

饲料蛋白质水平对肥育猪背最长肌嫩度及骨骼肌特异性蛋白-核转录因子 κ B 信号途径的影响

张勇¹ 崔岩¹ 陶亮¹ 朱宇旌¹ 邓科¹ 孙瑾¹ 邵彩梅²

(1. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110866; 2. 辽宁禾丰牧业股份有限公司, 沈阳 110164)

摘要: 本试验旨在研究饲料理想蛋白质水平对背最长肌嫩度及骨骼肌特异性蛋白-核转录因子 κ B (P94-NF κ B) 信号途径相关蛋白和钙蛋白酶抑制蛋白 (CAST) mRNA 表达量的影响。选择初始重约 50 kg 的杜洛克 × 长白 × 大白三元杂交猪 90 头, 随机分配到 3 个处理, 每个处理 3 个重复, 每个重复 10 头, 公母各占 1/2。3 个处理分别采用 12%、16%、20% 理想蛋白质水平的饲料, 饲料能量水平相同。正试期 58 d, 结束后屠宰取样, 测定肌肉剪切力并利用实时定量 PCR 法测定猪背最长肌 P94、NF κ B、核转录因子抑制物 (I κ B) 和 CAST mRNA 表达量。结果表明: 1) 饲料蛋白质水平对背最长肌剪切力、P94、NF κ B、I κ B 和 CAST mRNA 表达量有显著影响 ($P < 0.05$); 随饲料蛋白质水平升高, 背最长肌剪切力、I κ B 和 CAST mRNA 表达量升高、P94 和 NF κ B mRNA 表达量降低。2) 背最长肌剪切力与 I κ B (相关系数为 0.513, $P < 0.05$)、CAST mRNA 表达量 (相关系数为 0.816, $P < 0.01$) 呈正相关。3) CAST 与 P94 mRNA 表达量呈负相关 (相关系数为 -0.496, $P < 0.05$), 与 I κ B mRNA 表达量呈正相关 (相关系数为 0.710, $P < 0.01$)。4) P94 与 NF κ B mRNA 表达量呈正相关 (相关系数为 0.550, $P < 0.05$), 与 I κ B mRNA 表达量呈负相关 (相关系数为 -0.518, $P < 0.05$); I κ B 与 NF κ B mRNA 表达量呈负相关 (相关系数为 -0.539, $P < 0.05$)。结果提示: 饲料高蛋白水平提高了猪背最长肌剪切力、CAST 和 I κ B mRNA 表达量, 降低了肌肉嫩度和 P94 mRNA 表达量; 猪背最长肌 P94-NF κ B 信号途径在肌肉嫩度调控过程中发挥一定作用, 但不是主要途径。

关键词: 蛋白质水平; 钙蛋白酶抑制蛋白; 骨骼肌特异性蛋白; 核转录因子 κ B; 肌肉嫩度

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2011)08-1342-09

肉品质直接影响到养殖业、肉类加工业和批发零售业效益以及广大消费者的切身利益, 如何提高肉品质已成为当今学者共同关心的一项重大课题。嫩度作为评价肉品质的重要指标而倍受瞩目。在肌肉组织中, 钙蛋白酶系 (calpains) 控制着肌纤维蛋白的降解, 这一过程是肌肉蛋白质降解的限速步骤^[1], 钙蛋白酶系在肌肉纤维更新及宰

后的嫩化中扮演着重要角色^[2]。骨骼肌特异性蛋白酶 (P94, 又名 calpain-3、CAPN3) 和钙蛋白酶抑制蛋白 (calpastatin, CAST) 都属于钙蛋白酶系统的一员。核转录因子 κ B (NF κ B) 广泛存在于真核生物中, 是一个由复杂的多肽亚基组成的蛋白质家族, 在肌细胞形成、肌细胞再生和细胞增殖中发挥了重要作用。骨骼肌特异性蛋白酶-核转录因子

收稿日期: 2011-02-14

基金项目: 国家自然科学基金“钙蛋白酶调控猪体蛋白降解的信号途径研究”(30972112)

作者简介: 张勇 (1972-), 男, 甘肃武威人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事分子营养学与饲料资源开发利用研究。E-mail: syndzhy@yahoo.com.cn

