



宋雅萍, 张久盘, 魏大为, 杨东梅, 赵毅昂, 姜超, 宋小雨, 吴昊. *FOXO1* 基因调控牛前体脂肪细胞增殖和分化的功能研究[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(04): 226-238.

SONG Yaping, ZHANG Jiupan, WEI Dawei, YANG Dongmei, ZHAO Yiang, JIANG Chao, SONG Xiaoyu, WU Hao. Study on the function of *FOXO1* gene in regulating the proliferation and differentiation of bovine preadipocytes[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(04): 226-238.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.04.20

FOXO1 基因调控牛前体脂肪细胞增殖和分化的功能研究

宋雅萍¹ 张久盘² 魏大为^{1*} 杨东梅¹ 赵毅昂¹ 姜超¹ 宋小雨¹ 吴昊¹

(1. 宁夏大学 动物科技学院/宁夏反刍动物分子细胞育种重点实验室, 银川 750021;

2. 宁夏农林科学院 动物科学研究所, 银川 750021)

摘要 为探究干扰叉头转录因子 O1 (Forkhead box protein O1, *FOXO1*) 对牛前体脂肪细胞增殖和分化的作用, 本研究以固原黄牛的前体脂肪细胞为研究对象, 采用组织块法分离牛前体脂肪细胞, 并利用表型鉴定和标志基因表达谱 2 种方法鉴定所分离细胞的纯度和分化潜能。筛选并包装牛 *FOXO1* 干扰慢病毒, 利用 EdU 染色、流式细胞术、油红 O 染色和 qPCR 方法探究干扰 *FOXO1* 对牛脂肪细胞增殖和分化的作用。结果表明: 1) 成功分离了牛前体脂肪细胞, 且其具有较高的纯度和分化潜能。2) EdU 染色结果表明, 感染 Lv-*FOXO1* 极显著增加了牛脂肪细胞的增殖率 ($P < 0.01$)。3) 流式周期结果显示, 干扰 *FOXO1* 显著增加了牛脂肪细胞 S 期阳性细胞的比例, 促进了 G1/S 期的转化, 进而促进了牛脂肪细胞增殖。4) 干扰 *FOXO1* 后, 增殖标志基因 *PCNA*、*CDK1* 和 *CDK2* 的表达量均极显著上调 ($P < 0.01$)。5) 干扰 *FOXO1* 后牛前体脂肪细胞脂滴生成明显减少, 且成脂标志基因 *PPARG* 的表达极显著下调 ($P < 0.01$), *CEBPB* 和 *LPL* 的表达显著下调 ($P < 0.05$)。综上, 干扰 *FOXO1* 可通过上调增殖标志基因 *PCNA*、*CDK1* 和 *CDK2* 的表达促进牛脂肪细胞 G1/S 期的转化, 进而促进牛脂肪细胞增殖, 且其可通过降低成脂标志基因 *PPARG*、*CEBPB* 和 *LPL* 的表达减少牛脂肪细胞脂滴形成, 进而影响脂肪沉积。本研究可为中国地方黄牛的肉质遗传改良提供理论依据。

关键词 *FOXO1*; 固原黄牛; 前体脂肪细胞; 增殖; 分化

中图分类号 S823

文章编号 1007-4333(2024)04-0226-13

文献标志码 A

Study on the function of *FOXO1* gene in regulating the proliferation and differentiation of bovine preadipocytes

SONG Yaping¹, ZHANG Jiupan², WEI Dawei^{1*}, YANG Dongmei¹, ZHAO Yiang¹,
JIANG Chao¹, SONG Xiaoyu¹, WU Hao¹

(1. Key Laboratory of Ruminant Molecular Cell Breeding/College of Animal Science and Technology, Ningxia University,
Yinchuan 750021, China;

2. Institute of Animal Science, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750021, China)

Abstract The aim of the study was to investigate the effects of interfering with Forkhead box protein O1 (*FOXO1*) gene on the proliferation and differentiation of bovine preadipocytes. Taking the Guyuan cattle preadipocytes as the research object, bovine preadipocytes were isolated by tissue block method, and the purity and differentiation potential of the isolated cells were identified by phenotypic identification and marker

收稿日期: 2023-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060744, 32202641); 宁夏自然科学基金项目(2023AAC03394); 宁夏重点研发计划项目(2023BCF01006)

第一作者: 宋雅萍(ORCID: 0000-0003-3042-5379), 硕士研究生, E-mail: songyaping0905@163.com

通讯作者: 魏大为(ORCID: 0000-0002-0252-0099), 副教授, 主要从事动物肌肉和脂肪发育相关候选基因筛选及目标基因转录调控和甲基化调控机制研究, E-mail: weidaweidw@163.com

gene expression profiling. The bovine *FOXO1* interfering lentivirus was screened and packaged, and the effects of interfering *FOXO1* on the proliferation and differentiation of bovine adipocytes were explored by EdU staining, flow cytometry, oil red O staining and qPCR. The results showed that: 1) The bovine preadipocytes were successfully isolated and showed high purity and differentiation potential. 2) EdU staining showed that infection of Lv-*FOXO1* significantly increased the proliferation rate of bovine adipocytes ($P<0.01$). 3) Flow cytometry results showed that interfering with *FOXO1* significantly increased the proportion of S-phase positive cells and promoted the G1/S phase transformation of bovine adipocytes, which in turn promoted the proliferation of bovine adipocytes. 4) After interfering with *FOXO1*, the expression levels of proliferation marker genes *PCNA*, *CDK1* and *CDK2* were all extremely significantly upregulated ($P<0.01$). 5) After interfering with *FOXO1*, the production of lipid droplets in bovine precursor adipocytes was significantly reduced, and the expression of *PPARG*, a lipid-forming marker gene, was extremely significantly down-regulated ($P<0.01$), together with the expressions of *CEBPB* and *LPL* ($P<0.05$). In summary, interfering with *FOXO1* can promote the G1/S phase transformation of bovine adipocytes by up-regulating the expressions of proliferation marker genes *PCNA*, *CDK1* and *CDK2*, thereby promoting the proliferation of bovine adipocytes. Moreover, it can reduce the formation of lipid droplets in bovine adipocytes by reducing the expressions of lipogenic marker genes *PPARG*, *CEBPB* and *LPL*, thus affecting fat deposition. This study can provide theoretical basis for genetic improvement of meat quality of Chinese local yellow cattle.

Keywords *FOXO1*; Guyuan cattle, preadipocytes; proliferation; differentiation

在动物生产中, 肌内脂肪的含量与肉品质的好坏密切相关^[1]。脂肪的生长发育是一个复杂但协调的生物学过程, 其起源于中胚层体节的间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs), 经前体脂肪细胞的终末分化等过程最终形成成熟的脂肪细胞^[2-3]。在脂肪生成的过程中, 以过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (Peroxisome proliferators activated receptors γ , *PPARG*) 为核心所组成的复杂分子调控网络对前体脂肪细胞的增殖和分化发挥重要作用^[3], 各调控因子间相互作用, 共同推动脂肪生成的进程。然而, 涉及脂肪生成的许多潜在靶点尚未发现或其作用机制尚不明晰。因而, 发掘调控脂肪生成的关键基因, 完善脂肪生成的分子调控网络, 对畜牧业的肉质遗传改良而言有着重要意义。

叉头转录因子 O1 (Forkhead box protein O1, *FOXO1*) 是胰岛素反应组织 (如脂肪, 肌肉和肝脏等) 中最丰富的 FoxO 亚型, 其活性经由蛋白激酶 B (Protein kinase B, AKT) 介导的磷酸化和核排斥而受到胰岛素和生长因子的负调节^[4-6]。*FOXO1* 可通过磷酸酰肌醇 3 激酶/AKT (Phosphoinositide 3-kinase/AKT, PI3K/AKT) 和细胞外调节蛋白激酶/丝裂原活化蛋

