

猪脂肪酸结合蛋白4启动子的克隆及转录活性分析

刘可可^{1,2} 钟洁¹ 李红强¹ 张瑾² 东方阳^{1*} 毋文静^{2*}

(¹河北科技师范学院农学与生物科技学院, 秦皇岛 066000; ²嘉兴学院生物与化学工程学院, 嘉兴 314000)

摘要 该研究旨在解析猪(*Sus scrofa*)脂肪酸结合蛋白4(*FABP4*)基因的转录调控机制, 并获得猪脂肪组织特异性启动子元件。以6月龄大白猪为材料, 通过荧光定量PCR结合Western blot证明了猪*FABP4*为脂肪组织特异性表达较强的基因, 并分析推断其核心启动子区位于-2115 bp—2066 bp; 克隆得到从起始密码子开始到其上游的870 bp、2 914 bp、5 060 bp片段, 分别构建了双荧光素酶报告载体并将其命名为pGL3-F-1 Kb/3 Kb/5 Kb, 分析发现pGL3-F-3 Kb在脂肪细胞中的活性最高, 而在非脂肪细胞中无活性; 通过与脂代谢密切相关转录因子(*C/EBPα*、*KLF4*和*C/EBPβ*)共转染发现, *C/EBPα*正调控*FABP4*转录活性, 而*KLF4*和*C/EBPβ*负调控*FABP4*的转录活性。研究表明, 猪*FABP4*基因的起始密码子上游3 Kb片段具有脂肪组织特异启动子活性, 可以用于构建脂肪组织特异性基因修饰猪。

关键词 猪; 脂肪沉积; 启动子; 脂肪组织特异性; 转录调控

Cloning and Transcriptional Activity Analysis of Porcine Fatty Acid Binding Protein 4 Promoter

LIU Keke^{1,2}, ZHONG Jie¹, LI Hongqiang¹, ZHANG Jin², DONGFANG Yang^{1*}, WU Wenjing^{2*}

(¹College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066000, China;

²College of Biological Chemical Sciences and Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314000, China)

Abstract The purpose of this study was to analyze the transcriptional regulation mechanism of porcine *FABP4* (fatty acid binding protein 4) gene and obtain porcine adipose tissue specific promoter elements. Using 6-month-old large-white pigs as materials, it was proved that porcine *FABP4* was a gene specifically expressed in adipose tissue by fluorescence quantitative PCR and Western blot analysis. The core promoter region of *FABP4* was located between -2115 bp—2066 bp. The truncated fragments 870 bp, 2 914 bp, 5 060 bp upstream of the start codon were cloned, and dual luciferase reporter vectors were constructed naming as pGL3-F-1 Kb/3 Kb/5 Kb. It was found that pGL3-F-3 Kb had the highest activity in adipocytes, but had no activity in non-adipocytes. By co-transfection of transcription factors related to lipid metabolism, it was found that *C/EBPα* positively regulated *FABP4* transcriptional activity, while *KLF4* and *C/EBPβ* negatively regulated the transcriptional activity of *FABP4*. This study showed that the 3 Kb fragment upstream of the start codon of porcine *FABP4* gene had adipose tissue-specific promoter activity, which could be used to construct adipose tissue-specific gene modified pigs.

Keywords pig; fat deposition; promoter; adipose tissue specificity; transcription regulation

收稿日期: 2021-10-14 接受日期: 2021-12-17

浙江省自然科学基金(批准号: LY20C170003)、国家自然科学基金(批准号: 32102506、32172708)和嘉兴市公益性研究计划(批准号: 2021AY10046)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13780335864, E-mail: yang_dongfang@hevtc.edu.cn; Tel: 13736433510, E-mail: wuwenjing19851020@163.com

Received: October 14, 2021 Accepted: December 17, 2021

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. LY20C170003), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 32102506, 32172708) and Public Welfare Research Program of Jiaxing (Grant No. 2021AY10046)

*Corresponding authors. Tel: +86-13780335864, E-mail: yang_dongfang@hevtc.edu.cn; Tel: +86-13736433510, E-mail: wuwenjing19851020@163.com

