

去乙酰化酶 1 基因对牛前体脂肪细胞 凋亡影响的研究 *

刘晓牧^{1, 2)} 宋恩亮^{1, 2)} 刘桂芬^{1, 2)} 吴公莹³⁾ 谭秀文^{1, 2)} 刘振山^{1, 2)} 万发春^{1, 2)**}

¹⁾山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 济南 250100; ²⁾山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 济南 250100;

³⁾山东畜牧兽医职业学院, 潍坊 261061)

摘要 去乙酰化酶 1 (sirtuin type 1, SIRT1) 是一个新的脂肪细胞调控因子, 通过与其靶基因叉头转录因子 1 (the forkhead box O family 1, FoxO1) 相互作用, 参与细胞增殖、分化、衰老、凋亡和代谢过程. 利用吖啶橙 (acridine orange, AO) 染色、流式细胞仪、荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 等技术方法, 研究 SIRT1 的抑制剂——烟酰胺 (nicotinamide, NAM) 处理后对鲁西黄牛皮下前体脂肪细胞 (bovine subcutaneous preadipocytes, BSP) 和肌内前体脂肪细胞 (bovine intramuscular preadipocytes, BIP) 凋亡的影响. 观察了 BSP 和 BIP 的凋亡形态; 比较了 SIRT1 基因抑制后, 相关基因如 FoxO1 等在两种细胞之间的表达差异. 结果表明, NAM 对 BSP 和 BIP 细胞表现出相同的生长抑制作用, 处理组的 BSP 和 BIP 细胞的凋亡率均显著高于对照组, 其作用可能通过抑制 SIRT1, 激活 FoxO1 凋亡通路实现. SIRT1 及其相关基因对 BSP 和 BIP 的调控存在不同途径.

关键词 去乙酰化酶 1 (SIRT1), 烟酰胺, 牛, 前体脂肪细胞, 凋亡

学科分类号 Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00583

脂肪细胞凋亡与脂肪细胞增殖、分化一样, 在调控脂肪细胞数目方面具有重要作用, 可作为降低体脂沉积的研究手段. Miller 等^[1]发现明显的体重下降是脂肪细胞体积减小和脂肪细胞数目减少引起的, 但并未证明细胞数目减少通过何种机制发生. Prins 等^[2]首次证明人类的脂肪细胞在体外培养时由于生长因子缺乏或轻微热损伤而导致凋亡, 并于 1997 年发现前体脂肪细胞经 TNF α 诱导后可发生凋亡^[3]. 以后许多学者对脂肪细胞凋亡过程及其影响因素进行了更深入的研究, 但多集中在 3T3-L1 脂肪细胞和人、鼠、猪原代培养的脂肪细胞方面^[4-8], 关于牛前体脂肪细胞凋亡方面的研究未见报道.

去乙酰化酶 1 (sirtuin type 1, SIRT1) 是依赖于 NAD⁺ 的组蛋白去乙酰酶, 为 sirtuins 家族成员之一^[9], 与细胞增殖、分化、衰老、凋亡和代谢密切相关, 已成为生命科学领域研究的热点之一^[10-11]. SIRT1 除作用于组蛋白外, 还将叉头转录因子 1 (the forkhead box O family 1, FoxO1)、生肌决定因子 (myogenic determination gene, MyoD)、肿瘤抑制因子 p53 等许多转录因子作为底物发挥作用. Wan 等^[12]发现牛皮下前体脂肪细胞 (bovine

subcutaneous preadipocytes, BSP) 和牛肌内前体脂肪细胞 (bovine intramuscular preadipocytes, BIP) 对丙酸的利用调控机制不同. 而 SIRT1 及其相关基因 FoxO1、PPAR γ 等对牛 BSP 和 BIP 凋亡影响及其差异未见报道. 本研究采用荧光显微镜、流式细胞仪和荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 等技术, 利用 SIRT1 抑制剂——烟酰胺 (nicotinamide, NAM)^[13-14] 研究探讨 SIRT1 对 BSP 和 BIP 凋亡的影响, 并比较两种细胞之间的基因表达差异, 为研究肉牛肌内脂肪发育、体脂沉积以及改善牛肉品质提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物. 健康无病、450 kg 左右、18 月龄鲁西黄牛阉公牛 3 头.

* 国家高技术研究发展计划(863)(2008AA101010)和国家现代农业(奶业)产业技术体系资助项目(nycyt-x-02-04).

