

引用格式:

孙瑞萍, 陈婷, 王峰, 晁哲, 刘海隆, 刘圈炜, 黄丽丽, 邢漫萍, 郑心力, 魏立民. 五指山猪和长白猪背最长肌蛋白组学研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2021, 47(5): 562–570.

SUN R P, CHEN T, WANG F, CHAO Z, LIU H L, LIU Q W, HUANG L L, XING M P, ZHENG X L, WEI L M. Proteomic analysis of longissimus dorsi muscle of Wuzhishan pigs and Landrace pigs[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2021, 47(5): 562–570.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



五指山猪和长白猪背最长肌蛋白组学研究

孙瑞萍^{1,2}, 陈婷³, 王峰¹, 晁哲^{1,2}, 刘海隆^{1,2}, 刘圈炜^{1,2},
黄丽丽¹, 邢漫萍¹, 郑心力¹, 魏立民^{1,2*}

(1.海南农业科学院畜牧兽医研究所, 海南 海口 571100; 2.海南省热带动物繁育与疫病控制重点实验室, 海南 海口 571100; 3.华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 为比较五指山猪和长白猪生长后期肌肉生长发育的差异, 以 6、8 月龄五指山猪和长白猪为试验对象, 采用同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ)对其背最长肌总蛋白进行鉴定, 结合生物信息学技术筛选品种间和品种内差异蛋白, 并对其进行 KEGG 通路富集分析。结果表明: 4 组样品中共鉴定到 1713 个蛋白; 五指山猪和长白猪品种间比较, 6、8 月龄猪中分别有 460、337 个差异的蛋白; 品种内 2 个生长阶段比较, 五指山猪和长白猪中分别有 421、275 个差异蛋白; 2 种比较均为上调的差异蛋白数多于下调差异蛋白数; KEGG 通路分析发现, 在五指山猪和长白猪品种间, 6、8 月龄在 2 个品种间的差异蛋白富集到差异显著($P<0.05$)的条目分别为 34、33 个, 在品种内, 五指山猪和长白猪在 2 个生长阶段间的差异蛋白富集到差异显著($P<0.05$)的条目分别为 24、14 个; 在品种内发现了调控骨骼肌分化过程中发挥着重要作用的 PI3K/AKT 信号通路和影响脂肪沉积的 PPAR 信号通路, 在品种间除了这 2 种外, 还发现有肌纤维类型发育相关的糖酵解/糖异生信号通路; 品种内 2 个比较组在 PPAR 和 PI3K/AKT 信号通路分别有 10、9 个共同表达的基因, 品种间 2 个比较组在糖酵解/糖异生、PI3K/AKT 和 PPAR 信号通路分别有 10、13、9 个共同表达的基因, 对这些信号通路中共同表达的基因进行分析后筛选到一些与肌肉生长发育和脂肪代谢相关的关键基因。

关 键 词: 五指山猪; 长白猪; 背最长肌; 蛋白组学; 同位素标记相对和绝对定量技术; 信号通路; 脂肪沉积

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2021)05-0562-09

Proteomic analysis of longissimus dorsi muscle of Wuzhishan pigs and Landrace pigs

SUN Ruiping^{1,2}, CHEN Ting³, WANG Feng¹, CHAO Zhe^{1,2}, LIU Hailong^{1,2}, LIU Quanwei^{1,2},
HUANG Lili¹, XING Manping¹, ZHENG Xinli¹, WEI Limin^{1,2*}

(1. Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Hainan Academy of Agricultural Science, Haikou, Hainan 571100, China; 2. Hainan Key Laboratory of Tropical Animal Reproduction & Breeding and Epidemic Disease Research, Haikou, Hainan 571100, China; 3. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: In order to explore the differences of muscle growth and development between Wuzhishan pigs and Landrace pigs at the later stage of growth, in this study, an isobaric tag for relative and absolute quantification(iTRAQ) based

收稿日期: 2020-03-16

修回日期: 2020-07-17

基金项目: 海南省自然科学基金项目(319QN327); 海南省热带动物繁育与疫病研究重点实验室开放课题(HNXMSYS201501); 国家自然科学基金项目(31760646); 海南省省属科研院所技术开发研究专项(KYYS-2015-02)

作者简介: 孙瑞萍(1982—), 女, 山西运城人, 博士, 副研究员, 主要从事家畜遗传育种与繁殖研究, ruiping937@126.com; *通信作者, 魏立民, 副研究员, 主要从事动物营养与饲料科学研究, liminedu@126.com

proteome were used to analyze total protein of the longissimus dorsi muscle tissues of at the age of 6 months and 8 months of the two studied pig breeds. Combined with bioinformatics methods to sort out the differential proteins KEGG pathway enrichment analysis of differential proteins were performed to characterize the difference. The results showed that a total of 1713 proteins were identified in the four collected group samples. Comparing the 6-month-old and 8-month-old Wuzhishan pigs with those of Landrace pigs, 460 and 337 different proteins were found, respectively. The comparison of the two growth stages in the breed showed that there were 421 differential proteins in Wuzhishan pigs and 275 differential proteins in Landrace pigs, and the results were the same as one of intervarietal comparison, which was the number of up-regulated differential proteins was more than the number of differential down-regulated proteins. Based on the KEGG pathway enrichment analysis, 34 and 33 items with significant difference ($P < 0.05$) between the two growth stages of 6-month-old and 8-month-old of Wuzhishan pigs and Landrace pigs were found, respectively. While within the breed, the terms enriched were 24 and 14, respectively. The PI3K/AKT signaling pathway, which plays an important role in regulating skeletal muscle differentiation, and the PPAR signaling pathway that affect fat deposition, were found in the breeds; among breeds, the glycolysis/gluconeogenesis signaling pathway related to the development of muscle fiber types was also found. There were 10 and 9 genes co-expressed in PPAR and PI3K/AKT signaling pathways in the two groups within the breed, respectively. While 10, 13 and 9 genes co-expressed in glycolysis/gluconeogenesis, PI3K/AKT and PPAR signaling pathways between the two compared groups, respectively. After analyzing the genes commonly expressed in these signaling pathways, some key genes linked to the muscle growth and fat metabolism were screened.

