

# 瘦肉型与脂肪型猪血清Leptin的比较检测<sup>\*</sup>

龙火生, 孙超, 庞卫军, 杨公社, 孙世铎

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 为了研究我国脂肪型猪与引入的瘦肉型猪ob基因的蛋白表达差异, 用Western杂交比较检测了内江猪、八眉猪、长白猪和杜洛克猪的血清Leptin水平。结果发现, 脂肪型猪体内存在Leptin抵抗现象, 血清Leptin水平比瘦肉型猪高3.23倍; 同时发现一个大小约为33 ku的蛋白与Leptin有一定的结构同源性, 该蛋白也可能是Leptin的二聚体; 另外, 脂肪型猪ob基因的表达高于瘦肉型猪, 二者肥胖程度和瘦肉率性状的差异可能还存在与ob基因表达有关的机制。

**[关键词]** 瘦肉型猪; 脂肪型猪; Leptin; SDS-PAGE; Western杂交

**[中图分类号]** S828.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2004)06-0005-04

通过动物模型及对人的研究已找到与肥胖症相关的6个基因, ob基因(ob gene)为其中之一。Leptin(源于希腊语leptos, 意为瘦的, 译作瘦素、瘦蛋白、消脂素等)是ob基因在皮下脂肪组织中特异表达的一种蛋白质, 在分泌进入血液循环的过程中自我剪接, 形成146个氨基酸的功能蛋白, 分子质量为16.7 ku<sup>[1]</sup>。国内外对猪ob基因及其产物已经进行了许多相关研究, 目前的研究表明, Leptin具有广泛的生物学作用, 主要功能是通过下丘脑抑制脂肪的蓄积, 维持脂肪细胞的正常大小, 其机制为Leptin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, 从而抑制体重的增加<sup>[2]</sup>; 另一方面, Leptin作为脂肪—胰岛内分泌轴的一部分, 还参与胰岛素分泌的调节。近年还发现, Leptin可以恢复雌性ob/ob鼠的生育力<sup>[3]</sup>。最新的研究表明, Leptin还有引导和提高血管通透性的作用, 同时还协同成纤维细胞生长因子2(FGF-2)和血管内皮生长因子(VEGF)共同刺激和促进组织中血管的生成<sup>[4]</sup>。

我国拥有丰富的猪种资源, 其中不乏适应力强且肉质鲜美的脂肪型猪, 它们在我国早期的猪育种中发挥了重要的作用。血清Leptin水平的高低是机体能量平衡状况的一种反映。自发现ob基因以来, 针对ob基因的表达, 许多研究主要集中于阐明ob基因表达时, Leptin表达的血清水平及脂肪组织中

ob基因mRNA的表达水平。国外已有Ram say等<sup>[5]</sup>用Western杂交方法研究了一些杂种猪ob基因的cDNA序列以及Leptin的表达。另外, 胡晓湘<sup>[6]</sup>、戴茹娟等<sup>[7]</sup>分别对我国的梅山猪、二花脸猪、香猪和民猪的ob基因部分序列进行了测定和多态性研究, 但对我国猪种血清Leptin的研究至今尚未见报道。

本研究利用我国脂肪型地方猪种——内江猪和八眉猪, 以及引入的瘦肉型品种——杜洛克和长白猪为试验动物, 比较研究了其血清中Leptin水平与其肥胖的关系, 以求澄清猪血清Leptin含量与猪种不同肥胖程度的相互关系, 为促进动物育种、保健和后续利用猪ob基因提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用长白猪和杜洛克猪血清样品各10份, 采自陕西省原种猪场和兰州猪场, 10份内江猪血清采自四川省内江市内江猪原种猪场, 7份八眉猪血清采自青海省湟中县八眉猪保种场。所有试验猪均为母猪, 体重 $(97.1 \pm 7.4)$  kg, 每日3次饲喂全价配合饲料, 自由饮水。在猪中午进食后2 h内通过耳静脉或前腔静脉采血10~15 mL, 4℃静置过夜析出血清, 并于-20℃保存。

用于Western杂交的标准重组猪Leptin蛋白

<sup>\*</sup> [收稿日期] 2003-05-29

[基金项目] 教育部“春晖计划”资助项目; 西北农林科技大学重点科研项目

[作者简介] 龙火生(1971-), 男, 四川隆昌人, 在读博士, 主要从事动物分子遗传与育种研究。E-mail: longhsh@163.com

[通讯作者] 杨公社(1959-), 男, 陕西富平人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物肉类学、遗传学和育种学研究。E-mail: gongshe-yang@163.com

