

# 利用功能分类基因芯片研究不同品种猪脂肪中特定基因的发育性变化

李明洲<sup>1</sup>, 李学伟<sup>1</sup>, 朱砺<sup>1</sup>, 姜延志<sup>2</sup>, 唐国庆<sup>1</sup>

1 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014

2 四川农业大学生命科学与理学院, 雅安 625014

**摘要:** 利用 Oligo 功能分类基因芯片检测了瘦肉型的长白猪和脂肪型的太湖猪在 1、2、3、4 和 5 月龄间背部皮下脂肪中脂肪沉积代谢和细胞生长调控相关基因的动态表达变化。差异表达分析结果显示 1~5 月龄的品种间分别有 10、6、11、8 和 19 个基因的表达差异倍数大于 2 倍, 且长白猪有 25 个基因在不同月龄间的表达差异达显著水平( $P < 0.05$ )。其中血管生成素样蛋白 4 (*ANGPTL4*)、组织蛋白酶 K (*CTSK*)、异柠檬酸脱氢酶 2( $\text{NADP}^+$ ) (*IDH2*)、脂蛋白脂酶 (*LPL*)、苹果酸酶 1 (*ME1*)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 (*SCD*)和解耦联蛋白 2 (*UCP2*)这 7 个基因不仅在同月龄的品种间和品种内的不同月龄间差异表达, 主成分分析结果也显示其表达模式明显偏离其他基因, 提示受到了特殊的调控。聚类分析结果显示 1~5 月龄间长白猪中正调控脂肪酸代谢基因的表达量逐渐上调, 太湖猪中参与细胞生长调控基因的表达量平缓波动且变化幅度相对较小。另外, 5 个差异表达基因的荧光定量 RT-PCR 验证结果均与芯片结果呈正相关趋势。结果成功筛选出了对猪胴体和肉质性状可能具有重要影响并值得深入研究的一些候选基因, 初步揭示了相关基因的表达变化规律, 为了解生长发育过程中脂肪酸合成与水解的动态平衡过程提供了基础数据。

**关键词:** 猪, 功能分类基因芯片, 脂肪, 基因表达谱

## Developmental Expression Changes of Specific Genes in Adipose Tissue for Different Pig Breeds by Using Pathway-Focused Microarray

Mingzhou Li<sup>1</sup>, Xuewei Li<sup>1</sup>, Li Zhu<sup>1</sup>, Yanzhi Jiang<sup>2</sup>, and Guoqing Tang<sup>1</sup>

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

2 College of Biology and Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

**Abstract:** The expression changes of genes associated with adipose metabolism and regulation of cell growth in backfat tissue at five growth stages (1, 2, 3, 4 and 5 months) of Landrace (a leaner Western breed) and Taihu pigs (a fatty indigenous Chinese breed) were measured by using pathway-focused Oligo microarray. The comparative results between two pig breeds of change ratios

**Received:** August 2, 2007; **Accepted:** September 14, 2007

**Supported by:** Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University of Chinese Ministry of Education (No. IRT0555-6), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (No. 20060626003), Major Project of the Natural Scientific Research Fund of Sichuan Province (No. 2006D004) and the Youth Fund of Sichuan Province (No. 2006B004).

**Corresponding author:** Xuewei Li. Tel: +86-835-2886000; E-mail: lixuewei9125@126.com

教育部长江学者和创新团队发展计划项目(No. IRT0555-6)、教育部高等学校博士学科点专项基金项目(No. 20060626003)、四川省教育厅自然科学重点科研项目(No. 2006D004)和四川省教育厅青年基金项目(No. 2006B004)资助。

showed that the fold changes of 10, 6, 11, 8 and 19 genes were over two times at same month from 1 to 5 months respectively. Variance analysis (ANOVA) revealed that 25 genes in Landrace pigs showed significantly altered in expression among five growth stages ( $P < 0.05$ ). Principal components analysis (PCA) revealed that angiopoietin-like 4 (*ANGPTL4*), cathepsin K (*CTSK*), isocitrate dehydrogenase 2( $\text{NADP}^+$ ) (*IDH2*), lipoprotein lipase (*LPL*), malic enzyme 1 (*ME1*), stearoyl-CoA desaturase (*SCD*) and uncoupling protein 2 (*UCP2*) displayed distinctive expression patterns from other genes, which suggested that these genes may be subject to special regulation during the period from 1 to 5 months. K-means clustering analysis revealed that genes in Landrace pigs which showed up-regulation were mainly related to the positive regulation of fatty acid metabolism and genes in Taihu pigs which showed slight fluctuation were mainly related to the regulation of cell growth. Quantitative real-time RT-PCR was used to verify the microarray data for five modulated genes, and a good positive correlation between the two measures of expression was observed for both two pig breeds at different growth stages. These results highlight some possible candidate genes for porcine carcass and meat quality traits, reveal the expressional disciplinarian of correlative genes and provide some data on which to base further study of the dynamic balance process for fatty acid biogynthesis and hydrolyzation.

