

東海大學畜產與生物科技學系

Department of Animal Science and Biotechnology

Tunghai University

碩士論文

Master Thesis

指導教授：陳珠亮

Advisor: Chu-Liang Chen

不同產蛋能力土雞脂肪細胞約日節律相關基因表現之比較

Comparison of adipose function and circadian rhythm of  
Taiwan country chickens with different laying performances

研究生：林玟君

Graduate student: Wen-Chun Lin

中華民國一〇一年五月

May, 2012

## 致謝

寫論文致謝也意味著人生要走到下一個階段。回想過去這幾年，每天腦子幾乎想的都是實驗進度、材料是否齊全、實驗結果如何解釋等等，直到現在走到了一個段落，整理舊的資料時，才發現過去的自己到了現在，是成長了什麼。

在這四年中，我得到許多收穫，最先感謝的是指導我的陳珠亮老師，在這一段期間耐心地指導與包容，提供專業的建議。撰寫論文的過程，才知道自己的文筆有很大的進步空間，要用精簡的字意，把自己理解後的想法完整表達，是需要不斷修改與調整，並也在其中了解到自己的不足，需要不斷的學習與改善。除了撰寫論文外，平日每週的實驗室討論與報告中，老師除了提出我們沒注意到的疏忽，也不斷的提醒我們要學習的不是那些名詞與研究結果所產生的知識，而是學習整個研究推論過程中的邏輯思考，使我對於科學研究上有更正確的思路。同時也感謝系上老師們，在專題討論課程中，所提出的見解與報告上應注意的細節，對於報告與論文撰寫時非常受用。

論文口試期間，感謝中興大學動物科學系陳志峰老師、陳洵一老師及東海大學畜產與生物科技學系楊錫坤老師對論文內容的詳細審閱，對於論文缺失之處提出修正建議以及給予論文上的協助，在此謹致衷心的謝意。

此外，也要感謝在實驗室中的成員，感謝黃政猷學長對於實驗室的付出與實驗方法的說明，並祝福還在打拼論文的同學木蘭、學妹儒芸、學弟成志、成瑞，祝福你們可以順利地完成論文。

最該感謝的人，是我的我的父母，總是支持著我的理想，讓我能夠走著自己決定的道路，也感謝我最心愛的妹妹們與朋友，對我的幫忙與傾聽我的心事，最後要告訴在天上很關心我們這些孫子的外婆，我畢業了。

# 目錄

致謝.....	I
目錄.....	II
圖表目錄.....	V
摘要.....	1
前言.....	2
文獻檢討.....	3
壹、雞隻產蛋能力與能量代謝.....	3
一、台灣土雞產業現況.....	3
二、能量失衡與雞隻繁殖能力.....	4
三、禽類脂質運輸與代謝.....	5
貳、脂肪組織與能量代謝.....	5
一、脂肪組織.....	5
二、脂肪細胞發育.....	6
三、脂肪組織功能與繁殖.....	8
四、脂肪組織與能量平衡.....	8
(一) 脂質生成 (Lipogenesis) .....	9
(二) 脂質分解 (Lipolysis) .....	9
(三) 三酸甘油酯脂解酶 (Adipose triglyceride lipase, ATGL) .....	10
(四) AMP-活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) .....	11
(五) NAD <sup>+</sup> 依賴去乙酰酶 (Sirtuin1, Sirt1) .....	12
(六) 菸鹼胺磷酸核糖基轉移酶 (Nicotinamide phosphoribosyltransferase, Nampt) .....	14
(七) 脂聯素 (Adiponectin) .....	15
(八) 過氧小體增生活化受體 $\gamma$ (Peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) .....	16
(九) 脂肪油滴表面蛋白 (Perilipin) .....	16
(十) 脂肪細胞脂肪酸結合蛋白 (Adipocyte fatty acid binding protein, aFABP).....	17
參、約日節律.....	18
一、生物時鐘 (Biological clocks) .....	18
二、約日節律分子機制及相關基因.....	19
三、約日節律與細胞代謝.....	20
(一)NAD <sup>+</sup> 依賴去乙酰酶 (Sirt1) 與約日節律.....	20
(二)AMP-活化蛋白激酶 (AMPK) 與約日節律.....	21
四、約日節律與細胞週期.....	22
(一)細胞週期.....	22

(二)細胞週期的調控.....	22
(三)約日節律與細胞週期.....	23
肆、脂肪細胞培養模式.....	25
一、實驗模式.....	25
二、脂肪細胞分化培養模式.....	25
三、脂肪細胞約日節律同期化培養模式.....	25
材料與方法.....	27
壹、試驗設計.....	27
貳、實驗材料.....	27
一、實驗動物.....	27
二、實驗藥劑.....	28
參、實驗方法.....	28
一、動物飼養.....	29
二、前脂肪細胞收取.....	29
三、細胞培養.....	29
四、Alamar blue分析.....	29
五、雞隻脂肪細胞約日節律同期化處理.....	30
六、Oil-Red O 染色.....	30
七、三酸甘油酯含量分析 (TG assay) .....	30
八、甘油-3-磷酸去氫酶活性分析 (GPDH activity assay) .....	31
九、總RNA萃取.....	31
十、相對定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) .....	31
十一、即時聚合酶連鎖反應 (Real time-PCR) .....	32
十二、統計分析.....	33
結果與討論.....	34
試驗一、不同產蛋能力雞隻前脂肪細胞分裂與約日節律基因表現之比較.....	34
一、細胞分裂之比較.....	34
二、約日節律.....	34
(一) 約日節律相關基因表現.....	34
(二) 細胞週期相關基因表現.....	35
試驗二、不同產蛋能力雞隻脂肪細胞分化與約日節律基因表現之比較.....	36
一、脂肪細胞形態.....	36
二、脂肪細胞三酸甘油酯含量與GPDH酵素活性.....	36
三、約日節律.....	37
試驗三、不同產蛋能力雞隻脂肪細胞能量代謝表現之比較.....	38
一、細胞形態.....	39
二、脂肪細胞代謝基因表現之比較.....	39
(一) 脂肪細胞分泌激素Adiponectin與其受體基因表現.....	39

(二)	脂肪細胞能量代謝相關基因表現.....	40
(三)	脂肪細胞脂質代謝相關基因表現.....	40
(四)	脂肪細胞代謝基因表現於胰島素添加或移除反應之差異.....	41
	結論.....	43
	參考文獻.....	65
	英文摘要.....	87

## 圖表目錄

表1	試驗藥劑.....	28
表2	聚合酶連鎖反應分析雞脂肪細胞基因mRNA表現之引子序列.....	32
表3	即時聚合酶連鎖反應分析雞脂肪細胞基因mRNA表現之引子序列.....	33
表4	不同產蛋能力雞隻脂肪S-V細胞約日節律相關基因相對表現差異.....	35
表5	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞約日節律相關基因相對表現差異.....	37
表6	脂肪細胞對胰島素移除培養代謝基因表現之差異.....	41
表7	脂肪細胞代謝基因表現於胰島素添加或移除反應之差異.....	41
圖1	不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞之分裂.....	44
圖2	雞脂肪 S-V 細胞經血清刺激後 <i>Per2</i> mRNA 表現.....	45
圖3	不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞約日節律相關基因表現.....	46
圖4	不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞 <i>Per2</i> mRNA 約日節律表現型態.....	47
圖5	不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞 <i>Bmall</i> mRNA 約日節律表現型態.....	48
圖6	不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞 <i>Cry1</i> mRNA 約日節律表現型態.....	49
圖7	不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞 <i>Rev-erb<math>\beta</math></i> mRNA 約日節律表現型態.....	50
圖8	不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞細胞週期相關基因表現型態.....	51
圖9	不同產蛋能力雞隻前脂肪細胞分化形態比較.....	52
圖10	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞三酸甘油酯含量.....	53
圖11	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 GPDH 活性分析.....	54
圖12	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞約日節律相關基因表現.....	55
圖13	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 <i>Per2</i> mRNA 約日節律表現型態.....	56
圖14	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 <i>Bmall</i> mRNA 約日節律表現型態.....	57
圖15	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 <i>Cry1</i> mRNA 約日節律表現型態.....	58
圖16	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 <i>Rev-erb<math>\beta</math></i> mRNA 約日節律表現型態.....	59
圖17	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 <i>ROR<math>\beta</math></i> mRNA 約日節律表現型態.....	60
圖18	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞胰島素對細胞形態之影響.....	61
圖19	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞分泌激素 <i>Adiponectin</i> 與其受體基因表現.....	62
圖20	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞能量代謝相關基因表現.....	63
圖21	不同產蛋能力雞隻脂肪細胞脂質代謝相關基因表現.....	64

# 摘要

為改善台灣土雞因選拔生長性能，造成雞隻產蛋能力下降並伴隨過多的脂肪組織，本試驗以15週齡國立中興大學選拔來自同源的台灣土雞，分別是生長速度快（B品系）與產蛋數高（L2品系）的土雞作為試驗材料，探討其脂肪組織功能與產蛋能力間的關係。試驗採自雞隻腹脂之前脂肪細胞，比較前脂肪細胞分裂分化能力與代謝之表現，同時探討這些差異與細胞約日節律表現之關聯性。在前脂肪細胞分裂階段，B品系細胞分裂速度較L2品系細胞為快。經同期化後培養，B品系細胞有較高之*Rev-erbβ*相對表現與節律性振幅，以及較低的細胞週期蛋白激酶抑制子*p21<sup>WAF1/Cip1</sup>*之相對表現。前脂肪細胞經誘發分化，L2品系比B品系細胞有較多的脂肪堆積與較高GPDH活性。經同期化作用下，L2品系比B品系細胞有較鮮明的*Per2*、*Bmal1*、*Cry1*、*Rev-erbβ*、*RORβ*約日節律性振幅。另外，在移除胰島素培養條件下，L2品系脂肪細胞代謝相關基因 (*Adiponectin R1*、*Nampt*、*AMPKα*、*aFABP*) 表現皆顯著升高；而B品系脂肪細胞代謝相關基因表現則無顯著差異。於胰島素持續添加培養，L2品系脂肪細胞*AMPKα* mRNA相對表現顯著低於B品系脂肪細胞；而於胰島素移除培養，L2品系脂肪細胞*Nampt*、*aFABP*、*ATGL* mRNA相對表現顯著高於B品系。顯示L2品系比B品系脂肪細胞對於胰島素移除與環境改變有較佳之代謝反應。綜合以上結果，以生長性能選拔下，B品系脂肪細胞分裂速度較快，分化後有較低的代謝反應及約日節律振幅，推測可能是使成體後有較高的脂肪團塊因素之一。相對地，以產蛋數選拔下之L2品系脂肪細胞，有較慢的分裂速度，與分化後較佳的代謝反應與約日節律振幅，可能有助於產蛋期間，能夠有效釋出能量供給。至於兩品系脂肪細胞分裂、代謝之差異與約日節律間之分子機制，如何影響產蛋仍需再進一步探討。

關鍵詞：台灣土雞、產蛋、脂肪細胞、約日節律

# 前言

畜禽為提供人類動物性蛋白質重要來源，近年來消費者對於健康與食物風味的要求較以往重視，白肉與低脂肪為肉雞之優點，故肉雞為目前重要的畜產動物。土雞為台灣本土培育之雞種，雖然飼養期長，但肉質鮮美，口味符合國人喜愛，年產值約佔台灣肉雞市場一半。土雞生長雖不如白肉雞快速，但在近年來育種成果下，其生長速度與飼料效率已有相當的改善，但是土雞產蛋率卻逐年下降，飼養管理與生產成本成為我們需要重視與克服的問題。

為改善雞隻繁殖性狀，中興大學動科系自1982年起，自全國收集土雞，並研究其生長與繁殖性能，根據不同特性，分別育種成各種品系。其中B品系為公系之一，選拔目標為早熟性，以雞冠做為選拔指標。L2品系為母系之一，目標在於提高產蛋率，以40週齡前的產蛋數做為選拔標準。同源選拔育種下，產生生長快速(B品系)與產蛋數高(L2品系)的台灣土雞，B品系有優異的生長性能，但其產蛋性能卻不佳，且脂肪組織也較L2品系大。

脂肪組織功能會影響動物體內能量平衡，雞隻產蛋是能量需求密集的時期，而具良好功能的脂肪組織，能夠分泌激素調控生物體內能量平衡，並於生物體能量缺乏時提供所需，因此推測雞隻產蛋能力與家禽體內脂肪組織功能有關。

本研究中以兩品系產蛋能力不同的雞隻，研究其脂肪組織表現差異，試驗以細胞培養模式比較兩品系前脂肪細胞分裂速度、脂肪細胞脂質代謝相關基因表現。其中約日節律系統影響整個生物體多種生理功能，經外界環境改變或體內內分泌訊號刺激後，透過約日節律系統可調控各周邊組織生理反應，因此又以約日節律之角度，分析不同階段(前脂肪細胞與分化後脂肪細胞)脂肪細胞中，約日節律相關基因之表現形態，來瞭解不同產蛋能力雞隻脂肪組織之差異。以此研究希望能瞭解雞隻脂肪組織功能與產蛋能力間的關係，可在日後追求雞隻生長的同時，不影響其產蛋率，進而改善禽畜品質增進經濟效益。



# 文獻檢討

## 壹、雞隻產蛋能力與能量代謝

### 一、台灣土雞產業現況

雞為重要的家禽動物，是國人日常生活中常食用的肉類來源。台灣商用肉雞中，以白色肉雞及有色肉雞最為常見(李，2005)。有色肉雞在台灣生產與消費者統稱之為土雞，而非僅一個品種。土雞就遺傳而言，為本地育成，無混雜外來血統的雞(李與黃，1989)，其中又以紅羽土雞與黑羽土雞在市場之佔有率最高。相較於白色肉雞，土雞肉質鮮美、抗病力強、口味也符合國人喜愛(李與林，1993)，在國內市場上占有肉雞屠宰總量三分之一以上，年產值約207億元，為白肉雞年產值之1.38倍(行政院農業委員會，2010)。

目前民間飼養之土雞品系呈現少量多樣性，體型大小及羽色參差不齊，以致飼養管理不易(李，2005)。土雞生長性能相較於白肉雞差，生長成本高，經長年育種選拔下，生長速率及飼料效率已獲得改善，卻發現以屠體性能選拔下，其繁殖性能則越差(趙等，2005b)。於肉雞研究發現，追求快速生長之遺傳選拔下，同時會伴隨一些不良的性狀，包括骨骼畸形、代謝疾病(Griffin and Goddard, 1994; Julian, 1998)以及不良的繁殖性狀(Yu *et al.*, 1992a, b; Robinson *et al.*, 1993)。

為改善雞隻繁殖性狀，中興大學育有長期選拔自同一族群的台灣土雞B及L2品系，B品系為公系之一，以八週齡體重與雞冠大小作為選拔標準。L2品系為母系之一，以初產至40週齡的總產蛋數作為選拔標準。經由長期選拔，已超過20世代，相較於L2品系，B品系生長較為快速，並有較高的體重，但同時也伴隨著較高的腹脂量及較低的產蛋率(陳，2004)。

為找出肥胖影響繁殖性狀之因素，已有許多實驗針對肉用種母雞，比較胖與瘦之母雞中卵巢形態、濾泡對荷爾蒙之敏感性、血漿中促性腺激素、下視丘和腦下垂體等內分泌機制等(Hocking *et al.*, 1987, 1989; Bruggeman *et al.*, 1998a, b; Onagbesan *et al.*, 1999)，但是真正影響因素目前還不明確，僅知脂肪組織為內分泌器官(Fruhbeck *et al.*, 2001)，為生物體儲存能量之場所，可調控著生物體生理代謝機制。因此，脂肪細胞功能的改變，可能是影響雞隻產蛋能力的因素之一。

目前已知，B品系雞隻之體內腹脂含量較L2品系者為高，在B及L2品系雞隻腹部脂肪細胞相關實驗發現，B品系腹部脂肪細胞分化能力以及基礎脂解能力皆較L2品系為差(王，2006；黃，2008)。造成B品系雞隻有較高的腹脂含量，可能的因素為脂肪細胞於未成熟時之細胞分裂速度較快，或是成熟脂肪細胞之代謝能力較差。

因此，利用來自相同族群，歷經不同選拔標準，找出因選拔而改變兩品系間生理表現型態之因素，進而找出對策改善台灣土雞生長及繁殖率，為台灣肉雞產業的一大課題。

## 二、 能量失衡與雞隻繁殖能力

能量是維持生物體生命及生長與繁殖所必需的。能量供應不足或能量過度給予，皆會影響雞隻之生理表現。現代肉雞產業在追求生長快速且提高體蛋白含量的經濟考量之下，接受任飼的肉雞逐漸增加，導致禽類肥胖及體內能量平衡之失調(Wang *et al.*, 2001)。因此透過飼養管理，可有效控制雞隻體重及產蛋率，以及在飼養期間雞隻生長及產蛋之整齊度(Hudson *et al.*, 2001)。有研究指出，相較於任飼，限飼或改變飼糧的營養組成能夠改善雞隻之生長及產蛋率(Robbins *et al.*, 1988；Lilburn *et al.*, 1990；Joseph *et al.*, 2000)。

家禽飼糧中所含的碳水化合物及脂質為能量的主要來源，當攝取過多能量時會以三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 的型式儲存在肝臟、脂肪組織或是卵母細胞形成時的卵黃中。蛋雞在卵巢中有數千個小於 1 mm，且不會發育為成熟的卵，種用白肉雞隻於產蛋期間，每次約有 5-6 個卵在 6-7 天內直徑由 4 mm 發育到 37 mm，蛋黃內有 2/3 的固形物在這段時期形成，成分主要由含三酸甘油酯的脂蛋白組成，其功能在提供胚胎發育所需的能量(Kuksis, 1992)。因此雞隻繁殖為能量需求密集的過程，需要大量脂質提供三酸甘油酯去形成新的卵黃(Richards *et al.*, 2003)。

即便如此，當雞隻過度餵飼，三酸甘油酯由肝臟生成的量，超越其形成極低密度脂蛋白的能力，使極低密度脂蛋白之血漿脂質攜帶者的生成及運輸呈現飽和狀態，導致三酸甘油酯於肝臟蓄積，暫時儲存在肝細胞之細胞質之富含三酸甘油酯的囊泡中 (TG-rich vesicles)，而易發生肝臟相關疾病 (脂肪肝、肝硬化)(Renema *et al.*, 1999a)。在屠體成份分析中也發現，任飼母雞在性成熟時，體蛋白質含量雖較高，但體蛋白質之百分比卻與限飼母雞者沒有差異，甚至更低，而在腹脂及肝臟脂質含量或百分比皆顯著高於限飼母雞，這顯示增加採食主要會造成肝臟重及腹脂含量的增加。若於飼養全期給予任飼，則母雞有較高的死亡率(Robinson *et al.*, 1991；Yu *et al.*, 1992a)。母雞若於生長期過度餵飼，會導致提早到達成熟時期的肥胖度，並使繁殖性能下降(Yu *et al.*, 1992b)。另外，母雞若在育成期間給予任飼，會使腹部脂肪重量增加並且性成熟提早而開始產蛋，但總產蛋量與限飼的母雞相比卻明顯下降(Yu *et al.*, 1992a；Richards *et al.*, 2003)。

Chen 等人(2006)發現卵巢異常的雞隻，其血漿中三酸甘油酯與由脂肪分泌之瘦素 (leptin)，和肝臟中三酸甘油酯的含量及體脂肪含量都顯著較正常者高。是故，這些因素可能為導致卵巢異常降低產蛋的重要因素。此外，由脂肪組織所分泌的 Adiponectin 在雞隻體內也扮演著調節葡萄糖、脂質代謝與體重等功能(Yuan *et al.*, 2006)。因此，當雞隻採食後，雖然主要的脂質來源為腸道吸收與肝臟新合成，但在當下無法完全利用的脂質，將會被送至脂肪組織儲存，以待體內能量不足時提供使用，若是過多的能量蓄積於脂肪組織，會影響到脂肪組織原有的功能，進而影響雞隻體內能量失衡與繁殖能力。上述研究顯示，雞隻於產蛋期間能量需求量提升，但仍需透過飼養管理，利用限飼改善母雞產蛋率。換言之，雞隻產蛋與體內能量平衡具有相關。

### 三、 禽類脂質運輸與代謝

禽類脂質來源主要是靠飼糧及肝臟脂質生成作用而來(Leveill *et al.*, 1975 ; Brady *et al.*, 1976)。當雞隻攝食之碳水化合物經吸收後分解為葡萄糖，於細胞質中經糖解作用 (glycolysis) 產生丙酮酸，以丙酮酸型式進入粒線體中，由丙酮酸去氫酶 (pyruvate dehydrogenase) 及丙酮酸羧酶 (pyruvate carboxylase) 之氧化去羧作用，而產生乙醯輔酶 A (acetyl-CoA)，其為合成脂肪酸之基質 (Tanaka *et al.*, 1983)。

雞隻吸收脂質之主要部位在小腸。飼料中脂質進入消化道形成食糜，於小腸中與膽汁與胰液混合，經膽鹽與磷脂質之乳化作用 (emulsification)，再由胰臟分泌之脂解酶，將水與脂界面之三酸甘油酯分解為游離脂肪酸 (free fatty acid) 與單酸甘油酯 (monoglyceride)。脂質之脂化產物再與膽鹽及磷脂質共同形成混合微膠體 (mixed micelles)，由腸壁粘膜細胞 (mucosal cells) 吸收脂質，並以門脈微粒 (portmicron) 或未脂化脂肪酸之形式經門脈系統運送至肝臟進行代 (Krogdahl, 1985 ; Sklan *et al.*, 1989)。肝臟合成之脂肪酸經酯化成三酸甘油酯，再與磷脂質、脫輔基蛋白質 B (apoprotein-B) 及膽固醇結合形成極低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)，經由血液運送至各組織利用(Sklan *et al.*, 1984)。

各組織吸收脂質是以毛細血管壁上之脂蛋白脂解 (lipoprotein lipase, LPL)，將血液中 VLDL 內之三酸甘油酯分解成脂肪酸，並經由氧化產生能量，或由再酯化 (reesterification) 成三酸甘油酯儲存於組織(Cryer, 1981)。禽類脂肪組織、肌肉、心臟、濾泡都有 LPL 存在(Benson *et al.*, 1975 ; 1979)。於禽類脂肪組織中，LPL 之活性隨血液中 VLDL 之濃度而改變，當 VLDL 濃度提高，則 LPL 活性上升並增加脂質堆積，當 VLDL 濃度下降則反之(Hermier *et al.*, 1984)。於肉雞與蛋雞的研究報告中，發現肉雞腹脂的發育遠比蛋雞者快，肉雞腹脂 LPL 的活性也比蛋雞高，但兩者血漿中 VLDL 濃度則相似(Griffin *et al.*, 1987)。另外，產蛋雞血漿中的三酸甘油酯、磷脂與膽固醇含量較未成熟的雞隻有較高的含量(Chapman *et al.*, 1977 ; Griffin *et al.*, 1982)。由此推測產蛋中的雞隻有較高的能量需求。

## 貳、 脂肪組織與能量代謝

### 一、 脂肪組織

脂肪組織在組織學上歸類為疏鬆結締組織，由大小不一 (直徑約 20~200  $\mu\text{m}$ ) 的脂肪細胞鑲嵌於結締組織所組成。根據脂肪細胞的結構與功能，主要分為兩種：棕色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) 與白色脂肪組織 (white adipose tissue, WAT) (Albright and Stern, 1998)。

其中白色脂肪組織主要分布於內臟區域、腹部、臀部與大腿，具有保持體溫、

緩衝保護、熱絕緣等功能。當體內能量過剩時，可將能量以三酸甘油酯的形式儲存，而當體內能量不足時，則進行脂解作用，脂解作用所產生的游離脂肪酸，一部分被釋出至細胞外，以供生物體所需(Darlington *et al.*, 1998)，而另一部分則為脂肪細胞本身所利用，進入粒腺體內進行脂肪酸氧化 ( $\beta$ -oxidation) 產生能量，其餘則被細胞回收進行再脂化，合成三酸甘油酯(Arner *et al.*, 2005)。脂肪組織有完整的酵素及調節蛋白，隨時反應身體需求而執行脂質分解或合成，並參與細胞代謝與維持體內能量的平衡。

## 二、 脂肪細胞發育

脂肪細胞源自間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells)，此類幹細胞能夠分化成脂肪細胞之外，也能分化成肌肉細胞 (myocytes)、軟骨細胞 (chondrocytes) 以及骨細胞 (osteocytes) (Vaananen, 2005)。於前脂肪細胞 (preadipocyte) 的階段，細胞可進行細胞分裂，增殖數量(Gregoire *et al.*, 1998)。當細胞經由分化訊號刺激後，細胞會進行分化所需之細胞擴增 (mitotic clonal expansion) (Cornelius *et al.*, 1994)。

脂肪細胞分化早期，C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) 與PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) 兩種轉錄因子家族會誘發表現(Gregoire *et al.*, 1998)。C/EBP $\beta$ 與C/EBP $\delta$ 之表現在分化初始有短暫性的增加(Brun *et al.*, 1996；Mandrup and Lane, 1997)，而於細胞分化早期至中期下降，並誘發PPAR $\gamma$ 與C/EBP $\alpha$ 之表現(Clarke *et al.*, 1997)。PPAR $\gamma$ 與C/EBP $\alpha$ 開始調控下游與分化及代謝相關之基因表現(Cornelius *et al.*, 1994)，促使細胞堆積脂質。

脂肪細胞分化末期，細胞內骨架與細胞外間質發生改變，使細胞形態由類似纖維母細胞轉變為圓形，此時許多與脂質合成相關之基因表現及酵素活性都明顯增加，如：乙醯輔酶A羧酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC)、脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 等(Weiner *et al.*, 1991)，細胞內並開始累積三酸甘油酯 (Prins and O'Rahilly, 1997)。而胰島素敏感性度、胰島素受體數目與葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporters, GLUTs) 之表現皆增加(Garcia de Herreros and Birnbaum, 1989a)。脂肪組織特异性蛋白，如：脂肪細胞之脂肪酸結合蛋白 (adipocyte fatty acid binding protein, aFABP) (Bernlohr *et al.*, 1984)、瘦體素 (leptin) (MacDougald *et al.*, 1995)等，也會表現。下圖(圖1)為脂肪細胞發育之主要階段。

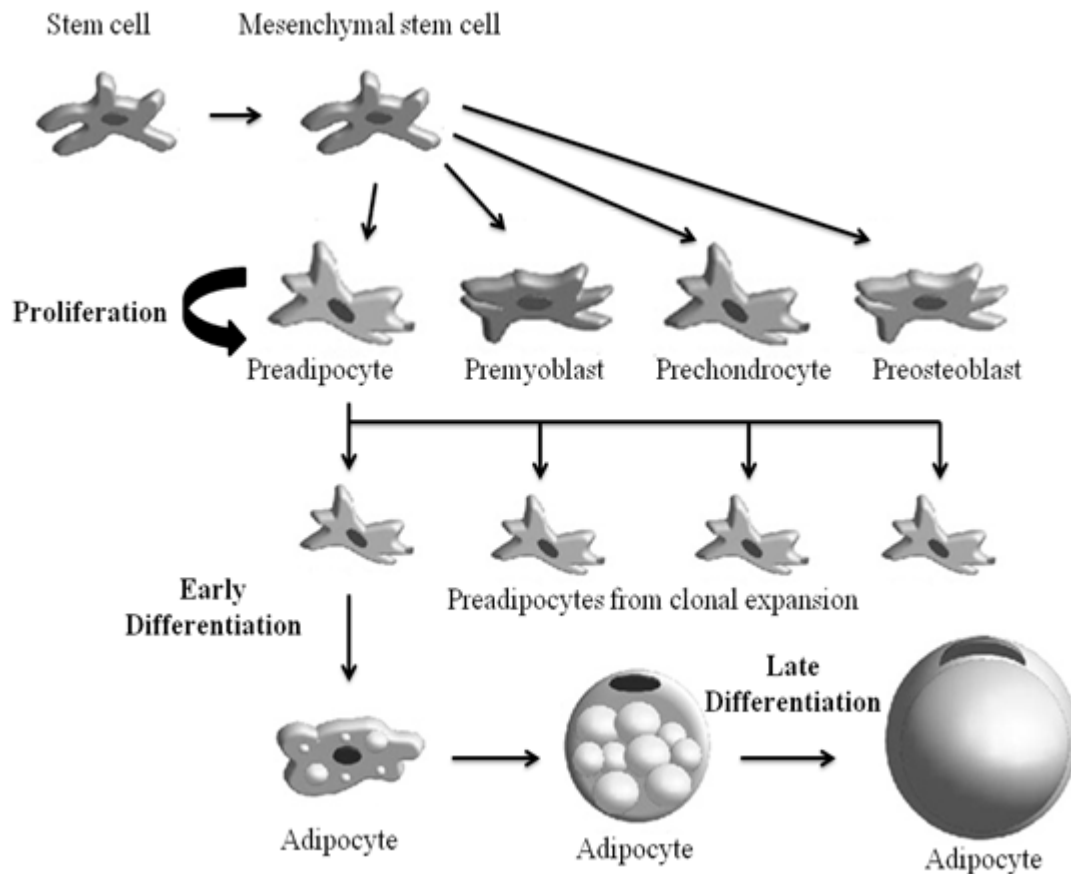


圖 1 脂肪細胞發育之主要階段。

Figure 1 Main stages of adipocyte development.

