

## 草鱼前体脂肪细胞的原代培养

吉红<sup>1,2</sup> 曹艳姿<sup>1</sup> 林亚秋<sup>3</sup> 刘品<sup>1</sup> 卢荣华<sup>1</sup> 苏尚顺<sup>1</sup> 杨公社<sup>1</sup> 奥宏海<sup>4</sup>

(1 西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100; 2 西北农林科技大学水产科学研究所, 杨凌 712100;

3 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041; 4 日本国水产养殖研究所, 南势 516-0193, 日本)

### PRIMARY CULTURE OF GRASS CARP PREADIPOCYTE IN VITRO

Ji Hong<sup>1,2</sup>, CAO Yan-Zi<sup>1</sup>, LIN Ya-Qiu<sup>3</sup>, LIU Pin<sup>1</sup>, LU Rong-Hua<sup>1</sup>, SU Shang-Shun<sup>1</sup>, YANG Gong-she<sup>1</sup> and OKU Hiromi<sup>4</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Fisheries Research Institute, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 3. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China; 4. National Research Institute of Aquaculture, Minam i - ise, Mie 516-0193, Japan)

关键词: 草鱼; 前体脂肪细胞; 细胞培养

Key words: Grass carp; Preadipocyte; Cell culture

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2009)06-1226-05

构建脂肪细胞体外培养体系, 研究脂肪细胞分化过程, 是探讨动物脂质代谢规律的重要手段。目前, 哺乳动物方面, 自 20 世纪 60 年代起至今, 国内外已成功构建了大鼠<sup>[1,2]</sup>、人<sup>[3,4]</sup>、牛<sup>[5,6]</sup>和猪<sup>[7,8]</sup>的前体脂肪细胞体外培养模型, 鱼类方面的工作则开始不久。国外已开展了虹鳟<sup>[9]</sup>、大西洋鲑<sup>[10]</sup>、真鲷<sup>[11,12]</sup>脂肪细胞培养的研究, 而淡水温水性鱼类脂肪细胞培养体系的建立尚未见到报道, 国内相关工作刚刚起步。本研究在对草鱼脂肪细胞的提取和保存方法进行研究的基础上<sup>[13]</sup>, 参考在哺乳动物及其他鱼类方面的相关研究成果, 初步探讨了淡水温水性鱼类原代前体脂肪细胞的培养技术, 以期研究淡水温水性鱼类脂质沉积规律及其调控提供新的技术和思路。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 试验材料 试验鱼购自陕西杨凌康乐市场, 体重 0.6—0.8 kg, 选择体质健壮、游动活泼的草鱼作为试验鱼。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基、型胶原酶均购自 Gibco 公司, 胎牛血清 (杭州四季青), 牛胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠、氯化可的松均购自 Signa 公司, 其他试剂均为分析纯。

1.1.3 培养液及主要试剂的配制 有血清培养液: 称取 1.56 g DMEM/F12, 0.35 g NaHCO<sub>3</sub>, 20 mL 胎牛血清, 加入各 100 U/mL 青、链霉素, 双蒸水定容至 100 mL。不加入胎牛血清即为无血清培养液。消化液: 称取 40 mg I 型胶原酶, 0.8 g 牛血清白蛋白溶于 40 mL 无血清培养基。诱导液: 牛胰岛素 5 μg/mL, 转铁蛋白 50 μg/mL, 亚硒酸钠 5 ng/mL, 氯化可的松 50 ng/mL。

#### 1.2 方法

1.2.1 草鱼前体脂肪细胞的获得和培养 无菌采集草鱼腹腔脂肪组织, PBS 缓冲液 (含 5% BSA) 冲洗 3 次, 剪至 1 mm<sup>3</sup> 的脂肪小块时向其中加入 1 mg/mL 的 I 型胶原酶消化液, 置 28 ℃ 振荡摇床内消化 50 min, 1000 r/min 离心 5 min 去上清, 以含 5% BSA 的 PBS 重悬, 过孔径为 200 目尼龙筛, 1000 r/min 离心 5 min 去上清, 以无血清培养液洗 3 次后, 去上清, 将下层沉积的细胞用有血清培养液重悬, 即获得草鱼前体脂肪细胞。以 5.0 × 10<sup>4</sup> 个/cm<sup>2</sup> 密度接种于涂有 1% 明胶的培养皿内, 于 28 ℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 3 d 后换液, 分别换为有血清培养液和分化诱导液, 此后每 2 天换液一次, 并在显微镜下进行观察、照相。

