维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0069-04

大鼠成熟脂肪细胞原代培养方法比较

张 艳,张晓萍,刘官信,刘友学

(重庆医科大学附属儿童医院儿保科,重庆 400014)

【摘 要】目的:探寻体外分离培养大鼠成熟脂肪细胞的最佳方法。方法:采用器官培养法、天花板培养法和改良天花板培养法 3 种不同的原代培养方法,体外培养大鼠成熟脂肪细胞。通过观察显微镜下细胞形态及油红 O 染色结果,比较 3 种培养方法所培养的脂肪细胞的差异。结果:3 种培养方法均培养出成熟的脂肪细胞,细胞形态一致,其中改良天花板培养法的培养效率最高,培养出的细胞形态最好。结论:改良天花板培养方法是一种长期稳定的大鼠成熟脂肪细胞原代培养方法,为进行脂肪细胞的相关研究提供良好的技术平台。

【关键词】脂肪细胞;细胞培养;原代培养;大鼠

【中国图书分类法分类号】R331.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-24

Efficacy comparison of three primary cell culture methods for mature rat adipocytes

ZHANG Yan, et al

(*Department of Child Health Care, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To identify the best method for isolating and culturing mature rat adipocytes in vitro. *Methods*: Three different primary culture methods, i.e. organ culture, ceiling culture, and modified ceiling culture were used in the present study. Mature Sprague-Dawley rat adipocytes were cultured in vitro. The cells were observed under microscope and oil red O staining to compare the distinction of cells with different culture methods in the same condition. *Rusults*: Adipocytes were successfully cultured by the three primary cell culture methods. Cells cultured were highly homogenous. Modified ceiling culture method was the best in terms of the efficiency of culturing and cell morphology. *Conclusion*: Modified ceiling culture, is a long-term stable primary culture method for mature rat adipocyte, providing a good technique platform for the studies related to adipocytes.

【Key words】 Adipocytes; Cell culture; Primary culture; Rats

单纯性肥胖症是目前世界范围内最受瞩目的营养性疾病,近年来由于其发病率急剧增高,被认为是本世纪严重危害人类健康的问题[1]。肥胖的发生是多种生理生化和行为因素综合作用的结果,其核心在于脂肪细胞的过度增殖和分化,生成了过多的脂肪细胞。近来越来越多的研究结果表明脂肪组织不仅仅是被动的能量储存器官,而且是能分泌多种激素类物质的内分泌器官,并与许多慢性非传染性疾病的发生、发展密切相关。为了深入了解脂肪组织和脂肪细胞的的结构功能及其调节机制,有必要在体外培养获得成熟的脂肪细胞。

作者介绍:张 艳(1978-),女,硕士,主要研究方向:干细胞与肥胖。

通讯作者:刘学友,男,研究员,E-mail:lyxiu@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(基金编号:30571565)。

目前体外得到成熟的脂肪细胞主要有 2 种方法:1 是诱导前脂肪细胞系分化为脂肪细胞,2 是脂肪细胞的原代培养。原代脂肪细胞培养是从脂肪组织中分离出脂肪细胞,将得到的脂肪细胞作体外培养的 1 种方法。培养前脂肪细胞并诱导其分化为脂肪细胞有助于研究脂肪细胞的分化机制,而为了研究完全分化的、成熟的脂肪细胞的功能则主要依赖脂肪细胞的原代培养。目前原代脂肪细胞的培养方法主要有 2 种:器官培养法和细胞培养法。本研究对脂肪细胞两种体外培养方法进行比较研究,以寻找 1 种方便、快捷、高效的脂肪细胞原代培养方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器试剂及动物

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.1 主要仪器和器械 2K15 型离心机为 Sigma 公司产品，IX70-111 型倒置显微镜为 OLYMPUS 公司产品，SHK-99-2 型恒温水浴摇床购自北京北方同正生物技术发展公司，FORMA3111 型 CO_2 培养箱为 Thermo 公司产品，BS-DDS、BBS-SSC 型生物洁净工作台为 BIOBASE 公司产品，25cm² 一次性塑料培养瓶、6 孔培养板为丹麦 Nunc 公司产品。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基、新生小牛血清、Ⅰ型胶原酶购自 GIBICO 公司，油红 O，异丙醇，多聚赖氨酸购自 Sigma 公司。

PBS 缓冲液：pH7.2~7.4，NaCl，KCl，KH_2PO_4，$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$。

