

网络出版时间:2018-09-06 17:30

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.03.001

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180906.1723.002.html>

# *SIRT1* 基因对牛卵泡颗粒细胞增殖及 细胞周期的影响

陈 洋<sup>1</sup>, 单雪松<sup>1</sup>, 赵志辉<sup>2</sup>, 刘红羽<sup>1</sup>, 吕文发<sup>1</sup>

(1 吉林农业大学 动物科学技术学院, 吉林 长春 130118;

2 吉林大学 畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062)

**【摘 要】** **【目的】** 探讨沉默信息调节因子 1(Silent information regulator1, *SIRT1*) 对牛卵泡颗粒细胞增殖及细胞周期的影响。 **【方法】** 选取牛卵巢上直径 2~6 mm 的卵泡, 用注射器抽取卵泡中的颗粒细胞, 进行体外培养。根据牛 *SIRT1* 基因的核苷酸序列, 构建了 4 条干扰载体(shRNA-*SIRT1*-1597、shRNA-*SIRT1*-1471、shRNA-*SIRT1*-1186、shRNA-*SIRT1*-1306) 及 1 条阴性对照载体(shRNA-NC), 利用脂质体将质粒转入牛卵泡颗粒细胞, 通过实时荧光定量 PCR 法筛选出干扰效果最佳的干扰载体用于后续试验。以转染 shRNA-*SIRT1*-1471 的颗粒细胞为干扰组, 转染 shRNA-NC 的颗粒细胞为阴性对照组, 不做处理的颗粒细胞为空白对照组, 采用 CCK-8 法检测转染后 24、36、48 和 60 h 各组颗粒细胞增殖情况, 用流式细胞术检测转染后 24、36 和 48 h 各组颗粒细胞的细胞周期变化情况。 **【结果】** 转染后 48 h shRNA-*SIRT1*-1471 干扰的颗粒细胞 *SIRT1* 表达量显著低于其他处理组 ( $P < 0.05$ ), 故选用 shRNA-*SIRT1*-1471 作为最佳干扰载体。转染后 24、36、48 和 60 h, 干扰组颗粒细胞增殖效果显著高于空白对照组和阴性对照组 ( $P < 0.05$ ); 转染后 24~48 h 干扰组与空白对照组和阴性对照组相比 G1 期细胞比例显著降低, S 期细胞比例显著升高, 从而使更多细胞进入 M 期进行正常的有丝分裂, 促进细胞增殖。 **【结论】** *SIRT1* 能抑制牛卵泡颗粒细胞的增殖, 并阻滞细胞周期的进程。

**【关键词】** *SIRT1* 基因; 牛卵泡颗粒细胞; 细胞增殖; 细胞周期

**【中图分类号】** Q789; S823.3

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2019)03-0001-06

## Effects of *SIRT1* gene on proliferation and cell cycle of bovine granulosa cells

CHEN Yang<sup>1</sup>, SHAN Xuesong<sup>1</sup>, ZHAO Zhihui<sup>2</sup>, LIU Hongyu<sup>1</sup>, LÜ Wenfa<sup>1</sup>

(1 College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun, Jilin 130062, China)

**Abstract:** **【Objective】** The effects of *SIRT1* (silent information regulator1, *SIRT1*) gene on the proliferation and cell cycle of granulosa cells were discussed. **【Method】** The 2—6 mm ovarian follicles were selected and the granular cells were extracted by syringe and cultured *in vitro*. Four interference vectors (shRNA-*SIRT1*-1597, shRNA-*SIRT1*-1471, shRNA-*SIRT1*-1186, and shRNA-*SIRT1*-1306) and one negative control vector (shRNA-NC) were constructed according to the nucleotide sequence of the *SIRT1* gene of cattle. The plasmids were transformed into bovine follicular granulosa cells by liposomes, and the interference vector with the best interference effect was screened by real-time fluorescence quantitative PCR for subsequent experiments. The granulosa cells transfected with shRNA-*SIRT1*-1471 were interference

**【收稿日期】** 2017-11-21

**【基金项目】** 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2013AA102505)

**【作者简介】** 陈 洋(1979—), 女(蒙古族), 吉林通榆人, 讲师, 硕士, 主要从事动物繁殖研究。E-mail: chenyang7419@163.com

**【通信作者】** 吕文发(1973—), 男, 吉林九台人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物繁殖障碍研究。E-mail: wenfa2004@163.com

group, the transfected shRNA-NC granulosa cells were control group, and the untreated granulosa cells were blank group. Proliferation of CCK-8 was used to detect the proliferation of granulosa cells 24, 36, 48 and 60 h after transfection. The changes of cell cycle of granulosa cells in each group were detected by flow cytometry 24, 36 and 48 h after transfection. 【Result】 *SIRT1* expression in granulosa cells 48 h after shRNA-*SIRT1*-1471 transfection was significantly lower than that in other treatment groups. Thus, shRNA-*SIRT1*-1471 was the best interference vector. The proliferation of granulosa cells in the interference group 24, 36, 48 and 60 h after shRNA-*SIRT1*-1471 transfection was significantly better than that in the blank control group and the negative control group ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank group and the control group, the proportion of G1 phase cells was significantly decreased and the proportion of S phase cells was increased. Therefore, more cells could enter M phase for normal mitosis and promote cell proliferation. 【Conclusion】 *SIRT1* can inhibit proliferation of bovine granulosa cells and block cell cycle progression.

