

波形纤维蛋白在前体脂肪细胞分化中的表达*

田志华, 杨公社

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 采用免疫组化(H IGH-SABC)法对前体脂肪细胞分化中波形纤维蛋白的表达进行了定性和定量检测,并结合计算机图像分析系统对细胞形态参数值(细胞总面积、胞核面积、细胞周长、等效直径及胞核质比)进行了分析。结果表明:(1)波形纤维蛋白参与前体脂肪细胞分化的全过程,而且其表达具有明显的时间依赖性——随分化的进行呈下降的趋势,染色模式为细胞质;(2)在前体脂肪细胞积聚脂滴向脂肪细胞分化的过程中,细胞总面积、胞核面积、细胞周长和等效直径总的呈上升趋势,胞核质比呈下降倾向。

[关键词] 前体脂肪细胞;脂肪细胞;免疫组化;波形纤维蛋白;细胞形态

[中图分类号] S852.16

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)03-0001-05

波形纤维蛋白(vimentin)是细胞骨架成分之一,属于III型中间纤维。波形纤维蛋白不仅在中胚层起源的细胞有表达,而且在体外培养的细胞中和许多未分化的细胞中表达^[1,2]。部分终末分化细胞用其特异的中间纤维蛋白部分或完全代替波形纤维蛋白^[3]。脂肪细胞属于中胚层来源的细胞,其中间纤维蛋白为波形纤维蛋白。国外早在20世纪50年代就已开始对脂肪细胞中间纤维的研究,而国内对这方面的研究尚未见文献报道。本试验采用免疫组化技术和图像分析仪,对波形纤维蛋白在前体脂肪细胞分化中的变化进行定性、定量研究,探索脂肪细胞分化过程中细胞形态参数的变化规律,以期对体脂过多沉积的调控研究提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 试验动物

SD (Sprague-Dawley)大鼠(白色,雄性,20日龄,体重70g左右)购自第四军医大学实验动物研究中心。脂肪组织取材于腹股沟、附睾远端和肾周围。将大鼠断颈处死,用体积分数75%酒精浸泡消毒,无菌状态下取出脂肪组织,除去血管和结缔组织,剪成1mm³的碎块。

1.2 主要试剂和仪器

鼠抗大鼠vimentin单克隆抗体(McAb Vm, V₉)、免疫组化(HIGH-SABC)染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);DAB(华美生物工程公

司);HPIAS-100高清晰度彩色图文分析系统(上海同济大学)。

1.3 方法

1.3.1 细胞爬片的制备 将切碎的脂肪组织块加入2倍体积的消化液(M199+20g/L牛血清白蛋白,临用时加入胶原酶I,质量浓度为1g/L),37℃消化60min,然后依次过孔径为0.074和0.027mm的尼龙网,2000r/min离心10min,弃上清液,加红细胞裂解液(154mmol/L NH₄Cl+10mmol/L KHCO₃+0.1mmol/L EDTA);室温放置10min,然后换无血清培养液洗3遍,再将5×10⁴cm⁻²的细胞悬液直接滴于载玻片上,放置于体积分数为5%CO₂培养箱培养(35~37℃,加湿至90%~95%饱和度)2~3h后,再加入适量的培养液,1d后换培养液(M199+50nmol/L胰岛素),此后2d换1次,直到8~10d后出现成熟的脂肪细胞。

1.3.2 波形纤维蛋白的免疫组化特异性染色 自接种日起,每隔1d取一批细胞爬片用HIGH-SABC法进行波形纤维蛋白的免疫组化特异性染色,显色用DAB。所设阴性对照以正常兔血清替代一抗。观察阳性的标准:光镜下胞浆出现棕黄色物质者为阳性。

1.3.3 计算机图像定量分析 用HPIAS-100高清晰度彩色图文分析系统,40倍物镜下对免疫组化染色不同时间点细胞波形纤维蛋白表达的平均灰度(灰度分级为0~255级,0级为最黑的灰度,255级

