

纯种与杂种猪肌肉生长相关分子表达的差异分析

章 杰, 罗宗刚*

(西南大学荣昌校区动物科学系, 荣昌 402460)

摘 要: 本研究旨在了解纯种与杂种猪肌肉生长发育过程中存在的分子调控差异, 并分析其对猪胴体和肉质的影响。选用体重 50 kg 左右的纯种杜洛克猪、长白猪和大白猪以及杜长大三元杂交猪为研究对象, 每个重复 6 头猪, 从表型和分子水平上对其背最长肌进行分析。结果表明, 与纯种猪相比较, 杂种猪背最长肌的肌纤维面积、白肌纤维比率、乳酸脱氢酶 A 基因表达量和线粒体 DNA 拷贝数显著提高 ($P < 0.01$); 虽然与纯种猪相比较, 有些基因的表达量在杂种猪背最长肌中的提高或降低不显著 ($P > 0.05$), 但总体上来说, 促进肌纤维生长发育的相关基因 *IGF1*、*PDK1* 和 *GLUT4* 的表达量显著提高 ($P < 0.05$), 抑制肌纤维生长发育的相关基因 *MSTN* 和 *FOXO1* 的表达量显著降低 ($P < 0.05$); 促进白肌纤维转化的相关基因 *PGC1A* 的表达量显著提高 ($P < 0.05$), 抑制白肌纤维转化的相关基因 *MEF2A*、*MYOZ1*、*MRF4* 和 *NFATC1* 的表达量显著降低 ($P < 0.05$); 促进肌纤维增殖的 miR-1 和 miR-133 表达量显著提高了 ($P < 0.01$), 抑制白肌纤维生长的 miR-499 表达量显著降低 ($P < 0.01$)。结果提示, 杂交改善猪的胴体性状是通过改变其分子调控水平来实现的, 但对肉品质有不利影响。

关键词: 猪; 肌肉; 生长; 分子表达

中图分类号: S828; S813.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)12-2370-09

The Molecular Expression Differences of Muscle Growth in Purebred and Crossbred Pigs

ZHANG Jie, LUO Zong-gang*

(Department of Animal Science, Southwest University Rongchang Campus, Rongchang 402460, China)

Abstract: To understand the molecular regulation differences of muscle growth and development in purebred and crossbred pigs, and analyze its effect on carcass and meat quality in pig. Duroc, Landrace, Large White pigs and Duroc × (Landrace × Large White) crossbred pigs with the average body weight of 50 kg were used. Each group was repeated by 6 individuals, and *longissimus dorsi* muscle was collected and analyzed at both phenotypic and molecular levels. The results showed that, compared with the purebred pigs, crossbred pigs had significant higher myofibre cross-sectional area, white myofibre ratio, lactate dehydrogenase A gene expression level and mtDNA copy number ($P < 0.01$); On the whole, the expression level of *IGF1*, *PDK1* and *GLUT4* genes promoting myofibre growth and development in crossbred pigs were significantly increased ($P < 0.05$), the expression level of *MSTN* and *FOXO1* genes inhibiting myofibre growth and development in crossbred pigs were significantly decreased ($P < 0.05$); the expression level of *PGC1A* gene promoting white myofibre conversion in crossbred pigs was significantly increased ($P < 0.05$), the expression level of *MEF2A*, *MYOZ1*, *MRF4* and *NFATC1* genes inhibiting white myofibre conversion in crossbred pigs were significantly decreased ($P < 0.05$); the expression level of miR-1 and miR-133 related to myofibre proliferation in crossbred pigs were significantly increased ($P < 0.01$), while the expression level of miR-499 inhibiting white myofi-

收稿日期: 2016-07-07

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2015C125)

作者简介: 章 杰(1985-), 男, 四川雅安人, 讲师, 博士, 主要从事猪遗传育种研究, E-mail: zhangjie813@163.com

* 通信作者: 罗宗刚, 讲师, E-mail: luozgg@163.com

bre growth in crossbred pigs was significantly decreased ($P < 0.01$). These results suggest that improving carcass traits in pigs through crossbreeding is achieved by changing its molecular regulation level, which had adverse effects on meat quality.

