

阉割对延边黄牛脂肪沉积的影响及相关基因表达研究

殷成港, 邵 静, 尹宝珍, 焦 石, 夏广军*

(延边大学, 吉林 延吉 133002)

摘 要: 本试验通过研究阉割对延边黄牛脂肪沉积的影响及相关基因的表达, 试图探索肉牛脂肪沉积的影响因素和分子机制。选择年龄、体重相近, 相同条件下饲养的延边黄牛公牛和阉牛各 15 头, 育肥至 36 月龄屠宰, 测定脂肪沉积相关性状, 并分析 *ANGPTL4*、*DGAT2* 和 *FABP4* 基因 mRNA 的表达变化。结果表明, 延边黄牛阉牛肌肉脂肪含量显著高于公牛 ($P < 0.05$), 背膘厚极显著高于公牛 ($P < 0.01$), 大理石花纹等级显著高于公牛 ($P < 0.05$), 说明阉割处理后的延边黄牛胴体和肌肉脂肪沉积量显著增加。阉牛的 *ANGPTL4* 和 *DGAT2* 基因的 mRNA 表达量显著高于公牛, *FABP4* 基因 mRNA 表达量极显著高于公牛 ($P < 0.01$), 说明阉割处理的延边黄牛 *ANGPTL4*、*DGAT2* 和 *FABP4* 基因的 mRNA 表达量增加, 促进了脂肪沉积。

关键词: 延边黄牛; 阉割; 脂肪沉积; 基因表达

中图分类号: S823.81; Q78

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)02-0044-05

Effect of Castration on Fatty Deposition and the Expression of Related Genes in Yanbian Yellow Cattle

YIN Chenggang, SHAO Jing, YIN Baozhen, JIAO Shi, XIA Guangjun*

(Yanbian University, Yanji 133002, China)

Abstract: The effect of castration on fatty deposition and the expression of related genes in Yanbian Yellow Cattle were studied in this experiment, and the influential factor and molecule mechanism of fatty deposits in beef cattle were further explored. 15 Yanbian Yellow Cattles and 15 steers with the similar age and same conditions were slaughtered until fattening to 36 months. Related character of fat deposition were determined, and mRNA expression of the *ANGPTL4*, *DGAT2* and *FABP4* were analyzed. The results showed that intramuscular fat content of the steer was significantly higher than the bulls' ($P < 0.05$), backfat thickness was significantly higher than that of the bull ($P < 0.01$), marbling level was significantly higher than the bulls' ($P < 0.05$), which indicated that the carcass and intramuscular fat deposition of Yanbian Yellow Cattle obviously increased after castration. Steer *ANGPTL4* and *DGAT2* gene mRNA expression quantity were significantly higher than the bulls', steer *FABP4* gene mRNA expression quantity was significantly higher than that of the bull ($P < 0.01$), which indicated that the increasing of *ANGPTL4*, *DGAT2* and *FABP4* gene expression quantity in Yanbian Yellow Cattle after castration made contributions to fat deposition.

Key words: Yanbian Yellow Cattle; Castration; Fatty deposits; Gene expression

在长期的实践中人们发现, 阉割可以改善牛肉品质, 使肌纤维变细, 肌肉脂肪增多, 增加肉的嫩度。经过阉割的公畜, 雄性激素在体内表达量

急剧下降, 使公畜蛋白质同化作用减弱, 肌肉生长速度会减慢, 脂肪沉积量会增加^[1-2]。而肌肉脂肪是评价牛肉品质性状的重要指标, 较低水平的雄激素会引起脂肪的大量沉积^[3-5]。延边黄牛高档牛肉生产实践证明, 阉割能够促进大理石花纹形成, 嫩度、风味等食用品质明显改善。但阉割对延边黄牛脂肪沉积性状的影响及作用机制尚缺乏明确的理论依据, 有待于进一步研究。血管生成素样蛋白 4 (Angiopoietin-like Protein 4, *ANGPTL4*)

