



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101768572 A

(43) 申请公布日 2010.07.07

(21) 申请号 200910155754.3

G01N 33/53(2006.01)

(22) 申请日 2009.12.25

(71) 申请人 杭州电子科技大学

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园区 2
号大街

(72) 发明人 徐铭恩 王小红 葛亚坤

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有
限公司 33100

代理人 徐飞虎 徐关寿

(51) Int. Cl.

C12N 5/0775(2010.01)

C12N 5/071(2010.01)

C12Q 1/26(2006.01)

C12Q 1/02(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种代谢综合症体外病理模型的构建及其在
药物筛选中的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种基于细胞组装技术的代谢综合症病理模型及其在高内涵药物筛选中的应用。通过将脂肪干细胞和仿细胞外基质材料组装形成具有一定孔隙率的含有细胞的三维结构体;通过控制诱导分化条件,使三维结构体内通道表面的脂肪干细胞分化为内皮细胞,基质材料内部的脂肪干细胞则分化为脂肪细胞;将从动物体内分离的胰岛直接组装在三维结构体的空隙中,形成多个调节分泌点。对上述的系统模型给予高浓度的葡萄糖、脂肪酸胰岛素、TNF 或脂肪细胞分泌因子等能量代谢调控物长时间刺激,诱导脂肪细胞、胰岛细胞和内皮细胞产生代谢综合症病理症状。并提供一种应用上述的代谢综合症病理模型用于药物筛选的方法。

1. 一种多细胞组合物,其特征在于,由包括以下步骤的方法制备:
 - (1) 将脂肪干细胞和基质材料组装形成具有一定孔隙率的含有细胞的三维结构体;
 - (2) 通过控制诱导分化条件,使三维结构体内通道表面的脂肪干细胞分化为内皮细胞,并在通道表面自组装成内皮样结构,基质材料内部的脂肪干细胞则分化为脂肪细胞。
 - (3) 将从动物体内分离的胰岛直接组装在三维结构体的空隙中。
2. 根据权利要求1所述的多细胞组合物,其特征在于:所述方法脂肪干细胞的数量为 10^6 – 10^8 个/ml 基质材料,胰岛细胞数量为5–50个。
3. 根据权利要求1所述的多细胞组合物,其特征在于:所述方法的步骤(1)中,用于基质细胞三维受控组装的专用实验系统主要包括专用数据处理软件,基于四轴运动控制卡和步进电机驱动的三维成形平台,材料输运子系统,独立温控的成形室和分体式设计的成形底板。
4. 根据权利要求1所述的多细胞组合物,其特征在于:所述方法的步骤(1)中,所述的基质材料为包括明胶、海藻酸钠和纤维蛋白原的组合物,其中明胶、海藻酸钠和纤维蛋白原的配比为1 : 0.2–1 : 0.2–1。
5. 根据权利要求1所述的多细胞组合物,其特征在于:所述方法的步骤(2)中,所述的控制诱导分化条件为先用内皮生长因子诱导,使三维结构体通道表面的脂肪干细胞先分化为内皮细胞,这些终末分化的细胞将失去分化为脂肪细胞的能力;接着用地塞米松、异丁基甲基黄嘌呤诱导培养,使基质材料内部的脂肪干细胞分化为成熟的脂肪细胞。
6. 一种构建代谢综合症病理模型的方法,包括如下步骤:
 - (1) 对权利要求1所述的多细胞组合物给予高浓度的葡萄糖或脂肪酸等能量代谢物刺激,诱导脂肪细胞、胰岛细胞和内皮细胞产生代谢综合症病理症状;或
 - (2) 对权利要求1所述的多细胞组合物给予高浓度胰岛素、TNF或脂肪细胞分泌因子等能量代谢调控物刺激,诱导脂肪细胞、胰岛细胞和内皮细胞产生代谢综合症病理症状。
7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述方法为采用10–25mM葡萄糖培养液培养7天后,诱导产生代谢综合症病理模型。
8. 一种筛选治疗代谢综合症中内皮细胞功能损伤药物的方法,其特征在于:按照权利要求6所述的方法构建代谢综合症病理模型,加入待测药物,检测模型在正常和病理条件下的相关标记物水平,分析待测药物的药理活性进行药物筛选。
9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述的标记物为NO和ET-1。
10. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述的代谢综合症为肥胖、高血压或动脉粥样硬化等疾病。

一种代谢综合症体外病理模型的构建及其在药物筛选中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体的说,涉及一种新的用细胞组装技术构建的代谢综合症病理模型、构建方法及其在高内涵药物筛选中应用。

[0002] 发明背景

[0003] 生命科学、信息科学与制造科学相结合,是二十一世纪科技发展的重要趋势。基于先进制造理论和组织工程理论的细胞三维受控组装,为组织工程、药物筛选等研究领域拓展了新的理论和技术空间。在药物研发领域,90 年代以来全球药物研发机构广泛应用的高通量筛选 (High-Throughput Screening, HTS) 等药物筛选评价技术,面临低成功率的困境 (Bleicher KH, et al. Nat Rev Drug Discov. 2003 ;2(5) :369-78)。其原因是由于现有的体外药物筛选体系和真实的体内环境存在巨大差异,这种差异导致筛选的低成功率。因此构建和体内环境一致的体外评价筛选系统,是目前药物研发领域必须解决的关键技术。而用细胞组装技术可以构建仿真体内环境的 3D 多细胞系统用于药物筛选,这样的技术为组织工程和药物研究领域搭起了桥梁,对于细胞组装技术和药物筛选技术都具有重要的科学意义和应用价值。

[0004] 建立在计算机 3D 建模和先进制造离散堆积理论基础上的细胞三维组装技术,是在组织器官的解剖学数字模型直接驱动下,定位装配活细胞 / 材料单元,制造组织或器官的多细胞前体的技术。如哈佛大学 Lee W 等人开发的 3D bio-printer 技术,可喷射细胞和材料,逐层打印纤维原细胞和角质细胞形成多层皮肤结构 (Lee W, et al. Biomaterials. 2009 ;30 :1587-95)。南卡罗来纳大学 Mironov F 和 Clemson 大学 Boland R 等人开发的 3D-cell printer 技术,通过改装打印机喷头喷射细胞和特殊的基质材料,打印出有活性的三维细胞系统 (Zhang C, et al. Biomaterials, 2008 ;29(28) :3781-91)。亚利桑那大学 Smith CM 开发的 3D bioassembly,基于直写技术组装细胞,并系统研究了各种环境因素对组装细胞的活性影响 (Smith CM, et al. TissueEng. 2007 ;13(2) :373-83)。MIT 的 Vacanti JP 和德雷珀实验室 Borenstein J 等,也以细胞为装配材料,结合芯片制造工艺,制造出微血管系统 (Fidkowski C, et al. TissueEng. 2005 ;11(1-2) :302-9)。国内清华大学颜永年等开发了基于快速成型 (RP) 原理的细胞三维受控组装技术,组装了能保持 3 个月活性的人工肝、人工脂肪等组织 (Yan YN, et al. Biomaterials. 2005 ;26(29) :5864-71)。