Key words: pig; muscle; growth; molecular expression

哺乳动物的肌肉组织大约占机体组织的 50%，它不仅是主要的运动器官，同时也是家养动物重要的经济性状^[1]。猪作为经济价值较高的家畜之一，产肉率达到 70% 以上，是人类高品质蛋白质的主要来源。目前，在受到各个因素（环境、成本、劳动力）制约的条件下，全球猪肉产量仍保持着逐年增长的稳定态势，这得归功于猪遗传育种改良工作取得的进展，使猪的生长速度和瘦肉率等生长和胴体性状得到了明显的提升^[2]。研究表明，杂交是一种非常有效地提高猪生长速度和胴体性状的方式。D. Franco 等^[3]对杂种塞尔塔猪和纯种塞尔塔猪进行了比较，发现前者的生长速度和胴体性状优于后者，但前者的肌内脂肪含量和剪切力要低于后者。K. Suzuki 等^[4]研究指出杂交可影响脂肪的沉积和品质性状。对猪而言，肌纤维数目在胚胎期 90 天时就已经确定，出生后肌纤维的生长主要是指肌纤维的肥大发育和肌纤维类型的转化^[5]，因此，杂交可能对猪肌肉组织生长发育的分子调控模式存在一定的影响。

针对肌肉组织生长发育的分子调控，前人的研究主要集中于平行比较不同品种之间的差异，而缺乏对纯种与杂交猪的纵向比较，比如 DLY 三元杂交猪，它是世界上应用最广泛、技术最成熟的商品猪配套系。故本试验选取纯种杜洛克猪、长白猪和大白猪及其杂交后代杜长大三元杂交猪为研究对象，分析其肌纤维面积、肌纤维类型比率、肌纤维肥大发育基因和肌纤维类型转化基因之间的差异，旨在了解猪肌肉生长发育的分子基础，同时也为猪的生产实践提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

为了研究猪肌肉的生长发育，本试验选取处于肌肉生长高峰期（体重约 50 kg）的猪背最长肌为研究对象。共 24 只试验猪饲养于重庆地区养殖场，按照国家 NY/T 65-2004 标准进行饲养，其中，纯种杜洛克猪(D)、长白猪(L)、大白猪(Y)及杜洛克×(长白×大白)三元杂交猪(DLY)各 6 头。宰前 24 h 禁

食、供水，宰后立即采集倒数 3~4 肋骨间的背最长肌样品，一部分样品使用 10% 的甲醛溶液固定；另外一部分立即放入液氮中，拿回实验室于 -80 °C 保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 肌纤维面积 将甲醛固定的肌肉组织用 TP1020 半封闭式组织处理机(Leica)包埋进石蜡中，然后使用 RM2135 旋转式组织切片机(Leica)将组织蜡块切成 6 μm 的薄片，采用苏木精 & 伊红对其染色(H&E)。最后使用 TE2000 荧光显微镜(Nikon)和 Image Pro-Plus 7.0 图像处理软件(Media-Cybernetics)随机选择 100 根肌纤维，统计出其平均直径后进行肌纤维面积的计算。

1.2.2 肌纤维类型比率 肌纤维类型测定采用 J. Ma 等报道的 qRT-PCR 定量法^[6]，采用肌肉中不同类型的肌球蛋白重链所对应的基因表达量所占比例进行计算，红肌纤维(MYH7 和 MYH2)，中间型肌纤维(MYH1)和白肌纤维(MYH4)^[7]。MHC 亚型比率的计算采用如下公式： $MHC \text{ 亚型} / (MYH1 + MYH2 + MYH4 + MYH7) \times 100\%$ 。

1.2.3 总 RNA 和 DNA 的提取 取肌肉组织 100 mg 于液氮中研磨，使用 TRIzol 试剂(TaKaRa)提取组织总 RNA，然后利用 RNeasy 柱(Qiagen)进行纯化。肌肉组织总 DNA 的提取按照 TIANamp 基因组 DNA 提取试剂盒(Tiangen)说明书进行操作。总 RNA 和 DNA 提取完成后，均利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳确认其完整性，-80 °C 保存备用。

1.2.4 qRT-PCR 定量

1.2.4.1 mRNA 定量分析:按照说明书使用 PrimeScript RT Master Mix kit(TaKaRa)试剂盒合成 cDNA，猪 GAPDH 基因作为内参，利用 SYBR Premix Ex Taq kit(TaKaRa)试剂盒在 CFX96 Real-Time PCR 检测系统(Bio-Rad)上进行 mRNA 的定量。反应体系(20 μL): GoTaq[®] qPCR Master Mix(10 μL)，Forward primer(0.4 μL)，Reverse primer(0.4 μL)，Nuclease-Free Water(9.2 μL)。反应参数:预变性 95 °C 2 min;变性 95 °C 15 s;退火/延伸 60 °C 1 min,40 个循环;熔解曲线:95 °C

15 s, 60 °C 15 s, 95 °C 15 s。mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。mRNA 定量引物序列见表 1。

