

# 猪 *FoxO1* 基因 cDNA 部分序列的克隆及其组织表达

杨燕军, 白亮, 庞卫军, 杨公社\*

(西北农林科技大学 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100)

**摘要:** 根据人、黑猩猩及大鼠等物种 *FoxO1* 基因同源序列设计引物, 利用 RT-PCR 方法从猪肝脏中克隆 *FoxO1* 基因 cDNA 的部分序列, 组织特异性表达分析表明, *FoxO1* 基因在 1 日龄和 9 月龄猪的肝、肺、肾、脾、心、胃、皮下脂肪、内脏脂肪、背最长肌和股四头肌等组织中均表达, 只是表达丰度随发育阶段和组织的不同有所差异。1 日龄猪的内脏脂肪中 *FoxO1* 的表达丰度最高, 心脏和骨骼肌中相对较低; 而 9 月龄猪的脾脏中 *FoxO1* 相对表达丰度最高, 明显高于免疫机能尚未完全建立的初生猪, 显示出 *FoxO1* 可能在机体的免疫调节中起一定作用, 另外, 9 月龄猪的 *FoxO1* 表达丰度不仅在平滑肌和骨骼肌中有显著差异, 而且在不同类型的骨骼肌中也存在显著差异, 显示出 *FoxO1* 的表达可能与骨骼肌类型和运动强度有关。

**关键词:** 猪; *FoxO1* 基因; 克隆; 组织表达

中图分类号: S828.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)11-1143-06

## Partial cDNA Cloning and Tissue Expression of *FoxO1* in Pig

YANG Yan-jun, BAI Liang, PANG Wei-jun, YANG Gong-she\*

(Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** The partial cDNA of *FoxO1* was cloned from pig's liver by RT-PCR, and primer was designed according to the homology blast among human, chimpanzee and rat. Analysis of tissue expression showed that *FoxO1* was widely expressed in the liver, lung, kidney, spleen, heart, stomach, subcutaneous adipose, visceral adipose, *m. longissimus dorsi* and *m. quadriceps femoris*. Moreover, *FoxO1* expressional profile was different between in 1-day-old and 9-month-old pigs following the different developmental stage and tissues. *FoxO1* was highest expressed in visceral adipose of 1-day-old pigs while lower in heart and skeletal muscle. Furthermore, *FoxO1* had the highest expression in spleen of 9-month-old pigs and significantly higher than piglet that didn't have complete immunity ability, showing *FoxO1* may be involved in body immunomodulation. In addition, the expression profile of *FoxO1* not only was significantly different from smooth muscle and skeletal muscle, but also was significantly different from various skeletal muscle of 9-month-old pig. It implied that the expression of *FoxO1* is intimately related to skeletal muscle types and exercise intensity.

**Key words:** pig; *FoxO1* gene; clone; tissue expression

Fox 蛋白家族是 2000 年才发布统一命名的蛋白质家族, 由于其在生物体内所起的重要作用, 已迅速成为生命科学研究的热点<sup>[1,2]</sup>。在 Fox 的 17 个

亚家族中, FoxO 主要通过转录调控和信号传导途径在动物的生长发育、细胞分化、代谢、凋亡和免疫等方面起重要作用<sup>[1,3,4]</sup>。

收稿日期: 2006-11-22

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2004CB117506)

