

山梨酸对 C2C12 细胞增殖、IGF-1 分泌和 相关基因表达的影响

方心灵, 王海峰, 束刚, 王松波, 朱晓彤, 王丽娜, 高萍, 江青艳

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:为研究山梨酸对小鼠骨骼肌成肌细胞(C2C12)增殖、IGF-1分泌、GH/IGF系统和糖脂代谢相关基因表达的影响,试验通过培养基中添加不同浓度的山梨酸(0、0.1、1.0、10.0和100.0 $\mu\text{mol/L}$)处理C2C12细胞,采用MTT法检测细胞增殖,RIA法检测细胞IGF-1分泌量,qPCR法检测相关基因mRNA的表达水平.结果表明:1)10.0 $\mu\text{mol/L}$ 山梨酸显著促进体积分数为10%胎牛血清(1和2 d)和无血清(4和5 d)培养的C2C12细胞增殖($P < 0.05$);2)0.1、1.0和100.0 $\mu\text{mol/L}$ 山梨酸均显著抑制无血清培养的C2C12细胞IGF-1的分泌($P < 0.05$);3)1.0 $\mu\text{mol/L}$ 山梨酸显著上调无血清培养的C2C12细胞IGF-1R、GHR和CPT1b的mRNA表达($P < 0.05$),对IGFBP3($P = 0.09$)、PDK4($P = 0.10$)和PGC1 α ($P = 0.10$)的mRNA表达量也有提高趋势.提示山梨酸可促进C2C12细胞的增殖和GH/IGF系统及糖脂代谢相关基因mRNA表达,但对IGF-1的分泌具有抑制作用.

关键词:山梨酸; C2C12; 增殖; IGF-1分泌; 基因表达

中图分类号:S816.7

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2012)04-0529-06

Effects of Sorbic Acid on Proliferation, IGF-1 Secretion and Related Gene mRNA Expression in C2C12 Cell

FANG Xin-ling, WANG Hai-feng, SHU Gang, WANG Song-bo, ZHU Xiao-tong,

WANG Li-na, GAO Ping, JIANG Qing-yan

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:The purpose of this experiment was to explore the effects of sorbic acid(SA) on proliferation, IGF-1 secretion, GH/IGF system and glucose and lipid metabolism-related genes mRNA expression in C2C12 cells. C2C12 cells were exposed to different doses of SA(0, 0.1, 1.0, 10.0 and 100.0 $\mu\text{mol/L}$) to measure cell proliferation by MTT assay, IGF-1 secretion by RIA assay and transcript levels by qPCR assay. Results indicated that: 1) SA(10.0 $\mu\text{mol/L}$) significantly promoted($P < 0.05$) proliferation of cell cultured with 10% fetal bovine serum(1 and 2 d) or without serum(4 and 5 d). 2) IGF-1 secretion was significantly suppressed($P < 0.05$) by 0.1, 1.0 or 100.0 $\mu\text{mol/L}$ SA in serum-free cultured C2C12 cells. 3) Expressions of IGF-1R, GHR and CPT1b mRNA were significantly up-regulated in serum-free cultured C2C12 cells treated with 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SA. The increasing trend of IGFBP3 ($P = 0.09$), PDK4 ($P = 0.10$) and PGC1 α ($P = 0.10$) transcript levels were also observed in serum-free cultured C2C12 cells by 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SA treatment. This suggested that SA could increase proliferation and GH/IGF system and glucose and lipid metabolism-related genes mRNA expression but depress IGF-1 secretion in C2C12 cells.