* [收稿日期] 2001-12-03

[基金项目] 国家教委博士点基金“激素及其生长因子与猪前体脂肪细胞的分化”资助项目(1998071232)

[作者简介] 田志华(1972-),女,四川成都人,博士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

为最浅的灰度,灰度值愈小表明染色强度愈强)及形态参数(细胞总面积、胞核面积、细胞周长、等效直径)进行定量分析,共 10 个试验组,每组 4 个重复,每重复随机选取 6 个视野,每视野观察 20 个细胞。

1.3.4 统计学处理 各组实验数据以均值 \pm 标准差即($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析(One Way ANOVA),有显著性差异者再进行多重比较。

2 结果

2.1 波形纤维蛋白免疫组化特异染色定性观察

波形纤维蛋白免疫组化染色结果显示,40 例细胞爬片(包括 1~ 10 d,每天 4 例)均呈不同程度的阳性反应,胞浆呈棕黄色(见图 1)。1~ 2 d 的前体脂肪细胞呈波形纤维蛋白强阳性反应,大量深棕黄色阳性物质围绕胞核分布;3~ 4 d 染色程度次强,随

脂滴的出现,阳性物质深浅不一,胞核周围染色较深;5~ 10 d 细胞染色较浅,主要分布在脂滴间和核周围,细胞周边呈弱阳性,而阴性对照则无棕黄色物质存在。

2.2 波形纤维蛋白免疫组化特异染色定量分析

细胞波形纤维蛋白免疫组化特异染色分析检测结果如图 2(为增强图的直观性,采用灰度值倒数作纵坐标)。从图 2 可见,波形纤维蛋白在前体脂肪细胞(接种后 1 d)中表达强阳性,其灰度值为 134.87 ± 19.41 ,2~ 5 d 波形纤维蛋白表达明显下降,但与第 1 天无明显差异。8 d 时灰度值显著增加为 208.91 ± 3.79 ($P < 0.01$),维持在较高的水平;成熟脂肪细胞(10 d)呈弱阳性,其灰度值为 215.42 ± 18.7 ,与第 1 天相比灰度值降低 59.60%,差异极显著 ($P < 0.01$)。

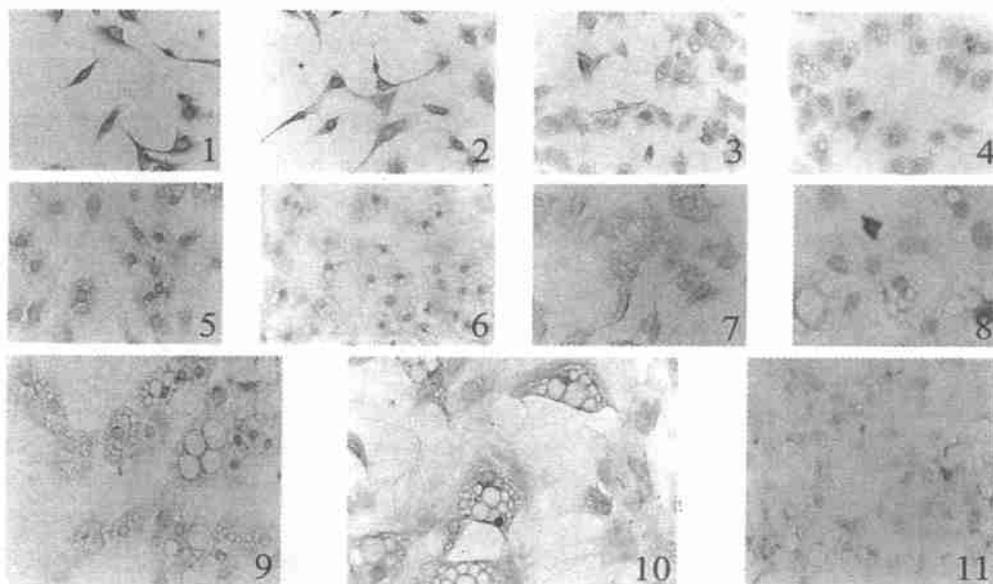


图 1 前体脂肪细胞分化中细胞波形纤维蛋白免疫组化染色 $\times 400$
1~ 10 代表细胞培养天数,11 代表阴性对照

Fig 1 Immuno-Histo-Chemical dyeing of vimentin during differentiation of preadipocyte
No. 1- 10 represent the day of cell culture, No. 11 represent negative control

