

蛋白质ADP核糖基化对秦川牛肉品质的影响

伏棋画, 李亚蕾*, 罗瑞明, 王雪蓉, 马旭华
(宁夏大学食品与葡萄酒学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 为研究蛋白质ADP核糖基化对宰后成熟初期秦川牛肉线粒体功能及肉品质的影响, 以20 $\mu\text{mol/L}$ Rucaparib (ADP核糖聚合酶1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP1) 抑制剂) 处理的秦川牛背最长肌为研究对象, 测定贮藏0 h、6 h、12 h、2 d、4 d、8 d对照组和抑制剂处理组样品的线粒体相关指标及肌原纤维小片化指数 (myofibril fragmentation index, MFI)、剪切力、pH值等品质指标, 并采用免疫印迹 (Western Blot) 法检测PARP1、肌间线蛋白表达水平。结果表明: 0 h~8 d (12 h除外) 抑制剂组活性氧含量显著低于对照组 ($P < 0.05$), 宰后0~12 h抑制剂组Caspase-3活性、MFI显著低于对照组 ($P < 0.05$); 在2~4 d抑制剂组线粒体膜电位较对照组高, 4~8 d抑制剂组琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$)。说明抑制表征ADP核糖基化反应进行的PARP1后, 线粒体膜电位下降变缓, SDH活性升高, 一定程度上维持了线粒体功能, 使MFI下降、肌间线蛋白降解变缓, 从而延缓肉品嫩化。

关键词: 秦川牛; 背最长肌; ADP核糖基化; 细胞凋亡

Effect of Adenosine 5'-Diphosphate Ribosylation on Meat Quality of Qinchuan Cattle

FU Qihua, LI Yalei*, LUO Ruiming, WANG Xuerong, MA Xuhua
(School of Food and Wine, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: This study addressed the effect of adenosine 5'-diphosphate (ADP) ribosylation on the mitochondrial function and quality of Qinchuan cattle meat during early postmortem aging. The *Longissimus dorsi* muscle of Qinchuan cattle treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ rucaparib, a poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) inhibitor, were evaluated for mitochondrial indices, myofibrillar fragmentation index (MFI), shear force, pH, and other quality indices after being stored for 0 h, 6 h, 12 h, 2 d, 4 d, and 8 d and the expression levels of PARP1 and desmin were detected using Western blot. The results showed that the content of reactive oxygen species (ROS) in the treated group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$) during 0 h–8 d (except 12 h) after slaughter. The caspase-3 activity and MFI in the treated group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$) during 0–12 h. Mitochondrial membrane potential during 2–4 d as well as succinate dehydrogenase (SDH) activity during 4–8 d were significantly higher in the treated group than in the control group ($P < 0.05$). These findings indicate that PARP1 inhibition, which characterizes ADP ribosylation, can slow down the decrease in mitochondrial membrane potential and increase SDH activity, preserving mitochondrial function to some extents and delaying the decrease in MFI and the degradation of desmin and thereby meat tenderization.

Keywords: Qinchuan cattle; *Longissimus dorsi* muscle; adenosine 5'-diphosphate ribonylation; apoptosis

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230308-076

中图分类号: TS251.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2024) 01-0008-07

引文格式:

伏棋画, 李亚蕾, 罗瑞明, 等. 蛋白质ADP核糖基化对秦川牛肉品质的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(1): 8-14. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230308-076. <http://www.spkx.net.cn>

FU Qihua, LI Yalei, LUO Ruiming, et al. Effect of adenosine 5'-diphosphate ribosylation on meat quality of Qinchuan cattle[J]. Food Science, 2024, 45(1): 8-14. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230308-076. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2023-03-08

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (32160535); 宁夏回族自治区重点研发项目 (2017BY068)

