



6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶3 (*PFKFB3*)促进猪肌内前体脂肪细胞成脂分化及其 互作蛋白的筛选

李 萌, 陈佳仪, 文明昕, 韩雨琪, 钱少杰, 明祖梅, 郭晓红, 李步高*

(山西农业大学动物科学学院, 太谷 030801)

摘 要: 旨在探究6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶3(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3, *PFKFB3*)对猪肌内前体脂肪细胞增殖和成脂分化的调控作用,并筛选其互作蛋白,为解析其调控机制提供线索。本研究通过在猪肌内前体脂肪细胞中过表达/干扰*PFKFB3*,采用qRT-PCR检测增殖标志基因的表达变化,采用CCK-8、EdU试验检测活细胞及处于增殖期细胞数量的变化;诱导猪肌内前体脂肪细胞成脂分化后,通过qRT-PCR、油红O等技术,检测其对细胞成脂分化的调控作用;运用免疫共沉淀及液相色谱-质谱技术识别和筛选*PFKFB3*的互作蛋白。结果显示,过表达*PFKFB3*后EdU阳性细胞数量显著增加($P<0.01$),细胞活力显著升高($P<0.01$),且增殖相关基因*CDK1*、*CCND1*、*PCNA*、*KI67*表达显著上调($P<0.05$);干扰*PFKFB3*则显著抑制细胞增殖($P<0.05$)。成脂分化方面,过表达*PFKFB3*可显著增加脂滴数量($P<0.01$)和甘油三酯含量($P<0.01$),并显著上调成脂关键基因*PPAR γ* 、*CEBP α* 、*CEBP β* 、*LPL*等的表达($P<0.05$);干扰*PFKFB3*显著抑制细胞的成脂分化($P<0.05$)。此外,通过Flag标签免疫沉淀结合质谱分析共筛选到17个*PFKFB3*的特异性互作蛋白。GO分析表明这些蛋白主要参与ATP结合和RNA结合等过程;STRING蛋白互作网络预测显示*PFKFB3*与*CHORDC1*、*ALAS1*、*ASCC3*、*KCNK2*等蛋白存在相互作用。综上,*PFKFB3*可正向调控猪肌内前体脂肪细胞的增殖和成脂分化,并初步筛选出其潜在互作蛋白,为深入解析猪肌内脂肪沉积的分子机制及改善猪肉品质提供了新线索。

关键词: *PFKFB3*;猪;肌内前体脂肪细胞;细胞增殖;成脂分化;互作蛋白

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)03-1362-11

6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase 3 (*PFKFB3*) Promotes Adipogenic Differentiation of Porcine Intramuscular Preadipocytes and Screening of Its Interacting Proteins

LI Meng, CHEN Jiayi, WEN Mingxin, HAN Yuqi, QIAN Shaojie, MING Zumei,
GUO Xiaohong, LI Bugao*

(College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: This study aimed to investigate the regulatory role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (*PFKFB3*) in the proliferation and adipogenic differentiation of porcine intramuscular preadipocytes, screen its interacting proteins and provide clues for understanding their regulatory

收稿日期: 2025-06-27

基金项目: 山西省重点研发计划项目(202302140601005); 山西省生猪育种联合攻关项目(NYGG21)

作者简介: 李 萌, 博士, 主要从事动物遗传育种与繁殖的研究, E-mail: 13994576150@163.com; 陈佳仪, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖的研究, E-mail: 1321057625@qq.com; 李萌和陈佳仪为同等贡献作者

* 通信作者: 李步高, 主要从事动物遗传育种与繁殖的研究, E-mail: jinrenn@163.com

mechanisms. *PFKFB3* was overexpressed or interfered in porcine intramuscular preadipocytes. qRT-PCR was used to detect changes in the expression of proliferation marker genes. CCK-8 and EdU assays were employed to measure changes in the number of viable cells and cells in the proliferation phase, respectively. After inducing adipogenic differentiation of porcine intramuscular preadipocytes, qRT-PCR and Oil Red O staining were used to assess its regulatory effect on adipogenic differentiation. Co-immunoprecipitation combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry was utilized to identify and screen proteins interacting with *PFKFB3*. The results showed that overexpression of *PFKFB3* significantly increased the number of EdU-positive cells ($P < 0.01$) and cell viability ($P < 0.01$), and significantly upregulated the expression of proliferation-related genes *CDK1*, *CCND1*, *PCNA*, and *KI67* ($P < 0.05$). Conversely, interfering with *PFKFB3* significantly inhibited cell proliferation ($P < 0.05$). Regarding adipogenic differentiation, overexpression of *PFKFB3* significantly increased the number of lipid droplets ($P < 0.01$) and triglyceride content ($P < 0.01$), and significantly upregulated the expression of key adipogenic genes *PPAR γ* , *CEBP α* , *CEBP β* , and *LPL* ($P < 0.05$). Interfering with *PFKFB3* significantly inhibited adipogenic differentiation ($P < 0.05$). Furthermore, Flag-tag immunoprecipitation combined with mass spectrometry analysis identified 17 specific interacting proteins of *PFKFB3*. GO analysis indicated that these proteins were primarily involved in processes such as ATP binding and RNA binding. STRING protein-protein interaction network prediction revealed interactions between *PFKFB3* and proteins including *CHORDC1*, *ALAS1*, *ASCC3*, and *KCNK2*. In summary, *PFKFB3* positively regulates the proliferation and adipogenic differentiation of porcine intramuscular preadipocytes. Potential interacting proteins of *PFKFB3* were preliminarily screened, providing new clues for in-depth analysis of the molecular mechanisms underlying porcine intramuscular fat deposition and improvement of pork quality.

Keywords: *PFKFB3*; pig; intramuscular preadipocytes; cell proliferation; adipogenic differentiation; interacting proteins

* **Corresponding author:** LI Bugao, E-mail: jinrenn@163.com

在全球肉类需求持续增长的背景下,肉品质日益成为决定消费者选择的核心考量。肉品质是一个复杂的性状,受许多理化特性的影响,如pH、嫩度、脂肪酸种类、肉色、肌内脂肪(intramuscular fat, IMF)含量和感官质量等^[1-5]。IMF含量是决定猪肉抗氧化性、嫩度、风味、多汁性及总体接受度的核心因素^[6-8]。研究发现,IMF适中的猪肉其嫩度与风味更佳。IMF不仅是风味载体,更蕴含重要的健康价值,有助于降低心血管及肌肉疾病风险^[9-11];同时,相较于其他动物脂肪来源,IMF的胆固醇含量显著偏低^[12],更契合现代消费者对营养均衡与低脂健康膳食的追求。然而,全球猪育种以提高瘦肉率和生长效率为首要目标,往往造成IMF含量减少及肉质性状下降^[13]。因此,深入解析IMF沉积的调控机制,对于满足高品质猪肉消费需求、提升产业价值

