

糯谷猪解耦联蛋白3和心脏型脂肪酸结合蛋白在骨骼肌中的表达和定位*

王 阳¹, 冉雪琴¹, 王嘉福^{1,2}, 冯诚诚¹, 胡 倩¹

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵州 贵阳 550025;

2. 贵州大学农业工程省重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘 要: 为了探索解耦联蛋白3 (uncoupling protein 3, UCP3) 和心脏型脂肪酸结合蛋白 (heart fatty acid-binding protein, H-FABP) 对骨骼肌细胞中脂肪代谢的调节作用, 采用 RT-PCR 和免疫组织化学方法, 研究了地方猪品种糯谷猪骨骼肌细胞中 UCP3 和 H-FABP 基因的表达和细胞内定位, 并与外二元杂交猪相比较, 结果表明, 糯谷猪的肌细胞及其细胞间隙较大, 血清游离脂肪酸和肌肉脂肪含量较高; 但 UCP3 和 H-FABP 基因表达量和蛋白分布密度均较杂交猪低。说明糯谷猪肌细胞中 UCP3 和 H-FABP 的表达量较少, 肌细胞中 ATP 的生成效率较高, 对脂肪酸供能的依赖性较低, 脂肪得以贮存。提示 UCP3 和 H-FABP 主要以蛋白量的变化参与猪骨骼肌细胞的脂肪代谢调节, 从而影响地方猪种的肉质等性状。

关键词: UCP3; H-FABP; 免疫组织化学; 骨骼肌; 糯谷猪

中图分类号: Q291 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2011) 01-0099-05

Expression and Localization of Uncoupling Protein 3 and Heart Fatty Acid-binding Protein in Skeletal Muscle Cells of Nuogu Pig

WANG Yang¹, RAN Xueqin¹, WANG Jiayu^{1,2}, FENG Chengcheng¹, HU Qian¹

(1. Faculty of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Key Laboratories for Agricultural Bioengineering of Guizhou Province, Guiyang 550025, China)

Abstract: Uncoupling protein 3 (UCP3) and heart fatty acid-binding protein (H-FABP) are pivotal in the regulation of fat metabolism in skeletal muscle cells. Taking binary crossbreed pig of Large White pig and Landrace as control, the expression and localization of UCP3 and H-FABP genes and proteins are detected in the skeletal muscle cells by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and histological and immunohistochemistry methods. The results show that both of UCP3 and H-FABP are detected in the cytoplasm of muscle cells from Nuogu pig and crossbreed pig. Compared with crossbreed pig, however, the expressions of UCP3 and H-FABP in Nuogu pig breed are significantly lower based on the scan results of mean optical density (mOD) of positive pellets in the muscle cells. And the content of serum free fatty acids and intramuscular fat (IMF) of skeletal muscle are much higher in Nuogu pig breeds together with larger muscle cells and intracellular spaces. It sounds that the absorption of fatty acids from blood is less because of the lower H-FABP in muscle cells of Nuogu pig. And the production of adenosine triphosphate (ATP) is much more effective in Nuogu pig due to the lower expression of UCP3, which seems to be compensation to the less intake of fatty acids for energy supply in muscle cells of Nuogu pig. As a result, the excessive fatty acids would turn to synthesize triglyceride deposited in fat cells inside of

* 收稿日期: 2009-12-03

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2008BADB5B02); 贵州省优秀青年科技人才培养计划资助项目 (黔科合人字 (2005) 0506 号); 贵州省长专项资金资助项目 (黔省专合字 [2009] 100 号)

作者简介: 王阳 (1983 年生), 女, 硕士; 通讯作者: 王嘉福; E-mail: jfwang@gzu.edu.cn

muscle and fat tissue, which results in higher intramuscular fat (IMF) and backfat in Nuogu pig breed. It suggests that both of UCP3 and H-FABP genes and the expression in the muscle cells are contributed to the meat quality and backfat traits in Nuogu pig breed.