表 1 mRNA 基因定量引物序列*

Table 1 Primer sequences of mRNA genes used in qRT-PCR*

基因 Gene symbol	NCBI 参考序列 NCBI reference sequence	引物序列 (5'→3') Primer sequence	产物长度/bp Product size	退火温度/°C Annealing temperature
<i>MYH1</i>	NM_00110495.1	F: ACTCTGGCTTTCCTCTTCACT R: TTGCCACCTTTCCTTCCACCT	71	56
<i>MYH2</i>	NM_214136.1	F: GGCCCTTTGATGCCAAGACA R: GGGTTGACGGTGACACAGAA	295	56
<i>MYH4</i>	NM_001123141.1	F: GTGCCCTGCTGCCATCAATA R: GACTTTCGGAGGTAAGGAGC	89	56
<i>MYH7</i>	NM_213855.1	F: GAAGGTGGGCAACGAATA R: TGCTTGGTCTCCAGGGTG	141	58
<i>LDHA</i>	NM_001172363.2	F: TCTTGACCTATGTGGCTTGG R: AGCACTGTCCACCACCTGTT	290	60
<i>IGF1</i>	NM_214256.1	F: CTGGTGGACGCTCTTCAGTT R: ACATCTCCAGCCTCCTCAGA	151	60
<i>PDK1</i>	NM_001159608.1	F: AATCACCAGGACAGCCAATA R: CTCGGTCACTCATCTTCACA	186	58
<i>MYOZ1</i>	NM_001025222.2	F: GGGGCTCTAAGATGTTCAA R: TGTAGGAGAATCCCTGACC	159	56
<i>MSTN</i>	NM_214435.2	F: AACAGCGAGCAAAAAGGAAAA R: ATCAATCAGTTCCCGGAGTG	201	60
<i>MRF4</i>	NM_001244672.1	F: CTTGAGGGTGCGGATTTCTCTG R: CTGAAGACTGCTGGAGGCTG	132	60
<i>PGC-1α</i>	NM_21396.3	F: ATCACCACCCAAATCCTTAT R: CCCTTTCAGACTCCCCTTC	332	60
<i>MEF2A</i>	NM_001097421.1	F: GACCCTGATACTTCCTATGTGC R: TGAACTCCCTGGGTTAGTGTAG	189	60
<i>NFATC1</i>	NM_214161.1	F: CTGTGCAAGCCGAATTCCTT R: AGGCAGGTAGGTGAAATGCT	138	58
<i>FOXO1</i>	NM_214014.2	F: GCTTTACAAGTGCCCTCTGCC R: TCTCCATCCATGAGGTTCGTT	197	58
<i>GLUT4</i>	NM_001042.2	F: CGTCGGGCTTCCAACAGATAG R: GAGTAGGCGCCAATGAGGAAT	442	60
<i>GAPDH</i>	NM_001206359.1	F: CTGGGCTACACTGAGCACC R: AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG	101	60

*. 引物序列利用在线软件 Primer3 进行设计。F. 上游引物; R. 下游引物。下同

*. Primer sequences are designed using online software Primer3. F. Forward primer; R. Reverse primer. The same as below

1.2.4.2 miRNA 定量分析:利用 SYBR Prime-Script miRNA RT-PCR Kit (TaKaRa) 试剂盒在 CFX96 Real-Time PCR 检测系统 (Bio-Rad) 上进行 miRNA 的定量。Met-tRNA、18S rRNA 和 5S rRNA 作为内参 miRNA^[8]。反应体系 (20 μ L):2 \times miRNA qPCR master mix 10 μ L, 上游引物 0.5 μ L, 下游引物 0.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L, RNase-free water 8 μ L。反应参数:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s; 60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s, 40 个循环; 熔解曲线:95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。miRNA 相对表

达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。miRNA 定量引物序列见表 2。

1.2.4.3 线粒体 DNA 拷贝数分析:依照前人的报道^[9]使用 qRT-PCR 法检测每个二倍体细胞线粒体 DNA 拷贝数。定量检测线粒体 DNA 特异基因 ATP6、COX1 和 ND1, 单拷贝核 DNA 基因 GCG 作为内参。反应体系和参数见 1.2.4.1。每个细胞线粒体 DNA 拷贝数的计算:(线粒体 DNA 特异基因拷贝数)/(GCG 基因拷贝数)。线粒体 DNA 特异基因定量引物序列见表 3。

表 2 miRNA 定量引物序列

Table 2 Primer sequences of miRNAs used in qRT-PCR

miRNA 名称 miRNA name	正向引物 (5'→3') Forward primer	反向引物 (5'→3') Reverse primer
ssc-miR-133a-5p	AGCTGGTAAAATGGAACCAAAT	
ssc-miR-499-5p	TTAAGACTTGCAGTGATGTTT	试剂盒提供的通用引物
ssc-miR-1	TGGAATGTAAAGAAGTATGTAT	
5S rRNA	GCCCGATCTCGTCTGATCT	AGCCTACAGCACCCGGTATT
18S rRNA	TTTCGCTCTGGTCCGTCTTG	TTCGGAAGTGGAGCCATGAT
Met-tRNA	CAGAGTGGCGCAGCGGAAGC	CGATCCATCGACCTCTGGGTTATG

