

蓝塘猪和长白猪 和 受体基因表达的变化

陈赞谋 戚晓鸿 张豪 吴珍芳 刘德武^{* *}

华南农业大学动物科学学院, 广州 510642

摘要 用实时荧光定量 PCR 方法研究了蓝塘猪和长白猪 1、27、90、150 和 180 日龄阶段脂肪组织中 leptin 基因 mRNA 和下丘脑中 leptin 受体基因 mRNA 的变化,并对 2 个品种不同生长阶段血液中 leptin 含量的变化规律进行了探讨。结果表明:(1)蓝塘猪 180 日龄时皮下脂肪中 leptin 基因表达量显著高于其它各阶段,而与长白猪相比,蓝塘猪除 1 日龄低于长白猪外,其它各个阶段均高于长白猪,180 日龄两者差异极显著;长白猪各阶段间差异不显著;(2)蓝塘猪 180 日龄时下丘脑中 leptin 受体基因的表达量显著高于其它各阶段,长白猪 180 日龄时最高,且显著高于 1 日龄和 27 日龄,蓝塘猪与长白猪 1 日龄时差异显著;(3)蓝塘猪血清中 leptin 浓度各阶段均高于长白猪,两品种均是 150 日龄时最高,蓝塘猪 150 日龄显著高于 27 日龄和 180 日龄,长白猪各阶段差异不显著。

关键词 猪; leptin; leptin 受体; 基因表达

中图分类号 Q 786 S 828 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)01-0067-04

leptin 基因首次在小鼠中发现,其编码的蛋白质对机体的脂肪沉积、体重和能量代谢等具有重要的调节作用^[1-2]。其调节机制为主要作用于下丘脑的体重调节中枢,引起食欲降低、能量消耗增加,从而抑制脂肪的蓄积和体重的增加^[3-4]。在啮齿类动物和人类的各器官中进行 leptin mRNA 检测,结果只有在大网膜、后腹膜、肠系膜及皮下脂肪组织中可见,尤以皮下脂肪组织最多^[5]。leptin 功能的发挥是通过与其受体(leptin receptor, LEPR)结合而实现的。研究表明,LEPR 基因在脑、心、胎盘、肝、肾、脾、肌肉、胸腺、前列腺、睾丸、卵巢、小肠、结肠、肾上腺中都有 mRNA 表达。LEPR 的广泛分布,决定了 leptin 具有广泛的生物学功能。如 leptin 可直接抑制胰岛素分泌,降低甲状腺素分泌,甚至影响猪的繁殖性能等^[6-8]。对脂肪型和瘦肉型猪血清 leptin 水平比较认为,脂肪型猪存在 leptin 抵抗现象,血清 leptin 水平比瘦肉型猪高出几倍^[9-10],脂肪型猪 leptin 基因的表达量也高于瘦肉型猪^[9-10]。

总之,leptin 与 LEPR 在调节动物脂肪沉积等方面有着重要的作用。本研究通过对瘦肉型长白猪和脂肪型蓝塘猪血清 leptin 水平、皮下脂肪组织

leptin 基因和下丘脑中 LEPR 基因的 mRNA 的检测和比较,旨在了解 leptin 与 LEPR 基因的表达规律,探讨不同类型猪脂肪沉积的遗传基础,为进行胴体组成和猪肉品质的遗传改良等提供理论依据。

材料与方法

试验样本

选用广东某猪场经产蓝塘母猪和长白母猪各 6 头纯繁,所生后代用于饲养试验。试验期内按常规饲养管理进行,仔猪 28 d 断奶,公猪 3 日龄阉割。分别于 1、27、90、150 和 180 日龄进行屠宰和相关性能测定(每品种 6 头,3 公 3 母),采集血液、皮下脂肪与下丘脑等组织样本,置液氮速冻, - 80 保存备用。

