

脂肪组织分泌物中蛋白浓度对诱导脂肪干细胞成脂的影响*

李婷^{1,2}, 李勇^{1,2}, 田卫东^{3,4,5}, 郭维华^{3,4}, 于湄³, 李晓东^{1,2△}

1. 重庆医科大学附属口腔医院 口腔颌面外科 (重庆 400015); 2. 口腔疾病与生物医学研究中心重庆市重点实验室 (重庆 401147);
3. 四川大学 口腔疾病研究国家重点实验室 (成都 610041); 4. 四川大学 口腔再生医学国家地方联合工程实验室 (成都 610041);
5. 四川大学华西口腔医院 口腔颌面外科 (成都 610041)

【摘要】 目的 观察胎牛血清(FBS)对体外培养获取的脂肪组织分泌物(ATE)诱导大鼠脂肪干细胞(ADSCs)成脂能力有无影响,并探讨 ATE 中不同蛋白浓度对诱导大鼠 ADSCs 成脂、细胞增殖和迁移能力的影响。**方法** 培养大鼠 ADSCs 并传代,对 ADSCs 成骨和成神经诱导,采用茜素红染色和神经丝蛋白(NF)免疫荧光检测鉴定。含有 FBS 和无 FBS 的培养基对脂肪组织块进行培养并收集 ATE,对第 4 代 ADSCs 进行诱导,第 7 d 时油红染色鉴定并计算成脂率;收集无 FBS 培养基获取的 ATE,分为不同蛋白质量浓度组(100 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 组),对第 4 代 ADSCs 进行成脂诱导,观察各组成脂率;并观察不同蛋白质量浓度组对 ADSCs 细胞增殖和迁移的影响。**结果** 培养的 ADSCs 成骨和成神经诱导后茜素红染色和 NF 免疫荧光染色阳性;获取 ATE 时添加或不添加 FBS,在第 3 d 时均能诱导 ADSCs 成脂,第 7 d 时的成脂率差异无统计学意义;ATE 500 $\mu\text{g/mL}$ 组较 100 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 组成脂率高(P 均 <0.05),细胞培养 2 d 后,3 个不同蛋白质量浓度组均抑制细胞增殖,不同蛋白质量浓度间细胞抑制率差异无统计学意义(P 均 >0.05);ATE 中不同蛋白质量浓度对细胞的迁移无影响。**结论** 无 FBS 的培养基获取的 ATE,短期内对 ADSCs 成脂能力没有影响;ATE 蛋白浓度与 ADSCs 成脂率有关。

【关键词】 脂肪组织分泌物 脂肪干细胞 浓度

Influence of Fetal Bovine Serum Protein Concentration in Adipose Tissue Extract on Adipogenic Differentiation of Adipose Derived Stem Cells LI Ting^{1,2}, LI Yong^{1,2}, TIAN Wei-dong^{3,4,5}, GUO Wei-hua^{3,4}, YU Mei³, LI Xiao-dong^{1,2△}. 1. The Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University of Stomatology, Chongqing 400015, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Research Center for Oral Diseases and Biomedical Science, Chongqing 400015, China; 3. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Engineering Center in Oral Biomechanics, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 5. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: 185640367@qq.com

【Abstract】 Objective To observe whether fetal bovine serum (FBS) will affect the adipogenic ability of adipose derived stem cells (ADSCs) induced by adipose tissue extract (ATE), and to explore the effects of different FBS protein concentrations in ATE on adipogenic ability, cell proliferation and migration of ADSCs. **Methods** Rat ADSCs were cultured, passaged, and then subjected to osteogenic and neural induction. The adipose explants were cultured in culture medium with or without FBS, then ATE was collected to induce passage four (P4)-ADSCs, which were subsequently detected with oil red staining on the 7th day and the adipogenic ratio was calculated. Different concentrations of ATE without FBS (100 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ and 500 $\mu\text{g/mL}$) were used to induce P4-ADSCs before the adipogenic events, and the adipogenic ratio of each concentration group was observed. The effect of different protein concentrations on ADSCs proliferation and migration was also observed. **Results** Alizarin red staining and NF immunofluorescence staining were positive after the osteogenic and neural induction of cultured ADSCs. Either ATE with or without FBS was able to induce adipogenic differentiation of ADSCs on the 3rd day and there was no significant differences of adipogenic differentiation between ATE with FBS and without FBS on the 7th day. The adipogenic ratio of 500 $\mu\text{g/mL}$ group was higher than that of 100 $\mu\text{g/mL}$ group and 250 $\mu\text{g/mL}$ group