1.2.2 油红 O 染色 参照文献 [14] 的方法分别取培养至第 3 天 (诱导 0 天)、第 5 天 (诱导第 2 天)、第 7 天 (诱导第 4

收稿日期: 2009-03-09; 修订日期: 2009-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771667); 中国博士后科学基金项目 (20080431254); 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目资助

通讯作者: 吉红 (1967—), 男, 汉族, 河南灵宝人; 副教授, 博士; 主要从事水生经济动物营养与饲料学研究。E-mail: jihong@nwsuaf.edu.cn

天),第 9 天(诱导第 6 天)的细胞,PBS洗 3 次,10%甲醛固定 30min后,PBS漂洗 2 次,油红 O 染色 8min,60%异丙醇分色 10—20s,自来水冲洗,甘油明胶封片。

1.2.3 总 RNA 的提取 分别收集培养至第 3 天与第 9 天的细胞各 3 皿,用 TRzol 进行总 RNA 的提取,核酸定量仪(NANODROP 1000, Thermo 公司)测定 RNA 纯度。提纯的 RNA,通过琼脂糖电泳鉴定后,贮存于 - 70 °C 冰箱备用。

1.2.4 引物设计与合成 分别根据 GenBank 中登录的草鱼 *LPL* (FJ612596)、*PPARY* (EU847421)和  $\beta$ -*actin* (DQ211096 ) 基因序列设计上下游引物,应用 Primer Premier 5. 0 软件设计 *LPL* 与 *PPARY* 两对引物,用于检测细胞培养过程中脂肪细胞分化标志基因的表达情况,并以持家基因 ( $\beta$ -*actin*)为内参。引物由上海生工生物工程有限公司合成。引物(表 1)。

1.2.5 RT-PCR 分析 cDNA 第一链的合成(即逆转录 RT)按照 Fementas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit# K1621 试剂盒(Fementas 公司),以 oligo (dT)<sub>18</sub> 为反转录引物,按照说明书进行操作。取获得的 cDNA 第一链为模板进行

PCR 扩增。扩增时每一个样品测 3 次。PCR 反应体系为:灭菌的双蒸水 18.6  $\mu$ L、10 mmol/ L dNTP Mix 0. 5  $\mu$ L、PCR buffer (NH)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 2. 5  $\mu$ L、25 mmol/ L MgCl<sub>2</sub> 1. 5  $\mu$ L、cDNA 1. 25  $\mu$ L、20  $\mu$ mol/ L Primer 0. 25  $\mu$ L、20  $\mu$ mol/ L Primer 0. 25  $\mu$ L、5 U / $\mu$ L *Taq* DNA Polymerase 0. 15  $\mu$ L。PCR 反应条件:95 °C 预变性 4min,95 °C 45s, 55 °C 45s(*LPL*)、50 °C 45s (*PPARY*) /53 °C 45s ( $\beta$ -*actin*), 72 °C 60s,33 个循环,72 °C 延伸 10min,指数增长期内终止反应。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,在 Wealtec 凝胶成像系统拍照,鉴定其亮度和特异性。并用 Dophin-1D 凝胶分析软件分析。结果用目的基因和  $\beta$ -*actin* 电泳带吸光度的比值表示。

1.2.6 数据处理 采用 SPSS11. 5 软件,用 ANOVA 对不同处理间的平均值进行统计分析, $P < 0. 05$  时,认为差异显著。

## 2 结 果

### 2.1 脂肪细胞的形态学观察

草鱼前体脂肪细胞接种时为圆形,培养至第 3 天(诱导

表 1 寡核苷酸多聚酶链式反应引物  
Tab. 1 Oligonucleotide polymerase chain reaction primers

| 基因<br>Genes            | 引物<br>Primers (5' - 3') | 产物长度<br>Product<br>Sizes (bp) | 退火温度 T <sub>m</sub><br>Annealing<br>temperature ( °C ) | 循环次<br>数<br>Times |
|------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------|
| <i>LPL</i>             | S: CGCAACAACATTACCCAA   | 360                           | 55                                                     | 33                |
|                        | A: AATCCCAATAGCGATCTGG  |                               |                                                        |                   |
| <i>PPARY</i>           | A: TTGGTCAGGGGGAATACT   | 438                           | 50. 5                                                  | 33                |
|                        | S: TCCTCCACAGTTTGCCGA   |                               |                                                        |                   |
| $\beta$ - <i>actin</i> | S: GATATGGAGAAATCTGGCA  | 410                           | 53. 5                                                  | 33                |
|                        | A: CAGAGCTTCTCCTGATGTC  |                               |                                                        |                   |