**Key words:** *SIRT1* gene; bovine granulosa cells; cell proliferation; cell cycle

颗粒细胞的增殖分化对原始卵泡启动和发育起重要调控作用。由于颗粒细胞的生长发育先于卵母细胞, 因此颗粒细胞变化可作为原始卵泡启动的信号; 生长期卵泡的发育及卵泡闭锁也是通过颗粒细胞受体介导途径调控的, 表明颗粒细胞的增殖分化与卵泡发育密切相关。颗粒细胞和卵母细胞之间通过间隙连接相互作用, 颗粒细胞分泌的 SCF 与卵母细胞上的 c-kit 受体结合, 能够促进卵母细胞生长, 并促进原始卵泡启动, 还能在卵泡破裂排卵后维持黄体分泌孕酮。

沉默信息调节因子 2 (Silent information regulator 2, Sir2) 首先从酵母中分离出来, 是一种依赖于  $\text{NAD}^+$  的脱乙酰酶<sup>[1-2]</sup>。Sir2 参与基因沉默、基因组稳定性、细胞周期以及代谢调控等生物学过程<sup>[2-4]</sup>。在哺乳动物中存在 Sir2 同源基因, 即 Sirtuins 家族, 该家族包括 7 个成员: *SIRT1*~*SIRT7*, 其中 *SIRT1* 与酵母 Sir2 同源性最高, 因此受到广泛关注<sup>[5-6]</sup>。*SIRT1* 基因是哺乳动物的长寿基因, 在调控新陈代谢、细胞存活和机体寿命等方面发挥着重要作用<sup>[7]</sup>。研究表明, 转 *SIRT1* 基因小鼠卵巢上有各级卵泡发育, 但不能正常排卵, 卵巢体积变小, 且性成熟较正常小鼠延迟<sup>[8]</sup>。*SIRT1* 基因缺失的雄鼠精子数量减少, 精细管发育异常<sup>[9]</sup>。有研究报道, *SIRT1* 基因缺失小鼠无论雌雄都丧失生殖能力, 下调 *SIRT1* 基因表达, 可抑制小鼠颗粒细胞凋亡, 但其具体分子机制迄今尚未阐明<sup>[10-11]</sup>。以上研究表明 *SIRT1* 在调控动物生殖功能方面具有重要作用, 其机制可能通过调节卵泡颗粒细胞的增殖进而影响卵泡发育或闭锁。

目前关于 *SIRT1* 基因对牛卵泡颗粒细胞增殖及细胞周期影响的研究尚未见报道, 因此本研究构

建了牛 shRNA-*SIRT1* 干扰载体, 并转染体外培养牛卵泡颗粒细胞, 探讨 *SIRT1* 对卵泡颗粒细胞增殖及细胞周期的影响, 旨在为揭示 *SIRT1* 基因在牛卵泡发育过程中的作用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 牛卵巢 从屠宰场采集牛卵巢, 将其于 37℃ 保温带回实验室, 剪掉卵巢周边多余的结缔组织, 用含双抗(青霉素含量为 10 000 U/mL, 链霉素质量浓度为 10 mg/mL, 下文同)的生理盐水清洗 3 遍, 备用。

1.1.2 试剂 DNA 内切酶、DNA 连接酶、DNA Marker, MBI Fermentas 生产; DNA 凝胶回收试剂盒, 天根生化科技有限公司生产; 酵母提取物、胰蛋白胍, OXOID 生产; DMEM/F12、2.5 g/L 胰蛋白酶, GIBCO 生产; 胎牛血清, BI 生产; SYBR Premix Ex Taq, TaKaRa 生产; CCK-8 试剂盒, 日本同仁生产; 细胞周期检测周期试剂盒, 碧云天生产; 无水乙醇、异丙醇、丙三醇等, 北京国药集团化学试剂有限公司生产。

