

· 临床研究 ·

1,25-二羟基维生素 D 对人大网膜脂肪细胞分化过程的作用

高捷,冯凭

(天津医科大学,天津 300070)

摘要:目的 研究 1,25-二羟基维生素 D 对人大网膜脂肪细胞分化过程的作用。方法 培养人大网膜脂肪细胞,在其生长的不同阶段加入 1,25-二羟基维生素 D,观察其对细胞的分化过程中的三酰甘油和细胞内脂肪积聚的作用。结果 1,25-二羟基维生素 D 对人脂肪细胞的分化有抑制作用,并抑制三酰甘油的合成。结论 该研究结果可为肥胖人群人体合理地摄入维生素 D 提供理论指导。

关键词:维生素 D;脂细胞;细胞分化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.21.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)21-2123-02

Study the effects of 1,25(OH)₂ vitamin D on human omentum majus lipocyte differentiation

Gao Jie, Feng Ping

(Tianjin Medical Sciences University, Tianjin 300070, China)

Abstract: Objective To study the effects of 1,25(OH)₂ Vitamin D on human omentum majus lipocyte differentiation. **Methods** 1,25(OH)₂Vitamin D were added to the culture media of human omentum majus lipocyte, then the expression of triglyceride and lipid droplet accumulation in the cytoplasm were recorded. **Results** 1,25(OH)₂ Vitamin D inhibited human omentum majus lipocyte differentiation, and synthesis of triglyceride. **Conclusion** This data advisory to obesity balanced daily intake of Vitamin D.

Key words: vitamin D; adipocytes; cell differentiation

脂肪组织不仅是体内主要的能量储存器官,而且具有重要的内分泌功能,在维持机体的能量及糖、脂肪代谢稳定方面具有十分重要作用^[1]。脂肪细胞作为脂肪组织的主要组成成分,其增殖与分化异常可导致肥胖或者脂肪组织发育不良,尤其是肥胖,其发病率呈逐年上升趋势,已成为世界性的健康问题^[2]。1,25-二羟基维生素 D 是一组具有生物活性的脂溶性类固醇衍生物,具有广泛的生理作用。除调节体内钙离子、磷代谢外,还影响免疫、神经、生殖、内分泌、上皮及毛发生长等。近来研究发现补充钙和维生素 D 有助于纠正肥胖患者的脂质代谢紊乱^[3]。

1 材料与与方法

1.1 材料 DMEM[中科院血研所(Gibco)];胰酶(中科院血研所);胎牛血清(中科院血研所);二甲亚砜(DMSO)[中科院血研所(Sigma)];I 型胶原酶[中科院血研所(Gibco)];牛血清清蛋白(中科院血研所);1,25-二羟基维生素 D[上海基星(Solarbio)];胰岛素[上海基星(Becton)];地塞米松[上海基星(Solarbio)];转铁蛋白[上海基星(Solarbio)];油红 O[上海基星(Solarbio)];苯酚红[上海基星(Solarbio)];异丙醇[上海基星(Solarbio)]。

1.2 方法

1.2.1 人大网膜前脂肪细胞原代培养^[4] 大网膜组织取材于剖腹产孕妇,无全身代谢及内分泌疾病,无服用糖及脂肪代谢药物史。(1)超净台内取新鲜切除的大网膜脂肪组织,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,剔除结缔组织和血管;(2)充分剪碎脂肪组织为 1 mm³ 的小块;(3)加入 2 倍体积的 0.2% 的 I 型胶原酶,37 °C 振荡 50 min;(4)加入 DMEM,吹打混匀后 100 目筛网过滤;(5)1 000 r/min 离心 10 min,弃上清;(6)加入完全 DMEM 吹打混匀,分瓶于 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后换液,以后每 2 d 换液 1 次。取 4 代细胞进行实验。

1.2.2 人大网膜前脂肪细胞的形态观察 (1)制作细胞爬片置于 CO₂ 培养箱中培养^[5];(2)分别于 1、2、3、5、7 d 4% 多聚甲醛固定细胞爬片;(3)行 HE 染色,中性树胶封片,镜下观察;(4)行油红 O 染色:将爬片置于油红 O 染剂中 20 min,水洗,水溶性封片剂封片,立即拍照(油红 O 染色会很快消退);(5)显微镜下观察诱导分化过程中细胞形态学改变以及细胞内脂滴产生情况。

