

李碧侠, 赵芳, 任守文, 等. *SIRT1* 基因对猪卵巢颗粒细胞中生殖激素受体基因表达量的影响[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 123-127.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.019

## *SIRT1* 基因对猪卵巢颗粒细胞中生殖激素受体基因表达量的影响

李碧侠, 赵芳, 任守文, 付言峰

(江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了探讨 *SIRT1* 基因在猪卵巢颗粒细胞生殖激素分泌中的作用, 采用白藜芦醇和尼克酰胺处理猪卵巢颗粒细胞, 检测猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* 基因和生殖激素受体表达水平, 分析 *SIRT1* 基因与生殖激素受体表达量的相关性。结果表明, 白藜芦醇和尼克酰胺可剂量依赖性地调节猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* 基因表达, *SIRT1* 基因表达量的升高可引起 *ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、*LHR* 表达量上调, 其相关系数分别为 0.820 6、0.519 7 和 0.140 7。说明, *SIRT1* 基因参与猪卵巢颗粒细胞生殖激素受体表达调控, 可影响猪卵巢颗粒细胞生殖激素分泌。

**关键词:** 猪; 卵巢颗粒细胞; *SIRT1*; 生殖激素受体

**中图分类号:** S634.3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-4440(2016)01-0123-05

## Role of *SIRT1* gene in expression of reproductive hormone receptor genes in porcine ovarian granulosa cells

LI Bi-xia, ZHAO Fang, REN Shou-wen, FU Yan-feng

(Institute of Animal Husbandry, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/ Jiangsu Provincial Platform for Conservation and Utilization of Agricultural Germplasm, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To explore the role of *SIRT1* gene in secretion of reproductive hormones in porcine ovarian granulosa cells, quantitative real-time PCR was employed to detect the mRNA expressions of *SIRT1* gene and reproductive hormone receptors genes in granulosa cells treated with resveratrol and nicotinamide. The correlation between expression levels of *SIRT1* and reproductive hormone receptors genes was also analysed by SPSS software. Results showed that expression of *SIRT1* gene was regulated by resveratrol and nicotinamide in granulosa cells in a dose-dependent manner. With the upregulation of *SIRT1* mRNA expression, mRNA expressions of *ER<sub>2</sub>*, *FSHR*, *LHR* were increased. Correlations between *SIRT1* and *ER<sub>2</sub>* expressions, between *SIRT1* and *FSHR* expressions and between *SIRT1* and *LHR* expressions were positively linear, with the correlation coefficients of 0.820 6, 0.519 7 and 0.140 7, respectively. These results suggest that *SIRT1* may take part in the regulation of reproductive hormone receptors expressions, thereby affecting the secretion of reproductive hormones in porcine ovarian granulosa cells.

**Key words:** porcine; ovarian granulosa cell; *SIRT1*; reproductive hormone receptor

收稿日期: 2015-07-06

**基金项目:** 国家生猪现代产业技术体系南京综合试验站项目(CARS-36); 江苏省农业种质资源库项目(BM2011134); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)2069]

**作者简介:** 李碧侠(1979-), 女, 江苏泗阳人, 博士, 副研究员, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。(E-mail) bxli790@ sina.com

*SIRT1* 是一种二氢尿嘧啶脱氢酶((Nicotinamide adenine dinucleotide, *NAD*<sup>+</sup>) 依赖的具有去乙酰化酶活性的多功能转录调节因子, 能够使一些非组蛋白转录因子底物, 如 *p53*、*FOXO1*、*FOXO3a*、*PPAR $\gamma$* 、*PGC1 $\alpha$*  等去乙酰化, 从而广泛参与众多基因转录、能量代谢

及细胞衰老等调节过程<sup>[1-5]</sup>。近年来研究发现,人、小鼠和猪的 *SIRT1* 基因与生殖激素分泌存在密切相关,直接或间接参与生殖调控<sup>[6-8]</sup>。在小鼠和人的卵巢组织中可检测到 *SIRT1* 蛋白,同时发现 *SIRT1* 蛋白主要定位于卵巢颗粒细胞中,且 *SIRT1* mRNA 表达量与黄体化颗粒细胞分泌孕酮能力存在较强的相关<sup>[9]</sup>。雌性小鼠双侧卵巢切除模型研究发现,多种组织中 *SIRT1* 蛋白表达量明显减少,在卵巢、心脏、主动脉和骨骼肌中减少得尤为明显<sup>[10-11]</sup>。*SIRT1* 与生殖激素分泌存在较大相关性,直接或间接参与生殖调控,但具体机制尚不清楚。

