

文章编号 :1004-0374(2009)05-0695-06

脂肪细胞的发育分化

宋檀婧, 黄海艳, 李 希, 汤其群*

(复旦大学生物医学研究院干细胞与再生医学研究所, 复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 上海 200032)

摘 要: 脂肪组织是人体重要的能量贮存器官, 同时还是一个重要的内分泌器官。适量的脂肪组织为人体所必需, 但过多或过少的脂肪组织都会引起代谢综合征。脂肪细胞起源于血管基质中多潜能干细胞, 这类干细胞具有自我更新和多向分化的潜能, 在合适的条件下不仅可以分化为脂肪细胞, 还可分化为肌肉细胞、软骨细胞和成骨细胞等中胚层来源的细胞。从多潜能干细胞到脂肪细胞的发育阶段可被分为三个阶段:(1)多潜能干细胞;(2)前脂肪细胞;(3)脂肪细胞。目前本领域的研究集中在干细胞定向为前脂肪细胞的机理以及这些定向为前脂肪细胞的干细胞的来源。该文将对从多潜能干细胞发育分化为成熟脂肪细胞的过程进行详细的阐述。

关键词: 多能干细胞; 脂肪细胞; 终末分化; 转录调控

中图分类号: Q21; Q813 文献标识码: A

Adipocyte development

SONG Tan-jing, HUANG Hai-yan, LI Xi, TANG Qi-qun*

(Institute of Stem Cell and Regenerative Medicine, Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fudan University Shanghai Medical College, Shanghai 200032, China)

Abstract: Adipose tissue plays an important role in energy storage, and recent studies indicate that adipose tissue also serves as an important endocrine organ by producing hormones (Adipokine) such as leptin, resistin and the cytokine TNF α . Obesity is accompanied by an increase in the size and number of adipocytes. The rise in adipocyte number is the result of: (i) recruitment of new preadipocytes from the population of mesenchymal stem cells (MSCs) in the vascular stroma of adipose tissue, and (ii) "mitotic clonal expansion" of the preadipocyte population during differentiation. Pluripotent MSCs have the potential to undergo commitment into adipocyte, myocyte, osteocyte, or chondrocyte lineages. The developmental pathway that gives rise to mature adipocytes involves 2 distinct processes: commitment and terminal differentiation. Although the sequential steps of terminal adipocyte differentiation have been clearly defined, the steps in the commitment of pluripotent stem cells to the adipocyte lineage have not. In the present review, we give a detail description of adipocyte development according to the work of ours and other groups.

Key words: pluripotent stem cell; adipocyte; terminal differentiation; transcriptional regulation

脂肪组织是人体重要的能量贮存器官, 当能量摄取大于消耗时, 机体就将多余的能量以甘油三酯的形式储存在脂肪细胞中; 而当机体能量消耗超出摄取时, 储存在脂肪细胞内的甘油三酯就会被分解成自由脂肪酸等形式释放出来, 以补充体内其他细胞或组织的生理需求。另外近十多年的研究发现脂肪组织还是一个重要内分泌组织^[1], 它分泌多种细

收稿日期: 2009-08-12

基金项目: 国家重大科学研究计划(2006CB943700); 国家杰出青年基金项目(30625015); 上海市医学领军人才项目(B-LJ06032); 国家自然科学基金项目(30700403; 30700121)

* 通讯作者: Tel: 021-54237198; E-mail: qqtang@shmu.edu.cn

胞因子(脂肪因子),如瘦素(leptin)、白细胞介素(interleukin)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)和脂联素(adiponectin)等。这些因子一方面参与能量代谢的调节;另一方面介导肥胖引起的代谢综合征。已有的研究表明过多或过少的脂肪组织都会引起代谢综合征,适量的脂肪组织为人体所必需。

脂肪细胞起源于血管基质中多潜能干细胞,这类干细胞具有自我更新和多向分化的潜能,在合适的条件下,不仅可以分化为脂肪细胞,还可分化为肌肉细胞、软骨细胞和成骨细胞等中胚层来源的细胞^[2]。从多潜能干细胞到脂肪细胞的发育可分为三个阶段(图1):(1)多潜能干细胞;(2)前脂肪细胞;(3)脂肪细胞。目前本领域的研究集中在干细胞定向为前脂肪细胞的机理以及这些定向为前脂肪细胞的干细胞的来源。本文将对从多潜能干细胞发育分化为成熟脂肪细胞的过程进行详细的阐述。

