

网络出版时间:2014-01-02 16:06

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.02.069

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.02.069.html>

牛前体脂肪细胞的分离培养及诱导分化

郭红芳^{1,2}, 咎林森¹, 孙永刚³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 许昌职业技术学院, 河南 许昌 461000;

3 青海省畜牧兽医科学院, 青海 西宁 810016)

[摘要] **【目的】**建立牛前体脂肪细胞的体外分离培养方法,研究牛前体脂肪细胞的生物学特性和分化特征,为研究牛脂肪发育和脂肪沉积的机制提供一种简便有效的细胞模型。**【方法】**采用 I 型胶原酶消化法自新生牛脂肪组织中获得前体脂肪细胞,对培养的前体脂肪细胞进行形态学观察、生长曲线测定、油红 O 染色及脂肪细胞标志基因 *LPL*、*PPAR- γ* 和脂联素表达研究。**【结果】**80% 的牛前体脂肪细胞接种后 12 h 开始贴壁,4 d 后开始向脂肪细胞转化,10 d 后绝大部分细胞脂滴融合,细胞脂肪含量增加;分离的牛前体脂肪细胞接种后 1~2 d 生长缓慢,3~8 d 进入对数生长期,9 d 后进入平台期,之后细胞数目开始下降。经胰岛素诱导分化过程中,*LPL* 在牛前体脂肪细胞分化的早期开始表达,*PPAR- γ* 在分化的中期开始高度表达,而脂联素在牛前体脂肪细胞分化的前期未检测到,在细胞分化后期高度表达。**【结论】**用 I 型胶原酶消化法可获得大量的牛前体脂肪细胞。培养的牛前体脂肪细胞成分均一、生长旺盛,经胰岛素诱导后能稳定的向脂肪细胞分化。

[关键词] 牛;前体脂肪细胞;生物学特性;诱导分化;分离培养

[中图分类号] S823;Q813.1⁺1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)02-0001-06

Primary culture and differentiation of bovine preadipocytes

GUO Hong-fang^{1,2}, ZAN Lin-sen¹, SUN Yong-gang³

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Xuchang Vocational Technical College, Xuchang, Henan 461000, China;

3 Qinghai Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to explore and establish a stable culturing system for bovine preadipocytes *in vitro* and study the biological and differentiation characteristics of bovine preadipocytes. **【Method】** Preadipocytes were isolated from adipose tissue of newborn bovine by type I collagenase. Cultured preadipocytes were identified by morphological change, growth curve, oil red O staining, and mRNA expression of lipoprotein lipase gene (*LPL*), peroxisome proliferators activated receptor- γ gene (*PPAR- γ*) and adiponectin gene. **【Result】** 80% bovine preadipocytes began to paste the wall after inoculation for 12 h, and the cells began to transfer to fat cells after 4 days. 10 days later, lipid droplets of most cells fused, and fat contents increased. Bovine preadipocytes grew well *in vitro*. On days 1—2, cells grew slowly, and the cells entered logarithmic growth phase during days 3—8. The growth of cells became stable from day 9, since when the number of cells decreased. During the differentiation by insulin, *LPL* gene expressed in the

[收稿日期] 2013-01-26

[基金项目] 国家肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-38);国家自然科学基金项目(31272411);国家“863”计划项目(2011AA100307-02, 2013AA102505);国家科技支撑计划项目(2011BAD28B04-03, 2012BAD12B07);教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0940);农业部科研杰出人才及其创新团队发展计划项目(2012-64-52);陕西省科技统筹创新工程计划项目(2011KTCL02-07)

[作者简介] 郭红芳(1982—),女,河南许昌人,硕士,主要从事动物细胞工程研究。E-mail:guohongfangkl@126.com

[通信作者] 咎林森(1963—),男,陕西扶风人,教授,博士生导师,主要从事肉牛、奶牛遗传改良与种质创新研究。E-mail:zanlinsen@163.com

early stage and *PPAR-γ* gene expressed in the middle stage. The expression of adiponectin gene was not detected in the early stage, but it was highly expressed in mature adipocytes. 【Conclusion】 Preadipocytes isolated from adipose tissue of newborn bovine by type I collagenase grew well and could be differentiated into mature adipocyte *in vitro*.

