

# 甲状腺相关眼病患者眼眶前脂肪细胞的培养及分化

王莉菲, 吴中耀, 杨华胜, 颜建华, 毛羽翔, 陈智聪

(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】研究甲状腺相关眼病患者(TAO)眼眶组织中是否存在前脂肪细胞,在一定条件下能否分化为成熟脂肪细胞,探讨脂肪细胞在TAO发病中的作用。【方法】选用TAO患者眼眶中的脂肪颗粒,共8例(8只眼),采用组织块培养法培养细胞,观察细胞形态;细胞免疫组织化学方法检测前脂肪细胞因子-1的表达,初步验证前脂肪细胞的存在;诱导细胞向成熟脂肪细胞分化,油红O染色观察细胞形态及细胞内脂滴形成情况;RT-PCR检测分化过程中转录因子过氧化物酶体增殖体激活受体 $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )表达的改变。【结果】原代培养细胞为梭形,增殖旺盛;免疫组化显示前脂肪细胞因子-1表达阳性;细胞可分化为成熟脂肪细胞,并伴有PPAR $\gamma$ 基因表达的增强。【结论】TAO患者眼眶组织中存在着功能活跃的前脂肪细胞;进一步验证了脂肪细胞数量的增加在TAO发病中的重要作用。

**关键词:**前脂肪细胞;脂肪分化;甲状腺相关眼病;细胞培养;基因表达

中图分类号:R77

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2005)03-0351-03

## Culture and Differentiation of Human Orbital Preadipocytes in Thyroid-associated Ophthalmopathy

WANG Li-fei, WU Zhong-yao, YANG Hua-sheng, YAN Jian-hua, MAO Yu-xiang, CHEN Zhi-cong  
(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】 To identify whether there are preadipocytes in the orbit of thyroid-associated ophthalmopathy (TAO) patients and whether they possess the capacity to undergo adipocytic differentiation. To discuss the effect of adipogenesis in TAO development. 【Methods】 Orbital fat tissue from TAO patients ( $n=8$ ) was placed in primary culture and proliferating cells were sub-passaged. The preadipocytes were identified primarily with immunohistochemical stain of pref-1 (preadipocyte factor-1). Confluent preadipocytes were subjected to a differentiation protocol. Oil Red O staining was performed to identify adipocyte cells. And peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) transcript levels were determined before and after differentiation. 【Result】 In primary culture, the cells were spindly and showed positive immunostaining for pref-1 protein. During the process of differentiation, cultured cells showed evidence of adipogenesis and relatively greater PPAR $\gamma$  gene expression with differentiation. 【Conclusion】 There are active preadipocytes in the orbital tissue of TAO patients which might be able to undergo adipocyte differentiation. These observations may represent that the preadipocytes differentiation contributes to excess orbital adipose tissue volume in TAO.

**Key words:** preadipocyte; adipocytic differentiation; thyroid-associated ophthalmopathy; cell culture; gene expression

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(3):351-353]

目前认为眼眶内肌肉增粗及眶脂肪容积增加是引起甲状腺相关眼病(thyroid-associated ophthalmopathy, TAO)患者眼球突出的主要原因,其中眶脂肪受累者占TAO患者一半以上<sup>[1]</sup>。研究表明,人体腹部脂肪组织中存在着前脂肪细胞,在机体内环境发生某种变化时可定向分化为成熟脂肪细胞<sup>[2]</sup>。有报道眼眶组织中同样存在着前脂肪细胞,可向

成熟脂肪细胞分化<sup>[3]</sup>,但未作深入研究,对分化过程中基因的调控目前还不十分明了。为了进一步验证前脂肪细胞在眶脂肪组织中的存在及在TAO发生、发展中的作用,我们进行了TAO患者眼眶前脂肪细胞的体外培养及初步鉴定并将其诱导分化为成熟脂肪细胞,对分化过程中转录调控因子过氧化物酶增殖体激活受体 $\gamma$  (peroxisome proliferator

收稿日期:2004-11-25

基金项目:“211工程”重点学科建设基金资助项目(中山医科大学98005)

