

白藜芦醇对猪前体脂肪细胞凋亡的作用及机理

张朝, 杨扬, 庞卫军, 孙超, 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: 旨在研究白藜芦醇对猪前体脂肪细胞凋亡的作用, 探讨其分子机制。以 50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇处理猪前体脂肪细胞, 采用 Hoechst 33258 染色剂染色, 光学和荧光显微镜分别观察细胞的形态学变化。semi-qRT-PCR 和 Western blotting 方法检测凋亡相关基因 *sirt1*、*caspase-3*、*bcl-2*、*bax*、*p53*、*NF- κ B* 的 mRNA 和蛋白的表达变化。结果表明, 白藜芦醇处理后, 前体脂肪细胞出现明显的细胞凋亡, 伴随细胞体积缩小, 染色质凝集, 核质固缩等特征显现, 与对照组相比 200 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞的凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。凋亡相关基因 *sirt1*、*caspase-3* 和 *bax* 的 mRNA 和蛋白表达水平显著上调 ($P < 0.05$), 而 *bcl-2*、*p53*、*NF- κ B* 等基因的表达水平明显下调 ($P < 0.05$)。进一步证实白藜芦醇特异性地增加 *sirt1* 的表达活性, 而 *sirt1* 的上调影响 *caspase-3* 和 *bcl-2* 家族因子的活性, 同时参与调控 *p53* 和 *NF- κ B* 的转录表达。因此, 推测 *sirt1* 调控凋亡相关因子表达是白藜芦醇诱导前体脂肪细胞凋亡的关键原因。

关键词: 白藜芦醇, 猪前体脂肪细胞, *sirt1*, *caspase-3*

Effect and underlying mechanism of resveratrol on porcine primary preadipocyte apoptosis

Zhao Zhang, Yang Yang, Weijun Pang, Chao Sun, and Gongshe Yang

Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: We demonstrated the effect of resveratrol on porcine primary preadipocytes apoptosis, to study the intracellular molecular mechanism. Porcine primary preadipocyte was treated with different concentration of resveratrol (0 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 200 $\mu\text{mol/L}$, 400 $\mu\text{mol/L}$). We used optical microscope and fluorescence microscope to observe morphological changes during apoptosis after Hoechst 33258 Fluorescent dyes staining; and RT-PCR and Western blotting to measure the expression of apoptosis-associated gene *sirt1*, *caspase-3*, *bcl-2*, *bax*, *p53*, *NF- κ B*. Primary preadipocyte apoptosis was apparent, accompanied by reduced cell volume, chromatin condensation, and nuclear shrinkage. Compared to the control and low concentration group, high dose group (200 $\mu\text{mol/L}$) significantly increased the ratio of primary preadipocyte apoptosis. The expression of *sirt1*, *caspase-3*, and *bax* was up-regulated markedly in response to resveratrol; in contrast, apoptotic inhibitor *bcl-2*, *p53*, *NF- κ B* down-regulated. We further proved fact that resveratrol can specifically promote the activity of *sirt1*; moreover, activated *sirt1* modulates the activity of *caspase-3* and *bcl-2* family, involving in transcriptional regulation of *p53* and *NF- κ B* through antagonizing factor-induced

Received: March 2, 2010; **Accepted:** May 19, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30600437), NWAUFU Young Research Program (No. 0114030), Basic Science Research Program (No. QN2009021).

Corresponding author: Weijun Pang. Tel: +86-29-87091017; Fax: +86-29-87092430; E-mail: pwj1209@gmail.com

Chao Sun. Tel: +86-29-87091017; Fax: +86-29-87092430; E-mail: sunchao2775@163.com

国家自然科学基金项目 (No. 30600437), 西北农林科技大学青年学术骨干支持计划 (No. 0114030), 基本科研业务费专项资金项目 (No. QN2009021) 资助。

acetylation. Taken together, our data established resveratrol as new regulator in porcine primary preadipocyte apoptosis via activating the expression of *sirt1*, modulating activity of apoptotic-associated factor.