第一作者简介: 伏棋画 (1997—) (ORCID: 0000-0003-0193-019X), 女, 硕士研究生, 研究方向为畜产品加工与贮藏。

E-mail: 14795092388@163.com

*通信作者简介: 李亚蕾 (1966—) (ORCID: 0000-0001-5245-9188), 女, 教授, 硕士, 研究方向为畜产品加工与贮藏。

E-mail: yaleili.cn@163.com

畜禽宰后肉品质的改变通常是几种不同的翻译后修饰共同作用^[1]。D'Alessandro等^[2]认为肌球蛋白轻链2的磷酸化通过负向调节肌动球蛋白解离、肌动球蛋白ATP酶活性,从而使肉嫩度下降。ADP核糖基化是翻译后修饰的一种,可调节基因稳定和细胞凋亡^[3],该反应主要是聚腺苷二磷酸核糖聚合酶家族(poly(ADP-ribose) polymerase, PARPs)催化进行,基本由聚ADP核糖酶1(poly(ADP-ribose) polymerase 1, PARP1)担任,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸被分解为ADP核糖和烟酰胺,ADP核糖则用来修饰目的蛋白。研究证实,活性氧(reactive oxygen species, ROS)致使DNA链损伤严重,进而引起PARP1过度激活,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)和ATP作为线粒体电子呼吸传递链上代谢过程的关键底物^[4],被PARP1过度消耗^[5],此反应影响到线粒体氧化呼吸和ATP合成等细胞生物学功能,加重线粒体功能障碍,细胞因能量供应不足而凋亡或坏死。Xu Jingjing等^[6]经过研究得出线粒体损伤诱导凋亡发生,活化ADP核糖转移酶,进而促进还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)的耗竭,降低ATP含量,造成细胞凋亡。

牛肉宰后成熟的本质是线粒体凋亡过程,线粒体是连接肌纤维和细胞凋亡的桥梁,肌纤维构成骨骼肌则与肉品质密切相关^[7]。目前国内外对宰后肉凋亡途径的研究主要集中于Ca²⁺、AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶(protein kinase, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、Caspase-3及其级联反应、蛋白质乙酰化、泛素化等通路与糖酵解、氧化磷酸化、三羧酸循环的相互调节作用。王宇等^[8]综述了AMPK调节糖代谢、蛋白代谢进而影响肉品质的机制,姜珊珊等^[9]等实验表明,通过向猪肉中注射氯化钙可降低高铁肌红蛋白还原酶、乳酸脱氢酶的活性,使肉品褪色严重,嫩化加速。Fuentes-Prior等^[10]发现半胱天冬蛋白酶介导的细胞凋亡积极影响宰后骨骼肌的蛋白水解,与肉品质密切相关。

聚ADP核糖基化与线粒体损伤的关系已被研究多年,鲜有将其引入肉品领域,是否可以从ADP核糖基化调控线粒体损伤进而改善肉的嫩度仍有待研究证明。Rucaparib是第一个进入临床阶段的PARP-1抑制剂^[11]。本研究采用PARP1抑制剂Rucaparib对宰后秦川牛背最长肌进行处理,研究秦川牛宰后成熟过程中ADP核糖基化水平与肉品质指标的变化,同时,分析ADP核糖基化与肉品质指标的相关性,以期对秦川牛宰后成熟过程中ADP核糖基化反应对食用品质的影响提供理论依据,从而丰富秦川牛肉成熟机理,进一步改善其品质。

1 材料与amp方法

1.1 材料与试剂

秦川公牛 宁夏尚农生物科技有限公司;线粒体膜电位检测试剂盒 上海碧云天生物技术有限公司;Caspase-3检测试剂盒、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH)检测试剂盒、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 北京索莱宝科技有限公司;蔗糖、Tris-HCl、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、EDTA-2Na、NaN₃、K₃PO₄ 美国Sigma公司;PARP1兔克隆抗体 武汉爱博泰克生物科技有限公司;GAPDH兔克隆抗体、RIPA裂解液 武汉赛维尔生物科技有限公司;生物素化山羊抗兔IgG(H+L) 江苏亲科生物研究中心有限公司;聚偏二氯乙烯膜 美国Sigma Aldrich公司。

1.2 仪器与设备

JXFSTPRP-CL全自动样品冷冻研磨仪 上海净信有限公司;EnSpire酶标仪 美国PerkinElmer股份有限公司;NAI-CS150超声波细胞破碎机 上海那艾精密仪器有限公司;ScanSpeed MiniVac Alpha冷冻离心机 美国Scan Speed公司;Thermo Scientific Forma 994-80 °C超低温冰箱 美国Thermo公司;UV-1200紫外分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;JY200C电泳仪 北京君意东方电泳设备有限公司;5200化学发光凝胶成像仪 上海天能科技有限公司;DW-86L386超低温冰箱 海尔集团;H2050R高速低温离心机 湘仪集团;TA-XT plus质构仪 北京微讯超技仪器技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集与处理

选取25月龄秦川公牛,屠宰放血后45 min内取背最长肌(5头牛胴体),剔除表面脂肪、结缔组织,切割为160 g(厚3 cm)的肉块,将肉样分成对照组和实验组,分别按照肉液比10:1(g/mL)均匀注射0.9%生理盐水和20 μmol/L Rucaparib溶液,置于4 °C冰箱贮藏,0 h、6 h、12 h、2 d、4 d、8 d作为分析取样点,快速测定pH值等品质指标,不便立即测定的免疫印迹等指标,在设计时间点采集足够肉样,用锡纸、保鲜膜、塑封袋密封,置于-80 °C冻藏待测。