作者简介:王莉菲(1976-),女,河北邢台人,博士生;吴中耀,教授,导师。E-mail:wlfhb@126.com

activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )的表达进行了分析。

CCG ACG CCT GCT TCA CCA C- 3', 扩增片段长度 788 bp,退火温度 55 °C。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

DMEM/F-12 培养液购自 Gibco 公司;前脂肪细胞因子 (preadipocyte factor-1, pref-1) 抗体购自 ADI 公司;即用型第二代免疫组化 Elivision plus 广谱试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司;RT-PCR 用试剂购自 Fermentas 公司;引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.2 眼眶前脂肪细胞的体外培养

眶脂肪组织取自严重的 TAO 患者行眼眶减压手术中,共 8 例(8 只眼),年龄 27~64 岁(平均 52 岁)。分离去除脂肪组织中肉眼可见的纤维成分及血管,剪成 1 mm×1 mm 小组织块,移入塑料培养瓶中,待组织块近干时(静置约 0.5 h)后加入少量含 200 mL/L 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液原代培养,第 4 天追加培养液约 2 mL。以后每 2 天换液 1 次。观察前脂肪细胞形态,待细胞生长至接近融合时,用 2.5 g/L 胰蛋白酶+0.2 g/L EDTA 溶液进行消化传代。用 2~5 代细胞进行下面实验。

### 1.3 前脂肪细胞的初步鉴定

应用细胞免疫组化对 pref-1 进行免疫组织化学鉴定。

### 1.4 前脂肪细胞向成熟脂肪细胞的分化

待细胞长至 80%融合时,将原培养液换为不含血清的 DMEM/F-12(1:1)培养液,再向其加入生物素 33  $\mu\text{mol/L}$ 、泛酸 17  $\mu\text{mol/L}$ 、转铁蛋白 10  $\mu\text{g/mL}$ 、三碘甲状腺原氨酸(T3) 0.2 nmol/L、胰岛素 1  $\mu\text{mol/L}$ 。另外在分化前 4 d 还需加入地塞米松 1  $\mu\text{mol/L}$  及异丁基甲基黄嘌呤 (IBMX) 0.1 mmol/L。诱导分化期间密切观察细胞形态学变化,16 d 结束分化。进行油红 O 染色。

### 1.5 细胞内脂肪含量的测定

将培养的前脂肪细胞按  $6 \times 10^3$  接种于 3.5 cm×3.5 cm 培养皿中,待细胞生长接近 80%融合时,进行诱导分化,采用油红 O 染色提取法测量每天脂肪含量,具体方法为将培养的细胞用 100 mL/L 甲醛固定 1 h 后蒸馏水漂洗,油红 O 浸泡 2 h,三蒸水漂洗数次后 32 °C 蒸发掉多余的水分,加入 1 mL 异丙醇萃取,510 nm 波长分光光度计测量吸光度(A),画出时间-吸光度曲线。

### 1.6 脂肪转录因子 PPAR $\gamma$ 基因的表达

收集分化前后培养细胞各  $1 \times 10^6$  个,提取总 RNA,以 Oligo (dT)<sub>18</sub> 为非特异性引物进行逆转录,获取 cDNA,进行 PCR 反应。其中 PPAR $\gamma$  扩增引物为:上游引物 5'-AGA CAA CAG ACA AAT CAC CAT -3';下游引物 5'-CTT CAC AGC AAA CTC AAA CTT- 3',扩增片段长度 400 bp,退火温度 55°C。内参照 GAPDH 扩增引物为:上游引物 5'-GGT CCG AGT CAA CGG ATT TGG TCG -3';下游引物 5'-CCT

## 2 结果

### 2.1 眼眶前脂肪细胞形态学观察

培养第 4 天所有样本均可见有细胞从组织块边缘爬出,呈梭形,类似于纤维细胞形态,后细胞增殖迅速,大约 20 d 即可传代(图 1)。以后每隔 3~4 d 传代 1 次。

### 2.2 前脂肪细胞的初步鉴定

免疫组化显示细胞 pref-1 胞浆内阳性表达,初步表明了培养细胞为前脂肪细胞(图 2)。

### 2.3 前脂肪细胞诱导分化过程中的细胞形态

诱导分化过程中,细胞停止增殖,细胞胞体逐渐变大,形态由梭形变为椭圆形,于第 6 天细胞浆内开始出现脂滴,后脂滴逐渐增多融合,至分化结束时胞浆内充满脂滴,油红 O 染色见胞浆内脂滴呈橘红色(图 3)。