具有重要科学意义。

猪IMF沉积受遗传、营养、环境等多重因素影响,其中遗传因素至关重要。目前已鉴定出大量参与该过程的基因。*PPAR α* 和*PPAR γ* 参与脂肪沉积及糖异生等关键代谢通路^[14-16]。脂肪酸结合蛋白家族成员的两个基因,*FABP3*和*FABP4*与猪肉大理石花纹及IMF含量高度相关^[15,17],为脂肪沉积的关键候选基因^[18-21]。SCD为脂肪酸合成的核心因子,其表达下调会提升脂肪组织饱和脂肪酸比例^[22-24]。因此,阐明这些关键基因的调控网络,对于揭示IMF形成的分子机制、缓解现代育种与肉质目标的冲突、推动优质猪肉生产意义重大。然而,目前关于调控猪IMF沉积关键基因的挖掘及功能机制的研究尚不完善,亟待深入探索。

鉴于IMF沉积对猪肉品质的核心作用,解析其关

键调控因子及分子机制已成为研究焦点。6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3, PFKFB3)是糖酵解通路中的双功能代谢枢纽,其激酶结构域催化果糖-6-磷酸(f6P)合成果糖-2,6-二磷酸(f2,6BP),也可经磷酸酶结构域水解 f2,6BP^[25]。F2,6BP 是磷酸果糖激酶-1 的强效变构激活剂,同时会抑制糖异生途径的关键酶—果糖-1,6-二磷酸酶(fructose-1,6-bisphosphatase, FBPase1)^[26]。此外,PFKFB3 在脂肪代谢中扮演关键角色。研究表明,小鼠脂肪组织特异性过表达 PFKFB3 可显著增加脂肪沉积,在一定程度上使其胰岛素敏感性得到改善^[27]。其机制涉及促进脂肪细胞糖酵解及糖酵解驱动的脂肪生成,并可能介导 PPAR γ 激活的抗炎与抗糖尿病效应^[28]。相反,干扰 PFKFB3 后,则导致脂质积累减少、炎症因子(TNF α 、IL-6)水平升高及胰岛素信号受损^[29]。这些证据共同表明,PFKFB3 是调控脂肪细胞代谢稳态与脂质储存的核心分子。然而,PFKFB3 在猪肌肉脂肪沉积中的具体调控作用及分子机制仍鲜有报道。

本研究以猪原代肌肉脂肪细胞为模型,通过功能获得与缺失试验,系统探究 PFKFB3 对细胞成脂的作用;机制层面,借助免疫共沉淀-质谱联用技术筛选其互作蛋白,初步揭示 PFKFB3 的调控机制。本研究结果可为解析猪肌肉脂肪沉积的分子机制提供新视角。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及样品采集 选取3头初生杜×长×大仔猪,用于猪肌肉前体脂肪细胞的分离。

1.1.2 主要试剂 胰酶和青链霉素购自美国 Sigma 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;胰岛素、红细胞裂解液和饱和油红 O 染液购自中国 Solarbio 公司;siRNA 和过表达载体、Lipofectamine 3000 Reagent 购自上海汉恒基因科技有限公司;CCK-8 试剂盒和 EdU 试剂盒购自亚科因生物技术有限公司;快速银染试剂盒、Flag 标签蛋白免疫沉淀试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 猪肌肉前体脂肪细胞的分离及成脂诱导 仔猪放血处死后依次使用灭菌蒸馏水及 75%

乙醇进行体表消毒,采集背最长肌组织样本,将样本置于 75% 乙醇溶液中浸泡消毒,随后转移至含 4% 双抗的 PBS 中进行漂洗。随后去除组织中的血管以及结缔组织,将处理干净的组织剪碎后加入消化液,恒温振荡培养箱(37℃, 120 r·min⁻¹)中进行消化处理,持续 60 min 至组织块消化到看不出形状,终止消化后进行梯度过滤(70 μ m 和 40 μ m 细胞筛),经过离心后去除上清保留沉淀(1 500 r·min⁻¹, 10 min)。用红细胞裂解液重悬细胞,静置 2 min,加入 10 mL 无血清 DMEM/F12 培养基,相同转速离心 5 min 后,弃上清液,重复清洗一次。最终使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基重悬沉淀,置于预处理培养器皿中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行原代培养,4 h 后换液。待培养瓶中的细胞长满后消化重新接种于 6 孔板当中,长满后换分化培养基,4 d 后换维持培养基。

1.2.2 细胞转染 待细胞密度为 60% 时进行转染。转染前更换为无血清 DMEM/F12 基础培养基,参照转染试剂 Lipofectamine 3000 的说明书进行转染,试验设计每个处理包含 3 个重复,转染 48 h 后检测过表达和干扰效率。

1.2.3 EdU 和 CCK-8 试验 在细胞培养板中,对转染过表达和干扰后的细胞,加入与培养液等体积的 EdU 工作液孵育 4 h,使用 4% 多聚甲醛对细胞进行固定,固定时间为 20 min,随后采用 0.1% 非离子型表面活性剂 Triton X-100 孵育 30 min,随后置于避光环境中加入预先配置好的 Click 反应液,孵育 40 min,最后加入 Hoechst,孵育 20 min, PBS 清洗 3 次后,在荧光倒置显微镜下观察和拍照。加入 CCK-8 试剂后,在不同时间检测 450 nm 波长下的吸光度。

1.2.4 油红 O 染色 成脂诱导分化 8 d 后,进行油红 O 染色及胞内甘油三酯(Triglycerides, TG)含量测定。油红 O 染色:除去培养基, PBS 洗涤细胞两次,固定液固定 30 min;60% 异丙醇处理;油红 O 染液室温避光染色 15 min;移除染液,60% 异丙醇漂洗至背景清晰,蒸馏水充分洗涤;Mayer 苏木素复染细胞核,弱碱性缓冲液返蓝;蒸馏水覆盖,光学显微镜下观察拍照。同时,定量脂质积累,裂解细胞,取上清。采用商品化 TG 测定试剂盒,酶标仪检测吸光度计算 TG 含量。

1.2.5 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, CO-IP)试验 在细胞中加入裂解液,使用细胞刮板收

集蛋白样品。根据蛋白样品与磁珠的配比(1 000 μL 样品对应 40 μL 磁珠悬液),将其混合并转移至低温水平振荡仪上,4 $^{\circ}\text{C}$ 持续孵育 16 h。随后将其放置于磁力架上 10 s,移除 1.5 mL 离心管中的液体并添加裂解缓冲液,进行磁珠洗涤。根据磁珠初始体积按 1:5(40 μL 磁珠对应 200 μL 洗脱液)加入 3 $\times$ Flag 多肽洗脱缓冲液,充分混匀后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,随后放置于磁力架上 10 s,收集含有目标蛋白复合物的上清液,立即分装至预冷的离心管中,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.6 银染试验 制备分离胶和浓缩胶,将洗脱的样品与 5 $\times$ SDS LoadingBuffer 混合于 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸,然后将样品缓慢加入胶孔中,80 V 恒压电泳直至样品进入分离胶;随后,120 V 恒压电泳。银染按照快速银染试剂盒说明书操作。

