浓度校正总胆固醇含量。

1.2.5 RNA提取及相对定量水平检测

6孔板加入1 mL TRIzol,使用无菌无酶枪头刮下裂解细胞,置于无菌无酶离心管内。向离心管加入200 μ L氯仿,剧烈上下颠倒振荡30 s。室温静置5 min后,取上清液转移至新的无菌无酶离心管内。加入与上清液等体积的预冷异丙醇,上下颠倒混匀,室温静置15 min。4 $^{\circ}$ C 10 000 *g*离心15 min,取白色沉淀加入1 mL已预冷的75%乙醇,焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)水配制,颠倒洗涤。4 $^{\circ}$ C 10 000 *g*离心10 min,弃上清,再次空离心管。吸去残留乙醇,白色沉淀即为RNA。加入

DEPC处理过的ddH₂O溶解30 min即可。使用Nanodrop微量核酸测定仪对所得RNA进行定量及纯度分析^[18]。

第一步去除基因组DNA(genomic DNA, gDNA),加入5 \times gDNA Eraser Buffer 2 μ L, gDNA Eraser 1 μ L, Total RNA 1 μ g, RNase Free ddH₂O加至10 μ L, 42 $^{\circ}$ C 5 min完成第一步反应。第二步为逆转录反应,向第一步反应液(10 μ L),添加PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ L, RT Primer Mix 1 μ L, 5 \times PrimeScript Buffer 2(for real time)4 μ L, RNase Free ddH₂O 4 μ L, 配成共计20 μ L的反应体系,37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s完成逆转录。逆转录cDNA保存于-20 $^{\circ}$ C。

使用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time PCR)测定SVF分化标志物以及Hepa1-6脂代谢通路变化。将cDNA稀释5倍后使用。取稀释后cDNA 1 μ L, SYBRGreen I 5 μ L, 上游引物(1 μ mol/L)2 μ L, 下游引物(1 μ mol/L)2 μ L混匀后,放入LightCycler480型Real-time PCR仪进行实时荧光PCR反应。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 40个循环, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C continuous, 40 $^{\circ}$ C 20 min。引物序列见表1。

1.3 统计学方法

所有实验重复3遍,用Graphpad Prism软件对实验数据进行统计学处理及作图,结果以均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示。使用两独立样本*t*检验分析结果,*P* < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SVF细胞单纯培养在倒置显微镜下呈现梭形

在DMEM/F12完全培养基中,通过原代提取的SVF细胞,大部分24 h即可贴壁,呈现灰色团状未伸展的状态(图1A)。同时,视野里可见较多无法贴壁的杂细胞,需在次日进行连续换液以及PBS洗涤得以除去。培养48 h,细胞逐渐伸展开,呈现梭形、多角形(图1B),表明SVF已成功提取。培养72 h后,SVF细胞完全伸展开,形态变得饱满(图1C)。此后经3~5 d,SVF细胞密度可达100%,呈现紧密接触抑制的状态。

2.2 SVF细胞经诱导分化6 d后成为成熟脂肪细胞

当SVF细胞接触抑制2 d后,首先使用分化液I(含有5 μ mol/L地塞米松,0.5 μ g/mL胰岛素,0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤,1 μ mol/L罗格列酮的DMEM/F12完全培养基)处理SVF细胞4 d,以诱导SVF向成脂方向分化。之后使用分化液II

