

## 论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.18.011

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200724.1057.008.html\(2020-07-24\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200724.1057.008.html(2020-07-24))

# 体外模拟动态力学刺激对 SD 幼鼠前脂肪细胞增殖及凋亡的影响研究\*

谢西梅<sup>1</sup>, 陈波<sup>2</sup>, 王明威<sup>3</sup>, 张旭龙<sup>3</sup>, 白秀<sup>3</sup>, 沈亚亭<sup>3</sup>

(1. 陕西省西安市中医医院针灸科 710021; 2. 贵阳中医学院 550002;

3. 陕西中医药大学针灸推拿学院, 陕西咸阳 712046)

**[摘要]** **目的** 探讨体外模拟动态力学刺激对 SD 幼鼠前脂肪细胞增殖及凋亡的影响, 为推拿按摩治疗青少年单纯性肥胖的现代医学细胞生物学机制提供理论与实验依据。**方法** 体外培养 SD 幼鼠前脂肪细胞, 从细胞生物力学角度模拟推拿治疗的按摩作用方式, 对前脂肪细胞实施不同程度动态力学刺激(0、1.5、3.0 Hz), 观察动态力学刺激对前脂肪细胞增殖及凋亡的影响。**结果** 1.5 Hz 组及 3.0 Hz 组前脂肪细胞的增殖活性较 0 Hz 组降低(1.5 Hz 组  $P=0.019$ ; 3.0 Hz 组  $P=0.006$ ), 而 1.5 Hz 组及 3.0 Hz 组细胞的凋亡与 0 Hz 组比较差异无统计学意义(1.5 Hz 组  $P=0.111$ ; 3.0 Hz 组  $P=0.091$ )。**结论** 推拿按摩可能通过抑制前脂肪细胞的增殖而达到减肥的效果。

**[关键词]** 推拿按摩; 动态力学刺激; 肥胖; 前脂肪细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡**[中图分类号]** R245.0**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)18-3026-03

## Effects study of simulated dynamic mechanical stimulation in vitro on proliferation and apoptosis of preadipocytes in SD rats\*

XIE Ximei<sup>1</sup>, CHEN Bo<sup>2</sup>, WANG Mingwei<sup>2</sup>, ZHANG Xulong<sup>3</sup>, BAI Xiu<sup>3</sup>, SHEN Yating<sup>3</sup>

(1. Department of Acupuncture and Moxibustion, Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi 710021, China; 2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550002, China; 3. College of Massage, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi 712046, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of simulated dynamic mechanical stimulation in vitro on the proliferation and apoptosis of preadipocytes in SD young rats, and to provide theoretical and experimental basis for the treatment of simple obesity in adolescents with massage. **Methods** The preadipocytes of SD young rats were cultured in vitro, and the action mode of massage therapy was simulated from the perspective of cell biomechanics. Different degrees of dynamic mechanical stimulation (0, 1.5, 3.0 Hz) were applied to the preadipocytes. The effects of dynamic mechanical stimulation on the proliferation and apoptosis of preadipocytes were observed. **Results** The proliferative activities of preadipocytes in the 1.5 Hz group and the 3.0 Hz group were higher than that in the 0 Hz group ( $P=0.019$  in the 1.5 Hz group;  $P=0.006$  in the 3.0 Hz group). There were no statistically significant differences in apoptosis rate of the 1.5 Hz group and the 3.0 Hz group when compared with the 0 Hz group ( $P=0.111$  in the 1.5 Hz group;  $P=0.091$  in the 3.0 Hz group). **Conclusion** Massage therapy may achieve weight loss by inhibiting the proliferation of pre adipocytes.