Key words: bovine; preadipocyte; biological characteristics; differentiation; primary culture

动物和人体内脂肪组织含量的调控是人们越来越关注的焦点之一。体内脂肪组织含量反映了体内能量分配、贮存和消耗的状态。脂肪细胞的分化和增殖失常可引起脂肪组织过多堆积,导致肥胖和胰岛素抵抗的发生,是动脉粥样硬化、Ⅱ型糖尿病、高血压和血脂代谢障碍等多种疾病的共同危险因素^[1]。畜禽体脂肪含量过高可导致肉品质、疾病抵抗力、畜禽生产性能、饲料利用率等下降,影响畜禽生产的进一步发展,已成为动物生产领域亟待解决的问题。

对前体脂肪细胞进行体外培养不仅能完整地认识脂肪组织发生和增生的全过程,并且可以直接观察各种因素对这个过程的调控。在牛生产中,脂肪组织的类型和含量与牛肉的质量及风味直接相关^[2]。本试验对牛前体脂肪细胞进行了分离培养,并对其生物学特性和分化特征进行了研究,以期为研究牛脂肪发育和脂肪沉积的机制提供一种简便有效的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

主要仪器有 CO₂ 培养箱(Sanyo, MCO-15AC)、超净工作台(哈东联, DL-CJ-2N)、倒置相差显微镜(Olympus, IX71)、PCR 仪(MJ-Research)。主要试剂有 D-MEM/F-12 培养基(GIBCO)、标准胎牛血清(民海)、牛胰岛素、转铁蛋白(Sigma)、BSA、MTT、油红 O 染液、胰蛋白酶(Solarbio)、I 型胶原酶(In-vitrogen)、RNA 提取试剂盒(上海飞捷)、反转试剂盒(Fermentas)。

1.2 试验方法

1.2.1 牛前体脂肪细胞的分离培养 取新生牛腹股沟和肾脏周围的脂肪组织,参照 Aso 等^[3]的方法,在无菌条件下,用眼科剪和镊子去除脂肪组织块表面肉眼可见的结缔组织、肌肉及血管,之后将脂肪组织剪成 1 mm³ 左右的小块,用 PBS 洗涤数次后加入等体积 1 mg/mL I 型胶原酶,在 37 ℃ 恒温水浴振荡器中消化 50 min(120 次/min),再用等体积的基础培养基(含体积分数 10% FBS)中和消化液,然

后用孔径 0.25 和 0.075 mm 无菌尼龙网依次过滤消化物。收集滤液于洁净无菌离心管中,700×g 离心 8 min,去除漂浮的脂肪细胞及上清液后,加入红细胞裂解液,吹打均匀,室温静置 10 min,再 700×g 离心 5 min,弃上清液,加入无血清培养液,吹打均匀,700×g 离心 5 min,弃上清液,加入完全培养基,吹打均匀,即可获得牛前体脂肪细胞,经台盼蓝染色进行细胞活力鉴定后,按 5×10⁴ 个/cm² 的密度接种于培养板和培养皿中,并置于 CO₂ 培养箱(37 ℃、饱和湿度、体积分数 5% CO₂) 中培养。培养 24 h 后换液,以除去血细胞和未贴壁的细胞,之后每 2~3 d 换液 1 次。

1.2.2 牛前体脂肪细胞的 MTT 比色法检测 将分离培养的牛前体脂肪细胞悬液按每孔 10³~10⁴ 个细胞接种于 96 孔培养板中(0 d),每孔容积 200 μL,将培养板移入 CO₂ 培养箱中,于 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养,自第 1 天起,每隔 2 d,在同一时间取 3 孔,每孔加 20 μL MTT 溶液后,37 ℃ 继续培养 4 h 后终止培养,吸去孔内溶液,每孔再加 150 μL DMSO,振荡 10 min,用酶联免疫检测仪于 490 nm 波长处测定各孔吸光值(A₄₉₀),记录结果,每组取 3 个重复。

1.2.3 牛前体脂肪细胞生长曲线的测定 参照司徒镇强等^[4]的方法,用血细胞计数板对牛前体脂肪细胞进行计数。取原代牛前体脂肪细胞,待细胞生长达 80% 细胞汇合时,传代后接种到 36 个 35 mm 培养皿中,随机分成 12 组,每 2 d 检测一组中每个培养皿的细胞密度,取平均数,直至第 12 天结束。

