



冷驯化条件下中缅树鼩脂肪组织切片的对比

孙舒然¹,朱万龙¹,陈金龙²,曹能¹,高文荣¹,左木林¹,叶芳艳¹,
付家豪¹,杨涛¹,王政昆¹

(1. 云南省高校西南山地生态系统动植物生态适应进化及保护重点实验室,云南师范大学生命科学学院,昆明 650500;2. 昆明市海口林场,昆明 650114)

【摘要】 目的 探讨冷驯化不同时期中缅树鼩脂肪细胞形态变化,为冷驯化是否可以诱导白色脂肪组织中米色脂肪细胞 (beige adipocytes) 的产生提供形态学依据。方法 通过苏木素-伊红染色切片、免疫组织化学染色切片、免疫荧光染色切片进行对比。结果 随着冷驯化时间延长,白色脂肪细胞和褐色脂肪细胞形态都明显变小,且褐色脂肪组织中解偶联蛋白1 (uncoupling protein 1, UCP1) 表达增加,同时腹部皮下白色脂肪组织中可能已发生褐变,产生一些具有UCP1表达的浅褐色脂肪细胞,即米色脂肪细胞。结论 不同染色切片不仅能够清晰观察到脂肪细胞的形态改变,还能从抗体阳性颜色中观察出UCP1表达变化,为中缅树鼩脂肪组织研究提供基础性材料。

【关键词】 冷驯化;脂肪组织;苏木素-伊红切片;免疫组织化学切片;免疫荧光切片

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 11-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.001

The comparisons of tree shrews (*Tupaia belangeri*) adipose tissue slices preliminary study under cold-acclimation

SUN Shu-ran¹, ZHU Wan-long¹, CHEN Jin-long², CAO Neng¹, GAO Wen-rong¹,
ZUO Mu-ling¹, YE Fang-yan¹, FU Jia-hao¹, YANG Tao¹, WANG Zheng-kun¹

(1. Key Laboratory of Ecological Adaptive Evolution and Conservation on Animals-Plants in Southwest Mountain Ecosystem of University in Yunnan Province School of Life Science Yunnan Normal University Kunming 650500 China;
2. Haikou Forest Farm of Kunming, Kunming 650114, China)

【Abstract】 Objective To understand the fat cells morphological changes during different periods under cold acclimation in tree shrews, whether the cold acclimation can induce cream-colored fat cells in white adipose tissue (beige adipocytes), and provide morphological basis. **Methods** The Hematoxylin-Eosin staining sections, Immunohistochemical staining sections and Immunofluorescence staining sections are compared. **Results** With the prolonged cold acclimation, the white fat cells and brown fat cells are decreased significantly, and the uncoupling protein1 expression in brown adipose tissues are increased. At the same time, abdominal subcutaneous white adipose tissue may have occurred browning, produce some shallow brown fat cells with UCP1 expression, namely the beige fat cells. **Conclusions** Different staining sections not only can clearly observe the morphological changes of fat cells, but also observe UCP1 from antibody positive color expression changes, and provide basic materials for the study of the adipose tissues in tree shrews.

【Key words】 Cold acclimatization; Adipose tissues; Hematoxylin-Eosin staining sections; Immunohistochemical staining sections; Immunofluorescence staining sections

[基金项目] 国家科技支撑计划项目子课题(2014BAI01B01-06); 国家国际科技合作专项(2014DFR31040); 国家自然科学基金项目(31360096)。

[作者简介] 孙舒然(1990-), 女, 汉族, 硕士生, 研究方向: 动物生理生态, E-mail: 18487198653@163.com。

[通讯作者] 王政昆(1959-), 男, 教授, 研究方向: 动物生理生态, E-mail: wz_k_930@126.com。

哺乳动物体内的脂肪组织主要分为白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)和褐色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)^[1]。白色脂肪组织由白色脂肪细胞构成,其细胞内含有一较大脂滴,成单室性,线粒体含量较少。WAT 主要以甘油三酯的形式储能,皮下和内脏脂肪为主要贮存能量部位。BAT 主要由褐色脂肪细胞构成,其细胞内含有多个小脂滴,成多腔室,线粒体含量较多且特异性表达解偶联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1)。BAT 通过线粒体内膜上的 UCP1 将脂肪酸氧化与 ATP 产生解偶联,把能量直接以热量的形式散失增加能量消耗。