Keywords: Wuzhishan pig; Landrace pig; longissimus dorsi muscle; proteomic; iTRAQ; signaling pathway; fat deposition

蛋白质同位素标记绝对和相对定量技术(iTRAQ)是把液相色谱和串联质谱相互结合的定量蛋白组学技术,因其检测具有高通量、高敏感、重复性好、精度高且可同时对 2~8 个样本的蛋白表达情况进行比较分析等优点,已逐渐得到广大学者的青睐^[1]。iTRAQ 技术的快速发展使不同组织和阶段蛋白的发育模式研究取得了重大进展。谢珊珊^[2]运用 iTRAQ 技术鉴定出 MSTN 编辑梅山猪和野生梅山猪背最长肌有 66 个差异表达的蛋白,主要富集到了骨骼肌的系统发育和生长及糖酵解等生物学过程中。王志秀^[3]采用 iTRAQ 对 4 个品种猪背最长肌组织的蛋白组进行分析,共鉴定了 288 个差异表达蛋白,富集得到了 28 个与肌肉生长有关的差异蛋白和 15 个与脂肪沉积相关的差异蛋白。程小芳^[4]利用 iTRAQ 技术分析了低蛋白日粮平衡氨基酸(14%CP、17%CP、20%CP)对断奶仔猪背最长肌中的蛋白表达的影响,3 组共鉴定出 1976 个蛋白,17%CP/14%CP 组差异蛋白有 138 个,20%CP/17%CP 组差异蛋白有 134 个,两组差异蛋白最显著富集的代谢通路均为氧化磷酸化代谢通路。

海南五指山小型猪具有肉质好、耐粗饲、抗逆性和适应性强等特点。与长白猪相比,五指山猪具有较好的肉品质,无论是其背最长肌鲜味氨基酸含量,还是肌肉脂肪含量均极显著高于长白猪的($P < 0.01$)^[5-7]。ZHANG 等^[8]利用 iTRAQ 技术对五指山猪和长白猪的早期发育胚胎的背最长肌进行了蛋

白表达谱的鉴定,鉴定出了一些与肌纤维组分和肌肉生成相关的候选蛋白,这些蛋白共同作用来调控猪肌纤维的生成。目前,对于五指山猪和长白猪生长后期差异蛋白的报道较少见。

本研究中,采用 iTRAQ 技术对生长后期 6、8 月龄五指山猪和长白猪背最长肌的蛋白质进行分析鉴定,并对品种间和品种内不同生长阶段的差异蛋白进行筛选和注释,探索五指山猪肌肉发育的分子机制,旨在为猪生长发育的基因结构及功能研究提供数据资源。

1 材料与方法

1.1 样品采集

供试 6、8 月龄的去势雄性五指山猪(分别记为 6W、8W)和长白猪(分别记为 6C、8C)分别来自海南五指山猪国家级保种场和海南罗牛山种猪育种有限公司。每组各 6 头试验样本。屠宰后,分别采集同一部位的背最长肌组织样品,于液氮中速冻后带回实验室,存放于 -80°C 冰箱,备用。

1.2 蛋白的提取及检测

每个样品组织按质量(g)、体积(mL)比 1:5 加入 pH 为 8.0 的提取缓冲液(40 mmol/L Tris-HCl+8 mol/L 尿素+10 mmol/L DTT),充分匀浆后超声 1 min,并于 $12\,000\times g$ 、 4°C 条件下离心 20 min,取上清。采用 BCA 法测定蛋白浓度,并用 10%聚丙烯酰胺凝胶电

泳检测样品的完整性。将每试验组中2个检测合格的蛋白样品等质量混合后作为1个生物学重复，最终每组获得3个生物学重复，4组共12个样品，送至深圳华大基因进行后期的蛋白质组测序分析。

1.3 iTRAQ 蛋白分析

每个样品取100 μg蛋白溶液，加入2.5 μg Trypsin 酶后于37 ℃摇晃反应过夜，12 000×g离心后得到酶解后肽段溶液，再加入到对应iTRAQ标签试剂中。根据说明书进行iTRAQ标记，标记后的肽段混合后进行液相分离；结合色谱洗脱峰图合并样品，经冷冻抽干、复溶、离心后取上清进样，再通过液相色谱仪分离肽段；经过液相分离的肽段进到ESI串联质谱仪进行数据收集，得到原始数据并统一进行后续的信息分析。原始质谱数据转换成mgf格式文件后，采用Mascot比对，提交到Uniprot_Sus_scrofa.fasta(<http://www.uniprot.org>)蛋白质数据库搜索鉴

定，质控合格后根据设定的阈值，得到最终可信的蛋白质鉴定结果，进行iTRAQ定量分析。3次重复。

1.4 差异蛋白统计与功能富集

使用由深圳华大基因科技服务有限公司开发的IQuant 分析各试验组蛋白质的 iTRAQ 定量，将6W/6C、6W/8W、6C/8C、8W/8C 设置为比较组。单次试验的显著差异蛋白以倍数 1.20 或 0.83 和 $Q\text{-value}<0.05$ 两个条件筛选。运用 DAVID 对差异蛋白进行 KEGG 通路的富集分析。

