

过表达山羊 *ATF3* 抑制肌内前体脂肪细胞分化

王重洋^{1,2}, 罗成^{1,2}, 张浩^{1,2}, 李鑫^{1,2}, 李艳艳^{1,2}, 熊燕^{1,2}, 王友利^{1,2}, 林亚秋^{1,2}

1 西南民族大学 畜牧兽医学院, 四川 成都 610041

2 西南民族大学 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部/四川省重点实验室, 四川 成都 610041

王重洋, 罗成, 张浩, 李鑫, 李艳艳, 熊燕, 王友利, 林亚秋. 过表达山羊 *ATF3* 抑制肌内前体脂肪细胞分化. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2939-2947.

WANG CY, LUO C, ZHANG H, LI X, LI YY, XIONG Y, WANG YL, LIN YQ. Overexpression of *ATF3* inhibits the differentiation of goat intramuscular preadipocytes. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2939-2947.

摘要: 本研究旨在探究山羊转录激活因子 3 (activating transcription factor 3, *ATF3*) 对肌内前体脂肪细胞分化的影响, 并从分子水平阐明其可能作用途径。利用基因重组方法构建 pEGFP-N1-*ATF3* 过表达重组质粒, 脂质体转染肌内前体脂肪细胞, 通过油红 O 脂肪染色法从细胞形态学水平确定对分化的影响, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测脂肪细胞分化标记基因相对表达水平, 从分子水平确定对分化的影响。最终成功构建 pEGFP-N1-*ATF3* 过表达载体, 转染山羊肌内前体脂肪细胞后发现脂滴积聚被抑制, qRT-PCR 检测到脂肪细胞分化标志基因 *PPAR γ* 、*C/EBP α* 、*SREBP1* 极显著下调 ($P < 0.01$), *C/EBP β* 、*AP2* 显著下调 ($P < 0.05$), 通过 ALGGEN PROMO 程序预测 *PPAR γ* 、*C/EBP α* 和 *AP2* 的启动子区域存在 *ATF3* 结合位点。研究表明, 过表达山羊 *ATF3* 抑制肌内前体脂肪细胞脂滴积聚, 这种作用通过下调 *PPAR γ* 、*C/EBP α* 和 *AP2* 来实现, 研究结果为阐明山羊 *ATF3* 调控肌内前体脂肪细胞分化机制提供重要的基础数据。

关键词: *ATF3*; 山羊; 肌内前体脂肪细胞; 过表达; 诱导分化

Received: April 14, 2022; **Accepted:** June 7, 2022; **Published online:** June 22, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32072723, 82002817); Science and Technology Program of Sichuan Province, China (2022JDTD0030); Fundamental Research Funds for the Central Universities, Southwest Minzu University, China (2021057)

Corresponding author: LIN Yaqiu. E-mail: 22100075@swun.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (32072723, 82002817); 四川省科技计划项目 (2022JDTD0030); 中央高校基本科研业务费专项基金项目 (2021057)

Overexpression of *ATF3* inhibits the differentiation of goat intramuscular preadipocytes

WANG Chongyang^{1,2}, LUO Cheng^{1,2}, ZHANG Hao^{1,2}, LI Xin^{1,2}, LI Yanyan^{1,2}, XIONG Yan^{1,2}, WANG Youli^{1,2}, LIN Yaqiu^{1,2}

1 College of Animal & Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

2 Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Protection and Utilization, Ministry of Education/Sichuan Province, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of activating transcription factor 3 (*ATF3*) on the differentiation of intramuscular preadipocytes in goat, and to elucidate its possible action pathway at the molecular level. In this study, the recombinant plasmid of goat pEGFP-N1-*ATF3* was constructed, and the intramuscular preadipocytes were transfected with liposomes. The relative expression levels of adipocyte differentiation marker genes were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). After transfection of goat intramuscular preadipocytes with the goat pEGFP-N1-*ATF3* overexpression vector, it was found that the accumulation of lipid droplets was inhibited, and the adipocyte differentiation markers *PPAR γ* , *C/EBP α* and *SREBP1* were extremely significantly down-regulated ($P < 0.01$), while *C/EBP β* and *AP2* were significantly down-regulated ($P < 0.05$). The *ATF3* binding sites were predicted to exist in the promoter regions of *PPAR γ* , *C/EBP α* and *AP2* by the ALGGEN PROMO program. The overexpression of goat *ATF3* inhibits the accumulation of lipid droplets in intramuscular preadipocytes, and this effect may be achieved by down-regulating *PPAR γ* , *C/EBP α* and *AP2*. These results may facilitate elucidation of the regulatory mechanism of *ATF3* in regulating the differentiation of goat intramuscular preadipocytes.