作者简介: 杨燕军 (1981-), 男, 陕西蒲城人, 硕士生, 主要从事分子生物学研究工作, E-mail: yyyj77@163.com

\* 通讯作者: 杨公社, 教授, Tel: 029-87092430, E-mail: gsyang999@yahoo.com.cn

FoxO 转录因子是 INS/IGF-1 (Insulin/insulin-like growth factor 1) 信号通路中的关键分子,上游受 PI3K/PKB (Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) 磷酸化级联通路的调节,其活性与磷酸化状态直接相关,下游调节的靶基因多与细胞周期、细胞衰老及代谢有关。FoxO 基因在进化上高度保守,氨基酸序列中含有 3 个高度保守的 PKB 磷酸化基序<sup>[4,5]</sup>。对哺乳动物 FoxO 蛋白的研究起始于线虫中发现的 FoxO 同源物 DAF-16,它是胰岛素信号通路中的必需组成部分<sup>[6]</sup>。FoxO1 是 FoxO 家族中发现最早的成员,在脂肪细胞分化信号通路与转录级联反应中具有重要作用,其与脂肪细胞代谢及成肌细胞分化有很大关系,能促进脂肪细胞的分化<sup>[7,8]</sup>、负调控骨骼肌的生成和 I 型肌纤维基因的表达<sup>[9]</sup>,且对肝细胞、胰岛  $\beta$  细胞及脂肪细胞中胰岛素作用的发挥起重要作用<sup>[10]</sup>。

目前,大鼠(Rat)、黑猩猩(Chimpanzee)等动物和人类(Human)的 FoxO1 完整 CDS 序列已克隆得到,但有关猪的 FoxO1 序列及其组织分布情况尚未见报道。本研究根据 GenBank 已发表的相关物种 FoxO1 基因 cDNA 的同源序列设计引物,扩增出长度为 414 bp 的猪 FoxO1 基因部分序列,并在 GenBank 登录 (Accession No. DQ673620),同时对 FoxO1 在 1 日龄和 9 月龄猪不同组织器官中的表达丰度进行了检测和分析,揭示 FoxO1 在初生仔猪和成年猪不同组织器官中的差异性表达规律,为进一步探讨 FoxO1 的功能及作用机理提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1 日龄和 9 月龄斯格猪 (Seghers) 各 3 头的新鲜组织取自于杨凌格润尔光明猪畜牧公司,于液氮内取回,立即贮存于  $-70^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

总 RNA 提取用 Trizol 试剂 (百泰克生物); 逆转录用 RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas); Taq DNA Polymerase (Fermentas); DNA 回收试剂盒 (天为时代); pMD-19T vector 以及 EcoR I、Xho I (TaKaRa); H. Q. & Q 质粒微量提取试剂盒 (安徽优品)。

### 1.2 猪肝总 RNA 的提取

取 1 日龄猪肝组织于液氮中研磨,用 Trizol 法进行总 RNA 提取。在紫外分光光度计上对所提总 RNA 进行纯度鉴定,并进行凝胶电泳检测。总

RNA 保存于  $-70^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.3 RT-PCR

RT 反应使用 RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit,取 4  $\mu\text{L}$  总 RNA,按照试剂盒说明书进行操作,逆转录得到 cDNA。根据人、黑猩猩及大鼠 FoxO1 保守序列的一致性,用 Primer5.0 软件设计一对引物,上游 (Primer1): 5'-GCCGTGC-TACTCGTTTGC-3'; 下游 (Primer2): 5'-CTT-GGGTCAGGCGGTTC-3',引物由上海生工合成。

PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ : 15.0  $\mu\text{L}$  灭菌的双蒸水, 2.5  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR buffer, 2.5  $\mu\text{L}$  2 mmol/L dNTPs Mix, 0.5  $\mu\text{L}$  25  $\mu\text{mol/L}$  Primer I, 0.5  $\mu\text{L}$  25  $\mu\text{mol/L}$  Primer II, 1.5  $\mu\text{L}$  25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1.5  $\mu\text{L}$  0.5 U/ $\mu\text{L}$  Taq DNA Polymerase, 1.0  $\mu\text{L}$  cDNA 模板。反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 6 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 54.3  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  80 s, 33 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。进行 PCR 扩增时,同时以不加模板的体系和 RNA 为模板的体系做对照,以排除试剂污染和基因组 DNA 污染引起假阳性的可能。

