

研究报告

瘦素诱导体外培养大鼠脂肪间充质干细胞凋亡

姜玉玲, 乔虹, 刘梦雪, 李强, 孙玉倩, 张巾超

哈尔滨医科大学附属第二医院内分泌科, 哈尔滨 150086

摘要: 为观察瘦素诱导体外培养大鼠脂肪间充质干细胞凋亡的作用, 采用胶原酶消化法分离培养大鼠附睾脂肪间充质干细胞, 第3代细胞用于实验。细胞免疫荧光化学方法鉴定 CD105、Vimentin 表达阳性率约 80% 以上, 10^{-6} mol/L 的瘦素作用细胞 48 h、72 h 后激光共聚焦显微镜观察分别可见早期及中晚期特征表现; 0 mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 瘦素分别作用于细胞 48 h 后, 应用 Annexin V/PI 双染色法流式细胞仪检测早期凋亡率分别为 $2.50\% \pm 0.72\%$ 、 $6.78\% \pm 1.99\%$ 、 $11.99\% \pm 1.58\%$ 、 $17.93\% \pm 4.82\%$ ($P < 0.05$); 随着瘦素浓度的增加和作用时间的延长, Caspase-3 的活性逐渐增高, 至 48 h 时达到高峰。说明瘦素可以直接诱导脂肪间充质干细胞凋亡, 从数量上减少脂肪组织的含量。

关键词: 瘦素, 脂肪间充质干细胞, 凋亡

Leptin Induced Apoptosis in Rat Adipose-derived Stem Cells Cultured *in vitro*

Yuling Jiang, Hong Qiao, Mengxue Liu, Qiang Li, Yuqian Sun, and Jinchao Zhang

Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Abstract: To determine the direct effect of leptin on adipose tissue apoptosis *in vitro* using rat adipose-derived stem cells (ADSCs), we isolated the ADSCs of rat epididymis adipose tissue by collagenase digestion, filtration, and subsequent centrifugation. Cell cultures with or without leptin (10^{-9} mol/L, 10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L and 10^{-6} mol/L) were incubated for different time. We examined the cell surface phenotype by immunofluorescence and detected the apoptosis morphological changes of ADSCs by laser scanning confocal microscope (LCSM). The number of apoptotic cells was determined by flow cytometry assay after annexin V binding and PI staining. Caspase-3 activity was measured by spectrofluorometry. The present study demonstrates that leptin treatment causes a marked increase in adipose-derived stem cell apoptosis. With the LCSM, after being treated with leptin, ADSCs showed the typical characteristic of apoptosis. Leptin in used concentrations (0 mol/L, 10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L) caused a marked increase in cell apoptosis after 48 h incubation time (for $2.50\% \pm 0.72\%$, $6.78\% \pm 1.99\%$, $11.99\% \pm 1.58\%$ and $17.93\% \pm 4.82\%$, respectively, $P < 0.05$). Caspase-3 activity increased and reached a maximal level after 48 h in a linear fashion. The effect of leptin was dose-dependent and time-dependent. Leptin has been demonstrated to induce preadipocyte and adipocyte apoptosis, and today we demonstrate that leptin can induce ADSCs apoptosis, which can contribute to the decrease of adiposity. To our knowledge, this is the first study demonstrating the direct peripheral effect of leptin on ADSCs.

Keywords: leptin, adipose-derived stem cells (ADSCs), apoptosis

Received: February 3, 2008; **Accepted:** April 22, 2008

Supported by: Heilongjiang Province Nature Science Fund (No. D200646), Heilongjiang Province Health Department Fund (No. 2004-228), Heilongjiang Province Post-graduate Fund (No. YJSCX2007-0198HLJ), Harbin Medical University Post-graduate Fund (No. HCXS2007005).

Corresponding author: Hong Qiao. Tel: +86-13359864888; E-mail: Qiaoh0823@sina.com

黑龙江省自然科学基金项目 (No. D200646), 黑龙江省研究生创新科研项目 (No. YJSCX2007-0198HLJ), 黑龙江省卫生厅医学科研课题 (No. 2004-228), 哈尔滨医科大学研究生创新基金 (No. HCXS2007005) 资助。

