

网络出版时间:2015-06-10 08:40

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.07.029

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150610.0840.029.html

KLF15 基因表达特征及其腺病毒超表达载体的构建

王 杰,陈 婷,沈清武

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**分析锌指蛋白转录因子 15(*KLF15*)在小鼠各组织及 C2C12 细胞分化过程中的表达情况,构建 *KLF15* 的腺病毒超表达载体。**【方法】**采集小鼠肝、脾、肾、脂肪、骨骼肌及培养的 C2C12 成肌细胞,提取不同分化时期(0,2,4 d)的 C2C12 细胞及不同组织的 RNA,检测 *KLF15* 的表达情况;过夜连接 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切后的 pAdTrack-CMV 与 *KLF15* 真核表达质粒(pcDNA3.1-*KLF15*),获得 pAdTrack-*KLF15* 质粒。将该质粒经 *Pme* I 线性化后转入 BJ5183 感受态细胞进行重组,构建 pAdEasy-*KLF15* 腺病毒超表达载体。将 pAdEasy-*KLF15* 质粒 *Pac* I 酶切线性化回收后,转染 293A 细胞进行包装、扩繁和纯化。将获得的 *KLF15* 重组腺病毒侵染 C2C12 细胞,实时荧光定量 PCR 检测其对 *KLF15* 表达的影响。**【结果】***KLF15* 在 C2C12 成肌细胞分化过程中表达显著升高,并在分化后期达最高值;*KLF15* 在肝脏、肾脏和脂肪中的表达水平极显著高于骨骼肌和脾脏。成功获得了 pAdEasy-*KLF15* 腺病毒超表达载体,其侵染 C2C12 细胞后能显著上调 *KLF15* mRNA 的表达水平。**【结论】***KLF15* 基因在 C2C12 成肌细胞中高表达,并成功构建了 *KLF15* 重组腺病毒载体。

[关键词] *KLF15*;重组腺病毒;C2C12 成肌细胞

[中图分类号] Q782

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2015)07-0035-06

Expression characteristics of *KLF15* gene and construction of its adenovirus vector

WANG Jie, CHEN Ting, SHEN Qing-wu

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

Abstract: **【Objective】**The aims of this study were to explore the expression of *KLF15* gene in tissues and differentiation of C2C12 cell of mice and conduct its adenovirus vector. **【Method】** Firstly, tissues of mice and C2C12 cells in different differentiation phases were collected to extract RNA for detecting expression of *KLF15* gene. Secondly, the target fragment obtained from pcDNA3.1-*KLF15* vector was connected to pAdTrack-CMV after being digested by *Hind* III and *Xba* I to obtain pAdTrack-*KLF15* vector. The pAdTrack-*KLF15* vector was linearized by *Pme* I and transformed into BJ5183 competent cells with pAdEasy to construct pAdEasy-*KLF15*. After the pAdEasy-*KLF15* vector was digested by *Pac* I, the purified product was transfected into 293A cells using lip for viral packaging. Finally, q-PCR was used to detect the expression of *KLF15* mRNA after pAdEasy-*KLF15* vector was injected into C2C12 cells for 48 h. **【Result】** *KLF15* showed significantly increasing expression during differentiation of C2C12 myoblasts and *KLF15* expression levels in liver, kidney and fat were significantly higher than in the skeletal muscle and spleen. The recombinant adenovirus vector pAdEasy-*KLF15* was successfully obtained, and the mRNA expression of *KLF15* gene indicated an observably up-regulated trend after it was transfected C2C12 cells.

[收稿日期] 2014-01-10

[基金项目] 西北农林科技大学引进人才科研启动经费项目(Z111021006)

[作者简介] 王 杰(1988—),男,河南信阳人,在读硕士,主要从事动物骨骼肌发育研究。

[通信作者] 沈清武(1973—),男,湖南沅陵人,教授,博士生导师,主要从事肌肉干细胞生物学研究。

【Conclusion】*KLF15* gene showed high expression in C2C12 cells. The recombinant adenovirus vector expressing mouse *KLF15* gene was successfully constructed.