(Romao *et al.*, 2011)

在胚胎發育後期，前脂肪細胞就已開始分化 (Poissonnet *et al.*, 1988)。隨著成長過程，脂肪細胞之數目逐漸增加。新生兒和新生動物中，脂肪組織的增加主要是新脂肪細胞的生成，而在成年人和動物中，脂肪組織的增加在正常情況下以細胞的體積變化為主。有研究利用碳14放射性同位素，對DNA使用碳定年 (carbon dating)，分析人類脂肪細胞的數量，結果顯示無論個體胖瘦，甚至在體重明顯降低或增加的情況下，成年人脂肪細胞數目多維持恆定，顯示脂肪細胞的數目，是在青少年時期之前就已決定。對成年人而言，無論年齡或者身體質量指數 (body mass index, BMI) 如何，每年大約更新10%的脂肪細胞，因此若於青少年時期肥胖，脂肪細胞數量較高，脂肪細胞每次所再新生成的數量，也會較原本於青少年時期是瘦的人為多 (Spalding *et al.*, 2008)。

成體動物中，攝取的能量大於消耗量，脂肪細胞的體積就會增大，稱為脂肪細胞肥大 (hypertrophy)，然而脂肪細胞體積並無法無限制的擴張。若持續過度攝取能量，除了脂肪細胞體積會再度增加之外，也促使前脂肪細胞分化成脂肪細胞，而增加細胞的數量則稱為脂肪細胞增生過度 (hyperplasia) (Bahceci *et al.*, 2007)。動物研究證實，脂肪細胞增生過度的發生比脂肪細胞肥大為晚，通常此時皆伴隨

著嚴重且不可逆的代謝疾病(Hirsch *et al.*, 1989；Bjorntorp *et al.*, 1982)。

因此，雞隻若於生長期為求快速生長而過度餵飼，生長速度雖然較快，但也伴隨脂肪組織過度增殖，造成日後成體雞隻有較高形成肥胖的潛在能力。

### 三、 脂肪組織功能與繁殖

脂肪組織為身體中最大的能量儲存場所，也是重要的內分泌組織，製造多種內分泌素及細胞激素 (cytokine)，這些統稱為脂肪素 (adipokine)。脂肪細胞透過其分泌的訊號物質，影響生物體內其他組織及免疫系統等，來調控生物體能量的平衡、新陳代謝 (metabolism)、葡萄糖 (glucose) 在體內的恆定及攝食行為 (feeding behavior) (Rosen and Spiegelman, 2006；Kershaw and Flier, 2004)。

目前發現多囊性卵巢症候群 (Polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是與代謝問題及女性生殖能力相關之疾病，與胰島素抗性有關(Dunaif, 1997)，並伴隨排卵異常等問題。治療此種病患，多使用thiazolidinediones (TZDs) 或metformin類等藥物改善胰島素敏感性，可改善月經週期與排卵問題(Iuorno and Nestler, 2001；Seli and Duleba, 2004)，而TZDs及metformin分別可活化PPAR $\gamma$ 及AMP-活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 路徑(Lehmann *et al.*, 1995；Musi *et al.*, 2002)。

在女性患有多囊性卵巢症候群者，血漿中Adiponectin含量顯著下降(Ardawi and Rouzi, 2005)，而Adiponectin為脂肪組織分泌之激素，可改善胰島素之敏感性(Kadowaki and Yamauchi, 2005)。使用TZDs及metformin可提升Adiponectin在血漿之濃度，而Adiponectin參與調節繁殖(Chabrolle *et al.*, 2007)。由上敘文獻可知，PPAR $\gamma$ 、AMPK及Adiponectin這些與脂肪細胞功能及調節能量使用之因子，也參與調控女性之生殖。

瘦素為脂肪組織分泌之內分泌素。哺乳類中瘦素信號受損會導致攝食量增加、肥胖，及因缺乏瘦素誘導促性腺激素之分泌所導致繁殖能力喪失(Zhang *et al.*, 1994；Ahima and Flier, 2000)。在大多肥胖動物中，多伴隨胰島素抗性、高脂血症以及繁殖力低下(Ahima and Flier, 2000)。喪失瘦素訊號的ZDF-fa/fa大鼠動物研究模式中發現，若堆積過多的三酸甘油酯及脂肪酸在非脂肪組織中(Wahle *et al.*, 1991, 1994)。這些症狀也就是脂質代謝失調，造成的細胞毒性 (脂毒性) (Unger, 2002)。

過度肥胖而使脂肪組織喪失原有的功能，進而造成其他器官損傷，也影響動物體繁殖力。因此，維持生物體內良好的能量平衡以及脂肪組織的功能，對於生物體繁殖能力具有重要性。

### 四、 脂肪組織與能量平衡

脂肪細胞中脂質的堆積可由脂質生成 (lipogenesis) 與脂質分解 (lipolysis) 兩大生理作用平衡所決定。

## (一) 脂質生成 (Lipogenesis)

當生物體能量過剩時，生物體將製造脂肪酸，並以三酸甘油酯的成分儲藏於體內，此為脂質生成作用，包含三酸甘油酯合成與脂肪酸合成。

脂肪細胞可扮演合成脂肪酸的角色，合成的位置為細胞質，主要合成路徑為：粒線體內的丙酮酸 (pyruvate) 氧化成乙醯輔酶A (Acetyl-CoA)，之後與草醯乙酸 (oxaloacetate) 形成檸檬酸 (citrate)，檸檬酸再藉由ATP-檸檬酸分解酶 (ATP-citrate lyase, ACLY) 分解成乙醯輔酶A與草醯乙酸。由乙醯輔酶A羧化酶可將乙醯輔酶A羧化為丙二醯輔酶A (malonyl-CoA)，並經由脂肪酸合成酶 (fatty acid synthase, FAS) 進而形成棕櫚酸。若要合成比棕櫚酸長的脂肪酸，須進行碳鏈加長的合成反應，由丙二醯輔酶A供應兩個碳，逐次加長碳鏈，經由碳鏈延長酶 (elongase) 和去飽和酶 (desaturase) 作用反覆延長與去飽和即可形成其他較長鏈或是不飽和脂肪酸(Martin *et al.*, 1961)。

三酸甘油酯由一分子的甘油與三分子的脂肪酸所組成。動物體內因缺乏甘油激酶 (glycerol kinase, GyK) (Reshef *et al.*, 2003)所以無法直接利用甘油合成三酸甘油酯。脂肪細胞中的甘油主要來源是利用醣類經糖解作用中所產的中間產物，二羥丙酮磷酸 (dihydroxyacetone phosphate, DHAP) 為前驅物，透過甘油-3-磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) 利用NADH將DHAP還原而得到甘油-3-磷酸 (glycerol-3-phosphate, G3P)。

脂肪酸經由醯基-CoA合成酶 (acyl-CoA synthase, ACS) ，在與腺苷三磷酸 (Adenosine 5-triphosphate, ATP) 幫助下，與CoA形成醯基-CoA。二分子之醯基-CoA 與甘油-3-磷酸作用形成1, 2-二醯基甘油酸磷酸 (1, 2-diacylglycerol phosphate)，另外一分子的醯基-CoA則於二醯基甘油基轉移酶 (diacylglycerol acyltransferase) 作用下，再與1, 2-二醯基甘油酸磷酸形成三酸甘油酯 (Steinberg *et al.*, 1961)。

## (二) 脂質分解 (Lipolysis)

當生物體能量缺乏時，則會進行脂質分解，以供各組織所需。調控脂質分解作用有二條訊息傳導路徑：第一是以兒茶酚胺類物質與脂肪細胞膜上β型受體 (β-adrenergic receptor) 結合，刺激G protein活化位於細胞膜的腺苷酸環化酶 (adenylate cyclase, AC) ，將細胞內ATP轉變成環狀腺苷單磷酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) ，由cAMP作為二級傳導物質(McKnight *et al.*, 1998)，使得蛋白激酶A (cyclic AMP-dependent protein kinase, PKA) 活性增加；第二是由胞外訊號調節激酶 (extracellular-signal regulated kinase, ERK) 調控，此為絲裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族之一員，經活化MAPK路徑而使ERK磷酸化而活化，將訊息傳遞至細胞核，調控基因之表現(Farnier *et al.*, 2003)。

當PKA活化時，則會磷酸化覆蓋在脂肪油滴表面的蛋白質Perilipins，使之無

法形成連續性的結構保護脂肪油滴，而使油滴暴露，同時PKA也會促使脂解酵素磷酸化活化，將油滴中的脂質脂解，釋出甘油與脂肪酸來提供能量(Sztalryd *et al.*, 2003)。參與整個脂解作用的酵素有：脂肪細胞三酸甘油酯脂解酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL)、激素敏感性脂解酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) 和單酸甘油酯脂解酶(monoglyceride lipase, MGL)。

ATGL與HSL可對三酸甘油酯做初步的分解，形成游離脂肪酸與雙酸甘油酯。HSL又對雙酸甘油酯作用，產生游離脂肪酸與單酸甘油酯，最後MGL將單酸甘油酯分解成游離脂肪酸與甘油。雖然HSL同時對三酸甘油酯與雙酸甘油酯作用，但它對雙酸甘油酯水解作用的專一性，遠高於對三酸甘油酯者作用約十倍(Fredrikson *et al.*, 1981)。因此，三酸甘油酯的脂解，主要是由ATGL作用，提供雙酸甘油酯做為基質，以促使HSL的作用，若提高ATGL的表現，會促進游離脂肪酸與甘油的釋放(Zimmermann *et al.*, 2004)。

脂質分解酶將三酸甘油酯，分解成為一分子的甘油與三分子的的脂肪酸(Langin *et al.*, 1996)，水解產生之甘油於脂肪組織中不易被利用，因此會擴散至血漿，由含有高甘油激酶活性之組織 (肝臟與腎臟等) 所利用。經代謝途徑生成二羥丙酮磷酸，即可進入糖代謝途徑氧化分解成ATP或進入肝臟經糖質新生(gluconeogenesis) 途徑轉變成葡萄糖。

脂質分解後所產生游離脂肪酸，於脂肪組織中經醯基CoA合成酶再次轉換成醯基-CoA，並與甘油三磷酸進行酯化反應形成三酸甘油酯。當酯化速率小於分解速率時，游離脂肪酸會進入血漿中與白蛋白結合，經由血液運送至各組織，在組織細胞內與輔酶A活化為脂醯輔酶A (fatty acyl CoA)，再與肉鹼 (carnitine) 結合進入細胞粒線體內，進行脂肪酸 $\beta$ -氧化作用(Robinson and Newsholme, 1969)。

已知B及L2品系雞隻腹部脂肪細胞實驗中，分析基礎脂解能力為L2品系高於B品系，但在升糖素 (glucagon) 刺激之下，B及L2品系脂解反應提高比例並無顯著差異(王, 2006)，由此可知，兩品系間脂解能力之差異在於基礎的脂解能力。於脂肪細胞中，ATGL為基礎脂解之脂解酶，以下為ATGL之描述。

### (三) 三酸甘油酯脂解酶 (Adipose triglyceride lipase, ATGL)

ATGL於2004年由不同研究人員分別發現，是具有脂解三酸甘油酯功能之酵素，而有不同的命名：ATGL (Zimmermann *et al.*, 2004)、desnutrin (Villena *et al.*, 2004)、calcium-independent phospholipase A2 $\zeta$  (iPLA2 $\zeta$ ) (Jenkins *et al.*, 2004)。

ATGL在大多組織皆有表現，但主要表現於白色脂肪組織。3T3-L1細胞分化後，ATGL即被誘發表現，油滴累積時，表現大量提升(Villena *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2004; Lake *et al.*, 2005; Jocken *et al.*, 2007)。PPAR $\gamma$ 可調控脂肪細胞分化與代謝過程(Zhang *et al.*, 1996)，在脂肪細胞研究模式證實，ATGL為PPAR $\gamma$ 之標的基因，PPAR $\gamma$ 及其活化劑rosiglitazone皆可提高ATGL基因之表現，並促進脂解(Festuccia *et al.*, 2006; Kershaw *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2007)。

ATGL參與脂質分解作用，於基礎狀態以及有激素刺激時皆然。Comparative



Gene Identification-58 (CGI-58) 為油滴表面蛋白，與Perilipin A交互作用結合在油滴上，可刺激ATGL活化(Lass *et al.*, 2006)。在小鼠缺失*cgi-58*基因表現者，相較於野生型小鼠，其ATGL對於三酸甘油酯脂解活性降低約20倍。在基礎狀態下之脂肪細胞，CGI-58是緊密結合在油滴上，當 $\beta$ -adrenergic刺激時，Perilipin A被磷酸化而改變構形後，CGI-58即釋出並與ATGL交互作用，促使活化脂解三酸甘油酯(Granneman *et al.*, 2007；Yamaguchi *et al.*, 2004；Yamaguchi *et al.*, 2007)。

ATGL基因缺失之小鼠，白色脂肪組織所釋出的游離脂肪酸減少75%，而HSL脂解能力也下降，其他器官上所累積的脂肪量隨之增加，這顯示ATGL對於其他器官之三酸甘油酯代謝，也相當重要(Haemmerle *et al.*, 2006)。

已有許多研究顯示，ATGL基因表現受到攝食影響：在於斷食中表現上升；再度進食則降低表現(Villena *et al.*, 2004；Lake *et al.*, 2005；Kim *et al.*, 2006；Jocken *et al.*, 2007)。在肥胖遺傳模式小鼠 (*ob/ob*和*db/db*) (Villena *et al.*, 2004；Kim *et al.*, 2006)，與患有胰島素抗性之肥胖患者中，白色脂肪組織中ATGL之基因表現量皆顯著降低(Jocken *et al.*, 2007；Berndt *et al.*, 2008)。綜合以上研究，ATGL於脂肪細胞分化後大量表現，並透過脂解三酸甘油酯的能力，調控生物體能量儲存及使用，對於能量代謝有重要之影響。

#### (四) AMP-活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)

AMP-活化蛋白激酶 (AMPK) 為調控細胞內能量平衡之酵素，於細胞中AMP/ATP比值提高時活化，進而刺激細胞內生成ATP (如：脂肪酸氧化等)，減少非必要性ATP的使用 (如：抑制三酸甘油酯合成、細胞增生等) (Kahn *et al.*, 2005)。

AMPK是由催化區 $\alpha$ 單元，與兩個調節次單元 $\beta$ 和 $\gamma$ 所組成的三聚體(Woods *et al.*, 1996a)，每個次單元有不同的亞型 ( $\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2, \gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$ )，經由不同組成，可形成不同型式及特性的AMPK(Hardie and Carling, 1997)，並有不同的組織專一性(Cheung *et al.*, 2000)。於脂肪細胞中，AMPK催化區主要為 $\alpha 1$ (Lihn *et al.*, 2004；Daval *et al.*, 2005)。AMPK能夠維持細胞內能量之恆定，是透過細胞內AMP濃度變化，當AMP濃度提高，Liver kinase B1 (LKB1) 會結合至AMPK $\gamma$ ，並將AMPK $\alpha$ 上172蘇胺酸磷酸化，使其具有活性(Shaw *et al.*, 2004)。下圖(圖2)顯示出AMPK在能量代謝中所扮演之角色。

腎上腺素 $\beta$ 受體激動劑 ( $\beta$ -agonists)，可增加細胞內cAMP之濃度，提高脂肪細胞AMPK活性(Moule and Denton, 1998；Daval *et al.*, 2005)，F442A脂肪細胞於培養液添加Interleukin-6 (IL-6)，能促使AMPK活化，而在IL-6缺失的小鼠中，AMPK活性則減少(Kelly *et al.*, 2004)。目前已知斷食或運動皆可刺激腎上腺素分泌，運動可促使肌肉細胞分泌IL-6，進而提高脂肪細胞中AMPK活性(Daval *et al.*, 2005)。AMPK活化時，會磷酸化部分參與代謝相關的蛋白質，進而影響代謝相關基因之轉錄，其中乙醯輔酶A羧酶為脂質生成的關鍵酵素(Sim and Hardie, 1988)，於大鼠脂肪細胞中，利用AMPK活化劑(Aminoimidazole-4-carboxamide

riboside, AICAR)處理，會增加乙醯輔酶A羧酶磷酸化而抑制其活性，進而降低其下游脂質生成作用(Sullivan *et al.*, 1994)。

AMPK活化可改善胰島素抗性，在大鼠肝臟中大量表現瘦素，其血液中瘦素濃度提高，促使脂肪細胞中UCP-1及UCP-2表現會增加，進而誘發AMPK活化並抑制乙醯輔酶A羧酶活化，並促使脂肪酸氧化(Orci *et al.*, 2004)。另於脂肪細胞中大量表現UCP-1，進而提升AMP濃度，促使活化AMPK而抑制乙醯輔酶A羧酶活化，而降低脂質生成(Matejkova *et al.*, 2004)。綜合以上所述，AMPK以細胞中AMP含量改變其活性，進而調控細胞中能量之使用，維持生物體能量之平衡。

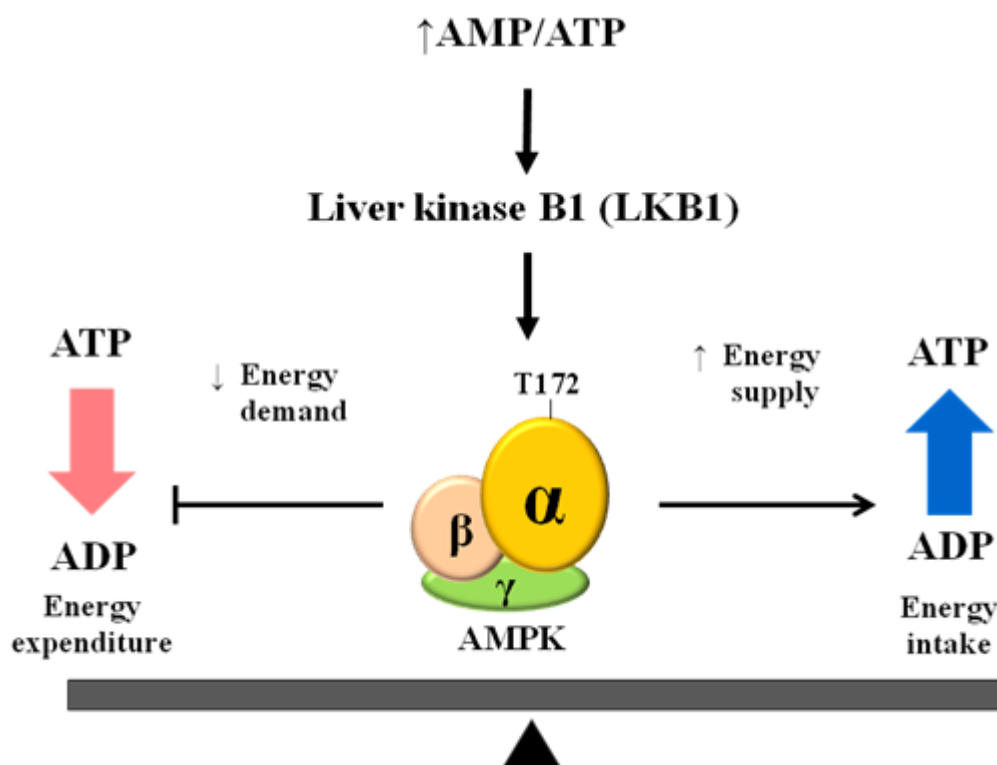


圖2 AMPK在能量代謝中所扮演之角色。

Figure 2 AMPK plays a key role in energy metabolism. (Ruderman *et al.*, 2010)

### (五) $\text{NAD}^+$ 依賴去乙醯酶 (Sirtuin1, Sirt1)

在多數物種中透過能量限制能夠調控 Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 此類家族蛋白之功能及活性，並延長生物壽命。Sirtuin 為  $\text{NAD}^+$  依賴去乙醯化酵素 (大鼠中稱 Sirt1)，多數物種研究證實，生物體 *Sirt1* 基因剔除，則尚失能量限制所延長壽命之功能(Lin *et al.*, 2000；Rogina and Helfand 2004；Li *et al.*, 2008)。

由於 Sirt1 需要  $\text{NAD}^+$  做為輔因子來進行它去的乙醯活性，因此能夠以細胞內能量狀態改變其活性，進而調控細胞中與代謝相關之基因轉錄(Imai *et al.*, 2000)。Sirt1 將標的蛋白質去乙醯後，將產生產物 nicotinamide (NAM)，此產物

會抑制 Sirt1 活性，而 NAM 可將由 NAM phosphoribosyltransferase (Nampt) 轉催化而恢復回 NAD<sup>+</sup> (Michan *et al.*, 2007)。圖 3 為 Sirt1 之調控。

小鼠細胞被誘發胰島素抗性後，會降低 *Sirt1* 基因之表現，若利用白藜蘆醇 (resveratrol) 再活化 *Sirt1* 基因表現，則可透過抑制 Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) 基因之轉錄，而增加細胞對胰島素敏感性 (Sun *et al.*, 2007)。Sirt1 影響代謝主要是其去乙酰化活性可活化關乎代謝之轉錄因子 (如：PGC1 $\alpha$ )，進而影響生物體內代謝路徑之活化 (Rodgers *et al.*, 2005；Nemoto *et al.*, 2005；Lagouge *et al.*, 2006；Liu *et al.*, 2008)。

相較於 *Sirt1*<sup>+/-</sup> 異合基因剔除之小鼠，野生型小鼠脂肪細胞在禁食時具較高的脂肪酸釋出能力。當小鼠在禁食下，Sirt1 經由與 PPAR $\gamma$  的輔因子 NcoR 結合，抑制 PPAR $\gamma$  所調控之與脂肪儲存相關基因之表現。同樣地，在 3T3-L1 脂肪細胞中，大量表現 *Sirt1* 可抑制 PPAR $\gamma$  之表現，減緩脂質之生成 (Picard *et al.*, 2004)。

於 3T3-L1 脂肪細胞試驗中，大量表現 *Sirt1* 或使用 RNA 干擾技術抑制內生性 *Sirt1* 基因表現，分別會提高與降低 *Adiponectin* 之基因轉錄。並由其中試驗發現，Sirt1 是透過提升 Forkhead box protein O1 (FOXO1) 與 C/EBP $\alpha$  轉錄複合體的形成，進而提高 *Adiponectin* 基因表現 (Qiao *et al.*, 2006)。在脂肪細胞培養試驗中，利用 RNA 干擾技術降低 *Sirt1* 表現，會降低脂肪細胞中基礎及異丙腎上腺素 (Isoprenaline) 刺激之下的脂解能力，並發現 SIRT1 主要可透過將 FOXO1 去乙酰化而活化，使之能夠結合至 ATGL 啟動子，而誘發表現 (Chakrabarti *et al.*, 2011)。

綜合以上所述，Sirt1 以細胞中 NAD<sup>+</sup> 含量改變其活性，於脂肪細胞中可經由活化 FOXO1 提升 *Adiponectin* 以及 ATGL 基因的表現，並藉由抑制 PPAR $\gamma$  活性，減緩脂質生成與促進脂質分解。這些研究結果顯示 Sirt1 可增加脂肪細胞 *Adiponectin* 基因表現與對能量代謝之調控。

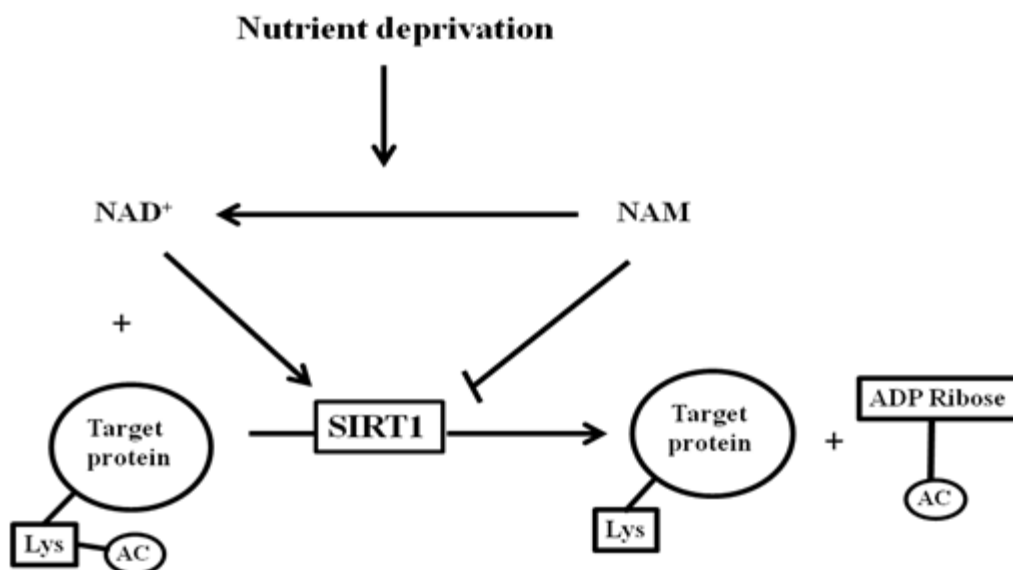


圖3 SIRT1之調控。

Figure 3 Regulation of SIRT1.

(Finkel *et al.*, 2009)

(六) 菸鹼胺磷酸核糖基轉移酶 (Nicotinamide phosphoribosyltransferase, Nampt)

Nampt最早在1994年，由Samal等人在人類周邊血液淋巴細胞cDNA資料庫中發現，當時稱為Pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF)，此與Interleukin 7 (IL-7)作用可促使前B細胞成熟(Samal *et al.*, 1994)。至2005年，Fukuhara等人於皮下脂肪分離出一種新的脂肪素，它在腹部脂肪之表現顯著高於在皮下脂肪，此時命名為Visfatin，經比對後與PBEF基因序列相同(Fukuhara *et al.*, 2005)。最後於2007年，Revollo誘發現此酵素具有菸鹼胺磷酸核糖基轉移酶的活性，因此將它稱為Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt)。在Fukuhara等人(2005)發現NAMPT具有類胰島素之作用，可與胰島素受體直接結合，活化其下游之路徑，降低血糖。在人類骨母細胞研究中，NAMPT可結合至胰島素接受器，並使胰島素接受器之受質1、2 (IRS-1、2) 上酪胺酸磷酸化(Xie *et al.*, 2007)。在大鼠注射Nampt表現載體至體內四天後，Nampt大量表現，同時血中膽固醇降低，並提高胰島素的敏感性，以及肝臟與脂肪組織中PPAR $\gamma$ 基因之表現(Sun *et al.*, 2009)。

NAD<sup>+</sup>合成途徑中，主要有兩個來源(圖4)，其中可由nicotinic acid經由nicotinic acid phosphoribosyltransferase (Npt) 轉為nicotinic acid mononucleotide (NaMN)，再經由nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase (Nmnat) 轉為deamide-NAD，並需經由脫醯胺作用才可轉為NAD，另一來源可由nicotinamide經nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt)轉為nicotinamide mononucleotide (NMN)，再由Nmnat轉為NAD。在哺乳類動物，細胞較優先使用nicotinamide作為合成之來源，在Revollo等人發現，Nampt為哺乳類中合成NAD<sup>+</sup>速度的關鍵酵素，因而可調控需依賴NAD<sup>+</sup>而有去乙醯化活性的Sirt1，以執行其後續功能(Revollo *et al.*, 2004)。由以上研究發現，Nampt為具有類胰島素功能的脂肪素，並且為生成NAD<sup>+</sup>的重要酵素，對於調控能量的使用扮演著重要的角色。

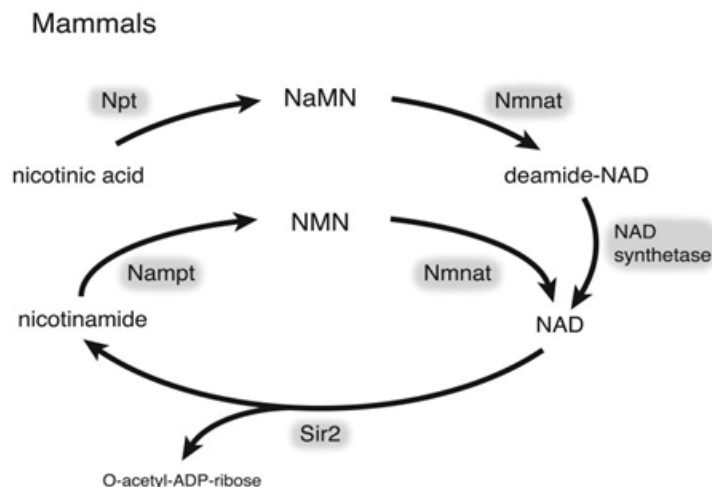


圖4 NAD合成路徑。

Figure 4 The NAD biosynthesis pathways.

(Revollo *et al.*, 2004)

## (七) 脂聯素 (Adiponectin)

Adiponectin 是由脂肪組織分泌之細胞激素，此細胞激素於 1995 年後分別被幾個研究團體發現，並有不同的名稱，如：Acrp30、APM1、AdipoQ 及 GBP28 (Scherer *et al.*, 1995；Maeda *et al.*, 1996；Hu *et al.*, 1996；Nakano *et al.*, 1996)。Adiponectin 是由 230 個胺基酸所組成，分子量為 30 kDa，結構主要分為三段：胺基酸 1-28 為 non-homologous region；28-93 為 collagen-like domain；93-230 為 globular domain，是 Adiponectin 之主要作用位置(Tsao *et al.*, 2002)。

Adiponectin 調控許多醣類及脂質之代謝過程。於脂肪細胞分化過程中，*Adiponectin* 基因表現量會提高 100 倍以上(Berg *et al.*, 2002)，雖然它由脂肪細胞分泌，卻有許多數據顯示肥胖者之血清中 Adiponectin 濃度是低於非肥胖者。Adiponectin 之分泌量，與許多代謝症候群相關疾病（如：糖尿病、冠狀動脈疾病等）呈現負相關，也與其參數（如：身體質量指數、體重、腰圍等）也呈現負相關(Yang *et al.*, 2002；Matsuzawa *et al.*, 2003)。

小鼠實驗中，將重組蛋白 Adiponectin 打入體內，可增加胰島素的敏感度，在不影響攝食量下，可降低小鼠體重與血漿脂肪酸、葡萄糖濃度，並可增加肌肉組織脂肪酸之氧化作用(Fruebis *et al.*, 2001)，其主要機轉為活化磷酸化肌肉中的 AMPK，進而促使磷酸化抑制乙醯輔酶 A 羧酶之活性(Yamauchi *et al.*, 2002)。

在禽類動物中，Adiponectin 不只由脂肪組織分泌，在腦下垂體、肝臟、脾臟、腎臟、卵巢與骨骼肌等皆有表現，其中 *Adiponectin* 在卵巢之濾泡膜細胞 (theca cells) 及顆粒細胞 (granulosa cells) 處也都有表現，以濾泡膜細胞之表現較為豐富(Chabrolle *et al.*, 2007)。

Adiponectin 需要經由與其受體的結合，來達成其調節細胞生理的機能。至目前已發現 Adiponectin 在細胞膜上有三種不同類型的受體，分別為 Adiponectin receptor 1 (AdipoR1)、Adiponectin receptor 2 (AdipoR2) 及 T-cadherin。AdipoR1 和 AdipoR2 在各組織或器官中皆有表現，其中 AdipoR1 在骨骼肌細胞的表現最高，而 AdipoR2 則於肝臟表現較高。此二種受體在卵巢中濾泡膜細胞及顆粒細胞皆有表現，其中 AdipoR1 則在顆粒性細胞表現較多，AdipoR2 則在兩種細胞表現相同(Chabrolle *et al.*, 2007)。T-cadherin 則在血管內皮細胞及其它平滑肌細胞表現，所以不同組織或器官對 Adiponectin 的反應不同，而其作用機制乃是藉由不同受體種類來調節其表現(Yamauchi *et al.*, 2003；Takeuchi *et al.*, 2007)。

Adiponectin 與 AdipoR1 結合後，可活化 AMPK 路徑(Yamauchi *et al.*, 2002)，並減少胰島素抗性和醣新生成作用，及增加肌肉對醣質的利用(Yamauchi and Kadowaki, 2008)。Adiponectin 結合 AdipoR2，能夠刺激活化 PPAR $\alpha$  (Kadowaki and Yamauchi, 2005)，活化降低發炎因子之相關機制(Fujita *et al.*, 2008)。經由 AMPK 或是 PPAR $\alpha$  路徑，最後皆有相互調控的機制(Dupont *et al.*, 2008)，都能達到抗發炎和抗糖尿病之功能(Yamauchi *et al.*, 2007)。

## (八) 過氧小體增生活化受體 $\gamma$ (Peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )

過氧小體增生活化受體屬於細胞核內荷爾蒙受體家族 (nuclear hormone receptor superfamily)，主要有PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 三種異構體，其表現位置及功能各自不同之外，也各自有其專一性之活化劑 (activators) 或配體 (ligands)，而具有不同的生理功能(Kliwer *et al.*, 1994；Tontonoz *et al.*, 1995)。

PPAR $\gamma$ 因不同的轉錄起點 (alternative promoters)，與不同之剪切 (splicing)，又分為三種型式： $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 與 $\gamma 3$ 。PPAR $\gamma 1$ 主要表現於骨骼肌、心臟、肝臟和脂肪組織中，PPAR $\gamma 2$ 則專一性表現於脂肪組織(Elbrecht *et al.*, 1996)，PPAR $\gamma 3$ 在血液巨噬細胞、結腸上皮細胞和脂肪細胞中表現(Fajas *et al.*, 1998)。PPAR $\gamma 2$ 於前脂肪細胞表現量極低，於分化刺激後則大量表現，已被證實為脂肪細胞分化之主宰基因 (master gene)。

PPAR的表現不僅能促進前脂肪細胞的分化，也能促進非脂肪細胞分化成脂肪細胞。在培養液中添加PPAR $\gamma$ 活化劑15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2)，纖維母細胞在體外培養的條件很快分化為脂肪細胞型態(Tontonoz *et al.*, 1994a)。另以反轉錄病毒為載體，送入PPAR $\gamma$ 基因表現，使原本分化力極低之NIH3T3纖維母細胞，進行分化成具有脂肪細胞的生理和生化特性的細胞形態(Forman, *et al.*, 1995)。

PPAR $\gamma$ 可影響脂肪細胞的整個脂質新生 (adipogenesis) 的過程，許多脂肪細胞特異性基因之調控區，皆可發現PPAR $\gamma$ 作用區段(Juge-Aubry *et al.*, 1997)。PPAR $\gamma$ 影響許多與胰島素生理作用相關基因之表現，可改善胰島素耐受性與血糖濃度平衡 (Rangwala *et al.*, 2003)，其致活劑TZDs也可抑制resistin的表現(Shojima *et al.*, 2002)，與改善胰島素耐受性(Shibasaki *et al.*, 2003)，也可增加脂肪細胞中GLUT4的表現來改善葡萄糖吸收的過程(Shimaya *et al.*, 1997)。以上文獻證實，PPAR $\gamma$ 影響脂肪細胞於成熟過程至成熟後醣類及脂質之代謝。

## (九) 脂肪油滴表面蛋白 (Perilipin)

Perilipin為脂肪細胞中包覆於油滴表面之蛋白質，主要功能為保護油滴不被生物體之脂解酵素分解，目前已知具有四種異構形 (isoform)。四種異構型皆源自於同一段基因，經選擇性切割 (alternative splicing) 後產生，分別為Perilipin A、B、C、D (Serventnick *et al.*, 1995)，其中以Perilipin A為脂肪細胞中最主要的表現型式(Greenberg *et al.*, 1993)。

Perilipin具有多個磷酸化部位，當體內需求能量時，會刺激脂解的訊號或激素，活化PKA使其磷酸化並改變其結構，而使油滴暴露，同時也磷酸化活化細胞質中之HSL，進而促使脂質分解(Clifford *et al.*, 2000；Souza *et al.*, 1998；Sztalryd *et al.*, 2003)。反之，胰島素具有抗脂解作用，與PKA的功用相異，可使Perilipin

去磷酸化(Egan *et al.*, 1990)。

Perilipin對於調控脂解及油滴的儲存具有相當的重要性。於Perilipin基因缺失小鼠餵飼高能量飼糧下，相較於野生型小鼠，較不容易發展成肥胖體型，並且基礎脂解作用高於三倍，當給予相同能量攝取條件下，Perilipin基因剔除與野生型小鼠相比，其體型較瘦，體脂肪降低30%，體內代謝速率上升，但周邊組織對胰島素抗性亦增加(Martinez-Botas *et al.*, 2000；Tansey *et al.*, 2001)。在細胞實驗中，Perilipin反而是可提高PKA所刺激的脂解作用，並也是HSL進行脂解作用前之轉位所必需(Miyoshi *et al.*, 2006；Sztalryd *et al.*, 2003；Zhang *et al.*, 2003)。