1 脂肪细胞终末分化

脂肪组织体积的增大,一方面是由于脂肪细胞体积的增大;另一方面是由于脂肪细胞数量的增加。脂肪细胞数量的增加,一方面是由于干细胞定向为前脂肪细胞,这些细胞在适当的激素诱导下分化为脂肪细胞;另一方面在前脂肪细胞分化为脂肪细胞的过程中发生有丝分裂克隆扩增的过程。3T3-L1是已定向的前脂肪细胞模型,在过去30年里,该模型被广泛应用于研究脂肪细胞终末分化的机理。

1.1 有丝分裂克隆扩增

在3T3-L1前脂肪细胞的培养过程中,前脂肪细胞生长融合后发生接触抑制,并停留在细胞周期的G₀/G₁期。生长抑制是前脂肪细胞分化所必需的^[3]。生长抑制的前脂肪细胞接收到合适的有丝分裂和成

脂信号后会同步地重新进入细胞周期,经历数轮细胞分裂,这一过程即被称为有丝分裂克隆扩增(图2)。尽管关于有丝分裂克隆扩增是否是脂肪细胞分化所必需的仍有争议,但是越来越多的占有优势的实验证据表明有丝分裂克隆扩增是脂肪细胞终末分化的先决条件。一般认为,这种有丝分裂的结果使DNA结构变得松散,从而使转录因子能够进入特定基因的转录调控结合区,以启动随后的脂肪细胞分化程序。众多研究表明,抑制有丝克隆扩增的过程也抑制了脂肪细胞的分化。用雷帕霉素(Rapamycin)、阿非迪霉素(Aphidicolin)或者Roscovitine等阻断细胞周期的进程,脂肪细胞的分化也随之阻断^[4-6]。阻断C/EBP β 信号能够阻止有丝克隆扩增及脂肪细胞分化^[7,8]。

随着细胞完成有丝分裂克隆扩增,它们进入了一个独特的细胞周期阶段即GD期,第二个也是永久性的生长抑制期。在3T3-L1细胞,这一过程以细胞周期蛋白依赖的激酶抑制剂p18、p21和p27的表达变化为特征。即使在分化启动后,前脂肪细胞仍然保持去分化和重新进入有丝分裂的能力,但是一旦细胞退出GD期,则将走向终末分化。

1.2 转录因子

在脂肪细胞终末分化的过程中,一系列重要转录因子的程序性表达导致了脂肪细胞特异基因的表达,从而产生脂肪细胞的表型(图2,3)。到目前为止,这个过程中研究最多的是有关C/EBP家族和PPAR家族转录因子。

1.2.1 C/EBP家族 C/EBP家族是具有激活特定基因DNA增强子CCAAT重复序列功能的转录因子。迄今为止,已有6个成员被发现,即C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP γ 、C/EBP δ 、C/EBP ϵ 和C/EBP ξ (又