Key words: *KLF15*; recombinant adenovirus; C2C12 myoblasts

锌指蛋白转录因子 (Kruppel-like factors, KLFs) 家族是锌指蛋白超家族中的一员, 其通过 C 端的锌指结构与 DNA 结合, 调控相关基因的表达, 在心肌、平滑肌和骨骼肌对细胞的增殖、分化、迁移以及相关疾病的调控中具有重要的作用^[1-4]。研究证明, KLFs 因子的结构主要分为 3 部分: 其一, KLFs 的 C 端包含 3 个 Cysteine2/Histidine2 位点^[5-6]; 其二, KLFs 因子中包含了一个高度保守的区域 TGEKP(Y/F)X, 该区域也是锌指蛋白所包含的区域^[7]; 其三, KLFs 因子可以与 CACCC 或 GT 盒子等一些特定的 DNA 绑定位点结合来调节 DNA 的转录^[6-7], 对细胞的增殖、分化、迁移都具有重要的作用。1993 年, 红细胞中第 1 个 KLF 因子被鉴定出来并被命名为 EKLF/KLF1^[8], 其对 β -globin 基因的活性和表达具有重要的作用^[9]。此后, 共有 17 种 KLF 家族成员被发现, 根据这些因子在染色体上的位置而依次命名为 KLF1—KLF17, 且在不同的细胞类型中会有不同的表达, 对细胞的增殖和分化具有重要的作用^[10]。

截至目前, 已发现有 10 多种 KLFs 家族因子在肌肉中表达, 但对其大部分的作用机理还不明确。*KLF15* 属于 KLF 超家族的一员, 最早在肾脏中被发现并命名为 Kidney-Enriched Kruppel-Like Factor^[11]。在骨骼肌中的研究显示, *KLF15* 可通过调节 GATA4 以及 acetylcoenzyme A2 的活性来参与骨骼肌的能量代谢^[12-13]; 同时, *KLF15* 可通过连接成肌因子和 D4Z4 的启动子来调节面部肌肉萎缩 (FSHD), 而超表达 *Myog* 可上调 *KLF15* 的表达^[14]。*KLF15* 可以通过调节 mTOR 信号通路的活性来影响糖皮质激素受体 (GR) 的活性^[15], 并且 *KLF15* 对骨骼肌脂质的流动以及运动后的适应能力也有一定的作用^[16]。但是到目前为止, 有关 *KLF15* 对骨骼肌成肌细胞分化影响的研究还未见报道。

本试验前期研究发现, *KLF15* 在骨骼肌快、慢肌中的表达差异显著, 在慢肌中的表达极显著高于快肌, 推测其可能在细胞分化过程中具有重要作用。为此, 本试验检测了 *KLF15* 在小鼠不同组织及 C2C12 成肌细胞分化中的表达情况, 并构建了 *KLF15* 重组腺病毒超表达载体, 旨在为进一步研究

KLF15 对活体肌肉发育的作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、载体及试剂 C2C12 细胞系、293A 细胞系、DH5 α 感受态细胞及 BJ5183 感受态细胞由西北农林科技大学脂肪沉积与肌肉发育实验室保存; *KLF15* 真核超表达载体 (pcDNA3.1-*KLF15*, 3' 端带 Flag 标签) 由 Susan J. Gray (University of Massachusetts Medical School) 赠送; pAdTrack-CMV 载体来自于西北农林科技大学脂肪沉积与肌肉发育实验室; 胰酶购于美国 Gibco 公司; Lipofectamin 2000 购于上海 Invitrogen 公司; 限制性内切酶 (*Hind* III 和 *Xba* I)、*Taq* 酶和 T4 连接酶、Real-time PCR 试剂盒、RNAiso Plus 均购于 TaKaRa 公司; 内切酶 *Pme* I 和 *Pac* I 购于 New England Biolabs 公司; DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、牛血清白蛋白 (BSA)、马血清 (HS) 购自 Hyclone 公司; 质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒购于 Omega 公司。

