

日粮不同蛋白水平对绵羊脂肪和肌肉中 *FAS* 基因表达的影响

张英杰, 刘月琴, 刘景云

(河北农业大学动物科技学院, 保定 071001)

摘要: 选择年龄、体质量相近的杂交母羊(萨福克♂×小尾寒羊♀)24只, 随机分为3组, 分别饲喂不同蛋白水平的日粮: 中蛋白日粮(150 g·d⁻¹)、低蛋白日粮(112.5 g·d⁻¹)和高蛋白日粮(187.5 g·d⁻¹)。采用半定量 RT-PCR 的方法, 检测日粮不同蛋白水平对绵羊脂肪和肌肉中 *FAS* 基因表达的影响。结果表明: 日粮的蛋白质水平影响绵羊腹部皮下脂肪、肠系膜脂肪和半腱肌组织中 *FAS* 基因的表达, 随着日粮蛋白质水平的升高 *FAS* 表达量降低。*FAS* 基因表达量在各组织间有差异, 腹部皮下脂肪、肠系膜脂肪中, 中蛋白组和低蛋白组间表达差异不显著 ($P>0.05$), 高蛋白组显著低于中蛋白组和低蛋白组 ($P<0.05$); 在半腱肌组织中, 中蛋白组与高蛋白组和低蛋白组间均差异显著 ($P<0.05$), 高蛋白组极显著低于低蛋白组 ($P<0.01$)。

关键词: 绵羊; 蛋白水平; *FAS*; 基因表达

中图分类号: S826; S816.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)07-0829-06

Effects of Different Dietary Protein Level on the Expression of *FAS* mRNA in Adipose and Muscle Tissue in Sheep

ZHANG Ying-jie, LIU Yue-qin, LIU Jing-yun

(College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Twenty four crossbred ewes (Black-Suffolk♂×Small Tail Han sheep♀) were randomly allocated into three groups fed with different protein levels diet, medium protein (150 g·d⁻¹), low protein (112.5 g·d⁻¹) and high protein (187.5 g·d⁻¹) groups, respectively. The expression level of *FAS* mRNA in adipose tissue and muscle of sheep were quantified by RT-PCR. The result showed that expression of *FAS* mRNA decreased with the increase of diet protein level in abdominal subcutaneous adipose tissue, mesentery adipose tissue and semitendinosus muscle of sheep. But the expression of *FAS* mRNA had tissue specificity, it was expressed in abdominal subcutaneous and mesentery adipose tissue, there was no significant difference between medium protein group and low protein group ($P>0.05$), but the expression of high protein group was significantly lower than that of medium protein group and low protein group ($P<0.05$). While in semitendinosus muscle tissue, the expression of *FAS* mRNA in medium protein group was significantly different from that in high protein group and low protein group ($P<0.05$), and the expression of *FAS* mRNA in high protein group was significantly higher than that in low protein group ($P<0.01$).

Key words: sheep; protein level; *FAS*; gene expression

动物的体脂沉积由脂肪酸合成酶(FAS)催化乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 合成甘油三酯(TAG)^[1-2]。FAS 表达水平的升高能够显著增加甘油三酯在体内的沉积而导致肥胖^[3]。熊文中等研究发现,猪脂肪组织中 FAS 与胴体脂肪量、胴体的脂肪率呈极显著正相关^[4]。因此,FAS 的活性高低及多寡对控制动物体脂沉积具有重要的作用,FAS 基因的表达直接影响着脂肪合成的多寡。

目前已有研究表明肝脏和脂肪组织中 FAS 活性及其基因表达受多种激素和日粮营养成分的调控。熊文中等研究发现,猪重组生长激素显著降低组织中 FAS 的活性^[4]。GH 处理能显著减少 FAS 等脂肪合成酶类在脂肪组织的表达,降低它们的活性,使脂肪组织自身的脂肪合成下降^[5]。刘作华等对生长育肥猪的研究结果表明,高能量日粮提高了背膘中 FAS mRNA 的表达,降低激素敏感脂酶 mRNA 的表达,从而增加了背膘中肌内脂肪酸合成酶与激素敏感脂酶 mRNA 的比值,进而增加肌内脂肪含量^[6]。

