

应用原子力显微镜分析猪脂肪前体细胞的分化

李盛璞¹, 师如意², 王秋兰¹, 王牡¹, 甘睿³, 潘洁¹, 蔡继业¹, 张守全²

1 暨南大学化学系, 广州 510632

2 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642

3 暨南大学药学院, 广州 510632

摘要: 脂肪形成过程中发生的异常变化与许多疾病的产生有着密切的关系。为深入了解脂肪形成的机制, 利用原子力显微镜研究脂肪前体细胞向成熟脂肪细胞分化前后细胞形貌、超微结构和机械性能的变化。结果表明, 脂肪前体细胞与成熟脂肪细胞在形貌上存在明显的差异。在超微结构的探测中成熟脂肪细胞表面粗糙度低于脂肪前体细胞。通过力曲线的分析得出, 分化前后两种细胞的机械性质均发生改变。脂肪前体细胞在粘弹力、硬度和杨氏模量的研究中比成熟脂肪细胞都高出约 20%。原子力显微镜在纳米尺度上分析脂肪前体细胞向成熟脂肪细胞分化过程中细胞膜的改变, 其研究结果为进一步探讨脂肪形成机制提供可视化定量数据。

关键词: 原子力显微镜, 脂肪前体细胞, 成熟脂肪细胞, 超微结构, 机械性能

Analysis of porcine preadipocytes differentiation by atomic force microscope

Shengpu Li¹, Ruyi Shi², Qiulan Wang¹, Mu Wang¹, Rui Gan³, Jie Pan¹, Jiye Cai¹,
and Shouquan Zhang²

1 Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China

2 College of Animal Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

3 College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Abnormal changes during fat formation are closely related to the prevalence of many diseases. In order to understand the formation mechanism of fat, we used atomic force microscopy (AFM) to characterize the morphology and mechanical properties of porcine preadipocytes during the differentiation. Preadipocytes and adipocytes were different morphologically. The surface roughness of adipocytes was less than preadipocytes by detection of the ultrastructure. The mechanical properties of preadipocytes were changed during differentiation with AFM-based force spectroscopy. Preadipocytes were 20% higher than adipocytes in the adhesion force, stiffness and Young's modulus. Therefore, AFM analysis of membrane changes related to adipocytes formation

Received: April 19, 2010; **Accepted:** July 27, 2010

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB833603), National Natural Science Foundation of China (No. 30872404).

Corresponding author: Jiye Cai. Tel/Fax: +86-20-85223569; E-mail: tjycail@jnu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2010CB833603), 国家自然科学基金 (No. 30872404) 资助。

provided quantitative data in the nanometer level for further studying the formation mechanism of the adipocytes.

Keywords: atomic force microscopy, preadipocytes, adipocytes, ultrastructure, mechanical properties

脂肪细胞不仅在生物体内的能量平衡方面起着重要的作用,并且在荷尔蒙分泌和一些相关的脂肪因子,如:免疫应答、食欲调节、胰岛敏感性、血管和骨架生长等方面也起着不可替代的作用^[1]。脂肪的过度沉积会导致肥胖,不仅增加中老年人患高血压、高血脂、II型糖尿病、心血管等疾病的风险,并且还与许多癌症发生的分子机制有关^[2-3]。脂肪前体细胞是白脂肪组织的前体细胞,其分化为成熟的脂肪细胞又称为脂肪形成,是伴随细胞形态学、激素水平和基因表达协调变化的一个复杂的生物进程^[4-5]。调节脂肪前体细胞的分化,进而使脂肪细胞脂肪含量的减少和脂肪细胞数目的减小,对肥胖病的治疗有重要意义^[6-7]。

细胞的形态、表面粗糙度和力学性质改变会影响细胞的性质、功能进一步引起疾病^[8-9]。另一方面,疾病也能引起细胞结构和力学性质的变化^[10]。因此细胞的形貌和力学性质的分析在更深层次研究生命活动、治疗疾病方面发挥着重要的作用。原子力显微镜 (Atomic force microscope, AFM) 能够在单细胞水平上对细胞的结构进行三维化和定量,获得细胞表面结构和力学性质的定量数据,使得分析更全面^[11-15]。文献报道脂肪前体细胞分化为成熟脂肪细胞是一个复杂的过程,不是单纯的脂滴形成。其分化过程中会产生不同的转录因子和蛋白等生物大分子,从而引起细胞膜的一系列变化^[16]。故本实验主要利用 AFM 研究猪脂肪前体细胞分化前后膜结构及其力学性质的改变,为更深入探讨分化的调控机制和疾病产生提供定量的数据。研究结果也揭示了 AFM 是在微观领域研究脂肪形成的一种有效工具。