Keywords: resveratrol, porcine primary preadipocyte, *sirt1*, *caspase-3*

脂肪细胞是体内功能组织的基本组成单位, 参与机体多方面的代谢调控。研究证实脂肪发育的调节控制主要有以下几个方面, 包括: 祖细胞向脂肪细胞分化的抑制; 前体脂肪细胞和脂肪细胞的凋亡; 以及脂肪细胞的去分化^[1]。因此, 前体脂肪细胞的凋亡调控是控制脂肪的关键途径之一。白藜芦醇 (RES) 是一种天然的植物抗毒素, 首次发现于红葡萄酒和葡萄汁中, 具有抗氧化、抗炎症、抗肿瘤的活性^[2]; 不仅可减少小鼠肝脏和 3T3-L1 脂肪细胞系中的脂质合成, 还可抑制某些蛋白激酶的活性, 诱导脂肪细胞凋亡的发生^[3-4]。*sirt1* (Sirtuin-1) 是 NAD⁺ 依赖性蛋白脱乙酰基酶家族的成员之一, 参与细胞增殖分化、细胞周期、能量代谢及寿命等多方面调控^[5]。研究表明, *sirt1* 通过调节关键的脂肪控制基因来减少脂肪合成, 促进脂肪水解^[6]。此外, RES 是 *sirt1* 重要的激活剂, 能有效减少脂肪的过多积累, 促进脂肪的动员, 诱导脂肪细胞凋亡, 但其内部的分子机制不甚清楚^[7-8]。目前, 尚未见 RES 对于猪的原代前体脂肪细胞凋亡影响的报道。与试验鼠相比, 猪的生理特点更接近人类, 是研究人类肥胖病的理想模式动物。因此, 本研究以猪前体脂肪细胞为研究对象, 探讨 RES 对于猪前体脂肪细胞凋亡的影响, 以及凋亡中 *sirt1* 和相关凋亡基因的表达变化, 为控制体脂沉积提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验动物

1~3 日龄仔猪由西北农林科技大学种猪场和杨凌光明猪畜牧公司共同提供。

1.1.2 主要试剂

白藜芦醇 (Sigma); DMEM/F12、I 型胶原酶 (Gibco); 胎牛血清 (Hyclone 公司); 牛血清白蛋白 (BSA) (华美生物工程公司); TRIzol 总 RNA 提取试剂盒 (百泰克生物技术有限公司); DEPC 原液

(Sigma); 反转录试剂盒 (TaKaRa); DL2000 (天为时代); *Taq* DNA 聚合酶 (Fermentas, MBI); Hoechst33258 凋亡染色试剂盒 (南京凯基公司); dNTPs (TaKaRa); *Sirt1*、*bcl-2*、*bax*、*NF-κB* 和 *p53* 基因引物由上海生工合成; Caspase-3、p53 多克隆抗体购自 bioworld 公司; *sirt1* 鼠源的单克隆抗体、NF-κB、*bcl-2* 多克隆抗体购自 SAB 公司; 实验的二抗均来源于 Santa Cruz 公司; 其他试剂为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

猪前体脂肪细胞原代培养参照本实验室建立的方法。无菌状态下取 1~3 日龄健康仔猪颈、背部的皮下脂肪组织, 剪成 1 mm³ 小块, 加消化液 (DMEM/F12 (Invitrogen, USA) +20 g/L 牛血清白蛋白 (华美生物工程公司), 临用时加 1 g/L 的胶原酶 I (Gibco)) 37℃ 消化 30~50 min (恒温水浴锅振荡), 然后过孔径为 200 目的不锈钢细胞筛, 收集滤液至离心管, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 DMEM/F12 培养液洗 1 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 然后加 10% FBS (Hyclone) 的 DMEM/F12 混匀, 即获得猪前体脂肪细胞。以 5×10⁴ 个/cm² 密度接种前体脂肪细胞。

1.2.2 RT-PCR

以 5×10⁴ 个/cm² 密度接种猪前体脂肪细胞于中皿内, 24 h 后更换为含 0、50、100、200、400 μmol/L RES 的处理培养液, 设 3 个重复。48 h 后取出培养皿, Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和核酸定量仪检测总 RNA 质量和纯度。反转录试剂盒 (TaKaRa) 将各组之间等量的 RNA 逆转录为 cDNA, 再取适当的 cDNA 扩增。Dolphin2DOC 凝胶分析系统摄像分析, 分别测得 2 个扩增产物条带的光密度值, 并计算下列基因与 *β-actin* 的光密度比值。

表 1 细胞凋亡相关基因引物列表

Table 1 Primer list apoptosis related gene

Gene	Primer sequence (5'-3')	Length (bp)	Temperature (°C)
sirt1	S: AGTAAACGGCTTGATGGT A: CTGCCTCTTGGTCACTT	280	58.0
Bcl-2	S: TGATTTCCTGGCTGTCTC A: GCCCGTGGACTTCACTTAT	102	54.6
Bax	S: GAATGGGGGGAGAGACACCT A: CCGCCACTCGGAAAAAGA	180	56.9
NF-κB	S: CAGCCCTATCCCTTTACG A: GCCACAGCCTGAGCAA	230	52.6
P53	S: CACGAACTGGCTGGATGAAA A: GAGAAGGGACAAAGGACGACA	130	58.7
β-actin	S: TTGTGCCTTGATAGTTCCG A: AGTCCTTCTGACCCATACCC	399	56.0

1.2.3 Hoechst33258 染色

分别以 0、200 μmol/L 处理原代前体脂肪细胞 48 h, 弃培养液, 缓冲液洗涤细胞 2 次, 4% 甲醇溶液固定细胞 10 min, 离心去固定液, 用 Buffer A 洗 2 遍, 适当的 Hoechst 33258 染色液避光染色 10 min, 荧光显微镜观察。凋亡细胞中, 细胞膜对 Hoechst 33258 的摄取增多, 并且由于染色体高度浓缩, Hoechst 33258 与之结合增强, 染色呈强蓝色荧光, 而正常细胞只呈微弱荧光, 死细胞则不被染色。