饲料蛋白质和氨基酸摄入量是影响动物生长速度和胴体构成的主要因素。Mildner 等研究认为高蛋白饲料能抑制猪脂肪细胞中脂肪酸合成酶基因的表达^[7]。张克英等研究表明日粮高蛋白质水平可显著提高猪日增体质量和饲料利用率,而眼肌面积和瘦肉率趋于增加,皮脂率和背膘厚下降^[8]。有关绵羊日粮蛋白水平与 FAS 基因表达的关系研究尚未见报道。本试验旨在通过研究日粮不同蛋白水平对绵羊脂肪和肌肉组织中 FAS 表达量的影响,以阐明日粮蛋白水平与 FAS 基因表达量之间的关系,从而为进一步研究营养素对绵羊肌肉和脂肪中 FAS 的调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物及日粮

选用 24 只健康无病、平均体质量 50 kg 左右的 1~1.5 岁杂交母羊(萨福克 ♂ × 小尾寒羊 ♀)。采用单因子试验设计,随机分为 3 组:A 组,低蛋白组(蛋白水平 112.5 g · d⁻¹);B 组,中蛋白组(蛋白水平 150 g · d⁻¹);C 组,高蛋白组(蛋白水平 187.5 g · d⁻¹)。各组除日粮蛋白水平不同外,能量及其它营养指标基本保持一致。中等蛋白水平按照中国肉羊饲养标准(NY/T816-2004)蛋白需要量执行(粗蛋白为 150 g · d⁻¹),另外 2 个试验处理是在中

等蛋白水平的基础上增加或减少 25%。饲料配方及营养水平见表 1。

表 1 饲料配方和营养成分

Table 1 The composition and nutrient contents of diet

原料 Ingredient	A	B	C
精料(%风干样基础) Concentrate(as-fed basis)			
玉米 Corn	92.0	61.6	52.8
棉籽粕 Cotton seed	0	9.0	10.0
花生饼 Peanut cake	0	10.0	23.0
麸皮 Wheat bran	5.2	17.0	12.0
磷酸氢钙 CaHPO ₄	0.8	0.4	0.2
食盐 Salt	1.0	1.0	1.0
预混料 Premix	1.0	1.0	1.0
总计 Total	100	100	100
饲喂量/(g · d ⁻¹) Intake	600	600	600
粗料(干物质)Roughage(DM)			
花生蔓粉/(g · d ⁻¹) Peanut vine	400	400	400
青贮玉米秸/(g · d ⁻¹) Corn stalk silage	300	300	300
* 营养水平 Nutrient level			
DE/(MJ · d ⁻¹)	14.48	14.46	14.52
CP/(g · d ⁻¹)	115.06	150.01	183.37
Ca/(g · d ⁻¹)	5.00	5.02	5.06
P/(g · d ⁻¹)	2.60	2.64	2.58

*. 营养水平为计算值 *. Nutrient level are calculated values

1.2 样品采集

试验羊经预饲期 7 d, 试验期 45 d 后, 外科手术取腹部皮下脂肪、肠系膜脂肪、半腱肌, 样品采集后装入灭菌冷冻管, 立即放入液氮中带回实验室, 置 -80 °C 低温冰箱中保存备用。

1.3 RNA 提取

RNA 提取按吴江维等^[9]设计的方法进行, 操作时对其中一些步骤稍做改进。然后用无 RNA 酶的 DNA 酶 I 除去总 RNA 中污染的 DNA。用紫外分光光度仪测定总 RNA 的浓度和纯度。

1.4 RT 反应

采用 20 μL 反应体系, 在 0.2 mL Eppendorf 管中依次加入: 模板 RNA 5 μL, 10 μmol · L⁻¹ Oligo(dT)15 2 μL, 2.5 mmol · L⁻¹ dNTPs 2 μL, 灭菌 DEPC 水 4 μL, 混匀, 70 °C 反应 5 min 后迅速在冰上冷却 2 min。简短离心收集反应液后依次加入 5 × First-Strand Buffer 4 μL, 0.1 mmol · L⁻¹ DDT 1 μL, 40 U · μL⁻¹ RNasin 1 μL, 轻轻混匀反应液, 42 °C 温浴 2 min, 加入 200 U · μL⁻¹ TIANScript M-MLV 1 μL, 42 °C 反应 50 min, 95 °C 加热 5 min 终止反应, 置冰上进行后续试验或 -20 °C 保存。