近年来的研究发现,动物实验表明 BAT 具有抵抗肥胖的作用^[2]。2009 年《新英格兰医学杂志》中发表了系列文章不仅证实健康成人体内存在着具有功能的褐色脂肪组织^[3-5],而且还证明冷暴露可以激活人体 BAT 的产热活性^[6]。不仅如此,许多研究也同样发现,在冷刺激和某些药物的诱导下,WAT 中会出现一种特殊的米色脂肪细胞,这种米色脂肪细胞具有多腔室的脂滴,富含线粒体,且表达褐色脂肪细胞特有标记物 UCP1^[7-8]。这一研究的发现为防治人类肥胖提供了一种极为重要的新方向,同时使 BAT 作为防治肥胖等疾病的靶器官受到研究者的广泛关注。

中缅树鼯 (*Tupaia belangeri*) 属于攀鼯目 (Scandentia) 树鼯科 (Tupauidae), 主要分布于南亚和东南亚,为东洋界特有的小型哺乳动物。现生攀鼯目只有一个科即树鼯科,我国仅有中缅树鼯一种。主要分布于云南、贵州、广西、四川西部及海南岛等地^[9]。树鼯与灵长类动物亲缘关系较近,具有特殊的进化地位,具有十分广泛的开发应用前景。而以树鼯为实验动物的肥胖模型的建立,在生物医学上可以作为人类代谢疾病的良好动物模型。但目前有关中缅树鼯 BAT 及 WAT 的组织结构和组织特征尚未见报道,缺少相应的基础材料。

本研究选取中缅树鼯作为实验动物,利用苏木素-伊红切片 (hematoxylin-eosin staining sections)、免疫组织化学切片 (immunohistochemical staining sections)、免疫荧光切片 (immunofluorescence staining sections),观察冷驯化是否可以使白色脂肪细胞和褐色脂肪细胞形态存在可塑性转变,并且通过切片寻找米色脂肪细胞出现的可能形态。为中缅树鼯 BAT 研究提供形态学的基础材料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验动物由中国医学科学院医学生物学研究所灵长类研究中心提供【SCXK(滇)2013-0001】,带回云南师范大学生命科学学院动物饲养房饲养【SYXK(滇)2013-0001】,22℃~25℃室温,光照 12L:12D 条件下适应 14 d,此为冷驯化 0 d 对照组。冷驯化 28 d、49 d 共两组,每组 10 只动物,在环境温度 5±1℃、光照 12L:12D、无巢材条件下单笼饲养。每天两次定点喂以由玉米面、奶粉、白糖以 90%:5%:5% 比例混合制得的熟食,少许水,并适量添加苹果,面包虫等。实验动物均为非繁殖期成年个体且体重差异不显著,实验组与对照组中雌雄各半。

1.2 脂肪组织的获取

将对照组、冷驯化 28 d、49 d 组的中缅树鼯断颈处死。无菌操作取下树鼯腋下褐色脂肪组织、腹部皮下脂肪组织进行石蜡包埋,为后续切片做准备。

1.3 主要实验试剂

封闭用正常羊血清、PV9000 通用二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒、抗淬灭封片剂(含 DAPI)均购自北京中杉金桥生物有限公司。TritonX-100、Tween 20 购自 Sigma-vetec。HE 染色试剂盒购于北京索莱宝生物有限公司。

免疫组化与免疫荧光所用 UCP1 抗体均购于 Abcam 公司。

1.4 苏木素-伊红染色切片的制备

切片进行常规脱蜡、水化。用 0.01 mol/L PBS 和蒸馏水分别漂洗 3 次,每次 5 min。加入 HE 染色试剂盒中的苏木素,室温孵育 2 min。蒸馏水洗去浮色,用试剂盒中的分化液,密切观察分色情况。蒸馏水漂洗 3 次每次 3 min。加入试剂盒中的伊红染液,孵育 1 min。蒸馏水洗去浮色,继续用蒸馏水漂洗 10 min。梯度酒精脱水(75%→80%→90%→90%→100%→100%,各 5 min),二甲苯透明 30 min,中性树胶封片,待晾干后,光学显微镜下拍照。