κB (P94-NF κB) 信号途径与肌细胞核凋亡密切相关。近年来,对 P94 的研究多集中于 P94 多态性的分析^[3-4],对 NF κB 和核转录因子抑制物(I κB) 的研究多集中在干细胞生物学领域及肌肉疾病的研究^[5-6],在动物营养中的应用很少,并且对 P94-NF κB 信号途径与肌肉嫩度的联系更是鲜见报道。曾有报道利用分子生物学技术手段研究饲料营养水平对肌肉嫩度的影响,从微观角度探讨相关基因表达对肌肉嫩度的调控机制。本试验考察饲料理想蛋白质水平对生长肥育猪肌肉 CAST 和 P94-NF κB 信号途径的影响,明确 CAST 与 P94-NF κB 信号途径在猪肌肉嫩度调控中的作用,为改善猪肉品质提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验仪器

数显式肌肉嫩度仪(C-LM3 型,东北农业大学工程学院研制);高速台式冷冻离心机(TGL-20M,长沙湘仪离心机仪器有限公司);紫外分光光度计(Cary 50 Probe,美国 Varian 公司);基因扩增仪[TC-96/G/H(6),杭州博日科技有限公司];PCR 仪(ABI PRISM 7000 HT Real-Time RCR System,美国 ABI 公司);凝胶成像系统(江苏捷达)。

1.2 试验试剂

RNA 提取试剂盒(RNAiso Reagent)、荧光定量 PCR(real time-PCR, RT-PCR) 试剂盒[SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (Perfect Real Time)]、DEPC 水、DNA 分子量标准(DL2000)、50 bp DNA Ladder Marker 均购自于 TaKaRa 公司;琼脂糖购自于宝泰克(西班牙)公司;其他常用化学试剂均为国产分析纯。

1.3 试验动物与试验设计

本试验采用完全随机区组试验设计,选择初始重约 50 kg 的杜洛克×长白×大白三元杂交猪 90 头,随机分配到 3 个处理,每个处理 3 个重复,每个重复 10 头,公母各占 1/2。3 个处理分别采用 12%、16%、20% 理想蛋白质水平的饲料,饲料能量水平相同,正试期 58 d,参照 NRC(1998) 肥育猪的营养需要配合成粉状全价料,饲料消化能保持相同。饲料组成及营养水平见表 1。

1.4 饲养管理

试验前进行驱虫、防疫、编号等工作。试验猪

水泥地面单圈饲养,自由采食,以鸭嘴式饮水器提供充足清洁饮水,日饲喂 3 次,清粪 3 次,保持舍内清洁,随时观察并记录饲养期间猪的食欲、精神状况、粪便等情况。

1.5 样品采集制备

为了使胴体尽量少受破坏,肉样采集位置为猪最后肋骨和最后腰椎间的单侧背最长肌,采样 400 g,用于肉品质测定;并在最短的时间内于第 13~16 肋骨间取猪背最长肌样本 30 g,放入锡箔纸中包好,用液氮迅速冷冻,之后放于 -80 °C 保存备用。

1.6 肌肉嫩度测定

采用 C-LM3 型数显式肌肉嫩度仪测定肉样剪切力值,具体试验步骤参考张勇等^[7-8]文献。

1.7 利用 RT-PCR 测定相关蛋白 mRNA 表达量

1.7.1 总 RNA 提取

参照 RNA 提取试剂盒推荐方法,提取猪背最长肌样品总 RNA。提取后的 RNA 用紫外分光光度计在 260 nm 和 280 nm 处测定吸光度值,根据 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 检验纯度,并按如下公式计算 RNA 的浓度:

$$\text{RNA 的浓度 (ng/}\mu\text{L)} = OD_{260\text{ nm}} \times \text{稀释倍数} \times 40.$$

1.7.2 cDNA 合成

按照 RT-PCR 试剂盒操作方法进行。cDNA 合成后放 -20 °C 保存备用。

1.7.3 引物设计与合成

本试验选择 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参,用相对定量的方法,测定肥育猪 P94、NF κB 、I κB 、CAST 的 mRNA 相对表达量。引物均由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司合成,引物序列及参数见表 2。

1.7.4 RT-PCR

β -actin、P94、NF κB 、I κB PCR 扩增反应的反应体系均为 25 μL : TaKaRa SYBR Premix Ex Taq (2 \times) 12.5 μL , 上游、下游引物各 0.5 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), Rox Reference Dye (50 \times) 0.5 μL , 模板 cDNA 溶液 2 μL , RNase-free H_2O 9 μL 。

反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s, 59~63 °C 退火 30 s(具体基因的退火温度见表 2), 72 °C 延伸 45 s, 40 个循环;72 °C 最后延伸 2 min。