白激酶 (Extracellular regulated protein kinase/Mitogen activated protein kinase, ERK/MAPK) 通路间接调控 3T3-L1 细胞分化^[7-8], 但其在分化早期并不会在生理上抑制脂肪细胞分化, 因为它的转录活性被 AKT 所介导的磷酸化所抑制^[9]。另一方面, *FOXO1* 的转录活性还可通过乙酰化和去乙酰化调节^[6]。Matsuzaki 等^[10]报道, *FOXO1* 的乙酰化会导致其 DNA 结合活性下降和对 AKT 依赖性磷酸化更敏感。在 3T3-L1 细胞中, SIRT2 (Sirtuin 2) 的敲低可增加 *FOXO1* 乙酰化, 进而降低 *FOXO1* 对脂肪发生的抑制作用并促进脂肪细胞的分化^[6]。因而, *FOXO1* 可通过磷酸化/去磷酸化和乙酰化/去乙酰化作用调控脂肪生成。此外, *FOXO1* 可通过调节脂肪细胞的大小和脂肪特异性基因 (如 *ATGL*) 的表达来调节小鼠脂肪组织的脂质代谢^[11]。以上研究进一步说明, *FOXO1* 在脂肪的生成中发挥重要作用。

目前, 现有的研究主要集中在小鼠脂肪细胞分化和脂质代谢方面, *FOXO1* 对牛脂肪细胞增殖和分化的调控作用尚不明晰。因此, 本研究以牛前脂肪细胞为研究对象, 通过干扰 *FOXO1* 基因的表达, 确定 *FOXO1* 基因在牛脂肪细胞增殖、分化和脂质代谢中的作用, 以期

阐明 *FOXO1* 对牛脂肪生成和沉积的调控作用机制,为改善牛肉品质提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验试剂

DMEM/high glucose、PBS、penicillin/streptomycin 和胰酶等购自 Hyclone 公司(Logan, Utah, USA);胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)和 Lipofectamine™ 3 000 购自 Invitrogen 公司(Carlsbad, USA);罗格列酮、IBMX (3-isobutyl-1-methyl-7H-xanthine)和地塞米松购自 Sigma-aldrich 公司(St. Louis, USA);Trizol 和 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 购自 Takara 公司(Shiga, Japan);Bodipy 493/503 购自安捷凯生物医药科技有限公司(武汉);油红 O 购自 Solarbio 公司(北京);2×M5 HiPer SYBR Premix EsTaq 购自 Mei5bio 公司(北京);BeyoClick™ EdU-555 细胞增殖检测试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒与 QuickBlock™ 免疫染色封闭液购自 Beyotime Biotechnology 公司(上海);无水乙醇、甲醛、氯仿和异丙醇等均为国产分析纯。

1.1.2 试验样品采集

本研究用于分离前体脂肪细胞的组织样采自 3 只健康状况良好,无血缘关系的 1 周龄固原黄牛公犊牛皮下脂肪。试验牛只经 75% 酒精消毒,用 PBS 溶液(含 1% Penicillin/Streptomycin)清洗数次后,利用无菌手术器械采集其脂肪组织,最后置于 PBS 溶液(含 1% Penicillin/Streptomycin)中带回细胞室。

1.2 试验方法

1.2.1 牛原代前体脂肪细胞的分离、培养与鉴定

本研究采用组织块法^[12]分离牛原代前体脂肪细胞(以下简称脂肪细胞)。首先,采集的脂肪组织用 PBS(含 1% penicillin/streptomycin)清洗 3 次后,利用无菌器械剔除血管、肌肉和结缔组织等,将脂肪组织剪成小块,并接种于胶原包被的培养皿中。于细胞培养箱(37℃、5%CO₂)倒置培养 6 h 后,加入生长培养基(10% FBS+1% penicillin/streptomycin + 89% DMEM/high glucose)继续培养。待组织块周围长出大量脂肪细胞后,挑出组织块,继续培养至细胞汇合度达 80% 左右时,进行扩大培养。采用表型鉴定(油红 O 染色和 Bodipy 染色)和标志基因

表达谱鉴定 2 种方法鉴定所分离牛脂肪细胞的纯度和分化潜能。

1.2.2 油红 O 染色和 Bodipy 染色

将 F3 代密度适宜的牛脂肪细胞($n=3$)铺至 6 孔板中,待细胞汇合度达 100% 左右时,将培养基更换为诱导分化培养基(DMEM/high glucose+10 μg/mL 胰岛素+0.5 mmol/L IBMX+1 μmol/L 罗格列酮+1 μmol/L 地塞米松),此时记为分化 0 d。诱导分化 2 d 后换为维持培养基(DMEM/high glucose+10 μg/mL 胰岛素+1 μmol/L 罗格列酮)继续培养。每 2 d 换液一次,培养至分化 8 d 进行油红 O 染色和 Bodipy 染色。

油红 O 染色:首先将分化 8 d 脂肪细胞用 PBS 溶液清洗 3 次;利用 4% 多聚甲醛固定,室温孵育 1 h;随后用 60% 异丙醇清洗,静置 5 min,待培养皿完全干燥后加入配制好的油红 O 工作液(油红 O 储备液:PBS=3:2 配制),并于室温条件下孵育 30 min(避光);最后,弃油红 O 工作液,并经 PBS 清洗后在显微镜(OLYMPUS, Tokyo, Japan)下进行成像观察,并拍照记录。

Bodipy 染色:利用 4% 多聚甲醛溶液固定分化第 8 天的牛脂肪细胞 60 min;利用 PBS 溶液对 Bodipy 储存液(5 μmol/L)进行稀释获得 Bodipy 工作液;每孔细胞添加 500 μL Bodipy 工作液,于室温条件下避光染色 30 min;PBS 洗 3 次后,利用 DAPI 染液染核 10 min;PBS 洗 3 次后,于 IX71 倒置荧光显微镜(OLYMPUS)下进行成像观察,并拍照记录。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(Real-time quantitative PCR, qPCR)

采用 Trizol 法提取牛脂肪细胞 RNA。参照 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 说明书将检测合格的总 RNA 反转录为 cDNA,于 -20℃ 保存备用。使用 2×M5 HiPer SYBR Premix EsTaq 荧光定量试剂盒对增殖和分化标志基因进行实时定量检测。定量引物利用由通用生物技术有限公司(安徽)进行合成,引物信息见表 1。qPCR 反应体系为(15 μL):2×M5 HiPer SYBR Premix EsTaq 7.5 μL, cDNA 1 μL, 上游引物(10 μmol/L)0.3 μL, 下游引物(10 μmol/L)0.3 μL, ddH₂O 5.9 μL。PCR 反应在 CFX96 Real-Time PCR Detection System 仪器(Bio-Rad, California, USA)上进行。反应程序为(两步法):预变性 30 s(95℃);变性 5 s

表 1 定量引物序列信息表
Table 1 The sequence information of qPCR primers

基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物大小 /bp Product length	登录号 Genbank No.
<i>PPARG</i>	F: AGGATGGGGTCCTCATATCC	121	NM_181024. 2
	R: GCGTTGAACTTCACAGCAAA		
<i>CEBPB</i>	F: TTCCTCTCCGACCTCTTCTC	79	NM_176788
	R: CCAGACTCACGTAGCCGTACT		
<i>FABP4</i>	F: AAGTCAAGAGCATCGTAA	111	NM_174314. 2
	R: CCAGCACCATCTTATCAT		
<i>FOXO1</i>	F: GCAGATTTACGAGTGGATGG	86	XM_025000053. 1
	R: TTGAATTCTTCCAGCCCCG		
<i>PCNA</i>	F: GAACCTCACCAGCATGTCCA	97	NM_001034494
	R: TACTAGTGCCAACGTGTCCG		
<i>CDK1</i>	F: GAAGGGGTTCTAGTACTGC	176	NM_174016. 2
	R: ATGAACTGACCAGGAGGG		
<i>CDK2</i>	F: GCCAGGAGTTACTTCTATGC	102	NM_001014934. 1
	R: CTCCGTCCATCTTCATCC		
<i>GAPDH</i>	F: CCAACGTGTCTGTTGTGGAT	80	NM_001034034. 2
	R: CTGCTTCACCACCTTCTTGA		

(95 ℃), 退火 30 s (最适退火温度), 延伸 30 s (72 ℃), 40 个循环。内参基因为 *GAPDH*。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对基因的 mRNA 表达水平进行相对定量分析。

1.2.4 *FOXO1* 干扰慢病毒重组质粒构建与病毒包装

首先, 利用 Thermofisher 的 RNAi 设计在线工具 (<http://rnaidesigner.thermofisher.com.rnaiexpress/>) 设计 3 条 (sh-*FOXO1*-2286、sh-*FOXO1*-1807 和 sh-*FOXO1*-1798) 靶向 *FOXO1* 的短发夹 RNA 序列 (表 2)。序列经通用生物 (安徽) 合成后, 将其互补的 2 条链经退火形成的双链 shRNA 序列和 pENTR/CMV-GFP/U6 载体分别双酶切 (*Bam*H I 和 *Xho* I)。接着, 分别将 3 条 shRNA 序列与 U6 质粒连接, 命名为 pENTR/U6-Sh-*FOXO1*-2286、pENTR/U6-Sh-*FOXO1*-1807 和 pENTR/U6-Sh-*FOXO1*-1798。进一步扩增 *FOXO1* 的 CDS 区, 并将其与 Psicheck II 载体连接以构建重组质粒 (psicheckII-*FOXO1*)。将上述所得到的 4 个重组质粒送至杨凌奥科生物技术有限公司进行测序。确