1.3.2 线粒体的提取

参考陈骋^[12]的方法提取线粒体蛋白。取2 g背最长肌样,用经冷藏过的生理盐水洗去表面残血,表面水分使用滤纸吸干,剪碎,置入10倍体积的线粒体分离液中(200 mmol/L蔗糖、10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA, pH 7.4)匀浆处理,匀浆液于4 °C、1 000×g离心10 min,分离上清液,再于4 °C、8 000×g离心10 min,最后在4 °C、10 000×g离心20 min,得到线粒体。以上实验均在4 °C条件下进行,双缩脲法测定蛋白的浓度。

1.3.3 ROS含量的测定

参照张佳莹^[4]的方法略作修改。因离心机规格不同,肉样质量改取200 mg,使用ROS含量检测试剂盒测定。

1.3.4 线粒体膜电位的测定

线粒体膜电位参照Tian Zhu等^[13]的方法稍作修改。因离心机规格不同,肉样质量改取200 mg,使用线粒体膜电位检测试剂盒操作。

1.3.5 Caspase-3活力的检测

参考Tian Zhu等^[13]的方法略作修改。因匀浆机及离心机规格不同,肉样质量改取250 mg使用Caspase-3活性检测试剂盒操作后测定 $A_{405\text{ nm}}$,通过标准曲线计算凋亡酶活力。

1.3.6 SDH活力的测定

使用SDH试剂盒测定参照师希雄等^[14]的方法。进行线粒体提取之后,超声波细胞破碎仪破碎处理细胞,以破坏线粒体细胞膜使SDH释放在提取液中测定吸光度。

1.3.7 肌原纤维小片化指数(myofibril fragmentation index, MFI)的测定

参照马旭华等^[15]的方法,并稍作修改。将肌肉样品(2 g)加入含有35 mL冰冷缓冲液(0.1 mol/L KCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L MgCl₂、25 mmol/L K₃PO₄和1 mmol/L NaN₃, pH 7.0)的50 mL试管中,并在4 °C、10 000×g匀浆30 s。在4 °C、2 000×g离心均质化样品10 min,将混悬液过滤至50 mL烧杯中,并使用1 mm²孔的筛网过滤器去除结缔组织。将肌原纤维沉淀重悬于25 mL缓冲液中并再次离心。重复该过程,将沉淀物重悬于20 mL冷缓冲液中。调节蛋白质量浓度至0.5 mg/mL,并立即使用紫外分光光度计在540 nm波长处测定吸光度,将蛋白质量浓度的吸光度乘200计算MFI。

1.3.8 剪切力测定

沿样品肌纤维方向用直径1.27 cm采样器平行取3个肉柱,然后用TA-XT plus质构仪垂直于肌纤维方向测定其剪切力,测定3次取其平均值。

1.3.9 pH值的测定

参考陈骋等^[16]的方法,使用pH计校正后测定pH值,待数值信号稳定后记录,每个样品测定5个平行数值,读数精确到0.01,取平均值。

1.3.10 PARP1、Desmin表达水平测定

采用Western Blot法测定PARP1表达水平。提取蛋白质^[17],采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度,采用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)调节蛋白质量浓度至5 mg/mL,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白(5%下层分离胶、10%上层浓缩胶),点样,采用100 V、15 min,当溴酚蓝染料到分离胶以后将电压调至180 V继续电泳,到达凝胶底部时停止电泳。按照由下到上的顺序放置海绵、滤纸(3张)、膜、凝胶、滤纸(3张)、海绵,将凝胶面与负极相连,聚偏二氟乙

烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜与正极相连,接通电源,200 mA转膜1~2 h,转印好后PVDF膜置于封闭液中(使用TBST缓冲液配制5%脱脂奶粉,等渗缓冲盐溶液有利于洗去膜上非特异性结合的抗体等试剂)摇床上室温条件下封闭3 h, TBST缓冲液清洗5次,每次8 min。加入配制的兔抗PARP1多克隆抗体(抗体与一抗稀释液体积比为1:1 000)、GAPDH抗体(抗体与一抗稀释液体积比为1:1 000),4 °C冰箱孵育过夜, TBST溶液清洗5次后,置于相应二抗(辣根过氧化物酶标记山羊IgG(H+L))中,摇床上轻摇,室温孵育2~3 h, TBST将PVDF膜清洗3次,每次10 min,将ECL均匀滴加到膜上反应1 min。采用GIS机箱控制软件V2.0进行条带曝光扫描,用目的蛋白表达量表示实验结果。

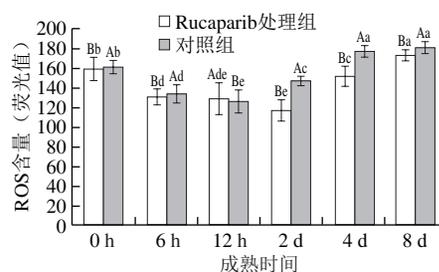
1.4 数据处理

各项指标进行5次测定,采用Excel统计数据结果,以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,采用SPSS Statistics 25.0进行单因素方差分析,并使用Origin 2021绘图。

