

猪前体脂肪细胞的分离培养

张国华 杨公社 屈长青 孙世铎*

(西北农林科技大学, 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100)

摘要 在比较组织块法和消化法分离培养猪前体脂肪细胞的基础上, 通过对前体脂肪细胞增殖与分化过程中细胞的形态学变化、生长曲线、油红 O 染色以及脂肪细胞特异性标志基因脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, *LPL*)和过氧化物体增殖剂活化受体 γ (peroxisome proliferators-activated receptor γ , *PPAR* γ)表达的研究, 证明用消化法可从猪的脂肪组织中分离获得大量的前体脂肪细胞, 其生长旺盛, 可见自发充脂; 传代细胞经诱导培养后, 充脂率大幅度提高, 脂肪特异性标志基因表达增强。这为深入研究脂肪细胞增殖与分化以及猪体脂肪沉积提供了一个较好的模型。

关键词 猪; 前体脂肪细胞; 传代; 诱导

脂肪细胞的体外培养始于 20 世纪 60 年代初。目前, 最常用的有两种体外培养系统, 即前体脂肪细胞系(preadipocyte cell line)和原代前体脂肪细胞(primary preadipocyte culture)。现已建立的最有代表性的两个前体脂肪细胞系是从小鼠胚胎的 Swiss3T3 细胞中诱导分化出来的, 即 3T3-F442A 和 3T3-L1 前体脂肪细胞系, 经诱导培养二者均能分化为脂肪细胞。几十年来, 利用啮齿类前体脂肪细胞系在研究脂肪细胞分化和代谢机制方面已取得一定的成果^[1]。在研究 3T3-L1 前体脂肪细胞系以及人、大鼠的前体脂肪细胞增殖与分化时, 发现 cAMP 信号通路在分化过程中发挥着重要的作用, 但在猪上的研究却发现, cAMP 信号通路在促进猪前体脂肪细胞分化时作用并不明显^[2]。说明脂肪细胞增殖与分化存在种属差异。

猪具有肥胖的自然属性, 也是最主要的肉用家畜, 其脂肪沉积量直接关系着肉的品质。在体外培养条件下, 猪脂肪细胞生脂调控具有其种属特异性。目前, 国内已经有了在人^[3,4]、大鼠^[5]及牛^[6]等动物上建立前体脂肪细胞培养模式的报道, 但在猪上相关研究还未见有报道。因此摸索建立猪的前体脂肪细胞培养体系, 对于研究其脂肪沉积与组织发育规律, 具有重要的理论和现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 脂肪组织 取自本校实验农场种猪场 7 日龄仔猪, 取材部位位于颈部皮下。

1.1.2 试剂和仪器 DMEM 培养基和 I 型胶原酶购自 Gibco BRL 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 牛血清白蛋白购自 Amersco 公司; 反转录试剂盒购自 Fermentas 公司; TRIzol 购自天为时代; 引物由上海生工合成; 其他试剂均购自华美生物工程公司; 培养瓶和培养皿购自 Corning 公司。CO₂ 培养箱(REVOC, USA), 倒置相差显微镜(Olympus, Japan)、酶联免疫检测仪(华东电子集团医疗装备有限责任公司)、超低温冰箱(Sanyo, Japan)、PCR 仪(MJ-RES EARCH, USA)等。

1.1.3 主要试剂的配制 完全培养基: 按说明取 5 g DMEM 培养粉, 1.83 g NaHCO₃, 1.2 g HEPES, 溶于 450 ml 四蒸水中, 加入 50 ml 胎牛血清。诱导培养基: 含 50 ng/ml 氢化可的松、10 μ g/ml 胰岛素、10 μ g/ml 转铁蛋白, 用完全培养基配制。胶原酶消化液: 称取 100 mg I 型胶原酶, 1 g 牛血清白蛋白溶于 100 ml 的 PBS 中。胰蛋白酶消化液: 称取 0.25 g 胰蛋白酶溶于 100 ml 的 PBS 中。上述溶液均经调整 pH 值至 7.2~7.4, 0.22 μ m 微孔滤膜正压过滤除菌, 分装后置 -20 $^{\circ}$ C 保存。油红 O 工作液: 称取 4.2 g 油红 O 溶于 1 200 ml 异丙醇中, 室温静置过夜, 分析滤纸过滤后收集滤液, 并加入 900 ml 三蒸水, 于 4 $^{\circ}$ C 再次静置过夜后过滤两次即可于室温贮存备用。

