

孙瑞萍,晁哲,郑心力,等. 饲料能量差异对海南猪 *IGFBP6* 基因 mRNA 表达的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):35-37.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.010

# 饲料能量差异对海南猪 *IGFBP6* 基因 mRNA 表达的影响

孙瑞萍<sup>1,2</sup>, 晁哲<sup>1</sup>, 郑心力<sup>1,2</sup>, 王峰<sup>1,2</sup>, 黄丽丽<sup>3</sup>, 刘圉伟<sup>1</sup>, 魏立民<sup>1</sup>

(1. 海南省农业科学院畜牧兽医研究所, 海南海口 571100; 2. 海南省家畜家禽工程技术研究中心, 海南海口 571100;

3. 海南省热带动物繁育与疾病研究重点实验室, 海南海口 571100)

**摘要:**将 36 头质量为  $(61.70 \pm 1.00)$  kg 的海南猪随机分为 2 个处理组, 分别饲喂高、低能量水平的 2 种日粮, 以研究不同能量水平对 *IGFBP6* 基因表达量及生产性能的影响。相比之下, 高能量水平饲料可显著提高海南猪平均日增质量 ( $P < 0.05$ ), 并显著降低料肉比 ( $P < 0.05$ )。RT-PCR 结果表明, 低能量水平饲料可促进 *IGFBP6* 基因表达量。海南猪 *IGFBP6* 基因表达量与平均日增质量、平均日采食量均呈不显著正相关 ( $P > 0.05$ ); 与料肉比呈显著负相关 ( $P < 0.05$ )。饲料能量水平可影响海南猪的生产性能, 但对海南猪 *IGFBP6* 基因表达量的影响不显著。

**关键词:**海南猪; 能量水平; *IGFBP6* 基因; 基因表达

**中图分类号:** S828.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)07-0035-03

猪生长性状是复杂的数量性状, 而营养是除遗传因素外影响生长的另一个重要因素, 它虽然无法改变动物的遗传性状, 但可通过营养途径, 调控猪生长等数量性状基因的表达, 从而在表型上改善胴体品质和肉质。IGFBPs 在 GH/IGFs 生长轴的调节中起着重要作用, 这些结合蛋白的作用受营养、生理条件、其他激素等诸多因素的影响。*IGFBP6* 基因作为 IGFs 超家族中的一员, 在成年动物体内广泛表达, 因其与 IGF-2 结合的特异性而受到研究者们关注。近几年研究表明, *IGF2* 基因在胎儿生长发育、肌肉生长等方面具有重要调控作用, 与猪的生长速度、背膘厚等产肉性状相关<sup>[1-4]</sup>, 是影响动物生长发育的主要候选基因。在 IGF 依赖型作用途径中, *IGFBP6* 通过与 IGF-2 的结合对动物的生长发育调节产生重要影响。海南猪是我国地方猪的一个品系, 适应性和抗逆性极强, 具有肉质细嫩、胴体瘦肉率高、肌纤维特细、肌间脂肪多等优点。迄今, 关于 *IGFBP6* 对动物生长发育影响的研究尚较少, 且主要集中于不同品种猪 *IGFBP6* 基因 mRNA 在不同组织间表达量的研究<sup>[5-7]</sup>, 而关于不同能量水平对猪 *IGFBP6* 基因 mRNA 表达量的影响, 以及 *IGFBP6* 基因 mRNA 表达量与生产性能相关性的研究尚未见报道。本研究利用 RT-PCR 技术并结合生长性状, 探讨不同能量水平对海南猪 *IGFBP6* 基因表达量的影响, 以及 *IGFBP6* 基因表达量与生长的相关性, 以期从分子水平解释营养对生长产生影响的机理。

## 1 材料与与方法

收稿日期: 2015-02-11

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2012BAI39B04); 海南省自然科学基金 (编号: 313098, 312080)。

作者简介: 孙瑞萍 (1982—), 女, 山西运城人, 博士研究生, 助理研究员, 主要从事家畜遗传育种与繁殖的研究。E-mail: ruiping937@126.com。

