

任子利,高卓然,李瑜鑫,等. *Ghrelin* 基因在藏猪胃底组织中的 mRNA 表达[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):46-48.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.011

Ghrelin 基因在藏猪胃底组织中的 mRNA 表达

任子利,高卓然,李瑜鑫,王建洲,赵彦玲
(西藏农牧学院动物科学学院,西藏林芝 860000)

摘要:为分析 *Ghrelin* 基因在藏猪与长白猪胃底组织中 mRNA 的表达差异,运用实时荧光定量 PCR 技术,对 *Ghrelin* 基因在藏猪与长白猪胃底组织中 mRNA 的表达水平进行相对定量检测分析。结果显示,藏猪胃底组织中 mRNA 的表达量($0.495\ 8 \pm 0.023\ 1$)显著低于长白猪($0.741\ 7 \pm 0.026\ 6$)。说明 *Ghrelin* 基因在藏猪胃底组织中 mRNA 的低表达可能是藏猪生长缓慢的原因之一,这将为提高藏猪生长速度的进一步研究奠定基础。

关键词:*Ghrelin* 基因;藏猪;胃底组织;mRNA 表达;PCR 技术

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)15-0046-03

藏猪主要生活在我国青藏高原海拔 2 500~4 300 m 的农区和半农半牧区,是中国特有的能适应高海拔地区的一个重要品种^[1-2],有“高原之珍”的美誉^[3]。然而,与长白猪的日增质量达 731 g 相比,藏猪的生长速度比较缓慢,一般 18~30 月龄体质量才达 50~60 kg,日增质量只有 171 g,提高藏猪的生长速度已成为藏猪饲养中的一个关键问题。饥饿激素(*Ghrelin*)被称为胃饥饿素、生长素或生长激素释放肽,是一种由 28 个氨基酸组成的多肽,是生长激素促分泌素受体(GHS-R)的一种内源性配体,由日本的 Kojima 等于 1999 年从小鼠和人的胃组织中成功分离并鉴定^[4]。*Ghrelin* 及其受体在动物体内广泛分布,具有调节生长激素分泌、摄食、能量代谢、生殖等多种生物学作用^[5-6]。在猪、羊等动物上已证实,动物摄食可以促进动物生长^[7-8]。模拟高原的低压低氧环境可致大鼠血清 *Ghrelin* 水平下降,胃黏膜 *Ghrelin* 分泌减少,*Ghrelin* 可能参与模拟低压低氧环境中机体消化功能紊乱的调节^[9]。然而,关于藏猪胃底组织中 *Ghrelin* 基因的 mRNA 表达水平是否与长白猪有差异,目前未见相关报道。因此,本研究运用实时荧光定量 PCR 技术,对 *Ghrelin* 基因在藏猪与长白猪胃底组织中 mRNA 的表达进行相对定量检测分析,以探讨藏猪生长缓慢的可能原因,为提高藏猪生长速度的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

表 1 目的基因与持家基因的定量用引物信息			
基因	GenBank 登录号	引物序列(5'-3')	目的片段长度(bp)
<i>Ghrelin</i>	NM_213807.2	F:GTGCTGAGGTGGAAAGCA;R:TTAGAGAGGCAGGGATGG	232
β - <i>actin</i>	AJ312193.1	F:GCCAACAGAGAGAAGATGACAC;R:GTAACACCATCACCAGAGTCCA	127

收稿日期:2016-06-11
基金项目:西藏自治区自然科学基金(编号:2015ZR-13-32)。
作者简介:任子利(1969—),男,河南卫辉人,博士,副教授,主要从事与动物繁殖相关的教学与研究工作。Tel:(0894)5822924;E-mail:zren0925@163.com。
通信作者:赵彦玲,硕士,副教授,主要从事与动物繁殖相关的教学与研究工作。E-mail:ylzhaohn@163.com。