### 1.2 干扰载体的构建

根据 GenBank 数据库中 *SIRT1* 基因的核苷酸序列 (GenBank 登录号: NM\_001192980.2), 按照 shRNA 设计原则, 运用 Oligo Designer 3.0 软件, 设计 4 对干扰序列: *SIRT1*-1597 正义链 5'-GGCT-CAAGTTCACCAGAAAGA-3', 反义链 5'-TCTT-TCTGGTGAAGTTGAGCC-3'; *SIRT1*-1471 正义链 5'-GGTGAATATGCCAACTTTGC-3', 反义链 5'-GCAAAGTTTGGCATATTCACC-3'; *SIRT1*-1186 正义链 5'-GCTGATGAACCGCTTGCTATC-

3',反义链 5'-GATAGCAAGCGGTTTCATCAGC-3';SIRT1-1306 正义链 5'-GGATCTTCCCTGAA-AGTAAGA-3',反义链 5'-TCTTACTTTTCAGGG-AAGATCC-3'。另外设计并合成与 SIRT1 基因序列无关的阴性对照(Negative control NC)序列:正义链 5'-GTTCTCCGAACGTGTCACGTC-3',反义链 5'-GACGTGACACGTTCCGAGAAC-3'。

干扰载体 shRNA-SIRT1-1597、shRNA-SIRT1-1471、shRNA-SIRT1-1186、shRNA-SIRT1-1306 及阴性对照载体 shRNA-NC 的连接、转化及重组质粒鉴定,均由苏州吉玛制药技术有限公司完成。

### 1.3 牛卵泡颗粒细胞的培养及转染

用 10 mL 无菌注射器抽吸牛卵巢上直径 2~6 mm 卵泡的卵泡液,用孔径 0.074 mm(200 目)的筛过滤,除去卵母细胞,收集滤液于 15 mL 离心管中,400 r/min 离心 5 min,收集牛卵泡颗粒细胞沉淀,用培养液重悬,接种于培养皿中,添加含体积分数 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,置于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养,每隔 2~3 d 换液 1 次,待 80%左右的颗粒细胞汇合时,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化,以体积比 1:2 传代培养。

将牛卵泡颗粒细胞密度调整为  $5 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>,接种于 6 孔板中,用无双抗培养液培养 24 h,选取细胞铺板均匀且融合度在 70%~80%的孔进行转染。将待转染细胞用无血清、双抗的 DMEM/F12 轻轻漂洗 2 次,加入 1.5 mL 无血清、双抗培养液备用,按照 Lipofectamine 2000 说明书的步骤,将干扰载体 shRNA-SIRT1-1597、shRNA-SIRT1-1471、shRNA-SIRT1-1186、shRNA-SIRT1-1306 及阴性对照载体 shRNA-NC 转染牛卵泡颗粒细胞,试验同时设未转染的牛卵泡颗粒细胞作为空白对照组。转染 48 h 后,在荧光显微镜下观察各组细胞形态及绿色荧光蛋白的表达情况。

### 1.4 干扰后牛卵泡颗粒细胞 SIRT1 基因表达量的检测

以  $\beta$ actin 为内参基因,采用实时荧光定量 PCR 法检测干扰后牛卵泡颗粒细胞 SIRT1 基因的表达量。

牛卵泡颗粒细胞转染干扰载体 48 h 后,用 trizol 法提取各孔细胞总 RNA,用反转录试剂盒反转录为 cDNA,-80 ℃冰箱保存备用。

根据 GenBank 提供的牛 SIRT1 基因序列,利用 primer 5.0 软件设计 SIRT1 基因实时荧光定量 PCR 引物序列,上游引物序列为 5'-CGTGC-

CAGAGTCCAAGTTTAG-3',下游引物序列为 5'-GCTTCAAATACAGTTCCTCCAG-3',内参基因  $\beta$ actin 上游引物序列为 5'-CAGCAAGCAGGAG-TACGATG-3',下游引物序列为 5'-AGCCATGCAATCTCATCTC-3'。引物由上海生工合成。将反转录合成的 cDNA、目的基因及内参基因的引物,利用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 反应,结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法对基因表达水平进行定量,选择干扰效果最佳的一组进行后续试验。

### 1.5 干扰 SIRT1 基因对牛卵泡颗粒细胞增殖的影响

采用 CCK-8 法检测干扰 SIRT1 基因对牛卵泡颗粒细胞增殖的影响。

收集牛卵泡颗粒细胞,将细胞以  $5 \times 10^3$  孔<sup>-1</sup>的量接种 96 孔板,每孔加 100  $\mu$ L 不含双抗的培养液,置于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中贴壁培养,24 h 后转染 shRNA-SIRT1-1471,试验同时设转染 shRNA-NC 质粒的牛卵泡颗粒细胞作为阴性对照组和未转染的牛卵泡颗粒细胞作空白对照组,每组 3 个重复。继续培养 24,36,48 和 60 h,结束培养前 2 h 加入 10  $\mu$ L 的 CCK-8 溶液,用酶标仪测定 450 nm 波长的吸光度值( $D_{450\text{ nm}}$ )。