Key words: UCP3; H-FABP; immunohistochemistry; skeletal muscle; Nuogu pig

骨骼肌细胞能量的直接供应形式是 ATP, 由糖、脂肪等分解后在线粒体中生成。ATP 的生成量受解耦联蛋白、脂肪酸结合蛋白等基因的调节。解耦联蛋白 (uncoupling protein, UCPs) 分为 5 种, 即 UCP1 ~ 5, 均为质子跨膜转运的载体。其中 UCP3 主要分布于骨骼肌、脂肪组织和心肌中, 且在骨骼肌中高效表达^[1], 调节骨骼肌细胞的能量代谢。UCP3 使线粒体内膜两侧的质子化学梯度消失, 将呼吸链与氧化磷酸化作用解耦联^[2], ATP 的生成量下降, 并促进糖、脂肪等分解, 使骨骼肌中的脂肪沉积减少。由于 UCP3 与骨骼肌中的脂肪代谢关系密切, 因此被认为是影响猪肉肉质性状的主效基因或与之紧密连锁^[3]。另一类参与脂肪代谢调节的重要分子是脂肪酸结合蛋白 (fatty acid binding proteins, FABPs), 分为心脏型脂肪酸结合蛋白 (heart fatty acid binding-protein, H-FABP)、脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白等 9 种, 均为小分子的胞质蛋白, 其中 H-FABP 的相对分子质量为 14 000 ~ 15 000^[4], 主要分布于心肌、骨骼肌和脂肪细胞中, 与脂肪酸结合并转运到脂肪酸氧化之处^[5], 直接影响细胞的脂肪贮存量, 也被认为是猪肉质的候选基因^[6]。糯谷猪为贵州省特有的地方猪种, 具有肉质鲜美等特点。我们之前的研究证明, 糯谷猪的肌肉脂肪含量、大理石纹和嫩度值明显高于外二元杂交猪, 并与 UCP3 基因外显子多态性相关^[3], 与 H-FABP 基因内含子多态性位点无关。目前还不清楚糯谷猪 UCP3 和 H-FABP 在骨骼肌中的表达变化, 也未明确其与脂肪代谢、肉质性状之间的关系, 因此本文应用 RT-PCR 和免疫组织化学方法, 研究糯谷猪骨骼肌细胞 UCP3 和 H-FABP 基因的表达和分布特点, 探索其对地方猪品种肉质调节的作用方式。

1 材料与方法

1.1 实验动物

23 头糯谷猪样品采自贵州纳雍县糯谷猪繁育中心, 25 头外二元杂交猪 (大 × 长) 样品采自当地生猪屠宰场, 耳静脉采血制备血清, -20 °C 保存, 用于检测游离脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 含量, 选择 12 月龄糯谷猪和杂交猪各 4 头, 取腰

椎背最长肌, 一部分用 $w = 4\%$ 多聚甲醛固定; 一部分置于液氮中, 用于提取组织 RNA; 一部分立即用于测定肌肉脂肪 (intramuscular fat, IMF) 含量^[3]。

1.2 血清游离脂肪酸的测定

用游离脂肪酸测试盒 (南京建成生物工程研究所) 测定。

1.3 骨骼肌 H-FABP 和 UCP3 mRNA 表达

参照已知序列设计基因 H-FABP 和 UCP3 的特异性引物, H-FABP_f: 5' - TGGAGTTT GATGAGCAACAGCAG - 3', H-FABP_r: 5' - TCTTTCTCGTAGTCCGAGTGC - 3', 预扩增片段 190 bp; UCP3_f: 5' - GACGTGGTGAAGGTTTCGATT - 3', UCP3_r: 5' - CGAGTTCATGTACCGGGTC T - 3', 预扩增片段 330 bp; β -actin_f: 5' - GGCTACAGCTT CACCAC - 3', β -actin_r: 5' - TACTCCTGCTTGCT GATC CAC - 3', 预扩增片段 500 bp (上海捷瑞生物工程有限公司)。

用 RNA 高效提取液 (上海飞捷生物技术有限公司) 提取样品总 RNA, 用 cDNA 合成试剂盒 (Fermentas, 立陶宛) 进行反转录; 以 H-FABP_f / H-FABP_r、UCP3_f / UCP3_r、 β -actin_f / β -actin_r 为引物进行 PCR 扩增, $w = 1.5\%$ 琼脂糖凝胶电泳, 以 GeneTools 图像分析系统 (Bio-rad) 分析目的基因条带的灰度值, 与 β -actin 基因条带的灰度之比代表基因的表达量, 以 SPSSv12.0 进行单因素方差分析。

1.4 免疫组织化学

背最长肌组织块 $w = 4\%$ 多聚甲醛固定 8 ~ 10 h, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 作 5 μ m 连续切片, 常规 HE 染色。用 SABC 免疫组化染色试剂盒 (武汉博士德) 对石蜡切片进行染色, 一抗为 1:2 000 兔抗人 UCP3 多克隆抗体或 1:1 000 兔抗人 FABP 多克隆抗体 (美国 Abcam 公司)。