脂肪沉积性状是猪重要的经济性状,与胴体瘦肉率、肉品质、料肉比等多项经济指标密切相关^[1-2]。鉴定影响猪脂代谢的关键基因,深入认识猪脂代谢的调控网络,是对猪脂肪沉积性状进行遗传改良的必要基础。脂肪酸结合蛋白4(fatty acid binding protein 4, *FABP4*),也被称作脂肪细胞蛋白2(adipocyte protein 2, *aP2*),是动物脂肪细胞中表达丰度最高的基因之一,其蛋白能够与长链脂肪酸结合,在脂肪酸摄取、转运和代谢中发挥作用,常被用来作为脂肪细胞分化成熟的标志基因^[3-6]。利用小鼠等模式生物研究发现,*FABP4*缺失能保护小鼠免于发生代谢类疾病^[7];在家猪的研究中,多个课题组报道了*FABP4*所呈现的多态与肌内脂肪含量相关^[8-11]。因此,*FABP4*是影响动物脂代谢的重要基因。

鉴于*FABP4*主要表达于脂肪细胞,因此小鼠*FABP4*的启动子是最早用于脂肪组织特异性转基因鼠的研究的^[12]。关于猪*FABP4*的表达研究,早在1990年ARMSTRONG等^[13]通过Western blot方法分析发现,猪*FABP4*仅在脂肪组织中表达。DING等^[14]在1999年的研究中,也印证了此观点。因此,我们推断猪*FABP4*的启动子具有脂肪组织特异性。本研究通过荧光定量PCR结合Western blot确认了猪*FABP4*的组织特异性表达,发现了对猪*FABP4*启动子活性具有重要调控作用的转录因子,加深了对猪脂肪代谢调控网络的认识;并克隆得到了猪*FABP4*的启动子,为构建脂肪组织特异性基因修饰猪奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 7日龄大白猪,体质量约2 kg,购自浙江省青莲食品有限公司。

1.1.2 细胞和试剂 3T3-L1脂肪前体细胞和293T人肾上皮细胞系由本实验室提供;DMEM培养基购自以色列BI公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司;IBMX、胰岛素、地塞米松均购自美国Sigma公司;青-链霉素双抗购自美国HyClone公司;Trizol试剂和Lipofectamine™ 2000试剂盒购自美国Invitrogen公司;cDNA反转录试剂盒购自日本TaKaRa公司;2× Plus SYBR real-time PCR Mixture试剂、蛋白裂解液、BCA蛋白测定试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司;ECL化学发光超敏显色试剂盒购自美国Millipore公司;双荧光素酶报告基

因检测试剂盒购自美国Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 样本采集 取7日龄大白猪,利用空气栓塞法分别处死3头猪仔,75%酒精擦拭后,在无菌条件下分离提取仔猪的脑、心、肝、脾、肾和皮下脂肪等组织,液氮速冻后置于-80℃冰箱保存备用。本实验经嘉兴学院生物与化学工程学院伦理委员会审核并通过(批准号:JUMC2021-125)。

1.2.2 启动子序列分析用到的软件 利用在线软件Promotor Scan(<http://www-bimas.cit.nih.gov/mol-bio/proscan/>)完成核心启动子序列预测,通过转录因子数据库TRANSFAC中的在线转录因子预测软件包括Patch、P-Match、Ali Baba2(<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>)预测*FABP4*启动子序列顺式作用元件。

1.2.3 *FABP4*启动子截短片段重组质粒的构建 根据家猪*FABP4*起始密码子上游序列设计不同片段长度的引物,利用引物设计分析软件Primer Premier 5.0和Oligo 6.0分别设计了扩增*FABP4*基因起始密码子上游1 Kb、3 Kb和5 Kb左右片段的引物,并在所有的上游引物5'端添加了*Nhe* I单酶切位点,下游引物添加了*Xho* I单酶切位点,设计引物如表1所示(斜体下划线部分为引入的酶切位点)。利用分子克隆技术构建*FABP4*启动子截短片段的双荧光素酶报告载体pGL3-F-1 Kb/3 Kb/5 Kb。

1.2.4 转染细胞及启动子活性分析 使用12孔板培养前脂肪细胞3T3-L1,每孔加入1.5 mL含10% FBS的DMEM培养基,置于37℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中,1~2天换液1次;当细胞长到汇合度为70%~80%时,吸出原培养基,每孔加入2 mL诱导剂I(完全培养基+0.5 mmol/L IBMX+1 μmol/L地塞米松+5 μg/L胰岛素),培养48 h;吸出2 mL诱导剂I,加入诱导剂II(完全培养基+5 μg/L胰岛素),再培养48 h;吸出诱导剂II,改为含10% FBS的DMEM普通培养液,每隔2天换液1次,诱导分化后第8天,成熟脂肪细胞占总细胞面积的90%时停止培养^[15]。