### 1.6 干扰 SIRT1 基因对牛卵泡颗粒细胞周期的影响

采用流式细胞术检测干扰 SIRT1 基因对牛卵泡颗粒细胞周期的影响。分别于 shRNA-SIRT1-1471 转染后的 24,36 和 48 h 收集细胞至离心管中,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,加入 1 mL 预冷的体积分数 70%乙醇,轻轻吹打均匀,4 ℃固定 12 h,预冷的 PBS 洗涤 3 次,加入 PI 染液,1 h 内上机检测。试验设 3 次重复。

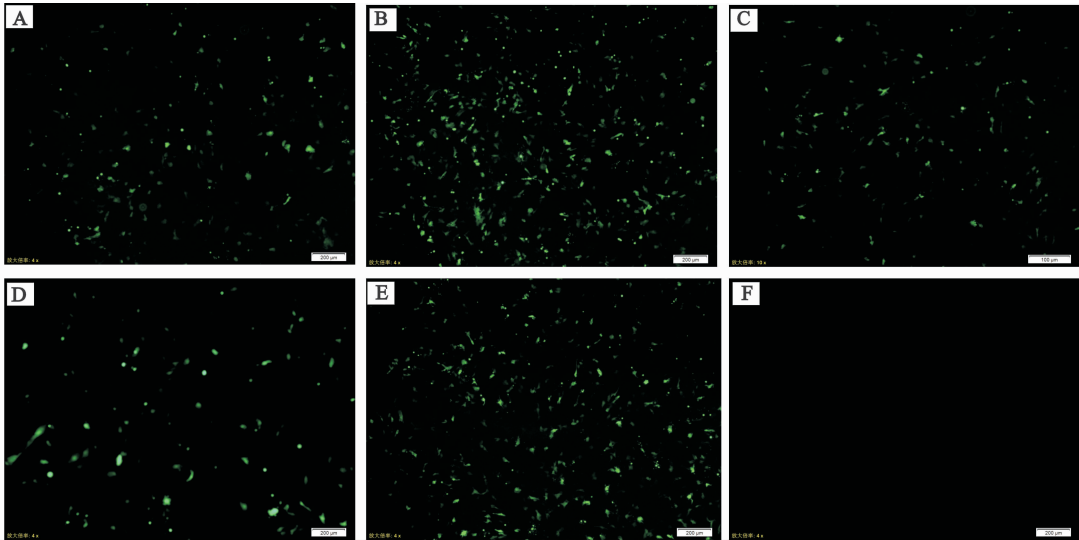
### 1.7 数据统计与分析

结果用“平均值±标准差”表示。采用 SPSS 20.0 统计分析软件进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 牛卵泡颗粒细胞转染效果的检测

转染干扰载体后牛卵泡颗粒细胞绿色荧光蛋白的表达情况如图 1 所示。转染后 48 h,干扰组(图 1-A、B、C、D)和阴性对照组(图 1-E)的牛卵泡颗粒细胞在荧光显微镜下均可见绿色荧光,未转染的牛卵泡颗粒细胞无绿色荧光(图 1-F)。结果表明,转染成功。



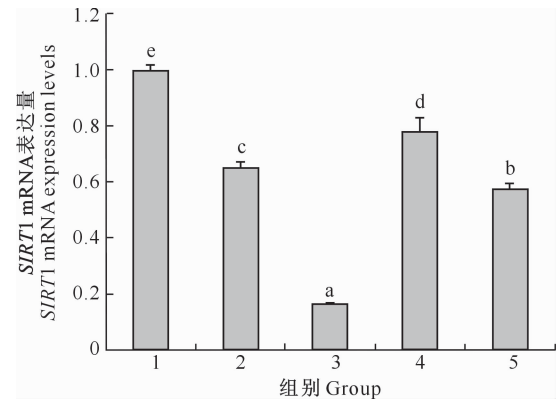
A. 转染 shRNA-SIRT1-1597 的颗粒细胞;B. 转染 shRNA-SIRT1-1471 的颗粒细胞;C. 转染 shRNA-SIRT1-1186 的颗粒细胞;  
D. 转染 shRNA-SIRT1-1306 的颗粒细胞 E. 转染 shRNA-NC 的颗粒细胞;F. 未转染的颗粒细胞  
A. Transfection of shRNA-SIRT1-1597 granulosa cells;B. Transfection of shRNA-SIRT1-1471 granulosa cells;  
C. Transfection of shRNA-SIRT1-1186 granulosa cells;D. Transfection of shRNA-SIRT1-1306 granulosa cells;  
E. Transfection of shRNA-NC granulosa cells;F. Non-transfected granulosa cells