通信作者: 魏立民, 副研究员, 主要从事家畜营养研究。E-mail: liminedu@126.com。

### 1.1 试验设计

采用单因子试验设计, 将 36 头质量为  $(61.70 \pm 1.00)$  kg 的海南猪随机分为 2 个处理组, 分别饲喂高、低能量水平的日粮, 每个处理组设 3 个重复, 每个重复 6 头猪。高能量水平日粮参照 NRC (1998)《猪营养需要》配制, 确定消化能 (DE) 为 14.21 MJ/kg; 低能量水平日粮参照 NY/T 65—2004《猪饲养标准》配制, 确定 DE 为 12.95 MJ/kg, 蛋白质含量均为 13.00% (表 1)。

### 1.2 饲养管理

按照海南省农业科学院畜牧兽医研究所猪场饲养管理办法进行饲养管理, 在 7 d 预饲期后, 对 2 个处理组分别饲喂高、低营养水平的饲料。试验期用湿拌料, 每日喂 2 次, 自由饮水, 保持圈舍清洁并定期消毒, 正式试验期为 40 d。

### 1.3 测定指标

1.3.1 生长性能指标 分别于试验开始、结束时空腹称质量, 以圈为单位计算日采食量、日增质量、料肉比。

1.3.2 样本采集 试验结束时, 选取 12 头质量接近于平均质量的海南猪进行屠宰取样 (每重复选 2 头, 每处理组选 6 头), 肉样采集位置为个体的最后肋骨、最后腰椎间的单侧背最长肌, 采集后立即置于液氮中速冻并于  $-70^{\circ}\text{C}$  保存, 用于提取肌肉组织总 RNA。

1.3.3 *IGFBP6* 基因实时定量表达量的测定 取最后肋背最长肌样本约 30 mg, 加入液氮并研磨成粉, 转入 1.5 mL Eppendorf 管中, 采用 RNA Simple Total RNA Kit 总 RNA 提取试剂盒提取样本总 RNA, 按说明书进行操作。通过琼脂糖凝胶电泳检测所提取总 RNA 的完整性, 并通过  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  检测样本纯度。采用 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒 (天根公司产品) 对总 RNA 进行反转录 (reverse transcription, RT), 配制反应体系、设置反应条件、合成 cDNA 均按说明书进行操作, 反转录产物于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

采用 Primer primer 5.0 软件设计引物, 由上海生工有限公司进行合成 (表 2)。

使用实时荧光定量 PCR 仪, 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : 模板

表1 试验日粮配方及营养水平(风干基础)

组别	原料组成(%)									营养水平					
	玉米	豆粕	麦麸	鱼粉	葵花油	石粉	磷酸氢钙	食盐	预混料	消化能(MJ/kg)	蛋白质(%)	赖氨酸(%)	蛋氨酸+胱氨酸(%)	钙(%)	有效磷(%)
高能量组	79.3	11.4	0.0	2.0	3.5	1.0	1.5	0.3	1.0	14.21	13.00	0.60	0.65	0.90	0.42
低能量组	77.4	11.0	4.3	1.5	2.0	1.0	1.5	0.3	1.0	12.95	13.00	0.58	0.64	0.90	0.42

注:预混料为1 kg日粮提供:Cu 10.00 mg;Fe 60.00 mg;Zn 60.00 mg;Mn 80.00 mg;Se 0.20 mg;I 0.20 mg;Co 0.15 mg;维生素E 10.00 mg;维生素D<sub>3</sub> 2 000 IU;维生素K<sub>3</sub> 2.00 mg;维生素B<sub>1</sub> 2.00 mg;维生素B<sub>2</sub> 8.00 mg;维生素B<sub>6</sub> 4.00 mg;维生素B<sub>12</sub> 0.02 mg;烟酸 50.00 mg;泛酸 20.00 mg;叶酸 1.00 mg;生物素 0.20 mg;胆碱 1 000.00 mg。