收稿日期: 2019-01-11

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20160204017NY); 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20180903KJ)

作者简介: 殷成港(1997-), 男, 在读本科, 研究方向为高档牛肉生产。

通讯作者: 夏广军, 男, 博士, 副教授, E-mail: ybuac@ybu.edu.cn

是与血管生成、脂类代谢、葡萄糖代谢、胰岛素敏感性密切相关的分泌性蛋白质因子。研究表明, *ANGPTL4* 可以促进脂肪酸氧化, 并通过抑制脂蛋白酯酶的活性和促进脂肪水解而直接影响脂类代谢, 促进脂肪沉积^[6-7]。二脂酰甘油酰基转移酶(*acyl-coA: diacylglycerol acyltransferase*, *DGAT*)是催化甘油三酯合成最后一步反应的关键酶。*DGAT* 有两种亚型, 其中 *DGAT2* 在血浆甘油三酯浓度的调节、肌肉能量代谢等方面发挥着重要作用^[8-9]。脂肪酸结合蛋白 4 (*Fatty acid binding protein 4*, *FABP4*) 主要在脂肪细胞中表达, 参与脂类代谢和脂肪沉积的调控, 在脂肪酸合成过程中起到关键作用^[10]。大量研究表明, *ANGPTL4*、*DGAT2*、*FABP4* 可以作为影响牛肉脂肪沉积的潜在候选基因。

目前有关阉割对延边黄牛脂肪沉积及相关基因表达的影响的报道较少。本研究通过比较在相同条件下饲养的延边黄牛育肥公牛和阉牛的肌肉脂肪、背膘厚及大理石花纹等级等性状, 并分析 *ANGPTL4*、*DGAT2*、*FABP4* 等脂代谢相关基因表达变化, 以阐明阉割对牛肉品质的确切作用, 为指导延边黄牛高档牛肉生产实践及后续脂肪沉积机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物

本试验选取吉林省珲春市吉兴牧业有限公司 6 月龄左右, 体重相近的延边黄牛公牛和阉牛各 15 头。所有试验牛在相同饲养条件下育肥至 36 月龄屠宰。

1.1.2 样品采集

试验牛屠宰后, 在每头牛右侧胴体 12~13 肋骨间切开, 取背最长肌样品分割成 0.3 cm³ 的小组织块装入冻存管, 立即存放于液氮中, 用于基因表达实验。宰后胴体在 0~4℃ 条件下排酸处理 3 d, 取右侧胴体第 12~13 根肋骨间的背最长肌样本, -20℃ 保存, 用于测定脂肪沉积相关性状。

1.1.3 主要试剂

Trizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; PrimeScript™ RT-PCR Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 脂肪沉积性状测定

采用索氏抽提法测定肌肉脂肪含量; 用螺旋测微器测定第 12~13 胸肋间的眼肌横切面处, 从靠近脊柱的一端起, 在眼肌长度的 3/4 处, 垂直于外表面测量背膘厚度; 大理石花纹等级于肉牛胴体排酸 3 d 后测定, 肉眼观察第 12~13 胸肋肌肉横切面, 对照牛肉大理石花纹等级评定图谱(见图 1), 确定眼肌大理石花纹等级^[11]。按 6 个等级进行评定, 1 级最好, 6 级最差。