主要试剂及仪器

总 RNA 提取试剂盒(TRIZOL)购自赛百盛公司,反转录酶(AMVR Tase)、DNA 聚合酶(Taq)、RNA 酶抑制剂购自美国 Promega 公司。PCR 仪为美国 PE 公司产品(9600),电泳凝胶成像系统(Electrophoresis Documentation and Analysis System120)为 Kodak 公司

收稿日期:2008-06-28; 修回日期:2008-12-30

* 国家自然科学基金项目(30571327)、广东省农业攻关项目(2008A020100001 和 2007B020706004)资助

** 通讯作者。E-mail: dwliu@scau.edu.cn

陈赞谋,男,1965 年生,硕士,副教授。研究方向:猪遗传育种。E-mail: zmchen@scau.edu.cn

产品。血清 leptin 浓度测定试剂盒购自天津九鼎医学生物工程公司。

提取和反转录

1) 总 RNA 的提取。按试剂盒 (TRIZOL) 方法提取总 RNA, 用无 Rnase 的 Dnase⁻ 处理以除去痕量的 DNA 污染。用琼脂糖凝胶电泳检测, 并用紫外分光光度计测其质量浓度, 稀释至 1 μg/μL 备用。

2) 反转录。采用两步法, 反应体系为: 总 RNA 1 μL, 10 mmol/L dNTPs (each) 2 μL, oligo (dT) 18 (50 μmol/L) 2 μL, RNase-free dd H₂O 补充至 31 μL, 65 °C 保温 5 min, 冰浴 5 min, 然后向反应管

中依次加入 RNase 抑制剂 1 μL, 10 ×AMV Reaction buffer 4 μL, DTT 2 μL, AMV 逆转录酶 2 μL, 混匀后于 37 °C 温育 1 h, 在 70 °C 保温 15 min, 以灭活逆转录酶, 10 °C 保存 5 min, 产物置 -20 °C 保存备用。

引物设计和定量

1) 引物设计。根据 leptin 和 LEPR 基因胞外区的核苷酸序列, 以及 β -actin 基因序列 (GenBank 登录号分别为 SSU59894、AF092422 和 AY550069), 用 Primer Premier 5.0 软件设计定量 PCR 引物和探针 (表 1)。探针序列 5' 端标记的为发光基团, 3' 端标记的为淬灭基团。送上海生工生物工程公司合成。

表 1 定量 PCR 引物与探针序列信息

Table 1 Information of primer and probe sequences in Real time RT-PCR

基因 Gene	引物或探针序列 Nucleotide sequences of primer and probe (5'-3')	产物长度/ bp Production length	退火温度/ Annealing temperature
leptin	F 5'-AAATCGAATGACCTGGAGAACCT-3'	139	60.0
	R 5'-CGTGGAGTAGAGGGAGGCTT-3'		
	Probe 5'-(FAM) CGCCAGGCTCTCCAAGGTCTCCA (Eclipse)-3'		
LEPR	F 5'-GTGTCA TTCCTGATTCCTGGT-3'	105	60.0
	R 5'-AGACTGGCTTCTCCCAAGATATTT-3'		
	Probe 5'-(FAM) AACCGCTGCCTCCATCCA GTGTGA (Eclipse)-3'		
β -actin	F 5'-AGTGGTCAGCCATCACAATCC-3'	124	60.0
	R 5'-GGTCTCAAGTACGTGTACAGGTAA-3'		
	Probe 5'-(FAM) CCTCCGCACCTCAACCCGCTCCTA (Eclipse)-3'		

2) 反应体系。总体积为 25 μL, 其中含 SYBR a Green I Realtime PCR Master Mix 12 μL, 前后引物各 0.4 μL, cDNA 模板 1 μL, 加 dd H₂O 至终体积 25 μL。

3) 反应程序。95 °C 预变性 1 min; 40 个循环 (95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15 s)。试验对所有样本进行 3 个重复测定, 并在每次实验时设置阴性对照。

