

分类号:

密级: 否



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# 硕士学位论文

MASTER'S DEGREE DISSERTATION

## 山竹醇对肥育猪宰后肌肉糖酵解和肉品质的 调控作用及机制研究

EFFECT AND MECHANISM OF GARCINOL ON  
POSTMORTEM MUSCLE GLYCOLYSIS AND MEAT  
QUALITY OF FINISHING PIGS

研 究 生: 李娟

CANDIDATE: LI JUAN

学 号: 2018302110070  
STUDENT NO.:

专 业: 动物营养与饲料科学

MAJOR: ANIMAL NUTRITION AND FEED  
SCIENCE

导 师: 黄飞若 教授

SUPERVISOR: PROFESSOR HUANG FEIRUO

中国 武汉  
WUHAN, CHINA

二〇二一年六月

JUNE, 2021

# 华中农业大学硕士学位论文

## 山竹醇对肥育猪宰后肌肉糖酵解和肉品质的 调控作用及机制研究

### Effect and Mechanism of Garcinol on Postmortem Muscle Glycolysis and Meat Quality of Finishing Pigs

研 究 生：李娟

学 号：2018302110070

指 导 教 师：黄飞若 教授

指 导 小 组：马 曦 教授

赵 峰 研究员

贺 喜 教授

任文凯 教授

张利生 教授

专业：动物营养与饲料科学

研究方向：猪的营养

获得学位名称：农学硕士

获得学位时间：2021 年 6 月

华中农业大学动物科技学院

二〇二一年六月



## 目 录

摘 要 .....	i
Abstract.....	iii
缩略语表 .....	vi
第一章 文献综述 .....	1
1 前言 .....	1
2 宰后肌肉糖酵解与猪肉品质 .....	2
2.1 猪肉品质概述 .....	2
2.2 宰后肌肉糖酵解代谢 .....	3
2.3 宰后肌肉糖酵解对猪肉品质的影响 .....	4
3 糖酵解代谢中的重要调控酶 .....	5
3.1 PFKFB3 .....	5
3.2 GAPDH .....	6
3.3 PGK1 .....	6
3.4 LDHA .....	7
4 糖酵解与蛋白乙酰化调控 .....	7
4.1 蛋白乙酰化修饰 .....	8
4.2 乙酰转移酶 PCAF 的结构与功能 .....	9
4.3 PCAF 对糖酵解的乙酰化调控 .....	10
5 山竹醇--PCAF 天然抑制剂.....	11
5.1 山竹醇的抗氧化活性 .....	12
5.2 山竹醇对 PCAF 的抑制作用 .....	12
5.3 山竹醇的饲喂安全性 .....	13
6 研究目的与意义 .....	13
第二章 山竹醇对肥育猪宰后肌肉糖酵解和肉品质的 .....	15
调控作用及机制研究 .....	15
1 前言 .....	15
2 材料与方法 .....	15
2.1 试验动物与试验设计 .....	15

2.2 试验材料 .....	15
2.3 试验仪器与试剂耗材 .....	15
2.4 试验日粮与饲养管理 .....	16
2.5 样品采集 .....	18
2.6 指标测定 .....	18
2.6.1 生长性能和胴体品质测定 .....	18
2.6.2 肉品质测定 .....	18
2.6.3 肌肉化学成分和乳酸含量测定 .....	19
2.6.4 酶活力测定 .....	20
2.6.5 RNA 提取、反转录和荧光定量 .....	20
2.6.6 Western Blot 检测蛋白表达量 .....	23
2.6.7 免疫共沉淀 .....	24
2.7 数据处理与统计分析 .....	24
3 结果与分析 .....	25
3.1 山竹醇对肥育猪生长性能和胴体性状的影响 .....	25
3.2 山竹醇对猪肉品质的影响 .....	26
3.3 山竹醇对肥育猪肌肉抗氧化功能的影响 .....	26
3.4 山竹醇对肥育猪肌肉 MyHC mRNA 表达的影响 .....	27
3.5 山竹醇对肥育猪肌肉化学成分和宰后乳酸含量的影响 .....	28
3.6 山竹醇对肥育猪肌肉 PCAF 表达和活性的影响 .....	28
3.7 山竹醇对肥育猪肌肉糖酵解酶乙酰化水平的影响 .....	29
3.8 山竹醇对肥育猪肌肉糖酵解酶 mRNA 表达和活性的影响 .....	30
4 讨论 .....	31
4.1 山竹醇对肥育猪生长性能和胴体性状的影响 .....	31
4.2 山竹醇对猪肉品质的影响 .....	32
4.3 山竹醇对肥育猪肌肉抗氧化功能的影响 .....	32
4.4 山竹醇对肥育猪肌肉化学成分和宰后乳酸含量的影响 .....	33
4.5 山竹醇对肥育猪宰后肌肉糖酵解和肉品质的调控机制 .....	34
第三章 结语 .....	36
1 成果与结论 .....	36

2 创新点 .....	36
3 不足与展望 .....	36
参考文献 .....	37
附录 研究生在读期间发表的主要论文 .....	51
致 谢 .....	52

## 摘 要

宰后糖酵解产生乳酸导致的肌肉 pH 下降是影响猪肉品质优劣的重要因素,猪肉系水力、肉色、嫩度等诸多性状都直接或间接地取决于 pH 的高低。本试验旨在研究日粮中添加山竹醇对宰后肌肉糖酵解和猪肉品质的调控作用及机制。选取 80 头健康状况良好、体况相似 ( $79.40 \pm 1.60$  kg) 的“杜×长×大”三元杂交去势公猪,随机分为 4 组:对照组和低、中、高三个添加剂量的山竹醇组 (200、400 和 600 mg/kg),每组设 5 个重复,每个重复 4 头,试验期 52 d。试验结束后,采集猪胴体背最长肌,测定肉品质、肌肉乳酸含量、糖酵解酶乙酰化水平、酶活性和相关基因表达,探究山竹醇对宰后肌肉糖酵解和猪肉品质的调控作用及机制。主要研究结果如下:

(1) 生长性能和胴体性状结果表明:与对照组相比,饲喂山竹醇显著增加猪 ADG ( $P < 0.05$ ),低、中剂量山竹醇组猪 ADG 无显著差异 ( $P > 0.05$ ),但显著低于高剂量山竹醇组 ( $P < 0.05$ )。200 mg/kg 山竹醇对 F/G 无显著影响 ( $P > 0.05$ ),但中、高剂量山竹醇显著降低 F/G ( $P < 0.05$ );各组间猪 ADFI 无显著差异 ( $P > 0.05$ )。胴体性状方面,对照组和山竹醇组猪末重、胴体重、屠宰率、第十根肋骨处的背最长肌面积 (LA) 以及最后一根肋骨处背膘厚无显著差异 ( $P > 0.05$ ),但山竹醇组猪第一根肋骨处和最后腰椎处背膘厚以及平均背膘厚显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。

(2) 肉品质结果表明:与对照组相比,低、中剂量山竹醇对猪肉 pH<sub>45min</sub> 无显著影响 ( $P > 0.05$ ),但 600 mg/kg 山竹醇显著提高 pH<sub>45min</sub> ( $P < 0.05$ )。且三个添加剂量的山竹醇均显著提高猪肉 pH<sub>24h</sub>、肉色 a\* 和 b\*<sub>24h</sub> 值 ( $P < 0.05$ ),并显著降低肉色 L\*<sub>24h</sub> 值、滴水损失以及猪肉剪切力 ( $P < 0.05$ );各组之间猪肉 L\*<sub>45min</sub>、b\*<sub>45min</sub> 值以及蒸煮损失没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。同时,低、中剂量山竹醇组的肉质性状无显著差异 ( $P > 0.05$ ),且在 pH<sub>45min</sub>、pH<sub>24h</sub>、a\*<sub>45min</sub> 值、嫩度和系水力方面显著低于 600 mg/kg 山竹醇组 ( $P < 0.05$ )。

(3) 肌肉抗氧化指标和肌球蛋白重链 (MyHC) mRNA 表达结果表明:三个添加剂量的山竹醇均显著增加猪 T-AOC、GPx 和 CAT 的活性 ( $P < 0.05$ ),并显著降低猪肌肉中 MDA 含量 ( $P < 0.05$ );低、中剂量山竹醇组与对照组猪肌肉 SOD 的活性无显著差异 ( $P > 0.05$ ),但 600 mg/kg 山竹醇组猪肌肉 SOD 活性显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。MyHC 表达方面,对照组和山竹醇组之间猪肌肉 MyHC I 型和 IIx 型的 mRNA 表达无显著差异 ( $P > 0.05$ )。三个添加剂量的山竹醇均显著提高 MyHC IIa

型 mRNA 的表达水平 ( $P<0.05$ )；200 mg/kg 山竹醇对 Iib 型 mRNA 表达无显著影响 ( $P>0.05$ )，但 400 和 600 mg/kg 山竹醇显著降低 Iib 型 mRNA 表达 ( $P<0.05$ )；

(4) 肌肉化学成分及宰后乳酸含量结果表明：与对照组相比，山竹醇显著增加猪肌肉中肌红蛋白含量 ( $P<0.05$ )，对肌肉水分、粗蛋白、肌内脂肪以及糖原、葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖含量无显著影响 ( $P>0.05$ )。三个添加剂量的山竹醇均显著降低宰后 45 min 和 24 h 猪肌肉中乳酸含量 ( $P<0.05$ )；200 和 400 mg/kg 山竹醇组猪肌肉化学成分和宰后乳酸含量无显著差异 ( $P>0.05$ )，但宰后 45 min 和 24 h 肌肉乳酸含量均显著高于 600 mg/kg 山竹醇组 ( $P<0.05$ )。

(5) PCAF 表达与活性及糖酵解酶乙酰化结果表明：与对照组相比，低剂量的山竹醇对猪肌肉 PCAF mRNA 表达没有显著影响 ( $P>0.05$ )，但中、高剂量的山竹醇显著降低猪肌肉中 PCAF mRNA 表达 ( $P<0.05$ )；且三个添加剂量的山竹醇均显著降低猪肌肉中 PCAF 的活性 ( $P<0.05$ )。同时，糖酵解酶 PFKFB3、GAPDH、PGK1 的乙酰化水平随着山竹醇添加剂量的增加而显著降低 ( $P<0.05$ )。

(6) 糖酵解酶 mRNA 表达及酶活性结果表明：与对照组相比，三个添加剂量的山竹醇对糖酵解酶 PFKFB3、PFK1、GAPDH、PGK1 和 LDHA mRNA 表达均无显著影响 ( $P>0.05$ )，但显著降低 PFKFB3、PFK1、GAPDH 和 LDHA 的酶活性 ( $P<0.05$ )。低剂量的山竹醇对猪肌肉 PGK1 活性无显著影响 ( $P>0.05$ )，但中、高剂量的山竹醇显著降低猪肌肉 PGK1 的活性 ( $P<0.05$ )。

综上所述：日粮添加山竹醇可提高肌肉抗氧化能力，并且可通过抑制 PCAF 介导的蛋白乙酰化来降低糖酵解酶 PFKFB3、PFK1、GAPDH 和 PGK1 的活性，减缓宰后肌肉糖酵解和乳酸的产生，改善猪肉品质。

**关键词：**猪肉品质；山竹醇；PCAF；宰后糖酵解；pH



## Abstract

Postmortem muscle glycolysis is the biochemical basis for the formation of pork quality characteristics, which directly affects the meat quality traits such as pH, color, water holding capacity and tenderness. The aim of this study was to investigate the effect and mechanism of dietary garcinol on postmortem muscle glycolysis and meat quality of finishing pigs. A total of 80 Duroc  $\times$  Landrace  $\times$  Yorkshire ( $79.40 \pm 1.60$  kg) ternary hybrid boars with good health and similar body condition were assigned into 4 groups at random, including control group and three dosage of garcinol groups (200, 400 and 600 mg/kg). Each group includes 5 replicates (4 pigs per replicate). The trial period was 52 days. At the end of the experiment, the longissimus dorsi muscle was collected to detect meat quality, postmortem muscle lactate content, glycolytic enzymes acetylation levels, enzyme activities and related gene expression, so as to explore the regulatory effect and mechanism of garcinol on postmortem muscle glycolysis and pork quality. The main results are as follows:

(1) The effect of garcinol on growth performance and carcass traits of pigs. The ADFI among control group and garcinol groups was not apparently different ( $P > 0.05$ ). However, compared with the basal diet, the three dosage of garcinol all increased the ADG ( $P < 0.05$ ). The ADG in low and middle dosage of garcinol groups was no significant difference ( $P > 0.05$ ), but was lower than that in high dosage of garcinol group significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, low dosage of garcinol has no significant effect on F/G ( $P > 0.05$ ), however, middle and high dosage of garcinol reduced the F/G markedly ( $P < 0.05$ ). Garcinol showed no remarkable impact on the final weight, carcass weight, slaughter rate, longissimus dorsi area and backfat thickness at the last rib ( $P > 0.05$ ), but markedly reduced the backfat thickness at the first rib and last lumbar vertebrae as well as the average backfat thickness ( $P < 0.05$ ).

(2) The results of pork quality showed that compared with the basic diet, low and middle dosage of garcinol showed no significant effect on the  $\text{pH}_{45\text{min}}$  ( $P > 0.05$ ), but 600 mg/kg garcinol increased the  $\text{pH}_{45\text{min}}$  significantly ( $P < 0.05$ ). The three dosage of garcinol all increased the  $\text{pH}_{24\text{h}}$ ,  $a^*$ ,  $b^*_{24\text{h}}$  and reduced the  $L^*_{24\text{h}}$ , water dripping loss and shear

force dramatically ( $P<0.05$ ). The  $L^*_{45\text{min}}$ ,  $b^*_{45\text{min}}$  and cooking loss were not significantly different in the control group and garcinol groups ( $P>0.05$ ). Besides, the pork quality between 200 and 400 mg/kg garcinol groups was not obviously different ( $P>0.05$ ), and the  $\text{pH}_{45\text{min}}$ ,  $\text{pH}_{24\text{h}}$ ,  $a^*_{45\text{min}}$ , tenderness and water-holding capacity in low and middle dosage of garcinol groups were significantly lower than those in 600 mg/kg garcinol group ( $P<0.05$ ).

(3) The results of muscle antioxidant indexes and myosin heavy chain (MyHC) mRNA expression of finishing pigs showed that the content of muscle MDA in the garcinol groups was markedly reduced than that in the control group ( $P<0.05$ ). The activities of GPx, CAT and T-AOC were markedly increased in garcinol groups ( $P<0.05$ ). The activity of SOD among control group, low and middle dosage of garcinol groups was no statistical difference ( $P>0.05$ ), but was lower than that in the 600 mg/kg garcinol group significantly ( $P<0.05$ ). Compared with the basal diet, three dosage of garcinol all improved the expression of Ila mRNA notably ( $P<0.05$ ), but had no marked impact on the mRNA expression of MyHC I and IIx ( $P>0.05$ ). 200 mg/kg garcinol showed no notable impact on the mRNA expression of MyHC IIb ( $P>0.05$ ), but middle and high dosage of garcinol significantly reduced the expression level of MyHC IIb ( $P<0.05$ ).

(4) The results of muscle chemical composition and postmortem lactate content showed that in comparison with the basal diet, the three dosage of garcinol significantly increased the content of myoglobin ( $P<0.05$ ), but had no marked impact on the content of muscle moisture, intramuscular fat (IMF), crude protein (CP), glycogen and glucose + 6-phosphate ( $P>0.05$ ). Comparison with the control group, the three dosage of garcinol all significantly decreased the content of muscle lactate in postmortem 45 min and 24 h ( $P<0.05$ ). The muscle chemical composition and postmortem lactate in 200 and 400 mg/kg garcinol groups was no significant difference ( $P>0.05$ ), but the lactate content in postmortem 45 min and 24 h were significantly higher than those in 600 mg/kg garcinol group ( $P<0.05$ ).

(5) The results of the mRNA expression, activity of PCAF and acetylation levels of glycolysis enzymes in the muscle of finishing pigs showed that the PCAF mRNA expression was not significantly different in control group and 200 mg/kg garcinol group

( $P>0.05$ ). However, middle and high dosage of garcinol significantly decreased the mRNA expression level of PCAF ( $P<0.05$ ). Moreover, dietary supplementation of garcinol significantly decreased the activity of PCAF in the muscle of finishing pigs ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the acetylation of PFKFB3, GAPDH and PGK1 were significantly decreased with the increase of garcinol dosage added ( $P<0.05$ ).

(6) The results of the mRNA expression and enzyme activities of glycolysis enzymes showed that compared with the control group, the three additive dosage of garcinol had no significant effect on the mRNA expression of glycolytic enzymes PFKFB3, PFK1, GAPDH, PGK1 and lactate dehydrogenase A (LDHA) ( $P>0.05$ ), but significantly decreased the enzyme activities of PFKFB3, PFK1, GAPDH and LDHA ( $P<0.05$ ). The enzyme activity of PGK1 in 200 mg/kg garcinol group and control group was no significantly difference ( $P>0.05$ ). but was significantly lower than that in middle and high dosage of garcinol groups ( $P<0.05$ ).

In conclusion, dietary garcinol can increase the muscle antioxidant ability, and can decrease the activities of PFKFB3, PFK1, GAPDH and PGK1 by inhibiting PCAF and PCAF-mediated acetylation of glycolytic enzymes, thus slowing down postmortem muscle glycolysis and improving the pork quality.

