

激活 HH 信号通路抑制猪 ADSCs 向脂肪细胞的分化

范彩云 张运海 王菊花 王尚 朱飞 赵男 程建波*

(安徽农业大学 动物科技学院,合肥 230036)

摘要 为探讨 HH 信号通路在脂肪细胞分化过程中的作用机制,以猪脂肪间充质干细胞(ADSCs)为材料,应用油红 O 染色法检测 ADSCs 成脂分化过程中的形态变化;采用荧光定量 PCR 及 Western Blot 的方法检测 HH 通路 *Gli1* 及脂肪细胞分化转录因子的时序表达。通过嘌呤衍生物 2,6,9-三元取代嘌呤(Purmorphamine, PM)激活猪 ADSCs 细胞中 HH 信号通路,探讨体外激活 HH 信号通路对猪 ADSCs 向脂肪细胞分化的作用及其机制。结果显示,在成脂诱导分化的过程中,经 5 $\mu\text{mol/mL}$ 的 PM 持续处理,细胞中 *Gli1* 的 mRNA 及蛋白表达量增加;猪 ADSCs 向脂肪细胞分化的数目减少、细胞内甘油三酯含量降低;脂肪细胞分化关键转录因子 *C/EBP α* 和 *PPAR γ* 的表达受到抑制。以上结果表明,激活 HH 信号通路可通过下调 *PPAR γ* 和 *C/EBP α* 的表达抑制猪 ADSCs 向脂肪细胞的分化。

关键词 猪;HH 信号通路;2,6,9-三元取代嘌呤;脂肪间充质干细胞;成脂分化

中图分类号 S 813.3

文章编号 1007-4333(2016)06-0075-07

文献标志码 A

Activation of HH signaling pathway inhibits the adipogenic differentiation of porcine adipose-derived mesenchymal stem cells

FAN Cai-yun, ZHANG Yun-hai, WANG Ju-hua, WANG Shang,
ZHU Fei, ZHAO Nan, CHENG Jian-bo*

(College of Animal Sciences and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract To investigate the effects and molecular mechanisms of HH signaling pathway in the adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs), porcine ADSCs was established and the HH signaling pathway was activated with continuous treatment by purmorphamine. The adipogenic differentiation of ADSCs was analyzed by oil red O staining. The expression of *Gli1* and adipogenic transcription factors was checked by Real-time PCR and Western blot. The results showed that: HH signaling pathway was activated by continuous treatment with 5 $\mu\text{mol/mL}$ purmorphamine (PM); The expression level of *Gli1* mRNA and protein was increased; The number of adipocytes and the content of triglyceride were decreased during adipogenic induction differentiation of porcine ADSCs; In addition, CCAAT/enhancer-binding protein- α (*C/EBP α*) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (*PPAR γ*), the adipogenic transcription factors, were repressed by PM. The result indicated that the activation of HH signaling pathway inhibits the adipogenic differentiation of porcine ADSCs, and its inhibition may be due to reducing the expression of *C/EBP α* and *PPAR γ* .

Keywords pig; HH signaling pathway; purmorphamine; ADSCs; adipogenic differentiation

白色脂肪组织是机体主要的能量贮存器官和重要的内分泌器官,其在不同部位的沉积程度直接影

响家畜胴体品质,而脂肪细胞的分化是决定脂肪沉积数量的重要因素之一。脂肪细胞的分化起始于多

收稿日期: 2015-09-02

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(KJ2013A115); 国家教育部博士点基金(新师类)(20133418120002); 农业部科技 948 项目(2014-Z3)

