

# 原代猪前体脂肪细胞培养方法的优化

李影 杨公社 卢荣华 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** 以胎猪皮下脂肪组织为材料, 比较不同培养方法、消化酶、筛网孔径和离心力对培养猪前体脂肪细胞的影响。结果表明, 组织块法与消化法均可培养出猪前体脂肪细胞, 但组织块法培养的原代细胞中分化为成熟的细胞较少, 消化法获得的细胞均匀一致, 形态学染色鉴定大部分均可分化为脂肪细胞; 在用消化法培养的过程中, 采用IV型胶原酶消化脂肪组织, 200目筛网孔径、800 g离心力离心5 min可获得大量的、纯度均一的细胞。可以认为, 实验成功建立了猪前体脂肪细胞培养的优化体系, 在体外重现了猪前体脂肪细胞增殖肥大的全过程。

**关键词** 猪; 前体脂肪细胞; 培养方法

前体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细胞, 它持续存在和作用于人和动物的一生<sup>[1]</sup>。脂肪细胞增殖和分化失控会导致肥胖, 并与糖及脂肪代谢、机体能量平衡、肥胖症、II型糖尿病等有非常密切的关系。因此, 选择合适的动物模型在体外重现前体脂肪细胞增殖肥大的全过程对于探讨上述生命和疾病过程具有重要意义。猪是肥胖程度最高的动物, 脂肪沉积最迅速, 且与啮齿类哺乳动物及禽类的脂肪沉积部位及沉积模式存在显著差异, 与人的更为接近<sup>[1]</sup>, 因而猪的脂肪细胞增殖与分化模式为研究人类机体脂肪沉积提供了一个理想模型, 同时为研究不同动物的脂肪沉积模式提供参考。目前, 国内已成功建立了大鼠、小鼠、人、犊牛和兔的前体脂肪细胞体外培养模型, 但尚未见成熟的猪前体脂肪细胞培养体系的建立。本实验获得大量的生物学性状良好的猪前体脂肪细胞, 为在体外研究人及动物体脂沉积打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 组织来源 西北农林科技大学实验猪场60日龄流产长白胎猪。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12培养基、IV型胶原酶、HEPES、均购自Gibco公司, 胎牛血清(杭州四季青), 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基及主要试剂的配制 依次称取5 g DMEM/F12培养基, 1.83 g NaHCO<sub>3</sub>, 1.20 g HEPES,

50 ml胎牛血清, 加入各100 IU/ml青、链霉素, 四蒸水定容至500 ml。消化液: 称取100 mg IV型胶原酶, 1 g牛血清白蛋白溶于100 ml的无血清培养液中。上述溶液均经调整pH值至7.2~7.4, 0.22、0.45 μm微孔滤膜过滤除菌, 分装后置4 °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, 混匀, 室温贮存备用, 临用前再过滤两次。

### 1.2 方法

1.2.1 组织块法培养胎猪前体脂肪细胞 无菌切取胎猪颈、背、腹部皮下脂肪组织, KRB缓冲液(Krebs Ringer Bicarbonate buffer)冲洗3次, 分离去除脂肪组织中可见的纤维及血管, 剪成约1 mm<sup>3</sup>的小块, 用眼科探针轻轻地将组织块平铺于干燥的培养瓶底壁, 然后将培养瓶翻转, 向瓶内注入适量基础培养液, 于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养, 4 h后翻转培养瓶, 继续于培养箱内培养。

1.2.2 消化法胎猪前体脂肪细胞培养 取材同上述方法, 向剪碎的组织块中加入1 mg/L的IV型胶原酶消化液, 置37 °C振荡摇床内温育60~80 min后取出, 然后将消化液分组, 各组分别过孔径为150、200和600目不锈钢细胞筛, 滤液分别以80 g、300 g、800 g离心5、10 min, 无血清培养

收稿日期: 2005-04-08 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, Fax: 029-87092430, E-mail:

ssdsm@tom.com

液洗 2 遍。沉积的细胞用基础培养液制成细胞悬液，进行细胞计数和存活率检测。9 滴细胞悬液加 1 滴 0.4% 台盼兰染液混匀，3 min 内用血细胞计数板分别计数活细胞及死细胞的数目，每组计数 3 次，取平均数作为最后结果，将计数后的细胞以  $5.0 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 密度接种至培养瓶、培养板内，于 37 °C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养，1 天后换液，此后每 2 天换液一次。每日观察、照相。

