

草鱼前体脂肪细胞原代、传代培养及鉴定*

曹 锴, 李 影, 蔡志华

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 400047)

摘要 建立草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)前体脂肪细胞的培养体系,体外重现草鱼脂肪细胞的增殖分化过程。实验采用油红O染色法对脂肪细胞进行鉴定,采用倒置显微镜(NIKON)和CCD对细胞进行观察摄像,选用的健康草鱼体重为800~900g,利用体外组织培养技术在温度为28℃,CO₂浓度为5%,血清浓度为20%,pH值为7.0~7.2的条件下,以DMEM/F12培养基对来源于草鱼腹腔的脂肪组织进行原代培养,单层的原代培养细胞达到瓶底面积的70%~80%且汇合时,对细胞进行传代培养。研究发现在本实验条件下,培养48h后组织块周围有梭形细胞迁出;3d后细胞数量增多,多为梭形和多边形,培养8d后大部分细胞融合,细胞内脂滴可被亲脂的油红O着色,证明为脂肪细胞。对融合后的细胞进行传代培养,可传至第4代,传代第3d可形成致密单层,第8d胞质内含有大量脂滴。研究初步确立了较为适宜的草鱼前体脂肪细胞离体培养体系。

关键词 草鱼;脂肪细胞;原代培养;传代培养

中图分类号:Q813.1

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2010)06-0020-03

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类和动物的一生^[1]。研究脂肪细胞增殖与分化规律,可了解人及动物诸多脂肪代谢紊乱性疾病奠定生物学基础。当前草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)等腹腔脂肪过度蓄积问题比较严重,研究草鱼脂肪细胞增殖、分化过程以及与脂肪沉积有关的因素,无论是从养殖生产的经济利益角度,还是从人健康问题出发,都是一项具有现实意义和经济意义的课题。自上世纪60年代起,国内外已成功构建了人^[2](*Homo sapiens*)、大鼠(*Rattus norvegicus*)^[3-4]、猪(*Sus scrota*)^[5-6]和牛(*Bos taurus*)^[7-8]的前体脂肪细胞体外培养模型,国外已研究了虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)^[9]、大西洋鲑(*Salmo salar*)^[10]、红鲷(*Pagrus major*)^[11-12]、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)^[13]等鱼类的脂肪细胞培养,本文在对草鱼脂肪细胞的提取方法进行研究的基础上,参考哺乳动物及上述鱼类的相关研究成果和吉红^[14]等利用胶原酶消化法对草鱼进行原代培养的结果,对鱼类前体脂肪细胞进行了原代与传代培养,并进行了初步鉴定,以期获得较为成熟的培养体系。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用鱼为购自重庆市沙坪坝区超市的健康草鱼,体重800~900g。主要试剂为:DMEM/F12培养基(GIBCO),胎牛血清(杭州四季青);牛血清白蛋白(Sigma);胰蛋白酶(Trypsin1,GIBCO);EDTA(Amresco);PBS(武汉博士德);油红O;青霉素;链霉素;卡那霉素;苯扎溴铵等。培养液的配制方法为:1.56g DMEM/F12,0.70g NaHCO₃,20mL胎牛血清,加入各100IU/mL青、链霉素,50IU/mL卡那霉素,三蒸水定容至100mL。不加入胎牛血清即为无血清培养液。消化液用PBS液配制含0.25%胰蛋白酶和0.02%EDTA。细菌过滤器过滤灭菌(0.45μm和0.22μm微孔滤膜)4℃条件下保存。

1.2 方法

1.2.1 原代培养 将鱼在0.1%苯扎溴铵溶液内浸泡30min,置于酒精消毒的托盘内并用碘酒和75%酒精棉球擦拭鱼体表,超净工作台内解剖取脂肪组织。获取的脂肪组织以PBS缓冲液(含5%BSA)冲洗2次,无血清培养液洗1次,在小烧杯中用眼科剪

* 收稿日期 2010-09-18 修回日期 2010-10-19

基金项目:国家自然科学基金(No. 30800843),重庆师范大学重庆市动物学重点学科拓展研究项目(2009)

作者简介:曹锴,男,硕士研究生,研究方向为细胞生物学,通讯作者:李影,E-mail:liyinqcnu@sohu.com

剪至 1 mm^3 ,弯头吸管以15块左右接种于75 mL培养瓶中,置 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养4 h后加入5 mL培养液。2 d后观察细胞从组织块中迁出与生长情况并显微照相,第3 d更换新鲜培养液。此后每2 d换液一次,并在倒置显微镜下进行观察、照相。