Keywords: *ATF3*; goat; intramuscular preadipocytes; overexpression; induced differentiation

肌内脂肪 (intramuscular fat, IMF) 作为脂肪沉积的一种主要形式, 是影响山羊肉质的关键因素, 其含量直接影响肉质色泽、风味、嫩度及多汁性。目前大多数商品羊 IMF 含量低于理想标准, 因此从肌内脂肪入手进行研究具有重要意义。前体脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞是 IMF 生成的重要过程, 受到转录因子、基因、激素等一系列因子调控^[1]。

转录因子是指能专一性结合 DNA 特定序列, 并调节其他基因转录的蛋白质, 山羊转录激活因子 3 (activating transcription factor 3, *ATF3*) 属于

转录因子 ATF/cAMP 应答元件结合蛋白 (cAMP response element binding protein, CREB) 家族, 是一种早期反应基因, 可被多种应激诱导表达, 最初从 TPA 处理的 HeLa 细胞分离得到^[2]。*ATF3* 蛋白质通过其亮氨酸拉链结构形成同型二聚体发挥转录抑制作用, 或与其他 ATF/CREB 家族成员蛋白质形成异二聚体激活靶基因^[3-4]。*ATF3* 的生物学功能研究主要集中在肿瘤发生、细胞凋亡、能量代谢和炎症等方面^[5-6], 据报道, *ATF3* 可参与葡萄糖代谢、加强胰岛素抵抗^[7], *ATF3* 诱导剂通过抑制脂肪细胞生成、促进脂肪分解

和棕色化来减少肥胖^[8-9], 因此 *ATF3* 被认为是预防肥胖和代谢疾病的潜在靶点。2006年, Kim等^[10]首次发现, 肥胖小鼠腹部脂肪组织中 *ATF3* 增加, 并负调节脂联素基因表达, 脂联素通过自分泌促进脂质积聚和脂肪细胞分化^[11]。进一步研究发现, 敲除小鼠 *ATF3* 后, 由高脂饮食诱导的肥胖和代谢功能障碍将加重, 随后恢复 *ATF3* 表达, 上述情况消除^[12]。这些研究表明, *ATF3* 在脂肪细胞代谢和分化过程中发挥重要作用。对延边黄牛高脂肪和低脂肪组的背最长肌进行 RNA-seq 测序发现, *ATF3* 上调 (低脂肪组作对照组), 且在背最长肌中 *ATF3* mRNA 表达量与 IMF 含量显著正相关^[13], 推测 *ATF3* 可能作为肌内脂肪沉积的候选基因并参与脂肪分化的调控。

基于上述有关小鼠和牛 *ATF3* 对脂肪调控的研究进展及尚未阐明的机制问题, 本研究以 *ATF3* 为研究的切入基因, 以山羊肌内前体脂肪细胞为试验材料, 通过将构建好的过表达载体 pEGFP-N1-*ATF3* 转入细胞中经油酸诱导分化, 利用油红 O 染色法确定脂肪细胞脂滴积聚情况, qRT-PCR 技术检测脂肪细胞分化标志基因表达水平, 为阐明山羊 *ATF3* 在肌内脂肪沉积的分子调控机制奠定基础, 为山羊的分子育种提供素材。

1 材料与方法

1.1 材料

TRIzol、SYBR[®] Premix Ex Taq (2×)、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nhe* I 和 *EcoR* I 购自 TaKaRa 公司; DNA 纯化回收试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞和高纯度质粒小提中量试剂盒购自天根生化科技有限公司; 反转录试剂盒和转染试剂 Turbofect Transfection

Reagent 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; DEME/F12 培养基购自 HyClone 公司; 胰蛋白酶、胎牛血清和青链霉素购自 Gibco 公司; 油酸购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 过表达载体构建^[14]