表2 荧光定量RT-PCR目的基因引物的相关信息

目的基因	引物序列(5'→3')	复性温度(°C)	GenBank 登录号
<i>IGFBP6</i>	F:GGCGTCCAAGACACTG;R:GGTCACAATTAGGCACCTAGAG	60	NM_001100190.1
$\beta$ -actin	F:ATCGTCCGGGACATCAAG;R:CAGGAAGGAGGGCTGGAA	60	U07786

cDNA 1.5  $\mu$ L,上游引物和下游引物各 0.6  $\mu$ L,SYBR Green 10  $\mu$ L,RNase-free ddH<sub>2</sub>O 7.3  $\mu$ L。反应程序为:95 °C 15 min;95 °C 10 s,60 °C 30 s,共 40 个循环。进行熔解曲线分析:60~95 °C范围内,每隔 0.5 °C 读板 1 次(温度恒定 1 s 后读板)。

#### 1.4 统计与分析

采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算方法分析目的基因的相对表达量。采用SPSS 13.0 统计软件对海南猪组织 *IGFBP6* 基因相对表达量进行 *t* 检验及相关性分析,试验结果用平均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用 *LSD* 法进行平均数之间的多重比较。

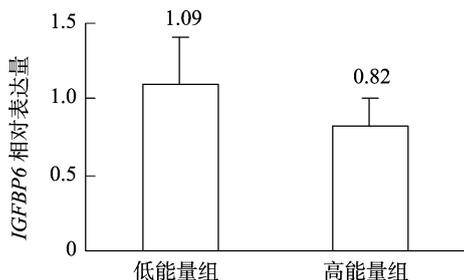
表3 日粮中能量水平对海南猪生产性能的影响结果

组别	初质量(kg)	末质量(kg)	平均日增质量(g)	平均日采食量(g)	料肉比
高能量组	61.55 $\pm$ 0.44a	87.15 $\pm$ 1.82a	640.07 $\pm$ 16.10a	2 419.47 $\pm$ 3.46a	3.78 $\pm$ 0.08a
低能量组	61.85 $\pm$ 0.21a	86.46 $\pm$ 1.20a	615.20 $\pm$ 11.81b	2 411.58 $\pm$ 6.51a	3.92 $\pm$ 0.13b

注:同列数据后不同小写字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。

#### 2.2 能量水平对 *IGFBP6* 基因表达量的影响

由图 1 可知,在低能量水平条件下,*IGFBP6* 基因表达量为 1.09,高能量水平条件下为 0.82,两者差异不显著( $P > 0.05$ )。

图1 营养水平对 *IGFBP6* 基因表达量的影响

#### 2.3 *IGFBP6* 基因表达量与生长性能的相关性分析

由表 4 可知,*IGFBP6* 基因表达量与料肉比呈显著负相关( $P < 0.05$ ),与平均日增质量、平均日采食量均呈不显著正相关( $P > 0.05$ )。

### 3 结论与讨论

能量是动物生长发育、繁殖所必需的营养物质之一,能量

## 2 结果与分析

### 2.1 日粮能量水平对海南猪生长性能的影响

由表 3 可知,日粮能量水平对海南猪平均日增质量、料肉比的影响均达显著水平( $P < 0.05$ ),而对末质量、平均采食量的影响则不显著( $P > 0.05$ )。初始质量差异不显著的海南猪经 40 d 的饲养,其试验期末质量虽未达显著水平,但各能量水平组的平均日增质量均达到显著水平。可见,提高生长后期日粮的能量水平,可显著提高海南猪的平均日增质量,降低料肉比。

表4 *IGFBP6* 基因表达量与生长性能的相关性分析

性状	相关系数			
	<i>IGFBP6</i> 基因表达量	平均日增质量	平均日采食量	料肉比
<i>IGFBP6</i> 基因表达量	1.000			
平均日增质量	0.562	1.000		
平均日采食量	0.260	0.866**	1.000	
料肉比	-0.861**	-0.420	-0.303	1.000

过量或缺乏均可引起猪生长速度的变化或质量的增减。马书林在研究不同能量水平对奶牛生产性能、繁殖性能的影响时指出,将哺乳奶牛日粮的能量水平提高 10%~20%,对其产奶量的影响虽与对照组差异不显著( $P > 0.05$ ),但添加能量可减缓奶牛质量的下降<sup>[8]</sup>。贾金凤研究发现,适当提高猪育肥期日粮的能量水平,可提升猪的日增质量和经济效益<sup>[9]</sup>。刘秋研究发现,不同能量水平对豪猪全期平均日采食量、日增质量、料肉比的影响均达显著水平( $P < 0.05$ )<sup>[10]</sup>。本试验结果表明,提高日粮能量水平对海南猪试验末质量、采食量的影响虽不显著,但可显著提高海南猪的平均日增质量,并降低料肉比( $P < 0.05$ ),这与刘秋在豪猪上的研究结果相一致。