定测序结果正确进行后续试验。将 pENTR/U6-shRNA 或 pENTR/U6-NC 分别与 psicheck II-*FOXO1* 质粒混合, 形成 DNA-脂质体混合物, 加入 HEK293T 细胞 (24 孔板) 中, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养环境中培养。48 h 后, 利用双荧光素酶报告基因实验测定荧光素酶活性, 鉴定出最佳干扰效率的 shRNA 序列, 并将其包装慢病毒。最后, 利用 Lipofectamine™ 3 000 将重组载体 c-shRNA 与辅助载体 pMD2G 和 psPAX2 共转染 HEK293T 细胞。转染 24 h 后即可利用倒置显微镜观察荧光表达情况, 并分别于 48 和 72 h 收集上清液用于浓缩和纯化病毒。

1.2.5 最佳感染复数 (Multiply of infection, MOI) 值的确定

将 F3 代密度适宜的牛脂肪细胞铺至 96 孔板中 ($n=3$), 待细胞汇合度达 50% 左右时, 设置多个感染梯度 (MOI=30、60、90、120、150 和 180), 利用 1/2 小体积感染法侵染脂肪细胞, 并于 4 h 后补全培养基。待 24 h 后换为新鲜培养基。最后, 于 72 h 时根据感染不同浓度病毒的牛脂肪细胞生长状态及其

表2 牛FOXO1的短发卡RNA序列信息

Table 2 Short hairpin RNA sequences information of FOXO1

序列名称	序列(5'→3')
Name of sequence	Sequence(5'→3')
sh-FOXO1-2286	F: GATCC GCATGTTTATCGAGCGCTTGGTCAAGAGCCAAGCGCTCGATAAAACATGC TTTTTT C
	R: TCGAG AAAAAA GCATGTTTATCGAGCGCTTGGCTCTTGACCAAGCGCTCGATAAAACATGC G
sh-FOXO1-1807	F: GATCC GGACAACAAATCGAGTTATGGTCAAGAG CCATAACTCGATTTGTTGTCC TTTTTT C
	R: TCGAG AAAAAAGGACAACAAATCGAGTTATGGCTCTTGACCATAAACTCGATTTGTTGTCC G
sh-FOXO1-1798	F: GATCC GACGCTGCAGGACAACAAATCTCAAGAGGATTTGTTGTCCTGCAGCGTC TTTTTT C
	R:TCGAG AAAAAA GACGCTGCAGGACAACAAATCCTCTTGAGATTTGTTGTCCTGCAGCGTC G

注：GATCC 和 TCGAG 为内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 的序列，加粗序列表示正链，下划线序列表示负链，斜体序列表示 loop 环。

Note: GATCC and TCGAG were the sequence of endonuclease *Bam*H I and *Xho* I, bold sequence indicated sense strand, underline sequence indicated loop sequence and red sequence indicated anti-sense strand.

荧光表达情况确定最佳感染复数。

1.2.6 EdU 染色

接种牛前体脂肪细胞至 24 孔板($n=3$),待牛前体脂肪细胞汇合度达 50% 左右时,以最佳 MOI 的病毒量侵染脂肪细胞,并于感染第 3 天进行 EdU 染色。首先,用 EdU 工作液(20 μ mol/L)孵育牛脂肪细胞 4 h(37 $^{\circ}$ C);接着,用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min;并在室温下用 0.3% Triton X-100 通透细胞 15 min;经洗涤后,加入 1 $\times$ Hoechst 33342 溶液避光染核 10 min;最后,于倒置显微镜下进行荧光检测,并拍照记录。

1.2.7 细胞周期测定

感染 Lv-NC 和 Lv-FOXO1 第 3 天的牛脂肪细胞($n=3$)经胰酶消化后收集于 1.5 mL 离心管中,利用预冷的 PBS 溶液洗细胞 2 次,并用预冷 70% 乙醇固定 12 h。利用细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(Beyotime)对已固定的牛脂肪细胞用碘化丙啶(Propidium iodide,PI)进行核染色,并于 37 $^{\circ}$ C 避光条件下孵育 30 min;最后,利用流式细胞仪(BD Biosciences, New Jersey, USA)进行检测。

1.2.8 数据分析

EdU 染色结果由 Image J 软件(Bethesda, Maryland, USA)进行分析,EdU 标记的增殖细胞数量除以 Hoechst 33342 标记的细胞核数量即为细胞增殖率。细胞周期结果由 FlowJo_v10.6.2 软件(BD Biosciences)进行分析。利用 Image Pro Plus 软件(MEDIA CYBERNETICS, Maryland, USA)

对 GFP 及油红 O 进行量化。使用 GraphPad Prism 8.0(San Diego, California, USA)进行单因素方差(one-way ANOVA)分析(或 *t* 检验分析)显著性并绘图,**表示极显著差异($P<0.01$),*表示显著差异($P<0.05$)。

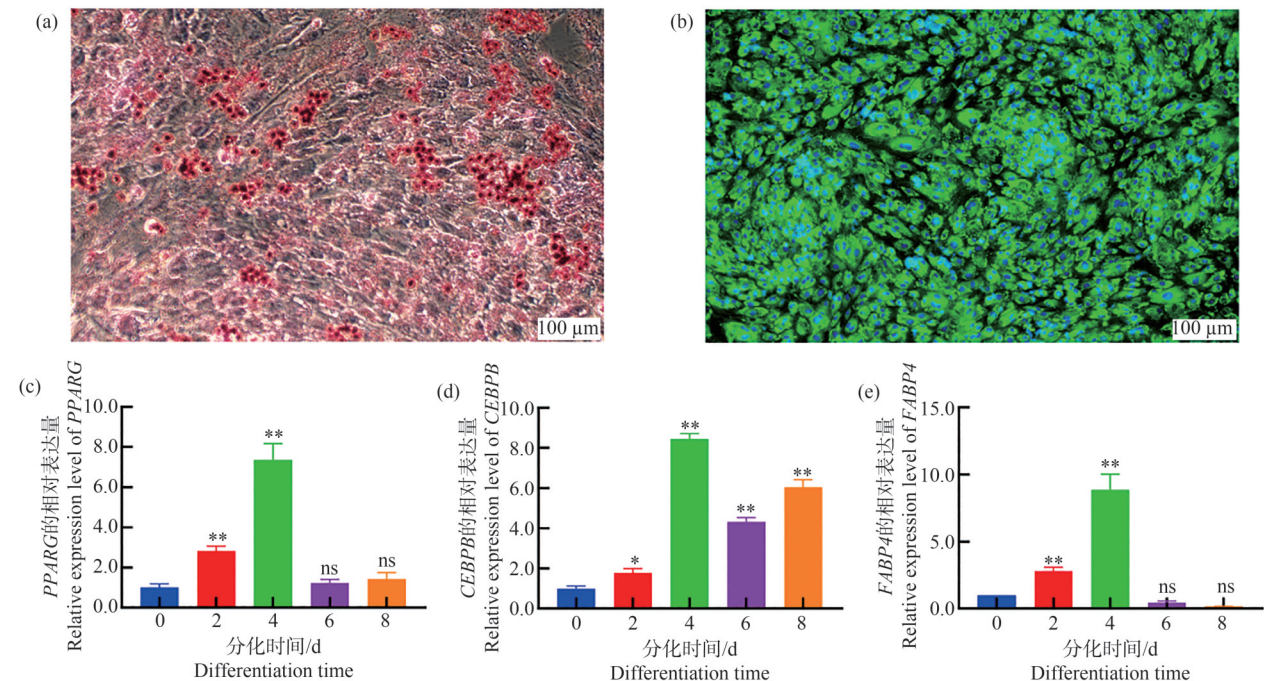
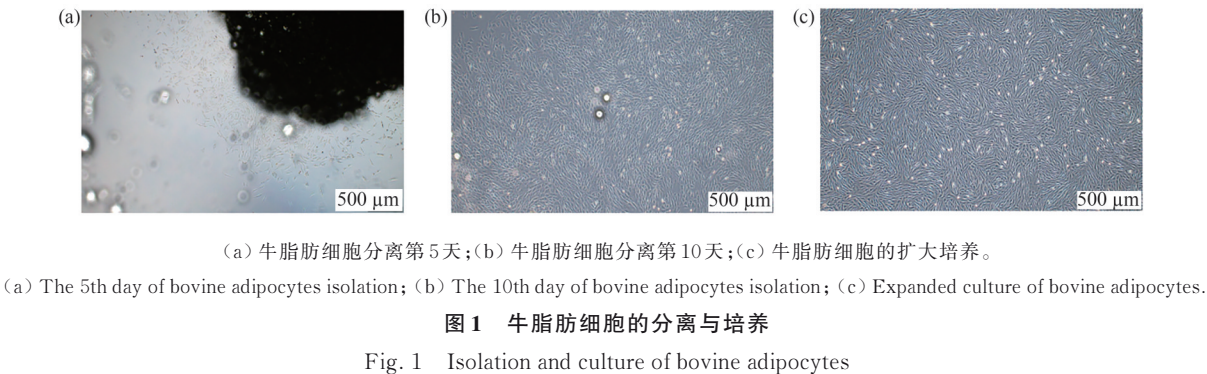
2 结果与分析