1.2.2 肌肉组织总 RNA 提取及纯化

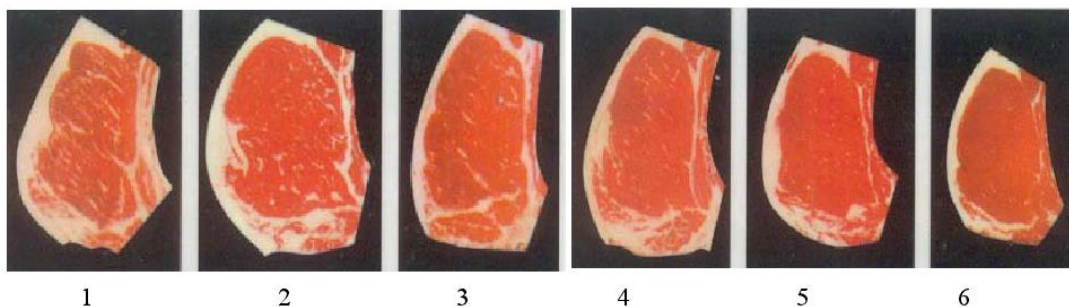


图1 大理石化纹评分标准

按照 Trizol 试剂盒说明书方法提取总 RNA。利用 PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒进行 cDNA 合成。

1.2.3 荧光定量 PCR

根据 NCBI 数据库中得到的 *ANGPTL4*、*DGAT2* 和 *FABP4* 基因序列, 用 Primer Premier 5.0、Oligo 6.0 软件进行引物设计, 选用 *GAPDH* 为内参基因(见表 1)。

按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒说明书进行荧光定量 PCR 操作, 反应体系见表 2。反应程序: 预变性 95℃ 30 s (升温速

率 4.4℃/s), 1 cycle; PCR 分析模式: 定量分析 95℃ 5 s (升温速率 4.4℃/s), 60℃ 30 s (升温速率 2.2℃/s, Acquisition Mode: Single), 40 cycles; 融解分析模式: 融解曲线 95℃ 5 s (升温速率 4.4℃/s), 60℃ 1 min (升温速率 2.2℃/s), 95℃ (升温速率 0.11℃/s, Acquisition Mode: Continuous, Acquisitions: 5 per℃), 1 cycle; 降温 50℃ 30 s (升温速率 2.2℃/s), 1 cycle。

1.2.4 数据分析

表 1 荧光定量 PCR 引物

基因	登录号	引物序列(5'-3')	产物(bp)
FABP4	NM_174314	F-TGGATGATAAGATGGTGCTGGA	114
		R-ATGGAGTTTCGATGCAAACGTC	
ANGPTL4	NM_001046043.2	F-GATGGCTCCGTGGACTTTAACC	103
		R-GGATGTGATGCACCTTCTCCAG	
DGAT2	NM_205793	F-CATTGCCGTGCTCTACTTCA	86
		R-AGTTTCGGACCCACTGTGAC	
GAPDH	BC102589	F-ACCCAGAAGACTGTGGATGG	247
		R-ACGCCTGCTTCACCACCTTC	

注:F 为上游引物,R 为下游引物

表 2 荧光定量 PCR 反应体系

试剂	体积(μL)
SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)(2×)	10
Forward Primer(10μM)	0.8
Reverse Primer(10μM)	0.8
cDNA	2
RNase Free dH ₂ O	6.4
合计	20

采用 Excel 软件整理数据并用 SPSS 19.0 进行统计分析,结果用“平均值±标准差”表示,采用独立样本 *t* 检验进行显著性分析, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 分别代表差异显著和差异极显著。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量, $\Delta Ct_{\text{目的基因}}=Ct_{\text{目的基因}}-Ct_{\text{内参基因}}$, $\Delta\Delta Ct=\Delta Ct_{\text{试验组}}-\Delta Ct_{\text{对照组}}$ 。

2 结果与分析

2.1 延边黄牛公牛与阉牛脂肪沉积性状对比

对育肥至 36 月龄的延边黄牛公牛与阉牛分别进行屠宰,测定脂肪沉积相关性状,结果显示:阉牛肌肉脂肪含量显著高于公牛($P<0.05$),阉牛的后腰厚极显著高于公牛($P<0.01$),阉牛的大理石花纹等级显著高于公牛($P<0.05$)(见表 3)。说明公牛阉割后育肥,可提高肌肉脂肪含量、后腰厚和大理石花纹等级。

表 3 公牛与阉牛脂肪沉积性状对比结果

性状	公牛	阉牛
肌肉脂肪(%)	13.26±6.45a	21.43±6.89b
后腰厚(cm)	1.25±0.21A	2.19±0.24B
大理石花纹等级	3.67±0.58a	1.50±1.29b

