

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00602

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

郭玉姣, 唐国庆, 李学伟, 朱砺, 李明洲

四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014

摘要: 采用荧光定量 PCR 技术分析长白猪和太湖猪背部皮下脂肪组织中胰岛素样生长因子 2 和胰岛素样生长因子结合蛋白 3 基因在 30、60、90、120 和 150 日龄时表达水平的发育性变化。结果表明: (1) 品种内日龄间比较, 长白猪 *IGF2* mRNA 在 30 日龄时的表达量极显著高于其他日龄 ($P < 0.01$), 之后逐渐下降, 至 120 日龄降至最低, 150 日龄时又明显上升; 太湖猪 *IGF2* mRNA 在 30~60 日龄的表达量较高, 90 日龄降至最低, 120 日龄迅速回升, 之后又有所下降。两品种 *IGFBP3* mRNA 表达的发育性变化模式基本相同, 30 日龄时表达量最高, 60 日龄显著下降 ($P < 0.05$), 之后趋于平缓但略有波动。(2) 品种间同日龄比较, 120 日龄时太湖猪 *IGF2* mRNA 的表达量极显著高于长白猪 ($P < 0.01$), 150 日龄时太湖猪 *IGFBP3* 的表达量极显著低于长白猪 ($P < 0.01$), 其余日龄间两品种差异均不显著 ($P > 0.05$)。研究结果提示: 猪脂肪组织 *IGF2* 和 *IGFBP3* 基因表达存在明显的发育性变化和品种差异; *IGF2* 基因表达水平的降低可能与脂肪细胞的增殖有关。

关键词: 猪; 脂肪组织; 荧光实时定量 PCR; 胰岛素样生长因子 2 (*IGF2*); 胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (*IGFBP3*)

Developmental expression changes of *IGF2* and *IGFBP3* genes in adipose tissue of two pig breeds

GUO Yu-Jiao, TANG Guo-Qing, LI Xue-Wei, ZHU Li, LI Ming-Zhou

College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

Abstract: To investigate the developmental expression patterns of Insulin-like Growth Factor 2 (*IGF2*) and Insulin-like Growth Factor Binding protein 3 (*IGFBP3*) genes at the age of 30, 60, 90, 120 and 150 days in back subcutaneous fat tissue of Landrace and Taihu pigs, real-time fluorescence quantitative PCR was applied. Results showed that the expression level of *IGF2* mRNA in Landrace pigs was significantly higher at 30 days than other days ($P < 0.01$), then gradually declined and lowest at 120 days, obviously increased at 150 days. In Taihu pigs, it was relatively higher at 30~60 days, lowest at 90 days, increased rapidly at 120 days, and then decreased. Developmental expression patterns of *IGFBP3* mRNA in the two pig breeds were similar, which were highest at 30 days, declined significantly at 60 days ($P < 0.05$) then maintained steady, but a little fluctuant between ages in each breed. In addition, the expression level of *IGF2* mRNA in Taihu pigs was significantly higher than that of Landrace pigs at the age of 120 days ($P < 0.01$), and the expression level of *IGFBP3* mRNA in Taihu pigs was significantly lower than that of Landrace at the age of 150 days ($P < 0.01$), with no significant difference between the

收稿日期: 2007-09-19; 修回日期: 2008-01-25

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(编号: IRT0555-6)和教育部高等学校博士学科点专项基金项目(编号: 20060626003)资助
[Supported by Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University from National Ministry of Education (No.IRT0555-6), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education from National Ministry of Education (No.20060626003)]

作者简介: 郭玉姣(1983-), 女, 河南洛阳人, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: guoyujiao321@163.com

唐国庆(1976-), 男, 讲师, 博士, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: tyg003@163.com

郭玉姣、唐国庆为共同第一作者。

通讯作者: 李学伟(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。Tel: 0835-2886000; E-mail: lixuewei9125@126.com

two pig breeds at other ages ($P>0.05$). The results suggest that the expression of *IGF2* and *IGFBP3* mRNA in the adipose tissue of pigs exhibits specific developmental changes and different patterns between the two pig breeds. The expression decrease of *IGF2* may be related to adipocyte hyperplasia.