2.1 牛脂肪细胞的分离与培养

本研究采用组织块法成功分离得到牛脂肪细胞。如图 1(a)所示,分离第 5 天组织块周围已有少量脂肪细胞生长。随着时间的推进,脂肪细胞数量逐渐增多,初始分离的脂肪细胞活力良好,形态规则、呈长梭形(图 1(b)~(c))。

2.2 牛脂肪细胞的鉴定

利用分化培养基对所分离牛脂肪细胞进行诱导分化,并采用表型鉴定(油红 O 染色和 Bodipy 染色)和标志基因表达谱鉴定 2 种方法共同鉴定牛脂肪细胞的纯度和分化能力。油红 O 染色结果显示(图 2(a)),分化第 8 天的牛脂肪细胞中有大量脂滴聚集,脂滴呈鲜红色的球状。Bodipy 染色发现(图 2(b)),分化第 8 天的牛脂肪细胞荧光强度较强,说明其脂质含量丰富。进一步用 qPCR 检测成脂标志基因在牛脂肪细胞分化过程中的表达模式发现(图 2(c)~(e)),相较于分化 0 d,成脂标志基因 *PPARG* 和 *FABP4* 的表达量随脂肪细胞分化进程的推进极显著上调($P<0.01$),于分化第 4 天达峰值,随后下调;*CEBPB* 与 *PPARG* 相似,随着分化进程推进,其

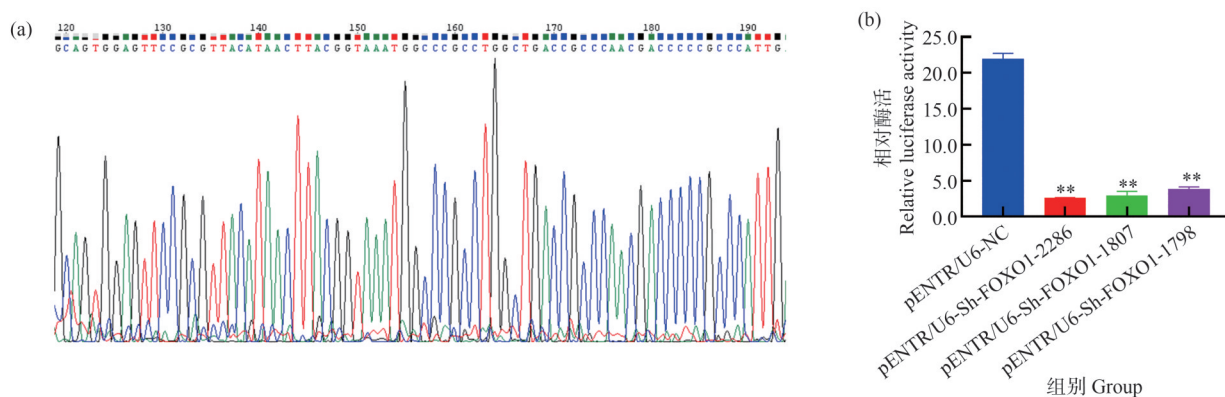


表达量逐渐上调,于分化第4天达高峰($P<0.01$),随后下调,分化第8天后其表达量开始回升。说明此次分离的脂肪细胞纯度高,且有很强的分化潜能,可用于后续试验。

2.3 牛 *FOXO1* 干扰慢病毒载体的构建与病毒包装

将所获得的 pENTR/U6-sh-*FOXO1*-2286、pENTR/U6-sh-*FOXO1*-1807、pENTR/U6-sh-

FOXO1-1798 和 psicheck II-*FOXO1* 4 个重组质粒进行测序发现(图 3(a)),序列正确且无突变。将 3 个 pENTR/U6-shRNA 分别与 psicheck II-*FOXO1* 混合,并转染至 HEK293T 细胞中。双荧光素酶活性报告试验显示(图 3(b)),与对照组 pENTR/U6-NC 相比, pENTR/U6-sh-*FOXO1*-2286、pENTR/U6-sh-*FOXO1*-1807 和 pENTR/U6-sh-*FOXO1*-



(a) 测序检测重组质粒无突变;(b) 双荧光素酶报告基因实验检测3条shRNA序列对FOXO1的干扰效率。数据以平均值±SEM($n=3$)表示。显著性通过单因素方差(one-way ANOVA)分析确定,** $P<0.01$ 。

(a) Sequencing and detecting that the recombinant plasmid has no mutation; (b) Detection of interference efficiency of three shRNA sequences on FOXO1 by using dual-luciferase reporter experiment. Data are presented as mean ± SEM ($n=3$). Significance was determined by One-way ANOVA analysis, ** $P<0.01$.

图3 牛FOXO1干扰慢病毒包装

Fig. 3 Packaging of bovine FOXO1 interference lentivirus

1798的相对酶活均极显著下调($P<0.01$)。最后,选择干扰效果最好的pENTR/U6-sh-FOXO1-2286序列进行单靶点慢病毒(记为Lv-FOXO1)包装,Lv-FOXO1和Lv-NC的滴度分别为 3×10^8 U/mL和 1.5×10^8 U/mL。

2.4 最佳MOI值的摸索与干扰效率检测

为确定所包装Lv-FOXO1在脂肪细胞中的最佳MOI,本研究设置了6个MOI梯度(MOI分别为30、60、90、120、150和180)感染牛脂肪细胞。结果发现(图4(a)~(b)),MOI为90时,牛脂肪细胞荧光数最高且细胞状态良好,说明其感染效率最佳。以最佳MOI值(MOI=90)的病毒添加量感染脂肪细胞,发现FOXO1的表达量极显著下调($P<0.01$),干扰效率为42%左右(图4(c))。说明所包装的Lv-FOXO1效果较好,可用于后续试验。

2.5 干扰FOXO1促进牛脂肪细胞的增殖

本研究利用EdU染色从表型上观察了FOXO1对牛脂肪细胞增殖的影响,发现Lv-FOXO1组中增殖的牛脂肪细胞数量明显多于Lv-NC组(图5(a))。进一步用Image J软件量化2组EdU染色的结果发现,干扰FOXO1极显著提高了牛脂肪细胞的增殖率($P<0.01$;图5(b))。这一结果说明干扰FOXO1可促进牛脂肪细胞的增殖。