3T3-L1成脂诱导分化第4天,将构建的pGL3-F-1 Kb/3 Kb/5 Kb质粒和内参质粒pRL-SV40瞬时共转染3T3-L1成脂细胞和293T细胞。再将pGL3-basic作为阴性对照,每种质粒做3次独立重复,通过检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性来反映*FABP4*基因各截短启动子的转录活性。

表1 *FABP4*启动子截短片段扩增引物
Table 1 The primers for truncated promoter of *FABP4*

引物名称	碱基序列(5'→3')
Primer name	Base sequence (5'→3')
F-pro-1 Kb	<u>GCTAGC</u> ATG GCT TGT GAC CAA ACC ACT TCT G
F-pro-2 Kb	<u>GCTAGC</u> TTT GGG AGA TTG TGA TGT GCT GGT G
F-pro-3 Kb	<u>GCTAGC</u> GAG GAT ATA CGG GTG GCC AAT ATG C
F-pro-5 Kb	<u>GCTAGC</u> ACT GCC CAA TAG AAA CAT AAC
F-pro-R	<u>CTCGAG</u> TAC TTC ATG TCT GGC TGG TGC TTC

下划线部分为引入的酶切位点。
The underlined part is the introduced enzyme digestion site.

1.2.5 调控*FABP4*的转录因子的筛选 3T3-L1细胞经过4天诱导为成脂细胞后, 取pGL3-F-3 Kb质粒分别与*C/EBPα*、*C/EBPβ*、*KLF4*、*KLF15*、*PPARγ*转录因子共转染, 24 h后收取细胞进行荧光素酶报告基因活性检测。

1.2.6 荧光定量PCR分析 利用Trizol裂解法提取组织总RNA, 参照TaKaRa反转录试剂盒说明进行反转录, 采用Thermofisher QuantStudio 3定量PCR仪检测*FABP4*的mRNA相对表达水平, 以*GAPDH*为内参基因, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达丰度^[16]。

1.2.7 Western blot分析 用蛋白裂解液提取组织总蛋白, BCA法测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度, 加入适量2× SDS上样缓冲液, 煮沸5 min, -20 °C保存备用。配制12% SDS-PAGE分离胶和5% SDS-PAGE浓缩胶, 100 V电泳2 h。4 °C、200 mA转移2~2.5 h, 将目的条带转移到PVDF膜上。37 °C封闭2 h, 一抗(1:1 000) 37 °C孵育2 h。TBST溶液漂洗膜3次, 二抗(1:20 000) 37 °C孵育1 h。最后用Bio-Rad ChemiDocXRS+曝光系统检测*FABP4*蛋白表达水平^[17]。

1.2.8 统计学分析 实验数据以平均值±标准误($\bar{x}\pm SE$)表示, 采用SPSS 13.0统计分析软件中的Student's *t*检验对各组进行差异显著性分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 猪*FABP4*组织表达谱分析

利用荧光定量PCR技术, 选择猪六种组织进行分析发现, *FABP4*在皮下脂肪中呈现极高丰度表达, 在心脏和肾脏中检测到*FABP4*的极低丰度的表达, 心脏和肾脏中mRNA丰度分别相当于皮下脂肪的1/50和1/100(图1A)。利用Western blot分析各组织中*FABP4*蛋白表达丰度, 发现仅在皮下脂肪组织中有

高丰度表达, 而心脏、肾脏等其他组织中结果均为阴性(图1B)。因此, 推断猪*FABP4*为脂肪组织特异性表达较强的基因。

2.2 猪*FABP4*核心启动子预测

对*FABP4*起始密码子上游5 Kb基因组序列进行分析, 发现有五个潜在的核心启动子区域, 其中分值最高的为片段3, 并且转录起始位点为A, 在转录起始位点上游的31 bp, 存在一个保守序列为GTA AAA ATG GCA GT的TATA-box(表2)。进一步对5 Kb序列潜在的顺势调控元件分析, 发现在片段3内的顺势调控元件数量多, 并且有脂代谢关键转录因子*C/EBPα*和*PPARγ*的结合位点(图2), 因此推断*FABP4*基因的核心启动子区很可能位于-2115 bp—-2066 bp的位置。