綜合以上得知，Perilipin作用為保護油滴不被脂解，但在生物體能量需求時，可協助脂解酶有效執行脂解作用。

#### (十) 脂肪細胞脂肪酸結合蛋白 (Adipocyte fatty acid binding protein, aFABP)

脂肪酸結合蛋白 (FABPs) 是細胞內脂質結合蛋白 (intracellular lipid binding proteins, iLBPs) 類的成員之一，其分子量約15 kD，普遍存在於動物組織中(McArthur *et al.*, 1999)，其主要功能為促進細胞脂肪酸的攝取、輸送與代謝，並參與基因調控與細胞的生長(Wolfrum *et al.*, 2001；Storch and Corsico, 2008)。

脂肪組織所表現之aFABP，被認為是脂肪細胞分化末期的標誌基因(Boord *et al.*, 2002)，在脂肪細胞分化期間，上游基因轉錄因子PPAR $\gamma$ 與Retinoid X Receptor共同組合成異質二聚體，促使其基因表現(Tontonoz *et al.*, 1994b)。研究顯示，aFABP可促進細胞脂肪酸釋出。aFABP基因缺失的小鼠，相較於野生型小鼠，其基礎脂解作用降低40%(Coe *et al.*, 1999；Jenkins-Kruchten *et al.*, 2003；Scheja *et al.*, 1999)。另一方面，aFABP可與HSL相互作用而增進HSL之脂解活性(Shen *et al.*, 2001)。綜合上述文獻可知，aFABP對於脂肪細胞成熟及脂質代謝皆具有重要之影響。

以上所述為參與脂肪細胞代謝及功能的相關基因。目前已知脂肪素調控許多生理代謝及能量平衡(Matsuzawa *et al.*, 2004)，而這些脂肪素與第二型糖尿病及許多代謝疾病有關(Fasshauer and Paschke, 2003)。此外，目前發現部分脂肪素於脂肪細胞中之表現有約略24小時現象，其中，於血液中 Adiponectin 之濃度於非肥胖者中呈現24小時週期之節律性變化，但於肥胖者則無此節律性(Calvani *et al.*, 2004；Yildiz *et al.*, 2004)。在小鼠之實驗也發現，肝臟中 Sirt1 活性呈現24小時週期節律性。於生物體中，存在一種約日節律 (circadian rhythm) 系統，調控著許多生理活動，如：睡眠、進食、內分泌分泌或細胞的有絲分裂等，並有研究證實約日節律系統調控許多生物體內之代謝相關作用(Green *et al.*, 2008；Hirota and Fukada, 2004；Kohsaka and Bass, 2007；La Fleur, 2003；Davidson *et al.*, 2004)。

## 參、 約日節律

### 一、 生物時鐘 (Biological clocks)

大自然界規律的日夜週期下，外界環境光線、溫度等，影響動、植物的行為及生理功能。其中動物活動如攝食、睡眠等，以及生物體內體溫、各組織系統之功能、內分泌等，隨著日夜轉換而有約略24小時週期性的律動，此稱為約日節律 (Panda *et al.*, 2002 ; Reppert and Weaver, 2002)。這些律動主要受到外在環境的調節，若使生物體處在一個完全沒有變化(溫度、光線等)的環境下，生物體內仍有內部時鐘 (internal clock) 調控著生物體內的生理反應。

中樞生理時鐘位於大腦下視丘前葉之視叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN)。當光線刺激後，可由直接的視網膜-下視丘神經徑 (retinohypothalamic tract, RHT) 以及間接的外側膝狀體核-下視丘神經徑 (geniculohypothalamic tract, GHT) 傳遞訊號至視叉上核。

視網膜-下視丘神經徑意指光線經由視網膜最外層的神經節細胞(ganglionic cells)，此細胞內含黑視質 (melanopsin)，能接收光的刺激(Provencio *et al.*, 2000)，並轉換為化學訊息傳導形式，利用穀胺酸 (glutamate) 傳送訊息到視叉上核，活化Fos蛋白質，進而影響下視丘視叉上核的約日節律表現(Abe *et al.*, 1991)。外側膝狀體核-下視丘神經徑意指光線間接刺激視叉上核，由黑視質的神經節細胞受光刺激後，先投射訊號至內側膝狀體間葉 (intergeniculate leaflet, IGL)，利用神經肽Y (neuropeptide Y, NPY)或 $\gamma$ -胺基丁酸 (gamma-amino butyric acid, GABA) 傳入視叉上核(Moore and Card, 1994 ; Yannielli and Harrington, 2004)。

視叉上核接收訊號後會投射至其它腦區，進而影響生理活動(Lu *et al.*, 2001 ; Chou *et al.*, 2003)，再經由神經內分泌訊號傳導至各周邊組織，統整各組織內部之生理時鐘，進而影響激素分泌(Reppert and Weaver, 2002 ; Lee *et al.*, 2001 ; Froy and Chapnik, 2007 ; Young, 2006)。因此，光線刺激視叉上核對約日節律的重新設定，具有重要的角色(Harrington and Rusak, 1986)。另外，周邊組織之約日節律除了可受到下視丘視叉上核之中樞生理時鐘刺激統整之外，也受攝食影響(Damiola *et al.*, 2000)，下圖 (圖5) 為中樞及周邊生理時鐘機制。



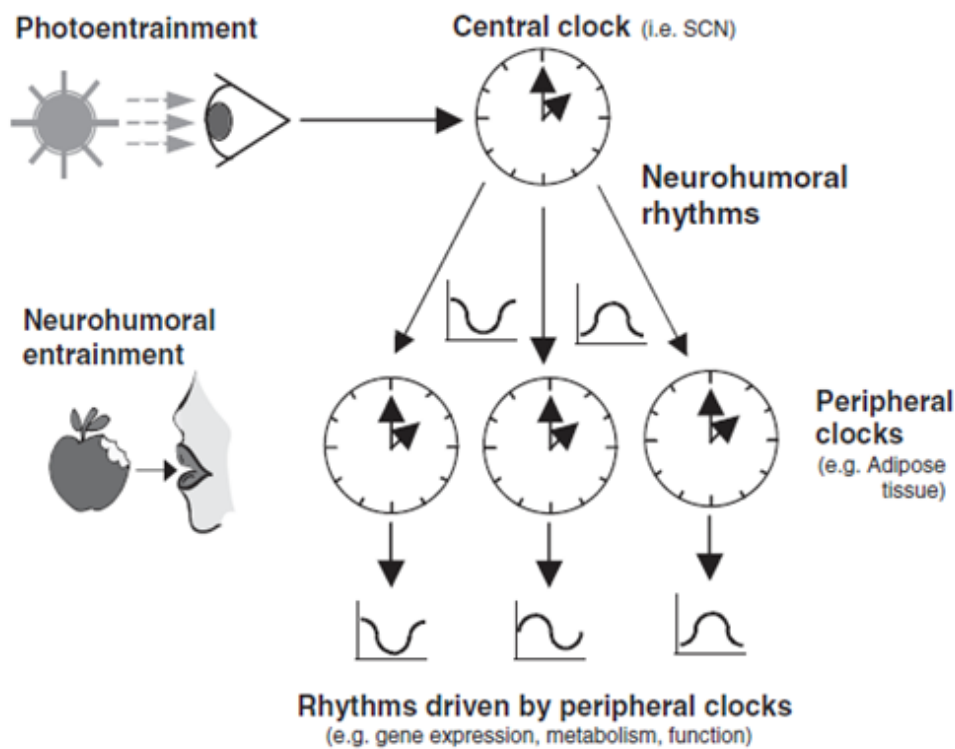


圖5 中樞及周邊生理時鐘機制。

Figure 5 Central and peripheral clock mechanisms. (Bray and Young, 2007)

## 二、 約日節律分子機制及相關基因

生物體各組織內每單一細胞皆有掌管約日節律系統之相關基因，這些基因經轉錄轉譯出蛋白質，再經由負迴饋機制抑制原基因表現，使蛋白質合成減少，進而減少其抑制基因的作用，成為封閉迴饋循環機制(Reppert and Weaver, 2001)。

參與約日節律的基因最主要有 *Clock*、*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (Bmal1)*、*Period (Per)* 以及 *Cryptochrome (Cry)*。*Clock* 與 *Bmal1* 兩基因轉錄及轉譯後，會形成二聚體 CLOCK/BMAL1 再回到細胞核中，結合到一段特殊的 DNA 序列 (E-box, CACGTG) (Hogenesch *et al.*, 1998)。*Per* 以及 *Cry* 啟動子上含有這段 E-box，促使其轉錄出 *Per*、*Cry* (Gekakis *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 1999)。轉譯後的 PER/CRY 複合體會與 casein kinase 1 $\epsilon$  (CK1 $\epsilon$ ) 結合，再進入細胞核抑制位於 E-box 上的 CLOCK/BMAL1，防止 *Per* 與 *Cry* 的轉錄 (Lowrey *et al.*, 2000)。除了 *Per*、*Cry* 帶有 E-box 序列外，*Rev-erb*、*RAR-related orphan receptors (Ror)* 等有含 E-box 序列都可受到 CLOCK/BMAL1 複合體促使轉錄活化，而 REV-ERB、ROR 又可在 *Clock*、*Bmal1* 的啟動子上與 *Rev-erb/Ror elements (RREs)* 作用，會分別抑制或促進 *Bmal1* 轉錄 (Duez and Staels, 2008)，因此形成一種周期性變化之迴路機制，如圖 6 所示。

CLOCK/BMAL1 複合體所調控的基因如 *Rev-erb*、*Ror* 等，會再去調控其下

游基因，而影響細胞生理作用，如細胞有絲分裂、細胞分化、細胞代謝等，使細胞內部分激素表現及生理活動呈現節律性的變化。

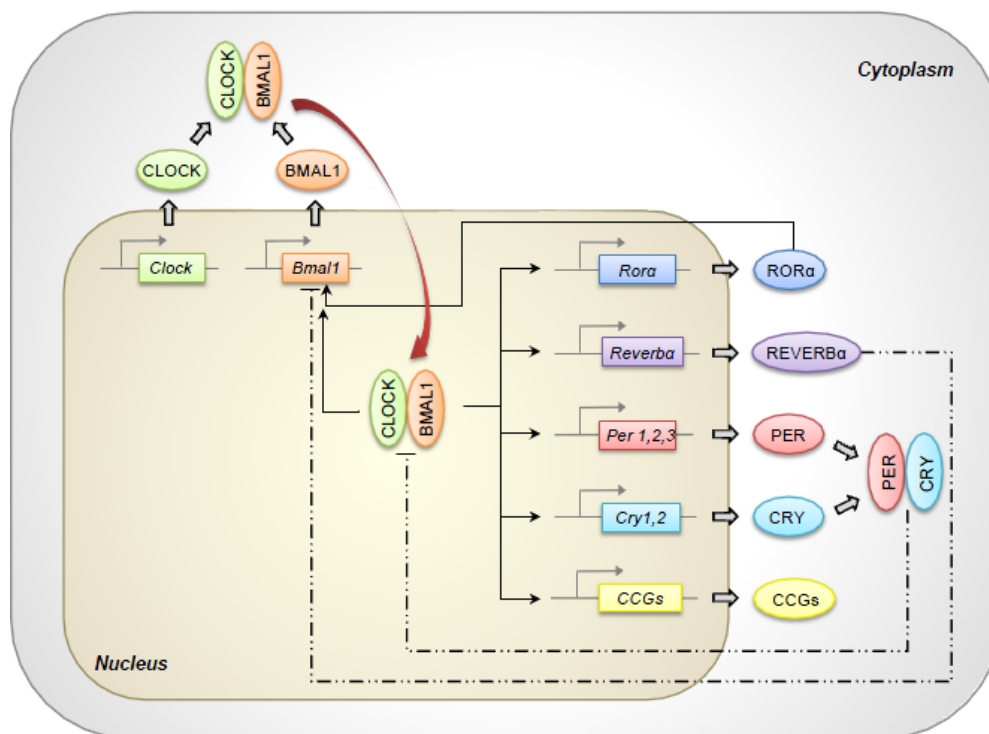


圖 6 約日時鐘之分子機制。

Figure 6 Molecular machinery of the circadian clock. (Zanquetta *et al.*, 2010)

### 三、 約日節律與細胞代謝

#### (一) $\text{NAD}^+$ 依賴去乙酰酶 (Sirt1) 與約日節律

晝夜節律中心蛋白質CLOCK，其擁有乙酰基轉移酶活性，能作用在標的蛋白質，如標的基因之組蛋白 (Histone) H3、H4 (Doi *et al.*, 2006)，以及與它交互作用調控約日節律的夥伴BMAL1 (Hirayama *et al.*, 2007)，使之乙酰化，並促使基因轉錄。*Per2*與*Cry1*為CLOCK/BMAL1所促使轉錄之標的基因，當PER2/CRY結合並進入細胞核，CLOCK也可將PER2乙酰化(Asher *et al.*, 2008)。

Sirt1為 $\text{NAD}^+$ 依賴去乙酰酶，影響細胞代謝與生理的晝夜節律。當細胞中 $\text{NAD}^+$ 含量提高，Sirt1可與CLOCK/BMAL1結合，共同位於標的基因啟動子上，並降低CLOCK對標的蛋白質 (H3及BMAL1) 乙酰化作用的程度(Nakahata *et al.*, 2008)，Sirt1可與PER2交互作用，並促使PER2去乙酰化及降解，進而調控晝夜節律變化(Asher *et al.*, 2008)。在 $\text{NAD}^+$ 生合成中，*Nampt*為合成 $\text{NAD}^+$ 速度的關鍵酶素(Revollo *et al.*, 2004)，而*Nampt*基因上帶有E-box片段，為CLOCK-BMAL1作用片段(圖7)，進而促使*Nampt*基因表現(Ramsey *et al.*, 2009; Nakahata *et al.*, 2009)。由此得知此為代謝與約日節律相互作用的關聯之一。

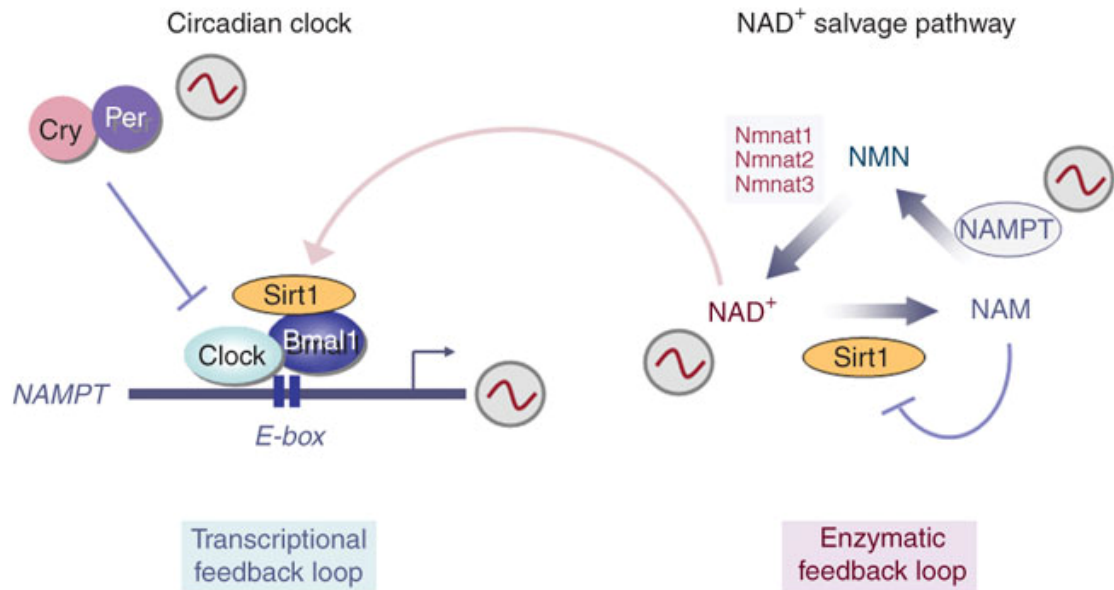


圖 7 NAD<sup>+</sup>藉由活化 Sirt1 共同參與約日節律與代謝之間兩個迴饋循環機制。

Figure 7 By activating Sirt1, NAD<sup>+</sup> conjoins two feedback loops necessary for cross-talk between the circadian clock and metabolite production.

(Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2009)

## (二) AMP-活化蛋白激酶 (AMPK) 與約日節律

AMPK為能感應細胞內能量之酵素，養分的攝取可影響AMPK磷酸化，當細胞AMP/ATP比值提高時，AMPK將被磷酸化並活化，刺激細胞內生成ATP。於生物體中，經由中央生理時鐘（即下視丘視叉上核）與攝食行為皆可調控周邊組織約日節律(Damiola *et al.*, 2000)。Lamia等人發現，AMPK能透過磷酸化CRY而使之降解，進而影響周邊組織約日節律之變化(Lamia *et al.*, 2009)。

綜合以上敘述，透過感應細胞內 NAD/NADH 及 AMP/ATP 比值，當細胞能量狀態改變時，分別改變 Sirt1 與 AMPK 活性，並透過改變約日節律系統，進而影響細胞代謝相關基因之表現，下圖（圖 8）為約日節律與代謝相關基因交互作用分子之機制(實線表示直接作用；虛線表示間接作用)。

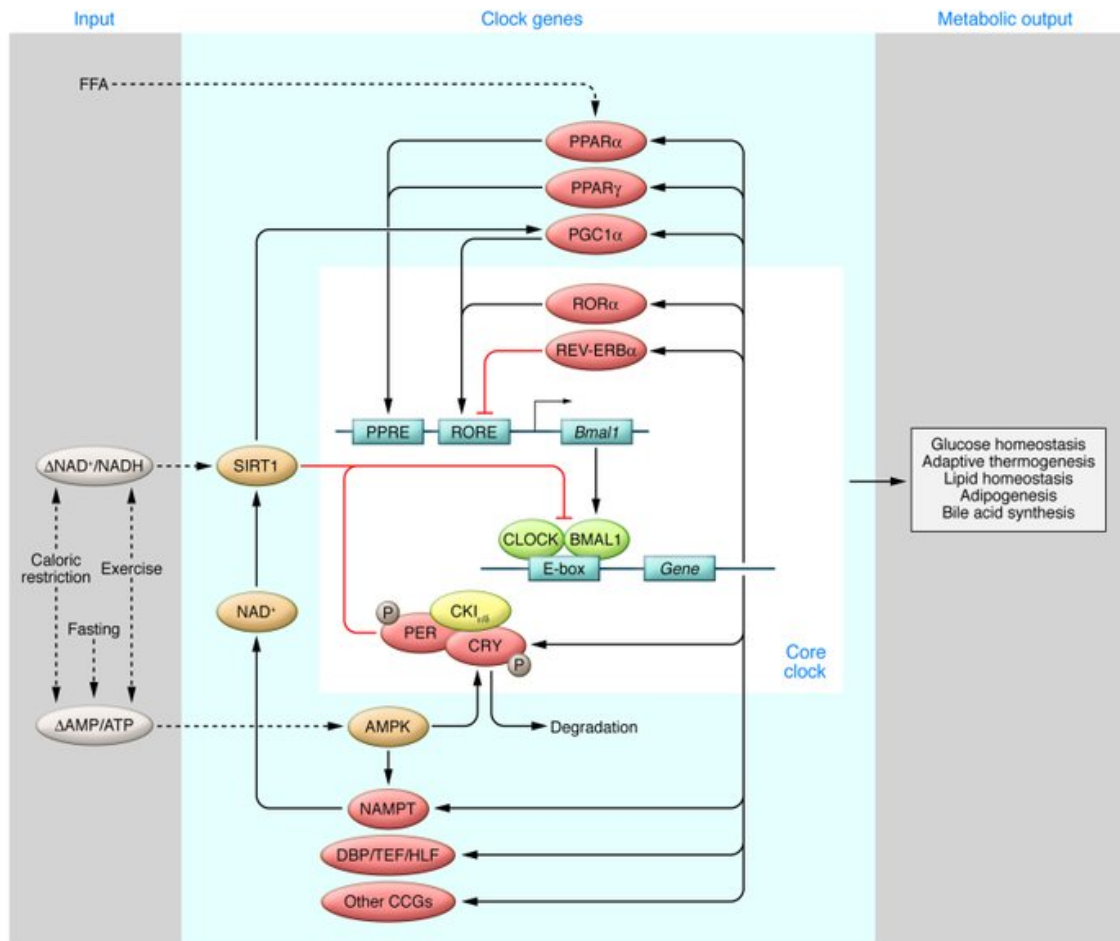


圖 8 約日節律與代謝相關基因交互作用分子機制。

Figure 8 Interactions between the molecular circadian and metabolic genes.

(Huang *et al.*, 2011)

#### 四、 約日節律與細胞週期

##### (一) 細胞週期

細胞週期指細胞由親代細胞 (parental cells) 分裂成兩個子代細胞 (daughter cells) 之過程，主要分為分裂間期 (物質準備與積累階段) 與分裂期 (細胞增殖過程)。整個週期表示為G1期 (Gap1 growth phase)、S期 (DNA synthesis phase)、G2期 (Gap2 mitosis preparation)和M期 (mitotic phase) (Murakami and Nurse, 2000)。細胞週期進行的正確性，對於細胞維持正常的代謝循環是重要的，若週期失去控制，可能導致細胞癌化(Stewart *et al.*, 2003)，因此不同期間各有酵素調控細胞週期的進行。

##### (二) 細胞週期的調控

細胞週期是由不同的週期蛋白質 (Cyclin) 所調控。當細胞受Mitogen刺激下，

細胞週期將由G1時期進入S時期進行DNA複製，再進入G2時期，隨後即進入細胞有絲分裂期。決定細胞週期的進行是藉由刺激因子啟動訊息傳遞路徑，活化各細胞週期特定Cyclin與CDK (Cyclin-dependent kinase)，使之形成複合體進行調控。

CDK為絲胺酸/蘇胺酸激酶 (serine/threonine kinase)，當與特定Cyclin結合後，才具有其活性，而與Cyclin進行結合的關鍵，則取決於CDK上蘇胺酸與酪胺酸殘基 (tyrosine residue) 是否磷酸化，除了活化調控外，當CKI (CDK inhibitor) 影響此區的磷酸化，將大幅抑制Cyclin/CDK的活化。

G1期的調控：G1期早期是由cyclin D-cdk4或cyclin D-cdk6使Rb蛋白質 (retinoblastoma protein) 部分磷酸化，到了晚期則是由cyclin E-cdk2使Rb蛋白質進一步磷酸化 (Murakami and Nurse, 2000；Bucher *et al.*, 2008)，Rb蛋白磷酸化即失去與轉錄因子E2F結合的能力，促使E2F釋出，細胞進而增加表現進入S期所需的調控蛋白，促使細胞由G1期進入S期 (Senderowicz and Sausville, 2000；Cam and Dynlacht, 2003)。其中p21<sup>WAF1/Cip1</sup>為CKI家族蛋白，會與cyclin D-cdk4/6及cyclin E-cdk2結合，使其不活化，使細胞週期停留在G1期。

S期的調控：S期受到cyclinA-cdk2所調控，但cell division control protein 2 homolog (cdc2) 若受到Wee1磷酸化，則會造成cyclinA-cdk2失去活性，使細胞週期停留在S期。

G2/M期的調控：在進入有絲分裂期時，cyclin B與cdc2會形成所謂的MPF (mitosis-promoting factor) 複合物，而Wee1於一般狀態下會將cdc2上Thr-14及Tyr-15進行磷酸化而不活化，當確定走向有絲分裂期，cell division cycle 25 homolog C (cdc25C) 必須將Thr-14及Tyr-15上的磷酸根移除，使cyclinB能夠與其結合並具有活性，而由G2期進入有絲分裂期 (Pines, 1999；Shackelford *et al.*, 2000)。

### (三) 約日節律與細胞週期

生物體中約日節律系統及細胞週期是共存於細胞中，多數實驗證實細胞週期發生在日夜週期某個時間點，意指約日節律系統參與了細胞週期的調控，早有研究發現，在單細胞裸藻 (*Euglena*) 中細胞分裂由內部生理時鐘調控 (Edmunds and Funch, 1969)，並有研究分析哺乳類組織如：皮膚、腸道、胃、口腔等細胞，增生活性有節律性變化 (Bjarnason *et al.*, 1999；Garcia *et al.*, 2001；Scheving *et al.*, 1983；Buchi *et al.*, 1991)。也有研究證實細胞週期蛋白受到晝夜節律相關基因調控，使之呈現節律性表現，並且在某些細胞中，細胞週期是依循晝夜節律而進行 (Matsuo *et al.*, 2003；Grundschober *et al.*, 2001；Bjarnason and Jordan, 2000；Hunt and Sassone-Corsi, 2007)。

Matsuo等人於小鼠肝臟切除實驗證實，約日節律相關基因經由調控Wee1表現，而影響肝臟細胞中細胞週期G2/M時期，主要機制為Wee1基因上帶有E-box片段，為CLOCK-BMAL1作用標的，進而促使表現 (Matsuo *et al.*, 2003)，並有研

究發現Wee1轉錄可經由CLOCK-BMAL1活化(Gekakis *et al.*, 1998)，由PER-CRY抑制(Kume *et al.*, 1999)。

在調控G1期中，CKI家族蛋白 $p21^{WAF1/Cip1}$ mRNA於小鼠肝臟細胞呈現節律性表現， $p21^{WAF1/Cip1}$ 基因帶有ROR response element (RORE)，CLOCK-BMAL1可經由活化 $Rev-erb$ 或 $Ror$ 基因表現，進而抑制 $p21^{WAF1/Cip1}$ 轉錄(Grechez-Cassiau *et al.*, 2008)。圖9為約日節律時鐘與細胞週期相關分子機制。

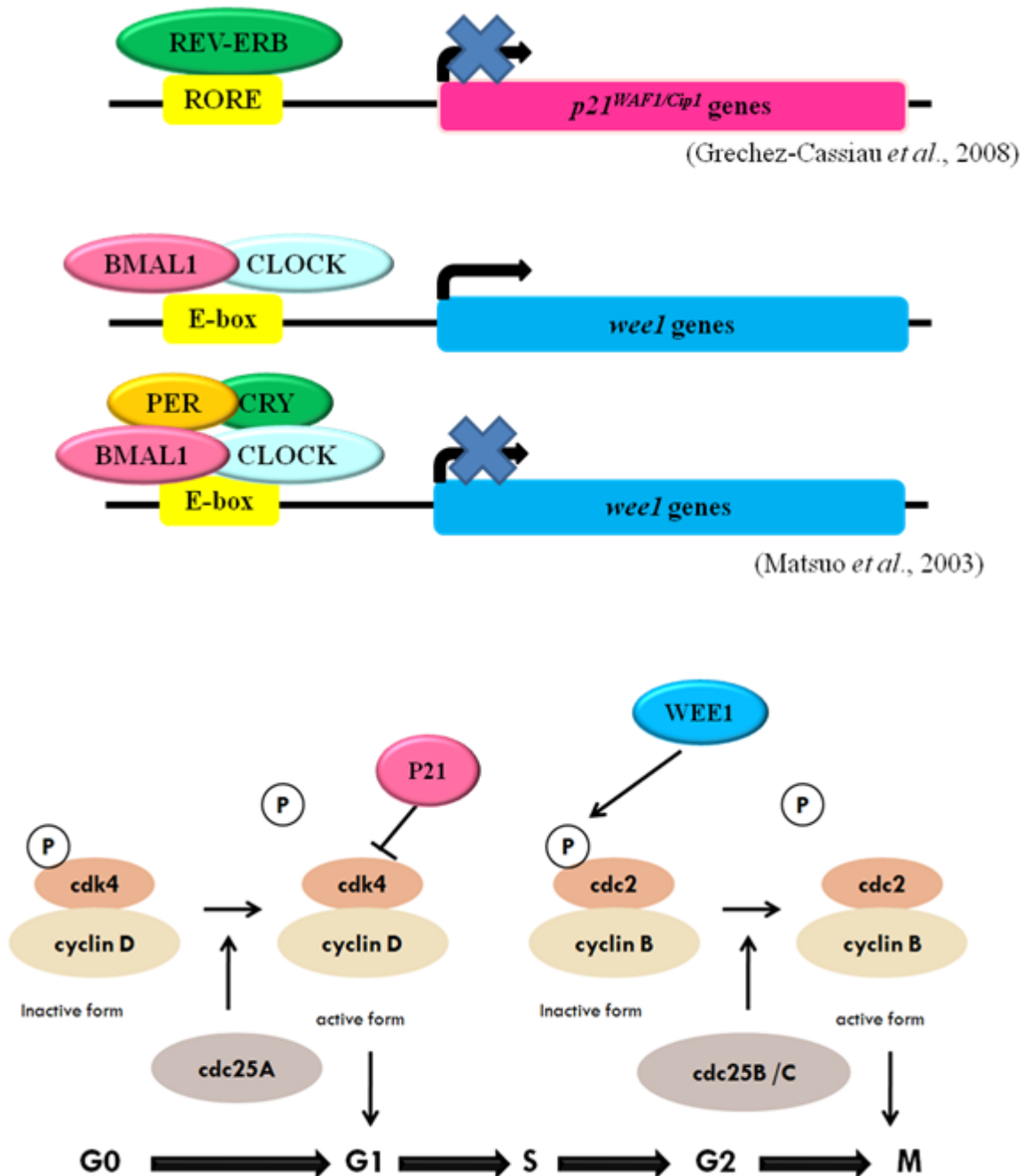


圖 9 約日節律時鐘與細胞週期相關分子機制。

Figure 9 Molecular links between circadian clock and cell cycle genes.

## 肆、 脂肪細胞培養模式

### 一、 實驗模式

脂肪細胞研究模式，可分為體外試驗(*in vitro*)與體內試驗(*in vivo*)。體外模式是將生物體內細胞取出進行體外培養，模擬生物體內生理環境：無菌環境、溫度、酸鹼度等，並提供細胞生長所需之營養成分，此模式優點在於不受體內繁複的環境影響，單純的研究細胞的增殖、分化、代謝與訊息傳遞等，因由人為控制培養條件，便於觀察實驗處理對細胞影響之反應。其中，脂肪細胞培養已被廣泛地應用於脂質生成與脂肪組織的研究上(Novakofski, 2004)，又分為細胞株(cell line) 培養與初代細胞培養(primary cell culture)。

初代細胞培養的優勢在於直接自動物體取出的細胞與原體內組織形態和功能等較為相似，並可由各物種及不同生長階段與部位獲取適合之細胞(Bjornmorp *et al.*, 1982)。過往初代細胞研究發現，自各物種不同生長階段與部位所獲取細胞所表現的生化反應或分子層次皆有所差異(Gregoire *et al.*, 1998；Masuzaki *et al.*, 1995)，故初代細胞培養具有反應體內脂肪組織生理表現之優點。

### 二、 脂肪細胞分化培養模式

脂肪細胞分化是指前脂肪細胞經誘導成為成熟脂肪細胞，脂肪細胞培養通常需要外來刺激誘導細胞的分化，細胞培養與分化過程，首先經過裂殖(mitogenesis)而增加細胞數目，最後到達一定密度下的細胞和細胞間互相接觸(confluent)，此階段的細胞培養可加入分化試劑來誘導細胞分化。

常見分化試劑為添加超出生理濃度的胰島素(insulin)、dexamethasone(DEX)。胰島素主要透過insulin/IGF-1 (insulin-like growth factor-1) 受體的磷酸酪胺基酸激酶路徑 (phosphatidylinositol 3-kinase pathway, PI3K) 刺激protein kinase B (Akt)，而Akt 與脂肪細胞分化有關，其為PI3K路徑的下游因子之一(Kohn *et al.*, 1996)。DEX 為人工合成的皮質類固醇，經證實可促進C/EBP $\delta$ 的表現，進而誘發C/EBP $\alpha$ 與C/EBP $\beta$ 陸續表現，兩者會再去啟動PPAR $\gamma$ 的表現，而由C/EBP $\alpha$ 的持續活化維持PPAR $\gamma$ 的表現，最後引發脂肪細胞特異性基因的表現(Wu *et al.*, 1996)。

### 三、 脂肪細胞約日節律同期化培養模式

在生物體中，除了位於下視丘之中樞生理時鐘外，各周邊組織細胞內部皆有調控生理時鐘系統之相關基因，這些相關基因之表現，可受到中樞生理時鐘與進食產生之訊號進而統整(Damiola *et al.*, 2000)。生物體血液中就含有多種荷爾蒙，如：腎上腺刺激素 (Adrenocorticotropin, ACTH)、甲狀腺刺激素 (Thyrotropin, TSH)、褪黑激素 (Melatonin) 等，這些荷爾蒙都呈現出約日之節律性的變化

(Chrousos, 1998)。在細胞培養模式下，各細胞分別處於不同生理時鐘時間點，為了方便觀察細胞約日節律變化，必須透過同期化作用，使所有細胞都處在相同的節律點。

目前已有多數細胞培養實驗，利用高濃度血清處理，刺激約日節律相關基因同期化，如：Rat-1纖維母細胞(Balsalobre *et al.*, 1998)、老鼠胚胎纖維母細胞(mouse embryonic fibroblast, MEF) (Nakahata *et al.*, 2008)、NIH3T3脂肪細胞(Nagoshi *et al.*, 2004)等，並已有實驗於人類纖維細胞(Qu *et al.*, 2008)、colon-26小鼠結腸癌細胞(Okazaki *et al.*, 2010)及NIH3T3脂肪細胞(Garbarino-Pico *et al.*, 2007)等，利用50%胎牛血清刺激約日節律相關基因同期化。

Balsalobre等人於Rat-1纖維母細胞實驗中(圖10)，利用血清刺激一小時，*Per2* mRNA表現立即提升，於血清刺激八小時降至最低，過十二小時後(血清刺激20小時)又開始提升(Balsalobre *et al.*, 1998)。本研究於試驗前利用50%胎牛血清於肉雞初代前脂肪細胞進行測試(於實驗結果圖二)，也得到相同結果，故用此為本實驗處理脂肪細胞約日節律同期化之方法。

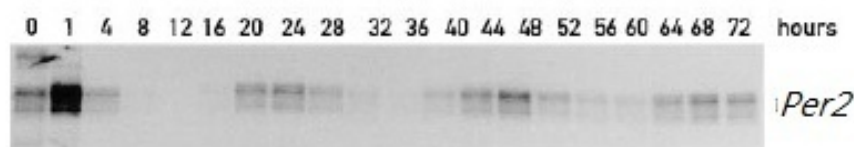


圖 10 Rat-1 纖維母細胞經血清刺激後 *Per2* mRNA 表現。

Figure 10 *Per2* mRNA expression in Serum-Shocked Rat-1 Fibroblasts.

