

低温环境对猪不同肌肉组织线粒体的影响

张冬杰,汪亮,李忠秋,王文涛,何鑫淼,吴赛辉,刘娣

(黑龙江省农业科学院 畜牧研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:猪是对外界环境温度较为敏感的一种恒温动物。为了探讨低温环境对猪肌肉组织线粒体的影响以及民猪与大白猪间的代谢差异,以民猪(耐寒品种)和大白猪(非耐寒品种)为试验材料,采用 Real-time PCR 的相对定量方法,检测了轻度和重度冷处理下两个猪种的腓肠肌、比目鱼肌及趾长伸肌线粒体 DNA 变化情况。结果表明:轻度冷处理下,民猪腓肠肌、比目鱼肌和趾长伸肌的 mtDNA 表达量均出现了明显的下降,而大白猪则表现为不变或略有上升。重度冷处理下,民猪的腓肠肌显著下降,民猪和大白猪其余的肌肉组织均表现为显著上升,而且比目鱼肌的上升倍数最大。据此认为,轻度冷处理下,民猪各肌肉组织的代谢模式不同于大白猪的;重度冷处理下,以红肌为主的比目鱼肌是颤栗性产热的主要肌肉组织,推测低温环境会诱导肌纤维类型的转化。

关键词:民猪;大白猪;肌肉组织;线粒体 DNA;实时定量 PCR

中图分类号:S828 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)05-0062-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.05.0062

低温环境或冷应激是养猪生产中经常会遇到的一种自然灾害,有报道称,在冷应激初期,机会会通过肌肉的颤栗产热维持体温,随着低温环境的持续作用,机会会改为非颤栗产热即代谢产热维持体温^[1]。本课题组在前期研究中发现,无论民猪还是大白猪,在持续的重度低温环境下,除了代谢产热(背部脂肪变薄)外,始终存在颤栗性产热。肌肉是颤栗性产热的主要组织器官,根据特异肌球蛋白重链亚型的不同,可将其分为4类,即I,IIa,IIx和IIb型^[2]。虽然肌纤维数目在出生时已确定,但肌纤维类型的组成并非固定不变,外界环境刺激、营养条件以及运动训练等,都会引起肌纤维类型的相应改变^[3],同时,这4种类型的肌纤维其线粒体含量也存在显著差异^[4],线粒体作为细胞的“动力车间”,为机体提供能量,同时也是物质代谢的重要场所,推测其在机体的颤栗性产热中发挥着重要作用,但相关研究一直未见报道。直接检测线粒体数量变化情况,实验方法繁琐,准确性低,在参考前人研究方法的基础上^[5-6],本研

究采用实时定量PCR方法,对线粒体DNA(mtDNA)进行定量测定,以分析低温环境对线粒体数量的影响。

民猪是黑龙江省的一个地方品种,属于脂肪型猪种,耐寒性是它不同于我国其它地方猪种的一个显著特征,大白猪是一个引入品种,属于瘦肉型猪种,适合集约化饲养,对低温环境敏感,不耐寒。本研究将民猪和大白猪作为试验材料,分析和探讨不同程度的低温环境对猪不同类型肌肉组织线粒体数量的影响,以期初步解释颤栗性产热下的线粒体能量代谢情况。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为民猪和大白猪,由黑龙江省农业科学院畜牧研究所民猪保种场提供。

1.2 方法

于2014年2月17日至3月3日期间,选择体重相近、身体健康的5月龄民猪和大白猪各9头,分别被随机分成3组,每组3头,其中第1组设为对照组(C),置于加热的舍内饲养,温度控制在 $(18\pm 2)^{\circ}\text{C}$,第2组设为轻度低温组(L1),置于无加热的舍内饲养,温度控制在 $(8\pm 2)^{\circ}\text{C}$,第3组设为重度低温组(L2),置于敞篷舍内饲养,舍内温度与外界环境温度一致,具体温度变化见图1。处理结束后,屠宰,取比目鱼肌、腓肠肌和趾长伸肌,置于液氮中带回实验室, -80°C 冰箱保存。