Keywords: pig; adipose tissue; real-time RT-PCR; insulin-like growth factor 2 (*IGF2*); insulin-like growth factor binding protein 3 (*IGFBP3*)

胰岛素样生长因子 2(insulin-like growth factor 2, *IGF2*)作为胰岛素样生长因子家族成员之一,在胎儿生长发育、肿瘤细胞增殖、肌肉生长和基因组印记等方面具有重要的调控作用,是影响猪胴体瘦肉率和背膘厚的重要候选基因^[1]。研究发现,向背膘更厚的遗传方向选择会提高猪血浆中 *IGF2* 浓度^[2]提示 *IGF2* 可能参与脂肪沉积的调节。*IGFs* 与其受体结合并发挥生物学效应受到胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding protein, *IGFBP*)的生理性调节。研究表明,在血清中 *IGFBP3* 是猪出生后最主要的 *IGFs* 载体,具有延长 *IGFs* 的半衰期,调节 *IGFs* 的生物学活性等作用^[3]。

本实验以肥胖型的太湖猪和瘦肉型的长白猪为研究对象,采用荧光实时定量 RT-PCR 技术,研究不同生长发育阶段猪脂肪组织中 *IGF2* 和 *IGFBP3* 基因表达的变化,并分析品种间基因表达的差异及其对背膘厚和脂肪细胞体积的影响,以揭示不同品种猪脂肪沉积和肥胖程度差异的遗传原因。

1 材料和方法

1.1 实验动物及采样

太湖猪和长白猪来自四川农业大学动物营养研究所实验猪场,设置 5 个等时间点进程(30、60、90、120 和 150 日龄),随机分配 4 头(2♂, 2♀)相同品种的全同胞仔猪到每个时间点,共计 40 头。所有实验猪只于同一时间开始组建群体,28 日龄断奶,采用相同营养水平和饲喂方式,达到相应时间点当天进行屠宰并采集倒数 3~4 肋骨间对应处的背部皮下脂肪样品,浸泡于 RNA later (Qiagen 公司), -70°C 保存。

1.2 性状测定

1.2.1 平均背膘厚的测定

屠宰后测定左半胴体在肩部最厚处、腰荐结合处和胸腰结合处的皮下脂肪厚度,并计算其平均值作为平均背膘厚。

1.2.2 脂肪细胞参数的测定和形态学观察

制作脂肪组织的石蜡切片(H. E. 染色),用日本

Nikon 电子显微成像系统采集代表性区域图像,观察脂肪细胞在不同时期的形态与结构,利用 Image-Pro Plus(5.1 版本)医学图象分析软件测定每个样品的 100 个单室脂肪细胞的长径和短径,取其几何平均数作为直径。根据细胞直径按照公式计算体积:

$$\text{平均体积}(V)=\pi/6 \sum f_i D_i^3 / \sum f_i$$

其中: D_i 为细胞直径; f_i 代表直径为 D_i 的脂肪细胞数目。

1.3 荧光定量 PCR 测定 *IGF2* 和 *IGFBP3* mRNA 的相对表达量

1.3.1 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

脂肪样品的总 RNA 按照 TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen 公司)的操作说明书提取,用 Bio-Rad 核酸蛋白检测仪测定浓度,并经琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性然后使用 SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit (TaKaRa 公司)进行 cDNA 的合成。

1.3.2 PCR 引物的设计及合成

引物利用软件 Primer3 在线程序(<http://frodo.wi.mit.edu/>)设计,由北京赛百盛基因技术有限公司合成,相关信息见表 1^[4,5]。

1.3.3 标准品制备

以 cDNA 为模板进行 PCR,扩增产物经琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根公司)回收目的片段。使用 EASY Dilution(TaKaRa 公司)10 倍梯度连续稀释回收产物得到实时荧光定量 PCR 的标准品。

1.3.4 标准曲线和熔解曲线分析

RT-PCR 采用 SYBR Green I 染料法,反应在 iQ[™] 5 Multicolor Real-Time PCR 检测系统(Bio-Rad 公司)上进行。PCR 反应体系为 25 μL : 12.5 μL SYBR[®] Premix Ex Taq[™], 0.5 μL 引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL cDNA 模板。PCR 循环参数为: 95.0°C 10 s; 95.0°C 5 s, 复性/延伸温度(表 1)30 s, 循环 40 次;随后进行熔解曲线分析,温度以 $0.5^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$ 的速率从 55.0°C 缓慢递增至 95.0°C 。每次反应设置标准品、未知样品(各重复 3 次)和一个阴性对照(NTC)。