(Balsalobre *et al.*, 1998)



# 材料與方法

## 壹、 試驗設計

本試驗採用15週齡之低產蛋品系(B)與高產蛋品系(L2)雞隻，取其腹脂stromal-vascular (S-V) 細胞進行培養，培養於不同階段各分析不同表現。主要分為三試驗進行，分述如下：

試驗一、不同產蛋能力雞隻前脂肪細胞分裂與約日節律基因表現之比較：細胞培養於前脂肪細胞階段，分別以細胞計數法以及alar blue分析法，測量細胞分裂速度。另外，細胞進行約日節律相關基因同期化處理，於同期化作用後0、1、8、12、16、20、24、28、32、36、48小時，萃取RNA經由Real-time PCR分析基因表現。以0小時未同期化之基因表現為基準，比較兩品系雞隻前脂肪細胞，約日節律與細胞週期相關基因之表現。

試驗二、不同產蛋能力雞隻脂肪細胞分化與約日節律基因表現之比較：細胞培養並以10%雞血清與分化試劑誘導分化，於分化過程中觀察細胞型態變化。並於分化培養第四天，細胞進行約日節律相關基因同期化處理，同期化作用後0、1、8、14、20、26、32小時，萃取RNA經由Real-time PCR分析基因表現，以0小時未同期化之基因表現為基準，比較兩品系雞隻脂肪細胞約日節律相關基因表現。再於分化培養第六天，細胞進行三酸甘油酯含量及GPDH酵素活性分析，確認兩品系分化能力之差異。

試驗三、不同產蛋能力雞隻脂肪細胞能量代謝表現之比較：細胞培養並以10%雞血清與分化試劑誘導分化。於分化培養第六天，分別依胰島素持續添加或移除培養兩天，觀察胰島素對細胞型態之影響，並萃取細胞RNA經由RT-PCR分析代謝基因表現，以分化培養第六天基因表現為基準，觀察至分化培養第八天，胰島素移除培養，分別對兩品系雞隻脂肪細胞代謝基因表現之影響，以及胰島素持續添加或移除培養，對於兩品系雞隻脂肪細胞間代謝基因表現之差異。

## 貳、 實驗材料

### 一、 實驗動物

實驗動物為中興大學選育之台灣土雞L2與B品系，15週齡各六隻(L2品系：母系，以初產至40週齡的產蛋數為選拔標準，B品系：公系，以八週齡體重與雞冠大小為選拔標準)。兩品系來自相同的基礎族群，經18世代選拔，在產蛋能力上，兩品系出現顯著的差異(第18世代L2與B品系，至40週齡的產蛋數分別為 $87\pm 19$ 顆及 $58\pm 17$ 顆)。

## 二、 實驗藥劑

本研究所使用試劑之名稱與來源如表1所示：

表1 試驗藥劑

Table 1 Reagents applied in experiments

試劑名稱	製造公司	產品編號
Collagenase Type 1	Worthington, Freehold, NJ, USA	LS004196
DMEM-F12	GIBCO, Grand, Island, NY, USA	12500-062
胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)	GIBCO, Grand, Island, NY, USA	10270-106
雞血清(chicken serum, CKS)	GIBCO, Grand, Island, NY, USA	16110-082
胰島素(insulin)	Sigma, St. Louis, MO, USA	I-1882
Dexamethasone	Sigma, St. Louis, MO, USA	D-4092
Oil-Red O 染劑	Sigma, St. Louis, MO, USA	O-0625
氯仿(chloroform)	Sigma, St. Louis, MO, USA	C-2423
甲醛(formaldehyde)	Sigma, St. Louis, MO, USA	F-1268
丙三醇(glycerol)	Sigma, St. Louis, MO, USA	G-6279
異丙醇(isopropanol)	Sigma, St. Louis, MO, USA	I-9516
辛酸(octanoic acid)	Sigma, St. Louis, MO, USA	C2875
蛋白質分析套組	Pierce, St. Louis, MO, USA	500-0006
牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA)	Pierce, St. Louis, MO, USA	23209
RareRNA 萃取液	真興實業有限公司，台中，臺灣	GPR02
無水酒精	Riedel-de Haën, Seize, Germany	32221
Taq DNA Polymerase	Takara Bio Inc., Shiga, Japan	R011A
Triglycerides 分析試劑	Randox, Antrim, UK, USA	TR213
QuantumRNA™ 18S Internal Standards 套組	Ambio, Austin, TX, USA	1716
2X SYBR® Green PCR Master Mix	Ambio, Austin, TX, USA	QPSY01
Superscript III	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	18080-044
RNaseH	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	18021-014
Alaman Blue	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	DAL1025

## 參、 實驗方法

## 一、 動物飼養

雞雛孵化後至四週齡，以商用小雞飼料飼養，四週齡後以中雞飼料飼養，水與飼糧皆給予任飼。L2 與 B 品系土雞飼養於平飼雞欄內(平飼)，飼養至 15 週齡後，各選取六隻犧牲，進行細胞試驗。

## 二、 前脂肪細胞收取

雞隻於犧牲前一天禁食，以頸部動脈放血，將腹部脂肪組織取出置於培養盤中剪碎。以 DMEM-F12 (pH 7.4，內含 2 mg/ml collagenase 及 100 mM N-2 hydroxyethylpiperazine-N 9-2 ethanesulfonic acid (HEPES) 與 1.5 % bovine serum albumin)，與組織共同培養於 37°C 震盪水浴槽 (130 rpm/min) 120 分鐘，培養後加入 5 倍體積未含 collagenase 之 buffer，經細網過濾未消化組織和聚集的大細胞群，以 50×g (roter 1617; UNIVERSAL 32R) 離心 3 分鐘，分離上層前脂肪細胞 (S-V 細胞) 與下層成熟脂肪細胞。取前脂肪細胞以 lysis buffer (0.154 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA) 培養於室溫 10 分鐘去除紅血球，收集細胞以 10% FBS/DMEM-F12 培養。

## 三、 細胞培養

前脂肪細胞培養於 10% FBS/DMEM-F12。細胞長滿平貼於培養盤，以含有 1.5 mM 辛酸之 10% CKS/DMEM-F12，並添加外源性分化試劑 (1.75 μM 胰島素、1 μM Dexamethasone) 誘導細胞分化，此時定義為分化第 0 天，其後為正，細胞培養每隔兩日更換一次培養液，並添加胰島素 (1.75 μM)。培養箱環境設定為 37 °C，使用二氧化碳濃度為 5%。

## 四、 Alamar blue 分析

細胞以每盤 3.5 cm<sup>2</sup> 五萬顆細胞培養，培養後一到五天移除培養液，並以 1X Phosphate-buffer saline (PBS, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9.4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl) 清洗並於每盤加入 1 ml 10% Alamar blue 之培養液(預留沒有放細胞的培養液當控制組)，將樣本置入 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培養箱 2 小時後，取培養液於分光光度計讀取 OD<sub>570</sub> (還原態) 及 OD<sub>600</sub> (氧化態) 數值，並依下列公式算出細胞還原態的比值。計算公式如下：

$$\text{公式：\% Reduced} = \frac{117,216 \times T_{570} - 80,586 \times T_{600}}{155,677 \times C_{600} - 14,652 \times C_{570}} \times 100$$

T570=實驗組在 570 nm 的吸收光

T600=實驗組在 600 nm 的吸收光

C570=沒有細胞的控制組在 570 nm 的吸收光

C600=沒有細胞的控制組在 600 nm 的吸收光

## 五、 雞隻脂肪細胞約日節律同期化處理

細胞同期化處理做法參考 Balsalobre 等人作法(Balsalobre *et al.*, 1998)，試驗前於肉雞初代前脂肪細胞進行測試，結果顯示於血清刺激一小時，*Per2* mRNA 表現提升，於八小時降至最低，過十二小時後 (血清刺激 20 小時) 又開始提升 (實驗結果圖 2)，與 Balsalobre 等人試驗結果相符，故以此為處理脂肪細胞約日節律同期化之方法。細胞培養至分析時間點，以 50% FBS/DMEM-F12 (serum shock) 兩小時處理為細胞同期化，再將培養液換成 DMEM-F12 (移除血清刺激)，並於不同時間點收集樣本。

## 六、 Oil-Red O 染色

細胞培養於3.5 cm<sup>2</sup>培養皿中至分化第8天，去除培養液並以1X PBS清洗，每盤再加入0.5 ml 10% formaldehyde於室溫下靜置30分鐘用以固定細胞，再以滅菌水清洗，加入Oil-Red O染劑 (0.3% Oil-Red O, 60% isopropanol) 後置於室溫下避光1小時，去除染劑再以滅菌水清洗退染。最後加入10% glycerol，於顯微鏡下拍照存檔。

## 七、 三酸甘油酯含量分析 (TG assay)

細胞培養於3.5 cm<sup>2</sup>培養皿中至分化第6天，去除培養液並以1X PBS清洗，再加入500 μl均質液 (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM Tris, 1 mM DTT)，用細胞刮杓將細胞從培養皿中刮下收集，再以超音波震碎均質而後將萃取液於4°C，12500×g (roter 1159, MIKRO 22R) 離心5分鐘，取得離心後細胞萃取液之上清液。將樣品澄清液與預先置於37°C之三酸甘油酯試劑混合，於37°C反應5分鐘，利用分光光度計於波長500 nm測定吸光值，以此計算樣品甘油含量，最後以蛋白質分析套組測定樣本總蛋白質濃度，定量三酸甘油酯含量。

計算公式如下：

$$\text{TG (mmole/mg protein)} = \frac{[2.29 \times (\text{OD}_{\text{sample}}/\text{OD}_{\text{standard}}) \times \text{培養液體積}(\mu\text{l})]}{\text{mg protein}}$$

## 八、 甘油-3-磷酸去氫酶活性分析 (GPDH activity assay)

細胞培養於3.5 cm<sup>2</sup>培養皿中至分化第6天，去除培養液並以1X PBS清洗，加入500 µl均質液將培養皿中細胞刮下收集，再以超音波震碎均質而後將萃取液於4°C，12500×g (roter 1159, MIKRO 22R) 離心5分鐘，並收集離心後細胞萃取液之上層澄清液至冰上，待GPDH活性分析。進行分析前，先配製 Triethanolamine-EDTA premix pH 7.5 (200 mM triethanolamine ; 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O)，配製完畢後充氮氣並避光，於塑膠比色管中注入取100 µl樣品上清液，再注入800 µl assay buffer (Triethanolamine-EDTA premix 8 ml; 1.43mM β-mercaptoethanol 9 µl ; β-NADH 2 mg ; 滅菌水4.8 ml)，最後再注入100 µl dihydroxy acetone phosphate lithium solution (1.1416 mg/ml) 作為受質，迅速混合後利用分光光度計以波長340 nm讀取樣品吸光值。以每30秒為間隔持續測定5分鐘，取0.5分鐘之吸光值 (A<sub>0.5</sub>) 與4.5分鐘吸光值 (A<sub>4.5</sub>) 計算樣品吸光值之差異與反應時間；最後以蛋白質分析套組測定上層澄清液中蛋白質濃度，以牛血清白蛋白為標準液，進而可求得GPDH 之活性。

GPDH 活性計算方程式為：

$$\text{GPDH activity (U/mg)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{0.00625 \text{ OD} \times 1 \text{ nMole} \times \text{mg protein}}$$

## 九、 總RNA萃取

細胞培養於 6 cm<sup>2</sup>培養盤，培養至分析時間點去除培養液以1X PBS清洗，而後添加 0.5 ml的RareRNA萃取液，並收集兩盤至離心管。加入氯仿300 µl混合均勻然後離心12000×g (roter 1159 ; MIKRO 22R)，4°C，10分鐘，於離心完畢將上層澄清液收集至新的離心管，添加上清液兩倍的無水酒精混合均勻，再次離心12000×g，4°C，5分鐘後，除去上層澄清液並加入70%酒精清洗，再離心14000×g(roter 1159 ; MIKRO 22R)，4°C，10分鐘。將上層澄清液去除乾淨，放至於室溫待其乾燥後，加入30 µl的DEPC H<sub>2</sub>O 溶解離心管底部的沉澱物，於乾熱器上以60°C加熱5分鐘，最後將所萃取之總RNA保存於-80°C。

## 十、 相對定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

試驗三代謝相關基因以 PCR 反應定量其表現。將萃取之 RNA 定量調整至 0.3 µg/µl，以 RNA 凝膠電泳觀察樣本品質。取 4 µl 的 RNA 置於 PCR 離心管內接著加入 1 µl random primer (3µg/µl) 和 7µl 的滅菌水均勻混合。置於 70°C 反應

10 分鐘後快速地將樣品置於冰上，之後再加入 4  $\mu$ l 5X buffer、2  $\mu$ l DTT(0.1 M)、1  $\mu$ l dNTP (10 mM)和 1  $\mu$ l Superscript III (200 unit/ $\mu$ l) 混合均勻，於 25 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，再置於 42  $^{\circ}$ C 反應 52 分鐘，再以 70 $^{\circ}$ C 反應 15 分鐘，最後加入 1  $\mu$ l RNaseH (2 unit/ $\mu$ l) 置於 37  $^{\circ}$ C 反應 20 分鐘，將樣本存於-20 $^{\circ}$ C。進行反轉錄後之樣本再進行 PCR 反應，每管 PCR 小管中放置 1  $\mu$ l Taq (5 unit/1 $\mu$ l)、2.5  $\mu$ l 10X PCR buffer、2  $\mu$ l dNTP (2.5 mM) 與所需要之引子一對各 1  $\mu$ l (10  $\mu$ M)，隨後加入 1  $\mu$ l cDNA，再以滅菌水將體積補足，總體積則為 25  $\mu$ l 進行反應。反應所用引子序列如表 2 所示：

表2 聚合酶連鎖反應分析雞脂肪細胞基因mRNA表現之引子序列

Table 2 Primers used for PCR analysis of genes expressed in chicken adipocytes

基因名稱	參考序列 NCBI GenBank #	引子序列
Adiponectin-R1	NM_001031027.1	Forward:5'- ACTGGCTGAAGGACAACGAT -3' Reverse:5'- CAAGACGCAGACAATGGAGA -3'
Adiponectin-R2	DQ072276.1	Forward:5'- AGGACAGCTCAGAGCAGAGG -3' Reverse:5'- CTCCTGCACAGGTGCTACAA -3'
PPAR $\gamma$	NM_001001460.1	Forward:5'- GGAAAGACGACAGACAAATCAC -3' Reverse:5'- GAACTTCACAGCAAACACTCAAAC -3'
Perilipin	GU327532.1	Forward:5'- GATGACGGCGAAGAAGAATC -3' Reverse:5'- TCCTCGTGTACCTTGCTGTG -3'
Adiponectin	EU620700.1	Forward:5'- AGCCTACATCACCACGAAGG -3' Reverse:5'- ACCACACGACTTCCCAAGAC -3'
aFABP	AY675941.1	Forward:5'- GCACTGTGCTTGACTGGGTA -3' Reverse:5'- CTCCAGCTGCATGTGTCAT -3'
Sirt1	NM_001004767.1	Forward:5'- CAGACCCACGGACAATTCTT -3' Reverse:5'- TGCAACCTGTTCCAATGTGT -3'
Nampt	NM_001030728.1	Forward:5'- TCCTCCTCGCCACCGACTCC -3' Reverse:5'- TCCAGTCCCTCCAAGCTGCCA -3'
AMPK $\alpha$ 1	NM_001039603.1	Forward:5'- GCCCCTTGGGCAGTGCTTGT -3' Reverse:5'- GCTTCAGGCCATTGCGTGGCA -3'
ATGL	EU852334.1	Forward:5'- GCCACAGGTGCTGCGGGATA -3' Reverse:5'- CTGGGGCCCTCCAAGCTCGA -3'

## 十一、 即時聚合酶連鎖反應 (Real time-PCR)

試驗一、二約日節律相關基因以Real time-PCR分析其表現，數據結果再以 CircWave v1.4軟體分析其節律型態 (<http://www.euclock.org/>)。每個反應管混合

10 $\mu$ l SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix與1 $\mu$ l cDNA，加入引子配至合適的濃度，反應總體積為20  $\mu$ l。以ABI StepOne Plus™系統進行，反應條件如下：95 $^{\circ}$ C 5分鐘熱活化，之後95 $^{\circ}$ C 15秒，60 $^{\circ}$ C 1分鐘，共40個循環。實驗中以18S作為內部控制組引子，所以計算方式為樣本預觀察基因的CT值去其18S基因的CT值，所得之值再以2的倒數次方換算即得樣本基因表現值，反應所用引子序列如表3所示：

表3 即時聚合酶連鎖反應分析雞脂肪細胞基因mRNA表現之引子序列

Table 3 Primers used for Real-time PCR analysis of genes expressed in chicken adipocytes

基因名稱	參考序列 NCBI GenBank #	引子序列
BMAL1	AF205219	Forward:5'-ATGGAAGACTGGACTACGCAGAC -3' Reverse:5'-GCTGTTCATTTTATCTCGACGCCGTT-3'
PER2	NM_204262.1	Forward:5'- CAGTGGATGCAGCAGCGAGCA -3' Reverse:5'-GCAGGAAGGTGAGCTTTCAGCTCTT-3'
p21 <sup>WAF1/Cip1</sup>	NM_204396.1	Forward:5'- CCTGCAGCATCCTGGTGCCC -3' Reverse:5'- CACGCAGGGCTCACACCCAG -3'
Rev-erb $\beta$	NM_205205.1	Forward:5'- AGGCCGGGACCTTTGAGGTTT -3' Reverse:5'- AGGTGACAGTACGCTCCCTTGCA -3'
ROR $\beta$	NM_205093.1	Forward:5'- CGGGGAGTCGCCAACACCATG -3' Reverse:5'- CTCCGAAAGAATCCCTTGCAGCCT -3'
Wee1	NM_001031181.2	Forward:5'- TGCAATGGCGGCAGTTTAGCC -3' Reverse:5'- GGCCTCGAGCCACCTGAAGC -3'
CRY1	NM_204245.1	Forward:5'- CCGCTGGCGGTTTCTGCTTCA -3' Reverse:5'- AACATCTGCTGGCTGTCCACGA -3'

## 十二、 統計分析

實驗採用飼養在相同平飼環境、飼料與飲水條件之雞隻，本試驗所得數據為6次試驗結果，依測定所得數據，使用統計軟體 Statistics Analysis System (SAS) 進行分析。試驗一、二細胞分裂分析、脂質代謝 (三酸甘油酯含量及 GPDH 酵素活性) 與約日節律相關基因表現，以獨立樣本 t 檢定比較兩品系間平均值之差異，其中兩品系之約日節律相關基因相對表現平均值有差異 ( $P<0.05$ )，以此表示兩品系於此時間點之表現振幅相異。約日節律基因表現結果再以軟體 CircWave v1.4 (<http://www.euclock.org/>) 分析其節律性表現。試驗三以一般線性模式 (General Linear Model) 進行變方分析，以 LS means 比較組間平均值之差異顯著性。統計結果以  $P<0.05$  表示有顯著差異。

# 結果與討論

## 試驗一、不同產蛋能力雞隻前脂肪細胞分裂與約日節律基因表現之比較

為瞭解雞隻產蛋能力與脂肪組織功能間的關係，本試驗藉由分析不同產蛋數雞隻脂肪組織之差異，來探討其關聯。脂肪細胞具有儲存與調節能量使用之功能，於動物體內扮演維持能量平衡的角色。過多的脂肪組織，除了導致動物體的肥胖，也使體內能量失去平衡，影響雞隻生理表現。脂肪組織含量取決於脂肪細胞的體積及數目，脂肪細胞數目是由前脂肪細胞的分裂，再經由分化至成熟的脂肪細胞而來。已知細胞有絲分裂過程，可受到約日節律系統之調控(Matsuo *et al.*, 2003；Grundschober *et al.*, 2001；Grechez-Cassiau *et al.*, 2008)。因此本試驗目的，在比較不同產蛋能力雞隻，前脂肪細胞分裂速度與約日節律相關基因表現。

### 一、細胞分裂之比較

細胞計數實驗結果顯示，細胞於培養第四天起，B品系雞隻S-V細胞數目增加比值就顯著高於L2品系(圖1A)。Alamar blue分析實驗結果顯示，細胞培養第五天，B品系雞隻細胞還原能力比值顯著高於L2品系(圖1B)。經由上述分析結果顯示，B品系相較於L2品系雞隻，S-V細胞有較快的分裂速度。

### 二、約日節律

細胞分裂之比較結果證實，B品系雞隻之S-V細胞有較L2品系快的分裂速度，因此進一步瞭解於細胞分裂時期，兩品系約日節律相關基因表現之差異。

#### (一) 約日節律相關基因表現

S-V細胞約日節律相關基因，未同期化處理之表現量，於兩品系並無顯著差異(圖3)。約日節律相關基因經同期化作用下，兩品系S-V細胞之*Bmall*、*Per2*、*Cry1*、*Rev-erb $\beta$*  mRNA經軟體(CircWave v1.4)分析，所呈現之節律性振幅如圖所示(圖4B至7B)。B品系雞隻S-V細胞mRNA相對(0小時)表現量，於同期化作用後12小時(*Cry1*、*Rev-erb $\beta$* )、32小時(*Per2*)、36小時(*Rev-erb $\beta$* )、48小時(*Bmall*)，皆顯著高於L2品系(圖4A至7A)。

已知*Rev-erb $\beta$* 轉錄經由CLOCK-BMAL1活化，而其作用受PER-CRY抑制，其中*Per2*於同期化作用後32小時，B品系相較L2品系雞隻S-V細胞，有較高的振幅表現(圖4A)，隨後36小時兩品系*Per2*相對表現則無顯著差異。並於同期化作用



後36小時，*Rev-erbβ*之表現振幅，B品系相較於L2品系雞隻S-V細胞高(圖7A)。這些差異可能影響其下游基因表現之改變，已知調控細胞週期之蛋白質  $p21^{WAF1/Cip1}$  (Grechez-Cassiau *et al.*, 2008)與*Weel* (Matsuo *et al.*, 2003)之基因轉錄，皆受到約日節律系統所調控，因此進一步探討細胞週期相關基因表現差異。

## (二) 細胞週期相關基因表現

$p21^{WAF1/Cip1}$  基因剔除之小鼠，相較於野生型其體內脂肪含量提高90%，脂肪細胞數目更提高1.7倍(Naaz *et al.*, 2004)。3T3-L1前脂肪細胞研究中，進入前分化時期，細胞會退出細胞週期並生長停滯，已有研究證實當細胞進入分化，需要CKI於此期表現，抑制細胞週期之進行(Harper and Elledge, 1996)。脂肪細胞中，PPAR $\gamma$ 可調控 $p21^{WAF1/Cip1}$  基因表現，促使脂肪細胞分化(Morrison and Farmer, 1999)。脂肪細胞進入分化前階段， $p21^{WAF1/Cip1}$  表現會上升，分化初期會經過一次至數次的細胞分裂 (mitotic clonal expansion) (Cornelius *et al.*, 1994)。細胞分化後， $p21^{WAF1/Cip1}$  表現會下降(Morrison and Farmer, 1999)。由此可知 $p21^{WAF1/Cip1}$  參與脂肪細胞分裂過程之調控。

在本試驗中，同期化作用下，兩品系雞隻S-V細胞之 $p21^{WAF1/Cip1}$  及*Weel* mRNA表現並無節律性變化，可能因血清中含有許多生長因子，此影響勝於其節律變化，以至於用血清刺激之模式同期化，無法觀察其節律性變化。L2品系雞隻S-V細胞於同期化作用下， $p21^{WAF1/Cip1}$  mRNA相對(0小時)表現量，大多時間點皆顯著高於B品系(12、16、20小時除外)(圖8)。*Weel*於同期化作用下，兩品系之相對表現量並無顯著差異(圖8)。經同期化作用下，L2品系雞隻S-V細胞 $p21^{WAF1/Cip1}$  mRNA，有較B品系高之相對(0小時)表現量。約日節律實驗結果整理於表4。

表4 不同產蛋能力雞隻脂肪S-V細胞約日節律相關基因相對表現差異

Table 4 Relative expression of circadian-related genes in adipose S-V cells from chickens with different laying performances

約日節律相關基因	相對(0小時)表現於兩品系間有顯著差異之時間點 ( $P < 0.05$ B vs. L2)
Per2	32 小時 (B > L2)
Bmal1	48 小時 (B > L2)
Cry1	12 小時 (B > L2)
Rev-erbβ	12、36 小時 (B > L2)
$p21^{WAF1/Cip1}$	同期化下大多時間點皆為 L2 高於 B 品系(12、16、20 小時除外)
Weel	無顯著差異

綜合試驗一結果顯示，B品系雞隻S-V細胞相較於L2品系有較快的分裂速度，

其中約日節律相關基因表現之*Rev-erbβ*於12、36小時，於B品系雞隻S-V細胞有較高的振幅。細胞週期相關基因中，調控G2/M期之蛋白質Wee1，於兩品系相對表現量並無顯著差異，而主要差異乃在於調控G1/S期之蛋白質 $p21^{WAF1/Cip1}$ 之相對(0小時)表現。已知 $p21^{WAF1/Cip1}$ 基因上帶有RORE片段(*Rev-erb*調控片段)，*Rev-erb*可由此抑制 $p21^{WAF1/Cip1}$ 轉錄(Grechez-Cassiau *et al.*, 2008)。B品系雞隻S-V細胞有較快分裂速度，可能是約日節律基因同期化下，較高的*Rev-erbβ*相對表現量，進而抑制 $p21^{WAF1/Cip1}$ 基因表現，使細胞分裂速度較L2品系者為快，但兩品系細胞分裂之差異是否直接受約日節律之影響，則有待進一步釐清其分子機制。

B品系雞隻是以八週齡體重為選拔標準，經選拔下有較好的生長性能，與較高的脂肪組織含量(陳，2004)。本試驗發現，經不同條件選拔下之兩品系雞隻，其前脂肪細胞分裂速度有顯著性差異，與過去比較肉雞與蛋雞之研究中(Donnelly *et al.*, 1993)，肉雞相較於蛋雞之前脂肪細胞有較快之增生速度，其結果是一致的。另外，在比較以生長能力為選拔條件之肉雞與未選拔之肉雞試驗中(Cartwright *et al.*, 1986)，發現以生長條件選拔下，其肌肉組織與腹部之脂肪重量，與脂肪細胞之數目與大小，於選拔下肉雞皆顯著高於未選拔者。

研究顯示，脂肪細胞數目於成體後會維持恆定，若於發育期(指細胞數目固定之前)有較高的脂肪細胞數量，則成體後之脂肪細胞數目也會較多(Spalding *et al.*, 2008)。因此，以生長性能選拔下之B品系與產蛋數選拔下之L2品系，前脂肪細胞分裂速度之不同，可能是成體後有不同脂肪組脂含量的因素之一。

## 試驗二、不同產蛋能力雞隻脂肪細胞分化與約日節律基因表現之比較

比較不同產蛋能力台灣土雞其脂肪細胞分化之表現報告(黃，2008)指出，高產蛋數L2品系雞隻，其脂肪細胞分化能力與對外在分化刺激之反應，較低產蛋數B品系為佳。已知約日節律系統也參與調控生物體中代謝過程(Eckel-Mahan and Sassone-Corsi, 2009；Nakahata *et al.*, 2009；Huang *et al.*, 2011)。因此，進一步瞭解不同產蛋能力雞隻脂肪細胞，於分化過程中之約日節律表現型態，是否也有所差異。

### 一、 脂肪細胞形態

脂肪細胞形態結果顯示，脂肪細胞於分化培養第二天起，細胞形態開始有變化。於分化過程中，細胞體積與形態變化上，於兩品系無法區分其差異(圖9)。

### 二、 脂肪細胞三酸甘油酯含量與GPDH酵素活性

雞前脂肪細胞誘發分化為脂肪細胞後，即誘發GPDH的表現與活性，並具有將能量以三酸甘油酯的形式儲存於細胞內之能力。因此，試驗以細胞中三酸甘油酯含量與GPDH活性，為判別前脂肪細胞分化程度的依據。實驗結果顯示，脂肪細胞於分化第六天，L2品系雞隻脂質堆積能力(圖10)與GPDH酵素活性(圖11)，皆顯著高於B品系。

### 三、 約日節律

以三酸甘油酯含量與GPDH酵素活性作為脂肪細胞分化能力指標，L2品系雞隻脂肪細胞相較於B品系，如同過去文獻(王，2006；黃，2008)有較好的分化能力。因此進一步觀察分化過程中，約日節律表現型態。

3T3-L1前脂肪細胞實驗中，於誘導分化培養第四天，*Bmall* mRNA即開始表現，並在*Bmall*基因剔除小鼠中發現，其脂肪S-V細胞以相同條件誘導分化刺激下，相較於野生型小鼠，無法分化成脂肪細胞，而再利用腺病毒送入其表現下，即可恢復其細胞分化能力，並發現*Bmall*影響脂質代謝相關基因(如：phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK、adenylate kinase 4, ACS4等)表現(Shimba *et al.*, 2005)，由此可知其對於脂肪細胞分化過程之影響性。

如圖12所示，兩品系脂肪細胞，於分化培養第四日，約日節律相關基因未同期化之表現量。於*RORβ* mRNA表現量，B品系脂肪細胞顯著高於L2品系。脂肪細胞經同期化作用後，兩品系細胞中*Bmall*、*Per2*、*Cry1*、*Rev-erbβ*、*RORβ* mRNA mRNA經軟體(CircWave v1.4)分析，所呈現之節律性表現如圖所示(圖13B至17B)。L2品系雞隻脂肪細胞mRNA相對(0小時)表現量，於同期化作用後1小時(*Per2*、*Cry1*、*Rev-erbβ*、*RORβ*)、14小時(*Rev-erbβ*、*RORβ*)、20小時(*Per2*、*Bmall*、*Cry1*、*Rev-erbβ*、*RORβ*)、26小時(*Cry1*)、32小時(*Per2*、*Cry1*、*Rev-erbβ*、*RORβ*)，皆顯著高於B品系(圖13A至17A)。實驗結果整理於下(表5)。

表5 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞約日節律相關基因相對表現差異

Table 5 Relative expression of circadian-related genes in adipocytes differentiated from adipose S-V cells of chickens with different laying performances

約日節律相關基因	相對(0小時)表現 $P < 0.05$ B vs. L2
Per2	1、20、32 小時(L2 > B)
Bmall	20 小時(L2 > B)
Cry1	1、20、26、32 小時(L2 > B)
Rev-erbβ	1、14、20、32 小時(L2 > B)
RORβ	1、14、20、26、32 小時(L2 > B)

在研究糖尿病模式的小鼠中，輕度肥胖並有糖尿病症狀之小鼠(KK mice)，以及病態性肥胖伴有嚴重高血糖症狀之小鼠(KK-Ay mice)，脂肪細胞中約日節

律相關基因之mRNA表現幅度，相較於控制組小鼠皆下降，其中在KK小鼠為輕度降低振幅，而在KK-Ay則嚴重降低振幅(Ando *et al.*, 2005)。脂肪組織會分泌多種脂肪素，進而調控體內代謝平衡，而部分脂肪素於脂肪細胞中其表現呈節律性變化，其中Adiponectin於血液中濃度於非肥胖者中是呈現24小時週期節律性的變化，但是在肥胖者中卻喪失這種節律性變化(Pickavance *et al.*, 1998; Calvani *et al.*, 2004; Yildiz *et al.*, 2004)。