1.2.4 牛前体脂肪细胞脂肪含量的检测 参照 Ramirez-Zacarias 等^[5]的方法,取第 2 代牛前体脂肪细胞分别用完全培养基和分化培养基培养,测定培养 0, 2, 4, 6, 8, 10 和 12 d 细胞内的脂肪含量。用体积分数 10% 甲醛等渗盐缓冲液固定培养板贴壁细胞 30 min 后,用蒸馏水漂洗,吸取油红 O 染液 2 mL 浸染培养板,30 min 后倒掉油红 O 染液,用蒸馏水漂洗培养板数次,直至完全漂洗干净。将已染色的培养板置于 32 ℃ 烘箱内,蒸发掉培养板所有孔内的水分,随即加入 1.5 mL 异丙醇萃取 15 min 后移出

染液,用分光光度计于 510 nm 波长处测吸光度(OD₅₁₀),并于倒置相差显微镜下观察并照相,采集油红 O 染色图片。

1.2.5 牛前体脂肪细胞 RNA 的提取 将第 2 代牛前体脂肪细胞按 5×10⁵ 个/mL 的密度接种到 6 孔培养板上,生长达 80%汇合时记为 0 d,然后用分化培养基对牛前体脂肪细胞进行诱导分化,依 RNAfast200 使用说明书,分别提取培养 0,3,6 和 9 d 的牛前体脂肪细胞总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量,并用紫外分光光度计测定其浓度。

表 1 PCR 引物参数
Table 1 Parameters of PCR primers

基因 Genes	引物 Primers	片段长度/bp Length	退火温度/℃ T _m	循环数 Cycles
LPL	S:5'-AAGCCCCACATACACGATTA-3' A:5'-GATGCCAACAACAAGTCACA-3'	227	58	28
PPAR- <i>α</i>	S:5'-GAGATCACAGAGTACGCCAAG-3' A:5'-GGGCTCCATAAAGTCACCAA-3'	216	58	28
脂联素 Adiponectin	S:5'-TGTACCCATTGCTTTACT-3' A:5'-TTTCACTTTGTGCTGCTT-3'	410	56	30
<i>βactin</i>	S:5'-GATGTGGATCAGCAAGCA-3' A:5'-CCTTCACCGTTCCAGTTT-3'	230	52	26

注:S.上游引物;A.下游引物。
Note:S. Sense primer;A. Antisense primer.

取已溶解的总 RNA 2 μL,按照 Fermentas 第一链合成试剂盒的使用说明反转录为 cDNA,再以 cDNA 为模板在 PTC-200 上进行扩增。反应体系为 15 μL:cDNA 模板 1 μL,2×Reaction Mix 7.5 μL(含 500 μmol/L dNTP each、20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L KCl、3 mmol/L MgCl₂),上、下游引物各 0.3 μL(10 μmol/μL),Taq DNA 聚合酶 0.15 μL(2.5 U/μL),补水至 15 μL。扩增反应热循环参数为:95 ℃ 10 min;94 ℃ 30 s,52~64 ℃ 40 s,72 ℃ 50 s,26~32 个循环;72 ℃延伸 10 min。取 PCR 扩增产物 2.5 μL,在 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳。电泳分离的 DNA 片段用 Gel Media System 凝

1.2.6 脂肪代谢相关基因的 RT-PCR 检测 供检测的脂肪代谢相关基因有脂蛋白酯酶(Lipoprotein Lipase,LPL)基因、过氧化物酶体增植物激活受体(Peroxisome proliferatorsactivated receptor-γ,PPAR-γ)基因和脂联素(Adiponectin)基因,以 *βactin* 基因为内参。参考 GenBank 中 LPL、PPAR-γ、脂联素和 *βactin* 基因序列(GenBank 号分别为 NM_01075120、NM_181024、NM_174742 和 NM_176648),用 Primer Premier 5.0 设计引物,交由上海生工合成,引物相关信息见表 1。

胶成像系统拍照,并用 Gel-Pro analyzer 凝胶分析软件(Media Cybernetics. USA)分析。结果用目的基因与 *βactin* 基因电泳带相对吸光度的比值表示。