表 1 饲料组成及营养水平(风干基础)

Table 1 Composition and nutrient levels of diets (air-dry basis)

%

项目 Items	蛋白质水平 Protein level/%		
	12	16	20
原料 Ingredients			
玉米 Corn	58.12	69.01	83.09
44% 豆粕 44% soybean meal	29.76	18.02	9.03
玉米干酒糟及其可溶物 DDGS	6.00	6.00	
膨化大豆 Expanded soybean	2.00	2.00	2.00
石粉 Limestone	1.17	1.18	0.96
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.56	0.84	1.20
玉米油 Corn oil	0.67	0.67	0.67
食盐 NaCl	0.29	0.42	0.5
预混料 Premix	1.40	1.40	1.40
DL-蛋氨酸 DL-Met		0.04	0.12
65% L-赖氨酸盐酸 65% L-Lys · HCl		0.38	0.81
耐热植酸酶 Thermostable phytase	0.02	0.02	0.02
L-苏氨酸 L-threonine		0.01	0.16
甜味剂 Sweetener	0.02	0.02	0.02
营养水平 Nutrient levels			
消化能 DE/(MJ/kg)	12.89	12.89	12.89
粗蛋白质 CP	20.00	16.00	12.00
可消化赖氨酸 TDlys	0.80	0.80	0.78
可消化蛋氨酸 TDMet	0.31	0.28	0.29
可消化苏氨酸 TDThr	0.64	0.50	0.50
可消化色氨酸 TDTrp	0.18	0.15	0.09
钙 Ca	0.65	0.70	0.70
有效磷 AP	0.28	0.30	0.33

预混料为每千克饲料提供 Premix provided the following per kg of diet: VA 1 300 IU, VD 150 IU, VE 20 mg, VK₃ 0.5 mg, VB₁ 1 mg, VB₂ 2 mg, VB₆ 1 mg, VB₁₂ 0.006 mg, 烟酸 nicotinic acid 7.5 mg, 泛酸 pantothenic acid 7 mg, 叶酸 folic acid 0.3 mg, 生物素 biotin 0.05 mg, 氯化胆碱 choline chloride 300 mg, Fe 50 mg, Zn 50 mg, Cu 3.5 mg, Mn 2.0 mg, I 0.14 mg, Se 0.25 mg, 赖氨酸 lysine 70 g。

1.7.5 电泳

将预先配制好的加溴化乙锭(EB)的1%琼脂糖凝胶融化,冷却至约60℃,倒入装好梳子的胶槽内,使凝胶厚度为5~7mm,待凝胶完全凝固后,小心移去梳子,将凝胶放入装有1×TAE电泳缓冲液的电泳槽中,将5μL PCR产物与1μL电泳上样缓冲液(6×Loading buffer)混合后,点样。同时于样品旁边点5μL DL2000 DNA Maker作为分子量标记,110V电压电泳20min。紫外线下观察结果,并拍照记录。

1.8 数据统计与分析

用中国科学院沈阳应用生态研究所的ABI

Prism 7000 SDS software 1.5进行相对定量分析。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的计算方法计算出目的基因的相对表达量,用SPSS 16.0对数据进行统计分析,并用LSD法和Duncan氏法进行多重比较,结果用平均值±标准差表示。

2 结果

2.1 背最长肌剪切力及P94、NFκB、IκB和CAST mRNA表达量

从表3可见,背最长肌剪切力随饲料蛋白质水平的升高而升高,20%组显著高于12%、16%组($P < 0.05$)。猪背最长肌P94、NFκB mRNA表达

量随饲料蛋白质水平的升高而降低,其中 P94 mRNA 表达量在 20% 组与 12%、16% 组之间差异显著 ($P < 0.05$), 而 NF κ B mRNA 表达量在不同组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。猪背最长肌 I κ B、CAST mRNA 表达量随饲料蛋白质水平的升高而升高,其中 I κ B mRNA 表达量 20% 组与 16% 组之

间差异显著 ($P < 0.05$), 20% 组与 12% 组差异极显著 ($P < 0.01$), 而 CAST mRNA 表达量在 20% 组与 12%、16% 组之间差异极显著 ($P < 0.01$)。所有基因 mRNA 表达量在 16% 组与 12% 组之间差异均不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 引物序列及实时定量 PCR 反应条件