第一作者: 范彩云, 讲师, 主要从事动物细胞分子遗传学研究, E-mail: fancaiyunmgbt@163.com

通讯作者: 程建波, 副教授, 主要从事反刍动物营养研究, E-mail: chengjiangbofcy@163.com

潜能间充质干细胞,而终止于成熟脂肪细胞。脂肪细胞在形成过程中发生的形态学上的变化是细胞在分化过程中特定基因诱导表达的结果^[1]。目前多个脂肪细胞分化转录因子和转录辅助因子已被发现,其中调节脂肪细胞分化的关键转录因子是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)和 CCAAT 增强子结合蛋白 α (C/EBP α)^[2]。几乎所有的脂肪细胞特异基因在终末分化过程中都受到这 2 个转录激活因子的调控,而多个信号通路参与了其上游脂肪细胞发育的过程^[3]。Hedgehog-Gli(简称 Hh-Gli 或 HH)信号通路是近年来发现的在脂肪组织发育和脂肪细胞分化过程中发挥重要作用的信号通路之一,是由细胞外的信号分子 Hedgehog(Hh)、细胞膜上的受体 Patched(Ptch)和 Smoothed (Smo)以及细胞内部的转录因子 Gli (Glioma-associated oncogene homolog)组成^[4-5]。Smo 是 HH 信号通路的关键因子,无胞外信号分子时,Smo 通过与 Ptch 结合而处于失活状态,阻止 HH 信号的传递;当信号分子出现时,Ptch 与信号分子结合而释放 Smo,随之启动胞内信号的传递,激活下游转录因子 Gli,最终启动靶基因的表达^[6-7]。Gli1 既是 HH 信号通路的转录因子也是靶基因,其活性是该信号通路激活的可靠标志^[8]。嘌呤衍生物 2,6,9-三元取代嘌呤(Purmorphamine, PM)是 HH 信号通路的特异性激活剂,通过直接与膜受体 Smo 结合而导致其空间构象发生改变,进而激活 HH 信号通路启动下游转录因子 Gli 的表达,并发挥其生物学功能^[8]。已有研究表明,激活 HH 信号通路能抑制鼠和人间充质干细胞分化为脂肪细胞,但其作用过程存在差异。激活鼠多能干细胞的 HH 信号通路主要是通过影响其早期定向分化阶段而抑制其分化为脂肪细胞;激活人间充质干细胞的 HH 信号通路是通过影响其脂肪细胞的成熟进而影响其分化^[9-11]。由此可见,HH 信号通路对脂肪细胞分化的作用存在种属特异性。

猪是研究脂肪沉积机制较为理想的动物模型^[12]。目前,尽管已经开展了一些有关基因和信号通路调控猪脂肪细胞分化的研究工作^[13-18],但关于 HH 信号通路在猪脂肪间充质干细胞(Adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)向脂肪细胞分化过程中的作用机制研究尚未见报道。且目前关于猪体外脂肪沉积机制的研究大多以前体脂肪细胞为模型,而以脂肪间充质干细胞为模型的类似研

究相对较少。因此,本研究以猪 ADSCs 细胞为研究对象,利用 HH 信号通路特异性激活剂 PM 持续处理细胞,在稳定激活 HH 信号通路的情况下,研究 HH 信号通路在猪 ADSCs 向脂肪细胞分化过程中的作用机制,旨在为进一步揭示 HH 信号通路在调节脂肪沉积及脂肪发育过程中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验对象

实验室冻存的 ADSCs 细胞,来源于 28 日龄健康的雌性长白仔猪颈部皮下脂肪组织^[19]。

1.1.2 试验试剂

DMEM/F12 培养液、胰蛋白酶、胎牛血清购自 GIBICO 公司(美国);Purmorphamine 购自美国 Selleck 公司;胰岛素(Insulin, INS)、地塞米松(Dexamethason, DEX)、罗格列酮(Rosiglitazone, RSG)、异丁基甲基黄嘌呤(3-Isobutyl-1-methylxanthin, IBMX)、青-链霉素双抗(Penicillin-Streptomycin)和油红 O 均购自 Sigma 公司(美国);Gli1 抗体、 β -actin 和羊抗鼠多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司;RNA 提取试剂盒购自 Omega 公司(瑞士);PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TliRNaseH Plus)试剂盒均购自 Takara 公司(日本);引物由上海生物工程技术有限公司合成,序列见表 1;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养液的配制