**Keywords:** pig, pathway-focused microarray, adipose tissue, gene expression profiling

猪作为沉积脂肪能力最强的动物之一,不仅是人类重要的肉食品来源,同时也是医学和生物学研究中广泛采用的模式动物。探讨在保证较高生长速度和瘦肉率的前提下维持一个适当的体脂和肌肉脂肪(Intramuscular fat, IMF)水平已成为进入 21 世纪以来猪遗传改良的研究方向和最新热点<sup>[1]</sup>。虽然目前通过候选基因法和基因组扫描法已鉴定出不少与猪背膘厚、IMF 含量和板油重等脂肪相关性状的基因或连锁标记,但由于该性状属于典型的数量性状,受控基因较多,单个基因的效应不足以明显改变其宏观表型,故大多数针对脂肪性状的标记辅助选择(Marker assisted selection, MAS)迄今尚未见到经得起反复验证的报道。实际上,动物活体内脂肪酸合成与水解的动态平衡过程决定着动物个体的体脂和 IMF 含量,然而目前脂肪细胞分化生长过程中很多转录调控因子的功能尚待阐明,相关基因互作的分子机理也还缺乏足够的认识<sup>[2,3]</sup>。

本研究选择在体脂和 IMF 含量上都存在明显表型差异的长白猪和太湖猪为对照动物模型,采用 Oligo 基因芯片技术研究背部皮下脂肪中脂肪沉积代谢和细胞生长调控相关基因在不同生长发育阶段的差异表达规律,以筛选影响猪胴体和肉质性状的关键特征基因并揭示相关基因的差异表达模式。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验群体

分别选用长白猪和太湖猪作为瘦肉型和脂肪型猪种的代表,设置 5 个等时间点进程(1、2、3、4 和 5 月龄),随机分配 4 头(2, 2)相同品种的全同胞

仔猪到每个时间点内,共计 40 头。在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 RNAlater(Qiagen 公司)中,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2 功能分类芯片的设计制作

结合 Onto-Design 工具<sup>[4]</sup>提供的 Gene Ontology (GO)注解信息和 GoPubMed 工具<sup>[5]</sup>查阅的文献资料选择 140 个与猪脂肪沉积代谢和细胞生长调控密切相关的基因以及阳性和阴性对照各 6 个,合计 152 个 70 mer 长的探针序列选自“Pig Genome Oligo Set and Extension V1.0”探针库(<http://omad.operon.com/pig/query.php>), 5'端氨基修饰的探针购自德国 Qiagen-Operon 公司。采用 OmniGrid 100(Gene-Machine 公司)点样仪将稀释好的探针点制在 GAPS II Slides(Corning 公司)基片上,制成  $4 \times 164$  点的功能分类芯片,后处理参照其说明。该芯片的探针序列、基因注解和矩阵信息均已提交到 NCBI 的 GEO 数据库(No. GPL5171)。

### 1.3 RNA 的提取、纯化和质检

采用 RNeasy Lipid Tissue Mini 试剂盒(Qiagen 公司)提取和纯化脂肪组织中的总 RNA, 1%琼脂糖凝胶电泳质检合格后,采用 Agilent 2100 分析仪进一步测定浓度并等量混合以构建代表某个品种和月龄的 RNA 池。

### 1.4 线性扩增和荧光标记

采用 Low RNA Input Linear Amplification Plus-two Color 试剂盒(Agilent 公司)分别进行 Cy3 和 Cy5 通道杂交样本的制备。

### 1.5 芯片杂交的试验设计

将直接环形和平行配对设计方案相结合<sup>[6]</sup>, 以

比较品种间相同月龄和品种内不同月龄间基因的表达差异, 合计使用 15 张芯片(图 1)。

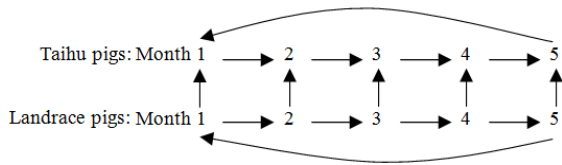


图 1 时间进程和品种比较的试验设计

Fig. 1 Modified loop microarray experimental designs for temporal and breed studies

The arrow from tail to head indicates Cy5 to Cy3 dye. Temporal gene expression changes within breeds were analyzed with microarrays using a direct loop design that included two independent loops, for a total of five arrays per loop. Breed changes in gene expression at same month were analyzed with microarrays using a matched-pair design that included five arrays.

