

# 猪 *Cathepsin B* 基因和 *Cystatin B* 基因 mRNA 表达的发育性变化及组织差异

陈磊<sup>1,2</sup>, 王金勇<sup>2</sup>, 李学伟<sup>1</sup>, 刘良<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>四川农业大学动物科技学院, 四川雅安 625014; <sup>2</sup>重庆市畜牧科学院, 重庆 402460)

**摘要:** 【目的】研究猪肉嫩度性状候选基因-组织蛋白酶 B (cathepsin B, CTSB) 和半胱氨酸蛋白酶抑制素 B (cystatin B, CSTB) 在体内不同组织、不同发育阶段的表达变化规律, 为研究嫩度性状的遗传调控机理提供依据。【方法】采用荧光探针 RT-PCR, 定量分析 CTSB 和 CSTB mRNA 在两个品种猪的多个组织、多个发育时间点的表达量。【结果】RT-PCR 结果表明, CTSB 和 CSTB mRNA 表达量最高的组织为肾脏, 心肌和骨骼肌中表达丰度低, 股四头肌 CSTB mRNA 表达量极显著高于背最长肌。CTSB mRNA 表达量在 0~5 月龄长白猪和梅山猪背最长肌中表现出先升高后降低的变化趋势, 梅山猪峰值出现较早, 并在 4 月龄后再次出现急剧上升。CSTB mRNA 表达量在梅山猪中表现出出生初期较高, 随后逐渐降低的表达模式, 长白猪的表达模式则为出生后表达量急剧升高, 2 月龄达到峰值, 随后逐渐降低。2 品种猪背最长肌组织 CTSB 和 CSTB mRNA 表达量表现出显著正相关。【结论】CTSB 和 CSTB mRNA 表达量受到组织、发育阶段和品种影响, 2 基因 mRNA 表达量呈显著正相关。

**关键词:** 猪; 组织蛋白酶 B 基因 (CTSB); 胱抑素 B 基因 (CSTB); 表达量; 嫩度

## Developmental Expression and Tissue Distribution of Porcine *Cathepsin B* and *Cystatin B* mRNA

CHEN Lei<sup>1,2</sup>, WANG Jin-yong<sup>2</sup>, LI Xue-wei<sup>1</sup>, LIU Liang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan; <sup>2</sup>Chongqing Academy of Animal Science, Chongqing 402460)

**Abstract:** 【Objective】The tissue- and developmental-specific expression of cathepsin B (CTSB) and cystatin B (CSTB) mRNA transcripts in porcine were studied in order to understand the genetic mechanism of tenderness traits. 【Method】The expression of CTSB and CSTB mRNA in different tissues and different development phases were revealed by Taqman real-time PCR analyses. 【Result】In adult pigs, CTSB mRNA and CSTB mRNA expression were widely detected in many tissues. The highest level of expression occurred in kidney and the lowest were in myocardium and skeletal muscle, respectively. The quadriceps femoris muscle had significantly higher CSTB mRNA expression than *m. longissimus dorsi* muscle ( $P < 0.01$ ). The expression of CTSB mRNA in *m. longissimus dorsi* muscle increased first then decreased in 0-5-month-old of age of Landrace and Meishan pigs. The peak of expression occurred earlier in Meishan than in Landrace. Continuously decreased expression patterns of CSTB mRNA were detected among different months in *m. longissimus dorsi* muscle of Meishan pig. And in Landrace pig the expression peaked at 2 months of age, then decreased. 【Conclusion】These results indicate that the expression of CTSB and CSTB mRNA are influenced by tissue, developmental phases and breed factors. There is a significant positive correlation between CTSB and CSTB mRNA expression.

**Key words:** pigs; *Cathepsin B* gene; *Cystatin B* gene; expression; tenderness

收稿日期: 2009-05-12; 接受日期: 2009-08-27

基金项目: 国家生猪现代产业技术体系 (NYCYTX-009)、农业部公益性行业科研专项 (NYHYZX07-034)、国家科技支撑计划项目 (2007BAD51B03)、重庆市畜牧科学院应用基础研究计划项目 (80608)

作者简介: 陈磊 (1980-), 男, 四川成都人, 研究方向为猪数量遗传与分子育种。E-mail: sicau.chen@gmail.com。通信作者李学伟 (1963-), 男, 重庆人, 教授, 研究方向为动物遗传育种。Tel: 0835-2886000; E-mail: lixuewei@ya-public.sc.cninfo.net