Table 2 Primer sequences and the conditions for real-time PCR

基因 Gene	产物大小 Product size/bp	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperatures/°C
β -肌动蛋白 β -actin	216	上游: TGCGGGACATCAAGGAGAAG 下游: AGTTGAAGGTGGTCTCGTGG	62
骨骼肌特异性蛋白酶 P94	119	上游: AGGCAGATAGCAGGCGATGA 下游: CGGCAGGACTCCAATGTGAA	59
核转录因子 κ B NF κ B	172	上游: TTATTCCCTTAGCGTTCTG 下游: CTGGCGATAGTTCTCCTCCT	60
核转录因子抑制物 I κ B	215	上游: GTTCTGCTCGGTCCCTTGATG 下游: AGTGCCTGTCTTCATTTGC	63
钙蛋白酶抑制蛋白 CAST	102	上游: GGTGAAGAGGACACGATGAG 下游: TCCTTAATGGAGCTGAGGTCAAG	60

表 3 饲料不同蛋白质水平对猪背最长肌剪切力及 P94、NF κ B、I κ B 和 CAST mRNA 相对表达量的影响

Table 3 Effects of dietary protein level on the shear force and P94、NF κ B、I κ B and CAST mRNA relative expression levels of longissimus dorsi in pigs

项目 Items	蛋白质水平 Protein level/%		
	12	16	20
剪切力 Shear force/N	3.405 \pm 0.115 ^a	3.509 \pm 0.172 ^a	3.659 \pm 0.145 ^b
骨骼肌特异性蛋白酶 P94	1.009 \pm 0.145 ^a	0.905 \pm 0.205 ^a	0.690 \pm 0.240 ^b
核转录因子 κ B NF κ B	1.009 \pm 0.148	0.918 \pm 0.103	0.850 \pm 0.107
核转录因子抑制物 I κ B	1.031 \pm 0.276 ^{aA}	1.096 \pm 0.216 ^{aAB}	1.516 \pm 0.282 ^{bB}
钙蛋白酶抑制蛋白 CAST	1.006 \pm 0.250 ^{aA}	1.120 \pm 0.281 ^{aA}	1.751 \pm 0.285 ^{bB}

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean significant difference ($P < 0.01$), while with the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$). The same as below.

2.2 背最长肌剪切力与 P94、NF κ B、I κ B 和 CAST mRNA 表达量相关性

由表 4 可见, 背最长肌剪切力与 P94、NF κ B mRNA 表达量呈负相关, 剪切力随背最长肌 P94、NF κ B mRNA 表达量的降低而升高, 相关系数分别为 -0.453、-0.181, 但相关性不显著 ($P > 0.05$)。背最长肌剪切力与 I κ B mRNA 表达量呈正相关, 剪切力的

值随背最长肌 I κ B mRNA 表达量的升高而升高, 相关系数为 0.513, 相关性显著 ($P < 0.05$)。背最长肌剪切力与 CAST mRNA 表达量呈正相关, 剪切力随背最长肌 CAST mRNA 表达量的升高而升高, 相关系数为 0.816, 相关性极显著 ($P < 0.01$)。

表 4 猪背最长肌剪切力与 P94、NF κ B、I κ B 和 CAST mRNA 相对表达量回归方程Table 4 Regression equations between shear force and mRNA relative expression levels of P94, NF κ B, I κ B and CAST of longissimus dorsi in pigs

与剪切力(x)关系 Relationship with shear force (x)	相关系数 Coefficient correlation	回归方程 Regression equation	P 值 P-value
骨骼肌特异性蛋白酶(y) P94(y)	-0.453	$y = -0.4078x + 3.8678$	0.059
核转录因子 κ B(y) NF κ B(y)	-0.181	$y = -0.2836x + 3.7781$	0.471
核转录因子抑制物(y) I κ B(y)	0.513	$y = 0.3222x + 3.1242$	0.030
钙蛋白酶抑制蛋白(y) CAST(y)	0.816	$y = 0.3987x + 3.0000$	<0.001

2.3 背最长肌 P94、NF κ B、I κ B 与 CAST mRNA 表达量的相关性

由表 5 可见, CAST 与 P94、NF κ B mRNA 表达量呈负相关, 相关系数分别为 -0.496、-0.224,

其中 CAST 与 P94 mRNA 表达量的相关性显著 ($P < 0.05$)。CAST 与 I κ B mRNA 表达量呈正相关, 相关系数为 0.710, 相关性极显著 ($P < 0.01$)。

表 5 猪背最长肌 CAST 与 P94、NF κ B、I κ B mRNA 相对表达量回归方程Table 5 Regression equations for mRNA relative expression levels of CAST and P94, NF κ B and I κ B of longissimus dorsi in pigs