血清中 leptin 浓度测定

用放射免疫法进行血清中 leptin 测定, 具体操作按试剂盒说明书进行。

数据统计

参照 Winer 等^[11]的方法, 用 2^{-C_t} 法度量目的基因的 mRNA 相对表达水平, 以 β -actin 为内标基因进行标准化。并采用方差分析进行相对表达量的差异显著性检验, 多重比较采用 SAS (8.01) 软件进行。

结果与分析

长白猪与蓝塘猪皮下脂肪中 leptin 基因的表
达 长白猪与蓝塘猪皮下脂肪中的 leptin 基因的表

达变化规律见表 2。结果显示, 2 个品种皮下脂肪中 leptin 基因表达的相对丰度有一定的规律及品种特点。蓝塘猪出生时表达量最低, 此后有增高趋势, 180 日龄最高, 且显著高于其它各阶段; 长白猪 27 日龄时最高, 180 日龄时最低, 各阶段差异不显著。蓝塘猪除初生时低于长白猪外, 其它各个阶段相对表达量均高于长白猪, 180 日龄阶段差异达极显著水平。

长白猪与蓝塘猪下丘脑中 leptin 受体基因的表达

2 个品种下丘脑中 leptin 受体基因相对表达量的变化见表 2。结果显示, 2 个品种下丘脑中 leptin 受体基因的相对表达量存在品种特征。蓝塘猪出生时较高, 此后有下降趋势, 在 180 日龄陡然升高, 且显著高于其它各阶段表达量; 长白猪一直保持升高趋势, 180 日龄时最高, 且显著高于 1 日龄和 27 日龄阶段。蓝塘猪与长白猪 1 日龄时差异显著, 其它各阶段差异不显著。

长白猪与蓝塘猪血清中 leptin 含量

长白猪与蓝塘猪血清中的 leptin 含量变化规律

表 2 皮下脂肪中 leptin 基因和下丘脑中 leptin 受体基因表达量的变化¹⁾

Table 2 Changes of leptin gene expression in subcutaneous fat

日龄 Days/d	leptin 基因 leptin gene		LEPR 基因 LEPR gene	
	蓝塘猪 Lantang pig	长白猪 Landrace	蓝塘猪 Lantang pig	长白猪 Landrace
1	0.535 1 ±0.101 1 b	2.636 3 ±1.172 0 a	5.488 3 ±1.948 6 b	0.347 2 ±0.106 2 bc *
27	5.910 6 ±1.734 8 b	4.397 7 ±1.404 4 a	4.493 6 ±1.278 2 b	1.278 0 ±1.002 7 b
90	4.267 0 ±1.446 6 b	2.690 3 ±1.100 1 a	4.307 2 ±1.059 9 b	4.881 4 ±1.351 5 abc
150	7.981 9 ±1.794 6 b	2.336 3 ±1.355 8 a	2.080 2 ±0.322 0 b	5.331 2 ±2.154 7 ab
180	92.789 4 ±17.281 0 a	1.628 8 ±0.667 2 a **	14.158 0 ±5.668 8 a	6.409 8 ±2.357 0 a

1) 同列不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), *, ** 表示同行差异显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$)。下同 Different letter represents significance within a line ($P < 0.05$), *, ** represent significance within a row ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The same as below.

见表 3。结果显示,两品种均是 150 日龄时最高,且蓝塘猪各阶段均高于长白猪。蓝塘猪 150 日龄显著高于 27 日龄和 180 日龄;长白猪各阶段差异不显著。

表 3 血清中 leptin 的含量变化

Table 3 Changes of serum leptin level

日龄 Days/d	蓝塘猪 Lantang pig	长白猪 Landrace
1	0.933 9 ±0.058 2 ab	0.791 4 ±0.064 5 a
27	0.871 9 ±0.106 6 b	0.684 6 ±0.045 6 a
90	1.038 0 ±0.046 4 ab	0.765 4 ±0.031 7 a
150	1.209 4 ±0.079 2 a	0.806 0 ±0.059 4 a
180	0.859 1 ±0.075 1 b	0.692 1 ±0.042 4 a