周邊組織約日節律系統，主要可受到中樞約日節律系統(下視丘訊號)與進食等影響(Damiola *et al.*, 2000)。當組織接收到訊號，改變約日節律相關基因表現，進而影響各組織釋出不同反應(如：代謝活動)，因而使生物體某些活動是有約日的節律性變化。肥胖者或有代謝疾病者，其體內內分泌的改變，進而影響約日節律相關基因之表現，並影響體內能量代謝之平衡。

綜合試驗二結果顯示，L2品系相較於B品系，脂肪細胞有較高的能量儲存與分化能力，並於同期化作用下，*Per2*、*Bmal1*、*Cry1*、*Rev-erb $\beta$* 、*ROR $\beta$*  mRNA表現，有較高的振幅。由此試驗發現，兩品系雞隻脂肪細胞於同期化作用下，約日節律相關基因表現振幅不同，這可能是影響脂肪細胞，對於刺激反應與其功能不同的原因之一。

### 試驗三、不同產蛋能力雞隻脂肪細胞能量代謝表現之比較

在先前研究顯示，對於兩品系脂解能力之分析顯示，於升糖素 (glucagon) 刺激之下，B及L2品系脂解反應提高比例並無顯著差異，主要差異在於未經激素刺激下，L2品系有較B品系高之基礎脂解能力(王，2006)。而在比較不同產蛋能力台灣土雞其脂肪細胞分化之表現報告(黃，2008)指出，L2品系相較B品系雞隻，其脂肪細胞對外在分化之反應為佳。在本研究也發現L2品系雞隻脂肪細胞於誘發分化後，約日節律相關基因mRNA表現，有較B品系高的振幅。因此進一步探討，不同產蛋能力雞隻脂肪細胞，環境改變對脂質代謝表現之影響。

一般於脂肪細胞分化培養時，會添加超出生理濃度胰島素作為誘導分化刺激(Klemm *et al.*, 2001a)。動物體於剛進食後，當血糖升高時，胰臟內中胰島 $\beta$ 細胞即分泌胰島素。於肌肉和脂肪組織中，胰島素可透過細胞表面的葡萄糖轉運子4 (glucose transporter 4, GLUT4)，來促進葡萄糖的吸收，進而控制血糖。

禽類與哺乳類具有相近的血中胰島素濃度，但血液中卻維持著高血糖濃度，可能因素為組織對於胰島素的低敏感性，如禽類組織中胰島素訊號路徑不同於哺乳類，然而在肝臟組織中之胰島素訊號路徑，禽類與哺乳類並無明顯差異，但在肌肉組織中PI3K活性即高於哺乳類，使之產生負回饋途徑，而抑制對胰島素之敏感性(Dupont *et al.*, 2009)。於探討雞隻肌肉組織之蛋白質合成研究中，以空腹肉雞給予餵飼或經由胰島素處理，可提高雞隻肌肉細胞中Ribosomal protein S6

kinase beta-1 (S6K1) 之活性，促使蛋白質之合成(Bigot *et al.*, 2003a)。因此胰島素對於雞隻生理仍是具有影響性的。

胰島素可增加脂肪細胞中，脂肪酸與脂肪合成及脂肪酸酯化作用，並透過抑制ATGL基因表現，進而抑制脂質分解(Kralisch *et al.*, 2005; Kershaw *et al.*, 2006)。整體而言，胰島素對於脂肪細胞是以脂質生成之方向進行。而雞隻產蛋為能量需求密集之時期，具良好功能之脂肪細胞，必需得知動物體需求(指訊號之接收)，並適時釋出能量供給(指訊號接受後之細胞反應)。因此，需要觀察雞隻處於能量缺乏時，脂肪細胞對此之代謝相關基因反應。雞隻攝食之狀態可影響體內胰島素之分泌，故本試驗以胰島素，觀察對不同產蛋能力雞隻脂肪細胞，能量代謝表現之影響。

## 一、 細胞形態

兩品系雞隻脂肪細胞於分化培養持續添加胰島素，皆有大量油滴累積，在胰島素移除培養，兩品系脂肪細胞油滴皆有縮小之情形，但無論在胰島素添加或移除之分化培養，脂肪細胞於體積或油滴累積情形及細胞外觀變化，無法區別兩品系之差異(圖18)。

## 二、 脂肪細胞代謝基因表現之比較

### (一) 脂肪細胞分泌激素Adiponectin與其受體基因表現

Adiponectin是由脂肪組織分泌之細胞激素，於脂肪細胞誘發分化後，其表現量會提高，可調控醣類及脂質代謝作用(Berg *et al.*, 2002)，並可增加胰島素之敏感性(Yamauchi *et al.*, 2007)。Adiponectin作用需透過與其受體結合，與AdipoR1結合後，可活化AMPK路徑，增加肌肉對醣質的利用，進而減少胰島素抗性與醣質新生作用(Yamauchi and Kadowaki, 2008)。Adiponectin結合AdipoR2，可活化PPAR $\alpha$ 而促使其下游能量代謝作用(Kadowaki and Yamauchi, 2005)。

AdipoR1/R2之表現與動物體之攝食活動有關，在限飼小鼠其骨骼肌與肝臟細胞，相較於任飼組AdipoR1/R2 mRNA表現量顯著提高，並於再度餵食時下降(Tsuchida *et al.*, 2004)。在肝臟與肌肉細胞培養添加胰島素，也下降其細胞AdipoR1/R2 mRNA表現量。於有胰島素抗性之ob/ob基因小鼠中，血中胰島素濃度提高，其脂肪組織與骨骼肌細胞AdipoR1/R2 mRNA表現量也是下降(Tsuchida *et al.*, 2004)。誘發高胰島素血症之大鼠，其骨骼肌與心肌細胞中，胰島素可透過PI3K/Akt與FOXO1路徑，而抑制AdipoR1表現與AMPK磷酸化(Cui *et al.*, 2012)。

綜合上述可知，Adiponectin之作用可增加細胞對胰島素之敏感性，但需經由與其受體結合產生作用，其受體AdipoR1/R2會在不同生理階段表現量不同，而此與環境中胰島素濃度成反比。試驗結果顯示，在胰島素持續添加或移除下，Adiponectin與其受體基因表現，於B品系雞隻脂肪細胞並無顯著差異。在L2品系

雞隻脂肪細胞，*AdipoR2* mRNA相對表現於胰島素移除下，顯著高於持續添加胰島素(圖19)。

## (二) 脂肪細胞能量代謝相關基因表現

AMPK、Nampt與Sirt1為細胞中感應能量平衡以及調控代謝之蛋白，AMPK及Sirt1於能量不足時皆可活化其活性，並促使活化能量產生之相關基因，而Nampt為NAD<sup>+</sup>生合成之關鍵酵素，Sirt1之活性取決於NAD<sup>+</sup>與NADH之比值，而Sirt1與AMPK又可相互調控彼此(Canto *et al.*, 2010)，此三者蛋白，對於調控細胞能量平衡，其作用是環環相扣的。大鼠透過Streptozotocin破壞胰島β細胞，誘發無分泌胰島素狀態下，額外注射胰島素，其肝臟中AMPKα、Sirt1活性皆下降(Barazzoni *et al.*, 2011)。並已有研究於大鼠心肌細胞與骨骼肌細胞中，胰島素可透過PI3K/Akt與FOXO1路徑，抑制*AdipoR1*表現，進而降低AMPK活性(Cui *et al.*, 2012)。

由上述研究可知，當動物體能量平衡改變時(如：攝食活動或斷食)，細胞中AMPK與Sirt1可透過改變其活性，影響下游代謝相關基因表現。而胰島素與改變動物體內細胞能量狀態有關，因此細胞反應對於環境中胰島素濃度之改變，需要有良好的反應。

試驗結果顯示，在胰島素持續添加或移除下，能量代謝相關基因表現，於B品系雞隻脂肪細胞並無顯著差異。在L2品系雞隻脂肪細胞，*Nampt*、*AMPKα1* mRNA相對表現於胰島素移除下，顯著高於持續添加胰島素(圖20)。

## (三) 脂肪細胞脂質代謝相關基因表現

PPAR $\gamma$ 於脂肪細胞分化早期即有表現，除了促使脂肪細胞分化，並活化許多脂肪細胞特異性蛋白質表現，其中與脂肪細胞脂解能力相關基因包含aFABP(Tontonoz *et al.*, 1994)、Perilipin(Nagai *et al.*, 2004)、ATGL(Kim *et al.*, 2006)皆為PPAR $\gamma$ 標地基因，並調控脂肪細胞中多種代謝反應(Juge-Aubry *et al.*, 1997)。PPAR $\gamma$ 可增加脂肪細胞中GLUT4的表現(Shimaya *et al.*, 1997)與胰島素耐受性，調控血糖濃度平衡(Rangwala *et al.*, 2003)。

在streptozotocin誘發第一型糖尿病之小鼠脂肪組織，與3T3-L1脂肪細胞研究發現，添加胰島素或TNF $\alpha$ 處理(透過抑制PPAR $\gamma$ 訊號)皆會下降ATGL表現(Kim *et al.*, 2006)。有研究給予大鼠PPAR $\gamma$ 活化劑，其脂肪組織之脂解作用增加(Festuccia *et al.*, 2006)。另有研究於P465L PPAR $\gamma$ 小鼠(喪失PPAR $\gamma$ 功能之小鼠)，發現會降低其脂肪組織脂解能力相關作用(Rodriguez-Cuenca *et al.*, 2012)。上述文獻可知，PPAR $\gamma$ 對於脂肪細胞脂解過程之影響。

試驗結果顯示，在胰島素持續添加或移除下，脂質代謝相關基因表現，於B品系雞隻脂肪細胞並無顯著差異。L2品系雞隻脂肪細胞，*aFABP* mRNA相對表現於胰島素移除下，顯著高於持續添加胰島素(圖21)。綜合結果整理於表6。

表6 脂肪細胞對胰島素移除培養代謝基因表現之差異

Table 6 Effects of insulin removal on metabolism-related genes expression of adipocytes in culture

	$P < 0.05$ Insulin vs. Insulin(-)
B	無顯著差異
L2	Adiponectin R1、Nampt、AMPK $\alpha$ 1、aFABP (相較胰島素添加，於胰島素移除提高)

由上表可知對於環境不同(胰島素添加與否)，B品系雞隻脂肪細胞其代謝相關基因表現皆無顯著差異，L2品系脂肪細胞Adiponectin R1、Nampt、AMPK $\alpha$ 1、aFABP，於胰島素移除則顯著高於胰島素持續添加培養。在過去研究顯示，L2品系雞隻脂肪細胞對外在分化刺激之反應較B品系高(黃，2008)。L2品系脂肪細胞對在胰島素添加與否環境下，有較多之代謝基因表現差異，反觀B品系則無反應差異。在雞產蛋時期為能量需求密集之過程，兩品系雞隻脂肪細胞，對於胰島素添加與否反應之差異，可能是造成產蛋能力不同因素之一。

#### (四) 脂肪細胞代謝基因表現於胰島素添加或移除反應之差異

由上述結果得知不同產蛋能力雞隻脂肪細胞，對於胰島素添加與否，代謝相關基因表現反應相異。因此想進一步比較，兩品系在相同環境下，代謝相關基因表現反應之差異。實驗結果顯示，於胰島素添加培養下，L2品系雞隻脂肪細胞AMPK $\alpha$ 1 mRNA相對(分化第六日)表現顯著低於B品系。胰島素移除培養下，L2品系雞隻脂肪細胞Nampt、aFABP、ATGL mRNA相對(分化第六日)表現顯著高於B品系(圖19至21)。綜合結果整理於表7。

表7 脂肪細胞代謝基因表現於胰島素添加或移除反應之差異

Table 7 Comparison of metabolism-related genes expression of adipocytes cultured in the with or without insulin

	$P < 0.05$ B vs. L2
胰島素添加	AMPK $\alpha$ 1 (相對分化第六日表現，於L2品系較低)
胰島素移除	Nampt、aFABP、ATGL (相對分化第六日表現，於L2品系較高)

胰島素添加與否可反映生物體之攝食狀態。AMPK一般於生物體內斷食或運動狀態下可活化(Daval *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008)，其下游基因Nampt為合成NAD<sup>+</sup>速度的關鍵酵素，同時可調控需依賴NAD<sup>+</sup>而有去乙酰化活性的Sirt1去執行其功能(Revollo *et al.*, 2004)。當生物體能量缺乏時，脂肪細胞會進行脂質分解，以供各組織所需。aFABP參與細胞內脂肪酸的攝取、輸送與代謝(Storch and

Corsico, 2008)，並可促進細胞脂解過程中，脂肪酸釋出(Jenkins-Kruchten *et al.*, 2003)。於B及L2品系雞隻腹部脂肪細胞實驗中，分析基礎脂解能力為L2品系高於B品系(王, 2006)，ATGL為脂肪細胞中基礎脂解之脂解酶。已有研究發現ATGL基因表現受到攝食影響，於斷食表現上升，再度進食則降低表現，於3T3-L1細胞經由胰島素處理，可抑制ATGL表現(Kim *et al.*, 2006；Jocken *et al.*, 2007)。

L2品系雞隻脂肪細胞處於胰島素持續添加狀態下，*AMPK $\alpha$ 1* mRNA相對(分化第六日)表現較B品系低，但在胰島素移除狀態下*Nampt*、*aFABP*、*ATGL* mRNA相對(分化第六日)表現較B品系高。由此試驗發現，L2品系於不同狀態下，相較於B品系有較好的代謝反應。

雞隻於產蛋時期能量使用是相當密集的，因此需要適時使用體內儲存之能量，脂肪組織為儲存能量之場所，對於能量儲存與使用，需要有良好的反應能力，兩品系脂肪細胞面對刺激反應不同，這可能是造成產蛋能力不同因素之一。而代謝相關基因如何影響其產蛋能力，可透過影響其代謝基因表現等相關研究，找出影響雞隻產蛋之因子及機制，以作進一步研究探討。



## 結論

台灣土雞因生長較慢，經育種選拔改善生長性能，卻影響雞隻產蛋能力，同時伴隨過多的脂肪組織。脂肪細胞具有儲存能量之功能，於能量需求時可提供在動物體使用，並可分泌脂肪激素，維持體內能量平衡。雞隻於產蛋期間能量需求密集，因此雞隻產蛋能力應與其脂肪組織功能有密切關係。試驗以中興大學育種而成之不同產蛋能力的台灣土雞(B與L2品系)為試驗動物，比較其腹脂前脂肪細胞分裂速度，以及脂肪細胞分化能力與代謝之表現，同時探討這些差異與細胞約日節律表現之關聯性。

前脂肪細胞分裂速度與約日節律相關基因之表現結果顯示，B品系雞隻前脂肪細胞，相較於L2品系有較快的分裂速度。此時期約日節律表現，在於B品系細胞經同期化作用，於12、36小時有較L2品系高之*Rev-erbβ*表現振幅，與較低的細胞週期蛋白激酶抑制子*p21<sup>WAF1/Cip1</sup>*之相對表現。

脂肪細胞分化時期脂質代謝與約日節律相關基因表現試驗中，脂肪細胞於誘導分化後，L2品系有較B品系佳的脂肪堆積能力與GPDH活性，並有較高之*Per2*、*Bmal1*、*Cry1*、*Rev-erbβ*、*RORβ*表現振幅，這顯示兩品系脂肪細胞內約日節律系統與其調控能量平衡是有差異的。

脂肪細胞代謝表現比較試驗中，胰島素持續添加或移除培養下，B品系脂肪細胞代謝相關基因相對表現無顯著差異，L2品系脂肪細胞代謝相關基因(*Adiponectin R1*、*Nampt*、*AMPKα1*、*aFABP*)之相對表現，於胰島素移除下顯著提高。在胰島素添加培養下，L2品系脂肪細胞*AMPKα* mRNA相對(分化第六日)表現顯著低於B品系，胰島素移除培養下，*Nampt*、*aFABP*、*ATGL* mRNA相對(分化第六日)表現顯著高於B品系。

綜合以上結果，以生長速度選拔下，B品系脂肪細胞分裂速度較快，分化後較差的代謝反應與約日節律表現，推測可能是使成體後有較高的脂肪團塊因素之一；以產蛋數選拔下L2品系脂肪細胞，有較慢的分裂速度，與分化後較佳的代謝反應與較高之約日節律表現振幅，可能是於產蛋期間，可有效釋出能量使用之部分因素。上述兩品系脂肪組織功能的不同(細胞分裂、分化、代謝)，可能是分別以不同條件選拔下，兩品系於後天生理上產生不同的差異。若能再進一步找出脂肪組織功能與雞隻產蛋能力確切因素，作為台灣土雞育種上的指標，能在維持生長速率下，而不影響繁殖性狀，即可增加台灣土雞之經濟價值。

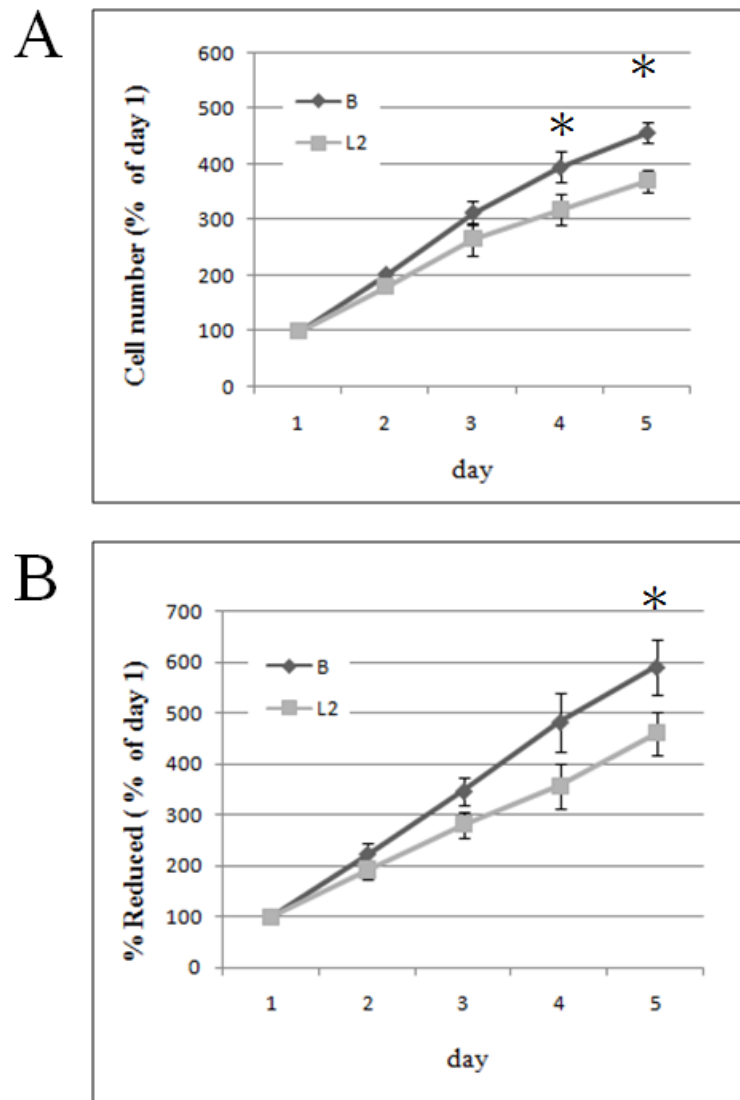


圖1 不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞之分裂。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞進行培養，培養後一到五天分析細胞分裂。圖 A：細胞計數分析；圖 B：alamer blue 分析。

Figure 1 Proliferation of adipose S-V cells from chickens with different laying performances. S-V cells were collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens, cell proliferation analysis was performed on day 1, 2, 3, 4 and 5 of culture. A: cell count assay; B: alamer blue analysis. Values are means  $\pm$  SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

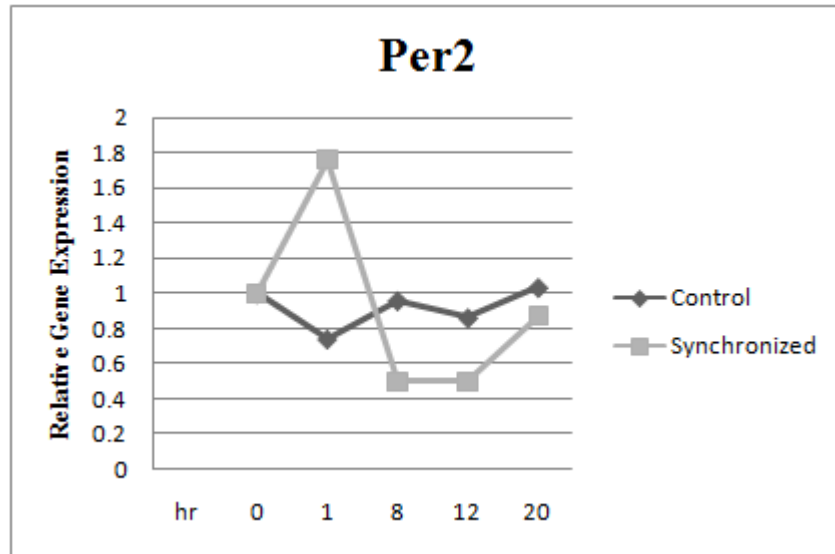


圖2 雞脂肪 S-V 細胞經血清刺激同期化後 *Per2* mRNA 表現。白肉雞取其腹部脂肪 S-V 細胞進行培養，以 50%胎牛血清刺激細胞同期化，於兩小時後更換成 DMEM-F12 培養。血清刺激後 0、1、8、12、20 小時，萃取 RNA 經由 Real-time PCR 分析，以 18S 為內源控制組。控制組：無處理；同期化：細胞經 50%胎牛血清處理兩小時。

Figure 2 *Per2* mRNA expression in chicken adipose S-V cells after synchronization by serum shock. S-V cells were collected from abdominal adipose tissues of broilers, cultured and then synchronized with 50% fetal bovine serum for 2 hours. The cells were cultured in DMEM-F12 and collected at the indicated time points (0, 1, 8, 12, and 20 hours after serum stimulation). The relative mRNA levels of *Per2* were examined by real-time PCR analysis, using 18s rRNA as an internal control. control: untreated; synchronized: cells exposed to 50% fetal bovine serum (FBS) for 2 hours.

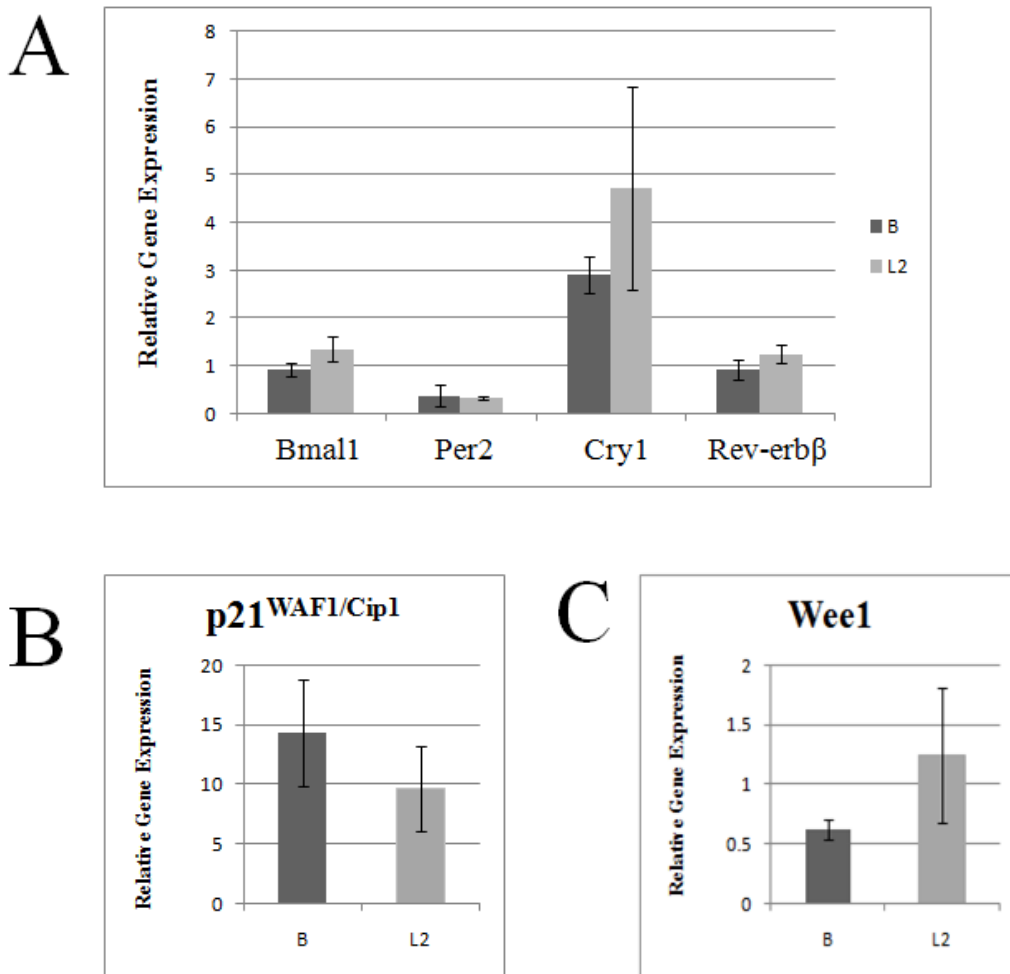


圖3 不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞約日節律相關基因表現。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻, 取其腹部脂肪 S-V 細胞進行培養, 培養至滿盤萃取 RNA, 經由 Real-time PCR 分析, 以 18S 為內源控制組。圖 A: 約日節律相關基因 mRNA 表現; 圖 B:  $p21^{WAF/Cip1}$  mRNA 表現; 圖 C: *Wee1* mRNA 表現。

Figure 3 Analysis of mRNA levels of circadian-related genes in adipose S-V cells isolated from chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured. The cells were collected and the relative mRNA levels of circadian-related genes were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control. A: circadian-related genes mRNA expression; B:  $p21^{WAF/Cip1}$  mRNA expression; C: *Wee1* mRNA expression. Values are means  $\pm$ SEM, n=6.

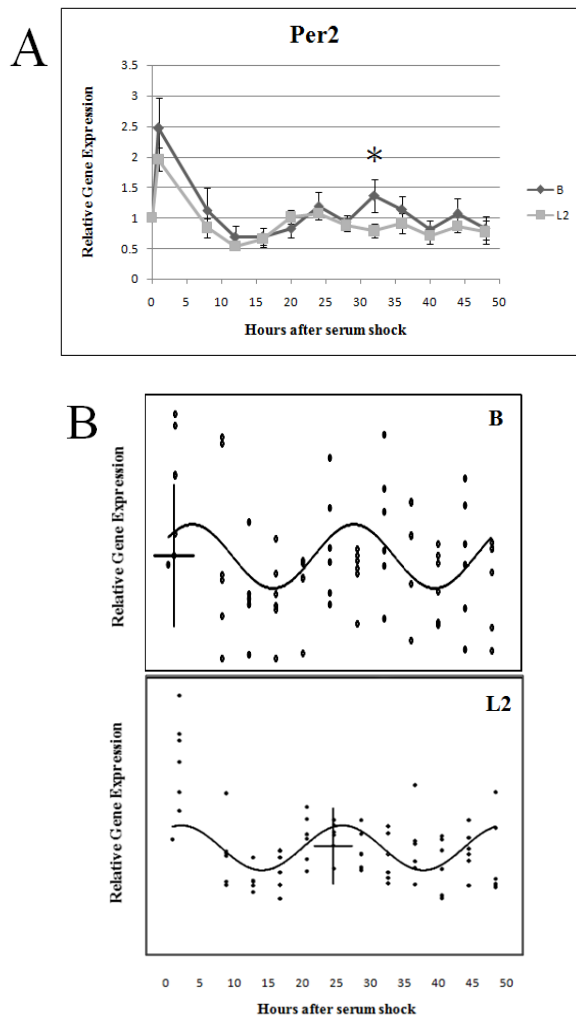


圖4 不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞 *Per2* mRNA 約日節律表現型態。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞進行培養，以 50% 胎牛血清刺激細胞同期化，於兩小時後更換成 DMEM-F12 培養。血清刺激後 0、1、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 小時，萃取 RNA 經由 Real-time PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A: *Per2* mRNA 表現型態；圖 B: CircWave v1.4 軟體分析 *Per2* 表現形態。

Figure 4 Circadian expression patterns of *Per2* in adipose S-V cells isolated from chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured, synchronized by serum-stimulation for 2 hours, and then replaced with DMEM-F12. After synchronization, RNA extracts were prepared at the indicated time points (0, 1, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 and 48 hours after serum stimulation). A: relative mRNA levels of *Per2* were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control; B: CircWave v1.4 analysis of *Per2* mRNA expression patterns. Values are means  $\pm$  SEM, n=6, \* :  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

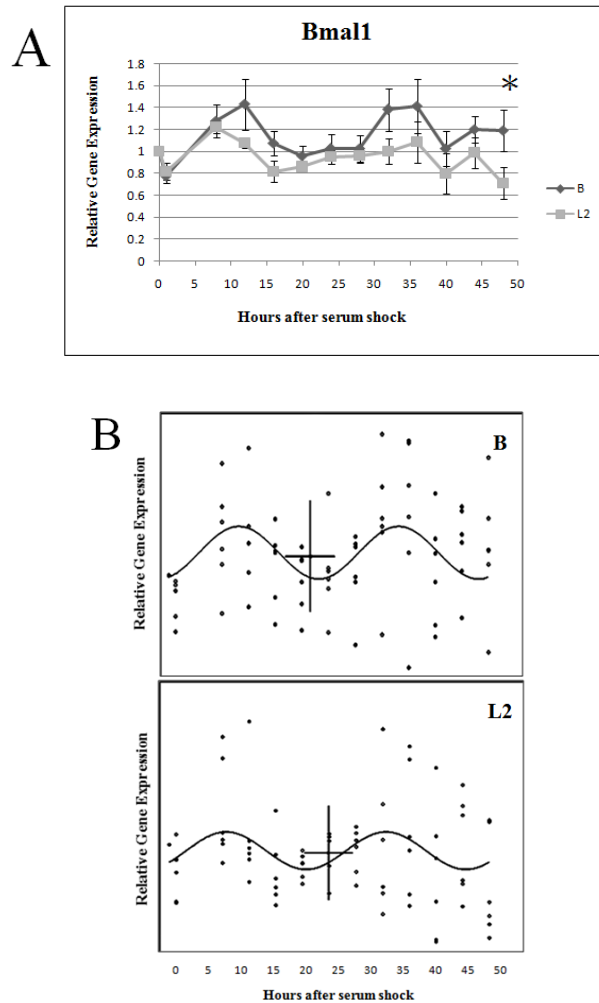


圖5 不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞 *Bmall* mRNA 約日節律表現型態。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞進行培養，以 50% 胎牛血清刺激細胞同期化，於兩小時後更換成 DMEM-F12 培養。血清刺激後 0、1、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 小時，萃取 RNA 經由 Real-time PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A：*Bmall* mRNA 表現型態；圖 B：CircWave v1.4 軟體分析 *Bmall* 表現形態。

Figure 5 Circadian expression patterns of *Bmall* in adipose S-V cells isolated from chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured, synchronized by serum-stimulation for 2 hours, and then replaced with DMEM-F12. After synchronization, RNA extracts were prepared at the indicated time points (0, 1, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 and 48 hours after serum stimulation). A: relative mRNA levels of *Bmall* were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control; B: CircWave v1.4 analysis of *Bmall* mRNA expression patterns. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

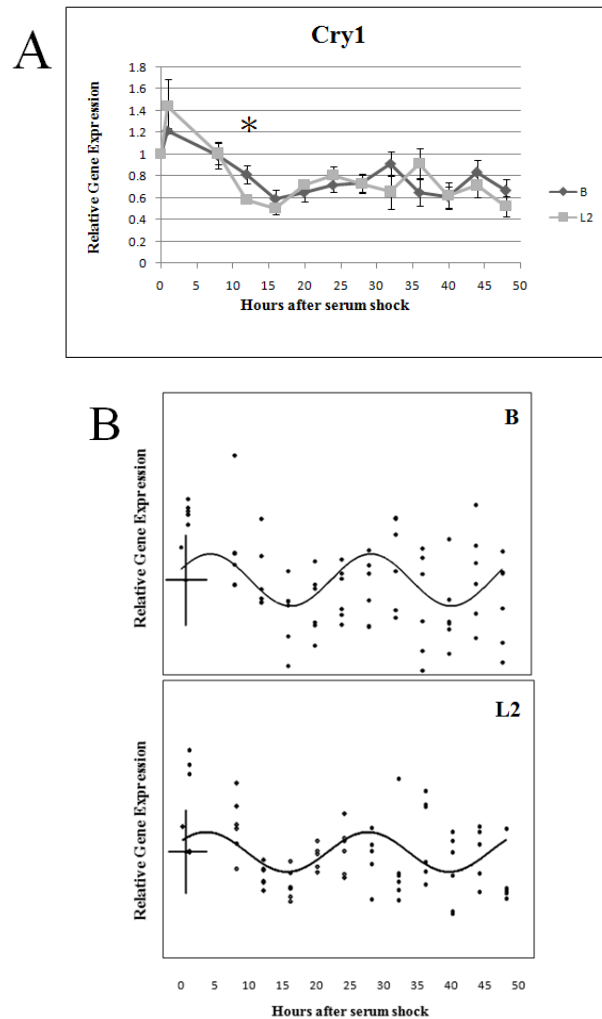


圖6 不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞 *Cry1* mRNA 約日節律表現型態。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞進行培養，以 50% 胎牛血清刺激細胞同期化，於兩小時後更換成 DMEM-F12 培養。血清刺激後 0、1、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 小時，萃取 RNA 經由 Real-time PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A: *Cry1* mRNA 表現型態；圖 B: CircWave v1.4 軟體分析 *Cry1* 表現形態。

Figure 6 Circadian expression patterns of *Cry1* in adipose S-V cells isolated from chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured, synchronized by serum-stimulation for 2 hours, and then replaced with DMEM-F12. After synchronization, RNA extracts were prepared at the indicated time points (0, 1, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 and 48 hours after serum stimulation). A: relative mRNA levels of *Cry1* were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control; B: CircWave v1.4 analysis of *Cry1* mRNA expression patterns. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

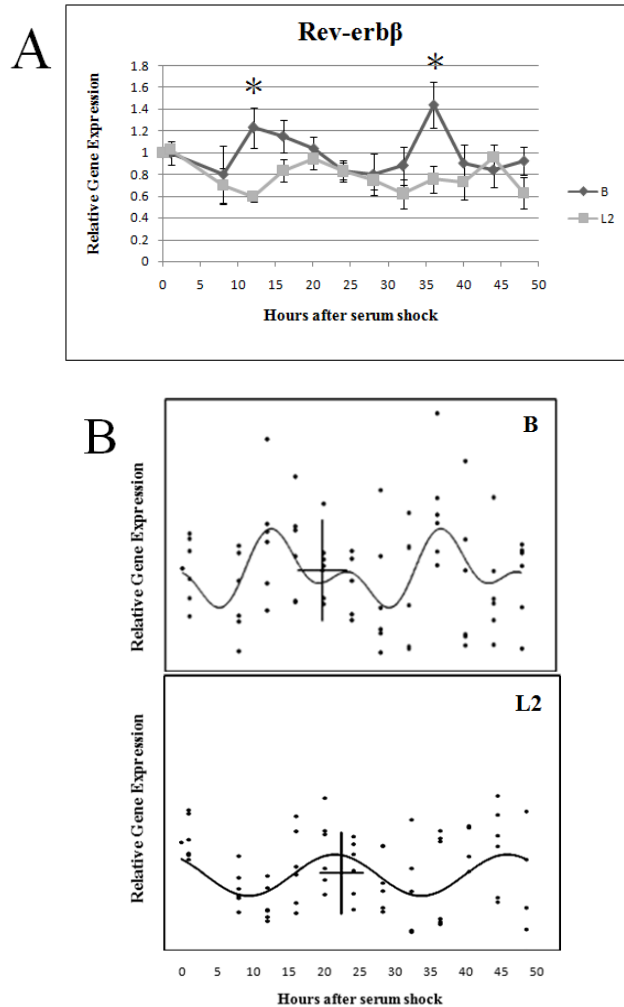


圖7 不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞 *Rev-erbβ* mRNA 約日節律表現型態。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞進行培養，以 50% 胎牛血清刺激細胞同期化，於兩小時後更換成 DMEM-F12 培養。血清刺激後 0、1、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 小時，萃取 RNA 經由 Real-time PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A：*Rev-erbβ* mRNA 表現型態；圖 B：CircWave v1.4 軟體分析 *Rev-erbβ* 表現形態。

Figure 7 Circadian expression patterns of *Rev-erbβ* in adipose S-V cells isolated from chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured, synchronized by serum-stimulation for 2 hours, and then replaced with DMEM-F12. After synchronization, RNA extracts were prepared at the indicated time points (0, 1, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 and 48 hours after serum stimulation). A: relative mRNA levels of *Rev-erbβ* were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control; B: CircWave v1.4 analysis of *Rev-erbβ* mRNA expression patterns. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between B and L2 lines.



