技术方法 文章编号:0253-3626(2009)06-0743-04

大鼠前脂肪细胞消化酶原代培养方法改良的探讨

蒋茂莹,张 艳,刘友学
(重庆医科大学附属儿童医院儿童营养研究中心,重庆 400014)

【摘 要】目的:改进大鼠前脂肪细胞的原代培养方法。方法:对 Poznanski 胶原酶消化法进行改良,包括延长胶原酶消化法时间、3 次离心和 2 次滤网过滤,分化培养后采用油红 O 染色对细胞进行鉴定,通过形态学观察、生长曲线的绘制确定原代培养大鼠前脂肪细胞的细胞学特性。结果:用改良后的方法获得大量成份均一、生长旺盛的前脂肪细胞,细胞活力测定 90%为活细胞;前脂肪细胞 5 d 左右进入指数增长期,8 d 左右达到平台期,倍增时间约为 60 h;在分化培养基的诱导下可以向脂肪细胞分化。结论:实验成功地建立了前脂肪细胞培养体系,较原方法更加有效。

【关键词】大鼠;前脂肪细胞;培养方法;改良
【中国图书分类法分类号】R72 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-22

Modification of collagen digestion method on isolation and culture of rat preadipocyte

JIANG Mao-ying, et al
(*Nutrition Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a better method for isolating and culturing preadipocytes from rat white adipose tissue. *Methods*: The adipose tissue was digested by collagen Ⅰ and preadipocytes were collected by centrifugations and filtrations. Cells were cultured using basic and differentiation media. Preadipocytes were detected by morphologic method, auxodrome study and stained with Oil red O for determining the cell identity. *Results*: Using our modified method, primary preadipocytes can be harvested in greater amount compared with the original method. The primary preadipocytes could differentiate into adipocytes under the induction of differentiation medium. The preadipocytes obtained by our method had the characteristics of preadipocytes. *Conclusion*: We have established an efficient preadipocyte culture method. Our medication method is better than the original method.

【Key words】Rats; Preadipocytes; Culture method; Modification

肥胖已经成为严重威胁人类健康的疾病,儿童肥胖在全世界已经开始流行,在经济发达地区和城市化发展好的地区尤为明显[1]。肥胖在生理上表现为脂肪细胞数目的增多和体积的增大,新生的脂肪细胞主要由前脂肪细胞分化而来,而前脂肪细胞是脂肪组织中一类具有增殖和向脂肪细胞分化能力的特异化细胞,持续存在和作用于人和动物的一生,在肥胖的发生中具有重要的作用[2]。由于在体内对前脂肪细胞增殖分化的机制进行研究相对困难,人们大多数在体外对前脂肪细胞的增值分化机制进行研究。一般的消化酶法获得细胞量少,且不易成功[3]。因此,本研究对大鼠前脂肪细胞原代培养体系进行改良,提供更为稳定的大鼠原代前脂肪细胞培养体系,为前脂肪细胞向脂肪细胞分化机制的研究和肥胖病因的探索,提供更为有利的技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织来源 重庆医科大学动物中心清洁级 8~10 周雌性 SD 大鼠,断颈处死,无菌取出卵巢、肾脏周围脂肪组织。

1.1.2 主要实验用品和化学试剂 DMEM/F12 培养基(Hyclone 公司 美国),胎牛血清(Hyclone 公司 美国),HEPES、Ⅰ型胶原酶和胰蛋白酶(Gibco 公司 美国),泛酸钙、转铁蛋白、胰岛素、青霉素、链霉素均是 Sigma 公司产品,其他试剂均为分析纯。

作者介绍:蒋茂莹(1982-),女,硕士,
研究方向:干细胞与肥胖。
通讯作者:刘友学,男,研究员,E-mail:lyxLiu@126.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(基金编号:30571565)。

1.1.3　培养基及主要试剂的配置　基础培养基(BCM)：取 90 ml DMEM/F12，加入 10 ml 胎牛血清，配成 10%的基础培养基；分化培养基(DCM)：在 BCM 中，加入浓度分别 15 mmol/L $NaHCO_3$，15 mmol/L HEPES，33 μmol/L 泛酸钙，100 mg/L 青霉素，100 mg/L 链霉素，10 mg/L 胰岛素，去离子水定容至 1 000 ml；消化液的配置：称取胶原酶 100 mg，溶入 100 ml 去离子水中，用 Zeiss 滤器 0.22 μm 的微孔滤膜正压过滤除菌，分装后 -20℃保存；油红 O 的配置：混合 0.7 g 油红 O，溶于 200 ml 异丙醇，摇匀，室温过夜，用滤纸过滤收集，加入 120 ml 蒸馏水稀释。室温储存备用，临用前再过滤 2 次。

