

## 滩羊肉嫩度形成中 $\text{Ca}^{2+}$ 的信号转导作用

姬琛<sup>1</sup>, 尤丽琴<sup>1</sup>, 刘吉娟<sup>2</sup>, 罗瑞明<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>宁夏大学农学院 银川 750021

<sup>2</sup>宁夏大学食品与葡萄酒学院 银川 750021)

**摘要** 以 6 月龄滩羊背最长肌为研究对象,测定 4 °C 贮藏 0,96,192 h 时剪切力、线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  水平、钙蛋白酶-1 及细胞凋亡效应酶-3 活性。基于同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ)结合多维液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术,研究贮藏期间  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路及凋亡调节信号转导通路蛋白质表达量的变化情况。结果表明:4 °C 贮藏期间,滩羊肉剪切力先降低后升高,线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  含量先升高后降低,钙蛋白酶-1 活性持续降低,细胞凋亡效应酶-3 活性先上升后下降。滩羊肉剪切力与  $\text{Ca}^{2+}$  水平呈显著负相关,与钙蛋白酶-1 活性呈极显著正相关,与细胞凋亡效应酶-3 活性呈极显著负相关。蛋白质组学分析表明: $\text{Ca}^{2+}$  跨膜转运 ATP 酶利用 ATP 水解的能量驱动  $\text{Ca}^{2+}$  跨膜运输,电压依赖性阴离子通道蛋白贮藏初期上调表达,为  $\text{Ca}^{2+}$  流入线粒体提供渠道,导致线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  超载、线粒体功能紊乱,使线粒体复合体表达量上升。同时,VDAC 异常表达促使 CYTC 释放至胞浆,最终激活细胞凋亡效应酶-3,水解结构蛋白质。另外, $\text{Ca}^{2+}$  可间接导致肌动蛋白表达量下调,引起细胞收缩,从而影响肉的嫩度。本研究结果证实  $\text{Ca}^{2+}$  在肉品嫩度形成过程中起重要的信号转导作用。

**关键词** 滩羊; 品质形成;  $\text{Ca}^{2+}$ ; 信号转导; 蛋白质组学

**文章编号** 1009-7848(2022)12-0214-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.12.022

嫩度是衡量肉品品质的重要指标,贮藏过程中肉品嫩度的变化主要是由于内源酶引起的结构蛋白质的水解<sup>[1]</sup>。钙蛋白酶(Calpains)是公认的结构蛋白水解酶,钙蛋白酶-1 参与大多数肌原纤维蛋白的降解过程,引起肌肉嫩度约 70% 的差异。细胞内钙蛋白酶-1 的激活依赖于  $\text{Ca}^{2+}$  浓度<sup>[2]</sup>,其被激活后可降解多种细胞骨架蛋白,如伴肌动蛋白、肌钙蛋白 T 和肌间线蛋白等。细胞凋亡酶(Caspases)被认为在细胞骨架蛋白的降解中发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。Huang 等<sup>[5]</sup>和 Ouali 等<sup>[6]</sup>研究表明细胞凋亡效应酶-3 有助于弱化 Z 盘和 I 盘之间的连接,从而影响肉的嫩度。细胞凋亡酶的激活依赖于内源性细胞凋亡引起的级联反应,线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  超载是引起内源性细胞凋亡的重要原因。因此,宰后贮藏期间  $\text{Ca}^{2+}$  的信号转导作用对肉品嫩度形成具有重要意义。

蛋白质组学分析为揭示肌肉转化为肉所经历的分子修饰提供了强有力的基础<sup>[6]</sup>。Zuo 等<sup>[7]</sup>采用蛋白质组学对不同保水性的牦牛肉进行分析,发现肌球蛋白轻链、热休克蛋白 27 和磷酸丙糖异构

酶可作为牦牛肉持水能力的生物标志物。Della 等<sup>[8]</sup>采用蛋白质组学研究宰后成熟过程中马不同部位肌肉蛋白质的降解情况,发现半腱肌的水解程度更剧烈。LÓPEZ-PEDROUSO 等<sup>[9]</sup>基于 SWATH-MS 研究发现糖异生、糖酵解及三羧酸循环是影响牛肉嫩度的重要途径。罗辉等<sup>[10]</sup>发现秦川牛肉贮藏过程中蛋白质变化引起的能量代谢物变化,对肉品质形成具有一定贡献。李升升<sup>[11]</sup>研究发现钙蛋白酶抑制蛋白、SLC25A4、ZYG、LMOD1 等可作为牦牛平滑肌嫩度的指示蛋白。然而,现有研究多为肉品嫩度生物标志物鉴定,蛋白质水平变化与肉品嫩度的关系,影响肉品嫩度形成的主要途径等,缺乏关键信号因子  $\text{Ca}^{2+}$  在嫩度形成中发挥信号转导作用的研究。

本试验以 6 月龄滩羊背最长肌为研究对象,测定其 4 °C 贮藏 0,96,192 h 时剪切力、线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  水平、钙蛋白酶-1 活性及细胞凋亡效应酶-3 活性的变化情况,基于同位素标记相对和绝对定量技术(iTRAQ)结合多维液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术研究贮藏过程中  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路及凋亡调节信号转导通路蛋白质表达量变化,确定  $\text{Ca}^{2+}$  在滩羊肉嫩度形成方面的信号转导作用,为进一步完善宰后肉品嫩度形成理论,改善滩

收稿日期: 2021-12-22

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(31860427)

第一作者: 姬琛,女,博士生

通信作者: 罗瑞明 E-mail: 11003912921tfboys@163.com

羊肉嫩度提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

滩羊背最长肌,宁夏盐池县大夏牧场食品有限公司提供。

尿素、二硫苏糖醇、碘乙酰胺、IPG buffer、甲酸,美国 GE Healthcare 公司;十二烷基磺酸钠、三羧基氨基甲烷、三氯乙酸、过硫酸铵、四甲基乙二胺,美国 Amresco 公司;三乙二胺碳酸盐和考马斯亮蓝 G-250, 美国 Sigma 公司;胰蛋白酶, 美国 Promega 公司;乙腈、水,美国赛默飞世尔公司;甘露醇、EDTA、硝酸、浓盐酸、浓硫酸(分析纯),国药集团;Elisa 试剂盒,上海科兴生物科技有限公司。未注明试剂均为色谱纯级。

### 1.2 仪器与设备

Sciex Triple TOF 5600 质谱仪、Eksigent nano LC-1D 液相系统, 美国 SCIEX 公司;Image Scanner III 扫描仪,美国 GE Healthcare 公司;iCE 3400 AAS 原子吸收光谱仪, 美国赛默飞世尔公司;VCX130 超声波细胞粉碎机, 美国 Sonics 公司;C-LM40 嫩度仪,北京布拉德科技发展有限公司;5910R 冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;真空冷冻干燥机,小垂直板电泳槽,美国伯乐公司。