营养物质可通过各种途径对基因表达进行多层次、多水平的调控,从而影响动物机体的生长发育和物质代谢。关于

能量水平对 *IGFBP6* 基因表达量的影响尚未见报道。Towle 等研究发现,日粮中的主要营养物质可显著影响动物体内许多基因的表达,其中包括一些控制机体代谢关键酶的基因,从而影响机体的代谢过程<sup>[11-12]</sup>。Marinaro 等研究发现,由 *IGFBP6* 基因引起的细胞间相互作用似乎受碳水化合物抑制<sup>[13]</sup>。Osgerby 等在对马的研究中发现,不同营养水平会影响胎儿的大小,并随 IGFs 的浓度而改变,营养水平越低则母体的 *IGFBP6* 基因 mRNA 越低(妊娠 45~90 d),随后开始上升,可见 *IGFBP6* 基因的水平受营养水平的影响,且其表达量具有时空效应<sup>[14]</sup>。本研究中营养水平对 *IGFBP6* 基因表达量有一定的影响,即低能量水平的饲料可使 *IGFBP6* 基因表达量升高,但与高能组差异不显著。可能的原因为高、低营养水平之间差别不大,尚未达到显著调控 *IGFBP6* 基因表达量的程度;虽然能量水平可影响 *IGFBP6* 基因的表达,但未必是调控 *IGFBP6* 基因表达量的最佳途径。

Mei 所构建的 *IGFBP6* 基因敲除小鼠在生长、繁殖性状上与野生小鼠没有显著差异<sup>[15]</sup>。Bienvenu 等研究发现,高表达人源 *IGFBP6* 基因的转基因小鼠质量减轻,雌性小鼠生育能力显著下降;过表达 *IGFBP6* 基因的转基因小鼠十二指肠质量显著减轻,其他器官与对照组无显著差异<sup>[16]</sup>。上述研究并不能完全证明 *IGFBP6* 基因对小鼠生长和繁殖的作用,IGFBPs 家族蛋白代谢过程中的一系列代偿作用也可能导致敲除小鼠与野生小鼠在表型上无显著差异。Wansner 对猪 *IGFBP6* 基因第 4 外显子 Taal - RFLP(T - C) 位点的多态性进行检测,发现该基因第 4 外显子突变位点与猪胸腰椎膘厚、肌肉失水率、促甲状腺素的含量均显著相关( $P < 0.05$ )<sup>[5]</sup>。王文君采用 PCR - SSCP 技术在 *IGFBP6*、*G3079A*、*T4069G* 处检测到 2 个 SNP,相关性分析表明,AT 单体型猪的生长发育性状、产肉性状均高于 GG 单体型猪,而板油质量的指标却恰恰相反,可见 *IGFBP6* 基因是猪生长发育性状的一个候选基因<sup>[6]</sup>。

*IGFBP6* 基因是 IGFs 超家族中的一员,其细胞层面的研究表明,*IGFBP6* 基因通过与 IGF2 结合阻断其与细胞表面受体的结合,从而可抑制由 IGF2 所介导的生长、发育、细胞粘连等<sup>[17]</sup>。Zhao 等指出 *IGFBP6* 基因在胚胎时期的肌肉组织中表达量较高,可能与肌肉的分化有关<sup>[18]</sup>。虞德兵研究发现 *IGFI II* 在猪肌肉组织中的表达水平随日龄的增加呈下降趋势<sup>[19]</sup>。房希碧等研究发现,猪肌肉组织中 *IGFBP6* 基因的表达量随月龄的增加呈上升趋势,可见肌肉组织中的 *IGFBP6* 基因可能通过依赖 IGF 的途径发挥对生长发育的调节作用,但此调节作用并非影响猪体型大小的关键因素<sup>[7]</sup>。上述研究进一步揭示了 *IGFBP6* 基因对动物生长、繁殖的作用,以及 *IGFBP6* 基因表达量对动物生长发育性状的影响。