图 1 转染干扰载体后牛卵泡颗粒细胞绿色荧光蛋白的表达情况(40×)

Fig.1 Expression of green fluorescent protein in bovine follicular granulosa cells after interfering with vector(40×)

2.2 干扰后牛卵泡颗粒细胞 SIRT1 基因的实时荧光定量 PCR 检测

4 条干扰载体干扰后牛卵泡颗粒细胞 SIRT1 基因表达量的实时荧光定量 PCR 结果如图 2 所示。



1. 阴性对照组;2~5. 分别为干扰载体 shRNA-SIRT1-1597、shRNA-SIRT1-1471、shRNA-SIRT1-1186、shRNA-SIRT1-1306 的干扰结果。图柱上标不同小写字母表示组间差异显著( $P<0.05$ )  
1. Negative control;2-5. The interference results of shRNA-SIRT1-1597, shRNA-SIRT1-1471, shRNA-SIRT1-1186, and shRNA-SIRT1-1306, respectively. Different lowercase letters indicate significant difference between groups ( $P<0.05$ )

图 2 4 条干扰载体干扰后牛卵泡颗粒细胞 SIRT1 基因表达量的实时荧光定量 PCR 检测结果

Fig.2 Real-time fluorescent quantitative PCR results of SIRT1 gene expression in bovine follicular granulosa cells silenced by four interfering vectors

由图 2 可知,与阴性对照组相比,干扰组 SIRT1 基因的表达量均显著降低( $P<0.05$ );4 个干扰处理相比,shRNA-SIRT1-1471 处理 SITT1 基因表达量显著降低( $P<0.05$ ),表明其干扰效果最好。

2.3 干扰 SIRT1 基因对牛卵泡颗粒细胞体外增殖的影响

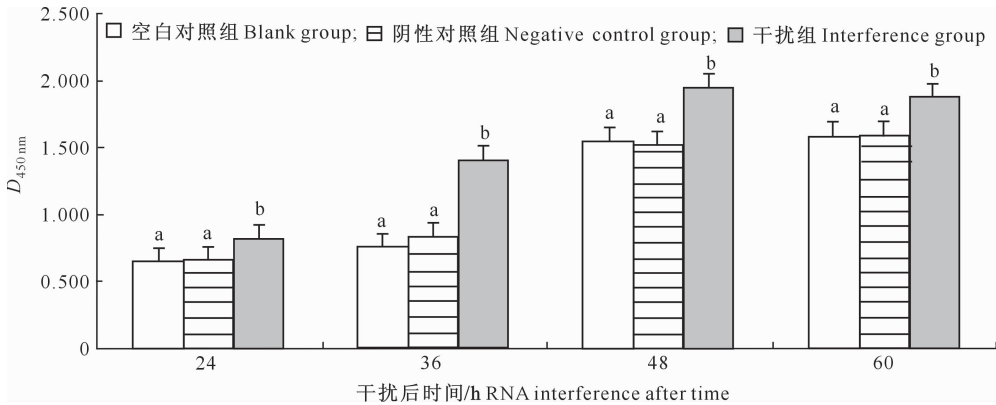
通过 CCK-8 法检测干扰 SIRT1 基因表达后 24,36,48 和 60 h 牛卵泡颗粒细胞的增殖情况,结果如图 3 所示。从图 3 可以看出,当干扰时间为 24~48 h 时,随着干扰时间的延长,空白对照组和阴性对照组以及干扰组  $D_{450\text{ nm}}$  值总体呈升高趋势;当干扰时间为 48~60 h 时,以上 3 组  $D_{450\text{ nm}}$  值无明显变化。不同干扰时间下空白对照组和阴性对照组  $D_{450\text{ nm}}$  值差异均不显著,干扰组  $D_{450\text{ nm}}$  值显著高于空白对照组和阴性对照组( $P<0.05$ ),表明 SIRT1 基因抑制了牛卵泡颗粒细胞的增殖。

2.4 干扰 SIRT1 基因对牛卵泡颗粒细胞周期的影响

干扰质粒载体转染后,下调了细胞 SIRT1 表达,显著促进了颗粒细胞增殖。为探讨细胞增殖活性的改变是否与细胞周期相关,收集细胞并利用流式细胞仪进行细胞周期检测,结果(图 4)显示,与空白对照组和阴性对照组相比较,干扰组的 G1 期细

胞比例显著降低( $P<0.05$ ),S 期细胞比例显著升高( $P<0.05$ ),提示 *SIRT1* 基因低表达可促进细胞进

入 S 期,从而使细胞能够进入 M 期进行正常有丝分裂,促进细胞增殖。



图柱上标不同小写字母表示同一干扰后时间下不同组间差异显著( $P<0.05$ )。下图同

Different lowercase letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ) among treatment groups at same time after interfering. The same below