表 3 线粒体 DNA 特异基因定量引物序列

Table 3 Primer sequences of mitochondrial DNA-specific genes used in qRT-PCR

基因 Gene symbol	NCBI 参考序列 NCBI reference sequence	引物序列 (5'→3') Primer sequence	产物长度/bp Product size	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature
ND1	NC_000845.1 (3922..4876)	F: GCCACATCCTCAATCTCCAT R: GATTAGAGGGTAGGGTATTGGTAG	220	56
COX1	NC_000845.1 (6511..8055)	F: ACTACTGACAGACCGCAACC R: TCCAATGGACATTATGGCTC	123	60
ATP6	NC_000845.1 (9120..9800)	F: TATTTGCCTCTTTTCATTGCCC R: GGATCGAGATTGTGCGGTTAT	198	60
GCG	NM_214324.1	F: GAATCAACACCATCGGTCAAAT R: CTCCACCCATAGAATGCCAGT	151	60

1.3 统计分析

上述所有试验均设置空白对照和 6 个生物学重复。数据处理采用 SPSS 18.0 软件对纯种猪 (D、L 和 Y) 和杂种猪 (DLY) 进行 student's *t* 检验比较差异是否显著, * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), ns 表示差异不显著 ($P >$

0.05)。结果均表示为“平均值 \pm 标准差”。

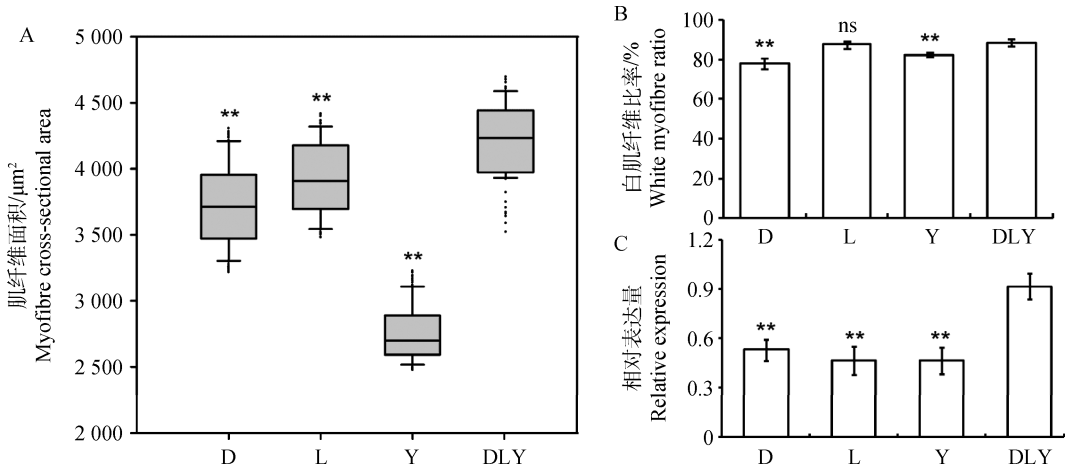
2 结果

2.1 肌肉表型特征

如图 1A 所示, DLY 的肌纤维面积均显著高于 D、L 和 Y ($P < 0.01$), 说明杂交促进了猪肌纤维面

积的增长。如图 1B 所示, DLY 白肌纤维比率显著高于 D 和 Y ($P < 0.01$), 同时也高于 L, 但不显著 ($P > 0.05$), 说明杂交提高了猪背最长肌中白肌纤维的比率。乳酸脱氢酶 A (LDHA) 是反映肌肉糖酵

解能力的关键代谢酶, 对肉质也具有显著影响。如图 1C 所示, DLY 的 LDHA 基因表达量均显著高于 D、L 和 Y ($P < 0.01$), 说明杂交提高了猪背最长肌中丙酮酸生成乳酸的能力。



A. 肌纤维面积; B. 白肌纤维比率; C. LDHA 基因相对表达量。* . $P < 0.05$; * * . $P < 0.01$; ns. 没有显著差异。下同

A. Myofiber cross-sectional area; B. White myofiber ratio; C. Relative LDHA gene expression level. * . $P < 0.05$; * * . $P < 0.01$; ns. No significant difference. The same as below

图 1 纯种猪与杂种猪背最长肌特征

Fig. 1 The characterization of longissimus dorsi muscle in purebred and crossbred pigs

2.2 肌纤维肥大相关基因的表达

肌纤维的生长发育过程受到环境、营养和遗传等因素的多重影响, 其中遗传因素对其影响最大, 研究也证实了许多基因的表达量对肌纤维的生长发育具有重要的调控作用。如图 2 所示, 促进肌肉生长发育的基因 IGF1 在 DLY 的表达量显著高于 Y ($P < 0.05$); PDK1 基因在 DLY 的表达量显著高于 D ($P < 0.01$)、L ($P < 0.05$) 和 Y ($P < 0.01$); GLUT4