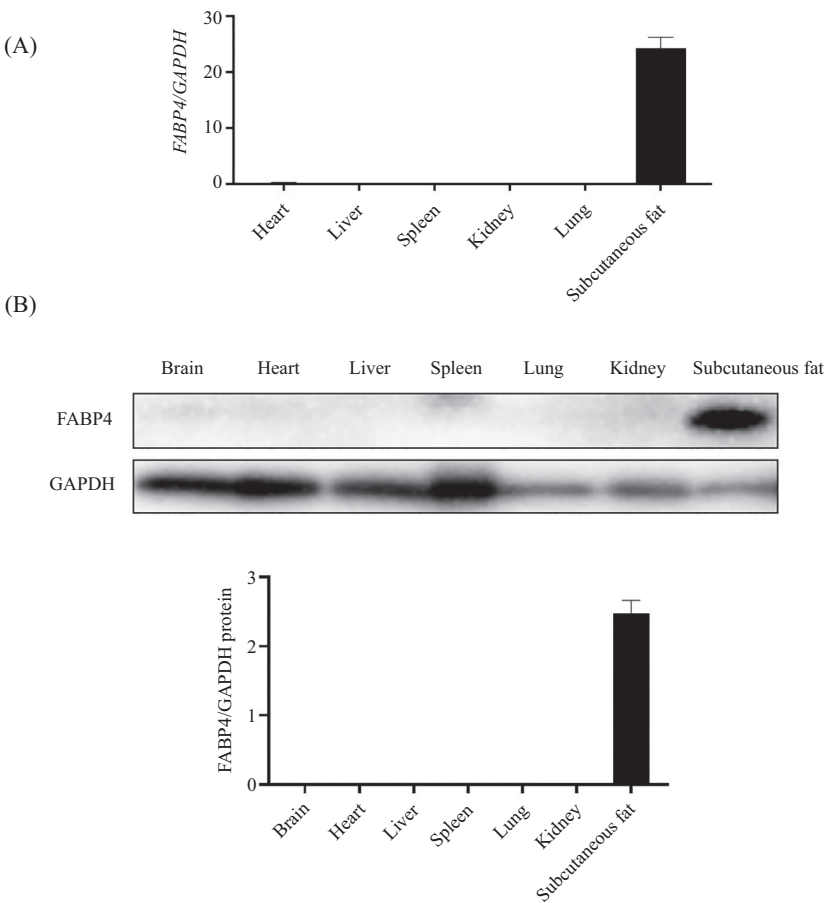
2.3 *FABP4*启动子截短片段的克隆与活性分析

基于启动子序列分析, 将猪*FABP4*起始密码子上游分为三个截短片段, 即-870 bp—+1 bp、-2914 bp—+1 bp、-5060 bp—+1 bp, 克隆得到各片段将其分别命名为F-1 Kb、F-3 Kb和F-5 Kb, 将三个片段分别构建双荧光素酶报告载体pGL3-F-1 Kb/3 Kb/5 Kb。

利用双荧光素梅报告分析系统, 将上述载体分别转染前脂肪细胞系3T3-L1(诱导分化第4天)和非脂肪细胞系293T, 分析启动子活性。结果表明, 三个片段在293T细胞中均未表现出启动子活性, 在3T3-L1细胞中, pGL3-F-1 Kb和pGL3-F-3 Kb表现出启动子活性, 其中pGL3-F-3 Kb活性约为pGL3-F-1 Kb的两倍, 而更长的片段pGL3-F-5 Kb却未表现出启动子活性(图3)。

2.4 影响*FABP4*启动子活性的转录因子筛查

为了筛查影响*FABP4*启动子活性的转录因子, 将pGL3-F-3 Kb分别与带有*C/EBPα*、*C/EBPβ*、*KLF4*、*KLF15*、*PPARγ*五种转录因子编码基因的质粒共转染3T3-L1细胞, 通过双荧光素酶报告系统



A: mRNA水平; B: 蛋白水平。
A: mRNA level; B: protein level.