表1 目的基因以及内参引物序列

Table 1 RT-qPCR primers of target genes and primers

基因	引物(5'→3')
36B4-F(Mouse)	CACTGGTCTAGGACCCGAGAAG
36B4-R(Mouse)	GGTGCCTCTGGAGATTTTCG
PPAR γ -F(Mouse)	CACAATGCCATCAGGTTTGG
PPAR γ -R(Mouse)	GCTGGTCGATATCACTGGAGATC
PGC-1 α -F(Mouse)	AAGTGTFFAACTCTCTGGAAC TG
PGC-1 α -R(Mouse)	GGGTTATCTTGGTTFFCTTTATG
Plin1-F(Mouse)	GGTGAGCGGGACCTGTGA
Plin1-R(Mouse)	TTCTCATAGGCATTGCACACAGA
FSP27-F(Mouse)	AAGCGCATCGTGAAGGAGAT
FSP27-R(Mouse)	GGTGCCAAGCAGCATGTG
Adiponectin-F(Mouse)	TCACGGTGTACATGAAAGATGTG
Adiponectin-R(Mouse)	GAGAACGGCCTTGTCTTCT
CD36-F(Mouse)	TTAGATGTGGAACCCATAACTGGA
CD36-R(Mouse)	TTGACCAATATGTTGACCTGCAG
FATP2-F(Mouse)	GATGCCGTGTCCGTCTTTTAC
FATP2-R(Mouse)	GACTTCAGACCTCCACGACTC
ACC-F(Mouse)	TGGACAGACTGATCGCAGAGAAAG
ACC-R(Mouse)	TGGAGAGCCCCACACACA
FAS-F(Mouse)	GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT
FAS-R(Mouse)	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
GPAT1-F(Mouse)	CAACACCATCCCCGACATC
GPAT1-R(Mouse)	GTGACCTTCGATTATGCGATCA
SREBP1c-F(Mouse)	GGAGCCATGGATTGCACATT
SREBP1c-R(Mouse)	GGCCCCGGAAGTCACTGT
SCD1-F(Mouse)	CCGGAGACCCCTTAGATCGA
SCD1-R(Mouse)	TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAACC
PPAR α -F(Mouse)	ACAAGGCCTCAGGGTACCA
PPAR α -R(Mouse)	GCCGAAAGAAGCCCTTACAG
ACOX1-F(Mouse)	TCCAGACTTCCAACATGAGGA
ACOX1-R(Mouse)	CTGGGCGTAGGTGCCAATTA
MTTP-F(Mouse)	CCTACCAGGCCCAACAAGAC
MTTP-R(Mouse)	CGCTCAATTTTGCATGTATCC

(含有 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素的 DMEM/F12 完全培养基) 处理 SVF 细胞 2 d 以进一步增加脂质积累。使用普通倒置光学显微镜观察 SVF 细胞形态, 发现与分化第 0 天相比, 经分化液 I、II 诱导分化 6 d 后, SVF 细

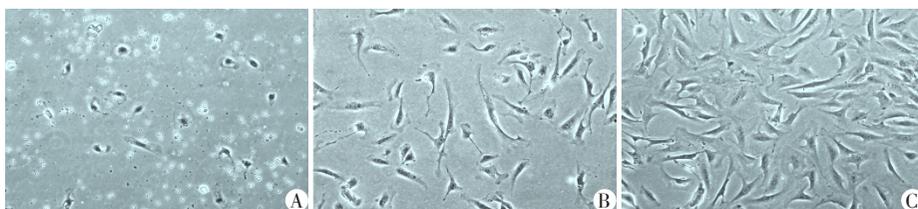
胞出现大量的透亮空泡, 呈现典型的脂滴形态, 提示出现明显的脂肪积累(图 2A)。此外, 通过反转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测分化标志分子过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPAR γ)、过氧化物酶体增殖激活受体共激活因子 1(peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha, PGC-1 α)、脂滴包被蛋白 1(perilipin 1, Plin1)、细胞死亡诱导 DFFA 样效应物 c(cell death-inducing DFFA-like effector c, FSP27)、脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)、脂联素(adiponectin)的 mRNA 水平明显上调(图 2B), 这些结果提示 SVF 细胞已经成功分化为成熟脂肪细胞, 可用于下一步实验。

2.3 成熟脂肪细胞与 Hepa1-6 共培养提高肝细胞甘油三酯水平

经分化 6 d, SVF 已成为成熟脂肪细胞。预先将 Hepa1-6 种入 Transwell 小室, 使之有足够时间贴壁, 并在贴壁 24 h 时, 达到细胞密度 50% 左右。如图 3 所示, 使成熟脂肪细胞与 Hepa1-6 进行间接接触无血清共培养 48 h(图 3A) 以及对照培养 48 h(图 3B)。培养完毕后, PBS 洗涤 2 遍, 收集 Hepa1-6 细胞进行进一步测定。分别使用普利莱组织细胞甘油三酯和总胆固醇试剂盒测定细胞甘油三酯和总胆固醇水平。相较于对照组, 进行过 Transwell 共培养的 Hepa1-6 细胞甘油三酯水平显著增加($P < 0.001$, 图 3C), 而总胆固醇水平无明显变化(图 3D), 表明两种细胞间接接触共培养已成功实现, 成熟 SVF 细胞能够诱导 Hepa1-6 细胞脂质堆积增加。