脂肪细胞由起源于中胚层的多能干细胞在多种因素的作用下逐步分化、发育而成, 其过程大致经历了脂肪间充质干细胞、前脂肪细胞、成熟脂肪细胞等几个阶段, 各阶段细胞凋亡都会影响脂肪的形成。瘦素(Leptin)是由脂肪细胞分泌的一种多效应细胞因子, 具有抑制食欲、增加能量消耗以及抑制脂肪合成的作用。我们通过观察不同浓度瘦素对脂肪间充质干细胞凋亡的影响, 探讨瘦素在脂肪形成过程中的作用, 为研究肥胖的发生机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Wistar 大鼠(哈尔滨医科大学第二临床医学院实验动物中心)。

1.1.2 主要试剂及仪器

高糖 DMEM 培养基(Hyclone 公司), 新生牛血清(Gibco 公司), 胶原酶 I (Sigma 公司), 重组大鼠瘦素(Sigma 公司), 兔抗大鼠 CD105、CD31、Vimentin、SMA 抗体, 山羊抗兔 FITC-二抗(北京博奥森生物技术有限公司), FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒(BD, 美国), Caspase 3 活性检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司), 荧光显微镜(Olympus, 日本), 激光共聚焦显微镜(Zeiss, 德国), 流式细胞仪(BD, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脂肪间充质干细胞(ADSCs)的分离及培养

参照 Zuk 等^[1]的方法进行大鼠脂肪间充质干细胞分离培养。取雄性 Wistar 大鼠(30~35 日龄), 水合氯醛过量麻醉处死, 无菌条件下取双侧附睾脂肪垫, PBS 冲洗 3~5 次, 尽量剔除肉眼可见的小血管, 用眼科剪细细剪碎, 加入 2~3 倍体积 0.1% 胶原酶 I, 37°C 水浴消化 30 min。用等量的含有 10% 新生牛血清的 DMEM 中和胶原酶, 200 目滤网过滤, 1600 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入含 10% 新生牛血清的 DMEM 重悬细胞, 以 10^6 /mL 的密度接种于 50 mL 培养瓶, 放置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 每 2~3 d 换液 1 次, 至贴壁细胞长满瓶底后用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 1:2 传代接种于新的 50 mL 培养瓶。第 3 代细胞用于实验。

1.2.2 细胞免疫荧光化学方法鉴定大鼠附睾脂肪垫间充质干细胞

细胞以 1×10^5 /mL 密度接种于 24 孔培养板内的无菌盖玻片上, 待细胞爬片满 80% 时, 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 4°C 固定, 分别滴加 1:100 Anti-CD105、Anti-CD31、Anti-Vimentin、Anti-SMA, 置湿盒 37°C 孵育 1 h, 1:100 FITC-二抗 37°C 孵育 30 min, 荧光显微镜观察荧光强度。

1.2.3 瘦素诱导

设立瘦素终浓度分别为 0 mol/L、 10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 组, 应用细胞培养板, 每一个浓度设 3 个复孔, 瘦素作用前, 换无血清 DMEM 培养 24 h, 使细胞同步化。

1.2.4 激光共聚焦显微镜观察细胞凋亡的形态

细胞以 5×10^5 /mL 的密度接种于预先铺好玻片的 6 孔板, 不同浓度组瘦素分别作用 48 h、72 h 后, 吸弃培养液, 每孔加入 2% 多聚甲醛 1 mL, PBS 轻轻冲洗, 然后滴加 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI, 37°C 孵育 10 min, 将玻片从 6 孔板中取出, PBS 轻轻冲洗片刻后, 用滤纸吸干多余液体, 封片剂封片后置激光共聚焦显微镜下观察凋亡细胞的形态。

1.2.5 流式细胞仪检测早期凋亡

常规消化细胞 2×10^6 个, 离心收集细胞后, PBS 洗 2 次, 小心去上清, 加入 500 μ L 冷 PBS 制成单细胞悬液。取 100 μ L 细胞悬液, 分别加入 5 mL Annexin V-FITC 和 5 μ L PI, 轻轻振荡混匀后常温避光孵育 15 min, 加入 400 μ L Annexin V binding buffer, 立即应用 BD 流式细胞仪检测, 结果使用 CellQuest 软件分析。

1.2.6 Caspase-3 蛋白活性的检测

不同浓度组瘦素分别作用 12 h、24 h、48 h、72 h 后, 胰酶消化贴壁细胞, 按照碧云天公司 Caspase-3 活性检测试剂盒说明书进行操作, 应用装备有 405 nm 激发光的酶标仪进行检测。

1.2.7 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差表示, 应用 SPSS13.0 软件处理, 采用方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脂肪间充质干细胞的鉴定