1.2.3 三酰甘油含量的测定 按照实验设计分组:未分化组、诱导分化组、分化+10⁻⁴ 维生素 D 组、分化+10⁻⁶ 维生素 D 组、分化+10⁻⁸ 维生素 D 组、分化+10⁻¹⁰ 维生素 D 组;诱导分化 5 d 后 4% 多聚甲醛固定细胞爬片;磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,每次 5 min;0.1% TritonX-100 孵育 15 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;3% 过氧化氢孵育 15 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;参照 Murry 等^[6] 的方法测定三酰甘油含量,并略加改进。以每细胞总蛋白中所含三酰甘油的量表示细胞三酰甘油的含量。分每组 6 孔,相同试验重复 3 次,并以 3 次实验结果的均数做统计学分析(表 1)。

2 结果

2.1 人大网膜前脂肪细胞的培养、分化的形态学观察 原代培养的人大网膜前脂肪细胞,倒置相差显微镜镜下观察细胞形态类似成纤维细胞,呈棱形、不规则形等;经分化培养基培养,形态逐渐变圆,前脂肪细胞逐渐分化为内含反光脂滴的脂肪细胞(彩插 IV 图 1)。经油红 O 染色细胞内脂质着色,而未分化细胞胞质内无着色,提示诱导分化的细胞内有富含脂肪的液滴,证实为脂肪细胞。在倒置显微镜放大 200 倍下数每个视野下分化细胞占总细胞数的比例,共数 10 个视野计算平均数,约有 70% 的细胞可以分化为脂肪细胞。

表 1 不同浓度 1,25-二羟基维生素 D 对脂肪细胞三酰甘油含量的影响

组别	n	三酰甘油含量
未分化组	6	0.21±0.05
分化组	6	2.51±0.07*
分化+10 ⁻⁴ 维生素 D 组	6	2.03±0.14*
分化+10 ⁻⁶ 维生素 D 组	6	1.97±0.10*
分化+10 ⁻⁸ 维生素 D 组	6	1.34±0.18*
分化+10 ⁻¹⁰ 维生素 D 组	6	1.29±0.05*△

2.2 不同浓度 1,25-二羟基维生素 D 对人大网膜脂肪细胞分化过程的抑制作用 油红 O 为脂质染色剂,通过对分化细胞进行油红 O 染色后在显微镜下观察,可以定性地看着分化细胞脂滴的变化。脂肪细胞分化成熟脂肪细胞,形态由最初的棱形或三角形变成椭圆形充满脂滴。培养至第 7 天的脂肪细

胞经油红 O 染色后,脂滴被亲脂的油红 O 着色而呈红色,细胞质不着色(彩插 IV 图 2)。 10^{-8} 、 10^{-10} 维生素 D 组的细胞内脂滴较多, 10^{-4} 、 10^{-6} 维生素 D 组细胞内脂滴明显减少,但均少于分化组,而未分化组无着色。1,25-二羟基维生素 D 是以剂量依赖的方式抑制人大网膜脂肪细胞的分化。

3 讨 论

在正常个体中,脂肪组织内的脂肪细胞数目基本保持在一个相对稳定的范围内,脂肪细胞的增殖分化与衰老死亡处在一个动态的平衡中^[7]。而肥胖患者体内的这种平衡被打乱,脂肪细胞出现异常增殖和分化,或者是脂肪细胞衰老死亡减少,最终出现脂肪细胞数目的增加和体积的增大,临床上表现为肥胖^[8]。当个体的体质量增加时,其脂肪组织的体积增加显著,而骨骼和肌肉体积几乎无明显变化^[9]。这一方面是由于过多的能量在体内被合成三酰甘油,并储存于脂肪细胞,而三酰甘油的不断积累则会使脂肪细胞体积增大。有研究发现 1,25-二羟基维生素 D 通过 VDR 抑制脂肪形成过程中的关键分子过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 及 CCAAT 增强子结合蛋白仅来调节脂肪形成^[10]。本实验发现,前体脂肪细胞的形态与成纤维细胞相似,经适当分化诱导剂的刺激,其细胞骨架和细胞外基质逐渐发生变化,细胞开始进入由不成熟脂肪细胞向成熟脂肪细胞的转变。此时,细胞形态由椭圆型逐渐趋于圆形或类圆形,胞体逐渐增大,胞质中开始出现小脂滴,标志脂质开始积累,小脂滴不断增多并融合为较大的脂滴,可经油红特殊染色呈红色,获得成熟脂肪细胞的形态特征。一般来说,分化进展越好,脂质含量越高,使用油红染色时着色越多。本研究证实维生素 D 是以剂量依赖的方式抑制人大网膜前脂肪细胞的分化。1,25-二羟基维生素 D 呈剂量依赖性地抑制体外培养的细胞三酰甘油的积聚。细胞油红染色显示,由于 1,25-二羟基维生素 D 的作用,细胞着色明显减少,表明 1,25-二羟基维生素 D 可以抑制细胞向成熟脂肪细胞分化。这也许可以拓宽科研人员对维生素 D 药理作用的认识,在临床上为给予肥胖人群提供维生素 D 提供理论支持。

参考文献:

[1] 位风芝,宋晶,段竹梅,等.肥胖婴儿与亚临床佝偻病的关

系[J].中国妇幼保健,2009,24(33):4676-4677.