### 1.3 方法

1.3.1 样品采集 采集宰后 4 ℃, 风速 3 m/s, 相对湿度 80%, 成熟 0, 96, 192 h 的滩羊背最长肌 200 g, 用于测定剪切力。采集不同成熟时间样本各 5 g, 封装于灭菌冷冻管中, 置于 -80 ℃ 冰箱备用, 用于测定钙蛋白酶-1 及细胞凋亡效应酶-3 活性。采集不同成熟时间样本 200 mg, 封装于灭菌冷冻管中, 置于 -80 ℃ 冰箱备用, 用于蛋白质组学分析。

1.3.2 蛋白质组学分析 参照李子欣等<sup>[12]</sup>的方法提取纯化滩羊肉中蛋白质, 置于 -80 ℃ 冰箱备用。参照尤丽琴等<sup>[13]</sup>的方法检索并筛选差异蛋白质。差异蛋白质的生物信息学分析通过京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路注释完成。

1.3.3 线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  含量的测定 参照王琳琳<sup>[14]</sup>的方法分离线粒体, 测定其  $\text{Ca}^{2+}$  含量。

1.3.4 钙蛋白酶-1 及细胞凋亡效应酶-3 活性测定 采用 Elisa 试剂盒, 根据操作说明书分别测定钙蛋白酶-1 活性及细胞凋亡效应酶-3 活性。

1.3.5 剪切力的测定 剪切力的测定采用 Di Luca 等<sup>[15]</sup>的方法并稍作修改。剔除可见脂肪与结缔组织, 将样品修整为 5 cm×5 cm×5 cm 的块状, 置于自封袋中, 于 80 ℃ 水浴锅中煮制。待中心温度到达 70 ℃ 后取出样品, 室温放置 12 h 后用取样器平行于肌纤维方向取直径为 1.27 cm 的肉柱, 以 1 mm/s 垂直于样品剪切肉柱, 测定其剪切力。

### 1.4 统计分析

每个指标重复测定 3 次, 结果以平均值±标准偏差(Standard Deviation, S.D.)表示。采用 SPSS 软件对数据进行方差分析、邓肯多元方差检验以及 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$  的变量被认为不同成熟时间之间存在显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 剪切力、线粒体 $\text{Ca}^{2+}$ 含量、钙蛋白酶-1 活性及细胞凋亡效应酶-3 活性变化

表 1 所示不同贮藏时间滩羊背最长肌剪切力、线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  含量、钙蛋白酶-1 活性及细胞凋亡效应酶-3 活性变化情况。贮藏 0 h 时, 滩羊背最长肌剪切力为 4.79 kgf; 贮藏 96 h 时, 滩羊背最长肌剪切力显著降低至 3.17 kgf ( $P < 0.05$ ); 贮藏 192 h 时, 滩羊背最长肌剪切力显著升至 3.74 kgf ( $P < 0.05$ ), 说明适度的贮藏有助于改善滩羊肉嫩度, 这与李文博等<sup>[16]</sup>的结论一致。0~96 h 内剪切力降低, 可能是由于构成肌肉结构的蛋白质在贮藏期间发生降解<sup>[17]</sup>。

线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  含量贮藏 0 h 为 2.23 mg/L, 96 h 显著上升至 2.52 mg/L ( $P < 0.05$ ), 192 h 时又降至 2.20 mg/L ( $P < 0.05$ ), 表明 0~96 h 内滩羊肌细胞线粒体发生  $\text{Ca}^{2+}$  超载, 与王琳琳<sup>[14]</sup>的研究结果一致。 $\text{Ca}^{2+}$  主要储存于内质网, 正常的离子稳态是维持细胞生命活动的基本条件, 线粒体摄取生理性  $\text{Ca}^{2+}$  信号调节有氧代谢, 而宰后  $\text{Ca}^{2+}$  超载会引起细胞程序性死亡, 即细胞凋亡过程<sup>[14]</sup>。同时,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度可调节细胞骨架蛋白水解酶钙蛋白酶活性。

钙蛋白酶-1 活性在整个贮藏期呈显著降低趋势 ( $P < 0.05$ ), 96 h 时显著降至初始值的 14%,

192 h 时显著降至初始值的 6%。大量研究表明,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高促使钙蛋白酶活性增强,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度进一步提高导致构象变化而表现蛋白水解酶活性, 是宰后贮藏初期细胞质中主要的蛋白水解酶, 在肌原纤维蛋白降解及肉品嫩度形成中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。钙蛋白酶-1 最适 pH7.0 左右<sup>[22]</sup>, 因此, 除  $\text{Ca}^{2+}$  外宰后肌肉 pH 值的变化也影响钙蛋白酶-1 活性, 其活性下降可能与宰后初期细胞环境酸化有关。

细胞凋亡效应酶-3 活性于贮藏期内呈先升高后降低的趋势, 96 h 时显著上升至初始值的 130% ( $P < 0.05$ ), 192 h 时活性为初始值的 116% ( $P < 0.05$ ), 表明线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  超载可能引起细胞凋亡级联反应, 使细胞凋亡效应酶-3 被激活, 且直至宰后 192 h 其活性仍显著高于初始活性。黄明等<sup>[23]</sup>证实细胞凋亡效应酶-3 可体外降解结构蛋白, 参与肉品宰后的嫩化。

表 1 不同贮藏时间滩羊肉剪切力、线粒体钙离子水平、钙蛋白酶-1 活性及细胞凋亡效应酶-3 活性变化  
Table 1 Changes in shear force, content of mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$ , and activities of calpain-1 and caspase-3

| 贮藏时间/h | 剪切力/kgf                  | $\text{Ca}^{2+}$ 含量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 钙蛋白酶-1 活性<br>(变化倍数)      | 细胞凋亡效应酶-3 活性<br>(变化倍数)   |
|--------|--------------------------|--|--------------------------|--------------------------|
| 0      | 4.79 ± 0.06 <sup>a</sup> | 2.23 ± 0.03 <sup>b</sup>                             | 1 <sup>a</sup>           | 1 <sup>c</sup>           |
| 96     | 3.17 ± 0.13 <sup>c</sup> | 2.52 ± 0.02 <sup>a</sup>                             | 0.14 ± 0.01 <sup>b</sup> | 1.30 ± 0.02 <sup>a</sup> |
| 192    | 3.74 ± 0.05 <sup>b</sup> | 2.20 ± 0.04 <sup>b</sup>                             | 0.06 ± 0.01 <sup>c</sup> | 1.16 ± 0.13 <sup>b</sup> |