1.2.4 Western blotting

以不同浓度的 RES 处理细胞, 提取细胞中的总蛋白, 蛋白定量仪定量。经蛋白定量后, 按蛋白等量原则将不同处理样品进行 SDS-PAGE 电泳, 分离不同大小的目的蛋白, 然后转移至 PVDF 膜, 利用合适浓度比例一抗孵育, 4°C 过夜, 缓冲液冲洗 3 次, 每次 10 min; 二抗孵育 2 h, 缓冲液洗涤 3 次, 发光液发光检测。ChemiDoc XRS 曝光系统检测蛋白条带亮度, Quantity One (Bio-Rad, USA) 分析蛋白条带密度值和表达量; 将各目的蛋白密度值数据与相应 β-actin 的密度值比对, 所得的数值进一步与对照组的数值比对, 作相对表达的柱状分析图。

1.2.5 统计学分析

试验所得数据采用统计软件 SPSS16.0 进行单因素方差分析与显著性检验。

2 结果与分析

2.1 RES 对猪前体脂肪细胞凋亡的形态学观察

本课题组前期的研究表明, RES 对于细胞的增

殖和分化具有较强抑制作用, 呈浓度和时间依赖性, 推测原因是 RES 启动了细胞的死亡机制^[9]。取仔猪的原代前体脂肪细胞培养, 如图 1A 所示, 细胞消化后贴壁呈长梭形或者不规则的三角形状, 24 h 后, 利用 200 μmol/L 的 RES 处理细胞, 如图 1B 所示, 细胞变圆皱缩, 呈不规则的形状, 偶见细胞核聚集等现象。进一步利用 Hoechst33258 染色剂染色, 图 1C 为对照组, 细胞核呈圆形或椭圆形, 细胞呈现正常的生长状态; 图 1D 为处理组, 细胞核出现凝集, 断裂等不规则的形状, 呈现出典型的细胞凋亡特征。结果表明, RES 可显著的抑制前体脂肪细胞的增殖, 诱导前体脂肪细胞的凋亡。

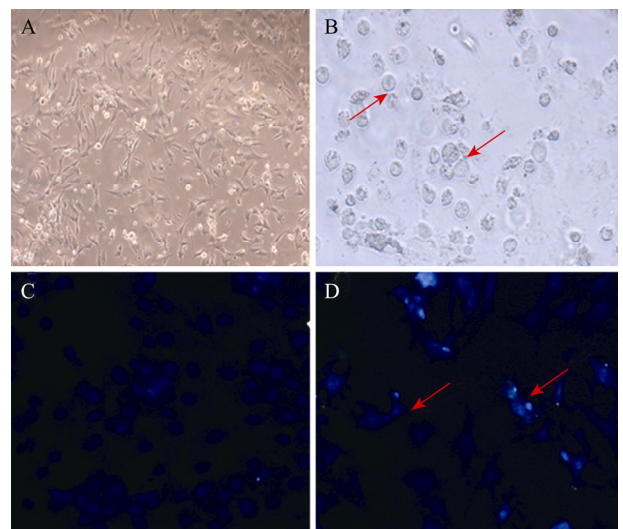


图 1 猪原代前体脂肪细胞凋亡的形态学观察

Fig. 1 Morphological observation during porcine primary preadipocyte apoptosis. (A) Porcine primary preadipocyte were cultured for 24 h *in vitro*. Showing stretched fibroblast-like or triangle cell phenotypes. (B) Cell morphological changes were observed after treatment with resveratrol. (C) Preadipocyte cells were stained with fluorescent dyes after culturing for 24 h, showing that cell nuclei was spherical. (D) Fluorescence microscopy of preadipocyte, after exposure to 200 μmol/L resveratrol 48 h, cell were stained with fluorescent dyes Hoechst-33258, showing that cell nuclei was shrinkage. Condensed nuclei are indicated using red arrows.

2.2 RES 对于前体脂肪细胞凋亡中 sirt1 和 caspase-3 表达的影响

白色脂肪组织中, sirt1 可抑制前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞的分化, 减少脂滴的积累^[10]。研究表明, sirt1 负调控 PPAR-γ 等细胞核受体来调节脂肪细胞的分化增殖, 然而, 脂肪细胞的脂解机制仍不甚