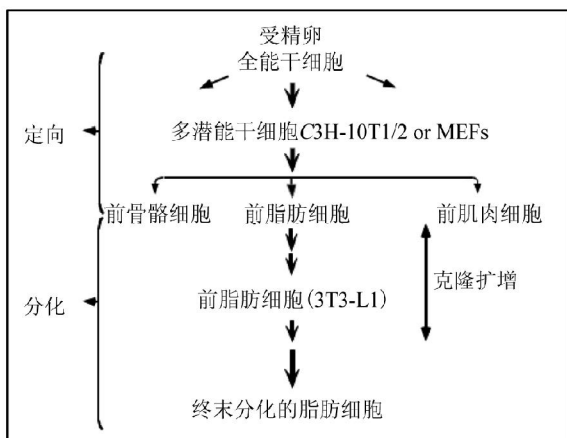


图1 脂肪细胞的发育过程

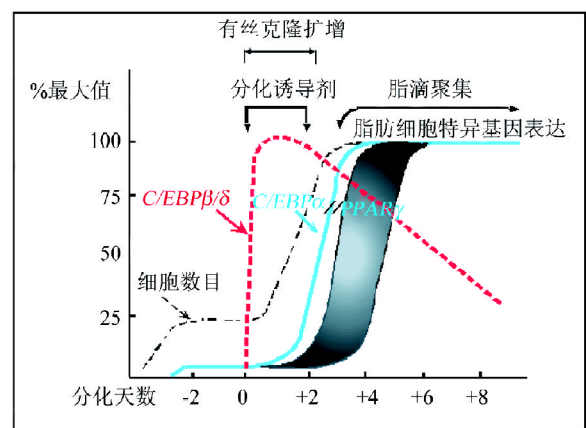


图2 3T3-L1前脂肪细胞分化过程中重要事件的发生

称 CHOP - 10)^[9]。这些蛋白在多种组织中调控细胞生长、分化和免疫反应等。其中, C/EBP α 、 C/EBP β 、 C/EBP δ 和 CHOP - 10 参与脂肪形成。

C/EBP 家族成员具有三个必需的功能域: 转录激活域、DNA 结合域和二聚化功能域。在 C/EBP 二聚化功能域中富含亮氨酸, 这些亮氨酸残基都在 α 螺旋的同一个方向出现, 形成亮氨酸拉链结构, 通过该结构 C/EBP 可以与自身或其他 C/EBP 成员以疏水键结合成同源或异源二聚体。同源或异源二聚体的形成影响 C/EBP 对 DNA 的亲和力, 不形成二聚体的 C/EBP 对 DNA 的亲和力明显降低。C/EBP 的 DNA 结合域和二聚化功能域位于蛋白 C 端, 统称 bZIP 结构域, 在 C/EBP 家族和不同生物中高度保守。

C/EBP 家族是第一个被证明在脂肪细胞分化过程中起重要作用且在脂肪生成过程中按一定时序表达的转录因子家族^[10]。在分化过程的早些时候, 转录因子 C/EBP β 和 C/EBP δ 的表达很快增加, 随后活化(图4)的 C/EBP β 和 C/EBP δ 可以激活 C/EBP α 。C/EBP α 基因启动子上具有 C/EBP 调节元件, 该元件能结合 C/EBP α 进而激活其自身表达, 维持分化状态。

C/EBP β 和 C/EBP δ 可以分别被 cAMP 和糖皮质激素诱导表达。C/EBP β 和 C/EBP δ 在脂肪生成中的作用是通过转基因的方法证明的。在激素缺乏的情况下外源性表达 C/EBP β 足以促使 3T3-L1 前脂肪细胞向脂肪细胞分化, 而 C/EBP δ 的外源性表达可以加速脂肪积累。缺少 C/EBP β 和 C/EBP δ 两者之一的胚胎成纤维细胞脂肪生成能力明显减低, 但当两者同时缺少时, 分化成脂肪细胞的过程被严重阻

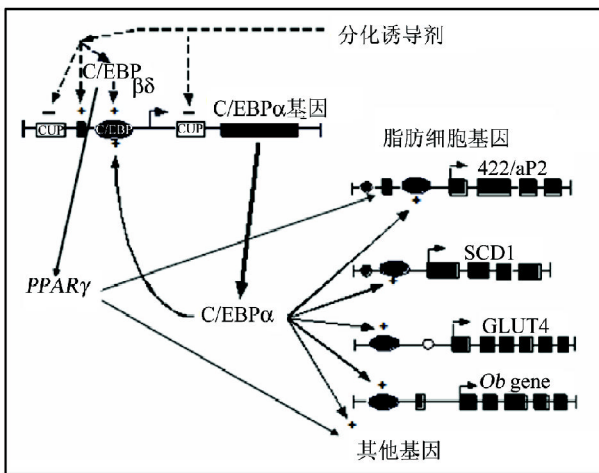


图3 3T3-L1前脂肪细胞发育分化过程中重要转录因子的分子调控网络

断。体内实验也取得了类似的结果。敲除 C/EBP β 和 C/EBP δ 两者之一的小鼠具有正常的白色脂肪组织, 但棕色脂肪组织中脂肪积累表现迟缓。同时敲除 C/EBP β 和 C/EBP δ 的小鼠, 85% 个体在围产期不明原因死亡, 存活者棕色脂肪组织明显减少, 白色脂肪组织轻度减少^[11]。C/EBP β 在发挥转录活性前还受到程序性的磷酸化(图4)和糖基化调控^[12-14]。