基因在 DLY 的表达量显著高于 D ($P < 0.01$) 和 L ($P < 0.01$); 虽然 DLY 与有些纯种猪相比基因的表达量变化不显著 ($P > 0.05$), 但在 DLY 的表达量均高于纯种猪。相反, 抑制肌肉生长发育的基因 MSTN 在 DLY 的表达量显著低于 D、L 和 Y ($P < 0.01$); FOXO1 基因在 DLY 的表达量显著低于 Y ($P < 0.01$); 与有些纯种猪相比, DLY 基因的表达量变化不显著 ($P > 0.05$), 但也均低于纯种猪。

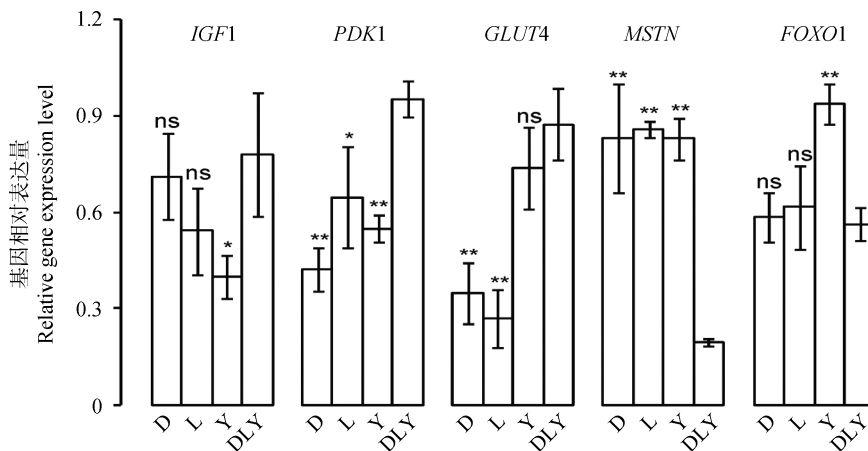


图 2 纯种猪与杂种猪中肌纤维生长发育相关基因的表达

Fig. 2 The relative expression level of myofiber development-related genes in purebred and crossbred pigs

2.3 肌纤维类型转化相关基因的表达

肌纤维在生长发育过程中经历了一个收缩能力分化的过程,导致肌束中肌纤维类型的不同,研究表明一些分子的表达量与肌肉纤维类型相关。如图 3 所示,促进肌纤维向白肌纤维转化的基因 *PGC1A* 在 DLY 的表达量显著高于 D、L 和 Y ($P < 0.01$)。相反,抑制肌肉向白肌纤维转化的基因 *MEF2A* 在 DLY 的表达量显著低于 D ($P < 0.01$)、L ($P < 0.05$) 和 Y ($P < 0.05$); *MYOZ1* 基因在 DLY 的表达量显著低于 D 和 Y ($P < 0.01$); *MRF4* 基因在 DLY 的表达量显著低于 D ($P < 0.01$)、L ($P < 0.01$) 和 Y ($P < 0.05$); *NFATC1* 基因在 DLY 的表达量显著低于 D

($P < 0.05$)、L ($P < 0.01$) 和 Y ($P < 0.01$); 其中,有些基因的表达量在 DLY 中要低于纯种猪,但并未达到显著水平 ($P > 0.05$)。

2.4 肌纤维生长发育相关 miRNA 的表达

研究指出,miRNA 可通过与靶 mRNA 分子的碱基特异性配对,引起 mRNA 降解或翻译抑制,对基因进行转录后的调控,达到参与调节肌肉生长发育及生理病理过程的目的。目前,许多与肌肉生长发育相关的 miRNA 被鉴定出来。如图 4 所示,促进肌纤维增殖的 miR-1 和 miR-133 在 DLY 的表达量显著高于 D、L 和 Y ($P < 0.01$),抑制白肌纤维生长的 miR-499 在 DLY 的表达量显著低于 D、L 和 Y ($P < 0.01$)。

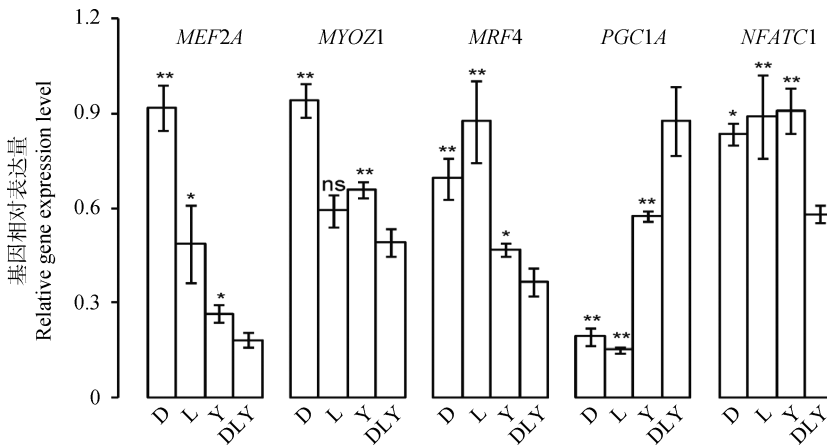


图 3 纯种猪与杂种猪中肌纤维类型相关基因的表达量

Fig. 3 The relative expression level of myofibre type-related genes in purebred and crossbred pigs