注: a-c 表示不同贮藏期的样本间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 下同。

## 2.2 剪切力与线粒体 $\text{Ca}^{2+}$ 水平、钙蛋白酶-1 活性及细胞凋亡效应酶-3 活性的相关性分析

表 2 所示为剪切力与线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  水平、钙蛋白酶-1 活性及细胞凋亡效应酶-3 活性的相关性分析。滩羊背最长肌剪切力与  $\text{Ca}^{2+}$  水平呈显著负相关 ( $P < 0.05$ ), 与钙蛋白酶-1 活性呈极显著正相关 ( $P < 0.01$ ), 与细胞凋亡效应酶-3 活性呈极显著负相关 ( $P < 0.01$ ); 钙蛋白酶-1 活性与细胞凋亡效应酶-3 活性呈极显著负相关 ( $P < 0.01$ ), 与  $\text{Ca}^{2+}$  水平与无明显相关性; 细胞凋亡效应酶-3 活性与  $\text{Ca}^{2+}$  水平呈显著正相关 ( $P < 0.05$ )。钙蛋白酶-1 活性不受  $\text{Ca}^{2+}$  水平影响, 可能是因为钙蛋白酶-1 活性受细胞环境影响因素如 pH 值、ATP 含量等较大。细胞凋亡效应酶-3 活性受细胞凋亡因子的调控, 线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  超载是促使 CYTC 释放至胞浆中的重要原因, 在细胞凋亡效应酶-3 激活过程中具有正向调控作用。钙蛋白酶-1 与细胞凋亡效应酶-3 均为水解肌原纤维的蛋白质, 肌原纤维蛋白降解由肌原纤维解装配成肌丝启动, 大量研究表明钙蛋白酶参与这一解装配过程, 因此, 钙蛋白酶-1 可能参与成熟初期肌原纤维蛋白的降解, 而细胞凋亡效应酶-3 在整个贮藏过程中均可水解肌原纤维。

表 2 不同贮藏时间滩羊肉剪切力与线粒体钙离子水平、钙蛋白酶-1 及细胞凋亡效应酶-3 活性相关性分析  
Table 2 Correlations between shear force and content of mitochondria  $\text{Ca}^{2+}$  and activities of calpain-1 and caspase-3

|              | 剪切力 | 钙离子     | 钙蛋白酶-1 活性 | 细胞凋亡效应酶-3 活性 |
|--------------|-----|---------|-----------|--------------|
| 剪切力          | 1   | -0.704* | 0.900**   | -0.983**     |
| 钙离子          |     | 1       | -0.352    | 0.716*       |
| 钙蛋白酶-1 活性    |     |         | 1         | -0.896**     |
| 细胞凋亡效应酶-3 活性 |     |         |           | 1            |

注: \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ 。

## 2.3 $\text{Ca}^{2+}$ 信号通路及凋亡调节信号转导通路关键蛋白质的变化

为明确  $\text{Ca}^{2+}$  在宰后的信号转导作用, 通过蛋白质组学分析鉴定  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路及凋亡相关信号转导通路蛋白质表达的变化情况, 结果显示: 贮藏 96 h 与 0 h 对比, 鉴定出 7 个显著差异蛋白质富集于  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路, 其中, 5 个上调表达差异蛋白质, 2 个下调表达差异蛋白; 192 h 与 96 h 对比, 鉴定出 3 个显著差异蛋白质富集于  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路,

均为下调表达差异蛋白质 (表 3)。其中,ATP2A1 即  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase,主要催化 ATP 的水解,并将  $\text{Ca}^{2+}$  由细胞质转移至内质网钙库,参与调节收缩/舒张周期<sup>[24]</sup>,其上调表达可能是因为动物屠宰后细胞环境及能量水平的改变导致细胞内离子平衡被打破,引起大量离子交换,ATP2A1 试图将  $\text{Ca}^{2+}$  逆浓度梯度泵入钙库。VDAC1 与 VDAC2 为电压依赖性阴离子通道蛋白 1 与 2,是线粒体通透性转换孔(mPTP)的构成部分<sup>[25]</sup>,调控 mPTP 的开放,其表达量上调可能导致线粒体内膜不完整并引起

mPTP 不可逆开放,线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  超载可能由此引起。SLC25A4 参与线粒体 ADP/ATP 的转移,PPP3CA 为钙依赖性酶,在细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  介导的信号转导中起重要作用。MYLK2 是一种钙/钙调蛋白依赖的酶,与肌肉收缩相关<sup>[26]</sup>。不同贮藏期  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路的变化表明,屠宰后初期滩羊肌细胞内离子稳态失衡, $\text{Ca}^{2+}$  刺激下游一系列蛋白质表达的变化,引起不同时期肌细胞收缩、肌纤维降解等现象,从而调节动物屠宰后肌肉的嫩度。

表 3 不同贮藏期  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路中富集的差异表达蛋白质

Table 3 The differentially abundant proteins enriched in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway at different storage periods

| 贮藏时间/h | 基因名称    | 蛋白质描述                 | 差异倍数 | 变化趋势 |
|--------|---------|-----------------------|------|------|
| 0~96   | ATP2A1  | 肌浆/内质网钙 ATP 酶 1       | 2.80 | ↑    |
|        | TNNC1   | 肌钙蛋白 C                | 1.67 | ↑    |
|        | SLC25A4 | ADP/ATP 移位酶 1         | 2.13 | ↑    |
|        | VDAC2   | 电压依赖性阴离子通道蛋白 2        | 1.31 | ↑    |
|        | VDAC1   | 电压依赖性阴离子通道蛋白 1        | 1.29 | ↑    |
|        | PPP3CA  | 蛋白磷酸酶 3 催化亚基 $\alpha$ | 0.78 | ↓    |
|        | ATP2A2  | 肌浆/内质网钙 ATP 酶 2       | 0.77 | ↓    |
| 96~192 | MYLK2   | 肌球蛋白轻链激酶 2            | 0.48 | ↓    |
|        | TNNC1   | 肌钙蛋白 C                | 0.36 | ↓    |
|        | SLC25A4 | ADP/ATP 移位酶 1         | 0.78 | ↓    |