2 结果与分析

2.1 ROS含量的变化

宰后骨骼肌细胞内高浓度ROS可造成细胞内DNA链断裂,磷脂酰丝氨酸外翻,激活细胞凋亡途径^[18]。宰后成熟期间ROS含量变化如图1所示,宰后0~12 h,对照组ROS含量显著降低($P < 0.05$),宰后12 h~4 d, ROS含量显著增加($P < 0.05$),宰后4~8 d无显著变化($P > 0.05$),这与师希雄等^[19]的研究结果一致。在Rucaparib作用下,ROS含量于宰后0~2 d下降,2~8 d显著上升($P < 0.05$)。0 h~8 d期间(12 h除外)对照组ROS含量高于抑制剂组,第2天抑制剂组ROS含量显著低于对照组($P < 0.05$),这与张绘艳等^[20]进行抑制PARP-1蛋白的活性后,ROS含量由12.8%降至5.29%的研究结果相符。可能是由于抑制PARP1表达会减少ATP消耗和呼吸代谢^[21],自由基链式反应被阻碍,进而也会影响Caspase-3的活性^[22],因此线粒体产生ROS水平一定程度降低。



不同小写字母表示同一组别不同时间差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示相同时间不同组别差异显著($P < 0.05$)。图2~5、8~9同。

图1 宰后成熟过程中秦川牛背最长肌ROS含量变化

Fig. 1 Changes of ROS content in *Longissimus dorsi* muscle of Qinchuan cattle during postmortem aging

2.2 线粒体膜电位的变化

线粒体膜电位的升高或降低可以反映线粒体损伤情况^[4]。由图2可知, 抑制剂组线粒体膜电位于宰后2~8 d显著降低 ($P < 0.05$), 8 d比12 h下降49.7%, 12 h抑制剂组线粒体膜电位比对照组高10.1%, 对照组线粒体膜电位在宰后6 h~4 d显著降低 ($P < 0.05$), 4~8 d无显著变化, 这与之前的研究结果^[23]相似。宰后6 h之后, 线粒体膜发生通透并伴随着膜电位的下降, 抑制剂处理组膜电位总体高于对照组, 并且抑制剂组膜电位降低延迟。说明抑制线粒体ADP核糖基化反应可保留线粒体膜电位^[24], 减轻了氧化应激后的大规模线粒体功能障碍^[25]。

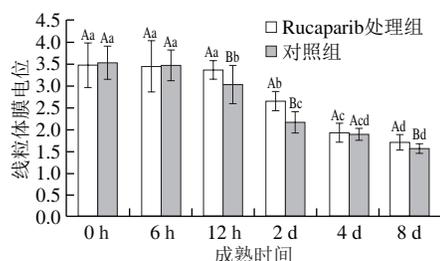


图2 宰后成熟过程中秦川牛背最长肌线粒体膜电位的变化

Fig. 2 Changes of mitochondrial membrane potential in *Longissimus dorsi* muscle of Qinchuan cattle during postmortem aging

2.3 Caspase-3表达水平的变化

Caspase-3通过线粒体内源性途径参与肉类的成熟嫩化^[26]。从图3可以看出, 抑制剂处理组在0 h~2 d期间Caspase-3活性上升 ($P < 0.05$), 2~4 d内活性逐渐下降, 活性最大值出现在2 d。对照组Caspase-3表达量在0~12 h呈显著上升趋势 ($P < 0.05$), 12 h~4 d活性显著下降 ($P < 0.05$)。宰后初期 (0~12 h), 两组的Caspase-3表达均逐渐增加, 这表明Caspase-3在牛肉宰后初期被激活^[27], 0~12 h期间, 抑制剂处理组的Caspase-3表达量始终低于对照组。本研究结果表明, 抑制PARP1的过量表达可一定程度减缓Caspase-3表达, 可以抑制凋亡信号的逐级释放。这可能是由于本该由Caspase-3切割的靶蛋白PARP1表达降低, Caspase-3无法在线粒体凋亡通路中发挥作用^[28]。

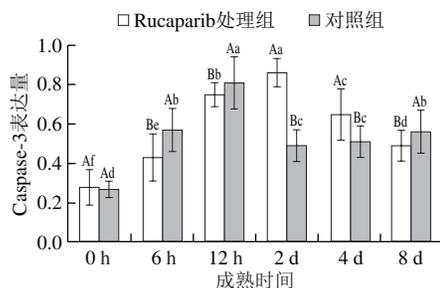


图3 宰后成熟过程中秦川牛背最长肌中Caspase-3表达量的变化

Fig. 3 Changes of caspase-3 expression in *Longissimus dorsi* muscle of Qinchuan cattle during postmortem aging