* 国家自然科学基金(No. 30973348)、教育部博士点基金(No. 20110181120067 及 No. 20110181110089)、四川省科技支撑计划(No. 2012SZ0013 及 No. 12ZC0493)、四川省基础研究基金(No. 2011JY0125 及 No. 12JC0212)和重庆市卫生局科研项目(No. 05-2-065)资助

△ 通讯作者, E-mail: 185640367@qq.com

($P < 0.05$). After two days of induction, all the three different protein concentrations could inhibit cell proliferation, and different protein concentrations in ATE had no effect on the migration of ADSCs. **Conclusion** ATE obtained from culture medium without FBS has no effect on adipogenic capacity of ADSCs in a short period of time. The adipogenic ratio of ADSCs is associated with protein concentration in ATE.

【Key words】 Adipose tissue extract Adipose derived stem cells Concentration

脂肪组织包含脂肪干细胞、脂肪细胞、内皮细胞和巨噬细胞等,如今已被公认为能量存储和内分泌器官^[1],并能释放多种细胞因子,调节细胞间信号传导。在脂肪干细胞成脂的研究中,生理性的诱导因子一直是研究热点。在前期研究中,我们发现脂肪组织分泌物能诱导脂肪干细胞成脂分化^[2]。在蛋白质研究中,无论是质谱分析还是蛋白质芯片等技术的应用,蛋白样品中混杂的非目的蛋白的高丰度蛋白是我们后续试验最大的障碍之一。因此在脂肪组织分泌物(ATE)收集过程中胎牛血清(FBS)的作用值得探讨。脂肪组织块原代培养时所收集的 ATE 能诱导成脂,但其中的蛋白浓度并未明确界定,这对应用 ATE 进行成脂方向的研究产生了一定的影响。如何选择 ATE 的作用浓度,何种作用浓度为最佳,成为急需解决的问题。本研究旨在观察不同浓度 ATE 对大鼠脂肪干细胞(ADSCs)诱导成脂生长状态的影响,以探讨其最适作用浓度,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物与主要试剂

2 周龄 SD 大鼠,雌雄不限(四川大学口腔疾病研究国家重点实验室动物中心提供),改良 α -MEM 培养基、FBS(Hyclon 公司);3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、吡啶美辛(INN)、 β -甘油酸钠、丁羟基茴香醚(MSDS)、佛斯扣林、丙戊酸(Sigma 公司);地塞米松(天津药业焦作有限公司);氢化可的松(Aladdin 公司);抗坏血酸(四川康特能药业有限公司);胰岛素(诺和诺德公司);胰蛋白酶、KCl(天津博迪化工股份有限公司);二甲基亚砜(Amresco 公司);荧光染料 DAPI(Wolsen 公司);油红 O、茜素红(Sigma 公司);IgG-TRITC 荧光标记羊抗鼠多克隆抗体(中杉金桥公司);神经丝蛋白(neurofilament protein, NF)兔源单克隆抗体、3KDa 超滤管(Millipor 公司)。

1.2 ADSCs 的获取及多向分化能力鉴定

1.2.1 ADSCs 的获取 取 2 周龄 SD 大鼠断颈处死,750 mL/L 乙醇浸泡 6 min,移入超净台内。用

组织剪剪开腹直线皮肤,更换眼科剪、眼科镊,分离取出腹股沟处的脂肪垫,置入 0.01 mol/L PBS(含 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素)中,去除肌肉、血管、淋巴结等其他组织。再用 PBS 清洗 3 遍,置入小皿内剪碎为约 2 mm $\times$ 2 mm 大小的组织块,用 0.01 mol/L PBS(含 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素)洗涤 3 次。纱布滤干洗过的组织块,移入 75 mL 培养瓶底并涂布均匀,每瓶放入 0.2 g 脂肪组织块,置入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱内培养,贴壁后加入 7 mL 培养基(含改良型 α -MEM、100 mL/L FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素),37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱内培养。每 3 d 更新培养基,待细胞长满瓶底后进行传代培养^[3]。