完全培养液:10%胎牛血清+90%DMEM/F12。

维持培养液:2%胎牛血清+100 IU/mL 双抗+DMEM/F12+0.5 mmol/L INS。

诱导培养液:1 μ mol/L DEX+5 mg/L INS+0.5 mmol/L IBMX+11 μ mol/L、11 μ mol/L RSG+100 IU/mL 双抗+DMEM/F12。

1.2 试验方法

1.2.1 猪 ADSCs 细胞的复苏及传代培养

将存有原代 ADSCs 细胞的冷冻管迅速由液氮转入到 37 $^{\circ}$ C 水浴中,不定时搅拌加速解冻。将解冻后细胞,1 200 r/min,离心 3 min,弃上清,加入 37 $^{\circ}$ C 预平衡的 10% FBS DMEM/F12 完全培养液,用吸管吹打均匀,细胞悬液移入 6 cm 培养皿中,

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time PCR

基因 Gene	上游(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游(5'-3') Reverse primer(5'-3')
<i>Gli1</i>	GAAGTCTGAGCTGGATGTGCTGGTG	CATGGATGTGTTTCGCTGTTGATGTG
<i>C/EBPα</i>	ACGCAGCCTTACGGAACT	TTGTTTAGTTGGGATTTGCT ^[16]
<i>PPARγ</i>	TGACCCAGAAAGCGATGC	CCTGATGGCGTCGTTATGAGACA ^[16]
<i>βactin</i>	ACTGCCGCATCCTCTTCCTC	CTCCTGCTTGCTGATCCACATC

每 2~3 d 换一次液,待细胞长到 80% 汇合时,经胰酶消化,按 2×10^5 /孔的密度接种于 6 孔培养板中,37 °C、5% CO₂ 条件下培养。每 2~3 d 更换上述完全培养液一次。

1.2.2 PM 激活剂处理细胞

待 6 孔板中猪 ADSCs 细胞生长至汇合后 3 d,用含 5 μ mol/mL PM 的成脂诱导液继续培养,3 d 后置于含 5 μ mol/mL PM 的维持培养液中培养,24 h 后再换成成脂诱导液培养,重复 3~5 次后,置于含 5 μ mol/mL PM 的维持培养液中维持培养 7 d,每 3 d 换液 1 次。对照组细胞为不含 PM 的正常诱导组。收集诱导分化 0、2、4、8、12 和 16 d 的细胞,置 -80 °C 备用。

1.2.3 油红 O 染色化学比色试验

取诱导分化 16 d 的 6 孔板培养细胞,将培养基吸掉后用 PBS 洗涤 2~3 次,加入 1 000 μ L 的 10% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 2 次,加入 0.5% 油红 O 避光染色 30 min 后, PBS 洗涤 3 次,置显微镜下观察。每孔加 2 000 μ L 的 100% 异丙醇,振荡萃取 10 min,利用紫外分光光度计测各孔光密度值(OD)。

1.2.4 RNA 的提取

严格按照 Omega 公司 RNA 提取试剂盒说明书步骤和条件提取诱导分化 0、2、4、8、12 和 16 d 的细胞总 RNA,测定其吸光度。并进行琼脂糖凝胶电泳,检测所提取的 RNA 完整性。将 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 值为 1.8~2.1 且电泳检测无明显降解的 RNA 置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2.5 反转录

根据 Takara 公司的反转录试剂盒说明书进行反转录,取 500 ng RNA,2 μ L 5 \times g DNA Eraser Buffer,1 μ L DNA Eraser,加 DEPC 处理过的 H₂O 至 10 μ L,42 °C,2 min;然后加入 4 μ L 5 \times primerscript

buffer,1 μ L primerscript RT Enzymix,RT primer Mix,加 DEPC 处理过的 H₂O 至 20 μ L。接着 37 °C 15 min,85 °C 反应 5 s,停止反应,冰上冷却。合成的 cDNA 置 -20 °C 保存。