2.4 SDH活性变化

SDH是唯一整合于线粒体内膜上的多亚基酶, 在线粒体电子传递链中连接三羧酸循环、氧化磷酸化等^[29]重要代谢途径。从图4可知, 在对照组和Rucaparib处理组中SDH活性在0~8 d逐步降低。在贮藏第8天, 抑制剂组SDH活力高于对照组42.7% ($P < 0.05$)。从图4可以看出, 抑制剂组SDH活性下降较对照组慢, 说明宰后肌细胞呼吸功能被维持^[30], 线粒体电子传递链复合物II中的SDH在三羧酸循环中产生的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸是电子传递链介导高铁肌红蛋白还原不可缺少的电子传递体^[31]。PARP1的抑制可减少能量代谢底物的消耗, 保持SDH活性, 进而支撑三羧酸循环和线粒体电子传递链中的电子传递^[32], 延迟了牛肉嫩化以及颜色变化。

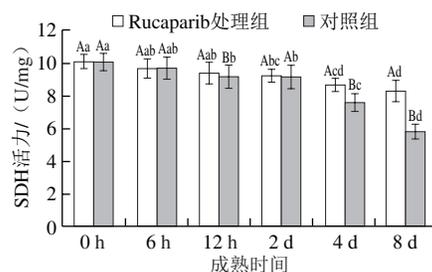


图4 宰后成熟过程中秦川牛背最长肌中SDH活力

Fig. 4 Activity of SDH in *Longissimus dorsi* muscle of Qinchuan cattle during postmortem aging

2.5 MFI的变化

MFI代表肌原纤维蛋白小片化程度, 反映细胞骨架蛋白完整情况, 用于间接表征肉品的嫩度^[33]。由图5可知, 秦川牛宰后成熟期间背最长肌MFI的变化趋势为显著上升趋势 ($P < 0.05$), 对照组在第8天达到整个贮藏过程的最高点94.00, 第8天是0 h的4.16倍。这可能是由于宰后成熟期间内源酶降解了肌纤维结构, 使其断裂为大量多肽类小片段^[1]。抑制剂组在12 h~2 d显著升高至53.00 ($P < 0.05$), 且在0 h~8 d各个时间段均低于对照组。表明PARP1抑制剂能够通过内源性途径抑制肌原纤维的降解, 这与张攀高等^[34]对宰后藏羊肉中MFI随宰后成熟时间延长的研究结果符合。

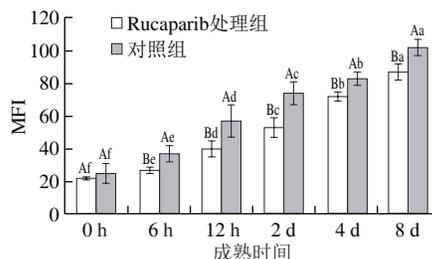
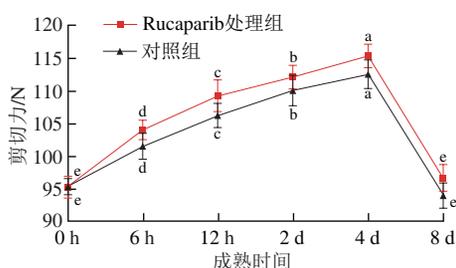


图5 宰后成熟过程中秦川牛背最长肌MFI的变化

Fig. 5 Changes of MFI in *Longissimus dorsi* muscle of Qinchuan cattle during postmortem aging

2.6 剪切力的变化

剪切力反映肉的嫩度, 剪切力越大则嫩度越差, 一般用肌肉纤维对抗剪切的作用力大小表示^[35]。从图6可以看出, 两组剪切力均呈现先升后降的趋势, 第4天达到最大值, 后期的降低可能是因为宰后肌肉经历僵直后肌纤维开始被内源酶破坏, 肌肉嫩度随之增大, 王琳琳等^[27]对牦牛肉的剪切力测定结果为第3天达到最大值, 与本研究存在差异, 这可能是品种不同造成的。Rucaparib处理组牛肉剪切力始终高于对照组, 在0~6 h上升程度大于对照组, 4~8 d下降程度大致相同, 抑制剂组剪切力较对照组略大一些。表明Rucaparib处理减缓了秦川牛宰后成熟过程中的嫩化速率。



同一组别小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。图7同。

图6 宰后成熟过程中秦川牛背最长肌剪切力的变化

Fig. 6 Changes of shear force in *Longissimus dorsi* muscle of Qinchuan cattle during postmortem aging