**Keywords:** pork quality; garcinol; PCAF; postmortem glycolysis; pH

## 缩略语表

### (Abbreviation)

缩写	英文名称	中文名称
Abbr.	English name	Chinese name
ADFI	Average daily feed intake	平均日采食量
ADG	Average daily gain	平均日增重
Ca	Calcium	钙
CP	Crude protein	粗蛋白
Cys	Cysteine	半胱氨酸
DFD	Dry, firm and dark	干燥、坚硬、色暗
F/G	Feed/gain ratio	料重比
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
GSH-Px	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化物酶
IMF	Intramuscular fat	肌肉脂肪
KAT	Lysine acetyltransferase	赖氨酸乙酰转移酶
KDAC	Lysine deacetylase	赖氨酸去乙酰化酶
LA	Longissimus dorsi muscle area	背最长肌面积
LDH	Lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LM	Longissimus dorsi muscle	背最长肌
Lys	Lysine	赖氨酸
Mb	Myoglobin	肌红蛋白
Met	Methionine	蛋氨酸
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
MyHC	Myosin heavy chain	肌球蛋白重链
P	Phosphorus	磷

PCAF	P300-CBP associated factor	P300-CBP结合因子
PFK1	Phosphofructokinase 1	磷酸果糖激酶1
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase	6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶3
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	磷酸甘油酸激酶1
PSE	Pale, soft and exudative	苍白、松软、渗出性
SEM	Standard error of mean	平均数标准误
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
T-AOC	Total antioxidant capacity	总抗氧化能力

# 第一章 文献综述

## 1 前言

随着社会经济的发展,我国猪肉产量快速增长,数量上已逐渐满足国人需求,猪肉品质的优劣成为消费者关注的焦点。因此,在保证猪肉产量的同时生产出高品质的猪肉是目前养殖工作者重点努力的方向。

肌肉转化成猪肉的过程中涉及到复杂的代谢变化,其中宰后肌肉糖酵解代谢显著影响猪肉品质(Melody et al 2004, 王恒 2007)。屠宰后,猪肌肉进行的是无氧糖酵解,糖原、葡萄糖等糖类化合物在一系列酶的催化下分解为乳酸并产生能量。由于乳酸无法像活体状态时经血液转运至肝脏,于是在肌肉中积累,从而造成肌肉pH值不断下降(Shen and Du 2005)。宰后24 h猪肉pH值的理想范围是5.6~5.8,过低的pH会影响猪肉色泽并降低系水力,甚至产生PSE(Pale, soft and exudative)肉,在猪生产中较为常见,发生率为10%~30%(O'Neill et al 2003, 李琼 2017)。因此,调控宰后肌肉糖酵解是改善猪肉品质的重要手段。糖酵解过程受到蛋白乙酰化修饰的调控,糖酵解酶6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶3(6-phosphofructo-2-kinase /fructose -2,6-biphosphatase, PFKFB3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde -3 -phosphate dehydrogenase, GAPDH)和磷酸甘油酸激酶1(phosphoglycerate kinase 1, PGK1)均可被乙酰转移酶P300/CBP结合因子(P300-CBP associated factor, PCAF)乙酰化而活性增加,加快糖酵解(Li et al 2014, Dom énech et al 2015, Hu et al 2017, Li et al 2018)。而研究报道,PCAF在缺氧、应激等条件下表达或活性会显著升高(Yamanaka et al 2014, Huang et al 2015, 贺琼玉等 2019)。那么PCAF是否是调控宰后缺氧条件下肌肉糖酵解和猪肉品质的重要靶点?为了验证这一观点,我们查阅文献后筛选出了PCAF的天然抑制剂—山竹醇(Garcinol)。

近年来,植物提取物由于其绿色、安全等特点在促进猪生长、改善猪肉品质方面成为研究热点。山竹醇,提取自藤黄属植物果皮,呈橙黄色粉末状,含有化学官能团酚羟基和 $\beta$ -二酮(Balasubramanyam et al 2004, Jagtap et al 2015, 贺琼玉等 2019),可缓解氧化应激,预防口腔癌,减轻炎症反应等,同时山竹醇可有效抑制乙酰转移酶PCAF(Behera et al 2016, Yao et al 2019)。然而,对于山竹醇的研究多集中在小鼠模型上,山竹醇对于猪肌肉糖酵解及肉品质调控方面的研究还鲜见报道。因此,本试验旨在通过动物试验来探究日粮添加山竹醇对肥育猪宰后肌肉糖酵解及

肉品质的调控作用及机制，为集约化养殖模式下猪肉品质的改善提供新的营养调控思路。

## 2 宰后肌肉糖酵解与猪肉品质

### 2.1 猪肉品质概述

我国肉类消费以猪肉为主，在过去十年来，猪肉生产量和消费量一直稳居全球第一。随着居民对猪肉口感的重视和保健意识的提高，人们越来越关注猪肉品质的好坏。因此，寻找提高猪肉品质的有效方法，生产出满足人们要求的猪肉，是养殖工作者亟待解决的问题。

宰后糖酵解产生乳酸导致的肌肉 pH 下降是决定猪肉品质优劣的关键因素，pH 值下降快慢及下降程度影响肌肉蛋白质变性和肌肉细胞收缩，直接或间接地决定肉色、系水力、剪切力等诸多肉质性状（Warner et al 2010, Hughes et al 2014）。宰后 24 h 猪肉 pH 值的理想范围是 5.6~5.8，当 pH 值大小在 5.0~5.5 范围时，肌肉保持自身水分的能力最差，肉色为苍白色，此时肉品质最差（Shi et al 2005, Bee et al 2007）；猪肉色泽是消费者用来评价肉品质好坏的直观指标，消费者们倾向于选择肉色鲜红的猪肉（Mancini and Hunt 2005），影响猪肉色的主要因素是肌肉中肌红蛋白（Myoglobin, Mb）的含量以及脂质氧化程度（雷剑等 2010）。系水力的高低反映出肌肉对自身水分的束缚能力。系水力强，则肉表面无水分渗出，口感鲜嫩多汁（孙建广和张石蕊 2008）；系水力弱，则猪肉水分流失较多，可溶性营养物质损失严重，猪肉变得干燥坚硬，且风味较差（van Laack et al 1994）；嫩度是影响猪肉口感的重要评价指标，主要受 pH、肌肉脂肪（Intramuscular fat, IMF）含量以及肌纤维类型的影响，其中 pH 值可通过影响肌细胞蛋白水解酶的稳定性和活性来影响猪肉嫩度（Rosenvold et al 2010）。

猪肉品质受到外界及机体内部诸多因素的影响，其中肌肉抗氧化能力、肌纤维类型以及宰后肌肉糖酵解代谢都会对猪肉品质产生重要影响。肌肉抗氧化能力低则会发生脂质过氧化反应，使猪肉产生异味，影响食用和加工质量；同时脂质过氧化会破坏生物膜的完整性，造成肌肉系水力变低（Cortinas et al 2005, Jamilah et al 2009, 郭建凤等 2015）。肌纤维是肌肉的主要组成单位，按肌球蛋白重链（MyHC）亚型分类可分为 I、IIa、IIx 和 IIb 型（周招洪等 2015）。机体在受到外界刺激和营养调控等因素时，肌纤维类型间可进行相互转化（Zhang et al 2014）。有研究报道，肉

的嫩度、色泽与 I 型和 IIa 型肌纤维比例呈正相关, I 型和 IIa 肌纤维比例增加有助于提高猪肉多汁性和嫩度, 改善肉品质 (Kang et al 2011)。而 IIb 型肌纤维比例增加则会促使肌肉 pH 下降速度偏快, 降低肉的嫩度, 甚至产生 PSE 肉 (Ryu and Kim 2005, Choi et al 2005)。而在猪宰杀后肌肉向猪肉转化过程中, 肌肉无氧糖酵解产生乳酸的多少和快慢是猪肉品质形成的重要生化基础, 并与其它肉质性状紧密相关。

## 2.2 宰后肌肉糖酵解代谢

正常生理条件下, 肌肉进行糖酵解将葡萄糖转化为丙酮酸, 并产生 ATP, 随后丙酮酸被转运至线粒体进行氧化供能。当机体缺氧时, 丙酮酸会在乳酸脱氢酶 A (Lactate dehydrogenase A, LDHA) 的作用下生成乳酸 (见图 1-1)。乳酸最先在肌肉中积累, 随后进入血液, 通过科里循环进入肝脏, 在肝脏中重新被氧化为丙酮酸, 丙酮酸作为糖异生底物可重新合成葡萄糖, 然后通过血液再次被转运到肌肉中 (Suhara et al 2015)。而当动物被屠宰后, 肌细胞仍然存活, 需要合成 ATP 维持能量需求。由于宰后血液循环终止, 氧气供应不足, 因此肌肉不能依靠有氧呼吸供能, 无氧糖酵解成为宰后肌细胞能量的主要来源。宰后肌肉以糖原、葡萄糖等底物进行糖酵解, 产物为乳酸和 ATP (Choe et al 2008)。但乳酸无法像活体状态时通过血液转运至肝脏进行分解, 于是在肌肉中积累。随着肌肉无氧糖酵解的进行, 肌肉乳酸不断堆积, pH 值持续下降直至肌肉糖原耗尽或糖酵解酶失活。pH 是衡量猪肉品质优劣的重要指标, 同时 pH 值高低还会影响其它肉质性状 (孙朋朋和宋春阳 2014)。因此宰后肌肉糖酵解对猪肉品质的影响至关重要。

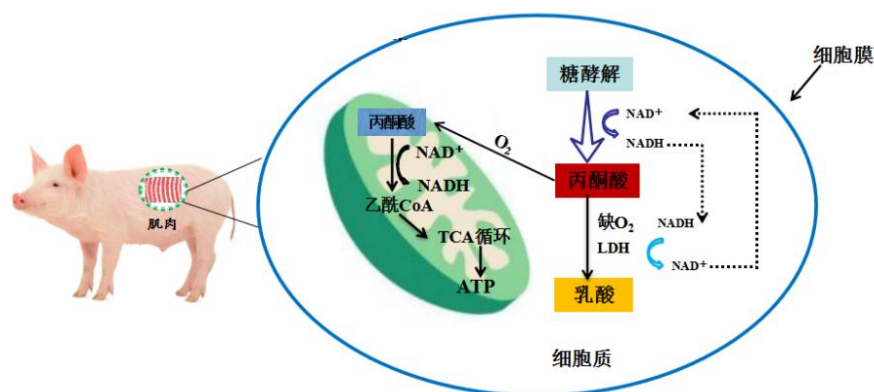


图 1-1 猪肌肉糖酵解代谢过程

Fig 1-1 The glycolysis process in the muscle of pigs



## 2.3 宰后肌肉糖酵解对猪肉品质的影响

在宰后代谢过程中,肌肉通过无氧糖酵解产生乳酸,导致猪肉 pH 值持续下降。屠宰后猪肉 pH 值的高低还会直接或间接地影响肌肉蛋白如肌红蛋白的变性程度和蛋白凝聚、肌肉能量代谢酶以及嫩化酶的活性等,从而影响宰后猪肉的系水力、肉色、嫩度等猪肉品质评价指标。因此, pH 是引起肉质性状差异的主要因素。

肌肉中糖酵解底物浓度和糖酵解酶活性是影响乳酸最终产生量及产生速度的关键因素,对猪肉品质尤其是 pH 值产生直接影响(Rosenvold et al 2001, Hamilton et al 2002, Bee et al 2006)。猪屠宰时肌肉中能够通过糖酵解作用产生乳酸的底物(肌糖原、葡萄糖等)越多,那么最终的 pH 值就有可能越低(Warriss et al 1989, 朱康平 2012, Li et al 2015)。研究表明,当猪在屠宰前受到较长时间的应激,肌肉中糖原会提前耗尽,导致宰后糖酵解不足,乳酸产生量过低,肌肉 pH 值偏高( $\text{pH}_{24\text{h}}$  高于 6.2)。高 pH 下,猪肉色泽表现为深红色;同时高 pH 会促使猪肌肉蛋白变性程度低,保水能力升高,并且剪切力变大,猪肉嫩度降低,形成暗红、坚硬且干燥的 DFD(dark, firm and dry)肉(Gašperlin et al 2000, Guàrdia et al 2010, 杨媛媛等 2019)。而宰后肌肉糖酵解相关酶活性高,糖酵解代谢则偏快,导致肌肉 pH 值迅速下降(Stephens et al 2008)。一般情况下,正常猪肉  $\text{pH}_{45\text{min}}$  在 6.0-6.4 范围内,  $\text{pH}_{24\text{h}}$  在 5.5-5.8 范围内;当 pH 下降较快导致  $\text{pH}_{45\text{min}}$  小于 5.8 或  $\text{pH}_{24\text{h}}$  小于 5.5 时,则会引起肌肉收缩和蛋白变性,导致系水力变弱,表现为苍白、松软、渗出样猪肉,即 PSE 肉(Scheffler et al 2007, Eadmusik et al 2011, 李琼 2017)。DFD 肉在牛生产中常见, PSE 肉则在猪生产中较为常见,发生率为 10%~30%(Josell et al 2003, Carrasco-García et al 2020)。因此可通过调控肌肉糖酵解底物浓度或糖酵解相关酶的活性来改善猪肉品质。研究发现,宰前对动物进行适当的禁食,可改善肉色,提高肉质 pH,降低滴水损失和蒸煮损失(Karaca et al 2016, Dalla Costa et al 2016)。Zhang 等(2015)通过在猪日粮中分别添加 300 和 600 mg/kg 的白藜芦醇发现,白藜芦醇可显著降低猪肌肉 LDHA 活性和肌肉乳酸含量,提高猪背最长肌的 pH 和猪肉  $a^*$  值,降低猪肉剪切力和滴水损失(Zhang et al 2015)。另有一些研究证明,宰前分别在日粮中添加草酸钠(降低丙酮酸激酶活性)、槲皮素(降低 LDHA 活性)、胍基乙酸(降低己糖激酶活性)、柠檬酸(降低磷酸果糖激酶活性)等可有效减缓宰后肌肉 pH 下降速率,降低滴水损失,增加肉质嫩度等(Reed et al 1974, Kremer et

al 1999, Jerez et al 2003, Liu et al 2015) (见表 1-1)。这些研究表明,通过调控宰  
后肌肉糖酵解来调节猪肉 pH、改善猪肉性状是切实可行的。

表 1-1 通过调控肌肉糖酵解对肉品质的影响

Table 1-1 The effect on meat quality by regulating muscle glycolysis

调控手段	作用机制	对肉品质的影响	参考文献
宰前短期 禁食	降低糖酵解底物 糖原的水平	改善肉色, 提高 pH, 降低滴水损失、蒸煮损失	(Karaca et al 2016, Dalla Costa et al 2016)
肌酸	减缓宰后糖酵解发生	pH 升高	(Berg and Allee 2001)
硫酸镁	减少糖酵解通量	pH <sub>45min</sub> 升高, L*值和 滴水损失降低	(Apple et al 2005)
$\alpha$ -脂肪酸	抑制糖酵解调控酶 APMK 活性	pH <sub>24h</sub> 值升高	(Shen and Du 2005)
胍基乙酸	降低己糖激酶活性	pH 下降速度减缓, 蒸煮损失减小	(刘洋 2015, Liu et al 2015)
柠檬酸钠	降低磷酸果糖激酶活性	嫩度增加	(Jerez et al 2003)
草酸钠	降低丙酮酸激酶活性	pH 下降速度减缓, 滴水损失降低	(Reed et al 1974)
白藜芦醇	降低 LDHA 活性	pH 和 a*值升高, L*值、 剪切力和滴水损失降低	(Zhang et al 2015)
槲皮素	降低 LDHA 活性	pH 升高, 滴水损失降低	(Kremer et al 1999)

### 3 糖酵解代谢中的重要调控酶

#### 3.1 PFKFB3

在糖酵解过程中, PFK1 催化果糖-1,6-二磷酸的生成。除了作为糖酵解中间产物外, 果糖-1,6-二磷酸在代谢过程中无其他任何去处, 这一性质保证了葡萄糖朝着生成丙酮酸的方向进行 (Wegener et al 2002)。因此 PFK1 催化的反应是糖酵解过程中关键的一步。PFK1 是一变构酶, 该酶有很多变构效应剂, 其中果糖-2,6-二磷酸是 PFK1 的活化剂, 同时还是糖酵解通路中最有效的刺激剂。果糖-2,6-二磷酸的合成与

水解是由 PFKFB 催化 (Schoors et al 2014, Cruys et al 2016)。PFKFB 共有 4 种亚型, 同时具有激酶活性和磷酸酶活性, 催化果糖-6-磷酸和果糖-2,6-二磷酸的互相转化。其中 PFKFB3 的激酶活性远大于磷酸酶活性, 主要负责催化果糖-2,6-二磷酸的生成, 从而维持较高的糖酵解率 (Minchenko et al 2002, Kim et al 2007, 鲁燕 2016, Macut et al 2019)。研究发现, 缺氧环境下如在肿瘤细胞中, PFKFB3 mRNA 表达显著增加, 糖酵解增强 (Minchenko et al 2002)。在内皮细胞和平滑肌细胞中特异性敲除 PFKFB3, 细胞的糖酵解能力显著下降, 进而糖酵解代谢产物丙酮酸和乳酸含量显著减少 (Cao et al 2019, Kovacs et al 2019)。

### 3.2 GAPDH

糖酵解可分为消耗能量和产生能量两个过程, 其中甘油醛-3 磷酸脱氢酶 (GAPDH) 催化糖酵解产能过程的第一步反应, 产物为 1,3-二磷酸甘油醛。哺乳动物的 GAPDH 高度保守, 因此 GAPDH 常被用作细胞质蛋白的标准内参 (Seidler 2013, Chauhan et al 2017)。GAPDH 的酶活受 ATP 和磷酸肌酸的调控, 两者均是甘油醛-3-磷酸脱氢酶的非竞争抑制剂。当肌肉收缩时, 磷酸肌酸浓度降低, 对 GAPDH 的抑制作用减小, 肌肉 GAPDH 的酶活性随之增加; 但随着肌肉中乳酸含量的增加, ATP 对甘油醛-3-磷酸脱氢酶的抑制作用增大, GAPDH 酶活随之降低 (Galbiati et al 2020)。同时, GAPDH 的表达与活性等受到翻译后修饰的调控, 与许多的人类疾病相关联。研究表明, 在癌细胞中, 较高的葡萄糖浓度可诱导 GAPDH 发生乙酰化, 使得 GAPDH 酶活性增加, 糖酵解加快以促进细胞增殖 (Jung et al 2014, Zhang et al 2017)。

### 3.3 PGK1

PGK 催化的反应是糖酵解中首次产生能量的反应, 因而在动物生命活动中起着关键作用, 是糖酵解途径中的一个重要代谢酶 (王玉英等 2019)。PGK 存在于所有生物体中, 相对分子质量为 64 kDa, 在人类基因组中有两个亚型, PGK1 和 PGK2。它们具有相似的结构与功能, 并且 80% 以上的氨基酸序列相似。然而, PGK1 与 PGK2 有着不同的分布, PGK2 主要在精子发生过程中表达, PGK1 在所有体细胞中组成型表达 (Fu et al 2020)。PGK1 基因突变会造成磷酸甘油酸激酶活性的降低, 干扰正常的糖酵解通路和能量产生, 导致细胞损伤或死亡。除代谢酶外, PGK1 还可以作为蛋白激酶磷酸化并增加丙酮酸脱氢酶激酶 1 的活性, 从而减少丙酮酸在线粒体中

的代谢, 增加丙酮酸在细胞质中向乳酸的转化 (Li et al 2016)。PGK1 表达与活性受到多种蛋白翻译后修饰并直接影响细胞糖酵解通量。研究发现, PGK1 可在 Y324 位点自磷酸化以激活其酶活性, 促进细胞糖酵解和能量的产生, 从而有利于癌细胞的生长与增殖 (Qian et al 2019)。Hu 等 (2017) 研究发现, PGK1 K323 位点乙酰化可提高 PGK1 的酶活力, 加速糖酵解过程 (Hu et al 2017)。

