

# 饲料中添加二甲双胍对猪 *PRKAG3* 基因 表达量及肉质的影响

李梦云<sup>1,2</sup>, 余冰<sup>1</sup>, 陈代文<sup>1\*</sup>

(1. 四川农业大学动物营养研究所, 雅安 625014; 2. 郑州牧业工程高等专科学校, 郑州 450011)

**摘要:** 旨在研究二甲双胍(Metformin)对 *PRKAG3* 基因表达量以及对猪生长性能及肉质的影响。挑选 80 kg 左右的杜洛克×长白×大约克三元杂交(DLY)阉公猪 10 头, 随机分为对照组和试验组。试验组日粮中添加 400 mg·kg<sup>-1</sup>体质量的 Metformin, 对照组日粮除不含 Metformin 外, 其它日粮成分与试验组相同。2 周试验结束后所有猪只全部屠宰, 测定生长性能、AMPK 活性、*PRKAG3* 基因表达量、AMPK $\gamma$ 3 蛋白表达量、胴体品质和肉质性状。结果表明: 1) 日粮中添加 400 mg·kg<sup>-1</sup>体质量的 Metformin 后, 试验组 AMPK 活性、*PRKAG3* 基因 mRNA 含量和 AMPK $\gamma$ 3 蛋白表达量分别比对照组提高了 13.92%、4.39 倍和 35.53% ( $P < 0.05$ )。2) 试验组采食量和平均日增体质量分别比对照组下降 13.80% ( $P < 0.05$ ) 和 13.14%, 而料肉比则比对照组提高 6.77%。3) 试验组胴体长显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 屠宰率、背膘厚、眼肌面积和瘦肉率均低于对照组, 但差异均不显著 ( $P > 0.05$ )。4) 试验组 pH2、滴水损失、a 值低于对照组 ( $P > 0.05$ ); pH1、剪切力和熟肉率高于对照组 ( $P > 0.05$ ); L 值和 b 值则极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。结果提示, Metformin 可激活 *PRKAG3* 基因表达, 进而可能影响猪生长性能和肉质。

**关键词:** 猪; 二甲双胍; *PRKAG3* 基因; 生长性能; 肉质

中图分类号: S828; S815.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)10-1566-07

## Effect of Metformin on *PRKAG3* Gene Expression and Pork Quality of Pigs

LI Meng-yun<sup>1,2</sup>, YU Bing<sup>1</sup>, CHEN Dai-wen<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Animal Nutrition, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Zhengzhou College of Animal Husbandry and Engineering, Zhengzhou 450011, China)

**Abstract:** This study was conducted to investigate the effect of Metformin on *PRKAG3* gene expression, growth performance and pork quality in pigs. 10 DLY pigs (80 kg) were randomly divided into control and experimental groups, pigs in experimental group fed diet supplemented with Metformin at dose of 400 mg·kg<sup>-1</sup> body weight. After 2 weeks, all pigs were slaughtered to determine growth performance, AMPK activity, *PRKAG3* gene expression, AMPK $\gamma$ 3 protein levels and pork quality traits. The results showed that, compared with control group, experimental group had 13.92% higher AMPK activity ( $P < 0.05$ ), 4.39-fold *PRKAG3* gene expression ( $P < 0.05$ ) and 35.53% higher AMPK $\gamma$ 3 protein level ( $P < 0.05$ ). Pigs in experimental group had 13.80% lower feed intake ( $P < 0.05$ ), 13.14% lower average daily gain and 6.67% higher F/G than that in control group. Experimental group reduced dressing percentage, lean percentage, eye lean area, and backfat thickness ( $P > 0.05$ ), and significantly reduced carcass length ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, experimental group had lower pH2, drip loss, a values, higher pH1, shear force and cooked meat percentage, but there was no significant difference

收稿日期: 2011-04-11

基金项目: 国家“973”项目(2012CB124701)

作者简介: 李梦云(1970-), 女, 湖北监利人, 副教授, 博士, 主要从事猪的营养与分子营养研究, Tel: 0371-65765117, E-mail: limengyun@163.com

\* 通讯作者: 陈代文, E-mail: chendwz@sicau.edu.cn

between control and experimental groups ( $P > 0.05$ ). Experimental group significantly increased L and b values ( $P < 0.01$ ). These results suggested that supplementary 400 mg · kg<sup>-1</sup> body weight Metformin in diet activated *PRKAG3* gene expression, which affected the growth performance and pork quality.