收稿日期:2017-03-18

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划资助项目(2015BAD03B02-5);国家生猪产业体系岗位科学家资助项目(CARS-36);黑龙江省科研机构创新能力提升专项资助项目(YC2016D001)

第一作者简介:张冬杰(1980-),女,黑龙江省桦南县人,博士,副研究员,从事猪分子遗传育种研究。E-mail: djzhang8109@163.com。

通讯作者:刘娣(1963-),女,博士,教授,博士生导师,从事猪遗传育种与繁殖研究。E-mail: liudi1963@163.com。

1.2.1 肌肉组织 DNA 的提取 使用 Qiagen 公司生产的 DNA 抽提试剂盒,提取肌肉组织的全基因组 DNA(包括 mtDNA)。所提取的 DNA 溶于 TE 缓冲液,通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,使用分光光度计测定其浓度,并将浓度全部调至 $150\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

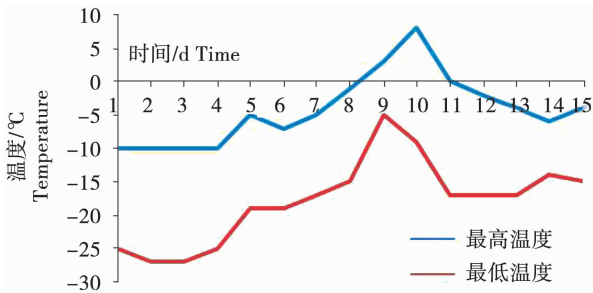


图 1 试验组 L2 的舍内温度

Fig. 1 Indoor temperature of experimental group L2

1.2.2 PCR 引物设计与合成 *MT-ND1* 基因荧光定量 PCR 用上游引物序列为:5'-AGCATC-CAACTCAAATACGCACTC-3',下游引物序列为:5'-AGGGGTCAGGATGTAAAGAT-TATTCAA-3',扩增片段长 180 bp。扩增 *MT-ND1* 标准品用上游引物序列为:5'-CCAGGCA-CATCCTCAATCTCCA-3',下游引物序列为:5'-TGCTATGAAGAATATGGCGAAAGGT-3',扩增片段长 492 bp。核 *β globin* 基因荧光定量 PCR 用上游引物序列为:5'-GGCAGGTTGG-TATCCAGGGCTTCA-3',下游引物序列为:5'-TGCCCTTGAGGTTGTCGAGATGT-3',扩增片段长 283 bp。扩增 *β globin* 标准品用上游引物序列为:5'-GGCAAAGTGAATGTGGACGAA-GT-3',下游引物序列为:5'-ATGACCAAGGAG-CAGAAGGAGAA-3',扩增片段长 429 bp。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 标准品的制备 PCR 反应体系 $50\text{ }\mu\text{L}$:Takara *rTaq* 酶($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$,PCR 缓冲液 $25\text{ }\mu\text{L}$,dNTP 混合物(2.5 mM) $8\text{ }\mu\text{L}$,DNA 100 ng ,上、下游引物($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $2\text{ }\mu\text{L}$,加去离子水至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 s ,30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min 。*MT-ND1* 和 *β globin* 的 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化后,分别克隆至 pMD18-T 载体中,转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,

挑取阳性克隆,经 PCR 和 DNA 测序鉴定,筛选出含有插入片段的质粒。使用 Qiagen 的质粒抽提试剂盒小量提取质粒,测定质粒浓度。

1.2.4 扩增效率的测定及待测样品中 *MT-ND1* 和 *β globin* 基因定量检测 将获得的 2 个克隆质粒分别按等比例稀释(取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 质粒+ $9\mu\text{L}$ 水,得 10^{-1} 标准品;取 $1\text{ }\mu\text{L}$ 10^{-1} 标准品+ $9\mu\text{L}$ 水,得 10^{-2} 标准品,同理依次稀释 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,共 5 个浓度梯度)。Mx3000P 荧光定量 PCR 仪上同时进行不同梯度浓度的标准品 PCR 扩增及待测样品中 *MT-ND1* 和 *β globin* 基因检测,绘制标准曲线。扩增效率(E)根据标准曲线的斜率进行计算,公式为 $E=10^{(-1/\text{斜率})}$ 。