图1 *FABP4*在猪各个组织中的表达
Fig.1 Expression of *FABP4* in pig tissues

表2 *FABP4*基因核心启动子区的预测

Table 2 The prediction of core promoter regions for <i>FABP4</i> gene				
编号 Fragment	起始 Start	终止 End	分值 Score	启动子序列 Promoter sequence
1	-735	-686	0.89	GGT CTA TTT TTT TAA GGG GTC CGT GAA AAG CAA CAT CAT CCT CTC ATT GA
2	-1346	-1297	0.82	ATG AAT ATA TAA TAA CAA AAG CCC ATG GGG AAA CGT ACA CCA CCC ACA GT
3	-2115	-2066	0.99	ATG GAG AGA GTA AAA ATG GCA GTG GTT TGA TGG GGT TGA GAG CAG GAG TG
4	-2742	-2693	0.98	TGG GAA TGT AAA ATA GTG CTG CCC ATT TGG AAG CCA GTG CCA TGG TTT CT
5	-2832	-2783	0.96	TAG CAC CAG TTA AAA TGG CCA AAA TTA CAA CAT TGA CAA CAT CAA GTG CT

方框里的碱基为转录起始位点; 下划线为TATA-box区。
The bases in the box are transcription initiation sites. The underlined bases are TATA-box.

分析各个转录因子对pGL3-F-3 Kb启动子活性的影响。如图4所示, *C/EBPα*能够增强pGL3-F-3 Kb启动子活性; *KLF15*和*PPARγ*对pGL3-F-3 Kb启动子活性无显著影响; *KLF4*和*C/EBPβ*能够抑制pGL3-F-3 Kb

启动子活性, 其中*KLF4*的抑制作用达到极显著。

3 讨论

猪皮下脂肪沉积影响猪的胴体瘦肉率和料肉

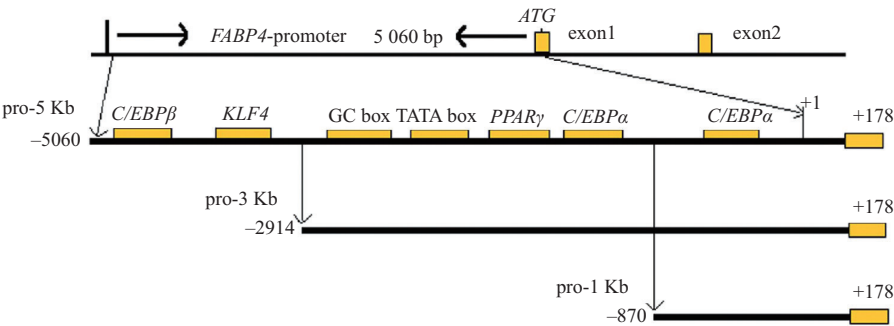
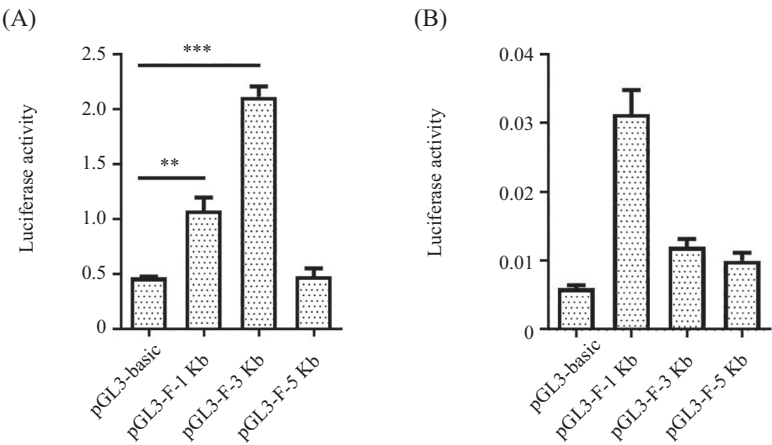