### 3.4 LDHA

LDH 是无氧糖酵解的标志酶, 无氧条件下, LDH 会在细胞质中将丙酮酸转化为乳酸。LDH 由两个结构不同的基因 LDHA 和 LDHB 编码的两个不同亚基随机组合形成。LDHA, 位于 2 号染色体, 在骨骼肌中表达量丰富, 主要负责催化乳酸的生成, 将 NADH 氧化为  $\text{NAD}^+$  (曹国娟等 2018); 而 LDHB 在心肌中表达更为丰富, 倾向于催化丙酮酸的产生, 从而进行氧化代谢 (Le et al 2010)。研究表明, 在多种癌细胞中 Myc 和 HIF 活性增加, 引起 LDHA 转录激活和高表达, 促进糖酵解产生乳酸, 可帮助癌细胞逃脱免疫系统的监控, 为肿瘤转移提供酸性微环境 (Gottfried et al 2006, Brand et al 2016); 敲低 LDHA 则限制细胞乳酸产生和增值能力 (Fantin et al 2006)。LDHA 表达与活性受到 PGC-1 $\alpha$  的调控, 研究发现, 剧烈运动后, 肌肉特异性转 PGC-1 $\alpha$  基因小鼠肌肉中 LDHA mRNA 表达比正常小鼠相比降低 53.5%, 同时肌肉中 LDHA 介导的丙酮酸转化为乳酸的活性降低 40.1% (Summermatter et al 2013)。同时, LDHA 也受到翻译后修饰, 研究表明, LDHA K5 位点的乙酰化可降低 LDHA 的催化活性 (Zhao et al 2013)。

## 4 糖酵解与蛋白乙酰化调控

蛋白质乙酰化是一种可逆的翻译后修饰方式, 在调控细胞代谢各方面发挥着关键的作用。宰后猪肉品质的优劣与肌肉糖酵解代谢有着重要联系, 而大量的研究证明, 肌肉能量代谢中的大多数酶类都受到蛋白乙酰化修饰。Zhou 等 (2019) 对宰后猪肌肉中乙酰化组进行定量分析, 共鉴定出 771 个乙酰蛋白, 在肌肉收缩、糖代谢、细胞凋亡和钙信号传导等方面均较丰富 (Zhou et al 2019)。李仲文 (2015) 通过小鼠宰前腹腔注射药物分别抑制乙酰转移酶 (lysine acetyltransferase, KAT) 和去乙酰化酶 (lysine deacetylase, KDAC), 发现抑制 KAT 后小鼠宰后肌肉糖酵解减缓, 肌肉 pH 增高。而抑制 KDAC 则导致小鼠肌肉糖酵解增快, 肌肉乳酸增多 (李仲文 2015)。同样地, 有研究报道, 通过抑制 KDAC 提高肌肉蛋白乙酰化水平, 可加速

小鼠肌肉糖酵解，导致肌肉乳酸产生增多，pH 下降（李琼 2017）。这些研究结果说明宰后糖酵解快慢与肌肉蛋白乙酰化程度之间有着紧密联系。

## 4.1 蛋白乙酰化修饰

蛋白质乙酰化过程是由 KAT 介导，将乙酰基团转移到蛋白质特定的赖氨酸位点上。该过程是动态可逆的，乙酰基团可在 KDAC 的作用下被移除。目前发现的 KAT 至少有 30 种，KDAC 有 18 种左右。其中 KAT 可分为 GNAT 家族、P300/CBP 家族和 MYST 家族等（见表 1-2），KDAC 可分为 I 型、II 型、III 型和 IV 型（李仲文等 2015）（见表 1-3），其中 I 型和 II 型去乙酰化酶的抑制剂是 TSA。III 型也被称为 Sirtuins 家族，抑制剂为 NAM（Hall et al 2013）。

蛋白质乙酰化修饰在调控细胞代谢酶功能方面发挥着重要作用，可影响蛋白酶在细胞中的定位、酶的活性、信号转导以及蛋白质与 DNA 的互作等。目前，已经发现超 2000 多个蛋白质受到乙酰化修饰（Drazic et al 2016）。研究发现，糖原合成与降解、糖酵解、三羧酸循环、脂质代谢等过程中的大多数代谢酶都遭受蛋白乙酰化调控（Wang et al 2010, Zhao et al 2010, 李琼 2017, Li et al 2019）。同时，乙酰化对酶类的修饰作用高度保守，在细菌和哺乳动物中有着相同的代谢酶被乙酰化（Starai et al 2004, Schwer et al 2006）。

表 1-2 乙酰转移酶家族

Table 1-2 Lysine acetyltransferases family

名称	成员
GNAT 家族	GCN5, PCAF, Hat1, Elp3, Hpa2, Hpa3, ATF2, Nut1
P300/CBP 家族	P300, CBP
MYST 家族	MOF, TIP60, HBO1, MOZ, MORF, YBF2
SRC 家族	SRC1, SRC2, SRC3, GRIP1
其他	TAF <sub>II</sub> 250, Rtt109

表 1-3 去乙酰化酶家族

Table 1-3 Lysine deacetylases family

名称	成员
I 型	KDAC1, KDAC2, KDAC3, KDAC8
II 型	KDAC4, KDAC5, KDAC6, KDAC7, KDAC9, KDAC10
III 型	SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6, SIRT7
IV 型	KDAC11

## 4.2 乙酰转移酶 PCAF 的结构与功能

GNAT 是最大的乙酰转移酶家族，其中成员 P300/CBP 结合因子（PCAF）是研究最广泛的乙酰转移酶之一，大小为 4508 bp。PCAF 最早是由 Yang 等人在研究 P300 / CBP 组蛋白乙酰化调控机制中发现的一种新蛋白，因其可以与 P300/CBP 结合形成复合体，于是将其命名为 P300/CBP 相关因子（Yang et al 1996）。

PCAF 可乙酰化组蛋白，导致核小体的结构变得松弛，有助于转录因子更容易与 DNA 结合，从而调节基因的转录水平，在细胞周期、细胞癌变等过程中发挥重要作用（Love et al 2012, Qiu et al 2019）。有研究发现，细胞中特异性敲除 PCAF，组蛋白 H3K9 的乙酰化水平显著降低（Jin et al 2011）。转录因子方面，PCAF 介导的 p53 乙酰化有利于其与 DNA 的结合，阻断癌细胞的分裂和增殖周期（Xenaki et al 2008, Perez et al 2010）。上游刺激因子 1 被 PCAF 乙酰化后，可促进脂肪酸合成酶等脂肪合成相关基因的转录和表达，导致肝脏脂肪合成增加（Corre et al 2009, Zhang et al 2012, 贺琼玉等 2019）。最近的一些研究发现，PCAF 也是修饰非组蛋白的主要 KAT，尤其是乙酰化细胞中一些重要的代谢酶，包括糖原合成、糖酵解、脂质代谢等相关酶，通过改变代谢酶活性或表达而调控细胞代谢过程（Li et al 2014, Hu et al 2017, Wang et al 2018）。

正常生理状态下，机体内 PCAF 表达和活性保持稳定不变。但当受到外界应激或机体内部发生病变时，PCAF 表达和活性可能发生变化。研究表明，在缺氧、免疫应激、氧化应激等条件下，PCAF 表达和活性上调（Yamanaka et al 2014, Huang et al 2015, 贺琼玉等 2019）。Fei 等（2016）研究发现，与对照组相比，胃癌细胞中 PCAF mRNA 和蛋白表达水平均下调（Fei et al 2016）；而在非酒精性脂肪肝炎、肝

癌以及前列腺癌中，PCAF 表达与活性上调（Gong et al 2012, Hu et al 2017, Wang et al 2020）。

### 4.3 PCAF 对糖酵解的乙酰化调控

蛋白质乙酰化广泛参与细胞代谢的调控。一些研究表明，超 2000 多种蛋白受到乙酰化修饰，包括糖酵解相关代谢酶。PCAF 作为 GANT 家族重要的 KAT 之一，其在参与糖酵解代谢相关酶调控中也发挥着重要作用。

研究表明，PFKFB3 的 K472 位点位于 PFKFB3 的核定位信号序列，受 PCAF 介导的乙酰化修饰。该位点乙酰化后可显著破坏 PFKFB3 与核转运蛋白的结合，导致 PFKFB3 无法被转运至细胞核而存留在细胞质，进一步于胞质中在 AMPK 的作用下发生磷酸化而活性增高（Doménech et al 2015, Li et al 2018）。GAPDH 催化糖酵解产能过程的第一步反应，产物为 1,3-二磷酸甘油酸。研究表明，GAPDH K254 位点被乙酰转移酶 PCAF 乙酰化可促进自身活化，加速糖酵解（Li et al 2014）。PGK1 在机体能量代谢中起着关键作用，因其催化的反应是糖酵解过程中第一次产生 ATP 的反应。Hu 等（2017）鉴定出 PGK1 的关键乙酰化位点 K323 由乙酰化酶 PCAF 介导。PCAF 介导的 PGK1 K323 位点乙酰化可以使 PGK1 的酶活力显著增高；敲低 PCAF 则有效降低 PGK1 乙酰化水平（Hu et al 2017）。

综上，糖酵解过程中的重要调控酶 PFKFB3、GAPDH 和 PGK1 都可以被乙酰转移酶 PCAF 乙酰化，增加酶活力，促进乳酸生成（见图 1-2）。与此相一致的是，Yao 等（2019）关于妊娠期小鼠肝脏糖酵解变化的研究结果表明，与非妊娠小鼠相比，妊娠期小鼠肝脏中 PCAF 活性较大程度地增强，糖酵解酶 PFKFB3、GAPDH 和 PGK1 的乙酰化水平和酶活性显著增加，导致妊娠小鼠肝脏中糖酵解加速，乳酸含量增加（Yao et al 2019）。值得注意的是，大多数研究都集中于病理状态如应激、炎症、癌症等条件下 PCAF 对糖酵解的调控，宰后肌肉糖酵解是否受到 PCAF 乙酰化调控研究还未见报道。

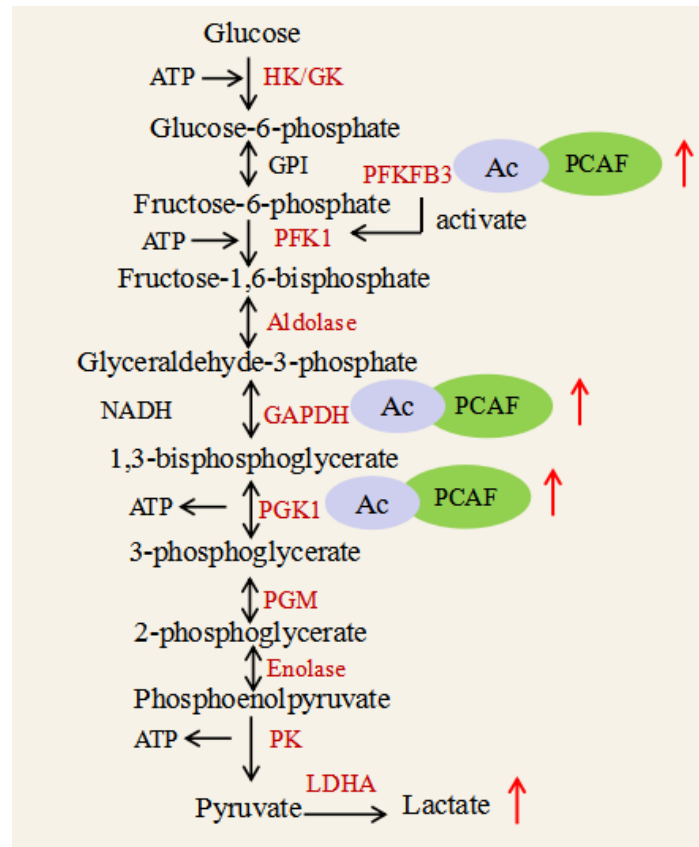


图 1-2 PCAF 对糖酵解的调控作用

Fig 1-2 The regulation effect of PCAF on glycolysis

## 5 山竹醇--PCAF 天然抑制剂

近年来，由于天然、绿色、安全、环保等特点，植物提取物在肉品质改善方面的研究越来越多，如白藜芦醇，酸藤子酚，姜黄素等（Simitzis et al 2010, Jing et al 2011, Zhang et al 2015）。山竹醇（Garcinol）提取自印度藤黄植物的干果皮，分子式为  $C_{38}H_{50}O_6$ ，分子量为 602，结构中含有官能团  $\beta$ -二酮和酚羟基，呈橙黄色粉末状，（Balasubramanyam et al 2004, Jagtap et al 2015, Lee et al 2019, 贺琼玉等 2019）（见图 1-3）。山竹醇具有良好的抗氧化、抑菌、抗炎等功效，可用来治疗糖尿病、肥胖、皮肤病、口腔癌以及乳腺癌和其他疾病（Liao et al 2004, Hong et al 2007, Liu et al 2015）。



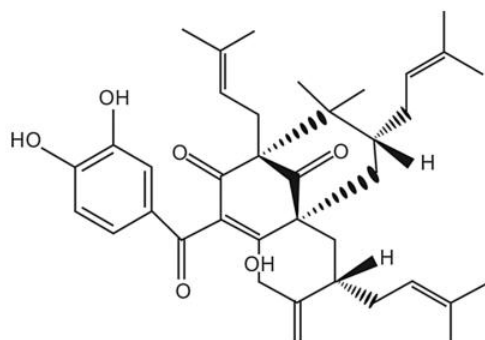


图 1-3 山竹醇的分子结构式

Fig 1-3 The molecular structure of garcinol

## 5.1 山竹醇的抗氧化活性

氧化应激被认为是众多慢性疾病的潜在共同原因，包括肥胖、糖尿病甚至癌症等（Kohen and Nyska 2002）。研究发现，山竹醇含有酚羟基和  $\beta$ -二酮，可与活性氧作用，形成共振中间稳定体，从而清除氧自由基，进而防止机体进一步的氧化损伤（Sang et al 2002，贺琼玉等 2019）。基于其抗氧化活性，山竹醇在美容护肤方面具有良好作用，能增强抗皱能力，有效延缓肌肤老化。

体外研究结果表明，山竹醇可以抑制 NO 等活性氧的生成（Tanaka et al 2000）。在脂多糖处理的星形胶质细胞中添加山竹醇能防止 NO 的聚集，同时显著降低诱导型一氧化氮合酶和环氧化酶-2 自由基的表达（Liao et al 2005）。Yamaguchi 等（2000）研究发现，山竹醇清除自由基的活性比维生素 E 高三倍（Yamaguchi et al 2000）。体内研究中，Kirana 和 Srinivasan（2010）在 2 型糖尿病大鼠氧化应激研究中发现，饲喂山竹醇可有效恢复大鼠红细胞中谷胱甘肽水平，表明了山竹醇的抗氧化作用（Kirana and Srinivasan 2010）。同时，日粮添加山竹醇可以提高乙醇灌喂大鼠肝脏内源性抗氧化剂的活性，减轻乙醇诱导的肝脏氧化损伤（Panda et al 2012）。这些研究结果证实，不管在体内还是体外，山竹醇都具有较高的抗氧化活性。

## 5.2 山竹醇对 PCAF 的抑制作用

蛋白质乙酰化由 KAT 介导，可调控蛋白质的活性、定位以及与 DNA 的互作等，在细胞代谢活动中起着重要作用。当 KAT 活性或功能异常时，会引发细胞内代谢变化。因此，通过调控乙酰转移酶表达或活性，改变蛋白乙酰化状态，可促进或抑制蛋白基因表达、酶活性或稳定性等，从而在代谢疾病上获得潜在治疗效果（Collins et al 2013）。PCAF 与高血脂、炎症以及肿瘤等疾病的发生有着重要联系，在非酒精

性脂肪肝炎、肝癌以及前列腺癌中, PCAF 表达与活性均上调 (Gong et al 2012, Hu et al 2017, Wang et al 2020)。而山竹醇被证实是 PCAF 的特异性天然抑制剂, 可显著降低 PCAF 的表达与活性, 从而调控 PCAF 介导的蛋白乙酰化状态 (Balasubramanyam et al 2004, Malatesta et al 2013)。PCAF 促进多种炎症基因的转录, 在动脉生成中起着主开关作用。有研究报道, 在小鼠后肢缺血模型中, 饲喂添加山竹醇的日粮可有效抑制 PCAF, 减缓动脉生成速度 (Bastiaansen et al 2013)。Yao 等(2019)在妊娠中晚期大鼠日粮中添加山竹醇发现, 山竹醇可以显著降低 PCAF 的活性, 减少怀孕大鼠肝脏中脂质含量, 有效缓解妊娠中晚期高脂血症 (Yao et al 2019)。贺琼玉等 (2019) 在氧化应激仔猪肝脏代谢研究中发现, 山竹醇可显著降低 PCAF mRNA 表达 (贺琼玉等 2019)。Chung 等 (2019) 在小鼠肾间质纤维化模型中发现 PCAF 表达与活性显著增高, 激活促炎基因的表达; 通过腹腔注射 PCAF 抑制剂-山竹醇 0.5 mg/kg 后, PCAF 表达与活性下调, 促炎因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 下调, 阻止了肾纤维化进展 (Chung et al 2019)。

### 5.3 山竹醇的饲喂安全性

山竹醇安全与毒性问题方面, 已有研究证实, 在大鼠日粮中分别添加 100 mg/kg 和 500 mg/kg 的山竹醇饲喂 22 周, 均未对大鼠的生长发育造成不良影响, 也没有引起大鼠肠道、肝脏和肾脏等脏器的病理变化 (Yoshida et al 2005)。同样, Majeed 等 (2018) 在测试 40% 山竹醇对实验大鼠安全性的研究中发现, 在饲喂高剂量 2000 mg/kg 山竹醇 28 d 和 90 d 的作用下, 实验大鼠没有任何异常的临床症状和行为改变, 生殖发育相关参数没有发生不良变化, 且几乎可以在所有器官中检测到山竹醇及其代谢物, 包括肝脏和肌肉 (Majeed et al 2018)。这表明山竹醇的饲喂安全性和无毒性, 即便高剂量的添加对动物也无明显副作用, 具有广泛的药理作用和研究前景, 在畜禽饲料中应用是安全可行的。

## 6 研究目的与意义

中国是猪肉消费大国, 在猪肉产量快速增加的同时, 如何生产出高品质的猪肉是养殖工作者极需重视的问题。宰后肌肉糖酵解产生乳酸导致的 pH 下降显著影响猪肉品质, 并影响肉色、系水力等其它肉质性状。研究表明, 在缺氧、应激等条件下, PCAF 可以通过修饰不同糖酵解酶来加快糖酵解, 而山竹醇是 PCAF 的天然抑制剂。那么, PCAF 是否是调控宰后猪肌肉糖酵解的重要靶点? 本试验拟通过动物