**Key words:** pigs; Metformin; *PRKAG3* gene; growth performance; pork quality

一磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 是一种参与体内营养代谢调节作用的蛋白激酶, 由催化亚基  $\alpha$ 、调节亚基  $\beta$  和  $\gamma$  构成,  $\alpha$  和  $\beta$  分别有 2 种同工型,  $\gamma$  亚基有  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、和  $\gamma 3$  3 种同工型。 *PRKAG3* 基因编码 AMPK $\gamma 3$  亚基。研究表明, AMPK 在糖代谢中起着非常重要的作用。可通过磷酸化作用抑制糖原合成酶, 降低糖原的合成速率。而且肌肉中 AMPK 的激活可导致葡萄糖转运子 4 (GLUT4) 从细胞内转运到细胞浆膜上, 促进肌肉对葡萄糖的吸收, 从而提高骨骼肌中糖原含量<sup>[1]</sup>。Milan 等<sup>[2]</sup> 报道, 汉普夏猪 *PRKAG3* 基因第 200 个密码子发生突变 (Arg<sup>200</sup> → Gln<sup>200</sup>) 可降低 AMPK 活性, 使骨骼肌中糖原含量升高 70%, 导致猪肉终 pH 降低, 是引起 RN 效应的根本原因。Ciobanu 等<sup>[3]</sup> 又证实, *PRKAG3* 中紧邻 Arg<sup>200</sup> 的 Val<sup>199</sup> → Ile<sup>199</sup> 突变具有与 RN 相反的效应, 它使骨骼肌中糖原含量降低, 因而有利于改善肉质。由此可以推测, *PRKAG3* 基因可能是一个影响肉质性状的主效基因。

二甲双胍 (Metformin) 是一种降糖药物, 其降低肝脏中葡萄糖的生产、增加肝中脂肪酸的氧化以及促进骨骼肌中葡萄糖的吸收都是通过激活 AMPK 来实现的。那么 Metformin 在活化 AMPK 总活性时, 能否提高 *PRKAG3* 表达量, 进而影响肉质呢? 目前这方面的研究还未见报道。因而研究 Metformin 对正常猪 *PRKAG3* 表达量的影响及其与肉质的关系非常重要, 这对从分子水平改善肉品质具有非常重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

Metformin 购自上海帮成生化有限公司, 纯度为 99.5%。

### 1.2 试验设计与实验动物

本试验采用单因子试验设计, 考察日粮中添加 Metformin 来激活 *PRKAG3* 基因的表达, 以及激活 AMPK $\gamma 3$  的表达进而研究对猪生长性能、胴体品质

和肉质性状的影响。挑选 80 kg 左右的杜洛克 × 长白 × 大约克三元杂交 (DLY) 阉公猪 10 头, 随机分成配对组和试验猪。每组 5 个重复, 每个重复 1 头猪。试验组日粮中添加 400 mg · kg<sup>-1</sup> 体质量的 Metformin, 对照组日粮中除不含 Metformin 外, 其它日粮成分与试验组相同。

### 1.3 试验日粮

基础日粮参照 NRC(1998)80~120 kg 肥育猪营养标准配制, 2 个处理的基础日粮配比与营养水平相同 (表 1)。

### 1.4 饲养管理

试验猪以每头为 1 个重复进行单圈饲养, 饲喂粉料, 日喂 3 次, 试验组每次喂料要少量多加, 使之刚好吃饱而食槽中未见余料为准, 自由饮水。2 组饲养管理条件一致。预试期 1 周, 正试期 2 周。正试期开始前称重 1 次, 试验结束后空腹称重, 然后, 所有猪只用电击的方式处死后全部屠宰取样, 并按标准方法<sup>[4]</sup> 进行现场胴体分割, 测定胴体和肉质性状。