### 1.6 芯片的杂交、洗涤及扫描

采用 Pronto Hybridization 试剂盒(Corning 公司)进行芯片的杂交和洗涤, 离心干燥后, 利用

ScanArray 4000 扫描仪(Perkin-Elmer 公司)获取荧光图像, 并通过 Imagene 7.5 软件(Bio-Discovery 公司)将图像转换为信号强度值。

### 1.7 荧光定量 RT-PCR 验证

选取 5 个芯片检测存在明显表达变化的基因和 3 个作为内参的看家基因, 采用 SYBR Green I 法进行荧光定量 RT-PCR 实验以验证芯片结果的可靠性<sup>[7]</sup>。引物由 Primer3 在线程序(<http://frodo.wi.mit.edu/>)根据芯片探针相应的核酸序列设计(表 1)。cDNA 制备采用 SYBR Prime Script RT-PCR 试剂盒(Takara 公司), 标准曲线由 PCR 产物梯度稀释后建立, 每个样本重复测定 3 次, 实时 PCR 分析由 IQ5 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)完成。内参基因表达稳定性的评估、标准化因子和目的基因相对表达量的计算由 geNorm 软件<sup>[8]</sup>完成。

表 1 荧光定量 RT-PCR 验证的基因和引物相关信息<sup>a</sup>

Table 1 Information on the primers used for quantitative real-time PCR<sup>a</sup>

Gene symbol	Primer sequence(5'→3')	Amplicon length/bp	Tm/°C	GenBank Accession No.
<i>ACTB</i>	TCTGGCACCACCTTCT	114	62	DQ178122
	TGATCTGGGTCATCTTCTCAC			
<i>TBP</i>	GATGGACGTTTCGGTTTAGG	124	60	DQ178129
	AGCAGCACAGTACGAGCAA			
<i>TOP2B</i>	AACTGGATGATGCTAATGATGCT	137	60	AF222921
	TGGAAAACTCCGTATCTGTCTC			
<i>IGF-II</i>	ACACCCTCCAGTTTGTCTGCG	108	61	X56094
	CAGCTACGGAAGCAGCACTCT			
<i>IGFBP3</i>	CCAGCGCTACAAGGTCGACTAC	73	61	AF085482
	TCTCGCGCTTGGACTCAGA			
<i>SCD</i>	AAGGAACCTAGAAGGCTGCTC	211	61	AY487829
	TGTAGAGCAGCAGCCATCAC			
<i>ME1</i>	TGAAGAACCTAGAAGCCATT	242	60	X93016
	AAGAGTGACCGGATCAAAAAG			
<i>UCP3</i>	ACGATGGATGCCTACAGGAC	200	61	DQ530368
	TCCGAAGGCAGAGACAAAAGT			

a: *ACTB* ( $\beta$ -actin), *TBP* (TATA box binding protein) and *TOP2B* (topoisomerase II  $\beta$ ) are the internal control genes<sup>[9]</sup>.

### 1.8 数据分析

原始信号强度值在扣除背景和非特异性杂交信号值后, 采用 Composite Loess 和 Print-tip Loess 方法<sup>[10]</sup>进行片内标准化并采用 Pooled Correlation 方法<sup>[11]</sup>将 4 个重复数据合并, 以上分析由 Webarray 在线分析程序<sup>[12]</sup> (<http://bioinformatics.skcc.org/webarray>)完

成。以在 70%的芯片中被检测为阈值筛选共同表达的基因, 得到在 15 张芯片中有 95 个基因被同时检测, 仍存在的缺失值用 5-Nearest Neighbour 方法估计<sup>[13]</sup>。本研究得到的所有扫描图像、原始数据、标准化步骤和操作流程均已提交到 NCBI 的 GEO 数据库(No. GSE7856)。

以表达差异倍数大于 2 倍作为筛选同月龄品种间差异表达基因的标准。品种内时间效应的方差分析采用 J/Maanova 软件包, 建立的基因特异性混合效应模型为  $\log_2(Y_{ijklm}) = m + A_i + D_j + T_k + S_l + \varepsilon_{ijklm}$ , 其中  $Y_{ijklm}$  代表第  $i$  张芯片, 第  $j$  种染料, 第  $k$  个月龄, 第  $l$  个 RNA 池, 第  $m$  个基因的荧光强度值;  $m$  代表总体均值;  $A_i$  代表第  $i$  张芯片的效应;  $D_j$  代表第  $j$  种染料的效应;  $T_k$  代表第  $k$  个月龄的效应;  $S_l$  代表第  $l$  个 RNA 池的效应(随机效应),  $\varepsilon_{ijklm}$  代表随机误差<sup>[14]</sup>。

采用 Genesis 软件<sup>[15]</sup>过滤掉两品种内任意月龄间的表达差异在均在 2 倍以下的 2 个基因后, 以协方差为相似性度量指标, 将 5 个时间点作为变量进行品种内的主成分分析; 以 Euclidian 距离为相似性度量指标进行品种内的 K-means 聚类, 因所有基因按照功能大致可分为正或负调控细胞生长增殖, 正或负调控脂肪沉积和其他, 故将预期聚类数确定为 5。

采用 SAS 9.1.3 软件进行单样本 Kolmogorov-Smirnov (Normal) 分析以检验数据分布型。在 5 个基因相对表达量的荧光定量 RT-PCR 和基因芯片检测结果均服从正态分布的基础上, 对两品种 1~5 月龄间同一基因相对表达量的两种不同实验方法检测结果进行 Pearson 相关检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 差异表达分析