1 材料与方法

1.1 材料

0.25%胰蛋白酶、1 mg/mL 胶原蛋白酶 I、1%

的青霉素、链霉素 (Sigma 公司), 10% (V/V) 胎牛血清 FCS(Hyclone 公司), DMEM (Gibco BRL 公司), 50 nmol/L 胰岛素、50 nmol/L 地塞米松、0.25 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、50 μ mol/L 油酸 (Sigma 公司)。

1.2 脂肪前体细胞的分离培养

用 75% 酒精进行仔猪全身消毒,之后用高压灭菌的手术器械取 2 日龄仔猪皮下脂肪组织,剪碎后采用胶原酶消化法:将胶原酶 I 用无菌 PBS 溶解,调整浓度为 1 mg/mL,在 37 $^{\circ}$ C 水浴摇床中消化 1.5 h,摇床速率为 100 r/min。之后用 PBS 清洗 2 次,1 000 r/min 转速下离心 5 min。

将消化好的细胞接种于 25 cm² 的培养瓶中,接种 1~1.5 h 后,将上清去掉,因为脂肪前体细胞的贴壁速度高于其他细胞,所以可以快速贴壁,用差速贴壁进行纯化。之后用完全培养基 10% FCS+DMEM (含 1% 的双抗) 进行培养,37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱,隔日换液,观察细胞贴壁以及生长情况。2~3 d 后细胞会长到 80% 左右,再进行消化传代,消化时用 0.25% 的胰酶进行消化,之后用等体积的含 10% FCS 完全培养基进行终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,之后去掉上清,用不完全培养基 DMEM 进行清洗 2 次,此时继续进行差速贴壁用以纯化所得细胞。传代 2~3 次后,就可以分离培养出细胞成分均一、增殖旺盛的脂肪前体细胞,经 2% 台盼蓝检查,细胞活性达到 98%。

1.3 脂肪前体细胞的诱导分化

对所获脂肪前体细胞采用含 50 nmol/L 胰岛素、50 nmol/L 地塞米松、0.25 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、50 μ mol/L 油酸混合液的鸡尾酒方法进行诱导,第 2 天时出现小脂滴,并开始融合成大脂滴。第 4 天之后完全形成成熟的脂肪细胞。

1.4 样品制备

取脂肪前体细胞和诱导分化后的成熟脂肪细胞分别滴在玻片上,自然铺展后吸附 10 min,先用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液冲洗 1 次,然后用 4% (质量分数) 的多聚甲醛固定 15 min,再用蒸馏水冲洗 3 次,室温自然干燥。

1.5 AFM 成像

将制备好的样品固定在 AFM (Autoprobe CP Research, veeco 公司, USA) 的 XY 扫描台上,用监视器定位所要扫描的样品区域,在空气中室温下利用接触模式成像。试验中采用 100 μm 扫描器,UL20B 硅探针,力常数为 2.8 N/m,AFM 图像仅经自带软件 IP2.1 (Thermomicroscopes proscan image processing software version 2.1) 平滑处理,以消除扫描方向上的低频背景噪音。利用 AFM 力位移曲线测量系统在同一加载速率下测量得到力的曲线进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 倒置显微镜观察脂肪前体细胞的分化

采用倒置显微镜对分离培养的猪皮下脂肪前体细胞及诱导分化后的成熟脂肪细胞分布进行观察,发现分化前后细胞形貌无太大变化,均成不规则的长梭形或三角形 (图 1A 和 1B),在诱导分化培养的第 2 天,用油红 O 染色进行观察,可以看见大量细胞有小的脂滴出现,分化率达 95% 以上。最初脂滴出现在核周,形似指环。随着培养时间的延长,小脂滴逐渐聚集成葡萄串状。第 3 天开始细胞内的脂滴逐渐汇合形成大的脂滴。诱导 4 d 之后,细胞分化为成熟脂肪细胞。从倒置显微镜等仪器能宏观了解分化前后细胞一些大的变化,而在分化的不同阶段,细胞内部表达出不同的转录因子和蛋白等生物大分子却用肉眼观察不到。这些微观的变化和细胞膜的结构和机械性能有着密切的关系,用 AFM 分析分化前后细胞结构和力学性质,用微观辅助宏观,进一步探测脂肪前体细胞向脂肪细胞分化的诸多变化。