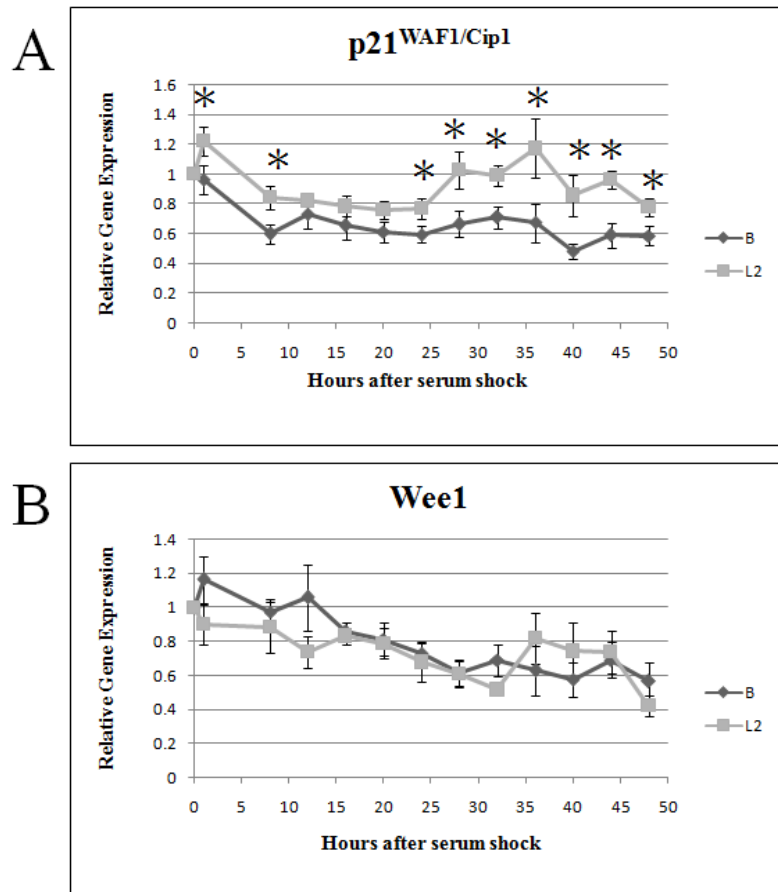


圖8 不同產蛋能力雞隻脂肪 S-V 細胞週期相關基因表現型態。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞進行培養，以 50%胎牛血清刺激細胞同期化，於兩小時後更換成 DMEM-F12 培養。血清刺激後 0、1、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 小時，萃取 RNA 經由 Real-time PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A： $p21^{WAF/Cip1}$  mRNA 表現型態；圖 B： $Wee1$  mRNA 表現型態。

Figure 8 Circadian expression patterns of cell cycle-related genes in adipose S-V cells isolated from chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured, synchronized by serum-stimulation for 2 hours, and then replaced with DMEM-F12. After synchronization, RNA extracts were prepared at the indicated time points (0, 1, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 and 48 hours after serum stimulation). Relative mRNA levels of  $p21^{WAF/Cip1}$  (A) and  $Wee1$  (B) were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

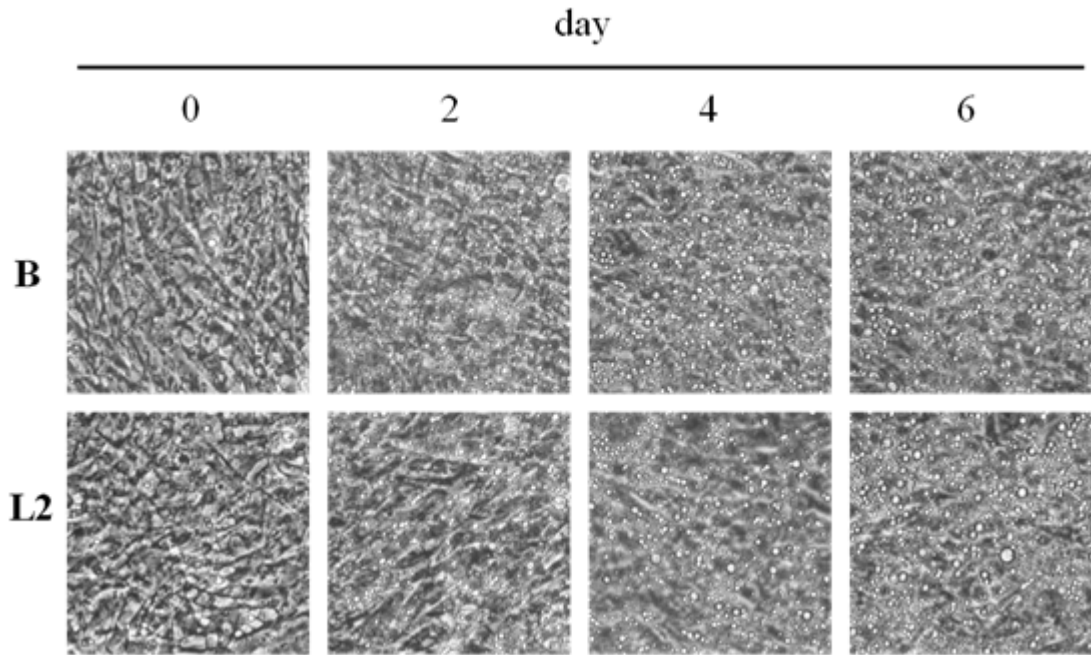


圖9 不同產蛋能力雞隻前脂肪細胞分化形態比較。15週齡B (B) 與L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞，進行分化培養，並觀察細胞型態。放大倍率：100 倍。

Figure 9 Differentiating of preadipocytes isolated from chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were induced to differentiate and visualized under a microscope. (Magnification:100X).

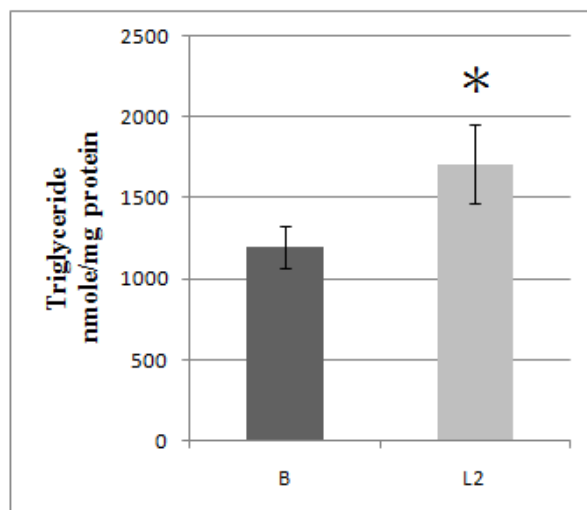


圖10 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞三酸甘油酯含量。15週齡B (B) 與L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞，培養於誘導分化第六日，進行三酸甘油酯含量分析。

Figure 10 Triglyceride content of adipocytes derived from S-V cells of chickens with different laying performances after differentiation induction. S-V cells were collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens. Triglyceride content was measured on day 6 after the induction of differentiation. Values are means  $\pm$ SEM,  $n=6$ , \*:  $P<0.05$  between B and L2 lines.

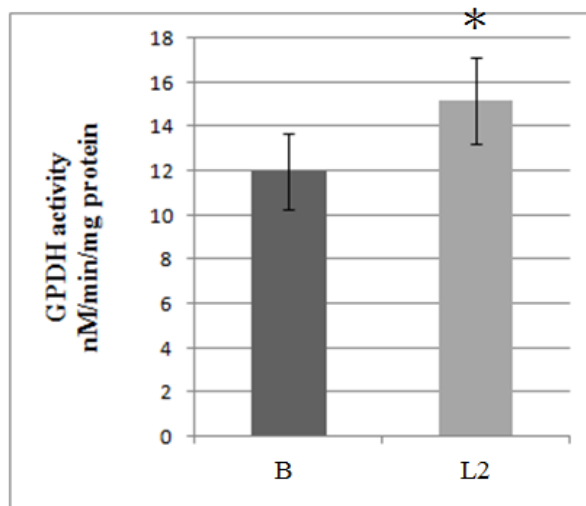


圖11 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 GPDH 活性分析。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞，培養於誘導分化第六日，進行 GPDH 活性分析。

Figure 11 GPDH activity of adipocytes derived from S-V cells of chickens with different laying performances after differentiation induction. S-V cells were collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens. GPDH activity analysis was performed on day 6 after the induction of differentiation. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

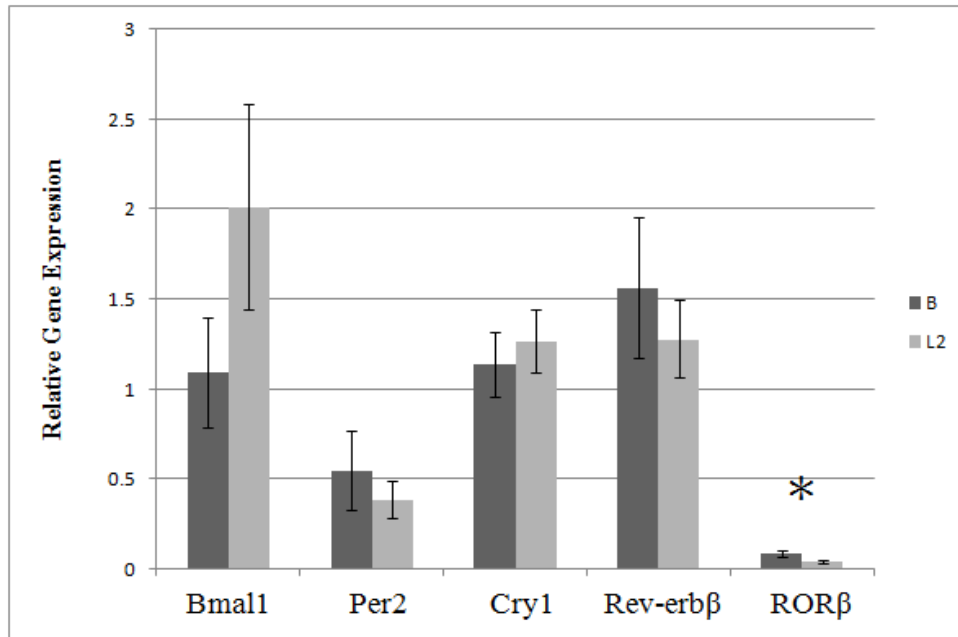


圖12 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞約日節律相關基因表現。15週齡B (B) 與L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪S-V細胞，培養於誘導分化第四日，萃取RNA經由Real-time PCR分析，以18S為內源控制組。

Figure 12 Analysis of mRNA levels of circadian-related genes in differentiated adipocytes derived from S-V cells of chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured and induced to differentiate. Four days after the induction of differentiation, RNA extracts were prepared and relative mRNA levels of circadian-related genes were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

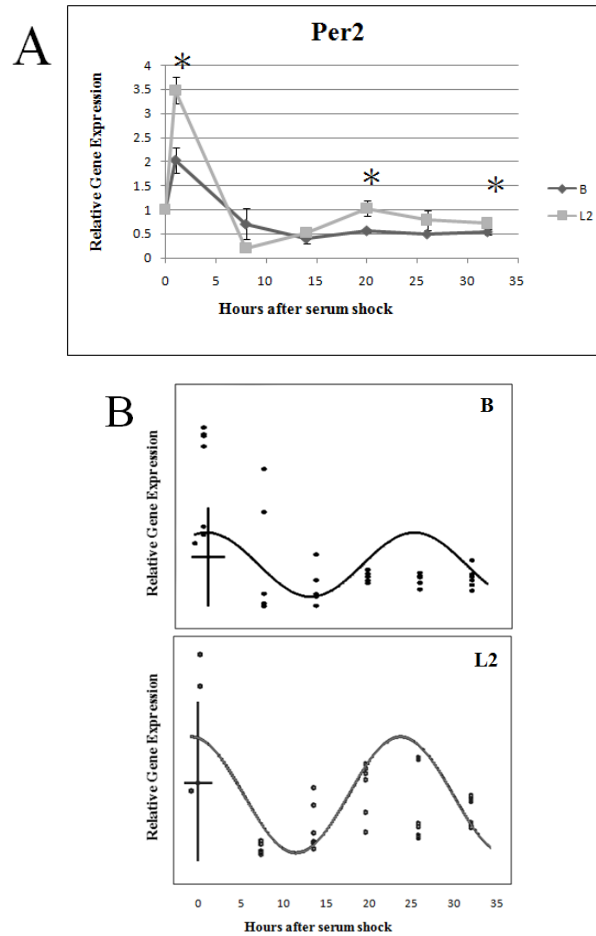


圖13 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 *Per2* mRNA 約日節律表現型態。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞，培養於誘導分化第四日，以 50%胎牛血清刺激細胞同期化，於兩小時後更換成 DMEM-F12 培養。血清刺激後 0、1、8、14、20、26、32 小時，萃取 RNA 經由 Real-time PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A：*Per2* mRNA 表現型態；圖 B：CircWave v1.4 軟體分析 *Per2* 表現型態。

Figure 13 Circadian expression patterns of *Per2* in differentiated adipocytes derived from S-V cells of chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured and induced to differentiation. Four days after the induction of differentiation, cells were synchronized by serum-stimulation for 2 hours, and then replaced with DMEM-F12. After synchronization, RNA extracts were prepared at the indicated time points (0, 1, 8, 14, 20, 26, and 32 hours after serum stimulation). A: relative mRNA levels of *Per2* were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control; B: CircWave v1.4 analysis of *Per2* mRNA expression patterns. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

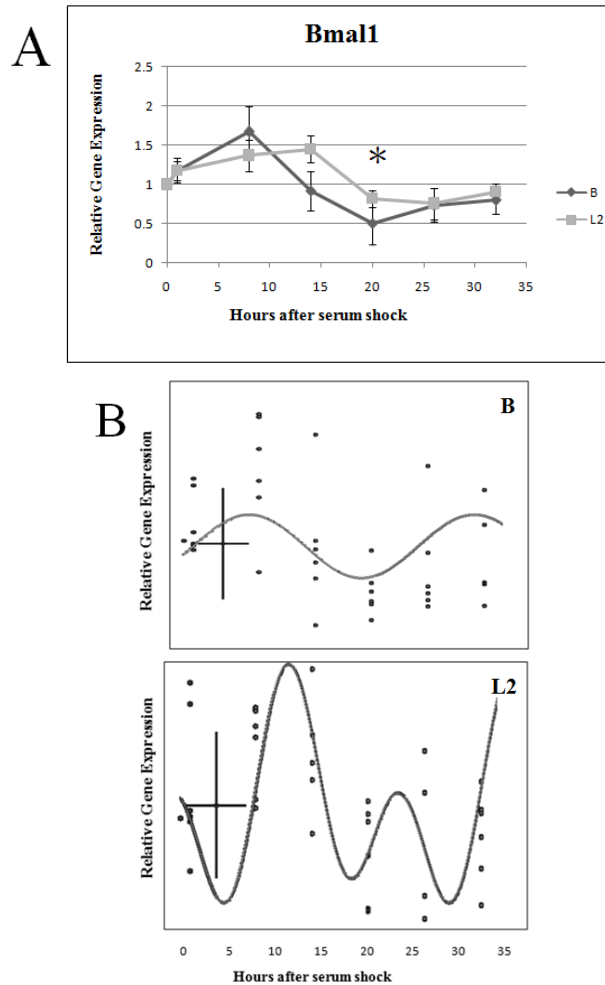


圖14 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 *Bmal1* mRNA 約日節律表現型態。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞，培養於誘導分化第四日，以 50%胎牛血清刺激細胞同期化，於兩小時後更換成 DMEM-F12 培養。血清刺激後 0、1、8、14、20、26、32 小時，萃取 RNA 經由 Real-time PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A：*Bmal1* mRNA 表現型態；圖 B：CircWave v1.4 軟體分析 *Bmal1* 表現型態。

Figure 14 Circadian expression patterns of *Bmal1* in differentiated adipocytes derived from S-V cells of chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured and induced to differentiation. Four days after the induction of differentiation, cells were synchronized by serum-stimulation for 2 hours, and then replaced with DMEM-F12. After synchronization, RNA extracts were prepared at the indicated time points (0, 1, 8, 14, 20, 26, and 32 hours after serum stimulation). A: relative mRNA levels of *Bmal1* were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control; B: CircWave v1.4 analysis of *Bmal1* mRNA expression patterns. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \* :  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

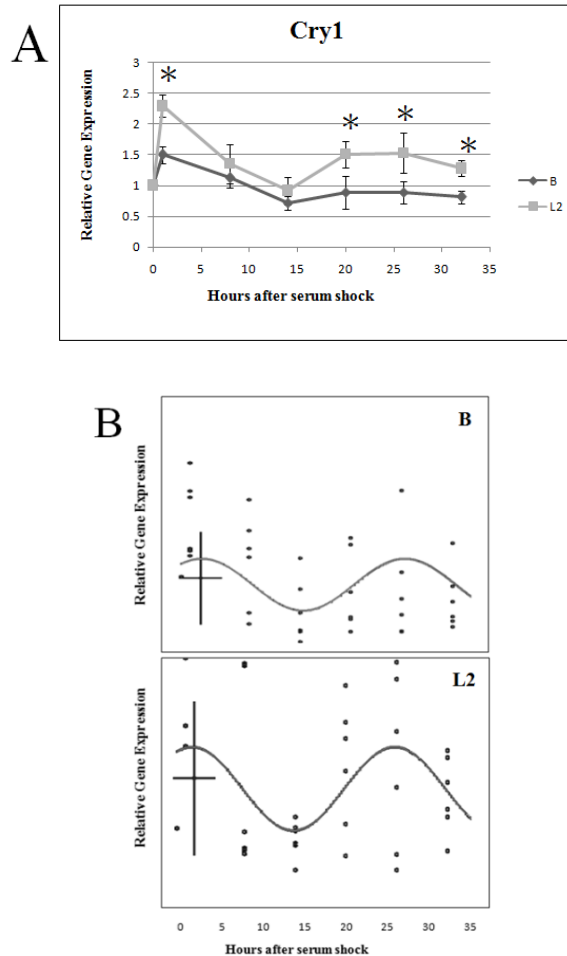


圖15 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 *Cry1* mRNA 約日節律表現型態。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞，培養於誘導分化第四日，以 50%胎牛血清刺激細胞同期化，於兩小時後更換成 DMEM-F12 培養。血清刺激後 0、1、8、14、20、26、32 小時，萃取 RNA 經由 Real-time PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A：*Cry1* mRNA 表現型態；圖 B：CircWave v1.4 軟體分析 *Cry1* 表現型態。

Figure 15 Circadian expression patterns of *Cry1* in differentiated adipocytes derived from S-V cells of chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured and induced to differentiation. Four days after the induction of differentiation, cells were synchronized by serum-stimulation for 2 hours, and then replaced with DMEM-F12. After synchronization, RNA extracts were prepared at the indicated time points (0, 1, 8, 14, 20, 26, and 32 hours after serum stimulation). A: relative mRNA levels of *Cry1* were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control; B: CircWave v1.4 analysis of *Cry1* mRNA expression patterns. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \* :  $P < 0.05$  between B and L2 lines.



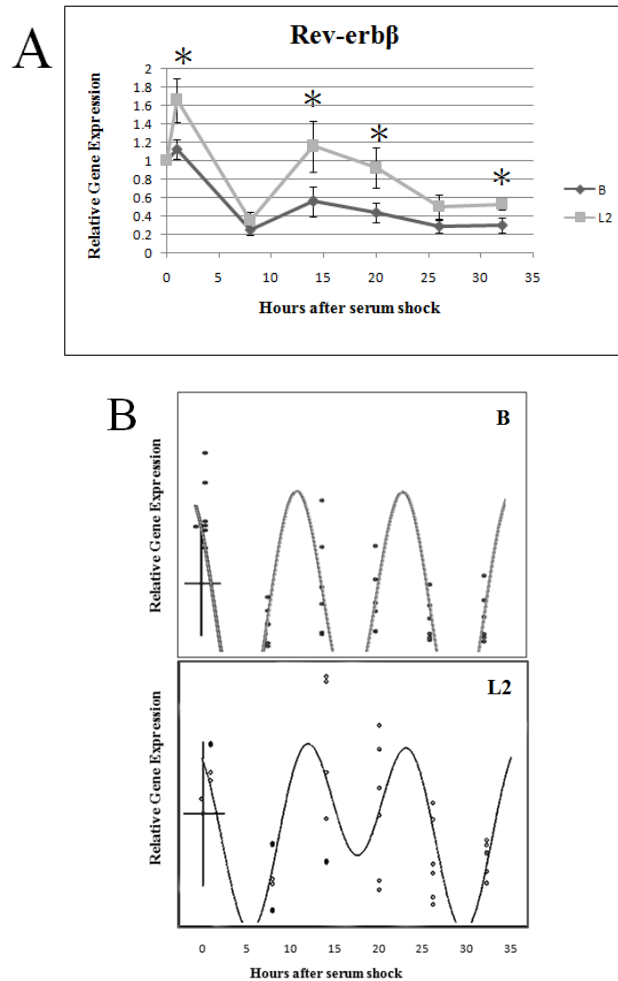


圖16 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 *Rev-erbβ* mRNA 約日節律表現型態。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻, 取其腹部脂肪 S-V 細胞, 培養於誘導分化第四日, 以 50% 胎牛血清刺激細胞同期化, 於兩小時後更換成 DMEM-F12 培養。血清刺激後 0、1、8、14、20、26、32 小時, 萃取 RNA 經由 Real-time PCR 分析, 以 18S 為內源控制組。圖 A: *Rev-erbβ* mRNA 表現型態; 圖 B: CircWave v1.4 軟體分析 *Rev-erbβ* 表現型態。

Figure 16 Circadian expression patterns of *Rev-erbβ* in differentiated adipocytes derived from S-V cells of chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured and induced to differentiation. Four days after the induction of differentiation, cells were synchronized by serum-stimulation for 2 hours, and then replaced with DMEM-F12. After synchronization, RNA extracts were prepared at the indicated time points (0, 1, 8, 14, 20, 26, and 32 hours after serum stimulation). A: relative mRNA levels of *Rev-erbβ* were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control; B: CircWave v1.4 analysis of *Rev-erbβ* mRNA expression patterns. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

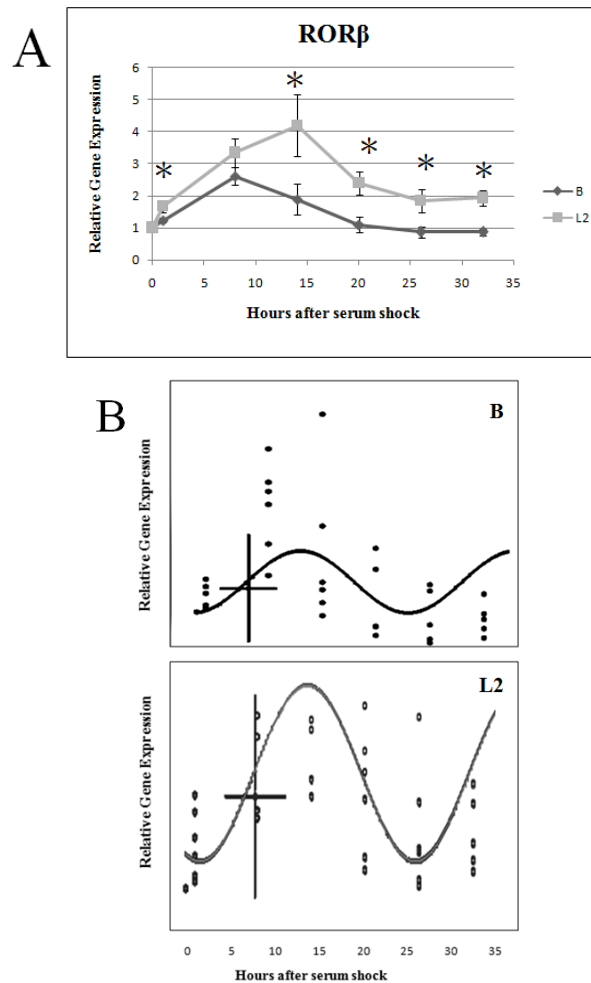


圖17 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞 *RORβ* mRNA 約日節律表現型態。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其腹部脂肪 S-V 細胞，培養於誘導分化第四日，以 50%胎牛血清刺激細胞同期化，於兩小時後更換成 DMEM-F12 培養。血清刺激後 0、1、8、14、20、26、32 小時，萃取 RNA 經由 Real-time PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A：*RORβ* mRNA 表現型態；圖 B：CircWave v1.4 軟體分析 *RORβ* 表現型態。

Figure 17 Circadian expression patterns of *RORβ* in differentiated adipocytes derived from S-V cells of chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were cultured and induced to differentiation. Four days after the induction of differentiation, cells were synchronized by serum-stimulation for 2 hours, and then replaced with DMEM-F12. After synchronization, RNA extracts were prepared at the indicated time points (0, 1, 8, 14, 20, 26, and 32 hours after serum stimulation). A: relative mRNA levels of *RORβ* were examined by real-time PCR using 18s rRNA as an internal control; B: CircWave v1.4 analysis of *RORβ* mRNA expression patterns. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \* :  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

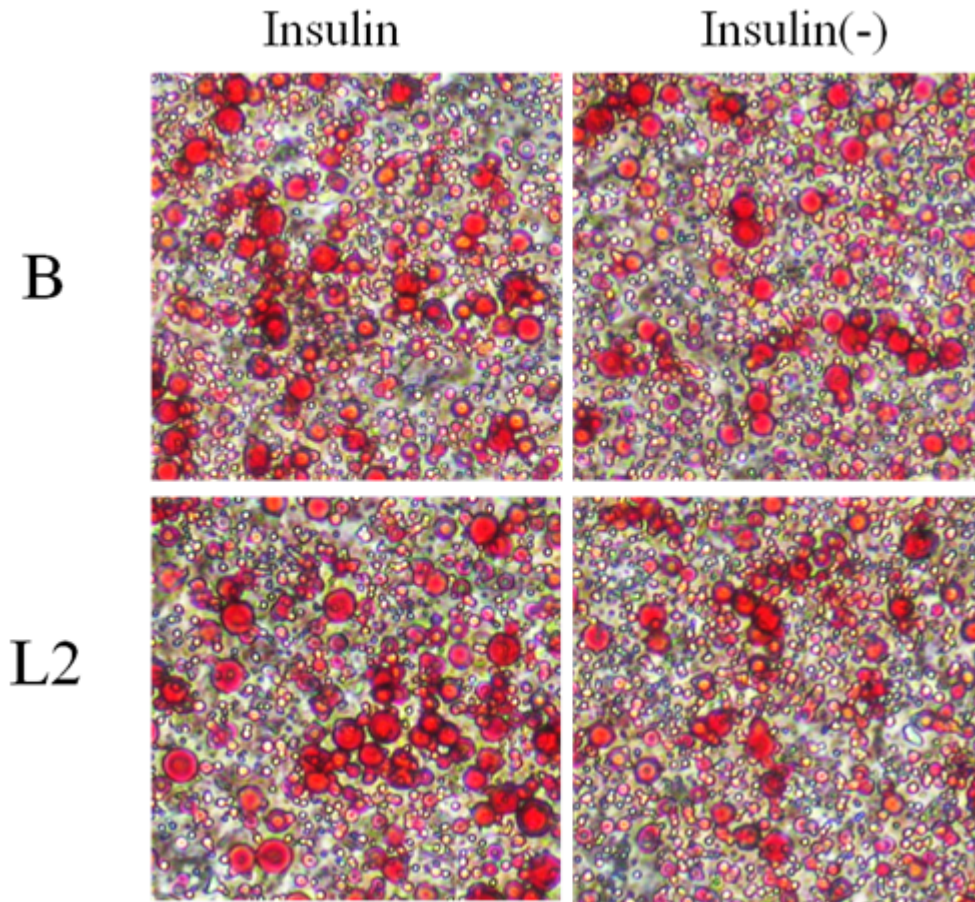


圖18 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞胰島素對細胞形態之影響。15週齡B(B)與L2(L2)品系雞隻，取其腹部脂肪S-V細胞，培養於誘導分化第六日，分別以胰島素添加與否進行至第八日，細胞經oil-red O染色，觀察油滴大小與細胞型態。Insulin：添加胰島素，Insulin(-)：無添加胰島素。

Figure 18 Effect of insulin on differentiation of adipocytes derived from adipose S-V cells of chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were treated either with (Insulin) or without (Insulin-) insulin incubated for 48 hrs on day 6 after the induction of differentiation. Oil-Red O staining was performed on day 8 after the induction of differentiation.