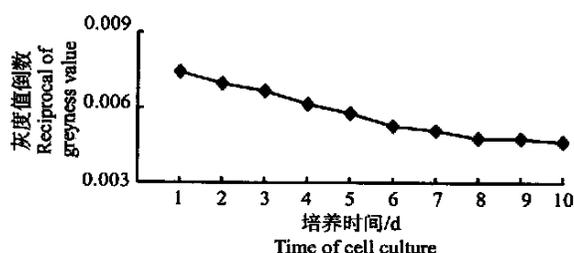


图 2 前体脂肪细胞分化过程中细胞免疫灰度的变化
Fig 2 Greyness changes of cellular immunology during differentiation of preadipocyte

2.3 前体脂肪细胞分化过程中细胞形态的变化规律

由于前体脂肪细胞分化中波形纤维蛋白的免疫组化染色在细胞边缘部分明显,清晰勾勒出细胞的整个轮廓,因而利用彩色图像分析仪,可量化脂肪细胞分化进程中主要细胞形态参数(细胞总面积、胞核面积、细胞周长、等效直径、胞核质比)的变化规律,测定结果如图 3~ 图 5。图 3 显示,在前体脂肪细胞的分化中,细胞总面积呈增大的趋势。在分化早期

(1~ 5 d), 细胞总面积变化比较平缓, 从第 1 天的 $(761.9 \pm 13.26) \mu\text{m}^2$ 到第 5 天的 $(847.15 \pm 33.16) \mu\text{m}^2$, 差异不显著; 从第 6 天开始直至第 10 天, 细胞总面积增加幅度加大, 由 $(1190.55 \pm 37.48) \mu\text{m}^2$ 上升到 $(3618 \pm 14.82) \mu\text{m}^2$, 均分别与第 1 天差异极显著 ($P < 0.001$)。而胞核面积变化在分化过程中, 依次出现一小、一大峰, 但总趋势为上升趋势: 从第 1 天 $(200.1 \pm 13.48) \mu\text{m}^2$ 增大到第 2 天的 $(205.75 \pm 42.13) \mu\text{m}^2$, 随后 2 d 则小幅度下降, 第 5 天又开始回升, 第 6 天胞核面积对应最大高峰为 $(216.3 \pm 24.17) \mu\text{m}^2$, 此后又开始下降, 直到第 10 天达到 $(215.1 \pm 32.47) \mu\text{m}^2$ 。

前体脂肪细胞向脂肪细胞转化的过程中, 细胞周长和等效直径呈上升趋势 (见图 4)。细胞周长在 1~ 5 d 增加缓慢, 在第 6 天出现 1 个折点, 细胞周长增长速度明显变快, 此后几天又继续平稳上升。第 6 天 $(214.2 \pm 11.36) \mu\text{m}$, 第 7 天 $(226.2 \pm 21.36) \mu\text{m}$, 第 8 天 $(242.6 \pm 42.15) \mu\text{m}$, 第 9 天 $(266.75 \pm 24.18) \mu\text{m}$, 第 10 天 $(278.3 \pm 43.21) \mu\text{m}$, 细胞周长同第 1 天 $(106.6 \pm 14.89) \mu\text{m}$ 相比, 差异极显著 ($P < 0.01$)。1~ 6 d 的细胞等效直径所构成的这一