### 1.4 序列测定与同源性比较

PCR 产物经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收和 DNA 凝胶回收试剂盒纯化后,连接于 pMD-19T 载体上,再将连接产物转化到感受态 *E. coli* DH 5 $\alpha$ , 涂布平板 (含 Amp, X-Gal 和 IPTG), 通过蓝、白斑筛选,将阳性克隆转种于含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 液体培养基进行扩大培养, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,用 H. Q. & Q 质粒微量提取试剂盒抽提质粒 DNA (碱裂解法), PCR 扩增初步鉴定重组质粒,再用 EcoR I 和 Xho I 进行双酶切进一步鉴定阳性克隆。经 PCR 和限制性内切酶酶切鉴定均为阳性克隆,送交测序。

将测序所得的序列与 GenBank 上已发表的人、黑猩猩、大鼠、牛和狗 FoxO1 基因序列利用 Clustal W 软件进行在线同源性比对,比较不同物种之间 FoxO1 基因的保守性。

### 1.5 FoxO1 的组织表达

1.5.1 各组织总 RNA 的提取及逆转录 分别取 1 日龄和 9 月龄猪的肝脏 (Liver)、肺脏 (Lung)、肾脏 (Kidney)、脾脏 (Spleen)、心脏 (Heart)、胃 (Stomach)、皮下脂肪 (Subcutaneous adipose)、内脏脂肪 (Visceral adipose)、背最长肌 (*m. longissimus dorsi*) 和股四头肌 (*m. quadriceps femoris*) 等 10 种器官和组织以及 9 月龄猪新鲜的皮肤 (*m. cutaneus*)

(1 日龄仔猪皮肤因太薄无法采取),应用 Trizol 法提取总 RNA,并进行逆转录。用 RT-PCR 法检测 *FoxO1* 基因分别在 1 日龄和 9 月龄猪各组织的表达情况,*FoxO1* 基因的引物及 PCR 反应体系、反应条件等同 1.3。使用  $\beta actin$  作为内参对照(产物长度为 399 bp),引物如下:上游 5'-ACTGCCGCATC-CTCTTCCTC-3';下游 5'-CTCCTGCTTGCT-GATCCACATC-3'。

1.5.2 PCR 循环次数的确定 SQ(Semi-quantitative, SQ)RT-PCR 技术是建立在两对引物扩增处于指数增长期的基础上,因此,循环次数应选择达到平台期前的线性范围内。本试验分别设计 27、28、29、30、31 和 32 等 6 个不同循环次数扩增 *FoxO1* 和  $\beta actin$  基因,筛选反应所需的合理循环次数。

1.5.3 凝胶电泳、凝胶成像和数据分析 取 2.5  $\mu\text{L}$  PCR 产物与微量溴酚蓝混合,进行琼脂糖凝胶电泳,Wealtec 凝胶成像系统拍照,并用 Dophin-1D 凝胶图像分析软件对条带进行光密度扫描定量,结果用 *FoxO1* 和  $\beta actin$  电泳带吸光度的比值表示。采用 DPS 统计软件进行单因素试验统计分析 with 显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 肝总 RNA 的质量检测及其浓度

在紫外分光光度计上对所提总 RNA 进行纯度鉴定,  $A_{260}$  为 0.058,  $A_{280}$  为 0.030,  $A_{260}/A_{280}$  为 1.933,其符合试验要求。总 RNA 浓度为 1 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。总 RNA 凝胶电泳检测,见图 1。

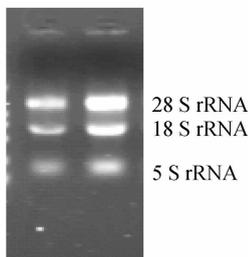
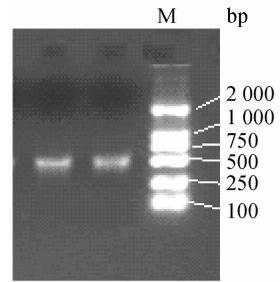


图 1 总 RNA 凝胶电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis profiles of total RNA

### 2.2 PCR 扩增 *FoxO1* cDNA 部分序列

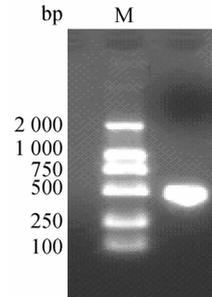
以猪肝总 RNA 逆转录产物为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物凝胶电泳检测见图 2,对 PCR 产物进行纯化回收,回收结果检测见图 3,双酶切鉴定见图 4。