1.1 材料
1.1.1 样本采集及处理 选择生长发育和营养状况正常的 6 月龄藏猪与 3 月龄长白猪胃底组织样本各 12 个(分别取自西藏大学农牧学院实习基地、西藏林芝当地屠宰场),取样后将样本迅速放入 RNA 样品保存液中,迅速带回实验室进行总 RNA 的提取或放于 -80 ℃ 冰箱备用。
1.1.2 主要试剂与仪器设备 Trizol(碧云天生物技术研究),Quantscript RT Kit、TransStart Top Green qPCR SuperMix (2×)(天根生物技术有限公司),2xPCRMix(北京百泰克生物技术有限公司)。
PCR 仪(德国 Eppendorf 公司),Boi-Rad 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),CFX96 荧光定量实时 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),NanoDrop ND-1000 紫外分光光度计(美国 NanoDrop 公司),Eppendorf Centrifuge 5417R、5415R 离心机(德国 eppendorf 公司)。
1.2 引物设计与合成
根据 GenBank 中已公布的猪 *Ghrelin* 基因(目的基因)以及 β -*actin* 基因(持家基因)的 cDNA 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计定量引物,并送交生工生物工程(上海)股份有限公司合成。2 个基因的引物信息见表 1。
1.3 总 RNA 的提取与鉴定
利用 Trizol 一步法,按照该试剂说明书,提取各个样本的总 RNA。先用紫外分光光度计测总 RNA 浓度和纯度,再用

1% 琼脂糖凝胶电泳确定总 RNA 的完整性,若 RNA 的纯度和完整性均符合要求,立即进行反转录或置于 -80 ℃ 条件下保存备用。
1.4 反转录 cDNA
按照 Quantscript RT Kit 试剂盒说明书提供的方法,将稀释成同一浓度总 RNA 的各个样品反转成 cDNA,接着进行后续试验或置于 -20 ℃ 条件下保存备用。

1.5 基因的 PCR 扩增

用梯度 PCR 筛选 2 对引物的最佳退火温度后,以 cDNA 第一链为模板,加入引物、dNTP 和 2xPCRMix 等,混匀后进行 PCR 扩增。反应体系包括反转录产物 (cDNA) 1 μ L、2xPCRMix 10 μ L,引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L、ddH₂O 8.2 μ L,总体积 20 μ L。PCR 扩增反应参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 20 s,58 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,36 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 结束。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.6 荧光定量 PCR

目的基因及持家基因的荧光定量 PCR 的反应程序为:95 $^{\circ}$ C 15 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环;95 $^{\circ}$ C 10 s,65~95 $^{\circ}$ C 每增加 0.5 $^{\circ}$ C 读取荧光 1 次,绘制溶解曲线。荧光定量 PCR 反应采用 20 μ L 反应体系:2X SYBR PCR Buffer 10 μ L,cDNA 1 μ L,引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L,ddH₂O 8.2 μ L。目的基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.7 数据统计分析

所得试验数据用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析,试验结果用“平均数 \pm 标准差”表示, $P < 0.05$ 为差异显著;用 Sigmaplot 软件作柱状图。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的检测结果

经紫外分光光度仪测定,各个样本总 RNA 的纯度 ($D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$) 均为 2.06~2.15,琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示,可见 28S、18S、5S 等 3 条条带。这说明所提取的总 RNA 纯度和完整性均符合反转录的要求,可以进行反转录试验。

2.2 基因的 PCR 扩增检测结果

由图 2 可以看出,目的基因与持家基因条带均在恰当位置,后经测序证实这 2 条条带即为目的基因与持家基因。

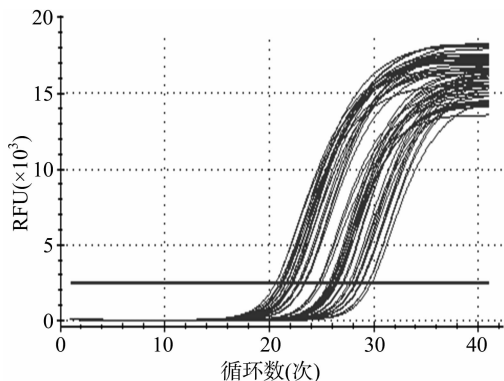
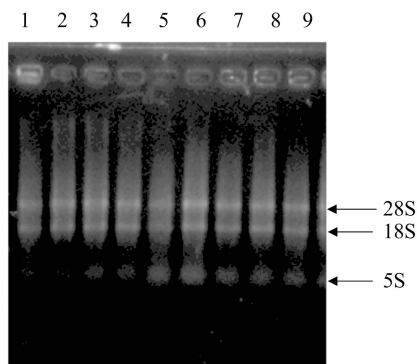