清楚, 表明了 *sirt1* 还有其他的作用机制来调节脂肪的代谢。以 0、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 等浓度的 RES 处理前体脂肪细胞 48 h, 采用半定量 RT-PCR 检测脂肪细胞中 *sirt1* mRNA 表达和 WB 检测蛋白的表达情况。结果表明, 与 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 相比, 200 $\mu\text{mol/L}$ 条件下 *sirt1* 的表达量显著的上升 ($P < 0.05$), 随着 RES 的浓度增加到一定的程度, *sirt1* 的表达量不再增加, 维持在较高的水平 (图 2A)。Caspase-3 是细胞凋亡的关键的执行因子, 如图 2B 所示, caspase-3 蛋白表达量随着处理浓度的增加出现递增的趋势, 在 200 $\mu\text{mol/L}$ 的水平下达到

最高值。结果表明, 白藜芦醇对于细胞中的 *sirt1* 具有明显的促进作用, 同时 caspase-3 也参与了白藜芦醇所调控的生理过程。

2.3 RES 对前体脂肪细胞凋亡中 *bcl-2* 和 *bax* 表达的影响

Bcl-2 家族是细胞凋亡中关键的调节因子, 起着凋亡分子开关的作用^[11]。研究表明, *bcl-2* 位于线粒体的内膜和内质网中, 通过影响线粒体的活性抑制细胞的凋亡。最近的研究证实, *bcl-2* 抑制 caspase-3 的表达活性从而抑制 RES 所诱导的细胞凋亡^[12]。*Bax* 的作用机制正好与 *bcl-2* 相反, 是细胞凋亡的正