M. DL2000 marker

图 2 PCR 产物凝胶电泳检测

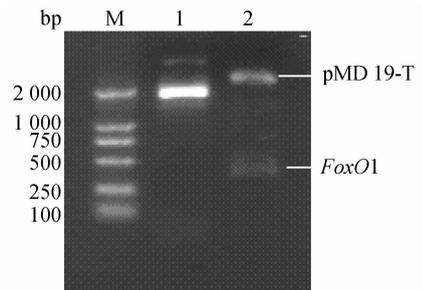
Fig. 2 Electrophoresis result of *FoxO1* PCR products



M. DL2000 marker

图 3 PCR 产物纯化回收凝胶电泳检测

Fig. 3 Electrophoresis result of depurated products



M. DL2000; 1. 重组质粒鉴定;2. 双酶切结果

M. DL2000; 1. PCR identification of recombinant plasmid pMD19; 2. *EcoR* I and *Xho* I restriction identification

图 4 重组质粒及双酶切鉴定

Fig. 4 *EcoR* I and *Xho* I restriction identification of recombinant plasmid

### 2.3 cDNA 序列的同源性分析

根据测序结果,*FoxO1* cDNA 部分序列长度 414 bp(见图 5),其 cDNA 序列通过 BLAST 比对,与人(Human)、黑猩猩(Chimpanzee)、大鼠(Rat)、牛(Cattle)和狗(Dog)的 cDNA 序列分别有 87%、87%、85%、87%、和 87% 的一致性,初步判定为猪

的 *FoxO1* cDNA 序列。该 cDNA 序列已提交 GenBank, 登录号为 DQ673620。

```

1  CCCAACTACC AAAAATACAC GTATGGCCAA TCCAGCATGA GCCCTTTGCC CCAGATGCCT
61  ATGCAACAC TTCAGGACAG CAAATCGAGT TACGGAGGCA TGGCCCACTA TAACTGTGCA
121 GCGGGACTCT TGAAGGAGTT ACTTACTTCC GACTCTCCTC CCCATAATGA CATTATGACC
181 CCAGTCGATC CGGGGGTGGC CCAACCCAAC AGCCGAGTCC TTGGCCAGAA TGTGCTGATG
241 GGCCTTAGTT CGGTTCATGCC AGCCTACGGC GGCCAGGCCT CTCATAACAA AATGATGAAT
301 CCCAGCTCCC ACAGCCACCC TGGACACGCT CAGTCCACGT CTGCCGTCAA TGGGCGTGCC
361 TTGCCCCACG CGGTGAACAC CATGCCCCAC GCCTCGGGGA TGAACCGCCT GACC

```

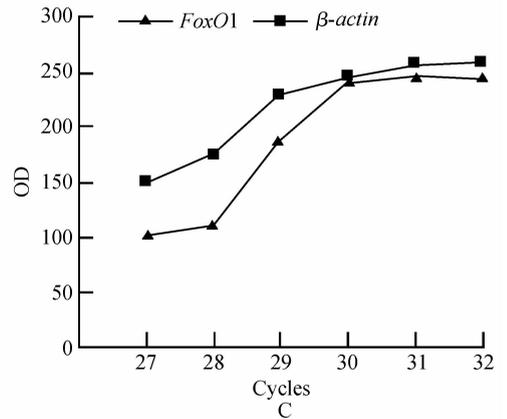
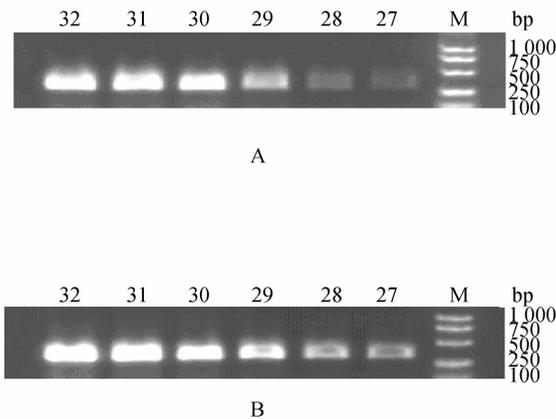
图 5 猪 *FoxO1* 基因部分片段的 cDNA 序列