荧光定量 PCR $20\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系:SYBR Premix Ex *Taq*($2\times$) $10\text{ }\mu\text{L}$,PCR 上游引物和下游引物($10\text{ }\mu\text{M}$)各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,模板 $0.8\text{ }\mu\text{L}$,加去离子水至 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。两步法 PCR 扩增,程序如下: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min ; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min ,40 个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 。

1.2.5 数据计算与分析 判断基因扩增效率是否一致,选择使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法或双标准曲线法计算各待测样品中目的基因的相对表达量。具体计算方法见参考文献[7]。所得数据利用 Excel 表格进行统计分析与作图。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的鉴定

对阳性菌落进行 PCR 鉴定,并小量提取质粒进行测序,测序结果与 NCBI 上已提交的序列完全一致,部分测序结果见图 2。说明 *MT-ND1* 和 *β globin* 基因的 PCR 片段已分别连入 pMD18-T 载体上。

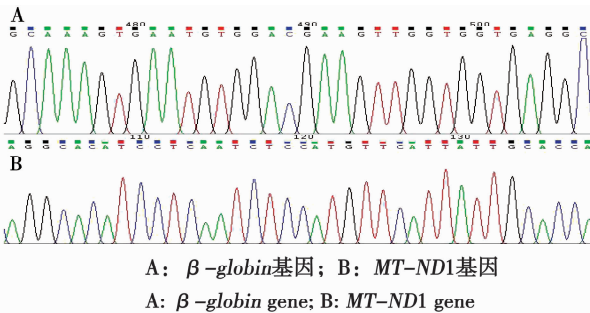


图 2 *β globin* 和 *MT-ND1* 基因部分测序结果

Fig. 2 Partial sequencing results of *β globin* and *MT-ND1* gene

2.2 用于检测扩增效率的 PCR 标准曲线

不同浓度梯度的标准品进行荧光定量 PCR 扩增后,得到系列扩增曲线,每个梯度均有特征性扩增曲线,呈明显的 S 型。根据 Ct 值及其对应的稀释倍数绘制标准曲线。不同稀释倍数的模板与 Ct 值呈正相关,MT-ND1 标准曲线回归方程为 $y = -3.494x + 23.09$,其中 y 值为 Ct 值, x 为质粒稀释倍数,扩增效率为 93.29%。 β -globin 基因标准曲线回归方程为 $y = -3.459x + 22.40$,扩增效率为 94.58%。两者差值小于 0.1,认为扩增效率一致,可用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

2.3 冷处理后不同肌肉组织 mtDNA 数量变化检测结果

利用实时定量 PCR 技术对冷处理后不同部位肌肉组织 mtDNA 数量变化情况进行了检测,

选择单拷贝核基因 β -globin 作为内参基因,因两个基因的扩增效率基本一致,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mtDNA 相对表达量变化情况。由图 3 可知,轻度冷处理(L1)下,民猪不同肌肉组织的 mtDNA 数量都出现了显著的下降,尤其是腓肠肌和趾长伸肌(0.41 和 0.48 倍),不及对照组的一半。而大白猪不同肌肉组织的 mtDNA 变化情况不一致,比目鱼肌出现了升高的趋势(1.08 倍),腓肠肌出现了显著的升高(1.29 倍),趾长伸肌出现了下降的趋势(0.92 倍)。重度冷处理(L2)下,民猪的腓肠肌 mtDNA 数量依旧是显著下降(0.76 倍),但是比目鱼肌和趾长伸肌都出现了显著的升高(1.30 和 1.19 倍)。大白猪的比目鱼肌和腓肠肌也出现了显著的升高(1.91 和 1.20 倍),趾长伸肌无显著变化(1.01 倍)。