### 1.5 测定指标及方法

1.5.1 生长性能指标 试验期准确记录每头猪每天的采食量, 试验开始前和试验结束后分别空腹称重, 计算出平均每日采食量、平均日增体质量和饲料转化率。

1.5.2 胴体性状测定 测定屠宰率、头质量、蹄质量、胴体长、背膘厚、眼肌面积和瘦肉率。

1.5.3 肉质性状测定 包括屠宰后 45 min 和 24 h 的 pH1 和 pH2、剪切力、滴水损失、熟肉率、L 值、a 值和 b 值。

#### 1.5.4 *PRKAG3* 基因实时定量测定

1.5.4.1 总 RNA 提取及 RT 反应: 取背最长肌样品 30 mg, 加入液氮并研磨成粉, 收集入 1.5 mL EP 管中, 按 QIAGEN 公司试剂盒 (Rneasy mini kit) 操作说明提取总 RNA。然后通过凝胶电泳检测其完整性, 并测定在 260 和 280 nm 处的 OD 值, 以检测 RNA 样品的纯度。将提取的总 RNA 作为模板进行 RT 反应。反应体系为 10  $\mu$ L: RNA 酶抑制剂

0.25  $\mu\text{L}$ 、 $\text{MgCl}_2$  2  $\mu\text{L}$ 、Oligo dT 引物 1  $\mu\text{L}$ 、dNTP Mixture 1  $\mu\text{L}$ 、总 RNA 4.25  $\mu\text{L}$ 、 $10\times\text{RT}$  缓冲液 1  $\mu\text{L}$ 、反转录酶 0.5  $\mu\text{L}$ 。反应程序:30  $^\circ\text{C}$  10 min, 42  $^\circ\text{C}$  2 h, 99  $^\circ\text{C}$  5 min, 5  $^\circ\text{C}$  5 min。

表 1 基础日粮组成及营养水平

Table 1 Compositions and nutrition levels of basal diet

原料 Ingredient	配比 Proportion	营养水平 Nutrition content	配比 Proportion
玉米 Corn	78.76	DE/(MJ $\cdot$ kg $^{-1}$ )	13.93
豆粕 Soybean meal	15.10	CP	13.00
大豆油 Soybean oil	2.00	Ca	0.51
石粉 Limestone	0.70	P	0.47
磷酸氢钙 Dicalcium phosphate	0.90	AP	0.27
食盐 Salt	0.30	D-Lys	0.67
赖氨酸 Lys	0.24	D-Met	0.20
添加剂预混料 Premix	2.00	D-(Met+Cys)	0.40
总计 Total	100.00	D-Thr	0.44

预混料每千克全价料含:铁 100 mg, 锌 100 mg, 锰 10 mg, 铜 10 mg, 硒 0.3 mg, 碘 0.5 mg, VA 2 000 IU, VD<sub>3</sub> 200 IU, VE 20 IU, VK 30.5 mg, 生物素 0.05 mg, 叶酸 0.3 mg, 尼克酸 20 mg, 泛酸 20.0 mg, 核黄素 2.5 mg, VB<sub>1</sub> 2 mg, VB<sub>6</sub> 1 mg, VB<sub>12</sub> 10  $\mu\text{g}$ , 氯化胆碱 1 g, 泰乐菌素 30 mg, 抗氧化剂 200 mg