C/EBP α 被认为是脂肪细胞分化过程中必不可少的因子。C/EBP α 在分化的较晚期阶段表达, 可激活大量的脂肪细胞分化的特异基因, 如 422/aP2、SCD1、GLUT4 和 Ob 基因等^[15]。在 3T3-L1 前脂肪细胞中, 反义 C/EBP α mRNA 片段可以抑制激素诱导的细胞分化。异位表达 C/EBP α 可在缺乏激素诱导的情况下启动分化。

CHOP - 10 不具有 DNA 结合域, 但与其他 C/EBP 成员异二聚化可以抑制其他成员的转录活性^[16]。CHOP - 10 表达于生长抑制的前脂肪细胞, 激素诱导后, 前脂肪细胞进入 S 期后, CHOP - 10 表达下调, 释放 C/EBP β , 从而使前脂肪细胞向脂肪细胞分化。过表达 CHOP - 10 或用蛋白酶体抑制剂增加 CHOP - 10 的表达将会抑制脂肪细胞的分化。

1.2.2 PPAR家族 过氧化物酶增殖物活化受体家族 PPAR 是一类核激素受体, 它由三个不同基因编码组成核受体 PPAR α 、PPAR β (δ)和 PPAR γ 。PPAR 的结构包括四个功能区: N 端的不依赖配体的活性区, 该区的结构在各亚型相差甚远, 它的丝氨酸残基受丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)磷酸化后可抑制受体活性; 高度保守的 DNA 结合区(DBD), 用于和目标 PPAR 反应元件(PPRE)结合; 铰链区, 将 DBD 与配体结合区相连; 配体结合区(LBD), 该区氨基酸序列的不同使各亚型的 PPAR 分别对不同配体产生亲和力。PPAR 基因激活后与另一核受体树脂样 X 受体(RXR)结合成异二聚体, 然后作用于特异的过氧化物增生反应元件, 从而改变靶细胞基因调控。

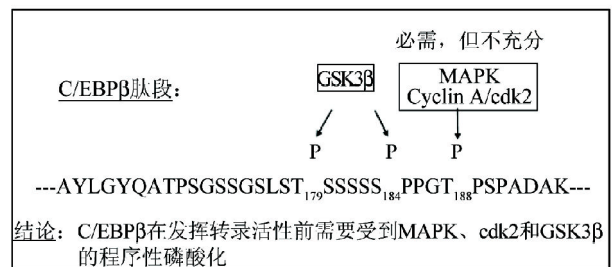


图4 程序性磷酸化是C/EBP β 获得DNA结合活性所必需

PPAR γ 是脂肪形成过程中关键的调节因子。该转录因子在诱导分化的过程中表达增加,之后可激活下游大量与脂肪酸结合、摄取和储存有关的基因表达,如422/aP2、脂蛋白酶、乙酰辅酶A合酶及磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)等^[17-20]。PPAR γ 有三种亚型:PPAR γ 1、PPAR γ 2和PPAR γ 3。其中,PPAR γ 1在不同组织中以低水平表达,PPAR γ 2仅在脂肪细胞中表达,PPAR γ 3仅在巨噬细胞和大肠中被发现。PPAR γ 在脂肪形成中的重要性已经从多方面被证实。PPAR γ 缺乏的小鼠可因胎盘缺陷而在胚胎期死亡^[21],单纯去除PPAR γ 基因的胚胎干细胞既不能分化为脂肪细胞,也不能参与脂肪组织形成。异位表达或使用外源性配体激活PPAR γ 可诱导脂肪细胞分化;PPAR γ 和C/EBP α 的联合表达可使成肌细胞转化为脂肪细胞。

1.2.3 SREBP 家族 固醇调节元件结合蛋白属碱性螺旋环螺旋家族,调节胆固醇和脂肪酸代谢有关的基因转录。目前已鉴定出3个成员:SREBP-1a、SREBP-1c和SREBP-2。脂肪细胞决定和分化依赖因子1(ADD1)在大鼠脂肪细胞中克隆出来,与人SREBP-1c同源。SREBP-1a和ADD1/SREBP-1c来源于同一个基因不同的启动子,SREBP-2来源于独立的基因。SREBP-1a是所有SREBP反应基因的强激活剂,SREBP-1c可激活脂肪酸合成所需的基因转录,SREBP-2增强胆固醇合成。