表 1 荧光定量 RT-PCR 目的基因引物的相关信息

Table 1 Information on the primers of the target genes used for real-time RT-PCR

目的基因 Target genes	引物序列 Sequences of primers(5'→3')	产物大小 Product length (bp)	复性/延伸温度 Annealing/Elongation(°C)	GenBank 登录号 GenBank accession No.
<i>ACTB</i>	F: TCTGGCACACACCTTCT R: TGATCTGGGTCATCTTCTCAC	114	62.0	DQ178122
<i>TBP</i>	F: GATGGACGTTTCGGTTTAGG R: AGCAGCACAGTACGAGCAA	124	60.0	DQ178129
<i>TOP2B</i>	F: AACTGGATGATGCTAATGATGCT R: TGGAAAACTCCGTATCTGTCTC	137	60.0	AF222921
<i>IGF2</i>	F: ACACCCTCCAGTTTGTCTGCG R: CAGCTACGGAAGCAGCACTCT	108	61.0	X56094
<i>IGFBP3</i>	F: CCAGCGCTACAAGGTCGACTAC R: TCTCGCGCTTGGACTCAGA	73	61.0	AF085482

注: *ACTB* (beta-actin, 肌动蛋白 β), *TBP* (TATA box binding protein, TATA 框结合蛋白) 和 *TOP2B* (topoisomerase II beta, 拓扑异构酶 II - β) 为内参。

Notes: *ACTB* (beta-actin), *TBP* (TATA box binding protein) and *TOP2B* (topoisomerase II beta) used as internal control.

1.4 统计分析

采用相对定量解析方法, 选用脂肪组织中稳定表达的看家基因 *ACTB*、*TBP* 和 *TOP2B*, 根据仪器分析软件计算的拷贝数(未经校正), 运用 GeNorm 软件分析, 得出看家基因的归一化因子 NF 值(normalization factor), 以目的基因 mRNA 的拷贝数(最大拷贝数设为 1)与对应样品的 NF 值的比值表示基因 mRNA 的相对表达量^[4]。

运用 SAS 8.2 软件的 PROC GLM 程序进行最小二乘均数分析, 结果以最小二乘均数 \pm 标准误表示, 均数间的多重比较用 Duncan 法并进行相关分析。

2 结果与分析

2.1 脂肪细胞体积和平均背膘厚的生长发育变化

由图 1a 可知, 太湖猪和长白猪脂肪细胞体积的发育性变化模式有所不同。太湖猪 30~90 日龄时脂肪细胞的体积较小, 日龄间差异不显著($P>0.05$), 此后极显著升高($P<0.01$); 而长白猪在 60 日龄时有所下降, 之后随着日龄的增加, 体积也不断地增大, 150 日龄显著高于 120 日龄($P<0.05$), 极显著高于其他日龄($P<0.01$)。品种间比较, 太湖猪的脂肪细胞体积在 60 日龄时显著高于长白猪($P<0.05$), 在 120 和 150 日龄极显著高于长白猪($P<0.01$)。整个实验期内, 太湖猪脂肪细胞的体积极显著高于长白猪($P<0.01$)。

由图 1b 可知, 两品种平均背膘厚的发育性变化模式基本一致, 在 30~60 日龄两品种背膘厚较低, 90~150 日龄迅速上升。品种间比较, 太湖猪平均背膘厚在 120 日龄显著高于长白猪($P<0.05$), 90 和 150 日龄时极显著高于长白猪($P<0.01$)。整个实验期内,

两品种平均背膘厚总体差异极显著, 太湖猪平均背膘厚极显著高于长白猪($P<0.01$)。

2.2 脂肪中 *IGF2* 和 *IGFBP3* mRNA 表达的发育性变化

由图 2a 可知, 长白猪和太湖猪脂肪组织 *IGF2* mRNA 表达存在明显的发育性变化。长白猪 *IGF2* 基因的表达量在 30 日龄极显著高于其他各日龄($P<0.01$), 随后逐渐下降, 至 120 日龄降到最低, 150 日龄时又有明显上升; 太湖猪在 30~60 日龄的表达量较高, 90 日龄时显著下降($P<0.05$), 120 日龄迅速回升, 之后在 150 日龄时又有所下降。不同日龄间 *IGF2* mRNA 的表达量总体差异极显著($P<0.01$), 品种间总体差异不显著($P>0.05$), 品种与时间的互作效应显著($P<0.05$)。品种间比较发现, 120 日龄时太湖猪 *IGF2* mRNA 的表达量极显著高于长白猪($P<0.01$), 其余时间点间两品种差异均不显著($P>0.05$)。