FITC 荧光信号呈绿色, 激发波长为 488 nm, 在

530 nm 波长以上观察。第 3 代 ADSCs 细胞 CD105、Vimentin 均匀染色, 表达阳性率约 80% 以上, 见图 1。内皮细胞、平滑肌细胞表面标志 CD31、SMA 表达阴性。

2.2 激光共聚焦显微镜观察

应用 AnnexinV/PI 双染色法, 激光共聚焦显微镜观察, 正常活细胞 AnnexinV 和 PI 均为低染, 细胞膜和细胞核均不着色; 10^{-6} mol/L 瘦素诱导 48 h 后, AnnexinV 高染, 细胞膜呈绿色荧光, PI 低染, 细胞核不着色, 是细胞早期凋亡特征(图 2A); 10^{-6} mol/L 瘦素诱导 72 h 后, AnnexinV 和 PI 均高染, 细胞膜呈

绿色荧光, 细胞核呈红色荧光, 是细胞中、晚期凋亡特征(图 2B)。在相同的时间点观察, 其余各浓度瘦素诱导凋亡现象不明显。

2.3 流式细胞仪分析

AnnexinV/PI 双染色法应用流式细胞仪检测, 细胞凋亡率随瘦素浓度不同呈现剂量依赖性。对照组、 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-6} mol/L 瘦素作用于大鼠脂肪间充质干细胞 48h 后, 早期凋亡率分别为 $2.50\% \pm 0.72\%$ 、 $6.78\% \pm 1.99\%$ 、 $11.99\% \pm 1.58\%$ 、 $17.93\% \pm 4.82\%$ ($P < 0.05$)。如图 3 所示, 右下象限代表早期凋亡细胞。

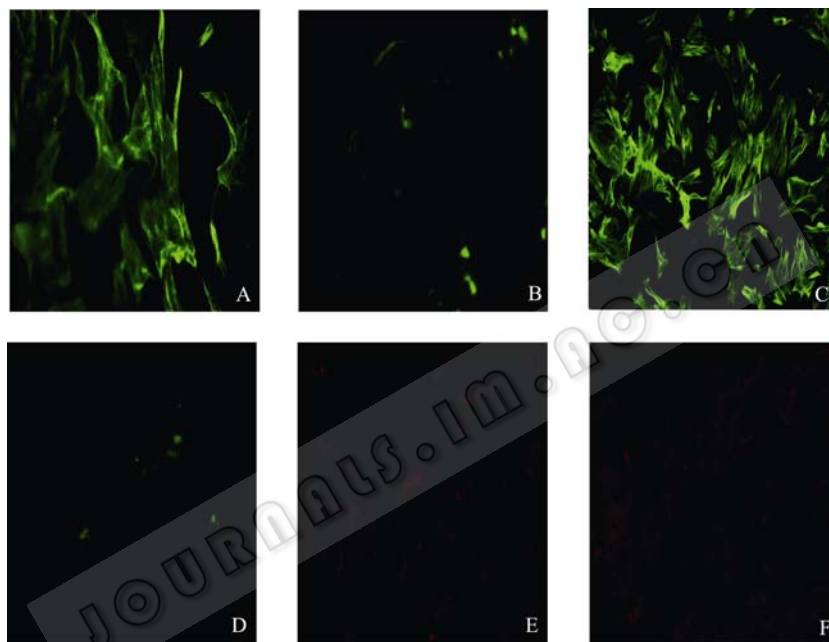


图 1 细胞表面标志的鉴定(×200)

Fig. 1 Identification of the cell surface phenotype (×200)

A: positive signals of vimentin (FITC, green); B: vimentin-control; C: positive signals of CD105 (FITC, green); D: CD105-control; E: negative signals of CD31; F: negative signals of SMA

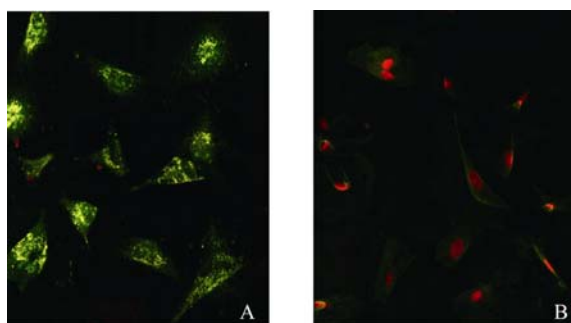


图 2 凋亡细胞形态

Fig. 2 The morphological evidence of apoptosis (×200)