The premix provides following for per kg diet: Fe 100 mg, Zn 100 mg, Mn 10 mg, Cu 10 mg, Se 0.3 mg, I 0.5 mg, VA 2 000 IU, VD<sub>3</sub> 200 IU, VE 20 IU, VK 30.5 mg, biotin 0.05 mg, folic acid 0.3 mg, niacin 20 mg, pantothenic acid 20 mg, riboflavin 2.5 mg, VB<sub>1</sub> 2 mg, VB<sub>6</sub> 1 mg, VB<sub>12</sub> 10  $\mu\text{g}$ , choline 1 g, tylosin 30 mg, antioxidant 200 mg

1.5.4.2 引物和 TaqMan 探针的设计与合成: 序列(GenBank: U07786)设计, 由上海基康生物公司设计合成(表 2)。  
PRKAG3 引物和探针根据基因序列(GenBank: AF214520)设计,  $\beta$ actin 内参引物和探针根据基因

表 2 PRKAG3 和  $\beta$ actin 基因引物和探针序列

Table 2 The primer and probe sequences of PRKAG3 and  $\beta$ actin genes

基因 Gene	引物序列(5'-3')Primer sequence	引物长度/bp Length	Tm/ $^\circ\text{C}$	产物大小/bp Products size
PRKAG3	FP: GTGCTCCACATCCTCACACATAA	23	58.6	115
	RP: ATGTGCCGATGCCCAAAT	18	58.3	
	Probe CTCAAGTTCCTGCACATCTTTGGCACC	27	68.3	
$\beta$ actin	FP: GCGGTGGCCATCTCGTT	17	59.2	69
	RP: GATCGTGCGGACATCAA	18	58.9	
	Probe: TCGAAGTCCAGGGCCACGTAGCA	23	68.6	

1.5.4.3 Real-time PCR 反应体系与程序: 以 cDNA 为模板进行的定量 PCR 反应体系总体积为 25  $\mu\text{L}$ 。反应体系: cNDA 2  $\mu\text{L}$ 、Premix Ex Taq(2 $\times$ ) 12.5  $\mu\text{L}$ 、上、下游引物各 0.5  $\mu\text{L}$ 、探针(10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、ROX DyeII(50 $\times$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、0.1% DEPC 处理水 8  $\mu\text{L}$ 。定量 PCR 反应程序: 95  $^\circ\text{C}$  3 min; 94  $^\circ\text{C}$  25 s, 60  $^\circ\text{C}$  30 s, 共 40 个循环; 70  $^\circ\text{C}$  延伸 5 min。

1.5.4.4 标准曲线的制备与定量分析: 每次定量扩

增目的基因和内参基因均要制备标准曲线。将常规 PCR 产物回收纯化,稀释 10 倍后在核酸蛋白仪上测 260 与 280 nm 处的 OD 值,用以检测样品的浓度与纯度。样品浓度的计算是根据 260 nm 处的 OD 值换算成每毫升的拷贝数。浓度范围在每毫升  $10^2 \sim 10^{10}$  拷贝之间。根据标准曲线,定量 PCR 仪自动计算出样本中 PRKAG3 和  $\beta actin$  每毫升的拷贝数,则 PRKAG3 的表达量为每毫升 PRKAG3 的拷贝数与  $\beta actin$  拷贝数的比值。

**1.5.5 AMPK $\gamma$ 3 异构体蛋白表达量的测定** 取背最长肌 10 g,浸至 0 °C 匀浆缓冲液中匀浆,匀浆液以  $2\ 000 \times g$  离心 10 min(4 °C)。保留上清,沉淀加入匀浆缓冲液如上重复匀浆离心,保留上清。2 次上清混合以  $9\ 000 \times g$  离心 10 min(4 °C)。取上清以  $190\ 000 \times g$  超速离心 1 h(4 °C)。取沉淀,加入少量缓冲液后用玻璃匀浆器匀浆至均一,得骨骼肌细胞膜悬浊液,分装后置于 -70 °C 保存。采用 Western blot 方法,测定骨骼肌中 AMPK $\gamma$ 3 异构体的蛋白表达量。分别对 AMPK $\gamma$ 3 蛋白和看家基因 GAPDH 蛋白进行免疫印迹,并用 ImageJ 分析软件计算出其灰度值,两者的比值即为 AMPK $\gamma$ 3 蛋白表达量。具体测定方法见参考文献[5]。

