

RNA 干扰技术沉默脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白基因对脂肪细胞合成甘油三酯及分泌内脂素的影响

吴洁, 邹瑾, 钟敏

(南华大学附属第一医院心内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白; RNA 干扰技术; 甘油三酯; 内脂素

[摘要] 目的 观察 RNA 干扰技术沉默脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白基因后, 脂肪细胞甘油三酯合成及内脂素分泌的变化。方法 将 3T3-L1 前脂肪细胞采用体外诱导分化为脂肪细胞, 将脂肪细胞与 0~1 mmol/L 不同浓度脂肪酸共孵育后, 测定其甘油三酯及内脂素的浓度。构建针对脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白基因的微小 RNA 质粒表达载体, 将上述载体转染 3T3-L1 脂肪细胞, 用逆转录聚合酶链反应和 Western blot 检测脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白基因及蛋白的表达, 将 0.5 mmol/L 脂肪酸与沉默前后的脂肪细胞共孵育 24 h, 用逆转录聚合酶链反应检测脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白基因沉默前后脂肪细胞内脂素 mRNA 表达的变化, 并测定其甘油三酯及内脂素浓度的变化。结果 随着脂肪酸浓度的增高, 与其共孵育的脂肪细胞内甘油三酯浓度也随着增加 ($P < 0.05$), 其分泌的内脂素浓度也随着增加 ($P < 0.05$); 构建脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白微小 RNA 质粒载体, 转染脂肪细胞后, 能显著抑制脂肪细胞内脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白的 mRNA 及蛋白表达水平 ($P < 0.05$); 沉默脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白基因后脂肪细胞内甘油三酯浓度明显低于沉默前 ($P < 0.05$), 其分泌的内脂素浓度也明显低于沉默前 ($P < 0.05$)。结论 经 RNA 干扰技术沉默脂肪细胞内脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白基因能明显降低脂肪细胞甘油三酯的合成及内脂素的分泌。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Adipocyte Fatty Acid Binding Protein Silencing on Triglyceride Production and Visfatin Secretion in 3T3-L1 Adipocyte

WU Jie, ZOU Jin, and ZHONG Min

(Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Adipocyte Fatty Acid Binding Protein; RNA Interference; Triglyceride; Visfatin

[ABSTRACT] **Aim** To explore the influence of adipocyte's triglyceride anabolism and visfatin secretion after silence adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) genes by RNA interference. **Methods** 3T3-L1 preadipocytes were cultured in vitro and were induced to differentiate into adipocytes, then the adipocytes were cultured with concentration from 0 to 1 mmol/L fatty acid, adipocyte's triglyceride production and visfatin secretion were measured. The micro RNA (miRNA) expression vector plasmid about A-FABP genes was constructed and then transfected with the 3T3-L1 mature adipocytes. A-FABP mRNA expression and A-FABP protein expression were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot. After and before silence A-FABP, the adipocytes were cultured with concentration of 0.5 mmol/L fatty acid, visfatin mRNA expression in adipocyte were measured by RT-PCR, adipocyte's triglyceride anabolism and visfatin secretion were detected. **Results** With the concentration of fatty acid risen in adipocytes, the concentration of triglyceride in adipocyte were raised ($P < 0.05$), the concentration of visfatin in adipocyte were raised too ($P < 0.05$). Constructing the miRNA expression vector plasmid about A-FABP genes, then transfecting the 3T3-L1 mature adipocytes, the expression of mRNA and protein about A-FABP genes were obviously restrained ($P < 0.05$). Af-

[收稿日期] 2011-07-05

[基金项目] 衡阳市科技局科研项目(2009KJ64)

[作者简介] 吴洁, 博士, 主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化的防治, 电话为 0734-8279327, E-mail 为 wujie702@yahoo.com.cn。邹瑾, 硕士, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化的防治, 电话为 0734-8279353, E-mail 为 zoujin1113@yahoo.cn。钟敏, 硕士, 医师, 研究方向为动脉粥样硬化的防治, 电话为 0734-8279353, E-mail 为 15319760@qq.com。

ter silence AFABP genes, the concentration of adipocyte's triglyceride was obviously lower than before ($P < 0.05$), the concentration of visfatin secretion was obviously lower than before ($P < 0.05$). **Conclusion** After silence A-FABP genes by RNA interference, the concentration of adipocyte's triglyceride anabolism and visfatin secretion were lower than before.

脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白(adipocyte fatty acid binding proteins, A-FABP)在脂肪细胞脂肪酸代谢及脂质储存中起重要作用^[1],已成为心血管领域的研究热点。内脂素是近期发现的一个脂肪因子,其主要来源于内脏脂肪,与腹型肥胖密切相关,与糖脂代谢紊乱相关^[2]。由于A-FABP参与脂肪细胞脂质代谢的调节,而脂肪细胞脂肪因子的分泌与其脂质代谢密切相关。因此,我们推测抑制脂肪细胞A-FABP基因表达有可能影响脂肪细胞脂质代谢,进而影响脂肪因子的分泌。本研究通过RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术沉默脂肪细胞A-FABP基因,观察A-FABP基因沉默前后脂肪细胞甘油三酯代谢及内脂素分泌的变化,以期进一步阐明了解A-FABP基因的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

3T3-L1前脂肪细胞系(美国ATCC公司),携带A-FABP微小RNA(miRNA)的质粒和GFP阳性对照质粒[宝生物工程(大连)公司构建],半定量逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂(Fermentas公司),序列分析(上海鼎安生物科技公司),甘油三酯试剂盒(北京北化康泰公司),小鼠内脂素酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(武汉华美公司),聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物、PCR扩增试剂盒(上海生物工程技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 3T3-L1细胞培养及诱导分化 按照文献中的方法^[3],将3T3-L1前脂肪细胞培养于含有10%小牛血清、100 000 u/L青霉素及100 000 u/L链霉素的DMEM培养液中,在5% CO₂、37℃细胞培养箱内培养,每2~3天更换1次培养液。待细胞汇合80%~90%时以含0.25%胰蛋白酶消化,按4×10⁵个细胞/cm²密度进行传代培养。诱导细胞分化参考文献[4]中的方法,待细胞完全汇合后2天诱导分化。诱导方法:用含10 mg/L胰岛素、0.5 mmol/L异丁基甲基黄嘌呤和1 μmol/L地塞米松的

标准培养基培养2天,然后吸净培养基,用含10 mg/L胰岛素的普通培养基培养2天,之后只用普通培养基培养,每2天换液1次。培养8天,用油红O染色进行细胞鉴定。

1.2.2 脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白微小RNA质粒的构建 从GenBank中搜索鼠A-FABP基因的mRNA序列(NM_024406),采用Invitrogen公司提供的在线设计工具设计miRNA。选择A-FABP基因mRNA序列中21nt片段为合适的miRNA靶序列。结合线性化pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR真核表达载体的特点,设计1个针对A-FABP基因的64nt的pre-miRNA寡核苷酸序列,并得到其互补序列,经NCBI Blast排除其非特异同源性。设计好的序列由宝生物工程公司合成,构建入pcDNATM6.2-GW/EmGFPmiR真核表达载体并转化至DH5α感受态大肠杆菌。重组体命名为A-FABP miRNA。

1.2.3 质粒转染3T3-L1脂肪细胞 实验分3组:正常对照组、一个为GFP对照插入序列的阳性对照组、实验组。瞬时转染48 h后,收集细胞抽提总RNA及蛋白,用于A-FABP基因的检测。

1.2.4 逆转录聚合酶链反应检测基因 用TRIzol试剂按说明书提取细胞内总RNA,1%甲醛变性电泳,紫外分光光度计定量,用RevertAidTM First-Strand cDNA合成试剂盒逆转录成cDNA,进行PCR扩增。A-FABP引物:正义链5'TGC CTT TGT GGG AAC CTG 3',反义链5'CCT GTC GTC TGC GGT GAT 3',扩增产物为229 bp;磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物:正义链5'CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG 3',反义链5'GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTAG 3',扩增产物为496 bp;内脂素引物:正义链5'CTT CCT ACT TTG AAT GCC GTG 3',反义链5'CCT CGG GAA CAG CCT TTA CT 3',扩增产物为264 bp。PCR反应体系为25 μL:cDNA模板2 μL,上下游引物各2 μL, MIX:12.5 μL,加双蒸水(distillation-distillation H₂O, ddH₂O)6.5 μL至终体积25 μL。A-FABP的PCR反应条件:94℃预变性5 min,94℃变性1 min,48℃退火1 min,72℃延伸1 min,30个循环后,72℃延伸5 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳回收,凝胶成像系统紫外照相扫描分析。内脂素的PCR