试验，探究山竹醇对宰后肌肉糖酵解核猪肉品质的调控作用及机制，预期为猪肌肉糖酵解代谢和肉品质的调控提供新的靶点和理论依据。

## 第二章 山竹醇对肥育猪宰后肌肉糖酵解和肉品质的 调控作用及机制研究

### 1 前言

宰后肌肉无氧糖酵解产生乳酸的量直接影响肉质 pH 高低,同时对系水力、猪肉嫩度等其它肉质性状产生影响。糖酵解过程受到蛋白乙酰化修饰的调控。近年来的研究表明,糖酵解相关酶 PFKFB3、GAPDH 和 PGK1 均可被乙酰转移酶 PCAF 乙酰化,增加酶活力,从而加快糖酵解。PCAF 在缺氧、应激等条件下表达或活性会显著升高(Yamanaka et al 2014, Huang et al 2015, 贺琼玉等 2019),而山竹醇是 PCAF 的天然抑制剂。目前,关于宰后肌肉糖酵解是否受到 PCAF 乙酰化调控的研究还未见报道,对于山竹醇的研究也集中在小鼠模型中。为了探究山竹醇是否可以通过作用于 PCAF 来调控宰后猪肌肉糖酵解和猪肉品质,本试验通过在肥育猪日粮中添加 0、200、400 和 600 mg/kg 的山竹醇,测定其对肥育猪的生长性能、肉品质、肌肉乳酸含量、PCAF 表达与活性及糖酵解酶乙酰化水平、酶活性等指标的影响。

### 2 材料与方法

#### 2.1 试验动物与试验设计

选取健康状况良好、体况相似的  $79.40 \pm 1.60$  kg 左右“杜×长×大”三元杂交去势公猪 80 头,根据体重相近原则随机分为 4 组,分别为对照组、200 mg/kg 山竹醇组、400 mg/kg 山竹醇组和 600 mg/kg 山竹醇组,每组 5 个重复,每个重复 4 头猪。预饲 7 d 后,开始正式试验,试验期 52 d。试验期间,对照组全程饲喂基础日粮,山竹醇组分别在基础日粮基础上添加 200、400 和 600 mg/kg 的山竹醇。

#### 2.2 试验材料

山竹醇来源于藤黄属植物果皮,由本实验室提取供应,有效含量为 32.84%。

#### 2.3 试验仪器与试剂耗材

仪器:酶标仪(MK3, Thermo 公司,美国),小型高速离心机(Sigma 公司,德国),高速匀浆机(上海净信实业发展有限公司),Lambda2 型紫外-可见光分光光度计(Perkin-Elmer 公司),102℃烘箱(吴江市立龙电热设备有限公司),4℃、-20℃冰箱(中科美菱),荧光定量 PCR 仪(Stepone plus, ABI),全套索氏萃取装

置(上海赛弗生物科技有限公司),直插式玻璃电极 pH 测定仪(pH-STAR, Germany),便携式肉色测定仪(Japan),质构仪(Brookfield 博勒飞,美国),凝胶成像仪(Tanon 2500, 中国)。

试剂与耗材: DEPC 水(上海雅吉生物科技有限公司), MagZol TM Reagent (Trizol Reagent, 美基生物), 三氯甲烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 异丙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司), 75%乙醇(国药集团化学试剂有限公司), HiScript TM Q RT SuperMix for qPCR(南京诺唯赞生物科技有限公司), 2×Taq Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司), 抗氧化酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所), PFKFB3、PFK1、GAPDH 和 PGK1 酶活测定试剂盒(南京建成生物工程研究所), 乳酸脱氢酶检测试剂盒(北京雷根生物技术有限公司), PCAF 活性测定试剂盒(Sigma, USA)

## 2.4 试验日粮与饲养管理

基础日粮参照 NRC(2012) 生长肥育猪营养需要进行配制, 其组成及营养水平见表 2-1。试验日粮为在基础日粮中添加试验设计剂量的山竹醇。

表 2-1 基础日粮组成及营养水平（风干基础，%）

Table 2-1 Composition and nutrient levels of basal diet (air-dry basis, %)

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	78.60
豆粕 Soybean meal	17.26
大豆油 Soybean oil	2.00
L-赖氨酸 L-Lys	0.20
DL-蛋氨酸 DL-Met	0.01
L-苏氨酸 L-Thr	0.03
氯化胆碱 Choline chloride	0.10
石粉 Limestone	0.55
磷酸氢钙 CaHPO <sub>4</sub>	0.62
食盐 NaCl	0.30
预混料 Premix	0.33
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels	
消化能 DE/(MJ/kg)	13.85
粗蛋白质 CP	14.52
钙 Ca	0.49
总磷 TP	0.43
有效磷 AP	0.21
可消化赖氨酸 DLys	0.74
可消化蛋氨酸 DMet	0.24
可消化蛋氨酸+胱氨酸 DMet+DCys	0.45
可消化苏氨酸 DThr	0.48
可消化色氨酸 DTry	0.14

注：预混料为每千克日粮提供：铁 100 mg，铜 15 mg，锌 120 mg，锰 40 mg，硒 0.3 mg，碘 0.25 mg，VA 13500 IU，VD<sub>3</sub> 2250 IU，VE 36 IU，VK<sub>3</sub> 4 mg，VB<sub>1</sub> 5 mg，VB<sub>2</sub> 12.5 mg，VB<sub>3</sub> 25 mg，VB<sub>5</sub> 15 mg，VB<sub>6</sub> 7.5 mg，VB<sub>12</sub> 0.05 mg，叶酸 2.4 mg，烟酸 50 mg，生物素 0.15 mg。

Note: The premix provided the following per kilogram of the diet: 100 mg of Fe (as ferrous sulfate), 15 mg of Cu (as copper sulfate), 120 mg of Zn (as zinc sulfate), 40 mg of Mn (as manganese sulfate), 0.3 mg of Se (as sodium selenite), 0.25 mg of I (as potassium iodide), 13500 IU of VA, 2250 IU of VD<sub>3</sub>, 36 IU of VE, 4 mg of VK<sub>3</sub>, 5 mg of VB<sub>1</sub>, 12.5 mg of VB<sub>2</sub>, 25 mg of VB<sub>3</sub>, 15 mg of VB<sub>5</sub>, 7.5 mg of VB<sub>6</sub>, 0.05 mg of VB<sub>12</sub>, 2.4 mg of folic acid, 50 mg of niacin, 0.15 mg of biotin.

试验在华中农业大学代谢室进行。试验前，圈舍进行彻底杀菌消毒。适应 7 d 后开始正式试验。室温保持在 26℃左右，相对湿度保持在 55%~65%，每天喂料 4 次（08:00、12:00、16:00、20:00），每次以猪吃饱后料槽内略有余料为度，自由饮水。圈舍每天打扫，注意通风换气，定期消毒，试验期为 52 d。

## 2.5 样品采集

试验结束时，每组随机选择 5 头健康且体重相近的试验猪。将猪只电击晕（220 V），迅速倒挂、主动脉放血、去毛、取出内脏、劈半，确保每头猪取样时间相同。迅速分离收集左侧胴体背最长肌，4℃保存，用于测定肉品质及肌肉乳酸含量。在右侧胴体第十肋骨前取下约 200 g 的背最长肌样本，液氮冷冻，随后-80℃冰箱保存，用于肌肉化学成分分析，RNA 提取、酶活性、乙酰化水平等测定。

## 2.6 指标测定

### 2.6.1 生长性能和胴体品质测定

试验期间准确记录每个重复试验猪每天的采食量，空腹称重，计算平均日增重（Average daily gain, ADG）、平均日采食量（Average daily feed intake, ADFI）和料重比（Feed/gain ratio, F/G）。记录宰前活体重和热胴体重量，用于计算屠宰率。测定第一肋骨、最后一根肋骨和最后一根腰椎处背膘厚，取平均值；测量左侧胴体第十根肋骨处的背最长肌面积（Longissimus dorsi muscle area, LA）。

### 2.6.2 肉品质测定

#### 2.6.2.1 肉色测定

从 4℃冰箱中取出 3.0 cm 厚的猪背最长肌样品，用于测定宰后 45 min 和 24 h 的背最长肌的肉色。使用便携式肉色测定仪进行测定，先将色度仪用矫正板标准化，然后将镜头垂直置于肉面上，镜头紧扣于肉面（不能漏光），按下摄像按钮，色度参数即自动存入微机。分别测定肉色指标 L\*（亮度值）、a\*（红度值）、b\*（黄度值），由于肉面颜色随位置而异，测量时随机选取 3 个不同位置，每个指标重复测 3 次取平均值。

#### 2.6.2.2 pH 测定

于宰后 45 min 的热胴体背最长肌中段切口插入 pH 计电极深入眼肌 1 cm 以

上, 读取  $\text{pH}_{45\text{min}}$ 。宰后背最长肌于  $4^{\circ}\text{C}$  冷却保存 24 h 后取出, 沿中段切开, 将 pH 计电极插入切口中, 读取  $\text{pH}_{24\text{h}}$ 。pH 计要事先校正, 测量时随机选取 3 个不同位置, 取平均值。

#### 2.6.2.3 蒸煮损失测定

取 50 g 经 24 h 冷藏处理的 3.0 cm 厚左侧胴体背最长肌, 将表面附着的胫腱、脂肪去除, 称重。再用塑料袋包扎好肉样, 保持袋口向上, 放入  $80^{\circ}\text{C}$  恒温水浴锅中, 加盖后持续加热, 直至肌肉中心温度达到  $70^{\circ}\text{C}$  为止, 取出肉样使肌肉冷却至  $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ , 称蒸煮后肉重, 计算蒸煮损失。

#### 2.6.2.4 滴水损失测定

用悬挂法测定肉样的滴水损失。从冰箱中取出肉样, 沿肌纤维切割成大小和重量相似的肉条, 称重。用细线系住肉条的一端, 垂直悬空于充气塑料袋内, 吊挂在  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱。24 h 后, 轻轻拭去样品表面的水分, 再次称重。计算公式为:

滴水损失 (%) =  $[\text{悬挂前肉样重 (g)} - \text{悬挂后样重 (g)}] / \text{悬挂前肉样重 (g)} \times 100\%$ 。  
每个样品做三次重复, 用平均值表示。

#### 2.6.2.5 剪切力测定

沿与肌肉自然走向 (即肌肉的长轴) 垂直的方向切取 3.0 cm 厚左右的肉块, 去除样品表面的结缔组织、脂肪和肌膜, 使其表面平整。从  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱取出肉样, 用塑料袋包扎好肉样, 保持袋口向上, 放入  $80^{\circ}\text{C}$  恒温水浴锅中, 加盖后持续加热, 直至肌肉中心温度达到  $70^{\circ}\text{C}$  为止, 取出肉样使肌肉冷却至  $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$  过夜, 平行于肌纤维的纵向方向切割样品, 然后使用纹理分析仪测量剪切力。样品重复测 3 次, 取平均值。

### 2.6.3 肌肉化学成分和乳酸含量测定

取约 50 g 猪背最长肌样品, 分别按照中华人民共和国国家标准 GB/T 18394-2020、GB/T 5009.5-2016、GB/T 5009.6-2016 来测定肌肉样品中水分、粗蛋白和脂肪的含量。肌红蛋白含量测定根据文献陈铭等 (1998) 所述, 称取 1 g 左右的猪背最长肌样品, 加入 10 倍体积的缓冲液 ( $\text{pH} 7.2$ ), 彻底匀浆后高速离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $10000 \text{ r/min}$ ) 10 min, 将离心上清液吸入另一离心管, 再次高速离心 ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $10000 \text{ r/min}$ ) 10 min, 取离心上清液用分光光度计测定吸光度值, 通过标准曲线换算成肌红蛋白



浓度值，分析肌红蛋白含量。使用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒分别测定肌肉组织样品中丙二醛（Malondialdehyde, MDA）、糖原、葡萄糖+6-磷酸葡萄糖含量和宰后 45 min 和 24 h 时猪肌肉中乳酸含量。

## 2.6.4 酶活力测定

称取约 5 g 肌肉样本，用于测定肌肉糖酵解相关酶和 PCAF 活性。糖酵解酶 PFKFB3、PFK1、GAPDH、PGK1 活性和抗氧化酶超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase, SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（Glutathione peroxidase, GSH-Px）、过氧化氢酶（Catalase, CAT）和总抗氧化能力（Total antioxidant capacity, T-AOC）活性均使用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定。LDHA 的活性是通过检测在 25℃ 丙酮酸还原为乳酸后，在 340 nm 处 NADH 的吸光度降低的速率来测定的（Kaloustian et al 1969），具体检测过程参照北京雷根生物技术有限公司提供的试剂盒进行。PCAF 的酶活性用活性测定试剂盒（Sigma, USA）测定。

## 2.6.5 RNA 提取、反转录和荧光定量

### （1）总 RNA 提取

取匀浆管，加入 1 mL 的 Trizol Reagent，置于冰上预冷，取 0.1 g 组织，加入到匀浆管中，使用匀浆仪充分研磨直至无可见组织块，12000 r/min 离心 10 min，转移上清液至新的离心管中。加入 200  $\mu$ L 氯仿，剧烈震荡 15 s，静置 5 min。4℃ 12000 r/min 离心 15 min，小心吸取上清 500  $\mu$ L 转到离心管，加入等体积异丙醇，上下颠倒混匀，室温静置 10 min。4℃ 12000 r/min 离心 10 min，含有 RNA 的白色沉淀在离心管底部。弃上清，每管加入 1 mL DEPC 水配置的 75% 乙醇，涡旋混匀。4℃ 12000 r/min 离心 5 min，弃上清，用 100  $\mu$ L 移液枪将剩余的 75% 的乙醇弃掉。在超净台将 RNA 沉淀吹 5~10 min 至半透明胶状。加 30~40  $\mu$ L DEPC 处理水或 TE 缓冲液溶解 RNA 沉淀。60℃ 孵育 10 min，小心混匀样品，使用核酸蛋白测定仪检测 RNA 的浓度与纯度，吸光度 260/280 在 1.8~2.0 之间较为理想。测定浓度后保存于 -80℃ 冰箱备用。

### （2）RNA 反转录为 cDNA

按照下表配制逆转录反应体系，配制完成后放入 PCR 仪，42℃ 反应 60 min，99℃ 反应 5 min，25℃ 反应 20 min。

表 2-2 逆转录反应体系

Table 2-2 Formula of reverse transcription

试剂	使用量
总 RNA	2.5 $\mu\text{g}$
Oligo(dT) <sub>20</sub>	3 $\mu\text{L}$
5 $\times$ buffer	5 $\mu\text{L}$
dNTPs (10 mmol/L)	2.5 $\mu\text{L}$
RNAse 抑制剂 (40 U/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
ReverTra Ace (100 U/ $\mu\text{L}$ )	1.25 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	补足到 25 $\mu\text{L}$

### (3) 荧光定量 PCR

PCR 反应体系为 10  $\mu\text{L}$ : 5  $\mu\text{L}$  SYBR Premix Ex Taq, 0.4  $\mu\text{L}$  上游引物, 0.4  $\mu\text{L}$  下游引物, 1  $\mu\text{L}$  cDNA, 3.2  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。采用 Primer 5.0 软件设计引物, PCR 引物序列见表 2-3。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 在各基因最佳退火温度下退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 共 40 个循环; PCR 反应后绘制熔解曲线以判断扩增产物的正确性, 温度以 0.5 $^{\circ}\text{C}/5$  s 的速度从 60 $^{\circ}\text{C}$  上升到 95 $^{\circ}\text{C}$ 。以 18s RNA 为内参, 对得到的各样品 CT 值进行均一化处理, 在各靶基因与 18s RNA 的扩增效率基本一致条件下, 以对照组基因的表达水平为基准, 通过  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法对相关基因的表达水平进行比较分析。

表 2-3 基因引物序列

Table 2-3 Primer sequences of genes

基因名称	引物序列	产物大小
Gene names	Primer sequences (5'—3')	Product size/bp
6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3	F: CCGCATCGTGTACTACCTGAT	223
PFKFB3	R: CGTCTGGATGGTGCTCTTCA	
磷酸果糖激酶	F: CCGCATCAAGCAGTCAGCAG	62
PFK1	R: AGCCAGGTAGCCACAGTAGC	
甘油醛-3-磷酸脱氢酶	F: GGAGCGAGATCCCGCCAACA	158
GAPDH	R: ACATGGGGGCATCGGCAGAA	
磷酸甘油酸激酶 1	F: GGTGGAATGGCCTTTACCTT	186
PGK1	R: GCCAATCTTGGCATTCTCAT	
乳酸脱氢酶 A	F: ACAGTGCTGACACTCTGTGG	179
LDHA	R: CTGGGAGCCCACATTCACAT	
肌球重链蛋白 I	F: AAGGGCTTGAACGAGGAGTAGA	115
MyHC I	R: TTATTCTGCTTCCTCCAAAGGG	
肌球重链蛋白 IIa	F: GCTGAGCGAGCTGAAATCC	137
MyHC IIa	R: ACTGAGACACCAGAGCTTCT	
肌球重链蛋白 IIx	F: AGAAGATCAACTGAGTGAAC	149
MyHC IIx	R: AGAGCTGAGAACTAACGTG	
肌球重链蛋白 IIb	F: ATGAAGAGGAACCACATTA	166
MyHC IIb	R: TTATTGCCTCAGTAGCTTG	
P300-CBP 结合因子	F: CCTGCCGATGGCTATGAAGT	213
PCAF	R: ACAGATGCTTCGGCAGATCC	
18s RNA	F: GAGCGAAAGCATTTGCCAAG	101
	R: GGCATCGTTTATGGTCGGAAC	

## 2.6.6 Western Blot 检测蛋白表达量

### (1) 蛋白的提取

把背最长肌样品剪切成细小的碎片，融解 Western 及 IP 蛋白质裂解液，混匀。取适当量的裂解液，在使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂 PMSF，使 PMSF 的最终浓度为 1 mmol/L。按照每 20 mg 组织加入 150~250  $\mu$ L 裂解液的比例加入裂解液。用玻璃匀浆器匀浆，直至充分裂解。充分裂解后，10000~14000 r/min 离心 3-5 min，取上清，根据 BCA 试剂盒的使用方法，测蛋白浓度，-80℃保存备用。按照比例添加 5x 上样缓冲液，至 1x 上样缓冲液，100℃煮沸 5-10 min，混合瞬离备用。

### (2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

胶板的制备：玻璃板和胶条事先洗净、晾干、装好，分离胶的各组分充分混匀后缓慢注入安装好的两玻板间，并在刚注入的分离胶上方轻缓地加入 1 mL 75% 乙醇液封以隔绝空气，注意加入乙醇时避免在固定位置一次性打入，冲散分离胶。室温静置一段时间后待分离胶凝固，倒弃乙醇，用滤纸吸干残留液体，再将混合好的浓缩胶加入两玻板间，及时将梳子垂直插入胶内，室温静置 30 min。按照下表进行 10% 分离胶与 5% 浓缩胶的制备。

表 2-4 分离胶及浓缩胶成分表

Table 2-4 The formula of separating gel and stacking gel

试剂	10% 分离胶	5% 浓缩胶
H <sub>2</sub> O	5.900 mL	4.100 mL
30% Acrylamide	5.000 mL	1.000 mL
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	3.800 mL	--
1.5M Tris-HCl (pH6.8)	--	0.750 mL
10% SDS	0.150 mL	0.060 mL
10% AP (过硫酸铵)	0.150 mL	0.060 mL
TEMED	0.006 mL	0.006 mL