**1.5.6 AMPK 总活性测定** AMPK 活性采用放射化学法测定,根据 AMPK 使特异性肽底物 SAMS(HMRSAMSGHLHLVKRR)磷酸化的原理,以 [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]ATP 作为磷供体检测酶的活性。

测定方法参照文献[6]:在 1 mL EP 管中加入

10  $\mu$ L AMPK 反应缓冲液,底物 SAMS 肽液 10  $\mu$ L,及  $\gamma$ - $^{32}P$  ATP 混合液 10  $\mu$ L,30 °C 水浴 5 min,加 10  $\mu$ L AMPK 酶液于 30 °C 水浴 15 min。反应结束后,迅速取 35  $\mu$ L 反应液滴在 Whatman P81 滤纸上(1 cm<sup>2</sup>),晾干后放入 500 mL 0.5% 磷酸中振荡洗涤 4 次(5 min · 次<sup>-1</sup>),再用 200 mL 丙酮洗涤 1 次,风干后放入闪烁瓶,加入 5 mL 闪烁液,立刻用 PACKARD TRI-CARB 2000CA 型闪烁计数仪测定。

## 1.6 统计分析

采用 SPSS 统计软件 12.0 对数据进行 *t* 检验。试验结果用“Mean $\pm$ SE”表示。

## 2 结果

### 2.1 添加 Metformin 对 PRKAG3 基因表达量的影响

猪日粮中添加 400 mg · kg<sup>-1</sup> 体质量的 Metformin 后,试验组 AMPK 活性、PRKAG3 基因 mRNA 含量及其蛋白表达量见表 3。从表中可以看出,试验组 AMPK 活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),比对照组提高了 13.92%;PRKAG3 基因表达量显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ),比对照组提高了 4.39 倍。另外,试验组的 AMPK $\gamma$ 3 蛋白表达量比对照组提高了 35.53% ( $P < 0.05$ ),这表明添加 Metformin 可有效活化 AMPK 和提高 PRKAG3 基因表达量。

表 3 添加 Metformin 对 AMPK 活性、PRKAG3 基因和 AMPK $\gamma$ 3 蛋白表达量的影响

Table 3 The effect of Metformin on AMPK activity, expression of PRKAG3 gene and AMPK $\gamma$ 3 protein

指标 Index	对照组 Control group	试验组 Experimental group
AMPK/(nmol · (g prot · min <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup> )	32.43 $\pm$ 0.75 <sup>a</sup>	37.67 $\pm$ 1.36 <sup>b</sup>
PRKAG3/ $\beta actin$ × 10 <sup>5</sup>	3.14 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>	16.92 $\pm$ 5.50 <sup>b</sup>
AMPK $\gamma$ 3/GAPDH	0.26 $\pm$ 0.027 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.048 <sup>b</sup>

同行数据标注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 ( $P < 0.01$ )。下同

The different small letters in the same row mean significant difference ( $P < 0.05$ ), the different capital letters mean very significant difference ( $P < 0.01$ ). The same as below

### 2.2 添加 Metformin 对猪生长性能的影响

对照组和试验组猪生长性能的差异比较见表 4,添加 Metformin 以后,试验组结束体质量比对照组降低了 3.41%,采食量比对照组下降 13.80%,平

均日增体质量下降 13.14%,而饲料转化率则比对照组提高了 6.77%。除采食量达差异显著外 ( $P < 0.05$ ),其它指标均未达到显著水平 ( $P > 0.05$ )。

