

网络出版时间:2015-06-30 13:47
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150630.1347.025.html>

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2015.08.025

秦川牛 *ADIG* 基因重组腺病毒过表达载体的构建与病毒包装

张 琼¹,姜碧杰¹,成 功¹,刘 扬¹,咎林森^{1,2}

(1 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100;2 国家肉牛改良中心,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】构建秦川牛 *ADIG* 基因的重组腺病毒载体,包装并扩繁病毒,为下一步研究该基因在脂肪细胞分化过程中的分子作用机制和相关信号通路奠定基础。**【方法】**根据 NCBI 收录的家牛 *ADIG* 基因(NM_001113720.1)mRNA 序列设计引物,以秦川牛组织样提取的总 RNA 反转录而成的 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 和 PCR 扩增获得目的基因,将其连接到 pMD 19-T Simple 载体并测序。质粒提取纯化后通过 *Bgl* II 与 *Sal* I 双酶切,然后胶回收酶切产物,将其连接到穿梭载体 pAdTrack/CMV 上,构建重组穿梭质粒 pAdTrack/CMV-*ADIG*。将 pAdTrack/CMV-*ADIG* 质粒用 *Pme* I 酶切线性化,转化含有腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 的大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞中进行同源重组,构建重组腺病毒质粒 pAD-*ADIG*,并用 *Pac* I 酶切鉴定,提取质粒后转化大肠杆菌 Top10 进行扩繁。用 *Pac* I 酶切线性化 pAD-*ADIG* 载体并回收质粒大片段,转染 293A 细胞进行病毒包装,然后完成病毒扩繁和病毒滴度的测定。**【结果】**PCR 扩增获得了 399 bp *ADIG* 基因 CDS 区;成功构建了重组穿梭质粒 pAdTrack/CMV-*ADIG* 和重组腺病毒质粒 pAD-*ADIG*。经检测,*ADIG* 重组腺病毒包装成功,扩繁后得到了高滴度的腺病毒(1×10^8 PFU/mL)。**【结论】**成功构建了秦川牛 *ADIG* 基因的重组腺病毒表达载体 pAD-*ADIG*,完成了病毒包装和扩繁。

【关键词】 *ADIG*;腺病毒;同源重组;秦川牛

【中图分类号】 Q78;S823.8⁺1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2015)08-0033-06

Construction of recombinant adenovirus vector and viral packaging of *ADIG* gene in Qinchuan cattle

ZHANG Qiong¹,JIANG Bi-jie¹,CHENG Gong¹,LIU Yang¹,ZAN Lin-sen^{1,2}

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2 National Beef Cattle Improvement Center in China, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 The aim of this project was to construct recombinant adenovirus vector of *ADIG* gene, then package and amplify the corresponding recombinant adenovirus, which would improve further study on its molecular mechanism and related signaling pathway on adipocyte differentiation. **【Method】** The *ADIG* gene was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and polymerase chain reaction (PCR), and the template was mixed cDNA from different tissues of Qinchuan cattle. Then PCR product was inserted to pMD 19-T Simple vector and confirmed by sequencing. The plasmids were prepared and then digested with *Bgl* II and *Sal* I before gel extraction. The product was then inserted into the adenoviral shuttle plasmid pAdTrack/CMV to obtain pAdTrack/CMV-*ADIG*. The linearized plas-

〔收稿日期〕 2014-01-17
〔基金项目〕 国家转基因重大专项(2013ZX08007-002);“十二五”国家“863”计划项目(2013AA102505);国家现代农业(肉牛牦牛)产业体系专项(CARS-38);国家自然科学基金项目(31272411);陕西省科技统筹创新工程计划项目(2014KTZB02-02)
〔作者简介〕 张 琼(1990—),女,陕西延长人,硕士,主要从事动物健康养殖研究。E-mail: zhangqiong232@163.com
〔通信作者〕 咎林森(1963—),男,陕西扶风人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。
E-mail: zanlinsen@163.com