图3 藏猪、长白猪胃底组织中目的基因 *Ghrelin*、持家基因 β -*actin* 的扩增曲线及熔解峰

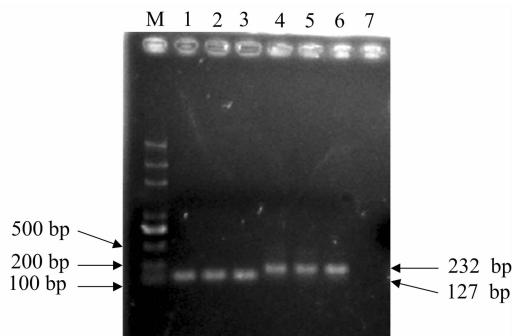
Ghrelin 相对表达量如图 4 所示,藏猪胃底组织中 mRNA 的表达量 (0.4958 ± 0.0231) 显著低于长白猪 (0.7417 ± 0.0266)。可见,*Ghrelin* 基因在藏猪胃底组织中 mRNA 的低表达可能是藏猪生长缓慢的原因之一,这将为提高藏猪生长速度的进一步研究奠定基础。

3 结论与讨论

Du 等的研究表明,在仔猪断奶后,其胃底 *Ghrelin*



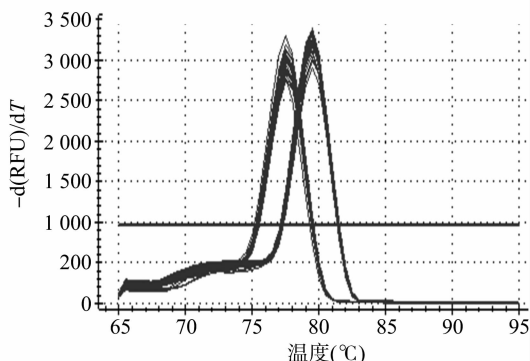
1~5—藏猪总 RNA; 6~9—长白猪总 RNA
图1 藏猪、长白猪胃底组织中总 RNA 琼脂糖凝胶电泳



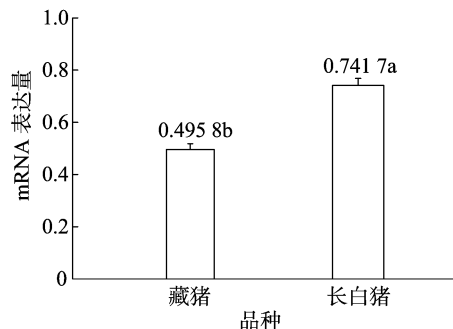
M—DL2000 Plus Marker; 1~3— β -*actin* 基因;
4~6—*Ghrelin* 基因; 7—阴性对照
图2 目的基因、持家基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

2.3 实时荧光定量 PCR 检测结果

藏猪、长白猪胃底组织目的基因 *Ghrelin* 及持家基因 β -*actin* cDNA 扩增曲线、熔解峰如图 3 所示,熔解曲线为单一的峰,说明没有非特异扩增。



mRNA 表达量上调 10 d^[10]。在体外,半胱胺能显著增加胃黏膜细胞 *Ghrelin* mRNA 的表达^[11]。Yang 等的研究表明,高铜日粮可以通过增强生长猪 *Ghrelin* mRNA 的表达水平、生长激素 (growth hormone) 的分泌来提高采食量、促进体质量的增加^[12];Yin 等也有类似的结果,认为仔猪日粮中添加 ZnO 能刺激其胃中 *Ghrelin* 的分泌^[13]。而禁食 24、48 h 均能显著降低大鼠下丘脑中 *Ghrelin* mRNA 的表达水平^[14]。在禁食 72 h 后,断奶仔猪下丘脑、垂体、胃中 *Ghrelin* mRNA 的表达水平均