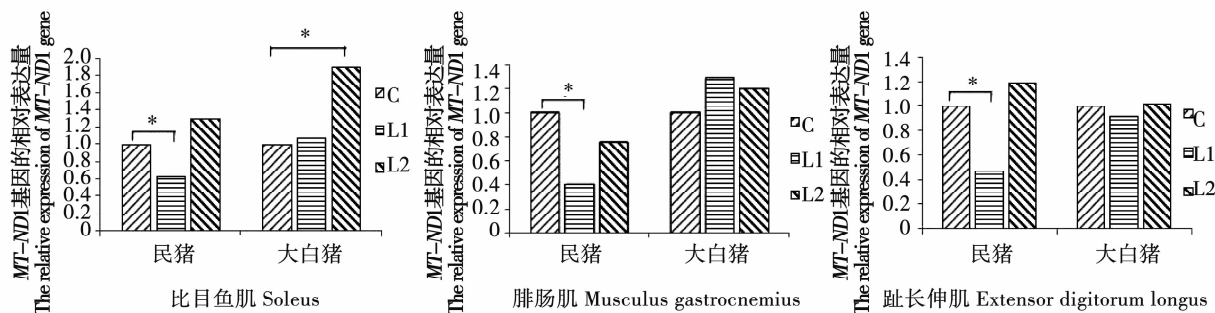


图 3 冷处理后民猪和大白猪不同肌肉组织 mtDNA 数量变化结果

Fig. 3 Change of the mtDNA in different muscle tissues number of Min pig and large white pig after cold treatment

3 结论与讨论

恒温动物需要通过内部产热来维持核心温度的恒定。哺乳动物,包括人类,都是依靠颤栗和非颤栗产热维持体温恒定^[8]。肌肉的颤栗性产热是对冷应激的一个快速反应,肌肉收缩时,需要消耗能量,所以会产热。但持续的肌肉颤栗会导致能量枯竭和肌肉损伤,在这种情况下,非颤栗性产热被激活,褐色脂肪是非颤栗性产热的主要部位^[9]。但最新研究发现,肌肉组织内的肌脂蛋白(sarcolipin)也可诱导其它闲置的肌肉燃烧,从而产生热量,而这种热量也有助于维持体温^[10]。运动也会诱导肌肉组织表达过氧化物酶体增殖物激活受体

γ 辅助激活因子 α (PGC-1 α), PGC-1 α 可刺激线粒体生物合成、血管生成和肌纤维类型转变^[11]。可见,低温环境下肌肉的颤栗性产热,不能简单的理解为肌肉的收缩与舒张,其中也包括很多复杂的生物学反应过程。

骨骼肌根据不同的划分标准,可以有很多种分类方式^[12]。在研究骨骼肌收缩运动方面,人们更喜欢用白(快)肌和红(慢)肌来进行划分。I 型肌纤维也叫红肌纤维,线粒体、肌红蛋白和毛细血管等丰富,有氧代谢相关酶活性高,收缩慢且持久。II 型肌纤维也叫白肌纤维,与红肌纤维相反,其收缩快但不持久,易疲劳。任何一块肌肉组织,

都不会是单一的白肌或红肌,而是两种肌纤维类型的混合体,只是所占的比例各不相同。例如,腓肠肌和趾长伸肌以白肌为主,而比目鱼肌以红肌为主。

本研究以线粒体 DNA 表达量的高低来代表线粒体数量的变化,结果发现无论是轻度还是重度低温环境,都导致大白猪腓肠肌内的线粒体数量发生了显著上升,而民猪的均表现为下降,这也是两个猪种间差异最显著的地方。这种变化趋势的不一致,可能与它们最初的肌纤维类型组成不同有关。但民猪腓肠肌内的线粒体数量在受到低温环境作用后,为何会发生显著下降还未知。而大白猪腓肠肌内线粒体数量的增加,推测存在两种可能,一种可能是肌纤维内原有线粒体数量发生了增加,另一种可能是发生了肌纤维类型的转化,即白肌向红肌转化。因为有报道显示,运动的确会造成腓肠肌内的肌球蛋白转变为 I 型慢肌纤维^[13]。