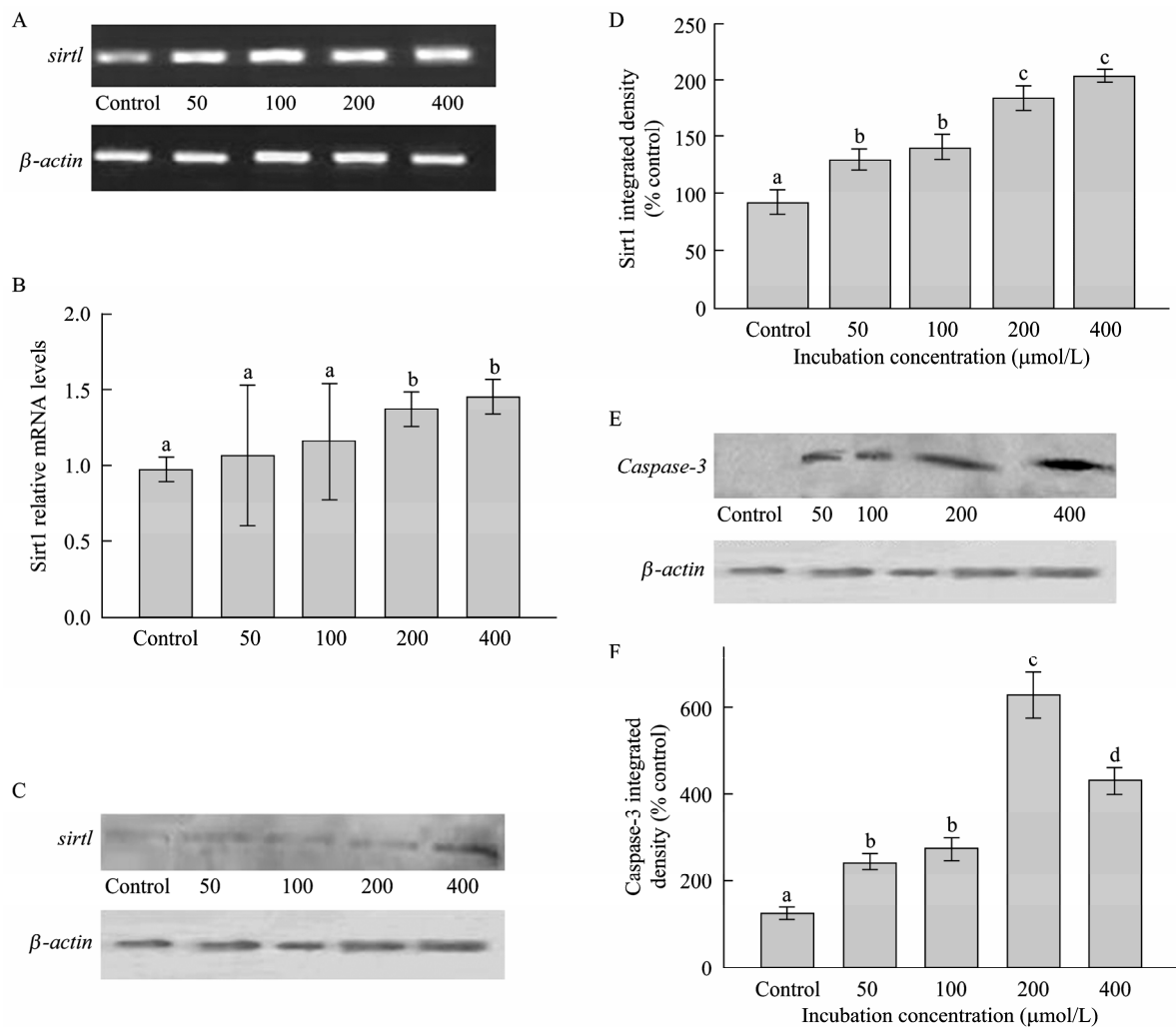


图 2 RES 对猪前体脂肪细胞凋亡中 *sirt1* 和 caspase-3 表达的影响

Fig. 2 Effect of RES on the expression *sirt1* and caspase-3 during porcine primary preadipocytes. (A) Agarose gel electrophoresis of *sirt1* gene after treatment with indicated resveratrol ($\mu\text{mol/L}$). (B) Quantitative analysis of *sirt1* mRNA expression, different letters mark show significant difference ($P < 0.05$). (C) Protein analysis of *sirt1* by western blotting treated with indicated concentration of resveratrol. (D) Quantitative analysis of *sirt1* protein level, different letters mark show significant difference ($P < 0.05$). (E) Protein analysis of caspase-3 by western blotting after dealing with indicated concentration of resveratrol. (F) Quantitative analysis of caspase-3 protein, different letters mark show significant difference ($P < 0.05$).

向调控因子^[13]。以不同浓度的 RES 处理前体脂肪细胞 48 h, 提取细胞中的 RNA 和蛋白, 利用半定量 RT-PCR 和 Western blotting 分析 *bcl-2* 和 *bax* 的表达变化。如图 3A 和 3B 所示, *bcl-2* 的表达量随着浓度的增加而呈现逐渐下降的趋势, 与对照组和低浓度的处理组相比, *bcl-2* 在高浓度的作用下表达量显著降低 ($P<0.05$)。与此相反, *bax* 的活性在 100 $\mu\text{mol/L}$ 处理水平下显著增加 ($P<0.05$), 但高浓度处理组之间的差异不明显。*bcl-2* 蛋白表达变化与 mRNA 的变化相一致, 在高浓度的处理下显著降低 ($P<0.05$) (图 3C、3D)。

2.4 RES 对于前体脂肪细胞凋亡中 p53 和 NF- κ B 表达的影响

研究表明, sirt1 位于细胞核中, 通过去乙酰化 NF- κ B、Foxo1、p53 参与细胞的能量代谢和炎症反

应^[5]。sirt1 可与 p53 的 C 端结合, 介导 p53 去乙酰化反应, 抑制 p53 的转录活性^[14]。此外, sirt1 通过去乙酰化 p65 亚基的 lys310 抑制 NF- κ B 的转录激活^[15]。以不同浓度的 RES 处理细胞, 提取细胞的 mRNA 和蛋白, PCR 和 Western blotting 分别检测 NF- κ B、p53 的表达变化。如图 4A、4B 所示, 随着处理浓度的增加 p53 mRNA 表达水平逐渐下调, 与低浓度处理组相比, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的表达量显著下调 ($P<0.05$)。与此相反的是, NF- κ B mRNA 表达量逐渐上调, 与对照组相比, 处理组之间差异显著 ($P<0.05$)。如图 4C、4D 所示, p53 和 NF- κ B 的蛋白表达量逐渐下调, 与对照组相比, 50 $\mu\text{mol/L}$ 及 100 $\mu\text{mol/L}$ 处理组 NF- κ B 的表达量显著下调 ($P<0.05$), 而 200 $\mu\text{mol/L}$ 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 的处理组 NF- κ B 的蛋白表达几乎检测不到。