[0005] 然而,由于器官结构的精细和复杂性,细胞组装技术面对制造肝、肾、心脏等复杂器官还有很多问题亟待解决。与此同时,细胞组装技术由于可以构建复杂的 3D 细胞培养模型,在生命科学其它领域显示了重要的理论和应用价值。研究者近年来利用组织工程技术制造的三维多细胞体开展研究,取得显著成果。比如普林斯顿大学的 Basu S 等人,利用人造三维多细胞体,研究了发育生物学的模式建成问题 (Basu S, et al. Nature. 2005, 28 ;434(7037) :1130-4)。Hotary KB 等利用三维多细胞体,发现 MT1-MMP 通过改变细胞空间几何形状,影响肿瘤细胞在 3D 基质中的增殖 (Hotary KB, et al. Cell. 2003 ;114(1) :33-45)。Basu S 指出,构造和研究三维多细胞体,可以提高对生物发育和功能的了解,并可应用于生

物材料,生物感测研究中。这些研究利用简单的技术构建三维多系统,在生物学和药物筛选等领域取得了有效的成果,证明细胞组装技术在药物筛选领域有重要的研究和应用价值。

[0006] 在药物研发领域,90 年代以来,基于分子和细胞水平信息检测的高通量筛选技术 (High-Throughput Screening, HTS),成为新药开发的主要手段。但由于整体是由多种细胞在三维空间有序排列,不同细胞间进行信号传导、调控的复杂体系;与 HTS 技术的基础:体外研究单个药物靶标、细胞二维培养细胞结构和功能不完整是完全不同的。这种差异对细胞结构和功能造成显著影响,如 Kang X 发现相比二维培养,脂肪细胞在三维培养环境中,其形态、增殖、分化,基因表达,代谢等生理功能存在明显差异 (KangX, et al. Tissue Eng. 2005 ;11 (3-4) :458-68)。正是这种差异,造成了目前困扰全球药物研发机构的问题——HTS 快速筛选出药物先导物,但其中绝大多数在整体实验中没有药理活性。HTS 迫切需要发展为高成功率的高内涵筛选 (High Content Screening, HCS) 已成为药物研究领域的共识 (Bleicher KH, et al. Nat Rev Drug Discov. 2003 ;2 (5) :369-78)。在国内,由于资金有限,药物研发高成本和高风险带来的影响更为严重。同时,04 年来罗氏、诺华、默克等大型跨国公司相继进入中国的药物研发领域,抢夺中国宝贵的中药资源,中国迫切需要开发低成本高效率的药物研发技术。

[0007] HCS 的前提是保持细胞结构、功能的完整性,这要求为细胞提供与体内相似的生长环境,为此研究者开始构建三维细胞系统进行药物研究。哈佛的 Fischbach C 等,利用三维支架培养细胞建立肿瘤模型,显示恶化、药敏等特征接近真实肿瘤,是良好的肿瘤药物筛选工具 (Fischbach C, et al. Nat Methods. 2007 ;4 (10) :855-60)。Liana Adam 用细胞囊这样的三维多细胞体,进行肿瘤药物研究 [18]。由于肝细胞可用于研究药物代谢和毒性,Griffith LG (Sivaraman A, et al. Curr Drug Metab. 2005 ;6 (6) :569-91),构建了肝细胞三维多细胞系统;Sun W 用 Multi-nozzle depositio 技术组装细胞,构建了三维微肝组织,用于药物代谢研究 (Chang R, et al. Tissue Engineering. 2008 ;14 (2) :157-66)。Yamada KM 指出三维细胞模型可以填补二维细胞培养和动物实验间的缺口,对药物筛选有重要意义 (Yamada KM, et al. Cell. 2007 ;130 (4) :601-10)。如果构建具有复杂的功能性组织结构和体内更相似的三维系统,将进一步推动药物筛选技术的发展。

[0008] 通过以上分析可见,组织工程学的先进技术可应用于其它研究领域取得成果。在药物研发领域,由于高通量筛选技术具有低成功率的缺陷、高通量筛选迫切需要发展为高内涵筛选,而目前高内涵筛选在保持细胞结构和功能完整性上没有较大进展。这些领域的现状和问题,引导我们提出利用细胞组装的理论和构建体外病理模型,应用于高内涵药物筛选,该技术有重要的理论价值和广泛的应用前景。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一种新的代谢综合症病理模型、构建方法及其在高内涵药物筛选中的应用。

[0010] 生理系统是由多个行使不同功能的器官或组织配合在一起组成。在人的各个生理系统中,既有如循环,泌尿系统这样由多个组织器官组成,对空间结构要求精确,结构复杂的系统,也有空间结构上相对简单的系统,能量代谢系统就是这样的系统。能量代谢系统主要由几群不同功能的细胞:脂肪细胞,胰岛细胞,神经细胞等构成,在一定的空间结构内,通

过内分泌等细胞通讯手段,组成调控机体能量代谢的复杂网络系统。近年来大量研究证实 β 细胞和脂肪细胞构成脂肪细胞-胰岛素轴调节能量代谢,内皮细胞则是构成选择性透过内分泌因子的分泌调节生物屏障。胰岛素分泌紊乱、胰岛素抵抗,脂肪细胞和内皮细胞功能损伤之间复杂的相互影响和作用,是联系代谢综合症的各种病理生理异常的主要机制。

[0011] 动物能量代谢系统的基本结构和参数(以人体为例):

[0012] (1) 正常人体脂肪含量约占人体体重的 10%,脂肪细胞总数约为 $26.9 \times 10^9 \pm 1.8 \times 10^9$,而正常人胰腺中胰岛总数约有 100 万个。由此得到,正常人脂肪细胞-胰岛素轴中,脂肪细胞和胰岛的比约为 3×10^4 脂肪细胞(个)/胰岛(个)。

[0013] (2) 人体脂肪细胞组织分布广泛,在正常情况下,绝大部分皮下层、网膜系膜、肾脏周围及骨髓等处有大量的脂肪沉积,构成能量代谢系统的结构基础。

[0014] (3) 胰岛集中散布在胰腺中的细胞群,构成能量代谢调节的点。

[0015] (4) 在脂肪细胞和胰岛之间,各自分泌的调节因子需要通过血管屏障,然后通过血液输送扩散到作用位置,因此内皮细胞构成选择性透过能量调节内分泌因子的生物屏障。

[0016] 而以细胞组装技术组装和诱导多种细胞并控制它们的精确位置,构建多种细胞的结构体在理论和技术上都是可行的。通过对脂肪细胞、胰岛 β 细胞和内皮细胞在体内的空间关系和数量比例的研究,我们设计了如下的多细胞组合物,作为体外能量代谢生理系统仿真模型。该多细胞组合物由包括以下步骤的方法制备:

[0017] (1) 将脂肪干细胞和基质材料组装形成具有一定孔隙率的含有细胞的三维结构体;