1.2 猪前体脂肪细胞的分离培养

收稿日期: 2005-03-16 接受日期: 2005-07-11

国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目资助(No.2004CB117506)

* 通讯作者。Tel: 029-87032582, E-mail: ssdsm@tom.com

1.2.1 组织块培养法 无菌状态下取仔猪颈部和背部皮下约 3 g 脂肪组织, 用含高浓度青霉素和链霉素的 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 剪去脂肪组织中可见的血管和结缔组织, 将脂肪组织剪成 1 mm³ 左右的小块, 整齐地摆放在 25 ml 培养瓶中(可摆放 20~40 块), 将培养瓶翻转过来加入 4 ml 完全培养基(避免组织块漂浮), 再放入 CO₂ 培养箱中, 4 h 后将培养瓶小心翻转过来, 让培养液浸注组织块, 继续放入 CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 胶原酶消化培养法 按上述方法取得脂肪组织冲洗并剪去脂肪组织中可见的血管和结缔组织后, 将脂肪组织剪成 1 mm³ 左右的小组织块, 加入 I 型胶原酶消化液消化 1 h (37 °C, 每 5 min 振荡一次), 再用 100 μm 和 25 μm 的双层尼龙筛过滤消化物, 将滤液 1 500 r/m 离心 10 min, 弃上清液, 加入红细胞裂解液, 吹打均匀, 室温静置 10 min, 再 1 000 r/m 离心 5 min, 弃上清液, 加入无血清培养液, 吹打均匀, 1 000 r/m 离心 5 min, 弃上清液, 加入完全培养基, 吹打均匀, 即可获得猪前体脂肪细胞, 台盼蓝染色, 用计数板计数后, 按 5×10⁴ 个/cm² 的密度将前体脂肪细胞接种于 6 孔培养板中, 放入 CO₂ 培养箱中培养。

1.3 细胞传代培养

原代培养至细胞达到 80%~90% 汇合时, 用胰蛋白酶消化液在 37 °C 下消化 3~5 min。等体积完全培养液终止消化, 1 500 r/m 离心 5 min, 然后按 1:3 的比例进行传代接种培养, 并标记为 P1。传代培养过程中, 每 2~3 天换一次完全培养液, 直至细胞汇合并铺满整个培养皿后, 再重复上述操作。

1.4 细胞生长曲线测定

原代培养至细胞达到 80%~90% 汇合时, 传代等量接种至 30 个直径 35 mm 培养皿内, 随机分成 10 组, 每组 3 皿, 每天检测一组中每皿的细胞总数, 取 3 个皿的均值, 如此至第 10 组结束。细胞计数参照司徒镇强等^[7]方法。

1.5 脂肪细胞诱导分化

传代细胞接种 24 h 后, 换用诱导培养液(诱导第一天记为 0 天), 每 3 天换一次液, 第 10 天提取总 RNA, 观察脂滴出现情况。

1.6 脂肪细胞的鉴定

1.6.1 油红 O 染色 参照文献[5]的方法, 取培养至第 10 天的培养皿, PBS 冲洗 3 次, 10% 甲醛固定 35 min, PBS 冲洗 2 次, 油红 O 染色 8 min, 60% 异丙醇分色 10~20 s, 自来水冲洗, 苏木精染