1.1.2 试验动物 2 月龄小白鼠, 购于第四军医大学。

1.2 *KLF15* 在小鼠不同组织及 C2C12 成肌细胞分化中的表达检测

1.2.1 C2C12 成肌细胞的培养及小鼠组织的采集 用增殖培养基 (GM, DMEM + 体积分数 10% FBS + 100 U/mL 青链霉素) 培养 C2C12 成肌细胞, 培养条件为 37 °C、体积分数 5% CO₂, 当细胞融合度达到 90% 时更换为分化培养基 (DM, DMEM + 体积分数 2% HS + 100 U/mL 青链霉素), 进行成肌诱导分化。将试验小鼠脊椎脱臼法处死后, 分别提取小鼠肝、脾、肾、脂肪、骨骼肌后放于超低温冰箱中, 待研磨后提取 RNA 进行后续试验。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 以 *GAPDH* 为内参基因, 采用实时荧光定量 PCR 检测 *KLF15* 基因的表达情况。根据 GenBank 中小鼠 *KLF15* 和 *GAPDH* 序列 (GenBank 的登录号分别为: NM_023184 和 AY618199), 采用 primer 5.0 设计 PCR 引物, 送华大基因公司合成。KLF15 引物序列为: F 5'-ACCGAAATGCTCAGTGGGTACCTA-3', R 5'-GGAACAGAAGGCTTGCGAGTCA-3'; GA-

PDH 引物序列为: F 5'-TGCTGAGTATGTCGTG-GAGTCT-3', R 5'-ATGCATTGCTGACAATCT-TGAG-3'。

用 RNAiso Plus 法提取小鼠不同组织及分化 0,2,4 d C2C12 细胞总 RNA,按照 TaKaRa 反转录试剂盒进行反转,合成 cDNA 第一链,然后采用 IQ5 (Bio-Rad 公司)实时荧光定量 PCR 仪检测 *KLF15* 基因的表达情况。反应体系为 25 μ L: SYBR Premix Ex Taq (2 $\times$) 12.5 μ L,上下游引物 (10 μ mol/L)各 1 μ L,cDNA 模板 2 μ L,ddH₂O 8.5 μ L。采用两步法程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s,共 40 个循环。每个样品重复 3 次,基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.3 pAdTrack-KLF15 载体的构建与鉴定

使用 *Hind* III 和 *Xba* I 分别双酶切 pAdTrack-CMV 载体和 *KLF15* 真核超表达载体 pcDNA3.1-*KLF15*,酶切体系为:质粒 5 μ L, *Hind* III (10 U/ μ L)和 *Xba* I (10 U/ μ L)各 0.75 μ L,Buffer 2 μ L,ddH₂O 12.0 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 6 h,用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳回收目的条带。将回收的 *KLF15* 目的基因及双酶切后的 pAdTrack-CMV 质粒 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,连接体系为:pAdTrack-CMV 质粒、*KLF15* 目的基因各 2.0 μ L,T4 连接酶 0.5 μ L,10 $\times$ Buffer 1.0 μ L。取 5 μ L 连接产物加入 50 μ L DH5 α 感受态细胞中,冰中静置 30 min,42 $^{\circ}$ C 热激 90 s,再在冰中放置 1 min。加入 800 μ L 的液体 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C、170 r/min 振荡培养 1 h,4 000 r/min 离心 4 min,取 100 μ L 左右的菌液涂于含有 50 μ g/ μ L 卡那霉素的 LB 琼脂培养板上培养 16 h,挑取单克隆,提取质粒,用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切进行鉴定,阳性质粒命名为 pAdTrack-KLF15。