点样及电泳：拆除两玻板间的胶条，重新组装好玻板，倾斜着放入装有电泳液的电泳槽中，避免向凝胶底部引入气泡。往内槽中央加满电泳液，垂直向上拔去梳子，保证点样孔完整。蛋白样品在沸水中煮 8~10 min，置于冰上冷却，样品及预染蛋白 marker 加入上样孔内。采用 80 V 低电压进行浓缩胶电泳，当样品进入分离胶

后将电压调高至 120 V, 根据预染的蛋白 marker 判断目的蛋白的位置决定电泳时间。

电转: 电泳结束后将分离胶切下, 转移至湿润的滤纸上, 聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜提前在甲醇中浸泡 15 s 活化, 按以下顺序组装电转“三明治”: 滤纸、分离胶、PVDF 膜、滤纸, 用玻棒赶尽每层之间的气泡, 装好夹子后放入电转槽中, 注意正负极的安装, 倒入转膜缓冲液, 整个装置置于装满冰的冰盒中, 恒流 200 mA 转膜 1 h。

封闭: 电转结束后, PVDF 膜用 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min, 漂洗后的膜转移至封闭液中, 摇床室温低速封闭 1~2 h。

一抗孵育: 一抗按一定的比例用一抗稀释液稀释之后制成工作液, 将一抗工作液及 PVDF 膜放入分子杂交袋中, 室温下摇动孵育 1~2 h 或 4℃孵育过夜。

二抗孵育: 一抗孵育结束后, PVDF 膜用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min。二抗按一定稀释比例用二抗稀释液稀释之后制成工作液, 将二抗工作液及 PVDF 膜加入杂交袋中, 摇床室温低速孵育 2 h。

显影: 二抗孵育结束后, PVDF 膜用 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min。将 A、B 液按 1:1 配制, 在一试管中各加入 400  $\mu$ L 的 A 液和 B 液。用滤纸吸干膜上的 TBST, 在膜上均匀涂布配制好的显色液, 并放入成像仪中关好仪器仓门, 根据蛋白表达丰度选择曝光时间并进行设置, 将显色好的图片进行微调并保存到指定文件夹中。

## 2.6.7 免疫共沉淀

每 100 mg 背最长肌样品加入 1 mL 裂解液, 在冰上裂解 30 min。将裂解液转移到离心管中, 4℃条件下 12000 r/min 离心 15 min 获得上清液。

取少量裂解液用于 western blot 检测。剩余裂解液加入相应抗体 1  $\mu$ g, 轻混匀后, 4℃摇晃孵育过夜。

取 10  $\mu$ L protein A 琼脂糖珠, 用适量裂解缓冲液冲洗 3 次, 每次 3000 r/min 离心 3 min。将预处理过的 10  $\mu$ L protein A 琼脂糖珠加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中 4℃缓慢摇晃孵育 2~4 h, 使抗体与 protein A 琼脂糖珠偶联。

免疫沉淀反应后, 在 4℃以 3000 r/min 离心 3 min, 将琼脂糖珠离心到管底。将上清小心吸去, 琼脂糖珠用 1 mL 裂解缓冲液洗 3~4 次; 最后加入 15  $\mu$ L 的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 沸水煮 5 分钟, 然后按照上述 western blot 实验步骤进行电泳。

## 2.7 数据处理与统计分析

所有数据均采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。试验数据采用单因素方差

分析, Duncan 氏法进行多重比较, 结果以“平均值 $\pm$ 标准差”形式表示,  $P<0.05$  表示差异显著,  $P>0.05$  表示差异不显著。

### 3 结果与分析

#### 3.1 山竹醇对肥育猪生长性能和胴体性状的影响

由表 2-5 可知, 生长性能方面, 与对照组相比, 三个添加剂量的山竹醇组猪 ADG 均显著增高 ( $P<0.05$ ), 低、中剂量山竹醇组猪的 ADG 无显著差异 ( $P>0.05$ ), 但显著低于 600 mg/kg 山竹醇组 ( $P<0.05$ )。与基础日粮相比, 200 mg/kg 山竹醇对 F/G 无显著影响 ( $P>0.05$ ), 但中和高剂量的山竹醇显著降低 F/G ( $P<0.05$ ); 各组之间 ADFI 未呈现显著的差异 ( $P>0.05$ )。胴体性状方面, 山竹醇对猪末重、胴体重、屠宰率、第十根肋骨处的背最长肌面积 (LA) 以及最后一根肋骨处背膘厚无显著差异 ( $P>0.05$ ), 但显著降低第一根肋骨处和最后一根腰椎处背膘厚以及平均背膘厚 ( $P<0.05$ ), 且 600 mg/kg 山竹醇组猪平均背膘厚最低。

表 2-5 山竹醇对肥育猪生长性能和胴体性状的影响

Table 2-5 The effect of dietary garcinol on growth performance and carcass traits  
of finishing pigs

项目	对照组	山竹醇组 Garcinol groups			SEM	P 值
Items	Con	200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg		
平均日采食量 ADFI (g/d)	2748.32	2777.61	2753.42	2748.15	15.45	0.841
平均日增重 ADG (g/d)	880.20 <sup>c</sup>	902.30 <sup>b</sup>	918.83 <sup>b</sup>	934.41 <sup>a</sup>	7.31	0.029
料肉比 F/G	3.12 <sup>a</sup>	3.08 <sup>a</sup>	2.99 <sup>b</sup>	2.94 <sup>b</sup>	0.02	0.018
末重 (kg)	125.14	126.32	127.25	127.90	2.54	0.502
胴体重 (kg)	91.66	93.11	95.60	94.93	1.35	0.194
屠宰率 (%)	73.22	73.70	75.23	74.28	0.19	0.230
LA (cm <sup>2</sup> )	57.40	57.50	58.27	58.71	0.03	0.371
背膘厚 (cm)						
第一根肋骨处	4.48 <sup>a</sup>	3.98 <sup>b</sup>	3.95 <sup>b</sup>	3.78 <sup>c</sup>	0.02	0.023
最后一根肋骨处	2.21	2.24	2.25	2.27	0.03	0.069
最后一根腰椎处	2.77 <sup>a</sup>	2.47 <sup>b</sup>	2.39 <sup>b</sup>	2.24 <sup>c</sup>	0.09	0.017
平均背膘厚	3.15 <sup>a</sup>	2.90 <sup>b</sup>	2.86 <sup>b</sup>	2.76 <sup>c</sup>	0.10	0.008

### 3.2 山竹醇对猪肉品质的影响

由表 2-6 结果可知, 与对照组相比, 低、中剂量的山竹醇对猪肉  $\text{pH}_{45\text{min}}$  无显著影响 ( $P>0.05$ ), 但 600 mg/kg 山竹醇显著提高  $\text{pH}_{45\text{min}}$  ( $P<0.05$ )。三个添加剂量的山竹醇均显著提高猪肉  $\text{pH}_{24\text{h}}$ 、肉色  $a^*$  和  $b^*_{24\text{h}}$  值 ( $P<0.05$ ), 并显著降低肉色  $L^*_{24\text{h}}$  值、滴水损失以及猪肉剪切力 ( $P<0.05$ ); 各组之间宰后猪肉  $L^*_{45\text{min}}$ 、 $b^*_{45\text{min}}$  值以及蒸煮损失无显著差异 ( $P>0.05$ )。此外, 低、中剂量的山竹醇组的肉质性状无显著差异 ( $P>0.05$ ), 且在猪肉  $\text{pH}_{45\text{min}}$ 、 $\text{pH}_{24\text{h}}$ 、 $a^*_{45\text{min}}$ 、嫩度和系水力方面显著低于 600 mg/kg 山竹醇组 ( $P<0.05$ )。

表 2-6 山竹醇对猪肉品质的影响

Table 2-6 The effect of garcinol supplementation on pork quality

项目	对照组	山竹醇组 Garcinol groups			SEM	P 值
Items	Con	200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg		
$\text{pH}_{45\text{min}}$	6.06 <sup>b</sup>	6.11 <sup>b</sup>	6.13 <sup>b</sup>	6.22 <sup>a</sup>	0.05	0.046
$\text{pH}_{24\text{h}}$	5.56 <sup>c</sup>	5.66 <sup>b</sup>	5.68 <sup>b</sup>	5.78 <sup>a</sup>	0.06	0.035
肉色参数						
$L^*_{45\text{min}}$	45.71	46.22	46.92	47.29	2.23	0.065
$a^*_{45\text{min}}$	5.02 <sup>c</sup>	6.25 <sup>b</sup>	6.21 <sup>b</sup>	6.34 <sup>a</sup>	0.18	0.009
$b^*_{45\text{min}}$	3.74	3.72	3.78	3.81	0.11	0.092
$L^*_{24\text{h}}$	55.90 <sup>a</sup>	53.31 <sup>b</sup>	52.70 <sup>b</sup>	52.48 <sup>b</sup>	2.06	0.037
$a^*_{24\text{h}}$	6.31 <sup>b</sup>	7.54 <sup>a</sup>	7.57 <sup>a</sup>	7.62 <sup>a</sup>	0.11	0.006
$b^*_{24\text{h}}$	5.65 <sup>b</sup>	5.79 <sup>a</sup>	5.83 <sup>a</sup>	5.85 <sup>a</sup>	0.15	0.028
剪切力 (kg)	4.66 <sup>a</sup>	4.31 <sup>b</sup>	4.26 <sup>b</sup>	4.17 <sup>c</sup>	0.07	0.005
滴水损失 (%)	2.03 <sup>a</sup>	1.63 <sup>b</sup>	1.59 <sup>b</sup>	1.49 <sup>c</sup>	0.03	0.003
蒸煮损失 (%)	33.62	32.55	32.30	32.00	2.24	0.120

### 3.3 山竹醇对肥育猪肌肉抗氧化功能的影响

由表 2-7 数据可得知, 与基础日粮相比, 山竹醇显著提高猪肌肉 T-AOC、GPx、CAT 的酶活性 ( $P<0.05$ ), 低、中剂量山竹醇组和对照组间猪肌肉 SOD 活性差异不显著 ( $P>0.05$ ), 但 600 mg/kg 山竹醇组猪肌肉中 SOD 的活性显著低于对照组

( $P<0.05$ )。同时,山竹醇显著减少猪肌肉中 MDA 含量( $P<0.05$ ),但三个添加剂量的山竹醇组间猪肌肉 MDA 含量无显著差异( $P>0.05$ );

表 2-7 山竹醇对肥育猪肌肉抗氧化功能的影响

Table 2-7 The effect of dietary garcinol on muscle antioxidant ability of finishing pigs

项目	对照组	山竹醇组 Garcinol groups			SEM	P 值
Items	Con	200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg		
MDA (nmol/mg prot)	2.52 <sup>a</sup>	2.15 <sup>b</sup>	2.04 <sup>b</sup>	1.98 <sup>b</sup>	0.09	0.006
GPx (U/mg prot)	62.43 <sup>c</sup>	66.50 <sup>b</sup>	71.39 <sup>a</sup>	72.85 <sup>a</sup>	4.12	0.020
CAT (U/mg prot)	110.21 <sup>c</sup>	115.24 <sup>b</sup>	117.60 <sup>b</sup>	121.40 <sup>a</sup>	9.78	0.031
SOD (U/mg prot)	16.52 <sup>b</sup>	17.06 <sup>b</sup>	17.23 <sup>b</sup>	19.65 <sup>a</sup>	1.17	0.040
T-AOC (U/mg prot)	1.28 <sup>c</sup>	1.72 <sup>b</sup>	1.89 <sup>a</sup>	1.94 <sup>a</sup>	0.15	0.004

### 3.4 山竹醇对肥育猪肌肉 MyHC mRNA 表达的影响

由图 2-1 结果可知,各组之间猪肌肉 MyHC I 型和 IIx 型的 mRNA 表达无显著差异( $P>0.05$ ),但山竹醇显著提高猪肌肉中 MyHC IIa 型的 mRNA 表达( $P<0.05$ );与对照组相比,200 mg/kg 山竹醇对猪肌肉 MyHC IIb 型 mRNA 表达无显著影响( $P>0.05$ ),但中、高剂量山竹醇可显著降低猪肌肉中 MyHC IIb 型 mRNA 表达( $P<0.05$ )。

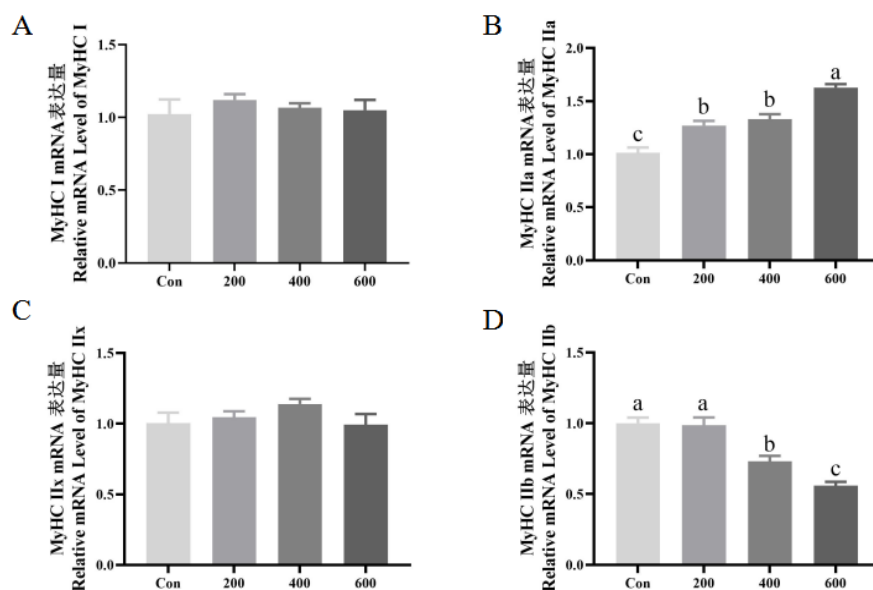


图 2-1 山竹醇对猪肌肉 MyHC mRNA 表达的影响

Fig. 2-1 The effects of garcinol on MyHC mRNA levels in muscle of finishing pigs.



### 3.5 山竹醇对肥育猪肌肉化学成分和宰后乳酸含量的影响

由表 2-8 中数据可以得知，与对照组相比，山竹醇显著增加猪肌肉中肌红蛋白含量 ( $P<0.05$ )，对肌肉中水分、粗蛋白、肌内脂肪以及糖原、葡萄糖+6-磷酸葡萄糖含量无显著影响 ( $P>0.05$ )。三个添加剂量的山竹醇均显著降低宰后 45 min 和 24 h 猪肌肉中乳酸含量 ( $P<0.05$ )，低、中剂量山竹醇组猪肌肉化学成分和宰后乳酸含量无显著差异 ( $P>0.05$ )，但宰后 45 min 和 24 h 肌肉乳酸含量均显著高于 600 mg/kg 山竹醇组 ( $P<0.05$ )。

表 2-8 山竹醇对肥育猪肌肉化学成分和宰后乳酸含量的影响

Table 2-8 The effect of garcinol on muscle chemical composition and postmortem

项目 Items	对照组 Con	山竹醇组 Garcinol groups			SEM	P 值
		200 mg/kg	400 mg/kg	600 mg/kg		
水分 (%)	70.25	71.30	70.66	71.03	1.06	0.093
粗蛋白 (%)	21.29	21.64	21.80	22.37	0.61	0.179
肌内脂肪 IMF (%)	3.68	3.55	3.51	3.57	0.15	0.086
肌红蛋白 (mg/g)	1.64 <sup>b</sup>	2.04 <sup>a</sup>	2.10 <sup>a</sup>	2.22 <sup>a</sup>	0.06	0.010
糖原 (μmol/g)	8.87	8.81	8.78	8.72	0.53	0.091
葡萄糖+6-磷酸葡萄糖 (μmol/g)	4.13	4.05	4.09	4.11	0.22	0.125
乳酸 <sub>45min</sub> (μmol/g)	39.10 <sup>a</sup>	31.65 <sup>b</sup>	30.53 <sup>b</sup>	26.58 <sup>c</sup>	1.04	0.004
乳酸 <sub>24h</sub> (μmol/g)	73.19 <sup>a</sup>	62.40 <sup>b</sup>	60.32 <sup>b</sup>	54.14 <sup>c</sup>	2.10	0.038

### 3.6 山竹醇对肥育猪肌肉 PCAF 表达和活性的影响

由图 2-2 A 结果可得出，与对照组相比，低剂量山竹醇组猪肌肉中 PCAF 表达无显著差异 ( $P>0.05$ )，但中、高剂量山竹醇组 PCAF mRNA 表达显著降低 ( $P<0.05$ )；由图 2-2 B 结果可知，三个添加剂量的山竹醇均可显著降低中猪肌肉中 PCAF 活性 ( $P<0.05$ )，且 600 mg/kg 山竹醇组猪肌肉中 PCAF 活性显著低于 200 和 400 mg/kg 山竹醇组 ( $P<0.05$ )。

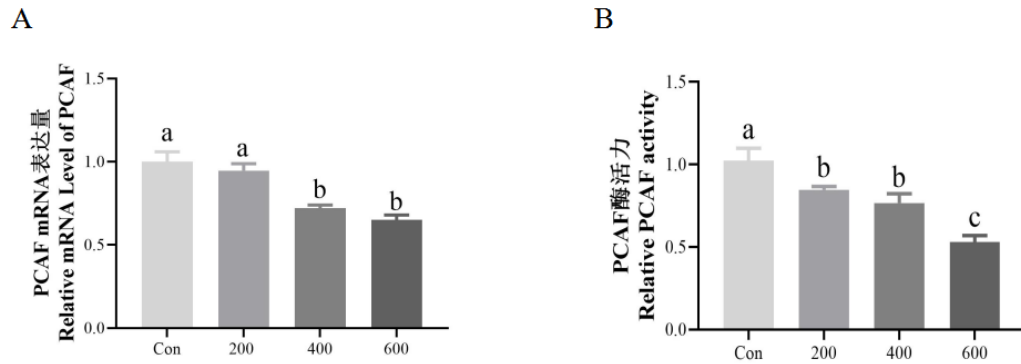


图 2-2 山竹醇对肥育猪肌肉 PCAF mRNA 表达及活性的影响

Fig. 2-2 The effect of garcinol on PCAF mRNA expression and activity in the muscle of finishing pigs.