1.5 PCR 扩增

PCR 引物序列: FAS 基因引物序列为: 上游引

物:5'-CTCGGTGCCCGTTGTCTA-3',下游引物:5'-GGAGGTATGCCCGCTTTT-3'(扩增产物长度为188 bp,在GenBank中的登录号为AF479289)。 β actin(作为内标)上游引物:5'-GCAGGTCAT-CACCATCGG-3',下游引物:5'-GCCAATCT-CATCTCGTTTTC-3',(扩增产物长度为467 bp,在GenBank中的登录号为U39357)。

对PCR反应条件(退火温度、 $MgCl_2$ 浓度和循环次数)及引物对之间竞争控制进行优化。确定最佳反应体系为:总体积20 μ L,包括1 μ L cDNA模板,2 μ L 10 \times PCR buffer,1.6 μ L 2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP Mix,10 μ mol \cdot L⁻¹的FAS、 β actin上下游引物各1 μ L,1.2 μ L 2.5 mmol \cdot L⁻¹ $MgCl_2$,1 μ L 1 U \cdot μ L⁻¹ Taq DNA Polymerase,灭菌的双蒸水补齐20 μ L。最佳PCR扩增条件为94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,59 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸8 min。

1.6 FAS 基因表达水平的半定量检测

取8 μ L PCR产物在含有EB的2.0%琼脂糖凝胶电泳,Gel-Pro凝胶成像系统软件分析图像,对结果进行半定量分析。依据目的基因和 β actin的PCR产物光密度值之比确定样品中FAS mRNA表达的相对含量。

1.7 数据分析

试验数据用SPSS 13.0软件ANOVA进行统计分析,用LSD检验确定差异显著性。

2 结果

2.1 脂肪总RNA的提取

取2.5 μ L经纯化的总RNA,经1%非变性琼脂糖凝胶电泳后检测mRNA的完整性,部分总RNA电泳的结果如图1所示。OD_{260 nm}/OD_{280 nm}的值在约为2.0,符合试验纯度和反转录要求。

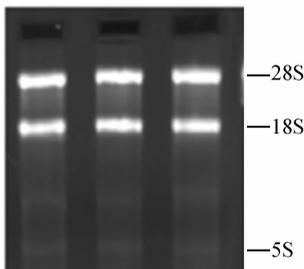
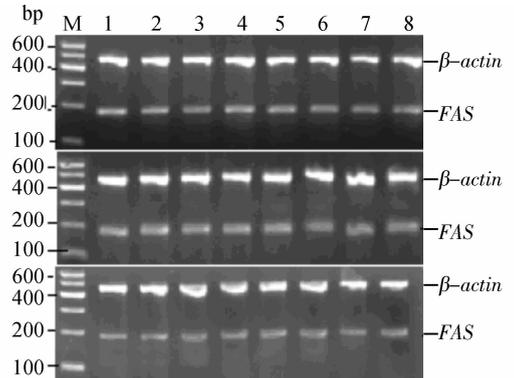


图1 绵羊总RNA

Fig. 1 Total RNA of sheep

2.2 日粮不同蛋白水平对绵羊腹部皮下脂肪组织中FAS基因表达的影响

日粮不同蛋白水平对绵羊腹部脂肪组织FAS基因表达的影响见图2、图3。与内标 β actin相比,绵羊FAS基因在腹部皮下脂肪组织表达量随日粮蛋白水平的升高而降低,中蛋白组和低蛋白组的腹部皮下脂肪组织中FAS基因表达量差异不显著($P > 0.05$),中蛋白组与高蛋白组间差异显著($P < 0.05$),低蛋白组与高蛋白组间差异极显著($P < 0.01$)。



M. DNA相对分子质量标准;1~8.各组每只羊的扩增产物。上图低蛋白组;中图中蛋白组;下图高蛋白组。图4、图6同M. DNA Marker;1-8. The amplification results of sheep in every diet group. Up: Low protein diet; Middle: Medium protein diet; Down: High protein diet. The same as Figure 4 and Figure 6

图2 日粮不同蛋白水平对腹部皮下脂肪组织中FAS半定量RT-PCR产物的电泳图

Fig. 2 Electrophoresis result of FAS semi-quantitative RT-PCR products in abdomen subcutaneous adipose tissue of sheep fed diets with different CP levels