1.3 统计分析

采用 SPSS 13.0 统计软件 One-way ANOVA 进行方差分析与显著性检验。试验数据以“平均值±标准差(means±SD)”表示。

2 结果与分析

2.1 牛前体脂肪细胞原代培养的形态学观察 牛前体脂肪细胞形态学观察结果见图 1。

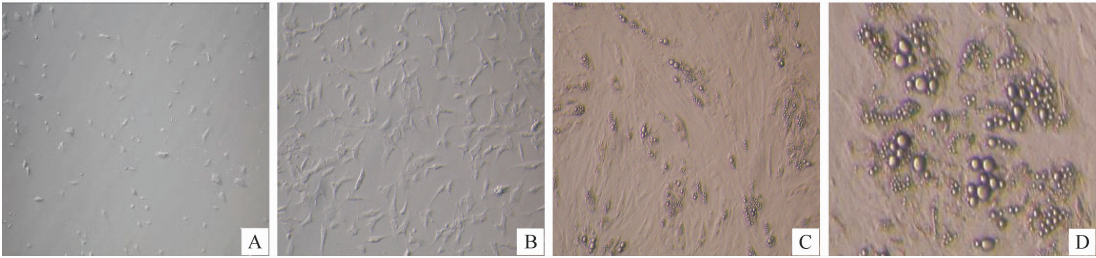


图 1 牛前体脂肪细胞的形态学观察(×100)
A. 培养 24 h;B. 培养 4 d;C. 培养 6 d;D. 培养 10 d
Fig.1 Morphology of bovine preadipocytes (×100)
A. Cultured for 24 h;B. Cultured for 4 d;C. Cultured for 6 d;D. Cultured for 10 d

显微镜下观察发现,用 I 型胶原酶消化收集到的牛前体脂肪细胞接种后,除个别为不规则形状外,

大部分细胞胞质回缩,呈圆球形。培养 3~4 h 大部分胞质回缩的圆球形细胞开始伸展,多为不规则形状,细胞开始贴壁;12 h 后 80% 细胞贴壁,大部分细胞伸展为小梭型,其余为星型、三角形和不规则形状,小部分未贴壁的细胞和大量的红细胞悬浮在培养液中;24 h 细胞开始贴壁(图 1-A),48 h 后换液,细胞生长速度加快,细胞形态向梭形样生长,培养 4 d 细胞数目明显增多,可见少量细胞变圆,出现脂滴(图 1-B);6 d 充脂细胞数目增多,出现大小不同的

脂滴和部分小脂滴融合成大脂滴(图 1-C);10 d 后绝大部分细胞脂滴融合,一个或多个大脂滴充满了细胞的大部分,大脂滴周围环绕无数个小脂滴,最后发育成成熟的椭圆形或圆形成熟脂肪细胞(图 1-D)。

2.2 MTT 比色法检测牛前体脂肪细胞活性

用酶联免疫检测仪在波长 490 nm 处检测牛前体脂肪细胞吸光值(A_{490}),可间接反应活细胞数量。从表 2 可以看出,在培养 1~9 d 时牛前体脂肪细胞增殖速度较快,到第 12 天时细胞数量开始减少。

表 2 MTT 比色法测定的牛前体脂肪细胞吸光值

Table 2 Light absorption of preadipocytes by MTT assay

培养时间/d Culture time	A_{490}	培养时间/d Culture time	A_{490}
1	0.122±0.002	9	0.701±0.018
3	0.405±0.007	12	0.412±0.009
6	0.585±0.022		

2.3 牛前体脂肪细胞的生长曲线

由图 2 可知,牛前体脂肪细胞的生长曲线呈“S”型,接种 2 d 内细胞处于滞留期,生长缓慢,2 d 后细胞生长速度加快进入对数生长期,9 d 后脂肪细胞生长进入平台期。按下式计算牛前体脂肪细胞的倍增时间。

$DT=t\times\lg 2/(\lg N_t-\lg N_0)$ 。

式中:DT 为细胞倍增时间,t 为培养时间, N_0 为首次计数获得的细胞数, N_t 为培养 t 时间后的细胞数。经计算得牛前体脂肪细胞的倍增时间约为 64 h。