2.4 Transwell 共培养后的 Hepa1-6 细胞脂代谢通路关键基因变化

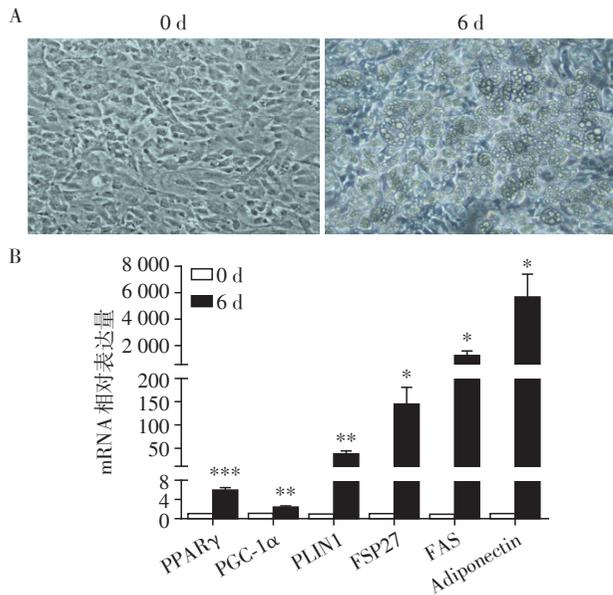
通过 Transwell 与成熟 SVF 细胞共培养能够增加 Hepa1-6 细胞的脂质积累, 提示 Hepa1-6 脂代谢通路可能发生变化。应用 RT-qPCR 检测 Hepa1-6 细胞脂代谢通路关键基因 CD36 分子(CD36 molecule, CD36)、脂肪酸转运蛋白 2(fatty acid transport pro-



A: 培养 24 h; B: 培养 48 h; C: 培养 72 h。

图 1 SVF 细胞提取后培养 24 h、48 h 和 72 h 细胞形态($\times 100$)

Figure 1 Morphology of SVF cells after 24 h, 48 h or 72 h cultured($\times 100$)



A: SVF经诱导分化0 d或6 d后的细胞形态; B: RT-PCR 检测SVF诱导分化6 d后分化标志基因mRNA水平的变化。与第0天比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图2 经诱导分化6 d SVF细胞已成功分化为成熟脂肪细胞
Figure 2 SVF cells were successfully differentiated into mature adipocytes

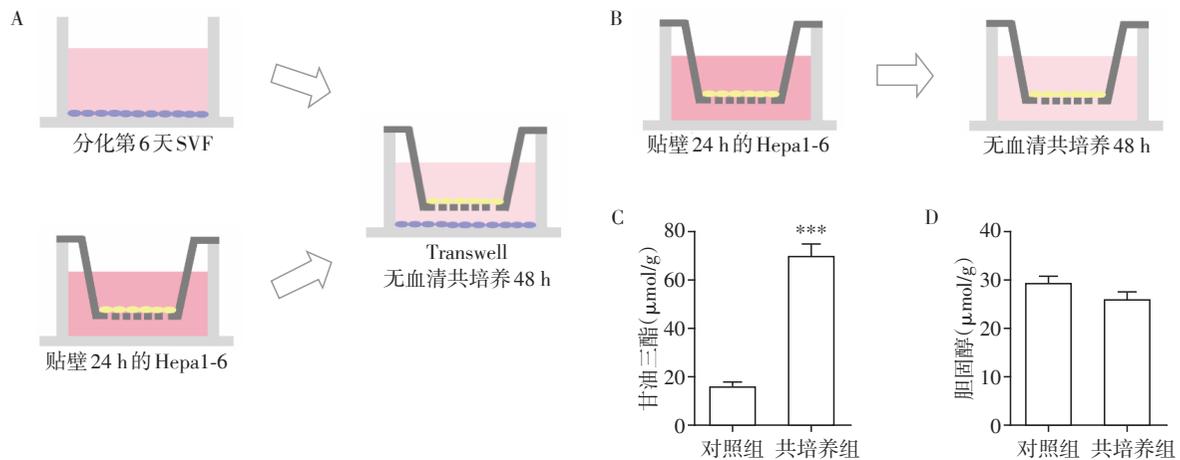
tein 2, FATP2)、乙酰辅酶 a 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)、脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)、固醇调节元件结合转录因子1(sterol regulatory element binding transcription factor 1, SREBP1c)、3-磷酸甘油酰基转移酶1(glycerol-3-phosphate acyltransferase 1, GPAT1)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶1(stearoyl-coenzyme A desaturase 1, SCD1)、过氧化物酶体增殖激活受体 α (peroxisome proliferator activat-