1.2　*方法*

1.2.1　酶消化法培养大鼠前脂肪细胞　Poznanski[4]的胶原酶消化法如下：在无菌条件下取出皮下脂肪垫，0.85%的 NaCl 溶液洗净血块，取适量组织，放入装有一定比例的白蛋白—碳酸氢盐缓冲液、胶原酶和葡萄糖溶液混合液的培养瓶中，在 37℃孵箱中震荡消化 1 h，低速离心，将离心后沉淀的物质移入玻璃培养瓶中，换液观察。本实验将原方法作如下改进：(1)将脂肪组织剪成 0.5~1 mm^3 大小颗粒再进行胶原酶消化；(2)置 37℃振荡摇床内分别孵育消化 1、1.5、3、7.5 h 或 15 h，确定最佳消化时间；(3)消化后过滤并离心：分别用 150、200、600 μm 孔径的尼龙网将细胞过滤，200 g 离心 5 min。用吸管吸出上层漂浮的白色絮状物，加入少许 PBS 液，再以 800 g 离心 5 min。吸出上清液，加入 10 ml 不含血清的 DMEM/F12 培养基，混匀，经 25 μm 尼龙网过滤，300 g 离心 30 min。所得沉积的细胞用 5 ml 基础培养基制成细胞悬液，吹打均匀，接种于 50 ml 培养瓶内，2~3 d 换液，每天观察，适时传代。

1.2.2　细胞活力测定　原代培养后用传代消化液将细胞制成悬液(10^6 个 /ml)，取 9 滴细胞悬液移入小试管内，加 1 滴 0.4%台盼蓝溶液，混匀。在 3 min 内，用血球计数板观察并计数。镜下观察，死细胞被染成蓝色。活细胞率(%)= 活细胞总数/(活细胞总数＋死细胞总数)。

1.2.3　细胞生长曲线的绘制　将细胞悬液混匀、计数，调整细胞浓度为 10^5 个/孔移入 96 孔板，每孔 100 μl，从第 1 d 起每 1 d 取 3 孔细胞按照马瑾瑜等[5]的 MTT 比色法法测定前脂肪细胞的生长曲线。取各时相吸光度平均值，以时间为横坐标，吸光度(表示细胞相对数量)为纵坐标，绘制生长曲线。

1.2.4　前脂肪细胞的诱导分化　取 3 代内生长良好的前脂肪细胞，常规消化传代于培养瓶内，用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养 24 h 后，用 PBS 液洗净，换用分化培养基进行培养，每 2~3 d 进行一次换液。

1.2.5　油红 O 染色　用 1.2.1 的方法得到细胞 24 h 后加入诱导培养基，细胞生长一段时间后用油红 O 染色，观察并照相。

2　结　果

2.1　*改良条件的确定*

组织孵育消化 1、1.5、3、7.5、15 h 都可得细胞，消化 1 h 得到的细胞数量较少，不易进行传代培养，而消化 15 h 得到的细胞活性极差，几乎不能用于传代。消化 1.5、3 和 7.5 h 都能得到一定数量有活性的细胞，但消化 1.5 h 得到的细胞数量最多，活性最好，在 10 代以内进行传代都可以保持较好的活性。

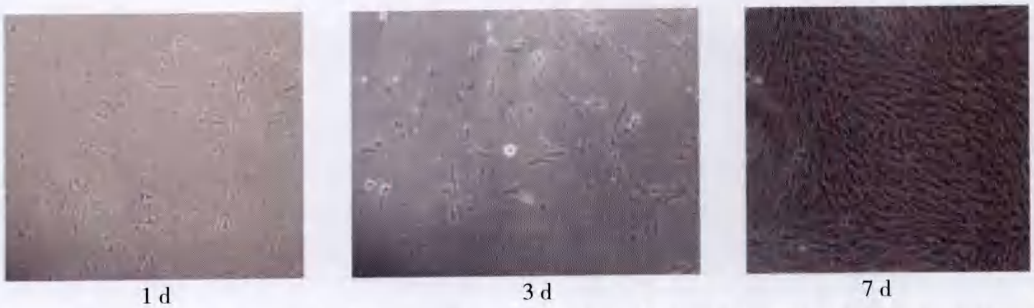
消化后的细胞过 150、200、600 μm 孔径的尼龙网均可分离到细胞，150 μm 分离的细胞较少，600 μm 分离的细胞含有的杂细胞较多，实验发现 200 μm 分离的细胞数目较多且成分单一。