1.2.7 质谱 银染完成后,对差异表达的条带

进行切割,质谱分析。使用 LC-MS/MS 分析方法,用 MaxQuant1.6.14 检索相应的数据库,鉴定其中的蛋白,并进一步对蛋白所属的所有 GO 条目进行汇总分析,针对所筛选出的互作蛋白采用 STRING 构建蛋白相互作用网络关系图。

1.2.8 qRT-PCR 按说明书使用 Trizol 试剂提取背最长肌组织中和细胞的总 RNA,样本检测合格之后 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用 PrimeScrip RT 试剂盒合成 cDNA,使用 SYBR[®]PrimeScript[™] RT-PCR 试剂盒进行定量 qRT-PCR,反应的总体积为 10 μL :引物的上、下游各需 0.3 μL ,cDNA 需 4.4 μL ,使用 q-Mix 补充至 10 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,45 个循环。引物序列见表 1,以 18S rRNA 为参照基因,数据结果使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算。

表 1 qRT-PCR 引物信息

Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物长度/bp Product length
<i>PFKFB3</i>	F: ATGAGAGTCCGCAAGCAGTGT R: TCTCTAGTAGTGTTGGTGGCATCA	110
<i>CDK1</i>	F: GCTTTTCAAAGCTGGCTCTGGG R: TGGATGTGGTAGATCCCAGCTTA	104
<i>CCND1</i>	F: CTCCGTATCTTACTTCAAGTGCG R: CTTCTCGGCAGTCAAGGGAA	250
<i>KI67</i>	F: ATCATTGACCGCTCCTTTAGGT R: GCTCGCCTTGATGGTTCCT	104
<i>PCNA</i>	F: GCAGAGCATGGACTCGTCTC R: TTGGACATGCTGGTGAGGTT	150
<i>PPARγ</i>	F: TGGGTGAAACTCTGGGAGATTC R: AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC	150
<i>CEBPα</i>	F: CAAGAACAGCAACGAGTACCG R: GTCAGTGGTCAACTCCAGCAC	124
<i>CEBPβ</i>	F: AAGAGTAAGACCAAGAAGACC R: GCTCCAGGACCTTATGCT	139
<i>FABP4</i>	F: ATGTCTAGCAACAGTTTCGCC R: TCGCTTCATAGCATCTAGCTTG	195
<i>LPL</i>	F: CGACTCTCTGTTGAATGAAG R: TTGGCTCTGACCTTATTGATC	141
<i>Perilipin-1</i>	F: TCCAGCCAAGGAAGAGTCAG R: GGAAGGTGTGTTGAGAGATGG	125
AdipoQ	F: AGGCTGGATGGCGGGTAT R: AACTGAATGCTGAACGGTAG	240
18S rRNA	F: ATAAACGATGCCGACTGGCGAT R: CAATCTGTCAATCCTGTCCGTGT	245

1.2.9 数据分析 数据结果使用SPSS 27.0软件独立样本T检验进行显著性分析,两组间比较满足正态分布时采用独立样本t检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。采用Graphpad Prism 9.5软件作图。 $P<0.05$ 被认为具有统计学显著性。

2 结果

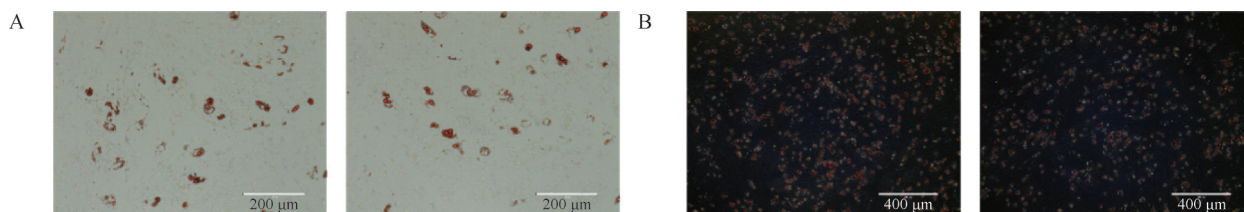
2.1 猪肌内前体脂肪细胞的成脂分化

当细胞接近长满时,诱导成脂分化,2 d后显微镜下观察开始出现小脂滴,集中于细胞核周围(图1A);第8天小脂滴逐渐汇合成大的脂滴,其着

色呈橘红色,形态大小不一,证实可分化为成熟脂肪细胞(图1B)。

2.2 过表达 *PFKFB3* 对猪肌内前体脂肪细胞增殖的影响

通过在猪肌内前体脂肪细胞中过表达 *PFKFB3*,探究其在细胞增殖中的作用。结果表明,与OE-NC组相比,OE-*PFKFB3*组 *PFKFB3* 的表达水平显著升高($P<0.01$,图2A)。EdU染色结果显示,在猪肌内前体脂肪细胞中过表达 *PFKFB3* 后阳性细胞数量显著高于OE-NC组($P<0.01$,图2B-C)。CCK-8结果显示过表达 *PFKFB3* 后细胞活力显著升高($P<0.01$,图2D)。qRT-PCR结果显示,