和第一抗体——通用生物素化兔抗人Leptin多克隆抗体(CRLQGSLQDMLWQLDLSPG)均购自Promega公司,稀释为20 ng/mL后备用。

## 1.2 试验方法

在汪家政等<sup>[8]</sup>提出的蛋白质电泳和Western杂交方法的基础上,参照Ram say的研究进行了一些改进,对4个猪种血清Leptin蛋白进行Western杂交的比较检测<sup>[9]</sup>。

血清变性后加入电泳缓冲液,同时在2块相同的胶板和同一个电泳仪上进行相同的SDS-PAGE电泳,各样品均上样50  $\mu$ L。电泳之后将一块胶染色观察,另一块胶在Y-4ZY型半干式转移电泳槽中将蛋白质条带转移并“印迹”到硝酸纤维素膜上,经封闭、杂交、底物显色后干燥,将膜扫描成位图文件,用Bands can条带定量软件分析各条带间的相对值。

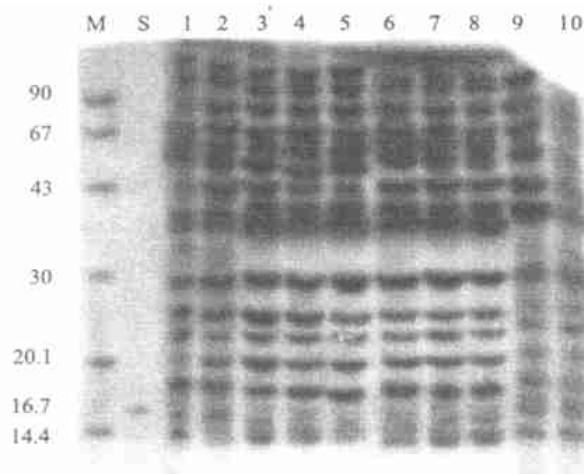


图1 内江猪血清的SDS-PAGE电泳结果

M. 分子量标准; S Leptin 标准; 1~10 内江猪的10个样本

Fig 1 SDS-PAGE result of Neijing pig sera

M. Molecular weight standard; S Standard Leptin;

1- 10 Represents the 10 samples of N ijiang pig

由图2的Western结果可以看到,杂交显色后,各个样品在硝酸纤维素膜上都出现了较为清晰的、颜色深浅不同的斑点,但杂交的斑点(条带)并不均匀;同时在每一样品的33 ku附近,也发现有不规则的杂交斑点,表明在猪的血清中,有33 ku左右的蛋白质与Leptin蛋白具有序列的同源性,并在Western杂交时也能与兔抗人Leptin的多克隆抗体结合,产生斑点信号。因其他3个猪种的电泳结果与内江猪的相似,故省略。

## 2.3 条带定量结果

各个猪种的Western杂交结果经Bands can 软

## 2 结果与分析

### 2.1 SDS-PAGE 电泳结果

从SDS-PAGE电泳染色结果(图1,内江猪)可以发现,电泳胶染色后,其上的Leptin及其附近的条带信号不是很强,表明猪血清Leptin表达水平不高。由于Leptin分子质量相对较小,仅为16.7 ku,而电泳条带较多较杂,需根据标准样品和分子质量标记的位置来确认电泳结果中是否含有Leptin。因其他3个猪种的电泳结果与内江猪的相似,故略去。