## 0 引言

【研究意义】组织蛋白酶 B (cathepsin B, CTSB) 是动物体内重要的内源蛋白酶, 属于木瓜蛋白酶超家族 (the papain superfamily) 的半胱氨酸蛋白酶<sup>[1]</sup>, 参与溶酶体的蛋白质水解作用, 与癌症、肿瘤、II 型糖尿病等有关<sup>[2-3]</sup>。动物屠宰后从破裂的肌纤维溶酶体中释放出的 CTSB 保持较高活性<sup>[4]</sup>, 参与肌肉蛋白质水解, 对肉制品嫩度产生效应<sup>[5]</sup>。胱抑素 B (cystatin B, CSTB) 是一种重要的胞内组织蛋白酶抑制剂<sup>[6]</sup>, 对多种组织蛋白酶有较强的抑制作用<sup>[7]</sup>, 是组织蛋白酶水解系统的重要调控因子。自 Russo 等<sup>[8]</sup>提出 CTSB 和 CSTB 可作为肉质性状候选基因研究, 目前已有多篇报道了它们在嫩度<sup>[9-10]</sup>、蛋白质含量<sup>[11]</sup>、日增重<sup>[8]</sup>等性状方面的遗传效应。因此利用分子生物学手段研究 CTSB 和 CSTB 的表达规律, 对深入研究肉品嫩度性状形成与调控具有重要意义。【前人研究进展】目前已测定了 CTSB 和 CSTB 的 cDNA 序列<sup>[9-10]</sup>, 对 CTSB 和 CSTB 表达规律的研究主要集中在人和模式动物疾病领域, 如癌症<sup>[12-13]</sup>、癫痫<sup>[14]</sup>。研究表明 CTSB 和 CSTB 的表达在 mRNA 和蛋白质两个层次均受到多种因素调控, 表达量变化幅度较大。【本研究切入点】本试验从猪 CTSB 和 CSTB mRNA 表达定量分析入手, 对二者的发育性变化、组织差异及表达量相关性进行研究。【拟解决的关键问题】探明猪 CTSB 和 CSTB mRNA 的时空变化规律, 为进一步探索遗传效应和调控机制奠定基础, 为猪肉嫩度性状候选基因的筛选和鉴定提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选用梅山猪和长白猪作为试验动物, 选择个体发育过程中的 6 个时间点 (初生、1、2、3、4 和 5 月龄), 每个品种随机分配 4 头 (2♂, 2♀) 全同胞仔猪到每个时间点, 共计 48 头。2 品种同一时间开始组建群体, 28 日龄断奶, 营养水平和饲喂方式相同。在试验猪达到相应时间点当天进行屠宰, 采集倒数第 3~4 肋骨间背最长肌样品。基因表达组织差异性分析选用 6 月龄长白猪与梅山猪各 5 头, 屠宰后及时采集肾脏、肠系膜淋巴结、肝脏、十二指肠、皮下脂肪、脾脏、心肌、股四头肌、腰大肌和背最长肌组织样品, 浸泡于 RNAlater 试剂 (Qiagen, Hilden, Germany) 中, -80℃ 保存用于基因表达量分析。总 RNA 抽提试剂 TRIZOL

购自 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒 RT reagents 与定量 PCR 试剂 SYBR Premix Ex Taq 购自 TAKARA 公司。

### 1.2 总 RNA 的提取及反转录

总 RNA 的提取按 TRIZOL 试剂手册操作, 反转录按 RT reagents 试剂盒说明书进行。

### 1.3 引物、探针设计及序列确认

荧光定量 PCR 引物及配套 Taqman 探针采用 ABI Primer Express 2.0 软件设计, 引物及探针序列 (表 1)。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Sequences of the primers and probes

基因	编号	引物 (探针) 序列 (5'→3')
Gene	No.	Sequences of primers (probes)(5'→3')
CTSB	CAT-FP1	GCC CTA CTC CAT CCC ACC
	CAT-RP1	TCG ATG CCA CAG TGA TCC T
	CAT-Probe	FAM-AGACAAGCACTTCGGATGCAGCTCC TAC-TAMRA
	CAT-FP2	TCT GCG AGC CTG GCT ACA C
	CAT-RP2	TCC GCC ATG ATC TCC TTC TC
	CSTB	CYS-FP1
CYS-RP1		CCT GCT TTT GTT GGT CTG GTA G
CYS-Probe		FAM-CGATGACAACCTTCGTGCACCTTCGG- TAMRA
CYS-FP2		TGG CAG GAA CCT CTT CAT CAA
CYS-RP2		GCG GGA GGC TTT CAA ACA
$\beta$ -actin		$\beta$ -actin-F1
	$\beta$ -actin-R1	GAT CGT GCG CGA CAT CAA
	$\beta$ -Probe	HEX-TCG AAG TCC AGG GCC ACG TAG CAP-TAMRA
	$\beta$ -actin-F2	CGG GAC CTG ACC GAC TAC CT
	$\beta$ -actin-R2	GGC CGT GAT CTC CTT CTG C

为了验证引物和探针结合区域序列的保守性, 确保引物和探针准确无误地结合到每一个样品的相应位点, 保证 RT-PCR 试验的精确性, 利用 3 对外围引物 (编号 CAT-FP1、CAT-RP1; CYS-FP1、CYS-RP1;  $\beta$ -actin-FP1、 $\beta$ -actin-RP1, 表 1) 分别对 CTSB、CSTB 和  $\beta$ -actin 的 RT-PCR 扩增片段进行外围扩增, 扩增片段包含了 RT-PCR 试验所涉及的完整序列, 扩增产物经柱式胶回收试剂盒 (天根公司, 北京) 进行纯化回收, 克隆到 JM109 大肠杆菌中, 送上海 Invitrogen 公司测序, 重复数为 3, 包括了在 2 个品种群体内随机挑选的 3 头个体。得到测序结果后利用 Bioedit 软件比对各重复测序片段, 确定引物与探针结合位点无变异、