2.6 干扰FOXO1促进牛脂肪细胞G1/S期的转化

真核细胞周期可分为4阶段:G1期(细胞变大,

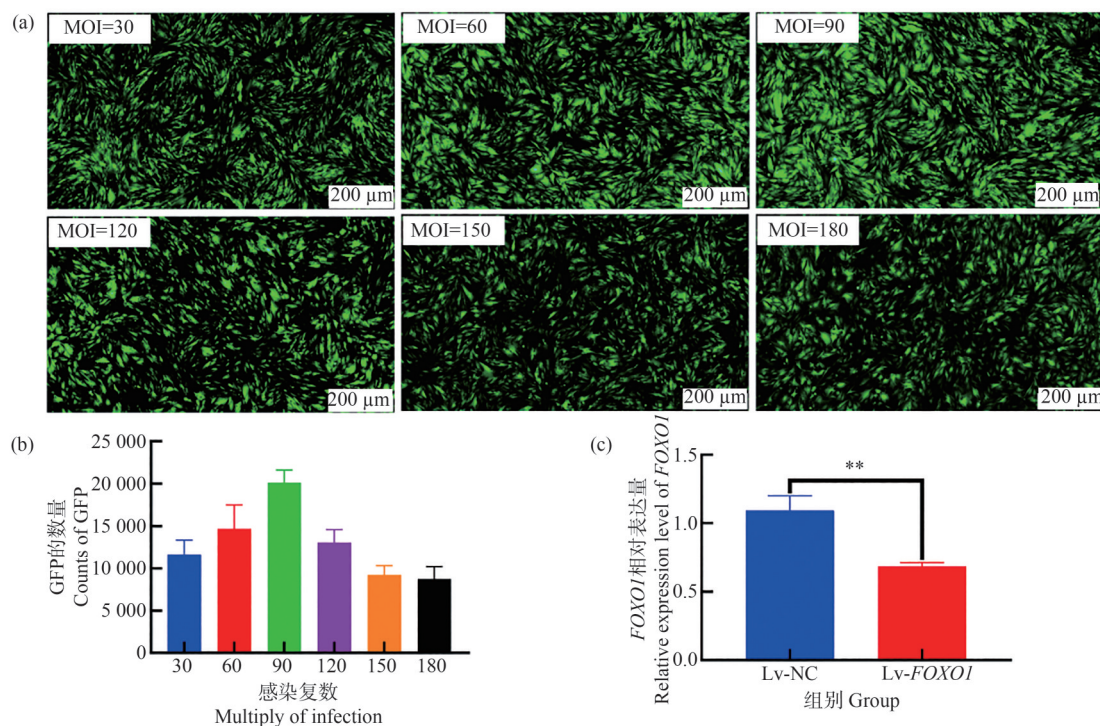
评估其代谢状态并准备分裂)、S期(实际基因组复制发生的地方)、G2期(细胞检查DNA复制的完成并准备分裂)和M期(发生有丝分裂和细胞分裂)。本研究用流式细胞术检测干扰FOXO1对牛脂肪细胞增殖周期的影响发现(图6(a)~(c)),干扰FOXO1减少了牛脂肪细胞G1期阳性细胞的比例,增加了S期阳性细胞的比例,促进了牛脂肪细胞G1/S期的转化,进而缩短了G1/S期的时间,促进了牛脂肪细胞增殖。

2.7 干扰FOXO1促进牛脂肪细胞增殖标志基因的表达

为探究FOXO1对牛脂肪细胞增殖标志基因表达的影响,在牛脂肪细胞中分别感染Lv-NC和Lv-FOXO1,提取其RNA,由图7(a)可知,本研究所提取的RNA可清晰看见28S和18S 2条带,表明RNA质量较好,可用于后续试验。将检验合格的RNA逆转录,并用于检测感染Lv-FOXO1后牛脂肪细胞中增殖标志基因表达的变化。结果显示(图7(b)),干扰FOXO1极显著上调了增殖标志基因PCNA、CDK1和CDK2的表达($P<0.01$)。此结果说明,干扰FOXO1可通过促进增殖标志基因的表达促进牛脂肪细胞的增殖。

2.8 干扰FOXO1抑制牛脂肪细胞脂滴的生成

本研究将Lv-NC和Lv-FOXO1分别感染至牛脂肪细胞中,诱导细胞分化至第4天进行油红O染色。结

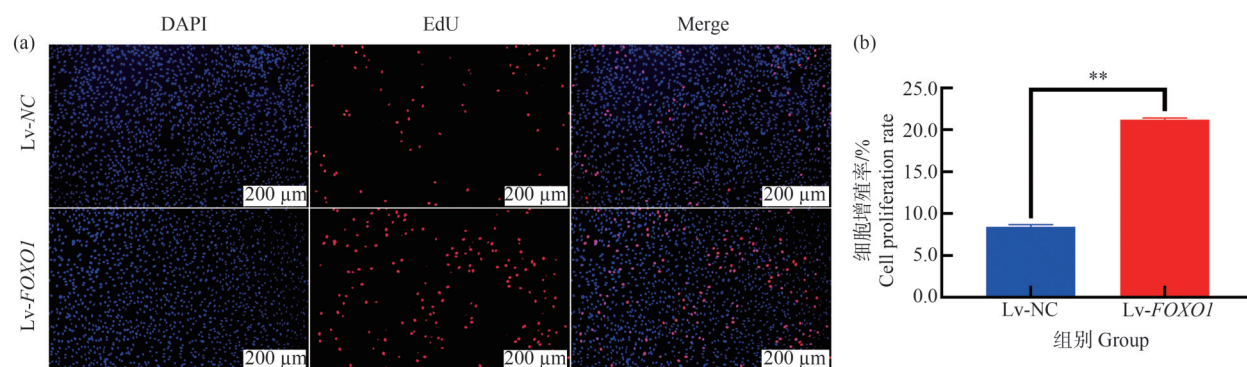


(a) 牛脂肪细胞中 *Lv-FOXO1* 最佳 MOI 值摸索; (b) 最佳 MOI 值摸索慢病毒荧光表达情况量化结果; (c) *Lv-FOXO1* 干扰效率的测定。数据以平均值 $\pm$ SEM ($n=3$) 表示。显著性通过 *t* 检验 (*t*-test) 确定, $**P<0.01$ 。

(a) Exploration of the optimal MOI value of *Lv-FOXO1* in bovine adipocytes; (b) Quantitative results of fluorescence expression in the exploration of the optimal MOI value; (c) Determination of *Lv-FOXO1* interference efficiency. Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n=3$). Significance was determined by *t*-test analysis, $**P<0.01$.

图 4 最佳 MOI 值的摸索及干扰效率测定

Fig. 4 Exploration of optimal MOI value and determination of interference efficiency



(a) *Lv-NC* 和 *Lv-FOXO1* 组的 EdU 染色结果 (蓝色为细胞核, 红色为增殖的细胞); (b) EdU 染色量化结果。数据以平均值 $\pm$ SEM ($n=3$) 表示。显著性通过 *t* 检验 (*t*-test) 确定, $**P<0.01$ 。

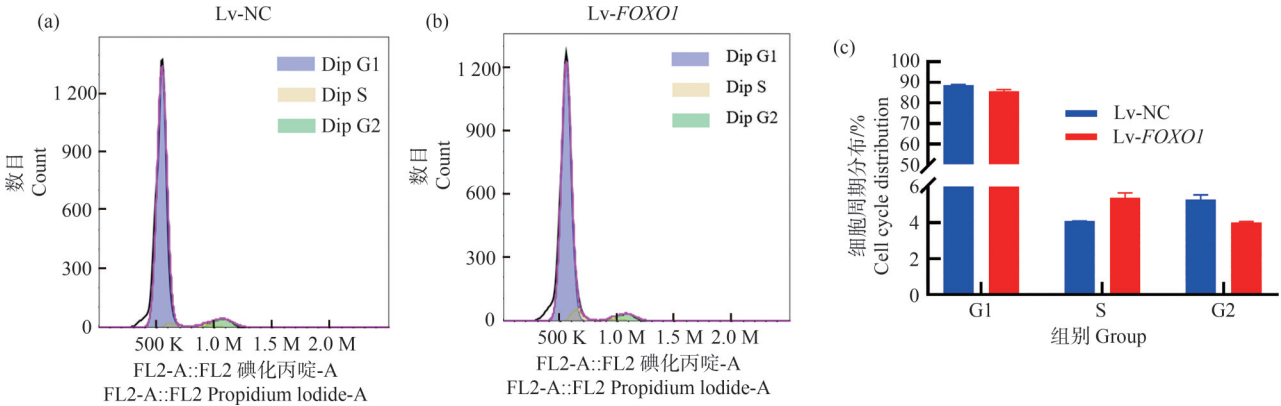
(a) The EdU staining results of *Lv-NC* and *Lv-FOXO1* groups (Blue is the nucleus, and red is the proliferating cells); (b) Quantitative results of EdU staining. Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n=3$). Significance was determined by *t*-test analysis, $**P<0.01$.