由图 2b 可知, 长白猪和太湖猪脂肪组织中 *IGFBP3* mRNA 表达的发育性变化模式基本相同, 在 30 日龄时的表达量最高, 60 日龄时显著下降($P<0.05$), 之后趋于平缓但略有波动。不同日龄间 *IGFBP3* mRNA 的表达量总体差异极显著($P<0.01$), 品种间总体差异不显著($P>0.05$), 品种与时间的互作效应不显著($P>0.05$)。品种间比较发现, 太湖猪 *IGFBP3* 在 150 日龄时极显著低于长白猪($P<0.01$), 其余时间点间两品种差异均不显著($P>0.05$)。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 技术具有特异性强、灵敏度高、定量准确等特点, 已广泛应用于核酸的定量分

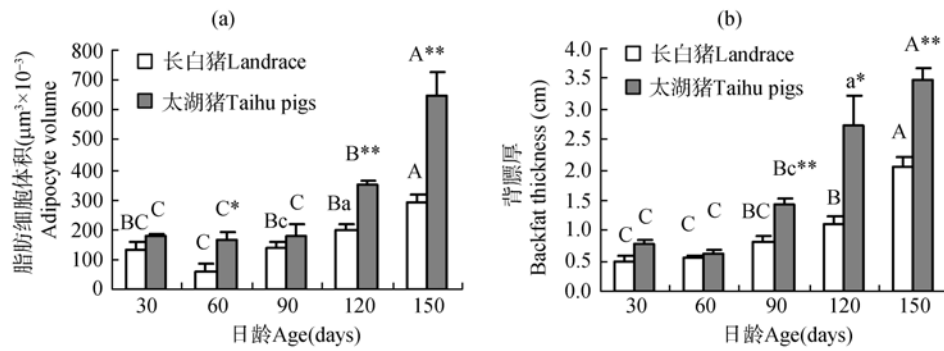


图1 长白猪和太湖猪脂肪细胞体积和背膘厚的发育性变化模式

a: 脂肪细胞体积的发育性变化模式; b: 平均背膘厚的发育性变化模式。同一品种不同日龄上相同的大写或小写字母之间表示差异不显著; 相同的大小写字母之间表示差异显著, 如 A 和 a 之间; 不同的大写字母或不同大小写字母之间表示差异极显著; *和**分别表示同一日龄不同品种差异显著和极显著。

Fig. 1 Developmental patterns of adipocyte volume and backfat thickness of Landrace and Taihu pigs

a: Developmental patterns of adipocyte volume; b: Development patterns of mean backfat thickness. Values with the same letters were not significantly different between ages for the same breed ($P > 0.05$). Values with the same small and capital letters were significantly different at the level of 0.05. Values with the different capital letters or different small and capital letters were significantly different at the level of 0.01. *and ** mean significantly different between the two pig breeds at the same age at the level of 0.05 and 0.01 respectively.

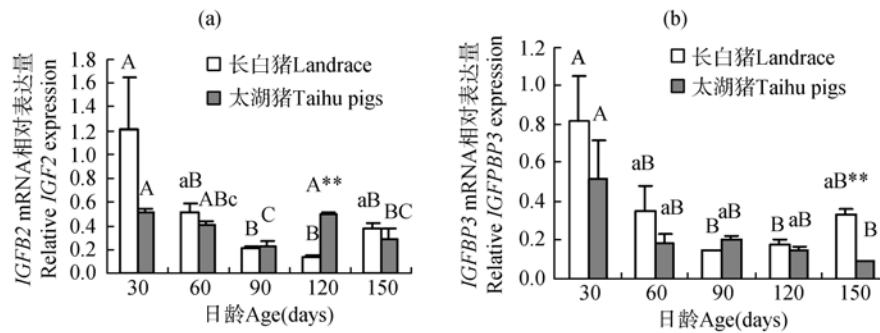


图2 长白猪和太湖猪脂肪组织中 *IGF2* 和 *IGFBP3* mRNA 表达的发育变化模式

a: *IGF2* mRNA 表达的发育性变化模式; b: *IGFBP3* mRNA 表达的发育性变化模式。差异显著性标注同图 1。

Fig. 2 Developmental patterns of *IGF2* and *IGFBP3* mRNA in adipose tissue of Landrace and Taihu pigs

a: Developmental patterns of *IGF2* mRNA; b: Developmental patterns of *IGFBP3* mRNA. The meanings of the letters see the legend in Fig.1.