1.2.2 ADSCs 多向分化及鉴定 成骨诱导:第 4 代脂肪干细胞融合到 90%时,加入化学成骨诱导剂(α -MEM 培养基、100 mL/L FBS、10 mmol/L β -甘油酸钠,0.05 mmol/L 维生素 C 和 100 mmol/L 地塞米松),每 2 d 换液 1 次,共诱导 21 d。鉴定:采用茜素红染色检测鉴定。成骨诱导完成后,去除培养基,PBS 洗涤 2 次。40 g/L 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤;1 g/L 茜素红溶液处理 30 min,洗涤。倒置显微镜下观察。

成神经诱导:第 4 代脂肪干细胞融合到 70%时,加入化学成神经诱导剂[无血清 α -MEM、MSDS(2 μ mol/mL)、KCl(0.25 mmol/mL)、丙戊酸(20 mmol/L)、佛斯扣林(0.1 μ mol/mL)、氢化可的松(10 μ mol/L)、胰岛素(5 μ g/mL)]处理 5 h,吸去培养基,换成含 100 mL/L FBS 的 α -MEM 培养基,继续培养 24 h。鉴定:采用细胞免疫荧光检测鉴定。成神经诱导完成后,去除培养基,PBS 洗涤两次。40 g/L 多聚甲醛固定 30 min;10 mL/L TritonX-100 处理 10 min;用 10 g/L BSA 封闭 30 min;加入抗体 NF(稀释比例 1:50),室温 2 h 孵育;加入二抗 IgG-TRITC(稀释比例 1:200),避光孵育 2 h。以上各步骤均用 PBS 洗涤。用 DAPI 染色,最后在荧光显微镜下观察。

1.3 不同方式获取 ATE 对成脂的影响

1.3.1 不同方式获取 ATE 按 1.2.1 的方法将脂

肪组织块移入培养瓶底贴壁后,加入 5 mL 培养基(含改良型 α -MEM、100 mL/L FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素),置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱内培养,3 d 后收集培养基即为 ATE1;加入 5 mL 培养基(含改良型 α -MEM、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素),37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO_2 孵箱内培养,3 d 后收集培养基,加入 100 mL/L FBS 即作为培养 ATE2。获取的 ATE1、ATE2 均用 200 目筛漏过滤,再用 22 μ m 过滤器过滤,-70 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.3.2 成脂分组诱导 取第 4 代 ADSCs,将其稀释为 1×10^4 /mL,24 孔板每个孔中加入 2 mL,ADSCs 长满 90% 时,用收集到的 ATE1、ATE2 分别诱导。阴性对照组用常规培养基,阳性对照组用化学成脂诱导剂(α -MEM、100 mL/L FBS、0.4 μ g/mL 地塞米松、5 μ g/mL 胰岛素、72 μ g/mL INN 和 111 μ g/mL IBMX)。

1.3.3 油红 O 染色检测 成脂诱导第 7 d 时,终止诱导,去除培养基,PBS 洗涤 3 次,40 g/L 多聚甲醛室温固定 30 min,用 PBS 洗涤 3 次,加入油红 O 工作液(0.4 g 油红 O,加入 100 mL 异丙醇,60 $^{\circ}$ C 水浴溶解,作为油红储存液。用 3 mL 油红储存液中加入 2 mL 双蒸水,过滤后作为油红工作液),室温下 20 min。用 PBS 洗涤 3 次,倒置显微镜下观察。加入 200 μ L 异丙醇,室温,摇床缓慢摇动,30 min。取 100 μ L 移入 96 孔板中,510 nm 下测吸光度(A)值,计算成脂率,成脂率(%)=(实验组 A 值-阴性对照组 A 值)÷(阳性对照组 A 值-阴性对照组 A 值)×100%。