图 5 *FOXO1* 对牛脂肪细胞增殖的影响

Fig. 5 Effect of *FOXO1* on proliferation of bovine adipocytes

果发现(图 8(a)~(b)), 相较于 *Lv-NC* 组, *Lv-FOXO1* 组生成脂滴明显减少。进一步利用 Image Pro Plus 软

件量化油红 O 染色结果发现(图 8(c)), 干扰 *FOXO1* 极显著减少了牛脂肪细胞脂滴的生成 ($P<0.01$)。

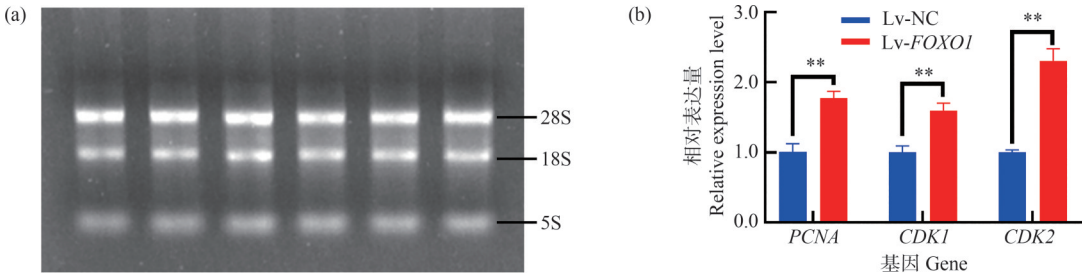


(a), (b) 分别为感染 Lv-NC 和 Lv-FOXO1 后 72 h 细胞周期各个阶段阳性细胞的比例; (c) 与 Lv-NC 相比, 感染 Lv-FOXO1 后细胞周期各个阶段阳性细胞比例的变化。

(a) and (b) are the proportion of positive cells in each stage of cell cycle at 72 h after Lv-NC and Lv-FOXO1 infection, respectively; (c) Compared with Lv-NC, the percentage of positive cells in different stages of cell cycle after Lv-FOXO1 infection.

图6 FOXO1对牛脂肪细胞增殖周期的影响

Fig. 6 Effect of FOXO1 on proliferation cycle of bovine adipocytes

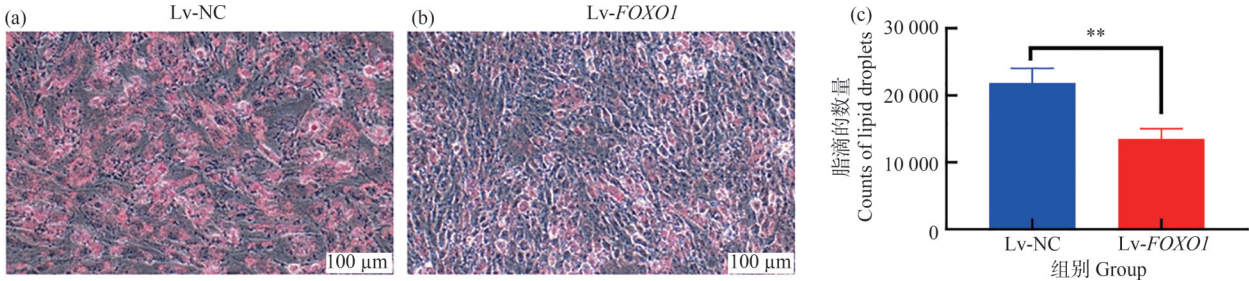


(a) RNA凝胶电泳检测; (b) 感染 Lv-FOXO1 后牛脂肪细胞中增殖标志基因表达变化。数据以平均值 $\pm$ SEM($n=3$)表示。显著性通过 t 检验(t -test)确定, $**P<0.01$ 。

(a) RNA gel electrophoresis detection; (b) The mRNA expression changes of proliferation marker genes in bovine adipocytes infected with Lv-FOXO1. Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n=3$). Significance was determined by t -test analysis, $**P<0.01$.

图7 干扰FOXO1对牛脂肪细胞增殖的作用

Fig. 7 Effect of interfering with FOXO1 on proliferation of bovine adipocytes



(a) 感染 Lv-NC 牛脂肪细胞中的脂滴染色; (b) 感染 Lv-FOXO1 牛脂肪细胞中的脂滴染色; (c) 油红 O 染色的量化结果。数据以平均值 $\pm$ SEM($n=3$)表示。显著性通过 t 检验(t -test)确定, $**P<0.01$ 。

(a) Staining with fat droplets of bovine adipocytes infected with Lv-NC; (b) Staining with the fat droplets in bovine adipocytes infected with Lv-FOXO1; (c) Quantitative results of oil red O staining. Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n=3$). Significance was determined by t -test analysis, $**P<0.01$.

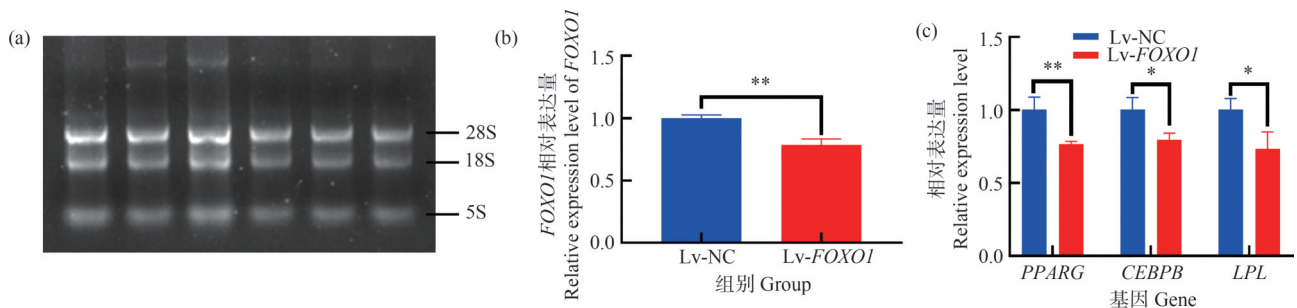
图8 干扰FOXO1对牛脂肪细胞脂滴生成的影响

Fig. 8 Effect of interfering with FOXO1 on lipid droplet formation in bovine adipocytes

2.9 干扰 *FOXO1* 抑制牛脂肪细胞分化标志基因的表达

为明晰 *FOXO1* 对牛脂肪细胞分化的调控作用,本研究进一步探究了干扰 *FOXO1* 对牛脂肪细胞中成脂标志基因表达的影响。RNA 质检结果显示(图 9(a)),本探究所提取 RNA 质量较好,可满足后续试验要求。进一步利用 qPCR 方法检测了 Lv-*FOXO1* 的干扰效率和成脂标志基因 *PPARG*、

CEBPB 和 *LPL* 的表达变化。结果显示(图 9(b)),感染 Lv-*FOXO1* 的牛脂肪细胞中 *FOXO1* 的表达量于分化第 4 天极显著下调,可用于后续试验。此外,本研究发现(图 9(c)),干扰 *FOXO1* 极显著降低了成脂标志基因 *PPARG* 的表达($P < 0.01$),并显著抑制了 *CEBPB* 和 *LPL* 的表达($P < 0.05$)。此结果说明,干扰 *FOXO1* 可通过抑制牛脂肪细胞成脂标志基因的表达抑制其分化。



(a) RNA 凝胶电泳检测;(b) 牛脂肪细胞分化第 4 天 LV-*FOXO1* 的干扰效率;(c) 感染 Lv-*FOXO1* 后牛脂肪细胞中成脂标志基因表达变化。数据以平均值 $\pm$ SEM ($n=3$) 表示。显著性通过 t 检验(t -test)确定, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

(a) RNA gel electrophoresis detection; (b) Interference efficiency of LV-*FOXO1* on the 4th day of bovine adipocyte differentiation; (c) The mRNA expression changes of adipogenic marker genes in bovine adipocytes infected with Lv-*FOXO1*. Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n=3$). Significance was determined by t -test analysis, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

图 9 干扰 *FOXO1* 对牛脂肪细胞中成脂标志基因的表的影响

Fig. 9 Effect of interfering with *FOXO1* on expression of adipogenic marker gene in bovine adipocytes

3 讨论

3.1 *FOXO1* 在牛脂肪生成中的重要作用

脂肪组织是机体储存能量、维持稳态的重要组织之一,其在动物体中的含量在一定程度上影响并决定着肉的嫩度、多汁性和风味的好坏^[13]。再者,脂肪的生成是一个复杂但协调的生物学过程,其主要经历了 MSCs 分化形成前体脂肪细胞和前体脂肪细胞终末分化形成成熟的脂肪细胞 2 个过程^[14]。因此,探究调控脂肪细胞增殖和分化的作用机制对牛肉质的改良有重要作用。研究表明,脂肪的生成受到许多内部因子的调控和外部信号的参与,这一系列有序的反应互相协作和影响,组成了一个复杂而精密的调控网络,推动着脂肪生成的进程^[13]。目前,以 *PPARG* 和 *C/EBP* 家族成员为中心调控脂肪生成的分子网络不断完善^[3],但涉及脂肪生成的许多途径和潜在靶点尚未发现或其作用机制尚不明晰。