缺失、插入等现象发生, 随后将确定的荧光定量 PCR 引物(编号 CAT-FP2、CAT-RP2; CYS-FP2、CYS-RP2;  $\beta$ -actin-FP2、 $\beta$ -actin-RP2, 表 1) 及配套 Taqman 探针 (探针编号 CAT-Probe; CYS-Probe;  $\beta$ -Probe, 表 1) 送上海基康生物公司进行合成。

#### 1.4 反应体系及条件

所用 RT-PCR 系统为 iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, CA, US)。扩增体系为: PremixEx Taq™ (2×) 12.5  $\mu$ l; 上游引物 (10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ l; 下游引物 (10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 1  $\mu$ l; 荧光探针 (10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 0.8  $\mu$ l; 灭菌蒸馏水加至总体积 25  $\mu$ l。

反应条件: 95℃ 10 s; 95℃ 5 s 40 个循环; 60℃ 20 s 40 个循环。每一循环第二步结束时进行荧光信号收集。每个待测样品设置 3 个重复, 对得到的 3 个 Ct 值取算术平均值, 以备带入公式进行计算。

#### 1.5 标准曲线的建立

利用真空旋转蒸发冷冻干燥仪 (Genevac, 英国) 将淋巴结组织 cDNA 浓缩为 1/100 体积, 随后用 EASY Dilution (TaKaRa, 大连) 依次梯度稀释成  $1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^{-9}$  个浓度 (10 倍梯度稀释), 选择  $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-9}$  共 7 个浓度为标准品, 标准品反应条件同上, 设置 3 个重复。基线由 iQ5 软件 (Bio-Rad, CA) 自动设置, 标准曲线由软件自动分析, 得到斜率和扩增效率。

#### 1.6 数据处理

根据系统自动分析的 *CTSB*、*CSTB* 以及  $\beta$ -actin 标准曲线的斜率可得 PCR 扩增效率 (E),  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$  [15-16], 将 E 值和 Ct 值代入下列公式计算 *CTSB* 表达量的相对值 RE:

$$RE = (E_{ref})^{Ct_{ref}} / (E_{target})^{Ct_{target}} [17]$$

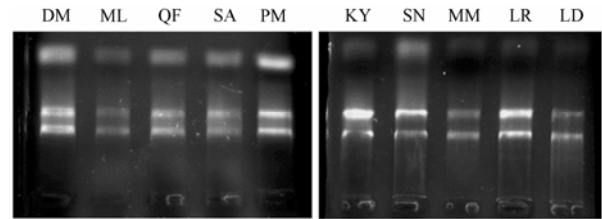
其中  $E_{ref}$  为内参基因的扩增效率,  $Ct_{ref}$  为某一样品的内参基因 Ct 值; 与之对应  $E_{target}$  为目的基因的扩增效率,  $Ct_{target}$  为同一样品目的基因 Ct 值。将 RE 数据经对数转换 [17-18] 后由 SAS 9.0 软件进行单因素方差分析或相关分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 抽提

采用 TRIZOL Reagent 进行各组织样本总 RNA 的抽提结果 (图 1), 可见明显的 3 组条带, 依次是 5 s rRNA、18s rRNA、28s rRNA, 其中 28s 条带亮度大约为 18s 条带的 2 倍, 5 s 条带亮度较低、边缘模糊。同时利用核酸蛋白检测仪 (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad) 对所抽提总 RNA 进行吸光度检测, 样品  $A_{260}/A_{280}$  为

1.86~1.97, 说明总 RNA 样品完整、降解较少、质量良好, 可用于进一步实验操作。



KY: 肾脏; ML: 肠系膜淋巴结; LR: 肝脏; DM: 十二指肠; SA: 皮下脂肪; SN: 脾脏; MM: 心肌; QF: 股四头肌; PM: 腰大肌; LD: 背最长肌  
KY: Kidney; ML: Mesenteric lymph node; LR: Liver; DM: Duodenum; SA: Subcutaneous adipose; SN: Spleen; MM: Myocardium; QF: Quadriceps femoris; PM: Psoas major; LD: Longissimus dorsi