2.2 AFM 对脂肪前体细胞分化前后的形貌分析

AFM 是样品表面信息的收集工具,较易获得细胞的形态、超微结构及其他一些表面信息。脂肪前体细胞向脂肪细胞分化的过程中,伴随着形态、生物化学性质和分子层面上的变化,这些都将导致细胞膜的变化。因此,有必要探测细胞膜表面的信息。

用原子力显微镜对多个单独细胞进行分析,拓扑图显示,脂肪前体细胞和成熟脂肪细胞均呈现不规则的长梭形或小三角形 (图 2A 和 2F),大小在 40~70 μm 之间,高度在 350~650 nm 之间。对局部小范围扫描,局部拓扑图 2B 和三维图 2D 发现脂肪前体细胞上存在直径约为 1 μm 大小的球状结构,在成熟脂肪上并没有观察到。在分化后的成熟脂肪细胞上,发现大多数细胞核周围出现大小不一的孔洞 (图 2G 和 2I),为脂肪形成过程中出现的空泡。图 2C 和 2H 为两种细胞膜上的超微结构,在 2 μm ×2 μm 区域里,可以看出脂肪前体细胞膜表面颗粒分布比较突出和明显,粒度分布图 2E 显示粒子大小主要分布在 60 nm 附近,分布均匀。而成熟脂肪细胞膜表面变得光滑,颗粒主要分布减小为 18 nm 左右 (图 2J)。选取多个不同的膜表面超微结构,利用 IP2.1 分析软件对其进行测量,得到几何参数值 (表 1): 分化前均方根粗糙度 (Rq) 为 (30.82±9.69) nm、分化后为 (15.02±7.96) nm; 平均粗糙度 (Ra) 在未分化时为 (24.97±8.23) nm、分化后减小到 (12.09±6.14) nm。从总体的形态上看,脂肪前体细胞和成熟脂肪细胞的形貌没有明显的区别。但从超微结构中可以看出两者有着明显区别。利用原子力显微镜在纳米级别上高分辨率的优势,分析得知分化之后膜表面变得光滑。

表 1 脂肪前体细胞分化前后的超微结构参数

Table 1 Comparison of ultrastructure parameter of preadipocytes and adipocytes

Ample	Rq (Rms rough) (nm)	Ra (Ave rough) (nm)
Preadipocytes	30.82±9.69	24.97±8.23
Adipocytes	15.02±7.96	12.09±6.14

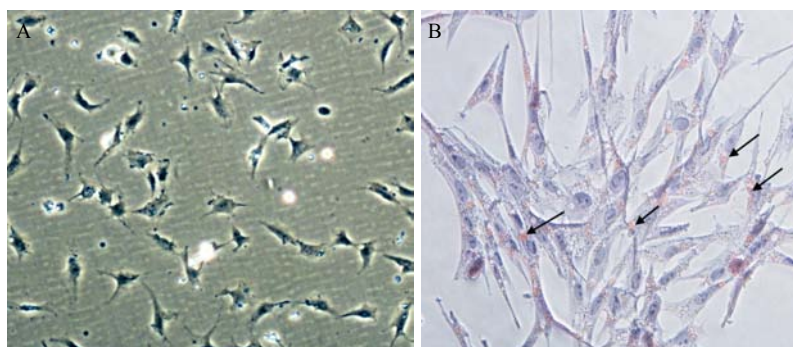


图 1 脂肪前体细胞分化前后的倒置显微镜图

Fig. 1 Inverted microscopy images of preadipocytes before and after differentiation. (A) Freshly plated preadipocytes (size: 400×). (B) preadipocytes after differentiation, black arrows shows the lipid droplet by oil red O staining (size: 400×).