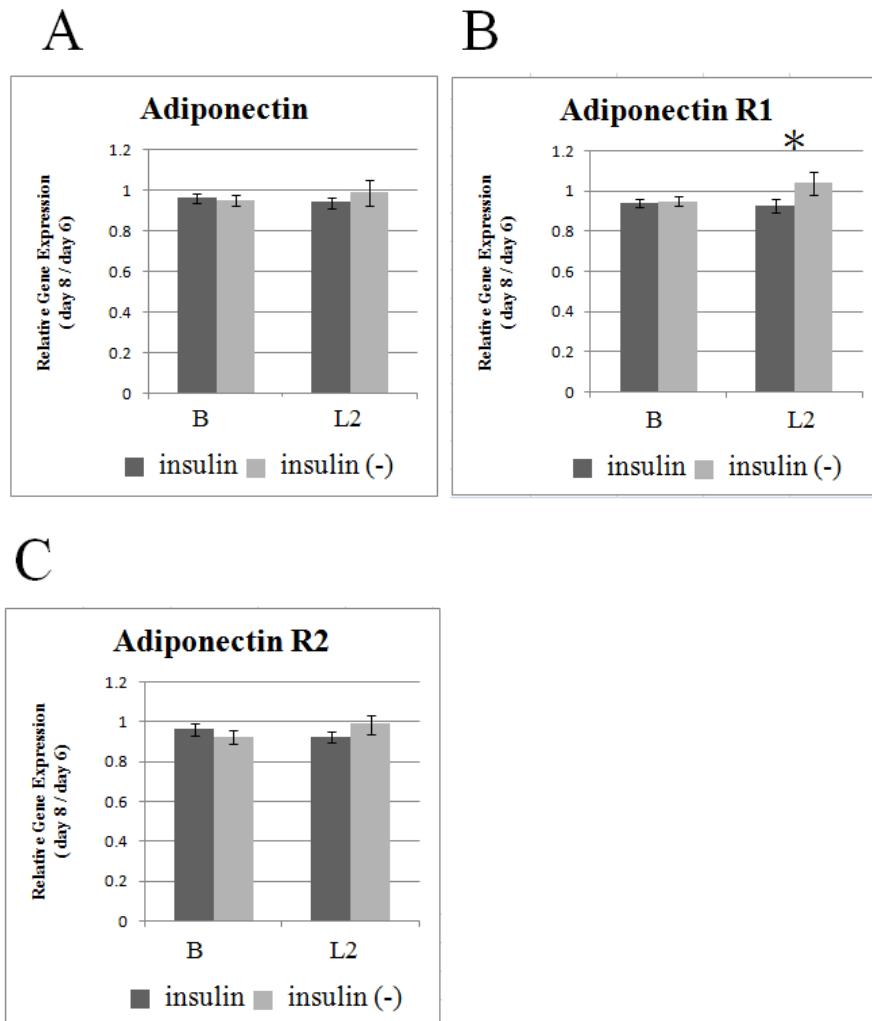


圖 19 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞分泌激素 *Adiponectin* 與其受體基因表現。15 週齡 B (B) 與 L2 (L2) 品系雞隻，取其脂肪 S-V 細胞，培養於誘導分化第六日，分別以胰島素添加與否進行培養兩日，萃取 RNA 經由 RT-PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A：*Adiponectin* mRNA 表現；圖 B：*Adiponectin receptor 1* mRNA 表現；圖 C：*Adiponectin receptor 2* mRNA 表現。insulin：添加胰島素；insulin(-)：無添加胰島素。

Figure 19 The mRNA levels of *Adiponectin* and *Adiponectin receptor* of differentiated adipocytes derived from S-V cells of chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were treated either with (insulin) or without (insulin-) insulin incubated for 48 hrs on day 6 after the induction of differentiation. The cells were collected on day 8 after the induction of differentiation, and the relative mRNA levels of *Adiponectin* (A), *Adiponectin receptor 1* (B) and *Adiponectin receptor 2* (C) were examined by RT-PCR with 18s rRNA as an internal control. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between insulin and insulin(-).

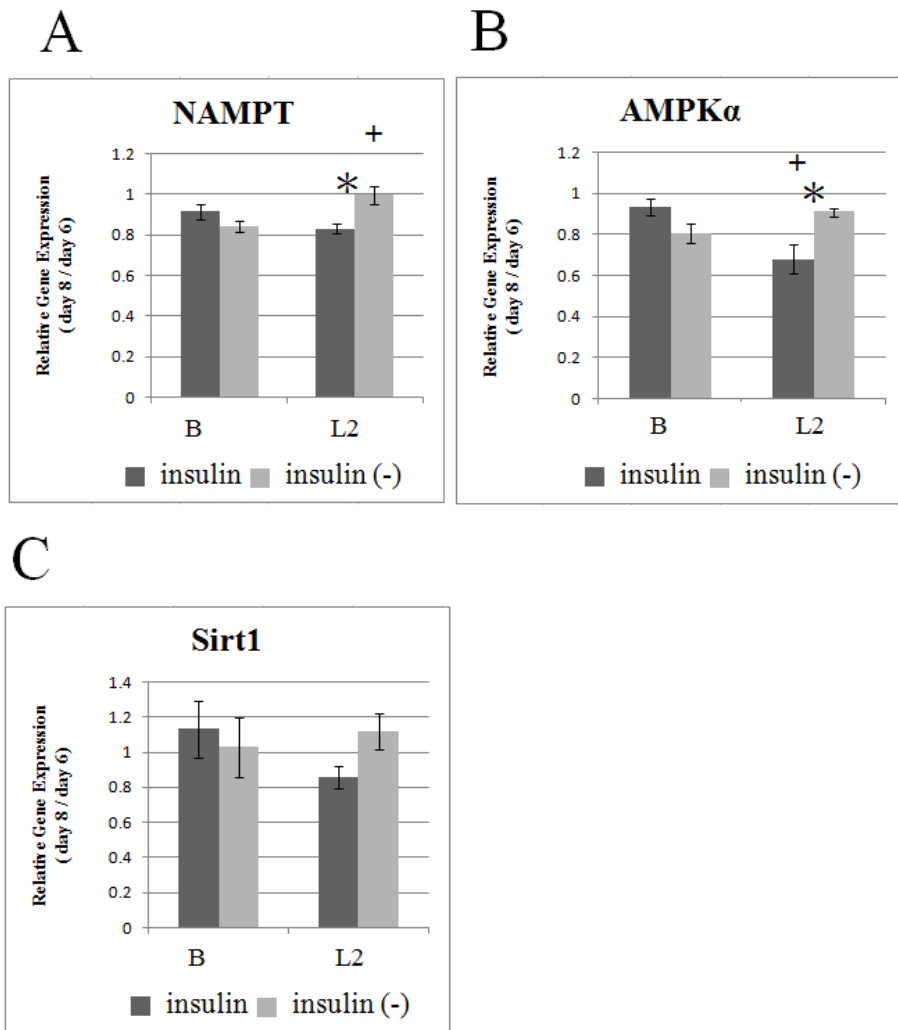


圖20 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞能量代謝相關基因表現。15週齡B(B) 與L2(L2) 品系雞隻，取其脂肪 S-V 細胞，培養於誘導分化第六日，分別以胰島素添加與否進行培養兩日，萃取 RNA 經由 RT-PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A：*Nampt* mRNA 表現；圖 B：*AMPK $\alpha$ 1* mRNA 表現；圖 C：*Sirt1* mRNA 表現。insulin：添加胰島素；insulin(-)：無添加胰島素。

Figure 20 The mRNA levels of energy metabolism-related genes of differentiated adipocytes derived from S-V cells of chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were treated either with (insulin) or without (insulin-) insulin incubated for 48 hrs on day 6 after the induction of differentiation. The cells were collected on day 8 after the induction of differentiation, and the relative mRNA levels of *Nampt* (A), *AMPK $\alpha$ 1* (B) and *Sirt1* (C) were examined by RT-PCR with 18s rRNA as an internal control. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between insulin and insulin(-), +:  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

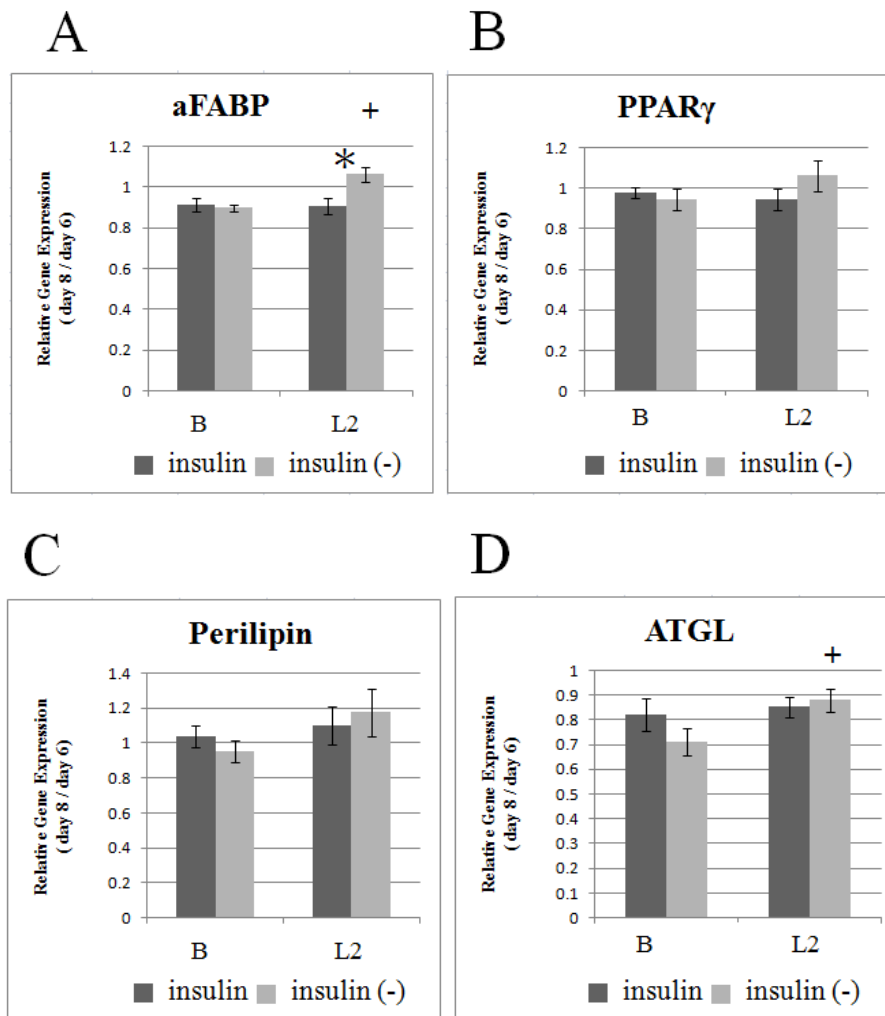


圖21 不同產蛋能力雞隻脂肪細胞脂質代謝相關基因表現。15週齡B(B) 與L2(L2) 品系雞隻，取其脂肪 S-V 細胞，培養於誘導分化第六日，分別以胰島素添加與否進行培養兩日，萃取 RNA 經由 RT-PCR 分析，以 18S 為內源控制組。圖 A：*aFABP* mRNA 表現；圖 B：*PPAR $\gamma$*  mRNA 表現；圖 C：*Perilipin* mRNA 表現；圖 D：*ATGL* mRNA 表現。insulin：添加胰島素；insulin(-)：無添加胰島素。

Figure 21 The mRNA levels of lipid metabolism-related genes of differentiated adipocytes derived from S-V cells of chickens with different laying performances. S-V cells collected from abdominal adipose tissues of 15-week-old B and L2 line chickens were treated either with (insulin) or without (insulin-) insulin incubated for 48 hrs on day 6 after the induction of differentiation. The cells were collected on day 8 after the induction of differentiation, and the relative mRNA levels of *aFABP* (A), *PPAR $\gamma$*  (B), *Perilipin* (C) and *ATGL* (D) were examined by RT-PCR with 18s rRNA as an internal control. Values are means  $\pm$ SEM, n=6, \*:  $P < 0.05$  between insulin and insulin(-), +:  $P < 0.05$  between B and L2 lines.

## 參考文獻

- 王昭華。2006。台灣土雞產蛋能力與脂肪細胞功能之探討。東海大學畜產研究所碩士論文，台中。
- 行政院農業委員會。2010。99年台灣農業統計年報。行政院農業委員會。台灣。
- 李淵百、黃暉煌。1989。台灣土雞育種。第一屆優質雞研討會文集，pp. 58-79。優質肉雞發展促進會。香港。
- 李淵百。2005。台灣土雞的育種改良與產業趨勢。農業生技產業季刊 2：5-11。
- 李學孚、林亮全。1993。台灣土雞與白色肉雞外觀與肉質差異性研究。食品科學 20：1-16。
- 林旻蓉、張伸彰、趙清賢、謝豪晃、陳添福、王治華、賈玉祥、鄭裕信、陳志峰、李淵百。2008。臺灣土雞群不同雜交組合之種蛋受精率、孵化率及胚胎死亡率的比較。中畜會誌 37：221-231。
- 陳奕廷。2004。雞脂質利用與產蛋率的探討。東海大學畜產研究所碩士論文，台中。
- 黃嵩程。2008。比較不同產蛋能力台灣土雞其脂肪細胞分化之表現。東海大學畜產研究所碩士論文，台中。
- 趙清賢、黃雅梅、陳志峰、何玉珍、蘇夢蘭、李淵百。2005b。台灣商用種母土雞的生長性能。中畜會誌 34：151-161。
- Abe, H., B. Rusak, and H. A. Robertson. 1991. Photic induction of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus is inhibited by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Neurosci. Lett.* 127:9-12.
- Ahima, R. S. and J. Flier. 2000. Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 62:413-437.
- Albright, A. L. and J. S. Stern. 1998. Adipose tissue. In: *Encyclopedia of Sports Medicine and Science*. Online Available: <http://www.sportsci.org/encyc/adipose/adipose.html>. Accessed Dec. 29, 2005.
- Ando, H., H. Yanagihara, Y. Hayashi, Y. Obi, S. Tsuruoka, T. Takamura, S. Kaneko, and A. Fujimura. 2005. Rhythmic messenger ribonucleic acid expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology* 146:5631-5636.
- Ardawi, M. S. and A. A. Rouzi. 2005. Plasma adiponectin and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 83:1708-1716.
- Arner, P. 2005. Human fat cell lipolysis: biochemistry regulation and clinical role. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19:471-482.
- Asher, G., D. Gatfield, M. Stratmann, H. Reinke, C. Dibner, F. Kreppel, R. Mostoslavsky, F. W. Alt, and U. Schibler. 2008. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 134:317-328.
- Bahceci, M., D. Gokalp, S. Bahceci, A. Tuzcu, S. Atmaca, and S. Arikan. 2007. The

- correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? *J. Endocrinol. Invest.* 30:210-214.
- Balsalobre, A., F. Damiola, and U. Schibler. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93:929-937.
- Barazzoni, R., M. Zanetti, M. Sturnega, M. Stebel, A. Semolic, A. Pirulli, P. Vinci, L. Zentilin, M. Giacca, L. Cattin, and G. Guarnieri. 2011. Insulin downregulates SIRT1 and AMPK activation and is associated with changes in liver fat, but not in inflammation and mitochondrial oxidative capacity, in streptozotocin-diabetic rat. *Clin Nutr.* 30:384-390.
- Belden, W. J. and J. C. Dunlap. 2008. SIRT1 is a circadian deacetylase for core clock components. *Cell* 134:212-214.
- Benson, J. D., A. Bensadoun, and D. Cohen . 1975. Lipoprotein lipase of ovarian follicles in the domestic chicken (*gallus domesticus*). *Exp. Biol. Med.* 148:347-350.
- Benson, J. D., V. Hearn, T. Boyd, and A. Bensadoun. 1979. Triglyceride hydrolase of chicken and rat pre- and postheparin plasma. Effects of fasting and comparison with adipose tissue lipoprotein lipase. *Int. J. Biochem.* 6:727-734.
- Berg, A. H., T. P. Combs, and P. E. Scherer. 2002. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends. Endocrinol. Metab.* 13:84-89.
- Berndt, J., S. Kralisch, N. Kloting, K. Ruschke, M. Kern, M. Fasshauer, M. R. Schon, M. Stumvoll, and M. Bluher. 2008. Adipose triglyceride lipase gene expression in human visceral obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 116:203-210.
- Bernlohr, D. A., C. W. Angus, M. D. Lane, M. A. Bolanowski, and T. J. Kelly, Jr. 1984. Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: identification of an mRNA encoding a homologue of myelin p2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81:5468-5472.
- Bigot, K., M. Taouis, and S. Tesseraud. 2003a. Refeeding and insulin regulate S6K1 activity in chicken skeletal muscles. *Journal of Nutrition.* 133:369-373.
- Bjarnason, G. A. and R. Jordan. 2000. Circadian variation of cell proliferation and cell cycle protein expression in man: clinical implications. *Prog. Cell Cycle Res.* 4:193-206.
- Bjarnason, G. A., R. C. K. Jordan, and R. B. Sothorn. 1999. Circadian variation in the expression of cell-cycle proteins in human oral epithelium. *Am. J. Pathol.* 154:613-622
- Bjorntorp, P., M. Karlsson, and P. Pettersson. 1982. Expansion of adipose tissue storage capacity at different ages in rats. *Metabolism* 31:366-373.



- Boord, J. B., S. Fazio, and M. F. Linton. 2002. Cytoplasmic fatty acid binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 13:141-147.
- Brady, L., D. R. Romsos, and G. A. Leveille. 1976. In vivo estimation of fatty acid synthesis in the chicken (*Gallus domesticus*) utilizing  $^3\text{H}_2\text{O}$ . *Comp. Biochem. Physiol.* B54:403-407.
- Bray, M. S. and M. E. Young. 2007. Circadian rhythms in the development of obesity: potential role for the circadian clock within the adipocyte. *Obes. Rev.* 8:169-181.
- Bruggeman, V., E. D'hondt, L. Berghman, O. Onagbesan, D. Vanmontfort, F. Vandesaende, and E. Decuypere. 1998a. The effect of food intake from 2 to 24 weeks of age on LHRH-1 content in the median eminence and gonadotropin levels in pituitary and plasma in female broiler breeder chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112:200-209.
- Bruggeman, V., O. Onagbesan, D. Vanmontfort, L. Berghman, G. Verhoeven, and E. Decuypere. 1998b. Effect of longterm food restriction on pituitary sensitivity to cLHRH-I in broiler breeder females. *J. Reprod. Fertil.* 114:267-276.
- Brun, R. P., P. Tontonoz, B. M. Forman, R. Eillis, J. Chen, R. M. Evans, and B. M. Spiegelman. 1996. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev.* 10:974-984.
- Bucher, N. and C. D. Britten. 2008. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br. J. Cancer.* 98:523-528.
- Buchi, K. N., J. G. Moore, W. J. Hrushesky, R. B. Sothorn, and N. H. Rubin. 1991. Circadian rhythm of cellular proliferation in the human rectal mucosa. *Gastroenterology* 101:410-415.
- Calvani, M., A. Scarfone, L. Granato, E. V. Mora, G. Nanni, M. Castagneto, A. V. Greco, M. Manco, and G. Mingrone. 2004. Restoration of adiponectin pulsatility in severely obese subjects after weight loss. *Diabetes* 53:939-947.
- Cam, H. and B. D. Dynlacht. 2003. Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* 3:311-316.
- Canaple, L., T. Kakizawa, and V. Laudet. 2003. The days and nights of cancer cells. *Cancer Res.* 63:7545-7552.
- Canto, C., L. Q. Jiang, A. S. Deshmukh, C. Matakaki, A. Coste, M. Lagouge, J. R. Zierath, and J. Auwerx. 2010. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab.* 11:213-219.
- Cartwright, A. L., H. L. Marks, and D. R. Champion. 1986. Adipose tissue cellularity and growth characteristics of unselected and selected broilers: implications for

- the development of body fat. *Poult. Sci.* 65:1021-1027.
- Chabrolle, C., L. Tosca, and J. Dupont. 2007. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction* 133:719-731.
- Chabrolle, C., L. Tosca, S. Crochet, S. Tesseraud, and J. Dupont. 2007. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: potential role in ovarian steroidogenesis. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33:480-487.
- Chakrabarti, P., T. English, S. Karki, L. Qiang, R. Tao, J. Kim, Z. Luo, S. R. Farmer, and K. V. Kandror. 2011. SIRT1 controls lipolysis in adipocytes via FOXO1-mediated expression of ATGL. *J. Lipid Res.* 52:1693-1701.
- Chapman, M. J., S. Goldstein, and M. H. Laudat. 1977. Characterization and comparative aspects of the serum very low and low density lipoproteins and their apoproteins in the chicken (*Gallus domesticus*). *Biochemistry* 16:3006-3015.
- Chen, S. E., J. P. McMurtry, and R. L. Walzem. 2006. Overfeeding-induced ovarian dysfunction in broiler breeder hens is associated with lipotoxicity. *Poult Sci.* 85:70-81.
- Cheung, P. C., I. P. Salt, S. P. Davies, D. G. Hardie, and D. Carling. 2000. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem. J.* 346:659-669.
- Chou, T. C., T. E. Scammell, J. J. Gooley, S. E. Gaus, C. B. Saper, and J. Lu. 2003. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J. Neurosci.* 23:10691-10702.
- Chrousos, G. P. 1998. Ultradian, circadian, and stress-related hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity—a dynamic digital-to-analog modulation. *Endocrinology* 139:437-440.
- Clarke, S. L., C. E. Robinson, and J. M. Gimble. 1997. CAAT/enhancer binding protein directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240:99-103.
- Clifford, G. M., C. Londos, F. B. Kraemer, R. G. Vernon, and S. J. Yeaman. 2000. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 275:5011-5015.
- Coe, N. R., M. A. Simpson, and D. A. Bernlohr. 1999. Targeted disruption of the adipocyte lipid binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid level. *J. Lipid Res.* 40:967-972.
- Cornelius, P., O. A. MacDougald, M. D. Lane. 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.* 14:99-129.

- Cryer, A. 1981. Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. *Int. J. Biochem.* 13:525-541.
- Cui, X. B., C. Wang, L. Li, D. Fan, Y. Zhou, D. Wu, Q. H. Cui, F. Y. Fu, and L. L. Wu. 2012. Insulin decreases myocardial adiponectin receptor 1 expression via PI3K/Akt and FoxO1 pathway. *Cardiovasc Res.* 93:69-78.
- Damiola, F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela, U. Schibler. 2000. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14:2950-2961.
- Darlington, G. J., S. E. Rose, and O. A. MacDougald. 1998. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 273:30057-30060.
- Daval, M., F. Diot-Dupuy, R. Bazin, I. Hainault, B. Viollet, S. Vaulont, E. Hajdouch, P. Ferre, and F. Foufelle. 2005. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280:25250-25257.
- Davidson, A. J., O. Castañón-Cervantes, and F. K. Stephan. 2004. Daily oscillations in liver function: diurnal vs circadian rhythmicity. *Liver Int.* 24:179-186
- Doi, M., J. Hirayama, and P. Sassone-Corsi. 2006. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* 125:497-508.
- Donnelly, L. E., A. Cryer, and S. C. Butterwith. 1993. Comparison of the rates of proliferation of adipocyte precursor cells derived from two lines of chicken which differ in their rates of adipose tissue development. *Br. Poult. Sci.* 34: 187-193.
- Duez, H. and B. Staels. 2008. Rev-erb alpha gives a time cue to metabolism. *FEBS Lett* 582:19-25.
- Dunaif, A. 1997. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr. Rev.* 18:774-800.
- Dupont, J., S. Tesseraud, and J. Simon. 2009. Insulin signaling in chicken liver and muscle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 163:52-57.
- Eckel-Mahan, K. and P. Sassone-Corsi. 2009. Metabolism control by the circadian clock and vice versa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16:462-467.
- Edmunds, L. N. Jr. and R. R. Funch. 1969. Circadian rhythm of cell division in *Euglena*: effects of a random illumination regimen. *Science* 165:500-503.
- Egan, J. J., A. S. Greenberg, M. K. Chang, and C. Londos. 1990. Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta adrenergic stimulation. *J. Biol. Chem.* 265:18769-18775.
- Elbrecht, A., Y. Chen, C. A. Cullinan, N. Hayes, M. Leibowitz, D. E. Moller, and J. Berger. 1996. Molecular cloning, expression and characterization of human

- peroxisome proliferator activated receptors gamma 1 and gamma 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224:431-437.
- Fajas, L., J. C. Fruchart, and J. Auwerx. 1998. PPAR $\gamma$ 3 mRNA: a distinct subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters.*438:55-60.
- Farnier, C., S. Krief, M. Blache, F. Diot-Dupuy, G. Mory, P. Ferre, and R. Bazin. 2003. Adipocyte Functions are Modulated by Cell Size Change: Potential Involvement of an Integrin/ERK Signalling Pathway. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27:1178-1186.
- Fasshauer, M. and R. Paschke. 2003. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 46:1594-1603.
- Festuccia, W. T., M. Laplante, M. Berthiaume, Y. Gelinias, and Y. Deshaies. 2006. PPAR $\gamma$  agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control. *Diabetologia* 49:2427-2436.
- Finkel, T. C., X. Deng, and R. Mostoslavsky. 2009. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 460:587-591.
- Forman, B. M., P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman, and R. M. Evans. 1995. 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR $\gamma$ . *Cell* 83:803-812.
- Fredrikson, G., P. Stralfors, N. O. Nilsson and P. Belfrage, Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 256:6311-6320.
- Froy, O. 2007. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol.* 28:61-71.
- Froy, O. and N. Chapnik. 2007. Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine. *Mol. Immunol.* 44:1964-1970.
- Fruebis, J., T. S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M. R. Erickson, F. T. Yen, B. E. Bihain, and H. F. Lodish. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:2005-2010 .
- Fruhbeck, G., J. Gomez-Ambrosi, F. J. Muruzabal, and M. A. Burrel. 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280:E827-E847.
- Fujita, K., N. Maeda, M. Sonoda, K. Ohashi, T. Hibuse, H. Nishizawa, M. Nishida, A. Hiuge, A. Kurata, S. Kihara, I. Shimomura, and T. Funahashi. 2008. Adiponectin protects against angiotensin II-induced cardiac fibrosis through activation of PPAR-alpha. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28:863-870.
- Fukuhara, A., M. Matsuda, M. Nishizawa, K. Segawa, M. Tanaka, K. Kishimoto, Y.

- Matsuki, M. Murakami, T. Ichisaka, H. Murakami, E. Watanabe, T. Takagi, M. Akiyoshi, T. Ohtsubo, S. Kihara, S. Yamashita, M. Makishima, T. Funahashi, S. Yamanaka, R. Hiramatsu, Y. Matsuzawa, and I. Shimomura. 2005. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307:426-430.
- Garbarino-Pico, E., S. Niu, M. D. Rollag, C. A. Strayer, J. C. Besharse and C. B. Green. 2007. Immediate early response of the circadian polyA ribonuclease nocturnin to two extracellular stimuli. *RNA* 13:745-755.
- Garcia de Herreros, A. and M. J. Birnbaum. 1989a. The acquisition of increased insulin-responsive hexose transport in 3T3-L1 adipocytes correlates with expression of a novel transporter gene. *J. Biol. Chem.* 264:19994-19999.
- Garcia, M. N., C. G. Barbeito, L. A. Andrini, and A. F. Badran. 2001. Circadian rhythm of DNA synthesis and mitotic activity in tongue keratinocytes. *Cell Biol. Int.* 25:179-183.
- Gekakis, N., D. Staknis, H. B. Nguyen, F. C. Davis, L. D. Wilsbacher, D. P. King, J. S. Takahashi, and C. J. Weitz. 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280:1564-1569.
- Granneman, J. G., H. P. Moore, R. L. Granneman, A. S. Greenberg, M. S. Obin, and Z. Zhu. 2007. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 282:5726-5735.
- Grechez-Cassiau, A., B. Rayet, F. Guillaumond, M. Teboul, and F. Delaunay. 2008. The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression and hepatocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* 283:4535-454.
- Green, C. B., J. S. Takahashi, and J. Bass. 2008. The meter of metabolism. *Cell* 134:728-742.
- Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, M. C. Moos, Jr, C. Londos, and A. R. Kimmel. 1993. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:12035-12039.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, and H. S. Sul. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78:783-809.
- Griffin, H. D. and C. Goddard. 1994. Rapidly growing broiler (meat-type) chickens: Their origin and use for comparative studies of the regulation of growth. *Int. J. Biochem.* 26:19-28.
- Griffin, H. D., G. Grant, and M. Perry. 1982. Hydrolysis of plasma triacylglycerol-rich lipoproteins from immature and laying hens (*Gallus domesticus*) by lipoprotein lipase in vitro. *Biochem. J.* 206:647-654.
- Griffin, H. D., S. C. Butterwith, and C. Goddard. 1987. Contribution of lipoprotein

- lipase to differences in fatness between broiler and layer-strain chickens. *Br. Poult. Sci.* 28:197-206.
- Grundschober, C., F. Delaunay, A. Puhlhofer, G. Triqueneaux, V. Laudet, T. Bartfai, and P. Nef. 2001. Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 276:46751-46758.
- Haemmerle, G., A. Lass, R. Zimmermann, G. Gorkiewicz, C. Meyer, J. Rozman, G. Heldmaier, R. Maier, C. Theussl, S. Eder, D. Kratky, E. F. Wagner, M. Klingenspor, G. Hoefler, and R. Zechner. 2006. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312:734-737.
- Hardie, D. G. and D. Carling. 1997. The AMP-activated protein kinase – fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem.* 246:259-273.
- Harper, J. W. and S. J. Elledge. 1996. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr. Biol.* 6:56-64.
- Harrington, M. E. and B. Rusak. 1986. Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 1:309-325.
- Hermier, D., M. J. Chapman, and B. Leclercq. 1984. Plasma lipoprotein profile in fasted and refed chickens of two strains selected for high or low adiposity. *J. Nutr.* 114:1112-1121.
- Hirayama, J., S. Sahar, B. Grimaldi, T. Tamaru, K. Takamatsu, Y. Nakahata and P. Sassone-Corsi. 2007. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 450:1086-1090.
- Hirota, T. and Y. Fukada. 2004. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoolog. Sci.* 21:359-368.
- Hirsch, J., S. K. Fried, N. K. Edens, and R. L. Leibel. 1989. The fat cell. *Med. Clin. North. Am.* 73:83-96.
- Hocking, P. M., A. B. Gilbert, M. Walker, and D. Waddington. 1987. Ovarian follicular structure of White Leghorns fed ad libitum and dwarf and normal broiler breeders fed ad libitum or restricted until point of lay. *Br. Poult. Sci.* 28:493-506.
- Hocking, P. M., D. Waddington, M. Walker, and A. B. Gilbert. 1989. Control of the development of the ovarian follicular hierarchy in broiler breeder pullets by food restriction during rearing. *Br. Poult. Sci.* 30:161-173.
- Hogenesch, J. B., Y. Z. Gu, S. Jain, and C. A. Bradfield. 1998. The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:5474-5479.