**1.2.3 油红 O 染色鉴定猪脂肪细胞** 细胞生长至第 8 天，取出爬有细胞的玻片，PBS 洗 3 次，10% 甲醛的等渗盐缓冲液固定 40 min 后，PBS 漂洗，吸取油红 O 工作液 10 ml，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。

## 2 结果

### 2.1 组织块法与消化法培养的原代胎猪前体脂肪细胞的形态观察

组织块法培养第 3 天即可观察到梭形、三角形和星形等不规则形状细胞从脂肪块周围游离出来(图 1)，消化法接种第 2 天即可观察到大部分圆形细胞都已贴壁且呈不规则形状，细胞分布均匀(图 2)；组织块法第 7 天游离出的细胞逐渐增多，围绕脂肪块呈漩涡状排列，第 12 天即可形成局部单层汇合，个别胞内出现微小脂滴(图 3)。消化法培养的细胞在第 3 天数目明显增多，其间可见积聚有脂肪颗粒的细胞出现，7 天左右细胞可长至培养瓶的 80%。第 9 天可观察到充脂细胞增多，细胞的不规则形状更加明显，脂滴大小不等且多散在，有小脂滴融合成大脂滴的情况(图 4)。到 2 周时脂滴逐渐汇合，一个或多个大脂滴以饱和状态充满了细胞的大部分形成周围环绕无数个小脂滴的数个大脂滴，最后发育成成熟的椭圆形、圆形脂肪细胞形态(图 5)，经油红 O 染色的原代培养的猪脂肪细胞在倒置相差显微镜下观察，脂滴被亲脂的油红 O 着色而呈橘红色。证实该细胞为脂肪细胞(图 6)。

### 2.2 细胞筛孔径、离心力、离心时间对细胞数和细胞纯度的影响

消化后的细胞过 200 目细胞筛与过 150 目和 600 目细胞筛都可分离到细胞，但过 600 目细胞筛分离到的细胞较少，过 150 目筛的细胞中含有杂细胞较多，而过 200 目筛网分离到的细胞数目较多且细胞成分较单一；采用 80 g、300 g 离心与 800 g 离心

表 1 不同离心力和离心时间所获得的细胞数及细胞存活率

离心力(g)	离心时间(min)	细胞数( $\times 10^5$ )	细胞存活率(%)
80	5	16.1 $\pm$ 0.145 <sup>a</sup>	98.9
80	10	17.9 $\pm$ 0.189 <sup>ab</sup>	98.2
300	5	19.5 $\pm$ 0.744 <sup>bc</sup>	96.8
300	10	21.9 $\pm$ 0.731 <sup>cd</sup>	95.6
800	5	25.2 $\pm$ 0.589 <sup>de</sup>	94.8
800	10	25.9 $\pm$ 0.503 <sup>e</sup>	89.6

相同字母上标表示无显著差异( $P>0.05$ )，不同字母上标表示差异极显著( $P<0.01$ )。

比较，后者试管底部沉淀物较多，可分离到更多的细胞；800 g 离心 10 min 与 800 g 离心 5 min 比较，离心 10 min 所获得的细胞其活力比离心 5 min 的细胞活力有所减小(表 1)。

## 3 讨论

体脂的过度积聚是脂肪细胞增殖与分化综合作用的结果，即脂肪细胞数目的增多与体积的增大。脂肪组织中的脂肪细胞非常活跃，细胞的数目、形态以及细胞内脂肪含量均处于动态变化之中。对前脂肪细胞进行体外培养，完整地认识脂肪组织的发生、增生和肥大的全过程，是研究脂肪组织发育的有效手段。获得大量、均匀一致、较强的增殖和分化能力的前体脂肪细胞，是建立合适的前脂肪细胞培养体系的关键。本研究比较了组织块法与消化法对获得原代猪前体脂肪细胞的影响，结果显示：组织块培养法产生的“脂肪细胞”很少，绝大部分从脂肪组织块游离的细胞在培养过程中没有多脂滴细胞形成，且由于从组织块游离的细胞时间不同，所以导致细胞所处细胞周期不同。原代培养脂肪细胞的异质性不利于研究脂肪细胞分化，因为这会导致细胞在分化能力、增殖能力和体外培养环境适应能力方面产生差异。所以，脂肪组织块培养不利于研究猪前体脂肪细胞分化过程。消化法培养出大量的、成分均一、增殖旺盛的细胞，油红 O 染色鉴定，此前体脂肪细胞可分化为成熟的脂肪细胞，且分化率较高。