2 结果与分析

2.1 总蛋白电泳检验结果

由图1可以看出，每个泳道条带均一，无蛋白降解或拖尾现象，说明蛋白质量浓度测定准确，且提取的效果和重复性较好，可用于后期蛋白组测序。

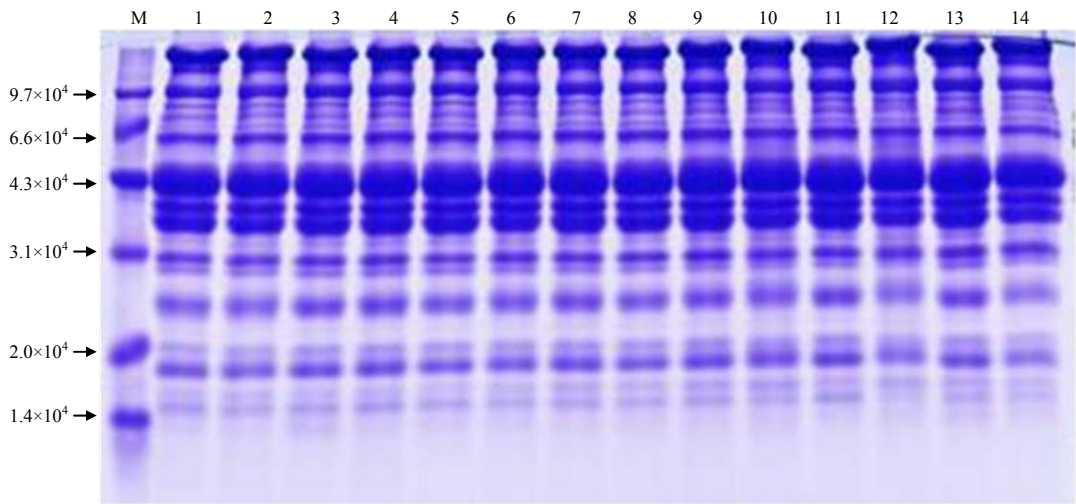


图 1 6 月龄和 8 月龄五指山猪和长白猪背最长肌组织样品总蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis diagram of total protein in longissimus dorsi tissue samples between 6-month-old and 8-month-old Wuzhishan pigs and Landrace pigs

2.2 蛋白质组数据分析结果

4组sus_scrofa样品(6W、6C、8W、8C)共生成下机的二级谱图866 058张，有9616条肽段被鉴定到，在1%蛋白水平FDR过滤标准下，共有1713个蛋白被鉴定到。3次重复试验中均鉴定到的蛋白有800个，平均CV值为0.15，重复性较好。

2.3 差异蛋白筛选结果

由表1可以看出，6月龄时五指山猪和长白猪背

表 1 6 月龄和 8 月龄五指山猪与长白猪背最长肌组织差异蛋白数

Table 1 The different proteins of longissimus dorsi tissue between 6-month and 8-month old Wuzhishan pigs and Landrace pigs			
比较组	上调蛋白数	下调蛋白数	总差异蛋白数
6W/6C	338	122	460
8W/8C	215	122	337
6W/8W	306	115	421
6C/8C	154	121	275

最长肌组织差异的蛋白数量比8月龄时的差异蛋白数多，有460个显著表达差异的蛋白，且2种月龄的不同猪间上调的差异蛋白数均远多于下调的差异蛋白数；五指山猪6、8月龄2个不同生长阶段的差异蛋白数多于长白猪在这2个生长阶段的差异蛋白数量，2种猪不同月龄间上调的差异蛋白数均多于下调的差异蛋白数。

2.4 差异蛋白 KEGG 通路分析结果

KEGG 通路分析发现，在五指山猪和长白猪品种间，6、8月龄2个生长阶段的猪的差异蛋白分别富集到244和232个条目，其中富集到差异显著($P<0.05$)的条目分别为34个(表2)和33个(表3)；其中与骨骼肌和肌纤维发育类型共同富集的条目有3

个，分别为PI3K/Akt信号通路、糖酵解/糖异生和氨基酸生物合成。此外，8月龄五指山猪和长白猪的差异蛋白还富集到调节脂肪代谢的过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路和脂肪酸代谢通路。同品种内差异蛋白的KEGG通路分析结果显示，五指山猪6、8月龄2个生长阶段的差异蛋白富集到234个条目，其中差异显著($P<0.05$)的条目24个(表4)，而长白猪在这2个生长阶段的差异蛋白富集到215个条目，其中差异显著($P<0.05$)的条目14个(表5)；两者共同富集到与骨骼肌纤维发育和肌内脂肪代谢相关的通路有PI3K/Akt信号通路和PPAR信号通路，长白猪还发现有与肌纤维发育相关的糖酵解/糖异生通路。

表 2 6 月龄五指山猪和长白猪背最长肌组织差异蛋白 KEGG 通路分析结果

Table 2 The result of KEGG pathway analysis of different proteins in longissimus dorsi tissue between 6-month-old Wuzhishan pigs and Landrace pigs

通路	基因数	通路	基因数	通路	基因数
心肌收缩	25	军团杆菌病	12	可卡因成瘾	3
扩张性心肌病	28	阿尔茨海默病	31	糖酵解/糖异生	17
亨廷顿氏舞蹈病	34	变形虫病	17	脂肪细胞脂类分解的调节	4
代谢通路	115	蛋白质消化吸收	15	弓形体病	12
丙酮酸代谢	17	小细胞肺癌	10	补体系统	12
柠檬酸循环	16	细胞凋亡	9	胰液分泌	9
帕金森氏病	31	非酒精性脂肪肝	25	胆汁分泌	6
ECM-受体互作	18	氧化磷酸化	26	cGMP-PKG 信号通路	14
碳代谢	36	PI3K/Akt 信号通路	23	乙醛酸和二羧酸代谢	9
肥厚型心肌病	25	胰高血糖素信号通路	18	氨基酸生物合成	18
钙信号通路	20	B 细胞受体信号通路	8	人类嗜 T 淋巴细胞病毒 I 型感染	12
心肌细胞肾上腺素能信号	22				