- Hu, E., P. Liang, and B. M. Spiegelman. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 271:10697-10703.
- Huang, K. C., C. C. Chen, L. M. Chuang, S. R. Ho, T. Y. Tai, and W. S. Yang. 2003. Plasma adiponectin levels and blood pressures in nondiabetic adolescent females. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:4130-4134.
- Huang, W., K. M. Ramsey, B. Marcheva, and J. Bass. 2011. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J. Clin. Invest.* 121:2133-2141.
- Hudson, B. P., R. J. Lien, and J. B. Hess. 2001. Effects of body weight uniformity and pre-peak feeding programs on broiler breeder hen performance. *J. Appl. Poult. Res.* 10:24-32.
- Hunt, T. and P. Sassone-Corsi. 2007. Riding tandem: circadian clocks and the cell cycle. *Cell* 129:461-464.
- Imai, S., F. B. Johnson, R. A. Marciniak, M. McVey, P. U. Park, and L. Guarente. 2000. Sir2: An NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 65:297-302.
- Iuorno, M. J. and J. E. Nestler. 2001. Insulin-lowering drugs in polycystic ovary syndrome. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 28:153-164.
- Jenkins, C. M., D. J. Mancuso, W. Yan, H. F. Sims, B. Gibson, and R. W. Gross. 2004. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J. Biol. Chem.* 279:48968-48975.
- Jenkins-Kruchten, A. E., A. Bennaars-Eiden, J. R. Ross, W. J. Shen, F. B. Kraemer and D. A. Bernlohr 2003. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. *J. Biol. Chem.* 278:47636-47643.
- Jin, X., L. P. Shearman, D. R. Weaver, M. J. Zylka, G. J. de Vries, and S. M. Reppert. 1999. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96:57-68.
- Jocken, J. W., D. Langin, E. Smit, W. H. Saris, C. Valle, G. B. Hul, C. Holm, P. Arner, and E. E. Blaak. 2007. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92:2292-2299.
- Joseph, N. S., F. E. Robinson, D. R. Korver, and R. A. Renema. 2000. Effect of dietary protein intake during the pullet-to-breeder transition period on early egg weight and production in broiler breeders. *Poult. Sci.* 79:1790-1796.
- Juge-Aubry, C., A. Pernin, T. Favez, A. G. Burger, W. Wahli, and C. A. Meier. 1997. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes

- on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region. *J. Biol. Chem.* 272:25252-25259.
- Julian, R. J. 1998. Rapid growth problems: Ascites and skeletal deformities in broilers. *Poult. Sci.* 77:1773-1780.
- Kadowaki, T. and T. Yamauchi. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Reviews* 26:439-451.
- Kahn, B. B., T. Alquier, D. Carling, and D. G. Hardie. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1:15-25.
- Kelly, M., C. Keller, P. R. Avilucea, P. Keller, Z. Luo, X. Xiang, M. Giralt, J. Hidalgo, A. K. Saha, B. K. Pedersen, and N. B. Ruderman. 2004. AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320:449-454.
- Kershaw, E. E. and J. S. Flier. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 89:2548-2556.
- Kershaw, E. E., J. K. Hamm, L. A. Verhagen, O. Peroni, M. Katic, and J. S. Flier. 2006. Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 55:148-157.
- Kershaw, E. E., M. Schupp, H. P. Guan, N. P. Gardner, M. A. Lazar, and J. S. Flier. 2007. PPARgamma regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293:E1736-E1745.
- Kim, J. Y., K. Tillison, J. H. Lee, D. A. Rearick, and C. M. Smas. 2006. The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291:E115-E127.
- Kim, J. Y., Y. Wu, and C. M. Smas. 2007. Characterization of ScAP-23, a new cell line from murine subcutaneous adipose tissue, identifies genes for the molecular definition of preadipocytes. *Physiol. Genomics.* 31:328-342.
- Klemm, D. J., J. W. Leitner, P. Watson, A. Nesterova, J. E. Reusch, M. L. Goalstone, and B. Draznin. 2001a. Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *J Biol Chem.* 276:28430-28435.
- Kliwer, S. A., B. M. Forman, B. Blumberg, E. S. Ong, U. Borgmeyer, D. J. Mangelsdorf, K. Umesono, and R. M. Evans. 1994. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:7355-7359.
- Kohn, A. D., S. A. Summers, M. J. Birnbaum, and R. A. Roth. 1996. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose



- ptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* 271:31372-31378.
- Kohsaka, A. and J. Bass. 2007. A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends. Endocrinol. Metab.* 18:4-11
- Kralisch, S., J. Klein, U. Lossner, M. Bluher, R. Paschke, M. Stumvoll, and M. Fasshauer. 2005. Isoproterenol, TNF $\alpha$ , and insulin downregulate adipose triglyceride lipase in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 240:43-49.
- Krogdahl, A. 1985. Digestion and absorption of lipids in poultry. *J. Nutr.* 115:675-685.
- Kuksis, A. 1992. Yolk lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1124:205-222.
- Kume, K., M. J. Zylka, S. Sriram, L. P. Shearman, D. R. Weaver, X. Jin, E. S. Maywood, M. H. Hastings and S. M. Reppert. 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98:193-205.
- La Fleur, S. E. 2003. Daily rhythms in glucose metabolism: suprachiasmatic nucleus output to peripheral tissue. *J. Neuroendocrinol.* 15:315-322.
- Lagouge, M., C. Argmann, Z. Gerhart-Hines, H. Meziane, C. Lerin, F. Daussin, N. Messadeq, J. Milne, P. Lambert, P. Elliott, B. Geny, M. Laakso, P. Puigserver, and J. Auwerx. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 127:1109-1122.
- Lake, A. C., Y. Sun, J. L. Li, J. E. Kim, J. W. Johnson, D. Li, T. Revett, H. H. Shih, W. Liu, J. E. Paulsen, and R. E. Gimeno. 2005. Expression, regulation, and triglyceride hydrolase activity of Adiponutrin family members. *J. Lipid Res.* 46:2477-2487.
- Lamia, K. A., U. M. Sachdeva, L. DiTacchio, E. C. Williams, J. G. Alvarez, D. F. Egan, D. S. Vasquez, H. Juguilon, S. Panda, R. J. Shaw, C. B. Thompson, and R. M. Evans. 2009. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 326:437-440.
- Langin, D., C. Holm, and M. Lafontan. 1996. Adipocyte hormone-sensitive lipase: A major regulator of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc.* 55:93-109.
- Lass, A., R. Zimmermann, G. Haemmerle, M. Riederer, G. Schoiswohl, M. Schweiger, P. Kienesberger, J. G. Strauss, G. Gorkiewicz, and R. Zechner. 2006. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* 3:309-319.
- Lee, C., J. P. Etchegaray, F. R. Cagampang, A. S. Loudon, and S. M. Reppert. 2001. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107:855-867

- Lehmann, J. M., L. B. Moore, T. A. Smith-Oliver, W. O. Wilkison, T. M. Willson, and S. A. Kliewer. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *J. Biol. Chem.* 270:12953-12956.
- Leveille, G. A., D. R. Romsos, Y. Yeh, and E. K. O'Hea. 1975. Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms. *Poult. Sci.* 54:1075-1093.
- Li, Y., W. Xu, M. W. McBurney, and V. D. Longo. 2008. SirT1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab.* 8:38-48.
- Lihn, A. S., N. Jessen, S. B. Pedersen, S. Lund, and B. Richelsen. 2004. AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316:853-858.
- Lilburn, M. S. and D. J. Myers-Miller. 1990. Effect of body weight, feed allowance, and dietary protein intake during the prebreeder period on early reproductive performance of broiler breeder hens. *Poult. Sci.* 69:1118-1125.
- Lin, S. J., P. A. Defossez, and L. Guarente. 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289:2126-2128.
- Liu, Y., R. Dentin, D. Chen, S. Hedrick, K. Ravnskjaer, S. Schenk, J. Milne, D. J. Meyers, P. Cole, J. Yates, J. Olefsky, L. Guarente, and M. Montminy. 2008. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 456:269-273.
- Lowrey, P. L., K. Shimomura, M. P. Antoch, S. Yamazaki, P. D. Zemenides, M. R. Ralph, M. Menaker, and J. S. Takahashi. 2000. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288:483-492.
- Lu, J., Y. H. Zhang, T. C. Chou, S. E. Gaus, J. K. Elmquist, P. Shiromani, and C. B. Saper. 2001. Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J. Neurosci.* 21:4864-4874.
- MacDougald, O. A., C. S. Hwang, H. Fan, and M. D. Lane. 1995. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose and 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:9034-9037.
- Maeda, K., K. Okubo, I. Shimomura, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and K. Matsubara. 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221:286-289.
- Mandrup, S. and M. D. Lane. 1997. Regulating adipogenesis. *J. Biol. Chem.*

272:5367-5370.

- Martin, D. B., M. G. Horning, and P. R. Vagelos. 1961. Fatty acid synthesis in adipose Tissue. I. Purification and properties of a long chain fatty acid-synthesizing system. *J. Biol. Chem.* 236:663-668.
- Martinez-Botas, J., J. Anderson J, D. Tessier, A. Lapillonne, B. Chang, M. Quast M, D. Gorenstein, K. Chen, and L. Chan. 2000. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat. Genet.* 26:474-479.
- Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Isse, N. Satoh, T. Okazaki, M. Shigemoto, K. Mori, N. Tamura, K. Hosoda, and Y. Yoshimasa. 1995. Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 44:855-858.
- Matejkova, O., K. J. Mustard, J. Sponarova, P. Flachs, M. Rossmeisl, I. Miksik, M. Thomason-Hughes, D. Grahame Hardie, and J. Kopecky. 2004. Possible involvement of AMP-activated protein kinase in obesity resistance induced by respiratory uncoupling in white fat. *FEBS Lett.* 569:245-248.
- Matsuo, T., S. Yamaguchi, S. Mitsui, A. Emi, F. Shimoda, and H. Okamura. 2003. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* 302:255-259.
- Matsuzawa, Y., T. Funahashi, S. Kihara, and I. Shimomura. 2004. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:29-33.
- McArthur, M. J., B. P. Atshaves, A. Frolov, W. D. Foxworth, A. B. Kier and F. Schroeder. 1999. Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J. Lipid Res.* 40:1371-1383.
- McKnight, G. S., D. E. Cummings, P. S. Amieux, M. A. Sikorski, E. P. Brandon, J. V. Planas, K. Motamed, and R. L. Idzerda. 1998. Cyclic AMP, PKA, and the Physiological Regulation of Adiposity. *Recent Progress in Hormone Research* 53:139-159.
- Michan, S. and D. Sinclair. 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem. J.* 404:1-13.
- Miyoshi, H., S. C. Souza, H. H. Zhang, K. J. Strissel, M. A. Christoffolete, J. Kovsan, A. Rudich, F. B. Kraemer, A. C. Bianco, and M. S. Obin. 2006. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 281:15837-15844.
- Moore, R. Y. and J. P. Card. 1994. Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J. Comp. Neurol.* 344:403-430.
- Morrison, R. F. and S. R. Farmer. 1999. Role of PPAR gamma in regulating a cascade

- expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c), and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 274:17088-17097.
- Moule, S. K. and R. M. Denton. 1998. The activation of p38 MAPK by the beta-adrenergic agonist isoproterenol in rat epididymal fat cells. *FEBS Lett.* 439:287-290.
- Murakami, H. and P. Nurse. 2000. DNA replication and damage checkpoints and meiotic cell cycle controls in the fission and budding yeasts. *Biochem J.* 349(Pt 1):1-12.
- Musi, N., M. F. Hirshman, J. Nygren, M. Svanfeldt, P. Bavenholm, O. Rooyackers, G. Zhou, J. M. Williamson, O. Ljunqvist, S. Efendic, D. E. Moller, A. Thorell, and L. J. Goodyear. 2002. Metformin increases AMP-activated protein-kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2074-2081.
- Naaz, A., D. R. Holsberger, G. A. Iwamoto, A. Nelson, H. Kiyokawa, and P. S. Cooke. 2004. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitors produces adipocyte hyperplasia and obesity. *FASEB J.* 18:1925-1927.
- Nagoshi, E., C. Saini, C. Bauer, T. Laroche, F. Naef, and U. Schibler. 2004. Circadian gene expression in individual fibroblasts: Cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119:693-705.
- Nakahata, Y., M. Kaluzova, B. Grimaldi, S. Sahar, J. Hirayama, D. Chen, L. P. Guarente, and P. Sassone-Corsi. 2008. The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134:329-340.
- Nakahata, Y., S. Sahar, G. Astarita, M. Kaluzova, and P. Sassone-Corsi. 2009. Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* 324:654-657.
- Nakano, Y., T. Tobe, N. H. Choi-Miura, T. Mazda, and M. Tomita. 1996. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J. Biochem.* 120:803-812.
- Nemoto, S., M. M. Fergusson, and T. Finkel. 2005. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 {alpha}. *J Biol Chem.* 280:16456-16460.
- Novakofski, J. 2004. Adipogenesis: Usefulness of in vitro and in vivo experimental model. *J. Anim. Sci.* 82:905-915.
- Okazaki, F., N. Matsunaga, H. Okazaki, N. Utoguchi, R. Suzuki, K. Maruyama, S. Koyanagi, and S. Ohdo. 2010. Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice. *Cancer Res.* 70:6238-6246.

- Onagbesan, O. M., B. Vleugels, N. Buys, V. Bruggeman, M. Safi, and E. Decuypere. 1999. Insulin-like growth factors in the regulation of avian ovarian functions. *Domest. Anim. Endocrinol.* 17:299-313.
- Orci, L., W. S. Cook, M. Ravazzola, M. Y. Wang, B. H. Park, R. Montesano, and R. H. Unger. 2004. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:2058–2063.
- Panda, S., J. B. Hogenesch, and S. A. Kay. 2002. Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417:329-335.
- Picard, F., M. Kurtev, N. Chung, A. Topark-Ngarm, T. Senawong, R. Machado De Oliveira, M. Leid, M. W. McBurney, and L. Guarente. 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR $\gamma$ . *Nature* 429:771-776.
- Pickavance, L., M. Tadayyon, G. Williams, and R. G. Vernon. 1998. Lactation suppresses diurnal rhythm of serum leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 248:196-199.
- Pines, J. 1999. Cell cycle. Checkpoint on the nuclear frontier. *Nature* 397:104-105.
- Poissonnet, C. M., M. Lavelle, and A. R. Burdi. 1988. Growth and development of adipose tissue. *Journal of Pediatrics* 113:1-9.
- Prins, J. B. and S. O’Rahilly. 1997. Regulation of adipose cell number in man. *Clin. Sci. (Lond)* 92:3-11.
- Provencio, I., I. R. Rodriguez, G. Jiang, W. P. Hayes, E. F. Moreira, M. D. Rollag. 2000. A novel human opsin in the inner retina. *J. Neurosci.* 20:600-605.
- Qiao, L. and J. Shao. 2006. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J. Biol. Chem.* 281:39915-39924.
- Qu, Y., M. Mao, X. Li, Y. Liu, J. Ding, Z. Jiang, C. Wan, L. Zhang, Z. Wang, and D. Mu. 2008. Telomerase reconstitution contributes to resetting of circadian rhythm in fibroblasts. *Mol. Cell Biochem.* 313:11-18.
- Ramsey, K. M., J. Yoshino, C. S. Brace, D. Abrassart, Y. Kobayashi, B. Marcheva, H. K. Hong, J. L. Chong, E. D. Buhr, C. Lee, J. S. Takahashi, S. Imai, and J. Bass. 2009. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis. *Science* 324:651-654.
- Rangwala, S. M., B. Rhoades, J. S. Shapiro, A. S. Rich, J. K. Kim, and G. I. Shulman. 2003. Genetic modulation of PPAR- $\gamma$  phosphorylation regulates insulin sensitivity. *Dev. Cell.* 5:657-663.
- Renema, R. A., F. E. Robinson, M. Newcombe, and R. I. McKay. 1999a. Effect of body weight and feed allocation during sexual maturation in broiler breeder hens. 1. Growth and carcass characteristics. *Poult. Sci.* 78:619-628.
- Rensing, L. and K. Goedeke. 1976. Circadian rhythm and cell cycle: possible

- entraining mechanisms. *Chronobiologia* 3:853-865.
- Reppert, S. M. and D. R. Weaver. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941.
- Reshef, L., Y. Olswang, H. Cassuto, B. Blum, C. M. Croniger, S. C. Kalhan, S. M. Tilghman, and R. W. Hanson. 2003. Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* 278:30413-30416.
- Revollo, J. R., A. A. Grimm, and S. Imai. 2004. The NAD biosynthesis Pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 279:50754-50763.
- Revollo, J. R., A. Körner, K. F. Mills, A. Satoh, T. Wang, A. Garten, B. Dasgupta, Y. Sasaki, C. Wolberger, R. R. Townsend, J. Milbrandt, W. Kiess, and S. Imai. 2007. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in  $\beta$  cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab.* 6:363-375.
- Richards, M. P., S. M. Poch, C. N. Coon, R. W. Rosebrough, C. M. Ashwellm, and J. P. McMurtry. 2003. Feed restriction significantly alters lipogenic gene expression in broiler breeder chickens. *J. Nutr.* 133:707-715.
- Robbins, K. R., S. F. Chin, G. C. McGhee, and K. D. Roberson. 1988. Effects of ad libitum versus restricted feeding on body composition and egg production of broiler breeders. *Poult. Sci.* 67:1001-1007.
- Robinson, F. E., J. L. Wilson, M. W. Yu, G. M. Fasenko, and R. T. Hardin. 1993. The relationship between body weight and reproductive efficiency in meat-type chicken. *Poult. Sci.* 72:912-922.
- Robinson, F. E., N. A. Robinson, and T. A. Scott. 1991. Reproductive performance, growth rate and body composition of full-fed versus feed-restricted broiler breeder hens. *Can. J. Anim. Sci.* 71:549-556.
- Robinson, J. and E. A. Newsholme. 1969. The effects of dietary conditions and glycerol concentration on glycerol uptake by rat liver and kidney-cortex slices. *Biochem. J.* 112:449-453.
- Rodgers, J. T., C. Lerin, W. Haas, S. P. Gygi, B. M. Spiegelman, and P. Puigserver. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113-118.
- Rodriguez-Cuenca, S., S. Carobbio, V. R. Velagapudi, N. Barbarroja, J. M. Moreno-Navarrete, F. J. Tinahones, J. M. Fernandez-Real, M. Oresic, and A. Vidal-Puig. 2012. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ -Dependent Regulation of Lipolytic Nodes and Metabolic Flexibility. *Mol Cell Biol.* 32:1555-1565.
- Rogina, B. and S. L. Helfand. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:15998-16003.

- Romao, J. M., W. Jin, M. V. Dodson, G. J. Hausman, S. S. Moore, and L. Guan le. 2011. MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 236:997-1004.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman. 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444:847-853.
- Ruderman, N. B., X. J. Xu, L. Nelson, J. M. Cacicedo, A. K. Saha, F. Lan, and Y. Ido. 2010. AMPK and SIRT1: A long-standing partnership? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298:E751-E760.
- Samal, B., Y. Sun, G. Stearns, C. Xie, S. Suggs, and I. McNiece. 1994. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol. Cell Biol.* 14:1431-1437.
- Scheja, L., L. Makowski, K. T. Uysal, S. M. Wiesbrock, D. R. Shimshek, D. S. Meyers, M. Morgan, R. A. Parker, and G. S. Hotamisligil. 1999. Altered insulin secretion associated with reduced lipolytic efficiency in aP2<sup>-/-</sup> mice. *Diabetes* 48:1987-1994.
- Scherer, P. E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini, and H. F. Lodish. 1995. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270:26746-25749.
- Scheving, L. E., T. H. Tsai, J. E. Pauly, and F. Halberg. 1983. Circadian effect of ACTH 1-17 on mitotic index of the corneal epithelium of BALB/C mice. *Peptides* 4:183-190.
- Seli, E. and A. J. Duleba. 2004. Treatment of PCOS with metformin and other insulin-sensitizing agents. *Curr. Diab. Rep.* 4:69-75.
- Senderowicz, A. M. and E. A. Sausville. 2000. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J. Natl. Cancer. Inst.* 92:376-387.
- Servetnick, D. A., D. L. Brasaemle, J. Gruia-Gray, A. R. Kimmel, J. Wolff, and C. Londos. 1995. Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and leydig cells. *J. Biol. Chem.* 270:16970-16973.
- Shackelford, R. E., W. K. Kaufmann, and R. S. Paules. 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.* 28:1387-1404.
- Shaw, R. J., M. Kosmatka, N. Bardeesy, R. L. Hurley, L. A. Witters, R. A. DePinho, and L. C. Cantley. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:3329-3335.
- Shen, W. J., S. Patel, Z. Yu, D. Jue, and F. B. Kraemer. 2007. Effects of rosiglitazone and high fat diet on lipase/esterase expression in adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* 1771:177-184.
- Shen, W. J., Y. Liang, R. Hong, S. Patel, V. Natsu, K. Sridhar, A. Jenkins, D. A.

- Bernlohr, and F. B. Kraemer. 2001. Characterization of functional interaction of adipocyte lipid binding protein with hormone-sensitive lipase. *J. Biol. Chem.* 276:49443-49448.
- Shibasaki, M., K. Takahashi, T. Itou, H. Bujo, and Y. A. Saito. 2003. PPAR agonist improves TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance of adipose tissue in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309:419-424.
- Shimaya, A., O. Noshiro, R. Hirayama, T. Yoneta, K. Niigata, and H. Shikama. 1997. Insulin sensitizer YM268 ameliorates insulin resistance by normalizing the decreased content of GLUT4 in adipose tissue of obese Zucker rats. *Eur. J. Endocrinol.* 137:693-700.
- Shimba, S., N. Ishii, Y. Ohta, T. Ohno, Y. Watabe, M. Hayashi, T. Wada, T. Aoyagi, and M. Tezuka. 2005. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:12071-12076.
- Shojima, N., H. Sakoda, T. Ogihara, M. Fujishiro, H. Katagiri, and M. Anai. 2002. Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells. *Diabetes* 51:1737-1744.
- Sim, A. T. and D. G. Hardie. 1988. The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon-stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 233:294-298.
- Sklan, D., P. Budowski, and S. Hurwitz, 1984. Intestine absorption and plasma transport of lipid in chicks and rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 78A:507-510.
- Sklan, D., T. Yosefov, and A. Friedman. 1989. The effect of vitamin a, beta-carotene and canthaxanthin on vitamin a metabolism and immune responses in the chick. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 59:245-250.
- Souza, S. C., L. M. de Vargas, M. T. Yamamoto, P. Lien, M. D. Franciosa, L. G. Moss, and A. S. Greenberg. 1998. Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273:24665-24669.
- Spalding, K. L., E. Arner, P. O. Westermark, S. Bernard, B. A. Buchholz, O. Bergmann, L. Blomqvist, J. Hoffstedt, E. Naslund, T. Britton, H. Concha, M. Hassan, M. Ryde'n, J. Frise'n, and P. Arner. 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783-787.
- Steinberg, D., M. Vaughan, and S. Margolis. 1961. Studies of triglyceride biosynthesis in homogenates of adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 236:1631-1637.
- Stewart, Z. A., M. D. Westfall, and J. A. Pietenpol. 2003. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends. Pharmacol. Sci.* 24:139-145.



- Storch, J. and B. Corsico. 2008. The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 28:18.1-18.23.
- Sullivan, J. E., K. J. Brocklehurst, A. E. Marley, F. Carey, D. Carling, and R. K. Beri. 1994. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett.* 353:33-36.
- Sun, C., F. Zhang, X. Ge, T. Yan, X. Chen, X. Shi, and Q. Zhai. 2007. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab.* 6:307-319.
- Sun, Q., L. Li, R. Li, M. Yang, H. Liu, J. N. Michael, Z. Haihong, X. Jun, and Y. Gangyi. 2009. Overexpression of visfatin/PBEF/Nampt alters whole-body insulin sensitivity and lipid profile in rats. *Ann Med.* 41: 311-320.
- Sztalryd, C., G. Xu, H. Dorward, J. T. Tansey, J. A. Contreras, A. R. Kimmel, and C. Londos. 2003. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J. Cell Biol.* 161:1093-1103.
- Takeuchi, T., Y. Adachi, Y. Ohtsuki, and M. Furihata. 2007. Adiponectin receptors, with special focus on the role of the third receptor, T-cadherin, in vascular disease. *Med. Mol. Morphol.* 40:115-120.
- Tanaka, K., S. Ohtani, and K. Shigeno. 1983. Effect of increasing dietary energy on hepatic lipogenesis in growing chicks. I. Increasing energy by carbohydrate supplementation. *Poult. Sci.* 62:445-451.
- Tansey, J. T., C. Sztalryd, J. Gruia-Gray, D. L. Roush, J. V. Zee, O. Gavrilova, M. L. Reitman, C. X. Deng, C. Li, and A. R. Kimmel. 2001. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 6494-6499.
- Tontonoz, P., E. Hu, and B. M. Spiegelman. 1994a. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 79:1147-1156.
- Tontonoz, P., E. Hu, and B. M. Spiegelman. 1995. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$ . *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5:571-576.
- Tontonoz, P., E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari, and B. M. Spiegelman. 1994. mPPAR $\gamma$ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8:1224-1234.
- Tsao, T. S., H. F. Lodish, and J. Fruebis. 2002. ACRP30, a new hormone controlling fat and glucose metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* 440:213-221.
- Tsuchida, A., T. Yamauchi, Y. Ito, Y. Hada, T. Maki, S. Takekawa, J. Kamon, M.

- Kobayashi, R. Suzuki, K. Hara, N. Kubota, Y. Terauchi, P. Froguel, J. Nakae, M. Kasuga, D. Accili, K. Tobe, K. Ueki, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2004. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem.* 279:30817-30822.
- Unger, R. H. 2002. Lipotoxic diseases. *Annu. Rev. Med.* 53:319-336.
- Vaananen, H. K. 2005. Mesenchymal stem cells. *Ann. Med.* 37:469-479.
- Villena, J. A., S. Roy, E. Sarkadi-Nagy, K. H. Kim, and H. S. Sul. 2004. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 279:47066-47075.
- Wahle, K. W., L. Milne, and G. McIntosh. 1991. Regulation of polyunsaturated fatty acid metabolism in tissue phospholipids of obese (fa/fa) and lean (Fa/-) Zucker rats. 1. Effect of dietary lipids on cardiac tissue. *Lipids* 26:16-22.
- Wahle, K. W., L. Milne, J. M. Fletcher, and G. McIntosh. 1994. Effect of dietary lipids and endocrine changes on polyunsaturated fatty acids in phospholipids of pancreas and brown adipose tissue of obese and lean rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 109:235-244.
- Wang, X., J. R. Day, and R. Vasilatos-Younken. 2001. The distribution of neuropeptide Y gene expression in the chicken brain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 174:129-136.
- Weiner, F. R., P. J. Smith, S. Wertheimer, and C. S. Rubin. 1991. Regulation of gene expression by insulin and tumor necrosis factor alpha in 3T3-L1 cells. Modulation of the transcription of genes encoding acyl-CoA synthetase and stearoyl-CoA desaturase-1. *J. Biol. Chem.* 266:23525-23528.
- Wolfrum, C., C. M. Borrmann, T. Borchers, and F. Spener. 2001. Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:2323-2328.
- Woods, A., P. C. F. Cheung, F. C. Smith, M. D. Davison, J. Scott, R. K. Beri, and D. Carling. 1996a. Characterization of AMP-activated protein kinase  $\beta$  and  $\gamma$  subunits. *J Biol Chem.* 271:10282-10290.
- Wu, Z., N. L. Bucher, and S. R. Farmer. 1996. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , and glucocorticoids. *Mol. Cell Biol.* 16:4128-4136.
- Xie, H., S. Y. Tang, X. H. Luo, J. Huang, R. R. Cui, L. Q. Yuan, H. D. Zhou, X. P. Wu, and E. Y. Liao. 2007. Insulin-like effects of visfatin on human osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 80:201-210.

- Yamaguchi, T., N. Omatsu, E. Morimoto, H. Nakashima, K. Ueno, T. Tanaka, K. Satouchi, F. Hirose, and T. Osumi. 2007. CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *J. Lipid Res.* 48:1078-1089.
- Yamaguchi, T., N. Omatsu, S. Matsushita, and T. Osumi. 2004. CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J. Biol. Chem.* 279:30490-30497.
- Yamauchi, T. and T. Kadowaki. 2008. Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases. *Int. J. Obes. (Lond).* 32 Suppl 7:S13-18.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Ito, A. Tsuchida, T. Yokomizo, S. Kita, T. Sugiyama, M. Miyagishi, K. Hara, M. Tsunoda, K. Murakami, T. Ohzeki, S. Uchida, S. Takekawa, H. Waki, N. H. Tsuno, Y. Shibata, Y. Terauchi, P. Froguel, K. Tobe, S. Koyasu, K. Taira, T. Kitamura, T. Shimizu, R. Nagai, and T. Kadowaki. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769.
- Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn, and T. Kadowaki. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8:1288-1295.
- Yamauchi, T., Y. Nio, T. Maki, M. Kobayashi, T. Takazawa, M. Iwabu, M. Okada-Iwabu, S. Kawamoto, N. Kubota, T. Kubota, Y. Ito, J. Kamon, A. Tsuchida, K. Kumagai, H. Kozono, Y. Hada, H. Ogata, K. Tokuyama, M. Tsunoda, T. Ide, K. Murakami, M. Awazawa, I. Takamoto, P. Froguel, K. Hara, K. Tobe, R. Nagai, K. Ueki, and T. Kadowaki. 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat. Med.* 13:332-339.
- Yang, W. S., W. J. Lee, T. Funahashi, S. Tanaka, Y. Matsuzawa, C. L. Chao, C. L. Chen, T. Y. Tai, and L. M. Chuang. 2002. Plasma adiponectin levels in overweight and obese Asians. *Obes. Res.* 10:1104-1110.
- Yannielli, P. and M. E. Harrington. 2004. Let there be "more" light: enhancement of light actions on the circadian system through non-photic pathways. *Prog. Neurobiol.* 74:59-76.
- Yildiz, B. O., M. A. Suchard, M. L. Wong, S. M. McCann, and J. Licinio. 2004. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:10434-10439.

- Young, M. E. 2006. The circadian clock within the heart: potential influence on myocardial gene expression, metabolism, and function. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 290:H1-H16.
- Yu, M. W., F. E. Robinson, and R. J. Etches. 1992b. Effect of feed allowance during rearing and breeding on female broiler breeders. 3. Ovarian steroidogenesis. *Poultry Sci.* 71:1762-1767.
- Yu, M. W., F. E. Robinson, R. G. Charles, and R. Weingardt. 1992a. Effect of feed allowance during rearing and breeding on female broiler breeders. 2. Ovarian morphology and production. *Poultry Sci.* 71:1750-1761.
- Yuan, J., W. Liu, Z. L. Liu, and N. Li. 2006. cDNA cloning, genomic structure, chromosomal mapping and expression analysis of ADIPOQ (adiponectin) in chicken. *Cytogenet Genome Res.* 112:148-51.
- Zanquetta, M. M., M. L. Corrêa-Giannella, M. B. Monteiro, and S. M. Villares. 2010. Body weight, metabolism and clock genes. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2:53
- Zhang, B., J. Berger, E. Hu, D. Szalkowski, S. White-Carrington, B. M. Spiegelman, and D. E. Moller. 1996. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol. Endocrinol.* 10:1457-1466.
- Zhang, H. H., S. C. Souza, K. V. Muliuro, F. B. Kraemer, M. S. Obin, and A. S. Greenberg. 2003. Lipase-selective functional domains of perilipin A differentially regulate constitutive and protein kinase A-stimulated lipolysis. *J. Biol. Chem.* 278:51535-51542.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.
- Zimmermann, R., J. G. Strauss, G. Haemmerle, G. Schoiswohl, R. Birner-Gruenberger, M. Riederer, A. Lass, G. Neuberger, F. Eisenhaber, A. Hermetter, et al. 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383-1386.

## Comparison of adipose function and circadian rhythm of Taiwan country chickens with different laying performances

Taiwan country chickens selecting for high growth rate usually results in the excessive fat mass and decreased egg production. This study aimed to explore the relationship between adipose function and egg production capacity by using a fast growing (B) and a high egg production (L2) line of chickens selected from a common base population of Taiwan country chickens. Adipose stromal-vascular (S-V) cells were collected and then cultured in various conditions to compare their proliferation rates, adipocyte differentiation abilities, metabolic performances, and circadian rhythms between B and L2 lines of chickens. Cell division rates of S-V cells from B-line chickens were higher than those from L2-line chickens. Compared to synchronized L2-line S-V cells, synchronized B-line S-V cells also expressed higher levels and amplitudes of circadian rhythm of *Rev-erb $\beta$*  mRNA, and lower mRNA levels of *p21<sup>WAF1/Cip1</sup>*. S-V cells from L2-line displayed higher fat accumulation and GPDH activities than those from B-line, when induced to undergo adipocyte differentiation. Amplitudes of circadian rhythm of *Per2*, *Bmal1*, *Cry1*, *Rev-erb $\beta$*  and *ROR $\beta$*  mRNA expression in L2-line adipocytes were more significant than those in B-line adipocytes. After insulin was removed from culture for 2 days, mRNA levels of metabolism-related genes (*Adiponectin R1*, *Nampt*, *AMPK $\alpha$* , and *aFABP*) were increased notably in L2-line adipocytes, but not in B-line adipocytes. Meanwhile, the relative mRNA levels of *Nampt*, *aFABP*, and *ATGL* in L2-line adipocytes in the absence of insulin were significantly higher and relative mRNA levels of *AMPK $\alpha$*  mRNA in the presence of insulin were significantly lower than those in B-line cells. These results suggest that L2-line adipocytes possessed greater metabolic responses than B-line cells to insulin removal. Overall, adipose S-V cells of B-line chickens selected for growth performance have high dividing rates. This may partly explain the higher adipose mass found in B-line than L2-line chickens. On the other hand, L2-line adipocytes showed higher amplitudes of circadian rhythm and metabolic responsiveness than B-line adipocytes, indicating that L2-line chickens may have better energy management for egg production than B-line chickens. Further studies are required to investigate how these differences in cell division rates, metabolic responsiveness and circadian rhythms between the two lines of Taiwan country chickens influence egg production.

Keywords: Taiwan country chicken, Egg laying performance, Adipocytes, Circadian rhythm