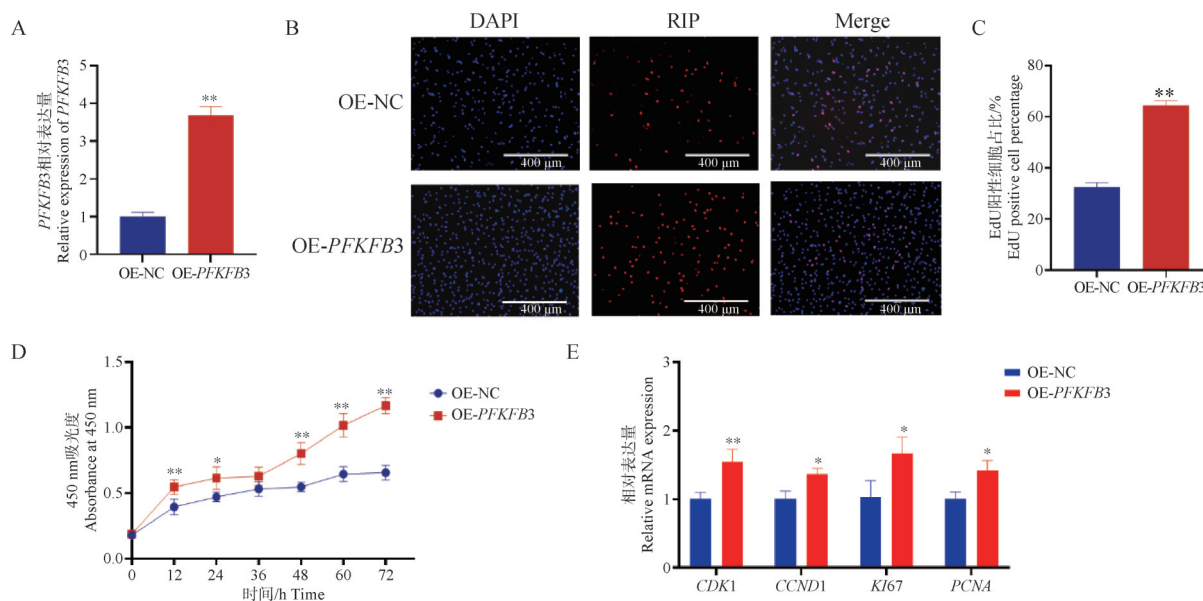


A. 成脂分化2 d; B. 成脂分化8 d

A. Adipogenic differentiation, day 2; B. Adipogenic differentiation, day 8

图1 猪肌内前体脂肪细胞油红O染色结果

Fig. 1 Oil Red O staining of porcine intramuscular preadipocytes



A. *PFKFB3* 过表达效率; B. EdU 试验, 阳性细胞呈红色, 细胞核呈蓝色; C. EdU 染色结果量化; D. CCK-8 试验结果; E. 过表达 *PFKFB3* 对细胞增殖相关基因表达的影响。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 下同

A. *PFKFB3* overexpression efficiency; B. EdU staining assay, EdU-positive cells were red and nuclei were blue; C. Quantification of EdU staining results; D. Results of CCK-8 assay; E. Effects of overexpression of *PFKFB3* on the expression of genes related to cell proliferation. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, the same as below

图2 过表达 *PFKFB3* 对猪肌内前体脂肪细胞增殖的影响

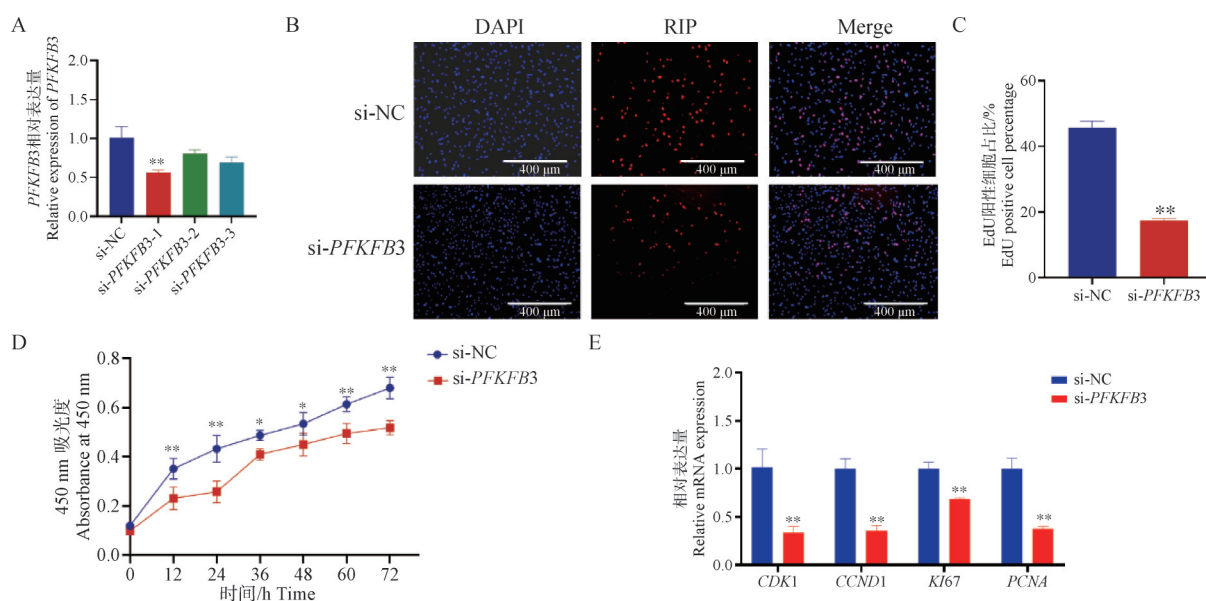
Fig. 2 Effect of overexpression of *PFKFB3* on proliferation of porcine intramuscular preadipocytes

相较于 OE-NC 组, OE-*PFKFB3* 组中 *CDK1*、*CCND1*、*PCNA* 和 *KI67* 的表达水平显著提高 ($P < 0.05$, 图 2E)。以上试验结果共同表明, 过表达 *PFKFB3* 可促进细胞增殖。

2.3 干扰 *PFKFB3* 对猪肌内前体脂肪细胞增殖的影响

干扰 *PFKFB3* 发现添加 si-*PFKFB3*-1 极显著下调 *PFKFB3* 的表达 ($P < 0.01$, 图 3A), 在随后的试验中使用 si-*PFKFB3*-1 并标记为 si-*PFKFB3*。

EdU 染色结果显示, 转染 si-*PFKFB3* 后阳性细胞数量显著低于 si-NC 组 ($P < 0.01$, 图 3B-C)。CCK-8 结果显示干扰 *PFKFB3* 后细胞活力显著降低 ($P < 0.05$, 图 3D)。qRT-PCR 结果显示, 相较于 si-NC 组, si-*PFKFB3* 组中增殖标志基因 *CDK1*、*CCND1*、*PCNA* 和 *KI67* 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$, 图 3E)。综上所述, 干扰 *PFKFB3* 抑制猪肌内前体脂肪细胞增殖。



A. *PFKFB3* 干扰效率; B. EdU 试验; C. EdU 染色结果量化; D. CCK-8 试验结果; E. 干扰 *PFKFB3* 对细胞增殖相关基因的表达变化

A. *PFKFB3* interference efficiency; B. EdU staining assay; C. Quantification of EdU staining results; D. Results of the CCK-8 assay; E. Effects of interfering with *PFKFB3* on the expression of genes related to cell proliferation

图 3 干扰 *PFKFB3* 对细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of interfering with *PFKFB3* on the cell proliferation

2.4 过表达 *PFKFB3* 对猪肌内前体脂肪细胞成脂分化的影响

与 OE-NC 组相比, 油红 O 染色发现 OE-*PFKFB3* 组脂滴数量明显增多 ($P < 0.01$, 图 4A-B), 过表达 *PFKFB3* 后细胞中的 TG 含量极显著上升 ($P < 0.01$, 图 4C)。qRT-PCR 结果表明, 与 OE-NC 组相比, 过表达 *PFKFB3* 后 *PPARγ*、*CEBPα*、*CEBPβ*、*LPL* 等成脂标志基因表达量显著升高 ($P < 0.05$, 图 4D)。