** 通讯联系人.

Tel: 0531-88676857, E-mail: wanfc@sina.com

收稿日期: 2009-10-08, 接受日期: 2009-12-23

1.1.2 主要试剂与仪器.

胶原酶 I、青霉素和链霉素原液、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司; 胰岛素、地塞米松(dexamethasone, DEX)、甲基异丁基黄嘌呤(1-methyl-3-isobutylmethylxanthine, IBMX)、辛酸钠、转铁蛋白、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、油红 O、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、羟乙基哌嗪乙磺酸(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-ethane-sulphonic acid, HEPES)、吖啶橙染料(acridine orange, AO)均为 Sigma 公司产品; DMEM/F12 为 Hyclone 公司产品; Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品; PrimeScript™ First Strand cDNA Synthesis Kit、SYBR® Premix Ex Taq™(Perfect Real Time)、DNA marker I (100~600 bp)为 TaKaRa 公司产品; Annexin V-FITC 试剂盒为晶美生物工程有限公司产品; 所有引物由博尚生物技术有限公司(上海)合成.

SANYO MCO-17A CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司); Olympus IX71 倒置相差显微镜、Olympus Microscope Digital Camera Model DP71 显微镜成像系统及 Olympus BX51 荧光显微镜(日本 Olympus 公司); BD FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司); Bio-Rad PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); ABI PRISM 7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司).

1.2 方法

1.2.1 牛前体脂肪细胞培养.

参见 Liu 等的方法^[15], 无菌状态下取牛皮下脂肪组织和 6~7 肋肌间脂肪组织剪成 1 mm³ 大小的组织块, 加入 I 型胶原酶消化液(DMEM/F12+20 g/L BSA, 临用时加入 1 g/L I 型胶原酶), 恒温振荡水浴锅 37℃ 消化 30 min. 加血清培养液终止消化, 200 目细胞筛过滤, 滤液 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 DMEM/F12 无血清培养液(1 000 r/min 离心 10 min)洗 2 次后, 加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 生长培养液混匀, 制成细胞悬液, 计数、接种, 即获得牛前体脂肪细胞.

待细胞汇合后, 更换 DMEM/F12 生长培养液为诱导分化培养液, 诱导前脂肪细胞分化为脂肪细胞. 48h 后, 更换诱导分化培养液为基础分化培养液, 以后每 2~3 天换 1 次基础分化培养液, 维持脂肪细胞的成熟和脂滴的聚集. 分化后的脂肪细胞培养 12 天结束.

1.2.2 油红 O 染色和提取法. 分化后的脂肪细胞

培养 12 天结束, 按油红 O 染色法鉴定脂肪细胞: 倾去培养液, PBS 洗细胞 3 次, 10%甲醛的等渗盐缓冲液固定 40 min 后, PBS 漂洗, 吸取油红 O 工作液 10 ml, 油红 O 染色 30 min, 60%异丙醇分色 10~20 s, 自来水冲洗, 苏木精染色 10 min, 自来水冲洗, 甘油明胶封片拍照. 分化后的脂肪细胞培养 6 天、12 天, 油红 O 提取法: PBS 洗 3 次, 10%甲醛固定 30 min; PBS 洗 3 次, 1%油红 O 染色 40 min; 100%异丙醇振荡萃取 15 min; 选择波长 500 nm, 紫外分光光度计测定吸光度值^[16].

1.2.3 AO 染色. 在细胞分化的第 0 天, 更换为 NAM(对照组: 0 μmol/L, NAM 组: 500 μmol/L)处理培养液, 设 3 个重复. 干预 48 h 后, 收集细胞, 制备活细胞悬浊液为 10⁷ 个/ml, 与 AO 应用液混合滴于载玻片上, 盖玻片封片, 室温染色 5 min, 置于荧光显微镜下观察细胞核变化, 拍照记录, 或制作细胞爬片, 操作同上.

1.2.4 流式细胞术检测脂肪细胞凋亡. 用基础培养液制备细胞悬浮液, 调整细胞浓度为 5×10⁴ 个/ml, 接种于 25 cm² 培养瓶. 在细胞分化的第 0 天, 更换为 NAM(对照组: 0 μmol/L, NAM 组: 500 μmol/L)处理培养液, 设 3 个重复. 干预 48 h 后取出培养瓶, 分别收集细胞, 以磷脂结合蛋白 V(annexin V)/碘化丙锭(PI)双染法检测细胞凋亡, 按照试剂盒说明进行操作. 同时制备 3 个质控样本设定流式细胞仪的荧光补偿和设置十字门范围: a. 没有染色的细胞; b. 仅用荧光标记的 Annexin V 染色的细胞; c. 仅用 PI 染色的细胞. 结果利用 WinMDI2.9 软件分析, 通过计数凋亡区细胞数量得出凋亡率.