Fig. 5 The partial cDNA sequence of pig *FoxO1* gene

## 2.4 确定组织表达检测中 PCR 反应的循环数

分别采用 27、28、29、30、31 和 32 次 PCR 循环扩增 *FoxO1* 和  $\beta$ actin 基因, 筛选反应所需的循环数, 结果见图 6A 和图 6B。对 *FoxO1* 的 PCR 产物电泳分析结果表明, 在 27~30 个循环之间, 基因产量呈线性扩增, 没有进入 PCR 反应的平台期(图 6

C), 可以进行半定量 RT-PCR 分析; 对  $\beta$ actin 的 PCR 产物电泳分析结果表明, 同样在 27~30 个循环之间, 基因产量呈线性扩增(图 6 C), 可以进行半定量 RT-PCR 分析, 因此本研究 *FoxO1* 和  $\beta$ actin 的 PCR 循环次数均采用 29 个循环。



A. 不同循环次数下 *FoxO1* 的 PCR 产物电泳图; B. 不同循环次数下  $\beta$ actin 的 PCR 产物电泳图; C. PCR 产物电泳条带 OD 值

A. PCR products on the agarose gel of *FoxO1*; B. PCR products on the agarose gel of  $\beta$ actin; C. OD analysis of electrophoretic bands of PCR products

图 6 不同循环数对 *FoxO1* 和  $\beta$ actin 扩增效率的影响

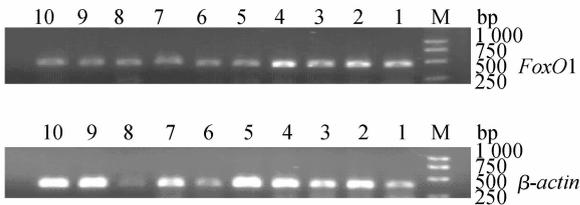
Fig. 6 Effect of cycles on PCR amplification efficiency of *FoxO1* and  $\beta$ actin

## 2.5 *FoxO1* 基因在初生猪和成年猪各组织中 mRNA 表达分析

对初生 1 日龄仔猪的 10 种组织用 RT-PCR 方法检测 *FoxO1* 基因的表达丰度情况, 每一组织均使用  $\beta$ actin 作为内参, 结果表明在所有检测组织中均得到目的扩增片断(扩增条带见图 7), 提示该基因在肝脏、肺脏、肾脏、脾脏、心脏、胃、皮下脂肪、内脏脂肪、背最长肌和股四头肌等 10 种组织中均有表达, 其中在内脏脂肪中相对表达丰度最高(相对表达

丰度比较见图 9 A), 在背最长肌、股四头肌和心脏中表达丰度较低, 且在平滑肌和骨骼肌中的表达差异不显著, 在皮下脂肪和内脏脂肪中表达丰度差异极显著。

对 9 月龄成年猪的 11 种组织用 RT-PCR 方法检测 *FoxO1* 基因的表达丰度情况, 每一组织均使用  $\beta$ actin 作为内参, 结果表明在所有检测组织中均得到目的扩增片断(扩增条带见图 8), 提示该基因在 11 种组织中(包括皮肤)均有表达, 在脾脏中相对表



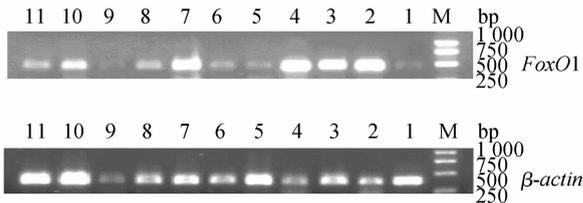
M. DL2000 marker; 1~10. 分别为肝、肺、肾、脾、股四头肌、皮下脂肪、心、内脏脂肪、胃及背最长肌; 以  $\beta$ -actin 为内参。下同