表 4 添加 Metformin 对生长性能的影响

Table 4 The effect of Metformin on growth performance

性状 Trait	对照组 Control group	试验组 Experimental group
起始体质量/kg Initial BW	82.85±1.23 <sup>a</sup>	82.20±1.36 <sup>a</sup>
结束体质量/kg Final BW	94.90±1.33 <sup>a</sup>	91.67±2.34 <sup>a</sup>
平均日增体质量/(g·d <sup>-1</sup> ) Average daily gain	753.13±56.22 <sup>a</sup>	654.17±147.96 <sup>a</sup>
采食量/kg Feed intake	2.61±0.70 <sup>a</sup>	2.25±0.86 <sup>b</sup>
料肉比 F/G	3.54±0.34 <sup>a</sup>	3.78±0.77 <sup>a</sup>

### 2.3 添加 Metformin 对胴体品质的影响

表 5 为对照组和试验组胴体品质比较,可见,添加 Metformin 后,试验组屠宰率、背膘厚、眼肌面积

和瘦肉率均低于对照组,但差异均不显著( $P > 0.05$ );两者眼肌面积  $P$  值达 0.071,接近显著水平;试验组胴体长显著低于对照组( $P < 0.05$ )。

表 5 添加 Metformin 对胴体品质的影响

Table 5 The effect of Metformin on carcass composition

性状 Trait	对照组 Control group	试验组 Experimental group
屠宰率/% Dressing percentage	70.81±0.82 <sup>a</sup>	69.91±0.31 <sup>a</sup>
胴体长/cm Carcass length	86.58±0.78 <sup>a</sup>	83.90±0.68 <sup>b</sup>
背膘厚/cm Backfat thickness	2.24±0.11 <sup>a</sup>	2.04±0.11 <sup>a</sup>
眼肌面积/cm <sup>2</sup> Eye muscle area	38.64±2.27 <sup>a</sup>	32.52±1.87 <sup>a</sup>
瘦肉率/% Lean percentage	56.80±0.67 <sup>a</sup>	54.75±0.63 <sup>a</sup>

### 2.4 添加 Metformin 对肉质性状的影响

表 6 为对照组和试验组肉质性状的测定结果,数据显示试验组 pH2、滴水损失、a 值低于对照组,但差异不显著( $P > 0.05$ ),其中 pH2  $P$  值达 0.101,

接近显著水平;pH1、剪切力和熟肉率高于对照组,差异也不显著( $P > 0.05$ );L 值和 b 值则极显著高于对照组( $P < 0.01$ )。

表 6 添加 Metformin 对肉质性状的影响

Table 6 The effect of Metformin on meat quality traits

性状 Trait	对照组 Control group	试验组 Experimental group
pH1	5.91±0.11 <sup>a</sup>	6.02±0.12 <sup>a</sup>
pH2	5.53±0.17 <sup>a</sup>	5.49±0.11 <sup>a</sup>
剪切力/kg Shear force	6.10±0.37 <sup>a</sup>	6.41±0.54 <sup>a</sup>
滴水损失/% Drip loss	2.78±0.15 <sup>a</sup>	2.54±0.13 <sup>a</sup>
熟肉率/% Cooked meat percentage	62.57±1.66 <sup>a</sup>	64.81±0.87 <sup>a</sup>
L	41.96±0.79 <sup>A</sup>	45.57±0.69 <sup>B</sup>
a	2.63±0.54 <sup>a</sup>	2.42±0.55 <sup>a</sup>
b	4.88±0.38 <sup>A</sup>	6.62±0.15 <sup>B</sup>

## 3 讨论

### 3.1 添加 Metformin 对 *PRKAG3* 基因表达量的影响

最近研究表明,抗糖尿病药物 Metformin 可以激活 AMPK。Metformin 作为一种降糖药物,其降低肝脏中葡萄糖的产生、增加肝中脂肪酸的氧化以及促进骨骼肌中葡萄糖的吸收<sup>[7]</sup>都是通过激活 AMPK 来介导实现的。Tosca 等<sup>[8]</sup>的研究也表明,在牛卵巢的颗粒层细胞中, Metformin 通过激活 AMPK 来抑制类固醇的生成。本试验结果表明,猪日粮中添加  $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体质量的 Metformin 后,试验组 AMPK 活性比对照组提高了 13.92%; *PRKAG3* 基因表达量比对照组提高了 4.39 倍。同时 AMPK $\gamma$ 3 蛋白水平也比对照组提高了 35.53% ( $P < 0.05$ ),这表明 Metformin 可活化 AMPK 和提高 *PRKAG3* 基因表达量。