1.4 pAdEasy-KLF15 腺病毒超表达载体的构建与鉴定

使用 *Pme* I 酶切线性化阳性的 pAdTrack-KLF15 载体,反应体系为:pAdTrack-KLF15 质粒 10 μ L,*Pme* I (10 U/ μ L)1.0 μ L,Buffer 2.0 μ L,BSA 0.2 μ L,ddH₂O 6.8 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 6 h。酶切产物采用乙醇沉淀法纯化。取 BJ5183 感受态细胞冰上溶解,加入 5 μ L 左右线性化的 pAdTrack-KLF15 载体,冰中静置 30 min,42 $^{\circ}$ C 热激 90 s,再在冰中放置 1 min,加入 800 μ L 左右的液体 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 170 r/min 振荡培养 1 h,4 000 r/min 离心 4 min,取 100 μ L 左右的菌液涂于含有 50 μ g/ μ L 卡那霉素的 LB 琼脂培养板上培养 18 h,挑取单克隆,

提取质粒,进行 *Pac* I 酶切鉴定,阳性质粒命名为 pAdEasy-KLF15。

1.5 重组腺病毒 pAdEasy-KLF15 的包装、浓缩与滴度测定

用 2.5 g/L 的胰酶消化对数生长期的 293A 细胞,并接种于 10 cm 培养皿中,待细胞融合度达到 80%~90%时,将 pAdEasy-KLF15 经 *Pac* I 酶切线性化,乙醇沉淀后,用 Lipofectamin 2000 转染 293A 细胞进行包装,于转染后 2,3,6 和 7 d 取样,观察细胞荧光及病变情况,并于转染后 7 d 收集细胞毒液,然后再感染 293A 细胞。将反复扩增后的毒液经氯化铯密度梯度(1.4,1.2 g/mL)离心纯化,即得 pAdEasy-KLF15 重组腺病毒,于-80 $^{\circ}$ C 保存。将重组腺病毒按照 10 倍倍比稀释,即得 10^{-10} 浓度梯度,分别感染 293A 细胞,3 d 后观察荧光表达情况,计算病毒滴度,病毒滴度=GFP 阳性细胞数 $\times$ 病毒稀释倍数/0.01 mL。

1.6 重组腺病毒 pAdEasy-KLF15 感染 C2C12 细胞

培养 C2C12 成肌细胞,待融合度达到 90%后换成分化培养基,并在分化培养基中加入 50%的重组腺病毒 pAdEasy-KLF15 毒液,24 h 后第 1 次观察荧光情况,48 h 后第 2 次观察荧光情况,并收集细胞,鉴定 *KLF15* 的表达情况。

1.7 数据统计与分析

试验数据以“平均值 $\pm$ 标准差”(mean $\pm$ S. D.)表示,运用 SPSS 13.0 统计分析,用 *t* 检验(*t*-test)对不同组之间的差异进行显著性分析($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 *KLF15* 在小鼠组织及 C2C12 成肌细胞分化过程中的表达

实时荧光定量 PCR 结果显示,随着 C2C12 成肌细胞分化时间的延长,*KLF15* 表达量极显著升高,并在分化的后期达到表达的最高值(图 1-A)。*KLF15* 在 2 月龄左右小鼠各个组织中都有表达,在肝脏、肾脏和脂肪中的表达水平极显著高于骨骼肌和脾脏(图 1-B),这与相关报道^[3]相一致。

2.2 pAdTrack-KLF15 载体的构建及鉴定

对 pcDNA3.1-*KLF15* 载体进行 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切获得 *KLF15* 片段,将该片段与同样经 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切的 pAdTrack-CMV 质粒进行同源重组,得到 pAdTrack-KLF15 重组质粒。该重组质粒经 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切鉴定,电泳后

可见 2 条片段,大片段为 9.2 kb 的 pAdTrack,小片段为 1 300 bp 的 *KLF15*(图 2)。回收小片段测序后与 GenBank 中小鼠的 *KLF15* 基因序列进行比