mid pAdTrack/CMV-ADIG was co-transformed into competent cells BJ5183 containing adenoviral backbone plasmid pAdEasy-1 to obtain recombinant adenovirus vector pAD-ADIG. The recombinant adenovirus vector pAD-ADIG was verified by enzyme cleavage with *Pac* I. The confirmed recombinant adenovirus plasmid pAD-ADIG was transformed into *E. coli* Top10 competent cells for further amplification. Plasmid of pAD-ADIG was then prepared and digested with *Pac* I to be totally linearized before being transfected into 293A cell line for packaging and amplification of the recombinant adenovirus. 【Result】PCR product with length of 399 bp was obtained and the shuttle vector pAdTrack/CMV-ADIG together with the recombinant adenovirus vector pAD-ADIG were obtained and verified by sequencing. ADIG recombinant adenovirus was packaged successfully and high concentration (1×10^8 PFU/mL) of ADIG adenovirus was obtained. 【Conclusion】A recombinant adenovirus vector containing ADIG gene was successfully constructed to package and amplify the recombinant adenovirus.

Key words: ADIG; adenovirus vector; homologous recombination; Qinchuan cattle

Kim 等^[1]在小鼠脂肪组织基因芯片筛选中,发现了一个异于其他蛋白质家族的潜在肥胖基因 SMAF1,被称为小脂肪细胞因子 1(Small adipocyte factor 1)。该基因有 0.7 kb 转录本,编码一个新的由 80 个氨基酸组成的 10 ku 跨膜蛋白,同源性检测暗示该基因可能只在哺乳动物中存在。该基因编码蛋白的 N 端富含亮氨酸, C 末端富含酸性氨基酸,它的调控和表达暗示了这个新蛋白在脂肪细胞转录组中占据了独特的地位,并且在脂肪组织的生理学和病理学方面起作用。SMAF1 基因仅在脂肪细胞中特异性表达,在牛上被命名为 ADIG。有研究表明^[1],在分离来自大鼠和小鼠上的原代脂肪前体细胞中该基因表达缺失; SMAF1 基因表达与脂肪细胞基因表型呈现密切相关;不仅如此, SMAF1 基因在脂肪细胞中的 mRNA 水平与脂肪细胞成熟分化程度呈正相关,但目前对 SMAF1 基因在脂肪细胞分化过程中所起的作用尚不清楚。本研究对秦川牛 ADIG 基因进行克隆,利用 AdEasy 系统构建该基因的重组腺病毒表达载体,并对其进行了病毒包装和扩繁,旨在为下一步研究该基因在秦川牛脂肪细胞分化中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

腺病毒穿梭载体 pAdTrack/CMV、腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 均由西北农林科技大学动物科技学院罗军教授惠赠,质粒小提试剂盒购自 OMEGA 公司,大肠杆菌 Top10、大量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、LA Taq DNA 聚合酶、KOD-Plus-Ver 2.0 高保真酶、pMD 19-T Simple 载体、T4 DNA ligase 及限制性内切酶 *Bgl* II、*Sal* I 购自大连宝生物公

司,反转录试剂盒、超纯琼脂糖购自美国 Invitrogen 公司,限制性内切酶 *Pme* I 购自英国 NEB 公司,PCR 引物由美国 Invitrogen 公司合成。

1.2 样品采集

以国家肉牛改良中心饲养的秦川牛(2~3 岁)为研究对象,屠宰后采集附睾脂肪组织,用 DEPC 水洗净样品表面残留的血液及杂质,迅速投入到液氮中保存,用于总 RNA 的提取。

1.3 总 RNA 的提取及 cDNA 模板的合成

利用 Trizol 法提取脂肪组织的总 RNA,凝胶电泳检测证实 RNA 的完整性较好,按照试剂盒说明将其反转录生成 cDNA 第一链。

1.4 秦川牛 ADIG 基因的克隆与测序鉴定

1.4.1 引物的设计与合成 根据 NCBI 收录的牛 ADIG 基因(GenBank 登录号:NM_001113720.1)的 mRNA 序列,运用 Primer 5.0 设计引物,上游引物添加 *Bgl* II 酶切位点(下划线),下游引物添加 *Sal* I 酶切位点(下划线),并在两端加上保护碱基,引物由南京金斯瑞公司合成。上游引物:5'-GGA AGATCTTTAGCCACACACGCACCAT-3',下游引物:5'-ACGCGTCGACCCAAAGTCCTCTCCCCTC-3'。