Cells were stained with annexin V-FITC and PI. A: in the early phase of cells apoptosis, the membranes are green and the nucleus are not red; B: in the middle and final phases of cells apoptosis, the membranes are green and the nucleus are red

2.4 Caspase-3 活性

在应用不同浓度瘦素作用于脂肪间充质干细胞后, 随作用时间的延长, Caspase-3 蛋白质的活性逐渐增高, 至 48 h 时达到高峰, 然后逐渐下降, 在 72 h 内仍保持较高水平(图 4)。

3 讨论

瘦素及其在肥胖发生过程中的重要作用是多年来的研究热点, 生理浓度的瘦素主要在中枢神经系统通过抑制摄食发挥作用这一点已经得到广大学者的共识, 而瘦素的外周直接作用尚处于研究阶段。

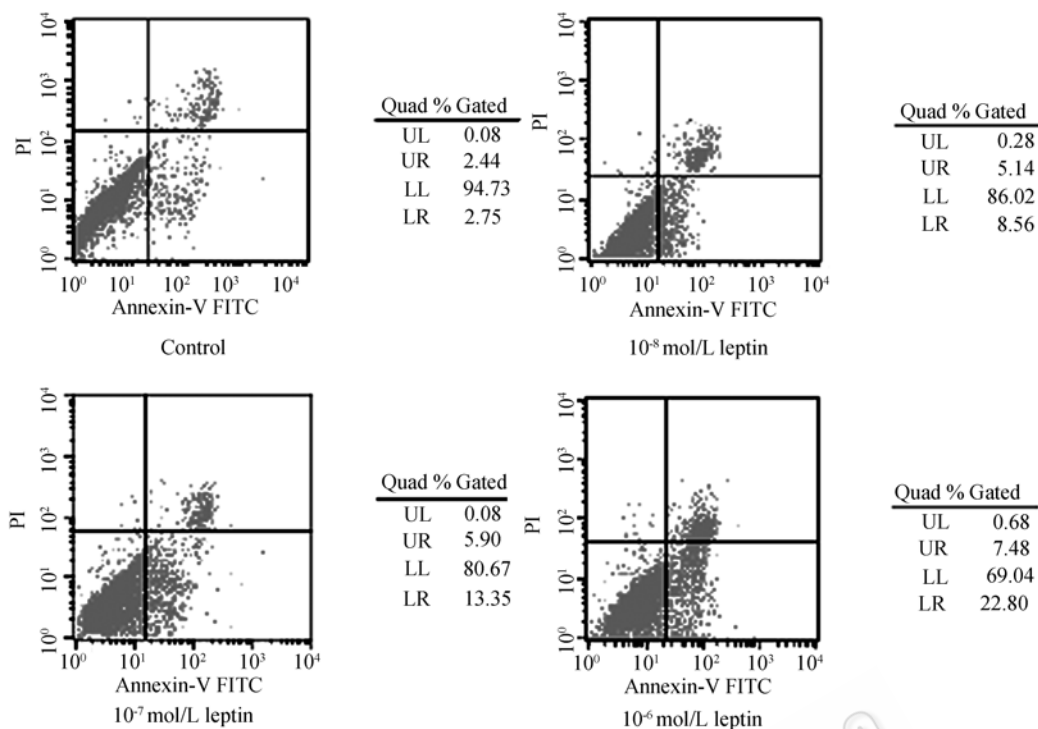


图3 早期凋亡率的检测

Fig. 3 Analysis of apoptotic ratio in the early phase

The number of apoptotic cells was quantified by FACScan flow cytometer after cells were stained with AnnexinV-FITC and PI

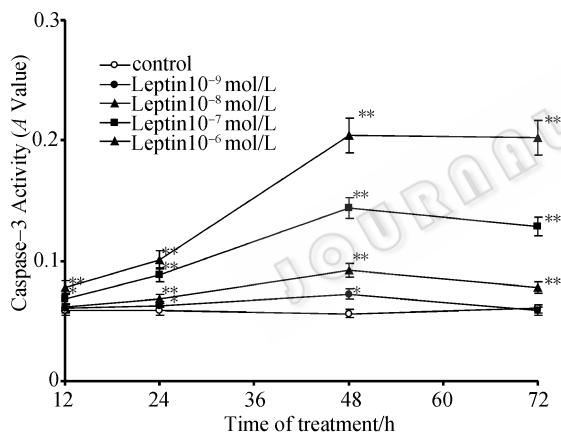


图4 Caspase-3 活性测定结果

Fig. 4 Caspase-3 levels of cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control