1.2.5 qPCR. 参见 Liu 等^[15]的方法, 以 5×10⁴/cm² 密度将细胞接种于 25 cm² 培养瓶, 在细胞分化的第 0 天, 更换为 NAM(0、500 μmol/L)处理培养液, 设 3 个重复. 干预 48 h 后取出培养瓶, 提取细胞总 RNA, 利用 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总 RNA 分子质量和纯度. 采用 SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)试剂盒(TaKaRa 公司)进行两步法 RT-PCR 反应体系. 反转录后, 取 2 μl cDNA 作模板, 加样于 96 孔板, 在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行 qPCR. SIRT1 及相关基因引物参见表 1. 以 18 S 为内参对照, 其他检测基因的相对表达量根据基因表达量相比而推算得到, 即相对表达量=2^{-ΔΔt}, 其中 Δt: Ct(待测基因)-Ct(内参基因), ΔΔt: Δt(处理组)-Δt(对照组). 本研究以未处理的 BIP 样本作为校正器和对照组, 即将校正器样

本的基因表达水平设定为 1.

Table 1 Primer sequences of PCR		
Gene	Primers	Product size/bp
SIRT1	F: CGTGCCAGAGTCCAAGTTTAG	119
	R: CTTCAAATACAGTTCCTCCAGC	
FoxO1	F: GCAACGCGTG GGGGCAACCTGT	115
	R: GGGCACGCTCTTACCATCCACTC	
PPAR γ	F: ATTTACACGATGCTGGCCTC	95
	R: GAGGCCAGCATCGTGTAAT	
Leptin ^[17]	F: TCTGTCTTACGTGGAGGCTGTGC	121
	R: TCTGTTTGGAGGAGACGGACTGC	
IGF-1 ^[17]	F: CTGCTTCCGGAGCTGTGATCTGAG	119
	R: TCCTTCTGAGCCTTGGGCATGTC	
GAPDH ^[18]	F: CACCCTCAAG ATTGTCAGCA	103
	R: GGTGATAAGTCCCTCCACGA	
18 S ^[19]	F: CGGTCGGCGTCCCCAACTT	97
	R: GCGTGCAGCCCCGGACATCTAA	

1.2.6 统计学分析. 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计分析软件中的 General Linear Model 模块 Univariate 命令进行两因素(NAM 处理、细胞) 方差分析.

2 结果与分析

2.1 牛前体脂肪细胞分化的形态学观察

BSP 和 BIP 形态无差别(图 1), 细胞在汇合前呈梭形或者不规则的三角形.

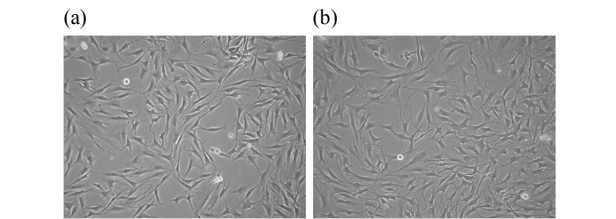


Fig. 1 Morphology of bovine preadipocyte
(a) Morphology of BSP before confluence. (b) Morphology of BIP before confluence. (x100)

脂肪细胞分化至 12 天左右, 细胞内脂肪滴数量和体积基本维持不变, 而脂肪滴逐渐呈现不透明的状态, 透光度下降, 细胞内脂滴的层叠现象明显, 大小脂滴混合, 细胞轮廓难以辨认(图 2).

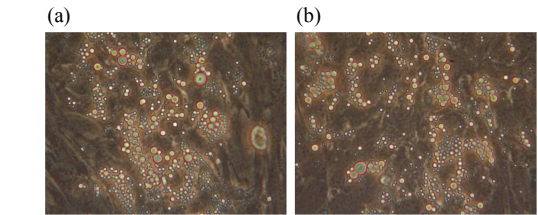


Fig. 2 Morphology of bovine preadipocyte after 12 days of differentiation
(a) BSP. (b) BIP. (x200)

油红 O 染色及提取法可简单、快速地检测体外培养的前体脂肪细胞转化为成熟脂肪细胞的百分率. 脂肪细胞内脂滴能被亲脂的油红 O 着色呈现红色, 从而证明所培养的细胞为脂肪细胞(图 3). BSP 在 6 天、12 天的 A 值分别以显著、极显著高于 BIP 的 A 值($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明 BSP 细胞中甘油三酯生成量明显增多(表 2).