在 NCBI 网站中查找山羊 *ATF3* 基因的 mRNA 序列 (XM_018060748.1), 以 *Nhe* I 和 *EcoR* I 作为酶切位点设计亚克隆引物 (表 1), 利用实验室早期保存的 *ATF3* 菌液作为模板, 通过亚克隆将目的片段 *ATF3* 连接至真核表达载体 pEGFP-N1 上。使用限制性内切酶 *Nhe* I 和 *EcoR* I 进行双酶切, 采用琼脂糖凝胶电泳和凝胶扫描成像进行验证 (图 1)。将构建的过表达载体转入感受态细胞 DH5 α 进行扩繁, 涂布于含卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 9 h, 挑取单克隆菌落于含抗生素的 LB 液体培养基进行培养, 以菌液为模板进行 PCR 验证后送至成都擎科生物技术有限公司测序, 使用质粒小提试剂盒提取质粒, -20 °C 保存。

1.2.2 细胞培养、pEGFP-N1-*ATF3* 转染和诱导分化

取出实验室前期液氮冻存的山羊肌内前体脂肪细胞, 在 37 °C 水浴锅中振荡快速融化进行复苏, 离心弃去冻存液, 加入含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 0.1% 青链霉素的完全培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 浓度的恒温细胞培养箱培养至 F3 代, 弃去培养基, PBS 清洗, 胰蛋白酶消化 1 min 后弃去, 加入完全培养基终止消化并接种于 12 孔板, 当细胞密度达到 90% 时进行转染, 根据试剂盒说明将 1 μ g 质粒与 4 μ L 转染试剂 (turbofect transfection reagent) 混匀, 在室温下孵育 20 min 后分别加入 12 孔板中。细胞培养箱中培养 6 h, 弃去培养液, 加入浓度为 50 μ mol/L 的油酸诱导液, 2 d 后收集细胞。

1.2.3 油红 O 脂肪染色法

使用 24 孔板培养山羊肌内前体脂肪细胞, 转染诱导, 弃去诱导液使用 PBS 清洗, 用 10% 甲醛固定 30 min, 油红 O 染色液染色 30 min 后弃去, 用 PBS 缓慢洗去残余染料, 于光学显微镜下观察山羊肌内前体脂肪细胞分化过程中脂滴积聚变化并拍照。

1.2.4 TRIzol 法提取细胞总 RNA

收集细胞并用 TRIzol 法提取总 RNA, 利用紫外分光光度计测量 OD_{260}/OD_{280} 均在 1.9–2.0, 按反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA, 稀释 5 倍, 用于 qRT-PCR。

1.2.5 qRT-PCR 检测过表达效率及相关基因表达

利用 Primer Premier 5.0 设计荧光定量 PCR 引物, 引物信息如表 1 所示。qRT-PCR 反应体系: 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 1 μL , 模板 1 μL , SYBR[®] Premix Ex Taq (2 \times) 10 μL , ddH₂O 7 μL ,

总体积为 20 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 39 个循环。选择 *UXT* 作为内参基因, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对 qRT-PCR 数据进行处理, 并使用 SPSS 软件对处理后的数据进行单因素方差分析和 Duncan 检验, $P < 0.05$ 为结果差异显著, $P < 0.01$ 为结果差异极显著, 最后通过 PRISM 软件作图, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.2.6 预测结合位点