1.2.6 实时荧光定量

将上述合成的 cDNA 产物作浓度梯度稀释后利用 StepOnePlus™ 型荧光定量 PCR 仪进行定量分析。以 *β actin* 作为内参,检测 *Gli1* 基因及转录因子 *C/EBP α* 和 *PPAR γ* 基因的表达。按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒(TaKaRa 公司)推荐的体系进行试验。荧光定量 PCR 扩增体系:10 μ L SYBR® Premix Ex Taq™ (TliRNaseH Plus)、10 μ mol/L 上游引物 0.8 μ L、10 μ mol/L、下游引物 0.8 μ L ddH₂O 6 μ L、cDNA 模板 2 μ L、ROX Reference Dye 0.4 μ L,加 H₂O 至 20 μ L,混合样品,不能使其产生气泡。反应条件:第 1 步,95 °C 30 s;第 2 步,95 °C 5 s,60 °C 30 s,循环 40 次;之后 95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s。阴性对照用 2 μ L 灭菌水代替模板。每个样品做 3 管平行样。

1.2.7 Western Blot

收集诱导分化不同时期的细胞,用细胞裂解液进行裂解并提取蛋白,检测蛋白的含量。之后 100 °C 变性 10 min,取 50 μ g 蛋白经 10% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离后,转移到硝酸纤维膜上。利用脱脂奶粉在室温条件下封闭 1 h,之后在室温下用一抗孵育 2 h,同样在二抗中孵育 2 h 后,使用化学发光法 X 光胶片感光检测 Gli1 蛋白在不同分化时期的表达。

1.3 统计分析

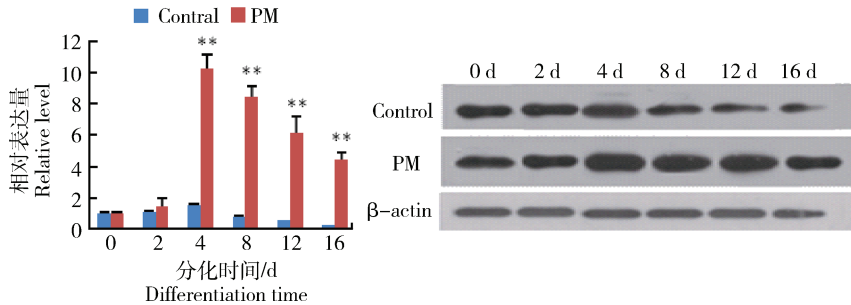
每组 ADSCs 细胞都来自同一头猪,每组试验均重复 3 次,试验的每个处理重复 3 次。荧光定量 PCR 结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算相对表达量(Livak,2001),所有数据采用 SPSS 16.0 软件 *t* 检

验进行差异显著性分析。

2 试验结果

2.1 PM处理后 *Gli1* 的 mRNA 及蛋白表达

取 PM 处理 0、2、4、8、12 和 16 d 的细胞,经荧光



** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

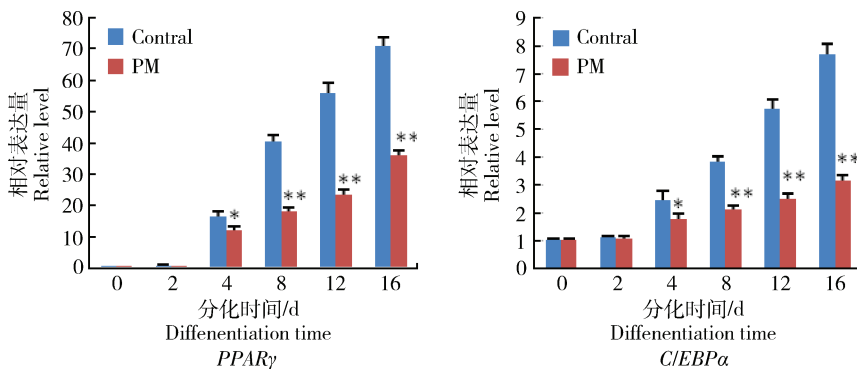
** indicatessignificantly differentat $P < 0.01$.