表 3 8 月龄五指山猪和长白猪背最长肌组织差异蛋白 KEGG 通路分析结果

Table 3 The result of KEGG pathway analysis of different proteins in longissimus dorsi tissue between 8-month-old Wuzhishan pigs and Landrace pigs

通路	基因数	通路	基因数	通路	基因数
柠檬酸循环	16	赖氨酸降解	8	PI3K/Akt 信号通路	17
丙酮酸代谢	15	脂肪酸降解	11	前列腺癌	6
PPAR 信号通路	14	丙酸代谢	10	过氧化物酶体	8
ECM-受体互作	15	缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸分解	13	果糖和甘露糖代谢	5
糖酵解/糖异生	17	甾类激素生物合成	4	谷胱甘肽代谢	7
代谢通路	85	碳代谢	35	安非他命上瘾	7
乙醛酸和二羧酸代谢	10	氨基酸生物合成	15	蛋白消化吸收	10
HIF-1 信号通路	15	帕金森氏病	20	叶酸生物合成	2
补体系统	11	脂肪酸代谢	9	2-氧代羧酸代谢	6
药物代谢-细胞色素 P450	4	钙信号通路	13	细胞凋亡	6
色氨酸代谢	8	病毒性癌病	13	嗅神经信号转导	5

表4 6月龄和8月龄五指山猪背最长肌组织差异蛋白 KEGG 通路分析结果

Table 4 The result of KEGG pathway analysis of different proteins in longissimus dorsi tissue between 6- and 8-month-old Wuzhishan pigs

通路	基因数	通路	基因数	通路	基因数
心肌收缩	20	亨廷顿氏舞蹈病	28	麻疹	8
扩张型心肌病	24	烟酸和烟酰胺代谢	4	金黄色葡萄球菌感染	5
细胞凋亡	10	帕金森病	25	血小板激活	13
钙信号通路	19	PPAR 信号通路	13	胰高血糖素信号通路	16
蛋白消化吸收	15	PI3K/Akt 信号通路	21	甾类激素生物合成	4
肥厚型心肌病	23	非酒精性脂肪肝	22	cGMP-PKG 信号通路	13
阿尔茨海默病	29	结核病	13	B 细胞受体信号通路	7
军团杆菌病	11	氧化磷酸化	23	破骨细胞分化	8

表5 6月龄和8月龄长白猪背最长肌组织差异蛋白 KEGG 通路分析结果

Table 5 The result of KEGG pathway analysis of of different proteins in longissimus dorsi tissue between 6- and 8-month-old Landrace pigs

通路	基因数	通路	基因数	通路	基因数
PPAR 信号通路	14	变形虫病	11	紧密连接	12
糖酵解/糖异生	14	低氧诱导因子 1A 信号通路	11	淀粉和蔗糖代谢	5
蛋白消化吸收	11	扩张型心肌病	14	脂肪细胞脂解的调节	3
心肌收缩	13	ECM-受体互作	10	PI3K/Akt 信号通路	14
胰高血糖素信号通路	13	丙酮酸代谢	9		

2.5 与肌肉生长发育和脂肪代谢相关的信号通路中共同表达的基因

对品种内和品种间肌肉发育相关的共同富集到的信号通路进行筛选,在品种内发现了在调控骨骼肌分化过程中发挥重要作用的PI3K/AKT信号通路和影响脂肪沉积的PPAR信号通路;在品种间除了PI3K/AKT信号通路和PPAR信号通路外,还发现有与肌纤维类型发育相关的糖酵解/糖异生信号通路。对这些信号通路中共同表达的基因进行统计,结果显示,品种内2个比较组(6W/8W和6C/8C)在PPAR信号通路有10个共同表达的基因,如已报道的与脂肪代谢相关的脂滴包被蛋白基因(*PLIN1*)、脂肪酸结合蛋白3基因(*FABP3*)、中链酰基辅酶A脱氢酶基因(*ACADM*)、乙酰辅酶A结合蛋白基因(*DBI*)和载脂蛋白A1基因(*ApoA1*)等;而在PI3K/AKT信号通路中有9个共同表达的基因,如在肌肉和肝脏糖原合成过程中起关键作用的糖原合成酶基因(*GYS*)(表6)。品种间2个比较组(6W/6C,8W/8C)在糖酵解/糖异生信号通路、PI3K/AKT信号通路和PPAR信号通路分别有10、13、9个共同表达的基因(表7)。在糖酵解/糖异生信号通路中,有已报道的与肌肉发育相关的磷酸丙糖异构酶1基因(*TPH1*)、磷酸甘油酸激酶1基因(*PGK1*)、果糖1,6-二磷酸醛缩酶基因(*ALDOC*)、乳酸脱氢酶B基因(*LDHB*)和乙醛脱氢酶2基因

(*ALDH2*);在PPAR信号通路中,与品种内发现的共有基因相比,已报道的与脂肪代谢相关相同的基因有*ApoA1*,不同的有脂肪酸结合蛋白5基因(*FABP5*)和羟基类固醇脱氢酶样2基因(*HSDL2*)。