1.5 免疫组织化学染色切片的制备

切片进行常规脱蜡、水化。用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。加入 3% 过氧化氢覆盖切片,室温避光孵育 30 min。0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次每次 5 min。用滤纸将切片周围的水分吸干后,用组化笔在切片周围画圆圈,防止后续染色过程中液体漏出。5% 羊血清室温封闭 60 min。甩去多余的

封闭液,加合适浓度的第一抗体(UCP1 抗体),4℃冰箱过夜。0.01 mol/L PBST 漂洗 3 次每次 5 min。加入 PV9000 试剂盒中的试剂 I,37℃ 孵育 30 min。0.01 mol/L PBST 漂洗 3 次每次 5 min。加入 PV9000 试剂盒中的试剂 II,37℃ 孵育 30 min。0.01 mol/L PBST 漂洗 3 次每次 5 min。将 DAB 试剂盒中的浓缩液 50 μ L 加入 1 mL 的稀释液中,混匀备用。吸取切片上多余的水滴,每张组织片上滴加 100 μ L 的 DAB 显色液,室温下避光反应 5 min,单蒸水终止显色。梯度酒精脱水(75% \rightarrow 80% \rightarrow 90% \rightarrow 90% \rightarrow 100% \rightarrow 100%,各 5 min),二甲苯透明 30 min,中性树胶封片,待晾干后,光学显微镜下拍照。

1.6 免疫荧光染色切片的制备

(1)切片进行常规脱蜡、水化。0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次每次 5 min。蒸馏水漂洗 3 次每次 5 min。加入 HE 染色试剂盒中的苏木素,室温孵育 2 min。蒸馏水洗去浮色,用试剂盒中的分化液,密切观察分色情况。蒸馏水漂洗 3 次每次 3 min。加入试剂盒中的伊红染液,室温孵育 1 min。蒸馏水洗去浮色,继续用蒸馏水漂洗 10 min。梯度酒精脱水(75% \rightarrow 80% \rightarrow 90% \rightarrow 90% \rightarrow 100% \rightarrow 100%,各 5 min),二甲苯透明 30 min,中性树胶封片,待晾干后,光学显微镜下拍照。

2 结果

2.1 苏木素—伊红染色切片

冷驯化 0 d、28 d、49 d 中缅甸树鼩腋下 BAT 的 HE 染色切片形态学变化显著。从切片中可以发现(彩插 2 图 1),随着冷驯化时间延长,中缅甸树鼩腋下褐色脂肪细胞中脂肪滴逐渐变小。对照组腋下褐色脂肪组织中存在比较大的脂肪滴。冷驯化 28 d 后,脂滴直径明显变小,较大的脂肪滴逐渐消失。而在冷驯化 49 d 时,褐色脂肪细胞脂滴比驯化 28 d 明显变小,且分布在血管周围的褐色脂肪细胞脂滴相对更小。

中缅甸树鼩腹部皮下典型 WAT 中脂肪滴也发生显著变化。冷驯化 0 d 时为典型的单泡脂肪细胞,细胞中央有一大脂滴,细胞核被挤到边缘,细胞呈空泡状。冷驯化 28 d 后,在单泡脂肪细胞中分化出部分具有小脂滴的多泡脂肪细胞。而在冷驯化 49 d 时,更多具有小脂滴的多泡脂肪细胞出现。这说明冷驯化不仅使褐色脂肪细胞在形态上发生改变,也改变了白色脂肪细胞的形态。

2.2 免疫组织化学切片

在用 UCP1 抗体染色的免疫组织化学切片(彩插 2 图 2)中可以观察到,对照组中缅甸树鼩腋下 BAT 中 UCP1 表达的黄褐色区域较少,随着冷驯化时间的延长,同一组织部位的 UCP1 阳性黄褐色面积增大,且颜色加深,说明经冷驯化后 UCP1 表达量可能增加。同时在冷驯化 28 d 时,BAT 中血管周围的黄褐色颜色明显更深,说明在冷驯化时中缅甸树鼩可通过增加典型 BAT 中 UCP1 的表达来增加产热,并通过毛细血管的运输为机体提供热量,以应对冷胁迫。经过冷驯化,褐色脂肪细胞中脂滴也逐渐变小,与 HE 染色切片的结果相同。