图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Result of total RNA

### 2.2 Real-time PCR 标准曲线的建立

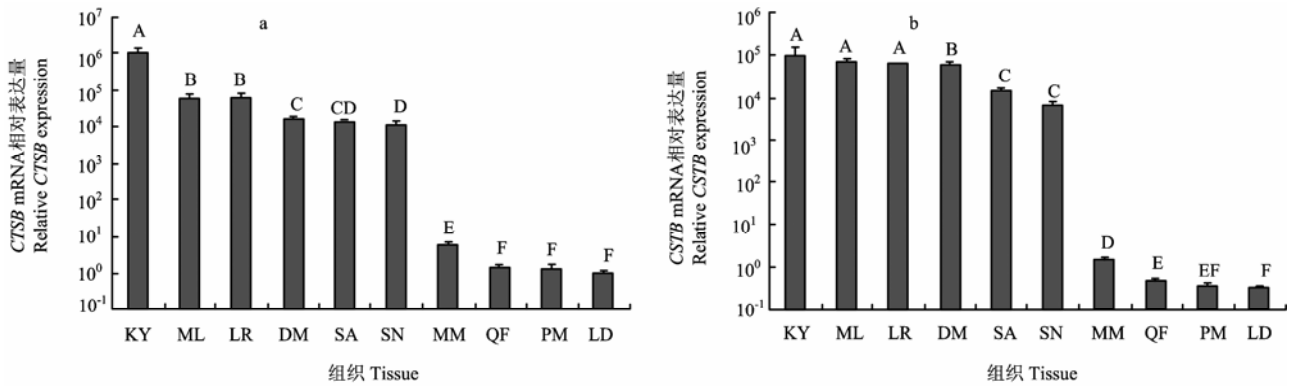
采用模板为  $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-9}$  7 个浓度梯度的标准 cDNA 分别进行 *CTSB*、*CSTB* 和  $\beta$ -actin 定量 PCR 反应, 得到 Real-time PCR 标准曲线, 曲线拟合度 ( $R^2$ ) 为 0.997~0.999, 扩增效率为 93.6%~104.3%, 效率及拟合度均良好, 可用于表达量定量分析。

### 2.3 *CTSB* 和 *CSTB* mRNA 在不同组织间的表达量差异

采用相对定量方案, 引入内参基因  $\beta$ -actin 校正初始细胞数、RNA 提取效率等不可控制因素, 归一化起始组织量。将 10 头 6 月龄长白猪和梅山猪的不同组织相对定量数据代入公式计算后得到 *CTSB* 和 *CSTB* mRNA 在不同组织中的表达规律 (图 2)。由图可见, *CTSB* mRNA 在肾脏、肝脏和淋巴结中表达量极高, 在十二指肠、皮下脂肪和脾脏中表达量较高, 而在心肌和骨骼肌中表达量低, 并且在 3 处不同部位的骨骼肌间无显著差异。*CSTB* mRNA 在肾脏、十二指肠和淋巴结中表达量极高, 在皮下脂肪中表达量极显著低于前者 ( $P < 0.01$ ), 但仍属高水平表达, 在肝脏和脾脏中表达量进一步降低, 在心肌和骨骼肌中表达量低, 在 3 处不同部位的骨骼肌中, 股四头肌组织 *CSTB* mRNA 表达量极显著的 ( $P < 0.01$ ) 高于眼肌, 腰大肌表达量居于二者之间。

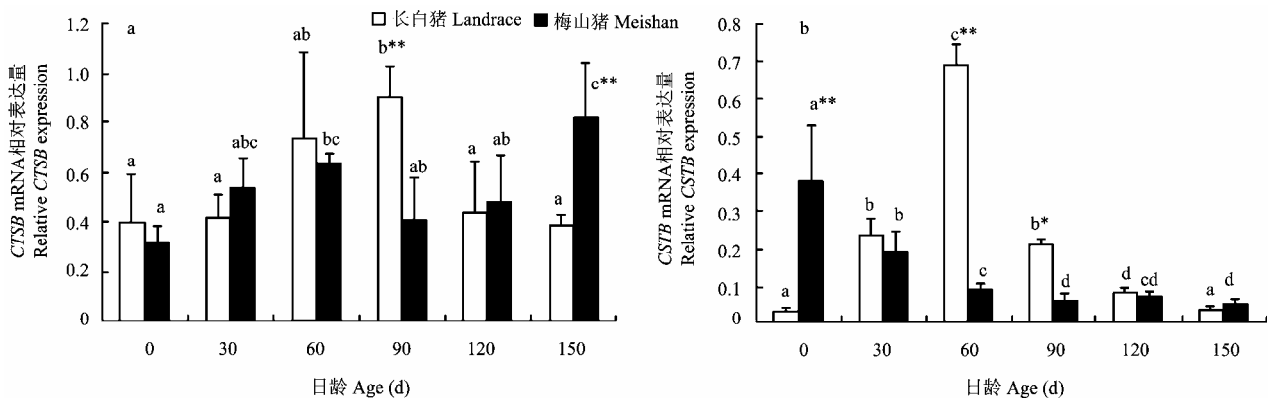
### 2.4 *CTSB* 和 *CSTB* mRNA 表达时序变化规律

不同月龄长白猪与梅山猪背最长肌组织 *CTSB* 和 *CSTB* 表达量 (图 3)。*CTSB* mRNA 表达量在长白猪与梅山猪 0~4 月龄发育过程中表现出先升高后降低



KY: 肾脏; ML: 肠系膜淋巴结; LR: 肝脏; DM: 十二指肠; SA: 皮下脂肪; SN: 脾脏; MM: 心肌; QF: 股四头肌; PM: 腰大肌; LD: 背最长肌  
 KY: Kidney; ML: Mesenteric lymph node; LR: Liver; DM: Duodenum; SA: Subcutaneous adipose; SN: Spleen; MM: Myocardium; QF: Quadriceps femoris; PM: Psoas major; LD: Longissimus dorsi  
 a: *CTS*B mRNA 组织分布; b: *CST*B mRNA 组织分布。不同组织上相同的大写字母之间表示差异不显著 ( $P>0.05$ ) ; 不同大写字母代表差异极显著 ( $P<0.01$ ) ; Y轴以对数刻度表示  
 a: Tissue distribution of porcine *CTS*B mRNA; b: Tissue distribution of porcine *CST*B mRNA. Values with the same letters were not significantly different between tissues ( $P>0.05$ ); Values with the different capital letters were significantly different at the level of 0.01; Ordinate marked by logarithmic calibration