表6 五指山猪和长白猪品种内在 PPAR 和 PI3K/Akt 信号通路共同表达的基因

Table 6 Co-expressed genes in the PPAR and PI3K/Akt signaling pathways within Wuzhishan pig and Landrace pigs

信号通路	基因登录号	基因名称	差异倍数	
			6W/8W	6C/8C
PPAR	NP_001001637_1	<i>PDLIM3</i>	0.80	0.82
	NP_001033727_1	<i>PLIN1</i>	1.39	0.60
	NP_001093401_1	<i>FABP3</i>	0.69	1.22
	NP_999204_1	<i>ACADM</i>	0.74	0.75
	NP_999284_1	<i>DBI</i>	0.71	0.70
	NP_999563_1	<i>ApoA1</i>	1.37	1.33
	XP_001924368_2	<i>ME1</i>	0.74	0.77
	XP_003482524_1	<i>PDLIM5</i>	0.83	0.75
	XP_013847772_1	<i>PDLIM7</i>	0.83	0.83
PI3K/Akt	NP_001098759_1	<i>COL5A2</i>	1.36	1.20
	NP_001182437_1	<i>GYS1</i> (肌肉)	1.20	1.30
	NP_001182440_1	<i>GYS1</i> (肝)	1.20	1.40
	NP_001230584_1	<i>COL1A2</i>	1.87	0.73
	NP_999138_1	<i>HSP90</i>	1.27	1.30
	XP_005658953_2	<i>IgG</i>	1.20	1.32
	XP_005659104_1	<i>COL6A1</i>	0.83	0.78
	XP_005663006_1	<i>YWHAZ</i>	0.74	0.83
	XP_013845689_1	<i>COL6A2</i>	1.28	0.80
	XP_013847731_1	<i>COL1A1</i>	1.67	1.27

表 7 五指山猪和长白猪品种间在糖酵解/糖异生和 PPAR 及 PI3K/Akt 信号通路共同表达的基因

Table 7 Co-expressed genes of glycolysis/gluconeogenesis, PPAR and PI3K/Akt in intervarietal comparation between Wuzhishan pigs and Landrace pigs

信号通路	基因登录号	基因名称	差异倍数	
			6W/6C	8W/8C
糖酵解/糖异生	NP_001032228_1	<i>TPI1</i>	1.22	1.23
	NP_001038076_1	<i>ALDH2</i>	0.77	0.76
	NP_001093402_1	<i>PGK1</i>	1.21	1.24
	NP_001230857_1	<i>ALDOC</i>	0.61	1.30
	NP_001231327_1	<i>PDHB</i>	1.42	1.21
	NP_999159_1	<i>DLAT</i>	1.3	1.20
	XP_003360292_2	<i>PDHA1</i>	1.59	1.26
	XP_005657900_1	<i>PGK1</i>	0.45	0.60
	XP_013843801_1	<i>LDHB</i>	0.75	0.68
	XP_013850523_1	<i>aldh7a1</i>	1.27	1.21
PI3K/Akt	NP_001230584_1	<i>COL1A2</i>	1.62	0.81
	NP_001258644_1	<i>LAMC1</i>	1.28	1.30
	XP_003133689_1	<i>FN1 X7</i>	1.20	1.39
	XP_005656885_1	<i>OPTN X2</i>	0.59	0.59
	XP_005657732_1	<i>vitronectin isoform X1</i>	1.39	1.32
	XP_005659104_1	<i>COL6A1 VI</i>	1.20	1.43
	XP_005663006_1	<i>YWHAZ</i>	1.20	1.26
	XP_005667793_1	<i>LAMB1</i>	1.41	1.28
	XP_013840079_1	<i>COL6A3 X1</i>	1.41	1.23
	XP_013840082_1	<i>COL6A3 X4</i>	1.43	1.35
	XP_013845689_1	<i>COL6A2</i>	1.48	1.20
	XP_013847731_1	<i>COL6A1 I</i>	1.43	0.81
	XP_013848027_1	<i>LAMA2</i>	1.38	1.25
	NP_001001637_1	<i>PDLIM3</i>	0.82	0.78
	NP_001034835_1	<i>FABP5</i>	1.63	1.32
PPAR	NP_001183950_1	<i>HSDL2</i>	1.51	1.27
	NP_999563_1	<i>ApoA1</i>	1.63	1.32
	XP_005666955_1	<i>SYNPO2</i>	1.20	1.20
	XP_005667748_1	<i>Gp5</i>	0.36	0.34
	XP_013839053_1	<i>PDLIM1</i>	0.82	0.81
	XP_013847772_1	<i>PDLIM7</i>	1.23	0.76
	XP_013852106_1	<i>PMP2</i>	3.21	2.17

3 结论与讨论

iTRAQ技术用于蛋白质定量，不仅能够同时鉴别和定量多种蛋白，而且还可同时研究成千上万个蛋白在特定生物学中的变化及蛋白与蛋白之间的互动关系和该蛋白所涉及的信号通路^[9]。商鹏^[10]选择藏猪(TP)、乌金猪(WJ)和大约克猪(LW)作为试验对象，通过iTRAQ技术对猪胚胎60日龄的背最长肌

进行分析，鉴定与猪生长性状相关的差异蛋白，初步筛选出12个可能与猪肌肉生长发育性状有关的基因。本研究中，采用iTRAQ技术比较分析了生长后期(6、8月龄)的五指山猪和长白猪之间背最长肌差异蛋白的表达情况。结果发现：品种间比较时，6月龄时五指山猪和长白猪有460个差异蛋白数，高于在8月龄时的337个差异蛋白，且2种月龄的不同猪间上调的差异蛋白数远多于下调的差异蛋白数；品种内比较时，五指山猪6、8月龄2个不同生长阶段的差异蛋白数(421)多于长白猪在这2个生长阶段的差异蛋白数(275)，也均为上调的差异蛋白数多于下调差异蛋白数。这个结果与前人的研究结果^[3,11]一致，即无论是在猪胚胎发育阶段还是生长后期，国内地方猪种与国外猪种差异蛋白中上调蛋白数均高于下调蛋白数。

