

犊牛前脂肪细胞的原代培养

夏成王哲^{1*} 牛淑玲¹ 张才² 张洪友

(黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319;

¹解放军军需大学军事兽医系临床教研室, 长春 130062; ²沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110161)

摘要 为了建立犊牛前脂肪细胞原代培养模式, 以便深入地研究奶牛脂肪组织增生的生物学特征。选用犊牛小肠网膜, 采用原代消化细胞培养法培养出梭形细胞; 同时以皮肤组织的成纤维细胞培养作为对照。结果显示: 培养出的梭形细胞成分均一, 增殖旺盛, 分化率高。经形态学动态变化的观察, 生长曲线及油红O脂肪染色抽取法测定, 证明是功能活跃的前脂肪细胞, 并在体外重现了其增殖的全过程。因此, 在犊牛小肠网膜中存在着可分化成熟的、生成脂肪的前脂肪细胞。为进一步研究与肥胖、胰岛素抵抗相关的疾病如奶牛酮病、脂肪肝等打下了基础。

关键词 犊牛前脂肪细胞; 原代细胞培养; 小肠网膜

脂肪细胞是胰岛素作用的经典靶细胞之一, 与人、动物的肥胖及胰岛素抵抗相关疾患如多囊卵巢综合症、脂肪肝等的研究关系密切, 近年来受到内分泌领域的重视。前脂肪细胞是一类具有增殖和向脂肪细胞分化能力的特异化的前体细胞, 它的存在和作用持续于人、动物的一生。目前, 有关鼠、人和猪的前脂肪细胞的原代培养已有报道^[1-3], 但是牛的尚未见报道。因此, 本研究对黑白花犊牛前脂肪细胞进行原代培养, 从而为应用体外脂肪细胞培养技术探索奶牛脂肪代谢疾病如酮病、脂肪肝的发病机制打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织来源 选取临床检查无异常的新生1日龄公犊牛1头。颈动脉放血致死, 无菌开腹切取腹腔内小肠网膜、腹部皮肤组织。

1.1.2 主要试验用品和化学试剂 DMEM/F12培养基(1:1), 小牛血清, I型胶原酶, HEPES, 牛转铁蛋白, 青、链霉素粉剂均购自Gibco BRL公司; 生物素、泛酸钙、胰岛素均系Sigma公司产品。培养皿购自Gibco BRL公司。

1.1.3 培养基及主要试剂的配制 基础培养基(BCM): 按产品说明取DMEM/F12培养粉10g, 加入10%小牛血清, 四蒸馏水定容至1000mL。分化培养基(DCM): 在BCM内, 加入终浓度分别为15mmol/L NaHCO₃, 15mmol/L HEPES, 33μmol/L

泛酸钙, 17μmol/L牛转铁蛋白, 100mg/L青霉素, 100mg/L链霉素, 10mg/L胰岛素, 蒸馏水定容至1000mL。消化液(1mg/mL): 称取100mg I型胶原酶, D-Hanks溶液定容至100mL。上述溶液均经调整pH值至7.4~7.6, 0.22μm微孔滤膜正压过滤除菌, 分装置-20℃保存。油红O工作液^[4]: 称取4.2g油红O溶于1200mL异丙醇中室温静置过夜, 分析滤纸过滤后收集滤液, 并加入900mL三蒸馏水, 于4℃再次静置过夜后过滤两次即可于室温贮存备用。

1.1.4 仪器 CO₂培养箱购自日本Sanyo电子仪器有限公司, 倒置显微镜购自上海光学仪器有限公司, 数码相机为Nikon E5700。

1.2 方法

1.2.1 犊牛前脂肪细胞、皮肤成纤维细胞的原代培养 采用人、鼠和猪的前脂肪细胞培养方式^[1-3]。手术无菌切取腹腔内小肠网膜组织约60g, 同时切取皮肤组织约0.5cm×3cm进行成纤维细胞培养作为对照。D-Hanks液洗涤, 分离去除脂肪组织中肉眼可见的纤维成份及血管, 皮肤组织则需去除表皮、皮下脂肪, 剪碎成约2mm×2mm的小块或更细, 加入D-Hanks液连同切碎组织吸入50mL的离心管内, 加入等体积的1mg/mL I型胶原酶, 置