在SREBP家族中,与脂肪生成有关最值得一提的是ADD1/SREBP-1c。它在体内可以调节很多和脂肪生成有关的基因的表达。ADD1/SREBP-1c mRNA水平在诱导分化后24 h增加,暗示它在脂肪形成的早期发挥重要作用。ADD1/SREBP-1c影响脂肪生成的机制还不是很清楚,但种种迹象表明与PPAR γ 有关^[22]。ADD1/SREBP-1c的表达可能产生了提高PPAR γ 活性的因子。ADD1/SREBP-1c基因杂合能导致脂肪细胞分化的阻断,而加入PPAR γ 配体TZD后分化完全恢复。最近有文献提出,PPAR γ 本身就是ADD1/SREBP-1c作用的一个靶基因。

2 多潜能干细胞向前脂肪细胞定向

C3H10T1/2是目前最常用的多潜能干细胞系。它由14—17 d C3H小鼠胚胎中分离,具有成纤维细胞形态和多向分化潜能,在DNA甲基化酶抑制剂5-氮杂胞苷(5-azacytidine)作用下能分化为肌肉细胞、脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞^[23-25]。这种细胞类型的转换是可以遗传的,因为分离出的克隆

即使不再给予5-氮杂胞苷处理也能保持这些特定的表型。DNA甲基化酶抑制剂5-氮杂胞苷被证实可以诱导某个或某些基因的稳定表达,而这些基因的表达导致了多潜能干细胞的定向^[26]。Myo D就是这样被发现的一种能够将多潜能干细胞转换为成肌细胞的转录因子^[27]。Myo D的发现又导致了在成肌细胞定向过程中其他转录因子Myf5和myogenin的发现^[28]。一些研究发现Sox9参与软骨方向的定向,而Runx2/Cbfa1、Osterix参与成骨方向定向。然而,参与多潜能干细胞向前脂肪细胞定向的基因仍不明确。

骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)属转化生长因子 β (TGF- β)超家族成员,最早被发现能够诱导异位成骨^[29]。但目前发现BMP具有多种生物学功能,通过调控多种类型细胞的发育分化参与胚胎发生、器官发生和形态发生^[30]。骨形成蛋白可促进多潜能干细胞分化为脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞和肌肉细胞等^[31-34]。Tang等^[35]发现BMP-4能够诱导多潜能C3H10T1/2细胞完全向前脂肪细胞定向。将C3H10T1/2细胞暴露于外源性BMP-4中,细胞可向前脂肪细胞定向,并在后续激素(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、地塞米松和胰岛素)的作用下分化为成熟的脂肪细胞^[35]。BMP-4预处理的多潜能C3H10T1/2细胞经皮下注入裸鼠体内,也可分化为与正常脂肪不能区分的脂肪组织^[36]。Bowers等^[36]又发现,用DNA甲基化酶抑制剂5-氮杂胞苷处理C3H10T1/2细胞筛选到一株前脂肪细胞系A33细胞,该细胞系高表达BMP-4,并且这种内源的BMP-4对于多潜能干细胞获得前脂肪细胞特性是必需的。这一现象对于破译多潜能干细胞向前脂肪细胞定向过程非常有价值。

细胞密度和细胞形态在干细胞定向过程中也发挥重要作用。McBeath等^[37]研究发现,人多潜能间质干细胞在密度低时易分化为成骨细胞,而在高密度时易分化为脂肪细胞。以微影图案基质控制细胞的伸展状态,研究人员发现生长在小的纤维黏连蛋白岛上的人间质干细胞处于未伸展并且收缩状态,只能转变成脂肪细胞;而生长在较大纤维黏连蛋白岛上的人间质干细胞处于扁平 and 伸展状态,只能分化为成骨细胞。赖氨酸氧化酶(LOX)在细胞基质的形成中起很重要的作用,Huang等^[38]研究发现该蛋白为BMP信号通路的一个靶基因,在干细胞定向为前脂肪细胞过程中起很重要作用(图5)。该基因在生物体内的功能有待在动物模型上进一步验证。

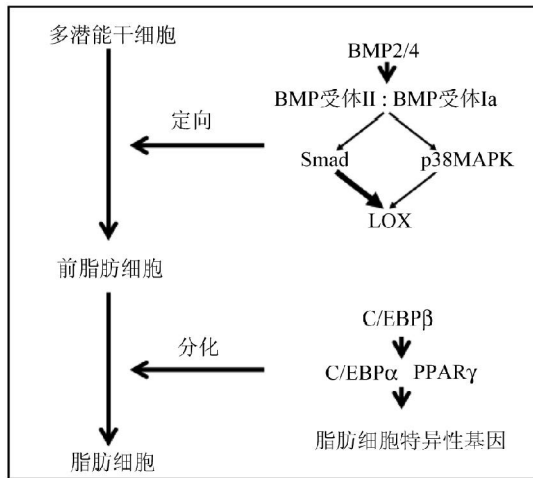


图5 脂肪细胞发育分化的分子机理

[参 考 文 献]