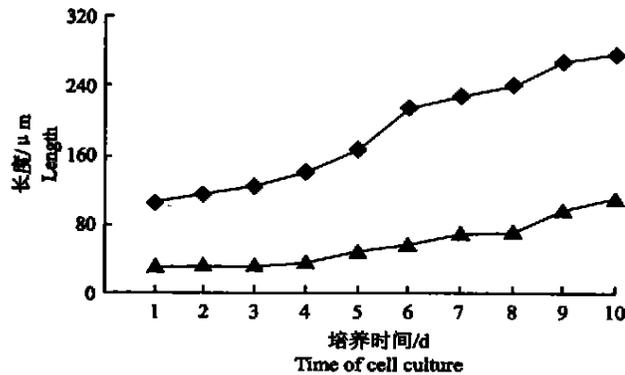


图 4 前体脂肪细胞分化过程中细胞周长和等效直径的变化
- - 细胞周长; - - 等效直径

Fig 4 Changes of cell perimeter and equivalent diameter during differentiation of preadipocyte
- - Cellular perimeter; - - Cell diameter

从图 5 可知, 在前体脂肪细胞分化中, 胞核质比呈下降的总趋势。前体脂肪细胞第 1 天的胞核质比为 0.3562, 第 2 天 0.3590, 随着胞浆中脂滴的少量出现, 第 3 天减小为 0.3159, 第 4 天上升了 0.0150, 从第 5 天后开始下降, 第 10 天为最低点 0.0508。这与光镜下脂肪细胞胞核被挤压在胞膜下

段曲线较为平坦, 在第 7 天变化速度逐渐加快, 第 8 天、第 9 天和第 10 天细胞等效直径分别是 $(71.84 \pm 15.62) \mu\text{m}$, $(98.06 \pm 24.56) \mu\text{m}$ 和 $(108.18 \pm 54.68) \mu\text{m}$, 与第 1 天细胞等效直径差异显著 ($P < 0.01$)。

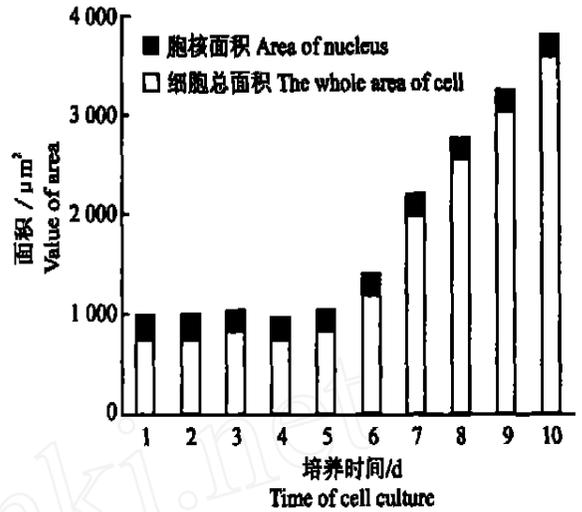


图 3 前体脂肪细胞分化过程中胞核面积和细胞总面积的对比
胞核面积; 细胞总面积

Fig 3 Comparison between cellular and cell volumes during differentiation of preadipocyte
Area of nucleus; The whole area of cell