VERARDO等^[12]研究表明，不同品种猪肌肉组织之间不同的能量代谢模式会引起肌肉纤维类型分布的不同，进而导致肉的品质之间存在较大的差异。国外猪种与国内地方猪间更是如此。PI3K/AKT信号通路在调控骨骼肌分化过程中发挥着重要作用，可通过调控肌肉特异分化基因肌细胞生成素和肌酸激酶的基因表达来调控骨骼肌分化^[13]。本研究中，4个比较组(6W/6C、6W/8W、6C/8C、8W/8C)的差异蛋白均显著富集到PI3K/AKT信号通路，品种内比较(6W/8W、6C/8C)的在该信号通路鉴定到9个共同表达的差异蛋白基因，其中包括已报道的与猪肌纤维发育类型相关的*GYS*。*GYS*在糖代谢过程中起重要作用，通过影响动物体内糖原的合成^[14]，直接影响肌肉中慢速氧化型肌纤维的比重^[15]。热应激蛋白(HSP)在某些条件下会在具有氧化活性的纤维(Ⅰ型与Ⅱa型)中表达，HSP90家族含量的降低会影响到肉品质^[16]。

PPAR信号通路可以促进脂质生成，其生理功能主要涉及脂肪酸代谢、糖代谢、细胞的增殖与分化等^[17-18]。本研究中，4个比较组差异蛋白也均显著富集到PPAR信号通路，品种内比较(6W/8W、6C/8C)的在该信号通路鉴定到共同表达的差异蛋白有10个，发现了已报道的与脂肪代谢相关的有5个(*PLIN1*、*FABP3*、*ACADM*、*DBI*、*APOA1*)。*PLIN1*是猪胴体、肉质性状分子标记辅助选择的候选基因，在猪肌肉中广泛表达，通过调节脂肪酶的功能

和脂肪沉积来影响肌肉的生长发育和肉质^[19-20]。*FABP3*是影响肌内脂肪含量的重要基因,其表达量与肌间脂肪(IMF)呈正相关,可影响肉质的嫩度、风味和多汁性,通过调控脂肪代谢来改善畜产品品质^[21]。*FABP3*在6月龄五指山猪背最长肌中的表达量显著低于其8月龄的表达量,在长白猪中的表达结果则呈相反趋势。究其原因认为,五指山猪与国内其他地方猪种一样,随月龄的增大,肌肉内脂肪沉积越多,而长白猪作为瘦肉型猪,脂肪沉积相对较少,但肉质的嫩度也变小^[22]。王志秀^[3]研究表明,*ACADM*缺失和突变可导致严重的代谢紊乱,从而影响脂肪酸的氧化,在中国6月龄地方猪背肌中的蛋白表达量显著高于国外猪的,*ACADM*和*FABP3*在梅山猪和大约克猪出生早期(3日龄)表达量最高。*ApoA1*是血浆高密度脂蛋白的重要组成部分,作为脂肪沉积的候选基因,许多学者^[3,23-24]以地方猪和国外猪的背肌为研究对象,采用高通量测序的方法筛选到了包括*ApoA1*、*ApoA2*、*ApoA5*、*ApoC3*等与猪脂肪沉积相关的关键基因,且这些基因均富集到脂肪酸和PPAR代谢通路。*FABP5*参与摄取和运输长链脂肪酸,维持体内脂肪酸代谢的相对平衡,在动物模型中,*FABP5*血液水平与肥胖和代谢紊乱有关^[25]。品种间比较(6W/6C、8W/8C),在PPAR信号通路鉴定到共同表达的差异蛋白有9个,发现了已报道的与脂肪代谢相关的有2个(*FABP5*、*ApoA1*)。除了*FABP3*和*PLIN1*在6W/8W、6C/8C之间的表达趋势相反之外,其他基因无论在品种间还是品种内的表达趋势均相同,且差异倍数也基本一致,这说明作为小型猪和瘦肉型猪的五指山猪和长白猪的肌肉在生长后期脂肪沉积速度相似^[6]。

糖酵解和糖异生均是与能量代谢和肌肉生长性状相关的通路,在肉质性状形成的生理过程中发挥着重要作用。在本研究筛选到的品种间差异蛋白中还有10个差异蛋白参与糖酵解/糖异生信号通路,其中已报道的与肌肉发育相关的基因有*TPH1*、*PGK1*、*ALDOC*、*LDHB*和*ALDH2*。*TPH1*被发现在嫩度较高的肉样中的含量显著高于嫩度较低的肉样的,与肌肉的嫩度成正比^[26]。李小金等^[22]研究发现,*PGK1*在国外瘦肉型猪(大约克、大白猪)中高表达,在中国地方猪种低表达,与IMF含量呈相反表达趋势。本研究结果同样发现,*PGK1*在五指山猪

中的表达量显著高于长白猪的。*LDHB*作为无氧糖酵解中的关键酶,其在肌肉中的含量已被作为衡量肉质的一个重要指标。在藏猪肌肉组织中*ALDOC*相对表达量显著高于大约克和乌金猪^[10]。本研究中,*LDHB*的表达量在五指山猪6、8月龄中均下调,*ALDOC*表达量在6、8月龄中呈相反的趋势,目前这2个基因与猪肉品质性状相关的研究尚未见报道,后续可以作为候选基因作进一步的探索。