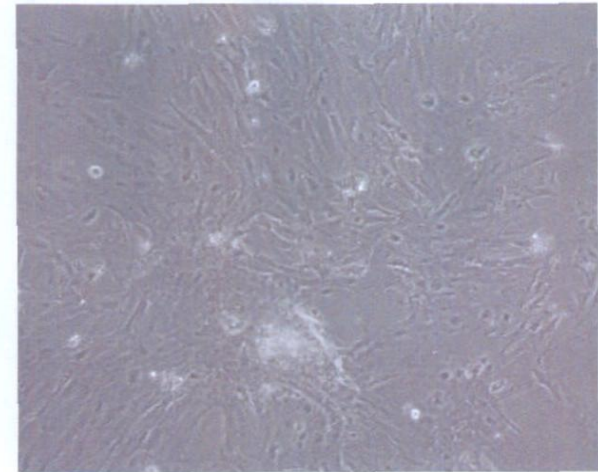


图 1 培养第 3 天的细胞 (×100)

Fig. 1 Morphology of adipocytes cultured 3 days (×100)

细胞开始贴壁变成梭形、三角形等不规则形状

The cell began changing into unregulation shape such as fusiform, triangle et al.

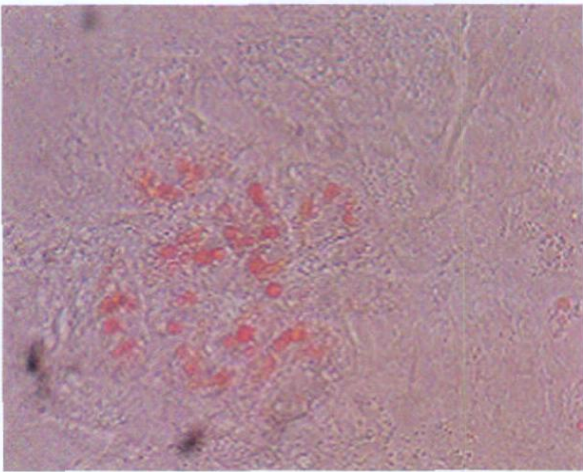


图 2 培养第 5 天经油红 O 染色的细胞 (×100)

Fig. 2 Morphology of adipocytes cultured 5 days stained with oil

red O (×100)

部分细胞出现小脂滴,油红 O 染色后呈橘红色

Small lipid droplets which showed jacinth after stained with oil red O appeared in some cells

0天)时圆形细胞开始贴壁且呈梭形、三角形等不规则形状(图1),第5天(诱导第2天)形成局部单层汇合,部分细胞内出现微小脂滴(图2),第7天(诱导第4天)分化的细胞增多,脂滴大小不等且多散在(图3),第9天(诱导第6天)脂滴逐渐汇合,出现融合现象(图4)。经油红O染色的脂肪细胞在显微镜下观察,脂滴被亲脂的油红O着色而呈橘红色,证明该细胞是脂肪细胞(图2—4)。

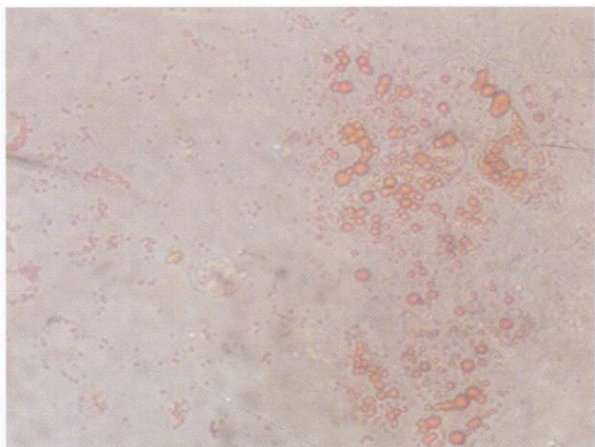


图3 培养第7天经油红O染色的细胞(×100)