图2 猪 *CTS*B 和 *CST*B 组织分布  
 Fig. 2 Tissue distribution of porcine *CTS*B and *CST*B mRNA



a: *CTS*B mRNA 表达量发育性变化规律; b: *CST*B mRNA 表达量发育性变化规律。同一品种不同日龄相同字母之间表示差异不显著 ( $P>0.05$ ) ; 不同大写字母和小写字母分别代表差异极显著 ( $P<0.01$ ) 和显著 ( $P<0.05$ ) 。\*和\*\*分别表示同一日龄不同品种差异极显著 ( $P<0.01$ ) 和显著 ( $P<0.05$ )  
 a: Developmental expression of porcine *CTS*B mRNA; b: Developmental expression of porcine *CST*B mRNA. Values with the same letters were not significantly different between ages for the same breed ( $P>0.05$ ); Values with the different small and capital letters were significantly different at the level of 0.05 and 0.01, respectively. \*and \*\* mean significantly different between the two pig breeds at the same age at the level of 0.05 and 0.01 respectively

图3 猪 *CTS*B 和 *CST*B mRNA 表达量发育性变化规律  
 Fig. 3 Developmental expression of porcine *CTS*B and *CST*B mRNA

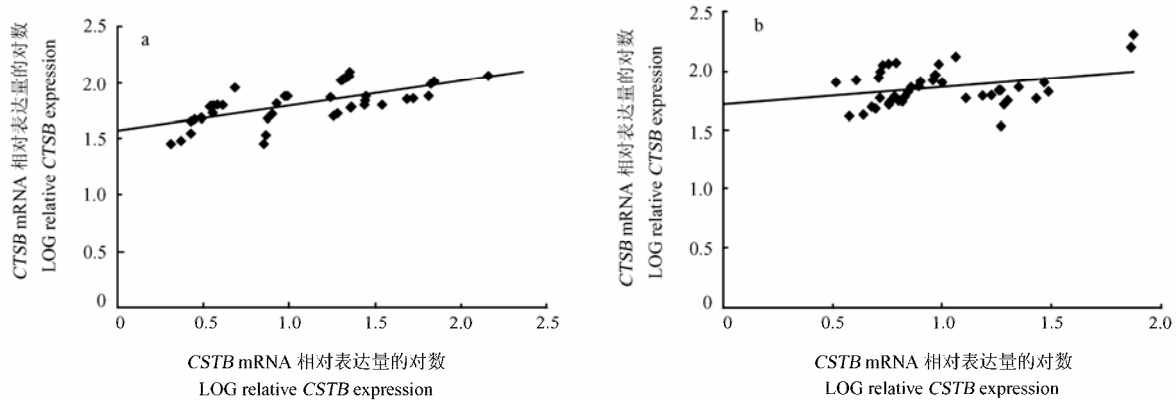
的变化趋势, 长白猪表达量峰值较高, 出现在3月龄发育阶段, 梅山猪表达量峰值出现稍早, 在2月龄发育阶段。4月龄以后, 2品种猪 *CTS*B mRNA 表达量表现出不同的变化趋势, 长白猪表达量持续降低, 梅山猪表达量又表现出急剧升高的趋势, 并超过发生在2月龄的第一个峰值。 *CST*B mRNA 表达量在梅山猪中

表现出出生后早期表达量较高, 随着个体发育逐渐降低的变化趋势, 而在长白猪背最长肌组织中则表现出升高后降低的变化趋势, 在出生早期表达量较低, 随后快速增长, 到二月龄出现表达峰值, 然后逐月降低, 到五月龄时已降低到初生时的水平, 与梅山猪同月龄表达量水平一致。

## 2.5 *CSTB* 与 *CTSB* 表达量的相关性

本试验中所有样品均同时分析了 *CSTB* 和 *CTSB* 两基因的 mRNA 表达量。结合 2 部分数据, 通过绘制散点图发现 2 品种发育过程中肌肉组织 *CTSB* 与 *CSTB* 相对表达量间均存在线性相关趋势 (图 4)。进一步