Key words:sorbic acid; C2C12; proliferation; IGF-1 secretion; gene expression

收稿日期:2012-05-26

作者简介:方心灵(1985—),男,博士研究生;通信作者:江青艳(1966—),男,教授,博士,E-mail:qyjiang@scau.edu.cn

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2012CB124701);企业横向课题《猪用抗生素替代品——新型高效有机酸制剂的研发》

山梨酸(Sorbic acid, SA),学名为2,4-己二烯酸,含有羧基和共轭双键等功能性基团,是一种不饱和直链脂肪酸($\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCOOH}$)。在饲料工业上,SA是一种重要的酸化剂和防霉剂,具有调节仔猪胃肠道微生物种群平衡、降低腹泻率、促进营养物质消化吸收、抑制饲料霉菌生长等作用^[1]。另外,SA可通过 β 氧化的代谢途径为机体提供能量,且对动物机体无毒副作用^[2-3]。华南农业大学动物科学学院生理生化实验室前期研究表明,日粮添加SA(0.05%~0.40%)能够提高断奶仔猪的日增体质量和血液IGF-1浓度,并且可能是通过促进肝细胞IGF-1的表达和分泌实现的^[4]。此外,日粮中添加0.6%SA能够降低黄羽肉鸡胸肌和腿肌的失水率和 pH_{1h} ^[5]。然而,动物的生长性能和肉品质的提高与骨骼肌细胞的增殖及糖脂代谢水平的改变有密切关系。因此,本试验以C2C12小鼠骨骼肌成肌细胞为模型,研究SA对C2C12细胞增殖、IGF-1分泌以及相关基因表达的影响,旨在深入揭示SA的促生长机制。

1 材料与方法

1.1 试验细胞株和试剂

C2C12小鼠骨骼肌成肌细胞株为华南农业大学动物科学学院生理生化实验室保存。

新生胎牛血清(GIBCO,美国);高糖DMEM和DMEM/F12(Hyclone,美国);胰岛素和山梨酸(Sigma,美国);MTT(北京鼎国);蛋白裂解抽提试剂和蛋白定量试剂盒(北京百泰克);Trizol(Invitrogen,美国); $10\times$ DNase I Buffer、DNase I(RNase-free)、Ribonuclease inhibitor和Oligo d(T)-18 Primers(TaKaRa,日本);dNTP Mix(Fermentas,立陶宛);M-MLV Reverse Transcriptase(Promega,美国);Realtime PCR Master Mix(TOYOBO,日本);引物合成(北京奥科);IGF-1放免测定试剂盒(天津九鼎)。

1.2 山梨酸对C2C12细胞增殖的影响

1.2.1 细胞生长标准曲线的绘制 用DMEM完全培养液(体积分数为10%的胎牛血清)将C2C12细胞稀释至 0.6×10^4 、 1.2×10^4 、 2.4×10^4 、 4.8×10^4 和 9.6×10^4 孔 $^{-1}$ 的密度梯度并接种于96孔板,同时设不含细胞的DMEM完全培养液作为空白对照($100\mu\text{L}/\text{孔}$, $n=8$),于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、饱和湿度、体积分数为5% CO_2 的培养箱中培养4h。采用MTT法^[6]检测每个细胞密度梯度对应的 D_λ 值。

1.2.2 细胞生长曲线的绘制 用DMEM完全培养

液将C2C12细胞以 $0.6\times 10^4\text{ mL}^{-1}$ 密度接种于96孔板中($100\mu\text{L}/\text{孔}$, $n=24$),待细胞全部贴壁并生长至70%~80%融合时,更换为含SA的培养液处理细胞。

1) 分别用含10.0和100.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SA的DMEM完全培养基换液,观察SA在有血清条件下对C2C12细胞增殖的影响(1和2d)。

2) 分别用含1.0和10.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SA的DMEM/F12培养基(含2.5mg/mL人胰岛素)换液,观察SA在无血清条件下对C2C12增殖的影响(1、2、3、4和5d)。

采用MTT法测得各组细胞 D_λ 值,结合细胞生长标准曲线,计算出各阶段的细胞数。

1.3 山梨酸对C2C12细胞IGF-1分泌和基因mRNA表达的影响

将C2C12细胞以 $1.5\times 10^4\text{ mL}^{-1}$ 接种到含DMEM完全培养液的24孔板中($1.5\text{ mL}/\text{孔}$, $n=6$),待细胞全部贴壁并生长至70%~80%融合时,更换为含SA的DMEM/F12无血清培养液(含2.5mg/mL人胰岛素)处理细胞^[7]。