1.4.2 完整编码区(CDS)的克隆 以秦川牛组织样提取的总 RNA 反转录而成的 cDNA 为模板,采用逆转录-聚合酶链式反应(Reverse transcription-PCR, RT-PCR)技术,利用 KOD-Plus-Ver 2.0 高保真酶扩增目的基因的完整 CDS 区,反应体系为:DNA 模板 50 ng, 1 U/ μ L KOD-Plus-Ver 2.0 高保真酶 0.4~0.6 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer 2 μ L, 2 mmol/L dNTP 2 μ L, 25 mol/L MgSO₄ 0.9~1.2 μ L, 上、下游引物各 0.8 μ L, 补加 ddH₂O 至总体积

为 20 μ L。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 12 s,60~53 $^{\circ}$ C 退火 30 s(此处设置梯度退火目的是寻找最佳扩增效果的退火温度),68 $^{\circ}$ C 延伸 35 s,30 个循环;68 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 冷却 10 min。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,确认片段大小是否与预期相符。

取扩增得到的 PCR 产物 5 μ L 加入 1 μ L 普通 Taq DNA 聚合酶,72 $^{\circ}$ C 加“A”反应 10 min。加“A”产物使用 DNA 凝胶回收试剂盒进行片段纯化。

1.4.3 目的基因的亚克隆 将 1.4.2 节的 PCR 产物与 pMD 19-T Simple 载体于 16 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后得到连接产物 pMD-T-ADIG,连接体系为: pMD 19-T Simple 载体 1 μ L,PCR 回收产物 1 μ L, Solution I 5 μ L,加 ddH₂O 至 10 μ L。将连接产物转化入 TSS 法制备的大肠杆菌 Top10 感受态细胞中,挑取经菌落 PCR 初步鉴定呈阳性的单克隆进行摇菌,扩繁后参照 Omega 质粒提取说明书提取质粒,用 Bgl II 和 Sal I 双酶切鉴定正确后送西安 Takara 公司测序。

1.5 pAdTrack/CMV-ADIG 质粒的构建

用 Bgl II 和 Sal I 限制性内切酶对 pMD-T-ADIG 重组质粒和腺病毒穿梭质粒 pAdTrack/CMV 分别进行双酶切,琼脂糖凝胶(0.8%)电泳检测并进行胶回收。将酶切后的重组质粒和腺病毒穿梭质粒于 16 $^{\circ}$ C 连接 30 min,得到连接产物 pAdTrack/CMV-ADIG,然后将其转入大肠杆菌 Top10 感受态细胞中。将菌液均匀涂抹在含 50 g/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上培养 14~20 h,挑取单克隆扩繁后做菌液 PCR 鉴定,并提取阳性菌液质粒,Bgl II 和 Sal I 双酶切鉴定正确后送西安 Takara 公司测序。

1.6 重组腺病毒质粒 pAD-ADIG 的构建及测序鉴定

用限制性内切酶 Pme I 将 pAdTrack/CMV-

ADIG 质粒线性化,转入含有腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 的大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞中,将菌液均匀涂抹在含 50 g/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上培养 20~30 h,挑取较小的菌落进行扩繁后提取质粒,并利用 Pac I 内切酶进行初步鉴定之后进行电泳检测。由于 BJ5183 菌株属于低拷贝菌种,因此将初步鉴定正确的质粒转入大肠杆菌 Top10 感受态细胞中进行扩繁,菌液送西安 Takara 公司测序。测序正确的菌液进一步扩繁后,使用无内毒素质粒提取试剂盒提取质粒,Pac I 酶切线性化后用异丙醇沉淀法沉淀 DNA 片段,酶标仪测定 DNA 浓度备用。

1.7 重组腺病毒质粒 pAD-ADIG 的包装与扩繁

用无内毒素质粒小量提取试剂盒抽提重组质粒 pAD-ADIG,测定质粒浓度并取 5 μ g 重组质粒用 Pac I 酶切,然后胶回收大片段,用 TurboFectTM in vitro Transfection Rengent 以每孔(6 孔板)2 μ g 的量转染汇合度为 80% 左右的 293A 细胞包装病毒。转染后每天在荧光显微镜下观察绿色荧光数量与分布情况并拍照,了解腺病毒包装进程。用第 1 代病毒悬液感染融合度为 100% 的 293A 细胞,按前述方法收集上清液,即为第 2 代病毒悬液。再用第 2 代病毒悬液感染 293A 细胞,重复“感染—冻融—收集”。收集高滴度病毒悬液,用绿色荧光蛋白(GFP)标记法测定病毒滴度,具体步骤参考 Lybarger 等^[2]及 Hett 等^[3]的方法。