采用直线相关分析了 2 基因 mRNA 表达量间关系。结果表明, 在长白猪 0~5 月龄发育过程中背最长肌组织 *CTSB* 和 *CSTB* mRNA 表达量呈现极显著正相关 ( $r=0.655$ ,  $P<0.0001$ ), 在梅山猪 0~5 月龄发育过程中 2 基因 mRNA 表达量相关程度稍低 ( $r=0.306$ ,  $P=0.049$ )。



a: 长白猪; b: 梅山猪 a: Changbai pig; b: Meishan pig

图 4 *CTSB* 与 *CSTB* 相对表达量散点图

Fig. 4 Scatter plot of relative *CSTB* and *CTSB* expression

## 3 讨论

*CTSB* mRNA 的组织分布是相关疾病研究的热点, 主要集中在病变组织和正常组织、患者与健康个体的比较, 针对不同正常组织、器官的比较研究较少。Segundo 等<sup>[19]</sup>采用斑点杂交和 Northern 杂交的方法研究了褐家鼠 (*rattus norvegicus*) *CTSB* mRNA 在体内各组织的表达情况, 发现该基因在肾脏和脾脏中高水平表达, 在肺脏和大脑中表达量偏低, 在心肌中低水平表达。本试验结果与其结果相一致。NCBI UniGene 数据库利用现有的猪 EST 数据, 通过同源比对找出与目的基因同源的 ESTs, 并统计这些 ESTs 在总体中所占的比例, 用其代表基因 mRNA 的表达丰度, 建立了相应基因的电子表达谱<sup>[20]</sup>, 其中本试验结果与 *CTSB* 电子表达谱基本一致, *CTSB* 和 *CSTB* mRNA 在肾脏、肝脏、淋巴结和脾脏中都呈高水平表达, 在心脏和肌肉中表达水平较低。Stauber 等<sup>[21]</sup>报道小鼠各肌肉组织中 *CTSB* 活性是有明显差异的, 活性高低顺序为心肌 > 比目鱼肌 (*soleus*) > 平滑肌 > 趾长伸肌 (*extensor digitorum longus*), 提示 *CTSB* 在不同部位肌肉组织中有可能存在表达差异。本试验选择 3 处不同部位、

嫩度差异明显的肌肉, 测定 *CTSB* mRNA 表达量, 结果未检测到显著差异, 说明 3 处肌肉的 *CTSB* 转录水平一致, 但并不排除蛋白水平表达量出现差异的可能, 进一步的研究需要选择更多部位的肌肉组织, 并利用蛋白表达测定和酶学手段进行分析。

*CTSB* mRNA 发育阶段表达量变化研究较少, 现有的研究主要涉及胚胎发育早期。Betchet 等<sup>[22]</sup>研究发现, 牛胚胎发育早期成肌细胞融合形成肌管的过程中, *CTSB* 活性和 mRNA 转录水平维持在较高状态, 而进一步形成肌纤维以后其活性与 mRNA 转录水平均显著降低; Bechet 等<sup>[23]</sup>对牛胚胎中后期肌肉组织中 *CTSB* 表达规律进行了研究, 发育 80~250 日龄间 *CTSB* 活性和 mRNA 转录水平均显著降低, 表明 *CTSB* 表达量受到发育阶段影响, 胚胎发育早期 *CTSB* 的高表达可能与肌细胞重塑有关。本试验测定不同品种猪生后发育阶段 *CTSB* mRNA 在背最长肌组织中的表达量, 发现长白猪与梅山猪在发育过程中均表现出先升高后降低的变化趋势, 生后早期表达量较少, 随后显著升高, 这可能与肌肉组织生长快、新陈代谢快有关, 随着肌肉生长的放缓表达量也逐渐降低, 这种表达模式与 NCBI UniGene *CTSB* 电子表达谱一致<sup>[20]</sup>。梅山猪表达

量峰值出现稍早,可能与地方猪种发育较早<sup>[24]</sup>,肌肉生长高峰出现较早有关。梅山猪表达量在4月龄以后急剧升高的机理还有待进一步研究分析。

*CSTB* mRNA 表达量在各组织间极显著差异,表明 *CSTB* 的转录受到组织特异性因素控制。Pennacchio 等<sup>[25]</sup>采用 Northern 杂交方法研究了小家鼠 (*mus musculus*) *CSTB* mRNA 在体内 8 个组织的表达情况,表明该 mRNA 在肝脏、肾脏中高水平表达,在脾脏呈中等水平表达,在骨骼肌、肺脏和大脑中低水平表达,本试验结果与上述研究相一致,但在心肌组织中检测出了 *CSTB* 的高水平表达,这可能是由物种因素造成的。在 3 处不同部位骨骼肌中,股四头肌 *CSTB* mRNA 表达量最高,理论上该部位肌肉中组织蛋白酶被抑制程度较高,屠宰后蛋白水解程度低,因而会表现出较低的嫩度,此前对相邻部位的股二头肌的试验佐证了这一点<sup>[26]</sup>。但仅利用 *CSTB* 表达量来判断不同部位肌肉的嫩度表现是远远不够的,因为不同部位肌肉间组织结构、肌纤维构成等差异较大,嫩度受到这些因素的影响较大,宰后蛋白水解往往是嫩度的次要因素。刘家忠等报道,腰大肌和背最长肌等肌肉中结缔组织即胶原的含量较低,如腰大肌胶原的含量仅为股二头肌、半腱肌的 1/2<sup>[26]</sup>。本试验中嫩度最高的腰大肌 *CSTB* 表达量反而略高于相对较硬的背最长肌,其原因也可能就是这点。