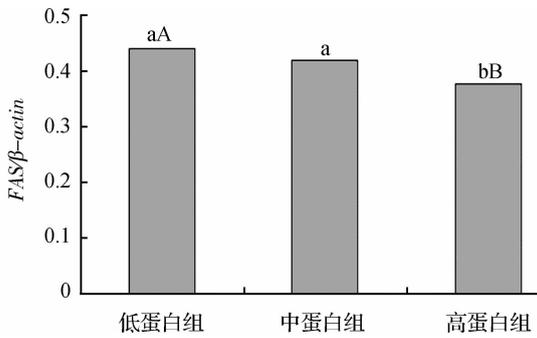
2.3 日粮不同蛋白水平对绵羊肠系膜脂肪组织中FAS基因表达的影响

日粮不同蛋白水平对绵羊肠系膜脂肪组织FAS基因表达的影响见图4、图5。

由图4、图5可以看出,与内标 β actin相比,绵羊FAS基因在肠系膜组织表达量随日粮蛋白水平的升高而降低,肠系膜脂肪组织中FAS基因的表达量在中蛋白组和低蛋白组间差异不显著($P > 0.05$),中蛋白组与高蛋白组间差异显著($P < 0.05$),低蛋白组与高蛋白组间差异显著($P = 0.02$)。

2.4 日粮不同蛋白水平对绵羊半腱肌中FAS基因表达的影响

日粮不同蛋白水平对绵羊半腱肌FAS基因表达的影响见图6、图7。



a, b, c. 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); A, B, C 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。图 5、图 7 同

a, b, c. The different small superscripts mean significant difference ($P < 0.05$); A, B, C. The different capitals mean significant difference ($P < 0.01$). The same as Figure 5 and Figure 7

图 3 日粮不同蛋白水平对绵羊腹部皮下脂肪组织 FAS mRNA 相对丰度的影响

Fig. 3 Effects of different dietary CP levels on relative abundance of FAS mRNA in abdomen subcutaneous adipose tissue of sheep

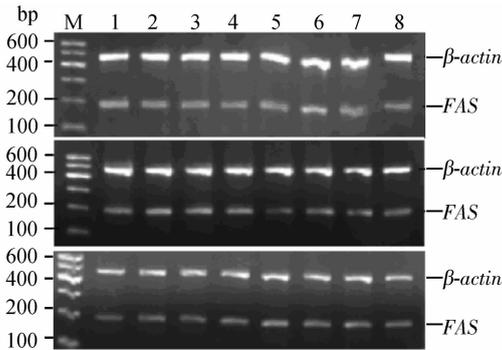


图 4 日粮不同蛋白水平绵羊肠系膜脂肪组织中 FAS 半定量 RT-PCR 产物的电泳图

Fig. 4 Electrophoresis result of FAS semi-quantitative RT-PCR products in mesentery adipose tissue of sheep fed diets with different CP levels

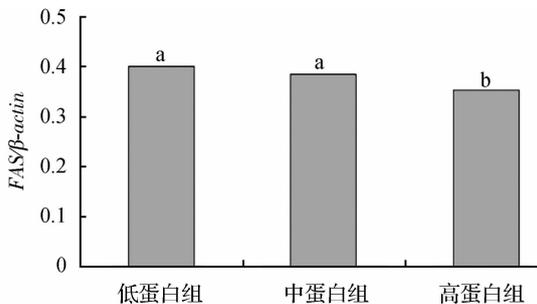


图 5 日粮不同蛋白水平对绵羊肠系膜组织 FAS mRNA 相对丰度的影响

Fig. 5 Effects of different dietary CP levels on relative abundance of FAS mRNA in mesentery adipose tissue of sheep

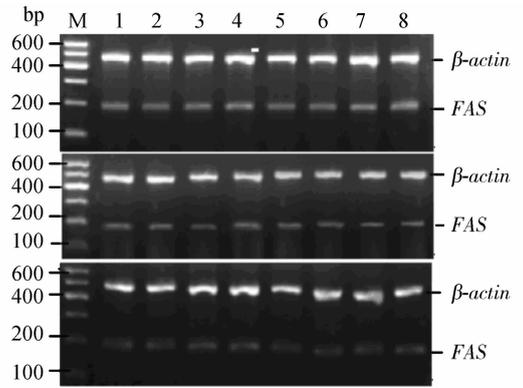


图 6 日粮不同蛋白水平绵羊半腱肌中 FAS 半定量 RT-PCR 产物的电泳图

Fig. 6 Electrophoresis result of FAS semi-quantitative RT-PCR products in semitendinosus muscle of sheep fed diets with different CP levels