卵巢颗粒细胞是目前广泛用于相关基因研究的有效且成熟的细胞模型<sup>[12-13]</sup>,颗粒细胞中生殖激素受体表达水平直接影响颗粒细胞分泌生殖激素的能力。因此,本研究通过白藜芦醇激活 *SIRT1* 基因表达和尼克酰胺抑制 *SIRT1* 基因表达,分析 *SIRT1* 基因表达量对猪卵巢颗粒细胞中生殖激素受体表达水平的影响。该研究将有助于更好地探究 *SIRT1* 基因在猪卵巢颗粒细胞生殖激素分泌中的作用,为揭示 *SIRT1* 基因影响猪生殖调控机制提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验猪由江苏省农业科学院六合猪场提供,采集新鲜健康的猪卵巢,置于 37 ℃ 生理盐水(添加青霉素和链霉素)中,2 h 内带回实验室。

### 1.2 试剂

新生胎牛血清、DMEM-F12 液体培养基购自 GIBCO 公司;尼克酰胺(NAM)、二甲亚砜(DMSO)、白藜芦醇(RES)购自 SIGMA 公司;Trizol 购自 Invitrogen

公司;SYBR Premix Ex Taq TM 购自 TaKaRa 公司;M-MLV Reverse Transcriptase 购自 FERMENTAS 公司;其他试剂自行配制。

### 1.3 猪卵巢颗粒细胞培养

采集新鲜猪卵巢经生理盐水冲洗后,用一次性注射器抽取健康卵泡的卵泡液,950 g 离心 4 min,收集细胞。加入适量 PBS 悬浮,并清洗细胞。吸取适量细胞培养基将细胞重悬浮,调整细胞密度至  $1 \text{ ml } 10^6$ ,接种于 25 ml 培养瓶中,每个培养瓶加 3 ml 细胞培养基,做相应标记,置于 37 ℃、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,12 h 后观察细胞贴壁状况,24 h 后换液。猪卵巢颗粒细胞密度达到 80% 时,分别以  $10 \text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $25 \text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $50 \text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $75 \text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $100 \text{ }\mu\text{mol/L}$  的白藜芦醇和尼克酰胺处理 24 h,采用荧光定量 PCR 技术检测猪卵巢颗粒细胞中相关生殖激素受体基因 mRNA 表达量。以无白藜芦醇和尼克酰胺处理为空白对照。

### 1.4 荧光定量 PCR 检测

根据 GenBank 中公布的猪 *SIRT1*、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)、雌激素受体( $\text{ER}_2$ )、促卵泡激素受体(*FSHR*)、黄体素受体(*CHR*)基因序列设计引物(表 1),引物由上海生物工程技术公司合成。Trizol 法提取猪卵巢颗粒细胞总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 质量和浓度,进行反转录、荧光定量 PCR 扩增。目的基因、管家基因荧光定量 PCR 程序为:反应总体积  $25.0 \text{ }\mu\text{l}$ ,包括 SYBR premixes Taq TM  $12.5 \text{ }\mu\text{l}$ ,上下游正反引物( $10 \text{ }\mu\text{mol/L}$ )各  $0.5 \text{ }\mu\text{l}$ ,cDNA 模板  $1.0 \text{ }\mu\text{l}$ ,去离子水  $10.5 \text{ }\mu\text{l}$ ,设无模板对照。采用两步法,反应条件均为:94 ℃ 预变性 10 s;94 ℃ 10 s,58 ℃ 20 s,72 ℃ 15 s,35 个循环。每个处理重复 3 次。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used in quantitative real-time PCR

基因	GenBank 登录号	引物序列	PCR 产物 (bp)
<i>SIRT1</i>	EU200984.1	正向: ATTCTTGTGAAAGTGATGAGGAT 反向: ATTGTTTCGAGGATCTGTGCC	130
<i>GAPDH</i>	NC_010447.3	正向: TGAAGGTCGGAGTGAACGGAT 反向: TGGGTGGAATCATACTGGAAC	148
$\text{ER}_2$	EF195768	正向: CGATAGAGAAGAACCGCGTAAAA 反向: AGCAGCTCCTTCACTCGGGTTGT	202
<i>FSHR</i>	NM_214386.3	正向: GATTTGGGGACCTGGAGAAA 反向: TTTGGGCAGATTGGAGAACA	86
<i>LHR</i>	NM_214449.1	正向: TGTGAAAGCACAGCAAGGAG 反向: TTGAGTGTCTTGGGTGAGC	117