1.5 图像处理及统计分析

用 BioMias 图像分析系统 (四川大学图像图形研究所) 分析免疫组化结果。每个样本取 10 张切片, 每张切片于 400 倍下随机选取 10 个视野, 测量每个视野中肌细胞内棕色颗粒的平均光密度 (mean optical density, mOD), 计算 100 个视野

mOD 的平均值，以 mean ± SD 表示，经 SPSSv12.0 单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异显著， $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结 果

2.1 肌内脂肪含量和血清游离脂肪酸含量

糯谷猪的 IMF 和血清 FFA 含量分别为 $(3.39 \pm 0.22)\%$ 和 $(2.45 \pm 0.51) \text{ mmol/L}$ ，均极显著高于杂交猪的相应数值 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1 糯谷猪与外二元杂交猪 IMF 和血清 FFA 含量比较¹⁾

Table 1 Comparison of IMF and FFA between Nuogu pig and binary crossbreed

Breeds	Number of samples	IMF/%	FFA/ (mmol · L ⁻¹)
Nuogu pig	23	$3.39 \pm 0.22^{**}$	$2.45 \pm 0.51^{**}$
Binary crossbreed	25	1.06 ± 0.07	1.38 ± 0.31

1) * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2.2 糯谷猪骨骼肌细胞的组织学结构

糯谷猪骨骼肌组织切片经 HE 染色，肌细胞的纵切面呈细长纺锤形，胞浆强嗜酸性，被伊红染成明暗相间的横纹；横切面呈多角形，细胞核椭圆形，被苏木素染成蓝色，沿细胞膜内侧面排列。对照组杂交猪的骨骼肌细胞结构与糯谷猪相似，主要差异表现在细胞大小和间质上 (图 1)。用 BioMias 图像分析系统测定肌细胞的横切面积，糯谷猪肌细胞横切面积为 $(6.17 \pm 0.47) \times 10^{-9} \text{ m}^2$ ，明显大于杂交猪的 $(3.99 \pm 0.63) \times 10^{-9} \text{ m}^2$ ($P < 0.01$)，且肌细胞中的间质也明显较多。

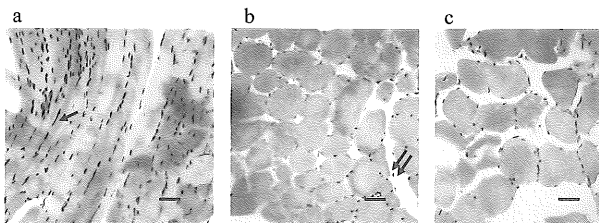


图 1 糯谷猪和杂交猪骨骼肌细胞的组织学结构

Fig. 1 Histological structure of skeletal muscle cells in Nuogu pig and binary crossbreed pig

a: 杂交猪骨骼肌纵切面结构 (箭头处为肌原纤维); b: 杂交猪骨骼肌横切面结构 (双箭头处为间质); c: 糯谷猪骨骼肌横切面结构。标尺为 50 μm

2.3 糯谷猪骨骼肌 UCP3 和 H-FABP mRNA 的表达

糯谷猪骨骼肌 UCP3 和 H-FABP 基因 mRNA 的表达量分别为 (0.86 ± 0.09) 和 (1.40 ± 0.08) ，显著低于对照组杂交猪的表达量 (1.11 ± 0.12) 和 (1.70 ± 0.13) ($P < 0.05$) (图 2, 3)。

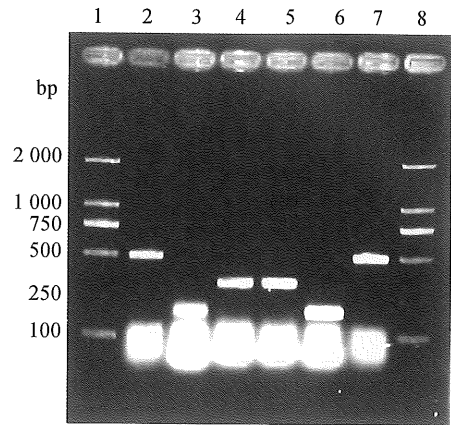


图 2 糯谷猪与外二元杂交猪骨骼肌 UCP3 和 H-FABP 基因表达的 RT-PCR 分析

Fig. 2 Expression of UCP3 and H-FABP genes in muscles of Nuogu pig and binary crossbreed by RT-PCR