色 1 min, 自来水冲洗, 甘油明胶封片。

1.6.2 RT-PCR 检测 传代细胞培养至第 10 天抽提细胞总 RNA, 以 Fermentas 试剂盒反转录为 cDNA。根据 GenBank 公布的猪脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase, *LPL*)和过氧化物体增殖剂活化受体 γ(peroxisome proliferators-activated receptor γ, *PPAR*γ)和 β 肌动蛋白基因序列, 设计上下游引物。*LPL* 上游引物: 5'-GCAGGAAGTCTGACCAATAAG-3', 下游引物: 5'-GGTT TCTGGATGCCAATAC-3'; *PPAR*γ 上游引物: 5'-TGACCCAGAAAGCGATGC-3', 下游引物: 5'-CCTGATGGCGTTATGAGACA-3'; β 肌动蛋白基因上游引物: 5'-ACTGCCG-CATCCTCTTCCTC-3', 下游引物: 5'-CTCCTGCT-TGCTGATCCACAT-3'。PCR 扩增后, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳, Dolphin-DOC 图像分析系统拍照。

2 结果

2.1 形态学观察

2.1.1 组织块法培养 脂肪组织块容易贴壁, 翻转后漂浮的组织块少。在培养 3 天后, 其边缘开始游出少量梭形或不规则形细胞, 这些细胞均为成纤维样细胞; 培养 5 天后, 小组织块周围游离出大量细胞并开始贴壁生长。显微镜下观察, 细胞以组织块为中心成放射状或旋涡状生长(图 1)。培养 7 天后, 少量成纤维样细胞出现脂滴, 继续培养至 9 天时, 有脂滴的细胞数目增多, 而且细胞中的脂滴由少变多, 出现典型的多脂滴细胞。之后, 细胞体积由小变大, 出现脂滴融合现象。

2.1.2 消化法培养 经 I 型胶原酶消化接种培养, 刚接种的细胞胞质回缩, 为小圆球形, 呈悬浮状态。3 h 后, 可见有大量的小三角形细胞贴壁, 12 h 后贴壁细胞伸展。贴壁后的细胞开始伸展变形, 多数细胞形态呈长梭形或星形, 少数呈不规则三角形。第 2 天可见少量的充脂细胞出现, 从第 2 天起, 细胞生长加速, 梭型和不规则型细胞大量增加, 充脂细胞数量增多(图 2), 第 5 天细胞达到 80%, 进行传代培养。

2.2 传代细胞生长曲线分析

细胞生长曲线的测定一般可利用细胞计数进行。细胞倍增时间的计算依下列公式求得:

$$TD = t \log 2 / (\log N_t - \log N_0)$$

TD 为细胞倍增时间, t 为培养时间, N₀ 为接种细胞数, N_t 为培养 t 小时后的细胞数。

前体脂肪细胞生长曲线近似 S 型(图 3), 符合

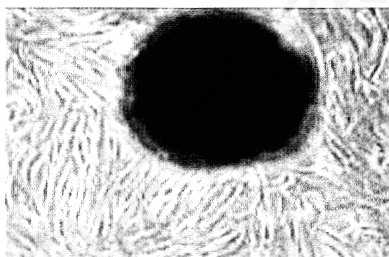


图1 细胞以组织块为中心成辐射状漩涡状生长(100×)



图2 消化法培养至第5天出现典型的多脂滴细胞(200×)

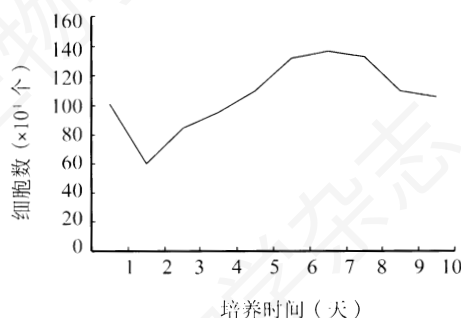


图3 前体脂肪细胞生长曲线

原代细胞的正常生长增殖规律,即经历潜伏期、指数生长期并有进入平台期的趋势。根据生长曲线,前体脂肪细胞的倍增时间为60.2 h。前体脂肪细胞接种后潜伏期约为36 h左右,培养5天后前体脂肪细胞增加了近2.5倍。接种后的第2~7天是前体脂肪细胞的指数增殖期,第7天后前体脂肪细胞的生长进入平台期。