图 1 PM 处理后 *Gli1* 的 mRNA 及蛋白表达

Fig. 1 mRNA and protein expression of *Gli1* after PM treatment

2.2 PM 处理过程中 *PPARγ* 和 *C/EBPα* 的 mRNA 表达下降

在成脂诱导分化过程中,利用荧光定量 PCR 检



* 表示差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Significant levels are: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

图 2 PM 处理后 *PPARγ* 和 *C/EBPα* 的 mRNA 表达

Fig. 2 mRNA expression of *PPARγ* and *C/EBPα* after PM treatment

2.3 激活 HH 信号通路抑制 ADSCs 向脂肪细胞的分化

PM 处理 16 d 后,用油红 O 染色法和油红 O 染色提取法检测脂肪细胞分化情况。结果表明,经 PM 持续处理后,脂肪细胞数目明显减少,且与对照组相比脂滴也明显变小(图 3),脂肪含量极显著降低 ($P < 0.01$)(图 4),说明 PM 在猪 ADSCs 向脂肪细胞分化的过程中起到了抑制作用。

定量 PCR 及 Western Blot 检测 *Gli1* 的 mRNA 及蛋白表达情况。结果发现,PM 处理 4 d 后 *Gli1* 蛋白表达量明显增加,*Gli1* 的 mRNA 表达量也在处理 48 h 后增加,在第 4 天时达到最大值,随后逐渐下降(图 1)。表明 PM 处理第 4 天后开始发挥明显作用。

测了脂肪细胞转录因子 *PPARγ* 和 *C/EBPα* 的表达。结果显示,PM 处理 4 d 后,*PPARγ* 和 *C/EBPα* 的 mRNA 表达均显著下降(图 2)。

3 讨论

1)成熟的脂肪细胞起始于多潜能干细胞,而后经定向成脂后形成前体脂肪细胞,终止于成熟脂肪细胞。而多潜能干细胞向前体脂肪细胞的定向分化也是成脂分化的关键起始步骤。多潜能干细胞与前体脂肪细胞相比具有获取量大、含量高、体外增殖速率高等优点。因此本研究以猪 ADSCs 为研究对象,

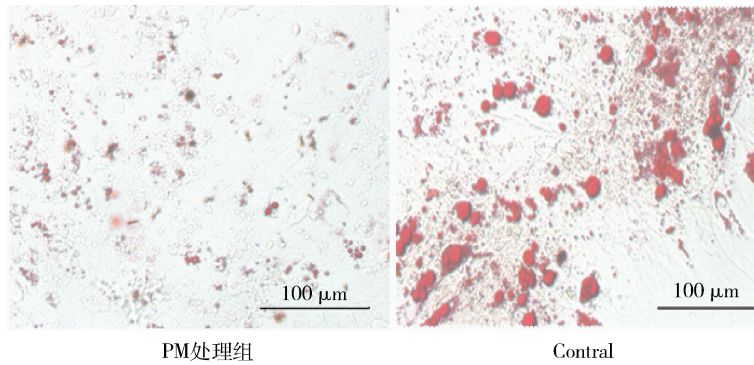
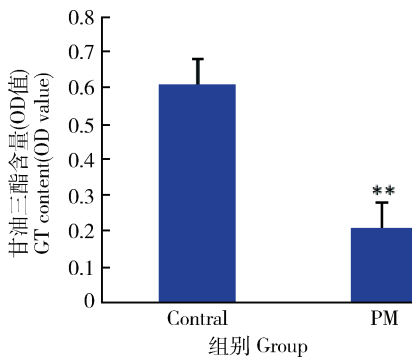