2.7 pH值的变化

pH值降低引起肌浆网功能受损, 引起细胞凋亡蛋白酶活化, 进而分解肌原纤维蛋白^[36]。由图7可知, 宰后0 h测得对照组和Rucaparib处理组秦川牛背最长肌pH值, 分别为6.34、6.36。随着成熟时间延长, 对照组与Rucaparib处理组pH值呈现先降后增的趋势, 抑制剂组0~12 h的降低速率低于2~4 d, 对照组和Rucaparib处理组的极限pH值分别为5.52、5.64。且对照组的pH值在0 h~8 d内低于Rucaparib处理组, Rucaparib处理组第8天较对照组高3.3%。本研究与田甲春^[37]实验得出的宰后牛肉的pH值变化趋势结果一致。以上实验结果可能是由于抑制PARP1表达能够减缓肌原纤维中能量代谢与蛋白分解速度。说明酸性环境有利于细胞凋亡的启动, 抑制PARP1表达减缓了pH值的下降。

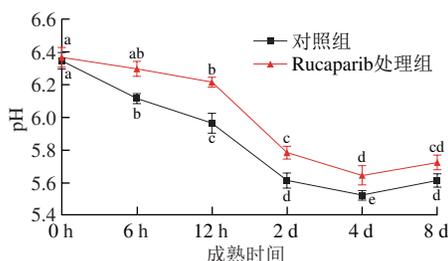


图7 宰后成熟过程中秦川牛背最长肌pH值变化

Fig. 7 Changes of pH in *Longissimus dorsi* muscle of Qinchuan cattle during postmortem aging

2.8 PARP1表达水平的变化

孟晓燕^[38]提出, Caspase-3表达水平的增高, 以及由此导致的底物PARP切割, 是诱发细胞凋亡的关键环节。如图8所示, 由Western Blot结果的条带颜色可以看出, 两组样品中PARP1蛋白表达在0 h差距较小, 对照组PARP1蛋白表达水平在0 h~8 d持续上涨, 8 d表达量是0 h的6.5倍 ($P < 0.05$), 对照组PARP1蛋白表达水平在6 h~8 d分别是Rucaparib处理组的1.52、5.98、4.02、2.88、12.15倍 ($P < 0.05$)。Rucaparib处理组第1天表达量为0.94, 第8天几乎不表达。结果表明Rucaparib抑制了PARP1激活, Caspase-3无切割底物, 并且储存了NAD⁺和ATP, 维持以ATP、NAD⁺为介质的生理学活动^[20], 减弱牛肉宰后氧化应激反应, 从而使肉质嫩化延缓。

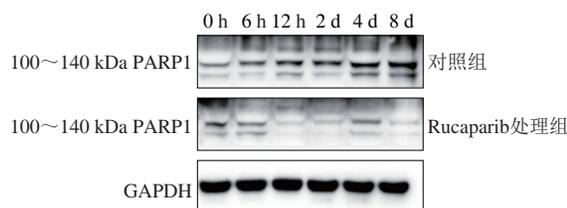
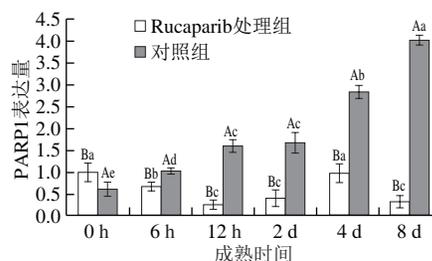


图8 宰后成熟过程中秦川牛背最长肌中PARP1表达水平变化

Fig. 8 Changes of PARP1 expression in *Longissimus dorsi* muscle of Qinchuan cattle during postmortem aging

2.9 肌间线蛋白表达水平的变化

肌间线蛋白横向连接线粒体膜、肌纤维, 是重要的骨架蛋白, 其降解对肉品嫩度形成具有直接作用^[39]。结合图9中的免疫印迹条带和表达量分析得出, 6 h~8 d Rucaparib处理组肌间线蛋白降解程度小于对照组 ($P < 0.05$), 说明Rucaparib处理组肌间线蛋白降解在宰后受到抑制。对照组免疫印迹条带在宰后成熟期间明显变浅, 表明肌间线蛋白降解程度增大, 与张爽^[40]用氯化钙与茶多酚处理宰后奶山羊骨骼肌的研究结果一致。由此得出, 在宰后成熟期间, 抑制ADP核糖基化反应, 可减缓肌间线蛋白的降解速度。