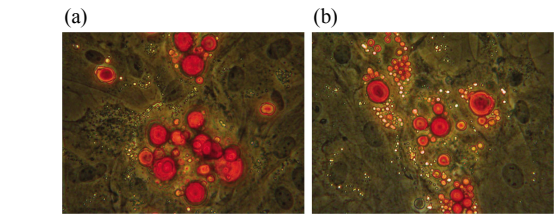


Fig. 3 Preadipocytes differentiation by Oil Red O Staining
(a) BSP. (b) BIP. (x400)

Table 2 Bovine preadipocytes by Oil Red O Extraction			
Cell	A(6d)	A(12d)	P
BIP	0.376 $\pm$ 0.079	0.599 $\pm$ 0.132	0.001
BSP	0.403 $\pm$ 0.098	0.682 $\pm$ 0.103**	0.001

$\bar{x} \pm s$, $n=3$. **BSP vs BIP ($P < 0.01$).

2.2 AO 染色结果

AO 具有膜通透性, 能透过细胞膜, 使核 DNA 和 RNA 染色, 与 DNA 结合量少发绿色荧光, 与 RNA 结合量多发桔黄色或桔红色荧光. 荧光显微镜下观察 AO 染色的细胞核可以发现, 正常脂肪细胞核饱满且呈现均匀的黄色或黄绿色荧光(图 4b, A), 部分发桔黄色或桔红色荧光(图 4a, A), 凋亡的细胞核染色质凝集固缩, 核碎裂, 形成凋亡小体(图 4a, B), 呈现致密浓染的黄绿色荧光(图 4b, B).

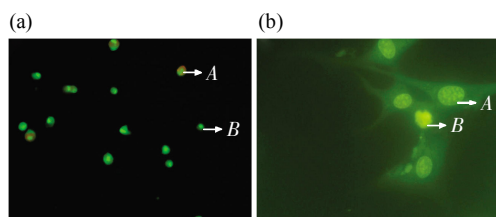


Fig. 4 AO staining result

(a) Cell suspension ($\times 40$). (b) Cells grow on cover glass ($\times 100$).
A: Normal cell; B: Apoptotic cell.

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

为了更好地定量确定 NAM 引起细胞凋亡的数量变化, 流式细胞仪检测如图 5 所示, 纵坐标和横坐标分别为 PI 荧光及 AnnexinV/FITC 荧光强度. 图 5 中第一象限代表细胞收集过程中出现的损伤细胞(An- PI+), 第二象限代表坏死细胞(An+ PI+), 第三象限代表正常细胞(An- PI-), 第四象限代表凋亡细胞(An+PI-). 由图 5 看出, 加入 500 $\mu\text{mol/L}$ NAM 作用脂肪细胞 48 h 后, 出现不同凋亡指数. 由表 3 可知, 加入 NAM 后, 细胞凋亡指数显著高于对照组($P < 0.01$), 且 BSP 的凋亡率高于 BIP ($P < 0.01$).

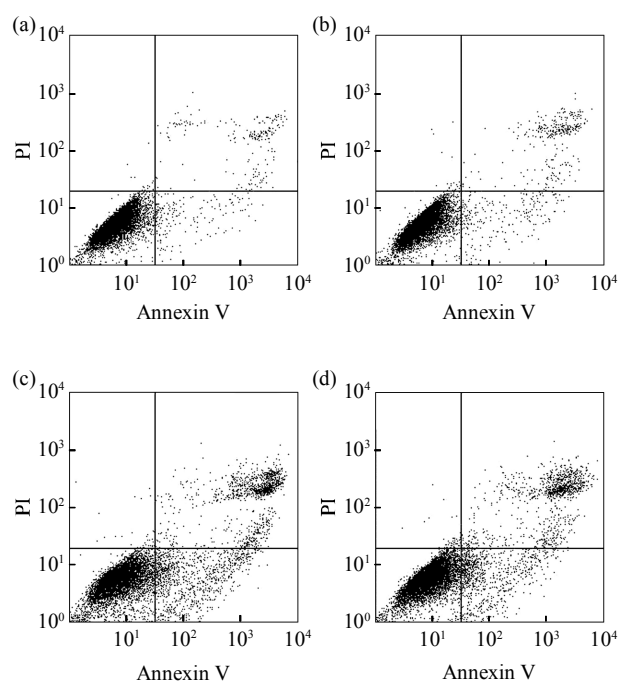


Fig. 5 Dimensional point pictures of bovine adipocytes under different treatments detected with flow cytometry
(a)(c) BIP. (b)(d) BSP. (a)(b) Control. (c)(d) NAM.