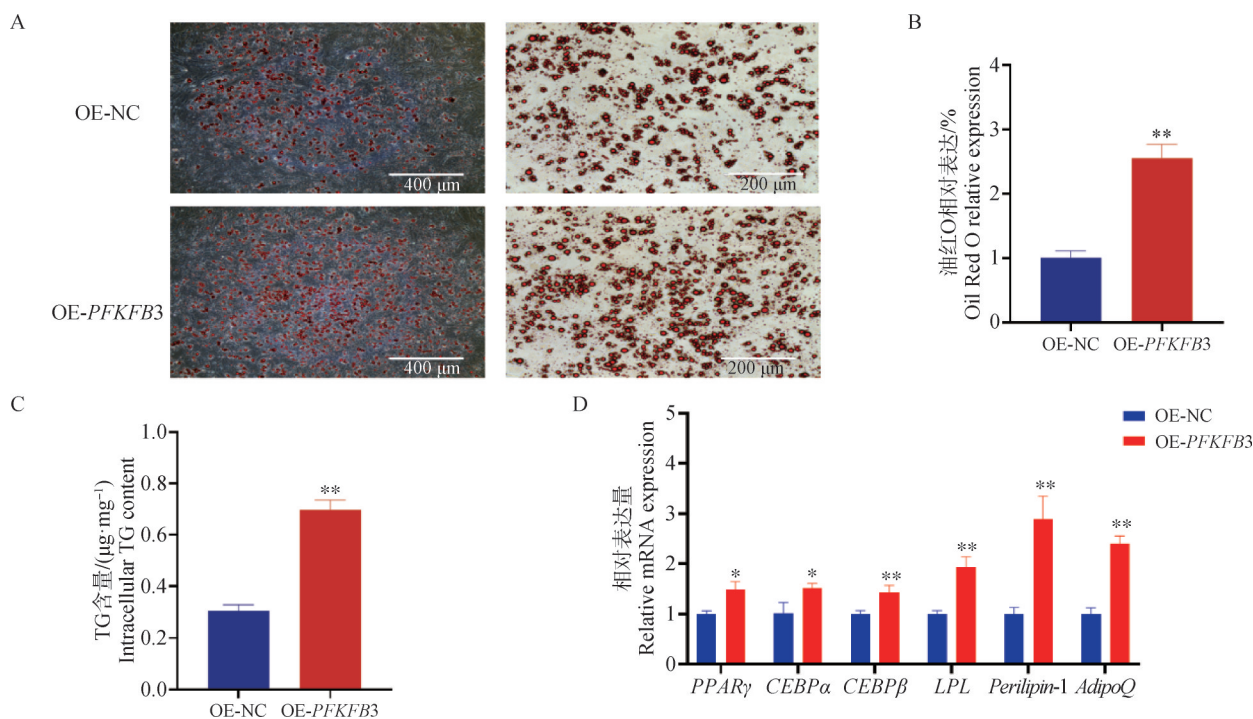
2.5 干扰 *PFKFB3* 对猪肌内前体脂肪细胞成脂分化的影响

在猪肌内前体脂肪细胞中转染 si-*PFKFB3* 并诱导细胞成脂分化 8 d 检测细胞成脂情况。油红 O

染色发现干扰 *PFKFB3* 后脂滴明显减少 ($P < 0.01$, 图 5A-B); 肌内前脂肪细胞中的 TG 含量极显著下降 ($P < 0.01$, 图 5C)。qRT-PCR 结果表明, 与 si-NC 组相比, 干扰 *PFKFB3* 后 *PPARγ*、*CEBPα* 等成脂标志基因表达量显著降低 ($P < 0.05$, 图 5D)。

2.6 *PFKFB3* Pull-down 蛋白的银染及质谱鉴定分析结果

细胞蛋白提取后通过 Flag 标签蛋白免疫沉淀获得的蛋白设置为空白对照、IgG 和 *PFKFB3* 组, 通过 SDS-PAGE 电泳后银染发现 *PFKFB3* pull-down 的蛋白中存在特异性表达的蛋白 (图 6A)。质谱结果表明, *PFKFB3*-NC 组和 *PFKFB3*-OE 组共富集到 207 个蛋白, 其中, *PFKFB3*-NC 组鉴定到 36 个特



A, B. 油红O染色试验结果; C. 过表达 *PFKFB3* 对猪肌内前体脂肪细胞中TG含量的影响; D. 过表达 *PFKFB3* 对成脂分化相关基因表达的影响

A, B. Oil red O staining test results; C. Effects of *PFKFB3* overexpression on TG accumulation in porcine intramuscular preadipocytes; D. Effect of overexpression of *PFKFB3* on genes expression related to lipogenic differentiation of cells

图4 过表达 *PFKFB3* 对猪肌内前体脂肪细胞分化的影响

Fig. 4 Effect of overexpression of *PFKFB3* on porcine intramuscular preadipocytes differentiation

异互作蛋白, *PFKFB3*-OE组鉴定到17个特异互作蛋白(图6B)其主要参与ATP结合和RNA结合等生物过程(图6C);采用STRING构建 *PFKFB3* 蛋白相互作用网络,发现 *PFKFB3* 与 *CHORDC1*、*ALAS1* 等存在较强的互作关系(图6D)。