1) 观察0、0.1、1.0、10.0和100.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SA在无血清条件下对C2C12细胞IGF-1分泌的影响(1、2、3、4和5d)。处理结束后,采用RIA检测细胞上清液IGF-1质量浓度,方法参照放免试剂盒进行;采用通用蛋白裂解抽提试剂裂解细胞沉淀,然后使用BCA法蛋白定量试剂盒测定总蛋白的浓度。

2) 观察1.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SA在无血清条件下对C2C12细胞相关基因表达的影响(3d)。处理结束后,去除培养上清液,迅速置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 条件保存。

1.4 相关基因mRNA表达量的测定

1) 总RNA抽提:利用Trizol一步法分别提取C2C12细胞总RNA,用紫外分光光度计检测其浓度和纯度,利用普通琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。

2) 总RNA消化:反应体系为16 μg 总RNA、2.0 μL 10 \times DNase I Buffer、1.0 μL 5U/ μL DNase I(RNase-free)、0.5 μL 40U/ μL Ribonuclease inhibitor,加入DEPC处理水至20.0 μL ;反应条件为 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温育30min,65 $^\circ\text{C}$ 5min。

3) 反转录:2 μg 消化后总RNA、3.0 μL 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的Oligo d(T)-18,加入DEPC处理水至15.0 μL ,70 $^\circ\text{C}$ 预变性5min,迅速取出并立即冰浴2min。分别加入5.0 μL 5 \times Buffer、1.0 μL 200U/ μL M-MLV反转录酶、0.625 μL 40U/ μL Ribonuclease inhibitor、1.25 μL 10mmol/LdNTP,加入DEPC处理水至25.0 μL ;

42 °C 反应 60 min, 70 °C 10 min.

4) Real-time qPCR: 根据 NCBI 中 GenBank 发表的基因序列, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计各基因的上、下游引物(见表 1). 反应体系为 1.0 μL 反转录产物、0.8 μL 5 μmol/L 引物、10.0 μL 2 × SYBR Green I Mix, 加入去离子水至 20.0 μL. 反应条件为 94 °C 1 min 预变性; 94 °C 15 s, 58 ~ 67 °C 15 s, 72 °C 40 s, 40 个循环. 获得各基因 Ct 值, 以 β-actin 作为内参, 采用 2^{-ΔCt} 法计算样品中各基因 mRNA 表达丰度.

表 1 C2C12 细胞各基因引物序列及扩增参数

Tab. 1 Gene primer sequences and amplification parameters of C2C12 cells

基因及序列号	引物序列 (5'-NNN-3')	长度/bp	θ/ °C
ACSS2	S: TTGGAACCTGTGGTGGCTAT	148	60
NM_019811	A: CCCTGTAGAAGGCATCTGTAGTG		
CPT1b	S: ATGTGCAAGCAGCCCGTCTA	159	60
NM_009948	A: TGCCTGGGATGCGTGTAGTG		
GHR	S: AACCCACCAACTCGCCTCTA	142	60
NM_010284	A: TTGGGCTATCCCTGCCTTAA		
GLUT4	S: TCCTTCTATTTGCCGTCCTC	140	54
NM_009204	A: GGGTTTCACCTCTGCTCTAA		
IGFBP3	S: ACCGAGTGACCGATTCCAAGTT	231	60
NM_008343	A: CGCCTCTGGGACTCAGCACAT		
IGF-1	S: GGACCGAGGGCCTTTTAC	163	60
NM_010512.4	A: TAGAGCGGGCTGCTTTTG		
IGF-1R	S: CTCCGGCCCTTTCACCTCTGTA	246	60
NM_010513	A: CTCGACTTGGCAGCCGTATT		
PDK4	S: AAAATGCCTGTGAAAGAACC	176	60
NM_013743	A: CTCATGGAAGTCCACCAAAT		
PGC1α	S: TGTGCTGCTCTGTTGGTGA	144	60
NM_008904	A: GGATATGATTTCCGATTGGTC		
β-actin	S: TAAGGCCAACCGTGAAAAGATGAC	428	60
NM_007393.3	A: ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG		