- [1] Kershaw EE, Filter JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89: 2548-56
- [2] Young HE, Mancini ML, Wright RP, et al. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn*, 1995, 202: 137-44
- [3] Pairault J, Green H. A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(10): 5138-42
- [4] Yeh WC, Bierer BE, McKnight SL. Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(24): 11086-90
- [5] Reichert M, Eick D. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene*, 1999, 8(2): 459-66
- [6] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(1): 44-9
- [7] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. CCAAT/enhancer-binding protein β is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(3): 850-5
- [8] Zhang JW, Tang QQ, Vinson C, et al. Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1): 43-7
- [9] Ossipov V, Descombes P, Schibler U. CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(17): 8219-23
- [10] Yeh WC, Cao Z, Classon M, et al. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev*, 1995, 9(2): 168-81
- [11] Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, et al. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene. *EMBO J*, 1997, 16(24): 7432-43
- [12] Tang QQ, Grønberg M, Huang H, et al. Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein β by MAPK and glycogen synthase kinase 3 β is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(28): 9766-71
- [13] Li X, Kim JW, Grønberg M, et al. Role of CDK2 in the sequential phosphorylation/activation of C/EBP β during adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(28): 11597-602
- [14] Li X, Molina H, Huang H, et al. O-linked N-acetylglucosamine modification on CCAAT enhancer-binding protein β : role during adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2009, 284(29): 19248-54
- [15] Lin FT, Lane MD. CCAAT/enhancer binding protein α is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(19): 8757-61
- [16] Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*, 1992, 6(3): 439-53
- [17] Tontonoz P, Hu E, Graves RA, et al. mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*, 1994, 8(10): 1224-34
- [18] Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, et al. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR γ and RXR α . *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(25): 5628-34
- [19] Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, et al. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem*, 1995, 270(33): 19269-76
- [20] Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, et al. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J*, 1996, 15(19): 5336-48
- [21] Barak Y, Nelson MC, Ong ES, et al. PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*, 1999, 4(4): 585-95
- [22] Kim JB, Wright HM, Wright M, et al. ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(8): 4333-7
- [23] Reznikoff, KA, Brankow DW, Heidelberger C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res*, 1973, 33(12): 3231-8
- [24] Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*, 1979, 17(4): 771-9
- [25] Pinney DF, Emerson CP Jr. 10T1/2 cells: an in vitro model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation. *Environ Health Perspect*, 1989, 80: 221-7
- [26] Konieczny SF, Emerson CP Jr. 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineage lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. *Cell*, 1984, 38(3): 791-800
- [27] Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single

- transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 1987, 51(6): 987-1000
- [28] Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*, 2000, 57(1): 16-25
- [29] Hanamura H, Urist MR. Osteogenesis and chondrogenesis in transplants of Dunn and Ridgway osteosarcoma cell culture. *Am J Pathol*, 1978, 91(2): 277-98
- [30] Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, 6(4): 432-8
- [31] Ahrens M, Ankenbauer T, Schröder D, et al. Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol*, 1993, 12(10): 871-80
- [32] Wang EA, Israel DI, Kelly S, et al. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors*, 1993, 9(1): 57-71
- [33] Date T, Doiguchi Y, Nobuta M, et al. Bone morphogenetic protein-2 induces differentiation of multipotent C3H10T1/2 cells into osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes in vivo and in vitro. *J Orthop Sci*, 2004, 9(5): 503-8
- [34] Shea CM, Edgar CM, Einhorn TA, et al. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem*, 2003, 90(6): 1112-27
- [35] Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9607-11
- [36] Bowers RR, Kim JW, Otto TC, et al. Stable stem cell commitment to the adipocyte lineage by inhibition of DNA methylation: role of the BMP-4 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(35): 13022-7
- [37] McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell*, 2004, 6(4): 483-95
- [38] Huang H, Song TJ, Li X, et al. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 12670-5