用 ALGGEN PROMO 程序在线预测 *ATF3* 与相关基因启动子的结合关系。

2 结果与分析

2.1 pEGFP-N1-ATF3 过表达载体构建

2.1.1 酶切结果

利用 *Nhe* I 和 *Eco*R I 限制性内切酶对重组质粒进行双酶切检验, 通过琼脂糖凝胶电泳和

表 1 克隆和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 引物
Table 1 Primers for cloning and qRT-PCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>ATF3</i>	S: CTAGCTAGCGATGATGCTTCAACACCCAGG A: CCGGAATTCTCTAGCTCTGCAATGTTCCCTC	545
<i>ATF3</i>	S: AAGGAAGAGCTGAGGTTTCGC A: TCCTTCTTCTGTTTCGGCA	203
<i>C/EBPα</i>	S: CCGTGGACAAGAACAGCAAC A: AGGCGGTCATTGTCACTGGT	142
<i>PPARγ</i>	S: AAGCGTCAGGGTTCCACTATG A: GAACCTGATGGCGTTATGAGAC	197
<i>C/EBPβ</i>	S: CAAGAAGACGGTGGACAAGC A: AACAAGTTCCGACAGGGTG	204
<i>LPL</i>	S: TCCTGGAGTGACGGAATCTGT A: GACAGCCAGTCCACCACGAT	174
<i>SREBP1</i>	S: AAGTGGTGGGCCTCTCTGA A: GCAGGGGTTTCTCGGACT	127
<i>AP2</i>	S: TGAAGTCACTCCAGATGACAGG A: TGACACATTCCAGCACACAGC	143
<i>UXT</i>	S: GCAAGTGGATTTGGGCTGTAAC A: ATGGAGTCCTTGGTGAGGTTGT	180

S: sense primer; A: antisense primer; *UXT*: ubiquitously-expressed transcript gene.

凝胶扫描成像得到两条带 (图 1A), 分别为长度为 545 bp 的目的基因 *ATF3* 片段和长度约为 4.7 kb 的载体 pEGFP-N1 片段 (与长度约为 5.2 kb 的 pEGFP-N1-*ATF3* 重叠)。

2.1.2 测序结果

将重组质粒 pEGFP-N1-*ATF3* 转入感受态细胞, 在固体培养基上挑取单菌落进行扩繁, 菌液送擎科公司测序, 测序结果与目的基因序列进行比对, 结果表明, 成功构建过表达载体 pEGFP-N1-*ATF3* (图 1B)。

2.2 过表达效果

2.2.1 转染效果

细胞转染后诱导 48 h, 观察 pEGFP-N1-*ATF3* 质粒中荧光蛋白基因的表达情况, 发现两组细胞荧光蛋白皆有表达 (图 2A), 荧光强度相近 (图 2B)。

2.2.2 表达效率

收集经脂质体转染并诱导分化 2 d 的细胞,

通过 qRT-PCR 检测 *ATF3* mRNA 相对表达水平, 结果显示, 与阴性对照 (NC) 相比, *ATF3* 过表达组 (OE) *ATF3* mRNA 表达量上升 332.55 倍 ($P<0.01$) (图 2C)。

2.3 过表达山羊 *ATF3* 影响肌内脂肪细胞分化

2.3.1 形态学检测过表达 *ATF3* 对肌内前体脂肪细胞分化的影响

细胞经甲醛固定及油红 O 脂肪染色后, 于光学显微镜下观察发现, *ATF3* 过表达细胞脂滴积聚明显减少 (图 3A), 过表达组脂滴含量显著下降 ($P<0.05$) (图 3B)。

2.3.2 qRT-PCR 检测脂肪细胞分化标志基因的表达

qRT-PCR 检测发现, 脂肪细胞分化标志基因 *C/EBPα*、*PPARγ* 和 *SREBP1* 极显著下调 ($P<0.01$), *C/EBPβ* 和 *AP2* 显著下调 ($P<0.05$), *LPL* 表达水平则无显著变化 ($P>0.05$) (图 4A)。