随着冷驯化时间的延长,冷驯化组 28 d、49 d 树鼩腹部大网膜上的白色脂肪细胞皆出现了分化,不仅脂滴变小,而且出现了 UCP1 阳性区域,显示出褐色脂肪细胞的一定特征。冷驯化很有可能使得介于褐色脂肪细胞与白色脂肪细胞特征两者之间的米色脂肪细胞出现。

2.3 免疫荧光染色切片

在以 UCP1 为一抗的免疫组织荧光染色切片中(彩插 3 图 3),对照组 BAT 中 UCP1 阳性红色荧光较少且暗淡,而冷驯化组 28 d、49 d 腋下 BAT 中的 UCP1 阳性荧光更亮,且可以看到一些阳性荧光的椭圆点,很可能是线粒体。这说明冷驯化使得中缅甸树鼩 BAT 中 UCP1 表达增加,与免疫组织化学染色结果一致。

冷驯化组 49 d 腹部大网膜的 WAT 中发现一些 UCP1 阳性红色荧光的椭圆点,很有可能是线粒体中 UCP1 的表达,这些细胞很有可能是冷驯化诱导的米色脂肪细胞。结果与免疫组织化学切片相同。

3 讨论

近年来,对于认识并挖掘 BAT 在肥胖防制中的应用价值成为防治人类代谢疾病研究的一大热点。Wouter 等^[7]的研究发现在冷刺激下,24 位健康成年人中有 23 位褐色脂肪组织活性被激活,且较肥胖个体的褐色脂肪组织活性显著低于较瘦个体。体质指数与体重百分比与褐色脂肪组织活性成显著负相关关系,而静止代谢率与之成显著正相关关系。Masayuki^[10]研究同样发现冷刺激(19℃)2 h 后,32 位健康成年人(23~35 岁)中有 17 位的锁骨及脊椎区域吸收了大量的 18 氟-氟化脱氧葡萄糖(2-fluoro-2-deoxy-D-glucose, 18F-FDG),而这些部位已在组织

学上证明是 BAT 部位。而且冬季的褐色组织活性显著高于夏季。在对中缅树鼩的研究中同样有所报道。根据张麟等^[11]的研究发现,冷驯化 28 d, BAT 中的 UCP1 含量逐渐增加,且在 21 d 时达到极显著水平。而朱万龙等人的报道也有相似的结果,随着冷驯化时间的延长,树鼩的静止代谢率和非颤抖性产热都明显呈上升趋势^[12]。冬季的静止代谢率和非颤抖性产热显著高于夏季^[13]。与袁方等^[14-15]的报道相一致。

本文通过三种切片对冷驯化不同时期的中缅树鼩脂肪细胞形态变化对比发现,冷驯化可以诱导白色脂肪细胞和褐色脂肪细胞的形态改变。并且 WAT 中可能已发生褐变,产生一些具有 UCP1 表达的浅褐色褐色脂肪细胞,即米色脂肪细胞。从 BAT 切片的 UCP1 阳性表达不仅在免疫组织化学染色中颜色随冷驯化时间逐渐加深,和在免疫组织荧光染色中荧光颜色逐步变亮中可以看出,冷驯化使得 BAT 中 UCP1 表达增加,这以以前的研究结果相一致。而在 WAT 切片中随着冷驯化时间延长,切片中出现米色脂肪细胞说明,UCP1 在典型的白色脂肪组织部位出现,增加了其适应性产热,使树鼩在维持体温应对冷胁迫时做出一定贡献。