图 3 成脂分化 16 d 后细胞内的脂滴 (200×)

Fig. 3 Fat droplets in cells after 16 days of the adipogenic differentiation (200×)



** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

** indicatessignificantly different at $P < 0.01$.

图 4 成脂分化 16 d 后细胞甘油三酯含量

Fig. 4 TG content in cells after 16 days of the adipogenic differentiation

利用 PM 激活 HH 信号通路后,猪 ADSCs 向脂肪细胞分化的能力受到抑制。这与人和鼠等动物的研究结果相一致^[9-11]。

2) 目前关于脂肪细胞分化转录水平的级联反应已有了比较清楚的研究,阐明了多个转录因子的功能及其作用机制。其中 $PPAR\gamma$ 和 $C/EBP\alpha$ 对脂肪细胞的分化起到了决定性的作用,是脂肪组织生长发育的重要因子,且 $PPAR\gamma$ 位于 $C/EBP\alpha$ 的上游,两者是通过相互激活转录并协同作用,进而触发脂肪细胞的最终分化^[1-2,20]。HH 信号通路是位于转录因子 $PPAR\gamma$ 上游的重要通路之一。研究表明,HH 信号通路主要成员在动物脂肪组织和细胞中均有表达,且通过对果蝇和线虫等模式动物的 SHH 转基因发现,该通路可抑制脂肪的沉积,此后在小鼠体内也得到了证实^[21-24]。研究发现,经 SHH 蛋白处理鼠间充质干细胞后,促进其成骨分化而抑制其

向脂肪细胞的分化,且脂肪细胞分化的重要转录因子 $PPAR\gamma$ 和 $C/EBP\alpha$ 等表达水平显著降低^[25]。此外,通过激活剂 PM 处理或过表达 SMO 均能激活 HH 信号通路,并通过下调脂肪细胞分化关键转录因子 $PPAR\gamma$ 和 $C/EBP\alpha$ 的表达而抑制鼠间充质干细胞或前体脂肪细胞的分化^[21]。但 HH 信号通路在不同物种脂肪细胞生长发育过程中的作用存在差异。激活鼠多能干细胞的 HH 信号通路主要影响其早期分化,而对于人多潜能干细胞的成脂分化过程主要影响其成熟阶段^[9-11]。关于 HH 信号通路在家畜当中的研究相对较少。滑留帅等^[26]研究表明,牛 SHH 能够在早期通过 $PPAR\gamma$ 通路调控前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞的分化。张瑾等^[27]研究发现, $Gli1$ 基因在脂肪组织中的表达随出生后仔猪日龄的增加而降低,表明 HH 信号通路可能也参与了猪脂肪组织的发育过程。

3) 在本研究中,通过 PM 处理猪 ADSCs 细胞 4d 后,HH 信号通路的转录因子 $Gli1$ 基因和蛋白表达极显著的升高,表明 HH 信号通路被激动剂 PM 稳定激活。因为 $Gli1$ 是 HH 信号通路的主要激活标志,不仅可以激活下游基因的表达,而且该基因本身也是靶基因之一^[28-29]。而 $PPAR\gamma$ 和 $C/EBP\alpha$ 是调节脂肪细胞分化的关键转录因子,经激活剂处理 4 d 后,其表达呈显著下降趋势,与经油红 O 染色所观察的细胞形态变化规律相一致,表明 HH 信号通路抑制猪 ADSCs 的成脂分化。此外,通过该信号通路的关键转录因子 $Gli1$ 基因的表达趋势可以看出,HH 信号通路的活性在第 4 天被全面启动,结合诱导成脂分化过程中细胞形态的变化,推测 ADSCs 被成脂诱导第 4 天可能是前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化的起始阶段。因此,HH 信