### 2.2 Western 杂交结果

4个猪种血清Leptin蛋白在电泳之后,经过转移、封闭和杂交,在底物溶液中显色后的结果见图2(内江猪)。

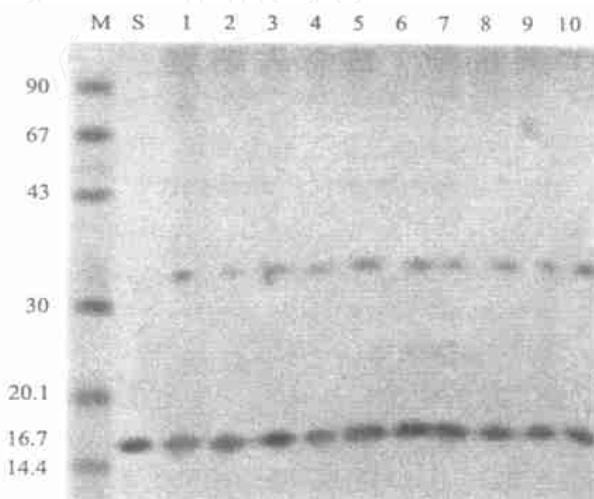


图2 内江猪血清Leptin的Western杂交结果

M. 分子量标准; S Leptin 标准; 1~10 内江猪的10个样本

Fig 2 Western blotting result of serum Leptin of Neijing pig

M. Molecular weight standard; S Standard Leptin;

1- 10 Represents the 10 samples of N ijiang pig

件分析之后,将杂交斑点与标准样品进行比较,二者的比值见表1。由表1可以看出,试验选用的内江猪、八眉猪、长白猪和杜洛克猪的血清Leptin蛋白水平与标准样品的相对值分别为0.943, 1.127, 0.278和0.211;与标准样品的比较结果表明,血液Leptin水平分别为18.86, 22.54, 5.56和4.22 ng/mL。说明脂肪型猪的血清Leptin水平是瘦肉型猪的4.23倍。其中八眉猪血液中的Leptin水平最高,杜洛克猪最低,表明我国脂肪型猪体内存在Leptin抵抗现象。

表 1 4 个猪种的血清样品与标准样品的 L e p t i n 相对水平

Table 1 Serum L e p t i n relative levels as compared to L e p t i n standard in 4 pig breed

| 猪种<br>Pig breed     | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | $\bar{x}$ | SD    |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------|-------|
| 内江猪<br>Neijiang pig | 0.81 | 0.87 | 1.09 | 0.7  | 1.23 | 1.28 | 1.03 | 0.93 | 0.74 | 0.75 | 0.943     | 0.202 |
| 八眉猪<br>Bamei pig    | 1.07 | 1.06 | 1.20 | 1.00 | 1.87 | 0.95 | 0.74 |      |      |      | 1.127     | 0.356 |
| 长白猪<br>Landrace pig | 0.24 | 0.21 | 0.28 | 0.24 | 0.37 | 0.41 | 0.34 | 0.32 | 0.16 | 0.21 | 0.278     | 0.080 |
| 杜洛克<br>Duroc        | 0.34 | 0.16 | 0.18 | 0.32 | 0.18 | 0.17 | 0.13 | 0.23 | 0.23 | 0.17 | 0.211     | 0.070 |

3 讨 论

3.1 L e p t i n 水平

ob 基因是最早发现与动物肥胖相关的基因之一。Zhang 等<sup>[1]</sup>发现, ob/ob 肥胖小鼠就是由于体内 ob 基因的突变导致不能生成 L e p t i n 而引起了肥胖, 从而证实了 L e p t i n 具有降低体脂含量、维持体重的功能。L e p t i n 由成熟的脂肪组织表达分泌后, 进入血液循环, 通过血脑屏障进入大脑, 并作用于下丘脑的饮食控制中枢, 对摄食、能量消耗、脂肪与葡萄糖代谢进行调控。L e p t i n 水平的变化对肥胖具有十分重要的生理意义, 表明 ob 基因是十分重要的控制点<sup>[10]</sup>。

动物血清 L e p t i n 水平的高低反映了机体的体脂含量的高低以及能量代谢的平衡状况, 而猪是较易沉积脂肪的动物之一。引入猪种的瘦肉率平均为 55%~60%, 而我国脂肪型的内江猪和八眉猪的瘦肉率只有 45% 左右<sup>[11]</sup>, 表明我国脂肪型猪比引入的瘦肉型猪脂肪沉积能力更强, 而瘦肉率性状更差。Ram say 等<sup>[5]</sup>用 W e s t e r n 杂交方法对脂肪型猪及其杂种猪的血清 L e p t i n 水平进行比较, 发现脂肪型猪的血清 L e p t i n 水平比杂种猪高 3 倍。本研究发现, 脂肪型猪比瘦肉型猪血清 L e p t i n 水平高 3.23 倍, 这与 Ram say 等<sup>[5]</sup>的研究结果非常接近。造成血清 L e p t i n 水平差异的原因可能是内江猪和八眉猪体脂含量相对较高, 脂肪组织源的 L e p t i n 分泌也就较高。本研究中同一品种内, 有的个体间 L e p t i n 水平差异较大, 这可能是由个体间的差异造成的, 因为影响 ob 基因表达的因素除了年龄、性别、摄食、体脂含量和转录因子以外, 还包括激素、免疫应激反应<sup>[12, 13]</sup>等因素。