收稿日期: 2004-04-29 接受日期: 2004-10-18

国家自然科学基金重点项目(No.30230260)

* 通讯作者。Tel: 0431-6986005, Fax: 0431-6986005, E-mail: wangzhe500518@sohu.com

37 °C 空气摇床内, 以 150 次 /min 摇动消化, 1.5 h 后, 250 μm 尼龙网过滤, 700 g 离心 5 min, 去除漂浮的脂肪细胞及培养液, D-Hanks 液洗涤并离心。沉积的细胞用 BCM 液制成细胞悬浮液, 接种至培养皿(Φ 6cm)内, 前脂肪细胞和成纤维细胞的接种密度均约为 5×10^4 个 /mL, 置于 37 °C, 5%CO₂ 培养箱内温育 2 天, 换用 DCM 液诱导和维持脂肪细胞分化, 以后每 2 天更换一次 DCM 液。

1.2.2 犊牛前脂肪细胞及皮肤成纤维细胞的组织学染色 采用人前脂肪细胞、皮肤成纤维细胞的组织学染色法^[5]。按原代培养过程, 待两种细胞贴壁后每 2 天各取一个培养皿(Φ 6 cm)染色。加入 10% 甲醛的等渗盐缓冲液中固定 10 min 以上, 然后用 PBS 缓冲液漂洗片刻, 倒掉缓冲液, 稍干燥后, 采用 SudanIII 或油红 O 染色脂肪滴及 Mayer 苏木素复染细胞核, 应用数码相机直接在倒置显微镜上拍摄。直至培养到 14 天。

1.2.3 细胞生长曲线的绘制 采用血液白细胞计数方法绘制犊牛前脂肪细胞、皮肤成纤维细胞的生长曲线。将细胞悬液等量接种至 21 个培养皿(Φ 6 cm)内, 随机分成 7 组, 每组 3 个, 每 2 天检测一组中每个平皿中的细胞密度, 取 3 个的均值, 如此至 14 天的第 7 组结束。

1.2.4 油红 O 染色提取法测定细胞内的脂肪含量

细胞培养、接种方法见 1.2.2 和 1.2.3, 根据 Ramirez-Zacarias 等^[4]的方法测定细胞内的脂肪含量。10% 甲醛的等渗盐缓冲液固定培养皿贴壁细胞 1 h 后, 蒸馏水漂洗。吸取油红 O 工作液 10 mL 浸染培养皿, 2 h 后倒掉油红 O 工作液, 蒸馏水漂洗培养皿数次, 直至完全漂洗干净。将已染色的培养皿置于 32 °C 培养箱内蒸发掉水分, 加入 1 mL 异丙醇, 萃取 20 min 后, 用吸管移出染液, 于分光光度计 510 nm 波长处测吸光度(A 值表示)。

2 结果

2.1 原代培养的犊牛前脂肪细胞、皮肤成纤维细胞形态学观察

犊牛前脂肪细胞贴壁后初为小圆形, 核 / 浆比例较大, 4 天后即可观察到细胞渐成梭型, 并开始积聚脂肪颗粒(图 1-1)。7 天左右此梭形细胞大量繁殖, 并积聚多量脂肪颗粒(图 1-2)。到 10 天左右开始分化成含多量小脂滴的脂肪细胞, 出现相互融合的脂肪滴(图 1-3), 到 14 天左右分化成大的单脂滴的脂肪细胞(图 1-4)。体外培养的脂肪细胞体积较大, 光镜下观察细胞膜薄, 轮廓不光滑, 胞质内有大量圆形脂滴, 大小不等且多散在, 也有小脂滴融合成大脂滴的情况; 而同时培养的皮肤成纤维细胞增殖速率较快, 但始终为长梭形, 无或很少的脂