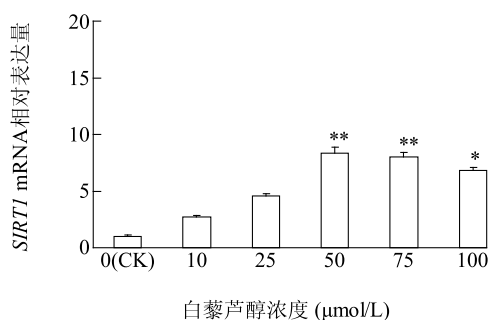
## 1.5 数据统计分析

采用 SPSS13.0 软件进行不同浓度白藜芦醇、尼克酰胺处理组中 *SIRT1*、*GAPDH*、*ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、*LHR* 表达量的方差分析以及 *SIRT1* 与 *ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、*LHR* 表达量的相关分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度白藜芦醇、尼克酰胺对 *SIRT1* 表达量的影响

采用荧光定量 PCR 方法,检测不同浓度白藜芦醇、尼克酰胺对猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* mRNA 表达量的影响。结果表明,随着白藜芦醇浓度的升高,*SIRT1* mRNA 表达量逐渐增多。培养液中白藜芦醇浓度低于 25  $\mu\text{mol/L}$  时,处理组猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* mRNA 表达量与空白对照组无显著差异。白藜芦醇浓度达到 50  $\mu\text{mol/L}$  时,处理组猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* mRNA 表达量达最大,极显著高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ) (图 1)。相反,随着尼克酰胺浓度的升高,猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* mRNA 表达量逐渐减少。培养液中尼克酰胺浓度达到 50  $\mu\text{mol/L}$  时,处理组猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* mRNA 表达量极显著低于空白对照组 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。因此,选用浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  的白藜芦醇和尼克酰胺用于后续试验。

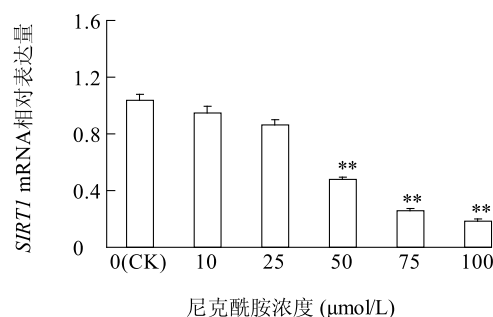


\* 和 \*\* 分别表示相应处理组与空白对照组差异达到 0.05 和 0.01 显著水平。

图 1 白藜芦醇处理的猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* mRNA 表达量  
Fig.1 The expression levels of *SIRT1* mRNA in porcine ovarian granulosa cells treated with resveratrol

### 2.2 白藜芦醇和尼克酰胺对猪卵巢颗粒细胞中 *ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、*LHR* 表达量的影响

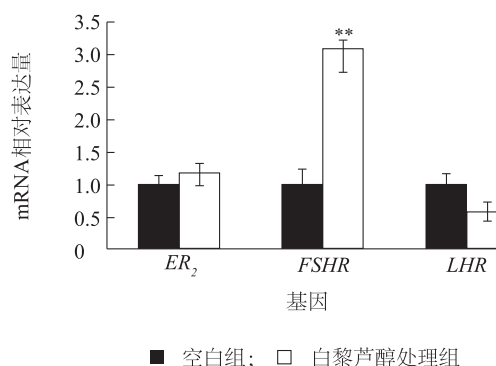
采用荧光定量 PCR 方法,分析浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇和尼克酰胺处理组中 *ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、



\*\* 表示相应处理组与空白对照组差异达到 0.01 显著水平。

图 2 尼克酰胺处理的猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* mRNA 表达量  
Fig.2 The expression levels of *SIRT1* mRNA in porcine ovarian granulosa cells treated with niacinamide

*LHR* mRNA 表达量。结果表明,白藜芦醇处理组中,*FSHR* mRNA 表达量极显著高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ),*ER<sub>2</sub>* mRNA 表达量与空白对照组差异未达到显著水平 ( $P > 0.05$ ),*LHR* mRNA 表达量低于空白对照组,但差异也未达到显著水平 ( $P > 0.05$ ) (图 3); 而尼克酰胺处理组中,*ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、*LHR* mRNA 表达量均极显著低于空白对照组 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。