- [2] 李瑞珍,马新瑜,陈寿康,等.儿童单纯性肥胖与糖、脂代谢及脂肪肝[J].临床儿科杂志,2008,26(12):1035-1037.
- [3] Tabara Y, Osawa H, Kawamoto R, et al. Reduced high-molecular weight adiponectin and elevated high-sensitivity C-reactive protein are synergistic risk factors for metabolic syndrome in a large scale middle-aged to elderly population; the shimanami health promoting program study[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(12): 715-722.
- [4] Lenders CM, Feldman HA, Von Scheven E, et al. Relation of body fat indexes to vitamin D status and deficiency among obese adolescents[J]. Am J Clin Nutr, 2009, 90(3): 459-467.
- [5] 徐洪,宋旭东,李莹,等.贴壁细胞在载玻片上爬片的新方法[J].中国应用生理学杂志,2009,25(2):283-285.
- [6] Murry LT, Toubro S, Astrup A. PPARgamma agonists in the treatment of type II diabetes; is increased fatness commensurate with long-term efficacy? [J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003, 27(2): 147-161.
- [7] Milanski M, Degasperi G, Coope A, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus; implications for the pathogenesis of obesity[J]. J Neurosci, 2009, 29(2): 359-370.
- [8] 黄鹏,孙玉倩,高萍. C-反应蛋白对脂肪细胞脂联素表达的影响[J].生物学杂志,2009,27(1):7-9.
- [9] 曹贵方.补充钙和维生素 D 有助于纠正肥胖患者的脂质代谢紊乱[J].中华医学杂志,2007,8(18):1229-1230.
- [10] 雪景,缪珩.维生素 D 与肥胖[J].国际内分泌代谢杂志,2010,30(3):168-170.

(收稿日期:2010-11-25 修回日期:2011-03-22)

(上接第 2103 页)

- bone marrow stem cells plastic or heterogenous-That is the question[J]. Exp-Hematol, 2005, 33(6): 613-623.
- [3] Shin SY, Nam JS, Lee YH, et al. TNF α -exposed bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote locomotion of MDA-MB-231 breast cancer cells through transcriptional activation of CXCR3 ligand chemokines[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(40): 30731-30740.
 - [4] Akihama S, Sato K, Habuchi T, et al. Bone marrow-derived cells mobilized by granulocyte-colony stimulating factor facilitate vascular regeneration in mouse kidney after ischemia/reperfusion injury[J]. Tohoku J Exp Med, 2007, 213(4): 341-349.
 - [5] Abbott JD, Huang Y, Giordano FJ, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury [J]. Circulation, 2004, 110(21): 3300-3305.
 - [6] Wang Y, Song YT, Wei H, et al. Quantitative analysis of lentiviral transgene expression in mice over seven generations[J]. Transgenic Res, 2010, 19: 775-784.
 - [7] Bergfeld SA, DeClerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment[J].

Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(2): 249-261.

- [8] Ciesielski MJ, Apfel L, Fenstermaker RA, et al. Antitumor effects of a xenogeneic survivin bone marrow derived dendritic cell vaccine against murine GL261 gliomas[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(12): 1491-1503.
- [9] 刘珊,范桂香,杨建业,等.两种小鼠肺纤维化造模方法的比较[J].西安交通大学学报,2004,25(3):244-249.
- [10] Ishii G, Sangai T, Ochiai A, et al. In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions[J]. Stem Cells, 2005, 23: 699-706.
- [11] 王莉,方妮,刘兵,等.骨实质来源间质干细胞对博来霉素诱导小鼠肺损伤的保护作用[J].解放军医学杂志,2008, 33(10): 1220-1224.
- [12] Macpherson H, Keir P, Dorin J, et al. Bone marrow-derived sp cells can contribute to the respiratory tract of mice in vivo[J]. J Cell Sci, 2005, 118: 2441-2450.
- [13] Abe S, Boyer C, Rennard SI, et al. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170: 1158-1163.
- [14] 汤勇,王帅,周训平.间充质干细胞免疫活性调节作用研究进展[J].重庆医学,2010,39(4):488-491.

(收稿日期:2010-10-13 修回日期:2011-01-19)