比目鱼肌位于腓肠肌下面,起自胫、腓骨上端的后面,与腓肠肌合称小腿三头肌。不同物种以及同一物种不同个体间,比目鱼肌的 I 型和 II 型肌纤维类型所占的比例都有所差别^[14]。趾长伸肌起自腓骨前面、胫骨上端和小腿骨间膜,向下至足背分为 4 个腱,作用为伸 2~5 趾,并助足背屈。本研究发现重度冷处理下,民猪和大白猪比目鱼肌的线粒体数量都发生了显著升高,趋势一致,而在轻度冷处理下,民猪比目鱼肌的线粒体数量依旧是发生了显著的下降,与其腓肠肌和趾长伸肌的变化趋势一致,但具体机理不明。有研究表明,耐力运动会显著提高比目鱼肌和趾长伸肌中的 ATP 含量,但只会上调比目鱼肌的线粒体 DNA,而趾长伸肌则无显著变化^[15]。缺氧及缺氧-复合运动和去负荷等都会导致比目鱼肌肌纤维类型的转化^[16-17],因此,对于冷处理后,线粒体数量的显著升高,本研究也更倾向于第二种推测,即肌纤维类型发生了白肌向红肌的转化。此外,还发现比目鱼肌的变化幅度远高于腓肠肌和趾长伸肌,这

说明比目鱼肌在机体体温调节过程中发挥着更为重要的作用。

综上所述,轻度冷处理下,民猪各肌肉组织的代谢模式不同于大白猪;重度冷处理下,以红肌为主的比目鱼肌是颤栗性产热的主要肌肉组织,推测低温环境会诱导肌纤维类型的转化。

参考文献:

- [1] Virtanen K A. BAT thermogenesis: Linking shivering to exercise[J]. Cell Metab, 2014, 19(3): 352-354.
- [2] 贾安峰,冯京海,张敏红. 调控骨骼肌肌纤维类型转化的因素及机制[J]. 动物营养学报, 2014, 26(5): 1151-1156.
- [3] 袁媛,刘月光,史新娥,等. 调控骨骼肌纤维类型转化的信号通路[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(9): 796-801.
- [4] Moyes C D, Hood D A. Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrate muscle [J]. Annu Rev Physiol, 2003, 65: 177-201.
- [5] 孙懿,曾思聪,胡亮,等. 荧光定量 PCR 精确检测人胚胎干细胞线粒体 DNA 拷贝数方法的建立[J]. 中国细胞生物学报, 2012, 34(7): 685-689.
- [6] 成文敏,霍金龙,信吉阁,等. 猪卵母细胞线粒体分布及线粒体 DNA 拷贝数变化[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(5): 635-640.
- [7] 徐丽华,刘春雷,常玉梅,等. 双标准曲线相对定量 PCR 试验原理与方法[J]. 生物技术通报, 2011(1): 70-75.
- [8] Block B A. Thermogenesis in muscle [J]. Annu Rev Physiol, 1994, 56: 535-577.
- [9] van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, et al. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis [J]. J Clin Invest, 2013, 123(8): 3395-3403.
- [10] 宋立稳,逢力男. Irisin: 一种诱导脂肪组织转化的肌因子[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(13): 6057-6059.
- [11] Bal N C, Maurya S K, Sopariwala D H, et al. Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals[J]. Nat Med, 2012, 18(10): 1575-1579.
- [12] 陈利. 家畜骨骼肌纤维分类及影响因素的研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2016(19): 99-103.
- [13] 张昕,李志清. 跑台运动训练对大鼠腓肠肌结构及最大收缩张力的影响[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 2013, 43(1): 70-74.
- [14] 李建龙,杨桂娇,李荣华. 人和哺乳动物比目鱼肌的纤维