### 2.4 前脂肪细胞分化过程中细胞内脂肪含量

经油红 O 染色提取法测定前脂肪细胞生长过程中细胞内的脂肪含量显示,前脂肪细胞诱导分化为脂肪细胞的过程中,细胞内的脂肪含量于第 6 天后迅速增加,约 12 d 达高峰,与形态学上第 6 天细胞内出现脂肪颗粒相吻合(图 4)。

### 2.5 脂肪转录调控基因 PPAR $\gamma$ 表达的改变

RT-PCR 显示在前脂肪细胞分化前后细胞内均有 PPAR $\gamma$  基因的表达,分化前仅有微弱表达,分化后表达明显增强(图 5)。

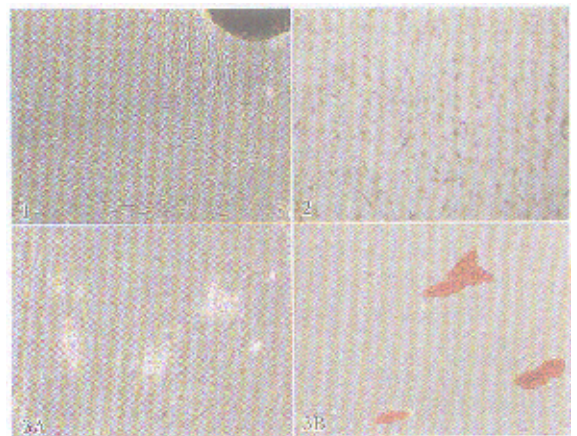


图 1 原代培养的眼眶前脂肪细胞图

图 2 pref-1 阳性的眼眶前脂肪细胞

图 3 前脂肪细胞分化为脂肪细胞

Fig.1 Primary cultured preadipocytes (×40)

Fig.2 Cultured pref-1 cells (×50)

Fig.3 Some preadipocytes differentiate into mature adipocytes

A: numerous lipid droplets in intracytoplasm (×200); B: the differentiated cells with Oil O staining (×100)

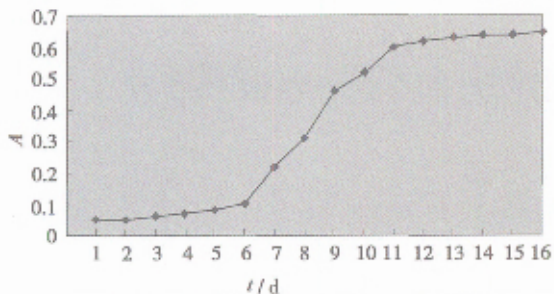


图4 前脂肪细胞分化过程中细胞内脂肪含量的变化

Fig.4 The change of intracytoplasmic lipids of preadipocytes in culture

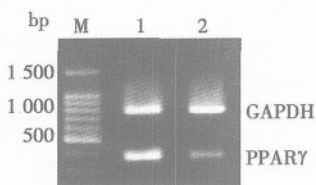


图5 RT-PCR 检测分化前后 PPAR $\gamma$  基因表达图

Fig.5 PPAR $\gamma$  expression before and after adipogenesis

M: marker; 1: after adipogenesis; 2: before adipogenesis

### 3 讨论

#### 3.1 人体内脂肪细胞的分化及意义

人体脂肪细胞系是由起源于中胚层的多能干细胞逐步分化、发育而成,大致经历4个阶段<sup>[4]</sup>。由于前脂肪细胞的存在及其分化功能,脂肪组织保持着终身增殖能力。通常情况下,前脂肪细胞受抑制基因(例如 pref-1)的控制,保持稳定状态,在一定条件作用下,该抑制被解除,多种信号转导途径被激活,促使不同转录因子(PPAR $\gamma$  和 C/EBP 等)调控脂肪细胞特殊性基因的表达,导致前脂肪细胞骨架及细胞外基质蛋白表达的改变,形状由梭形转变为椭圆形,获得成熟脂肪细胞的形态和生化特征。因此前脂肪细胞过度分化,将会导致机体脂肪代谢紊乱,脂肪再生及重分布,从而引起一系列疾病的发生。如果眼眶中前脂肪细胞存在并在一定病理条件下异常分化生成过多的成熟脂肪细胞,这有可能是TAO发病原因之一。