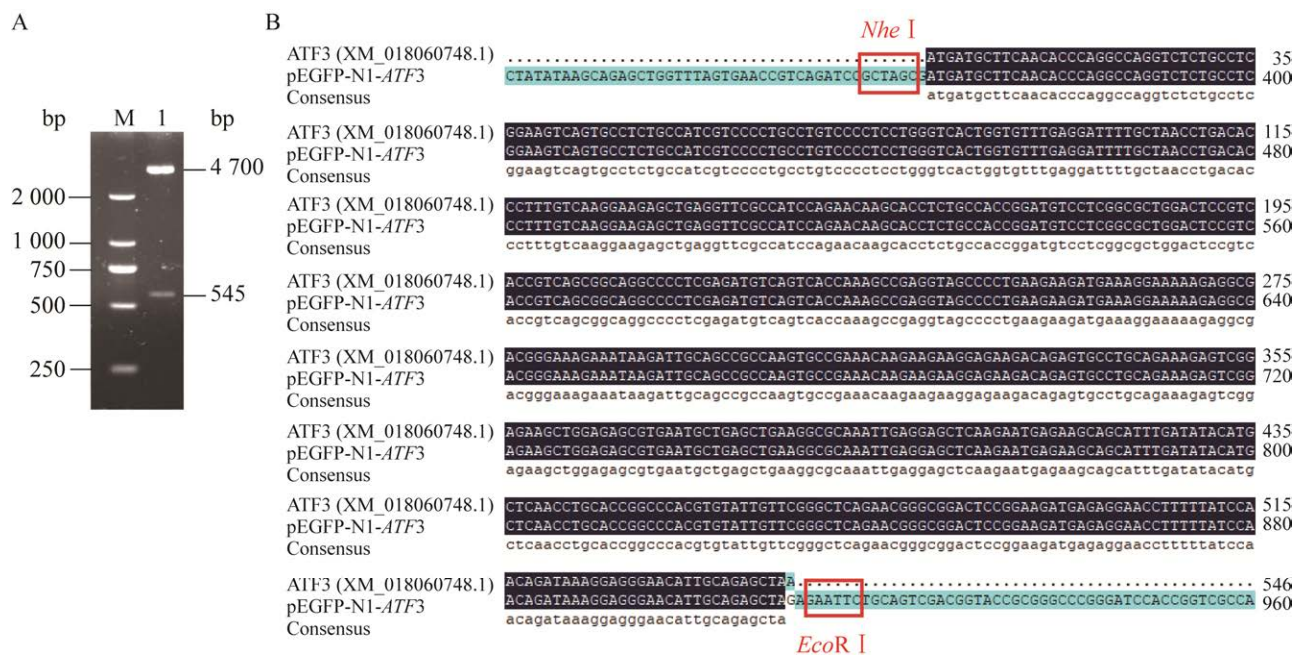


图 1 *ATF3* 过表达载体构建

Figure 1 Identification of pEGFP-N1-*ATF3*. (A) Digestion identification of pEGFP-N1-*ATF3*. M: DL2000 DNA marker; 1: pEGFP-N1-*ATF3*. (B) The result of sequence alignment.

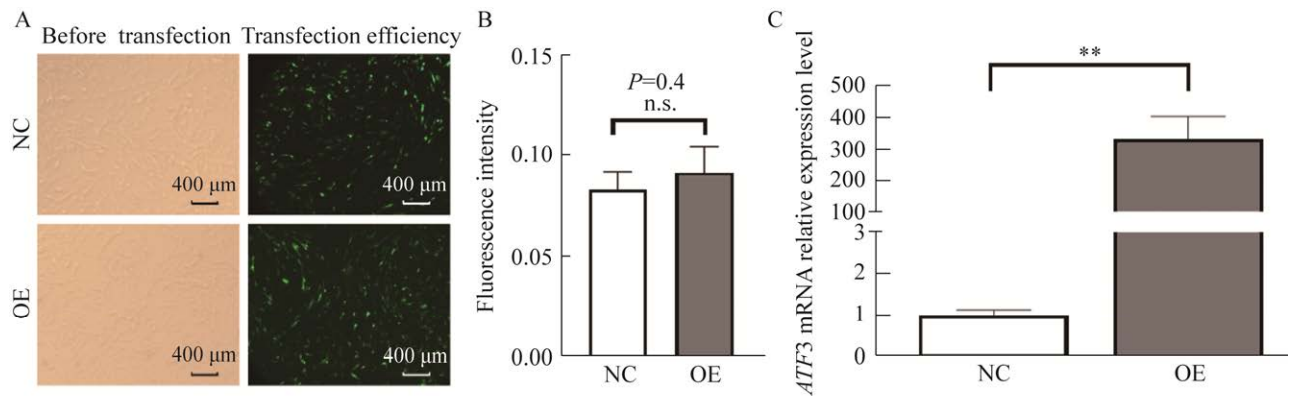


图2 山羊 *ATF3* 转染肌内前体脂肪细胞及过表达效率检测

Figure 2 Transfection of goat *ATF3* into intramuscular preadipocytes and detection of overexpression efficiency. (A) The transfection efficiency of pEGFP-N1-*ATF3* in goat intramuscular preadipocytes. (B) The determination of Fluorescence intensity. (C) *ATF3* overexpression efficiency. **: the difference between the control group and the overexpression group was extremely significant ($P<0.01$); n.s.: the difference was not significant ($P>0.05$).