注:“↑”表示上调表达的差异蛋白质,“↓”表示下调表达的差异蛋白质。

表 4 所示凋亡调节信号转导通路相关蛋白质的变化。0~96 h 内 30 个显著差异表达蛋白质富集于凋亡调节信号转导通路,其中,23 个上调表达的差异蛋白质,7 个下调表达的差异蛋白质。96~192 h 内 15 个显著差异表达蛋白质富集于凋亡调节信号转导通路,其中 6 个上调表达的差异蛋白质,9 个下调表达的差异蛋白质。凋亡信号调节转导通路富集的差异蛋白质表明,滩羊屠宰后受缺氧缺血信号的刺激,线粒体发生不可逆的损伤,线粒体复合体 I, II, III, IV, V 表达量上调,试图通过将 NADH 转换为  $\text{NAD}^+$  与  $\text{H}^+$  调节细胞内离子稳态,降低合成反应所引起的 ATP 消耗,由此引起  $\text{H}^+$  积累<sup>[27]</sup>,这可能是导致 96 h 内钙蛋白酶-1 活性降低的重要原因之一。王霖<sup>[28]</sup>研究表明胞质或线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  升高可能会破坏线粒体电子传递体,这与本研究结论一致。CYTC 在线粒体嵴突上与其它

氧化酶排列成呼吸链,作为电子传递体之一参与有氧呼吸,在能量代谢调节中扮演重要角色,也是线粒体凋亡途径的重要调控因子。CYTC 从线粒体释放到胞浆中,会导致电子呼吸链的电子传递受阻,引发细胞能量供应减少。VDAC1 与 VDAC2 作为 mPTP 蛋白,其上调表达可能为 CYTC 释放至胞浆中提供了渠道,由此启动凋亡级联反应<sup>[29]</sup>,激活细胞凋亡效应酶-3。Wang 等<sup>[30]</sup>研究表明,CYTC 宰后初期从牦牛肌细胞线粒体释放至胞浆中,最终激活细胞凋亡效应酶-3,并影响肌肉嫩度,而线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  超载是触发 CYTC 释放的重要原因。CYTC 释放及细胞色素 C 氧化酶亚基 II(COX2)下调表达,可能是引起宰后电子传递链解偶联的主要原因。胞浆中 CYTC 表达量上调引起的电子传递受阻,可能与宰后能量供给方式转变有关。

表4 不同贮藏期凋亡调节信号转导通路中富集的显著差异表达蛋白质

Table 4 The differentially abundant proteins enriched in apoptosis signal transduction pathways at different storage periods