1.5 数据处理与分析

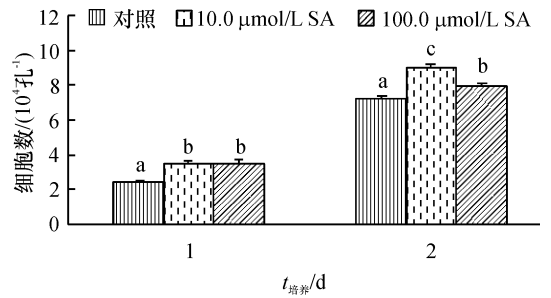
全部数据采用 SAS 统计软件进行统计, 细胞增殖和 IGF-1 分泌指标采用单因素方差分析和 Turkey 法进行多重比较, 基因表达指标采用独立样本 t 检验.

2 结果与分析

2.1 山梨酸对 C2C12 细胞增殖的影响

2.1.1 山梨酸对有血清培养的 C2C12 细胞增殖的影响 由图 1 可知, SA 可促进体积分数为 10% 胎牛血清培养的 C2C12 细胞增殖. 10.0 和 100.0 μmol/L SA

处理 1 和 2 d, 均能显著促进 C2C12 细胞增殖 ($P < 0.05$); 其中, 10.0 μmol/L SA 组在第 2 天时的促增殖效应显著高于 100.0 μmol/L SA 组 ($P < 0.05$).

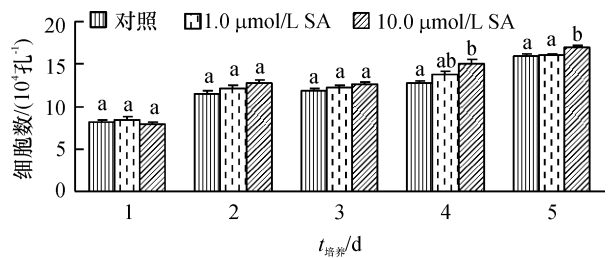


同一时间点的柱上凡有一个相同小写字母者, 表示同一时间点不同处理组间差异不显著, $P > 0.05$ (采用单因素方差分析和 Turkey 法进行多重比较).

图 1 SA 对有血清培养的 C2C12 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of SA on proliferation of C2C12 skeletal muscle cells with serum culture

2.1.2 山梨酸对无血清培养的 C2C12 细胞增殖的影响 由图 2 可知, 除第 1 天外, 随着 SA 浓度的升高, C2C12 细胞增殖均有提高的趋势. 其中, 10.0 μmol/L SA 能显著促进后期(4 和 5 d) C2C12 细胞的增殖 ($P < 0.05$).



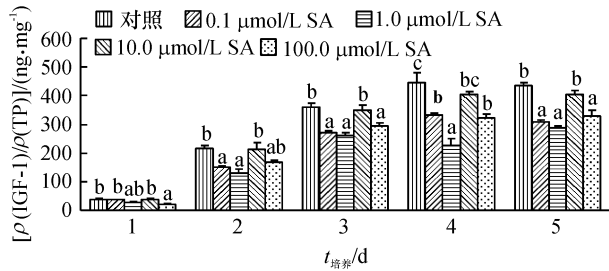
同一时间点的柱上凡有一个相同小写字母者, 表示同一时间点不同处理组间差异不显著, $P > 0.05$ (采用单因素方差分析和 Turkey 法进行多重比较).