图2 *FABP4*起始密码子上游序列潜在的顺式调控元件预测

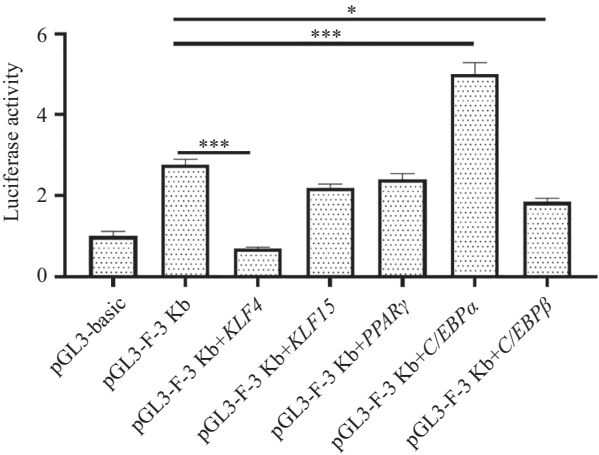
Fig.2 The prediction of potential cis-acting regulatory elements in the upstream sequence of *FABP4* start codon



A: 3T3-L1细胞; B: 293T细胞。 ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
A: 3T3-L1 cells; B: 293T cells. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图3 *FABP4*截短启动子片段在3T3-L1和293T细胞中的荧光素酶活性

Fig.3 The luciferase activity of *FABP4* trucked promoter in 3T3-L1 or 293T cells



* $P<0.05$, *** $P<0.001$.

图4 不同转录因子对*FABP4*启动子活性的影响

Fig.4 The impacts of different transcription factors on *FABP4* promoter activity

比, 肌内脂肪沉积与肉品质密切相关, 因此深入认识猪脂肪沉积的调控网络, 改良猪脂肪沉积性状, 是猪育种工作的重要内容之一^[18-19]。近年来随着组学技

术的发展, 猪脂肪组织的基因表达谱、非编码RNA表达谱的研究取得了长足的进步, 鉴定了多个对猪脂肪代谢具有重要影响的分子^[20-24], 但在细胞层面对

脂代谢调控网络的认识有待深入。本研究明确了猪*FABP4*为脂肪组织特异性表达较强的基因,并且推断了其核心启动子区域位于-2115 bp—2066 bp,克隆得到具有脂肪组织特异性活性的启动子片段F-3 Kb,最后确定了影响其转录活性的转录因子*C/EBPα*、*C/EBPβ*和*KLF4*。

脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding protein, *FABP*)广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物的细胞质中,在协调各种组织和器官的脂质转运、代谢和反应中起着重要作用,其包含9个成员,分别表达于不同的组织中^[9,25]。*FABP*的命名是基于最先发现这个蛋白的组织,比如第一个发现的*FABP*(*FABP1*)主要表达于肝脏,就将其命名为L-*FABP*。*FABP4*主要表达于脂肪组织,因此又被叫做A-*FABP*,其功能是作为脂伴侣蛋白,与脂肪酸、类花生酸类和维甲酸等结合从而参与它们的代谢和运转^[26-28],在动物脂代谢中发挥重要作用。研究表明,在机体缺乏食物供给时,*FABP4*促进自由脂肪酸从脂肪细胞中释放出来,供给其他组织能量需要;但当动物处于肥胖状态时,*FABP4*促进自由脂肪酸的释放,导致肝脏、心脏和胰岛β细胞内脂过度积累,影响机体脂代谢平衡。敲除*FABP4*基因后,小鼠在高脂饲喂下依然保持糖脂代谢正常^[7]。*FABP4*基因在猪脂代谢中的功能研究还较少,但多个课题组报道了*FABP4*基因多态性与猪肌肉脂肪含量、皮下脂肪沉积量具有相关性^[9-10]。

在脂肪细胞启动分化后,*FABP4*的表达水平迅速升高,成为脂肪细胞中表达丰度最高的基因之一^[29]。关于*FABP4*基因的转录调控,TUNCMAN等^[30]于2006年报道了*FABP4*基因起始密码子上游-87 bp处突变(T突变成C)会导致转录减弱,从而降低机体糖脂代谢失衡的风险。然而关于*FABP4*基因启动子的研究,至今未见报道。本研究基于猪*FABP4*基因起始密码子上游序列分析,预测得到五个潜在的核心启动子。所谓核心启动子,是指保证RNA聚合酶II转录正常起始所必需的、最少的DNA序列,包括转录起始位点及转录起始位点上游TATA-box。对五个潜在的核心启动子序列分析发现,序列3分值最高,且其转录起始位点为A,在转录起始位点上游31 bp处,有TATA-box,后期功能研究也证明,F-3 Kb片段具有较高的启动子活性,并且具有较好的脂肪组织特异性,因此,我们推断*FABP4*基因的核心启动子区位于-2115 bp—2066 bp的位置。