消化液：Ⅰ型胶原酶 1g/L。

油红 O 工作液：混合 0.7g 油红 O 与 200ml 纯异丙醇，摇动，室温中过夜，用 Wchatman 滤纸过滤，用120ml 蒸馏水稀释 180ml 染液，置 4℃过夜，滤纸过滤，置 30min 后再次过滤，可室温放置 6~8 个月。

1.1.3 实验动物 动物来源于第三军医大学大坪医院动物中心，雄性 SD 大鼠，年龄 6~7 周，体重 150g 左右。

1.2 培养方法

1.2.1 器官培养法 将大鼠脱颈处死，在无菌的条件下分离大鼠附睾、腹股沟、肾周等处的脂肪垫，放入装有 PBS 的培养皿中，转至超净工作台，将脂肪垫移入新的培养皿后，仔细去除肉眼可见的纤维和血管组织，并用 PBS 洗涤 3 次，以去除血块。按照司徒镇强等的方法培养脂肪细胞[2]：用眼科剪剪成 0.5~1mm³ 大小的均匀颗粒，小心移入 15ml 离心管中，加入适量 PBS 或 DMEM/F12 培养基，以 1 000r/min 的转速离心 10min。取上层纯脂肪颗粒，轻轻的铺在干燥的 25cm² 培养瓶底壁上，静置 3~5min，脂肪颗粒黏附牢固后缓慢加入含 20%新生小牛血清的 DMEM/F12 培养基，放入 37℃，5%CO_2 饱和湿度培养箱中进行培养。

1.2.2 天花板培养法 将大鼠断颈处死，按照 Rodbell 的方法从脂肪组织中分离脂肪细胞[3]，在无菌条件下分离大鼠附睾、腹股沟、肾周等处的脂肪垫，放入装有 PBS 的培养皿中，转至无菌工作台，将脂肪垫移转入新的培养皿后，仔细去除肉眼可见的纤维和血管组织，用 PBS 洗涤 3 次，以去除血块。用眼科剪剪成 0.5 ~ 1mm³ 大小，加入胶原酶Ⅰ，37℃水浴振荡（100r/min）消化 60~90min，直至形成乳糜样浓稠液体。按照 Sugihara 等人的方法[4]，将消化后的乳糜样物经过滤离心后，可在液体表面看到一层白色悬浮物，此即为脂肪细胞。以 10^5 的密度移入 25cm² 培养瓶中，将培养瓶中加满含 20%新生小牛血清的 DMEM/F12 培养基，倒置放入 37℃，5%CO_2 饱和湿度培养箱中培养，待细胞牢牢的黏附于培养瓶内表面后，再将培养瓶正常放置进行培养，步骤如图 1 所示。

1.2.3 改良天花板培养法 大鼠的处死和脂肪垫的分离消化同天花板培养法，按照 Zhang 等人的方法[5]，将消化后的乳糜样液体加入 4ml PBS，轻轻吹打混匀，通过 250μm 孔径的尼龙网将细胞入离心管中，向离心管中加入 10ml PBS 洗细胞 3 次。以 250g/min 的转速离心 5min，用吸管吸出上清液，加入另一试管中，加入 PBS10ml 洗细胞，再次离心、去除下清液，重复此步骤 2 次。再用 10ml 含 20%新生牛血清的 DMEM/F12 细胞培养液洗涤并重悬细胞，调整密度为 2×10^6 个 /ml，取 50μl 加入每孔 2ml 的培养液的 6 孔板中，盖以 20mm × 20mm 大小的用多聚赖氨酸处理过的无菌盖玻片。放入 37℃，5%CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

1.2.4 脂肪细胞形态学观察 形态学观察一，在倒置显微镜下进行观察；观察二，油红 O 染色：细胞 PBS 漂洗 2 次，加 1 ml 10%福尔马林固定，室温过夜。60%异丙醇去除福尔马林，洗 30min。油红 O 染色 1h。60%的异丙醇洗 5s 去除染液，自来水冲洗 3min。向载玻片上滴 1 滴甘油明胶封片，在显微镜下进行观察。