消化法培养细胞主要涉及消化酶、筛网孔径及离心力等重要环节。胶原酶(又称间质胶原降解酶，金属蛋白酶 I)是专门消化细胞基质的一组蛋白酶家族，共包括 I、II、III、IV 四种亚型，它们的作用底物是胶原，能使胶原的三维构象分解而成为单束纤维，然后非特异性胶原降解酶再对单束纤维进行降解。脂肪组织内含有大量胶原，因而一

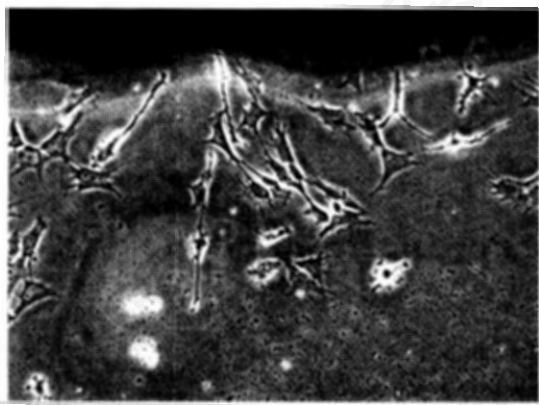


图1 组织块法培养3天后细胞形态(200×)

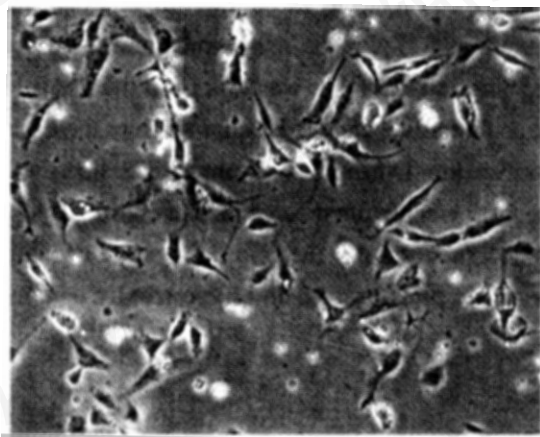


图2 消化法培养2天后细胞形态(200×)

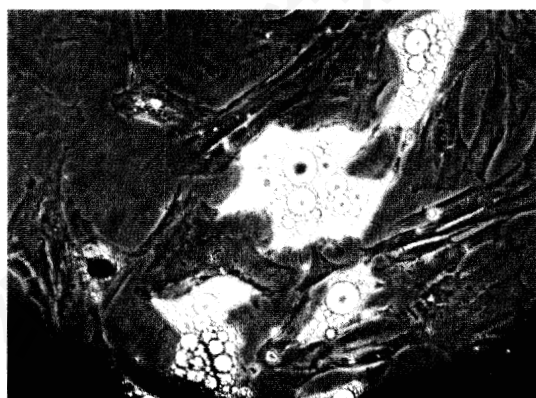


图3 组织块法培养12天后细胞形态(200×)

一般采用胶原酶分离脂肪细胞，如用胰蛋白酶消化，则获得的细胞数量较少。大鼠<sup>[2]</sup>、犊牛<sup>[3]</sup>、人<sup>[4]</sup>的前体脂肪细胞培养通常采用I型胶原酶，用I型胶原酶消化也可获得猪前体脂肪细胞。本试验采用IV型胶原酶获得了大量的具有良好生物学特性的猪前体脂肪细胞。龙良启等<sup>[5]</sup>采用未过滤或用纱布过滤