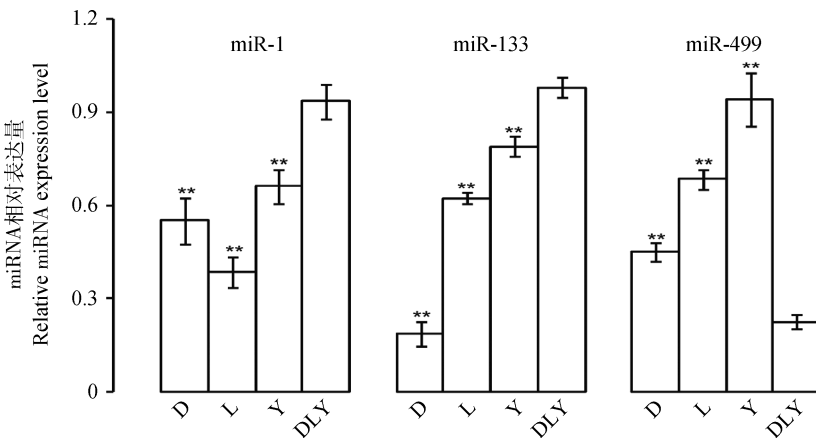


图 4 纯种猪与杂种猪中肌纤维生长发育相关 miRNA 的表达量

Fig. 4 The relative expression level of myofibre development-related miRNAs in purebred and crossbred pigs

2.5 肌纤维线粒体 DNA 拷贝数

肌肉是重要的能量代谢器官,其代谢能力与线粒体 DNA 拷贝数相关。如图 5 所示,DLY 线粒体

DNA 拷贝数均显著高于 D、L 和 Y ($P < 0.01$),说明杂交提高了猪背最长肌的能量代谢能力。

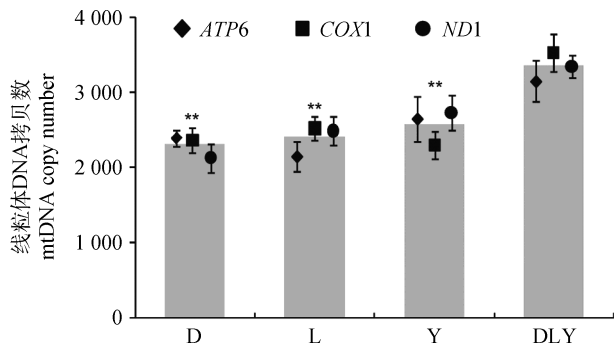


图5 纯种猪与杂种猪背最长肌线粒体 DNA 拷贝数
Fig. 5 The mtDNA copy number of longissimus dorsi muscle in purebred and crossbred pigs

3 讨论

猪是重要的家畜动物,在人类的生活中起着举足轻重的作用,尤其是为人类提供高品质的肉制品。肌肉作为猪的重要经济性状,占到猪体重的 50% 左右,其生长速度和产出率决定了猪的商品价值。本研究就以处于快速生长发育阶段的猪(体重约 50 kg)背最长肌为研究对象,比较分析了纯种猪(D、L、Y)与杂种猪(DLY)的肌纤维表型、肌纤维生长发育和肌纤维类型转化相关功能基因表达水平以及线粒体 DNA 拷贝数的差异,从表型和分子水平上揭示引起猪肌肉生长发育差异的理论基础,为猪的分子育种提供理论依据。

3.1 纯种猪与杂种猪肌肉表型差异

研究证实,通过杂交使猪生长速度和瘦肉率等生长和胴体性状方面得到了明显改良,但猪肉品质性状却出现了急剧下降。肌纤维面积与胴体性状间存在极显著的正相关,即肌纤维面积越大则胴体性状越好,但对肉质则有不利的影 响。肌纤维面积是影响肌肉嫩度和系水力的重要指标,肌纤维面积越大,肌内脂肪的沉积量越低,从而导致肌肉嫩度和系水力下降^[10]。另外,肌纤维类型与肉质性状也具有密切的关系。动物屠宰后,肌肉中的糖原发生酵解产生乳酸,最终导致 pH 降低。白肌纤维中 ATP 酶活性和糖原含量较高,糖原发生酵解的速度和能力较高,使肌肉中乳酸大量积聚引起 pH 大幅度下降,进而导致蛋白质变性。研究还指出白肌纤维比率越高,磷脂含量越低,风味越差^[11]。乳酸脱氢酶是糖酵解过程中催化丙酮酸生成乳酸的酶,其基因表达量越高,催化丙酮酸的能力越大,产生的乳酸越多,