本试验首次研究了 *IGFBP6* 基因相对表达量与肥育猪生产性能的关系,结果表明 *IGFBP6* 基因表达量与料肉比呈显著负相关( $P < 0.05$ ),与平均日增质量、平均日采食量均呈不显著正相关( $P > 0.05$ )。

#### 参考文献:

[1] Tilley R E, McNeil C J, Ashworth C J, et al. Altered muscle development and expression of the insulin-like growth factor system in growth retarded fetal pigs[J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2007, 32(3):

167 - 177.

- [2] 唐中林,李勇,邓宏,等. *IGF2* 荧光定量 PCR 方法建立及其在中外猪胚胎骨骼肌中的表达[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(2): 202 - 207.
- [3] 郭玉姣,唐国庆,李学伟,等. 猪脂肪组织中 *IGF2* 和 *IGFBP3* 基因表达的发育性变化及其品种差异[J]. *遗传*, 2008, 30(5): 602 - 606.
- [4] Stinckens A, Vanden M K, Luyten T, et al. The RYR1 g. 1843C > T mutation is associated with the effect of the *IGF2* intron3 - g. 3072 G > A mutation on muscle hypertrophy[J]. *Animal Genetics*, 2007, 38(1): 67 - 71.
- [5] 万斯妮. 猪 *IGFBP6* 和 *CYR61* 基因片段的克隆、定位、多态及组织表达谱研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2006: 40 - 45.
- [6] 王文君. 猪胰岛素样生长因子结合蛋白 1 - 6 基因核苷酸变异的研究[D]. 北京:中国农业大学, 2006: 113 - 116.
- [7] 房希碧,贾泓瑶,张昕,等. 西藏小型猪与农牧一号白猪 *IGFBP-6* 基因表达差异分析[J]. *吉林农业大学学报*, 2013, 35(6): 727 - 731.
- [8] 马书林. 初产母牛围产期不同能量水平日粮对其生产性能和繁殖性能的影响[D]. 北京:中国农业科学院, 2012.
- [9] 贾金凤. 不同能量水平对冬季生长猪生产性能和经济效益的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2014, 8(15): 104 - 105.
- [10] 刘秋. 不同水平消化能和蛋白质对 6~8 月龄豪猪生产性能的影响[D]. 长沙:湖南农业大学, 2012.
- [11] Towle H C, Kaytor E N, Owle H C, et al. Regulation of the expression of lipogenic enzymes by carbohydrate[J]. *Annual Review of Nutrition*, 1997, 17(1): 405 - 433.
- [12] Clarke S D, Abraham S. Gene expression: nutrient control of pre- and post-transcriptional events[J]. *FASEB Journal*, 1992, 6(13): 3146 - 3152.
- [13] Marinaro J A, Neumann G M, Russo V C, et al. O-glycosylation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein - 6 maintains high IGF - II binding affinity by decreasing binding to glycosaminoglycans and susceptibility to proteolysis[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(17): 5378 - 5386.
- [14] Osgerby J C, Wathes D C, Howard D, et al. The effect of maternal undernutrition on the placental growth trajectory and the uterine insulin-like growth factor axis in the pregnant ewe[J]. *Journal of Endocrinology*, 2004, 182(1): 89 - 103.
- [15] Mei Q. The actions of IGFs on growth and glucose metabolism in transgenic mouse models[D]. New Brunswick: New Jersey, 2010.
- [16] Bienvenu G, Seurin D, Grellier P, et al. Insulin-like growth factor binding protein - 6 transgenic mice: postnatal growth, brain development, and reproduction abnormalities[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(5): 2412 - 2420.
- [17] Murphy L J. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 1998, 21(2): 97 - 107.
- [18] Zhao X, Mo D L, Li A N, et al. Comparative analyses by sequencing of transcriptomes during skeletal muscle development between pig breeds differing in muscle growth rate and fatness[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19774.
- [19] 虞德兵. 猪 *IGF-II* 基因变异对猪生长性状及肌肉发育相关基因表达的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2007.