品种间表达差异倍数在 2 倍以上的基因在 1~5 月龄间分别有 10、6、11、8 和 19 个, 其中差异倍数在 4 倍以上的基因分别有 3、3、2、3 和 5 个(表 2)。

品种内时间效应的分析结果显示长白猪有 25 个基因(表 3), 而太湖猪没有基因在月龄间的表达差异达显著水平( $P < 0.05$ )。

### 2.2 主成分分析

品种内的主成分分析表明长白猪和太湖猪第 1 主成分的贡献率分别为 58.20% 和 53.43%, 第二主成分的贡献率分别为 15.54% 和 20.59%, 两品种前 2 个主成分的累计贡献率已分别达到 73.74% 和 74.02% (图 2)。

### 2.3 聚类分析

K-means 聚类结果显示长白猪第 1~5 类中分别包含 11、28、17、19 和 18 个基因, 其表达模式分别为逐渐下调, 逐渐上调, 先降后升, 轻微波动以及略有降低后趋于平缓; 太湖猪的第 1~5 类中分别包含 15、12、25、18 和 23 个基因, 其表达模式分别为波动中略有下降, 剧烈起伏波动, 平缓下降后平缓上升, 略有升高后趋于平稳以及波动中略有上升(图 3)。

表2 同月龄的长白猪和太湖猪间差异表达的基因(差异倍数>4倍)<sup>a</sup>

Table 2 List of differential expression genes between Landrace and Taihu pigs at the same month(fold change>4)<sup>a</sup>

ID	Gene name	Gene symbol	Differential expression (Landrace versus Taihu pigs) <sup>b</sup>				
			Mon1	Mon2	Mon3	Mon4	Mon5
1	Acyl-CoA dehydrogenase, long chain	<i>ACADL</i>	0.94	0.36	1.27	<b>5.55</b>	1.40
2	Angiopoietin-like 4	<i>ANGPTL4</i>	1.67	0.80	1.15	0.70	<b>6.25</b>
3	Cathepsin K	<i>CTSK</i>	<b>0.17</b>	3.73	1.24	2.92	1.44
4	Isocitrate dehydrogenase 2(NADP <sup>+</sup> )	<i>IDH2</i>	2.37	0.67	<b>7.18</b>	0.49	<b>0.24</b>
5	Insulin-like growth factor binding protein 2	<i>IGFBP2</i>	0.38	<b>0.10</b>	0.99	0.89	<b>0.16</b>
6	Hormone-sensitive lipase	<i>LIPE</i>	0.44	<b>0.22</b>	0.69	1.00	2.01
7	Lipoprotein lipase	<i>LPL</i>	<b>0.24</b>	1.19	0.28	1.56	<b>7.66</b>
8	Malic enzyme 1,NADP <sup>(+)</sup> -dependent	<i>ME1</i>	1.08	1.37	0.55	<b>10.93</b>	1.20
9	Peroxisome proliferative activated receptor $\gamma$	<i>PPARG</i>	0.65	1.64	0.72	1.68	<b>4.39</b>
10	Stearoyl-CoA desaturase	<i>SCD</i>	1.86	<b>6.09</b>	0.56	2.61	0.85
11	Uncoupling protein 2	<i>UCP2</i>	3.80	0.45	<b>4.29</b>	<b>5.65</b>	1.52
12	Uncoupling protein 3	<i>UCP3</i>	<b>0.23</b>	0.62	0.45	0.66	1.10

a. All genes showed above were found to have the fold change was greater than four times at least on one month and their fold change values are marked in bold.

b. The differential expression represents the change ratios of the gene expression levels of Landrace versus Taihu pigs and without logarithmic transformed.

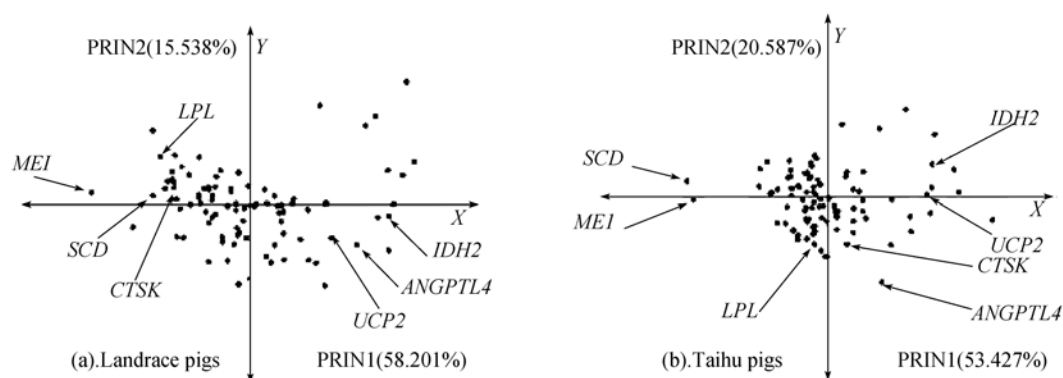
表3 长白猪在1~5月龄间差异表达显著的基因( $P<0.05$ )<sup>a</sup>  
**Table 3 List of differential expression genes of Landrace pigs among 1 to 5 months ( $P<0.05$ )<sup>a</sup>**