导致肌肉 pH 偏低。G. Otto 等研究也指出 LDHA 基因能够影响 pH 和肉色等肉质指标^[12]。本研究结果与前人的结论相一致,合理地解释了杂种猪的肉质为什么较纯种猪差。

3.2 纯种猪与杂种猪肌纤维生长发育相关基因表达量差异

肌纤维的生长发育过程包括肌纤维的肥大和肌纤维类型的转化两个方面,该过程主要由正向和负向调控因子进行双向调节来实现,而关键因子的基因表达量则决定了其调节活性的高低。本研究结果显示,促进肌肉生长发育的基因在杂种猪中高于纯种猪,而抑制肌肉生长发育的基因在杂种猪低于纯种猪,表明杂种猪肌肉蛋白质的合成能力比纯种猪高,故杂种猪胴体性状要优于纯种猪。其中 IGF1 基因能刺激生长激素的合成,在调控肌肉的肥大发育过程中发挥着重要的作用。研究表明,IGF1 基因表达量的提高可以刺激肌卫星细胞的增殖和肌肉的再生长,其机制是增强翻译起始和延伸来加速肌肉中蛋白质的合成^[13-14]。A. F. Aguiar 等研究指出肌纤维面积与 IGF1 基因表达量呈极显著正相关^[15],这与本研究结果是一致的。此外,IGF1 基因在调节肉质和肌肉生长发育方面具有重要的潜力,故可在分子水平上作为动物肌肉生长发育的遗传和营养模型^[16]。PDK1 基因能够激活核糖体蛋白 S6 激酶进而促进蛋白质合成^[17]。肌肉是利用葡萄糖的主要组织,故葡萄糖的跨膜转运是肌肉葡萄糖代谢的限速步骤。GLUT4 基因编码的葡萄糖转运体可与葡萄糖结合后转运至细胞内储存^[18]。MSTN 和 FOXO1 基因是肌纤维生长发育的主要负调控因子。MSTN 基因可抑制细胞的增殖、葡萄糖的吸收、DNA 和蛋白质的合成,从而抑制肌肉的生长^[19]。FOXO1 基因主要是通过抑制生肌因子的表达来组织肌肉细胞的分化^[20]。此外,本研究中背最长肌是典型的白肌,主要由白肌纤维构成,从表型上可以看出杂种猪的白肌纤维比率要高于纯种猪,这与分子水平的数据结果是相一致的,促进白肌纤维转化的基因在杂种猪中高表达,抑制白肌纤维转化的基因在杂种猪中低表达。在小鼠上的研究表明,MEF2A 基因编码的蛋白可与快肌纤维基因启动子区的顺式因子结合,影响其转录效率从而调节肌纤维类型的组成^[21]。MYOZ1 基因可通过抑制钙调神经磷酸酶的活性来增加快肌纤维类型的转化^[22]。NFATC1 基因编码蛋白可作用于多种表达 I 型肌

纤维的基因,并增加其表达水平^[23]。PGC1A 基因可抑制 II 型肌纤维的转录,但可激活 I 型肌纤维的转录,并且能够有效诱导线粒体的生物合成,使线粒体生物氧化能力增强^[24],这与杂种猪线粒体 DNA 拷贝数高于纯种猪的结果是一致的。

3.3 纯种猪与杂种猪肌纤维生长发育相关 miRNA 表达量差异

猪作为重要的肉用动物,其肌肉生长发育的基因调控机理已日益引起更多的关注。研究表明,miRNA 是基因表达调控机制中重要的方式,故研究 miRNA 在肌肉生长发育中的作用机理已成为热点问题。本研究比较了 miR-1、miR-133 和 miR-499 在纯种和杂种猪中的表达差异,均与前人报道的生物学功能相一致,同时也反映了表型上的差异。研究表明,miR-1 和 miR-133 在心的发育过程中呈现上调表达的趋势,其中 miR-133 主要是通过抑制血清因子来促进肌细胞的增殖^[25];miR-499 在肌纤维的分型中,主要起着抑制快肌生长,促进慢肌生长的作用^[26]。上述结果说明,将来对肌肉生长发育的研究不能仅局限于基因表达,还要对基因调控机理进行深入的研究,比如 miRNA、甲基化、磷酸化等。

3.4 纯种猪与杂种猪肌纤维线粒体 DNA 拷贝数差异

肌肉组织是重要的运动器官,其运动能力主要由能量代谢过程决定。糖酵解在维持肌肉的生理学功能中扮演着重要的作用,其能量代谢过程主要在线粒体中进行。前人的研究指出线粒体 DNA 拷贝数能够反映线粒体的能量代谢能力,蛋白质合成能力越强的组织线粒体 DNA 拷贝数越高^[13]。本研究中,DLY 的线粒体 DNA 拷贝数显著高于 D、L 和 Y,说明杂种猪的蛋白质合成能力和肌纤维生长发育速度高于纯种猪,这与 DLY 的胴体性状好和肉质性状差的结果是一致的。由于实际生产实践中对猪胴体和肉质性状测定的繁复性,可考虑选择测定肌肉线粒体 DNA 拷贝数来间接比较不同品种猪胴体和肉质性状的差异。

参考文献 (References):

[1] ZHANG J, ZHOU C, MA J, et al. Breed, sex and anatomical location-specific gene expression profiling of the porcine skeletal muscles [J]. *BMC Genet*, 2013, 14: 53.