讨 论

本研究结果中,蓝塘猪和长白猪皮下脂肪 leptin 基因表达变化规律有明显的品种特征。蓝塘猪是中国典型的脂肪型猪种,其出生时皮下脂肪中 leptin 基因表达量最低,此后有增高趋势,180 日龄最高,且显著高于其它各阶段。180 日龄时 2 个品种差异达极显著水平,且除 1 日龄蓝塘猪低于长白猪表达量之外,其它各阶段均高于长白猪,此结果与龙火生等研究基本一致^[9]。后者认为,瘦肉型猪种 leptin 基因的表达量低于脂肪型猪种。但本研究中长白猪初生时 leptin 基因的表达量高于蓝塘猪,这是否与怀孕期胎儿的生长发育有关还有待进一步研究。有研究表明,leptin 在猪的胚胎发育的早期就开始参与相关功能的调节^[12-13]。

下丘脑中 LEPR 基因相对表达量的变化规律也具有品种特征。蓝塘猪 180 日龄阶段显著高于其它各阶段,长白猪 180 日龄阶段显著高于 1 日龄和 27 日龄阶段。这一结果与 2 个类型猪的脂肪沉积规律基本一致。说明随着脂肪沉积的增加,LEPR 基因相对表达量有增加趋势。但 1 日龄时长白猪 leptin 受体基因相对表达量显著低于蓝塘猪,结合

初生长白猪 leptin 基因表达量高于蓝塘猪这一结果,作者认为,初生时可能有其它因素影响 2 个基因的表达,如胎儿的生长发育、分娩或仔猪哺乳等,具体有待深入研究。

在血清中 leptin 浓度方面,有研究表明,脂肪型猪的血清中 leptin 水平比杂种猪高出 3 倍或更多^[9,14]。本研究中,蓝塘猪各阶段 leptin 水平均高于长白猪,与前人的结果一致,但两者差异并没有达到所报道的 2~3 倍,这可能与试验中所采用的不同猪种有关。前人研究认为,一些啮齿类先天肥胖动物和过量摄食导致的肥胖动物中发现脂肪组织 leptin 基因 mRNA 表达增加,血 leptin 的水平升高,说明这些动物体内对 leptin 的反应减弱或无反应,这种现象称为 leptin 抵抗^[14]。

本研究结果说明蓝塘猪和其它脂肪型猪种一样存在 leptin 抵抗现象。到目前为止,由于 leptin 抵抗的机理非常复杂,人们对动物机体产生 leptin 抵抗的了解还十分有限。另外,其它因素也可能影响 leptin 水平的变化,如在人类的外科手术后,机体中的 leptin 水平明显升高,说明 leptin 可能是动物机体参与应激反应的重要组成成分^[15]。另外,大白猪血液中的睾酮到 120 日龄显著升高,从而抑制了 leptin 基因的表达,这也说明机体 leptin 水平与性成熟有关^[10]。

总之,leptin 基因是最早发现与动物肥胖相关的基因之一,已受到广泛的重视。大量研究已证明,leptin 与 leptin 受体基因在调节动物脂肪沉积方面有着重要的作用,血清 leptin 水平能反映机体能量代谢和脂肪沉积状况。同时,leptin 和动物体内多种激素存在相互作用,其对动物机体的调节机理非常复杂。深入研究猪 leptin 与 leptin 受体基因的结