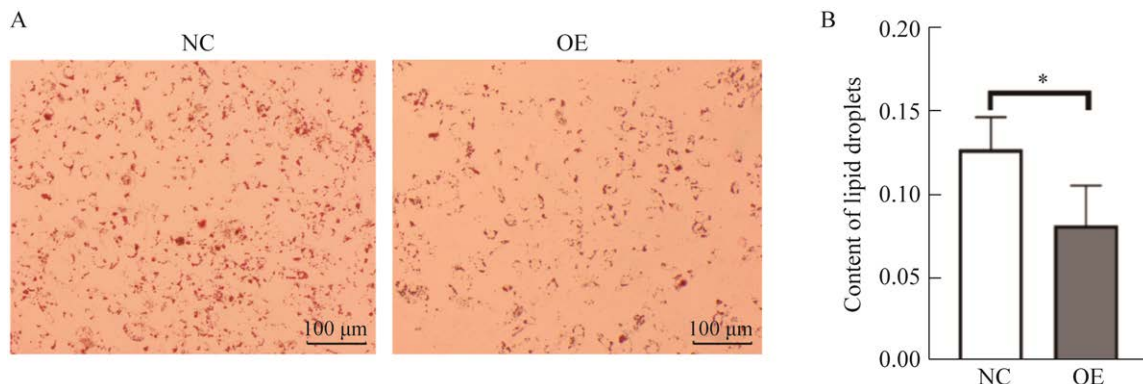


图3 过表达山羊 *ATF3* 抑制肌内前体脂肪细胞分化

Figure 3 The overexpression of goat *ATF3* inhibits intramuscular preadipocyte differentiation. (A) Morphological observation of oil red O staining. (B) Determination of lipid drop content. *: the difference between the control group and the overexpression group was significant ($P<0.05$).

2.3.3 预测 *ATF3* 与基因启动子结合位点

利用 ALGGEN PROMO 在线预测 *ATF3* 与 *CEBP/α*、*PPARγ*、*AP2* 存在多个结合位点 (图 4B)。推测 *ATF3* 形成同二聚体与 *CEBP/α*、*PPARγ*、*AP2* 启动子区域结合, 抑制靶基因表达。

3 讨论与结论

目前有关 *ATF3* 研究大多集中在人和小鼠

方面, 在畜禽方面鲜见报道, 仅见 Pang^[13]利用 RNA-seq 筛选得到 *ATF3* 为高脂肪组和低脂肪组牛背最长肌的差异基因, 但尚未阐明其功能。本研究通过转染山羊 *ATF3* 过表达载体入肌内前体脂肪细胞, 并通过形态学检测发现, 过表达组脂滴积聚减少, 表明分化过程受到抑制。为阐明产生上述现象的原因及可能的机制, 利用 qRT-PCR 检测发现, *C/EBPα*、*PPARγ*、

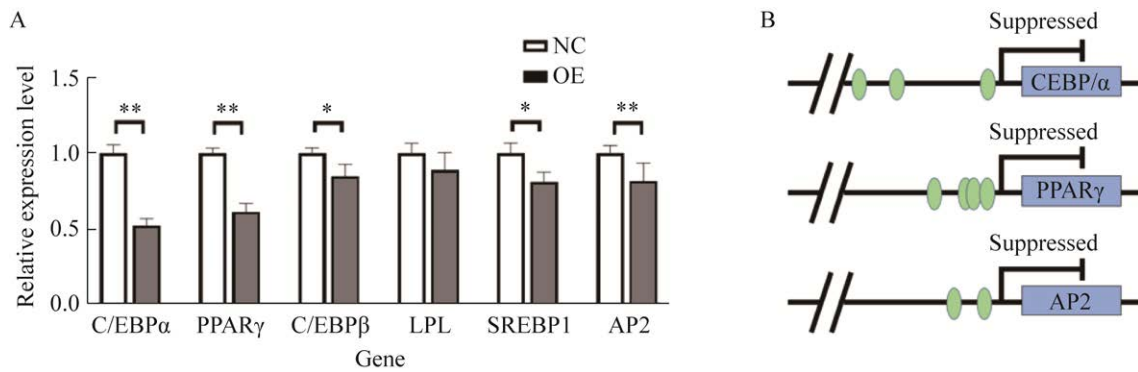


图4 脂肪分化标志基因表达水平及 *ATF3* 与基因启动子结合位点预测

Figure 4 The expression levels of differentiation marker genes and prediction of binding sites. (A) The effects of *ATF3* overexpression on the expression of adipocyte differentiation marker genes. (B) Prediction of *ATF3*-binding sites with gene promoters.