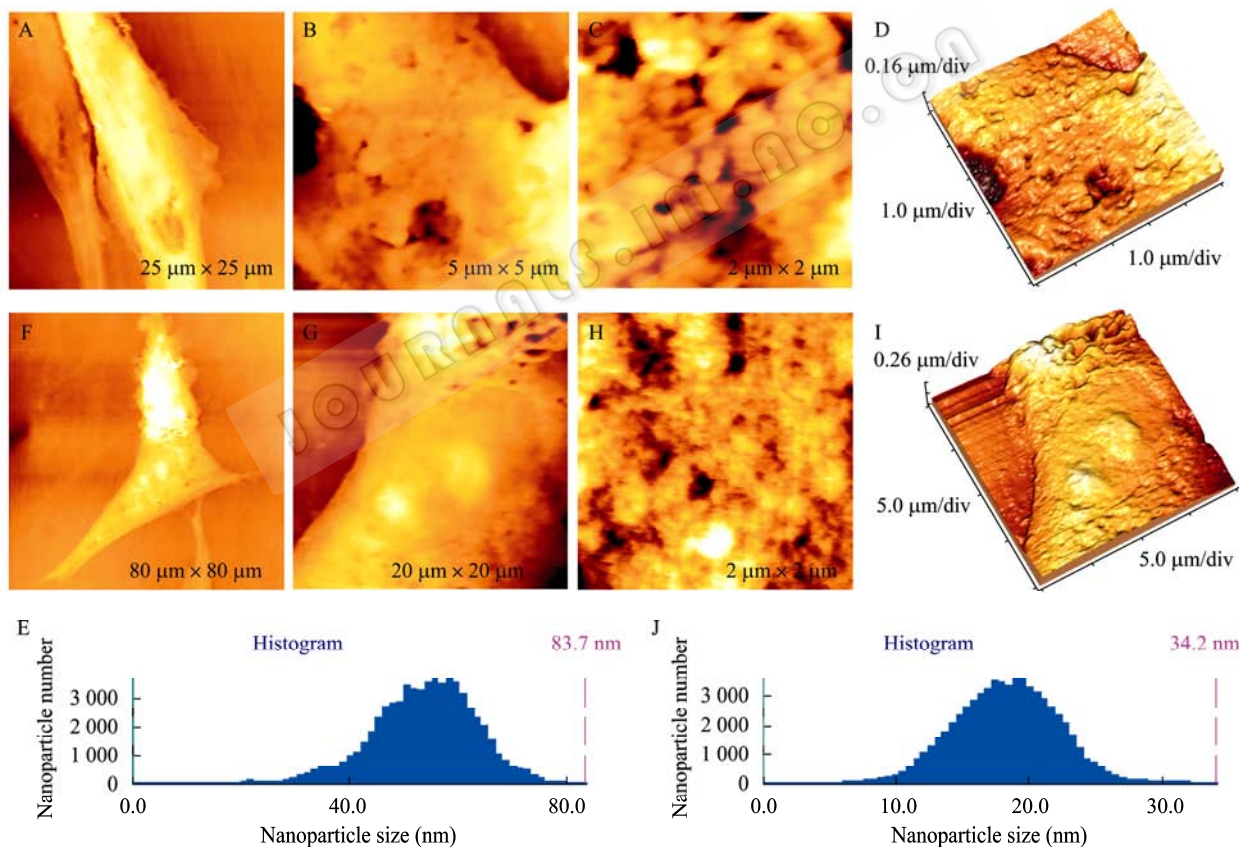


图 2 脂肪前体细胞分化前后的 AFM 图

Fig. 2 AFM images of preadipocytes and adipocytes. (A–E) First group: AFM images of preadipocytes. (A) Topological morphology (size: 25 $\mu\text{m}\times 25\ \mu\text{m}$). (B) Local membrane surface zoomed from (A) (size: 5 $\mu\text{m}\times 5\ \mu\text{m}$). (C) Ultrastructure of the cell membrane surface zoomed from (A) (size: 2 $\mu\text{m}\times 2\ \mu\text{m}$). (D) Three-dimensional morphology of (C). (E) Particles histogram of (C). (F–J) Second group: AFM images of adipocytes. (F) Topological morphology (size: 80 $\mu\text{m}\times 80\ \mu\text{m}$). (G) Nuclei of adipocytes. (H) Ultrastructure of the cell membrane surface zoomed from (F) (size: 2 $\mu\text{m}\times 2\ \mu\text{m}$). (I) Three-dimensional morphology of (H). (J) The particles histogram of (H). div: division.