2 结果与分析

2.1 ADIG 基因 CDS 区的克隆结果鉴定

用 KOD-Plus-Ver 2.0 高保真酶选用梯度退火温度的方法扩增 ADIG 基因 CDS 区,获得了 399 bp 长度的目的片段;当退火温度为 60 $^{\circ}$ C 时,目的基因扩增效果特异性好,杂带明显减少,同时目的基因条带清晰明亮(图 1)。

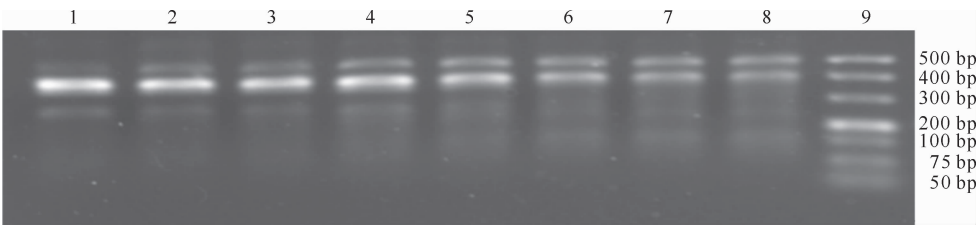


图 1 秦川牛 ADIG 基因 CDS 区扩增结果的琼脂糖凝胶电泳检测

1~8. 退火温度依次为 60,59,58,57,56,55,54,53 $^{\circ}$ C 下 ADIG 基因的扩增结果;9. DNA Marker

Fig. 1 Detection of CDS part of ADIG gene using agarose gel electrophoresis

1—8. PCR products of ADIG gene under different annealing degrees (60,59,58,57,56,55,54,and 53 $^{\circ}$ C);9. DNA Marker

2.2 pMD-T-ADIG 质粒的鉴定

用 *Bgl* II 和 *Sal* I 限制性内切酶对 pMD-T-ADIG 载体双酶切,获得了约 400 bp 的目的片段。测序结果比对后发现其具有完整的 CDS 区,且无任何突变位点,进一步确定目的片段序列完好,可用于下一步穿梭载体的构建。

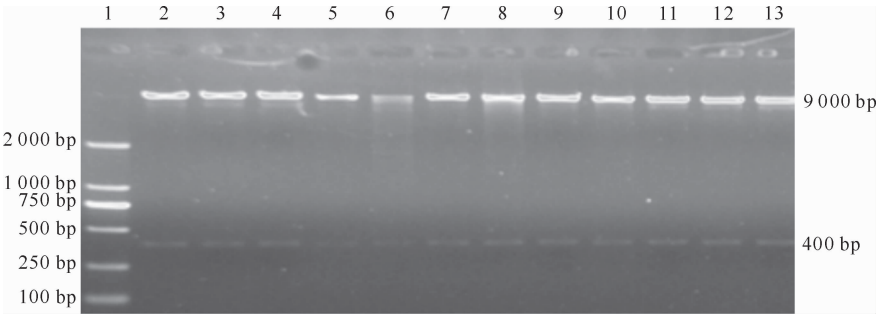


图 2 pAdTrack/CMV-ADIG 穿梭质粒的双酶切鉴定

1. DNA Marker;2~12. pAdTrack/CMV-ADIG 载体 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切结果

Fig. 2 Dual enzyme digestion of pAdTrack/CMV-ADIG

1. DNA Marker;2—12. Results of pAdTrack/CMV-ADIG digested by *Bgl* II and *Sal* I

2.4 pAD-ADIG 重组质粒的鉴定

提取 pAD-ADIG 质粒经进行 *Pac* I 酶切鉴定,结果在 4.5 kb 处出现了目的条带(图 3),表明腺病毒重组成功。

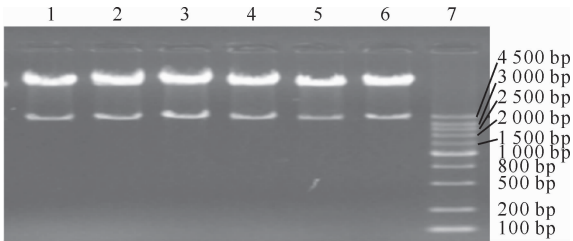


图 3 pAD-ADIG 重组腺病毒质粒的 *Pac* I 酶切鉴定

1~6. pAD-ADIG 质粒经 *Pac* I 酶切结果;7. DNA Marker

Fig. 3 *Pac* I digestion of pAD-ADIG

1—6. Results of pAD-ADIG digested with *Pac* I ;