C/EBP β 、*SREBP1* 和 *AP2* 等脂肪细胞分化标志基因显著下调, 为进一步确定其可能发挥调控作用的途径, 通过 ALGGEN PROMO 在线预测发现, 山羊 *ATF3* 在 *C/EBP α* 、*PPAR γ* 和 *AP2* 启动子区域存在多个结合位点。

CCTTA 增强子结合蛋白 α (CCTTA-enhancer-binding protein α , *C/EBP α*) 和过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor γ , *PPAR γ*) 是脂肪分化过程中关键转录因子, 具有协同作用^[15]。Adams 等^[16]研究表明 *PPAR γ* 表达水平和脂肪生成在早期呈正相关变化, 小鼠胚胎缺乏 *PPAR γ* 基因则不能形成脂肪组织^[17]。Jang 等发现, *ATF3* 抑制 *PPAR γ* 表达进而调控脂肪细胞分化^[18], 此后又证实 3T3-L1 细胞中 *ATF3* 与 *C/EBP α* 启动子 (-1928 到 -1907 区域) 结合下调 *C/EBP α* 表达, 抑制脂肪细胞分化^[19]。本研究结果与之相似, 过表达 *ATF3* 后 *C/EBP α* 、*PPAR γ* 的表达受到抑制, 并根据预测结果推测, *ATF3* 可能通过结合 *C/EBP α* 、*PPAR γ* 启动子区域抑制其表达, 进而减少脂质积聚, 抑制细胞分化。

本研究还发现, *C/EBP β* 、*SREBP1*、*AP2* 表达受到抑制, 可能原因分别为 *C/EBP β* 通过调节 *C/EBP α* 和 *PPAR γ* 的启动子核心序列, 从而激活 *C/EBP α* 和 *PPAR γ* 转录, 表达启动生脂信号^[20-21]; 并且 Pan 等^[22]发现 *ATF3* 可与 *C/EBP β* 结合形成异二聚体并激活 *ATF3*, 推测过表达 *ATF3* 引起 *C/EBP β* 下调将负反馈调节自身转录, 但其中具体机制仍待进一步探究。*SREBP1* 作为重要的核转录因子, 主要调控脂肪合成和葡萄糖代谢相关酶基因的表达^[23], Ku 等^[9]发现 *ATF3* 可上调脂肪细胞分化的重要信号分子腺苷酸激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 表达, *SREBP1* 是 AMPK 下游重要负调控靶点之一^[24], 给予本文过表达 *ATF3* 抑制肌内脂肪细胞分化过程中 *SREBP1* 表达水平下降原因的可能解释, 具体仍需进一步实验对 AMPK 信号通路进行研究。脂肪型脂肪酸结合蛋白 (adipocyte fatty acid binding protein, *AP2*) 对长链脂肪酸有很强的亲和力, 是 *PPAR γ* 下游影响脂类储存和脂质代谢的靶基因^[25-26], 因此推测本研究 *AP2* 的下调可能与 *PPAR γ* 被抑

制有关。值得注意的是,最新的研究证实 *ATF3* 下调 *AP2* 还存在另外一种调节方式,*ATF3* 通过与 *PPAR γ* 相互作用,阻断 *PPAR γ* 结合靶基因启动子上的 PPRE,抑制 *AP2* 转录^[27]。此外我们预测到 *ATF3* 可与 *AP2* 启动子区域结合,但需要进一步通过双荧光素酶报告基因检测系统确认 *ATF3* 与 *AP2* 是否具有靶向关系。

本研究通过脂质体将 pEGFP-N1-*ATF3* 过表达载体转染到羊的肌内前体脂肪细胞中并诱导其分化,发现过表达山羊 *ATF3* 基因显著抑制肌内前体脂肪细胞脂滴的积聚,并且这种作用可能是通过下调脂肪细胞分化标志基因 *CEBP α* 、*PPAR γ* 和 *AP2* 的表达实现的。