构、表达,以及与脂肪沉积等相互关系对探讨猪的脂肪沉积机理有重要意义。

参 考 文 献

- [1] ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature, 1994, 372: 425-432.
- [2] HAVEL P J. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance [J]. Proc Nutr Soc, 2000, 59: 359-371.
- [3] BIDWELL C A, JI S, FRANK G R, et al. Cloning and expression of the porcine obese gene[J]. Anim Biotech, 1997, 8(2): 191-206.
- [4] PELLEYMOUNTER M A, CULLRN M J, BAKER M B, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice[J]. Science, 1995, 269: 540-543.
- [5] MASUZAKI H, OGAWA Y, ISSE N, et al. Human obese gene expression: adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue[J]. Diabetes, 1995, 44: 855-858.
- [6] CEDDIA R B, WILLIAM W N J, CURI R. Leptin increases glucose transport and utilization in skeletal muscle *in vitro* [J]. Gen Pharmacol, 1998, 31(5): 799-801.
- [7] SMOLINSKA N, SIAWRYS G, KAMINSKI T, et al. Leptin gene and protein expression in the trophoblast and uterine tissues during early pregnancy and the oestrous cycle of pigs[J]. J Physiol Pharmacol, 2007, 58(3): 563-581.
- [8] 刘德武, 杜颖军, 张豪, 等. 猪 Leptin 基因的 SNP 筛查及其与生长性状的关联分析[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(2): 251-257.
- [9] 龙火生, 孙超, 庞卫军, 等. 瘦肉型猪与脂肪型猪血清 leptin 的比较检测[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(6): 5-8.
- [10] 周杰, 赵茹茜, 韦习会, 等. 二花脸脂肪 leptin 和下丘脑中 Ob-rb 基因表达的发育性变化[J]. 中国科学, 2003, 33(6): 525-531.
- [11] WINER J, JUNG C K S, SHACKEL I, et al. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*[J]. Anal Biochem, 1999, 270(1): 41-49.
- [12] SIAWRYS G, KAMINSKI T, SMOLINSKA N, et al. Expression of leptin and long form of leptin receptor genes and proteins in pituitary of cyclic and pregnant pigs [J]. J Physiol Pharmacol, 2007, 58(4): 845-857.
- [13] KAMINSKI T, SMOLINSKA N, GAJEWSKA A, et al. Leptin and long form of leptin receptor genes expression in the hypothalamus and pituitary during the luteal phase and early pregnancy in pigs[J]. J Physiol Pharmacol, 2006, 57(1): 95-108.
- [14] RAMSA Y T G, YAN X, MORRISON C. The obesity gene in Swine: Sequence and expression of porcine leptin [J]. J Anim Sci, 1998, 76: 484-490.
- [15] KAIN Z N, ZIMOLO Z, HENINGER G. Leptin and the perioperative neuroendocrinological stress response[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(7): 2438-2442.

Changes of Leptin and Leptin Receptor Gene Expression in Subcutaneous Fat and Hypothalamus of Lantang and Landrace Pigs

CHEN Zan-mou QI Xiao-hong ZHANG Hao WU Zhen-fang LIU De-wu

College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract Real time RT-PCR was applied to study the developmental patterns of leptin and leptin receptor gene mRNA expression at the ages of 1, 27, 90, 150 and 180 days after born (DAB) in subcutaneous fat and hypothalamus of Lantang and Landrace pigs. The results showed that: (1) in subcutaneous fat, Lantang had the highest leptin mRNA level at 180 DAB. Leptin mRNA at all ages in lantang was higher than that in landrace, except at 1 DAB. Leptin mRNA was significantly higher in Lantang pig than that in landrace pig at 180 DAB. Leptin mRNA had no significant difference among landrace pigs at all ages. (2) In hypothalamus, leptin receptor mRNA was highest at 180 DAB for both the two breeds, and it had significantly higher than that at other ages in lantang, and at 1 and 27 d in landrace. Two breeds at 1 d had apparent differed. (3) Lantang pigs at all ages had higher serum leptin level than landrace. Two breeds at 150 d were the highest compared with other ages. Lantang pigs at 150 day had significantly higher than at ages of 27 and 180 day. No significant changes were seen in all ages in landrace.

Key words pig; leptin; leptin receptor; gene expression

(责任编辑:边书京)