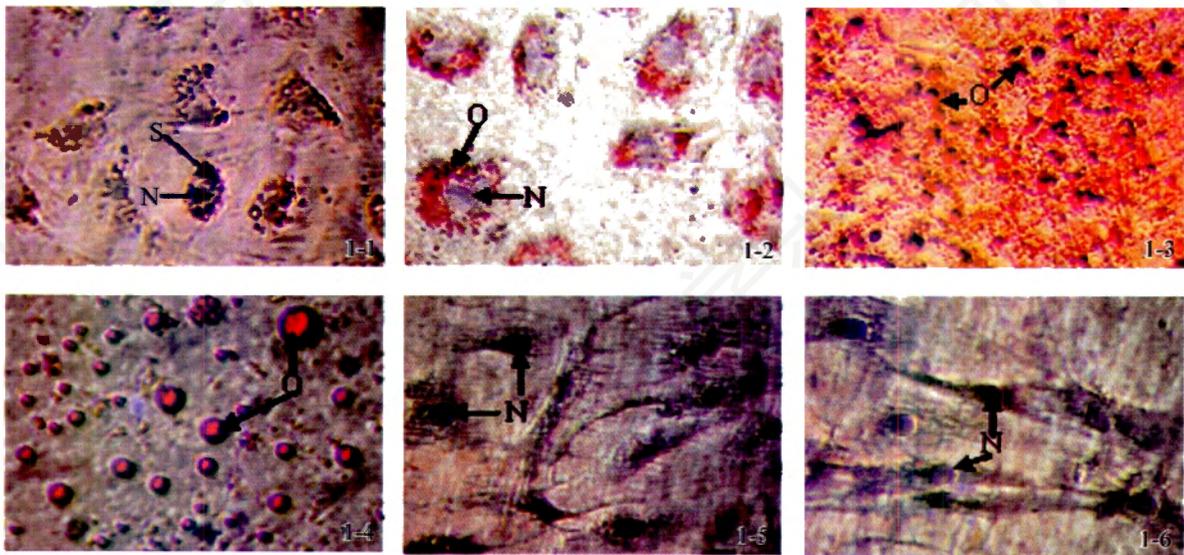


图 1 原代培养的犊牛前脂肪细胞和成纤维细胞的形态学观察

1-1: 前脂肪细胞培养 4 天, SudanIII-Mayer 染色, $\times 250$; 1-2: 前脂肪细胞培养 7 天, 油红 O-Mayer 染色, $\times 400$; 1-3: 前脂肪细胞培养 10 天, 油红 O 染色, $\times 100$; 1-4: 前脂肪细胞培养 14 天, 油红 O 染色, $\times 250$; 1-5: 成纤维细胞培养 4 天, 油红 O-Mayer 染色, $\times 250$; 1-6: 成纤维细胞培养 14 天, 油红 O-Mayer 染色, $\times 250$ 。N: 细胞核, O: 油红染色脂肪滴, S: SudanIII 染色的脂肪滴。

滴积聚(图 1-5 和图 1-6)。

本研究采用脂肪细胞常用的 SudanIII、油红 O-Mayer 苏木素染色法, 显示细胞内脂肪滴和细胞核。在培养的前脂肪细胞和成纤维细胞(图 1)中可见, 由 SudanIII、油红 O 染色的细胞质内脂肪滴, 前者呈黄色(图 1-1), 后者呈红色(图 1-2、1-3、1-4)。Mayer 苏木素复染细胞核呈紫色(图 1-1、1-2、1-5、1-6), 而且在其周围有黄色或红色的脂肪滴。先 SudanIII 或油红 O 染色, 再 Mayer 苏木素染色, 能较好的显示出脂肪滴和细胞核, 但是细胞膜不清。图 1-1、1-5、1-6 先 SudanIII 或油红 O 染色, 再 Mayer 苏木素染色, 为了显示整个细胞形态、结构及脂肪滴染色; 图 1-3、1-4 仅用油红 O 染色, 为了显示细胞脂肪滴数量及染色效果。本实验显示随细胞密度增高, 脂肪滴数量增加, 细胞核染色效果不佳。这些染色的效果与人、鼠、猪等前脂肪细胞的相类似^[6,7]。