反应条件:95℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,46℃退火 30 s,72℃延伸 50 s,30 个循环后,72℃延伸 10 min。

1.2.5 Western blot 检测脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白 细胞经 200 μ L 细胞裂解液 [50 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 5 mmol/L 乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA), 25% 蔗糖 100 mg/L, PMSF 0.6 μ L, β -巯基乙醇 2.4 μ L] 冰浴裂解, 8% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离, 电转移至硝酸纤维素膜上, 在含 5% 脱脂奶粉的 TBST (tris-buffered saline and tween 20) (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mol/L NaCl, 0.05% Tween 20) 中室温封闭过夜, 加入 1:100 稀释的兔抗小鼠单克隆抗体, 4℃孵育 2 h, 加入 1:500 稀释的山羊抗兔 IgG, 室温孵育 2 h, BCIP/NBT 显色。以 β -actin 作为内对照。

1.2.6 脂肪细胞的分组 将成熟的脂肪细胞分为 4 组^[5], 对照组:成熟的脂肪细胞;脂肪酸 1 组:成熟的脂肪细胞 + 0.5 mmol/l 脂肪酸共孵育 24 h; RNAi 组:miRNA 质粒表达载体转染的 3T3-L1 脂肪细胞;脂肪酸 2 组:miRNA 质粒表达载体转染的 3T3-L1 脂肪细胞 + 0.5 mmol/L 脂肪酸共孵育 24 h。

1.2.7 脂肪细胞内甘油三酯的测定 参照文献 [6] 方法抽提甘油三酯, 根据甘油三酯试剂盒内说明书测定甘油三酯。计算公式:甘油三酯浓度 = 样本光密度 (optical density, OD) 值/标准品 OD 值 \times 2.26 mmol/L。

1.2.8 脂肪细胞内脂素的测定 采用 ELISA 法检测脂肪细胞培养液中内脂素水平。按照 ELISA 试剂盒说明书测定标准品及各孔细胞培养上清液中内脂素含量。以系列浓度内脂素标准品绘制 A450 标准曲线, 根据标准曲线计算内脂素浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3T3-L1 前脂肪细胞诱导为成熟脂肪细胞的形态学观察

3T3-L1 前脂肪细胞呈长梭形或不规则形, 胞浆中无脂滴; 诱导分化后, 细胞内逐渐出现脂滴, 细胞变圆、变大, 脂滴数量不断增多, 并围绕胞核形成典型的“戒环”样结构, 油红 O 染色显示细胞内脂滴呈红色 (图 1)。