图 2 SA 对无血清培养的 C2C12 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of SA on proliferation of C2C12 skeletal muscle cells with serum-free culture

2.2 山梨酸对无血清培养的 C2C12 细胞上清 IGF-1 含量的影响

从图 3 可知, 随着 SA 浓度的增加, C2C12 细胞上清 IGF-1 的质量浓度呈倒 N 形的趋势. 除第 1 天外, 0.1 和 1.0 μmol/L SA 均能显著抑制 IGF-1 的分泌量 ($P < 0.05$); 且在第 4 天时, 1.0 μmol/L SA 组的抑制显著效应高于 0.1 μmol/L SA 组 ($P < 0.05$). 与对照组相比, 10.0 μmol/L SA 组对 IGF-1 分泌量均无显著作用 ($P > 0.05$). 当 SA 浓度增加至 100.0 μmol/L 时, IGF-1 分泌在 5 个时间点均呈现抑制的趋势.



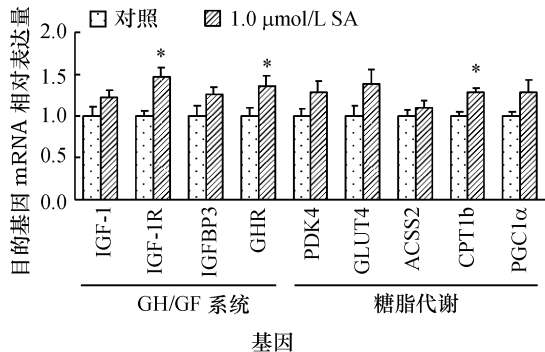
同一时间点的柱上凡有一个相同小写字母者,表示同一时间点不同处理组间差异不显著, $P>0.05$ (采用单因素方差分析和 Turkey 法进行多重比较)。

图3 SA对无血清培养的C2C12细胞上清IGF-1含量的影响

Fig.3 Effects of SA on IGF-1 secretion of C2C12 skeletal muscle cells with serum-free culture

2.3 SA对无血清培养的C2C12细胞相关基因表达的影响

由图4可知,1.0 $\mu\text{mol/L}$ SA显著上调GHR、IGF-1R和CPT1b mRNA表达($P<0.05$),并且有提高IGFBP3($P=0.09$)、PDK4($P=0.10$)和PGC1 α ($P=0.10$)mRNA表达量的趋势。



*表示对照组与处理组间差异显著(采用独立样本 t 检验, $P<0.05$)。

图4 SA对无血清培养的C2C12细胞GH/IGF系统和糖脂代谢相关基因mRNA表达的影响

Fig.4 Effects of SA on GH/IGF system, glucose and lipid metabolism-related genes mRNA expression of C2C12 cells with serum-free culture

3 讨论

3.1 SA对C2C12骨骼肌成肌细胞增殖的影响

有大量研究表明,脂肪酸尤其不饱和脂肪酸(UFA)对骨骼肌细胞的增殖和功能有重要作用^[8]。单不饱和脂肪酸(MUFA)的油酸(OA)和 $n-6$ 系列多不饱和脂肪酸(PUFA)的亚麻酸(LA)、 γ -亚麻酸(GLA)及花生四烯酸(AA)均能促进C2C12细胞的增殖(含体积分数为5%胎牛血清DMEM),而 $n-3$ 系列PUFA和饱和脂肪酸(SFA)对C2C12细胞增殖无

影响。值得一提的是,反-9,顺-11共轭亚油酸(CLA)有提高C2C12细胞增殖的作用,而其异构体反-10,顺-12 CLA的作用则相反^[9]。另外,顺式UFA以及OA和LA等也能促进离体培养的血管平滑肌细胞的增殖^[10-11]。提示UFA对肌肉细胞增殖具有调节作用,且其生理调节活性可能与不饱和键的数目和位置有关。本试验研究结果表明,在体积分数为10%胎牛血清DMEM或无血清DMEM/F12中添加10.0 $\mu\text{mol/L}$ SA,对C2C12细胞的增殖均有促进作用。这与前人关于UFA对肌肉细胞增殖的研究结果基本一致,并且似乎可以解释SA促进断奶仔猪生长发育的现象。而且前期试验结果表明SA对断奶仔猪的促生长作用主要是通过提高肝细胞IGF-1的表达和分泌实现的^[4]。