2.2 犍牛前脂肪细胞、皮肤成纤维细胞的生长曲线

由图 2 生长曲线可见, 犍牛前脂肪细胞和皮肤成纤维细胞在接种细胞密度均约为 5×10^4 个/mL 下, 两者倍增时间分别为 2.1 天左右和 2.5 天左右, 基本相近, 而且曲线变化大致相同。

2.3 犍牛前脂肪细胞、皮肤成纤维细胞生长过程中细胞内脂肪含量的变化

由图 3 可见, 胞浆内的脂肪含量于培养 7 天后迅速增加, 14 天左右可到达高峰, 而皮肤成纤维细胞内无脂肪积聚。此油红含量的变化与图 1 中两

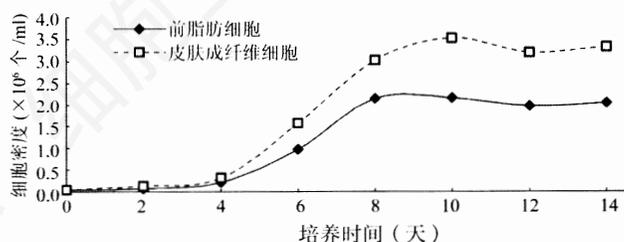


图 2 犍牛前脂肪细胞和皮肤成纤维细胞生长曲线

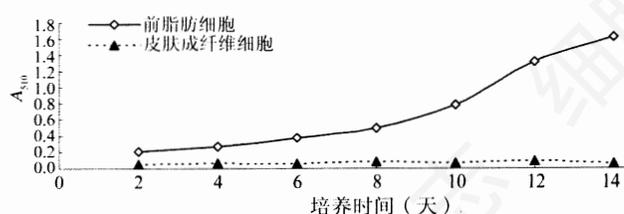


图 3 犍牛前脂肪细胞和皮肤成纤维细胞内油红含量变化曲线

种细胞的染色的结果基本一致。

3 讨论

3.1 体外原代培养的犍牛前脂肪细胞的生物学特性

目前, 国内外前脂肪细胞体外培养系统大致有两类, 其中一类来源于血管基质组份细胞(stromal vascular fraction, SVF), 这是经典的前脂肪细胞。Van 等^[9]对 SVF 的系统研究形成了完整的前脂肪细胞理论。将切下的脂肪组织用胶原酶处理, 再将组织悬液离心, 其中的沉淀物基质血管成份即是 SVF, 将培养的 SVF 和培养的成纤维细胞比较, 这两种培养物以差不多的速率增殖, 倍增时间 2 天多。起初 SVF 细胞胞浆内无脂肪颗粒, 但在形成单层汇合后可积聚大量脂滴, 而成纤维细胞的胞浆内则无脂滴。这就证明了 SVF 是具有增殖和向脂肪细胞分化潜能的前脂肪细胞^[7]。

本研究观察到犍牛前脂肪细胞贴壁后 4 天左右大量增殖, 1 周后开始多量的脂肪颗粒的积聚。培养 2 周时, 分化成多脂滴或单脂滴的脂肪细胞。同时应用油红 O 染色提取法对体外培养的犍牛前脂肪细胞转化率进行定量, 在胰岛素等的作用下, 培养的前脂肪细胞第 4 天即开始有脂肪的少量积聚, 1 周后积聚量明显增多, 2 周时达到高峰, 这与形态学上的培养 1 周后细胞内开始出现多量脂肪颗粒相吻合。另外, 体外培养的犍牛前脂肪细胞(2.1 天)与皮肤成纤维细胞(2.5 天)的增殖速率相近。这些结果与文献报道的人、鼠和猪的结果相类似^[1-3,6,7]。