Table 3 Effects of different treatment on bovine preadipocytes apoptotic rate under the flow cytometry detection

Cell	Control	NAM	<i>P</i>
BIP	2.03 ± 0.24	10.32 ± 0.53	0.001
BSP	2.26 ± 0.35	$13.43 \pm 0.67^{**}$	0.001

$\bar{x} \pm s$, $n=3$. *P*: Control vs NAM. ** BSP vs BIP ($P < 0.01$).

2.4 SIRT1 基因及相关基因在牛前体脂肪细胞凋亡的表达

为了比较其他相关信号因子在细胞凋亡时的变化, 同时检测了 SIRT1 及其相关基因 FoxO1、PPAR γ 、GAPDH、IGF-1、Leptin 的表达情况. 由图 6 表明, NAM 作用 BSP 和 BIP 后, SIRT1 表达均极显著下降($P < 0.01$). FoxO1 和 IGF-1 表达均极显著上升($P < 0.01$). PPAR γ 和 GAPDH 在 BSP 的

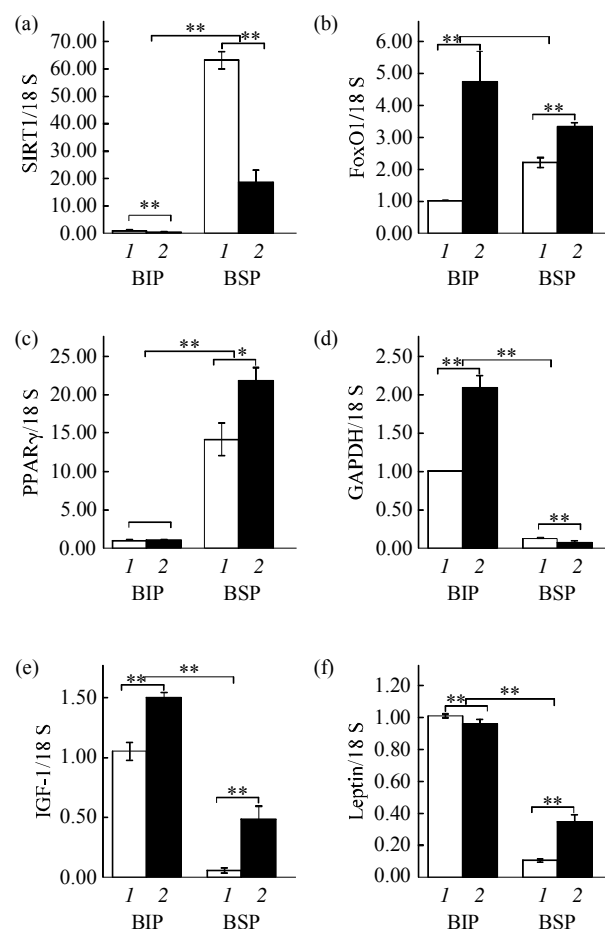


Fig. 6 Expression of genes in the bovine preadipocytes during apoptosis

(a) SIRT1. (b) FoxO1. (c) PPAR γ . (d) GAPDH. (e) IGF-1. (f) Leptin.
 $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $n=3$. 1: Control; 2: NAM.

表达显著上升($P < 0.05$), 而在 BIP 中差异不显著($P > 0.05$). GAPDH 在 BSP 中显著下降($P < 0.05$), 而在 BIP 中极显著上升($P < 0.01$), Leptin 与之相反, 即在 BSP 中极显著上升($P < 0.01$), 而在 BIP 中极显著下降($P < 0.01$).

比较 SIRT1、FoxO1、PPAR γ 、GAPDH、IGF-1、Leptin 在 BSP 和 BIP 中的表达差异, 可以看出, FoxO1 在 BSP 和 BIP 中的表达无显著差异($P > 0.05$), 而 SIRT1、PPAR γ 、GAPDH、IGF-1、Leptin 在 BSP 和 BIP 中的表达差异极显著($P < 0.01$). 结果说明 SIRT1 及其相关基因对 BSP 和 BIP 的调控可能存在不同途径.