2.3 AFM 对脂肪前体细胞分化前后的机械性能的分析

细胞各方面性质和能力的改变会导致机械性能的变化，而膜表面机械性质无法用肉眼看见。本实验通过原子力显微镜测量得到的力-距离曲线来分析脂肪前体细胞和成熟脂肪细胞膜上的机械性质。由力曲线图可得到细胞膜表面的粘附力、相对硬度和杨氏模量。图 3A 和图 3B 分别是脂肪前体细胞和成熟脂肪细胞的力曲线示意图。

通过力曲线得出粘附力的分布范围，脂肪前体细胞粘附力较大，分布在 (146.33 ± 11.23) PN，而成熟脂肪细胞粘附力较低，分布在 (119.95 ± 8.67) PN (图 4A 和 4B)。硬度是表征细胞膜表面力学性质的一个重

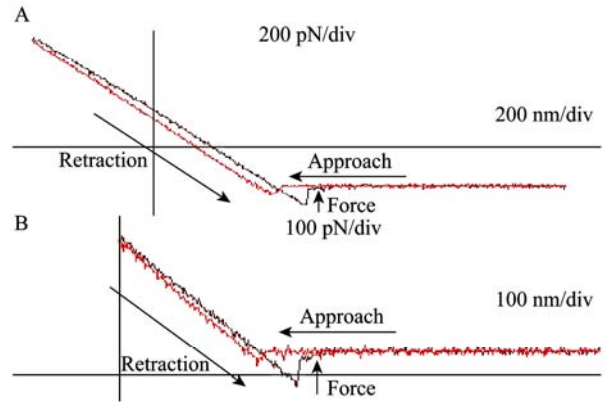


图 3 脂肪前体细胞分化前后的力曲线示意图

Fig. 3 Representative examples of force-distance curve acquired from preadipocytes and adipocytes, respectively. (A) Representative force curves of preadipocytes. (B) Representative force curve of adipocytes.