析。为了避免单个内参校正的误差问题, 本实验采用 3 个在猪背部皮下脂肪组织中持续稳定表达的看家基因作为内参对目的基因表达量进行校正, 得到了准确可靠的结果^[4]。

猪脂肪组织的生长发育包括脂肪细胞增殖(hyperplasia)和肥大(hypertrophy)两方面, 前者使脂肪细胞数目增多, 后者使其体积增大和重量增加^[6]。杨公社等对关中黑猪和长白猪脂肪细胞直径、表面积和体积的研究表明, 脂肪细胞在出生后逐渐增大, 关中黑猪 30 日龄时就明显大于长白猪, 且这种差异随着日龄的增长而加大^[7]。本实验结果也显示猪脂肪细胞的大小随着日龄的增长而持续性的增加, 在 90~150 日龄太湖猪的变化幅度更为明显。但在 60 日龄时脂肪细胞的体积有所下降, 这可能是由于断奶日龄不同对实验结果造成的影响(报道的实验猪

为 60 日龄断奶, 本次实验猪为 28 日龄)。而且在整个实验期内, 太湖猪的脂肪细胞体积和背膘厚都极显著高于长白猪, 这显示出肥胖型的太湖猪脂肪细胞的肥大作用和沉积脂肪的能力比瘦肉型的长白猪要强, 这种差异是由二者的遗传差异造成的。

资料显示, *IGF2* 是影响猪脂肪沉积性状的候选基因^[1]。Hausman 等^[8]通过基因微阵列和蛋白组学分析, 表明 *IGF2* 基因在胎儿和新生仔猪(5~7 天)的脂肪组织中有丰富的表达水平。Peng 等研究发现在猪肝脏、肾脏、肌肉^[9]和胰腺组织^[10]中 *IGF2* 表达的发育性变化模式有一定的差别, 但 *IGF2* mRNA 水平均在胎儿期最高, 以后会降低。表明 *IGF2* 基因表达存在组织特异性, *IGF2* 是胎儿生长因子, 参与组织早期的生理变化。本实验观察到猪脂肪组织中 *IGF2* mRNA 表达量呈时序性变化。 *IGF2* 在 30 日龄的表

达量最高,随后逐渐下降,太湖猪 90 日龄下降到最低,长白猪 120 日龄下降到最低。*IGF2* mRNA 表达的这一变化与实验中脂肪组织切片观察到的多室脂肪细胞的数量在 30 日龄之后大幅度减少的变化趋势相吻合,提示 *IGF2* 基因在早期与脂肪细胞的增殖和分化的功能有关。另外两品种 *IGF2* mRNA 表达量在达到最低之后会明显增加,可能与这一时期脂肪细胞体积和背膘厚显著高于前一时期有关。本实验还发现, *IGF2* 基因的表达在品种间存在差异,太湖猪 120 日龄时极显著高于长白猪,这可能与太湖猪体内较高的脂肪沉积有关。

IGFs 与其受体结合并发挥生物学效应受到 *IGFBP* 的生理性调节。本实验发现,脂肪组织中长白猪的 *IGF2* 和 *IGFBP3* 基因表达模式基本相同,说明 *IGFBP3* mRNA 的表达可能通过依赖 *IGF2* 的方式影响脂肪组织的发育。但太湖猪中却有明显的不同,其调节机制还不甚清楚,或许 *IGF2* 影响脂肪沉积性状是与 *IGFBP3* 及其他激素相互协调、共同作用的结果。本实验中还发现,两品种在 60~150 日龄间 *IGFBP3* mRNA 的表达量差异不显著,但在 90~150 日龄间长白猪的表达量呈上升趋势,而太湖猪却逐渐下降,在 150 日龄时长白猪极显著高于太湖猪。由于 *IGFBP3* 和 *IGF2* 结合后,就会阻止 *IGF2* 与受体结合从而不能发挥生物学效应^[3],提示 *IGFBP3* 也许通过此种方式间接地促进脂肪组织的沉积。