目前关于 Metformin 激活 AMPK 的机制还不清楚。有研究表明, Metformin 可能通过降低细胞内能荷来激活 AMPK,因为 Metformin 是呼吸链中复合物 I 的抑制剂<sup>[9]</sup>,但最近的报道又否认了这种观点,因为 Metformin 激活 AMPK 并没有影响 AMP/ATP 比值<sup>[10]</sup>,目前关于 Metformin 激活 AMPK 的作用机理还不是很清楚。

### 3.2 添加 Metformin 对猪生产性能的影响

Ashwell 和 Memutry<sup>[11]</sup>用 300 和  $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体质量的 Metformin 处理 18 日龄的肉仔鸡 10 d,结果发现  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体质量的 Metformin 对肉仔鸡的采食量和平均日增体质量无显著影响,而添加  $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体质量的 Metformin 后,可使采食量降低 15%,平均日增体质量也显著降低。关于 Metformin 对猪生产性能的影响目前还未见报道。本研究表明,日粮中通过添加  $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体质量的 Metformin 而引起的 AMPK 和 *PRKAG3* 表达量活化模型中,试验组的采食量比对照组下降了 13.80%,平均日增体质量下降了 13.14%,而料肉比则比对照组提高了 6.77%。

最近,大量研究表明下丘脑 AMPK 活性调控采食量。Andersson 等<sup>[12]</sup>研究发现,活化下丘脑 AMPK 活性使雄性大鼠采食量和体质量均增加,而抑制 AMPK 活性则降低采食量和体增质量,这表明通过调节下丘脑 AMPK 活性能改变大鼠的采食量和体质量。进一步研究表明,下丘脑中 AMPK 通过

调控乙酰辅酶 A 羧化酶-丙二酸单酰辅酶 A-肉毒碱棕榈酰转移酶途径来调控采食量<sup>[13]</sup>。本试验未测猪下丘脑中 AMPK 活性,但知道添加 Metformin 后可活化骨骼肌中 AMPK,因而只能推测 Metformin 在活化骨骼肌中 AMPK 活性的同时而抑制下丘脑中 AMPK 活性,从而降低猪的采食量和体质量。

### 3.3 添加 Metformin 对肉质的影响

关于添加 Metformin 激活 *PRKAG3* 基因表达后对肉质的影响,目前还未见报道。本研究结果表明,激活 *PRKAG3* 表达量后,胴体长显著低于对照组,屠宰率、头质量、蹄质量、背膘厚、眼肌面积和瘦肉率均低于对照组。原因可能在于激活 *PRKAG3* 基因表达后,猪的采食量显著降低,使从饲料中获得的能量和蛋白质等养分不足,肌肉蛋白质合成受阻,合成的瘦肉量降低而减少瘦肉率。