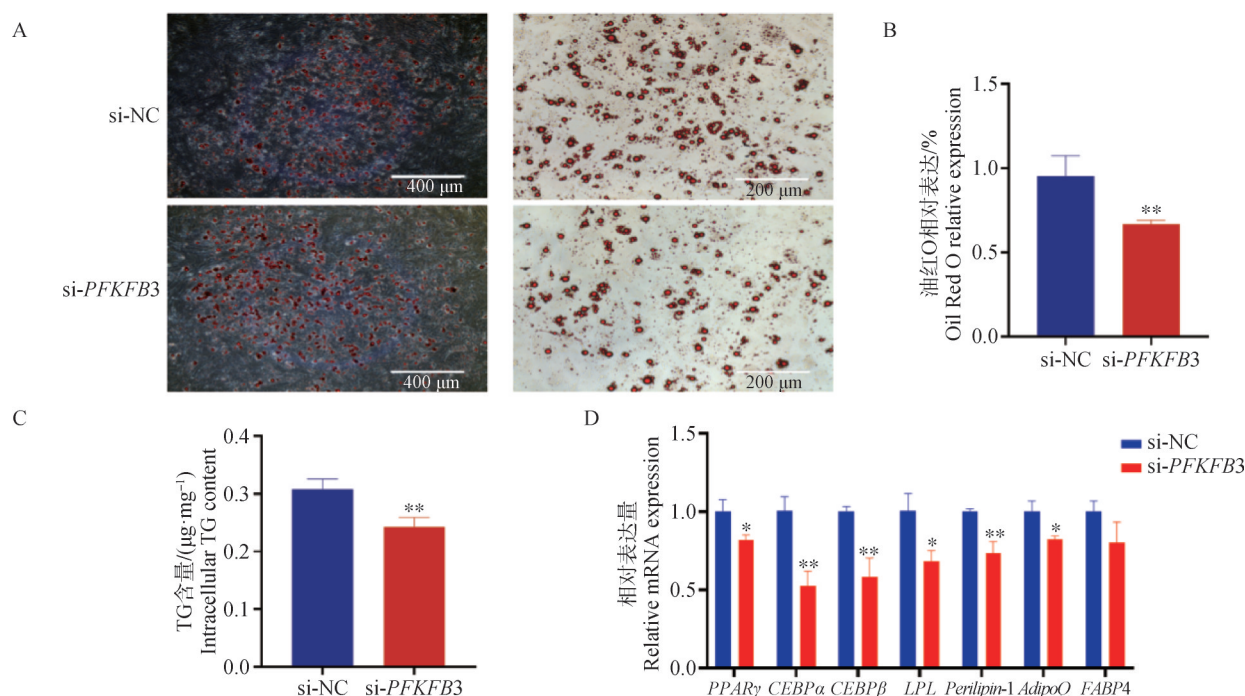
3 讨论

IMF是调控猪肉品质的核心要素,其含量水平与化学组成是影响猪肉嫩度、风味形成及营养价值的关键变量^[8,30]。通常,较高IMF含量赋予猪肉更佳的嫩度和多汁性。这主要归因于IMF填充于肌纤维间隙,降低肌纤维束紧密度,从而改善肉质的口感和咀嚼特性。研究表明,高IMF含量的猪肉在烹饪过程中保水能力更强,有助于维持肉质鲜嫩^[31]。此外,IMF对风味形成至关重要。热加工时,其不饱和脂肪酸组分发生氧化反应,降解产生醛类、酮类和醇类等一些挥发性风味化合物,对肉品特征性香气的形成与整体风味的增强至关重要^[32,33]。值得注意的是,猪肌内脂肪中饱和脂肪酸

比例相对较低,这不仅有助于保持良好的风味,还可能降低心血管及肌肉疾病风险^[9-11]。本课题组前期研究发现,纳米维生素A能显著提高仔猪生长速度并促进肌内脂肪沉积。基于此,通过多组学联合分析确定 *PFKFB3* 为调控猪肌内脂肪沉积的一个关键候选基因。

作为糖酵解途径的核心限速酶, *PFKFB3* 通过催化 f2,6BP 的转化,不仅精细调节糖酵解过程,同时深刻影响细胞周期动态^[34]。 *PFKFB3* 可调控细胞周期关键因子,如促进 Cyclin 与其依赖激酶的活性,并抑制 p27 表达,增加 S 期细胞的数量^[35]。本研究证明, *PFKFB3* 显著促进细胞增殖,与上述结果一致。脂肪生成是一个受多阶段、多信号通路和转录因子精密调控的复杂生物学过程^[36-38], *PFKFB3* 在此过程中发挥着重要的作用。既往研究指出, *PFKFB3* 可增强脂肪细胞的糖酵解和脂质生成能力^[39]。本研究证明, *PFKFB3* 可促进猪肌内前体脂肪细胞的成脂分化。

本研究通过互作蛋白筛选,发现 *PFKFB3* 可能



A、B. 油红O染色试验结果;C. 干扰 *PFKFB3* 对猪肌内前体脂肪细胞中TG含量的影响;D. 干扰 *PFKFB3* 对细胞成脂分化相关基因表达的影响

A, B. Oil red O staining test results; C. The effect of interfering with *PFKFB3* on the TG content in porcine intramuscular preadipocytes; D. Effect of interfering with *PFKFB3* on genes expression related to lipogenic differentiation of cells

图5 干扰 *PFKFB3* 对猪肌内前体脂肪细胞分化的影响

Fig. 5 Effect of interfering with *PFKFB3* on porcine intramuscular preadipocytes differentiation

与CHORDC1、ALAS1、ASCC3及KCNK2等蛋白存在相互作用。其中,富含半胱氨酸和组氨酸的结构域蛋白1(CHORDC1)的功能尤为值得关注。作为HSP90的重要共伴侣分子,CHORDC1可参与细胞应激响应、能量平衡、蛋白质折叠与组装等关键过程^[40]。其广泛互作能力使其在细胞周期调控和免疫应答等生物学过程中发挥重要作用^[41]。PFKFB3是糖酵解通路中的核心调控因子,是细胞能量代谢的关键枢纽^[42,43]。CHORDC1对HSP90活性的调节高度依赖于核苷酸状态,尤其在ADP/ATP比例升高时作用更为显著^[40]。基于此,我们提出一种潜在的作用模式:PFKFB3可能通过其强大的促糖酵解能力,维持细胞内充足ATP供应,优化ADP/ATP比例,从而间接影响CHORDC1-HSP90复合物的构象与功能活性,最终调控其介导的蛋白质折叠、应激响应及能量感知等过程。这种PFKFB3-CHORDC1的功能性耦联,可能为理解糖酵解代谢流如何影响蛋白质稳态及细胞应激适应提供新视角,尤其在猪肌内前体脂肪细胞的成脂分化微环境中。此外,氨基乙酰丙酸合酶1(ALAS1)

是血红素生物合成途径的限速酶,主要参与血红素的生物合成,在血红素合成的负反馈调节中发挥作用^[44],推测,PFKFB3可能通过调节能量代谢状态影响血红素合成效率,进而调控线粒体功能及细胞色素相关酶的活性,最终参与脂质代谢的精细调控。激活信号协整合复合体亚基3(ASCC3)是激活信号协整合复合体的核心解旋酶组分,其在修复烷基化DNA损伤、维护基因组稳定性中发挥关键作用^[45],我们推测,在脂肪细胞快速增殖与分化过程中,FKFB3-ASCC3互作可能旨在高效修复复合体,确保脂代谢相关的关键基因在转录程序顺利进行,从而促进成脂分化。钾通道蛋白KCNK2(TREK-1)是一种双孔钾通道,在多种细胞类型中被证实具有抑制细胞增殖的功能^[46],我们推测,PFKFB3可能通过调节KCNK2的通道活性,进而共同调控前体脂肪细胞由增殖转向分化,为脂质沉积调控提供新视角,并揭示离子通道在代谢中的非经典功能。*PFKFB3*是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)的靶基因^[29],推测PFKFB3可能是PPAR γ 行使功能的关键下游,通过驱动糖酵解代谢