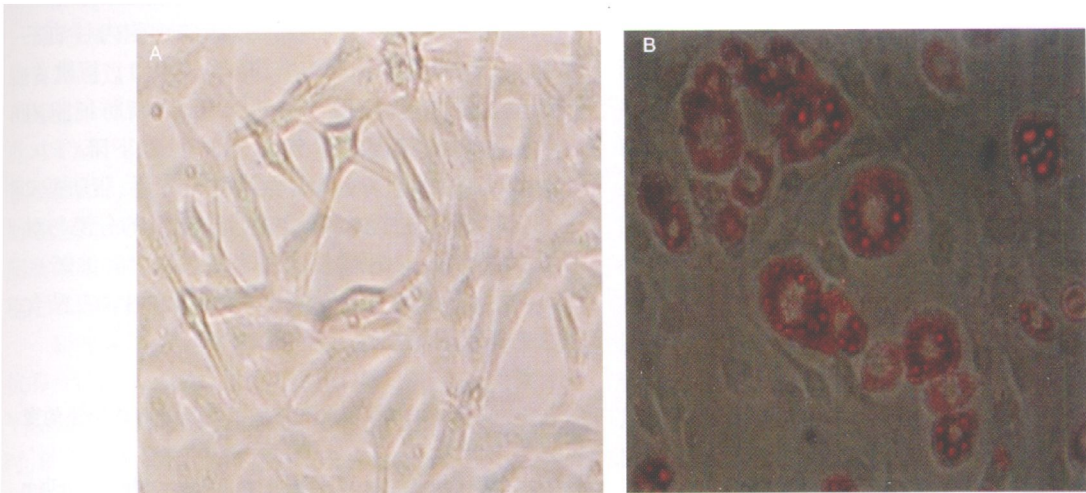


图 1. 3T3-L1 脂肪细胞 (油红 O 染色, $\times 20$) A 为前脂肪细胞, B 为成熟脂肪细胞。

Figure 1. 3T3-L1 adipocytes

2.2 不同浓度脂肪酸对脂肪细胞内甘油三酯含量及内脂素分泌的影响

以 0.0、0.25、0.50、1.00 mmol/L 脂肪酸与 3T3-L1 脂肪细胞共孵育 24 h, 结果发现:随着脂肪酸浓度的增加细胞内甘油三酯的含量随之增加, 脂肪细胞分

泌内脂素的含量也随着增加 (表 1)。

2.3 微小 RNA 质粒的转染对 3T3-L1 脂肪细胞内脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白表达的抑制

2.3.1 逆转录聚合酶链反应检测脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白 mRNA 表达 逆转录聚合酶链反应

结果显示,构建的 A-FABP miRNA 能显著抑制脂肪细胞 A-FABP mRNA 表达水平。与对照组比较, RNAi 组 A-FABP mRNA 抑制率为 71% ($P < 0.05$; 图 2)。

表 1. 不同浓度脂肪酸对 3T3-L1 细胞甘油三酯合成及内脂素分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1. The influence of fatty acid on triglyceride anabolism and visfatin secretion in adipocytes

分 组	甘油三酯 (mmol/L)	内脂素 ($\mu\text{g/L}$)
0 mmol/L 脂肪酸	2.446 \pm 0.008	1.967 \pm 0.135
0.25 mmol/L 脂肪酸	2.816 \pm 0.010 ^a	2.391 \pm 0.035 ^a
0.50 mmol/L 脂肪酸	3.184 \pm 0.027 ^{ab}	2.531 \pm 0.156 ^{ab}
1.00 mmol/L 脂肪酸	3.905 \pm 0.015 ^{abc}	2.613 \pm 0.076 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与脂肪酸浓度 0 mmol/L 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与脂肪酸浓度 0.25 mmol/L 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与脂肪酸浓度 0.50 mmol/L 组比较。

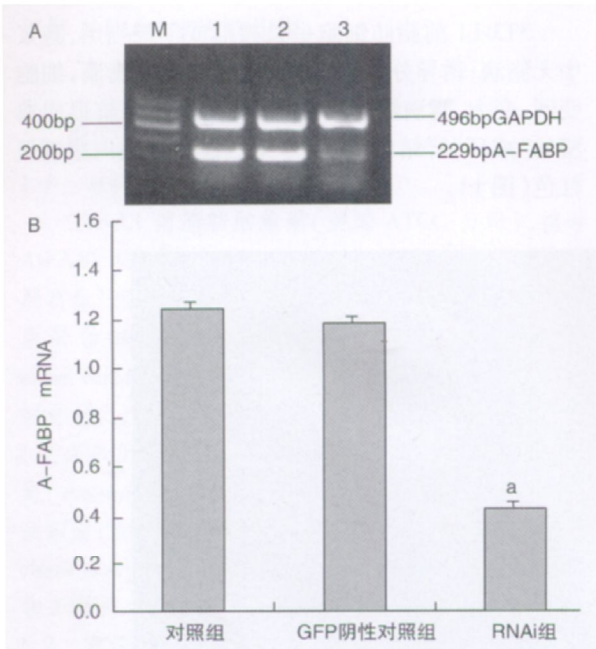


图 2. 3T3-L1 脂肪细胞 A-FABP 的 mRNA 表达水平 A 图: A-FABP mRNA 的电泳图; M 为 marker, 1 为对照组, 2 为 GFP 阴性对照组, 3 为 RNAi 组。B 图: A-FABP mRNA 表达的半定量分析图; a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 2. Expression of mRNA for A-FABP in 3T3-L1 adipocytes