Barnes 等<sup>[14]</sup>通过转基因小鼠模型证实该突变可使 *PRKAG3* 基因的表达量大幅度降低,同时 AMPK 的活性也降低,而 AMPK 可控制肌肉对葡萄糖的吸收,并调节糖原合成,因而影响骨骼肌中糖原含量,进而影响肉质。而且 *PRKAG3* 基因敲除小鼠糖原重新合成能力减弱,而突变型(R225Q)小鼠糖原重新合成能力显著增强。这提示 *PRKAG3* 基因可调节骨骼肌特别是糖酵解纤维中糖代谢。本研究结果也表明,激活 *PRKAG3* 基因表达后,pH2、滴水损失、a 值低于对照组,而 L 值和 b 值则极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。机理可能在于激活 *PRKAG3* 基因表达量后,肌细胞膜中 GLUT4 的蛋白表达量增加,促进了骨骼肌中葡萄糖的吸收,从而增加了肌糖原含量。而屠宰时肌肉糖原含量越多,将导致乳酸增加和更低的终 pH。Jing 等<sup>[15]</sup>报道,激活 AMPK 可增加葡萄糖转运和己糖激酶的活性,从而使 6-磷酸葡萄糖增加,6-磷酸葡萄糖可正反馈激活糖原合成酶,同时作为糖原合成的底物存在。Sajan 等<sup>[16]</sup>也证实, Metformin 通过激活 AMPK 活性来增加骨骼肌中葡萄糖的转运,进而提高肌肉中葡萄糖的含量。因而可以推测,AMPK $\gamma$ 3 亚基参与调控 AMPK 活性,影响骨骼肌中糖原代谢,进而影响肌糖原含量。而肌糖原影响猪屠宰后熟化过程和终 pH,因而影响肉质,特别是 pH。但激活 AMPK 活性和 *PRKAG3* 基因表达对骨骼肌中糖代谢的调节作用还有待于进一步的研究。

## 4 结 论

综合上述试验结果,本研究可以得出如下结论:日粮中添加  $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体质量的 Metformin 后,可显著活化 AMPK,并提高 PRKAG3 基因表达量及 AMPK $\gamma$ 3 蛋白表达量。日粮中添加 Metformin 后,有降低采食量和减轻体质量的作用,并对肉质有一定的影响。

## 参考文献:

- [1] WINDE W W, HOLMES B F, RUBINK D S, et al. Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle[J]. *J Appl Physiol*, 2000, 88: 2219-2226.
- [2] MILAN D, JEON J T, LOOFT C, et al. A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle[J]. *Science*, 2000, 288: 1248-1251.
- [3] CIOBANU D, BASTIAANSEN J, MALET M, et al. Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated gamma(3)-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality[J]. *Genetics*, 2001, 159(3): 1151-1162.
- [4] 陈润生. 猪生产学[M]. 北京:中国农业出版社, 1995: 165-169.
- [5] ZOUM H, STACY S, KIRKPATRICK B J, et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin *in vivo*: Role of mitochondrial reactive nitrogen species[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 43940-43951.
- [6] 陈晓春. AMPK 对产蛋鸡胆固醇代谢的调节作用[D]. 雅安:四川农业大学, 2006.
- [7] ZHOU G C, MYERS R, LI Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of Metformin action [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(8): 1167-1174.
- [8] TOSCA L, CHABROLLE C, SVETLANA M, et al. Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK) [J]. *Biol Reprod*, 2007, 76: 368-378.
- [9] OWEN M R, DORAN E, HALESTRAP A P. Evidence that Metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain[J]. *Biochem J*, 2000, 348: 607-614.
- [10] HAWLEY S A, GADALLA A E, OLSEN G S, et al. The antidiabetic drug Metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism [J]. *Diabetes*, 2002, 51: 2420-2425.
- [11] ASHWELL C M, MCMUTRY P. Hypoglycemia and reduced feed intake in broiler chickens treated with Metformin [J]. *Poult Sci*, 2003, 82: 106-110.
- [12] ANDERSSON U, FILIPSSON K, CAROLINE R, et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 12005-12008.
- [13] XUE B Z, KAHN B B. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues[J]. *J Physiol*, 2006, 574: 73-83.
- [14] BARNES B R, MARKLUND S, SERILER T L, et al. The 5'-AMP-activated protein kinase 3 isoform has a key role in carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 38441-38447.
- [15] JING M, CHERUYU V K, FARAMARZ I B. Stimulation of glucose transport in response to activation of distinct AMPK signaling pathways [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 295: C1071-C1082.
- [16] SAJAN M P, BANDYPOPADHYAY G, MIURA A, et al. AICAR and metformin, but not exercise, increase muscle glucose transport through AMPK-, ERK-, and PDK1-dependent activation of atypical PKC [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 298: E179-E192.

(编辑 郭云雁)