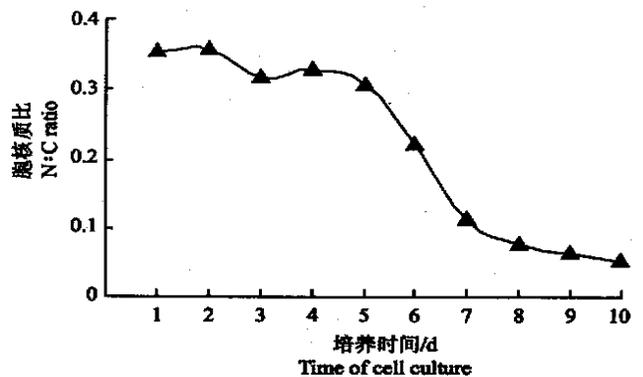


图 5 前体脂肪细胞分化过程中胞核质比的变化

Fig 5 Changes of ratio (nucleus/plasma) during differentiation of preadipocyte

形成狭窄的环形, 仅占细胞总容积的 1/40 相一致。

3 讨论

3.1 波形纤维蛋白在前体脂肪细胞分化中的表达
本研究曾用兔抗鼠角蛋白抗体对分化中的前体脂肪细胞进行免疫组化特异性染色, 结果均呈阴性

反应;而对于抗波形纤维蛋白抗体免疫组化特异性染色,细胞均呈不同程度阳性反应,这提示在前体脂肪细胞和脂肪细胞中,中间纤维蛋白的类型为波形纤维蛋白,而不是角蛋白。

3.2 波形纤维蛋白与前体脂肪细胞分化程度的关系

波形纤维蛋白的蛋白质表达水平在分化早期处于高水平,而在分化的末期则下降,由此本研究认为,波形纤维蛋白的表达量与前体脂肪细胞分化程度有关。脂肪细胞(10 d)波形纤维蛋白表达减弱的原因,目前尚不清楚,可能与前体脂肪细胞分化中相关基因的表达有关,这还有待于进一步从分子水平上研究。

3.3 细胞形态参数与前体脂肪细胞分化程度的关系

本研究首次应用图像分析仪定量分析前体脂肪细胞的分化中细胞形态参数的变化规律,结果表明:在前体脂肪细胞积聚脂滴向脂肪细胞分化的过程中,细胞总面积、细胞周长、胞核面积和等效直径呈上升的总趋势,胞核质比则有下降倾向。以上细胞形态参数的变化可能与分化前期脂滴较少,而后期脂滴数目的增多和体积的增大有关。

3.4 波形纤维蛋白对脂肪细胞生成的调控

早期研究发现,在肾上腺细胞中,脂滴与线粒体相连接^[4]。在大鼠 Leydig 细胞,波形纤维和光滑内质网(smooth endoplasmic reticulum, sER)相结合^[5]。人 SW-13 肾上腺肿瘤细胞中波形纤维对胆固醇的胞内转移有功能性作用^[6]。在促肾上腺皮质激素(ACTH)作用下,胆固醇向线粒体的转移离不开中间纤维、肌动蛋白和微丝的协调作用^[3,7,8]。ER(endoplasmic reticulum)内分离的微粒体中包含参与甘油三酯等生物合成的酶系,是大部分细胞脂类

合成的重要场所。rER(rough ER)和 sER(smooth ER)两者都能合成脂类。在许多类型的细胞中,rER 合成蛋白质,而 sER 合成脂类。在正常情况下,肝细胞 ER 内合成的许多脂类与蛋白质复合成脂蛋白小滴,这些小滴大部分或全部经过高尔基体的囊泡分泌出去。其中有一种称为极低密度脂蛋白(VLDL)的脂蛋白能运输胆固醇,携带甘油三酯到储存脂肪的脂肪组织。中间纤维蛋白与脂类的亲和性,也使人们推测其可能扮演与生脂有关的角色。以上资料表明,重要生脂细胞器如线粒体、内质网、高尔基体与波形纤维结构上存在特异性连接,这对脂滴的生成意义重大。Levasseur 等^[9]认为,波形纤维还参与细胞的有丝分裂过程。综上所述,本研究推测波形纤维蛋白参与脂肪细胞的形成,与脂滴的形成存在一定的关联,其作用方式主要有:通过其形态和分布的改变,支持脂肪细胞内脂滴的积聚,在脂滴周围形成不连续的致密笼状物;通过中间纤维结合蛋白与生脂相关的重要细胞器(核糖体、ER)相互作用,参与脂滴内甘油三酯的生成和运输;波形纤维蛋白调控基因表达^[10]。波形纤维蛋白进入细胞核的一个可能途径是 IF 蛋白的 N 端对核膜具有亲和性,因而 N 端可以与核膜外的受体蛋白识别,从而越过核膜进入受体部位^[11,12]。