**[Key words]** massage; dynamic mechanical to stimulate; obesity; preadipocyte cell; cell proliferation; cell apoptosis

近年来,我国单纯性肥胖的发生率呈上升趋势。单纯性肥胖是由于体内多余脂肪堆积而影响机体健

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(30960486);陕西省中医药管理局中医重点专科项目(陕中医药发[2012]55号);西安市科技计划项目[SF1321(6)]。作者简介:谢西梅(1978—),副主任医师,博士,硕士生导师,主要从事生物医学工程在针灸推拿中的研究与应用研究。

康的一种常见疾病,它是导致糖尿病、高血脂、心脑血管病的危险因素<sup>[1-2]</sup>,所以防治肥胖症已成为医学领域研究的重要课题。本研究运用体外细胞培养的方法,从力学细胞生物学角度,对前脂肪细胞运用不同频率力学刺激,模拟推拿按摩,观察推拿按摩对前脂肪细胞增殖、凋亡的影响,为临床治疗单纯性肥胖提供理论依据。现将实验汇报如下。

## 1 材料与方法

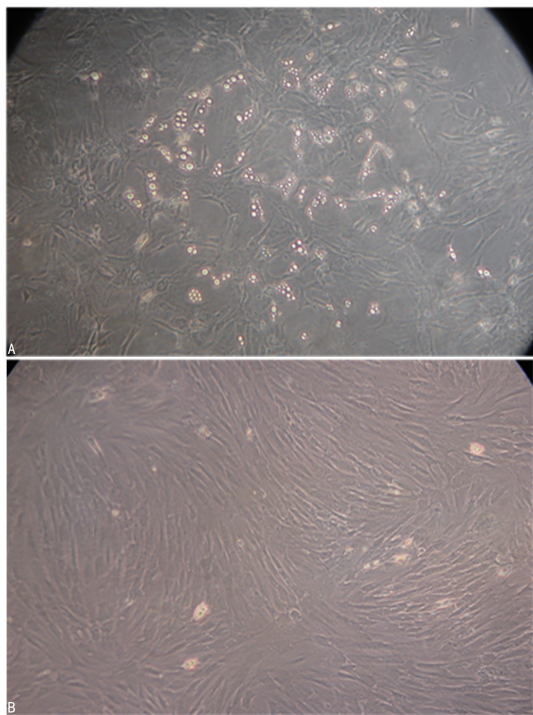
### 1.1 主要材料

本研究选取 SD 肥胖幼鼠 6 只,由华西医学院实验动物中心提供(实验动物号 0003014)。胰蛋白酶、四甲基偶氮唑蓝(MTT)、油红 O 染色试剂购自美国 Sigma 公司;DMEM/F12 培养基购自美国 Thermo Fisher 公司;倒置相差显微镜及组像系统购自日本 Olympus 公司;CO<sub>2</sub> 培养箱购自德国 Heraeus 公司,新生牛血清购自成都哈里生物制品有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 原代培养及传代培养前脂肪细胞

参照文献[3-4]的前脂肪细胞培养方法进行。在前脂肪细胞原代培养至 5~7 d 时观察并进行拍照(图 1A)。当传代的前脂肪细胞生长单层融合接近 70% 时,可按 1:2 的比例进行传代培养(图 1B)。



A:原代培养;B:传代培养。

图 1 前脂肪细胞形态学观察(×50)

#### 1.2.2 油红 O 染色法<sup>[5]</sup>鉴定前脂肪细胞

PBS 冲洗细胞,培养物用 10%甲醛固定 1 h 后,蒸馏水漂洗。吸取油红 O 工作液 10 mL,使培养面向下浸染,2 h 后倒掉瓶内的油红 O 工作液,蒸馏水漂洗

培养瓶数次,直至完全漂洗干净。再加入苏木素复染 10 min。染色后在倒置显微镜下观察并拍照。

#### 1.2.2 力学加载前脂肪细胞的实验方法

采用自制的力学加载装置,将培养的前脂肪细胞分为 0 Hz 组、1.5 Hz 组和 3.0 Hz 组,共 3 组。分别实施不同频率的动态力学刺激,2 次/天,每次间隔 12 h,共 3 d。