2 结 果

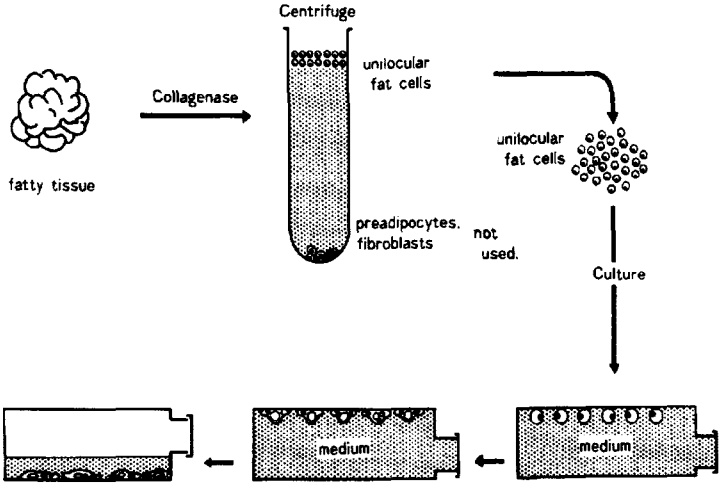


图 1 脂肪细胞培养方法图示

维普资讯 http://www.cqvip.com

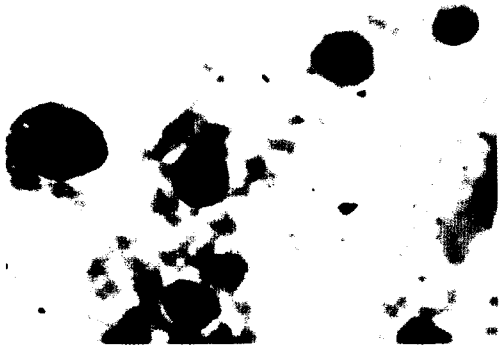


图 2 脂肪细胞油红 O 染色图片（×200，光镜）



图 3 脂肪细胞培养 3d（×200，光镜）

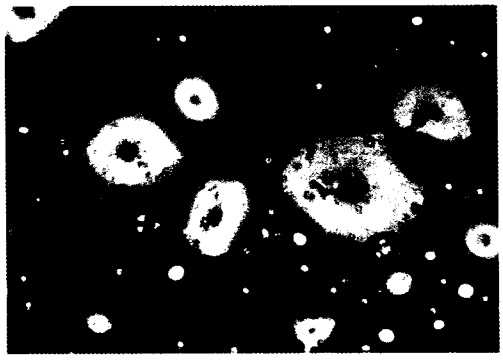


图 4 脂肪细胞 3d（×200，光镜）



图 5 脂肪细胞 3d（×200，光镜）

通过上述 3 种方法进行培养均可得到成熟的脂肪细胞。在显微镜下观察可见：分离出的脂肪细胞悬浮在培养板 / 培养瓶内培养基的表面，细胞大小不等，散在分布。在细胞培养的前 2d，细胞与内表面的粘附很松弛，从第 3d 或第 4d 开始，这种粘附变得紧密，这时多数细胞为球形。随后，虽然细胞体仍为球形，但胞质的边缘开始变平，向外凸出，其形态类似触手，在脂肪细胞周围可以见到一些小脂滴。这种改变多见于培养的第 5d 或第 6d。

对这 3 种脂肪细胞培养方法进行比较，可以看出改良天花板培养法得到的脂肪数量较多，细胞形态好，体外生长 14d 后，细胞仍然存活，经油红 O 染色后，可见散在分布的细胞呈橘红色（见图 2、图3）。天花板培养法和器官培养法得到的细胞数量较少，细胞形态不如改良天花板培养法培养出的细胞，且细胞生长不是非常稳定（见图 4、图 5），在体外培养过程中细胞逐渐死亡，14d 后仅有少量细胞存活。因此可以看出改良天花板培养法是一种良好的成熟脂肪细胞体外培养方法。

3 讨 论

脂肪组织中的脂肪细胞非常活跃，细胞的数量、体积和细胞内脂肪含量终生处于动态变化中。肥胖症发生的原因就在于体内脂肪细胞数量和体积的增加，而最近的研究发现脂肪组织不仅是能量的储存器官，同时还具有内分泌功能，其分泌的多种活性因子能够调控摄食、影响机体代谢活动、免疫反应和调节神经内分泌功能，如瘦素、脂联素、抵抗素等[6]。脂肪细胞的增殖、分化、凋亡失控及其分泌的因子是导致肥胖症及高血压、糖尿病、高血脂等肥胖相关疾病发生的重要致病环节[7]。因此脂肪细胞体外培养技术对于阐明肥胖相关疾病的发病机制有重要意义。

自 1964 年，Rodbell 已经成功的用胶原酶将脂肪细胞从脂肪组织中分离[2]，分离得到的脂肪细胞在消化后仍保持有新陈代谢的活性。虽然这种方法可以得到新鲜分离的脂肪细胞，但这种细胞易裂解，无法进行较长时间的观察，因此需要建立一种长期稳定的脂肪细胞培养方法。