[2] MOELLER S J, CRESPO F L. Overview of world swine and pork production [J]. *Agr Sci*, 2009, 1:

195-208.

- [3] FRANCO D, VAZQUEZ J A, LORENZO J M. Growth performance, carcass and meat quality of the Celta pig crossbred with Duroc and Landrace genotypes [J]. *Meat Sci*, 2014, 96(1): 195-202.
- [4] SUZUKI K, SHIBATA T, KADOWAKI H, et al. Meat quality comparison of Berkshire, Duroc and crossbred pigs sired by Berkshire and Duroc [J]. *Meat Sci*, 2003, 64(1): 35-42.
- [5] MAI M, JIN L, TIAN S, et al. Deciphering the microRNA transcriptome of skeletal muscle during porcine development [J]. *PeerJ*, 2016, 4: e1504.
- [6] MA J, WANG H, LIU R, et al. The miRNA transcriptome directly reflects the physiological and biochemical differences between red, white, and intermediate muscle fiber types [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 9635-9653.
- [7] SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Fiber types in mammalian skeletal muscles [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(4): 1447-1531.
- [8] LI M, XIA Y, GU Y, et al. MicroRNAome of porcine pre- and postnatal development [J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11541.
- [9] WANG J, JIANG J, FU W, et al. A genome-wide detection of copy number variations using SNP genotyping arrays in swine [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 273.
- [10] AN J Y, ZHENG J X, LI J Y, et al. Effect of myofiber characteristics and thickness of perimysium and endomysium on meat tenderness of chickens [J]. *Poult Sci*, 2010, 89(8): 1750-1754.
- [11] KARLSSON A H, KLONT R E, FERNANDEZ X. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality [J]. *Livest Prod Sci*, 1999, 60(2-3): 255-269.
- [12] OTTO G, ROEHE R, LOOFT H, et al. Associations of DNA markers with meat quality traits in pigs with emphasis on drip loss [J]. *Meat Sci*, 2007, 75(2): 185-195.
- [13] ZHANG J, MA J, LONG K, et al. Dynamic gene expression profiles during postnatal development of porcine subcutaneous adipose [J]. *Peer J*, 2016, 4: e1768.
- [14] BODINE S C, STITT T N, GONZALEZ M, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo* [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(11): 1014-1019.
- [15] AGUIAR A F, VECHETTI-JÚNIOR I J, ALVES

- DE SOUZA R W, et al. Myogenin, MyoD and IGF-I regulate muscle mass but not fiber-type conversion during resistance training in rats[J]. *Int J Sports Med*, 2013, 34(4): 293-301.
- [16] DUCLOS M J. Insulin-like growth factor-I (IGF-1) mRNA levels and chicken muscle growth[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2005, 56(Suppl 3): 25-35.
- [17] LAWLOR M A, MORA A, ASHBY P R, et al. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice[J]. *EMBO J*, 2002, 21(14): 3728-3738.
- [18] ABEL E D, PERONI O, KIM J K, et al. Adipose-selective targeting of the *GLUT4* gene impairs insulin action in muscle and liver[J]. *Nature*, 2001, 409(6821): 729-733.
- [19] ANTONY N, BASS J J, McMAHON C D, et al. Myostatin regulates glucose uptake in BeWo cells[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293(5): E1296-E1302.
- [20] ALLEN D L, UNTERMAN T G. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(1): C188-199.
- [21] ALLEN D L, WEBER J N, SYCURO L K, et al. Myocyte enhancer factor-2 and serum response factor binding elements regulate fast Myosin heavy chain transcription *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(17): 17126-17134.
- [22] FREY N, RICHARDSON J A, OLSON E N. Calcisarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(26): 14632-14637.
- [23] CALVO S, VENEPALLY P, CHENG J, et al. Fiber-type-specific transcription of the troponin I slow gene is regulated by multiple elements[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(1): 515-525.
- [24] LIN J, WU H, TARR P T, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres[J]. *Nature*, 2002, 418(6899): 797-801.
- [25] KUSAKABE R, TANI S, NISHITSUJI K, et al. Characterization of the compact bicistronic microRNA precursor, miR-1/miR-133, expressed specifically in Ciona muscle tissues[J]. *Gene Exp Patterns*, 2013, 13(1-2): 43-50.
- [26] VAN ROOIJ E, QUIAT D, JOHNSON B A, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(5): 662-673.

(编辑 郭云雁)