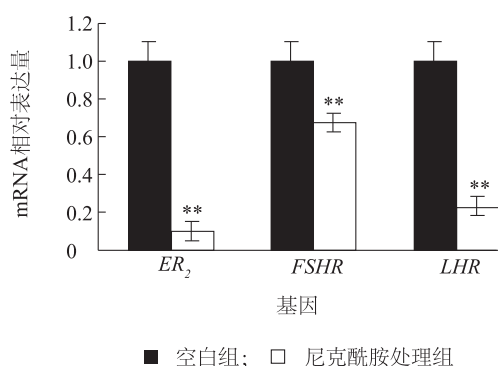
\*\* 表示相应处理组与空白对照组差异达到 0.01 显著水平。

图 3 白藜芦醇处理的猪卵巢颗粒细胞中 *ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、*LHR* 表达量

Fig.3 The expression levels of *ER<sub>2</sub>*, *FSHR*, *LHR* mRNA in porcine ovarian granulosa cells treated with resveratrol

### 2.3 猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* 基因与 *ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、*LHR* 基因表达量的相关性

为了探讨颗粒细胞中 *SIRT1* 表达量对 *ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、*LHR* mRNA 表达量的影响,本研究分析了 *SIRT1* mRNA 表达量与 *ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、*LHR* mRNA 表达量的相关性。结果表明,*SIRT1* mRNA 表达量与 *FSHR* 和 *ER<sub>2</sub>* 存在较强的正相关,相关系数分别为



\*\* 表示相应处理组与空白对照组差异达到 0.01 显著水平。

图 4 尼克酰胺处理的猪卵巢颗粒细胞中 *ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、*LHR* 表达量

Fig.4 The expression levels of *ER<sub>2</sub>*, *FSHR*, *LHR* mRNA in porcine ovarian granulosa cells treated with niacinamide

0.820 6和0.519 7; *SIRT1* 与 *LHR* 也存在正相关,但相关系数仅为0.140 7。

表 2 *SIRT1* 与 *ER<sub>2</sub>*、*FSHR*、*LHR* 表达量的相关系数

Table 2 The correlation analysis between *SIRT1* and *ER<sub>2</sub>*, *FSHR*, *LHR* expression levels

基因	<i>SIRT1</i>	<i>LHR</i>	<i>FSHR</i>	<i>ER<sub>2</sub></i>
<i>SIRT1</i>	1.000 0			
<i>LHR</i>	0.140 7	1.000 0		
<i>FSHR</i>	0.820 6*	-0.056 7	1.000 0	
<i>ER<sub>2</sub></i>	0.519 7*	0.653 0*	0.592 3*	1.000 0

\* 表示相关系数达到 0.05 显著水平。

### 3 讨论

母猪生殖激素在体内受到下丘脑-垂体-卵巢轴的调节,下丘脑释放 GnRH,刺激垂体前叶释放 FSH 和 LH,FSH 和 LH 与卵巢上特定受体结合,促进卵巢内卵泡的生长发育、成熟、排卵<sup>[14-15]</sup>。成熟的卵泡分泌雌二醇,排卵后的卵泡形成黄体,黄体分泌的孕酮维持妊娠过程<sup>[16]</sup>。因此,卵巢上生殖激素受体表达水平,直接影响卵巢内卵泡的生长发育,从而影响母猪产仔数量。

近年来研究发现,在哺乳动物黄体细胞、卵母细胞、颗粒细胞中均存在 *SIRT1* 基因表达。人和小鼠的 *SIRT1* 基因与卵巢中孕酮、雌激素分泌存在密切相关性<sup>[17]</sup>。体外研究结果已证实,*SIRT1* 通过蛋白去乙酰化,增加 p53、NF- $\kappa$ B、FOXO3a、STAT3 等活