图 3 干扰 *SIRT1* 基因对牛卵泡颗粒细胞体外增殖的影响

Fig. 3 Effect of *SIRT1* gene interfering on proliferation of bovine granulosa cells

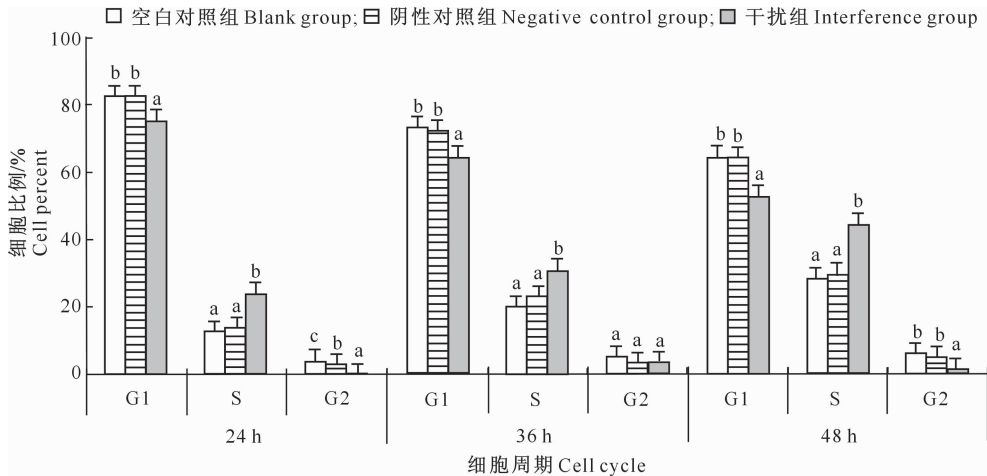


图 4 干扰 *SIRT1* 基因后不同时间下牛卵泡颗粒细胞的细胞周期变化

Fig. 4 Cell cycle changes of granulosa cells at different times after *SIRT1* gene interfering

3 讨 论

卵泡是决定雌性动物繁殖性能的关键因素,而颗粒细胞对原始卵泡的启动,生长期卵泡的发育、成熟以及黄体功能的维持起着至关重要的作用<sup>[12-13]</sup>。*SIRT1* 是一种去乙酰化酶,能与多种底物相互作用,使底物去乙酰化。*SIRT1* 在细胞增殖、分化、衰老、凋亡、自噬、DNA 损伤修复等过程中发挥着重要的调控作用<sup>[14-19]</sup>。近年来的研究表明,*SIRT1* 在生殖调控过程中也发挥着重要作用,上调 *SIRT1* 表达可抑制原始卵泡激活、卵泡成熟以及卵泡闭锁,进而增加卵巢卵泡储备量延长卵巢寿命<sup>[20]</sup>。卵泡颗粒细胞形态、功能改变直接影响卵泡的发育及闭锁,因此颗粒细胞可作为相关基因研究的成熟模型<sup>[21-22]</sup>。

本研究利用 RNA 干扰技术干扰牛卵泡颗粒细胞 *SIRT1* 基因的表达,探讨 *SIRT1* 基因对牛卵泡颗粒细胞增殖、细胞周期的影响及其作用机制,结果发现,*SIRT1* 基因干扰组颗粒细胞增殖的效果明显优于空白对照组和阴性对照组,*SIRT1* 基因低表达有利于颗粒细胞增殖的一种机制可能是通过调控与细胞生长相关的靶基因叉头转录因子 O (Forkhead transcription factors box class O, FOXO) 和 mTOR 来实现。*SIRT1* 可通过去乙酰化激活 FOXO 的转录调节活性,进而上调多种细胞周期抑制因子,如 CDKI、p21WAF1/CIP1 和 p27Kip1 等,诱导细胞周期阻滞或细胞凋亡<sup>[23-25]</sup>。FOXO 还可通过上调 INK4 家族蛋白(P15、P16、P18、P19)调控细胞周期,抑制细胞增殖<sup>[26]</sup>。*SIRT1* 基因低表达使卵

泡颗粒细胞增殖的另一种机制可能是通过下调 mTOR 信号实现<sup>[27]</sup>。mTOR 主要通过调节核糖体蛋白 S6 激酶 1 (S6K1) 和蛋白质翻译起始因子 eIF4E 结合蛋白 1 (4EBP1) 对蛋白质的翻译进行调控, 加速细胞 G1/S 期的转换, 促进细胞生长和增殖, 抑制细胞凋亡<sup>[-28-29]</sup>。