2.3 油红O染色分析

传代细胞经诱导后,充脂细胞数显著增加(图4)。经油红O染色,可见脂滴被亲脂的油红O着色而呈橘红色,细胞核因苏木精着色而呈兰色(图5)。

2.4 RT-PCR

由图6可以看出,在诱导第0天,*LPL*和*PPARγ*的表达量均较低,在培养第10天,未诱导组*LPL*和*PPARγ*的表达增加,但其表达量明显少于诱导组。

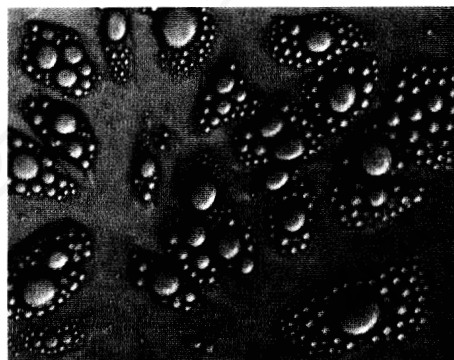


图4 传代细胞经诱导后,充脂细胞数增加(200×)

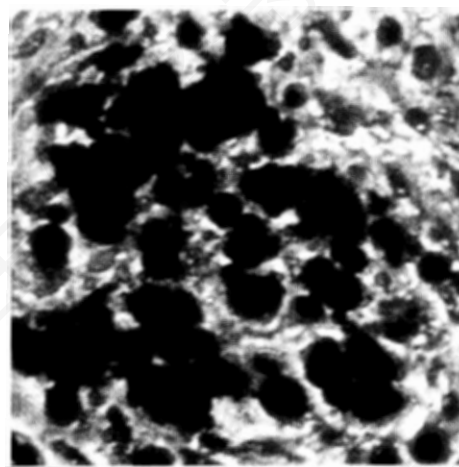


图5 脂肪细胞的油红O染色(200×)

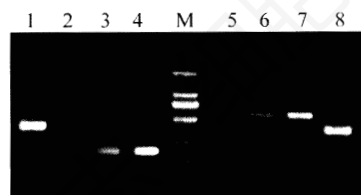


图6 *LPL*和*PPARγ*的表达变化

1, 8: β 肌动蛋白基因; 2, 5: 诱导第0天*LPL*、*PPARγ*的表达; 3, 6: 未诱导细胞第10天时*LPL*、*PPARγ*的表达; 4, 7为诱导细胞第10天时*LPL*、*PPARγ*的表达。

3 讨论

本实验观察到原代培养的细胞在达到80%~90%汇合时可见自发充脂,而传代以后的细胞,在达到汇合但并没有经过诱导,几乎观察不到充脂细胞,加入诱导剂后,细胞迅速充脂,经过油红O染色鉴定均为脂肪细胞,说明传代可以提高细胞的纯度。

细胞体外分离培养是研究复杂的生物系统的重要手段。本研究采用了组织块培养法和酶消化培养法分离培养猪前体脂肪细胞。发现组织块法培养的细胞同源性好且具有操作简便和成功率高等优点,

但并非每个组织块都有生长能力, 培养的细胞成活率低, 到可传代的时间较长, 获得的细胞较少。而胶原酶消化法第 5 天可见细胞达到 80% 汇合, 消化法适于短期内获得大量细胞的实验。因此, 我们以后的培养均采用消化法培养, 并且是在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度下培养, 这与人^[4]、牛^[6]及大鼠^[5]等的前体脂肪细胞培养条件相一致。