对,结果显示,回收片段的序列与 GenBank 中小鼠的 *KLF15* 基因序列完全吻合,证明 pAdTrack-*KLF15* 重组质粒构建成功。

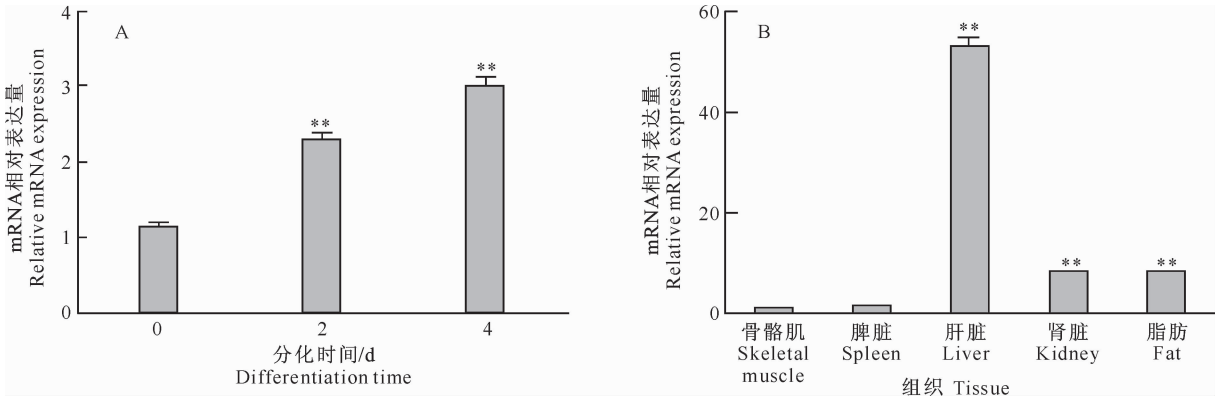


图 1 *KLF15* 基因在 C2C12 细胞分化(A)及小鼠不同组织(B)中的表达特征

* * 表示差异极显著($P<0.01$),图 6 同

Fig. 1 Expression of endogenous *KLF15* gene during the differentiation of C2C12 cells (A) and in different tissues (B)

* * indicates extremely significant difference($P<0.01$). The same for Fig. 6

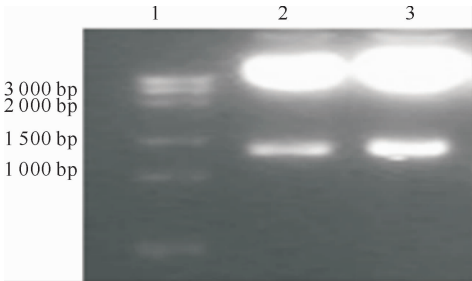


图 2 pAdTrack-KLF15 载体的 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切鉴定

1. DNA Marker;2,3. pAdTrack-KLF15
重组质粒双酶切结果

Fig. 2 Identification of recombinant pAdTrack-KLF15
digested by *Hind* III and *Xba* I

1. DNA Marker;2,3. Lane for the pAdTrack-KLF15
digested by *Hind* III and *Xba* I

2.3 pAdEasy-KLF15 腺病毒载体的构建及鉴定

将线性化后的 pAdTrack-KLF15 质粒与 BJ5183 感受态细胞进行同源重组,挑选单克隆质粒,经 *Pac* I 酶切后,释放 1 个大小为 3 kb 的片段(图 3),表明 pAdEasy-KLF15 构建成功。

2.4 pAdEasy-KLF15 腺病毒载体的包装及扩繁

将 *Pac* I 酶切线性化后的 pAdEasy-KLF15 转染 293A 细胞,转染后 2 d 腺病毒开始扩繁并表达 GFP 产生荧光(图 4-A);3 d 后病毒颗粒开始释放,感染周围的细胞(图 4-B);6 d 后出现病毒包装过程中典型的“彗星尾”现象(图 4-C);7 d 后荧光表达增多,整个视野的荧光水平显著升高(图 4-D),有 70% 的细胞表达荧光。收集细胞毒液,反复扩增和纯化,滴度可达到 7×10^{-10} PFU/mL。