为了进一步探讨干扰 *SIRT1* 基因后颗粒细胞增殖活性的改变是否与细胞周期相关, 本研究利用流式细胞术检测不同处理组颗粒细胞周期变化, 结果表明, 干扰 *SIRT1* 基因后 G1 期细胞比例较阴性对照组和空白对照组显著降低, S 期细胞比例则显著升高, 说明细胞能进入 M 期进行正常有丝分裂进而促进细胞增殖, 这与细胞增殖试验的结果一致。其原因可能是干扰 *SIRT1* 基因后, FOXO 转录活性降低及 mTOR 信号下调, 进而对细胞 G1 期的阻滞作用减弱, 使细胞由 G1 期进入 S 期, 从而促进了细胞增殖。

## [参考文献]

- [1] Rine J, Herskowitz I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 1987, 116(1): 9-22.
- [2] Imai S I, Armstrong C M, Kaeberlein M, et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase [J]. *Nature*, 2000, 403(6771): 795-800.
- [3] Ho C, van der Veer E, Akawi O, et al. *SIRT1* markedly extends replicative lifespan if the NAD<sup>+</sup> salvage pathway is enhanced [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(18): 3081-3085.
- [4] Vaziri H, Dessain S K, Eaton E N, et al. hSIR2 (*SIRT1*) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase [J]. *Cell*, 2001, 107(2): 149-159.
- [5] Frye R A. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast *SIR2* gene; Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 260(1): 273-279.
- [6] Frye R A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(2): 793-708.
- [7] Rahman S, Islam R. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions [J]. *Cell Communication and Signaling*, 2011, 9(11): 1-8.
- [8] Bordone L, Cohen D, Robinson A, et al. *SIRT1* transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction [J]. *Aging Cell*, 2007, 6(6): 759-767.
- [9] Coussens M, Maresh J G, Yanagimachi R, et al. Sirt1 deficiency attenuates spermatogenesis and germ cell function [J]. *PLoS ONE*, 2008, 3(2): e1571.
- [10] Mcburney M W, Yang X, Jardine K, et al. The mammalian SIR2 alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(1): 38-54.
- [11] Seifert E L, Caron A Z, Morin K, et al. SirT1 catalytic activity is required for male fertility and metabolic homeostasis in mice [J]. *The FASEB Journal*, 2012, 26(2): 555-566.
- [12] Parrott J A, Skinner M K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculo-genesis [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(9): 4262-4271.
- [13] Braw-Tal R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2002, 187(1): 11-18.
- [14] Huang R, Xu Y, Wan W, et al. Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation [J]. *Mol Cell*, 2015, 57(3): 456-466.
- [15] Lee I H, Cao L, Mostoslavsky R, et al. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(9): 3374-3379.
- [16] Haigis M C, Sinclair D A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance [J]. *Annu Rev Pathol*, 2010, 5: 253-295.
- [17] Ou X, Chae H D, Wang R H, et al. *SIRT1* deficiency compromises mouse embryonic stem cell hematopoietic differentiation, and embryonic and adult hematopoiesis in the mouse [J]. *Blood*, 2011, 117(2): 440-450.
- [18] Chae H D, Broxmeyer H E. *SIRT1* deficiency downregulates PTEN/JNK/FOXO1 pathway to block reactive oxygen species-induced apoptosis in mouse embryonic stem cells [J]. *Stem Cells and Development*, 2010, 20(7): 1277-1285.
- [19] Chen I C, Chiang W F, Huang H H, et al. Role of *SIRT1* in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma metastasis [J]. *Molecular Cancer*, 2014, 13(254): 1-19.
- [20] Zhou X L, Xu J J, Ni Y H, et al. *SIRT1* activator (SRT1720) improves the follicle reserve and prolongs the ovarian lifespan of diet-induced obesity in female mice via activating *SIRT1* and suppressing mTOR signaling [J]. *Journal of Ovarian Research*, 2014, 7(97): 1-12.
- [21] 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(1): 123-127.
- Li B X, Zhao F, Ren S W, et al. Effect of *SIRT1* gene on gene expression of reproductive hormone receptor in porcine ovarian granulosa cells [J]. *Journal of Jiangsu Agricultural College*, 2016(1): 123-127.
- [22] Lin P, Rui R. Effects of follicular size and FSH on granulosa cell apoptosis and atresia in porcine antral follicles [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2010, 77(8): 670-678.
- [23] Weigelt J, Climent I, Dahlman-Wright K, et al. Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4) [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(20): 5861-5869.

mammary gland epithelial cells by regulating parathyroid hormone-related protein [J]. *Gene*,2014,51(2):279-289.

[16] 郝志云,王继卿,胡江,等. 绵羊 *STAT5a* 基因的组织表达及核苷酸序列变异分析 [J]. *农业生物技术学报*,2018,26(1):96-103.