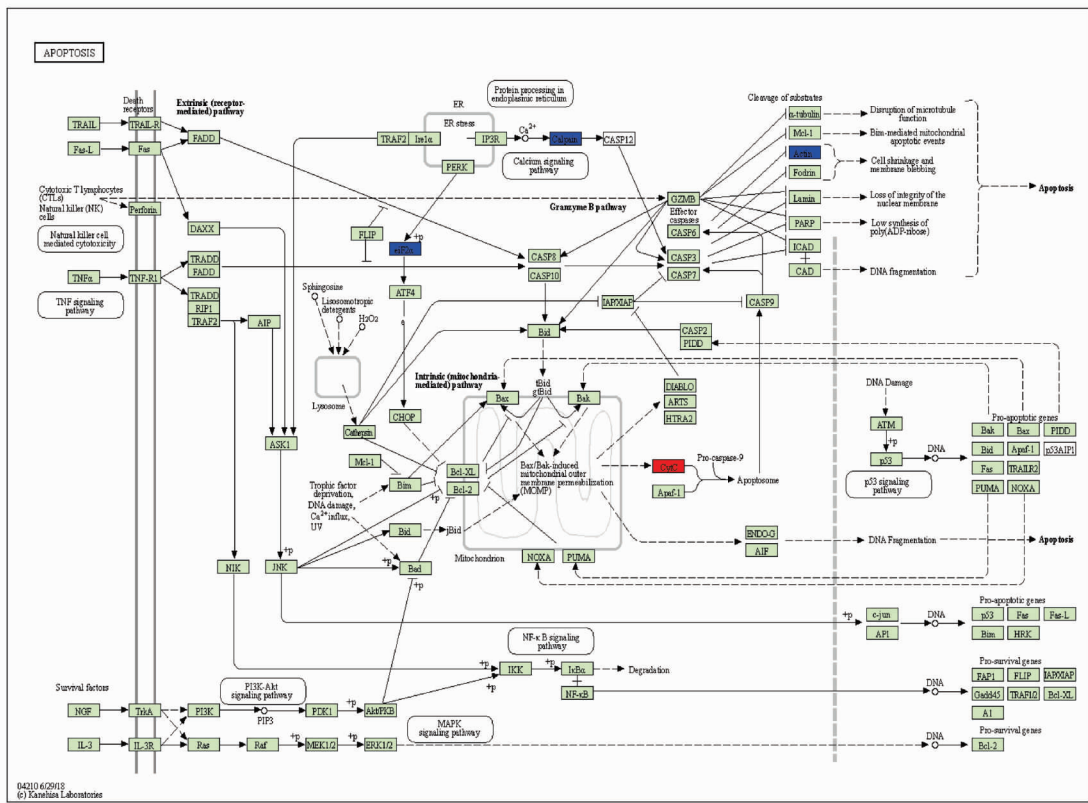
| 贮藏时间/h         | 基因名称           | 蛋白质描述                               | 差异倍数               | 变化趋势 |   |
|----------------|----------------|-------------------------------------|--------------------|------|---|
| 0~96           | <i>CYTC</i>    | 细胞色素 C                              | 1.95               | ↑    |   |
|                | <i>ATP2A1</i>  | ATP 酶肌浆/内质网 Ca <sup>2+</sup> 转运蛋白 1 | 2.80               | ↑    |   |
|                | <i>SLC25A4</i> | ADP/ATP 移位酶 1                       | 2.13               | ↑    |   |
|                | <i>VDAC2</i>   | 电压依赖性阴离子通道蛋白 2                      | 1.31               | ↑    |   |
|                | <i>VDAC1</i>   | 电压依赖性阴离子通道蛋白 1                      | 1.29               | ↑    |   |
|                | <i>NDUFAB1</i> | NADH:泛素氧化还原酶亚基 AB1                  | 2.45               | ↑    |   |
|                | <i>COX5A</i>   | 细胞色素 C 氧化酶亚基 5A                     | 1.36               | ↑    |   |
|                | <i>UQCRRS1</i> | 泛素-细胞色素 C 还原酶                       | 1.24               | ↑    |   |
|                | <i>UQCRI0</i>  | 泛素-细胞色素 C 还原酶复合物 III 亚基 X           | 1.26               | ↑    |   |
|                | <i>SDHB</i>    | 琥珀酸脱氢酶配合铁硫亚基 B                      | 1.87               | ↑    |   |
|                | <i>ATP5D</i>   | ATP 合成酶 F1 亚单位 Delta                | 1.49               | ↑    |   |
|                | <i>ATP5H</i>   | ATP 合酶外周茎亚单位 D                      | 1.61               | ↑    |   |
|                | <i>COX4I1</i>  | 细胞色素 C 氧化酶亚基 4I1                    | 1.36               | ↑    |   |
|                | <i>ATP5O</i>   | ATP 合酶外周茎亚单位 OSCP                   | 1.68               | ↑    |   |
|                | <i>NDUFV1</i>  | NADH:泛素氧化酶核心亚基 V1                   | 1.31               | ↑    |   |
|                | <i>COX5B</i>   | 细胞色素 C 氧化酶亚基 5B                     | 1.56               | ↑    |   |
|                | <i>NDUFA8</i>  | NADH:泛素氧化还原酶亚基 A8                   | 1.54               | ↑    |   |
|                | <i>ATP5J</i>   | ATP 合成酶 F 亚基                        | 1.51               | ↑    |   |
|                | <i>HSPA8</i>   | 热休克蛋白家族 A(Hsp70)成员 8                | 1.22               | ↑    |   |
|                | <i>FLNB</i>    | 细丝蛋白 B                              | 1.82               | ↑    |   |
|                | <i>HSPA1B</i>  | 热休克蛋白家族 A(Hsp70)成员 1B               | 1.35               | ↑    |   |
|                | <i>SKP1</i>    | s 相激酶关联蛋白 1                         | 1.22               | ↑    |   |
|                | <i>SOD2</i>    | 超氧化物歧化酶 2                           | 1.82               | ↑    |   |
|                | <i>PPP3CA</i>  | 蛋白磷酸酶 3 催化亚基 α                      | 0.78               | ↓    |   |
|                | <i>GNAI2</i>   | G 蛋白亚基 α I2                         | 0.70               | ↓    |   |
|                | <i>ACTG1</i>   | 肌动蛋白 γ1                             | 0.21               | ↓    |   |
|                | <i>CAPN1</i>   | 钙蛋白酶-1                              | 0.79               | ↓    |   |
|                | <i>EIF2S1</i>  | 真核翻译起始因子 2 亚单位 α                    | 0.79               | ↓    |   |
|                | <i>MT-CO2</i>  | 线粒体编码细胞色素 C 氧化酶 II                  | 0.53               | ↓    |   |
|                | <i>ATP2A2</i>  | ATP 酶肌浆/内质网 Ca <sup>2+</sup> 转运蛋白 2 | 0.77               | ↓    |   |
|                | 96~192         | <i>ACTG1</i>                        | 肌动蛋白 γ1            | 2.96 | ↑ |
|                |                | <i>MT-CO2</i>                       | 线粒体编码细胞色素 C 氧化酶 II | 2.14 | ↑ |
|                |                | <i>ATP5A1</i>                       | ATP 合成酶 α 亚基 1     | 1.86 | ↑ |
| <i>NDUFA13</i> |                | NADH:泛素氧化还原酶亚基 A13                  | 1.31               | ↑    |   |
| <i>COX4I1</i>  |                | 细胞色素 C 氧化酶亚基 4I1                    | 1.22               | ↑    |   |
| <i>UQCRRQ</i>  |                | 泛素-细胞色素 C 还原酶复合物 III 亚基 VII         | 1.47               | ↑    |   |
| <i>NDUFAB1</i> |                | NADH:泛素氧化还原酶亚基 AB1                  | 0.71               | ↓    |   |
| <i>COX5A</i>   |                | 细胞色素 C 氧化酶亚基 5A                     | 0.78               | ↓    |   |
| <i>HSPA8</i>   |                | 热休克蛋白家族 A(Hsp70)成员 8                | 0.48               | ↓    |   |
| <i>FLNB</i>    |                | 细丝蛋白 B                              | 0.73               | ↓    |   |
| <i>HSPA1B</i>  |                | 热休克蛋白家族 A(Hsp70)成员 1B               | 0.48               | ↓    |   |
| <i>HSPB1</i>   |                | 热休克蛋白家族 B(小)成员 1                    | 0.71               | ↓    |   |
| <i>CYTC</i>    |                | 细胞色素 C                              | 0.71               | ↓    |   |
| <i>SLC25A4</i> |                | ADP/ATP 移位酶 1                       | 0.78               | ↓    |   |
| <i>MYLK2</i>   |                | 肌球蛋白轻链激酶 2                          | 0.48               | ↓    |   |