注:同一行数据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

2.2 延边黄牛公牛与阉牛脂肪沉积相关基因表达分析

2.2.1 总 RNA 提取结果

应用 TRIzol RNA 提取法提取延边黄牛背最长肌组织总 RNA,经超微量分光光度计检测,A260/A280 在 1.9~2.1 之间,由图 2 可以看出, RNA 分子条带清晰,完整性好, RNA 无降解,无 DNA 污染,满足实验要求。

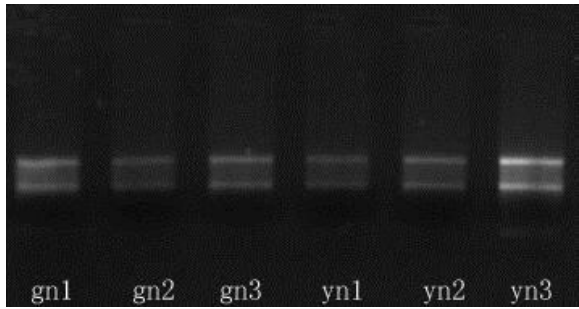


图 2 肌肉组织总 RNA 电泳图
(公牛组:gn1、gn2、gn3;阉牛组:yn1、yn2、yn3)

2.2.2 ANGPTL4、DGAT2、FABP4 基因表达分析

对提取的肌肉组织总 RNA 进行反转录,并进行荧光定量 PCR 反应,由图 3 可知,引物特异性好,扩增效率高。结果显示:阉牛 ANGPTL4 和 DGAT2 基因的表达量显著高于公牛($P<0.05$),阉牛 FABP4 基因的表达量极显著高于公牛($P<0.01$)(见表 4)。

表 4 延边黄牛肌肉 ANGPTL4、DGAT2 和 FABP4 基因 mRNA 表达量

基因	公牛	阉牛
ANGPTL4	7.97±0.97a	10.51±0.64b
DGAT2	4.43±1.15a	7.45±0.55b
FABP4	8.92±0.61A	46.36±3.54B