[0018] (2) 通过控制诱导分化条件,使三维结构体内通道表面的脂肪干细胞分化为内皮细胞,并在通道表面自组装成内皮样结构,基质材料内部的脂肪干细胞则分化为脂肪细胞。

[0019] (3) 将从动物体内分离的胰岛细胞直接组装在三维结构体的空隙中。

[0020] 上述步骤中,脂肪干细胞的数量为 10^6-10^8 个/1ml 基质材料,优选 $1-5 \times 10^7$ 个/1ml 基质材料。胰岛细胞数量为 5-50 个,优选为 10-20 个。脂肪干细胞和胰岛细胞来源于动物,例如大鼠、小鼠、兔子、猪、牛或人等,优选来源于大鼠或人。

[0021] 细胞外基质构成细胞生存的外环境,它们是发育过程中从细胞内分泌到细胞外的各种大分子,然后在细胞周围构成高度水合的凝胶或纤维性网络,起支持、保护、营养细胞的作用,对细胞的分化、运动、通讯有重要影响。应用于细胞组装的人工基质材料应有助于三维组装结构的形成和稳定,有助于细胞在适宜的三维开放环境内形成细胞群,并传输化学和力学信号至细胞。

[0022] 细胞外基质的成分复杂,包括胶原蛋白、蛋白多糖、糖胺聚糖、层连蛋白、纤连蛋白和弹性蛋白等,这些成分的具有不同的分子构成,分子长度,和结构特性。本发明从仿生学角度考虑,组装过程的细胞外基质材料,应该是由多种材料构成的,而单一材料也是很难满足机械成形、构建多级结构及可控降解性等的需求的。综合考虑以上对材料的要求,选择了具有良好生物相容性、可控降解性和细胞亲和性的明胶(Gelatine)、海藻酸钠(Sodium alginate)和纤维蛋白原混合作为基质材料。

[0023] 基质材料是包含明胶、海藻酸钠、纤维蛋白原三种材料的共混物,明胶、海藻酸钠和纤维蛋白原的配比为 1 : 0.2-1 : 0.2-1。可以将明胶和海藻酸钠分别溶于 PBS 缓冲液中,将纤维蛋白原溶解于 DMEM 培养液中,临用时将三种材料以 1 : 0.2-1 : 0.2-1 均匀共

混,优选以 1 : 1 : 1 共混。由于基质材料是共混物,因此,其凝胶化方式比单一材料的凝胶化方式多,既可以通过控制温度(明胶)实现凝胶化,也可以通过引入交联剂和酶凝胶化。更具有优势的是,可以用酶和诱导因子控制结构的降解。

[0024] 将共混材料和培养的脂肪干细胞混合,得到浓度约为 10^6 – 10^8 个脂肪干细胞/mL 的脂肪干细胞-复合材料共混材料,优选为 1 – 5×10^7 个/mL 共混材料。

[0025] 上述步骤中,可通过细胞组装技术将溶于基质材料内的脂肪干细胞组装成型。用于细胞三维受控组装的专用实验系统主要包括专用数据处理软件,例如 Solidworks, Cark 分层软件等,基于四轴运动控制卡和步进电机驱动的三维成形平台,材料输运子系统,及独立温控的成形室及分体式设计的成形底板。通过整个系统的协调控制,实现了对组装过程的精确控制,成形完成后得到具有一定孔隙率的含有细胞的三维结构体,孔隙率优选为 65%–85%。

[0026] 将明胶基共混材料/细胞组装结构体培养 3–5 天,冷冻干燥后的电子显微镜照片显示,明胶/海藻酸钠/纤维蛋白原共混材料,结构孔隙率高,由于纤维蛋白原凝固聚合后的分子链比海藻酸钠长,更容易形成大量具有 10~30 μ m 直径孔隙的结构。细胞在三维空间自由伸展,形成网状结构和大量空隙可供培养液深入结构内部。上述实验结果充分证实了采用海藻酸钠、纤维蛋白原和明胶基共混材料,可以构建出适合细胞生长的微单元结构。

[0027] 上述步骤中,纤维蛋白原/明胶/海藻酸钠/细胞通过低温堆积成形,再经 Ca^{2+} 离子和凝血酶双交联,结构稳定,既具有一定的硬度,也具有一定的抗拉特性,结构可稳定维持 1 个月以上,设计的通道始终保持清晰可辨。其原因在于,海藻酸钠的分子链相对较短和纤维蛋白聚合体的分子链较长,所以形成两种力学特性不同的结构,当两种材料配合在一起使用时,两种分子结构共同作用,提高了组装结构的整体强度和稳定性。

[0028] 上述步骤中,诱导分化条件可选择先用内皮生长因子(EGF)诱导,优选内皮生长因子-1(EGF-1),使三维结构体内通道表面的脂肪干细胞先分化为内皮细胞,这些终末分化的细胞将失去分化为脂肪细胞的能力;接着用地塞米松和异丁基甲基黄嘌呤(isobutyl-methylxanthine, IBMX)诱导培养,使基质材料内部的脂肪干细胞能分化为成熟的脂肪细胞。这一方法能精确控制结构体中不同位置脂肪干细胞的分化,细胞的分化取决于诱导的步骤和脂肪干细胞在结构中所处的位置。

[0029] 待分化诱导完成后,将从动物体内分离出的胰岛细胞定位组装在三维结构体内。例如可用注射器吸取培养的结构完整的胰岛细胞注入到三维结构体的空隙中,胰岛细胞数量为 5–50 个,优选为 10–20 个。

[0030] 本发明的另一目的是提供一种构建代谢综合症病理模型的方法,该方法可采用以下两种技术方案:(1) 对上述的多细胞组合物给予高浓度的葡萄糖或脂肪酸等能量代谢物刺激,诱导脂肪细胞、胰岛细胞和内皮细胞产生代谢综合症病理症状;或(2) 对上述的多细胞组合物给予高浓度胰岛素、TNF- α 或脂肪细胞分泌因子等能量代谢调控物刺激,诱导脂肪细胞、胰岛细胞和内皮细胞产生代谢综合症病理症状。

[0031] 作为一种优选的技术方案,可采用 10–25mM,优选 15mM 葡萄糖培养液培养 5–10 天后,诱导产生代谢综合症病理模型。

[0032] 另一优选的技术方案,可采用 6–20 μ M,优选 10 μ M insulin 培养液培养 5–10 天后,诱导产生代谢综合症病理模型。

[0033] 另一优选的技术方案,可采用 30-80ng/mL,优选 40ng/mL TNF- α 培养液培养 5-10 天后,诱导产生代谢综合症病理模型。

[0034] 本发明的另一目的是提供一种应用上述的代谢综合症病理模型用于药物筛选的方法。构建好代谢综合症病理模型后,加入待测药物,检测模型在正常和病理条件下的相关标记物水平,通过分析待测药物的药理活性进行药物筛选。