FOXO1 因其在脂肪细胞分化和脂质代谢中所发挥的重要调控作用而成为脂肪生成和沉积的关

键转录因子之一^[15]。作为 FoxO 亚家族成员之一, *FOXO1* 参与调控细胞周期、脂肪细胞分化和脂质代谢等过程^[16-17]。目前,有关 *FOXO1* 对细胞增殖作用的研究主要集中在癌细胞中^[18-19], *FOXO1* 对脂肪细胞增殖的作用机制仍不明晰。Chae 等^[20]报道, G9a 介导的 *FOXO1* 甲基化可通过降解 *FOXO1* 促进结肠癌细胞的增殖,并减少细胞凋亡。再者, *FOXO1* 还被证明在包括胃肠间质瘤^[21]和肾癌^[22]在内的几种细胞系中显著抑制细胞增殖并增加细胞凋亡。另一方面,与 *FOXO1* 基因对脂肪细胞分化的作用相关研究在人和小鼠等动物中略有涉及,如 Liu 等^[23]发现沉默 *FOXO1* 会抑制小鼠脂肪细胞分化和脂滴生长,但 Dong 等^[24]报道,在脂肪生成的早期, *FOXO1* 可通过抑制 *PPARG* 的转录来阻碍猪前脂肪细胞的分化,这 2 种结论无疑是相悖的。近些年,有关牛 *FOXO1* 基因的研究逐渐增多,如对牛 *FOXO1* 基因的组织表达分析以及肉质性状关联分析等^[25-26]。课题组前期研究发现^[27], *FOXO1* 在牛脂肪细胞分化过程中差异表达,推测其在牛脂肪生成

中发挥着重要作用,但 *FOXO1* 基因对牛脂肪生成的作用机制尚不明晰。因此,深入研究 *FOXO1* 基因在牛脂肪细胞增殖和分化过程中的调控作用对改善肉牛肉质性状具有重要意义。

3.2 *FOXO1* 对牛脂肪细胞增殖的影响

细胞增殖主要分为S期(合成期)和M期(有丝分裂期),在S期和M期之前有2个中间间隙期:G1期和G2期^[28-29]。在分子水平上,越来越多的证据表明,真核生物中的细胞周期进程是由进化上保守的中枢机制驱动的,该机制主要包括CDK,其可通过磷酸化增殖关键靶标促进DNA合成和染色体分裂^[30]。CDK的活性是通过与细胞周期蛋白结合来调节,细胞周期蛋白的水平则会根据细胞周期的特定阶段而波动^[30-31]。具体而言,CDK与Cyclin一起共同调控细胞周期,CCNB与CDK1结合,CDK1在G1之前的M期被激活,CDK2在G1/S转化时与CCNE结合,在S期时与CCNA结合^[30-32]。此外,PCNA是复制过程中DNA聚合酶必不可少的辅助因子,且其可将聚合酶与DNA结合并显著增加其合成能力^[33]。目前,有关*FOXO1*对脂肪细胞增殖的调控作用在小鼠和猪中已有相关报道。如Nakae等^[34]研究表明,*FOXO1*可通过激活其靶细胞周期抑制剂*p21*以及抑制增殖标志基因*CCND1*和*CCND2*的表达影响脂肪生成。本研究发现,干扰*FOXO1*显著增加了S期牛脂肪细胞阳性细胞数量,其可通过缩短G1/S期转化的时间促进牛脂肪细胞增殖。再者,qPCR发现,干扰*FOXO1*极显著促进了增殖标志基因*PCNA*、*CDK1*和*CDK2*的表达($P<0.01$)。因此,本研究发现干扰*FOXO1*可通过促进*PCNA*、*CDK1*和*CDK2*等增殖标志基因的表达调控牛脂肪细胞G1/S期的转化,进而正向调控牛脂肪细胞的增殖。

3.3 *FOXO1* 对牛脂肪细胞分化的影响

据报道,*FOXO1*可通过PI3K/AKT和ERK/MAPK通路间接调控脂肪细胞分化^[7-8]。早在2003年,*FOXO1*就被证明在激素激活的信号通路与促进脂肪细胞分化的复杂转录级联的整合中起重要作用^[34]。但目前,*FOXO1*在调控脂肪细胞分化的作用还不明晰,甚至在一些结论上相互矛盾。成脂标志基因*PPARG*和*C/EBP*在脂肪细胞生成过程中相互作用、相互调控,共同调控着生脂基因的表达和胰岛素的敏感性,推动着脂肪生成的进

程^[3]。具体而言,*CEBPB*和*C/EBP δ* 在早期激活*PPARG*表达中起重要作用,激活的*PPARG*诱导*CEBPA*和其他生脂基因的表达以促进终末分化,之后*CEBPA*又通过正反馈回路维持*PPARG*的表达^[35-36]。另一方面,LPL是将三酰基甘油积累到脂肪细胞中的限速酶,可促进脂质的摄取和储存^[37-38]。因LPL在脂肪细胞生成早期就开始表达,且在分化的细胞中持续表达而被作为脂肪细胞分化的早期标记物之一^[37]。本研究探究了干扰*FOXO1*对*PPARG*、*CEBPB*和LPL表达的影响,结果发现干扰*FOXO1*极显著下调了*PPARG*的表达,并显著下调了*CEBPB*和LPL的表达。这一结果与Munekata等^[7]的报道一致,干扰*FOXO1*可通过抑制*PPARG*和*CEBPA*的表达抑制脂肪细胞分化,其抑制机制可能是干扰*FOXO1*抑制了*IRS2*的表达所致。再者,利用*FOXO1*抑制剂AS1842856处理小鼠的3T3-L1细胞发现,AS1842856可通过抑制*PPARG*蛋白的表达抑制脂肪细胞分化和脂滴的生成^[23]。

基于此,本研究发现干扰*FOXO1*可减少牛脂肪细胞的脂滴生成,这一作用是通过下调成脂标志基因*PPARG*、*CEBPB*和LPL的表达来实现的。此外,*FOXO1*调控牛脂肪生成的潜在分子机制仍需进一步探究,该结果亦需在活体水平上进行验证。

4 结 论

干扰*FOXO1*可通过上调增殖标志基因*PCNA*、*CDK1*和*CDK2*的表达促进牛脂肪细胞增殖,且其可通过降低成脂标志基因*PPARG*、*CEBPB*和LPL的表达减少牛脂肪细胞脂滴形成,抑制牛脂肪细胞的分化,进而影响脂肪的沉积。本研究为分析*FOXO1*基因调控脂质沉积和改善牛肉品质的转录调控提供依据。

参考文献 References

- [1] Zhang M, Li D H, Zhai Y H, Wang Z Z, Ma X F, Zhang D Y, Li G X, Han R L, Jiang R R, Li Z J, Kang X T, Sun G R. The landscape of DNA methylation associated with the transcriptomic network of intramuscular adipocytes generates insight into intramuscular fat deposition in chicken [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 206
- [2] Uezumi A, Ito T, Morikawa D, Shimizu N, Yoneda T, Segawa M, Yamaguchi M, Ogawa R, Matev M M, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Tsujikawa K, Tsuchida K, Yamamoto H, Fukada S I. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle [J]. *Journal of Cell Science*, 2011, 124(21): 3654-3664