7. DNA Marker

2.5 重组腺病毒质粒 pAD-ADIG 的包装与扩繁

用 *Pac* I 酶切线性化 pAD-ADIG 重组腺病毒载体,回收 DNA 大片段并转染 293A 细胞。转染 30 h,荧光倒置显微镜观察,仅有少量的绿色荧光亮点(图 4-A);转染 7 d,绿色荧光细胞明显增多,视野变亮并在局部出现彗星状荧光聚集,荧光分布最密集区域有些细胞开始变圆脱落(图 4-B);转染 10 d,绿色荧光铺满整个视野,大量细胞病变脱落,出现明显的空斑(图 4-C),待约 50%细胞脱落,收集细胞与培养液,得到第 1 代病毒悬液。重复“侵染—冻融—收集”扩繁得到高滴度病毒,用高滴度病毒侵染

2.3 pAdTrack/CMV-ADIG 穿梭质粒的鉴定

用 *Bgl* II 和 *Sal* I 限制性内切酶对 pAdTrack/CMV-ADIG 载体双酶切,琼脂糖凝胶电泳分别得到长度约为 400 和 9 000 bp 2 条带(图 2),与预期结果相一致,证明 pAdTrack/CMV-ADIG 穿梭载体构建成功。

293A 细胞(图 4-D)约 30 h 后有 50%细胞病变圆脱壁,收集病毒并测定病毒滴度。绿色荧光蛋白(GFP)标记法的测定结果显示,病毒滴度为 1×10^8 PFU/mL。

3 讨 论

腺病毒载体是目前用于基因转移最广泛的载体之一,重组腺病毒感染谱广、安全性高、容量大、体外可操作性好。目前常用的腺病毒载体系统主要包括 ViraPower™ Adenoviral Expression System 及 AdEasy™ Adenoviral Vector System 等^[4-5]。本试验采用的是 ViraPower™ 腺病毒系统,其特点是重组系统由 2 种质粒组成,一种是包含有全部(或右侧大部分)腺病毒基因组 DNA 的大质粒(骨架质粒);另一种是小的穿梭质粒,其带有目的基因表达盒以及在表达盒两侧的与大质粒上目的基因拟插入部位同源的序列^[4-5]。

pAdEasy-1 系统是首先将目的基因插入到穿梭载体(pAdTrack-CMV)中,然后用 *Pme* I 酶切使之线性化,线性化产物转染到含有骨架载体 pAdEasy-1 的大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞中。穿梭质粒与骨架载体的重组方式有 2 种,也正因为重组方式的不同,重组腺病毒质粒 *Pac* I 酶切鉴定也显示 2 种不同的结果,因此其条带出现在 4.5 kb 处或是 3.0 kb 处都可认为其重组成功^[6]。本试验构建过程中,检测到的重组方式只有 1 种,酶切结果只显示一种