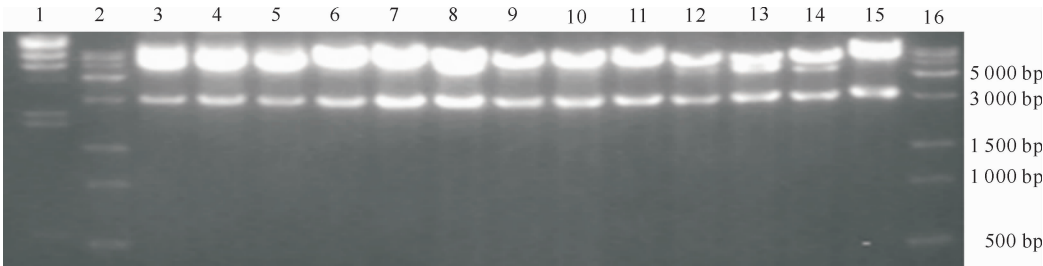


图 3 pAdEasy-KLF15 载体的 *Pac* I 酶切鉴定

1,2,16. DNA Marker;3~15. pAdEasy-KLF15 质粒片段

Fig. 3 Identification of recombinant pAdEasy-KLF15

1,2,16. DNA Mark;3-15. Lane for the pAdEasy-KLF15

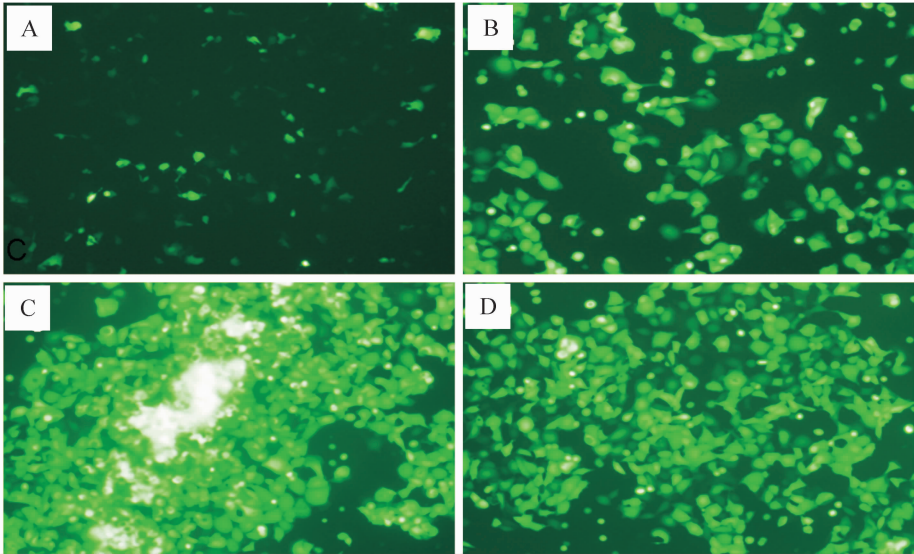


图 4 pAdEasy-KLF15 转染 293A 细胞不同时间后的荧光表达情况
A. 转染后 2 d;B. 转染后 3 d;C. 转染后 6 d;D. 转染后 7 d

Fig. 4 Expression of GFP after 293A cells transfected by pAdEasy-KLF15
A—D. 293A cells 2,3,6, and 7 d after being transfected by pAdEasy-KLF15