综上所述,本研究通过比较两品种猪不同发育时期 *IGF2* 和 *IGFBP3* 基因表达的变化,证实 *IGF2* 和 *IGFBP3* 对脂肪沉积性状有一定的影响,但 *IGF2* 和 *IGFBP3* 能否作为有效的标记基因用于脂肪性状的分子标记辅助选择,其调节脂肪沉积的机制和生理功能仍有待于进一步的研究。

参考文献(References):

- [1] LIU Gui-Lan, JIANG Si-Wen, XIONG Yuan-Zhu, ZHENG Rong, QU Yan-Chun. Association of PCR-RFLP polymorphisms of *IGF2* gene with fat deposit related traits in pig resource family. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(12): 1107–1112.
刘桂兰, 蒋思文, 熊远著, 郑嵘, 屈彦纯. *IGF2* 基因 PCR-RFLP 多态性与脂肪沉积相关性状的关联分析. 遗传学报, 2003, 30(12): 1107–1112.
- [2] Buonomo FC, Klindt J. Ontogeny of growth hormone (*GH*), insulin-like growth factors (*IGF-I* and *IGF-II*) and IGF binding protein-2 (*IGFBP-2*) in genetically lean and obese swine. *Domest Anim Endocrinol*, 1993, 10(3): 257–265. [\[DOI\]](#)
- [3] Neely EK, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors (*IGFs*) reduce IGF-binding protein-4 (*IGFBP-4*) concentration and stimulate *IGFBP-3* independently of IGF receptors in human fibroblasts and epidermal cells. *Endocrinology*, 1992, 130 (2): 985–993. [\[DOI\]](#)
- [4] Erkens T, Van Poucke M, Vandesompele J, Goossens K, Van Zeven A, Peelman LJ. Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A. *BMC Biotechnol*, 2006, 6: 41. [\[DOI\]](#)
- [5] Tilley RE, McNeil CJ, Ashworth CJ, Page KR, McArdle HJ. Altered muscle development and expression of the insulin-like growth factor system in growth retarded fetal pigs. *Domest Anim Endocrinol*, 2007, 32(3): 167–177. [\[DOI\]](#)
- [6] GAO Qin-Xue, LI Jun, LIU Hong-Lin, WANG Lin-Yun, XU Yin-Xue. Comparative study on lipogenic and lipolytic gene expression in intramuscular fat tissue between growing Erhualian and Large White pigs. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(11): 1218–1225.
高勤学, 李俊, 刘红林, 王林云, 徐银学. 二花脸猪与大约克猪生长期肌肉脂肪合成与水解基因表达特征的比较研究. 遗传学报, 2004, 31(11): 1218–1225.
- [7] YANG Gong-She, QIU Huai, LU Xing-Zhong. Cellular and histchemical comparative studies for development of adipose tissue between Guanzhong Black and Landrace pigs. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1996, 27(1): 25–31.
杨公社, 邱怀, 路兴中. 关中黑猪与长白猪细胞形成的细胞学和组织化学比较研究. 畜牧兽医学报, 1996, 27 (1): 25–31.
- [8] Hausman GJ, Poulos SP, Richardson RL, Barb CR, Andacht T, Kirk HC, Mynatt RL. Secreted proteins and genes in fetal and neonatal pig adipose tissue and stromal-vascular cells. *J Anim Sci*, 2006, 84(7): 1666–1681. [\[DOI\]](#)
- [9] Peng M, Pelletier G, Palin M-F, Veronneau S, LeBel D, Abribat T. Ontogeny of IGFs and IGFBPs mRNA levels and tissue concentrations in liver, kidney and skeletal muscle of pig. *Growth Development and Aging*, 1996, 60(3-4): 171–187.
- [10] Peng M, Abribat T, Calvo E, LeBel D, Palin MF, Bernatchez G, Morisset J, Pelletier G. Ontogeny of insulin-like growth factors (*IGF*), IGF binding proteins, IGF receptors, and growth hormone receptor mRNA levels in porcine pancreas. *J Anim Sci*, 1998, 76(4): 1178–1188.