[0035] 代谢综合症病理模型的一种用途是可以作为糖尿病病理模型,在体外模拟糖尿病的病理特征。糖尿病属于代谢综合症中的糖代谢障碍,是由于人体内胰岛素绝对或相对缺乏所致,以高血糖为主要特征;糖尿病的发病,不仅有外周组织对胰岛素的抵抗性,还有 β 细胞分泌功能不正常,即分泌胰岛素能力减低,释放缓慢,分泌峰的延迟,胰腺 β 细胞分泌功能及胰岛素作用之间不能维持正常的动态平衡,因而导致机体能量供给障碍,由此可以产生一系列代谢变化,最终造成多方位的代谢紊乱。培养液中葡萄糖相当于机体内的血糖,通过观察模型中的脂肪细胞对葡萄糖的转化消耗,可以在一定程度上反映脂肪细胞的合成脂肪活力和对胰岛素的敏感性。因此培养液中葡萄糖的消耗,可以作为糖代谢的检测标志。

[0036] 高浓度葡萄糖长时间培养,在模型上诱发了显著的病理变化,葡萄糖消耗下降,证明了模型对糖尿病的模拟能力。对于高浓度葡萄糖长时间培养诱发的葡萄糖消耗下降,罗格列酮在该模型上显示出明显的药理作用。罗格列酮对于诱发的病理改变的治疗作用,组装的能量代谢系统比 2D 培养系统和缺乏胰岛的 3D 组装系统更为显著。

[0037] 内皮细胞存在于整个脉管系统的内腔,作为体内循环血液和其它组织间接触面和物理屏障,对脂肪细胞-胰岛内分泌轴而言,是一个主动的选择性透过屏障。同时,代谢综合症中代谢分子的病理改变是通过损伤内皮细胞才导致高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病的发生的。内皮细胞功能损伤总是和肥胖,胰岛素抵抗共存,并贯穿于代谢综合症的整个发病过程中,肥胖和胰岛素抵抗病理情况下产生的内皮细胞功能损伤,是连接代谢综合症中肥胖和胰岛素抵抗(糖尿病)到心血管疾病的重要枢纽。内皮细胞分泌的物质中,内皮素(ET-1)和一氧化氮(NO)在内皮细胞的功能中起重要作用,ET-1 为收缩血管物质,NO 为舒张血管物质,是机体血压稳定及血循环功能正常的关键物质,在代谢综合症导致的动脉粥样硬化的病理过程中起重要作用。

[0038] 根据内皮细胞功能损伤在代谢综合症中的作用,检测了重要的内皮功能因子 ET-1。组装的能量代谢系统,相比 2D 培养系统和缺乏胰岛的 3D 系统,模型中一氧化氮(NO)和内皮素(ET-1)的分泌变化也更为接近体内的真实情况,罗格列酮可改善病理诱导情况下 NO 和 ET-1 的分泌紊乱。从而进一步证明了该模型对筛选代谢综合症疾病中的心血管类疾病药物的适用性。

[0039] 罗格列酮是目前市场上仅有的几种被证明对代谢综合症类疾病有广泛药理作用的药物,这一结果充分证明了,组装的能量代谢系统在筛选代谢综合症药物的潜力,同时这些实验也提出了运用模型进行药物筛选的方法。

[0040] 本发明以细胞组装技术和干细胞技术建立药物筛选模型,基于物理交联,化学交联和生物学交联的分步交联工艺,相比物理和化学交联技术,生物交联技术稳定可靠,既可以控制其固化又可以控制降解。根据这一技术完成适合体外生理系统模型构建的细胞-成形材料的选择和配比、材料后处理工艺、系统组装流程设计。

[0041] 建立了以脂肪细胞,内皮细胞和胰岛为主的体外能量代谢系统建模框架。设计了

用以指导构建能量代谢系统模型的三维分级结构模型。应用细胞组装技术,完成了设计结构的组装。研究表明模型比平面培养的脂肪细胞、胰岛细胞、内皮细胞能更好的仿真体内的生理病理情况。

[0042] 基于脂肪干细胞起源和分化的基本理论,实验设计了定向分化脂肪干细胞的方法。研究表明,通过采用分步控制和精确诱导的方法,可以将三维结构材料内部的细胞分化为脂肪细胞,结构内部通道表面的细胞分化为内皮细胞,而分化出的内皮细胞在通道表面自组装成内皮层样的结构。

[0043] 从糖脂代谢的生理意义和在能量代谢过程中的重要性出发,选择了葡萄糖消耗作为糖脂代谢标志物,并建立相应的检测方法。组装的能量代谢系统模型相比 2D 培养系统和缺乏胰岛的 3D 系统,其糖脂代谢更接近体内真实情况,长时间高浓度葡萄糖诱导下更容易产生糖尿病的病理状态,罗格列酮的药理作用更为显著。

[0044] 从内皮细胞功能紊乱在代谢综合症病理过程中的重要性出发,选择了 ET-1 和 NO 作为内皮细胞功能紊乱标志物,并建立相应的检测方法。组装的能量代谢系统,相比 2D 培养系统和缺乏胰岛的 3D 系统,模型中 NO 和 ET-1 的分泌变化更为接近体内的真实情况,长时间高浓度葡萄糖诱导下更容易产生代谢综合症的病理状态,罗格列酮的药理作用更为显著。

[0045] 本模型和建立模型的技术,在药物研究领域有广泛的应用前景,将使体外药物实验更系统、准确接近体内实验,可弥补高通量筛选技术低成功率的缺陷,降低药物开发成本和风险,推动 21 世纪威胁人类健康的主要疾病代谢综合症 (Metabolic syndrome, MS) 的机制和药物研究。

[0046] 下面结合具体实施方式对本发明作进一步说明,本发明的保护范围并不局限于实施例,凡是根据本发明公开的内容或原理实施的任何本领域的等同替换,均属于本发明的保护范围。

附图说明

[0047] 附图 1 为不同条件下的葡萄糖摄取实验其中 2D :2D 培养系统 ;3D :3D 培系统 ;3D+ β -cell :组装了胰岛的 3D 培养系统。Normal :正常培养 ;HG :高浓度葡萄糖 (15mM) 培养 7d ;HG+ROS :第 11 天加罗格列酮 (3 μ g/mL)。Data are mean $\pm$ s. d. , n = 6.

[0048] 图 2 为代谢综合症病理模型下内皮细胞内皮素分泌。其中 2D :2D 培养系统 ;3D :3D 培系统 ;3D+ β -cell :组装了胰岛的 3D 培养系统。HG :高浓度葡萄糖 (15mM) 培养 5d ;HG+ROS :第 12 天加罗格列酮 (3 μ g/mL) ;HG+anti-insulin :第 13 天加 anti-insulin。Data are mean $\pm$ s. d. , n = 6.

[0049] 图 3 为代谢综合症病理模型下内皮细胞 NO 分泌。其中 2D :2D 培养系统 ;3D :3D 培系统 ;3D+ β -cell :组装了胰岛的 3D 培养系统。HG :高浓度葡萄糖 (15mM) 培养 5d ;HG+ROS :第 12 天加罗格列酮 (3 μ g/mL) ;HG+anti-insulin :第 13 天加 anti-insulin。Data are mean $\pm$ s. d. , n = 6.