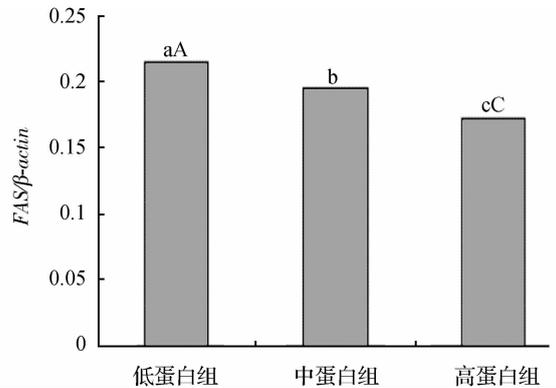


图 7 日粮不同蛋白水平对绵羊半腱肌 FAS mRNA 相对丰度的影响

Fig. 7 Effects of different dietary CP levels on relative abundance of FAS mRNA in semitendinosus muscle of sheep

由图 6、图 7 可以看出,与内标 β -actin 相比,绵羊 FAS 基因在半腱肌表达量随日粮蛋白水平的升高而降低。低蛋白组与中蛋白组之间,中蛋白组与高蛋白组之间差异均显著 ($P < 0.05$),高蛋白组极显著低于低蛋白组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

许多研究表明,日粮蛋白质水平影响动物的背膘厚度和肌内脂肪含量^[10-13]。Wood 等研究认为,日粮蛋白水平对猪的生长速度和背膘厚有影响,低蛋白日粮降低猪的生长速度但增加肌内脂肪含量^[14]。Goerl 等研究表明,随着猪(28~104 kg)日

粮中粗蛋白水平的提高(10%~25%),背膘厚度下降,但眼肌面积增大,且与粗蛋白水平呈二次方关系^[15]。邓敦等研究报道,随着日粮蛋白水平的下降,生长猪背膘厚有上升趋势($P>0.05$)^[16]。陈金文等对5~9周黄羽肉鸡的试验结果证明,日粮粗蛋白水平对腹脂有明显影响,腹脂随粗蛋白水平升高而降低,日粮粗蛋白水平对板油的影响与腹脂相似^[17]。

目前蛋白质对畜禽 FAS 基因的表达调控报道不多,但认为增加动物日粮中蛋白质的含量会抑制动物 FAS 基因的表达调控。Mildner 等研究表明,高蛋白饲料将抑制猪脂肪细胞中 FAS 基因的表达,用蛋白质含量分别为 14%、18%和 24%的日粮饲喂 60 kg 的肥育猪,发现高蛋白日粮组脂肪组织中 FAS mRNA 含量分别比中蛋白和低蛋白组下降 11.73%和 48.24%,而肝脏中的含量变化不大^[7]。Clarke 研究也发现,喂给小鼠高蛋白日粮可降低脂肪组织 FAS mRNA 的丰度,但不影响肝脏组织 FAS mRNA 的丰度,有利于减少体脂肪的沉积^[18-19]。

本试验研究表明,日粮蛋白质水平影响绵羊腹部皮下脂肪、肠系膜脂肪和半腱肌组织 FAS 基因的表达,随着日粮蛋白质水平的升高 FAS mRNA 表达量降低,且表达具有组织特异性,在腹部皮下脂肪、肠系膜脂肪和半腱肌中的表达量不同。说明日粮蛋白水平影响羊体内脂肪和肌肉组织中脂肪的合成,并且影响的程度不同。

有研究表明 FAS 表达水平的升高能显著地增加甘油三酯在体内的沉积而导致肥胖^[3]。熊文中等研究也发现,猪脂肪组织中 FAS 与胴体脂肪量、胴体的脂肪率呈极显著正相关^[4]。但近年来研究认为,肌内脂肪沉积可能是通过调节 FAS 和激素敏感脂酶(HSL)2 种酶 mRNA 表达转录共同实现的,而不是 FAS 单独作用的结果,FAS 与 HSL mRNA 的比值与肌内脂肪含量之间存在着显著的正相关^[6,20]。所以有关绵羊日粮蛋白水平影响肌肉和脂肪组织中 FAS mRNA 表达的机理还有待于进一步研究。