3.2 脂肪型猪的 L e p t i n 抵抗

L e p t i n 在体内的主要功能是控制摄食和调节能量代谢, 使机体的体脂含量和能量代谢处于一个

相对稳定的平衡状态。本试验中, 脂肪型猪血清 L e p t i n 水平比瘦肉型猪高 3.23 倍, 表现出在肥胖类型中存在的 L e p t i n 抵抗现象。L e p t i n 抵抗现象与机体的体脂含量有密切关系<sup>[14]</sup>。除了遗传性肥胖的 ob/ob 小鼠以外, 几乎所有的肥胖类型都表现出 L e p t i n 抵抗现象。内江猪和八眉猪体内存在 L e p t i n 抵抗的原因可能有, 脂肪型猪体内表达高水平 L e p t i n 的同时, 存在 L e p t i n 的运输障碍, 如血液循环中存在 L e p t i n 的抗体或拮抗物; 血液循环中 L e p t i n 结合蛋白的增加令游离的 L e p t i n 减少; 血脑屏障的 L e p t i n 转运饱和现象; 也可能是其主要作用部位——下丘脑中 L e p t i n 信号系统与其他体重调节因子之间的失衡等, 使下丘脑对 L e p t i n 的敏感性丧失或者迟钝<sup>[15]</sup>。本试验同时也表明, 脂肪型与瘦肉型猪肥胖程度和瘦肉率性状的差异, 可能还存在有与 ob 基因表达有关的机制。

3.3 W e s t e r n 杂交与 33 ku 蛋白

与其他分子杂交方法相比, W e s t e r n 杂交更为直观, 其操作对实验者身体的损害更小。W e s t e r n 杂交<sup>[8]</sup> (W e s t e r n blotting) 是一种检测固定在基质上的蛋白质的免疫化学方法, 也称为蛋白印迹或免疫印迹杂交 (I m m u n o - b l o t t i n g)。它可以有效地鉴定某一蛋白质的性质, 定量分析小分子抗原, 筛选及纯化抗体, 分析蛋白质的结构域, 检测 (转) 基因表达结果等。

本试验通过 W e s t e r n 杂交, 发现猪血清中还有一个大小约 33 ku 的蛋白也出现了杂交斑点, 这可能是一个与猪 L e p t i n 在结构上有一定同源性的蛋白质, 但由于其分子质量正好约为 L e p t i n 的 2 倍, 也可能是 L e p t i n 的二聚体。如果深入研究其结构和功能, 有可能发现猪体内 L e p t i n 的一些结构和功能的类似物, 以及 ob 基因表达的一些调控因子, 但对此还需作进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Zhang Y 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] Pelleymounter M A, Cullen 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.
- [3] Mounzih K, Lu R, Chehab F F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males[J]. Endocrinology, 1997, 138: 1190- 1193.
- [4] Cao R H, Brakenhielm E, Wahlestedt C, et al. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 6390- 6395.
- [5] Ramsay T G, Yan X, Morrison C. The obesity gene in Swine: Sequence and expression of porcine Leptin[J]. Journal of animal science, 1998, 76: 484- 490.
- [6] 胡晓湘. 猪 ob 基因及其受体基因的分子遗传学研究[D]. 北京: 中国农业大学, 1998.
- [7] 戴茹娟, 李 宁, 吴常信. 猪 ob 基因 cDNA 的克隆与分析[J]. 遗传学报, 2000, 27(4): 290- 297.
- [8] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 77- 110.
- [9] 龙火生, 杨公社. 一种改进的 Western 杂交方法[J]. 畜牧兽医杂志, 2003, 22(3): 11- 13.
- [10] Prolo P, Wong M L, Licinio J, et al. Leptin[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1998, 30: 1285- 1290.
- [11] 许振英. 中国地方猪种种质特性[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1989.
- [12] De Vos P, Saladin R, Auwerx J, et al. Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 15958- 15961.
- [13] Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, et al. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration[J]. Nature, 1995, 377: 527- 529.
- [14] Frederich R C, Hamann A, Anderson S, et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to Leptin action[J]. Nature Med, 1995, 1: 1311- 1314.
- [15] Caro J E, Kolaczynski J W, Nyce M R, et al. Decreased cerebrospinal fluid/serum ratio in obesity: a possible mechanism for Leptin resistance[J]. Lancet, 1996, 348: 159- 161.

## Comparative detection of serum Leptin levels between obese and lean swine

LONG Huo-sheng, SUN Chao, PANG Wei-jun, YANG Gong-she, SUN Shi-duo

(College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** To investigate the expressional differences of ob gene between obese and lean swine, Western blotting and software Bandscan were employed to analyze the serum Leptin levels of Neijiang Pig, Bamei Pig, Landrace and Duroc. We found that Leptin resistance lies in obese swine; the serum Leptin level in obese swine is 323% higher than that in lean swine; a new peptide of about 33 ku in swine serum, which might be dimer of Leptin too, is structural homologous to Leptin. The fatness differences between obese and lean swine may be due to the pattern of ob gene expression.

**Key words:** obese swine; lean swine; Leptin; SDS-PAGE; Western blotting