4.5 kb 的短片段(图 3),没有出现 3.0 kb 的短片段,也说明前一种重组方式更容易实现重组。在细菌中实现腺病毒载体的重组,然后提取重组腺病毒

载体,用 *Pac* I 酶切线性化,回收质粒大片段转染 293A 细胞,包装扩繁得到高滴度病毒^[7]。

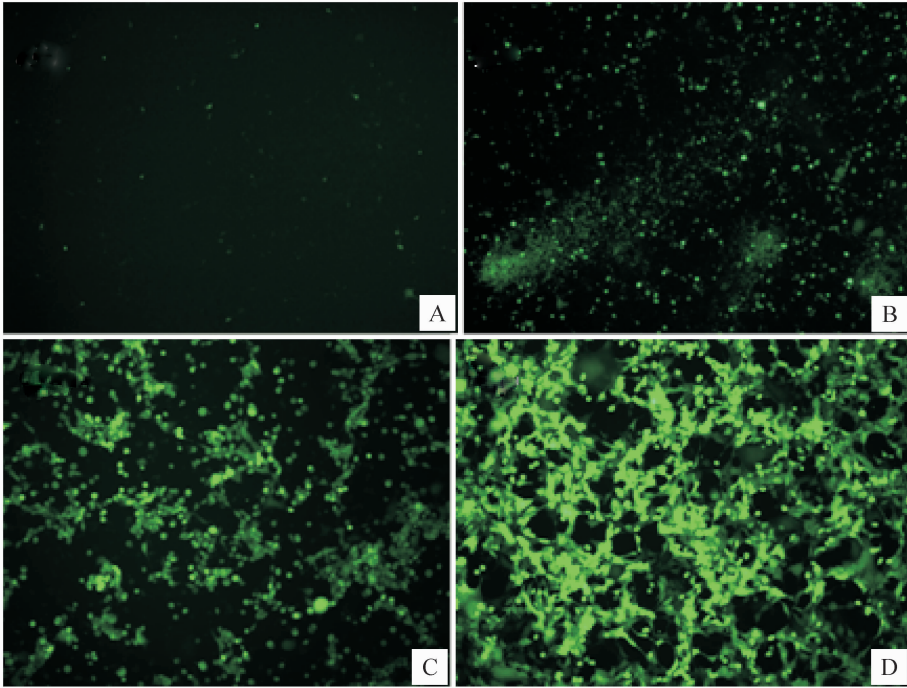


图 4 重组腺病毒质粒 pAD-ADIG 的包装与扩繁

A. 重组腺病毒载体转染 30 h 的 293A 细胞,整个视野下仅有数个绿色荧光点(40×);B. 转染 7 d 的 293A 细胞,绿色荧光细胞(GEP)明显增多,局部出现彗星状聚集(40×);C. 转染 10 d 的 293A 细胞,绿色荧光细胞铺满整个视野,大量细胞病变圆脱壁(40×);D. 高滴度腺病毒侵染 30 h 后的 293A 细胞 (100×)

Fig. 4 Packaging and amplification of adenovirus

A. Fluorescence microscopic image of 293A cells transfected after 30 h (40×);B. After 7 d,GEP positive 293A cells increased and showed a grapes-like gathering (40×);C. After 10 d,GEP positive 293A cells covered the entire field of vision, and most cells rounded off the wall (40×);D. 30 h after infection of high titers adenovirus (100×)

由于 *ADIG*(*SMAF1*)基因只能在成熟脂肪细胞中表达,这种组织特异性激起了国内外众多学者的研究兴趣。韩威等^[8]研究发现,*SMAF1* 基因在 3T3-L1 细胞中的异位表达能有效抑制 3T3-L1 细胞的增殖,而对细胞分化和凋亡未见有明显的抑制作用。同时大量研究表明,脂肪细胞分化受多基因调控^[9-20],*SMAF1* 基因在脂肪细胞中的 mRNA 水平与脂肪细胞成熟分化程度呈正相关。用 TNF 处理过的成熟脂肪细胞去分化后,引起了 *SMAF1* 表达的急剧下降,12 h 后下降幅度更明显。这种状况是在 *PPARγ* 的表达水平下降后出现的,说明 TNF 介导的 *SMAF1* 的下降可能是通过 *PPARγ* 的作用实现的^[21]。*PPARγ* 在前体脂肪细胞中的异位表达能对脂肪细胞分化有明显的促进作用^[22]。日本学者研究表明,饲喂高脂肪日粮的小鼠,*SMAF1* 的 mRNA 水平明显提高^[23],这与提高 *PPARγ* 的表达

后取得的效果相同,但是 *SMAF1* 基因也被发现能够被视黄酸下调,同时发现该基因只在细胞膜上表达^[23],胞质中没有表达。另外,在日本和牛上所做的 *ADIG* 基因几种不同脂肪组织的表达谱分析表明,含有脂肪多的组织 *ADIG* 基因表达量更高^[24]。

本研究应用腺病毒载体与目的基因进行体外连接,成功构建了秦川牛 *ADIG* 基因的重组腺病毒过表达载体,并在 293A 细胞中包装后进一步扩繁得到高滴度腺病毒,为下一步继续研究该基因在脂肪细胞分化过程中的功能提供了理想的生物载体表达系统。

[参考文献]

[1] Kim J Y, Tillison K, Smas C M. Cloning, expression, and differentiation-dependent regulation of *SMAF1* in adipogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 326(1): 36-44.
[2] Lybarger L, Dempsey D, Franek K J, et al. Rapid generation