Fig. 3 Morphology of adipocytes cultured 7 days stained with oil red O (×100)

油红O染色后可见充脂细胞增多

The number of cells filled with lipid increased after stained with oil red O

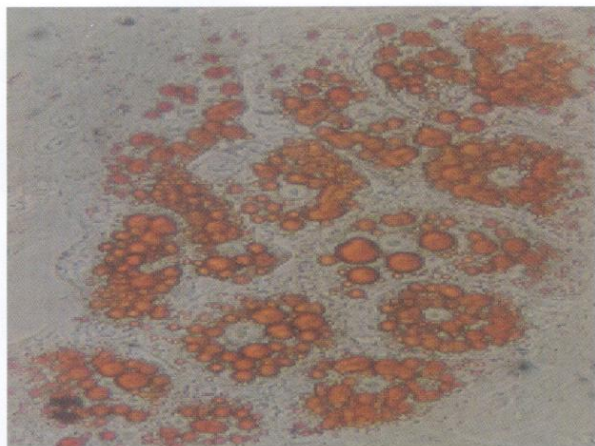


图4 培养第9天经油红O染色的细胞(×100)

Fig. 4 Morphology of adipocytes cultured 9 days stained with oil red O (×100)

油红O染色后可见细胞大部分充脂,并且小脂滴融合成大脂滴  
After stained with oil red O most cells filled with lipid and the small lipid droplet coalesce into a big one being observed

2.2 脂肪细胞分化过程中标志基因表达情况

在培养第3天(诱导0天),*LPL*和*PPARγ*均有表达,培养第9天(诱导6天),诱导组*LPL*和*PPARγ*的表达显著高于培养第3天( $P < 0.05$ ),且在培养至第9天时诱导组

*PPARγ*表达量显著高于( $P < 0.05$ )未诱导组(图5、6)。

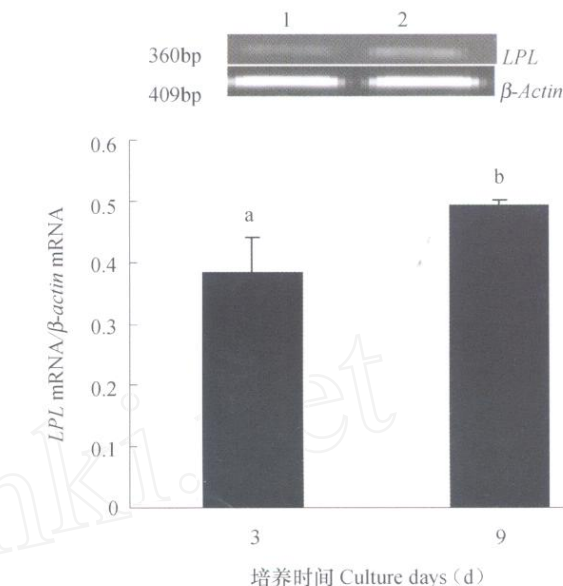


图5 草鱼前体脂肪细胞分化过程中*LPL*基因的表达变化  
Fig. 5 *LPL* gene expression during the grass carp preadipocyte differentiation

1. 培养3d; 2. 培养9d; 不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同  
1. after 3d culture; 2. after 9d culture; Values not sharing common superscript letters are significantly different at  $P < 0.05$ ; The same as following figure

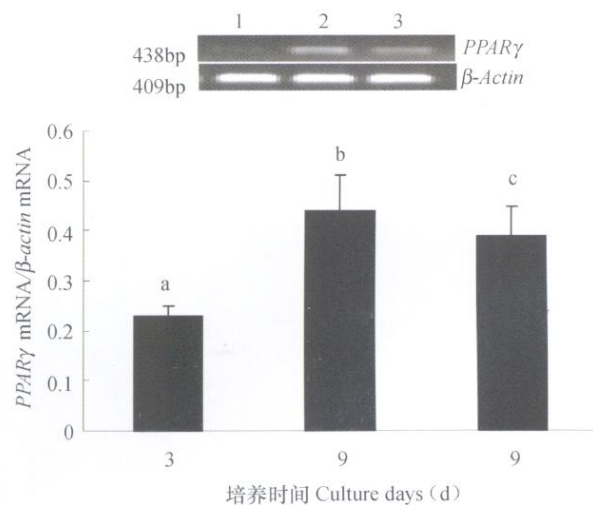


图6 草鱼前体脂肪细胞分化过程中*PPARγ*基因的表达变化  
Fig. 6 *PPARγ* gene expression during the grass carp preadipocyte differentiation