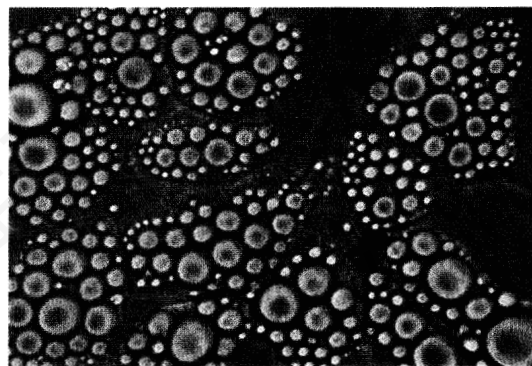


图4 消化法培养9天后细胞形态(200×)

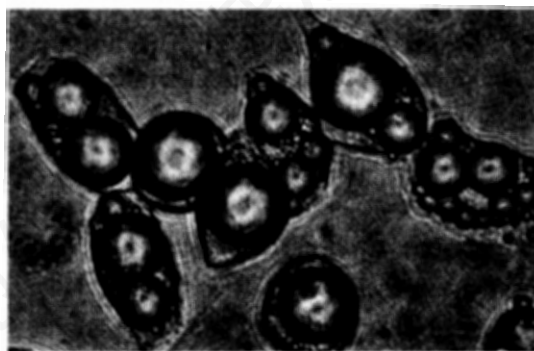


图5 消化法培养14天细胞形态(200×)

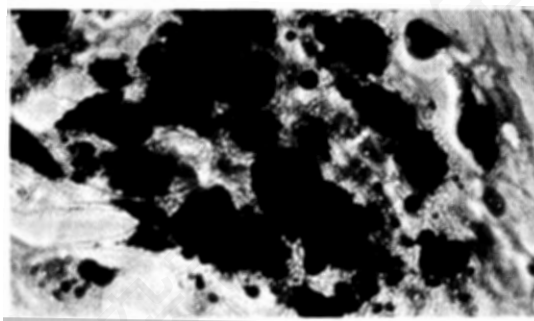


图6 消化法培养14天油红O染色(200×)

细胞消化提取液的方法分离到猪成熟脂肪细胞，但含有较多杂细胞。在本实验中，消化后的细胞提取液采用200目筛网孔径，800 g离心力与600目，150目筛网孔径和80 g、300 g离心力比较，前者获得的细胞数较多，细胞成分均一。这可能因为猪的前体脂肪细胞与大鼠、小鼠、兔的前体脂肪细胞相比，细胞直径与细胞密度均较大，因而可用较大孔径的细胞筛和较大的离心速度。在选择所应用的离心力时，离心的时间不宜过长，因为较长的离心时间会损伤细胞，进而致使细胞活力下降。因而本实

验在应用 800 g 离心时, 只离心 5 min。

### 参考文献 (References)

[1] Gondret F *et al.* *J Lipid Res*, 2001, **42**: 106

[2] 田志华等。《动物学报》, 2003, **49**: 807

[3] Aso H *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **213**: 369

[4] 朱晓海等。《中华整形烧伤外科杂志》, 1999, **15**: 199

[5] 龙良启等。《河南农业科学》, 1997, (7): 44

## Optimal Culture Method of the Porcine Preadipocyte

Ying Li, Gong-She Yang, Rong-Hua Lu, Shi-Duo Sun\*

(Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development,  
Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China)

**Abstract** Compared the effect of different culture methods, collagenase, mesh aperture and centrifugal force on the swine preadipocyte in primary culture. The results were as follows: the tissue mass and the digested method were all able to outgrow pig preadipocyte, but the mature adipocyte number was less from the tissue mass than the digested method, and the cells were highly homogeneous, proliferative, and differentiating from the digested method, which were mature adipocytes by oil red o staining identification. During the culture by digested method, the  $\alpha$  collagenase was used for the first time, the 200 item mesh, 800 g centrifugal force, 5 min could get lots of, homogeneous porcine preadipocyte. In conclusion, we established successfully the optimal system of primary porcine preadipocyte culture, and redisplay the whole process of the proliferative and hypertrophy of porcine preadipocyte.

**Key words** porcine; preadipocyte; culture method

Received: April 8, 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, Fax: 86-29-87092430, E-mail: ssdsm@tom.com