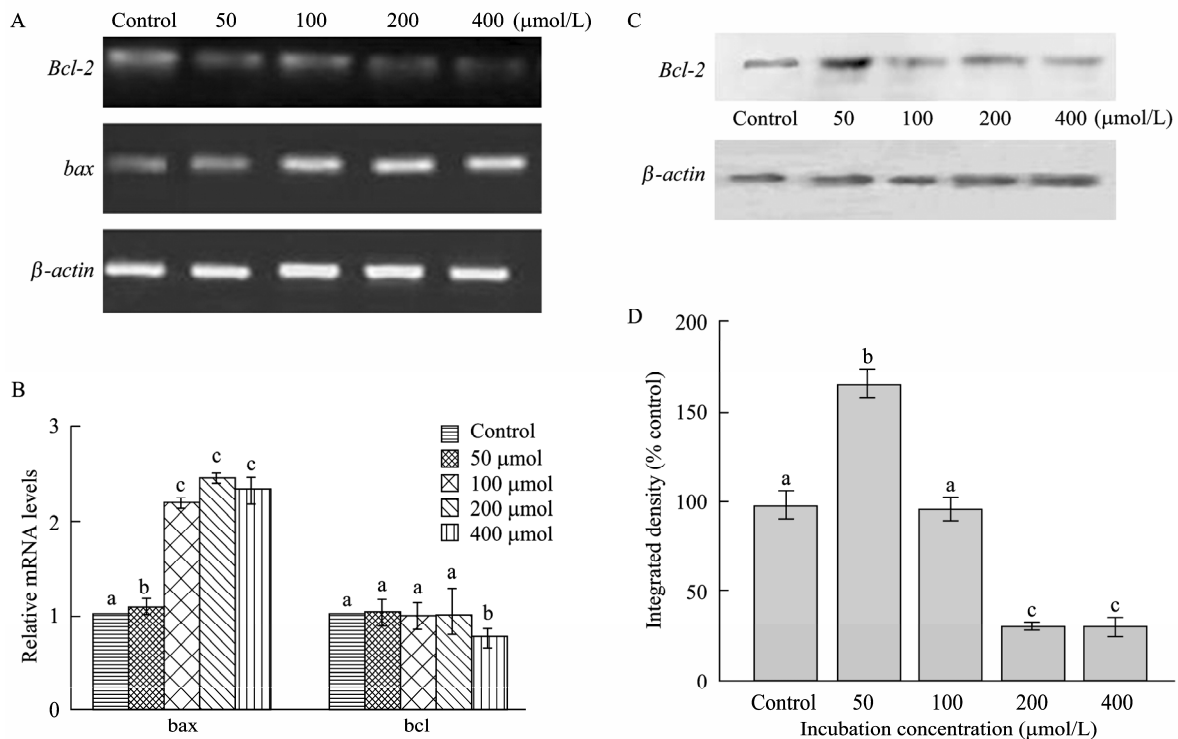


图 3 RES 诱导前体脂肪细胞凋亡中 *bcl-2* 和 *bax* 的表达变化

Fig. 3 Effect RES on the expression change of *bcl-2* and *bax* during primary preadipocyte. (A) Electrophoresis analysis of *bcl-2*, *bax* gene after treatment with indicated concentration of resveratrol. (B) Quantitative analysis of *bcl-2*, *bax* mRNA expression, different mark show significant difference ($P<0.05$). (C) Protein analysis of *bcl-2* by western blotting in response to indicated concentration of resveratrol. (D) Quantitative analysis of *bcl-2* protein, different mark show significant difference ($P<0.05$).

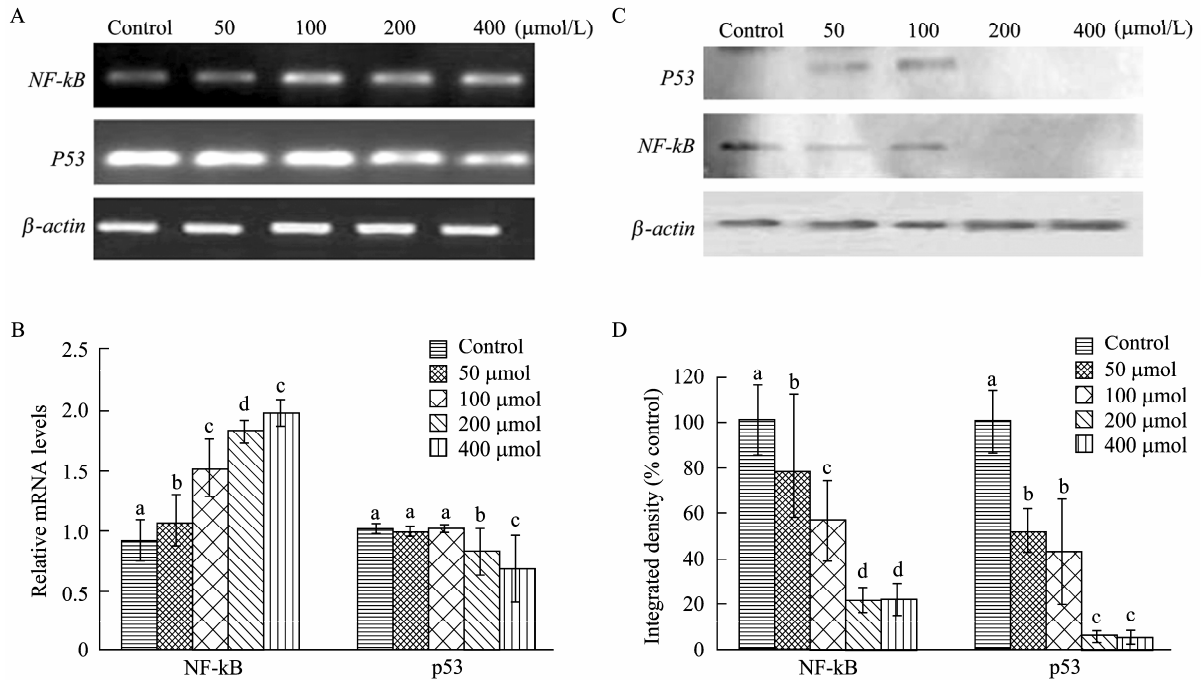


图4 RES诱导前体脂肪细胞凋亡中p53和NF-κB的表达变化

Fig. 4 Effect RES on the expression change of p53 and NF-κB during primary preadipocytes. (A) Agarose gel electrophoresis of p53 and NF-κB mRNA following treatment with indicated concentration (μmol/L). (B) Quantitative analysis of p53 and NF-κB mRNA expression, different mark show significant difference ($P < 0.05$). (C) Protein analysis of p53 and NF-κB by western blotting in response to indicated concentration of resveratrol. (D) Quantitative analysis of p53 and NF-κB protein, different mark show significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