1. 培养3d; 2. 培养9d; 3. 未诱导培养至第9天  
1. after 3d culture; 2. after 9d culture; 3. after 9d culture without introduction

3 讨论

3.1 鱼类前体脂肪细胞体外培养体系构建

动物体脂蓄积是脂肪细胞增殖、分化和凋亡综合作用的结果,即脂肪细胞数目的增多、体积的增大以及细胞的程序性死亡。通过细胞培养的方式,在体外重现脂肪细胞增殖分

化过程,是研究体脂沉积、脂肪组织发育的重要内容。本文通过胶原酶消化与尼龙网分离相结合的方法获得草鱼前体脂肪细胞,并成功在体外进行了原代培养。

影响前体脂肪细胞提取效率及体外培养效果的因素包括胶原酶浓度、消化时间、血清浓度、培养基、培养温度等。不同研究小组在进行不同物种的脂肪细胞培养时所采用的体系不尽相同。胶原酶浓度大都采用 1%;人<sup>[3]</sup>、牛<sup>[5]</sup>、猪<sup>[8]</sup>的前体脂肪细胞相关研究中采用的消化时间分别是 1.5、1.5 和 1h;血清浓度与培养基大多采用含有 10%胎牛血清的 DMEM / F12 (1:1) 或 M199;哺乳动物多采用 37 作为最佳培养温度,而在鱼类上培养温度因种类不同而有所差异,如培养真鲷前体脂肪细胞采用 25<sup>[11]</sup>,培养大西洋鲑前体脂肪细胞采用 13<sup>[10]</sup>,培养虹鳟前体脂肪细胞采用 18<sup>[9]</sup>。本研究用 1%胶原酶消化脂肪组织 50min, 1000 r/min 离心 3min 分离细胞,含有 20%胎牛血清的 DMEM / F12 (1:1) 培养基在 28 进行培养,获得了大量、均一、生长旺盛的前体脂肪细胞。同时还发现在培养皿中涂有 1%明胶有利于草鱼脂肪细胞贴壁,而进行大鼠和猪前体脂肪细胞培养时不需要涂明胶细胞即能很好的贴壁。这可能是由于物种不同,脂肪细胞的黏附能力也存在一定的差异。

### 3.2 原代培养脂肪细胞分化的细胞及分子生物学特性

形态学及油红 O 染色观察显示,草鱼前体脂肪细胞可自发充脂,但强度不及诱导组。培养 3d 后细胞贴壁呈梭形,培养 5d 后可见细胞开始充脂,7d 后可见细胞充脂数目明显增多,细胞大部分变为椭圆形,培养 9d 时可见部分小脂滴融合成大脂滴。这一过程符合脂肪细胞分化规律,即从前体脂肪细胞到不成熟脂肪细胞,最后到成熟脂肪细胞,这与 Akanbi, *et al.*<sup>[15]</sup> 和 Ding, *et al.*<sup>[16]</sup> 的报道一致。在形态学观察过程中还发现,与体外培养的猪、小鼠的脂肪细胞相比,草鱼脂肪细胞的脂滴小而多,这一现象可能与物种差异有关,也可能是由于培养体系中加入较高水平的胎牛血清。有报道指出胎牛血清中含有多种激素和生长因子可促进前体脂肪细胞的增殖<sup>[17,18]</sup>。