已有实验证实^[2], 瘦素可以直接作用于前脂肪细胞和脂肪细胞, 影响脂肪的形成。Della-Fera 等^[3]的研究表明, 瘦素促进鼠脂肪细胞和前脂肪细胞凋亡, 并且凋亡率与瘦素浓度呈正相关。我们的实验结果显示, 瘦素可以诱导体外培养的大鼠脂肪间充质干细胞凋亡, 且呈现出时间和剂量依赖性, 浓度越高、作用时间越长凋亡作用越明显。由于脂肪组织的形成和脂肪细胞的分化受多种因素的影响, 因此我们的实验在瘦素诱导前 24 h 采用去血清培养, 以减少

各种激素及多种细胞因子对脂肪间充质干细胞的干扰作用。除促进凋亡外, 也有实验发现^[4,5], 瘦素可以使前脂肪细胞的增殖显著减少, 直接抑制前脂肪细胞成熟, 且呈现剂量依赖性。以上结果提示瘦素可以在脂肪细胞形成的不同阶段中发挥作用, 即抑制增殖或促进凋亡, 从而减少成脂的数量。而 Ramsay^[6]的研究却发现, 瘦素明显促进前脂肪细胞增殖和分化, 增加新生脂肪的数量。这种由瘦素导致不同作用结果的机制尚不清楚, 可能是由于 Ramsay^[6]所用瘦素浓度较低, 也可能是由于他在细胞培养过程中加入了胰岛素、地塞米松等分化诱导剂, 这些物质都有抗细胞凋亡的作用。

瘦素诱导脂肪间充质干细胞凋亡的机制目前尚不十分清楚, 可能与 Caspase-3 的活化有关。正常情况下, Caspase-3 以无活性的酶原形式存在于哺乳动物多种组织和细胞内, 活化后可特异性识别并切割底物的氨基酸序列, 使胞内许多重要进程发生功能障碍, 并破坏细胞结构成分, 从而导致凋亡不可逆地发生。Caspase-3 的活性与细胞凋亡程度密切相关, 其酶活性越高, 凋亡的细胞数就越多。多项研究表明^[7,8], 脂肪细胞与前脂肪细胞的凋亡时 Caspase-3 的活性显著升高, 而我们的实验也发现, 加入瘦素

后 Caspase-3 的活性升高, 且与瘦素浓度呈正相关, 并在 48 h 达高峰, 因此我们推测, 瘦素可以激活 Caspases 级联反应从而促进脂肪间充质干细胞的凋亡, 但具体机制尚需进一步研究证实。

本研究结果提示, 瘦素可以直接诱导脂肪间充质干细胞凋亡, 从数量上减少脂肪组织的含量。然而在机体内, 血浆瘦素水平随肥胖程度的增加而升高, 当体重增加 10% 以上时, 随着脂肪的增多, 逐渐出现高胰岛素血症和瘦素抵抗。胰岛素具有促进脂肪合成及抑制脂肪细胞凋亡的作用, 因此掩盖了瘦素诱导凋亡的作用, 所以肥胖的发生机制尚需进一步研究, 以期望为其防治提供依据。

REFERENCES

- [1] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 2001, **7**(2): 211–228.
- [2] Gullicksen PS, Della-Fera MA, Baile CA. Leptin-induced adipose apoptosis: Implications for body weight regulation. *Apoptosis*, 2003, **8**(4): 327–335.
- [3] Della-Fera MA, Li C, Baile CA. Resistance to IP leptin-induced adipose apoptosis caused by high-fat diet in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **303**(4): 1053–1057.
- [4] Zwirska-Korczala K, Adamczyk-Sowa M, Sowa P, *et al.* Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *J Physiol Pharmacol*, 2007, **58**(Suppl 1): 53–64.
- [5] Ambati S, Kim HK, Yang JY, *et al.* Effects of leptin on apoptosis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Pharmacol*, 2007, **73**(3): 378–384.
- [6] Ramsay TG. Porcine preadipocyte proliferation and differentiation: a role for leptin? *J Anim Sci*, 2005, **83**(9): 2066–2074.
- [7] Hsu CL, Yen GC. Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Agric Food Chem*, 2007, **55**(5): 1730–1736.
- [8] Qian H, Hausman DB, Compton MM, *et al.* TNF α induces and insulin inhibits caspase 3-dependent adipocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **284**(5): 1176–1183.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法(Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results): 本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的(如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。