关于 *CSTB* mRNA 发育阶段表达变化方面的研究未见报道。本试验地方猪种梅山猪表现为出生后初期较高,随后平缓降低;而长白猪则表现为出生后表达量急剧升高,2月龄达到峰值,随后逐渐降低的趋势。分析 NCBI UniGene *CSTB* 电子表达谱<sup>[20]</sup>,可见在新生儿阶段 *CSTB* mRNA 表达量有急剧增加的过程,其表达变化模式与梅山猪一致,而长白猪此表达量急剧增加的过程可认为是向后推迟到 2 月龄,这可能与瘦肉型猪种与脂肪型猪种间肌肉组织生长发育规律差异有关。

胱抑素作为组织蛋白酶的高效可逆抑制因子,对调节体内组织蛋白酶表达量或活性具有重要作用。在正常组织内组织蛋白酶和胱抑素处于一种动态平衡的状态,以发挥组织蛋白酶正常生理功能的同时不会产生不必要的蛋白水解<sup>[6]</sup>。在肿瘤等病变组织内二者的动态平衡被打破,导致癌细胞的侵袭和转移<sup>[27-28]</sup>。本试验所检测的样本中 *CSTB* 和 *CTSB* 两基因的 mRNA 表达量表现出显著的正相关,印证了组织蛋白酶与胱抑素动态平衡的存在。相关程度的品种差异可能与长

白猪 0~5 月龄发育过程中两基因表达量变化幅度相对较高,动态调控机制作用明显有关,同时说明该调控作用受品种因素影响。相对较低的相关程度说明 *CSTB* 和 *CTSB* 二者间的抑制调控关系并非是单一对应,广泛存在的 *CSTC*、*CSTA* 等其它胱抑素也全面参与胞内 *CTSB* 的活性抑制<sup>[29]</sup>,另外 *CSTB* 最早是作为一种组织蛋白酶 B 的特异性抑制因子被发现<sup>[30]</sup>,但随后的研究发现它对组织蛋白酶 B、D、H、S 甚至植物体内的木瓜蛋白酶都有较强的抑制作用<sup>[7]</sup>,因此如果能在线性模型中考虑更多的酶与抑制因子,就可能发现更全面的相关关系,更深入的分析二者间的相互调控的机制。

## 4 结 论

4.1 *CTSB* 和 *CSTB* mRNA 表达量受组织因素影响。二者在肾脏和淋巴结等组织中高丰度表达,在心肌和骨骼肌表达丰度较低。*CSTB* 表达量在不同部位的骨骼肌间表现出极显著差异,但不能作为评判肌肉嫩度的标准;

4.2 *CTSB* 和 *CSTB* mRNA 表达量受到发育阶段和品种因素影响。*CTSB* mRNA 表达量在 0~5 月龄长白猪和梅山猪背最长肌中表现出先升高后降低的变化趋势,梅山猪峰值出现较早,并在 4 月龄后再次出现急剧上升趋势;*CSTB* mRNA 表达量在 0~5 月龄地方猪种梅山猪中表现出生后初期较高,随后逐渐降低的表达模式;而长白猪的表达模式则为出生后表达量急剧升高,2 月龄达到峰值,随后逐渐降低;

4.3 猪背最长肌组织中 *CTSB* 和 *CSTB* mRNA 表达量表现出显著的正相关,相关程度具有品种差异性。

## References

- [1] Turk V, Turk B. Lysosomal cysteine proteases and their protein inhibitors: recent developments. *Acta Chimica Slovenica*, 2008, 55: 727-738.
- [2] Sitabkhan Y, Frankfater A. Differences in the expression of cathepsin B in B16 melanoma metastatic variants depend on transcription factor Sp1. *DNA and Cell Biology*, 2007, 26: 673-682.
- [3] Agnieszka P, Maria K K, Izabela F, Maria W. Urinary activities of cathepsin B, N-acetyl-bD--glucosaminidase and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Medical Science Monitor*, 2006, 12(5): 210-214.
- [4] 赵改名,周光宏,徐幸莲. 肌肉内源蛋白酶及其在干腌火腿加工过程中的作用. *食品与发酵工业*, 2003, 29(4): 70-75.