- and flow cytometric analysis of stable GEP-expressing cells [J]. Cytometry, 1996, 25(3): 211-220.
- [3] Hett D C, Booth J L, Dandapani V, et al. A flow cytometric protocol for titrating recombinant adenoviral vectors containing the green fluorescent protein [J]. Mol Biotechnol, 2000, 14(3): 197-203.
- [4] He T C, Zhou S, Dacosta L T, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(5): 2509-2514.
- [5] Lodde B M, Delporte C, Goldsmith C M, et al. A recombinant adenoviral vector encoding functional vasoactive intestinal peptide [J]. Biochem Bioph Res Co, 2004, 319: 189-192.
- [6] Negrete A, Ling T C, Lyddiatt A. Production of adenoviral vectors and its recovery [J]. Process Biochemistry, 2007, 42: 1107-1113.
- [7] Luo J, Deng Z L, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system [J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1236-1247.
- [8] 韩 威, 段佳慧, 吴民沛, 等. SMAF1 基因的异位过表达对脂肪细胞 3T3-L1 增殖和凋亡的影响 [J]. 成都医学院学报, 2009, 4(3): 198-201.
- Han W, Duan J H, Wu M L, et al. effect of ectopic expression of SMAF1 on proliferation and apoptosis of preadipocyte 3T3-L1 [J]. Journal of Chendu Medical College, 2009, 4(3): 198-201. (in Chinese)
- [9] 朱江江, 罗 军, 王紫鸾, 等. 西农萨能羊乙酰/丙二酸单酰基转移基因重组腺病毒载体的构建 [J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(3): 489-495.
- Zhu J J, Luo J, Wang Z Q, et al. Construction of the recombinant adenovirus of malonyl transferase of Xinong Sanen Goat [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2012, 43(3): 489-495. (in Chinese)
- [10] Ho I C, Kim J H, Rooney J W, et al. A potential role for the nuclear factor of activated T cells family of transcriptional regulatory proteins in adipogenesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(26): 15537-15541.
- [11] Yang X Y, Wang L H, Chen T, et al. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT [J]. J Biol Chem, 2000, 275(7): 4541-4544.
- [12] Musaro A, McCullagh K J, Naya F J, et al. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1 [J]. Nature, 1999, 400(6744): 581-585.
- [13] Reusch J E, Colton L A, Klemm D J. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(3): 1008-1020.
- [14] Morrison R F, Farmer S R. Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18 (INK4c) and p21 (Waf1/Cip1), during adipogenesis [J]. J Biol Chem, 1999, 274(24): 17088-17098.
- [15] Chen P L, Riley D J, Chen Y, et al. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with CEBPs [J]. Genes Dev, 1996, 10(21): 2794-2804.
- [16] Tong Q, Dalgin G, Xu H, et al. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition [J]. Science, 2000, 290(5489): 134-138.
- [17] Moldes M, Lasnier F, Feve B, et al. Id3 prevents differentiation of preadipose cells [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(4): 1796-1804.
- [18] Ross S E, Hemati N, Longo K A, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling [J]. Science, 2000, 289(5481): 950-953.
- [19] Smas C M, Sul H S. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation [J]. Cell, 1993, 73(4): 725-734.
- [20] Stepan C M, Bailey S T, Bhat S, et al. The hormone resectin links obesity to diabetes [J]. Nature, 2001, 409(6818): 307-312.
- [21] Mueller E, Drori S, Aiyer A, et al. Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferators activated receptor gamma isoforms [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277: 41925-41930.
- [22] Rosen E D, Sarraf P, Spiegelman B M, et al. PPAR Gamma is required for the differentiation of adipocyte tissue *in vivo* and *in vitro* [J]. Mol Cell, 1999, 4(4): 611-617.
- [23] Hong Y H, Miyahara H, Hishikawa D, et al. Molecular cloning and expression analysis of cDNA encoding bovine adipogenin [J]. Animal Science Journal, 2006, 77: 613-619.
- [24] Hong Y H, Hishikawa D, Miyahara H, et al. Up-regulation of adipogenin, an adipocyte plasma transmembrane protein, during adipogenesis [J]. Mol Cell Biochem, 2005, 276(1/2): 133-141.