2.4 牛前体脂肪细胞分化过程中脂肪含量的变化

用油红 O 染色提取法测定完全培养基和分化培养基培养 0~12 d 牛前体脂肪细胞的脂肪含量,结果见图 3。由图 3 可见,用完全培养基培养牛前体脂肪细胞的分化程度小,培养 10 d 以后牛前体脂肪细胞的油滴增多,细胞脂肪含量增加,与牛前体脂肪细胞的形态学特征一致。由于胰岛素能促进前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞的分化,加胰岛素的培养基培养 4 d 后细胞内脂滴明显增多,细胞脂肪含量增加(图 3);培养 10 d 后绝大部分细胞经过脂滴融合,分化为成熟的脂肪细胞(图 4)。

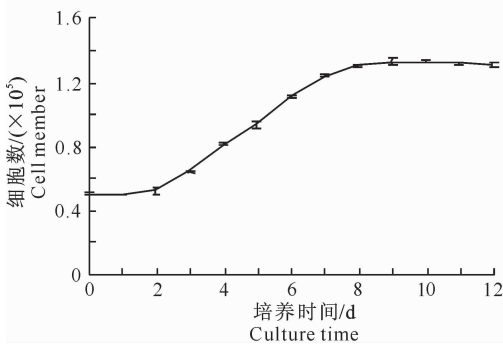


图 2 牛前体脂肪细胞的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of bovine preadipocytes cultured *in vitro*

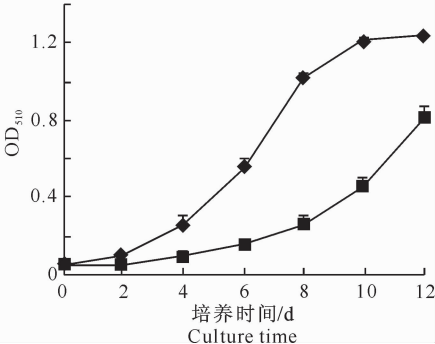


图 3 牛前体脂肪细胞分化过程中脂肪含量的变化

—◆—, 分化培养基; —■—, 完全培养基
Fig. 3 Changes of cellular lipid contents during the differentiation of bovine preadipocytes
—◆—, Differential medium; —■—, Complete medium

2.5 LPL、PPAR- γ 和脂联素基因在牛前体脂肪细胞分化过程中的表达

由图 5 可见,LPL mRNA 在牛前体脂肪细胞诱导分化的早期开始表达,在整个分化过程中 LPL mRNA 的表达呈上升趋势,但是各个时间段的 mR-

NA 表达量差异不显著($P>0.05$)。由图 6 可见,PPAR- γ mRNA 在牛前体脂肪细胞诱导分化的前 3 d 表达量较少,第 6 天开始表达量急剧增加;0 与 3 d 的 mRNA 表达量相比差异不显著,第 6 天与第 9 天相比差异不显著,但是 0,3 d 与 6,9 d 差异显著

($P<0.05$)。由图 7 可见,在牛前体脂肪细胞分化的 0 d 未检测到脂联素基因 mRNA 的表达,随着脂肪细胞的分化,脂联素 mRNA 的表达明显增加,在

分化的第 9 天达到最大,而且在分化各个时间段变化差异显著($P<0.05$)。

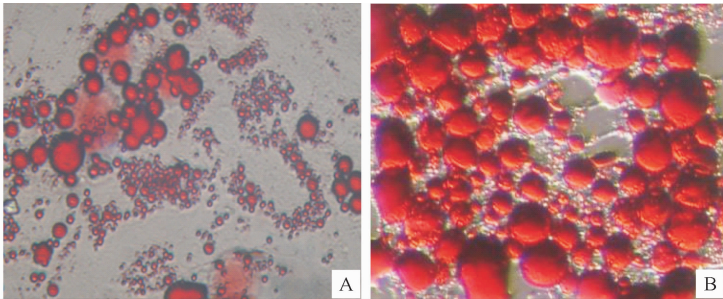


图 4 牛前体脂肪细胞分化过程中油红 O 染色结果($\times 200$)
A. 分化 6 d;B. 分化 10 d

Fig. 4 Bovine preadipocytes stained with oil red O ($\times 200$)
A. Differentiated for 6 d;B. Differentiated for 10 d