与钙蛋白酶抑制蛋白(x)关系 Relationship with CAST (x)	相关系数 Coefficient correlation	回归方程 Regression equation	P 值 P-value
骨骼肌特异性蛋白酶(y) P94(y)	-0.496	$y = -0.2690x + 1.2119$	0.036
核转录因子 κ B(y) NF κ B(y)	-0.224	$y = -0.0701x + 1.0164$	0.371
核转录因子抑制物(y) I κ B(y)	0.710	$y = 0.5520x + 0.5008$	0.001

2.4 背最长肌 P94、NF κ B、I κ B mRNA 表达量三者之间的相关性

由表 6 可见, P94 与 NF κ B mRNA 表达量呈正相关, 相关系数为 0.550, 随着 P94 mRNA 表达量的增加, NF κ B mRNA 表达量也随之增加, 相关性显著 ($P < 0.05$)。P94 与 I κ B mRNA 表达量呈负

相关, 相关系数为 -0.518, 随着 P94 mRNA 表达量的增加, I κ B mRNA 表达量降低, 相关性显著 ($P < 0.05$)。I κ B 与 NF κ B mRNA 表达量呈负相关, 相关系数为 -0.539, 随着 I κ B mRNA 表达量的增加, NF κ B mRNA 表达量降低, 相关性显著 ($P < 0.05$)。

表 6 猪背最长肌 P94 与 NF κ B、I κ B mRNA 相对表达量回归方程Table 6 Regression equations for mRNA relative expression levels of NF κ B, P94 and I κ B of longissimus dorsi in pigs

项目 Items	相关系数 Coefficient correlation	回归方程 Regression equation	P 值 P-value
核转录因子 κ B(y) 和骨骼肌特异性蛋白酶(x) NF κ B(y) and P94(x)	0.550	$y = 0.3168x + 0.6521$	0.018
核转录因子抑制物(y) 和骨骼肌特异性蛋白酶(x) I κ B(y) and P94(x)	-0.518	$y = -0.7425x + 1.8560$	0.028
核转录因子 κ B(y) 和核转录因子抑制物(x) NF κ B(y) and I κ B(x)	-0.539	$y = -0.2167x + 1.1890$	0.021

3 讨论

3.1 理想蛋白质水平对猪背最长肌剪切力的影响

理想蛋白质是氨基酸平衡最佳的蛋白质。饲料蛋白质不足,肌肉蛋白质合成受阻,未被利用的能量以脂肪的形式沉积下来,使肌内脂肪含量增加;提高饲料蛋白质水平有促进蛋白质沉积的作用。Davey等^[9]发现,用高蛋白饲料饲喂瘦肉型猪,可提高瘦肉率,降低肌肉内脂肪水平,肉的嫩度下降。Goerl等^[10]研究了饲料蛋白质水平对28~104 kg猪肉品质的影响,同样发现,随饲料蛋白质水平的增加,胴体背膘厚下降、瘦肉率增加、肉嫩度下降。张克英等^[11]研究表明,随饲料理想蛋白质水平的提高,肌肉率趋于增加、肌肉脂肪含量显著下降。何若钢等^[12]采用3个能量水平和3个蛋白质水平对生长期特种野猪屠宰性能的影响进行了评定,肌肉剪切力、瘦肉率随饲料蛋白质水平的增加而增加。在本试验中随着饲料蛋白质水平的提高,肌肉剪切力也随之提高,与上述研究结果相一致。低蛋白质水平能提高肉的嫩度,其原因可能是肌肉内脂肪含量的升高和低蛋白质饲料促使体内蛋白质周转加快所致。

3.2 理想蛋白质水平对 CAST 和 P94-NFκB 信号途径相关蛋白 mRNA 表达量的影响

随着营养基因组学的不断发展,营养水平与基因型之间的互作逐步被人们所认识。钙蛋白酶系统在骨骼肌肌丝蛋白降解过程中起到重要作用,存在于绝大多数细胞中^[13]。饲料蛋白质水平会影响动物机体内的蛋白质周转代谢,有可能也会影响骨骼肌中有关蛋白质降解的基因。本试验结果表明,随着饲料理想蛋白质水平的升高,CAST mRNA 表达量显著升高,而 P94 mRNA 表达量显著降低。P94 是 calpains 的成员之一,而 CAST 正是 calpains 的抑制剂,CAST mRNA 表达量的增加或减少必然会引起 calpains mRNA 表达量的减少或增加,这与本试验结果相符合。Senskypl 等^[14]曾研究表明,注射生长激素和饲喂β-兴奋剂克伦特罗均可改变背最长肌 CAST mRNA 表达量,但 P94 与 NFκB 未发生变化,提出生长激素和β-兴奋剂对 CAST mRNA 表达的调控与 P94-NFκB 信号途径无关。本试验中饲料理想蛋白质水平对 P94、IκB mRNA 表达量有显著影