M. DL2000 marker; 1-10. Liver, lung, kidney, spleen, *m. quadriceps femoris*, subcutaneous adipose, heart, visceral adipose, stomach, and *m. longissimus dorsi*, respectively.  $\beta$ -actin as position control. The same as below

图 7 *FoxO1* 基因在初生猪(1 d) 10 种不同组织中的扩增条带

Fig. 7 The RT-PCR result of piglet *FoxO1* gene in 10 tissue samples

达丰度最高,在肝脏中最低(相对表达丰度比较见图 9B)。与初生猪有明显不同的是,成年猪的 *FoxO1* 表达丰度不仅在平滑肌和骨骼肌中有着显著差异,而且在不同类型的骨骼肌(背最长肌、股四头肌和皮肤)中也存在显著差异。



11. *m. cutaneus*. The same as below

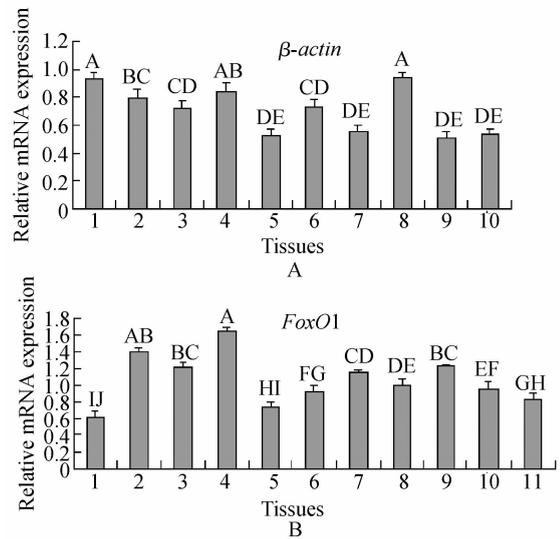
图 8 *FoxO1* 基因在成年猪(9 月龄) 11 种不同组织中的扩增条带

Fig. 8 The RT-PCR result of finished pig *FoxO1* gene in 11 tissue samples

不同组织中 *FoxO1* 基因的相对表达丰度显著性检验结果如图 9。在柱形图上方用大写字母注明差异显著性水平,其中字母完全相同者表示无显著性差异( $P > 0.05$ ),首个字母相同而第 2 个字母不同者表示有显著性差异( $P < 0.05$ ),字母完全不同者及其他情况表示有极显著差异( $P < 0.01$ ) (其中 A 和 AB 之间有极显著差异)。

### 3 讨论

作为一个新发现的基因,对其进行组织表达分析是功能研究的前提,因此从猪肝脏克隆出 *FoxO1*



A. 初生猪(1 日龄); B. 成年猪(9 月龄)

A. Piglet(1 d); B. Finished pig(270 d)

图 9 初生猪和成年猪各组织 *FoxO1* 基因 mRNA 相对表达丰度的比较及显著性检验

Fig. 9 The significance test of *FoxO1* mRNA expression in different tissues from piglet and finished pig

基因后,检测基础水平各组织中 *FoxO1* mRNA 的表达丰度,结果发现 *FoxO1* 在所检测的初生仔猪和成年猪各组织中均有表达,但表达丰度差异较大,进一步证实了 *FoxO1* 在有机体生命活动中存在着广泛的生物学效应。