*FABP4*主要表达于猪的脂肪组织,推测可能原因是其转录过程需要脂肪细胞特有的转录因子参与。本实验室克隆了猪脂代谢密切相关的转录因子,分别与F-3 Kb片段做了双荧光素酶报告分析,筛选得到了*C/EBPα*、*C/EBPβ*和*KLF4*三个转录因子,它们对*FABP4*基因的转录具有调控作用。*KLF4*是Krüppel样因子(KLF)家族转录因子的成员,是脂肪生成的重要调节因子,其直接与*C/EBPβ*启动子结合并诱导*C/EBPβ*的表达;*C/EBPβ*表达后,可以促进*C/EBPα*和*PPARγ*的表达^[31]。本研究结果表明,虽然F-3 Kb片段区域不含*KLF4*启动子结合区域,但是与*KLF4*共转染后会抑制其启动子活性。转录因子在线预测软件已经应用多年,对实验研究具有很好的指导作用。但不同的软件预测结果存在一定的差异,我们选用了认可度较高的TRANSFAC在线预测软件,并结合我们已经有的脂类代谢的知识,确定了F-3 Kb片段没有*KLF4*位点,但经过实验验证*KLF4*对F-3 Kb片段启动子活性有显著影响,说明预测结果存在假阴性,与*KLF4*是否有其他非转录活性依赖的调控作用无关。基于DING等^[14]的研究,*FABP4*是脂肪细胞分化后第4天才有微弱表达,而到了分化第7天,已经呈现高丰度表达。本研究所取得的数据可以解释此结果:当脂肪细胞接收到诱导分化的信号时,*KLF4*诱导*C/EBPβ*表达,这二者对*FABP4*的转录均有抑制作用,而当*C/EBPα*被诱导表达后,增强*FABP4*的转录活性,才能启动*FABP4*的表达。

综上所述,本研究明确了猪*FABP4*为脂肪组织特异性表达较强的基因,鉴定了*C/EBPα*、*C/EBPβ*和*KLF4*三个转录因子对*FABP4*的转录具有调控作用,并且克隆得到了具有脂肪组织特异性启动子活性的F-3 Kb片段。本研究不仅加深了对猪脂肪调控网络的认识,还为基因修饰猪提供了脂肪组织特异性启动子元件。

参考文献 (References)

- [1] 蔡如玉,段梦琪,王士欣,等.藏猪与大白猪胴体性能及肉质特性分析[J].家畜生态学报(CAI R Y, DUAN M Q, WANG S X, et al. Carcass performance and meat quality characteristics of Tibetan and large white pigs [J]. Acta Ecologicae Animalis Domestici), 2021, 42(7): 35-38.
- [2] 吴婷,敖翔,何健.肌肉脂肪与肉质关系及其营养调控策略[J].养猪(WU T, AO X, HE J. Relationship between intramuscular fat and meat quality and its nutritional regulation strategy [J]. Swine), 2021(4): 50-4.