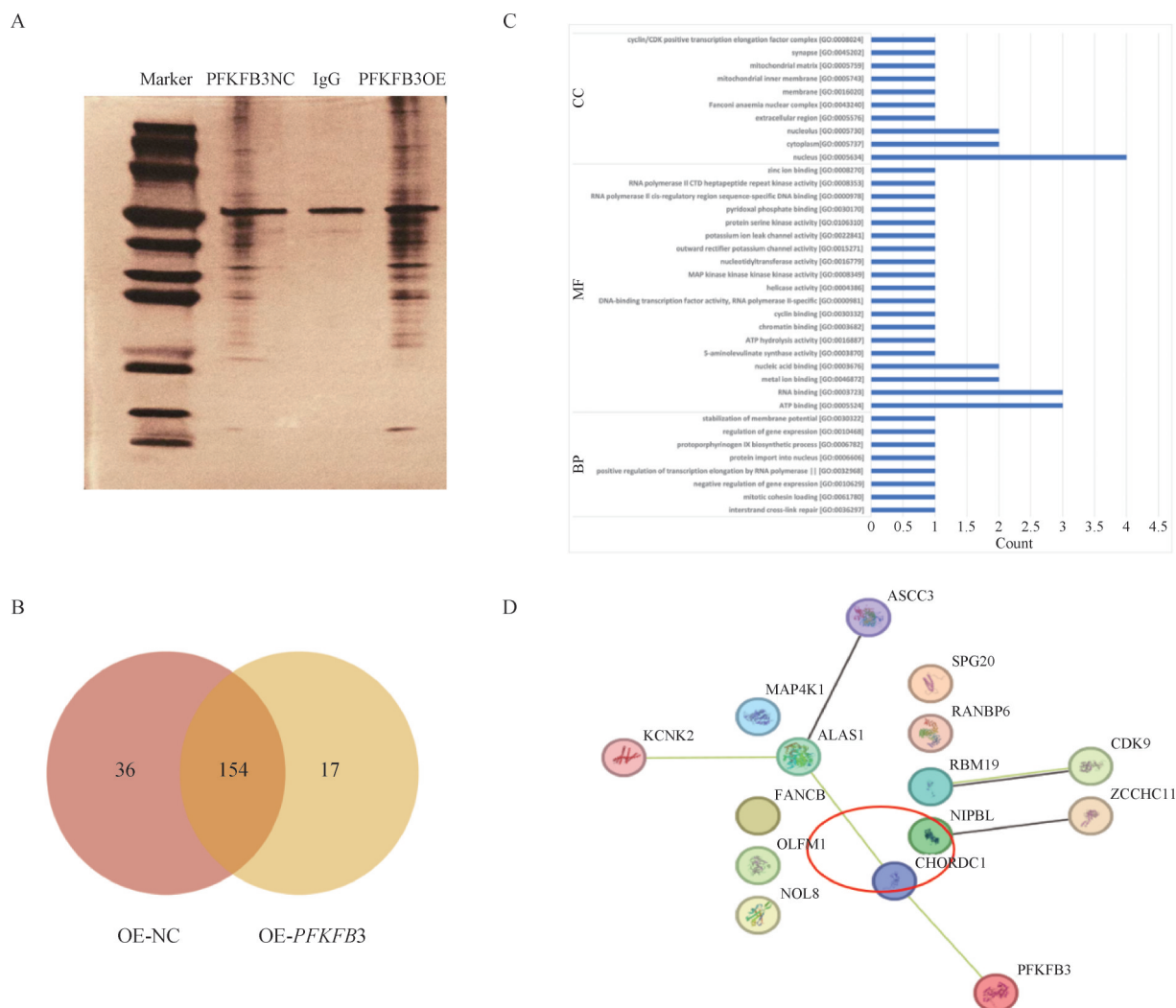


图6 PFKFB3 Pull-down 蛋白的银染及质谱鉴定分析结果

Fig. 6 Results of silver staining and mass spectrometry identification analysis of PFKFB3 Pull-down proteins

流,为PPAR γ 介导的脂肪生成提供必需的能量和底物。这些发现深度揭示了糖酵解代谢枢纽PFKFB3对猪肌肉脂肪沉积的调控作用,并初步研究了其调控机制,为解析脂肪细胞发育的代谢调控提供了新视角。

4 结 论

本研究在猪肌肉前体脂肪细胞模型中系统阐明了PFKFB3通过促进细胞增殖和驱动成脂分化双重机制调控肌肉脂肪沉积,同时通过互作蛋白筛

选鉴定出CHORDC1、ALAS1等新型互作因子,为解析PFKFB3调控脂肪细胞代谢的分子机制提供了新线索。

参考文献 (References):

- [1] LI J, ZHANG D H, YIN L Q, et al. Integration analysis of metabolome and transcriptome profiles revealed the age-dependent dynamic change in chicken meat[J]. *Food Res Int*, 2022, 156: 111171.
- [2] DEVATKAL S K, NAVEENA B M, KOTAIAH T. Quality, composition, and consumer evaluation of meat

- from slow-growing broilers relative to commercial broilers[J]. *Poult Sci*, 2019, 98(11): 6177-6186.
- [3] JUN KIM D, SONG S, CHENG H, et al. Physicochemical and histochemical characteristics of bovine longissimus lumborum muscle defected as muscular steatosis (massive adipocyte infiltration)[J]. *Food Chem*, 2021, 349: 129205.
- [4] LIU J J, ELLIES-OURY M P, CHRIKI S, et al. Contributions of tenderness, juiciness and flavor liking to overall liking of beef in Europe[J]. *Meat Sci*, 2020, 168: 108190.
- [5] YAN E, GUO J X, YIN J D. Nutritional regulation of skeletal muscle energy metabolism, lipid accumulation and meat quality in pigs [J]. *Anim Nutr*, 2023, 14: 185-192.
- [6] NDLANDLA T W, CHENG F Y, HUANG C W, et al. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* supplementation on intramuscular fat accumulation and meat quality in finishing pigs[J]. *Anim Biosci*, 2025, 38(3): 551-559.
- [7] ZHANG L Y, LI F N, GUO Q P, et al. Balanced branched-chain amino acids modulate meat quality by adjusting muscle fiber type conversion and intramuscular fat deposition in finishing pigs[J]. *J Sci Food Agric*, 2022, 102(9): 3796-3807.
- [8] ZHANG X Y, LIU C Y, KONG Y Y, et al. Effects of intramuscular fat on meat quality and its regulation mechanism in Tan sheep [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 908355.
- [9] AL SAEDI A, DEBRUIN D A, HAYES A, et al. Lipid metabolism in sarcopenia [J]. *Bone*, 2022, 164: 116539.
- [10] LI Y H, GAN M C, TANG T, et al. Intramuscular adipocyte and fatty acid differences between high-fat and control rabbit groups subject to a restricted diet [J]. *Vet Med Sci*, 2021, 7(5): 2051-2060.
- [11] REALINI C E, PAVAN E, PURCHAS R W, et al. Relationships between intramuscular fat percentage and fatty acid composition in *M. longissimus* lumborum of pasture-finished lambs in New Zealand [J]. *Meat Sci*, 2021, 181: 108618.
- [12] XU Z Y, CHEN W T, WANG L Y, et al. Cold exposure affects lipid metabolism, fatty acids composition and transcription in pig skeletal muscle [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 748801.
- [13] POKLUKAR K, ČANDEK-POTOKAR M, BATOREK LUKAČ N, et al. Lipid deposition and metabolism in local and modern pig breeds: A review [J]. *Animals*, 2020, 10(3): 424.
- [14] QIU Y H, GAN M L, WANG X Y, et al. The global perspective on peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in ectopic fat deposition: A review [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253(Pt 5): 127042.
- [15] XU D N, ZHUANG S Q, CHEN H Z, et al. IL-33 regulates adipogenesis via Wnt/ β -catenin/PPAR- γ signaling pathway in preadipocytes [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 363.
- [16] KELLER H, DREYER C, MEDIN J, et al. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(6): 2160-2164.
- [17] LI X P, KIM S W, CHOI J S, et al. Investigation of porcine FABP3 and LEPR gene polymorphisms and mRNA expression for variation in intramuscular fat content [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(8): 3931-3939.
- [18] SWEENEY T, O' HALLORAN A M, HAMILL R M, et al. Novel variation in the FABP3 promoter and its association with fatness traits in pigs [J]. *Meat Sci*, 2015, 100: 32-40.
- [19] JIANG Y, LIU J L, LIU H T, et al. miR-381-3p inhibits intramuscular fat deposition through targeting FABP3 by ceRNA regulatory network [J]. *Biology*, 2022, 11(10): 1497.
- [20] GAO Y Y, CHENG G, CHENG Z X, et al. Association of variants in FABP4, FASN, SCD, SREBP1 and TCAP genes with intramuscular fat, carcass traits and body size in Chinese Qinchuan cattle [J]. *Meat Sci*, 2022, 192: 108882.
- [21] YU H W, GUO J T, LI B Z, et al. Erucic acid promotes intramuscular fat deposition through the PPAR γ -FABP4/CD36 pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 298: 140121.
- [22] CATILLO G, ZAPPATERRA M, ZAMBONELLI P, et al. Genome-wide association study identifies quantitative trait loci regions involved in muscle acidic profile in Large White heavy pigs [J]. *Animal*, 2020, 14(7): 1342-1350.
- [23] MUÑOZ M, GARCÍA-CASCO J M, CARABALLO C, et al. Identification of candidate genes and regulatory factors underlying intramuscular fat content through longissimus dorsi transcriptome analyses in Heavy Iberian pigs [J]. *Front Genet*, 2018, 9: 608.
- [24] WANG Z X, LI Q G, CHAMBA Y Z, et al. Identification of genes related to growth and lipid deposition from transcriptome profiles of pig muscle tissue [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0141138.