3 讨 论

3.1 牛前体脂肪细胞分化的形态学观察

本研究观察到牛 BSP 和 BIP 分化过程中细胞形态无差别, 经油红 O 染色鉴定均能分化为成熟的脂肪细胞, 与 Wan 等^[12]观察到的牛前体脂肪细胞分化结果一致. 本研究发现 BSP 细胞中甘油三酯生成量明显增多, 说明 BSP 比 BIP 有更容易积聚脂滴的能力.

3.2 牛前体脂肪细胞凋亡

本研究观察到牛前体脂肪细胞凋亡的形态学变化为: 细胞体积缩小, 细胞浆凝缩, 染色质逐渐凝集, 细胞核固缩断裂, 胞膜不断出芽、脱落, 细胞变成数个大小不等的由膜包裹的凋亡小体. 在整个过程中, 细胞膜一直保持完整, 胞内容物不释放出来, 与林亚秋等^[8]观察到的猪前体脂肪细胞凋亡结果一致.

本文采用 Annexin V 和 PI 双染的方法检测早期细胞凋亡. 细胞发生凋亡时, 位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸外翻, 由于 Annexin V 能特异地与磷脂酰丝氨酸结合, 根据结合量的变化可反映凋亡细胞的百分率. 此方法减少了坏死细胞的干扰, 增加了试验的可信性. 本研究检测到 NAM 对牛前体脂肪细胞有一定程度的凋亡诱导作用, 可能首先与上皮细胞膜上受体结合, 引发细胞内一系列的级联反应, 破坏了 DNA 完整性, 最终导致细胞凋亡.

3.3 SIRT1 及其相关基因对牛脂肪细胞凋亡的调控

SIRT1 对细胞凋亡的功能调节是复杂的反馈调节过程, 既有抑制凋亡作用, 又有促进凋亡作用^[20]. SIRT1 不仅使组蛋白去乙酰化, 还可以使 FoxO1^[11, 21]、MyoD^[22]、肿瘤抑制因子 p53^[23]以及 PGC-1 α ^[24-25]等去乙酰化而具有抑制凋亡的作用. 但

Jin 等^[20]研究发现, SIRT1 在某些细胞系(如 LoVo)可定位于细胞质(cytoplasm-localized), 而定位于细胞质中的 SIRT1 可促进细胞凋亡. FoxO 家族是 INS/IGF-1 信号通路中的关键因子, 其上游受磷酸肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3/PKB) 磷酸化级联通路的调节, 下游靶基因与细胞增殖、分化、代谢、凋亡及基因表达密切相关. SIRT1 对 FoxO 家族相关基因的作用, 既有激活作用又有抑制作用^[10]. SIRT1 通过去乙酰化抑制 FoxO3a 的转录因子活性, 降低 FoxO3a 的表达^[26]. SIRT1 的表达同时又受 FoxO3a 的调节, SIRT1 的启动子含有 2 个 p53 结合元件, FoxO3a 与 p53 结合成蛋白质复合体, 驱动 SIRT1 基因的表达^[21]. Bai 等^[27]报道 SIRT1 可通过 FoxO1 及其靶基因来调控猪前体脂肪细胞增殖与分化. 本试验初步检测了 SIRT1 及其相关基因 FoxO1、PPAR γ 、IGF-1、Leptin 的表达, 用 NAM 抑制 SIRT1 后, 促进了细胞凋亡, 也就是说 SIRT1 有抑制凋亡的作用, 同时 SIRT1 在 BSP 中的表达高于 BIP, FoxO1 表达均比对照组显著增加. 由此我们推测, SIRT1 负调控 FoxO1, 通过 FoxO1 及其靶基因来调控牛前体脂肪细胞凋亡, 在 BSP 中减缓脂肪细胞的凋亡速度高于 BIP, 进而造成皮下脂肪比肌肉脂肪更容易沉积.

Qian 等^[28]研究表明, Leptin 可通过中枢性作用引起脂肪细胞凋亡, 并且认为 Leptin 诱导的信号导致 PPAR γ 磷酸化可能是脂肪细胞凋亡信号传导的重要一步. Della-Fera 等^[29]报道 Leptin 促进鼠脂肪细胞和前脂肪细胞凋亡, 并且凋亡率与 Leptin 浓度呈正相关. 本研究中 BIP 的 Leptin 表达显著高于对照组, 与以上研究结果相一致, 但在 BSP 中差异不显著, 说明 Leptin 在 BIP 中的作用更敏感.