响,但对 NFκB mRNA 表达量无显著性影响,这表明理想蛋白质水平对 P94-NFκB 信号途径存在一定影响,但具体的影响机制还需要进一步研究。

3.3 CAST 和 P94-NFκB 信号途径对肌肉嫩度的影响

肉的嫩度好坏是肌肉内部结构的反映,在一定程度上反映了肌原纤维、结缔组织以及肌肉脂肪的含水量、分布和化学结构^[15]。CAST 是细胞内专一抑制 calpain 活性的蛋白质,CAST 是通过抑制 calpain 的自溶作用而发挥作用的,且这种抑制作用并不受 pH 的影响^[16]。Delgado 等^[17]发现,降解后的 CAST 同样具有抑制 calpain 的活性,并发现肉的嫩化与 CAST 活性及降解速度有关。Melody 等^[18]研究表明,CAST 与肌肉发育之间存在密切关系,CAST 能提高肌肉的嫩度,指出通过调节 calpain 和 CAST 的活性可调节肌肉的发育,从而提高家畜的瘦肉率和产出率,提高肌肉的质量。Koochmarai 等^[19]研究认为,高水平的 CAST 抑制宰后肌肉蛋白水解和嫩化。程丰等^[20]发现,CAST 的基因型与猪肉的嫩度存在相关性,为 CAST 作为猪肉嫩度的候选基因奠定了基础。武艳群等^[21]试验进一步证明 CAST 是一个与肉质相关性非常高的候选基因。曾有试验表明 CAST mRNA 表达量与肌肉嫩度显著相关^[7-8]。本试验结果同样证实 CAST 与肌肉嫩度存在显著相关性,CAST mRNA 表达量的增加降低猪背最长肌嫩度。

P94-NFκB 信号途径与肌细胞凋亡密切相关。Ouali 等^[22]推断,动物宰后应该有一个细胞凋亡的过程,从微观角度看,肌肉的成熟嫩化是肌细胞发生凋亡进而继发性坏死的过程,因此,细胞凋亡与肌肉的成熟嫩化有着密切的关系。P94 是骨骼肌 NFκB 信号途径的上游调节者,调节相关基因表达,维持肌核功能。2A 型脐带型肌营养不良症患者肌肉中 P94 的表达缺陷导致 IκB-α 在患者肌肉中积累,从而减弱 NFκB 对基因表达的调控,导致肌核程序性细胞凋亡^[23]。Ojima 等^[24]探讨了 P94 在骨骼肌细胞信号调节途径中的作用,试验结果指出 P94 受肌纤维的种类、肌纤维的收缩、肌节的成熟化的影响。Kimberly 等^[25]研究发现鼠的肌肉营养失调主要是由 P94 的活性引起的。Murphy 等^[26]在鼠的骨骼肌中发现 P94 的活性与肌纤维密切联系。沙玉圣等^[27]试验证明通过上调半腱肌

P94 mRNA 的表达可显著改善半腱肌的嫩度。但 Parr 等^[28]的研究表明, P94 与猪背最长肌的嫩度并没有直接的关系。本试验结果显示: P94 mRNA 表达量与猪背最长肌嫩度存在负相关性, 但是相关性不显著, 本结果与 Parr 等的结论相符合。本试验结果也显示 NF κ B mRNA 表达量与猪背最长肌嫩度没有相关性, 这表明 P94-NF κ B 信号途径与猪背最长肌嫩度并无明显关系。对于 P94-NF κ B 信号途径与肌肉嫩度的研究国内外鲜见报道, 其间具体的相关性还有待研究。

4 结 论

① 饲料高蛋白质水平提高了猪背最长肌剪切力、降低了肌肉嫩度。

② 饲料高蛋白质水平提高了猪背最长肌 CAST mRNA 表达量; 对 P94-NF κ B 信号途径上游调节者显著降低了 P94 和 I κ B mRNA 表达量分别起到降低和提高的作用。