3.2 SA对C2C12细胞GH/IGF系统表达的调节作用

为了避免血清中大量生长因子的干扰,本试验采用无血清培养的方式研究SA对C2C12细胞IGF-1分泌的时间和剂量效应。本研究结果表明,随着SA浓度的升高,C2C12细胞上清IGF-1的浓度先下降,再恢复到原来的水平,然后再一次下降。当SA浓度高于100.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,我们观察到无血清培养的C2C12细胞状态和活性均受到明显影响,提示100.0 $\mu\text{mol/L}$ SA组的IGF-1质量浓度显著下降,可能与细胞状态和活性不佳有关。有趣的是,与对照组相比,1.0 $\mu\text{mol/L}$ SA组C2C12细胞上清液中IGF-1的质量浓度显著降低,而其mRNA表达无显著改变。Coleman等^[12]研究表明,肥育猪肌肉注射猪重组GH显著提高肝脏和皮下脂肪IGF-1 mRNA的表达,但对肌肉IGF-1 mRNA表达无影响。Gayan-Ramirez等^[13]研究表明,胆汁性肝硬化抑制肝脏IGF-1的表达,但对肌肉组织则无影响。在机体中肝细胞分泌的IGF-1大部分进入血清,然后输送到各个组织器官发挥其生理调节作用^[14],而肌肉细胞产生的IGF-1主要通过自分泌和旁分泌的方式起作用^[15]。因此,提示IGF-1在肝脏和肌肉组织中可能存在不同的表达调节模式。

IGF-1R是一种在质膜中发现的受体酪氨酸激酶,具有传递细胞生存和增殖信号的作用,是IGF-1发挥生物学功能的主要介导者^[16]。近年研究表明,PUFA(CLA、ALA和LA)对IGF-1R的表达有调节作用^[17-18]。而且,SA(100.0 $\mu\text{mol/L}$)也能显著提高离体培养的肝细胞(6 h)IGF-1R mRNA的表达^[4]。本研究结果表明,1.0 $\mu\text{mol/L}$ SA处理C2C12细胞3 d后可以显著上调IGF-1R mRNA表达。提示IGF-1R可能

介导 SA 的促 C2C12 细胞增殖作用,同时 IGF-1R 表达的提高可能更多结合 IGF-1,从而导致上清 IGF-1 含量的降低,但这有待试验证实.另外,SA 对肝细胞 GHR 和 IGFBP3 mRNA 表达均无显著影响^[4].而本研究结果表明,1.0 $\mu\text{mol/L}$ SA 显著上调 GHR mRNA 的表达,对 IGFBP3 mRNA 的表达量也有提高的趋势.这提示 SA 对 GH/IGF 系统表达的调节作用可能具有组织特异性.

3.3 SA 对 C2C12 细胞糖脂代谢相关基因表达的影响

丙酮酸脱氢酶激酶 4 (PDK4) 在糖代谢中具有重要作用,在一定生理条件下将能量来源从糖向脂肪转换的关键酶^[19]. Xu 等^[20]研究表明,胰腺 β 细胞培养基中添加高水平的棕榈酸和葡萄糖能够分别上调和下调 PDK4 mRNA 的表达. GLUT 4 是骨骼肌细胞中主要的葡萄糖转运载体,其介导的葡萄糖转运是骨骼肌糖代谢的主要限速步骤^[21]. 本试验结果表明,1.0 $\mu\text{mol/L}$ SA 有提高 C2C12 细胞 PDK4 mRNA 表达量的趋势,对 GLUT4 mRNA 表达无显著影响.因此,提示 SA 在糖代谢中可能更多是影响葡萄糖的有氧化,而不是葡萄糖的摄取和转运.

肉碱棕榈酰转移酶 1b (CPT1b) 是脂肪酸氧化过程中的一种限速酶,位于线粒体外膜,能够催化长链脂肪酸(C10 ~ C18) 转运至线粒体基质进行 β 氧化,在能量代谢中具有重要作用^[22]. 其中,长链脂肪酸可以通过 PPAR 激活肌肉 CPT1 的表达^[23],或者呈剂量依赖地上调离体培养肝细胞 CPT1 mRNA 的表达^[24],从而增加脂肪酸的氧化. 本研究结果表明,无血清培养中添加 1.0 $\mu\text{mol/L}$ SA 能显著上调 C2C12 细胞 CPT1 mRNA 的表达. 近年研究证实,CPT1 基因的调节区域上存在 PPAR 反应元件^[25],提示脂肪酸激活 CPT1 的转录可能是通过 PPAR 进行调节的.