注:“↑”表示上调表达的差异蛋白质,“↓”表示下调表达的差异蛋白质。

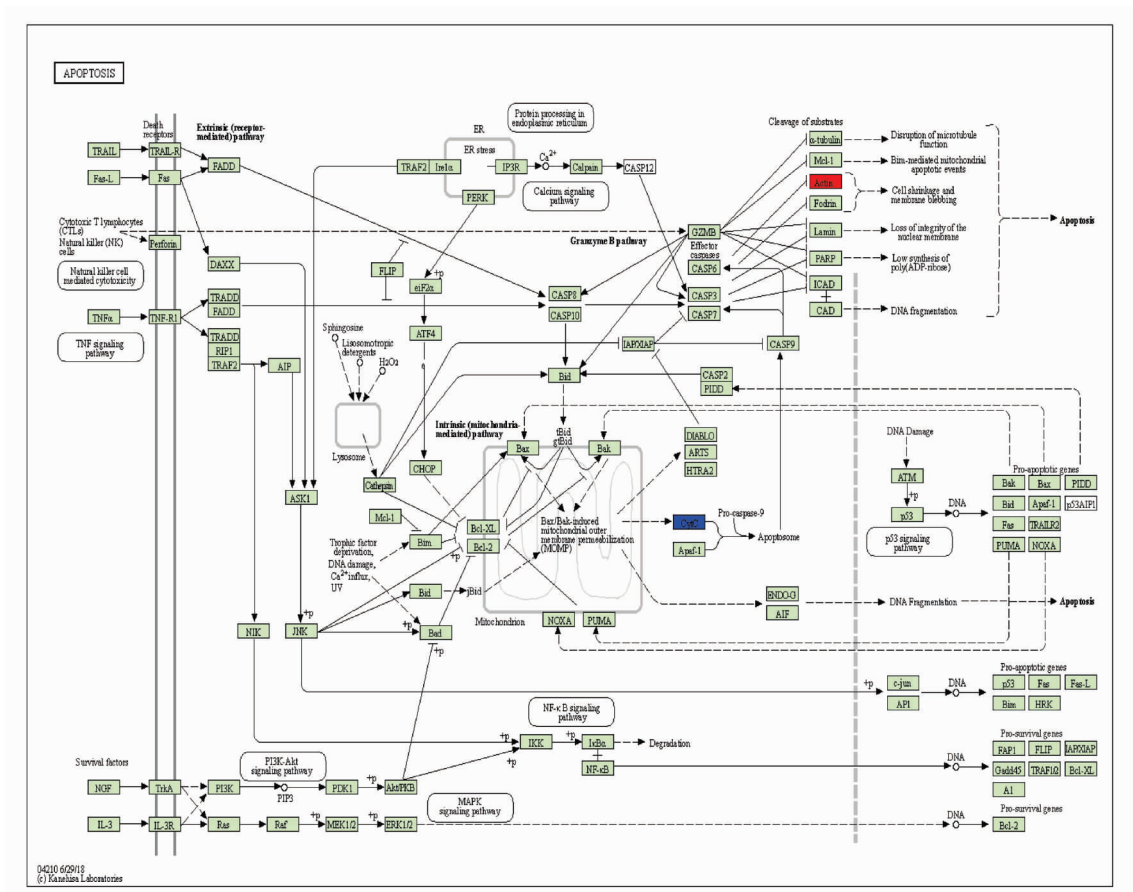
不同贮藏时间显著差异蛋白质 KEGG 数据库映射的细胞凋亡通路(KEGG#04210)见图 1。贮藏初期,CYTC 由线粒体释放至胞浆,引起胞浆中 CYTC 表达量升高,由此可能导致凋亡级联反应。细胞凋亡效应酶-3 活性于 96 h 时升高,与胞浆中 CYTC 表达量升高有关。Ca<sup>2+</sup>由内质网释放引起钙蛋白酶表达量下调,而 Ca<sup>2+</sup>浓度持续上升会引发钙蛋白酶-1 自溶<sup>[31]</sup>,这可能是导致其表达量下调的主要原因。肌动蛋白于贮藏初期表达量下调可能与肌动球蛋白复合体形成有关<sup>[32]</sup>。真核翻译起始因子 2 亚基 1 负责真核生物翻译起始,其下调表达可能是因为宰后细胞生命活动与活体有区别所致,也可能是因为动物屠宰后蛋白质的持续降解。大量研究表明,动物屠宰后初期胞浆中 CYTC 表达量上升,本研究结果符合这一规律。贮藏 96 h 后,释放至胞浆的 CYTC 减少。王琳琳<sup>[14]</sup>研究表明牦牛宰后 72 h 胞浆中 CYTC 表达量显著下降约 60%。本研究中 CYTC 变化趋势与其一致。肌动蛋白表达量上调可能与热休克蛋白引起应激保护作用有关。

### 2.4 Ca<sup>2+</sup>的信号转导作用及其在嫩度形成中的贡献

为进一步阐明 Ca<sup>2+</sup>的信号转导作用,基于以上关键通路中富集到的差异蛋白质,以 KEGG pathway 为载体,绘制 Ca<sup>2+</sup>信号转导核心网络于图 2。由图 2 可知,SERCA 利用 ATP 水解的能量驱动 Ca<sup>2+</sup>跨膜运输,mPTP 由多个电压依赖性阴离子通道蛋白构成,贮藏初期上调表达为 Ca<sup>2+</sup>流入线粒体提供渠道,导致线粒体 Ca<sup>2+</sup>超载、功能紊乱,使线粒体复合体表达量上升,NADH 转化为 NAD<sup>+</sup>+H<sup>+</sup>,细胞内出现 H<sup>+</sup>积累,而 COX2 表达量下调促使电子传递链解偶联,导致宰后细胞能量供给方式转变;同时,mPTP 蛋白质异常表达促使 CYTC 释放至胞浆中,可能引起细胞凋亡级联反应,因此激活细胞凋亡效应酶-3,水解结构蛋白质,影响肉的嫩度。Ca<sup>2+</sup>可间接导致肌动蛋白表达量下调引起细胞收缩,从而影响肉的嫩度。另外,由 Ca<sup>2+</sup>信号转导核心网络图可知,钙蛋白酶与细胞凋亡效应酶-3 可能在水解蛋白质方面具有协同作用<sup>[33]</sup>。Huang 等<sup>[34]</sup>研究发现,当牛骨骼肌中注射 Ca<sup>2+</sup>时,细胞凋



(a)贮藏 4 d 与 0 d 对比



(b) 贮藏 8 d 与 4 d 对比

注:图中红色为上调表达的差异蛋白质,蓝色为下调表达的差异蛋白质。

图 1 不同贮藏时间滩羊肉中差异蛋白质映射的细胞凋亡通路(KEGG#04210)

Fig.1 Apoptosis of differential abundant proteins mapping in Tan Sheep meat at different storage period (KEGG#04210)

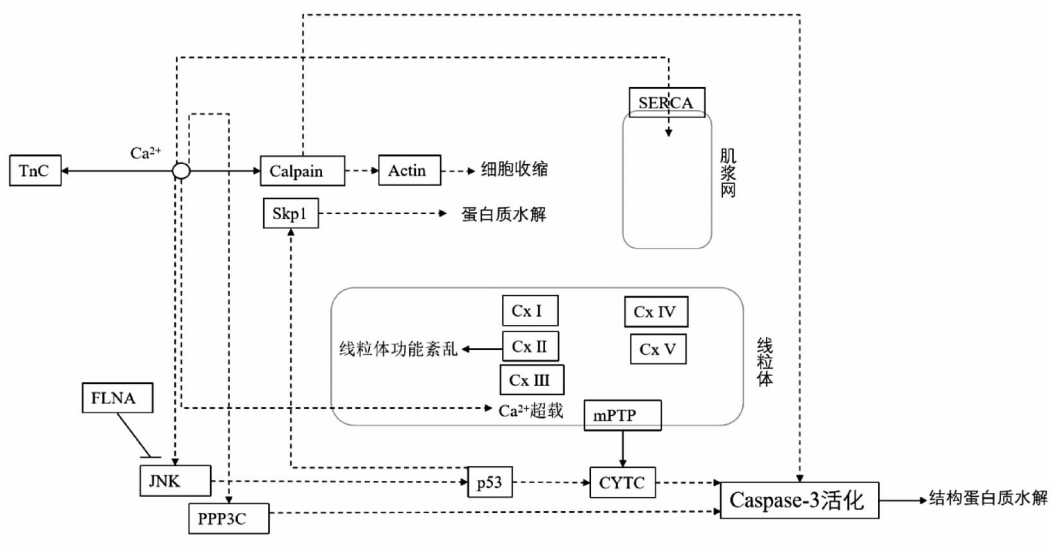


图 2 滩羊肉宰后嫩度形成中 Ca<sup>2+</sup>信号转导核心网络

Fig.2 Core network of calcium signal transduction in postmortem tenderization of Tan sheep meat