ID	Gene name	Gene symbol	Differential expression <sup>b</sup>				P Value <sup>c</sup>
			Mon2/1	Mon3/1	Mon4/1	Mon5/1	
1	See table 2	<i>ANGPTL4</i>	0.21	0.19	0.07	0.22	0.016
2	See table 2	<i>CTSK</i>	3.37	2.04	3.39	5.33	0.043
3	Dehydrogenase/reductase(SDR family) 3	<i>DHRS3</i>	3.84	1.92	4.92	5.80	0.031
4	Enoyl CoA hydratase, short chain, 1	<i>ECHS1</i>	2.49	4.53	3.37	3.23	0.037
5	Enolase 3	<i>ENO3</i>	0.52	0.22	0.10	0.10	0.037
6	Fatty acid binding protein 3,muscle and heart	<i>FABP3</i>	1.48	1.87	2.74	2.88	0.037
7	See table 2	<i>IDH2</i>	0.24	0.19	0.10	0.07	0.026
8	Insulin-like growth factor binding protein 3	<i>IGFBP3</i>	0.33	0.13	0.27	0.38	0.043
9	Lactate dehydrogenase A	<i>LDHA</i>	3.29	1.09	0.37	0.40	0.047
10	See table 2	<i>LPL</i>	7.08	2.72	4.72	7.78	0.035
11	Myoglobin	<i>MB</i>	0.37	0.13	0.13	0.07	0.036
12	See table 2	<i>MEI</i>	2.11	20.46	28.05	7.15	0.026
13	Myosin, heavy polypeptide 2b	<i>MYH2B</i>	1.28	0.63	0.16	0.15	0.037
14	Myosin, heavy polypeptide 7	<i>MYH7</i>	0.25	0.12	0.25	0.06	0.026
15	Myosin, light polypeptide 1	<i>MYL1</i>	1.92	0.59	0.12	0.07	0.012
16	Leptin	<i>OB</i>	3.34	3.18	3.78	4.51	0.043
17	Propionyl CoA carboxylase, polypeptide	<i>PCCB</i>	4.59	3.93	3.89	4.60	0.031
18	Phosphoglucomutase 1	<i>PGM1</i>	0.60	0.34	0.30	0.26	0.047
19	Ryanodine receptor 1	<i>RYR1</i>	0.45	0.19	0.13	0.05	0.016
20	Sterol-C4-methyl oxidase-like	<i>SC4MOL</i>	8.74	5.61	9.48	5.73	0.039
21	See table 2	<i>SCD</i>	1.90	4.46	8.40	3.67	0.033
22	Titin-cap (telethonin)	<i>TCAP</i>	0.41	0.27	0.08	0.04	0.012
23	Troponin I type 1	<i>TNNI1</i>	0.17	0.08	0.23	0.05	0.026
24	Titin	<i>TTN</i>	1.14	0.68	0.54	0.05	0.016
25	See table 2	<i>UCP2</i>	0.24	0.24	0.33	0.17	0.043

a. All genes showed above were found to have  $P<0.05$  in mixed linear model analysis at 1 to 5 months

b. The differential expression represents the change ratios of gene expression levels versus the level at 1 month and without logarithmic transformed

c.  $P$  value is the adjusted permutation  $P$  value after false discover rate (FDR) control which obtained from empirical Bayes test statistic, the iterative number was 10 000<sup>[16]</sup>



**Fig. 2 Two-dimensional map of principal component analysis (PCA) used the time-series data of Landrace (a) and Taihu (b) pigs**

All genes plotted with respect to first and second principal components. Each black point represents a gene. The first two components of two pig breeds both accounted for over 70% of the variance which allowed most of the information to be visualized in rotated and dimensionally reduced ichnography