PGC1 α 是最初由 Puigserver 等^[26] 在小鼠体内发现的核激素受体 PPAR γ 的转录辅激活因子,在线粒体的生成、脂肪酸的 β 氧化及肝糖异生等过程中有重要作用. 研究表明,PGC1 α 与 PPAR α 协同调节线粒体脂肪酸 β 氧化酶的转录^[27]. PGC1 α 通过子宫内膜雌激素受体 α (EER α) 共激活 PDK4 的表达,从而调节葡萄糖代谢^[28]. 染色体免疫共沉淀试验也表明 PGC1 α 可以直接结合在 PDK4 的启动子区^[29]. 另外,在 C2C12 肌管中过表达 PGC1 α 可以诱导 PDK4 的表达,从而导致葡萄糖的氧化率降低^[28]. 本研究结果表明,1.0 $\mu\text{mol/L}$ SA 处理 C2C12 细胞对 PGC1 α mRNA 表达量有提高的趋势,提示 PGC1 α 可能介导了 SA 上调 PDK4 和 CPT1b mRNA 表达,从而抑制葡

萄糖利用和促进脂肪酸氧化,但这有待进一步研究证实.

参考文献:

- [1] 廖阳华, 韩君. 山梨酸型高效酸化剂在断奶仔猪日粮中的应用[J]. 饲料博览, 2005(6): 46-48.
- [2] WALKER R. Toxicology of sorbic acid and sorbates [J]. Food Addit Contam, 1990, 7(5): 671-676.
- [3] SUGIHARA N, TSURUTA Y, FURUNO K. Effect of potassium sorbate on cellular gsh level and lipid peroxidation in cultured rat hepatocytes [J]. Biol & Pharm Bull, 1998, 21(5): 524-526.
- [4] LUO Zeng-fu, FANG Xin-ling, SHU Gang, et al. Sorbic acid improves growth performance and regulates igf system gene expression in swine [J]. J Anim Sci, 2011, 89(8): 2356-2364.
- [5] 卢陆女, 王松波, 朱晓彤, 等. 二甲酸钾、苯甲酸和山梨酸对黄羽肉鸡生长性能与胴体品质的影响[J]. 华南农业大学学报, 2009, 30(3): 72-75.
- [6] 徐淑云. 药理实验方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 1221-1222.
- [7] GOTO S, MIYAZAKI K, FUNABIKI T, et al. Serum-free culture conditions for analysis of secretory proteinases during myogenic differentiation of mouse C2C12 myoblasts [J]. Anal Biochem, 1999, 272(2): 135-142.
- [8] CAZZOLLI R, CRAIG D L, BIDEN T J, et al. Inhibition of glycogen synthesis by fatty acid in C2C12 muscle cells is independent of pkc-alpha, -epsilon, and -theta [J]. American J Physiol Endocrinol Metabol, 2002, 282(6): E1204-E1213.
- [9] LEE J H, TACHIBANA H, MORINAGA Y, et al. Modulation of proliferation and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells by fatty acids [J]. Life Sci, 2009, 84(13/14): 415-420.
- [10] RAO G N, ALEXANDER R W, RUNGE M S. Linoleic acid and its metabolites, hydroperoxyoctadecadienoic acids, stimulate c-fos, c-jun, and c-myc mRNA expression, mitogen-activated protein kinase activation, and growth in rat aortic smooth muscle cells [J]. J Clin Invest, 1995, 96(2): 842-847.
- [11] LU Gang, MEIER K E, JAFFA A A, et al. Oleic acid and angiotensin II induce a synergistic mitogenic response in vascular smooth muscle cells [J]. Hypertension, 1998, 31(4): 978-985.
- [12] COLEMAN M E, RUSSELL L, ETHERTON T D. Porcine somatotropin (pST) increases igf-I mRNA abundance in liver and subcutaneous adipose tissue but not in skeletal muscle of growing pigs [J]. J Anim Sci, 1994, 72(4): 918-924.
- [13] GAYAN-RAMIREZ G, VAN DE CASTEELE M, ROLLIER H, et al. Biliary cirrhosis induces type IIX/B fiber atrophy