#### 3.2 TAO 患者眼眶前脂肪细胞的分化及意义

有研究表明,在TAO患者中单纯眼外肌增粗不伴有脂肪增加的占48%;既有肌肉增粗又有脂肪病变者占46%,还有6%的病人仅有眶脂肪的增加而没有肌肉的增粗<sup>[1]</sup>,也就是说TAO患者中眶脂肪受累者占一半以上。Peyster等<sup>[5]</sup>通过CT等检查证实TAO患者眼球突出程度与眶肌肉增粗的程度不一致,但与眶脂肪的增加有很好的依从性。眶脂肪容积的增加可能有两方面的原因,一方面是由于脂肪细胞分化导致脂肪细胞本身的体积和数量的增加;另一方面是由于TAO患者眶内大量糖胺多糖(GAGS)的合成及分泌,吸收大量水分而引起眶内容的增加。目前认为后者在眶脂肪增加中起着十分轻微的作用。眼眶CT

亦证实TAO患者眶脂肪密度与正常眶脂肪密度一致<sup>[1]</sup>,从而从宏观上初步证实了成熟脂肪细胞体积及数量的增加是TAO眶脂肪容积增加的主要原因。本研究通过体外培养眼眶脂肪组织证实,眼眶脂肪组织中可以生长出形状类似于成纤维细胞,并且 pref-1 染色阳性的细胞,在一定条件下该细胞可以向成熟脂肪细胞分化,从而在细胞学水平初步证实了眼眶组织中确实存在脂肪细胞的前体。

#### 3.3 PPAR $\gamma$ 在脂肪分化过程中的表达

由人体脂肪分化过程可知,分化转录因子是实现脂肪细胞终末性分化、完成脂肪特异性功能的关键物质,PPAR $\gamma$  既是其中一员,和其他成员一样,必须与其他核激素受体形成二聚体并与DNA结合才能表现出转录活性。PPAR $\gamma$  的主要配体有过氧化物增殖剂、游离脂肪酸、前列腺素代谢物和胰岛素增敏剂(TZD)等<sup>[6]</sup>。PPAR $\gamma$  在脂肪细胞分化的早期即在大多数脂肪细胞基因转录激活前就有表达,在脂肪细胞分化过程中,通过正反馈调控,PPAR $\gamma$  表达水平不断上升,至成熟脂肪细胞达最高,被认为在脂肪细胞分化全过程内均起着十分重要作用。为了进一步证明眼眶中存在着前脂肪细胞向脂肪细胞的分化,我们检测了分化前后 PPAR $\gamma$  表达量的改变。由 RT-PCR 结果可以看出,在前脂肪细胞分化前 PPAR $\gamma$  仅有微弱表达,随着向成熟脂肪细胞的分化,PPAR $\gamma$  表达明显增强,从而从基因水平证实了眼眶脂肪组织中确实存在着前脂肪细胞,并可向成熟脂肪细胞分化。

#### 参考文献:

- [1] Bahn RS. Thyroid eye disease [M]. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2001. 37-42.
- [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): 443-6.
- [3] Kumar S, Coenen MJ, Scherer PE, *et al.* Evidence for enhanced adipogenesis in the orbits of patients with Graves' ophthalmopathy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(2): 930-5.
- [4] Shao D, Lazar MA. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation [J]. J Biol Chem, 1997, 272(34): 21473-8.
- [5] Peyster RG, Ginsberg F, Silber JH. Exophthalmos caused by excessive fat: CT volumetric analysis and differential diagnosis [J]. Am J Roentgenol, 1986, 146(3): 459-64.
- [6] Vazquez M, Silvestre JS, Prous JR. Experimental approaches to study PPAR gamma agonists as antidiabetic drugs [J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2002, 24(8): 515-23.

(编辑 刘清海)