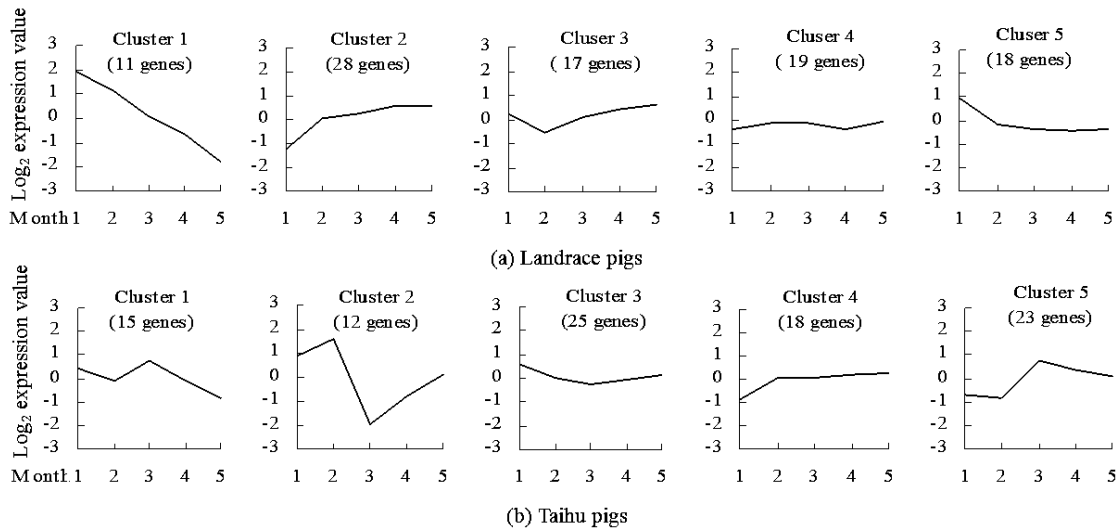


图3 长白猪和太湖猪相关基因表达谱的 K-means 聚类

Fig. 3 K-means clustering results of gene expression profiling for Landrace (a) and Taihu (b) pigs by using Euclidian distance and five preconcerted clusters

A total of 93 genes of two pig breeds were clustered based on their expression profiling among five growth stages. X-axes correspond to a successive time point. Y-axes denotes the logarithmic transformed expression value at each time point

#### 2.4 荧光定量 RT-PCR 验证

两种实验方法对 5 个基因表达量的检测结果均为正相关, 相关系数平均为  $0.874 \pm 0.071$ , 相关性以

长白猪的 *IGFBP3* 基因为最高 ( $r=0.986$ ,  $P<0.01$ ,  $n=5$ ), 而太湖猪的 *SCD* 基因为最低 ( $r=0.768$ ,  $P>0.05$ ,  $n=5$ ) (表 4)。

表4 基因芯片和荧光定量RT-PCR结果的相关分析

Table 4 Pearson correlation analysis of selected gene expression changes between microarray and quantitative real time RT-PCR

Gene symbol	Breed	r value	P value
<i>IGF-II</i>	Landrace pigs	0.975	0.005
	Taihu pigs	0.875	0.052
<i>IGFBP3</i>	Landrace pigs	0.986	0.002
	Taihu pigs	0.894	0.041
<i>SCD</i>	Landrace pigs	0.781	0.119
	Taihu pigs	0.768	0.130
<i>ME1</i>	Landrace pigs	0.851	0.068
	Taihu pigs	0.874	0.053
<i>UCP3</i>	Landrace pigs	0.838	0.076
	Taihu pigs	0.902	0.036

Pearson correlation test was executed based on the expression data of five selected genes were normally distributed (One-Sample Kolmogorov-Smirnov test,  $P>0.05$ ).

### 3 讨论

两猪种相同月龄间差异表达的基因主要集中在脂肪酸合成和代谢过程中起着重要作用的酶和调节蛋白(表 2), 如参与脂肪酸  $\beta$  氧化和丙酸酯代谢的酰基辅酶 A 脱氢酶(长链) (*ACADL*), 其缺陷可引发超重和肥胖症状<sup>[17]</sup>; 胰岛素样生长因子结合蛋白 2 (*IGFBP2*)可促进不同类型细胞的增殖和分化, 加速动物生长和发育<sup>[18]</sup>; 激素敏感脂肪酶 (*LIPE*)是甘油三酯(triglyceride, TAG)水解的限速酶, 而 TAG 合成和分解的状态及速率均会影响体内脂肪的积累<sup>[19]</sup>;

过氧化物酶体增殖剂激活受体 (*PPARG*)是脂肪生成的必需转录因子, 具有促进脂肪生成作用<sup>[20]</sup>; 解藕联蛋白 3 (*UCP3*)可解耦联呼吸链与三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)的产生过程, 使能量以产热形式散发<sup>[21]</sup>。提示两猪种在脂肪沉积能力上的明显差别可能与以上基因的差异表达规律密切相关。