#### 1.2.3 前脂肪细胞增殖及凋亡检测

0.25%胰酶消化 2~3 min,含血清 DMEM/F12 培养液终止消化,收获细胞,PBS 反复洗涤、离心(1 000 r/min)3 次。弃尽 PBS,向细胞中加入 75%乙醇 1 mL,制成细胞悬液,4 °C 冰箱冷藏,待检。向标本中加入碘化丙啶(PI)染液 1 mL,作用 30 min 后上机检测。前脂肪细胞以 60~90 个/秒通过流式细胞仪的氩离子激光检测口,信号被计算机记录,得到单个细胞的细胞周期及 DNA 含量变化,计算得到细胞的增殖率和凋亡率。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 前脂肪细胞的鉴定

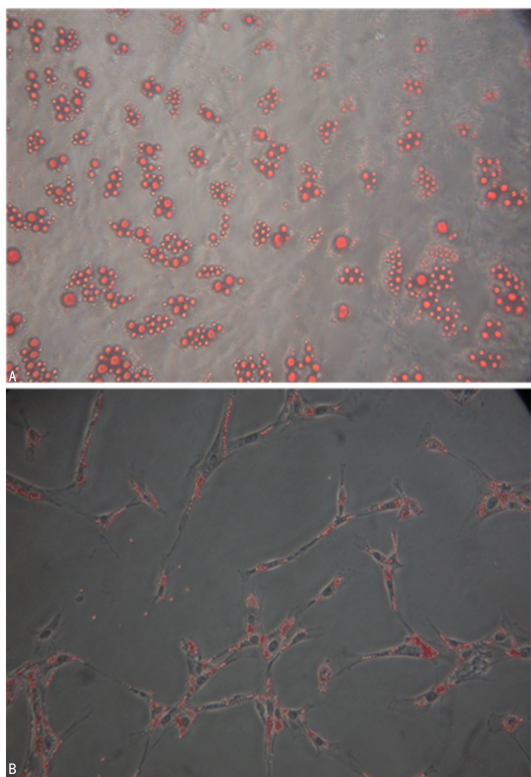
当前脂肪细胞经油红 O 染色后,细胞内出现红染的颗粒,证明显微镜下可见的细胞内颗粒为脂肪滴,见图 2。

### 2.2 不同频率力学刺激对前脂肪细胞增殖的影响

1.5 Hz 组前脂肪细胞的增殖活性[(28.00 ± 0.42)%]、3.0 Hz 组[(26.20 ± 1.20)%]与 0 Hz 组[(33.55 ± 3.80)%]比较,差异有统计学意义( $P = 0.019, P = 0.006$ )。

### 2.3 不同频率力学刺激对前脂肪细胞凋亡的影响

前脂肪细胞采用流式细胞仪测定的 DNA 含量数据,经细胞周期专用处理软件处理后得到前脂肪细胞的细胞周期分布图。图中左边的第一峰为二倍体前脂肪细胞峰,代表 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的前脂肪细胞,第二峰为四倍体前脂肪细胞峰,代表 G<sub>2</sub>/M 期前脂肪细胞,第一峰与第二峰之间为 S 期前脂肪细胞。1.5 Hz 组前脂肪细胞的凋亡率[(18.65 ± 3.15)%]、3.0 Hz 组[(5.800 ± 1.70)%]与 0 Hz 组[(5.20 ± 0.10)%]比较差异无统计学意义( $P = 0.111, P = 0.091$ )。