1.4 ATE 不同质量浓度蛋白对 ADSCs 成脂的影响

1.4.1 ATE 不同质量浓度蛋白的制备 预实验发现短期内大鼠脂肪组织块在含 FBS 或不含 FBS 的培养基内释放的 ATE,对 ADSCs 成脂诱导的作用差异无统计学意义,因此我们选不含 FBS 的 ATE 做后续实验。用超滤管将 ATE 进行浓缩。浓缩后用凯基 BCA 蛋白浓度试剂盒进行蛋白质质量浓度检测,制备成 100 μ g/mL、250 μ g/mL、500 μ g/mL ATE 加入常规培养基(含改良型 α -MEM、100 mL/L FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素),待用。

1.4.2 ATE 不同质量浓度蛋白对 ADSCs 成脂的影响 成脂诱导同 1.3.2。分别加入 ATE 100 μ g/mL、250 μ g/mL、500 μ g/mL 蛋白进行诱导。并设置阴性对照和阳性对照,阴性对照组用常规培养基,阳性对照组用化学成脂诱导剂。油红染色与成脂率

检测同 1.3.3。

1.4.3 ATE 不同质量浓度蛋白对 ADSCs 增殖的影响 取生长良好的第 4 代 ADSCs,消化稀释成 1×10^4 /mL 密度的细胞悬液,96 孔板每孔中加入 100 μ L 细胞悬液,培养 24 h 后,去除原培养基,分别更换为 ATE 蛋白 100 μ g/mL、250 μ g/mL、500 μ g/mL 培养基,及阴性对照常培养基继续培养。分别在 1、2、3、4、5 d,向培养板中加入 10 μ L CCK-8 溶液,将培养板放入细胞培养箱中孵育 2 h,用酶标仪检测 450 nm 处 A 值。计算细胞增殖抑制率,抑制率(%)=(阴性对照组 A 值-实验组 A 值)/阴性对照组 A 值×100%。

1.4.4 ATE 不同质量浓度蛋白对 ADSCs 迁移的影响 用记号笔在 6 孔板背后画均匀横线,宽为 1 mm,取生长良好的第 4 代 ADSCs,消化成悬液,按 1×10^5 /mL 的密度接种于 6 孔板中,每孔 3 mL。待细胞长满 80% 时,按孔底横线在孔内划痕,PBS 洗涤 3 次去除划下的细胞。分别加入实验组和对照组培养基,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的孵箱中培养。在 0 h 和 24 h 时在显微镜下观察、拍照。

1.5 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSCs 形态学观察及多向分化能力鉴定

2.1.1 ADSCs 形态学观察 采用组织块培养法获取大鼠 ADSCs,第 2 d 时可见有个别细胞爬出组织块,细胞形态为长梭形,第 7 d 时几乎铺满瓶底,此时进行传代。第 4 代 ADSCs 形态多为长梭形或纺锤型,也可见多角形,贴壁生长(图 1A)。

2.1.2 ADSCs 多向分化能力 成骨诱导 21 d 时进行茜素红染色,可见形成钙化结节(图 1B)。成神经诱导 5 h 后可见 ADSCs 开始向神经细胞方向分化。普通培养基培养 24 h 后,可见细胞胞体回缩,轴突形成(图 1C);荧光免疫染色见绝大部分细胞胞质 NF 表达阳性(图 1D)。

2.2 FBS 对获取 ATE 成脂能力的影响

脂肪组织块培养获取 ATE 过程中,加或不加 FBS 对收集到的 ATE 的成脂能力差异无统计学意义。2 个实验组在第 3 d 时均可见个别细胞成脂分化,第 7 d 时可见部分细胞成脂分化。ATE1、ATE2 成脂率分别为:25.0% $\pm$ 0.9%,28.2% $\pm$ 2.7%,组间差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。