### 3.7 山竹醇对肥育猪肌肉糖酵解酶乙酰化水平的影响

由图 2-3 结果可以看出，三个添加剂量的山竹醇组猪肌肉中糖酵解酶 PFKFB3、GAPDH 和 PGK1 的乙酰化水平均显著低于对照组 ( $P<0.05$ )，且 600 mg/kg 山竹醇组糖酵解酶 PFKFB3、GAPDH 和 PGK1 乙酰化程度最低。

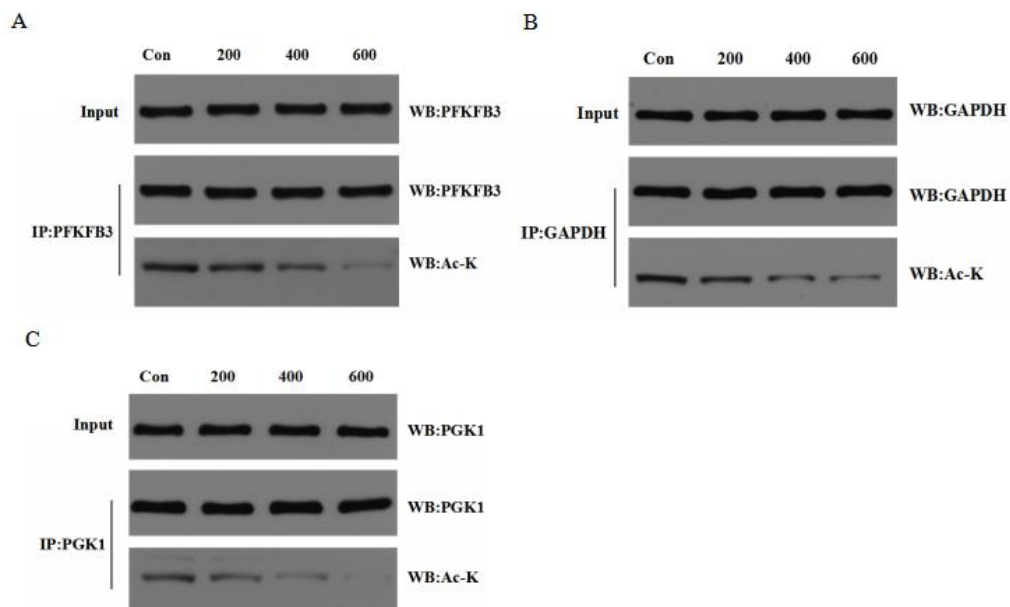


图 2-3 山竹醇对肥育猪肌肉糖酵解酶乙酰化水平的影响

Fig. 2-3 The effect of garcinol supplementation on acetylation levels of glycolytic enzymes in the muscle of finishing pigs.

### 3.8 山竹醇对肥育猪肌肉糖酵解酶 mRNA 表达和活性的影响

由图 2-4 可看出，与对照组相比，日粮添加山竹醇对猪肌肉糖酵解酶 PFKFB3、PFK1、GAPDH、PGK1 和 LDHA mRNA 表达无显著差异 ( $P>0.05$ )。由图 2-5 结果可知，与对照组相比，三个添加剂量的山竹醇均显著降低猪肌肉中糖酵解酶 PFKFB3、PFK1、GAPDH 和 LDHA 的活性 ( $P<0.05$ )，且 PFKFB3、PFK1 和 LDHA 酶活性在低、中剂量山竹醇组无显著差异 ( $P>0.05$ )。PGK1 活性方面，对照组和 200 mg/kg 山竹醇组猪肌肉 PGK1 的活性无显著差异 ( $P>0.05$ )，并显著低于中、高剂量山竹醇组猪肌肉 PGK1 的活性 ( $P<0.05$ )。

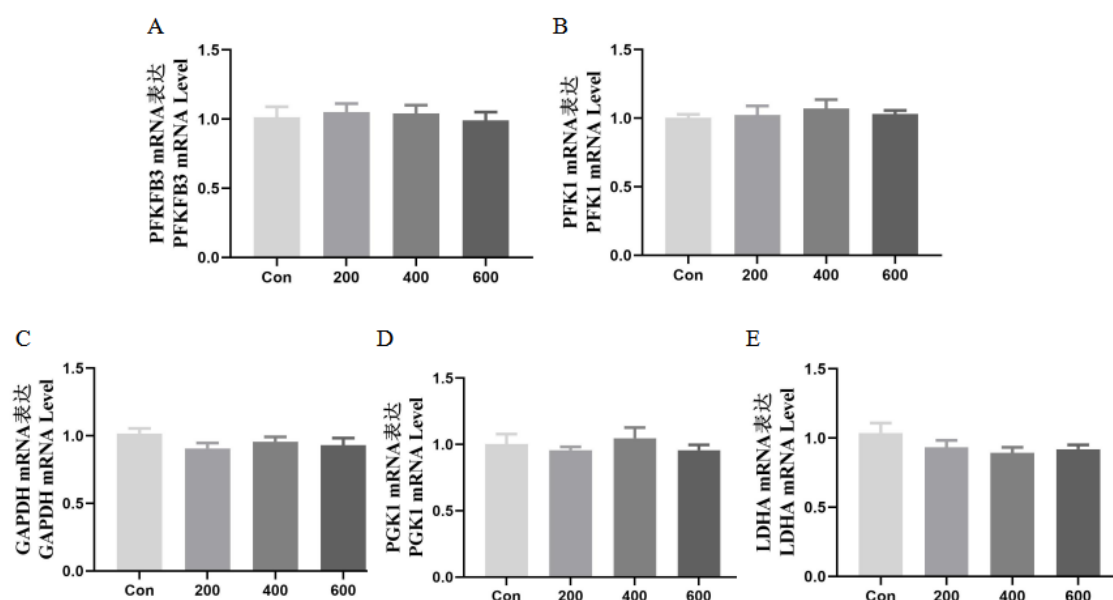


图 2-4 山竹醇对肥育猪肌肉糖酵解酶 mRNA 表达的影响

Fig. 2-4 The effect of garcinol on mRNA expression levels of glycolytic enzymes in the muscle of finishing pigs.

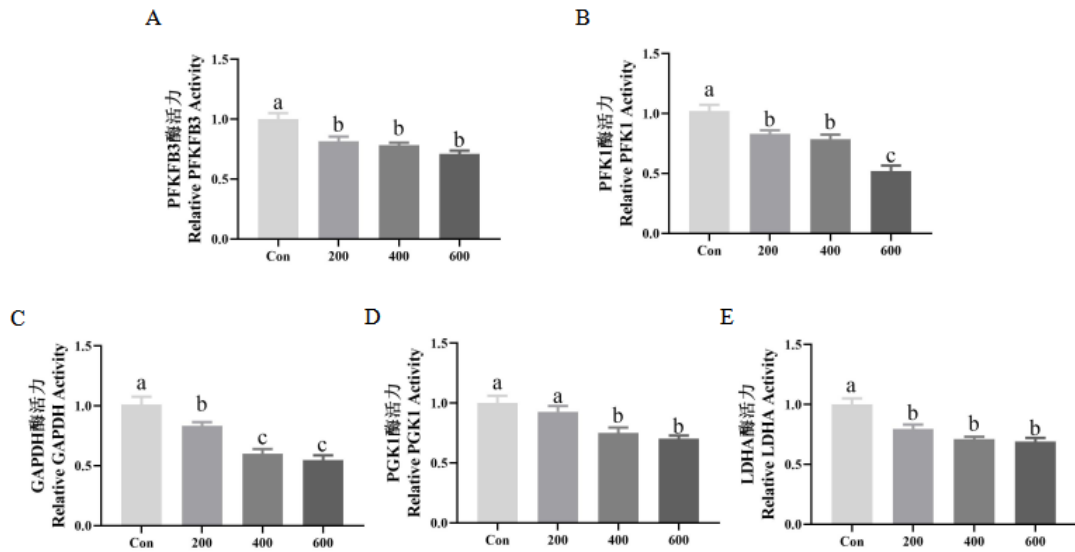


图 2-5 山竹醇对肥育猪肌肉糖酵解酶活性的影响

Fig. 2-5 The effect of garcinol on the activities of glycolytic enzymes  
in the muscle of finishing pigs.

## 4 讨论

### 4.1 山竹醇对肥育猪生长性能和胴体性状的影响

山竹醇提取自藤黄科或藤黄属植物干果皮，与姜黄素结构类似。张靖等（2011）在研究姜黄素对猪肉品质的影响时发现，日粮添加 400 mg/kg 姜黄素时对猪肉品质的改善效果最好（张靖等 2011）。而对于山竹醇的研究多集中在鼠上面，在猪上面的研究较少。大多数研究表明，在大鼠模型中，饮食给予山竹醇安全无副作用，在高剂量单次剂量为 2000 mg/kg 条件下，未发现大鼠肝、肾、肺、心脏或食道器官系统的组织学或病理学改变（Majeed et al 2018, Semwal et al 2015）。本实验中，猪日粮中山竹醇添加量为 200、400 和 600 mg/kg，整个试验阶段未发现猪只出现不良反应，说明在猪日粮中添加这三个剂量浓度的山竹醇是安全可行的。

山竹醇具有广泛的药理作用。大量研究表明，山竹醇在抗菌、抗炎、抗肥胖、抗氧化以及抗癌方面都取得显著的效果（Pei-Sheng et al 2018, Panda et al 2012, Liu et al 2015）。基于山竹醇的这些功能，日粮添加山竹醇对猪的生长速度以及胴体性状可能有较好地改善作用。在本实验中发现，日粮添加山竹醇对肥育猪 ADFI 无显著影响，但显著增加 ADG，降低 F/G 和平均背膘厚，这说明山竹醇可提高猪的生长性能，改善猪胴体性状。Wang 等（2020）发现山竹醇可改善断奶仔猪肠道屏障受损，

增加肠绒毛高度,减轻肠道炎症反应,降低仔猪空肠和回肠粘膜中 IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的水平。同时,山竹醇能抑制仔猪肠道内大多数有害细菌,并且有利于乳酸菌等的生长(Wang et al 2020)。因此,山竹醇对猪生长性能的提高很可能是因为山竹醇的抗菌、抗炎以及抗氧化等作用,改善猪肠道微环境,提高肠道对营养物质的吸收与利用,从而提高猪生长速度。对于背膘厚的改善,可能是因为山竹醇的抗肥胖作用,减少了猪皮下脂肪沉积。

## 4.2 山竹醇对猪肉品质的影响

在集约化养殖模式下,遗传、营养、环境、外界刺激以及药物使用等多方面因素都会影响猪肉品质。而随着经济发展和居民生活质量的提高,人们对高品质猪肉的需求也日渐增加。因此,提高猪肉品质是养殖工作者亟待解决的问题。近年来,天然植物提取物如酸藤子酚、白藜芦醇、原花青素等由于其绿色、安全、环保,并且具有广泛的生物学功能,吸引了众多肉品质研究者的关注。目前,关于山竹醇对猪肉品质的调控作用以及作用机制鲜见报道。本研究发现,日粮添加山竹醇能显著提高猪肉 pH<sub>24h</sub> 和肉色 a\* 值,显著降低 L\*<sub>24h</sub> 和滴水损失。已知宰后 pH<sub>24h</sub> 值在 5.6~5.8 范围内的猪肉品质较为理想,pH 过低会导致肌肉蛋白变性,使得肌肉保持自身水分的能力降低,肉色呈现灰白色(Kim et al 2013, Li et al 2016)。当 pH<sub>24h</sub> 低于 5.5 则为 PSE 肉,表现为高 L\*,低 a\*,低系水力(李琼 2017)。本实验中,未添加山竹醇组猪肉 pH<sub>24h</sub> 为 5.54,而 200、400 和 600 mg/kg 山竹醇组猪肉 pH<sub>24h</sub> 值显著提高,均在猪肉 pH<sub>24h</sub> 值理想范围内(5.6~5.8),且猪肉 L\*<sub>24h</sub> 显著降低,a\* 显著增加,猪肉色泽得到很好地改善,同时猪肉系水力提高。这表明,日粮添加山竹醇可通过提高猪肉 pH,改善肉品质,预防和减少猪生产中劣质猪肉的产生,从而降低劣质猪肉问题所带来的经济损失。且在本试验三个添加剂量的山竹醇组中,600 mg/kg 山竹醇对猪肉品质的改善效果最佳,200 和 400 mg/kg 山竹醇组之间猪肉品质没有显著差异。

## 4.3 山竹醇对肥育猪肌肉抗氧化功能的影响

正常养殖条件下,猪机体内自由基含量维持在正常范围内。在猪生产中,高温、养殖密度大、饲料霉变、缺乏维生素等因素都会引起猪体内自由基的增多,宰前运输、屠宰方式以及肉产品加工贮存条件不当也会造成猪肌肉中自由基的大量增加,影响肉的风味、色泽等肉质性状。因此,越来越多抗氧化剂被添加到猪日粮中,如

白藜芦醇、硒、维生素 E、植物多酚等，用于改善猪生长性能和肉品质。

研究发现，植物提取物山竹醇具有很好的抗氧化效果，能有效减少机体内活性氧自由基（Panda et al 2012, Liu et al 2015）。Jing 等（2014）在脂多糖/D-半乳糖胺诱导小鼠凋亡性肝损伤的研究中发现，小鼠日粮添加 700 mg/kg 的山竹醇可有效降低小鼠肝脏中活性氧自由基和丙二醛的含量（Jing et al 2014）。在链脲佐菌素诱导的大鼠氧化应激中，饲喂山竹醇可有效恢复大鼠红细胞中谷胱甘肽水平（Kirana and Srinivasan 2010）。本研究发现，三个添加剂量的山竹醇均显著增加猪肌肉中 GPx、CAT 和 T-AOC 的活性，显著降低猪肌肉中 MDA 含量。对山竹醇的抗氧化机制进行化学研究发现，山竹醇的官能团酚羟基与  $\beta$ -二酮可以抑制 NO 等自由基的形成，可以与活性氧作用生成共振中间稳定体，从而减轻氧化反应对机体所造成的不良作用（Sang et al 2002）。

#### 4.4 山竹醇对肥育猪肌肉化学成分和宰后乳酸含量的影响

随着生活质量的提高，人们对猪肉的需求在逐渐由“吃饱”向“吃健康”过渡，人们不再追求猪肉数量，而是更关注猪肉的营养价值与食用口感。肌肉中常规营养成分如水分、粗蛋白、肌肉脂肪含量反映猪肉营养价值的高低，同时侧面反映出饲料营养物质在猪体内的吸收与沉积率。猪肉色泽是消费者用来评价肉品质优劣的感官指标，主要受肌红蛋白含量（Mb）的影响。肌红蛋白含量越高， $a^*$ 越大（Bekhit and Faustman 2005，雷剑等 2010，Yu et al 2017）。本研究发现，日粮添加山竹醇对肌肉中水分、粗蛋白、IMF 含量均无显著作用，但显著增加猪肌肉中肌红蛋白含量，且 600 mg/kg 山竹醇组猪肌肉中 Mb 含量最高。这说明日粮添加山竹醇对猪肉营养价值无显著影响，但显著增加肌肉中 Mb 含量，提高肉色  $a^*$ 值。

肌肉转化为肉的过程涉及一系列代谢变化，其中宰后糖酵解产生的乳酸是导致猪肉 pH 下降以及影响其他肉质性状的主要原因（Melody et al 2004，王恒 2007）。本研究发现，日粮添加山竹醇显著降低宰后 45 min 和 24 h 猪肉中乳酸含量。这表明，日粮添加山竹醇减缓了宰后猪肌肉糖酵解，减少了猪肌肉乳酸生成，这与上述山竹醇提高猪肉 pH 结果相一致。宰后 45 min 和 24 h 肌肉糖酵解产生乳酸的量取决于猪屠宰时肌肉中能够通过糖酵解产生乳酸的底物浓度和宰后糖酵解酶活性的高低（李蛟龙 2015，杨媛媛等 2019）。本研究结果表明山竹醇对猪肌肉中糖原、葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖含量无显著影响，这说明本试验中添加山竹醇不是通过降低屠宰时肌

肉中能够进行糖酵解产生乳酸的糖类化合物含量来影响宰后糖酵解的，影响宰后乳酸产生以及最终猪肉品质的主要因素是糖酵解下游反应，即由葡萄糖转化为乳酸的过程中。因此山竹醇很可能是通过调控糖酵解酶活力来减缓宰后糖酵解，提高猪肉 pH 的。

## 4.5 山竹醇对肥育猪宰后肌肉糖酵解和肉品质的调控机制

猪被宰杀后，肌肉进行无氧糖酵解，导致肉质 pH 不断降低，直至肌肉糖原耗尽或糖酵解相关酶失活，到达极限 pH 值（杨媛媛等 2019）。糖酵解过程受到多种酶的共同调控，其中由 PFKFB3 负责催化合成的果糖-2,6-二磷酸是糖酵解通路中最有效的刺激剂（Schoors et al 2014, Cruys et al 2016）。GAPDH 催化糖酵解产能过程的第一步反应；PGK1 在机体能量代谢中起着关键作用，因其催化的反应是糖酵解过程中第一次产生 ATP 的反应（王玉英等 2019）。研究表明，PFKFB3、GAPDH 和 PGK1 都可以被乙酰转移酶 PCAF 乙酰化，被乙酰化修饰后的 PFKFB3、GAPDH、PGK1 的酶活力均提高，促进糖酵解和乳酸生成。已有研究报道，PCAF 在缺氧、应激条件下表达或活性都会显著提高，而在猪屠宰过程会不可避免地受到应激，同时宰后猪肌肉处于缺氧状态，因此可推测宰后肌肉 PCAF 表达或活性是处于较高水平的。而植物提取物山竹醇是 PCAF 的有效抑制剂，Bastiaansen 等（2013）和 Yao 等（2019）研究均证明山竹醇可显著降低 PCAF 的表达及活性（Bastiaansen et al 2013, Yao et al 2019）。因此，在本试验中，我们测定了 PCAF 的表达与活性和糖酵解相关酶的乙酰化程度，发现随着山竹醇添加量的增加，乙酰转移酶 PCAF 的表达和活性以及糖酵解酶 PFKFB3、GAPDH 和 PGK1 的乙酰化水平均显著降低，PFKFB3、PGK1、GAPDH、PGK1 的酶活性随之降低。这表明，山竹醇可以通过抑制 PCAF，降低其介导的糖酵解酶乙酰化程度，改变糖酵解相关酶活力，从而调控宰后肌肉糖酵解和乳酸的产生。此外，本实验中发现山竹醇可降低 LDHA 的活性。LDHA 是无氧糖酵解的标志酶，负责催化乳酸的产生。Cho 等（2016）在研究氧化应激对杜洛克猪肉品质影响时发现，对照组和氧化应激组猪肌肉 LDHA mRNA 表达无显著差异，但氧化应激组猪肌肉中 LDHA 活性显著增高（Cho et al 2016）。这表明 LDHA 活性与肌肉抗氧化能力密切相关，而山竹醇具有较强的抗氧化功能，因此在本实验中山竹醇对猪肌肉 LDHA 活性的抑制作用很可能是通过提高肌肉抗氧化能力来降低 LDHA 活性的。因此，山竹醇对宰后猪肌肉糖酵解的调控可以通过抑制 PCAF 及其