2. 5 pAdEasy-KLF15 感染 C2C12 细胞后对 KLF15 表达的影响
重组腺病毒感染 C2C12 细胞 2 d 后,约有 60%

的细胞被腺病毒感染并产生荧光(图 5)。收集细胞,提取 RNA,实时荧光定量 PCR 检测 KLF15 mRNA 的表达水平,结果见图 6。

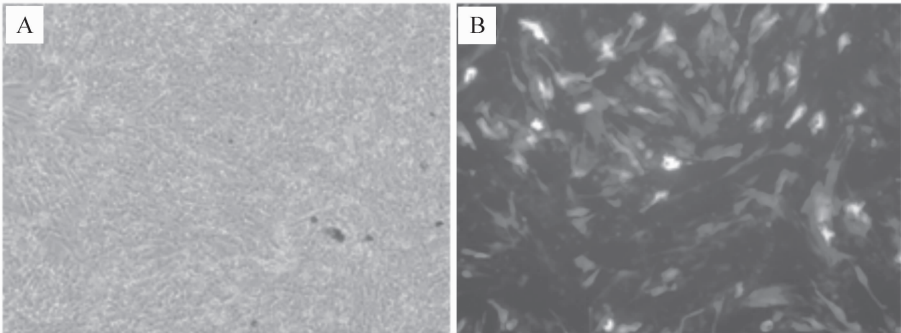


图 5 pAdEasy-KLF15 侵染 C2C12 细胞 48 h 后细胞的荧光强度
A. 白光下细胞形态;B. 绿光下细胞的荧光强度

Fig. 5 Expression of GFP after pAdEasy-KLF15 transfected C2C12 cells for 48 h
A. Cell on white light;B. Expression of GFP on green ray

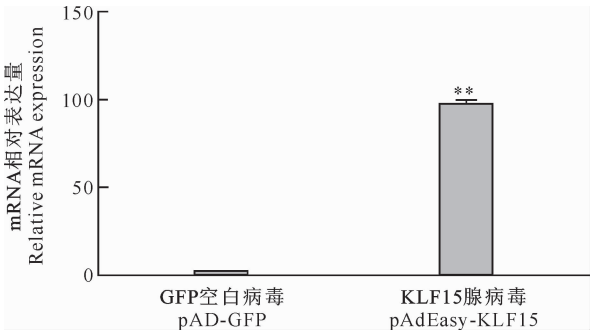


图 6 转染 pAdEasy-KLF15 质粒对 C2C12 细胞 KLF15 基因表达的影响

图 6 显示,与对照相比,KLF15 mRNA 的表达水平增加了约 100 倍。说明 KLF15 的重组腺病毒表达载体可以显著提高 KLF15 基因 mRNA 的表达水平。

3 讨 论

KLF15 作为 KLF 家族的一员,在心肌中可以抑制心肌肥大,在平滑肌中可以抑制平滑肌细胞的迁移。在心肌中,KLF15 可以通过抑制 GATA4 和 MEF2A 的活性来调节心肌细胞的增殖和分化,超表达 KLF15 的小鼠患心肌肥大的可能性会显著下降^[17]。相关报道称,KLF15 对平滑肌的分化有抑制

Fig. 6 Expression of KLF15 gene after C2C12 cells were infected by pAdEasy-KLF15

作用,在正常的血管平滑肌中 *KLF15* 的表达量很高,但是当血管内皮破损后,*KLF15* 的表达量会显著下降,而超表达 *KLF15* 的平滑肌细胞的再生能力会有所下降,并且向受伤部位迁移的能力也明显降低^[18]。*KLF15* 对骨骼肌的能量代谢也起到重要的调节作用^[16]。上述结果表明,*KLF15* 在肌肉的发育过程中具有重要的作用。

本试验研究显示,*KLF15* 在 C2C12 成肌细胞分化过程中表达显著升高,并在分化的后期达到最高值,而且在肌肉组织中的表达水平也较高,这与相关报道^[15]相一致。同时,前期研究发现 *KLF15* 在慢肌肌肉中的表达量极显著高于快肌,推测其可能对骨骼肌的形成,特别是对快慢肌的形成具有重要的作用。