③ 猪背最长肌剪切力与 I κ B mRNA 表达量呈显著正相关、与 P94、NF κ B mRNA 表达量呈不显著负相关, 表明猪背最长肌 P94-NF κ B 信号途径在肌肉嫩度调控过程中发挥一定作用, 但不是主要途径。

参考文献:

- [1] HUANG J, NEIL E F. Role of calpain in skeletal - muscle protein degradation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95:12100 - 12105.
- [2] HOPKINS D L, THOMPSON J M. Inhibition of protease activity. Part 1. The effect on tenderness and indicators of proteolysis in ovine muscle [J]. Meat Science, 2001, 59:175 - 185.
- [3] ILIAN M A, BEKHIT A E D, STEVENSON B, et al. Up and down-regulation of longissimus tenderness parallels changes in the myofibril-bound calpain 3 protein [J]. Meat Science, 2004, 67:433 - 445.
- [4] LARSEN N J, KENEALY S, TUGGLE C K, et al. Rapid communication: a Hinc II morphism in the porcine calpain, large polypeptide L3 (CAPN3) gene [J]. Journal of Animal Science, 1998, 76:918 - 919.
- [5] MATSUO H, TAMURA M, KABASHIMA N. Prednisolone inhibits hyperosmolarity-induced expression of MCP-1 via NF-kappaB in peritoneal mesothelial cells [J]. Kidney International, 2006, 69 (4): 736 - 746.
- [6] KAFOURY R M, HEMANDEZ J M, LASKY J A, et al. Activation of transcription factor IL-6 (NF-IL-6) and nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by lipid ozonation products is crucial to interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells [J]. Environmental Toxicology, 2007, 22 (2): 159 - 168.
- [7] 张勇, 高彦, 朱宇旌, 等. 不同饲喂方式对猪背最长肌钙蛋白酶抑制蛋白和钙蛋白酶基因表达及剪切力的影响 [J]. 动物营养学报, 2010, 22 (3): 640 - 646.
- [8] 张勇, 李方方, 朱宇旌, 等. 日粮不同蛋白质水平对猪骨骼肌钙蛋白酶抑制蛋白和钙蛋白酶基因表达及嫩度的影响 [J]. 动物营养学报, 2008, 20 (3): 360 - 365.
- [9] DAVEY R J. Growth and carcass characteristics of high-and low-fat swine fed diets varying in protein and lysine content [J]. Journal of Animal Science, 1976, 43:598 - 605.
- [10] GOERL K F, EILERT S J, MANDIGO R W, et al. Pork characteristics as affected by two populations of swine and six crude protein levels [J]. Journal of Animal Science, 1995, 73:3621 - 3626.
- [11] 张克英, 陈代文, 罗献梅, 等. 饲料理想蛋白水平对猪肉品质的影响 [J]. 四川农业大学学报, 2002, 20 (1): 37 - 39.
- [12] 何若钢, 冯誉龄, 李秀宝, 等. 不同能量和但蛋白水平对生长期特种野猪屠宰性能的影响 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009 (4): 112 - 113.
- [13] ILIAN M A, BEKHITA E D, BICKERSTAFFE R. The relationship between meat tenderization, myofibril fragmentation and autolysis of calpain 3 during post-mortem aging [J]. Meat Science, 2004, 66: 387 - 397.
- [14] SENSKYP L, JEWELL K K, RYAN K J, et al. Effect of anabolic agents on calpastatin promoters in porcine skeletal muscle and their responsiveness to cyclic adenosine monophosphate and calcium-related stimuli [J]. Journal of Animal Science, 2006, 84 (11): 2973 - 2982.
- [15] 李德发. 营养调控肉品质量的研究现状及发展趋势 [C] // 动物营养研究进展论文集. 北京: 农业科技出版社, 2004: 7 - 14.
- [16] ROMAN L, HRUSKA U S. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by calpain under postmortem conditions [J]. Journal of Animal Sci-