1.2.2 传代培养 单层培养细胞达瓶底的70%~80%且汇合时对细胞进行传代培养。吸出旧培养液,沿培养瓶细胞面对侧按 $0.2\text{ mL}/\text{cm}^2$ 加入PBS清洗细胞。去除清洗液,加消化液到培养瓶细胞面对侧,翻转培养瓶,在倒置显微镜下观察到胞质回缩、细胞间隙增大时终止消化,消化时间约5 min。倾斜培养瓶,吸出消化液,加入培养液轻轻转动培养瓶把残留消化液冲掉,再加入2 mL培养液,弯头吸管轻柔吹打成细胞悬液,计数,接种到新的培养瓶中,放入 CO_2 培养箱培养。4 h后观察细胞贴壁情况,此后每2 d换液1次,并在倒置显微镜下进行观察、照相。

1.2.3 油红O染色鉴定 细胞生长至第8 d,PBS洗3次,10%甲醛的等渗盐缓冲液固定30 min后,PBS漂洗2次,吸取油红O工作液5 mL,油红O染色8 min,60%异丙醇分色20 s,蒸馏水冲洗,在倒置显微镜下观察、照相。

2 结果

2.1 原代培养

以DMEM/F12培养基对草鱼脂肪组织块进行原代培养,2 d后可见部分贴壁组织块周围出现梭形或不规则三角形细胞(封二图版1A),3 d后可见大部分贴壁组织块周围出现梭形或不规则三角形细胞(封二图版1B)。第8 d梭形或不规则形细胞逐渐增多并形成局部单层汇合,部分胞内出现小脂滴(封二图版1C)。经油红O染色的原代培养的草鱼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(封二图版1D),证实该细胞为脂肪细胞。

2.2 传代培养

传代培养的细胞接种2 d即开始蓄积脂滴。大约3 d细胞增殖迅速,细胞为梭形或多边形,膜边缘清晰。生长至第5 d可见细胞普遍融合(封二图版1E),8 d油红O染色显微摄影发现细胞内脂滴已聚合成单个或多个大脂滴(封二图版1F)。

2.3 脂肪细胞的鉴定

经油红O染色,倒置显微镜下观察,脂滴被亲

脂的油红O着色而呈橘红色,可以鉴定为脂肪细胞。其中未分化的前脂肪细胞和非脂聚积的部分不着色。

3 讨论

组织块培养法是一种简便易行且成功率较高的常用原代培养方法^[15]。细胞的成活率比较高,操作简单方便,与酶消化法相比接种培养简便经济,污染几率较小。

吉红^[14]等对草鱼前体脂肪细胞原代培养,第3 d圆形细胞开始贴壁且呈梭形、三角形等不规则形状,第5 d形成局部单层汇合,部分胞内出现小脂滴,第7 d分化的细胞增多,脂滴大小不等,第9 d脂滴汇合。

Anne Vegusdal^[10]等对大西洋鲑鱼前体脂肪细胞增殖和分化的研究,24 h分离出较小的前体脂肪细胞,48 h后检测到增殖活动已经开始。继续培养发现细胞继续增长并且邻近的细胞连接在一起。5 d后培养的细胞显示一个非常长的细胞质,细胞以非常快的速度增长直到1周后融合。11 d时,大多数细胞包含大的脂质内含物。未分化的前体脂肪细胞形态与成纤维细胞类似,细胞质中缺乏脂滴。在前体脂肪细胞融合之前,其胞浆内什么也没有或者偶尔有少量的小的脂质内含物。

本试验在组织块接种后48 h有细胞从组织块周围迁出,第3 d迁出的细胞增多,第8 d大多数细胞融合,部分胞内出现小脂滴。与吉红和Anne Vegusdal等的研究结果有所差异,这可能是由于实验所采用的鱼种的区域性和鱼种不同造成。

鱼类为变温动物,对于冷水性鱼类来说,其细胞培养的适温是 $4\sim 24\text{ }^\circ\text{C}$;温水性鱼类则是 $15\sim 37\text{ }^\circ\text{C}$ ^[16]。草鱼属温水性鱼类,最适生长温度在 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 左右。大鼠前体脂肪细胞采用 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 作为最佳培养温度^[3-4],虹鳟前体脂肪细胞采用 $18\text{ }^\circ\text{C}$ ^[9],大西洋鲑前体脂肪细胞采用 $13\text{ }^\circ\text{C}$ ^[10],红鲷前体脂肪细胞采用 $25\text{ }^\circ\text{C}$ ^[11-12],本试验离体培养的草鱼脂肪细胞在DMEM/F12培养基,20%胎牛血清、 $28\text{ }^\circ\text{C}$ 培养条件下生长良好,这与吉红^[14]等的研究一致。

本研究利用组织块法对草鱼前脂肪细胞的离体原代培养进行了初步探索,获得了较为满意的结果,并成功地将草鱼脂肪细胞传至第4代,初步确立了草鱼离体培养的较为适宜的培养条件,为今后草鱼及鲤形目鲤科雅罗鱼亚科的细胞离体培养以及相应