介导的糖酵解酶乙酰化水平来降低糖酵解酶 PFKFB3、PFK1、GAPDH 和 PGK1 的酶活力，并且可能通过其抗氧化能力来降低 LDHA 活性，从而减缓宰后糖酵解，提高猪肉 pH。

宰后肌肉进行无氧糖酵解产生乳酸是导致猪肉 pH 不断下降，以及影响系水力、剪切力等其它肉质性状的重要原因，此外，肌肉抗氧化能力以及肌纤维类型也会影响猪肉品质。肌肉脂质氧化会产生醛、酮类化合物，影响猪肉风味，同时还会破坏生物膜完整性，造成猪肉滴水损失增加（Cortinas et al 2005, Jamilah et al 2009, 郭建凤等 2015）。而猪肉嫩度、色泽和 IIa 型肌纤维比例呈正相关（Kang et al 2011），IIb 型肌纤维比例增加则会促使肌肉 pH 快速下降，降低肉的嫩度，甚至产生 PSE 肉（Ryu and Kim 2005, Choi et al 2005）。本研究发现，日粮添加山竹醇显著提高肌肉抗氧化能力，并且降低 MyHC IIb 型表达，提高 MyHC IIa 型表达水平。因此，山竹醇可能是通过提高猪肌肉抗氧化能力，促进肌纤维 IIb 向 IIa 型转化并减缓宰后糖酵解来改善猪肉品质的。



## 第三章 结语

### 1 成果与结论

1. PCAF 是调控宰后猪肌肉糖酵解的重要靶点，山竹醇可通过抑制 PCAF 调控肌肉糖酵解酶 PFKFB3、GAPDH 和 PGK1 蛋白乙酰化程度，从而降低 PFKFB3、PFK1、GAPDH 和 PGK1 的活性，减缓宰后肌肉糖酵解和乳酸产生。

2. 山竹醇可提高猪肉 pH 和 a\*值，降低滴水损失和剪切力，改善猪肉品质，可能机制是通过提高肌肉抗氧化能力、促进肌纤维 IIa 型表达并减缓宰后肌肉糖酵解。

3. 在三个添加剂量中，200 和 400 mg/kg 山竹醇对宰后肌肉糖酵解和肉品质的影响差异不显著，600 mg/kg 山竹醇对减缓宰后肌肉糖酵解、改善猪肉品质的效果最佳。

### 2 创新点

本研究证明了乙酰转移酶 PCAF 是调控宰后猪肌肉糖酵解的重要靶点，并阐明了山竹醇对宰后肌肉糖酵解和猪肉品质的调控作用及作用机制，为集约化养猪生产中猪肉品质改善问题提供新的营养调控手段。

### 3 不足与展望

1. 在研究山竹醇对猪肉 pH 影响时，在宰后多个时间段内连续监测肌肉乳酸含量和 pH 变化更能直观反映山竹醇对宰后肌肉糖酵解和乳酸产生的调控。

2. 下一步应结合细胞实验，分别过表达和敲除 PCAF，并利用山竹醇处理骨骼肌细胞，进一步证实山竹醇通过抑制 PCAF 对肌肉糖酵解的调控作用。

## 参考文献

1. 曹国娟, 段淑荣, 席召燕, 刘盼月, 陈明. 乳酸脱氢酶 A 在神经退行性疾病中的研究. 脑与神经疾病杂志, 2018, 26: 575-578.
2. 陈铭, 杨欣, 周兆年. 心肌肌红蛋白含量的生化测定方法. 中国应用生理学杂志, 1998, 14: 283-285.
3. 贺琼玉, 邵亚飞, 姚卫磊, 王同心, 夏军, 黄飞若. 饲料添加山竹醇对氧化应激仔猪生长性能、抗氧化功能及肝脏脂质合成的影响. 动物营养学报, 2019, 31: 5834-5845.
4. 雷剑, 冯定远, 左建军. 宰后糖酵解潜力对肉质的影响及宰前饲养管理调控. 中国饲料, 2010, 00: 26-30.
5. 李蛟龙. 一水肌酸和胍基乙酸对育肥猪肉质的影响及其作用机制研究. [博士学位论文]. 南京: 南京农业大学图书馆, 2015.
6. 李琼. 赖氨酸  $\epsilon$ -氨基乙酰化修饰在宰后肌肉糖酵解中的作用研究. [硕士学位论文]. 长沙: 湖南农业大学图书馆, 2017.
7. 李仲文. 蛋白乙酰化修饰及 AMPK 对宰后肌肉糖酵解的调控作用. [硕士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学图书馆, 2015.
8. 刘洋. 胍基乙酸和甜菜碱对育肥猪肉质和机体代谢的影响. [硕士学位论文]. 南京: 南京农业大学图书馆, 2015.
9. 鲁燕. TLR4 参与肝细胞的糖代谢作用和初步机制的研究. [博士学位论文]. 苏州: 苏州大学图书馆, 2016.
10. 施佩影, 李仁伟. 肉制品脂肪氧化控制研究进展. 肉类研究, 2016, 30(06): 52-56.
11. 孙建广, 张石蕊. 猪肉品质研究进展. 中国猪业, 2008, 3: 58-59.
12. 孙朋朋, 宋春阳. 猪肉品质的评价指标及营养因素对猪肉品质影响的研究进展. 猪业科学, 2014, 31: 112-114.
13. 王恒. 肌肉中 calstarcin 基因的差异表达和转录调控研究. [硕士学位论文]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2007.
14. 杨媛媛, 李敬, 赵青余, 汤超华, 张军民, 秦玉昌. 猪肌肉糖原酵解潜力的影响因素及其营养调控研究进展. 中国畜牧杂志, 2019, 11: 8-15.
15. 张靖, 周明, 王井亮, 陈征义. 姜黄素替代育肥猪饲料中喹烯酮对抗体合成和

- 猪肉品质的影响. 饲料工业, 2011, 32: 4-7.
16. 周招洪, 陈代文, 田刚, 肖竺宏, 余冰. 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活因子 1 $\alpha$  与肌纤维类型转化及其表达调控研究进展. 中国畜牧兽医, 2015, 42: 2636-2643.
17. 朱康平. 猪肌肉糖酵解潜力及几个重要代谢调控基因的表达与肉质性状关联性分析. [硕士学位论文]. 雅安: 四川农业大学图书馆, 2012.
18. 王玉英, 戚欣, 李静. 磷酸甘油酸激酶 1 与肿瘤. 药学学报, 2019, 54: 978-983.
19. Apple JK, Kegley EB, Maxwell CV Jr, Rakes LK, Galloway D, Wistuba TJ. Effects of dietary magnesium and short-duration transportation on stress response, postmortem muscle metabolism, and meat quality of finishing swine. *J Anim Sci*, 2005, 83:1633-1645.
20. Balasubramanyam K, Altaf M, Varier RA, Swaminathan V, Ravindran A, Sadhale PP, Kundu TK. Polyisoprenylated Benzophenone, Garcinol, a Natural Histone Acetyltransferase Inhibitor, Represses Chromatin Transcription and Alters Global Gene Expression. *J Biol Chem*, 2004, 279:33716-33726.
21. Bastiaansen AJNM, Ewing MM, De Boer HC, Van dPK, T C, De Vries MR, Peters EAB, Welten SMJ, Arens R, Moore SM, Faber JE. Lysine Acetyltransferase PCAF Is a Key Regulator of Arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33:1902-1910.
22. Bee G, Anderson AL, Lonergan SM, Huff-Lonergan E. Rate and extent of pH decline affect proteolysis of cytoskeletal proteins and water-holding capacity in pork. *Meat Sci*, 2007, 76:359-365.
23. Bee G, Biolley C, Guex G, Herzog W, Huff-Lonergan E. Effects of available dietary carbohydrate and preslaughter treatment on glycolytic potential, protein degradation, and quality traits of pig muscles. *J Anim Sci*, 2006, 84:191.
24. Behera AK, Swamy MM, Natesh N, Kundu TK. Garcinol and Its Role in Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 928:435-452.
25. Bekhit AED, Faustman C. Metmyoglobin reducing activity. *Meat Sci*, 2005, 71:407-439.
26. Berg EP, Allee GL. Creatine monohydrate supplemented in swine finishing diets and

- fresh pork quality: I. A controlled laboratory experiment. *J Anim Sci*, 2001, 79:3075-3080.
27. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolizus M, Schoenhammer G, Thiel A, Matos C, Bruss C, Klobuch S, Peter K, Kastenberger M, Bogdan C, Schleicher U, Mackensen A, Ullrich E, Fichtner-Feigl S, Kesselring R, Mack M, Ritter U, Schmid M, et al. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab*, 2016, 24:657-671.
28. Cao Y, Zhang X, Wang L, Yang Q, Ma Q, Xu J, Wang J, Kovacs L, Ayon RJ, Liu Z, Zhang M, Zhou Y, Zeng X, Xu Y, Wang Y, Fulton DJ, Weintraub NL, Lucas R, Dong Z, Yuan JX, et al. PFKFB3-mediated endothelial glycolysis promotes pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci*, 2019, 116:13394-13403.
29. Carrasco-García AA, Pardo-Sedas VT, León-Banda GG, Ahuja-Aguirre C, Paredes-Ramos P, Hernández-Cruz BC, Murillo VV. Effect of stress during slaughter on carcass characteristics and meat quality in tropical beef cattle. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2020, 33:1656-1665.
30. Chauhan AS, Kumar M, Chaudhary S, Patidar A, Dhiman A, Sheokand N, Malhotra H, Raje CI, Raje M. Moonlighting glycolytic protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): an evolutionarily conserved plasminogen receptor on mammalian cells. *FASEB J*, 2017, 31:2638-2648.
31. Cho JH, Lee RH, Jeon YJ, Park SM, Shin JC, Kim SH, Jeong JY, Kang HS, Choi NJ, Seo KS, Cho YS, Kim MS, Ko S, Seo JM, Lee SY, Shim JH, Chae JI. Proteomic assessment of the relevant factors affecting pork meat quality associated with longissimus dorsi muscles in duroc pigs. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2016, 29:1653-1663.
32. Choe JH, Choi YM, Lee SH, Shin HG, Ryu YC, Hong KC, Kim BC. The relation between glycogen, lactate content and muscle fiber type composition, and their influence on postmortem glycolytic rate and pork quality. *Meat Sci*, 2008, 80:355-362.
33. Choi YM, Ryu YC, Lee SH, Kim BC. Relationships between myosin light chain isoforms, muscle fiber characteristics, and meat quality traits in porcine longissimus

- muscle. *Food Sci Biotechnol*, 2005, 14:639.
34. Chung S, Kim S, Son M, Kim M, Koh ES, Shin SJ, Park CW, Kim HS. Inhibition of p300/CBP-Associated Factor Attenuates Renal Tubulointerstitial Fibrosis through Modulation of NF- $\kappa$ B and Nrf2. *Int J Mol Sci*, 2019, 20:1554.
35. Collins HM, Abdelghany MK, Messmer M, Yue B, Deeves SE, Kindle KB, Mantelingu K, Aslam A, Winkler GS, Kundu TK, Heery DM. Differential effects of garcinol and curcumin on histone and p53 modifications in tumour cells. *BMC Cancer*, 2013, 13:37.
36. Corre S, Primot A, Baron Y, Le Seyec J, Goding C, Galibert MD. Target gene specificity of USF-1 is directed via p38-mediated phosphorylation-dependent acetylation. *J Biol Chem*, 2009, 284:18851-18862.
37. Cortinas L, Barroeta A, Villaverde C, Galobart J, Guardiola F, Baucells MD. Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: lipid oxidation. *Poultry Sci*, 2005, 84:48-55.
38. Cruys B, Wong BW, Kuchnio A, Verdegem D, Cantelmo AR, Conradi LC, Vandekeere S, Bouché A, Cornelissen I, Vinckier S, Merks RM, Dejana E, Gerhardt H, Dewerchin M, Bentley K, Carmeliet P. *Nat Commun*, 2016, 7:12240.
39. Cunniff P, Cunniff P, Horwitz W, Windham WR, Scott PM, Windham W, Cundiff P, Horwitz W, Winters-Hilt S, Tennyson J. Official methods of analysis of AOAC internacional. *Trends Food Sci Technol*, 1996, 6:382.
40. Dalla Costa FA, Devillers N, Paranhos da Costa MJ, Faucitano L. Effects of applying preslaughter feed withdrawal at the abattoir on behaviour, blood parameters and meat quality in pigs. *Meat Sci*, 2016, 119:89-94.
41. Doménech E, Maestre C, Esteban-Martínez L, Partida D, Pascual R, Fernández-Miranda G, Seco E, Campos-Olivas R, Pérez M, Megias D, Allen K, López M, Saha AK, Velasco G, Rial E, Méndez R, Boya P, Salazar-Roa M, Malumbres M. AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nat Cell Biol*, 2015, 17:1304-1316.
42. Drazic A, Myklebust LM, Ree R, Arnesen T. The world of protein acetylation. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1864:1372-401.

43. Eadmusik S, Molette C, Fernandez X, Rénignon H. Are one early muscle pH and one early temperature measurement sufficient to detect PSE breast meat in turkeys? *Br Poult Sci*, 2011, 52:177-188.
44. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, 2006, 9:425-434.
45. Fei HJ, Zu LD, Wu J, Jiang XS, Wang JL, Chin YE, Fu GH. PCAF acts as a gastric cancer suppressor through a novel PCAF-p16-CDK4 axis. *Am J Cancer Res*, 2016, 6:2772-2786.
46. Fu Q, Yu Z. Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) in cancer: A promising target for diagnosis and therapy. *Life Sci*, 2020, 256:117863.
47. Galbiati A, Zana A, Conti P. Covalent inhibitors of GAPDH: From unspecific warheads to selective compounds. *Eur J Med Chem*, 2020, 207:112740.
48. Gašperlin L, Zlender B, Abram V. Colour of normal and high pH beef heated to different temperatures as related to oxygenation. *Meat Sci*, 2000, 54:391-398.
49. Gong AY, Eischeid AN, Xiao J, Zhao J, Chen D, Wang ZY, Young CY, Chen XM. miR-17-5p targets the p300/CBP-associated factor and modulates androgen receptor transcriptional activity in cultured prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 2012, 12:492.
50. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, Mackensen A, Kreutz M. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood*, 2006, 107:2013-2021.
51. Guàrdia MD, Estany J, Balasch S, Oliver MA, Gispert M, Diestre A. Risk assessment of DFD meat due to pre-slaughter conditions in pigs. *Meat Sci*, 2010, 70:709-716.
52. Hall JA, Dominy JE, Lee Y, Puigserver P. The sirtuin family's role in aging and age-associated pathologies. *J Clin Invest*, 2013, 123:973-979.
53. Hamilton DN, Ellis M, Hemann MD, McKeith FK, Miller KD, Purser KW. The impact of longissimus glycolytic potential and short-term feeding of magnesium sulfate heptahydrate prior to slaughter on carcass characteristics and pork quality. *J Anim Sci*, 2002, 80:1586-1592.
54. Hong J, Kwon SJ, Sang S, Ju J, Zhou JN, Ho CT, Huang MT, Yang CS. Effects of

- garcinol and its derivatives on intestinal cell growth: Inhibitory effects and autoxidation-dependent growth-stimulatory effects. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42:1211-1221.
55. Hu H, Wang J, Zhu R, Guo J, Wu Y. Effect of myosin heavy chain composition of muscles on meat quality in Laiwu pigs and Duroc. *Sci China C Life Sci*, 2008, 51:127-132.
56. Hu H, Zhu W, Qin J, Chen M, Gong L, Li L, Liu X, Tao Y, Yin H, Zhou H, Zhou L, Ye D, Ye Q, Gao D. Acetylation of PGK1 promotes liver cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Hepatology*, 2017, 65: 515-528.
57. Huang J, Wan D, Li J, Chen H, Huang K, Zheng L. Histone acetyltransferase PCAF regulates inflammatory molecules in the development of renal injury. *Epigenetics*, 2015, 10:62-72.
58. Hughes JM, Kearney G, Warner RD. Improving beef meat colour scores at carcass grading. *Anim Prod Sci*, 2014, 54:422-429.
59. Jagtap P, Bhise K, Prakya V. A phytopharmacological review on *Garcinia indica*. *Int J Herb Med*, 2015, 3:02-07.
60. Jamilah B, Mohamed A, Abbas KA, Rahman RA, Karim R. A review on the effect of animal diets and presence of selected natural antioxidants on lipid oxidation of meat. *J Food Agric Environ*, 2009, 7:76-81.
61. Jerez NC, Calkins CR, Velazco J. Prerigor injection using glycolytic inhibitors in low-quality beef muscles. *J Anim Sci*, 2003, 81:997-1003.
62. Jin Q, Yu LR, Wang L, Zhang Z, Kasper LH, Lee JE, Wang C, Brindle PK, Dent SY, Ge K. Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J*, 2011, 30:249-262.
63. Jing Y, Ai Q, Lin L, Dai J, Jia M, Zhou D, Che Q, Wan J, Jiang R, Zhang L. Protective effects of garcinol in mice with lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced apoptotic liver injury. *Int Immunopharmacol*, 2014, 19:373-380.
64. Josell A, von Seth G, Tornberg E. Sensory quality and the incidence of PSE of pork in relation to crossbreed and RN phenotype. *Meat Science*, 2003, 65:651-660.

65. Jung DW, Kim WH, Seo S, Oh E, Yim SH, Ha HH, Chang YT, Williams DR. Chemical targeting of GAPDH moonlighting function in cancer cells reveals its role in tubulin regulation. *Chem Biol*, 2014, 21:1533-1545.
66. Kaloustian HD, Stolzenbach FE, Everse J, Kaplan NO. Lactate dehydrogenase of lobster (*Homarus americanus*) tail muscle. I. Physical and chemical properties. *J Biol Chem*, 1969, 244:2891-2901.
67. Kang YK, Choi YM, Lee SH, Choe JH, Hong KC, Kim BC. Effects of myosin heavy chain isoforms on meat quality, fatty acid composition, and sensory evaluation in Berkshire pigs. *Meat Sci*, 2011, 89:384-389.
68. Karaca S, Erdoğan S, Kor D, Kor A. Effects of pre-slaughter diet/management system and fasting period on physiological indicators and meat quality traits of lambs. *Meat Sci*, 2016, 116:67-77.
69. Kim GD, Kim BW, Jeong JY, Hur SJ, Cho IC, Lim HT, Joo ST. Relationship of Carcass Weight to Muscle Fiber Characteristics and Pork Quality of Crossbred (Korean Native Black Pig×Landrace) F2 Pigs. *Food Bioprocess Tech*, 2013, 6:522-529.
70. Kim SG, Cavalier M, El-Maghrabi MR, Lee YH. A direct substrate-substrate interaction found in the kinase domain of the bifunctional enzyme, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *J Mol Biol*, 2007, 370:14-26.
71. Kirana H, Srinivasan B. Aqueous extract of garcinia indica choisy restores glutathione in type 2 diabetic rats. *J Young Pharm*, 2010, 2:265-268.
72. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 2002, 30: 620–650.
73. Kovacs L, Cao Y, Han W, Meadows L, Kovacs-Kasa A, Kondrikov D, Verin AD, Barman SA, Dong Z, Huo Y, Su Y. PFKFB3 in Smooth Muscle Promotes Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200: 617-627.
74. Kremer BT. Effect of dietary glycolytic inhibitors on pork quality. (Ph D dissertation). Ames: Iowa State University, 1999.



75. Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, Royer RE, Vander Jagt DL, Semenza GL, Dang CV. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 2037-2042.
76. Lee PS, Teng CY, Kalyanam N, Ho CT, Pan MH. Garcinol Reduces Obesity in High-Fat-Diet-Fed Mice by Modulating Gut Microbiota Composition. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63:e1800390.
77. Li FL, Liu JP, Bao RX, Yan G, Feng X, Xu YP, Sun YP, Yan W, Ling ZQ, Xiong Y, Guan KL, Yuan HX. Acetylation accumulates PFKFB3 in cytoplasm to promote glycolysis and protects cells from cisplatin-induced apoptosis. *Nat Commun*, 2018, 9:508.
78. Li J, Wang TX, Xia J, Yao WL, Huang FR. Enzymatic and nonenzymatic protein acetylations control glycolysis process in liver diseases. *FASEB J*, 2019, 33:11640-11654.
79. Li T, Liu M, Feng X, Wang Z, Das I, Xu Y, Zhou X, Sun Y, Guan KL, Xiong Y, Lei QY. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is activated by lysine 254 acetylation in response to glucose signal. *J Biol Chem*, 2014, 289:3775-3785.
80. Li X, Jiang Y, Meisenhelder J, Yang W, Hawke DH, Zheng Y, Xia Y, Aldape K, He J, Hunter T, Wang L, Lu Z. Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis. *Mol Cell*, 2016, 61:705-719.
81. Li Y, Li J, Zhang L, Yu C, Lin M, Gao F, Zhou G, Zhang Y, Fan Y, Nuldnali L. Effects of Dietary Energy Sources on Post Mortem Glycolysis, Meat Quality and Muscle Fibre Type Transformation of Finishing Pigs. *PLoS One*, 2015, 10:e0131958.
82. Liao CH, Ho CT, Lin JK. Effects of garcinol on free radical generation and NO production in embryonic rat cortical neurons and astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329:1306-1314.
83. Liao CH, Sang S, Liang YC, Ho CT, Lin JK. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in downregulating nuclear factor-kappa B pathway by Garcinol. *Mol Carcinog*, 2004, 41:140-149.

84. Liu C, Ho PC, Wong FC, Sethi G, Wang LZ, Goh BC. Garcinol: Current status of its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-cancer effects. *Cancer Lett*, 2015, 362:8-14.
85. Liu Y, Li JL, Li YJ, Gao T, Zhang L, Gao F, Zhou GH. Effects of dietary supplementation of guanidinoacetic acid and combination of guanidinoacetic acid and betaine on postmortem glycolysis and meat quality of finishing pigs. *Anim Feed Sci Technol*, 2015, 205:82-89.
86. Love IM, Sekaric P, Shi D, Grossman SR, Androphy EJ. The histone acetyltransferase PCAF regulates p21 transcription through stress-induced acetylation of histone H3. *Cell Cycle*, 2012, 11:2458-2466.
87. Macut H, Hu X, Tarantino D, Gilardoni E, Clerici F, Regazzoni L, Contini A, Pellegrino S, Luisa Gelmi M. Tuning PFKFB3 Bisphosphatase Activity Through Allosteric Interference. *Sci Rep*, 2019, 9:20333.
88. Majeed M, Bani S, Bhat B, Pandey A, Mundkur L, Neupane P. Safety profile of 40% Garcinol from *Garcinia indica* in experimental rodents. *Toxicol Rep*, 2018, 5:750-758.
89. Malatesta M, Steinhauer C, Mohammad F, Pandey DP, Squatrito M, Helin K. Histone acetyltransferase PCAF is required for Hedgehog-Gli-dependent transcription and cancer cell proliferation. *Cancer Res*, 2013, 73:6323-6333.
90. Mancini RA, Hunt MC. Current research in meat color. *Meat Sci*, 2005, 71:100-121.
91. Melody JL, Lonergan SM, Rowe LJ, Huiatt TW, Mayes MS, Huff-Lonergan E. Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J Anim Sci*, 2004, 82:1195-1205.
92. Minchenko A, Leshchinsky I, Opentanova I, Sang N, Srinivas V, Armstead V, Caro J. Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J Biol Chem*, 2002, 277:6183-6187.
93. O'Neill DJ, Lynch PB, Troy DJ, Buckley DJ, Kerry JP. Influence of the time of year on the incidence of PSE and DFD in Irish pigmeat. *Meat Sci*, 2003, 64:105-11.
94. Panda V, Ashar H, Srinath S. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Garcinia*

- indica fruit rind in ethanol-induced hepatic damage in rodents. *Interdiscip Toxicol*, 2012, 5:207-213.
95. Perez RE, Knights CD, Sahu G, Catania J, Kolukula VK, Stoler D, Graessmann A, Ogryzko V, Pishvaian M, Albanese C, Avantaggiati ML. Restoration of DNA-binding and growth-suppressive activity of mutant forms of p53 via a PCAF-mediated acetylation pathway. *J Cell Physiol*, 2010, 225:394-405.
96. Qian X, Li X, Shi Z, Xia Y, Cai Q, Xu D, Tan L, Du L, Zheng Y, Zhao D, Zhang C, Lorenzi PL, You Y, Jiang BH, Jiang T, Li H, Lu Z. PTEN Suppresses Glycolysis by Dephosphorylating and Inhibiting Autophosphorylated PGK1. *Mol Cell*, 2019, 76:516-527.
97. Qiu L, Xu C, Chen J, Li Q, Jiang H. Downregulation of the transcriptional co-activator PCAF inhibits the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells and attenuates NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513:41-48.
98. Reed GH, Morgan SD. Kinetic and magnetic resonance studies of the interaction of oxalate with pyruvate kinase. *Biochemistry*, 1974,13:3537-3541.
99. Rosenvold K, Borup U, Therkildsen M. Stepwise chilling: tender pork without compromising water-holding capacity. *J Anim Sci*, 2010, 88:1830-1841.
100. Rosenvold K, Petersen JS, Lwerke HN, Jensen SK, Therkildsen M, Karlsson AH, Møller HS, Andersen HJ. Muscle glycogen stores and meat quality as affected by strategic finishing feeding of slaughter pigs. *J Anim Sci*, 2001, 79:382-391.
101. Ryu YC, Kim BC. The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig longissimus dorsi muscle. *Meat Sci*, 2005, 71:351-357.
102. Sang S, Liao CH, Pan MH, Rosen RT, Lin-Shiau SY, Lin JK, Ho CT. Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol with peroxy radicals and their antitumor activities. *Tetrahedron*, 2002, 58:10095-10102.
103. Scheffler TL, Gerrard DE. Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Sci*, 2007, 77:7-16.

104. Schoors S, De Bock K, Cantelmo AR, Georgiadou M, Ghesquière B, Cauwenberghs S, Kuchnio A, Wong BW, Quaegebeur A, Goveia J, Bifari F, Wang X, Blanco R, Tembuyser B, Cornelissen I, Bouché A, Vinckier S, Diaz-Moralli S, Gerhardt H, Telang S, et al. Partial and Transient Reduction of Glycolysis by PFKFB3 Blockade Reduces Pathological Angiogenesis. *Cell Metab*, 2014, 19:37-48.
105. Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103:10224-10229.
106. Seidler NW. Basic Biology of GAPDH. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 985:1-36.
107. Semwal RB, Semwal DK, Vermaak I, Viljoen A. A comprehensive scientific overview of *Garcinia cambogia*. *Fitoterapia*, 2015, 102:134-148.
108. Shen QW, Du M. Effects of dietary  $\alpha$ -lipoic acid on glycolysis of postmortem muscle. *Meat Sci*, 2005, 71:306-311.
109. Shi Q, Zhou Y, Sun Y. Influence of pH and ionic strength on the steric mass-action model parameters around the isoelectric point of protein. *Biotechnol Prog*, 2005, 21:516-523.
110. Simitzis PE, Symeon GK, Charismiadou MA, Bizelis JA, Deligeorgis SG. The effects of dietary oregano oil supplementation on pig meat characteristics. *Meat Sci*, 2010, 84:670-676.
111. Starai VJ, Escalante-Semerena JC. Identification of the protein acetyltransferase (Pat) enzyme that acetylates acetyl-CoA synthetase in *Salmonella enterica*. *J Mol Biol*, 2004, 340:1005-1012.
112. Stephens JW, Dikeman ME, Unruh JA, Haub MD, Tokach MD, Dritz SS. Effects of oral administration of sodium citrate or acetate to pigs on blood parameters, postmortem glycolysis, muscle pH decline, and quality attributes of pork. *J Anim Sci*, 2008, 86:1669-1677.
113. Suhara T, Hishiki T, Kasahara M, Hayakawa N, Oyaizu T, Nakanishi T, Kubo A, Morisaki H, Kaelin WG, Suematsu M, Minamishima YA. Inhibition of the oxygen sensor PHD2 in the liver improves survival in lactic acidosis by activating the Cori cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112:11642-11647.

114. Summermatter S, Santos G, Pérez-Schindler J, Handschin C. Skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor  $\alpha$ -dependent activation of LDH B and repression of LDH A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110:8738-8743.
115. Tanaka T, Kohno H, Shimada R, Kagami S, Yamaguchi F, Kataoka S, Ariga T, Murakami A, Koshimizu K, Ohigashi H. Prevention of colonic aberrant crypt foci by dietary feeding of garcinol in male F344 rats. *Carcinogenesis*, 2000, 21:1183-1189.
116. van Laack RL, Kauffman RG, Sybesma W, Smulders FJ, Eikelenboom G, Pinheiro JC. Is colour brightness (L-value) a reliable indicator of water-holding capacity in porcine muscle? *Meat Sci*, 1994, 38:193-201.
117. Wang Q, Zhang Y, Yang C, Xiong H, Lin Y, Yao J, Li H, Xie L, Zhao W, Yao Y, Ning ZB, Zeng R, Xiong Y, Guan KL, Zhao S, Zhao GP. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science*, 2010, 327:1004-1007.
118. Wang T, Chen K, Yao W, Zheng R, He Q, Xia J, Li J, Shao Y, Zhang L, Huang L, Qin L, Xu M, Zhang Z, Pan D, Li Z, Huang F. Acetylation of lactate dehydrogenase B drives NAFLD progression by impairing lactate clearance. *J Hepatol*, 2020, S0168-8278:33815.
119. Wang T, Yao W, Li J, Shao Y, He Q, Xia J, Huang F. Dietary garcinol supplementation improves diarrhea and intestinal barrier function associated with its modulation of gut microbiota in weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol*, 2020, 11:12.
120. Wang T, Yao W, Shao Y, Zheng R, Huang F. PCAF fine-tunes hepatic metabolic syndrome, inflammatory disease, and cancer. *J Cell Mol Med*, 2018, 22: 5787–5800.
121. Warner RD, Greenwood PL, Pethick DW, Ferguson DM. Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Sci*, 2010, 86:171-183.
122. Warriss PD, Bevis EA, Ekins PJ. The relationships between glycogen stores and muscle ultimate pH in commercially slaughtered pigs. *Br Vet J*, 1989, 145:378-383.
123. Wegener G, Krause U. Different modes of activating phosphofructokinase, a key regulatory enzyme of glycolysis, in working vertebrate muscle. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30:264-270.

124. Xenaki G, Ontikatzte T, Rajendran R, Stratford IJ, Dive C, Krstic-Demonacos M, Demonacos C. PCAF is an HIF-1 $\alpha$  cofactor that regulates p53 transcriptional activity in hypoxia. *Oncogene*, 2008, 27:5785-5796.
125. Yamaguchi F, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa H. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J Agric Food Chem*, 2000, 48:180-185.
126. Yamanaka S, Yokote S, Yamada A, Katsuoka Y, Izuhara L, Shimada Y, Omura N, Okano HJ, Ohki T, Yokoo T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in long-term dialysis patients display downregulation of PCAF expression and poor angiogenesis activation. *PLoS One*, 2014, 9:e102311.
127. Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, 1996, 382:319-324.
128. Yao W, Wang T, Xia J, Li J, Yu X, Huang F. Dietary Garcinol Attenuates Hepatic Pyruvate and Triglyceride Accumulation by Inhibiting P300/CBP-Associated Factor in Mid-to-Late Pregnant Rats. *J Nutr*, 2020, 150:231-239.
129. Yoshida K, Tanaka T, Hirose Y, Yamaguchi F, Kohno H, Toida M, Hara A, Sugie S, Shibata T, Mori H. Dietary garcinol inhibits 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis in rats. *Cancer Lett*, 2005, 221:29-39.
130. Yu Q, Wu W, Tian X, Jia F, Xu L, Dai R, Li X. Comparative proteomics to reveal muscle-specific beef color stability of Holstein cattle during post-mortem storage. *Food Chem*, 2017, 229:769-778.
131. Zhang C, Chen X, Zhu RM, Zhang Y, Yu T, Wang H, Zhao H, Zhao M, Ji YL, Chen YH, Meng XH, Wei W, Xu DX. Endoplasmic reticulum stress is involved in hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in fructose-fed mice. *Toxicol Lett*, 2012, 212:229-240.
132. Zhang C, Luo J, Yu B, Zheng P, Huang Z, Mao X, He J, Yu J, Chen J, Chen D. Dietary resveratrol supplementation improves meat quality of finishing pigs through changing muscle fiber characteristics and antioxidative status. *Meat Sci*, 2015, 102:15-21.

133. Zhang H, Zhao Y, Zhou DX. Rice NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase OsSRT1 represses glycolysis and regulates the moonlighting function of GAPDH as a transcriptional activator of glycolytic genes. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45:12241-12255.
134. Zhang M, Liu YL, Fu CY, Wang J, Chen SY, Yao J, Lai SJ. Expression of MyHC genes, composition of muscle fiber type and their association with intramuscular fat, tenderness in skeletal muscle of Simmental hybrids. *Mol Biol Rep*, 2014, 41:833-840.
135. Zhao D, Xiong Y, Lei QY, Guan KL. LDH-A acetylation: implication in cancer. *Oncotarget*, 2013, 4:802-803.
136. Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, Yao J, Zhou L, Zeng Y, Li H, Li Y, Shi J, An W, Hancock SM, He F, Qin L, Chin J, Yang P, Chen X, Lei Q, et al. Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation. *Science*, 2010, 327:1000-1004.
137. Zhou B, Shen Z, Liu Y, Wang C, Shen QW. Proteomic analysis reveals that lysine acetylation mediates the effect of antemortem stress on postmortem meat quality development. *Food Chem*, 2019, 293:396-407.

## 附录 研究生在读期间发表的主要论文

1. **Li J<sup>#</sup>**, Wang TX<sup>#</sup>, Xia J, Yao WL, Huang FR\*. Enzymatic and nonenzymatic protein acetylations control glycolysis process in liver diseases. *FASEB Journal*, 2019, 33(11):11640-11654.
2. **李娟<sup>#</sup>**, 夏军, 王同心, 姚卫磊, 张黎, 黄飞若\*. 不同饲料原料加工工艺对猪肠道健康的影响. *猪业科学*, 2020, 037(005):68-71.
3. Wang TX, **Li J**, Shao YF, Yao WL, Xia J, He QY, Huang FR\*. The effect of dietary garcinol supplementation on oxidative stability, muscle postmortem glycolysis and meat quality in pigs. *Meat Science*, 2020, 161:107998.
4. Wang TX, Yao WL, **Li J**, Shao YF, He QY, Xia J, Huang FR\*. Dietary garcinol supplementation improves diarrhea and intestinal barrier function associated with its modulation of gut microbiota in weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol*, 2020, 11(1):12.
5. Wang TX, Yao WL, Xia J, **Li J**, Shao YF, Huang FR. Dietary supplementation with garcinol during late gestation and lactation facilitates acid-base balance and improves the performance of sows and newborn piglets. *J Anim Sci*. 2019;97(11):4557-4566.
6. Yao WL, Wang TX, Xia J, **Li J**, Yu XH, Huang FR. Dietary Garcinol Attenuates Hepatic Pyruvate and Triglyceride Accumulation by Inhibiting P300/CBP-Associated Factor in Mid-to-Late Pregnant Rats. *J Nutr*, 2020, 150(2): 231-239.
7. Huang L, Yao WL, Wang TX, **Li J**, He QY, Huang FR. Acetylation of Phenylalanine Hydroxylase and Tryptophan 2,3-Dioxygenase Alters Hepatic Aromatic Amino Acid Metabolism in Weaned Piglets. *Metabolites*, 2020, 10(4):146.



## 致 谢

时光荏苒，我的硕士生涯已接近尾声。这三年的时光漫长而又短暂，充满了酸甜苦辣，也有收获与成长。硕士期间，感谢陪我在华中农业大学度过美好生活的各位老师和同学，正是你们的指导与帮助，我才能克服困难，解决疑惑，顺利完成学业。

本论文是在我的导师黄飞若教授的悉心指导下完成的。他严肃的科学态度，精益求精的工作作风，深深感染和激励着我。论文课题的选取、试验的顺利完成，以及硕士三年取得的学术成果和荣誉奖励，都离不开黄老师对我的细心指导和不懈支持。在此谨向导师致以最诚挚的谢意和崇高的敬意，感谢黄老师在这三年来对我学业和生活上的关怀与指导！

衷心感谢动物营养与饲料科学系的彭健教授、齐德生教授、晏向华教授、孙铝辉教授、齐智利副教授、张妮娅副教授、马立保副教授、魏宏逵副教授、周忠新副教授、周远飞副教授、许庆彪副教授等老师在我读研期间对于课程教学、课题开展以及开题和中期答辩等过程所给予的关心、指导与支持！

衷心感谢实验室的兄弟姐妹们对我的帮助与关心，与我分享快乐！感谢王同心博士、姚卫磊博士、秦龙山博士以及张黎博士在我试验开展、论文撰写、答辩 PPT 制作等过程中提出宝贵的建议和对我的帮助。感谢李晗、夏军、徐明明、张政、黄璐、温淑、闫艳霞、郭宝印、金泰民、吴燕、张定然、徐鸿润、邢小光等在我读研期间生活与学业上提供的热心帮助与支持！

感谢我们家人和朋友们在这三年来给予我的支持、理解、关爱与信任，在我烦恼、遇到困难时为我排忧解难，给我带来开心与温暖。

再次向所有给予我关心与帮助的老师、同学、朋友及家人们表示最诚挚的感谢！感谢华中农业大学和动物营养与饲料科学系对我的培养之恩，衷心祝愿华中农业大学和动物营养与饲料科学系发展越来越好！

李娟

2021 年 6 月