2.3.2 Western blot 检测脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白表达 Western blot 分析结果表明, 构建的 A-FABP miRNA 能显著抑制脂肪细胞 A-FABP 蛋白表

达水平。与对照组比较, RNAi 组 A-FABP 蛋白抑制率为 63% ($P < 0.05$; 图 3)。

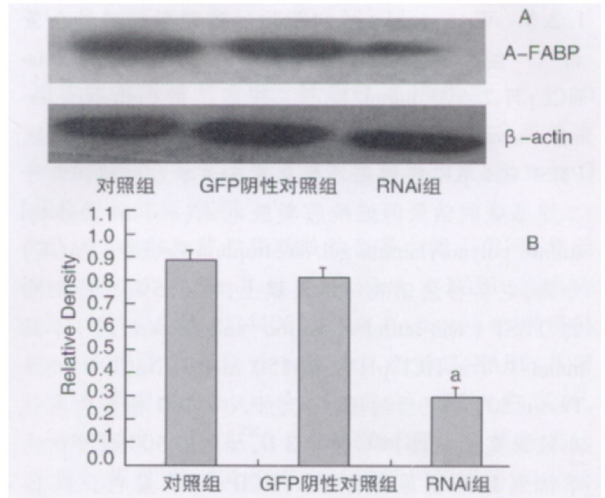


图 3. 3T3-L1 脂肪细胞 A-FABP 的蛋白表达水平 A 图: A-FABP 蛋白表达的电泳图。B 图: A-FABP 蛋白表达的半定量分析图; a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 3. Expression of protein for A-FABP in 3T3-L1 adipocytes

2.4 脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白沉默前后脂肪细胞内甘油三酯含量及内脂素分泌的变化

与对照组比较, 脂肪酸 1 组脂肪细胞内甘油三酯含量及内脂素的分泌均增加 ($P < 0.05$)。沉默 A-FABP 基因后, RNAi 组与对照组比较, 脂肪细胞内甘油三酯含量及内脂素的分泌均明显下降 ($P < 0.05$); 即使加 0.5 mmol/L 软脂酸孵育后, 脂肪酸 2 组的脂肪细胞内甘油三酯含量及内脂素的分泌与对照组和脂肪酸 1 组比较仍明显下降 ($P < 0.05$)。RNAi 组与脂肪酸 2 组比较, 脂肪细胞内甘油三酯含量及内脂素的分泌均下降 ($P < 0.05$; 表 2)。

表 2. RNAi 前后脂肪细胞合成甘油三酯及分泌内脂素的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2. The influence of RNAi on triglyceride anabolism and visfatin secretion in adipocytes

分 组	甘油三酯 (mmol/L)	内脂素 ($\mu\text{g/L}$)
对照组	2.476 \pm 0.007	1.962 \pm 0.128
脂肪酸 1 组	3.192 \pm 0.025 ^a	2.516 \pm 0.149 ^a
RNAi 组	1.436 \pm 0.005 ^{ab}	1.489 \pm 0.074 ^{ab}
脂肪酸 2 组	1.862 \pm 0.049 ^{abc}	1.654 \pm 0.045 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与脂肪酸 1 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 RNAi 组比较。

2.5 脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白基因沉默前后内脂素 mRNA 的变化

经 RNAi 沉默 A-FABP 基因后的 RNAi 组脂肪细胞内脂素 mRNA 表达水平较对照组和脂肪酸 1 组均明

显降低 ($P < 0.05$) ; 加 0.5 mmol/L 脂肪酸孵育后, 脂肪酸 2 组脂肪细胞内脂素 mRNA 的表达较 RNAi 组增高, 但仍较对照组和脂肪酸 1 组低 ($P < 0.05$; 图 4)。