1, 8: DNA Marker; 2: 糯谷猪 β-actin; 3: 糯谷猪 H-FABP; 4: 糯谷猪 UCP3; 5: 杂交猪 UCP3; 6: 杂交猪 H-FABP; 7: 杂交猪 β-actin

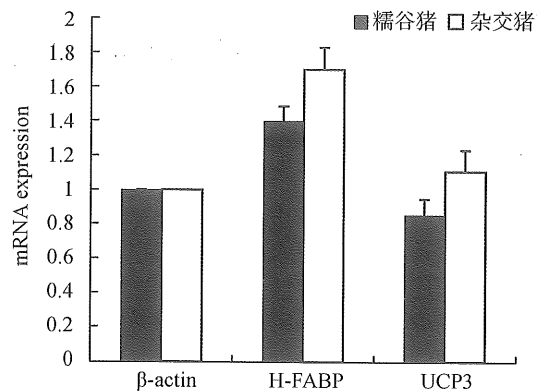


图 3 糯谷猪与外二元杂交猪骨骼肌 UCP3 和 H-FABP 基因 mRNA 表达量比较

Fig. 3 Comparison of UCP3 and H-FABP mRNA expression in muscle between Nuogu pig and binary crossbreed

2.4 糯谷猪骨骼肌细胞中 UCP3 的分布

用特异性抗体从糯谷猪骨骼肌细胞中检测到 UCP3 蛋白的阳性信号为棕色颗粒，仅分布于细胞质，呈簇状或散在分布，细胞核被苏木素复染前后，均未发现棕色颗粒沉着 (图 4)。对照组杂交猪骨骼肌细胞中 UCP3 蛋白的表达信号与糯谷猪的

相似, 但单个细胞中棕色颗粒的密度明显较多, 阳性细胞分布得更为广泛。糯谷猪和杂交猪骨骼肌细胞中阳性颗粒的 mOD 分别为 (123.99 ± 4.16) 和 (155.21 ± 9.75) ($P < 0.01$) (表 2)。阴性对照中以 PBS 代替一抗, 细胞质和细胞核中均未发现阳性信号。

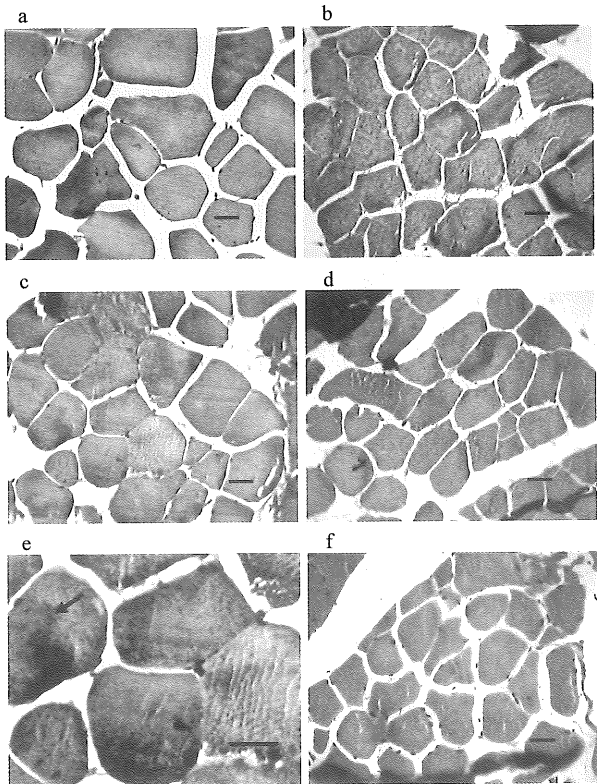


图 4 糯谷猪与外二元杂交猪 UCP3 和 H-FABP 蛋白在骨骼肌细胞中的定位

Fig. 4 Distribution of UCP3 and H-FABP proteins in skeletal muscle cells of Nuogu pig and binary crossbred
a: 糯谷猪 UCP3; b: 杂交猪 UCP3; c: 糯谷猪 H-FABP; d: 杂交猪 H-FABP; e: 图 c 的局部放大 (箭头示 H-FABP 蛋白棕色沉淀); f: 杂交猪阴性对照。标尺为 50 μm