具体实施方式

[0050] 实施例 1 种子细胞培养

[0051] 选择来源于大鼠的脂肪干细胞作为构成系统基础的种子细胞,脂肪干细胞为多能干细胞,能向脂肪细胞、成骨细胞、肌肉细胞等定向分化。

[0052] (1) 大鼠(100-150g)腹腔注射戊巴比妥钠麻醉后,用70%乙醇浸泡10min,无菌取腹部皮下脂肪组织,迅速放入无菌的烧杯内,转移入超净台;

[0053] (2) 上述操作完成后,在超净台内,用止血钳剔除脂肪组织上的结缔组织和血块,用D-Hank's溶液(Ca^{2+} , Mg^{2+} -free Hank's, pH7.4):8.175g NaCl,0.403g KCl,0.114g Na_2HPO_4 ,溶于950mL重蒸水,加HEPES(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid,4-羟乙基哌嗪乙磺酸)调pH值,定容至1L)清洗三遍,转入新的烧杯中,将脂肪组织剪成直径 $2\times 2\text{mm}$ 的小块,加入D-Hank's溶液,转移到离心管中,1500rpm离心10分钟;

[0054] (3) 轻轻吸取上层漂浮的脂肪组织到烧杯中,然后加入2mL的0.1%胶原酶(II型)溶液,37℃消化45min,用250-mm的尼龙滤网过滤消化液,过滤后的液体转移到离心管中,1000rpm离心10分钟;

[0055] (4) 吸去上层成熟的脂肪细胞,沉积的细胞用D-Hank's溶液再次配成细胞悬液,用25-mm的尼龙滤网再次过滤,滤液1000rpm离心10分钟;

[0056] (5) 去除上清,加入含15%FCS(胎牛血清)的DMEM(Sigma)培养基,吹打散开所有细胞团,记数,调整细胞浓度到 $1.5\sim 3\times 10^5\text{cells/mL}$,接种于 25cm^2 培养瓶中(预先用0.2%明胶浸泡处理过);培养于37℃二氧化碳恒温培养箱中;

[0057] (6) 培养箱内孵育12小时后,轻轻晃动培养瓶,使未粘附的物质(组织和细胞碎片)悬浮起来,倾倒掉培养液,PBS轻轻洗涤一次,加入新的含15%FCS的DMEM培养基继续培养。

[0058] (7) 一般三天左右,细胞达到单层汇合,细胞汇后,进行常规传代培养;

[0059] (8) 传代:吸去培养液,加入0.2%的胰酶溶液1mL,迅速洗涤瓶壁后吸去,再加入0.2%的胰酶溶液1mL,37℃孵育约5min,显微镜观测,待80%的细胞变圆后,轻轻吸去胰酶溶液,迅速加入含15%FCS的DMEM培养基终止消化;吹打培养瓶壁,再次配成细胞悬液;调整细胞浓度到 $1.5\sim 3\times 10^5\text{cells/mL}$,接种于新培养瓶中。

[0060] (9) 细胞可以正常传代培养,每三天传代一次。

[0061] 实施例2 大鼠胰岛的分离和培养

[0062] (1)SD大鼠,戊巴比妥钠(30mg/kg)肌肉注射麻醉。消毒,剖腹,显露胰腺及胆总管,在近十二指肠的胆总管远端、胆总管近肝门处经后面各穿一缝线,暂不结扎。

[0063] (2) 于胆总管中段向远侧顺行插入4.5号针头(已连接装有预温消化分离液的注射器),结扎胆总管近肝门处缝线,向胆总管内推注少量消化分离液,使胆总管内的胆汁排入十二指肠腔,之后结扎胆总管远端缝线,将预温的5%胶原酶溶液10-15ml缓慢逆行注入胰管内,使胰腺充分膨胀。

[0064] (3) 迅速完整摘取胰腺,移入50ml锥形瓶中(其内装有预温的上述消化分离液6-10ml),并置于38℃水浴中轻轻摇动(25-30)min,20目不锈钢网过筛,加入冰冷的Hanks液(含10%新生牛血清,NCS),终止消化。

[0065] (4)4℃,1000r/min离心3min,弃上清,同法洗2次。未消化胰腺组织继续上述步骤,直至组织完全消化。沉淀物用Ficoll 400密度梯度离心法分离,依次加入Hank液配制的浓度分别为25%,23%,20%和11%Ficoll液。

[0066] (5) 4℃, 1000r/min 离心 20min, 在 (23-20)% 和 (20% -11%) 界面收集胰岛, 经 Hanks 液洗 3 次, 加入新的含 10% FCS 的 DMEM 培养基培养备用。

[0067] 实施例 3 多细胞系统模型构建过程

[0068] (1) 明胶, 海藻酸钠, 纤维蛋白原和细胞共混材料制备: 将明胶溶于 PBS 缓冲液中, 形成 20% 的溶液, 将海藻酸钠溶解于 PBS 缓冲液中, 形成 5% 溶液, 分别用 NaOH 中和残余醋酸, 调节 pH 值到 7.1, 70℃ 烘箱中间歇式灭菌。无菌条件下将纤维蛋白原溶解于 DMEM 培养液中, 形成 5% 的溶液。临用时将三种材料以 1 : 1 : 1 均匀共混。将材料和培养的脂肪干细胞混合, 得到浓度约为 1×10^7 /mL 脂肪干细胞 - 复合材料共混材料。

[0069] (2) 能量代谢系统的组装由系统基础组装和胰岛组装两步构成。将脂肪干细胞 / 复合材料共混材料注入 1mL 的一次性注射器, 置于 4℃ 冰箱预冷 30 分钟以上;

[0070] (3) 选用殷华公司的 Cell Assembly II 设备, 在成形室内固定已灭菌的成形底板, 打开成形室温控开关使成形室降温, 实时监测温度, 待温度降低到 6℃ 时, 安装注射器及固定喷头;

[0071] (4) 由 Solidworks 设计 3D 模型及选定的成形参数直接驱动组装成形, 系统三级结构的 CAD 模型设计为 10mm×10mm×3mm 立方体结构, 次级结构特征尺寸为 300mm, 传输特征尺寸为 350mm, 行列数 $n = 15$ 。根据次级结构特征尺寸及材料对应不同尺寸喷头膨胀率, 选用型号 6# 的喷头。扫描速度 30mm/s, 挤出流量 $1.2\text{mm}^3/\text{s}$ 。

[0072] (5) 成形完成后得到具有 82% 孔隙率的含有细胞的三维结构体。将结构体储存于无菌 4℃ 的环境内, 1 小时内进行成形后处理。

[0073] (6) 将组装好的结构体浸入到 5% 灭菌氯化钙溶液交联 1 分钟, 用 DMEM 洗涤三次, 然后用 100U/mL 纤维蛋白酶交联 10min;

[0074] (7) 从成形底板切割结构体, 转移到培养皿中, 加含有 10% FCS, $1\mu\text{mol/L}$ insulin, 50ng/mL EGF-1 and 50U/mL aprotinin 的 DMEM 培养液, 37℃, 5% CO_2 环境下培养 3d。