- [25] ATSUMI T, NISHIO T, NIWA H, et al. Expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase/PFKFB3 isoforms in adipocytes and their potential role in glycolytic regulation [J]. *Diabetes*, 2005, 54(12):3349-3357.
- [26] YAMAMOTO T, TAKANO N, ISHIWATA K, et al. Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway [J]. *Nat Commun*, 2014, 5:3480.
- [27] HUO Y Q, GUO X, LI H G, et al. Targeted overexpression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase in adipose tissue increases fat deposition but protects against diet-induced insulin resistance and inflammatory responses [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(25):21492-21500.
- [28] GUO X, XU K F, ZHANG J F, et al. Involvement of inducible 6-phosphofructo-2-kinase in the anti-diabetic effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation in mice [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(31):23711-23720.
- [29] HUO Y Q, GUO X, LI H G, et al. Disruption of inducible 6-phosphofructo-2-kinase ameliorates diet-induced adiposity but exacerbates systemic insulin resistance and adipose tissue inflammatory response [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(6):3713-3721.
- [30] ZHANG L Y, LI F N, GUO Q P, et al. Balanced branched-chain amino acids modulate meat quality by adjusting muscle fiber type conversion and intramuscular fat deposition in finishing pigs [J]. *J Sci Food Agric*, 2022, 102(9):3796-3807.
- [31] YU T Y, TIAN X K, LI D, et al. Transcriptome, proteome and metabolome analysis provide insights on fat deposition and meat quality in pig [J]. *Food Res Int*, 2023, 166:112550.
- [32] LI J, YANG Y Y, TANG C H, et al. Changes in lipids and aroma compounds in intramuscular fat from Hu sheep [J]. *Food Chem*, 2022, 383:132611.
- [33] HOU X H, ZHANG R, YANG M, et al. Metabolomics and lipidomics profiles related to intramuscular fat content and flavor precursors between Laiwu and Yorkshire pigs [J]. *Food Chem*, 2023, 404(Pt A):134699.
- [34] PENG F, LI Q, SUN J Y, et al. PFKFB3 is involved in breast cancer proliferation, migration, invasion and angiogenesis [J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(3):945-954.
- [35] LI J, ZHANG S Q, LIAO D Z, et al. Overexpression of PFKFB3 promotes cell glycolysis and proliferation in renal cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1):83.
- [36] AL-MANSOORI L, AL-JABER H, PRINCE M S, et al. Role of inflammatory cytokines, growth factors and adipokines in adipogenesis and insulin resistance [J]. *Inflammation*, 2022, 45(1):31-44.
- [37] LI W, WANG F, SUN F, et al. Effects of vitamin A on intramuscular fat development in beef cattle: A meta-analysis [J]. *Front Vet Sci*, 2023, 10:1105754.
- [38] MA Z Q, WANG Y Q, SHEN J N, et al. Overexpression of ALDOC promotes porcine intramuscular and intermuscular fat deposition by activating the AKT-mTORC1 signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(43):23893-23907.
- [39] HUO Y Q, GUO X, LI H G, et al. Targeted overexpression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase in adipose tissue increases fat deposition but protects against diet-induced insulin resistance and inflammatory responses [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(25):21492-21500.
- [40] GANO J J, SIMON J A. A proteomic investigation of ligand-dependent HSP90 complexes reveals CHORDC1 as a novel ADP-dependent HSP90-interacting protein [J]. *Mol Cell Proteom*, 2010, 9(2):255-270.
- [41] PICHLEROVÁ K, ŠINSKÝ J, KOTÁSEK M, et al. CHORDC1, the novel interacting partner of tau protein [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2024, 43(4):367-370.
- [42] LU L, CHEN Y Y, ZHU Y. The molecular basis of targeting PFKFB3 as a therapeutic strategy against cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(37):62793-62802.
- [43] SEO M, KIM J D, NEAU D, et al. Structure-based development of small molecule PFKFB3 inhibitors: a framework for potential cancer therapeutic agents targeting the Warburg effect [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24179.
- [44] KUBOTA Y, NOMURA K, KATOH Y, et al. Novel mechanisms for heme-dependent degradation of ALAS1 protein as a component of negative feedback regulation of heme biosynthesis [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(39):20516-20529.
- [45] JIA J Q, ABSMEIER E, HOLTON N, et al. The interaction of DNA repair factors ASCC2 and ASCC3 is affected by somatic cancer mutations [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):5535.
- [46] WANG J, LI J Q, CHENG D, et al. miR-132-3p promotes heat stimulation-induced esophageal squamous cell carcinoma tumorigenesis by targeting KCNK2 [J]. *Mol Carcinog*, 2023, 62(5):583-597.