另外, Ca^{2+} 主要参与肌肉(包括骨骼肌、平滑肌)收缩过程,在细胞内, Ca^{2+} 调节蛋白和 Ca^{2+} 离子结合,形成的一种复合物,可激活体内多种酶的活性,从而起到调控细胞正常活动的作用。本研究中,在品种间比较(6W/6C、8W/8C)中的差异蛋白均发现富集到钙信号通路,而品种内比较(6W/8W、6C/8C)的差异蛋白未富集到该信号通路,暗示该通路的差异蛋白可能与五指山猪和长白猪骨骼肌的生长有关。

参考文献:

- [1] 马静,武开乐,库西塔别克·买买提依不拉音,等. iTRAQ 技术在动物生产中的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(12): 1599-1604.
MA J, WU K L, KUXITABIEKE·MAIMAITIYIBULAYIN, et al. Application of iTRAQ technology in animal production[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2017, 39(12): 1599-1604.
- [2] 谢珊珊. 利用整合组学开展 MSTN 编辑梅山猪的表型遗传分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
XIE S S. Phenotypic genetic analysis of MSTN-edited Meishan pigs by integrated omics[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.
- [3] 王志秀. 基于转录组和蛋白组数据鉴定猪肌肉生长和脂肪沉积相关的基因[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
WANG Z X. Identification of genes related to muscle growth and lipid deposition from transcriptomic and proteomic profiles of pig[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [4] 程小芳. 低蛋白日粮平衡氨基酸对断奶仔猪骨骼肌生长相关蛋白质表达规律的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
CHENG X F. Effects of low protein diets with amino acids balanced on growth related proteins expression profiling in the skeletal muscle of weaned piglets[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
- [5] 荀文娟, 施力光, 周汉林, 等. 五指山猪与长白猪胴体性状和肉品质的比较研究[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(5): 93-96.

- XUN W J, SHI L G, ZHOU H L, et al. Comparative study on carcass traits and meat quality of Wuzhishan and Landrace pigs[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2013, 40(5): 93–96.
- [6] 魏立民, 晁哲, 刘海隆, 等. 五指山猪和长白猪背最长肌差异基因的筛选与注释[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(6): 2489–2497.
- WEI L M, CHAO Z, LIU H L, et al. Screening and annotation of differentially expressed genes in longissimus muscle of Wuzhishan pig and Landrace pig[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(6): 2489–2497.
- [7] 曹婷. 五指山猪和长白猪肌肉发育差异的初步研究[D]. 海口: 海南大学, 2013.
- CAO T. The preliminary study on the differences in muscle development of Wuzhishan and Landrace pigs[D]. Haikou: Hainan University, 2013.
- [8] ZHANG X M, CHEN Y S, PAN J C, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals the distinct early embryo myofiber type characteristics involved in Landrace and miniature pig[J]. BMC Genomics, 2016, 17: 137.
- [9] ZHANG J Z, GAO Y, LU Q P, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of longissimus muscle from growing pigs with dietary supplementation of non-starch polysaccharide enzymes[J]. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B(Biomedicine & Biotechnology), 2015, 16(6): 465–478.
- [10] 商鹏. 基于胚胎肌肉组织转录组和蛋白质组数据鉴定猪生长性状相关基因[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- SHANG P. Identification of candidate genes on growth traits integrating transcriptome and proteome of embryonic muscle in pigs[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [11] 杨虎. 沙子岭猪和大白猪背最长肌转录组与蛋白组研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.
- YANG H. Transcriptome and proteome study on longissimus dorsi muscle between Shaziling and Yorkshire pigs[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2015.
- [12] VERARDO L L, NASCIMENTO C S, SILVA F F, et al. Identification and validation of differentially expressed genes from pig skeletal muscle[J]. Journal of Animal Breeding and Genetics, 2013, 130(5): 372–381.
- [13] 李晶, 张云生, 李宁, 等. PI3K/AKT 信号通路调控 *Myogenin* 和 *MCK* 基因的表达[J]. 遗传, 2013, 35(5): 637–642.
- LI J, ZHANG Y S, LI N, et al. Expression of *Myogenin* and *MCK* genes regulated by PI3K/AKT pathway[J]. Hereditas, 2013, 35(5): 637–642.
- [14] 龙清孟, 周迪, 毛世明, 等. 从江香猪和大白猪不同组织中 *GYS1*、*GYS2* 基因表达水平的研究[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(9): 6–10.
- LONG Q M, ZHOU D, MAO S M, et al. Expression levels of the *GYS1* and *GYS2* genes in different tissues of Congjiang Xiang pig and Large White pig[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019, 51(9): 6–10.
- [15] KIM G D, RYU Y C, JEONG J Y, et al. Relationship between pork quality and characteristics of muscle fibers classified by the distribution of myosin heavy chain isoforms[J]. Journal of Animal Science, 2013, 91(11): 5525–5534.
- [16] 鲍恩东, SULTAN K R, NOWAK B, 等. 运输应激猪骨骼肌中热应激蛋白 HSP₇₀ 和 HSP₉₀ 家族的表达[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(1): 81–84.
- BAO E D, SULTAN K R, NOWAK B, et al. Expression of HSP₇₀ family and HSP₉₀ family in skeletal muscles of transport stressed pigs[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2001, 24(1): 81–84.
- [17] 马柳安, 邱惠玲, 李荔, 等. miRNA 通过 PPAR 和 AMPK/SREBPs 信号通路调控脂质代谢[J]. 生命的化学, 2017, 37(6): 1017–1029.
- MA L A, QIU H L, LI L, et al. miRNA regulate lipid metabolism via PPAR and AMPK/SREBPs signaling pathway[J]. Chemistry of Life, 2017, 37(6): 1017–1029.
- [18] CHINETTI G, FRUCHART J C, STAELS B. Peroxisome proliferator-activated receptors(PPARs) nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation[J]. Inflammation Research, 2000, 49(10): 497–505.
- [19] 黄龙. 安徽地方猪种胴体与肉质性状候选基因研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- HUANG L. Study on candidate genes of carcass and meat quality traits in Anhui native pig breeds[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2013.
- [20] 雷娜, 贾青, 赵广珍, 等. PLIN1 第 2、4 外显子多态性与猪脂肪沉积性状的相关性分析[J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(3): 106–111.
- LEI N, JIA Q, ZHAO G Z, et al. Correlation analysis between SNPs of PLIN1 Exon 2, 4 and swine fat deposition traits[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2012, 35(3): 106–111.
- [21] 张丽, 农伟伦, 卢建雄, 等. 八眉猪 *FABPs* 主要家族基因单核苷酸多态性筛查及生物信息学分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2019, 45(1): 109–118.
- ZHANG L, NONG W L, LU J X, et al. Single nucleotide polymorphism screening and bioinformatics analysis of the main family genes of *FABPs* in Bamei pig[J]. Journal of Zhejiang University(Agriculture and Life Sciences), 2019, 45(1): 109–118.
- [22] 李小金, 钱坤, 刘林清, 等. 基于 RNA-seq 技术对不同品种猪背最长肌差异表达基因的筛选与注释[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(6): 1–8.