[0075] (8) 培养 3 天后, 培养液转换为含有 10% FCS, $1\mu\text{M}$ insulin, $1\mu\text{M}$ dexamethasone, 0.5mmol/L, isobutyl-methylxanthine (IBMX; Sigma), 50u/mL aprotinin 的 DMEM 培养液, 37℃, 5% CO_2 环境下培养 3d。

[0076] (9) 在第 6 天, 用注射器 (4# 针头) 吸取培养的结构完整的 10 个胰岛细胞, 定位组装在结构体内。隔日换液, 收集培养上清液 0.5mL 放入试管封存, -20℃ 冰箱冻存待测。

[0077] 对照实验: 组装完毕后, 培养皿中的多细胞系统, 先加含有 10% FCS, $1\mu\text{M}$ insulin, $1\mu\text{M}$ dexamethasone, 0.5mmol/L, isobutyl-methylxanthine (IBMX; Sigma), 50u/mL aprotinin 的 DMEM 培养液, 37℃, 5% CO_2 环境下培养 3d。培养 3 天后, 培养液转换为含有 10% FCS DMEM, 10% FCS, $1\mu\text{mol/L}$ insulin, EGF and 50U/mL aprotinin 的 DMEM 培养液, 37℃, 5% CO_2 环境下培养 3d。在第 6 天, 用注射器 (4# 针头) 吸取培养的结构完整的 10 个胰岛细胞, 定位组装在结构体内, 隔日换液。

[0078] 在荧光显微镜下观察经不同处理步骤培养的细胞组装体, CD31 染色和油红 O 双染。对于先用 EGF 培养诱导过的细胞组装体, 材料内部的脂肪干细胞分化为脂肪细胞 (红色), 而通道表面只有少数细胞分化为脂肪干细胞。对于未先用 EGF 诱导培养的细胞组装体, 可见通道表面的细胞也大量分化为脂肪细胞。这一结果显示, 在我们设计的分化条件诱

导控制下,先用 EGF 诱导能导致通道表面的脂肪干细胞先分化为内皮细胞,这些终末分化的细胞将失去分化为脂肪细胞的能力,导致接着用地塞米松、IBMX 诱导培养,只有材料内部的脂肪干细胞能分化为成熟的脂肪细胞。相反的,如果先用地塞米松、IBMX 诱导,将会导致通道表面的脂肪干细胞先分化为成熟的脂肪细胞,失去分化为内皮细胞的能力。这一结果证明,可以通过控制诱导分化条件的方法,精确控制结构体中不同位置脂肪干细胞的分化,通道表面的脂肪干细胞分化为内皮细胞,并在通道表面自组装成内皮样结构,构成选择性透过内分泌因子的生物屏障,基质材料内部的脂肪干细胞则分化为脂肪细胞,形成类似于体内脂肪细胞位置结构的生理系统仿真模型。

[0079] 实施例 4 代谢综合症病理模型的构建以及在药物筛选中的应用

[0080] (1) 组装完成后的多细胞系统,用含 10% FCS, normal glucose (5mM) 的 DMEM 培养液, 37℃, 5% CO₂ 环境下培养 7d, 隔日换液;

[0081] (2) 同时采用高浓度葡萄糖 (15mM) 培养, 诱导产生代谢综合症的病理状态;

[0082] (3) 在第 12 天换液, 37℃, 5% CO₂ 环境下培养 24 小时后, 收集培养上清液 0.5mL 放入试管封存, -20℃ 冰箱冻存待测;

[0083] (4) 在第 13 天, 收集之前的培养液后, 将培养液换成含 10% FCS, 25mM 葡萄糖的 DMEM 培养液, 37℃, 5% CO₂ 环境下培养 24 小时;

[0084] (5) 在第 14 天, 收集培养上清液 0.5mL 放入试管封存, -20℃ 冰箱冻存待测;

[0085] (6) 无胰岛多细胞系统和平面培养对照组, 进行相同的处理;

[0086] (7) 收集的上清液体中的葡萄糖浓度用葡萄糖检测试剂盒监测;

[0087] (8) 葡萄糖消耗, 用未与细胞共培养过的 DMEM 中葡萄糖浓度 (M), 减去培养上清液中葡萄糖的浓度 (N) 表示;

[0088] (9) 葡萄糖消耗率 $C = [M(13d) - N(13d)] / [M(12d) - N(12d)]$

[0089] (10) 未组装胰岛的多细胞系统和 2D 培养系统, 采用相同的方法检测葡萄糖消耗;

[0090] (11) 阳性对照药物罗格列酮 (3 μg/mL) 在培养的第 11 天加入到 high glucose (15mM) 的 DMEM 培养液中。

[0091] 由实验结果 (图 1) 可见, 在 15mM 的葡萄糖刺激下, 相比于平面培养体系, 3D 组装结构中脂肪细胞的葡萄糖消耗明显增加, 这一结果显示 3D 组装结构中的脂肪细胞, 由于培养环境更接近于真实体内情况, 更具有活力。在同是 3D 培养环境下, 组装胰岛的 3D 系统的葡萄糖消耗是没有组装胰岛的系统的 3 倍。这是由于组装的胰岛可以对高糖刺激应答, 分泌大量胰岛素, 而胰岛素可以刺激脂肪细胞摄取葡萄糖合成脂肪。

[0092] 在用 15mM 葡萄糖培养液诱导培养 7 天后, 三个培养系统的脂肪细胞葡萄糖消耗都有下降, 但组装胰岛的 3D 系统葡萄糖消耗下降最为显著。这是由于长时间的高浓度葡萄糖培养能同时诱导脂肪细胞产生胰岛素抵抗、胰岛 β 细胞对葡萄糖应答敏感性下降, 两种效应的叠加, 导致高浓度葡萄糖刺激的葡萄糖消耗明显下降, 这一点是符合体内真实情况的。因此证明组装胰岛的 3D 系统更容易诱导产生显著的病理变化, 适合病理建模。对于高浓度葡萄糖长时间培养诱发的葡萄糖消耗下降的病理情况下, 罗格列酮对于诱发的病理改变的治疗作用, 组装的能量代谢系统比 2D 培养系统和缺乏胰岛的 3D 组装系统更为显著。罗格列酮是目前市场上仅有的几种被证明对代谢综合症类疾病有广泛药理作用的药物, 这一结果充分证明了, 组装的能量代谢系统在筛选代谢综合症药物的潜力, 同时这些实验也提出

了运用模型进行筛选的方法。

[0093] 实施例 5 代谢综合症病理模型下的内皮功能紊乱实验研究

[0094] 多细胞系统 NO 分泌检测

[0095] (1) 组装完成后的多细胞系统,用含 10% FCS,5mM 葡萄糖的 DMEM 培养液,37℃,5% CO₂ 环境下培养,隔日换液;

[0096] (2) 接种在平面培养基上的脂肪细胞用相同的步骤处理;

[0097] (3) 在第 11 天换液,37℃,5% CO₂ 环境下培养 2 天后,收集培养上清液 1mL 放入试管封存,-20℃冰箱冻存待测,作为 NO 的基础分泌水平;