亡效应酶-3 活性呈下降趋势,可能是由于 calpain 的直接切割导致细胞凋亡效应酶-3 失活。这一结果充分证明  $\text{Ca}^{2+}$  在嫩度形成过程中重要的信号转导作用, SERCA、CYTC、VDAC、COX2 等多个蛋白质在其信号传递过程中发挥重要作用。

### 3 结论

滩羊肉 4℃ 贮藏期间剪切力先降低后升高, 96 h 时降至最低。线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  含量于宰后 96 h 内显著升高, 随后降低, 钙蛋白酶-1 活性在贮藏期内持续降低, 细胞凋亡效应酶-3 活性于 0~96 h 显著上升, 96~192 h 有所下降。Pearson 相关性分析表明滩羊背最长肌剪切力与  $\text{Ca}^{2+}$  水平呈显著负相关, 与钙蛋白酶-1 活性呈极显著正相关, 与细胞凋亡效应酶-3 活性呈极显著负相关。蛋白质组学分析表明, 0~96 h 内 5 个显著上调差异蛋白质与 2 个显著下调差异蛋白质富集于  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路, 96~192 h 内 3 个显著下调的差异蛋白质富集于  $\text{Ca}^{2+}$  信号通路; 0~96 h 内 30 个显著差异表达蛋白质富集于凋亡调节信号转导通路, 96~192 h 内 15 个显著差异表达蛋白质富集于凋亡调节信号转导通路。SERCA 利用 ATP 水解的能量驱动  $\text{Ca}^{2+}$  跨膜运输, mPTP 蛋白质 VDAC 贮藏初期上调表达为  $\text{Ca}^{2+}$  流入线粒体提供渠道, 导致线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  超载、线粒体功能紊乱, 致线粒体复合体表达量上升; 同时, mPTP 蛋白质异常表达促使 CYTC 释放至胞浆中, 最终激活细胞凋亡效应酶-3, 水解结构蛋白质影响肉的嫩度。另外,  $\text{Ca}^{2+}$  可间接促使肌动蛋白表达量下调引起细胞收缩, 从而影响肉的嫩度。本研究结论证实了  $\text{Ca}^{2+}$  在肉品嫩度形成过程中重要的信号转导作用。

### 参 考 文 献

- [1] LIAO C C, CHANG Y S, YANG S Y, et al. Post-mortem proteolysis and tenderisation are more rapid and extensive in female duck breast muscle [J]. *British Poultry Science*, 2016, 57(6): 734-739.
- [2] BHAT Z F, MORTON J D, MASON S L, et al. Role of calpain system in meat tenderness: A review[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2018, 7(3): 196-204.
- [3] HUANG F, HUANG M, ZHOU G, et al. *In vitro* proteolysis of myofibrillar proteins from beef skeletal muscle by caspase-3 and caspase-6[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(17): 9658-9663.
- [4] OUALI A, HERRERA-MENDEZ C H, COULIS G, et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms [J]. *Meat Science*, 2006, 74(1): 44-58.
- [5] HUANG M, HUANG F, XUE M, et al. The effect of active caspase-3 on degradation of chicken myofibrillar proteins and structure of myofibrils[J]. *Food Chemistry*, 2011, 128(1): 22-27.
- [6] PAREDI G, RABONI S, BENDIXEN E, et al. 'Muscle to meat' molecular events and technological transformations: The proteomics insight[J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75(14): 4275-4289.
- [7] ZUO H, HAN L, YU Q, et al. Proteome changes on water-holding capacity of yak longissimus lumborum during postmortem aging [J]. *Meat Science*, 2016, 121: 409-419.
- [8] DELLA M A, DE PALO P, LORENZO J M, et al. Application of proteomic to investigate the post-mortem tenderization rate of different horse muscles [J]. *Meat Science*, 2019, 157: 107885.
- [9] LÓPEZ-PEDROUSO M, LORENZO J M, DI STASIO L, et al. Quantitative proteomic analysis of beef tenderness of Piemontese young bulls by SWATH-MS[J]. *Food Chemistry*, 2021, 356: 129711.
- [10] 罗辉, 何雨薇, 张杏亚, 等. 秦川牛肉冷藏期间能量代谢变化机制及其对肉品质的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(17): 201-209.  
LUO H, HE Y W, ZHANG X Y, et al. The changes in energy metabolism of Qinchuan beef during chilled storage and its effects on meat quality [J]. *Food Science*, 2021, 42(17): 201-209.
- [11] 李升升. 基于蛋白质组学的牦牛平滑肌嫩度形成机制研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2019.  
LI S S. Mechanism of tenderness in yak (*Bos grunniens*) rumen smooth muscle during refrigerated storage based on proteomics [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2019.
- [12] 李子欣, 尤丽琴, 罗瑞明, 等. 滩羊肉风味形成中重要蛋白质的解析[J]. *肉类研究*, 2019, 33(5): 7-12.  
LI Z X, YOU L Q, LUO R M, et al. Analysis of