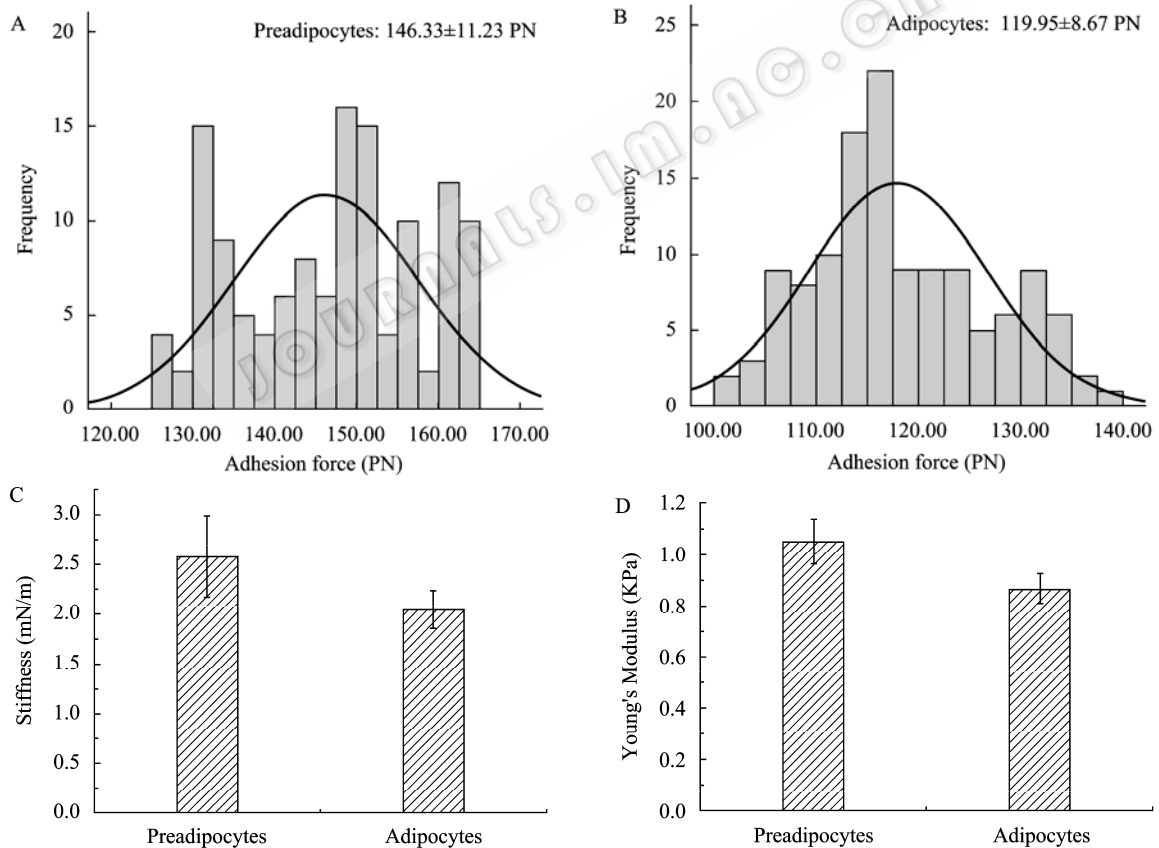


图 4 脂肪前体细胞分化前后机械性质的比较

Fig. 4 The mechanical properties of preadipocytes and adipocytes. (A) Frequency-adhesion force histogram of preadipocytes, the adhesion force distributed in (146.33 ± 11.23) PN. (B) Frequency-adhesion force histogram of adipocytes, the adhesion force distributed in (119.95 ± 8.67) PN. (C) Histograms for stiffness of preadipocytes and adipocytes group (scanning size: $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$). The cell stiffness is the slope of the retraction curve. $\text{Stiffness} = Y(\text{PN})/X(\text{nm})$. (D) Histograms for Young's modulus of preadipocytes and adipocytes group (scanning size: $2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$). Young's modulus $E = 3F(1 - \nu^2) / 4(R\delta^{3/2})^{1/2[17-18]}$. F is the adhesion force, ν is the Poisson's ratio, R is the radius of the probe, and δ is indentation depth.

要参数,它反映的是刚性随形变的变化,诸多文献报道其与细胞骨架有很大关系。图 4C 是分化前后细胞硬度的对比。脂肪前体细胞的硬度 (2.58 ± 0.41) mN/m 比成熟脂肪细胞 (2.05 ± 0.19) mN/m 高出约 20%。图 4D 是脂肪前体细胞组和成熟脂肪细胞组的杨氏模量对比,杨氏模量反映了细胞膜表面的刚性。脂肪前体细胞组的杨氏模量 (1.05 ± 0.09) kPa 也高于成熟脂肪细胞组 (0.87 ± 0.06) kPa 约 20%。

细胞膜上有很多膜蛋白和脂多糖等生物大分子颗粒。从 AFM 对成脂分化前后细胞膜表面超微结构的分析可得,脂肪前体细胞向成熟脂肪细胞分化后,膜逐渐变得光滑,粗糙度降低,表面颗粒减小,成熟脂肪细胞膜上与原子力显微镜的针尖相互作用的生物大分子颗粒减少,所以粘附力低于脂肪前体细胞。细胞骨架由微丝、微管和肌动蛋白等构成,其变化影响细胞膜的硬度,从而影响膜的流动性。脂肪前体细胞向脂肪细胞分化后,细胞骨架发生变化,硬度降低,膜流动性增加,说明成熟脂肪细胞比起脂肪前体细胞,膜流动性有所增强。刚性也是细胞形变的一个参数,杨氏模量越大,细胞越不易变形。成熟脂肪细胞比脂肪前体细胞杨氏模量小,说明成脂分化后的细胞更易变形。

3 结论

原子力显微镜是分析成脂分化前后细胞膜表面超微结构和力学性质的一种有效工具。脂肪细胞在体外经过分化而形成的过程与体内脂肪组织分化产生的基因表达、蛋白变化过程具有非常类似之处。通过 AFM 在体外研究鸡尾酒法诱导脂肪前体细胞向成熟脂肪细胞的分化,清楚地观察到分化前后细胞形貌和膜表面超微结构的改变,同时对力曲线进行分析,发现膜表面粘附力、硬度、杨氏模量的变化。脂肪前体细胞在分化后,膜表面变得光滑,粗糙度减小,颗粒大小降低,膜表面粘附力由 (146.33 ± 11.23) PN 降低到 (119.95 ± 8.67) PN。而硬度与杨氏模量方面,脂肪前体细胞也比成熟脂肪细

胞高约 20%。对脂肪细胞过程中细胞膜的研究结果说明,成熟脂肪细胞比脂肪前体细胞更易变形,膜的流动性更强。AFM 以其在纳米级别的高分辨优势,获得的可视化图像和定量数据有助于全面了解脂肪前体细胞向脂肪细胞的分化过程和分化机制。