号通路可能主要对其后期的成熟阶段及前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞的分化阶段发挥作用,而对ADSCs的早期定向成脂阶段没有影响,这与人和牛的研究结果较为相似^[11,26]。HH信号通路是通过抑制PPAR γ 和C/EBP α 的活性而抑制猪ADSCs的成脂分化的,而且主要影响脂肪细胞的成熟,而对ADSCs的定向分化阶段没有影响。但关于HH信号通路与PPAR γ 和C/EBP α 间的具体作用方式还有待进一步研究。

4 结 论

激活HH信号通路可通过下调PPAR γ 和C/EBP α 的表达抑制猪ADSCs向脂肪细胞的分化。

参 考 文 献

- [1] Rosen E D, Walkey C J, Puigserver P, Spiegelman B M. Transcriptional regulation of adipogenesis [J]. *Genes & Development*, 2000, 8(14): 1293-1307
- [2] Rosen E D, Macdougald O A. Adipocyte differentiation from the inside out [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(12): 885-896
- [3] Muruganandan S, Roman A A, Sinal C J. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells; Cross talk with the osteoblastogenic program [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66(2): 236-253
- [4] Zhang Y, Mao F, Lu Y, Wu W, Zhang L, Zhao Y. Transduction of the Hedgehog signal through the dimerization of Fused and the nuclear translocation of Cubitus interruptus [J]. *Cell Research*, 2011, 21(10): 1436-1451
- [5] Cousin W, Fontaine C, Dani C, Peraldi P. Hedgehog and adipogenesis: Fat and fiction [J]. *Biochimie*, 2007, 89: 1447-1453
- [6] McMahon A P, Ingham P W, Tabin C J. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling [J]. *Current topics in Developmental Biology*, 2003, 53(8): 111-114
- [7] Ahn S, Joyner A L. *In vivo* analysis of quiescent adult neural stem cells responding to sonic hedgehog [J]. *Nature*, 2005, 437(7060): 894-897
- [8] Sinha S, Chen J K. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened [J]. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2(1): 29-30
- [9] James A W, Leucht P, Levi B, Carre A L, Xu Y, Helms J A, Longaker M T. Sonic Hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells [J]. *Tissue Engineering Part A*, 2010, 16(8): 2605-2616
- [10] Cousin W, Dani C, Peraldi P. Inhibition of the anti-adipogenic Hedgehog signaling pathway by cyclopamine does not trigger adipocyte differentiation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2006, 349(2): 799-803
- [11] Fontaine C, Cousin W, Plaisant M, Dani C, Peraldi P. Hedgehog signaling alters adipocyte maturation of human mesenchymal stem cell [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(4): 1037-1046
- [12] Yang G S, Zhang H W, Bai L. Pig-aideal study animal model of obesity and diabetes [J]. *Progress in natural science*, 2008, 18(5): 481-487
- [13] Ding S T, McNeel R L, Mersmann H J. Expression of porcine adipocyte transcripts: tissue distribution and differentiation in vitro and in vivo [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 1999, 123: 307-318
- [14] McNeel R L, Ding S T, Smith E O, Mersmann H J. Expression of porcine adipocyte transcripts during differentiation in vitro and in vivo [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 2000, 126: 291-302
- [15] 张罕星, 朱晓彤, 束刚, 高萍, 高淑静, 张常明, 江青艳, 陈瑶生. 猪脂肪前体细胞分化过程中聚脂相关基因的表达模式 [J]. *动物学报*, 2007, 53: 143-150
- Zhang H X, Zhu X T, Shu G, Gao P, Gao S J, Zhang C M, Jiang Q Y, Cheng Y S. Expression profile of the genes involved in adipogenesis during porcine preadipocyte differentiation [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2007, 53(1): 143-150 (in Chinese)
- [16] 李惠侠. Wnt/ β -catenin 信号通路在猪 ADSCs 向脂肪细胞分化中的作用及机理研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008
- Li H X. Roles of Wnt/ β -catenin signaling in adipogenic differentiation of porcine adipose-derived mesenchymal stem cells [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2008 (in Chinese)
- [17] 刘炳婷. Sirt2 在猪前体脂肪细胞分化中的作用及其机理研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010
- Liu B T. Effects and molecular mechanism of sirt2 during porcine preadipocytes differentiation [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2010 (in Chinese)
- [18] 贾夏丽, 潘洋洋, 乔利英, 郭云雁, 胡子乔, 张方, 李宝钧, 刘文忠. 脂肪分化相关信号通路及 microRNA 调节研究进展 [J]. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(4): 518-525
- Jia X L, Pan Y Y, Qiao L Y, Guo Y Y, Hu Z Q, Zhang F, Li B J, Liu W Z. Research progress in signaling pathway and microRNA regulation of adipocyte differentiation [J]. *Acta Veterinariae Zootechnica Sinica*, 2015, 46(4): 518-525 (in Chinese)
- [19] Zhang Y, Wei C, Zhang P F, Li X, Liu T, Pu Y, Li Y S, Cao Z B, Cao H G, Liu Y, Zhang X R, Zhang Y H. Efficient reprogramming of Naive-like induced pluripotent stem cells from porcine Adipose-derived stem cells with a Feeder-independent and Serum-free system [J]. *PLoS One*, 2013, 9(1): e85089. doi:10.1371
- [20] Adoligbe C, Huangfu Y F, Zan L S, Wang H. C/EBP α gene as a genetic marker for beef quality improvement [J]. *Genetics and*