3.2 犍牛前脂肪细胞培养技术的特点

由于不同的组织细胞培养需要不同的生长条件, 尤其体外培养的细胞对生长环境要求更高。文献指出脂肪组织来源于原始的网状结缔组织, 由结缔组织和脂肪细胞组成, 细胞成分中以脂肪细胞为主, 此外还含有其他细胞。脂肪细胞和成纤维细胞均来自中胚层, 因此脂肪细胞和成纤维细胞的培养具有相似的体外培养条件, 但是前脂肪细胞的增殖和转化为脂肪细胞需要促脂肪形成因子的作用, 目前已知的这类物质有: 胰岛素、糖皮质激素、甲状腺素、生长激素、转铁蛋白等^[1-3,6,7]。本研究显示尽管犍牛前脂肪细胞的原代培养大致可遵循人、鼠和猪的培养方式, 如一般采用 DMEM/F12(1:1)培养基等, 但是由于动物、组织的不同, 在培养基、消化酶浓度和消化时间的选择, 接种的细胞数

量等方面需要进行反复的实验摸索才能确定有利于体外培养的细胞的生长条件。

本研究不仅确立了犊牛前脂肪细胞的体外培养的条件,而且从犊牛小肠网膜获得成分均一、增殖和分化均旺盛的梭形细胞,经生长曲线测定和脂肪染色,证明是具有典型特征的前脂肪细胞,符合文献中提出的3个标准^[6,7],即:①来自脂肪组织,形态为梭形,胞浆内无或很少有脂肪颗粒。②增殖迅速,与来自同一个体的成纤维细胞在倍增时间上接近。③在形成单层汇合后能变为脂肪细胞,如脂肪细胞特异性酶的出现或胞浆内出现脂肪颗粒,并且胰岛素是这个过程中的主要促进因素。

综上所述,通过一系列的实验和研究分析,我

们初步建立犊牛前脂肪细胞原代培养模式,探索了犊牛前脂肪细胞生长、增殖及分化的生物学特征。证明犊牛小肠网膜中存在着可分化成熟的、生成脂肪的前脂肪细胞。并在体外重现了其增殖的全过程。

参考文献 (References)

- [1] Van Harmelen V *et al.* *Metabolism*, 2004, **53**: 632
- [2] Gerfault V *et al.* *J Nutr*, 2000, **130**: 1179
- [3] Shin SM *et al.* *FEBS Lett*, 2003, **543**: 25
- [4] Ramirez-Zacarias JL *et al.* *Histochemistry*, 1992, **97**: 493
- [5] Van RL *et al.* *J Clin Invest*, 1976, **58**: 699
- [6] 朱晓海等. *中华整型烧伤外科杂志*, 1999, **15**: 199
- [7] 王竹晨等. *中山医科大学学报*, 2001, **22**: 443

Primary Culture of Calf Preadipocyte

Cheng Xia, Zhe Wang^{1*}, Shu-Ling Niu¹, Cai Zhang², Hong-You Zhong

(College of Animal Science, HeiLongjiang Aug. 1st Agriculture University, Daqing 163319, China;

¹ Department of Military Veterinary, Liberation Army Required University, Changchun 130062, China;

² College of Animal Science and Veterinary, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110161, China)

Abstract To establish a primary calf preadipocyte culture method for better understanding the properties of hyperplasia of calf adipose tissue, fibroblast like cells from calf small intestine omentum were cultured and fibroblasts from cattle dermise were also cultured to serve as control. Results shown: The cells from intestine omentum were highly homogeneous, proliferative and have high differentiation rate. Their dynamic morphological changes, growth curve, extracting stained intracytoplasmic lipid with oil red O, all verified their preadipocyte identity. Under controlled conditions, the preadipocytes replayed their hyperplasia process *in vitro*. Conclusion: In calf omentum tissue, there exist preadipocytes that can differentiate into mature adipocytes. Since adipocyte is one kind of classic target cells to insulin, this study aid the basis for further probing into obesity and insulin resistant diseases such as ketosis and fatty liver in dairy cows.

Key words calf preadipocyte; primary cell culture; small intestinal omentum

Received: April 29, 2004 Accepted: October 18, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30230260)

*Corresponding author. Tel: 86-431-6986005, Fax: 86-431-6986005, E-mail: wangzhe500518@sohu.com