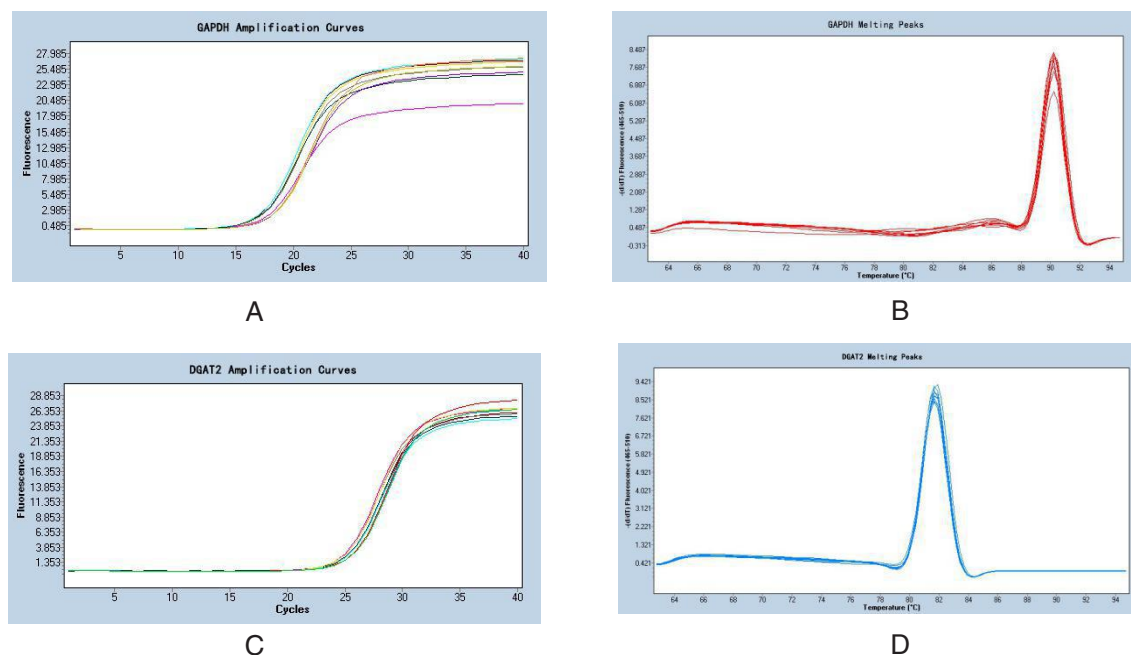


图3 目的片段的扩增曲线和溶解曲线
(A、C为扩增曲线,B、D为溶解曲线)

3 讨论

公牛阉割后育肥在肉牛生产中被广泛应用,阉割可以改善牛肉品质、提高牛肉等级,尤其是在高档肉牛育肥过程中可以使牛性情变得温顺,易于饲养管理,能促进体脂沉积。而阉割对肉牛脂肪沉积性状的影响及作用机制尚缺乏确切的理论依据。Landon等研究发现,阉牛牛肉的大理石花纹、pH值以及嫩度都比公牛好^[12]。本研究结果进一步证实,延边黄牛阉牛在肌肉脂肪含量、背膘厚、大理石花纹等级相较于公牛有显著提升,说明阉割使与延边黄牛肉质密切相关的脂肪沉积性状得到了显著改善,进一步明确了阉割在高档牛肉生产中的作用。

动物脂肪组织沉积受多种因素影响,除营养等因素外,还受自身基因调控的影响。*ANGPTL4*基因具有抑制脂蛋白酯酶的活性,正调控血浆甘油三酯水平,*ANGPTL4*基因是肉质性状分子育种领域备受关注的基因之一。马云研究发现,*ANGPTL4*基因的遗传变异与牛育肥后肌肉脂肪含量存在显著相关^[13]。徐畅等研究发现背最长肌中*ANGPTL4*基因的表达量与肌肉脂肪含量呈显著正相关^[14]。本试验结果表明,阉牛*ANGPTL4*基因的表达量显著高于公牛。*DGAT2*基因在血浆甘油三酯浓度的调节、肌肉能量代谢等方面发挥着重要作用。王国富等在金华猪中发现,*DGAT2*基因的表达对肌肉脂肪沉积有显著影响^[15]。Jeong等研

究表明*DGAT2*基因表达水平与背最长肌内的肌肉脂肪含量呈显著正相关^[16]。本试验结果表明,延边黄牛阉牛*DGAT2*基因的表达量显著高于公牛,与上述研究结论一致。*FABP4*基因在脂肪酸合成过程中起关键作用,影响肌间脂肪含量。有关*FABP4*基因的多态性与生产性状的相关研究表明,*FABP4*是影响牛肉嫩度和肌肉脂肪含量的候选基因之一,与牛肉品质密切相关^[17]。在和牛、韩牛、澳大利亚牛的研究中也发现*FABP4*基因影响脂肪酸组成、皮下脂肪厚度和肌肉脂肪含量^[18-20]。本试验结果表明,阉牛*FABP4*基因的表达量极显著高于公牛。本次研究的*ANGPTL4*、*DGAT2*、*FABP4*基因与脂肪代谢密切相关。肉牛经阉割处理后增加了肌肉中三个基因的表达量,表明延边黄牛阉割后可能通过影响脂代谢基因表达,进而改变脂质代谢,增加肌肉脂肪沉积。

4 结论

试验结果表明,延边黄牛公牛阉割后育肥能显著增加肌肉脂肪沉积,提高大理石花纹等级,改善牛肉品质。阉割处理上调了*FABP4*、*DGAT2*、*ANGPTL4*三个脂代谢相关基因的表达,可能是影响肌肉脂肪沉积增加的因素之一。

参考文献:

- [1] 陈洪深. 阉割对瘦肉型猪肥育性状和胴体质量的影响[J]. 吉林畜牧兽医, 1985(6): 7-10.