ed receptor alpha, PPAR α)、乙酰辅酶 A 氧化酶1(acetyl-CoA oxidase 1, ACOX1)、微粒体甘油三酯转移蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, MTP)的变化。如图4所示,可见经共培养后的Hepa1-6细胞GPAT1、CD36表达水平明显上调,而FATP2、ACC、FAS、SREBP1c、SCD1、PPAR α 、ACOX1、MTP等无明显变化,提示GPAT1、CD36表达水平的升高可能是引起共培养后Hepa1-6细胞甘油三酯水平增加的原因。

3 讨论

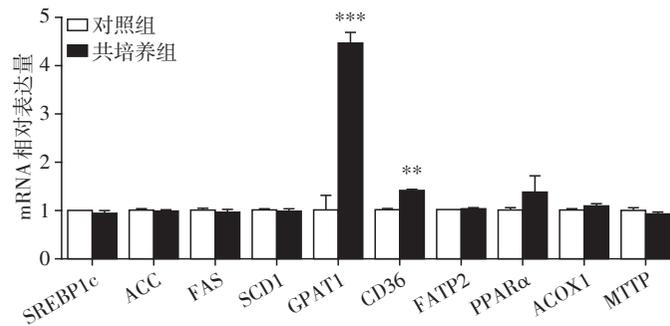
近年随着肥胖症患病率明显升高,非酒精性脂肪肝的发病率也显著增加^[19-21]。肥胖诱导非酒精性脂肪肝发生的原因诸多,作用机制非常复杂。脂肪和肝脏是肥胖症和非酒精性脂肪肝病发生密切相关的组织。目前认为,脂肪组织不仅能够储存能量,还能分泌瘦素、脂联素等脂肪因子^[22-23]。因此,脂肪细胞脂质代谢异常以及病理性脂肪因子的分泌,必然会引起肝细胞相应信号的改变,从而引起肝细胞表征的变化。虽然对脂肪细胞的能量代谢以及分泌功能具有较深入了解,但对其影响肝细胞的具体过程知之不多。寻找到方便可行且有效的体外模型,对于研究脂肪细胞和肝细胞的相互作用具有重要意义。

生理条件下,脂肪组织分泌的细胞因子通过血液循环到达靶器官如肝脏等,与对应的受体结合或进入细胞内部发挥作用^[24]。Transwell小室共培养为间接接触共培养,0.4 μm 的小室孔径能够阻拦细



A: SVF与Hepa1-6共培养实验组培养方法示意图; B: Hepa1-6对照培养示意图; C: 进行Transwell共培养48 h后Hepa1-6的甘油三酯和总胆固醇水平。与对照组比较, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图3 SVF细胞和Hepa1-6共培养
Figure 3 SVF cells and Hepa1-6 co-culture model



与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图4 Transwell共培养48 h后Hepa1-6脂代谢通路关键基因变化

Figure 4 Changes of key genes of lipid metabolism in Hepa1-6 by co-cultured 48 h in Transwell