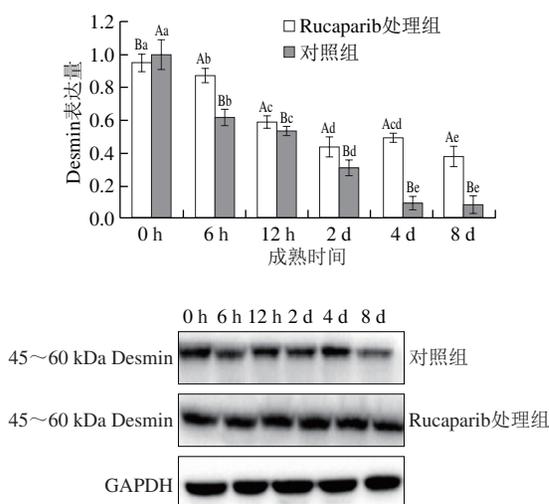


图9 宰后成熟过程中秦川牛背最长肌中Desmin表达水平变化
Fig.9 Changes of desmin expression in *Longissimus dorsi* muscle of Qinchuan cattle during postmortem aging

3 结论

本实验结果表明, 0 h~8 d (12 h除外) 抑制剂组ROS含量整体上显著低于对照组 ($P < 0.05$), 宰后12 h抑制剂组Caspase-3活性、MFI显著低于对照组 ($P < 0.05$); 在2~4 d抑制剂组线粒体膜电位较对照组高, 4~8 d抑制剂处理组SDH活性显著高于对照组 ($P < 0.05$)。通过抑制PARP1的活性发现肌细胞中ROS含量显著减少, Caspase-3活性减弱, SDH活性升高, 线粒体膜电位也升高, 进而在肉质方面表现为MFI降低, pH值下降速率变慢, 剪切力变大, 负责连接单个肌原纤维的肌间线蛋白降解变慢, 因此得出, 可通过抑制ADP核糖基化反应调控线粒体内源性途径, 使牛肉嫩化减缓。

参考文献:

[1] 黄琳琳, 张一敏, 朱立贤, 等. 蛋白质氧化和翻译后修饰对肉品质的影响及机制研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(9): 241-247. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200330-435.

[2] D'ALESSANDRO A, ZOLLA L. Meat science: from proteomics to integrated omics towards system biology[J]. Journal of Proteomics, 2013, 78: 558-577. DOI:10.1016/j.jprot.2012.10.023.

[3] 闫珍珍, 杨肖云, 王亚光, 等. ADP-核糖基化可逆修饰在DNA损伤应答及癌症治疗中的研究进展[J]. 中国科学: 生命科学, 2021, 51(9): 1218-1228.

[4] 张佳莹. 线粒体通路信号介导细胞凋亡机制及对宰后牛肉嫩化影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020.

[5] 刘雪莲. PARP活性检测及抑制剂筛选[D]. 广州: 东南大学, 2020.

[6] XU J J, DAI X M, LIU H L, et al. A novel 7-azaisoindigo derivative-induced cancer cell apoptosis and mitochondrial dysfunction mediated

by oxidative stress[J]. Journal of Applied Toxicology, 2011, 31(2): 164-172. DOI:10.1002/jat.1577.

[7] ZHANG J Y, YU Q L, HAN L, et al. Effects of lysosomal iron involvement in the mechanism of mitochondrial apoptosis on postmortem muscle protein degradation[J]. Food Chemistry, 2020, 328: 127174. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.127174.

[8] 王宇, 袁倩, 王柏辉, 等. 腺苷酸活化蛋白酶活性及其级联效应对肉品质的影响研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(17): 298-304. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201817047.

[9] 姜珊珊, 杨阳, 刘登勇, 等. 注射水和氯化钙溶液对宰后猪肉肉色及其稳定性的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(17): 106-111.

[10] FUENTES-PRIOR P, SALVESEN G S. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition[J]. Biochemical Journal, 2004, 384(Pt 2): 201-232. DOI:10.1042/bj20041142.

[11] SLEIJFER S, BOGAERTS J, SIU L L. Designing transformative clinical trials in the cancer genome era[J]. Journal of Clinical Oncology, 2013, 31(15): 1834-1841. DOI:10.1200/jco.2012.45.3639.

[12] 陈骋. 脂质氧化和抗氧化因子对牦牛肉肌红蛋白稳定性及高铁肌红蛋白还原能力的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.

[13] TIAN Z, LI X R, SHI X X, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitor on mitochondria apoptosis and meat quality in postmortem Gannan yak (*Bos grunniens*) meat[J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(9): e14234. DOI:10.1111/jfbc.14234.

[14] 师希雄, 张攀高, 赵瑞娜, 等. 冰温贮藏甘南藏羊肉色稳定性与线粒体MMb还原能力研究[J]. 农业机械学报, 2022, 53(5): 400-405.

[15] 马旭华, 杨波, 李亚蕾, 等. 宰后成熟期间结构蛋白对秦川牛肉嫩度的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(17): 199-207. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210706-050.