细胞系的建立奠定了实验基础。

参考文献：

- [1] Gondret F , Ferré P , Dugail I. ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species[J]. Journal of Lipid Research , 2001 , 42 :106.
- [2] 王竹晨 , 刘建中 , 李燕 , 等. 人前脂肪细胞的原代培养 [J]. 中山医科大学学报 2001 22(6) :443-446.
- [3] 田志华 , 杨公社 , 赵兴波 , 等. 抗波形纤维蛋白单抗对大鼠前体脂肪细胞增殖分化及波形纤维形态的影响 [J]. 动物学报 2003 49(6) :807-812.
- [4] 佟晓哲 , 邹阳. 大鼠前脂肪细胞的原代培养 [J]. 辽宁中医杂志 2010 37(2) :243-244.
- [5] 李影 , 杨公社 , 卢荣华 , 等. 原代猪前体脂肪细胞培养方法的优化 [J]. 细胞生物学杂志 2005 27 :697-700.
- [6] 屈长青 , 张国华 , 陈粉粉 , 等. 猪前体脂肪细胞的原代培养 [J]. 农业生物技术学报 2005 13(5) :649-653.
- [7] 宋文华 , 张才 , 车英玉 , 等. 犊牛前脂肪细胞的传代培养 [J]. 中国兽医学报 2008 28(6) :715-718.
- [8] 夏成 , 王哲 , 朱淑玲 , 等. 犊牛前脂肪细胞的培养及其增殖与分化模型的建立 [J]. 中国兽医科技 2004 34(5) :26-30.
- [9] Weil C , Sabin N , Bugeon J , et al. Differentially expressed proteins in rainbow trout adipocytes isolated from visceral and subcutaneous tissues [J]. Comparative Biochemistry and Physiology 2009 , Part D 4 :235-241.
- [10] Vegusdal A , Sundvold H , Gjøen T , et al. An in vitro Method for Studying the Proliferation and Differentiation of Atlantic Salmon Preadipocytes [J]. Lipids 2003 38(3) :289-296.
- [11] Oku H , Umino T. Molecular characterization of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their gene expression in the differentiating adipocytes of red sea bream *Pagrus major* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology(Part B) 2008 151 :268-277.
- [12] Oku H , Tokuda M , Umino T. The effects of 2-bromopalmitate on the fatty acid composition in differentiating adipocytes of red sea bream [J]. Comparative Biochemistry and Physiology(Part B) 2009 152 :370-375.
- [13] Roy S S , Mukherjee M , Bhattacharya S , et al. A new cell secreting insulin [J]. Endocrinology 2003 144(4) :1585-1593.
- [14] 吉红 , 曹艳姿 , 林亚秋 , 等. 草鱼前体脂肪细胞的原代培养 [J]. 水生生物学报 2009 33(6) :1226-1230.
- [15] 司徒镇强 , 吴军正. 细胞培养 [M]. 第 2 版. 西安 : 世界图书出版公司 2007 :58.
- [16] Fryer J L , Lannan C N. Three decades of fish cell culture : A current listing of cell lines derived from fishes [J]. Journal of Tissue Culture Methods 1994 16 :87-94.

Animal Sciences

The Primary and Subculture and Identification of Grass Carp Preadipocyte from Adipose Tissue

CAO Kai , LI Ying , CAI Zhi-hua

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology , College of Life Sciences , Chongqing Normal University , Chongqing 400047 , China)

Abstract : To establish the culture system of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) preadipocyte , and redisplay the whole process of the proliferation and differentiation of grass carp preadipocytes in vitro , these experiments were carried out. The adipocytes were identified by oil red O staining , and the cells morphology was observed by inverted microscope and CCD. Grass carp selected was healthy and about 800 ~ 900 g. Primary culture of adipose tissue from grass carp abdominal cavity was done in the DMEM/F12 medium by using the tissue culture technology. All the experiments were done under the condition of 28℃ , 5% CO₂ , 20% calf serum , pH 7.0 ~ 7.2. When monolayer cells occupied 70% ~ 80% of the bottle 's bottom and confluent , the subculture was done. The results showed that the spindle cells emigrated from the tissues after 48 hours , the cell number increased and the cell morphology were mainly spindle and polygon after 3 days , cells confluent most after 8 days and oil red O staining proved that stained cells were adipocytes. Confluent cells could be passed at fourth passage. The cells could formed monolayer at the third day , and cytoplasm contained large quantities of lipid droplets at the eighth day. In summary , the suitable culture system of grass carp preadipocyte was established initially.

Key words : grass carp ; preadipocyte ; primary culture ; subculture