李咏等^[30]用 50 mmol/L NAM 作用人乳腺癌 MCF27 细胞后, 激活 caspase 凋亡通路. 由于本研究的 NAM 浓度是 500 μ mol/L, 不排除该作用浓度下除了抑制 SIRT1 活性之外, 还抑制其他蛋白质而引起细胞凋亡. 由于并未检查 NF- κ B 信号通路及 caspase3、Bcl-2 等的表达, 而且 NAM 在抑制 SIRT1 表达外, 是否提高了其他促凋亡因子的活性, 或抑制了其他酶活, 其作用机制有待于进一步研究.

本研究利用 AO 染色、流式细胞仪、qPCR 等技术方法研究 NAM 处理后对 BSP 和 BIP 凋亡的影

响, 并比较两种细胞之间的基因表达差异. 结果表明, 用 NAM 处理抑制 SIRT1 基因后, BSP 和 BIP 的凋亡率均显著高于对照组. SIRT1 负调控 FoxO1, 通过 FoxO1 及其靶基因来调控前体脂肪细胞凋亡, 减缓脂肪细胞的凋亡速度, 从而使皮下脂肪比肌内脂肪更容易沉积. 但关于 SIRT1 抑制牛前体脂肪细胞凋亡的分子机理仍需要深入探讨.

参 考 文 献

- [1] Miller W H J, Faust I M, Goldberger A C, *et al.* Effects of severe long-term food deprivation and refeeding on adipose tissue cells in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1983, **245**(1): E74-E80
- [2] Prins J B, Walker N I, Winterford C M, *et al.* Apoptosis of human adipocytes *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **201**(2): 500-507
- [3] Prins J B, Niesler C U, Winterford C M, *et al.* Tumor necrosis factor- α induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes*, 1997, **46**(12): 1939-1944
- [4] Magun R, Gagnon A, Yaraghi Z, *et al.* Expression and regulation of neuronal apoptosis inhibitory protein during adipocyte differentiation. *Diabetes*, 1998, **47**(12): 1948-1952
- [5] Niesler C U, Urso B, Prins J B, *et al.* Igf-I inhibits apoptosis induced by serum withdrawal, but potentiates TNF- α -induced apoptosis, in 3T3-L1 preadipocytes. *J Endocrinology*, 2000, **167**(1): 165-174
- [6] Sun X C, Zemel M B. Role of uncoupling protein 2 (Ucp2) expression and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D-3 in modulating adipocyte apoptosis. *FASEB J*, 2004, **18**(10): 1430-1432
- [7] Kim H K, Della-Fera M, Lin J, *et al.* Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr*, 2006, **136**(12): 2965-2969
- [8] 林亚秋, 庄和林, 杨公社. 维甲酸 α 受体 (RXR α) 对猪前体脂肪细胞凋亡的影响. *农业生物技术学报*, 2009, **17**(3): 419-425
Lin Y Q, Zhuang H L, Yang G S. *J Agricultural Biotechnology*, 2009, **17**(3): 419-425
- [9] Alcendor R R, Kirshenbaum L A, Imai S, *et al.* Silent information regulator 2 α , a longevity factor and class Iii histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circ Res*, 2004, **95**(10): 971-980
- [10] Giannakou M E, Partridge L. The interaction between Foxo and Sirt1: tipping the balance towards survival. *Trends Cell Biol*, 2004, **14**(8): 408-412
- [11] Brunet A, Sweeney L B, Sturgill J F, *et al.* Stress-dependent regulation of Foxo transcription factors by the Sirt1 deacetylase. *Science*, 2004, **303**(5666): 2011-2015
- [12] Wan R, Du J, Ren L, *et al.* Selective adipogenic effects of propionate on bovine intramuscular and subcutaneous preadipocytes. *Meat Science*, 2009, **82**(3): 372-378
- [13] Bitterman K J, Anderson R M, Cohen H Y, *et al.* Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast Sir2 and human Sirt1. *J Biol Chem*, 2002, **277**(47): 45099-45107
- [14] Jackson M D, Schmidt M T, Oppenheimer N J, *et al.* Mechanism of nicotinamide inhibition and transglycosylation by Sir2 histone/protein deacetylases. *J Biol Chem*, 2003, **278**(51): 50985-50998
- [15] Liu X M, Fu J L, Song E L, *et al.* Effect of nicotinamide on proliferation, differentiation, and energy metabolism in bovine preadipocytes. *Asian-Aust. J Anim Sci*, 2009, **22**(9): 1320-1327
- [16] Wolfram S, Raederstorff D, Wang Y, *et al.* Teavigo (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Annal Nutrition Metabolism*, 2005, **49**(1): 54-63
- [17] Kim Y K, Choi H, Myung K H. Effects of propylene glycol on carcass traits and its related gene expression in Korean native steers. *J Anim Sci*, 2005, **83**(2): 344-349
- [18] Komatsu T, Itoh F, Mikawa S, *et al.* Gene expression of resistin in adipose tissue and mammary gland of lactating and non-lactating cows. *J Endocrinology*, 2003, **178**(3): R1-5
- [19] Lehnert S A, Reverter A, Byrne K A, *et al.* Gene expression studies of developing bovine *Longissimus* muscle from two different beef cattle breeds. *BMC Developmental Biology*, 2007, **7**: 95-108
- [20] Jin Q, Yan T, Ge X, *et al.* Cytoplasm-localized Sirt1 enhances apoptosis. *J Cell Physiol*, 2007, **213**(1): 88-97
- [21] Motta M C, Divecha N, Lemieux M, *et al.* Mammalian Sirt1 represses forkhead transcription factors. *Cell*, 2004, **116**(4): 551-563
- [22] Fulco M, Schiltz R L, Iezzi S, *et al.* Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell*, 2003, **12**(1): 51-62
- [23] Luo J, Nikolaev A Y, Imai S, *et al.* Negative control of P53 by Sir2 α promotes cell survival under stress. *Cell*, 2001, **107**(2): 137-148
- [24] Gerhart-Hines Z, Rodgers J T, Bare O, *et al.* Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through Sirt1/Pgc-1 α . *EMBO J*, 2007, **26**(7): 1913-1923
- [25] Rodgers J T, Lerin C, Haas W, *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of Pgc-1 α and Sirt1. *Nature*, 2005, **434**(7029): 113-118
- [26] Nemoto S, Fergusson M M, Finkel T. Nutrient availability regulates Sirt1 through a forkhead-dependent pathway. *Science*, 2004, **306**(5704): 2105-2108
- [27] Bai L, Pang W J, Yang Y J, *et al.* Modulation of sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Mol Cell Biochem*, 2008, **307**(1): 129-140
- [28] Qian H, Azain M J, Compton M M, *et al.* Brain administration of leptin causes deletion of adipocytes by apoptosis. *Endocrinology*, 1998, **139**(2): 791-794
- [29] Della-Fera M A, Qian H, Baile C A. Adipocyte apoptosis in the regulation of body fat mass by leptin. *Diabetes Obes Metab*, 2001, **3**(5): 299-310
- [30] 李咏, 徐榕, 张秀敏, 等. SIRT1 去乙酰化酶抑制剂引起人乳腺癌 MCF-7 耐药细胞凋亡的机制. *药理学学报*, 2008, **43**(10): 1003-1010
Li Y, Xu R, Zhang X M, *et al.* *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2008, **43**(10): 1003-1010