REFERENCES

- [1] Hu R, He ML, Hu H, et al. Characterization of calcium signaling pathways in human preadipocytes. *J Cell Physiol*, 2009, 220(3): 765–770.
- [2] Moller DE, Flier JS. Insulin resistance—mechanisms, syndromes and implication. *N Engl J Med*, 1991, 325(13): 938–948.
- [3] Spiegelman BM, Choy L, Hotamisligil GS, et al. Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes. *J Biol Chem*, 1993, 268(10): 6823–6826.
- [4] Li CH. The regulation of adipose tissue growth. *Foreign Med*, 1998, 18(3): 123–126.
李长红. 脂肪组织生长的调节. *国外医学*, 1998, 18(3): 123–126.
- [5] Nobusue H, Kano K. Establishment and characteristics of porcine preadipocyte cell lines derived from mature adipocytes. *J Cell Biochem*, 2010, 109(3): 542–552.
- [6] Zhang HX, Zhu XT, Shu G, et al. Differential mRNA expression profiles of porcine intramuscular preadipocytes compared with subcutaneous preadipocytes during differentiation. *Sci Agri Sin*, 2008, 41(11): 3760–3768.
张罕星, 朱晓彤, 束刚, 等. 猪肌肉脂肪前体细胞与皮下脂肪前体细胞分化过程中基因差异表达分析. *中国农业科学*, 2008, 41(11): 3760–3768.
- [7] Liu HF, Wang X, Li XW, et al. Primary culture and induced differentiation of porcine preadipocytes. *J Sichuan Agri Univ*, 2009, 27(2): 214–217.
刘海峰, 王翔, 李学伟, 等. 猪脂肪前体细胞的原代培养及诱导分化. *四川农业大学学报*, 2009, 27(2): 214–217.
- [8] Lee GYH, Lim CT. Biomechanics approaches to studying human diseases. *Trends Biotechnol*, 2007, 25(3): 111–118.
- [9] Lim CT, Zhou EH, Li A, et al. Experimental techniques for single cell and single molecule biomechanics. *Mater Sci Eng C. Biom Supramol Systems*, 2006, 26(8): 1278–1288.

- [10] Crick SL, Yin FCP. Assessing micromechanical properties of cells with atomic force microscopy: importance of the contact point. *Biomech Model Mechanobiol*, 2007, 6(3): 199–210.
- [11] Hu MQ, Wang JK, Cai JY, et al. Analysis of sodium benzoate biotoxicity using atomic force microscope. *Chin J Biotech*, 2008, 24(8): 1428–1432.
胡明铅, 王炯坤, 蔡继业, 等. 应用原子力显微镜分析苯甲酸钠生物毒性. *生物工程学报*, 2008, 24(8): 1428–1432.
- [12] Cai XF, Cai JY, Dong SS, et al. Morphology and mechanical properties of normal lymphocyte and Jurkat revealed by atomic force microscopy. *Chin J Biotech*, 2009, 25(7): 1107–1112.
蔡小芳, 蔡继业, 董世松, 等. 应用原子力显微镜分析正常淋巴细胞和 Jurkat 细胞的形态和机械性质. *生物工程学报*, 2009, 25(7): 1107–1112.
- [13] Hinterdorfer P, Dufrêne YF. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2006, 3(5): 347–355.
- [14] Hsieh CH, Lin YH, Lin S, et al. Surface ultrastructure and mechanical property of human chondrocyte revealed by atomic force microscopy. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(4): 480–488.
- [15] Pelling AE, Sehati S, Gralla EB, et al. Local nanomechanical motion of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 2004, 305(5687): 1147–1150.
- [16] Pandey V, Vijayakumar MV, Kaul-Ghanekar R, et al. Atomic force microscopy, biochemical analysis of 3T3-L1 cells differentiated in the absence and presence of insulin. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790(1): 57–64.
- [17] Dimitriadis EK, Horkay F, Maresca J, et al. Determination of elastic moduli of thin layers of soft material using the atomic force microscope. *Biophys J*, 2002, 82(5): 2798–2810.
- [18] Brochu H, Vermette P. Young's moduli of surface-bound liposomes by atomic force microscopy force measurements. *Langmuir*, 2008, 24(5): 2009–2014.