[0098] (4) 在第 13 天,培养液换为含 10% FCS,25mM 葡萄糖的 DMEM 培养液,37℃,5% CO₂ 环境下培养 2 天后,收集培养上清液 1mL 放入试管封存,-20℃冰箱冻存待测;

[0099] (5) 样本中 NO 的浓度用基于 NO 还原酶方法的 NO 检测试剂盒检测,按照检测试剂盒的说明书操作;

[0100] (6) 抗胰岛素实验,anti-insulin 在第 13 天加入培养液;

[0101] (7) 未组装胰岛的多细胞系统和 2D 培养系统,采用相同的方法检测 NO 的分泌;

[0102] (8) 阳性对照药物罗格列酮 (3 μg/mL) 在培养的第 10 天加入 DMEM 培养液中。

[0103] 多细胞系统 ET-1 分泌检测

[0104] (1) 组装完成后的多细胞系统,用含 10% FCS,5mM 葡萄糖的 DMEM 培养液,37℃,5% CO₂ 环境下培养,隔日换液;

[0105] (2) 接种在平面培养基上的脂肪细胞用相同的步骤处理;

[0106] (3) 在第 11 天换液,37℃,5% CO₂ 环境下培养 2 天后,收集培养上清液 1mL 放入试管封存,-20℃冰箱冻存待测,作为 NO 的基础分泌水平;

[0107] (4) 在第 13 天,培养液换为含 10% FCS,25mM 葡萄糖的 DMEM 培养液,37℃,5% CO₂ 环境下培养 2 天后,收集培养上清液 1mL 放入试管封存,-20℃冰箱冻存待测;

[0108] (5) 样本中 ET-1 的浓度用基于 ELLSA 方法的 ET-1 检测试剂盒检测,按照检测试剂盒的说明书操作;

[0109] (6) 抗胰岛素实验,anti-insulin 在第 13 天加入培养液;

[0110] (7) 未组装胰岛的多细胞系统和 2D 培养系统,采用相同的方法检测 ET-1 的分泌;

[0111] (8) 阳性对照药物罗格列酮 (3 μg/mL) 在培养的第 10 天加入 DMEM 培养液中。

[0112] ET-1 分泌的紊乱是代谢综合症内皮功能损伤的重要标志。实验结果 (图 8) 显示,在高糖刺激下,相比于平面培养体系,3D 培养体系中脂肪细胞的 ET-1 分泌明显要高,这一结果显示由于培养环境更接近于真实体内情况,3D 培养体系中的脂肪细胞,对高糖刺激更敏感,分泌 ET-1 的活力更强。在同样的 3D 培养环境下,组装了胰岛的 3D 培养系统的 ET-1 分泌比没有组装胰岛的系统显著增高。体内研究证明,胰岛素能刺激内皮细胞合成和分泌内皮素 (ET),且与胰岛素浓度呈正相关。胰岛素抵抗状态下,胰岛素与内皮细胞膜下的受体结合,激活酪氨酸激酶,刺激 ET 的 mRNA 转录,使 ET 合成分泌增加。ET 作为目前已知的最强的血管收缩剂,可引起外周阻力增加,促进肾小管对钠水重吸收,还可促进平滑肌及心肌增殖,引起心血管重塑。为了验证是否是组装体中的胰岛分泌的胰岛素促进了系统的 ET-1 分泌,我们在培养体系中加入胰岛素抗体。研究结果证明加入胰岛素抗体可抑制组装有胰岛的系统的 ET-1 分泌,但未将 ET-1 分泌水平抑制到未组装胰岛的系统的水平,说明还有其

它机制参与该过程,胰岛素抗体对未组装胰岛系统的 ET-1 分泌没有作用。这一结果证明了是系统中组装的胰岛分泌的胰岛素,促进了系统中内皮细胞 ET-1 的分泌。这也证明了系统组装的脂肪-胰岛素内分泌轴形成了预期的反馈调控作用。

[0113] 在加入罗格列酮的情况下,相比平面培养系统,3D 培养系统中脂肪细胞 ET-1 分泌明显降低,ET-1 分泌的减少有助于内皮的舒张,这一作用和体内罗格列酮的药理作用是一致的,模型可检测出罗格列酮的这一药理作用,证明该模型可从该靶向角度筛选药物。NO 在内皮细胞的功能中起重要作用,NO 不仅参与调节血管紧张度,调节血压,而且参与内皮损伤保护和血管内神经传导。NO 释放的紊乱是代谢综合症内皮功能损伤的重要标志。实验结果显示,在高糖刺激下,NO 的分泌除了组装有胰岛的 3D 系统显著增加外,2D 培养系统和无胰岛的 3D 系统的内皮细胞 NO 分泌都没有明显的改变。体内研究证明,患有胰岛素抵抗综合症的个体会出现内皮细胞分泌 NO 异常的情况,胰岛素可通过刺激内皮细胞增加 NO 的释放,而产生直接的舒张血管的作用。

[0114] 为了验证是否是组装体中的胰岛分泌的胰岛素促进了系统的 NO 分泌,我们在培养体系中加入胰岛素抗体,研究结果证明加入的胰岛素抗体可抑制组装有胰岛的系统的 NO 分泌,并且将 NO 分泌水平抑制到未组装胰岛系统的水平,胰岛素抗体对未组装胰岛系统的 NO 分泌没有作用,这一结果证明了是系统组装的胰岛分泌的胰岛素,促进了系统中内皮细胞 NO 的分泌。同时也证明了系统组装的脂肪-胰岛素内分泌轴形成了预期的反馈调控作用。值得注意的是,胰岛素可同时刺激舒血管物质 NO 分泌的增加和缩血管物质 ET-1 分泌的增加,在体内正常情况两者同时增加相互拮抗达到平衡,代谢综合症患者的患有胰岛素抵抗,而胰岛素抵抗状态下,发生内皮细胞信号传递异常,NO 的增量明显减少,NO/ET 平衡失调,导致血管张力增加,血压升高。

[0115] 在加入罗格列酮的情况下,相比平面培养系统,3D 培养系统中脂肪细胞 NO 分泌明显增高,NO 的增加有助于内皮的舒张,这一作用和体内罗格列酮的药理作用是一致的。罗格列酮对组装有胰岛的 3D 培养系统 NO 的增加最为显著,这一结果和真实人体的情况是一致的,证明模型可检测出罗格列酮的这一药理作用,证明该模型可从该靶向角度筛选药物。