- important proteins for flavor formation of Tan sheep meat[J]. *Meat Research*, 2019, 33(5): 7-12.
- [13] 尤丽琴, 姬琛, 罗瑞明. 蛋白质组学揭示滩羊宰后成熟过程中风味前体物质的变化机理[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 20-27.
- YOU L Q, JI C, LUO R M. Proteomic analysis revealed the change mechanism of flavour precursors in Tan sheep meat during post-mortem ageing[J]. *Food Science*, 2021, 42(19): 20-27.
- [14] 王琳琳. Cyt-c 释放和介导宰后牦牛肉线粒体凋亡途径激活机制及对嫩度影响的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2018.
- WANG L L. Study on the effect of cytochrome c release and its mediation mechanism of mitochondrial apoptosis activation on yak meat tenderness during postmortem aging[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2018.
- [15] DI LUCA A, MULLEN A M, ELIA G, et al. Centrifugal drip is an accessible source for protein indicators of pork ageing and water-holding capacity[J]. *Meat Science*, 2011, 88(2): 261-270.
- [16] 李文博, 罗玉龙, 郭月英, 等. 苏尼特羊宰后成熟过程中肌原纤维蛋白特性与肉品质的变化分析[J]. *食品科学*, 2021, 42(3): 48-55.
- LI W B, LUO Y L, GUO Y Y, et al. Analysis of changes in myofibrillar protein properties and meat quality during post-mortem aging of Sunit sheep carcasses[J]. *Food Science*, 2021, 42(3): 48-55.
- [17] KOOHMARAIE M. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat[J]. *Meat Science*, 1996, 43(S1): 193-201.
- [18] CHANNON H A, HAMILTON A J, D'SOUZA D N, et al. Estimating the impact of various pathway parameters on tenderness, flavour and juiciness of pork using Monte Carlo simulation methods[J]. *Meat Science*, 2016, 116: 58-66.
- [19] 黄明, 周光宏, 徐幸莲, 等. 牛肉宰后嫩化机制的研究[J]. *农业工程学报*, 2004, 20(1): 198-202.
- HUANG M, ZHOU G H, XU X L, et al. Mechanism of postmortem tenderization of beef[J]. *Transactions of the Chinese society of agricultural engineering*, 2004, 20(1): 198-202.
- [20] CRUZEN S M, PAULINO P V, LONERGAN S M, et al. Postmortem proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle[J]. *Meat Science*, 2014, 96(2 Part A): 854-861.
- [21] MELODY J L, LONERGAN S M, ROWE L J, et al. Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles[J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 82(4): 1195-1205.
- [22] 王惠惠. 不同氧化强度下内源酶对牦牛肉宰后嫩度形成的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020.
- WANG H H. Effect of endogenous enzymes on the formation of tenderness of Yak meat under different oxidation intensity during postmortem aging [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural university, 2020.
- [23] 黄明, 赵莲, 徐幸莲, 等. 鸡肉在成熟过程中肌原纤维蛋白的降解机制研究[J]. *农业工程学报*, 2007, 23(11): 42-46.
- HUANG M, ZHAO L, XU X L, et al. Mechanism of myofibrillar proteins degradation during chicken postmortem aging[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2007, 23(11): 42-46.
- [24] 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.
- WANG L L, SUN Z C, HAN L, et al. The effect of cell energy metabolism enzyme on Caspase-3 and meat quality in Yak muscles during postmortem aging[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(4): 102-111.
- [25] RAPIZZI E, PINTON P, SZABADKAI G, et al. Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of  $Ca^{2+}$  microdomains to mitochondria[J]. *Journal of Cell Biology*, 2002, 159(4): 613-624.
- [26] 邹松峰. 衰老时心肌肌球蛋白轻链激酶 (cMLCK) 参与调控心肌收缩力的作用机制研究[D]. 深圳: 深圳大学, 2018.
- ZOU S F. Studies on the role of cardiac myosin light-chain kinase (cMLCK) in the regulation of myocardial contractility in aging[D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2018.
- [27] 周光宏. 肉品加工学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- ZHOU G H. *Meat Science and Technology*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2008.
- [28] 王霖.  $Ca^{2+}$  诱导损伤线粒体的结构与形态学变化研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- WANG L. Study on the changes of structure and

- morphology of injured mitochondria induced by calcium ions[D]. Yangling; Northwest A & F University, 2012.
- [29] 杨渊, 钟才高. 电压依赖性阴离子通道在线粒体依赖性细胞凋亡中作用的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(2): 211–215.
- YANG Y, ZHONG C G. Progress in voltage-dependent anion channels in mitochondria-dependent apoptosis[J]. Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology, 2011, 25(2): 211–215.
- [30] WANG L, MA G, ZHANG Y, et al. Effect of mitochondrial cytochrome c release and its redox state on the mitochondrial-dependent apoptotic cascade reaction and tenderization of yak meat during post-mortem aging[J]. Food Research International, 2018, 111: 488–497.
- [31] 杜曼婷, 李欣, 李铮, 等. 钙蛋白酶系统磷酸化对肉嫩度的影响研究进展[J]. 中国食品学报, 2018, 18(10): 286–294.
- DU M T, LI X, LI Z, et al. Influence of the Calpain system phosphorylation on meat tenderness[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(10): 286–294.
- [32] 李胜杰. 宰后肌动球蛋白的解离对鸡肉嫩度的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- LI S J. The effect of dissociation of Acomyosin on Chicken tenderness[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [33] GOLL D E, NETI G, MARES S W, et al. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains[J]. Journal of Animal Science, 2008, 86(14 Suppl): E19–E35.
- [34] HUANG F, DING Z, ZHANG C, et al. Effects of calcium and zinc ions injection on caspase-3 activation and tenderness in post-mortem beef skeletal muscles[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2018, 53(3): 582–589.

### The Transduction Role of $\text{Ca}^{2+}$ in Meat Tenderness Development of Tan Sheep

Ji Chen<sup>1</sup>, You Liqin<sup>1</sup>, Liu Jijuan<sup>2</sup>, Luo Ruiming<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021

<sup>2</sup>College of Food and Wine, Ningxia University, Yinchuan 750021)

**Abstract** This study was design to clarify the important transduction role of  $\text{Ca}^{2+}$  in meat tenderness development of Tan sheep during postmortem storage. Results indicated that the shear force decreased significantly before 96 h, and then increased significantly from 96–192 h. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  levels increased significantly before 96 h, and decreased significantly after 96 h. The activity of calpain-1 decreased significantly with increasing time postmortem. The activity of caspase-3 increased significantly before 96 h and then decreased significantly. Correlation analysis indicated that the shear force was positively correlated with mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  levels, and significant positively correlated with activity of caspase-3, significant negatively correlated with activity of calpain-1. 0–96 h, 5 up-regulated differentially abundant proteins and 2 down-regulated differentially abundant proteins were enriched in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway. 96–192 h, 2 down-regulated differentially abundant proteins were enriched in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway. 0–96 h, 30 differentially abundant proteins were enriched in apoptosis signal transduction pathways. 96–192 h, 15 differentially abundant proteins were enriched in apoptosis signal transduction pathways. The energy from hydrolysis of ATP was used by SERCA to drive  $\text{Ca}^{2+}$  transport across membranes. Increasing of VDAC likely provided channels for  $\text{Ca}^{2+}$  lead to mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overloading and mitochondrial dysfunction. Meanwhile, increasing of VDAC could be related to the increase of CYTC in cytoplasm, thereby caused the cascade of apoptosis, and activated caspase-3 to hydrolyze structural proteins, finally influence tenderness of Tan sheep meat. In addition, the decrease of actin was caused by  $\text{Ca}^{2+}$ , and provided the contractile mechanism of muscle tissue, thus affecting the tenderness of meat. The conclusion of this study further confirmed the important signal transduction role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the development of meat tenderness during postmortem storage.

**Keywords** Tan sheep; meat quality development;  $\text{Ca}^{2+}$ ; signal transduction; proteomics