腺病毒具有包装简单,可反复扩繁以及毒力稳定等优势,为了进一步验证 *KLF15* 在原代细胞系和活体中对成肌过程的作用机理,同时为了避免真核表达质粒对原代细胞转染率低的局限性^[19],本试验通过酶切已知载体得到了外源目的基因,成功构建了穿梭载体 pAdTrack-KLF15,通过同源重组,将外源目的基因 *KLF15* 整合到腺病毒骨架载体中,得到了 pAdEasy-KLF15,并于包装后感染 C2C12 细胞;实时荧光定量 PCR 结果显示,pAdEasy-KLF15 可以极显著上调 *KLF15* mRNA 的表达水平,为后续研究 *KLF15* 在原代成肌细胞和活体中的作用机理奠定了基础。

[参考文献]

- [1] McConnell B B, Yang V W. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases [J]. *Physiol Rev*, 2010, 90: 1337-1381.
- [2] Ruiz-Gomez M, Romani S, Hartmann C, et al. Specific muscle identities are regulated by Kruppel during *Drosophila embryo-genesis* [J]. *Development*, 1997, 124: 3407-3414.
- [3] Haldar S M, Ibrahim O A, Jain M K. Kruppel-like factors (KLFs) in muscle biology [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43: 1-10.
- [4] Parakati R, DiMario J X. Repression of myoblast proliferation and fibroblast growth factor receptor 1 promoter activity by KLF10 protein [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288: 13876-13884.
- [5] Miller I J, Bieker J J. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 2776-2786.
- [6] Perkins A C, Sharpe A H, Orkin S H, et al. Lethal beta-thalas-saemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF [J]. *Nature*, 1995, 375: 318-322.
- [7] Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, et al. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angioten-sin II signaling and an essential regulator of cardiovascular re-modeling [J]. *Nat Med*, 2002, 8: 856-863.
- [8] Turner J, Crossley M. Basic Kruppel-like factor functions with-in a network of interacting haematopoietic transcription factors [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, 31: 1169-1174.
- [9] Bieker J J. Isolation, genomic structure, and expression of hu-man erythroid Kruppel-like factor (EKLF) [J]. *DNA Cell Bi-ol*, 1996, 15: 347-352.
- [10] Dang D T, Zhao W, Mahatan C S, et al. Opposing effects of Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) and Kruppel-like factor 5 (intestinal-enriched Kruppel-like factor) on the promoter of the Kruppel-like factor 4 gene [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 2736-2741.
- [11] Uchida S, Tanaka Y, Ito H, et al. Transcriptional regulation of the CLC-K1 promoter by myc-associated zinc finger protein and Kidney-Enriched Kruppel-Like factor, a novel zinc finger repressor [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 197319-197331.
- [12] Fisch S, Gray S, Heymans S, et al. Kruppel-like factor 15 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 7074-7079.
- [13] Yamamoto J, Ikeda Y, Iguchi H, et al. A Kruppel-like factor KLF15 contributes fasting-induced transcriptional activation of mitochondrial acetyl-CoA synthetase gene AceCS2 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 16954-16962.
- [14] Dmitriev P, Petrov A, Ansseau E, et al. The Kruppel-like fac-tor 15 as a molecular link between myogenic factors and a chromosome 4q transcriptional enhancer implicated in fa-cioscapulohumeral dystrophy [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286: 44620-44631.
- [15] Sunadome K, Yamamoto T, Ebisuya M, et al. ERK5 regulates muscle cell fusion through KLF transcription factors [J]. *Dev Cell*, 2011, 20: 192-205.
- [16] Haldar S M, Jeyaraj D, Anand P, et al. Kruppel-like factor 15 regulates skeletal muscle lipid flux and exercise adaptation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 6739-6744.
- [17] Pikkariainen S, Tokola H, Kerkela R, et al. GATA transcrip-tion factors in the developing and adult heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63: 196-207.
- [18] Owens G K, Kumar M S, Wamhoff B R, et al. Molecular regu-lation of vascular smooth muscle cell differentiation in devel-opment and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84: 767-801.
- [19] Yang S J, Xu C Q, Wu J W, et al. Construction of SOCS3 re-combinant adenovirus and its expression in porcine primary adipocytes [J]. *Chin J Biotechnol*, 2000, 26: 462-469.