Effect of SIRT1 on Apoptosis of Bovine Preadipocytes*

LIU Xiao-Mu^{1,2)}, SONG En-Liang^{1,2)}, LIU Gui-Fen^{1,2)}, WU Gong-Ying³⁾,
TAN Xiu-Wen^{1,2)}, LIU Zhen-Shan^{1,2)}, WAN Fa-Chun^{1,2)**}

⁽¹⁾ *Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China;*

⁽²⁾ *Shandong Key Laboratory of Animal Disease Control and Breeding, Jinan 250100, China;*

⁽³⁾ *Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 261061, China)*

Abstract Sirtuin type 1 (SIRT1), a novel regulatory factor of adipocyte and myocyte, interacts with target the forkhead box O family 1 (FoxO1) to modulate cell proliferation and differentiation, aging, apoptosis and metabolism. The effect of nicotinamide (NAM, inhibitor of SIRT1) on the apoptosis of bovine preadipocytes was investigated with Acridine Orange (AO) staining, the flow cytometry detection and quantitative real-time PCR (qPCR). The results showed that NAM inhibited the differentiation of bovine subcutaneous preadipocytes (BSP) and bovine intramuscular preadipocytes (BIP), and their apoptosis rates were higher than control. SIRT1 influenced the apoptosis of bovine preadipocytes by regulating FoxO1 and adipocyte marker genes. The different mechanisms of SIRT1 and its related genes exist in BSP and BIP.

Key words SIRT1, nicotinamide, bovine, preadipocytes, apoptosis

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00583

*This work was supported by grants from Hi-Tech Research and Development Program of China (2008AA101010) and The Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research(nycyt-02-04).

**Corresponding author.

Tel: 86-531-88676857, E-mail: wanfc@sina.com

Received: October 8, 2009 Accepted: December 23, 2009