Hao Z Y,Wang J Q,Hu J,et al. The tissue expression of the sheep(*ovis aries*)*STAT5a* gene and the analysis of nucleotide sequence variation [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*,2018,26(1):96-103.

[17] Zhou H T,Hickford J G,Fang Q. A two-step procedure for extracting genomic DNA from dried blood spots on filter paper for polymerase chain reaction amplification [J]. *Analytical Biochemistry*,2006,354(1):159-161.

[18] Byun S,Fang Q,Zhou H T,et al. An effective method for silver-staining DNA in large number of polyacrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*,2009,385(1):174-175.

[19] Gong H,Zhou H T,Hickford J G. Diversity of the glycine/tyrosine-rich keratin-associated protein 6 gene(*KAP6*) family in sheep [J]. *Molecular Biology Reports*,2011,38(1):31-35.

[20] Park Y W,Juárez M,Ramos M,et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk [J]. *Small Ruminant Research*,2007,68(1/2):88-113.

[21] Kaleri R. Heritability estimates for some performances traits of baluchi sheep [J]. *Journal of Basic & Applied Sciences*,2017,13,114-116.

[22] Geenty K G. Effects of weaning age on export lamb production [J]. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*,1979,39:202-210.

[23] 赵有璋. 中国养羊学 [M]. 北京:中国农业出版社,2013.

Zhao Y Z. Chinese sheep science [M]. Beijing:China Agriculture Press,2013.

[24] 李庆章. 奶牛乳腺发育与泌乳生物学 [M]. 北京:科学出版社,2014.

Li Q Z. Mammary gland development and lactation biology of daily cow [M]. Beijing:Science Press,2014.

[25] Nott A,Meislin S H,Moore M J. A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression [J]. *RNA-a Publication of the RNA Society*,2003,9(5):607-617.

[26] Wang J,Zhou H,Rachel H J,et al. Variation in the ovine *MYF5* gene and its effect on carcass lean meat yield in New Zealand Romney sheep [J]. *Meat Science*,2017,131:146-151.

[27] Gam R,Shah P,Crossland R E,et al. Genetic association of hematopoietic stem cell transplantation outcome beyond histocompatibility genes [J]. *Front Immunol*,2017,8(899/905):380.

[28] Cases E,White S N,Riler D G,et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle [J]. *Journal of Animal Science*,2005,83(1):13-19.

[29] 王以婷,杨卫红,赵云龙,等. *CYP3A4* 内含子 10 对 *CYP3A4* 基因表达的增强子作用 [J]. *昆明医科大学学报*,2017,38(1):13-17.

Wang Y T,Yang W H,Zhao Y L,et al. The enhancer role of *CYP3A4* intron 10 in *CYP3A4* gene expression [J]. *Journal of Kunming Medical University*,2017,38(1):13-17.

[30] Chang K C. Critical regulatory domains in intron 2 of porcine sarcomeric myosin heavy chain gene [J]. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*,2000,21:451-461.

[31] Chen S,Li K,Cao W,et al. Codon-resolution analysis reveals a direct and context-dependent impact of individual synonymous mutations on mRNA level [J]. *Molecular Biology & Evolution*,2017,34(11):2944-2958.

[32] Seligmann H,Warthi G. Genetic code optimization for cotranslational protein folding;codon directional asymmetry correlates with antiparallel betasheets,trna synthetase classes [J]. *Computational & Structural Biotechnology Journal*,2017,15:412-424.

[33] Escudero J A,Nivina A,Cambray G,et al. Recoding of synonymous genes to expand evolutionary landscapes requires control of secondary structure affecting translation [J]. *Biotechnology & Bioengineering*,2018,115(1):184-191.

(上接第 6 页)

[24] Sengupta A,Kalinichenko V V,Yutzey K E. FoxO1 and FoxM1 transcription factors have antagonistic functions in neonatal cardiomyocyte cell-cycle withdrawal and *IGF1* gene regulation [J]. *Circ Res*,2013,112(2):267-277.

[25] Tang Y L,Huang L B,Lin W H,et al. Butein inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in acute lymphoblastic leukemia via FOXO3a/p27kip1 pathway [J]. *Oncotarget*,2016,7(14):18651.

[26] Ho W,Pikor L,Gao Y,et al. Calpain 2 regulates Akt-FoxOp27Kip1 protein signaling pathway in mammary carcinoma [J]. *Journal of Biological Chemistry*,2012,287(19):15458-15465.

[27] Fingar D C,Salama S,Tsou C,et al. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E [J]. *Genes Dev*,2002,16(12):1472-1487.

[28] Beck T,Hall M N. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient regulated transcription factors [J]. *Nature*,1999,402(6762):689-692.

[29] Fingar D C,Richardson C J,Tee A R,et al. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E [J]. *Mol Cell Biol*,2004,24(1):200-216.