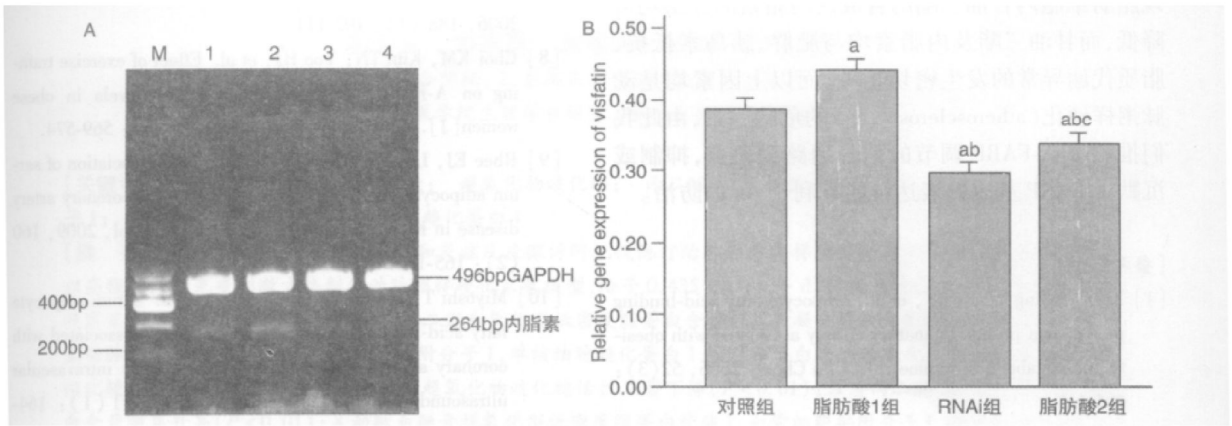


图 4. 各组脂肪细胞内脂素 mRNA 表达的变化 A 图: 脂肪细胞内脂素 mRNA 的电泳图; M 为 marker, 1 为对照组, 2 为脂肪酸 1 组, 3 为 RNAi 组, 4 为脂肪酸 2 组。B 图: 内脂素 mRNA 表达的半定量分析图; a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与脂肪酸 1 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 RNAi 组比较。

Figure 4. Expression of mRNA for visfatin in 3T3-L1 adipocytes

3 讨论

脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白是 FABP 家族中的一员, 主要在脂肪细胞中表达。有研究发现, 脂肪细胞首先通过其膜受体 CD36 介导摄取长链脂肪酸, 再通过 A-FABP 转运以合成甘油三酯、储存能量, 因此 A-FABP 在脂肪细胞脂肪酸代谢及脂质储存中起重要作用。本实验通过将不同浓度脂肪酸与成熟脂肪细胞共孵育后发现, 随着脂肪酸浓度的不断增高, 脂肪细胞内甘油三酯含量也随着增高。证实脂肪细胞可以通过摄取脂肪酸来合成甘油三酯。

研究发现敲除 A-FABP 基因后能减少胰岛素抵抗等代谢相关疾病, 并降低血甘油三酯和胆固醇水平, 从而优化糖脂代谢。当 A-FABP 基因过度表达时, 能够加速胆固醇和甘油三酯在泡沫细胞中的聚集, 提示 A-FABP 在脂质代谢及泡沫细胞形成中起关键作用^[7]。近年来研究发现, 血浆 A-FABP 水平是颈动脉粥样硬化的独立危险因素^[8], 并随着冠状动脉病变支数的增多而升高^[9]; 且冠状动脉病变患者血清 A-FABP 水平与斑块面积呈正相关^[10]。提示血清 A-FABP 水平升高是冠心病的独立危险因素^[11]。

RNA 干扰技术是由双链 RNA 诱发的同源 mRNA 高效特异性降解的现象。由于 RNAi 能高效特

异阻断基因的表达, 它成为研究信号传导通路的良好工具。而其中利用微小 RNA 表达载体实现的 RNA 干扰, 更因其稳定性高、用量少和特异性强等特点, 在 RNAi 中得到广泛应用。故本实验针对 A-FABP 基因采用构建 miRNA 重组质粒的方法转染脂肪细胞, 发现转染 A-FABP miRNA 重组质粒的 3T3-L1 细胞 A-FABP mRNA 及蛋白的表达明显降低。提示我们构建的重组质粒能有效的抑制 3T3-L1 细胞中 A-FABP 基因的表达, 为进一步研究 A-FABP 基因在脂肪细胞中的作用提供了可靠方法。