2.2　*改良酶消化法大鼠前脂肪细胞培养形态观察*

采用改良后的酶消化法，刚接种的前脂肪细胞呈圆形，具有回缩现象。细胞接种 24 h 后大部分贴壁生长，体积较小，表现为成纤维细胞样的纺锤形和不规则的三角形，核浆比例较大。培养 2 d 后，细胞逐渐伸展，细胞变扁呈梭形，数量开始增加。5~6 d 细胞大量增殖，核浆比例减小，可见核分裂像，局部细胞融合呈漩涡状或平行紧密排列。8~10 d 细胞生长至 90%融合时常规消化传代(图 1)。

2.3　*前脂肪细胞活力测定*

活细胞率在均在 90%以上，说明消化酶法所得



1 d　　3 d　　7 d

前脂肪细胞培养 1 d 时，贴壁生长，体积较小，呈纺锤形和不规则三角形，到第 3 d 可见细胞伸展变成梭形，数量开始增加，到 7 d 时，细胞融合呈现漩涡状或平行排列。

图 1　不同培养时间大鼠原代前脂肪细胞培养(×100)

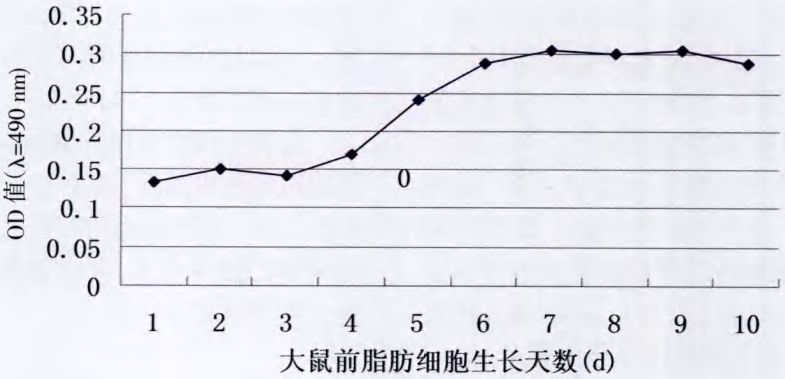


图 2 大鼠前脂肪细胞生长曲线



细胞诱导分化 5 d 时，细胞逐渐由梭形变成圆形，体积变大轮廓模糊，胞浆内脂肪颗粒增多。

图 3 前脂肪细胞诱导分化 5 d(×200)



经诱导分化的前脂肪细胞用油红 O 染色，被红染的部位为胞浆内大小不等的橘红色脂肪颗粒。

图 4 前脂肪细胞诱导分化油红 O 染色(×200)

的细胞活力较高

2.4 前脂肪细胞生长曲线

前脂肪细胞生长曲线符合原代细胞的正常生长增殖规律，根据生长曲线(图 2)，前脂肪细胞 5 d 左右进入指数增长期，8 d 左右达到平台期，其倍增时间大约为 60 h。

2.2 前脂肪细胞诱导分化鉴定

原代培养细胞贴壁后，前脂肪细胞换用分化培养基进行培养，增殖逐渐停止，形态由梭形逐渐变为椭圆形或圆形，体积逐渐变大，胞膜出现皱缩，凹凸不平有褶皱，轮廓模糊，胞浆内脂肪颗粒逐渐增多，光镜下呈晶莹透亮的脂肪小滴，部分可融合变大(图 3)。诱导完成后，油红 O 染色呈大小不等的橘红色脂肪滴，提示所培养的前脂肪细胞具有分化为成熟脂肪细胞的能力(图 4)。

3 讨 论

目前，国内外前脂肪细胞体外培养多采用来源于血管基质组份细胞(Stromal vascular fraction，SVF)，即经典的前脂肪细胞。Van[6]将培养的 SVF 和培养的成纤维细胞比较，两种培养以基本相同的速率增殖，倍增时间 2 d 左右。本研究观察到大鼠前脂肪细胞体外培养的增殖速率与皮肤成纤维细胞的增殖速率相近[6]，也与文献报道的人的结果一致[3]。

本研究采用改良后的酶消化法进行培养，得到了形态一致，增殖分化旺盛的梭形细胞，经生长曲线测定、分化培养、油红 O 染色，均证明是具有典型特征的前脂肪细胞，符合文献提出的 3 个标准[6]：(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成脂肪细胞，胞浆内出现脂肪颗粒。

油红 O 染色可以简便快速的测定体外培养前脂肪细胞的转化率。有文献报道其准确性和敏感性同前脂肪细胞分化过程中标志酶 GDPH 相似，常用于体外前脂肪细胞的鉴定[7,8]。因此，本研究采用该方法鉴定前脂肪细胞向脂肪细胞的分化情况。

Poznanski[4]的胶原酶消化法进行前脂肪细胞的原代培养，消化时间短，组织的前脂肪细胞释放不完全，导致获得的细胞数量较少，生长周期较长。混杂的组织块贴壁后会有前脂肪细胞的游出，导致细