- LI X J, QIAN K, LIU L Q, et al. Screening and annotation of differentially expressed genes in longissimus muscle of different pig breeds based on RNA-seq technology[J]. Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition), 2016, 44(6): 1-8.
- [23] 黄万龙, 张秀秀, 李媛, 等. 利用 RNA-seq 技术筛选大白猪皮下和肌内脂肪组织差异表达基因[J]. 遗传, 2017, 39(6): 501-511.
- HUANG W L, ZHANG X X, LI A, et al. Identification of differentially expressed genes between subcutaneous and intramuscular adipose tissue of Large White pig using RNA-seq[J]. Hereditas, 2017, 39(6): 501-511.
- [24] 钱辉. 利用表达谱芯片技术研究中外猪种不同时期肌肉组织中的表达差异基因[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- QIAN H. Microarray analysis of skeletal muscle at four stages in Yorkshire and Meishan pigs[D]. Wuhan:
- Huazhong Agricultural University, 2012.
- [25] MAEDA K, UYSAL K T, MAKOWSKI L, et al. Role of the fatty acid binding protein mall in obesity and insulin resistance[J]. Diabetes, 2003, 52(2): 300-307.
- [26] 李明洲, 李学伟, 朱砺, 等. 猪背最长肌中肌肉生长和脂肪沉积相关基因的差异表达和主成分分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(1): 46-54.
- LI M Z, LI X W, ZHU L, et al. Differential expression and principal component analysis of genes related to muscle growth and adipose deposition in porcine longissimus dorsi muscle[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2008, 24(1): 46-54.
- 责任编辑: 邹慧玲
英文编辑: 柳 正
-
- (上接第 552 页)
- [25] 宗俊勤, 陈静波, 聂东阳, 等. 我国不同地区芒和荻种质资源抗盐性的初步评价[J]. 草地学报, 2011, 19(5): 803-807.
- ZONG J Q, CHEN J B, NIE D Y, et al. Preliminary evaluation on salinity tolerance of *Miscanthus sinensis* Anderss. and *M. sacchariflorus*(Maxim.) Benth. of China[J]. Acta Agrestia Sinica, 2011, 19(5): 803-807.
- [26] 李强, 李加鹏, 何淼. 荻实生苗生物构件对土壤水分胁迫的响应[J]. 草业科学, 2013, 30(6): 893-897.
- LI Q, LI J P, HE M. Study on the adaptability of *Misconstrues sacchariflorus* biological components to soil water stress[J]. Pratacultural Science, 2013, 30(6): 893-897.
- [27] 吴琴, 尧波, 幸瑞新, 等. 鄱阳湖典型湿地土壤有机碳分布及影响因子[J]. 生态学杂志, 2012, 31(2): 313-318.
- WU Q, YAO B, XING R X, et al. Distribution pattern of soil organic carbon in Poyang Lake wetland and related affecting factors[J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31(2): 313-318.
- [28] 胡佳宇, 谢永宏, 李峰, 等. 东洞庭湖丁字堤苔草群落特征及其影响因子[J]. 应用生态学报, 2014, 25(3): 745-751.
- HU J Y, XIE Y H, LI F, et al. Characteristics of *Carex brevicuspis* and its impact factors in Dingzidi, East Dongting Lake[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(3): 745-751.
- [29] 谢深喜, 刘强, 熊兴耀, 等. 水分胁迫对柑橘光合特性的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2010, 36(6): 653-657.
- XIE S X, LIU Q, XIONG X Y, et al. Effect of water stress on *Citrus* photosynthesis characteristic[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2010, 36(6): 653-657.
- [30] 戚志伟, 高艳娜, 樊同, 等. 崇明东滩围垦湿地芦苇生态特征与水盐因子的关系[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(5): 739-746.
- QI Z W, GAO Y N, FAN T, et al. Relationship between ecological characteristics of *Phragmites australis* and water-salt indicators in the reclaimed wetland at Dongtan of Chongming Island, China[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2016, 22(5): 739-746.
- 责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳 正