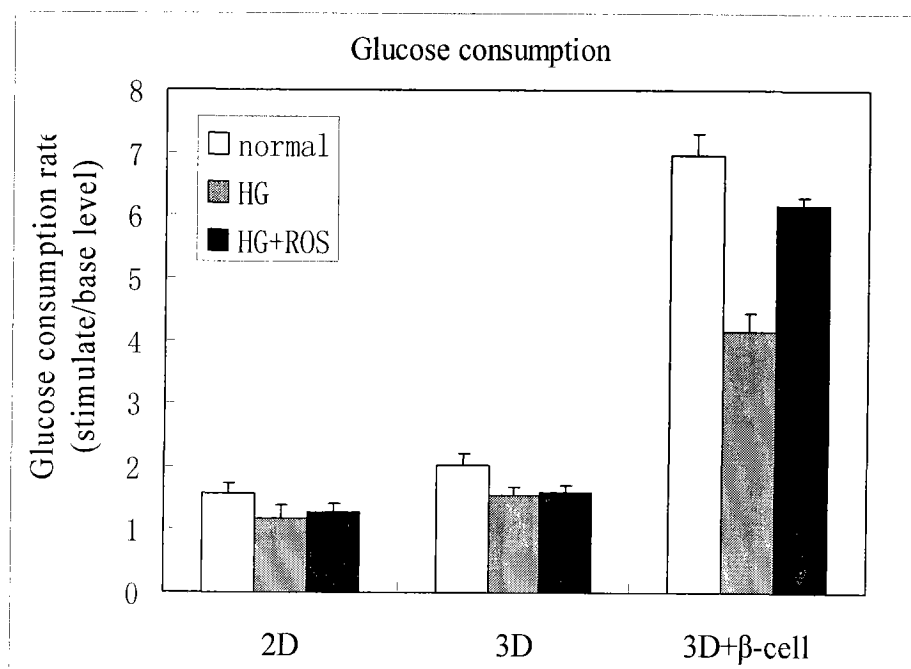


图 1

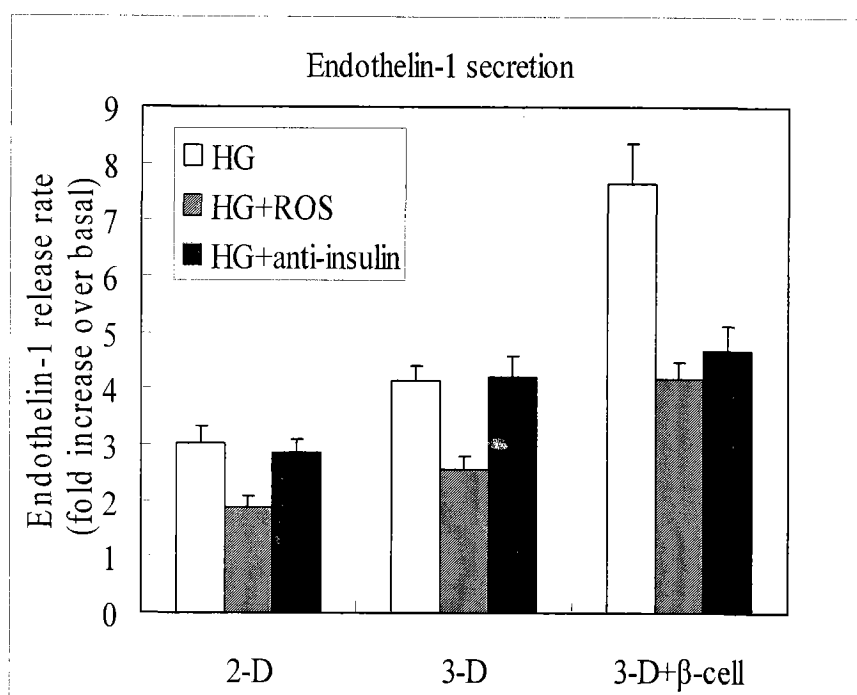


图 2

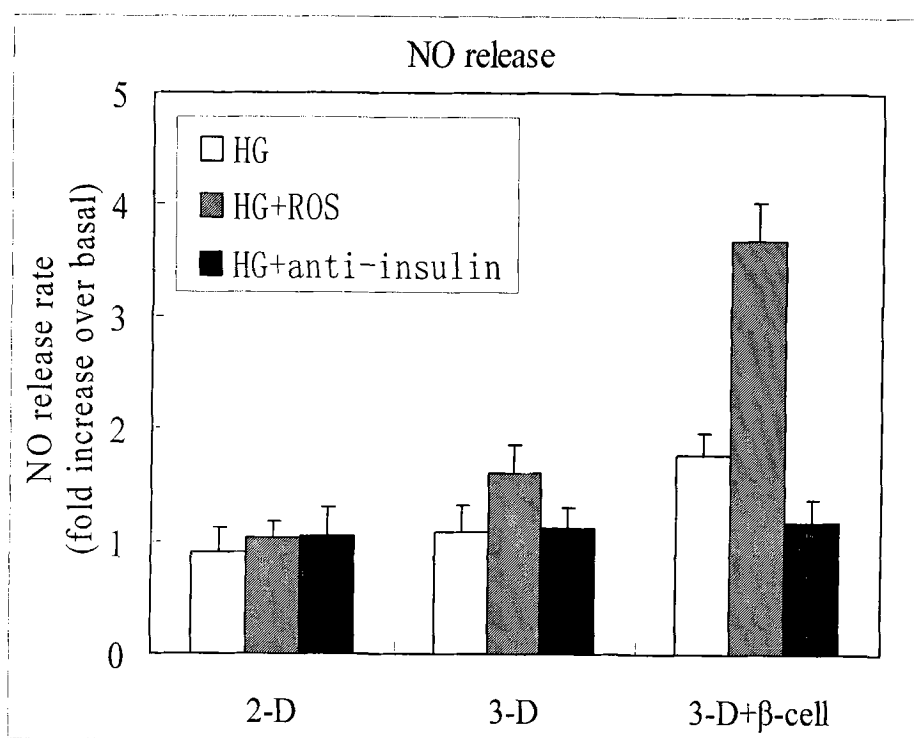


图 3

专利名称(译)	一种代谢综合征体外病理模型的构建及其在药物筛选中的应用		
公开(公告)号	CN101768572A	公开(公告)日	2010-07-07
申请号	CN200910155754.3	申请日	2009-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	杭州电子科技大学		
申请(专利权)人(译)	杭州电子科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	杭州电子科技大学		
[标]发明人	徐铭恩 王小红 葛亚坤		
发明人	徐铭恩 王小红 葛亚坤		
IPC分类号	C12N5/0775 C12N5/071 C12Q1/26 C12Q1/02 G01N33/53		
代理人(译)	徐飞虎		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于细胞组装技术的代谢综合征病理模型及其在高内涵药物筛选中的应用。通过将脂肪干细胞和仿细胞外基质材料组装形成具有一定孔隙率的含有细胞的三维结构体；通过控制诱导分化条件，使三维结构体内通道表面的脂肪干细胞分化为内皮细胞，基质材料内部的脂肪干细胞则分化为脂肪细胞；将从动物体内分离的胰岛直接组装在三维结构体的空隙中，形成多个调节分泌点。对上述的系统模型给予高浓度的葡萄糖、脂肪酸胰岛素、TNF或脂肪细胞分泌因子等能量代谢调控物长时间刺激，诱导脂肪细胞、胰岛细胞和内皮细胞产生代谢综合征病理症状。并提供一种应用上述的代谢综合征病理模型用于药物筛选的方法。