REFERENCES

- [1] Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2005, 40(4): 229-242.
- [2] Hai T, Hartman MG. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene*, 2001, 273(1): 1-11.
- [3] Liang G, Wolfgang CD, Chen BP, et al. *ATF3* gene. Genomic organization, promoter, and regulation. *J Biol Chem*, 1996, 271(3): 1695-1701.
- [4] Chen BP, Liang G, Whelan J, et al. *ATF3* and *ATF3* delta Zip. Transcriptional repression *versus* activation by alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem*, 1994, 269(22): 15819-15826.
- [5] Lee YS, Sasaki T, Kobayashi M, et al. Hypothalamic *ATF3* is involved in regulating glucose and energy metabolism in mice. *Diabetologia*, 2013, 56(6): 1383-1393.
- [6] Ku HC, Cheng CF. Master regulator activating transcription factor 3 (*ATF3*) in metabolic homeostasis and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11(556): 1-16.
- [7] Kalfon R, Koren L, Aviram S, et al. *ATF3* expression in cardiomyocytes preserves homeostasis in the heart and controls peripheral glucose tolerance. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(2): 134-146.
- [8] Kim S, Song NJ, Bahn G, et al. *Atf3* induction is a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(4): 903-908.
- [9] Ku HC, Chan TY, Chung JF, et al. The *ATF3* inducer protects against diet-induced obesity *via* suppressing adipocyte adipogenesis and promoting lipolysis and browning. *Biomed Pharmacother*, 2022, 145: 112440.
- [10] Kim HB, Kong M, Kim TM, et al. *NFATc4* and *ATF3* negatively regulate adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*, 2006, 55(5): 1342-1352.
- [11] Fu YC, Luo NL, Klein RL, et al. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res*, 2005, 46(7): 1369-1379.
- [12] Cheng CF, Ku HC, Cheng JJ, et al. Adipocyte browning and resistance to obesity in mice is induced by expression of *ATF3*. *Commun Biol*, 2019, 2: 389.
- [13] 庞喆. 基于 RNA-seq 延边黄牛肌内脂肪候选基因的筛选与表达分析[D]. 延吉: 延边大学, 2018. Pang Z. Screening and expression analysis of intramuscular fat candidate genes in Yanbian yellow cattle based on RNA-seq[D]. Yanji: Yanbian University, 2018 (in Chinese).
- [14] Wang T, Liao TA, Zhong SB. Transfection of bone marrow mesenchymal stem cells using green fluorescence protein labeled hVEGF165 recombinant plasmid mediated by liposome. *Asian Pac J Trop Med*, 2013, 6(9): 739-742.
- [15] Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*, 2000, 130(12): 3122S-3126S.
- [16] Adams M, Montague CT, Prins JB, et al. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest*, 1997, 100(12): 3149-3153.
- [17] Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. *PPAR* gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell*, 1999, 4(4): 611-617.
- [18] Jang MK, Jung MH. *ATF3* represses *PPAR γ* expression and inhibits adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 454(1): 58-64.
- [19] Jang MK, Kim CH, Seong JK, et al. *ATF3* inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 421(1): 38-43.
- [20] De-Sá PM, Richard AJ, Hang H, et al. Transcriptional

- regulation of adipogenesis. *Compr Physiol*, 2017, 7(2): 635-674.
- [21] Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 1998, 273(46): 30057-30060.
- [22] Pan YX, Chen H, Thiaville MM, et al. Activation of the *ATF3* gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem J*, 2007, 401(1): 299-307.
- [23] Kim JB, Wright HM, Wright M, et al. *ADD1/SREBP₁* activates *PPAR_γ* through the production of endogenous ligand. *PNAS*, 1998, 95(8): 4333-4337.
- [24] Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 2001, 108(8): 1167-1174.
- [25] Tuncman G, Erbay E, Hom X, et al. A genetic variant at the fatty acid-binding protein *aP2* locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *PNAS*, 2006, 103(18): 6970-6975.
- [26] Hertzler AV, Bernlohr DA. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab*, 2000, 11(5): 175-180.
- [27] Jang MK, Jung MH. *ATF₃* inhibits *PPAR_γ*-stimulated transactivation in adipocyte cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(1): 80-85.

(本文责编 陈宏宇)