长白猪有 25 个基因而太湖猪没有基因在不同月龄间的表达差异达显著水平 ( $P<0.05$ ) (表 3)。这与长白猪生长发育速度较太湖猪快, 脂肪的各项生理

生化代谢较为活跃的性状特点相关。值得注意的是, 血管生成素样蛋白 4 (*ANGPTL4*)、组织蛋白酶 K (*CTSK*)、异柠檬酸脱氢酶 2( $\text{NADP}^+$ ) (*IDH2*)、脂蛋白脂酶 (*LPL*)、苹果酸酶 1 (*ME1*)、硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 (*SCD*)和解耦联蛋白 2 (*UCP2*)这 7 个基因的表达变化不仅在同月龄的品种间差异明显(差异倍数>4 倍), 在长白猪的不同月龄间也达显著水平 ( $P<0.05$ ), 且主成分分析的 2 维图显示这 7 个基因的表达模式明显偏离品种内的其他基因(图 2)。表明在 1~5 月龄这个重要的生长发育阶段中这些基因受到了重要的调控, 不仅表达水平依据各自特异的生理生化功能表现出明显的起伏变化, 其表达模式也较为特殊。其中, *ANGPTL4* 通过参与正调控脂代谢和负调控 *LPL* 等过程而直接影响脂肪沉积的多项重要通路, 已成为目前医学领域中肥胖相关疾病的研究热点<sup>[22]</sup>, 但 *ANGPTL4* 对猪胴体和肉质性状的影响还未见报道, 建议可给予更多关注。*LPL* 主要催化乳糜微粒和极低密度脂蛋白中的 TAG 水解, 其表达水平高低直接决定脂肪与其他组织器官脂质底物配额的相对量, 并间接决定从食物中摄入脂类的代谢方向<sup>[23]</sup>。Spurlock 等<sup>[24]</sup>研究发现禁食 96 h 后猪脂肪和背最长肌中 *LPL* 基因的表达水平分别极显著降低到禁食前的 20%和 37% ( $P<0.01$ )。*ME1* 在催化三羧酸循环时产生的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)是脂肪酸合成时主要的能量来源<sup>[25]</sup>。Vidal 等<sup>[26]</sup>研究发现长白猪 *ME1* 基因的 3 个 SNP 多态与 171 d 时的背膘厚和肌肉 pH 值存在显著相关 ( $P<0.05$ )。Gao 等<sup>[27]</sup>研究发现二花脸猪在 20~60 kg 这个生长阶段中冈上肌和半膜肌中的 *LPL* 和 *ME1* 基因的表达水平变化与 IMF 的沉积趋势相吻合。*SCD* 作为合成单不饱和脂肪酸的限速酶, 在脂肪酸生物合成中起着中心调节作用<sup>[28]</sup>。Doran 等<sup>[29]</sup>发现低蛋白日粮在特异性提高 IMF 含量的同时, *SCD* 基因的表达量与 IMF 含量间存在显著正相关 ( $P<0.05$ ), 并因此认为 *SCD* 的作用机制在 IMF 和皮下脂肪中存在差异。*UCP2* 作为解耦联蛋白家族的一员, 主要参与能量代谢和脂代谢调节, 对机体能量平衡涉及的体重(肥胖)、静止代谢率和食物(饲料)转化率等性状具有显著的效应, 特别是其分布的广泛性和轻微解耦联作用均明显不同于该家族其他成员, 提示其作

用模式可能更为复杂<sup>[30]</sup>。鉴于以上基因功能的重要性, 差异表达的特点以及相关研究的提示, 建议可作为猪胴体和肉质性状的重要候选基因进行深入研究。

聚类结果显示长白猪的第 2 类中包含 28 个基因, 太湖猪的第 3 和 5 类中分别包含 25 和 23 个基因, 分别为各自品种内基因数目较多的分类(图 3), 其表达变化趋势可作为相关基因主要的表达模式。通过对各类中基因的具体生物学功能进行分析, 发现长白猪第 2 类中的基因主要参与正调控脂肪酸代谢, 包括烯酰辅酶 A 水合酶 1 (*ECHI*)、瘦蛋白 (*LEP*)、丙酰辅酶 A 羧化酶 肽 (*PCCB*)、脂肪连接蛋白受体 2 (*ADIPOR2*)、十二氯烷辅酶 A  $\delta$  异构酶 (*DCI*)、脱氢酶/还原酶 (SDR 家族)成员 3 (*DHRS3*)和固醇 C4 甲基氧化酶样 (*SC4MOL*)等。其逐渐上调的表达模式表明在 1~5 月龄间长白猪背部皮下脂肪中脂肪的代谢消耗过程较为活跃, 这与长白猪脂肪沉积能力较低, 背膘较薄, 胴体瘦肉率高的种质特性相一致。太湖猪第 3 类中的基因主要与调控细胞生长增殖相关, 其中磷脂酸性磷酸酶 2A (*PPAP2A*)、组蛋白脱乙酰酶 5 (*HDAC5*)、沉默调节蛋白 (*SIRT2*)和铁蛋白重肽 1 (*FTH1*)等具有负调控细胞增殖的功能, 而胰岛素样生长因子 2 (*IGF2*)和生长激素受体 (*GHR*)等具有促生长作用, 其基因表达量呈现出平缓下降后又平缓上升的趋势, 但变化幅度相对较小。这可能与太湖猪生长发育速度较为缓慢, 与脂肪细胞分化生长相关的代谢过程较为平缓相关。而太湖猪第 5 类中的基因由于涉及功能较多且作用类型存在较大差异, 未能分析出具有相似功能且占优势数量的基因集合, 当然这也与本试验所用芯片包含的基因数目较少有关。此外, 荧光定量 RT-PCR 验证表明本次芯片试验结果基本能够正确反映被检测基因的表达变化规律<sup>[31]</sup>。

本试验初步筛选出了在生长发育过程中受到重要调控, 对于猪胴体和肉质性状可能具有重要影响、值得深入研究的一些基因, 为后续更加深入可靠的研究提供了有价值的参考方向。

## REFERENCES

- [1] Plastow GS, Carrion D, Gil M, et al. Quality pork genes and meat production. *Meat Sci*, 2005, **70**(3): 409-421.