脂肪细胞分化包括一系列表型的改变,其实质是一系列基因时序表达的结果。*LPL* 属于脂肪酶基因家族的成员,在鱼类组织中广泛表达<sup>[19,20]</sup>。哺乳动物的研究指出 *LPL* 是脂肪细胞分化早期的标志基因,并随分化其表达逐渐增强<sup>[21]</sup>, Oku, *et al.* 在真鲷前体脂肪细胞的培养过程中亦证实了这一点,即和哺乳动物一样,*LPL* 在脂肪细胞分化的早期即开始表达,在诱导后 3d 达到最高点,之后进入平台期<sup>[11]</sup>。*PPARY* 是脂肪组织中高水平表达的转录因子,它介导特异性脂肪基因的表达,而且它在脂肪细胞分化诱导过程中是在大多数脂肪细胞特异性基因的表达之前被诱导的,是脂肪细胞分化的重要调控因子<sup>[22]</sup>,转染 *PPARY* 质粒可使多能干细胞诱导分化为脂肪细胞<sup>[23]</sup>,在 3T3-L1 前体脂肪细胞和人类原代前体脂肪细胞中沉默 *PPARY*,细胞分化受到抑制<sup>[24,25]</sup>。本研究通过 SQ RT-PCR 方法初步检测在培养第 3 天 (诱导 0 天) 及培养第 9 天 (诱导的第 6 天) *LPL* 与 *PPARY* mRNA 的表达情况,

结果表明培养第 9 天与培养第 3 天相比, *LPL* 与 *PPARY* 基因表达均增加,且诱导组较未诱导组 *PPARY* 表达量高,这与张国华等<sup>[26]</sup>在猪上的研究报道相一致。Vegusda, *et al.*<sup>[10]</sup> 在大西洋鲑研究中也指出鱼类脂肪细胞增殖分化过程受 *PPARY*、CAAT 增强子结合蛋白 (CAAT/enhancer binding protein $\alpha$ , C/EBP $\alpha$ ) 的调控。

### 参考文献:

- [1] Tian Z H, Yang G S, Zhao X B, *et al.* Effects of cytoplasm microinjection of anti-vimentin monoclonal antibody on the proliferation and differentiation of rat preadipocytes and morphology of vimentin [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, 49: 807—812 [田志华, 杨公社, 赵兴波, 等. 抗波形纤维蛋白单抗对大鼠前体脂肪细胞增殖分化及波形纤维形态的影响. 动物学报, 2003, 49: 807—812]
- [2] Zhang J L, He J N, Luo M F, *et al.* Primary culture of rat preadipocyte [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2007, 2 (3): 180—182 [张金玲, 何俊娜, 罗明富, 等. 大鼠前脂肪细胞的原代培养分化. 中国医药生物技术, 2007, 2 (3): 180—182]
- [3] Wang Z C, Liu J Z, Li Y, *et al.* Primary culture of human preadipocyte [J]. *Academic Journal of Sun Yat-sen University of Medical Sciences*, 2001, 22 (6): 443—446 [王竹晨, 刘建中, 李燕, 等. 人前脂肪细胞的原代培养. 中山医科大学学报, 2001, 22 (6): 443—446]
- [4] Fang Z W, Zhu J, Mao X M, *et al.* Primary culture and differentiation of human preadipocyte [J]. *Shandong Medical Journal*, 2007, 47 (21): 11—13 [方振伟, 祝骥, 毛向明, 等. 人前体脂肪细胞的培养及分化研究. 山东医药, 2007, 47 (21): 11—13]
- [5] Xia C, Wang Z, Zhu S L, *et al.* Culture of calf preadipocyte and establishment of its proliferation and differentiation model [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2004, 34 (5): 26—30 [夏成, 王哲, 朱淑玲, 等. 犊牛前脂肪细胞的培养及其增殖与分化模型的建立. 中国兽医科技, 2004, 34 (5): 26—30]
- [6] Aso H, Abe H, Nakajima I, *et al.* A preadipocyte clonal line from bovine intramuscular adipose tissue: nonexpression of GLUT-4 protein during adipocyte differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 213 (2): 369—375
- [7] Suryawan A. L, Swanson V, Hu C. Y. Insulin and hydrocortisone, but not Triiodothyronine, are required for the differentiation of pig preadipocytes in primary culture [J]. *J. Anim. Sci*, 1997, 75: 105—111
- [8] Qu C Q, Zhang G H, Chen F F, *et al.* Primary culture of porcine preadipocyte [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2005, 13 (5): 649—653 [屈长青, 张国华, 陈粉粉, 等. 猪前体脂肪细胞的原代培养. 农业生物技术学报, 2005, 13 (5): 649—653]
- [9] Bouraoui L, Gutiérrez J, Navarro I. Regulation of proliferation and differentiation of adipocyte precursor cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Journal of Endocrinology*, 2008, 198: 459—469