胞发生迁移,但分泌因子以及营养物质能透过小孔在两种细胞间自由扩散^[25]。相较于自分泌旁分泌模式下的两细胞直接共培养^[26-27],Transwell共培养更好地模拟了脂肪细胞与肝细胞间的实际分泌循环,对于研究脂肪-肝脏交流具有重要的意义。本研究中,采用无血清培养基支持共培养体系,不仅不干扰分泌因子的正常分泌,且能够较好的排除血清物质对分泌因子作用的干扰。同时,该体系避免外源性脂质参与,从而为两种细胞间交流创造影响因素相对单一的环境。

SVF包含有较多成纤维干细胞,具有分化的潜能,在体外能较好地模拟脂肪细胞从前体细胞发育成为成熟脂肪细胞的过程。SVF细胞每次使用均需经原代提取,相较于连续传代的脂肪细胞系,能更好地代替小鼠体内真实脂肪细胞前体。经诱导分化的SVF出现明显较大脂滴,且分化标志物PPAR γ 、PGC-1 α 、Plin1、FSP27、FAS、Adiponectin等显著上调,表明成熟SVF能够高效分化为成熟脂肪细胞。为配合SVF的鼠源性,本研究选用Hepa1-6作为肝细胞来源。

生理条件下,脂肪动员后对肝脏的影响主要表现在脂肪酸和甘油三酯的代谢。经Transwell共培养后,Hepa1-6细胞甘油三酯水平较对照组显著增加($P < 0.001$),而总胆固醇水平无明显变化,表明肝细胞通过与脂肪细胞进行物质、信号的交流,使得自身脂质堆积明显提高,能够抵御饥饿带来的营养不良,两种细胞共培养非常成功。但所测总胆固醇水平无明显变化,其有关机制值得继续研究。同时也提示,成熟SVF细胞可能通过影响Hepa1-6细胞的甘油三酯代谢通路来引起脂质堆积增多。

造成肝细胞脂质堆积的原因,主要由以下几个方面:由CD36、FATP2等介导的脂肪酸摄取增多;

Srebp1c、ACC等介导的脂肪酸从头合成;PPAR α 、ACOX1等介导的脂肪酸氧化减少;极低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)等介导的甘油三酯分泌减少^[28]。通过对Hepa1-6细胞CD36、FATP2、ACC、FAS、SREBP1c、SCD1、GPAT1、PPAR α 、ACOX1、MTTP等基因表达水平进行检测,发现GPAT1、CD36的表达量明显增加。外源性脂肪酸由CD36摄取入肝后,会分解形成乙酰辅酶A。而新生成的乙酰辅酶A可被GPAT1等酯化形成溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA),随后继续参与合成甘油三酯^[29]。这表明,成熟SVF很有可能是通过影响CD36的表达,从而提高了肝细胞对SVF细胞分泌的游离脂肪酸的摄取。而随着肝细胞内外源性游离脂肪酸的增多,使得肝内乙酰辅酶A水平提高。为适应过高的乙酰辅酶A,GPAT1发生代偿性上调,并使甘油三酯合成增多,最终诱发肝脏脂质堆积。由脂肪酸摄取的增加诱发肝细胞代偿性机制的变化,这可能是脂肪细胞导致肝细胞脂质堆积的关键所在。这也提示,CD36在脂肪-肝脏交流中发挥着十分重要的作用。

综上所述,通过Transwell小室建立成熟SVF与Hepa1-6细胞共培养模型,能成功诱导Hepa1-6脂质堆积增多,且该模型成模机制与机体宏观器官交流的媒介形式基本吻合,具有较高的可行性。同时,本实验发现,成熟SVF细胞可能通过影响CD36、GPAT1的表达来促进肝细胞脂质堆积。以上研究为探索脂肪-肝脏交流提供了简明有效的体外模型。

[参考文献]

- [1] CHOOI Y C, DING C, MAGKOS F. The epidemiology of obesity[J]. *Metabolism*, 2019, 92: 6-10
- [2] BRAY G A, HEISEL W E, AFSHIN A, et al. The science of obesity management: an endocrine society scientific