对于成年猪, *FoxO1* 基因在肺、肾、脾、心和胃等组织中表达丰度较高,显示出其在代谢旺盛组织中的重要作用,这个结论与 Bouillet 等<sup>[11]</sup>的研究结果基本一致,与 Nakae 等<sup>[7]</sup>的研究结果稍有差异,主要表现在肝脏的组织表达上,这可能与所研究的动物类别和日龄有关。另外 *FoxO1* 在平滑肌和骨骼肌中表达差异较大,且在不同类型骨骼肌中也存在差异,背最长肌、股四头肌和皮肤分别属于多裂肌、纺锤形肌和板状肌,其位置和机能不同,活动强度也有很大差异,本试验结果显示,成年猪 *FoxO1* 在活动强度较大的股四头肌中表达丰度低,在活动强度较小的背最长肌中表达丰度高,而在活动强度一般的皮肤中表达丰度介于两者之间,三者差异极显著( $P < 0.01$ )。同时有研究表明, *FoxO1* 作为潜在因子与骨骼肌的分化以及成肌细胞分化中的肌管形成有重要关系<sup>[12,13]</sup>; Kamei 等用转基因鼠研究表明, *FoxO1* 负调控骨骼肌的量和 I 型肌纤维基因表达,不利于骨骼肌的功能发挥<sup>[9]</sup>,虽然其中具体的分

子调控机理还不清楚,但 *FoxO1* 在骨骼肌增殖与分化过程中的重要作用已得到证实,下一步还需从细胞水平和分子水平着手进行深入研究。

Leenders 等研究表明,在脾脏中 B 细胞和 T 细胞均表达 *FoxO1*, *FoxO* 可能是淋巴细胞成熟的标志性分子,在调控免疫细胞的细胞周期、细胞增殖及免疫应答过程中起一定作用<sup>[14]</sup>,而本试验也显示出成年猪脾脏中 *FoxO1* 的相对表达丰度在所检测的 11 种组织中最高,但尚未在胸腺、淋巴结及不同阶段的 T 细胞和 B 细胞中进行检测,这些也将成为下一步的研究内容,结合其他研究手段,以期进一步验证和探索 *FoxO1* 在机体免疫调节中的作用和功能。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Kaestner K H, Knöchel W, Martinez D E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors[J]. *Genes & Dev*, 2000, 14(2):142~146.
- [ 2 ] Czech M P. Insulin's expanding control of forkheads [J]. *PNAS*, 2003, 100(20): 11 198~11 200.
- [ 3 ] Arden K C, Biggs W H. Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 403 (2): 292~298.
- [ 4 ] Puig O, Marr M T, Ruhf M L, *et al.* Control of cell number by *drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(16):2 006~2 020.
- [ 5 ] Brikenkamp K U, Coffey P J. FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for[J]. *The Journal of Immunology*, 2003, 171(4):1 623~1 629.
- [ 6 ] Imae M, Fu Z, Yoshida A, *et al.* Nutritional and hormonal factors control the gene expression of FoxOs, the mammalian homologues of DAF-16[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2003, 30:253~262.
- [ 7 ] Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, *et al.* The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation[J]. *Dev Cell*, 2003, 4(1):119~129.
- [ 8 ] Brunet A, Sweeney L B, Sturgill J F, *et al.* Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase[J]. *Science*, 2004, 303 (5 666): 2 011~2 015.
- [ 9 ] Kamei Y, Miura S, Suzuki M, *et al.* Skeletal muscle FOXO1 (FKHR)-transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (slow twitch / red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:41 114~41 123.
- [10] Farmer Stephen R. The forkhead transcription factor Foxo1: a possible link between obesity and insulin resistance[J]. *Mol Cell*, 2003, 11:6~8.
- [11] Bouillet P, Metcalf D, Huang D C, *et al.* Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity[J]. *Science*, 1999, 286 (5 445): 1 735~1 738.
- [12] Bois P R, Brochard V F, Salin-Cantegrel A V, *et al.* FoxO1a-cyclic GMP-dependent kinase I interactions orchestrate myoblast fusion[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(17):7 645~7 656.
- [13] Hribal M L, Nakae J, Kitamura T, *et al.* Regulation of insulin-like growth factor dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 162(4):535~541.
- [14] Leenders H, Whitfield S, Benoist C, *et al.* Role of the forkhead transcription family member, FKHR, in thymocyte differentiation[J]. *Eur J Immunol*, 2000, 30(10):2 980~2 990.