胞分布不均,有的区域已经形成接触抑制,开始分化,有的区域细胞还很稀疏,较难确定最佳传代时机。原方法采用低速离心,细胞沉淀中会混杂大量的成纤维细胞等杂细胞,成纤维细胞形态和前脂肪细胞相似,贴壁以后很难在培养过程中去除。且成纤维细胞生长过多,使前脂肪细胞的生长受到抑制。同时,正常小鼠胚胎成纤维细胞有 50%可以分化为脂肪细胞[9]。综上所述,用 Poznanski[4]的方法获得的细胞不利于前脂肪细胞的体外分化研究。

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、Ⅳ4 种胶原酶,它们的作用底物是胶原,能使胶原的三维构像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。脂肪组织中含有大量胶原,因而一般采用胶原酶分离细胞,如用胰蛋白酶,则获得的细胞数量较少。犊牛、人前脂肪细胞的培养通常采用Ⅰ型胶原酶,我们也采用Ⅰ型胶原酶对大鼠脂肪组织进行消化。实验中我们将各组分别消化 1、1.5、3、7.5、15 h,确定消化 90 min 最为适合。消化时间过短,细胞不能完全释放,消化时间过长则会损伤细胞的活性。不间断对消化中的细胞进行手动震摇,可以增加组织和胶原酶的接触面积,一方面使所需的最佳消化时间缩短,一方面还能减少消化酶作用时间过长导致的对前脂肪细胞活性的损坏[10]。同时,本实验对前脂肪细胞细胞活力的测定表明:经过上述过程的处理后,对细胞存活没有明显影响,活细胞率均在 90%以上。

本实验中,采用 3 次离心和 2 次滤网过滤,这一点不同于其它学者,他们在用改良酶消化法培养前脂肪细胞时,通常只进行 1 次过滤和离心[3,11]。200 μm 滤网过滤后 200 g 5 min 的离心不仅可以将大块的没消化掉的纤维及杂质除去,还能将脂肪细胞分离出去,使得到的前脂肪细胞成分均一。同时,分离的细胞还可以用于脂肪细胞的培养。第 2 次离心 800 g 5 min,这种转速之下可以让大部分的脂肪细胞胞膜破裂,避免脂肪细胞的混入,减少了操作中前脂肪细胞的丢失。第 3 次 25 μm 滤网过滤并离心,可以去除混杂的内皮细胞,使分离的前脂肪细胞在最大程度上得到纯净。

实验中没有应用红细胞裂解液去除红细胞,而是通过换液来清除,避免了红细胞裂解液对细胞的损伤。用一般的基础培养基进行培养,方法简便,满足细胞的营养要求,同时避免细胞过早分化,还降低了实验费用。

参 考 文 献

[1] Wang Y, Lobstein T. Worldwide trends in childhood overweight and obesity [J]. International Journal Of Pediatric Obesity, 2006, 1(1):11-25.

[2] Faust I M, Johnson P R, Stern JS, et al. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity[J]. The American Journal of Physiology, 1978, 235(3):E279-286.

[3] 雷 翔, 许雪亮. 两种方法培养人眼眶前脂肪细胞的比较 [J]. International Journal of Ophthalmology, 2007, 7(3):707-709.

[4] Ng C W, Poznanski W J, Boroweeki M, et al. Differences in growth in vitro of adipose cells from normal and obese patients [J]. Nature, 1971, 231: 445.

[5] 马瑾瑜, 顾映红, 余竹元. 用快速比色计量法测量细胞生长 [J]. 上海医科大学学报, 1993, 20(4):309-311.

[6] Van R L, Bayliss C E, Roncari D A. Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture [J]. Journal of Clinical Investigation, 1976, 58(3):699-704.

[7] Ram í rez-Zacar í as J L, Castro-Mu ñ ozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytop lasmic lipids with oil red O[J]. Histochemistry, 1992, 97(6):493-497.

[8] Hausman D B, Park H J, Hausman G J. Isolation and culture of preadipocytes from rodent white adipose tissue [J]. Methods in Molecular Biology, 2008, 456:201-219.

[9] Wang Y, Su H S. Eetodomain shedding of preadipocyte factor-1 (Pref-1)by tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) and inhibition of adipocyte differentiation [J]. Molecular and Cellular Biology, 2006, 26(14):5421-5435.

[10] Fried S K, Moustaid-Moussa N. Culture of adipose tissue and isolated adipocytes[J]. Methods in Molecular Biology, 2001, 155:197-212.

[11] 盛志峰, 王平芳, 王 薇, 等. 人网膜前脂肪细胞原代培养[J].中南大学学报:医学版, 2006, 31(1):75-78.

(责任编辑:关蕴良)