研究指出脂肪组织由成熟脂肪细胞和少量的前体脂肪细胞组成。前体脂肪细胞位于脂肪组织的间充质和血管腔隙中,在相应的信号诱导下,经过一系列复杂的基因表达变化分化为成熟的脂肪细胞^[16-17]。脂肪细胞的数量除受前体脂肪细胞分化和增殖的调控外,还受脂肪细胞去分化、前体脂肪细胞凋亡的调控^[18-19]。因此,研究前体脂肪细胞凋亡分子机理为调控脂肪组织积累提供新的途径。目前有研究认为,脂肪细胞分化可减弱脂肪细胞对凋亡诱导敏感性,在3T3-L1前体脂肪细胞系的研究中,生长因子的去除可明显诱导前体脂肪细胞凋亡,前体脂肪细胞分化为脂肪细胞过程中,凋亡抑制基因*bcl-2*和*AIP*表达明显增加,阻碍caspase的级联途径传递和凋亡的产生,从而表现出抗凋亡的特征^[20-21]。与之不同的是,有研究发现去除血清后,人的前体脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞过程中,凋亡抑制基因*AIP*表达明显减少^[22]。说明了3T3-L1前体

脂肪细胞与人前体脂肪细胞凋亡的调控存在差异。

最近的研究表明,猪的脂肪沉积模式与啮齿动物存在显著差异,却与人类更为接近,且取材方便,故可作为研究人类肥胖症及相关疾病的理想模型^[23]。目前为止,关于脂肪细胞凋亡的研究多集中于细胞系和成熟的脂肪细胞,尚未见任何有关猪原代前体脂肪细胞凋亡的研究报道。本研究以不同浓度的RES处理原代前体脂肪细胞,结果表明,RES可显著诱导细胞凋亡,出现细胞皱缩、染色体凝集等典型凋亡特征,呈浓度依赖性。近来的研究证明,RES抑制3T3-L1前体脂肪细胞系中脂肪分化并诱导细胞凋亡^[24],此外,RES调控多种因子以降低各种细胞系如HT29细胞、血管平滑肌细胞和骨髓瘤细胞的增殖活性并诱导细胞凋亡和细胞周期停滞^[25-27]。本研究结果与上述研究结果相同,证明RES可诱导原代前体脂肪细胞凋亡。

脂肪细胞凋亡是多基因时序表达调控的结果。参与细胞凋亡调控的基因主要有*sirt1*、*caspase-3*、*bcl-2*、*bax*、*p53*、*NF-κB*等。研究表明,*sirt1*是位

于细胞核内的细胞寿命调节因子, 去乙酰化 p53 调控细胞增殖和凋亡。p53 具有多个乙酰化位点, 其高度乙酰化的状态可激活细胞凋亡和细胞周期停滞; 而 *sirt1* 的过表达则抑制 p53 其转录活性, 进而抑制氧化应激状态下 p53 依赖性的凋亡^[5,14], 哺乳动物中研究证实 *sirt2* 起着凋亡抑制因子的作用, 该过程通过抑制 p53 的乙酰化来发生。与此相反的是, Griswold 等研究表明, 果蝇中过表达 *sirt2* 可促进 *caspase-3* 等凋亡相关基因的表达量增加, 诱导 *caspase* 依赖性的细胞凋亡; *sirt2* 的过表达并不影响 p53 的活性, 与 p53 协同地促进细胞的凋亡^[28]。本研究的结果表明, *p53* 的表达水平随 RES 浓度增加而逐渐降低, 处理间差异显著, 推测其内部的机制可能是: RES 是 *sirt1* 药理性激活剂, 上调 *sirt1* 的表达, 进而去乙酰化调控 *p53* 的表达, 致使 *p53* 的活性明显降低, 这与上述的研究结果一致。不同的是, RES 可同时增加猪前体脂肪细胞中 *caspase-3* 的蛋白表达, 这与上述的结果不同。

NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) 是细胞核关键的转录调控因子, 参与细胞黏连、细胞周期和细胞凋亡的调控。免疫沉淀和过表达的实验证实, *sirt1* 直接与 NF- κ Bp65 亚基相互作用, 使 lys³¹⁰ 位点去乙酰化而抑制其转录激活, 增加细胞对 TNF- α 诱导凋亡的敏感性^[15]。本研究结果显示 NF- κ B 的 mRNA 表达量随 RES 浓度的增加出现上调, 而蛋白表达逐渐下降, 证实了 NF- κ B 参与前体脂肪细胞凋亡调控, 推测其内部的机制是由于 *sirt1* 与 NF- κ B 的作用位点结合, 从而抑制其在细胞凋亡中活性发挥。