表 2 糯谷猪与外二元杂交猪骨骼肌细胞中 UCP3 和 H-FABP 蛋白的分布密度¹⁾

Table 2 Distribution of H-FABP and UCP3 proteins in skeletal muscle cells of Nuogu pig and binary crossbred

Breeds	Number of samples	UCP3 (mOD)	H-FABP (mOD)
Nuogu pig	4	$123.99 \pm 4.16^{**}$	$139.95 \pm 8.16^{**}$
Binary crossbred	4	155.21 ± 9.75	168.46 ± 8.12

1) $*P < 0.05$; $**P < 0.01$

2.5 糯谷猪骨骼肌细胞中 H-FABP 的分布

H-FABP 蛋白也仅在骨骼肌细胞质中表达, 且

糯谷猪肌细胞中的信号明显比杂交猪的弱。糯谷猪和杂交猪骨骼肌细胞中 H-FABP 阳性颗粒的 mOD 分别为 (139.95 ± 8.16) 和 (168.46 ± 8.12) ($P < 0.01$) (表 2)。阴性对照中没有棕色颗粒沉着。

3 讨论

采用 RT-PCR 和免疫组织化学方法证明, 成年糯谷猪和杂交猪骨骼肌细胞中都有 UCP3 基因的表达, 但糯谷猪肌细胞中 UCP3 基因和蛋白的分布量明显较少。进入骨骼肌细胞的脂肪酸, 在线粒体中经 β -氧化生成乙酰辅酶 A, 主要经三羧酸循环彻底分解放能, 产生的 FADH 和 NADH 等携带的能量, 经呼吸链通过氧化磷酸化作用生成 ATP。UCP3 存在于线粒体的内膜, 主要作为质子漏使氧化磷酸过程中产生的质子梯度消失^[7], ATP 合成酶难以被激活, 致使呼吸链与氧化磷酸化过程解耦联, 产生的 ATP 量减少^[8], 同时细胞对 ATP 的需求刺激脂肪酸、碳水化合物等物质的分解^[9]。UCP3 在骨骼肌、白色脂肪、棕色脂肪组织及心肌中表达, 但猪缺乏棕色脂肪组织^[10], UCP3 在骨骼肌中的高表达使机体的静止能量代谢水平增加^[11]。转基因小鼠骨骼肌中 UCP3 基因过量表达时, 表现出饲料消耗量增加、体重却明显下降^[12], 说明机体的能量大部分以热量的形式散失^[2]。与杂交猪相比, 糯谷猪骨骼肌细胞中 UCP3 的含量较低, 对氧化磷酸过程的影响较小, 糖、脂肪等物质分解时产生 ATP 的效率较高, 则肌肉或脂肪组织中脂肪等低水平消耗就能够满足机体的能量需求^[13], 则骨骼肌、脂肪组织中脂肪的沉积量较高, 与糯谷猪的优良肉质和低瘦肉率相对应^[3]。相应地, 因杂交猪 UCP3 基因和蛋白的表达量均较高, ATP 的生成效率下降, 脂肪难以沉积, 致使肌内脂肪含量下降, 肉品的嫩度降低, 背膘厚也相应下降, 瘦肉率增加^[14]。

糯谷猪肌细胞中 H-FABP 基因和蛋白的分布量也明显少于杂交猪。H-FABP 可促进细胞吸收脂肪酸, 在肌肉组织中, H-FABP 的表达量与脂肪酸代谢的强度密切相关^[15]。H-FABP 在心肌中的表达量最高, 其次是红肌, 但未成熟的肌肉组织中表达量极低, 当细胞开始利用脂肪酸作为能源时表达量才迅速上升, 并随着对脂肪酸依赖性的上升而增加^[16]。糯谷猪肌细胞中 H-FABP 的表达量较杂交猪低, 提示糯谷猪骨骼肌细胞对脂肪酸供能的依赖性较低。由于骨骼肌细胞中脂肪酸合成酶的活性极低, 不能合成脂肪酸, 因此主要从血液中摄取^[17],

则骨骼肌获取脂肪酸的量取决于 H-FABP。糯谷猪骨骼肌 H-FABP 的分布较少, 捕获的脂肪酸量较少, 对脂肪酸的消耗减少, 存在于血液中的 FFA 相对增加, 实际测得糯谷猪血清 FFA 含量确显著高于杂交猪的相应值。血液中高浓度的 FFA 可能有利于脂肪酸向骨骼肌中的脂肪细胞转运, 合成甘油三酯并贮存, 与实际测定的糯谷猪肌内脂肪量高相符(表1)。糯谷猪骨骼肌组织切片经 HE 染色, 可见糯谷猪肌纤维之间的间隙明显大于杂交猪(图1), 提示其间的脂肪细胞数量或体积较大(HE 染色中, 脂肪细胞不着色)。