性,促进颗粒细胞凋亡。*SIRT1* mRNA 表达量与雌激素分泌水平存在较强的正相关性<sup>[18]</sup>。随后研究发现,激活 *SIRT1* 信号通路,可显著影响颗粒细胞分泌 P4 和 IGF-1 能力,但具体作用机制尚不明确<sup>[19]</sup>。因此,本研究分析 *SIRT1* 基因表达量的变化对猪卵巢颗粒细胞中生殖激素受体表达水平的影响,结果表明,白黎芦醇可有效激活 *SIRT1* 基因表达,而尼克酰胺可显著地抑制 *SIRT1* 基因表达,*FSHR*、*ER<sub>2</sub>* 表达量随着 *SIRT1* 基因表达量的变化呈现规律性的改变,相互间存在较强的相关性,相关系数分别达到 0.820 6和0.519 7。该结果表明,猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* 表达水平影响 *FSHR*、*ER<sub>2</sub>*、*LHR* 表达量,*SIRT1* 基因表达量的升高可显著增强 *FSHR* 表达水平;而 *SIRT1* 基因表达量下降,可显著降低 *FSHR*、*ER<sub>2</sub>*、*LHR* 表达量。因此,*SIRT1* 基因表达量的变化可改变猪卵巢颗粒细胞中生殖激素 FSH、E<sub>2</sub>、LH 的敏感性,从而影响猪卵巢卵泡发育。

综上所述,白黎芦醇和尼克酰胺可有效激活或抑制 *SIRT1* 基因表达,*SIRT1* 基因的表达可影响 *FSHR*、*ER<sub>2</sub>*、*LHR* 表达量,从而影响 FSH、E<sub>2</sub>、LH 的敏感性,但具体调控机制尚需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 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(5666):2011-2015.
- [2] VAZIRI H, DESSAIN S K, NG EATON E, et al. hSIR2(*SIRT1*) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase[J]. Cell, 2001, 107(2):149-159.
- [3] RODGERS J T, LERIN C, HAAS W, et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and *SIRT1* [J]. Nature, 2005, 434(7029):113-118.
- [4] PICARD F, KURTEV M, CHUNG N, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- $\gamma$  [J]. Nature, 2004, 429(6993):771-776.
- [5] 赵芳,鄧西柱,任守文,等. *SIRT1* 基因对猪卵巢颗粒细胞凋亡因子表达量的影响[J]. 江苏农业学报, 2014, 30(2):325-330.
- [6] FU M, LIU M, SAUVE A A, et al. Hormonal control of androgen receptor function through *SIRT1* [J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(21):8122-8135.
- [7] LI H, RAJENDRAN G K, LIU N, et al. SirT1 modulates the estrogen-insulin-like growth factor-1 signaling for postnatal development of mammary gland in mice [J]. Breast Cancer Research, 2007, 9(1):R1.

- [8] 李碧侠,赵芳,付言峰,等. 猪卵巢颗粒细胞中 *SIRT1* 基因表达量与雌激素分泌的相关性[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(3): 555-558.
- [9] MORITA Y, WADA-HIRAIKE O, YANO T, et al. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2012, 10:14.
- [10] SEIFERT E L, CARON A Z, MORIN K, et al. SirT1 catalytic activity is required for male fertility and metabolic homeostasis in mice[J]. FASEB J, 2012, 26(2):555-566.
- [11] KOLTHUR-SEETHARAM U, TEERDS K, DE ROOIJ D G, et al. The histone deacetylase SIRT1 controls male fertility in mice through regulation of hypothalamic-pituitary gonadotropin signaling[J]. Biol Reprod, 2009, 80(2):384-391.
- [12] LIN P, RUI R. Effects of follicular size and FSH on granulosa cell apoptosis and atresia in porcine antral follicles[J]. Mol Reprod Dev, 2010, 77(8):670-678.
- [13] MATSUI T, MANABE N, GOTO Y, et al. Expression and activity of Apaf1 and caspase-9 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries[J]. Reproduction, 2003, 126(1):113-120.
- [14] MAYERHOFER A, DISSEN G A, COSTA M E, et al. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary[J]. Endocrinology, 1997, 138(8):3320-3329.
- [15] TSAI-TURTON M, LUDERER U. Gonadotropin regulation of glutamate cysteine ligase catalytic and modifier subunit expression in rat ovary is subunit and follicle stage specific[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 289(3):E391-402.
- [16] CHEN Y, JEFFERSON W N, NEWBOLD R R, et al. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary *in vitro* and *in vivo*[J]. Endocrinology, 2007, 148(8):3580-3590.
- [17] YAO Y, LI H, GU Y, et al. Inhibition of SIRT1 deacetylase suppresses estrogen receptor signaling[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(3):382-387.
- [18] BERNIER M, PAUL R K, MARTIN-MONTALVO A, et al. Negative regulation of STAT3 protein-mediated cellular respiration by SIRT1 protein[J]. J Biol Chem, 2011, 286(22):19270-19279.
- [19] BAI L, PANG W J, YANG Y J, et al. Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 307(1-2):129-140.

(责任编辑:陈海霞)