A: 染色前; B: 染色后。

图 2 油红 O 染色鉴定前脂肪细胞

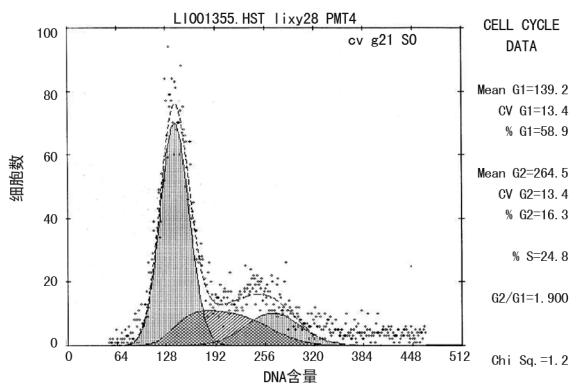


图 3 流式细胞仪测定前脂肪细胞 DNA 含量及细胞周期示意图

### 3 讨论

肥胖症属中医的肥满、肥人、胖人等范畴。现代研究表明<sup>[6-8]</sup>:单纯性肥胖是前脂肪细胞增殖分化失控导致的。其中脂肪代谢包括脂肪生成、分解、脂蛋白的合成、分泌等过程,能够受到相关脂肪代谢方面信号通路的调控<sup>[9-11]</sup>。有研究表明前脂肪细胞的过度分化与肥胖关系密切<sup>[12-13]</sup>。抑制细胞增殖分化或许成为治疗单纯性肥胖的有效手段。细胞增殖为细胞分裂、再生的整个过程<sup>[14]</sup>。而细胞凋亡可以清除不具有长久生理功能或衰老的细胞,细胞凋亡过程有利于保持脂肪细胞数量的稳定,避免脂肪细胞增多而产生肥胖<sup>[15]</sup>。

目前,推拿按摩减肥临床上认为是一种无副作用

且经济有效的临床治疗方法<sup>[16]</sup>。推拿按摩治疗单纯性肥胖实质上是动态力学的不同刺激作用。从力学角度对细胞实施不同频率动态力学刺激,动态力学刺激可以通过调节体外细胞培养的培养液液面高度,产生液体压力的方式进行,推拿按摩可以通过细胞培养液的流动性对贴在培养板壁的前脂肪细胞产生的内摩擦力形式进行模拟,前脂肪细胞主要受到外在压力和摩擦力的双重作用,动态转动前脂肪细胞的加力装置,使细胞培养液在细胞培养板内按照不同频率流动,使前脂肪细胞在液压的基础上,同时受到摩擦力的作用,即体外模拟不同频率推拿按摩的刺激。

本次实验初步研究了不同频率动态力学刺激前脂肪细胞的作用机制。运用流式细胞仪检测动态力学刺激对前脂肪细胞的增殖、凋亡的影响,结果表明,1.5 Hz 组、3.0 Hz 组前脂肪细胞的增殖低于 0 Hz 组,且差异有统计学意义( $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ ),表明实施不同频率的动态力学刺激,前脂肪细胞的增殖减少;1.5 Hz 组、3.0 Hz 组前脂肪细胞的凋亡与 0 Hz 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),表明不同频率的动态力学刺激对前脂肪细胞的凋亡无显著影响。

总之,本次实验研究结果证实了推拿按摩的动态力学刺激治疗单纯性肥胖或许是通过抑制人体的前脂肪细胞增殖而达到治疗肥胖的效果。

### 参考文献

- [1] OZSOY Z, DEMIR E. The Evolution of bariatric surgery publications and global productivity: a bibliometric analysis[J]. Obesity Surgery, 2017, 28(12): 1-13.
- [2] TOMIYAMA A J. Stress and obesity[J]. Annu Rev Psychol, 2018, 26(5): 1257-260.
- [3] 朱晓海, 何清濂, 林子豪. 人前脂肪细胞培养及增殖与分化模型的建立[J]. 中华整形烧伤外科杂志, 2009, 15(3): 200.
- [4] 罗盛康, 席菁乐. 成人前脂肪细胞的原代培养[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(3): 270-271.
- [5] RAMIREZ J L, CASTRO M F, KURI H W. Quantization of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O[J]. Histochemistry, 2012, 97(6): 493-512.
- [6] RONCARI D A K. Abnormalities of adipose cells in massive obesity [J]. Int J Obes, 2014, 14(S3): 187-192.