综上所述, 糯谷猪骨骼肌细胞中 UCP3 的表达量较低, 使得肌细胞中 ATP 的生产效率较高; 同时, 糯谷猪骨骼肌中 H-FABP 的表达量较低, 对脂肪酸的摄入量较少, 致使滞留在血液中的游离脂肪酸量增加; 二者综合作用使糯谷猪的脂肪分解代谢下降, 表现为肌肉脂肪含量上升, 背膘厚也因此增加, 肉质得以明显的改善。本文的研究结果提示糯谷猪骨骼肌细胞中 UCP3 和 H-FABP 基因的表达量较少可能是其肉质优良、瘦肉率低的重要原因。

参考文献:

- [1] VIDAL-PUIG A, SOLANES G, GRUJIC D, et al. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 235(1): 79-82.
- [2] HAN D H, NOLTE L A, JU J S, et al. UCP-mediated energy depletion in skeletal muscle increases glucose transport despite lipid accumulation and mitochondrial dysfunction [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 286(3): E347-353.
- [3] 胡倩, 王嘉福, 冉雪琴. 贵州地方猪种 UCP3 基因多态性与肉质性状的相关性分析 [J]. *中国畜牧杂志*, 2008, 44(13): 1-4.
- [4] KRAGTEN J A, VAN NIEUWENHOVEN F A, VAN DIEIJEN-VISSER M P, et al. Distribution of myoglobin and fatty acid-binding protein in human cardiac autopsies [J]. *Clin Chem*, 1996, 42(2): 337-338.
- [5] GERBENS F, RETTENBERGER G, LENSTRA J A, et al. Characterization, chromosomal localization and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein [J]. *Mamm Genome*, 1997, 8(5): 328-332.
- [6] 李长龙, 萨晓婴, 孟和, 等. H-FABP 基因的多态性和营养因素对猪肉质的影响 [J]. *遗传*, 2009, 31(7): 713-718.
- [7] BOSS O, SAMEC S, PAOLONI-GIACOBINO A, et al. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression [J]. *FEBS Lett*, 1997, 408(1): 39-42.
- [8] CHENG G, POLITO C C, HAINES J K, et al. Decrease of intracellular ATP content downregulated UCP2 expression in mouse hepatocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308(3): 573-580.
- [9] SAMEC S, SEYDOUX J, RUSSELL A P, et al. Skeletal muscle heterogeneity in fasting-induced upregulation of genes encoding UCP2, UCP3 PPARgamma and key enzymes of lipid oxidation [J]. *Pflugers Arch*, 2002, 445(1): 80-86.
- [10] TRAYHURN P, TEMPLE N J, VAN AERDE J. Evidence from immunoblotting studies on uncoupling protein that brown adipose tissue is not present in the domestic pig [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1989, 67(12): 1480-1485.
- [11] OBERKOFER H, LIU Y M, ESTERBAUER H, et al. Uncoupling protein-2 gene: reduced mRNA expression in intraperitoneal adipose tissue of obese humans [J]. *Diabetologia*, 1998, 41(8): 940-946.
- [12] LI B, NOLTE L A, JU J S, et al. Skeletal muscle respiratory uncoupling prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice [J]. *Nat Med*, 2000, 6(10): 1115-1120.
- [13] JORGENSEN W, GAM C, ANDERSEN J L, et al. Changed mitochondrial function by pre-and/or postpartum diet alterations in sheep [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(6): E1349-1357.
- [14] 王安娜, 冉雪琴, 王嘉福, 等. 贵州地方猪品种 HSL 基因多态性与屠宰性状的关联性研究 [J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(5): 627-632.
- [15] VEERKAMP J H, MAATMAN R G. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes [J]. *Prog Lipid Res*, 1995, 34(1): 17-52.
- [16] SCHAAP F G, VAN DER VUSSE G J, GLATZ J F. Fatty acid-binding proteins in the heart [J]. *Mol Cell Biochem*, 1998, 180(1/2): 43-51.
- [17] SCHAFFER J E. Fatty acid transport: the roads taken [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(2): E239-246.