本研究比较了 3 种不同的培养大鼠成熟脂肪细胞的方法，结果显示 3 种培养方法都可以得到成熟的脂肪细胞，但在这 3 种方法中，改良天花板培

维普资讯 http://www.cqvip.com

养法培养的脂肪细胞数量较大,油红 O 染色鉴定,脂肪细胞形态好,生存时间长。与天花板培养法比较,改良天花板培养法去除了混杂的其他种类细胞,培养结果更加稳定,得到的细胞不仅数量多,且更加纯正;相对于天花板培养法需要将培养瓶充满所需要的培养基量(25cm² 培养瓶需 50ml 培养基),改良天花板培养法只要每孔 2ml 培养基即可(6 孔板需 12ml 培养基),节约了大量培养基,而且培养后可直接在盖玻片进行如染色、免疫组化的操作,更简便直接。与器官培养法比较,改良天花板培养法培养虽然步骤较多,但其培养所得的细胞均一,形态一致,细胞存活率高,而器官培养法培养所得的细胞,除脂肪细胞外,还混杂有前脂肪细胞、内皮细胞等其他细胞。天花板培养法与器官培养法比较,器官培养法的操作虽然简便,无胶原酶消化的步骤,但由于脂肪细胞主要由脂滴构成,密度小于水,脂肪细胞悬浮于培养基表面,这样培养出的细胞仅有少量为脂肪细胞。这 3 种方法比较,器官培养法步骤最少,操作最简便,但培养的细胞数量最少,天花板培养法与改良天花板培养法操作步骤相似,但天花板培养法混杂其他种类细胞,所需培养基较多,且不便于后续操作。因此,我们认为改良天花板培养法是一种行之有效的成熟脂肪细胞体外培养方法。

在本实验中,为了探索最合适的胶原酶Ⅰ消化时间,分别将脂肪组织在相同条件下用胶原酶Ⅰ消化了 1、3.5、7、15h 后再进行培养,结果证实消化 1h 为最适宜消化时间,所得的脂肪细胞长期培养结果最好。随着胶原酶消化时间的增加,从脂肪组织中分离出的细胞数量也有所增长,但能够长期存活的细胞数量却相对减少,当用胶原酶Ⅰ消化 15h 后,分离出的脂肪细胞的数量最多,而培养 24h 后,大部分细胞死亡,分析其为细胞被胶原酶过度作用,造成严重损伤,使细胞粘附能力和散播能力下降所致。

本研究成功建立了一种长期稳定的大鼠成熟脂肪细胞培养方法,获得了形态均一、生长稳定的大鼠成熟脂肪细胞,为进一步研究肥胖症的发病机制、脂肪组织的内分泌功能奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Hill JO. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective[J]. Endocr Rev,2006;27(7):750-761.

[2] 司徒镇强, 吴军正.细胞培养[M]. 第 2 版.西安:世界图书出版社,2005.155-156.

[3] Rodbell M. Metabolism of isolated adipocyte. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis[J]. J Biol Chem,1964;239(2):375-380.

[4] Sugihara H,Yonemitsu N,Miyabara S,et al. Primary cultures of unilocular fat cells:Characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties[J]. Differentiation,1986;31(1):42-49.

[5] Zhang HH,Humar S,Barnett AH,et al. Ceiling culture of mature human adipocytes:use in studies of adipocyte functions[J]. J Endocrinol,2000;164(2):119-128.

[6] Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ[J]. Obesity (Silver Spring),2006;14(5):244S-249S.

[7] Calabro P,Yeh ET. Obesity,imflammation,and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ[J]. Subcell Biochem,2007;42(1):63-91.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 68 页)

in gastroenterology,2004;20(4):360-367.

[6] Mirshafiey A,Khodadadi A,Rehm BH,et al. Sodium Alginate as a Novel Therapeutic Option in Experimental Colitis[J]. Scandinavian Journal of Immunology,2005;61(4):316—321.

[7] Seril DN,Liao J,West AB,et al. High-Iron Diet:Foe or Feat in Ulcerative Colitis and Ulcerativecolitis-associated Carcinogenesis [J]. Journal of Clinical Gastroenterology,2006;40(5):391-397.

[8] Hawkins JV,Emmel EL,Feuer JJ,et al. Protease Activity in a hapten-induced model of ulcerative colitis in rats[J]. Digestive Diseases and Sciences,1997;42(9):1 969-1 980.

[9] 郑 礼, 高振强, 王淑仙. 大鼠溃疡性结肠炎模型的实验研究[J].中国药理学通报,2001;16(2):88-95.

(责任编辑:关蕴良)