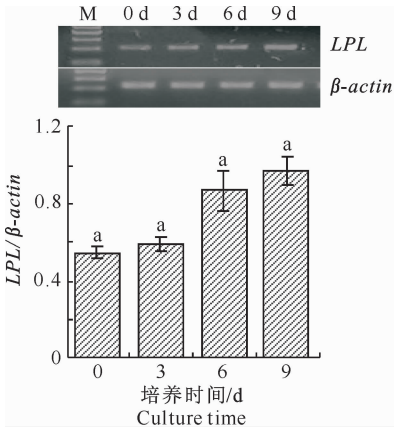


图 5 LPL mRNA 在牛前体脂肪细胞分化过程中的表达

Fig. 5 mRNA expression level of LPL in bovine preadipocytes

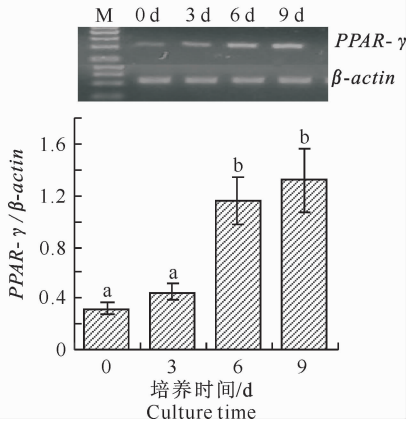


图 6 PPAR-γ mRNA 在牛前体脂肪细胞分化过程中的表达

Fig. 6 mRNA expression level of PPAR-γ in bovine preadipocytes

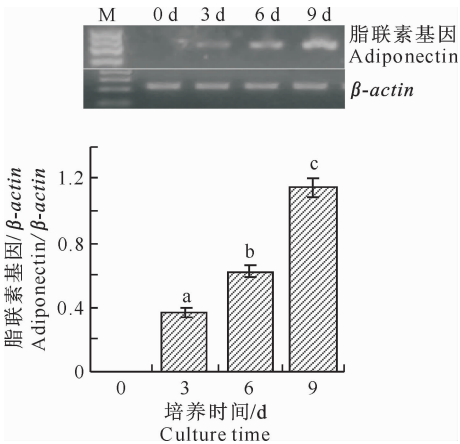


图 7 脂联素基因 mRNA 在牛前体脂肪细胞分化过程中的表达

Fig. 7 mRNA expression level of adiponectin in bovine preadipocytes

3 讨 论

脂肪组织中脂肪细胞非常活跃,细胞的数目、形态以及细胞内脂肪的含量均处于动态变化之中,并保持终生。前体脂肪细胞是一类具有增殖和向脂肪细胞分化能力的特异化的前体细胞,它的存在和作用持续于动物的一生,与脂肪代谢有密切关系。对前体脂肪细胞的体外培养不仅能完整地认识脂肪组织发生和增殖的全过程,并且可以直接观察各种因素对这个过程的调控。因此,牛前体脂肪细胞体外培养模型的建立为研究反刍动物脂肪发育及其沉积机制提供了一种简便有效的细胞模型。

本研究选取新生牛腹股沟和肾脏周围的脂肪组织,采用 I 型胶原酶消化法,可获得大量的牛前体脂肪细胞;接种后 1~2 d 细胞生长缓慢;2 d 后细胞生

长速度加快,进入对数生长期;9 d 后进入平台期。牛前体脂肪细胞的生长曲线为“S”型,符合正常细胞的生长特征。本试验中牛前体脂肪细胞的培养条件为 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 及饱和湿度,与已建立的人^[6]、小鼠^[7]和猪^[8]的前体脂肪细胞的培养条件一致。经油红 O 染色和脂肪代谢相关标志基因检测发现,分离培养的牛前体脂肪细胞符合前体脂肪细胞的 3 个标准^[9],即:①来自脂肪组织,形态为梭形,胞浆内无或很少有脂肪颗粒;②增殖迅速,与来自同一个体的成纤维细胞在倍增时间上接近;③在形成单层汇合后能变为脂肪细胞,包括脂肪细胞特异性酶的出现和胞浆内出现脂肪颗粒,并且胰岛素是这个过程中的主要促进因素。

细胞活力的检测方法应用较多的是染料排除法,如台盼蓝染色法和伊红染色法,但这些方法存在主观因素影响较大、时间不宜过长等缺点,而 MTT 比色法具有灵敏度高、重复性好、操作简便、无放射性污染等特点,与计数法有良好的相关性,因此广泛用于检测细胞活力和观察细胞生长等方面。本试验用 MTT 比色法间接反映了活细胞数量在不同培养时间的变化,与前体脂肪细胞生长曲线基本符合。