脂肪细胞可以分泌几十种脂肪细胞因子, 如内脂素, 其主要来源于内脏脂肪。研究发现, 内脂素不仅可以促进脂肪的积聚, 还具有类胰岛素样作用。用免疫组化染色法检测急性心肌梗死患者斑块破裂区的组织, 发现内脂素强染色效应亦出现在富含脂质的区域。提示内脂素可能与冠心病患者的不稳定斑块损伤有关^[12]。我们的研究发现, 随着成熟脂肪细胞内甘油三酯含量的增加, 脂肪细胞分泌内脂素的水平也随着增加, 提示内脂素的分泌可能与脂质沉积相关。沉默 A-FABP 基因后, 脂肪细胞内甘油三酯含量及内脂素的分泌均明显下降, 提示 A-FABP 基因可能参与调控脂肪细胞内脂素的分泌。进一步研究发现, 经 RNAi 沉默 A-FABP 基因后, 脂肪细胞内脂素 mRNA 表达水平较 A-FABP 基因沉默前明显降低, 提示 A-FABP 基因可能参与内脂素基

因表达的调控,从而影响脂肪细胞内脂素的分泌,但其具体机制有待进一步研究证实。

总之,我们的实验通过沉默 A-FABP 基因后,发现脂肪细胞内甘油三酯的合成及内脂素的分泌均可降低,而甘油三酯及内脂素均与肥胖、胰岛素抵抗、脂质代谢异常的发生密切相关,而以上因素均是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的危险因素,由此我们推测以 A-FABP 调节的信号通路为靶点,抑制或沉默 A-FABP 基因的表达可能有利于 As 的防治。

[参考文献]

- [1] Xu A, Wang Y, Xu JY, et al. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome [J]. *Clin Chem*, 2006, 52 (3) : 405-413.
- [2] Daniel L, Michele P, Gerard S, et al. Visfatin: The link between inflammation and childhood obesity [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32 (6) : e71.
- [3] Juan CC, Chen Y, Wu LY, et al. Angiotensin II enhances insulin sensitivity in vitro and in vivo [J]. *Endocrinology*, 2005, 146 (5) : 2 246-254.
- [4] Murase Y, Koba yashi J, Nohara A, et al. Raloxifene promotes adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 538 (3) : 1-4.
- [5] 张静,王秋月,姜雅秋,等.游离脂肪酸诱导 3T3-L1 细胞胰岛素抵抗模型的建立 [J]. *解剖科学进展*, 2008, 14 (2) : 126-129.
- [6] 曾涛,谢克勤,张翠丽,等.氯仿 P 甲醇匀浆测定肝脏甘油三酯含量 [J]. *卫生研究*, 2008, 12 (5) : 550-551.
- [7] Fu Y, Luo L, Luo N, et al. Lipid metabolism mediated by adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene expression in human THP-1 macrophages [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 188 (1) : 102-111.
- [8] Choi KM, Kim TN, Yoo HJ, et al. Effect of exercise training on A-FABP, lipocalin-2 and RBP4 levels in obese women [J]. *Clin Endocrinol*, 2009, 70 (4) : 569-574.
- [9] Rhee EJ, Lee WY, Park CY, et al. The association of serum adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in Korean adults [J]. *Eur J Endocrinol*, 2009, 160 (2) : 165-172.
- [10] Miyoshi T, Onoue G, Hirohata A, et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is independently associated with coronary atherosclerotic burden measured by intravascular ultrasound [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211 (1) : 164-169.
- [11] Doi M, Miyoshi T, Hirohata S, et al. Association of increased plasma adipocyte fatty acid-binding protein with coronary artery disease in non-elderly men [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2011, 10: 44.
- [12] Adya R, Tan BK, Puno A, et al. Visfatin induces human endothelial VEGF and MMP-2/9 production via MAPK and PI3K/Akt signaling pathways: novel insights into visfatin-induced angiogenesis [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 78 (2) : 356-365.

(此文编辑 曾学清)