- [3] Song Y P, Wei D W, Raza S H A, Zhao Y A, Jiang C, Song X Y, Wu H, Wang X P, Luoreng Z M, Ma Y. Research progress of intramuscular fat formation based on co-culture[J]. *Animal Biotechnology*, 2023, 34(7):3216-3236
- [4] Fan W Q, Imamura T, Sonoda N, Sears D D, Patsouris D, Kim J J, Olefsky J M. FOXO1 transrepresses peroxisome proliferator-activated receptor gamma transactivation, coordinating an insulin-induced feed-forward response in adipocytes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(18):12188-12197
- [5] Chakrabarti P, Kandror K V. FoxO1 controls insulin-dependent adipose triglyceride lipase (ATGL) expression and lipolysis in adipocytes[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(20):13296-13300
- [6] Jing E X, Gesta S, Kahn C R. SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation[J]. *Cell Metabolism*, 2007, 6(2):105-114
- [7] Munekata K, Sakamoto K. Forkhead transcription factor Foxo1 is essential for adipocyte differentiation[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2009, 45(10):642-651
- [8] Baba S, Ueno Y, Kikuchi T, Tanaka R, Fujimori K. A limonoid kihadanin B from immature *Citrus unshiu* peels suppresses adipogenesis through repression of the akt-FOXO1-PPAR γ axis in adipocytes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(51):9607-9615
- [9] Qiao L, Shao J. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein α transcriptional complex[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281:39915-39924
- [10] Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A. Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(32):11278-11283
- [11] Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo M R. FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: Implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment[J]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4(10):e861
- [12] 高玉红, 冯雪, 汪书哲, 户春丽, 李芬, 张路培, 杨润军, 马云. 黄牛 circCAP2 在前体脂肪细胞分化过程中的功能研究[J]. 农业生物技术学报, 2023, 31(7):1441-1449
- Gao Y H, Feng X, Wang S Z, Hu C L, Li F, Zhang L P, Yang R J, Ma Y. Function of circCAP2 in the differentiation of cattle (*Bos taurus*) preadipocytes[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2023, 31(7):1441-1449 (in Chinese)
- [13] Guo H F, Khan R, Raza S H A, Ning Y, Wei D W, Wu S, Hosseini S M, Ullah I, Garcia M D, Zan L S. KLF15 promotes transcription of KLF3 gene in bovine adipocytes[J]. *Gene*, 2018, 659:77-83
- [14] Du M, Tong J, Zhao J, Underwood K R, Zhu M, Ford S P, Nathanielsz P W. Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals[J]. *Journal of Animal Science*, 2010, 88(suppl_13):E51-E60
- [15] Li Y, Ma Z Q, Jiang S, Hu W, Li T, Di S Y, Wang D J, Yang Y. A global perspective on FOXO1 in lipid metabolism and lipid-related diseases[J]. *Progress in Lipid Research*, 2017, 66:42-49
- [16] Chen J Y, Lu Y, Tian M Y, Huang Q R. Molecular mechanisms of FOXO1 in adipocyte differentiation[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2019, 62(3): R239-R253
- [17] Ioannilli L, Ciccarone F, Ciriolo M R. Adipose tissue and FoxO1: Bridging physiology and mechanisms[J]. *Cells*, 2020, 9(4):849
- [18] Li F, Xie W W, Fang Y, Xie K F, Liu W D, Hou L N, Tan W. HnRNP-F promotes the proliferation of bladder cancer cells mediated by PI3K/AKT/FOXO1[J]. *Journal of Cancer*, 2021, 12:281-291
- [19] Byun J W, An H Y, Yeom S D, Lee S J, Chung H Y. NDRG1 and FOXO1 regulate endothelial cell proliferation in infantile haemangioma[J]. *Experimental Dermatology*, 2018, 27(6):690-693
- [20] Chae Y C, Kim J Y, Park J W, Kim K B, Oh H, Lee K H, Seo S B. FOXO1 degradation via G9a-mediated methylation promotes cell proliferation in colon cancer[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(4):1692-1705
- [21] Wang T, Zhao H, Gao H, Zhu C M, Xu Y, Bai L P, Liu J B, Yan F. Expression and phosphorylation of FOXO1 influences cell proliferation and apoptosis in the gastrointestinal stromal tumor cell line GIST-T1[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2018, 15(4):3197-3202
- [22] Zhao Z, Zhang M, Duan X, Chen Y, Li E, Luo L, Wu W, Peng Z, Qiu H, Zeng G. TRPM7 regulates AKT/FOXO1-dependent tumor growth and is an independent prognostic indicator in renal cell carcinoma[J]. *Molecular Cancer Research*, 2018, 16(6):1013-1023
- [23] Liu L H, Zheng L D, Zou P, Brooke J, Smith C, Long Y C, Almeida F A, Liu D M, Cheng Z Y. FoxO1 antagonist suppresses autophagy and lipid droplet growth in adipocytes[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(15):2033-2041
- [24] Dong P, Mai Y, Zhang Z, Mi L, Wu G, Chu G, Yang G, Sun S. MiR-15a/b promote adipogenesis in porcine pre-adipocyte via repressing FoxO1[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2014, 46(7):565-571
- [25] 王玲. 普通牛 *FoxO1*、*FoxO3*、*FoxO4* 基因的克隆、表达及其对肉质性状的遗传效应分析[D]. 雅安: 四川农业大学
- Wang L. Cloning and expression of *FoxO1*, *FoxO3* and *FoxO4* genes in common cattle and analysis of their genetic effects on meat quality traits[D]. yaan: Sichuan Agricultural University(in Chinese)
- [26] 孙雨佳. 秦川牛 FoxO1 基因遗传变异及组织表达谱分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学,
- Sun Y J. Genetic variation and tissue expression profile analysis of FoxO1 gene in Qinchuan cattle[D]. Yangling: Northwest A & F University(in Chinese)
- [27] 宋雅萍, 雷召雄, 赵毅昂, 姜超, 王兴平, 罗仍卓么, 马云, 魏大为. 牛 FoxO1 基因 CDS 区克隆及其在脂肪细胞分化过程中的表达分析[J]. 浙江农业学报, 2023, 35(5):1016-1027
- Song Y P, Lei Z X, Zhao Y A, Jiang C, Wang X P, Luo Reng Z M, Ma Y, Wei D W. Cloning of CDS region of bovine *FoxO1* gene and analysing expression pattern during adipocyte differentiation[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2023, 35(5):1016-1027(in Chinese)
- [28] Gao S W, Liu F. Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination[J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2019, 20(6):467-475
- [29] Matson J P, Cook J G. Cell cycle proliferation decisions: The impact of single cell analyses[J]. *The FEBS Journal*, 2017, 284(3):362-375
- [30] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9(3):153-166
- [31] Hubbi M E, Semenza G L. Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2015, 309(12):C775-C782
- [32] Wood Daniel J, Endicott Jane A. Structural insights into the functional diversity of the CDK-cyclin family[J]. *Open Biology*, 2018, 8(9):180112
- [33] Choe K N, Moldovan G L. Forging ahead through darkness: PCNA, still the principal conductor at the replication fork[J]. *Molecular Cell*, 2017, 65(3):380-392
- [34] Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs W H, Arden K C, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation

- [J]. *Developmental Cell*, 2003, 4(1): 119-129
- [35] El Ouarrat D, Isaac R, Lee Y S, Oh D Y, Wollam J, Lackey D, Riopel M, Bandyopadhyay G, Seo J B, Sampath-Kumar R, Olefsky J M. TAZ is a negative regulator of PPAR γ activity in adipocytes and TAZ deletion improves insulin sensitivity and glucose tolerance [J]. *Cell Metabolism*, 2020, 31(1): 162-173. e5
- [36] Gatticchi L, Petricciuolo M, Scarpelli P, Macchioni L, Corazzi L, Roberti R. Tm7sf2 gene promotes adipocyte differentiation of mouse embryonic fibroblasts and improves insulin sensitivity [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2021, 1868(1): 118897
- [37] Bouraoui L, Cruz-García L, Gutiérrez J, Capilla E, Navarro I. Regulation of lipoprotein lipase gene expression by insulin and troglitazone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) adipocyte cells in culture [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2012, 161(1): 83-88
- [38] Wang H, Eckel R H. Lipoprotein lipase: from gene to obesity [J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2009, 297(2): E271-E288

责任编辑:秦梅



第一作者简介: 宋雅萍, 宁夏大学在读硕士研究生, 主要从事牛肌肉脂肪生成的分子机制研究。曾荣获宁夏大学研究生三等学业奖学金和一等学业奖学金各1次。主持并顺利结题宁夏大学研究生科研训练项目1项。以第一作者发表学术论文3篇(SCI论文2篇)。



通讯作者简介: 魏大为, 副教授, 博士, 宁夏大学博士生导师, 主要从事动物肌肉和脂肪发育相关候选基因筛选及目标基因转录调控和甲基化调控机制研究。目前主持国家自然科学基金项目2项, 主持宁夏重点研发、宁夏自然科学基金(重点)等省部级项目5项。授权专利并成果转化1项, 参编“十四五”规划教材1部, 完成省级科技成果登记4项, 以第一或通讯作者在国内外高质量期刊发表论文30余篇。