油红 O 染色提取法可简便、快速地对体外培养的前体脂肪细胞分化率进行定量,其准确性和敏感性与测定前体脂肪细胞分化过程中的标志酶 GPDH 相似,因此常用来作为对体外培养的前体脂肪细胞进行鉴定。对含体积分数 10% FBS 正常生长和胰岛素诱导分化的细胞分别进行油红 O 染色提取,结果发现,胰岛素能明显促进前体脂肪细胞分化,使脂肪细胞的充脂能力增强,牛的前体脂肪细胞一般 10 d 左右全部分化为成熟的充脂脂肪细胞。本研究中正常生长的牛前体脂肪细胞也能自动分化,但是分化程度较低。这可能是由于分离的前体脂肪细胞有部分处于分化后期,在培养条件下继续分化,并分泌有关的激素,通过旁分泌途径来加强或促进周围细胞的分化进程,其具体机制有待进一步研究。

LPL 基因为脂肪细胞的前期分化标志基因^[10],在分化早期即开始表达,在前体脂肪细胞及成熟脂肪细胞中均可表达,其表达量随分化进程的推进而逐渐增加,之后随晚期标志基因的表达而逐渐趋于稳定^[11]。本研究发现,未添加胰岛素的脂肪细胞中,*LPL* 在牛前体脂肪细胞分化早期开始表达,并且在整个分化过程中呈增长趋势。*PPAR-γ* 是一个配体激活的转录因子,为核激素受体超家族的一员^[12],除了调控脂肪细胞增殖和分化相关基因的表

达外,同时也调控脂质生物合成和糖代谢相关基因的表达^[13],是前体脂肪细胞分化中后期表达的标志基因。*LPL* 和 *PPAR-γ* 的活性均可做为检测脂肪细胞活性的重要指标^[14]。本研究发现,*PPAR-γ* mRNA 的表达量随着培养时间的推移逐渐增加,并且在培养第 9 天时达到最大。本研究中 *LPL* 和 *PPAR-γ* 表达量的变化从分子水平证明,未添加胰岛素的脂肪细胞可以向成熟的脂肪细胞分化,但延迟了脂肪细胞的分化。脂联素是新发现的由脂肪细胞特异性分泌的一种细胞因子,其合成和分泌只发生在成熟的脂肪细胞中,在前体脂肪细胞中不表达,脂肪细胞是诱导脂联素表达的必须组织^[15]。本研究中,在牛前体脂肪细胞分化的 0 d 未检测到脂联素基因 mRNA 的表达,随着前体脂肪细胞的分化,脂联素 mRNA 的表达量逐渐增加,在分化第 9 天成熟的脂肪细胞中表达量达到最大。

[参考文献]

- [1] Rosen E D, MacDougald O A. Adipocyte differentiation from the inside out [J]. *Molecular Cell Biology*, 2006, 7: 885-896.
- [2] Masaaki T, Le L G, Bing Z, et al. Adipogenesis of bovine perimuscular preadipocytes [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 366: 54-59.
- [3] Aso H, Abe H, Nakajima N, et al. A preadipocyte clonal line from bovine intramuscular adipose tissue: Nonexpression of GLUT-4 protein during adipocyte differentiation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, 213(2): 369-375.
- [4] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 2007: 73-75.
Situ Z Q, Wu J Z. Cell culture [M]. Xi'an: World Book Inc, 2007: 73-75. (in Chinese)
- [5] Ramirez-Zacarias J L, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with oil red O [J]. *Histochemistry*, 1992, 97: 493-497.
- [6] 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): 443-446.
Wang Z C, Liu J Z, Li Y, et al. Primary culture of human preadipocytes [J]. *Journal of Zhongshan Medical University*, 2001, 22(6): 443-446. (in Chinese)
- [7] Stephens J M, Morrison R F, Pilch P F. The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 10441-10444.
- [8] 张国华, 杨公社, 屈长青, 等. 猪前体脂肪细胞的分离培养 [J]. 细胞生物学杂志, 2005(6): 693-696.
Zhang G H, Yang G S, Qu C Q, et al. The isolated culture of pig preadipocyte [J]. *Journal of Cell Biology*, 2005(6): 693-696. (in Chinese)