- Molecular Research*, 2015, 14(3): 9370-9383
- [21] Suh J M, Gao X, McKay J, McKay R, Salo Z, Graff J M. Hedgehog signaling plays a conserved role in inhibition fat formation[J]. *Cell Metabolism*, 2006, 3(1): 25-34
- [22] Pospisilik J A, Schramek D, Schnidar H, Cronin S J, Nehme N T, Zhang X. Drosophila genome-wide obesity reveals hedgehog as determinant of brown versus white adipose cell fate[J]. *Cell*, 2010, 140(1): 148-160
- [23] Li Z, Zhang H, Denhard L A, Liu L H, Zhou H X, Lan Z J. Reduced white fat mass in adult mice bearing a truncated Patched1[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2008, 4(1): 29-36
- [24] Buhman K K, Wang L C, Tang Y, Swietlicki E A, Kennedy S, Xie Y, Liu Z Y, Burkly L C, Levin M S, Rubin D C, Davidson N O. Inhibition of hedgehog signaling protects adult mice from diet-induced weight gain[J]. *Journal of Nutrition*, 2004, 34(11): 2979-2984
- [25] Spinella-Jaegle S, Rawadi G, Kawai S, Gallea S, Faucheu C, Mollat P, Courtois B, Bergaud B, Ramez V, Blanchet A M, Adelmant G, Baron R, Roman-Roman S. Sonic hedgehog increases the commitment of pluripotent mesenchymal cells into the osteoblastic lineage and abolishes adipocytic differentiation[J]. *Journal of Cell Science*, 2001, 114(11): 2085-2094
- [26] 滑溜帅. 牛 SHH 基因通过 PPAR γ 通路调控脂肪生成[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012
- Hua L S. Cattle SHH gene regulating adipogenesis through PPAR γ pathway[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012(in Chinese)
- [27] 林佳丽, 沈良才, 潘登科, 张瑾. 猪 Gli1 基因的克隆、表达谱分析及脂肪组织特异性表达载体的构建[J]. *遗传*, 2012, 34(10): 1291-1297
- Lin J L, Shen L C, Pan D K, ZHANG J. Molecular cloning, expression profile analysis and construction of adipose tissue specific expression vector of pig Gli1 gene[J]. *Hereditas*, 2012, 34(10): 1291-1297 (in Chinese)
- [28] Marigo V, Johnson R L, Vortkamp A, Tabin C J. Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development[J]. *Developmental Biology*, 1996, 180, (1): 273-283
- [29] Marigo V, Tabin C. Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996(93): 9346-9351

责任编辑: 苏燕