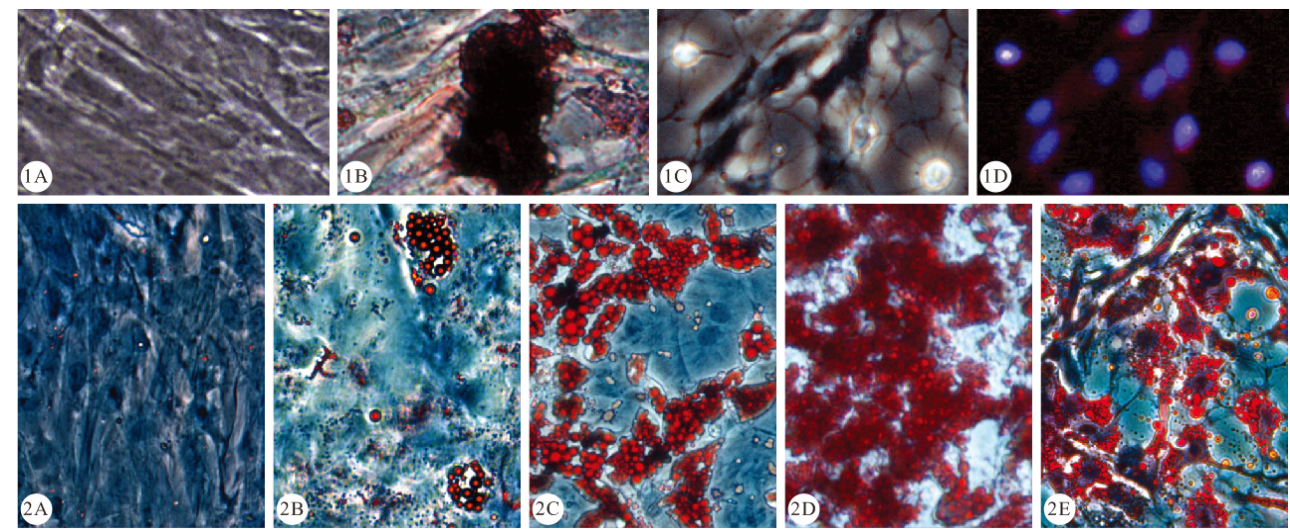


图 1 ADSCs 培养及多向分化能力的鉴定。×100 图 2 ATE 不同质量浓度蛋白诱导 ADSCs 7 d 后油红 O 染色。×200

Fig 1 Culturing and identification of multipotential differentiation ability of ADSCs. ×100 Fig 2 ADSCs induced by different protein content concentrations ATE for 7 days and the Oil red O staining. ×200

1A: Passage four (P4)-ADSCs; 1B: AR-S staining positive after osteogenic differentiation of ADSCs; 1C: Neural differentiation of ADSCs; 1D: NF immunofluorescence staining positive after neural differentiation of ADSCs; 2A: Negative control; 2B,2C,2D: 100 µg/mL, 250 µg/mL and 500 µg/mL ATE; 2E: Positive control

2.3 ATE 不同质量浓度蛋白对 ADSCs 的影响

2.3.1 成脂能力的影响 诱导第 3 d 时实验组均可见个别细胞成脂,第 7 d 时高质量浓度蛋白(500 µg/mL)组的成脂细胞较低质量浓度蛋白组多。100 µg/mL 组 ADSCs 细胞只有少部分细胞成脂,而 500 µg/mL 组大部分细胞均成脂分化(图 2)。实验组细胞成脂分化成簇分布,阳性对照组细胞几乎全部成脂,阴性对照组无细胞成脂。100 µg/mL、250 µg/mL、500 µg/mL 组成脂率分别为:25.2%±0.6%,41.9%±0.8%,87.8%±2.1%,500 µg/mL 组的成脂率较低质量浓度蛋白组的成脂率高,各组间成脂率差异有统计学意义(P 均<0.05)。

2.3.2 细胞增殖的影响 分别培养 2 d 后,ATE 不同质量浓度蛋白对 ADSCs 的增殖均有抑制作用。不同质量浓度蛋白组间细胞增殖抑制率差异无统计学意义(P 均>0.05),见附表。

附表 ATE 不同质量浓度蛋白对细胞增殖抑制率的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)