- [10] Vegusdal A, Sundvold H, Gjøen T, *et al.* An in vitro method for studying the proliferation and differentiation of atlantic salmon preadipocytes [J]. *Lipids*, 2003, **38**: 289—296
- [11] Oku H, Tokuda M, Okumura T, *et al.* Effects of insulin, triiodothyronine and fat soluble vitamins on adipocyte differentiation and LPL gene expression in the stromal-vascular cells of red sea bream, *Pagrus major* [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 2006, **144**: 326—333
- [12] Oku H, Tokuda M, Umino T. The effects of 2-bromopalmitate on the fatty acid composition in differentiating adipocytes of red sea bream (*Pagrus major*) [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 2009, **152**: 370—375
- [13] Liu Q, Ji H, Su S S, *et al.* Study on the extraction and preservation of grass carp adipocytes [J]. *Reservoir Fisheries*, 2007, **27** (2): 7—8 [刘茜, 吉红, 苏尚顺, 等. 草鱼脂肪细胞提取与保存的研究. 水利渔业, 2007, 27(2): 7—8]
- [14] Sun C. Regulation of mice preadipocytes proliferation and differentiation by ECM components and cAMP [M]. *Doctoral dissertation of Northwest A & F University*, 2001 [孙超. ECM组分和cAMP对大鼠前体脂肪细胞增殖分化的调控. 西北农林科技大学博士论文, 2001]
- [15] Akanbi K A, Brodie A E, Sviray A, *et al.* Effect of age on the differentiation of porcine adipose stromal-vascular cell in culture [J]. *J Anim Sci*, 1994, **72**: 2828—2835
- [16] Ding S T, McNeel R L, Mersmann H J, *et al.* Expression of porcine adipocyte transcripts: tissue distribution and differentiation in vitro and in vivo [J]. *Comp Biochem. Physiol. B*, 1999, **123**: 307—318
- [17] Butterwith S C. Regulators of adipocyte precursor cells: the development of In vitro culture of domestic primary preadipocytes [J]. *Poultry Science*, 1997, **76**: 118—123
- [18] Ramsay T G, Rao S V, Wolverson C K. In vitro systems for the analysis of the development of adipose tissue in domestic animals [J]. *J. Nutr*, 1992, **122**: 806—817
- [19] Oku H, Koizumi N, Okumura T. Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase genes. Effects of fasting and refeeding on their gene expression in red sea bream *Pagrus major* [J]. *Can Biochem Physiol Part B*, 2006, **145**: 168—178
- [20] Yu Y, Liang X F, Li S Y, *et al.* Molecular cloning and evolutionary analysis of NPY, UCP2, LPL and HL gene of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32** (6): 900—907 [于燕, 梁旭方, 李诗盈, 等. 大口黑鲈脂代谢相关基因 NPY、UCP2、LPL、HL 克隆与分子进化分析. 水生生物学学报, 2008, 32(6): 900—907]
- [21] Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R, *et al.* Cellular and molecular aspects of adipose tissue development [J]. *Annu Rev Nutr*, 1992, **12**: 207—233
- [22] Rosen E D, Sarraf P, Troy A E, *et al.* PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro [J]. *Mol Cell*, 1999, **4**: 611—617
- [23] Takahashi H, Kato K, Miyake K, *et al.* Adeno-associated virus vectormediated anti-angiogenic gene therapy for collagen-induced arthritis in mice [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2005, **23**: 455—461
- [24] Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, *et al.* RNA interference of PPARgamma using fibermodified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells [J]. *Gene*, 2005, **348**: 157—165
- [25] Xu Y, Mirmalek-Sani S H, Yang X, *et al.* The use of small interfering RNAs to inhibit adipocyte differentiation in human preadipocytes and fetal-femur-derived mesenchymal cells [J]. *Exp Cell Res*, 2006, **312**: 1856—1864
- [26] Zhang G H, Yang G S, Qu C Q, *et al.* Isolation and culture of porcine preadipocyte in vitro [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2005, **27**: 693—696 [张国华, 杨公社, 屈长青, 等. 猪前体脂肪细胞的分离培养. 细胞生物学杂志, 2005, 27: 693—696]