图中小写字母不同表示在 0.05 水平上差异显著

图4 藏猪、长白猪胃底组织中 *Ghrelin* 基因 mRNA 相对表达量

较低^[15]。在猪、羊等动物上已证实,动物摄食可以促进动物生长^[7-8],本研究结果与之基本一致,即 *Ghrelin* 基因在藏猪胃底组织中 mRNA 的表达显著低于长白猪,这可能是藏猪生长缓慢的原因之一。然而李加龙却得出相反的研究结果,在牦牛皱胃中, *Ghrelin* 阳性细胞分布于黏膜层胃底腺的下部,而瘤胃、网胃和瓣胃上未见其表达,牦牛 *Ghrelin* 阳性产物的表达面积(S)和累计光密度值(IOD)均大于黄牛且差异极显著($P < 0.01$),他认为牦牛胃中的 *Ghrelin* 可能以内源性为主,且与外源性相结合共同参与了食欲、摄食行为及能量代谢与平衡等生理功能的调节^[16]。这可能与物种等不同有关,若究其原因,尚需进一步研究。

总之, *Ghrelin* 具有调节生长激素分泌、摄食等多种生物学作用,而动物摄食可以促进动物生长。藏猪胃底组织中 *Ghrelin* mRNA 的表达量显著低于长白猪,即该基因在藏猪胃底组织中 mRNA 的低表达可能是藏猪生长缓慢的原因之一,这将为提高藏猪生长速度的进一步研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 强巴央宗. 藏猪饲养实用技术[M]. 北京:中国农业出版社,2011.
- [2] 强巴央宗,谢庄,田发益. 高原藏猪现状与保种策略[J]. 中国畜牧杂志,2001,37(6):46-47.
- [3] 任子利,赵彦玲,王建洲,等. 维生素 C 对藏猪精液 4℃ 保存及其精子全基因组 DNA 甲基化的影响[J]. 畜牧兽医学报,2016,47(5):1057-1061.
- [4] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999, 402

(6762):656-660.

- [5] Sun Y, Butte N F, Garcia J M, et al. Characterization of adult ghrelin and ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance[J]. Endocrinology, 2008, 149(2):843-850.
- [6] 张文龙,邢福珊,王韦华. *Ghrelin* 对莎能奶山羊垂体催乳素和生长激素 mRNA 表达的影响[J]. 中国兽医学报,2009,29(8):1081-1084.
- [7] Hayashida T, Murakami K, Mogi K, et al. Ghrelin in domestic animals; distribution in stomach and its possible role[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2001, 21(1):17-24.
- [8] Murray C D, le Roux C W, Gouveia C, et al. The effect of different macronutrient infusions on appetite, ghrelin and peptide YY in parenterally fed patients[J]. Clinical Nutrition, 2006, 25(4):626-633.
- [9] 孙正启,廉会娟,赵洁,等. 模拟高原低压低氧对大鼠血清和胃黏膜 *Ghrelin* 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(16):1726-1730.
- [10] Du G M, Shi Z M, Wei X H, et al. Expression of gastric ghrelin and $H^+ - K^+ - ATPase$ mRNA in weanling piglets and effect of ghrelin on $H^+ - K^+ - ATPase$ expression and activity in gastric mucosal cells *in vitro* [J]. Research in Veterinary Science, 2007, 82(1):99-104.
- [11] Du G, Shi Z, Xia D, et al. Cysteamine improves growth performance and gastric ghrelin expression in preweaning piglets[J]. Domestic Animal Endocrinology, 2012, 42(4):203-209.
- [12] Yang W Y, Wang J G, Zhu X Y, et al. High lever dietary copper promote *ghrelin* gene expression in the fundic gland of growing pigs [J]. Biological Trace Element Research, 2012, 150(1/2/3):154-157.
- [13] Yin J D, Li X L, Li D F, et al. Dietary supplementation with zinc oxide stimulates ghrelin secretion from the stomach of young pigs [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2009, 20(10):783-790.
- [14] Sato T, Fukue Y, Teranishi H, et al. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration[J]. Endocrinology, 2005, 146(6):2510-2516.
- [15] Salfen B E, Carroll J A, Keisler D H. Endocrine responses to short-term feed deprivation in weanling pigs [J]. Journal of Endocrinology, 2003, 178(3):541-551.
- [16] 李加龙. 牦牛 *Ghrelin* 基因的克隆及其在“下丘脑-垂体-胃”轴上的表达机理[D]. 兰州:兰州大学,2012.