Time	ATE		
	100 µg/mL (%)	250 µg/mL (%)	500 µg/mL (%)
1 d	-6.2±8.9	-5.4±17.2	1.8±15.4
2 d	33.8±5.7	23.4±2.2	27.4±3.6
3 d	41.4±11.9	39.0±10.8	26.4±9.5
4 d	63.3±6.3	56.3±5.2	57.1±7.2
5 d	58.0±2.4	50.5±7.79	64.2±2.1

2.3.3 细胞迁移的影响 ATE 不同质量浓度蛋白对 ADSCs 的迁移几乎没有影响,见图 3。

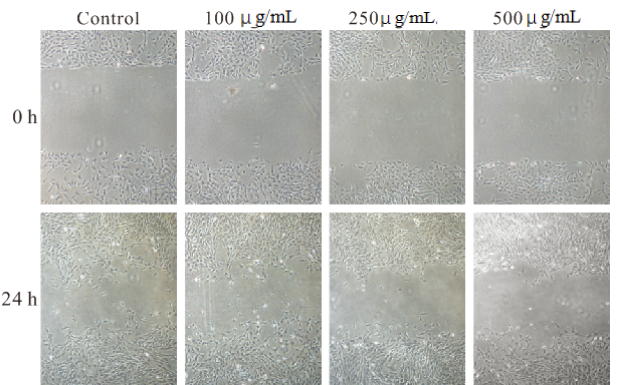


图 3 ATE 不同质量浓度蛋白对 ADSCs 细胞迁移的影响。×100

Fig 3 Influence of different protein content concentrations in ATE on migration of ADSCs. ×100

3 讨论

脂肪组织为 ADSCs 分化为脂肪细胞提供了生理性环境,它所释放的 ATE 已经被证实能够诱导 ADSCs 成脂分化。但是其中所含有成脂因子的成分并不清楚。如今运用于蛋白质研究的方法如蛋白质芯片、质谱分析等,都需要除去高丰度蛋白^[4]。之前的文献报道获取 ATE 的实验方法同 ATE1 获取的方法相同,即在培养基中加入了 FBS^[2]。FBS 一旦加入就会成为高丰度蛋白,为后续对 ATE 中成

脂因子的研究产生巨大的障碍。有研究表明 FBS 对牛脂肪组织分泌脂蛋白酯酶没有影响^[5]。我们的实验发现,短期内大鼠脂肪组织块在含 FBS 或不含 FBS 的培养基内释放的 ATE,对 ADSCs 成脂诱导的作用没有差异,两组成脂时间无差别,7 d 时的成脂率差异无统计学意义。因此以后的实验我们在获取 ATE 的过程中可不必加入 FBS。另外限制外源性蛋白的使用,对以后 ATE 应用于临床也十分有利^[6]。

用脂肪组织块法获取脂肪组织分泌物的过程中不可避免的会对脂肪组织块进行机械性的切割,这就导致部分细胞破裂致使胞内蛋白释放;在获取脂肪组织块的过程中,肉眼下组织块里的毛细血管无法完全去净,其中的血源性蛋白也会缓慢释放出来。因此本实验在这个过程中采用对脂肪组织块多次洗涤,以尽量去除这两种来源的蛋白。

脂肪组织作为能量储存和内分泌器官,通过储存脂肪并分泌细胞因子,如:瘦素、抵抗素、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、视黄醇结合蛋白-4、脂联素等^[7],参与全身的能量代谢。如瘦素能与下丘脑作用,脂联素能保护 β 细胞等。除了脂肪细胞外,脂肪组织还包括:内皮细胞,巨噬细胞,成纤维细胞等^[8],通过各种细胞间交互作用产生各种细胞因子。巨噬细胞分泌因子能促进小鼠胚胎成纤维细胞(3T3-L1)细胞因子的分泌,以及游离脂肪酸和葡萄糖的吸收^[9]。另一方面,瘦素能促进巨噬细胞产生 TNF- α 而脂联素能抑制这一过程^[10]。因此这些内在的交互作用产生的细胞因子可能就是 ATE 中成脂因子的来源。我们的研究表明 ATE 成脂效率与其蛋白质量浓度相关,在本次实验中蛋白质量浓度越高的实验组成脂能力越强。与 Sarkanen 等^[11]实验结果一致,同样条件收集的 ATE 在不同蛋白质量浓度条件下,质量浓度越高其成脂率越高。