- in rat diaphragm and skeletal muscle, and decreases igf-i mRNA in the liver but not in muscle [J]. *J Hepatol*, 1998, 29(2): 241-249.
- [14] SJOGREN K, LIU Jiu-li, BLAD K, et al. Liver-derived insulin-like growth factor i (igf-i) is the principal source of igf-i in blood but is not required for postnatal body growth in mice [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1999, 96(12): 7088-7092.
- [15] ADAMS G R. Invited review: Autocrine/paracrine igf-i and skeletal muscle adaptation [J]. *J Appl Physiol*, 2002, 93(3): 1159-1167.
- [16] KARAS M, DANILENKO M, FISHMAN D, et al. Membrane-associated insulin-like growth factor-binding protein-3 inhibits insulin-like growth factor-i-induced insulin-like growth factor-i receptor signaling in ishikawa endometrial cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(26): 16514-16520.
- [17] SETI H, LEIKIN-FRENKEL A, WERNER H. Effects of omega-3 and omega-6 fatty acids on igf-i receptor signaling in colorectal cancer cells [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2009, 115(3): 127-136.
- [18] PARK J H Y. Inhibition of colon cancer cell growth by dietary components: Role of the insulin-like growth factor (igf) system [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2008, 17: 257-260.
- [19] ARAKI M, MOTOJIMA K. Identification of erralpha as a specific partner of pgc-1alpha for the activation of pdk4 gene expression in muscle [J]. *FEBS J*, 2006, 273(8): 1669-1680.
- [20] XU Jian-xiang, HAN Jun-ying, EPSTEIN P N, et al. Regulation of pdk mRNA by high fatty acid and glucose in pancreatic islets [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344(3): 827-833.
- [21] 刘树欣, 刘玉倩, 王海涛, 等. 运动对葡萄糖转运蛋白4介导的骨骼肌糖摄取调节机制的研究进展[J]. *中国康复医学杂志*, 2010, 25(6): 592-594.
- [22] 张芳林. 肉碱棕榈酰转移酶-1的研究进展[J]. *国外医学:内分泌学分册*, 2002, 22(3): 166-169.
- [23] JONG-YEON K, HICKNER R C, DOHM G L, et al. Long- and medium-chain fatty acid oxidation is increased in exercise-trained human skeletal muscle [J]. *Metabolism*, 2002, 51(4): 460-464.
- [24] CHATELAIN F, KOHL C, ESSER V, et al. Cyclic amp and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase i gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 235(3): 789-798.
- [25] SONG Shu-lan, ATTIA R R, CONNAUGHTON S, et al. Peroxisome proliferator activated receptor alpha (ppar-alpha) and ppar gamma coactivator (pgc-1alpha) induce carnitine palmitoyltransferase ia (cpt-1a) via independent gene elements [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 325(1/2): 54-63.
- [26] PUIGSERVER P, WU Zhi-dan, PARK C W, et al. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis [J]. *Cell*, 1998, 92(6): 829-839.
- [27] VEGA R B, HUSS J M, KELLY D P. The coactivator pgc-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(5): 1868-1876.
- [28] WENDE A R, HUSS J M, SCHAEFFER P J, et al. Pgc-1alpha coactivates pdk4 gene expression via the orphan nuclear receptor erralpha: A mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(24): 10684-10694.
- [29] MA Ke, ZHANG Yi, ELAM M B, et al. Cloning of the rat pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene promoter - activation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(33): 29525-29532.

【责任编辑 柴 焰】