Bcl-2 能够保护细胞免受病毒感染、射线衍射、化疗药物等刺激引起的细胞凋亡。体内外的研究证实 *bcl-2* 可调控细胞中 Ca⁺ 水平并抑制线粒体功能发挥。最近的研究表明^[12], 在 U937 细胞中, *bcl-2* 的过表达可抑制白藜芦醇诱导的细胞凋亡; 其内部的分子机制是: *bcl-2* 调控线粒体膜的离子通道活性, 阻断细胞色素释放, 抑制 *caspase-3* 的激活。本研究的结果与上述相近, *bcl-2* 活性的下降释放了细胞信号中的转导因子, 进而刺激 *caspase-3* 活性升高, 促进细胞凋亡。

综上所述及结合本研究发现, *sirt1* 和凋亡相关

因子活性的变化可能是 RES 诱导细胞凋亡的关键原因, 但 *sirt1* 如何与 *caspase-3*、*bcl-2* 相互作用还有待进一步研究证实。

REFERENCES

- [1] Prins J, O'Rahilly S. Regulation of adipose cell number in man. *Clin Sci (Lond)*, 1997, **92**: 3–11.
- [2] Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*, 2000, **66**(8): 663–673.
- [3] Rayalam S, Yang JY, Ambati S, et al. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res*, 2008, **22**(10): 1367–1371.
- [4] Borra M, Smith B, Denu J. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem*, 2005, **280**(17): 17187–17195.
- [5] Yamamoto H, Schoonjans KJA. Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol*, 2007, **21**(8): 1745–1755.
- [6] Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*, 2004, **429**: 771–776.
- [7] Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 [alpha]. *Cell*, 2006, **127**(6): 1109–1122.
- [8] Baur J, Pearson K, Price N, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 2006, **444**(7117): 337–342.
- [9] Bai L, Pang W, Yang Y, et al. Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Mol Cell Biochem*, 2008, **307**(1): 129–140.
- [10] Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature*, 2006, **444**(7121): 868–874.
- [11] Duprez L, Wirawan E, Berghe TV, et al. Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect*, 2009, **11**(13): 1050–1062.
- [12] Park J, Choi Y, Suh S, et al. Bcl-2 overexpression attenuates resveratrol-induced apoptosis in U937 cells by inhibition of caspase-3 activity. *Carcinogenesis*, 2001, **22**(10): 1633–1639.
- [13] Gross A, McDonnell J, Korsmeyer S. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 1999, **13**(15): 1899–1911.
- [14] Langley E, Pearson M, Faretta M, et al. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J*, 2002, **21**(10): 2383–2396.

- [15] Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*, 2004, **23**(12): 2369–2380.
- [16] Hwang C, Loftus T, Mandrup S, *et al.* Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu Rev Devl Biol*, 1997, **13**(1): 231–259.
- [17] Ailhaud G. Cell surface receptors, nuclear receptors and ligands that regulate adipose tissue development. *Clin Chim Acta*, 1999, **286**: 181–190.
- [18] Alkhoury N, Gornicka A, Berk MP, *et al.* Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *J Biol Chem*, 2010, **285**(5): 3428–3438.
- [19] Sorisky A, Magun R, Gagnon AM. Adipose cell apoptosis: death in the energy depot. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000, **24**(Suppl 4): S3–7.
- [20] 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.
- [21] Magun R, Boone DL, Tsang BK. The effect of adipocyte differentiation on the capacity of 3T3-L1 cells to undergo apoptosis in response to growth factor deprivation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1998, **22**: 567–571.
- [22] Papineau D, Gagnon A, Sorisky A. Apoptosis of human abdominal preadipocytes before and after differentiation into adipocytes in culture. *Metabolism*, 2003, **52**(8): 987–992.
- [23] Yang GS, Zhang HW, Bai L. Pig-a ideal study animal model of obesity and diabetes. *Prog Nat Sci*, 2008, **18**(5): 481–487.
- [24] Yang J, Della-Fera M, Rayalam S, *et al.* Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci*, 2008, **82**(19/20): 1032–1039.
- [25] Liang Y, Tsai S, Chen L, *et al.* Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol*, 2003, **65**(7): 1053–1060.
- [26] Estrov Z, Shishodia S, Faderl S, *et al.* Resveratrol blocks interleukin-1 β -induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 2003, **102**: 987–995.
- [27] Haider U, Sorescu D, Griendling K, *et al.* Resveratrol increases serine15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 2003, **63**(4): 925–932.
- [28] Griswold A, Chang K, Runko A, *et al.* Sir2 mediates apoptosis through JNK-dependent pathways in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(25): 8673–8678.