成脂分化前,ADSCs 在细胞周期的 G_1 期即 DNA 合成前期发生生长抑制,这时的细胞开始停止生长并且失去了对促有丝分裂介质的反应,称为 G_d 期。此时细胞能在缺少 DNA 合成的情况下获得分化表型。生长抑制之后,细胞立刻重返细胞周期,经过至少两轮的 DNA 复制和细胞加倍,称为无性扩增阶段^[12]。此时的细胞在无性扩增中获取了向成熟脂肪细胞分化的信号和物质蓄积。如转录因子 C/EBP β 在 3T3-L1 细胞无性扩增期间激活组蛋白活性^[13],它可对染色体的结构做出不同的调整,

以此来影响转录因子的结合从而调控分化基因的表达。我们的实验发现 ATE 对 ADSCs 的增殖有抑制作用,与 ADSCs 成脂分化机制相符。

不同质量浓度蛋白的 ATE 对细胞增殖的抑制程度几乎没有变化,表明 ATE 对细胞增殖的影响是一定程度的而不是无限制的;同时 ATE 对细胞迁移没有影响,说明 ATE 对 ADSCs 正常生理活动没有影响,是一种理想的生理性的成脂诱导液。在获取 ATE 时短期内可不用加入 FBS, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ATE 诱导组是较合适的成脂诱导浓度。

尽管 ATE 中所含成脂因子的成分和作用机制仍然未知,但是我们已经为新因子的探索迈出了新的一步。

参 考 文 献

- 1 Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, *et al.* Adipose tissue; the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci*, 2009; 54 (9):1847-1856.
- 2 廖菊荣, 李 杰, 黄 科等. 脂肪分泌物对脂肪间充质干细胞的诱导研究. *四川大学学报(医学版)*, 2012; 43(4):488-492.
- 3 Jing W, Xiao J, Xiong Z, *et al.* Explant culture: an efficient method to isolate adipose-derived stromal cells for tissue engineering. *Artif Organs*, 2011; 35(2):105-112.
- 4 Zhang Y, Li Y, Qiu F, *et al.* Comprehensive analysis of low-abundance proteins in human urinary exosomes using peptide ligand library technology, peptide OFFGEL fractionation and nanoHPLC-chip-MS/MS. *Electrophoresis*, 2010; 31 (23-24): 3797-3807.
- 5 Faulconnier Y, Thevenet M, Flechet J, *et al.* Lipoprotein lipase and metabolic activities in incubated bovine adipose tissue explants: effects of insulin, dexamethasone, and fetal bovine serum. *J Anim Sci*, 1994; 72(1):184-191.
- 6 van der Valk J, Mellor D, Brands R, *et al.* The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro*, 2004; 18(1):1-12.
- 7 Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*, 2010; 316(2):129-139.
- 8 Kheterpal I, Ku G, Coleman L, *et al.* Proteome of human subcutaneous adipose tissue stromal vascular fraction cells versus mature adipocytes based on DIGE. *J Proteome Res*, 2011; 10(4):1519-1527.
- 9 Permana PA, Menge C, Reaven PD. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 341(2):507-514.
- 10 Zhao T, Hou M, Xia M, *et al.* Globular adiponectin decreases leptin-induced tumor necrosis factor- α expression by murine macrophages: involvement of cAMP-PKA and MAPK pathways. *Cell Immunol*, 2005; 238(1):19-30.
- 11 Sarkanen JR, Kaila V, Mannerstrom B, *et al.* Human adipose tissue extract induces angiogenesis and adipogenesis *in vitro*. *Tissue Eng Part A*, 2012; 18(1-2):17-25.
- 12 Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, 2006; 4(4):263-273.
- 13 Zhang YY, Li X, Qian SW, *et al.* Transcriptional activation of histone H4 by C/EBP β during the mitotic clonal expansion of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Mol Biol Cell*, 2011; 22 (13):2165-2174.

(2013-01-26 收稿, 2013-03-05 修回)

编辑 沈 进