- [3] MATARESE V, BERNLOHR D A. Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(28): 14544-51.
- [4] SCHROEDER F, PETRESCU A D, HUANG H, et al. Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription [J]. *Lipids*, 2008, 43(1): 1-17.
- [5] ISO T, MAEDA K, HANAOKA H, et al. Capillary endothelial fatty acid binding proteins 4 and 5 play a critical role in fatty acid uptake in heart and skeletal muscle [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(11): 2549-57.
- [6] WU W J, JI M, XU K, et al. Knockdown of CTRP6 reduces the deposition of intramuscular and subcutaneous fat in pigs via different signaling pathways [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020, 1865(8): 158729.
- [7] PRENTICE K J, SAKSI J, HOTAMISLIGIL G S. Adipokine FABP4 integrates energy stores and counterregulatory metabolic responses [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(4): 734-40.
- [8] ZHAO X Y, HU H M, LIN H C, et al. Muscle transcriptome analysis reveals potential candidate genes and pathways affecting intramuscular fat content in pigs [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 877.
- [9] STORCH J, CORSICO B. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins [J]. *Annu Rev Nutr*, 2008, 28: 73-95.
- [10] GERBENS F, HARDERS F L, GROENEN M A, et al. A dimorphic microsatellite in the porcine H-FABP gene at chromosome 6 [J]. *Anim Genet*, 1998, 29(5): 408.
- [11] GERBENS F, VERBURG F J, VAN MOERKERK H T, et al. Associations of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expression with intramuscular fat content in pigs [J]. *J Anim Sci*, 2001, 79(2): 347-54.
- [12] LONGO K A, WRIGHT W S, KANG S, et al. Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(34): 35503-9.
- [13] ARMSTRONG M K, BERNLOHR D A, STORCH J, et al. The purification and characterization of a fatty acid binding protein specific to pig (*Sus domesticus*) adipose tissue [J]. *Biochem J*, 1990, 267(2): 373-8.
- [14] DING S T, MCNEEL R L, MERSMANN H J. Expression of porcine adipocyte transcripts: tissue distribution and differentiation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1999, 123(3): 307-18.
- [15] 伍家利, 张秀玲, 杜润家, 等. 脂肪细胞分化的分子机制研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*(WU J L, ZHANG X L, DU R J, et al. Research progress on molecular mechanism of adipocyte differentiation [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2017, 39(6): 826-32.
- [16] WU W J, ZHANG D W, YIN Y J, et al. Comprehensive transcriptomic view of the role of the LGALS12 gene in porcine subcutaneous and intramuscular adipocytes [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 509.
- [17] JI M, XU K, ZHANG D W, et al. Adipose-tissue-specific expression of pig ApoR protects mice from diet-induced obesity [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(7): 2256-62.
- [18] 吕亚宁, 贺琛昕, 兰旅涛. 猪肌肉脂肪与肉品质的关系及其影响因素的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*(LU Y N, HE C X, LAN L T. Research progress on the relationship between intramuscular fat and meat quality and its influencing factors in pigs [J]. *China Animal Husbandry Veterinarians*), 2020, 47(2): 554-63.
- [19] 甘麦邻, 堵晶晶, 杨琼, 等. 动物肌肉脂肪对肉质的影响及其分子机制研究进展[J]. *现代畜牧兽医*(GAN M L, DU J J, YANG Q, et al. Research progress on the effect of intramuscular fat on meat quality and its molecular mechanism [J]. *Modern Animal Husbandry Veterinarians*), 2017, (10): 51-7.
- [20] WANG Q, QI R L, WANG J, et al. Differential expression profile of miRNAs in porcine muscle and adipose tissue during development [J]. *Gene*, 2017, 618: 49-56.
- [21] MIAO Z G, WANG S, WANG Y M, et al. Comparison of microRNAs in the intramuscular adipose tissue from Jinhua and Landrace pigs [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(1): 192-200.
- [22] KUMAR H, SRIKANTH K, PARK W, et al. Transcriptome analysis to identify long non coding RNA (lncRNA) and characterize their functional role in back fat tissue of pig [J]. *Gene*, 2019, 703: 71-82.
- [23] XU K, JI M, HUANG X, et al. Differential regulatory roles of mirnas in porcine intramuscular and subcutaneous adipocytes [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(13): 3954-62.
- [24] JIN L, TANG Q Z, HU S L, et al. A pig BodyMap transcriptome reveals diverse tissue physiologies and evolutionary dynamics of transcription [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3715.
- [25] LI B, HAO J Q, ZENG J, et al. SnapShot: FABP functions [J]. *Cell*, 2020, 182(4): 1066.
- [26] REESE W A, THOMPSON J, BANASZAK L. Structural properties of the adipocyte lipid binding protein [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1441(2/3): 106-16.
- [27] SCHAAP F G, VAN DER VUSSE G J, GLATZ J F C. Evolution of the family of intracellular lipid binding proteins in vertebrates [J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 239(1/2): 69-77.
- [28] CAO H M, SEKIYA M, ERTUNC M E, et al. Adipocyte lipid chaperone aP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production [J]. *Cell Metab*, 2013, 17(5): 768-78.
- [29] BERNLOHR D A, BOLANOWSKI M A, KELLY T J, et al. Evidence for an increase in transcription of specific mRNAs during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(9): 5563-7.
- [30] 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 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(18): 6970-5.
- [31] XU Q, LI Y, LIN S, et al. KLF4 Inhibits the differentiation of goat intramuscular preadipocytes through targeting C/EBP β directly [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 663759.