(下转第 3032 页)

- [5] 王建安. 中国心脏瓣膜病介入治疗的现状与展望[J]. 中华心血管病杂志, 2019, 47(9): 706-709.
- [6] 孟旭, 张海波. 对比解读 2017 欧美瓣膜性心脏病管理指南[J]. 中国循环杂志, 2017, 32(z2): 80-83.
- [7] 高润霖. 中国心瓣膜病现状[J]. 华西医学, 2018, 33(2): 127-131.
- [8] SINGH A D, MIAN A, DEVA SENAPATHY N, et al. Percutaneous mitral commissurotomy versus surgical commissurotomy for rheumatic mitral stenosis: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *Heart (British Cardiac Society)*, 2020, 106: 1094-1101.
- [9] PUTRA T M H, SUKMAWAN R, ELEN E, et al. Prognostic value of late gadolinium enhancement in postoperative morbidity following mitral valve surgery in rheumatic mitral stenosis [J]. *Int J Angiol*, 2019, 28(4): 237-244.
- [10] JIAO Y, LUO T, ZHANG H, et al. Repair versus replacement of mitral valves in cases of severe rheumatic mitral stenosis: mid-term clinical outcomes [J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(9): 3951-3961.
- [11] CAIMMI P P, SABBATINI M, FUSARO L, et al. Politetrafluorene suture used as artificial mitral chord: mechanical properties and surgical implications [J]. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2017, 58(6): 895-903.
- [12] 吴志勇, 卢海彬, 姬德宇. 重症风湿性心脏瓣膜病的外科治疗[J]. 中华全科医学, 2010, 8(8): 989-990.
- [13] 刘石健, 马东亮, 蔡国华, 等. 人工腱索植入术对二尖瓣置换术后患者左心功能的影响[J]. 心肺血管病杂志, 2014, 33(1): 13-16.
- [14] MADHURAPANTULA R S, KRELL G, MORFIN B, et al. Advanced methodology and preliminary measurements of molecular and mechanical properties of heart valves under dynamic strain [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 763.
- [15] GRINBERG D, ADAMO NOUHO K, POZZI M, et al. Artificial mitral chordae: when length matters [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 157(2): e23-25.
- [16] 严闹, 杨威, 方樵, 等. 人工腱索在老年二尖瓣置换术中的临床应用[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(2): 426-427.

(收稿日期: 2020-03-22 修回日期: 2020-05-02)

(上接第 3028 页)

- [7] BI LINGS E, MAY J W. Historical review and present status of free fat graft auto transplantation in plastic and reconstructive surgery [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2015, 83(2): 368-381.
- [8] FAUST I M, JOHNSON P R, STEM J S. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity [J]. *Am Physiol*, 2015, 235: F279-286.
- [9] SAVAGE D B, PETERSEN K F, SHULMAN G I. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance [J]. *Physiol Rev*, 2018, 87(2): 507-520.
- [10] SALTIEL A R, KAHN C R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism [J]. *Nature*, 2019, 414(6865): 799-806.
- [11] BERG A H, COMBS T P, SCHERER P E. AC-RP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 13(2): 84-89.
- [12] FUIWAR A K, HASEGAW A K, OHKUM O T, et al. Necdin controls proliferation of white adipocyte progenitor cells [J]. *PLoS One*, 2019, 7(1): 309-318.
- [13] HAUSMAN D B, DIGIROLAM O M, BARTNESS T J, et al. The biology of white adipocyte proliferation [J]. *Obesrev*, 2017, 2(4): 239-246.
- [14] KOPELMAN P G. Obesity as a medical problem [J]. *Nature*, 2017, 404: 635-643.
- [15] 白延斌, 李伟. 脂肪细胞凋亡及调控因素的研究进展 [J]. 兰州大学学报, 2016, 32(4): 73-74.
- [16] 宋敏, 宋贵杰. 推拿疗法的作用机理及实验研究 [J]. 按摩推拿, 2014, 7(24): 43.

(收稿日期: 2020-03-01 修回日期: 2020-05-15)