前体脂肪细胞的原代培养可再现其增殖与分化过程, 即生长停顿 - 生长再续 - 细胞分化的连续过程。生长停顿是必要的第一步, 此后这些细胞至少进行一次以上的再分裂, 才继续向成熟脂肪细胞分化。我们发现细胞贴壁后经过一段时间的潜伏期后开始生长, 到第 4 天, 这些贴壁的细胞内出现许多松散的脂滴。随着时间的延长, 细胞内脂滴增大, 相互融合。这与 Akanbi 等^[8]和 Ding 等^[9]的报道相一致。细胞的生长曲线是细胞生长基本规律的重要表现。猪前体脂肪细胞在体外培养第 2 天时大量增殖, 第 7 天时细胞增殖速度逐渐下降进入平台期, 其生长曲线近似 S 型, 基本符合细胞的正常生长增殖规律。

脂肪细胞分化是由分化转录因子调控的复杂过程。LPL、PPARs 及 CCAAT/ 增强子结合蛋白家族 (CCAAT/enhancer binding protein family, C/EBPs) 是调控脂肪细胞分化的主要转录因子, 这些转录因子的表达与肥胖、高脂血症和 II 型糖尿病等疾病的形成

和发展密切相关^[10]。LPL 是脂肪细胞分化早期的标志基因, 与脂肪酸的合成代谢有关。PPAR 属激素核受体超家族成员, 由不同基因编码的 3 个亚型 (PPAR α 、PPAR β 及 PPAR γ) 组成。其中 PPAR γ 最具脂肪组织特异性, 是脂肪细胞分化晚期的标志基因。将 PPAR γ 基因转染入成肌细胞或成纤维细胞以后, 可诱导一系列脂肪细胞特有的基因使细胞成为脂肪细胞^[11]。本实验检测了脂肪细胞分化标志基因 LPL 和 PPAR γ 在培养不同时间的表达变化, 结果表明未经诱导的前体脂肪细胞虽然可自发向成熟脂肪细胞分化, 但分化率较低, 从而在电泳条带上显示条带较暗。而诱导后, LPL 和 PPAR γ 表达量大幅度增加, 说明细胞经诱导后, 分化率显著提高。其结果与形态学观察一致。

参考文献 (References)

- [1] Adachi H *et al.* *Endocrinology*, 1994, **135**: 1824
- [2] Boone C *et al.* *Domest Anim Endocrinol*, 1999, **17**: 257
- [3] 朱晓海等. *中华整形烧伤外科杂志*, 1999, **15**: 199
- [4] 王竹晨等. *中山医科大学学报*, 2001, **22**: 443
- [5] 孙超. *西北农林科技大学博士论文*, 2001
- [6] 夏成等. *中国兽医科技*, 2004, **34**: 26
- [7] 司徒镇强等主编. *细胞培养*, 西安: 世界图书出版公司, 2001
- [8] Akanbi KA *et al.* *J Anim Sc*, 1994, **72**: 2828
- [9] Ding ST *et al.* *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1999, **123**: 307
- [10] 张崇本. *生理科学进展*, 2004, **35**: 7
- [11] Hu E *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 9856

Isolation and Culture of Porcine Preadipocyte *In Vitro*

Guo-Hua Zhang, Gong-She Yang, Chang-Qing Qu, Shi-Duo Sun*

(Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development,

Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract Explant techniques and monolayer culture in culturing porcine preadipocytes were compared. Cells obtained from monolayer culture are more than from explant techniques in a short period of time, but we have to purify cells by successive passage culture. Subcultured cells were plated in differentiation medium, analyzed by their morphological changes, growth curve, oil red O staining and lipoprotein lipase gene, peroxisome proliferators-activated receptor γ gene expression. Results shown a lot of preadipocytes could be harvested from adipose tissue samples obtained from crossbreed piglets, these preadipocytes were typical fibroblasts with normal morphology, proliferative and had some extent differentiation rate in primary culture. Under controlled condition, especially purified by subculture, these preadipocytes replayed their hyperplasia process with higher accumulation of drop lipid. This study laid the basis for further probing into adipocyte proliferative, differentiation and fat deposition.

Key words porcine; preadipocyte; subculture; differentiation

Received: March 16, 2005 Accepted: July 11, 2005

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2004CB117506)

*Corresponding author. Tel: 86-29-87032582, E-mail: ssdsm@tom.com