4 结 论

从蛋白质水平证实,波形纤维蛋白不仅参与了前体脂肪细胞分化的全过程,而且其表达具有较明显的时间变化特点——呈下调趋势,其在脂肪细胞形成过程中可能发挥重要作用。

[参考文献]

- [1] Lazarides E, Granger B L, Gard D L, et al Desin and vimentin containing filaments and their role in the assembly of the Z disk in the muscle cells[J]. Cold Spring Harbor: Symp Quant Biol, 1982, 46: 351- 378
- [2] Osborn M, Weber K. Intermediate filament: cell-type-specific markers in differentiation and pathology[J]. Cell, 1982, 31: 303- 306
- [3] Oaswa S, Betz G, Hall P F. The role of actin in the responses of adrenal cells to ACTH and cyclic AMP: inhibition of DNase[J]. J Cell Biol, 1984, 99: 1335- 1342
- [4] Merry J. Mitochondrial structure in the adrenal cortex[J]. J Anat, 1975, 119: 611- 618
- [5] Russell L D, Mamlani S R, Vogl A W, et al Characterisation of filaments with in Leydig cells of the rat testis[J]. Amer J Anat, 1987, 178:

231- 240

- [6] Sarria A J, Panini S R, Evans R M. A functional role for intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol on human SW-13 cells[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 19455- 19463
- [7] Hall P K, Charponnier C, Nakamura M, et al The role of microfilaments in the response of adrenal tumour cells to adrenocorticotrophic hormone[J]. *J Biol Chem*, 1979, 254: 9080- 9084
- [8] Motek J, Hall P F. Response of adrenal tumour cells to adrenocorticotrophin site of inhibition of cytochaladin[J]. *Biochemistry*, 1977, 16: 3177- 3181.
- [9] Levasseur M P, Brown D L. Vimentin dynamics during the mitogenic stimulation of mouse splenic lymphocytes[J]. *Cell Motility Cytoskeleton*, 1987, 8: 227- 231.
- [10] Fidlerova H, Sovova V, Krekule I, et al Immunofluorescence detection of the vimentin epitope in chromatin structures of cell nuclei and chromosomes[J]. *Hereditas*, 1992, 117: 265- 273
- [11] Ouellet T, Leval P, Royal A. Complete sequence of the mouse type-II keratin end A: Its amino-terminal region resembles mitochondria signal peptides[J]. *Gene*, 1988, 70: 75- 84
- [12] Perides G, Harter C, Traub P. Electrostatic and hydrophobic interactions of the intermediate filament protein vimentin and its amino terminus with lipid bilayers[J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 13742- 13749.

Expression of vimentin during the differentiation of rat preadipocyte

TIAN Zhi-hua, YANG Gong-she

(College of Animal Science and Technology, North West Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of differentiation of rat preadipocytes into adipocytes on vimentin protein expression was determined by immunohistochemistry, using a monoclonal anti-rat vimentin antibody, on the morphologic parameters (whole cell area, nucleus area, cell perimeter, equivalent diameter, and N:C ratio) of the cells observed by cell image analysis. The results demonstrated (1): the immunophenotype of IF was vimentin⁺, staining intensity varied as cultured rat preadipocytes became differentiated, usually showing more intense staining for the vimentin systems at the preadipocytes during early differentiation compared to the rounded lipid filled adipocytes undergoing changes in morphology. Downregulation of vimentin was required for adipose conversion and expression of vimentin showed a time-dependence; (2) the differentiation of growing preadipocytes into adipocytes led to a strong increase in the cell equivalent diameter, perimeter, surface area and volume and a reduction of N:C ratio.

Key words: preadipocyte; adipocyte; immunohistochemistry; vimentin; cellular morphology