但目前关于白色脂肪组织褐变的机制还未清楚。Khanh 等^[16]通过脂肪组织的超微结构、脂肪细胞分化时的分子标记物以及流式细胞对于抗体的筛选,发现血管内皮细胞具有分化为米色脂肪细胞的特点,认为米色脂肪细胞可能起源于血管内皮细胞。G. Barbatelli 等^[17]发现冷驯化使 WAT 中抗有丝分裂的 C/EBP α 基因表达增加,而与细胞繁殖有关的基因表达未改变,并结合脂肪组织的超显微结构认为冷刺激可以诱导白色脂肪细胞直接分化转化为米色脂肪细胞。而 Tim 则利用流式细胞仪分选出具有一定特性的前体骨骼肌细胞 (Sca-1 +, CD45 -, Mac1),并经实验证明这些细胞经冷刺激或药物诱导也可分化为米色脂肪细胞^[7]。目前的研究证据主要指向这三种不同的转变机制,但不能排除这三种机制共同作用,若有共同作用,何种作用为主导皆有待阐明。相信以 BAT 为靶点,安全有效的诱导 WAT 中具有功能性的米色脂肪细胞的方法必将成为防治肥胖等代谢疾病研究的新方向。

参考文献:

[1] Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance[J]. *Physiological Reviews*, 2004, 84

(1): 277-359.

- [2] Enerback S. Human brown adipose tissue [J]. *Cell Metab*, 2010, 11(4): 248-252.
- [3] Cohade C, Osman M, Pannu HK, et al. Uptake in supraclavicular area fat ("USA-Fat"); description on 18F-FDG PET/CT[J]. *J Nucl Med*, 2003, 44(2): 170-176.
- [4] Yeung HW, Grewal RK, Gonen M, et al. Patterns of 18FFDG uptake in adipose tissue and muscle: a potential source of false-positives for PET[J]. *J Nuclear Med*, 2003, 44(11): 1789-1796.
- [5] Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293(2): E444-E452.
- [6] Wouter D. van Marken Lichtenbelt, Joost W. et al. Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men [J]. *The New England Journal of Medicine*, *N Engl J Med* 2009,360:1500-1508.
- [7] Tim J. Schulz, Tian Lian Huang, Thien T. Trana, et al. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat[J]. *PNAS*, 2011, 108(1): 143-148.
- [8] Sona Rajakumari. EBF2 Determines and Maintains Brown Adipocyte Identity[J]. *Cell Metabolism* 17, 2013, 4(2): 562-574.
- [9] 王应祥, 李崇云, 马世来. 树鼩的分类与生态. 树鼩生物学 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 1991: 21-70.
- [10] Masayuki Saito, Yuko Okamatsu-Ogura, Mami Matsushita, et al. High Incidence of Metabolically Active Brown Adipose Tissue in Healthy Adult Humans Effects of Cold Exposure and Adiposity [J]. *Diabetes*, 2009, 58:1526-1531.
- [11] Lin Zhang, Peng-fei Liu, Wan-long Zhu, et al. Variations in thermal physiology and energetics of the tree shrew (*Tupaia belangeri*) in response to cold acclimation[J]. *J Comp Physiol B* 2012, 182:167-176.
- [12] Wan-long Zhu, Li-hua Meng, Zheng-kun Wang. Body mass, Thermogenesis and energy metabolism in *Tupaia belangeri* during cold acclimation [J]. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 2012, 8(2):90-109.
- [13] Wan-long Zhu, Hao Zhang, Zheng-kun Wang. Seasonal changes in body mass and thermo genesis in tree shrews (*Tupaia belangeri*): The roles of photoperiod and cold[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2012, 37:479-484.
- [14] 袁方. 低温对中缅树鼩解偶联蛋白-1 的影响[J]. 昆明医学院学报, 2002, 23(4): 25-27.
- [15] 袁方. 低温对中缅树鼩褐色脂肪组织及肝脏解偶联蛋白 mRNA 表达的影响[J]. 昆明医学院学报, 2010, 31(6): 42-44.
- [16] Khanh-Van Tran, Olga Gealekman, Andrea Frontini, et al. The Vascular Endothelium of the Adipose Tissue Gives Rise to Both White and Brown Fat Cells[J]. *Cell Metabolism*, 2012, 15:222-229.
- [17] G. Barbatelli, I. Murano, L. Madsen, et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298: E1244-E1253.

[修回日期] 2015-10-12