4 结 论

FAS 基因在绵羊脂肪、半腱肌组织中的相对表达量随日粮中蛋白水平的增加而呈降低的趋势,相对表达量在低蛋白组中最高,高蛋白组中最低。

FAS 基因在不同组织的相对表达量具有组织特异性。

参考文献:

- [1] 颜新春,汪以真,许梓荣. 动物脂肪酸合成酶(FAS)基因表达的调控[J]. 动物营养学报,2002, 2(14): 1-4.
- [2] SIMITH S, WITKOWSKI A, JOSHI A K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase[J]. *Progress in Lipid Research*, 2003, 42(4): 289-317.
- [3] SEMENKNVICH C F. Regulation of fatty acid synthase (FAS)[J]. *Progress in Lipid Research*, 1997, 36: 43-53.
- [4] 熊文中,杨 风,周安国. 猪重组生长激素对不同杂交肥育猪脂肪代谢调控的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2001,32(1):1-4.
- [5] WANG Y X, FRIED S K, PETERSEN R N, et al. Somatotropin regulates adipose tissue metabolism in neonatal swine [J]. *J Nutr*, 1999, 129(1): 139-145.
- [6] 刘作华,杨飞云,孔路军,等. 日粮能量水平对生长育肥猪肌内脂肪含量以及脂肪酸合成酶和激素敏感脂酶 mRNA 表达的影响[J]. 畜牧兽医学报,2007, 38(9): 934-941.
- [7] MILDNER A M, CLARKE S D. Porcine fatty acid synthase: Cloning of a complementary DNA, tissue distribution of its mRNA and suppression of expression by somatotropin and dietary protein [J]. *J Nutr*, 1991, 121: 900-907.
- [8] 张克英,陈代文,罗献梅. 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, (1): 12-16.
- [9] 吴江维,杨公社,孙 超. 脂肪组织 RNA 提取方法的改进[J]. 生物技术通报,2005, 5:75-77.
- [10] ADEOLA O, YOUNG L G. Dietary protein-induced changes in porcine muscle respiration, protein synthesis and adipose tissue metabolism [J]. *J Anim Sci*, 1989, 67:664-673.
- [11] KARLSSON A, ENFALT A C, GUSTAVSSON B E, et al. Muscle histochemical and biochemical properties in relation to meat quality during selection for increased lean tissue growth rate in pigs[J]. *J Anim Sci*,1993, 71(4):930-938.
- [12] CASTELL A G, CIPLETT R L, POSTE -FLYNN L M, et al. Performance, carcass and pork characteristics of castrates and gills self-fed diets differing in

- protein content and lysine: energy ratio[J]. *Can J Anim Sci*, 1994,74(3): 519-528.
- [13] KERR B J, McKEITH F K, EASTER R A. Effect on performance and carcass characteristics of nursery to finisher pigs fed reduced crude protein, amino acid-supplemented diets[J]. *J Anim Sci*, 1995, 73(2): 433-440.
- [14] WOOD J D, NUTE G R, RICHARDSON R I, et al. Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs [J]. *Meat Science*, 2004, 67(4):651-667.
- [15] 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]. *J Anim Sci*, 1995,73(12): 3621-3626.
- [16] 邓 敦,李铁军,孔祥峰,等.日粮蛋白水平对生长猪生产性能和氮平衡的影响[J]. *广西农业生物科学*, 2007, 2:137-143.
- [17] 陈金文,杨 山.日粮能量和蛋白水平对肉鸡腹脂和血脂的影响[J]. *动物营养学报*, 1998,10(1):20-28.
- [18] CLARKE S D, ARMSTRONG M K, JUMP D B. Nutritional control of rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA abundance [J]. *J Nutr*, 1990, 120(2): 218-224.
- [19] CLARKE S D. Regulation of fatty acid synthase gene expression: An approach for reducing fat accumulation. [J]. *J Anim Sci*, 1993,71(7): 1957-1965.
- [20] 陈 杰,杨晓静,佟 辉,等. FAS 和 HSL mRNA 在猪背最长肌的表达及其与肌内脂肪含量的关系[J]. *农业生物技术学报*, 2004,12(4):422-426.

(编辑 郭云雁)