- [2] Ailhaud G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol*, 2006, **329**(8): 570–577.
- [3] Wang HB, Wang QG, LI H. cDNA microarray on differentially expressed genes of adipose tissue in two breeds chicken. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(6): 979–982.  
王洪宝, 王启贵, 李辉. 利用基因芯片技术研究两品种鸡脂肪组织差异表达基因. *生物工程学报*, 2005, **21**(6): 979–982.
- [4] Khatri P, Bhavsar P, Bawa G, *et al.* Onto-Tools: an ensemble of web-accessible, ontology-based tools for the functional design and interpretation of high-throughput gene expression experiments. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32** (Web Server issue): W449–W456.
- [5] Doms A, Schroeder M. GoPubMed: exploring PubMed with the Gene Ontology. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33** (Web Server issue): W783–W786.
- [6] Yang YH, Speed T. Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat Rev Genet*, 2002, **3**(8): 579–588.
- [7] Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, *et al.* Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat Genet*, 2002, **32** (Suppl): 509–514.
- [8] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 2002, **3**(7): 34–45.
- [9] Erkens T, Van Poucke M, Vandesompele J, *et al.* 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**: 41–48.
- [10] Yang YH, Dudoit S, Luu P, *et al.* Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(4): e15.
- [11] Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicates spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics*, 2005, **21**(9): 2067–2075.
- [12] Xia X, McClelland M, Wang Y. WebArray: an online platform for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics*, 2005, **6**: 306–311.
- [13] Troyanskaya O, Cantor M, Sherlock G, *et al.* Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics*, 2001, **17**(6): 520–525.
- [14] Wolfinger RD, Gibson G, Wolfinger ED, *et al.* Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *J Comput Biol*, 2001, **8**(6): 625–637.
- [15] Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*, 2002, **18**(1): 207–208.
- [16] Yang H, Churchill G. Estimating *P*-values in small microarray experiments. *Bioinformatics*, 2007, **23**(1): 38–43.
- [17] Gillingham MB, Purnell JQ, Jordan J, *et al.* Effects of higher dietary protein intake on energy balance and metabolic control in children with long-chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase (*LCHAD*) or trifunctional protein (*TFP*) deficiency. *Mol Genet Metab*, 2007, **90**(1): 64–69.
- [18] Ricort JM. Insulin-like growth factor binding protein (*IGFBP*) signalling. *Growth Horm IGF Res*, 2004, **14**(4): 277–286.
- [19] Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase: new roles for an old enzyme. *Biochem J*, 2004, **379**(1): 11–22.
- [20] Sharma AM, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue—understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, **92**(2): 386–395.
- [21] Bézaire V, Seifert EL, Harper ME. Uncoupling protein-3: clues in an ongoing mitochondrial mystery. *FASEB J*, 2007, **21**(2): 312–324.
- [22] Li C. Genetics and regulation of angiopoietin-like proteins 3 and 4. *Curr Opin Lipidol*, 2006, **17**(2): 152–156.
- [23] Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med*, 2002, **80**(12): 753–769.
- [24] Spurlock ME, Ji SQ, Godat RL, *et al.* Changes in the expression of uncoupling proteins and lipases in porcine adipose tissue and skeletal muscle during feed deprivation. *J Nutr Biochem*, 2001, **12**(2): 81–87.
- [25] Hsu WC, Hung HC, Tong L, *et al.* Dual functional roles of ATP in the human mitochondrial malic enzyme. *Biochemistry*, 2004, **43**(23): 7382–7390.
- [26] Vidal O, Varona L, Oliver MA, *et al.* Malic enzyme 1 genotype is associated with backfat thickness and meat quality traits in pigs. *Anim Genet*, 2006, **37**(1): 28–32.
- [27] Gao QX, Li J, Liu HL, *et al.* 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, 等. 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比较研究. *遗传学报*, 2004, **31**(11): 1218–1225.
- [28] Sampath H, Miyazaki M, Dobrzyn A, *et al.* Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J Biol Chem*, 2007, **282**(4): 2483–2493.
- [29] Doran O, Moule SK, Teye GA, *et al.* A reduced protein diet induces stearoyl-CoA desaturase protein expression in pig muscle but not in subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formation. *Br J Nutr*, 2006, **95**(3): 609–617.
- [30] Brand MD, Esteves TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins *UCP2* and *UCP3*. *Cell Metab*, 2005, **2**(2): 85–93.
- [31] Qin LX, Beyer RP, Hudson FN, *et al.* Evaluation of methods for oligonucleotide array data via quantitative real-time PCR. *BMC Bioinformatics*, 2006, **7**: 23–34.