- Zhao G M, Zhou G H, Xu X L. Muscle endo-proteinases and their effects in dry cured ham processing. *Food and Fermentation Industries*, 2003, 29(4): 70-75. (in Chinese)
- [5] Chéret R, Delbarre-Ladrat C, Lamballerie-Anton M, Verrez-Bagnis V. Calpain and cathepsin activities in post mortem fish and meat muscles. *Food Chemistry*, 2007, 101: 1474-1479.
- [6] Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *Febs Letters*, 1991, 285(2): 213-219.
- [7] Ritonja A, Machleidt W, Barrett A J. Amino acid sequence of the intracellular cysteine proteinase inhibitor cystatin B from human liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1985, 131: 1187-1192.
- [8] Russo V, Fontanesi L, Davoli R, Nanni Costa L, Cagnazzo M, Buttazzoni L, Virgili R, Yerle M. Investigation of candidate genes for meat quality in dry-cured ham production: the porcine cathepsin B (*CTSB*) and cystatin B (*CSTB*) genes. *Animal Genetics*, 2002, 33(2): 123-131.
- [9] 陈 磊, 李学伟, 朱 砾, 李 强, 李明洲. 猪 Cystatin B 基因 cDNA 克隆及遗传多态性分析. *中国农业科学*, 2008, 41: 2120-2127.
- Chen L, Li X W, Zhu L, Li Q, Li M Z. Cloning characterization and polymorphism of the porcine (*Sus Scrofa*) cystatin B gene. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41: 2120-2127. (in Chinese)
- [10] 陈 磊, 李学伟, 朱 砾, 李 强, 李明洲. 猪 CathepsinB 基因 cDNA 分子克隆, 序列分析及遗传多态性分析. *畜牧兽医学报*, 2008, 39: 385-392.
- Chen L, Li X W, Zhu L, Li Q, Li M Z. Molecular cloning, characterization and polymorphism of the porcine (*Sus scrofa*) cathepsin B gene. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39: 385-392. (in Chinese)
- [11] Juszczuk-Kubiak E, Rosochacki S J, Sloniewski K, Poloszynowicz J, Wicinska K. Polymorphism in *CTSB* exon 7 as associated with activity of the lysosomal proteases in longissimus dorsi muscle of growing friesian bulls. *Animal Science Papers and Reports*, 2007, 25(4): 201-209.
- [12] Shiraishi T, Mori M, Tanaka S, Sugimachi K, Akiyoshi T. Identification of cystatin B in human esophageal carcinoma, using differential displays in which the gene expression is related to lymph-node metastasis. *International Journal of Cancer*, 1998, 79(2): 175-178.
- [13] Feldman A S, Banyard J, Wu C L, McDougal W S, Zetter B R. Cystatin B as a tissue and urinary biomarker of bladder cancer recurrence and disease progression. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(3): 1024-1031.
- [14] Lafreniere R G, Rochefort D L, Chretien N, Rommens J M, Cochius J I, Kaelviaeinen R, Nousiainen U, Patry G, Farrell K, Soederfeldt B. Unstable insertion in the 5' flanking region of the cystatin B gene is the most common mutation in progressive myoclonus epilepsy type 1, EPM 1. *Nature Genetics*, 1997, 15: 298-302.
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [16] Pfaffl M W, Horgan G W, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(9): e36.
- [17] Filby A L, Tyler C R. Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Biology of Reproduction*, 2005, 73: 648-662.
- [18] Filby A L, Tyler C R. Cloning and characterization of cDNAs for hormones and/or receptors of growth hormone, insulin-like growth factor-I, thyroid hormone, and corticosteroid and the gender-, tissue-, and developmental-specific expression of their mRNA transcripts in fathead minnow (*pimephales promelas*). *General and Comparative Endocrinology*, 2007, 150(1): 151-163.
- [19] Segundo S B, Chan S J, Steiner D F. Differences in cathepsin B mRNA levels in rat tissues suggest specialized functions. *Febs Letters*, 1986, 201: 251-256.
- [20] NCBI. UniGene Database (NIH). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unigene>.
- [21] Stauber W T, Ong S H. Fluorescence demonstration of cathepsin B activity in skeletal, cardiac, and vascular smooth muscle. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1981, 29: 866-869.
- [22] Bechet D M, Ferrara M J, Mordier S B, Roux M P, Deval C D, Obled A. Expression of lysosomal cathepsin B during calf myoblast-myotube differentiation characterization of a cDNA encoding bovine cathepsin B. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266: 14104-14112.
- [23] Bechet D M, Deval C, Robelin J, Ferrara M J, Obled A. Developmental control of cathepsin B expression in bovine fetal muscles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1996, 334: 362-368.
- [24] 许振英. 中国地方猪种种质特性. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1989.
- Xu Z Y. *Germplasm Characteristics of Chinese Native Pigs*.

- Hangzhou: Zhejiang Science & Technology Press, 1989. (in Chinese)
- [25] Pennacchio L A, Myers R M. Isolation and characterization of the mouse cystatin B gene. *Genome Research*, 1996, 6: 1103-1109.
- [26] 刘家忠, 陈润生, 刘 声. 猪十三块肌肉嫩度秩位的确定. 肉类研究, 1990, (4): 2-3.
- Liu J Z, Chen R S, Liu S. Rank of pork tenderness from 13 carcass parts. *Meat Research*, 1990, (4): 2-3. (in Chinese)
- [27] Hirai K, Yokoyama M, Asano G, Tanaka S. Expression of cathepsin B and cystatin C in human colorectal cancer. *Human Pathology*, 1999, 30: 680-686.
- [28] Bervar A, Zajc I, Sever N, Katunuma N, Sloane B F, Lah T T. Invasiveness of transformed human breast epithelial cell lines is related to cathepsin B and inhibited by cysteine proteinase inhibitors. *Biological Chemistry*, 2003, 384: 447-455.
- [29] Turk V, Stoka V, Turk D. Cystatins: Biochemical and structural properties, and medical relevance. *Frontiers in Bioscience*, 2008, 13: 5406-5420.
- [30] Lenney J F, Tolan J R, Sugai W J, Lee A G. Thermostable endogenous inhibitors of cathepsins B and H. *European Journal of Biochemistry*, 1979, 101(1): 153-161.

(责任编辑 高 雨, 林鉴非)