- 型[J]. 解剖学杂志, 1995, 18(5): 412-415.
- [15] 邱霓, 李聪, 方伟进, 等. 耐力运动 8 周对大鼠骨骼肌收缩功能和线粒体生物合成的影响及机制[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(5): 691-697.
- [16] 蔡明春, 黄庆愿, 高钰琪, 等. 缺氧及缺氧-复合运动大鼠比目鱼肌肌球蛋白重链组成变化[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(12): 2428-2431.
- [17] 李莉, 刘红菊, 杨明浩, 等. 去负荷小鼠比目鱼肌收缩特性和纤维类型转化[J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 28(2): 97-101.

Effect of Low Temperature on Mitochondria of Different Muscle in Pig

ZHANG Dong-jie, WANG Liang, LI Zhong-qiu, WANG Wen-tao, HE Xin-miao, WU Sai-hui, LIU Di

(Institute of Animal Husbandry, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Pig is one of a warm blooded animal, which is sensitive to the ambient temperature. In order to investigate the low temperature impact of the mitochondria in pig skeletal muscle and difference of metabolism between Min pig and large white pig, Min pig (cold tolerance breed) and large white pig (non-cold tolerance breed) were disposed as experimental materials. The relative quantitative method of real-time PCR was used. The change of mitochondrial DNA in gastrocnemius, soleus muscle and extensor longus digitorum under mild and severe cold treatment were detected. The results showed that under the mild cold treatment, the expression of Min pig gastrocnemius, soleus and extensor longus digitorum mtDNA were all declined, while the large white pig was unchanged or slightly increased. Under severe cold treatment, in addition to Min pig gastrocnemius was still declined, the rest were all significantly increased. The increased ratio of soleus muscle was maximal. Accordingly, it was believed that under mild cold treatment, the metabolism style of Min pig muscle tissue was different from large white pig; under severe cold treatment, the soleus muscle mainly dominated by red muscle was the main muscle of shivering thermogenesis. It was speculated that low temperature could induce the transformation of muscle fiber type.

Keywords: Min pig; large white pig; muscle tissue; mtDNA; real-time PCR

(上接第 59 页)

Abstract: In order to further study the herbicide of soybean field in northeast China, stem and leaves were sprayed different doses of $480 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Bentazone AS in weeds 2~4 leaf stage after soybean seeding, photosynthetic rate of soybean and annual broadleaf weeds were determined by plant photosynthesis meter. The results showed that: Bentazone showed rapid control effect to annual broadleaf weeds, weeds went dry to death usually after spraying for 5~10 days, *Polygonum bungeanum* Turz. and *Abutilon theophrasti* Medic were very sensitive, *Chenopodium album* L. was general sensitive, *Amaranthus retroflexus* L. was insensitive. When photosynthetic rate of weeds was less than 20%, Strains effect and fresh weight effect of weeds were more than 90% on Bentazone, Weeds were effectively controlled; when photosynthetic rate of weeds was more than 40%, strains effect and fresh weight effect of weeds were less than 60% on Bentazone, weeds were not effectively controlled. When photosynthetic rate of weeds was less than 20%, photosynthetic rate of crop was more than 70%, the dose was minimum effective dose on photosynthesis inhibiting herbicide. To general sensitive weed *Chenopodium album* L. (2~4 leaf age) as datum, the minimum effective dose of photosynthesis inhibiting herbicide Bentazone was $600 \text{ g} \cdot \text{hm}^{-2}$.

Keywords: photosynthesis inhibiting herbicide; Bentazone; minimum effective dose; photosynthetic rate; control effect