- statement[J]. *Endocr Rev*, 2018, 39(2): 79-132
- [3] AVGERINOS K I, SPYROU N, MANTZOROS C S, et al. Obesity and cancer risk: emerging biological mechanisms and perspectives[J]. *Metabolism*, 2019, 92: 121-135
- [4] LONGO M, ZATTERALE Z, NADERI J, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2358
- [5] KAWAI T, AUTIERI M V, SCALIA R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320(3): 375-391
- [6] PETERSEN M C, SHULMAN G I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(4): 2133-2223
- [7] VISHVANATH L, GUPTA R K. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(10): 4022-4031
- [8] CINTI S. Adipose organ development and remodeling[J]. *Compr Physiol*, 2018, 8(4): 1357-1431
- [9] HAMMARSTEDT A, GOGG S, HEDJAZIFAR S, et al. Impaired adipogenesis and dysfunctional adipose tissue in human hypertrophic obesity[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(4): 1911-1941
- [10] SCHEJA L, HEEREN J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(9): 507-524
- [11] WATT M J, MIOTTO P M, DE NARDO W, et al. The liver as an endocrine organ-linking nafld and insulin resistance[J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(5): 1367-1393
- [12] FANG H, JUDD R L. Adiponectin regulation and function[J]. *Compr Physiol*, 2018, 8(3): 1031-1063
- [13] DUWAERTS C C, MAHER J J. Macronutrients and the adipose-liver axis in obesity and fatty liver[J]. *Cell Mol Gastroenterol hepatol*, 2019, 7(4): 749-761
- [14] BORA P, MAJUMDAR A S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 145
- [15] ZHANG H Z, CHAE D S, KIM S W. ASC and SVF cells synergistically induce neovascularization in ischemic hindlimb following cotransplantation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 185
- [16] SI Z, WANG X, SUN C H, et al. Adipose-derived stem cells: sources, potency, and implications for regenerative therapies[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108765
- [17] 蔡丽娥,张 许,季学涛,等. PNPLA7在脂肪组织中的表达及调控的初步研究[J].南京医科大学学报(自然科学版),2020,40(1):4-9
- [18] 朱晓蕾,杜苏苏,严琴慧,等.姜黄素诱导小鼠皮下前脂肪细胞棕色化的作用及机制[J].南京医科大学学报(自然科学版),2020,40(6):796-802
- [19] VUSIRIKALA A, THOMAS T, BHALA N, et al. Impact of obesity and metabolic health status in the development of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A United Kingdom population-based cohort study using the health improvement network (THIN)[J]. *BMC Endocr Disord*, 2020, 20(1): 96
- [20] 胡默然,吴周璐,赵晨曦,等.神经节苷脂GM3在非酒精性脂肪肝炎小鼠肝脏中的表达变化[J].南京医科大学学报(自然科学版),2022,42(2):153-159
- [21] 张 培,张园园,严君君,等.S1PR2在非酒精性脂肪性肝炎中的作用初探[J].南京医科大学学报(自然科学版),2020,40(6):810-815,845
- [22] FRIEDMAN J M. Leptin and the endocrine control of energy balance[J]. *Nat Metab*, 2019, 1(8): 754-764
- [23] ISHTIAQ S M, RASHID H, HUSSAIN Z, et al. Adiponectin and PPAR: a setup for intricate crosstalk between obesity and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2019, 20(3): 253-261
- [24] FUNCKE J B, SCHERER P E. Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication[J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(10): 1648-1684
- [25] LIN J, CAO S W, WANG Y, et al. Long non-coding RNA UBE2CP3 enhances HCC cell secretion of VEGFA and promotes angiogenesis by activating ERK1/2/HIF-1 α /VEGFA signalling in hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 113
- [26] HSU M J, CHRIST M, CHIRST B. Co-culture of human mesenchymal stromal cells and primary mouse hepatocytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2269: 151-165
- [27] BORCIANI G, MONTALBANO G, BALDIN N, et al. Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: simulating in vitro bone remodeling in regenerative approaches[J]. *Acta Biomater*, 2020, 108: 22-45
- [28] IPSEN D H, LYKKESFELDT J, TVEDEDEN N P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(18): 3313-3327
- [29] ALVES B M, COHEN D E. Triglyceride metabolism in the liver[J]. *Compr Physiol*, 2017, 8(1): 1-8

[收稿日期] 2022-03-03
(本文编辑:唐 震)