- [2] Nielsena B K, Thamsborg S M. Welfare,health and product quality in organic beef production: a Danish perspective[J]. Livestock Production Science, 2005, 94(1-2): 41-50.
- [3] Anderson L, McEernan P, Barnett A, et al.The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site[J]. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2001, 86(10): 5045-5051.
- [4] Christoffersen B O, Gade L P, Golozubova V, et al.Influence of castration-induced testosterone and estradioldeficiency on obesity and glucose metabolism in male Göttingen minipigs[J]. Steroids, 2010, 75(10): 676-684.
- [5] 蔡兆伟,陈民利,张立凡,等.去势对猪脂肪沉积及其关键基因表达的影响[J].农业生物技术学报,2013,21(10): 1203-1209.
- [6] Dijk W, Kersten S. Regulation of lipid metabolism by angiopoietin-like proteins[J]. Curr Opin Lipidol, 2016, 27(3): 249-256.
- [7] Dijk W, Schutte S, Aarts E O, et al. Regulation of angiopoietin-like 4 and lipoprotein lipase in human adipose tissue[J]. Journal of Clinical Lipidology, 2018, 12(3): 773-783.
- [8] 闫雷,林家栋,刘若余,等.DGAT基因在畜禽育种中的应用[J].贵州农业科学,2010,38(1): 138-142.
- [9] 吴光松,燕志宏,林鹏飞,等.RNA干扰DGAT1和DGAT2在猪肝细胞和肌内前体脂肪细胞中表达的研究[J].中国畜牧杂志,2018,54(7):91-96.
- [10] 许瑞霞,高磊,赵伟利,等.FABP4基因在阿勒泰羊尾脂沉积与代谢模型中的表达变化规律[J].遗传,2015(2): 174-182.
- [11] 王淑辉.利用基因芯片对阉割引起牛生长发育和脂肪沉积变化分子机理的研究[D].北京:中国农业科学院,2008.
- [12] Landon M E,Hedrick H B,Thompson G B. Live animal performance and carcass characteristics of beef bullocks and steers[J]. Taiwan Journal of Forest Science,2001, 16(2): 93-102.
- [13] 马云.牛三个基因的分离、定位及其与牛经济性状的关联研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2006.
- [14] 徐畅,宋霁轩,庞喆,等.延边黄牛ANGPTL4基因组织表达规律与肌内脂肪沉积相关性研究[J].中国畜牧杂志,2017,53(10):43-46.
- [15] 王国富,高树新,张立凡,等.金华猪DGAT1、DGAT2基因发育性表达特点及其与肌内脂肪的关联分析[J].华北农学报,2011,26(5):25-28.
- [16] Jeong J, Kwon E G,Im S K,et al.Expression of fat deposition and fat removal genes is associated with intramuscular fat content in longissimus dorsi muscle of Korean cattle steers[J]. Journal of Animal Science, 2012, 90(6): 2044-2053.
- [17] Cho S,Park T S,Yoon D H,et al.Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle.[J]. Bmb Reports, 2008, 41(1): 29-34.
- [18] Barendse W, Bunch R J, Thomas M B,et al.A splice site single nucleotide polymorphism of the fatty acid binding protein 4, gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in longissimus muscle in Australian cattle[J]. Animal Genetics, 2009, 40(5): 770-773.
- [19] Hoashi S, Hinenoya T, Tanaka A, et al.Association between fatty acid compositions and genotypes of FABP4 and LXR-alpha, in Japanese Black cattle[J]. BMC Genetics, 2008, 39(1): 1-7.
- [20] Shin S C, Heo J P, Chung E R. Genetic variants of the FABP4 gene are associated with marbling scores and meat quality grades in Hanwoo (Korean cattle)[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(5):5323-5330.