- ence, 1999(7):685-692.
- [17] DELGADO E F, GEESIN G H, MARCHELLO J A, et al. The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep[J]. *Journal of Animal Science*, 2001, 79:398-412.
- [18] MELODY J L, LONERQAN S M, ROWE L J, et al. Early postmortem biochemical factor influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles[J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82: 1195-1205.
- [19] KOOHMARAIE M, GEESINK G H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system[J]. *Meat Science*, 2006, 74:34-43.
- [20] 程丰, 赵云焕, 易本驰, 等. 猪 CAST 基因 PCR-RFLPs 与肉质相关性的分析[J]. *河南农业科学*, 2006(2):103-106.
- [21] 武艳群, 吴旧生, 赵晓枫, 等. 猪 CAST 基因与肌纤维组织学特性及屠宰性状的相关性分析[J]. *遗传*, 2007, 29(1):65-69.
- [22] OUALI A, HERRERA-MENDEZ C H, COULIS G, et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms[J]. *Meat Science*, 2006, 74:46-48.
- [23] SORIMACHI H, ONO Y, SUZUKI K. Skeletal muscle-specific calpain, p94 and connectin/titin: their physiological functions and relationship to limb-girdle muscular dystrophy type 2A[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2000, 481:383-395.
- [24] OJIMA K, ONO Y, HATA S, et al. Possible functions of p94 in connectin-mediated signaling pathways in skeletal muscle cells[J]. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 2005, 26(6/8):409-417.
- [25] KIMBERLY A, HUEBSCH E K, CHRISYINE M W, et al. Mdm muscular dystrophy: interactions with calpain 3 and a novel functional role for titin's N2A domain[J]. *Human Molecular Genetics*, 2005, 19(14):2801-2811.
- [26] MURPHY R M, VERBURH E, LAMB G D. Ca^{2+} activation of diffusible and bound pools of μ -calpain in rat skeletal muscle[J]. *The Journal of Physiology*, 2006, 576(2):595-612.
- [27] 沙玉圣, 王谭稳, 杨晓静, 等. 半胱胺对育肥山羊生长及肌肉嫩度的影响[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(5):1010-1016.
- [28] PARR T, SENSKY P L, SCOTHERN G P, et al. Relationship between skeletal muscle-specific calpain and tenderness of conditioned porcine longissimus muscle[J]. *Journal of Animal Science*, 1999, 77: 661-668.

Dietary Protein Level Affects the Tenderness and P94-NF κ B Signaling Pathway of Longissimus Dorsi in Finishing Pigs

ZHANG Yong¹ CUI Yan¹ TAO Liang¹ ZHU Yujing¹ DENG Ke¹ SUN Cui¹ SHAO Caimei²

(1. School of Animal Science and Veterinary, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Liaoning Wellhope Agri-Tech Co. Ltd., Shenyang 110164, China)

Abstract: The study was conducted to investigate the effect of dietary ideal protein level on tenderness and mRNA expression levels of P94-NF κ B signaling pathway related to proteins and CAST of longissimus dorsi in finishing pigs. Ninety crossbred pigs (Duroc \times Landrace \times Large white, about 50 kg BW) were randomly allocated into 3 treatments with 3 replicates per treatment and 10 heads per replicate. Pigs in the three treatments were fed diets with the same energy level and ideal protein levels at 12%, 16% and 20%, respectively. All pigs were slaughtered after 58 days experiment and then muscle samples were collected for the analysis of shear force, meanwhile, mRNA expression levels of P94, NF κ B, I κ B and CAST of longissimus dorsi in pigs were determined by real-time PCR. The results showed as follows: 1) there were significant effects of dietary protein level on shear force and the mRNA expression levels of P94, NF κ B, I κ B and CAST of longissimus dorsi ($P < 0.05$); with the increasing of dietary protein level, the shear force and mRNA expression level of I κ B and CAST were increased, but that of P94 and NF κ B were decreased. 2) the shear force was positively correlated with the mRNA expression levels of I κ B (coefficient correlation = 0.513, $P < 0.05$) and CAST (coefficient correlation = 0.816, $P < 0.01$). 3) The mRNA expression level of CAST was negatively correlated with that of P94 (coefficient correlation = -0.496, $P < 0.05$), but positively correlated with that of I κ B (coefficient correlation = 0.710, $P < 0.01$). 4) The mRNA expression level of P94 was positively correlated with that of NF κ B (coefficient correlation = 0.550, $P < 0.05$), but negatively correlated with that of I κ B (coefficient correlation = -0.518, $P < 0.05$); the mRNA expression levels of I κ B and NF κ B were negatively correlated (coefficient correlation = -0.539, $P < 0.05$) to each other. The results indicate that high dietary protein level can increase the shear force and the mRNA expression levels of CAST and I κ B, but decrease the tenderness and the mRNA expression level of P94; P94-NF κ B signaling pathway plays a role in the process of regulating muscle tenderness, but it is not the main pathway. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2011, 23 (8):1342-1350]

Key words: protein level; CAST; P94; NF κ B; muscle tenderness