[16] 陈骋, 郭雨轩, 师希雄, 等. HIF-1 α 作用下宰后成熟初期牛肉糖酵解能力研究[J]. 农业机械学报, 2022, 53(4): 403-411.

[17] 师希雄, 罗天林, 余群力. 牦牛肉成熟前后差异蛋白质组学分析[J]. 农业机械学报, 2015, 46(9): 251-256.

[18] MADEO F, FROHLICH E, LIGR M, et al. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast[J]. Journal of Cell Biology, 1999, 145(4): 757-767. DOI:10.1083/JCB.145.4.757.

[19] 师希雄, 岳建伟, 张攀高, 等. 宰后H₂O₂处理的藏羊肉能量代谢、细胞凋亡及嫩化研究[J]. 农业机械学报, 2021, 52(3): 357-363.

[20] 张绘艳, 罗通旺, 严磊, 等. PARP-1蛋白在镉致NRK-52E细胞凋亡中的作用研究[J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(12): 11-14.

[21] 肖靖淞, 侯贵钟, 赛燕, 等. PARP-1在鱼藤酮诱导PC12细胞线粒体DNA损伤中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(8): 778-785.

[22] 李艳红. Cr(VI)诱导肝细胞凋亡与线粒体电子传递链功能障碍的关系[D]. 长沙: 中南大学, 2011.

[23] 刘春梅, 魏起超, 韩东, 等. 线粒体膜通透性转化孔促进剂苍术苷对宰后牛肉线粒体损伤及嫩度的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(8): 124-130. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220401-002.

[24] 柴晶美, 李欣, 尤文, 等. 二参颗粒对氯化钴诱导的H9C2细胞氧化应激介导的细胞凋亡的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2020, 36(2): 175-179. DOI:10.13412/j.cnki.zyyj.2020.02.013.

[25] DU L, ZHANG X, HAN Y Y, et al. Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced

- by oxidative stress[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(20): 18426-18433. DOI:10.1074/jbc.m301295200.
- [26] 黄峰. 细胞凋亡效应酶在牛肉成熟过程中的作用机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [27] 王琳琳, 孙志昶, 韩玲, 等. 细胞能量代谢酶对牦牛肉宰后成熟过程中Caspase-3及肉品质的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(4): 102-111.
- [28] 杨安慧. 石吊兰素通过caspase-3介导肝癌细胞凋亡的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [29] 徐婷, 李华, 鲁姗姗, 等. 线粒体电子传递呼吸链及其生物学意义的研究进展[J]. 复旦学报(医学版), 2015, 42(2): 250-255.
- [30] 张小康, 上官相超, 陈长宝, 等. 一氧化氮对冷藏桃果实能量代谢的调控作用[J]. 保鲜与加工, 2019, 19(4): 1-9.
- [31] 梁荣蓉, 许宝琛, 张一敏, 等. 蛋白质组学在生鲜肉肉色变化机制研究中的应用[J]. 农业工程学报, 2020, 36(16): 283-292.
- [32] 黄欣莉, 韩延超, 陈杭君, 等. 1-甲基环丙烯通过调控香菇能量代谢抑制其采后褐变[J]. 食品科学, 2022, 43(13): 192-198. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20211217-202.
- [33] 吴菊清, 李春保, 周光宏, 等. 宰后成熟过程中冷却牛肉、猪肉色泽和嫩度的变化[J]. 食品科学, 2008(10): 136-139.
- [34] 张攀高, 师希雄, 田铸, 等. 宰后N-硝基-L-精氨酸甲酯盐酸盐处理对藏羊肉品质的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(19): 43-48. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20201028-290.
- [35] 杨致昊, 刘畅, 窦露, 等. 苏尼特羊宰后成熟过程中单磷酸腺苷活化蛋白激酶活性、糖酵解与肉品质指标的变化分析[J]. 食品科学, 2022, 43(11): 156-162. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210426-377.
- [36] MA J B, YU Q L, HAN L. The effect of postmortem pH decline rate on caspase-3 activation and tenderness of bovine skeletal muscle during aging[J]. Journal of Food Biochemistry, 2022, 46(9): e14215. DOI:10.1111/jfbc.14215.
- [37] 田甲春. 牦牛肉宰后成熟过程中组织蛋白酶L、B、H对肉品质及微观结构的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [38] 孟晓燕. 半胱氨酸蛋白酶-3和多聚(ADP-核糖)聚合酶-1在过度训练致急性肾损伤中的表达及山茛菪碱干预的影响[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2007.
- [39] 薛梅. 蛋白质氧化对牛肉成熟过程肌原纤维蛋白降解和食用品质的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [40] 张爽. 细胞凋亡诱导剂对羊肉成熟过程Caspase-3激活通路的机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.