

细胞凋亡对牦牛肉成熟过程中品质的影响

孙志昶¹, 余群力¹, 韩玲¹, 张文华², 杨勤³

(1. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070) (2. 宁夏厦华肉食品有限公司, 宁夏中卫 755000)

(3. 甘南州畜牧科学研究所, 甘肃合作 747000)

摘要: 为研究宰后牦牛肉在成熟过程中前驱肱三头肌 (TB)、中部背最长肌 (ML)、后驱半膜肌 (SM) 中细胞凋亡过程对其品质变化的影响, 选取 24 头甘南黑牦牛按照伊斯兰方式进行屠宰, 于 0~4 °C、风速 0.5 m/s 条件下成熟, 在成熟过程中不同时间点 (1、3、5、7 d) 进行剪切力、MFI、肉色、蒸煮损失、细胞凋亡率以及 caspase-3 活力测定。TB、ML 和 SM 在宰后 1~5 d 剪切力值显著降低 ($p < 0.05$), MFI 显著上升 ($p < 0.01$); L^* 、 a^* 、 b^* 值在宰后 3 d 显著升高 ($p < 0.01$); 蒸煮损失在宰后 1~7 d 呈先上升后下降的趋势; 宰后 5~7 d TB、SM 的细胞凋亡率在是一个极显著增加的过程 ($p < 0.01$), 宰后 7 d, TB 和 ML 中阳性细胞核数量差异极显著 ($p < 0.01$); TB、ML 和 SM 在宰后 0.5 h 检测到 caspase-3 活力, 宰后 12 h ML 的 caspase-3 达到最高活力。相关性分析中宰后牦牛肉中凋亡率的变化、caspase-3 活力的变化与成熟过程中嫩度、肉色和持水力的变化是显著相关的。结果说明, 牦牛肉宰后成熟过程中细胞凋亡的发生, 及其程度的加深与牦牛肉品质变化是同步进行的。

关键词: 牦牛; 成熟; 品质; 原位末端法; 细胞凋亡

文章编号: 1673-9078(2014)8-82-88

The Research of Apoptotic in Yak Muscles during Postmortem Aging

SUN Zhi-chang¹, YU Qun-li¹, HAN Ling¹, ZHANG Wen-hua², YANG Qin³

(1. College of Food Science and Engineering, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China)

(2. Ningxia Xiahua Meat food Co. Ltd., Zhongwei 755000, China)

(3. Gannan Institute of Animal Science and Veterinary, Hezuo 747000, China)

Abstract: Twenty-four Gannan yak were slaughtered according to Islamic way of slaughtering, then aged at 0~4 °C with wind speed of 0.5 m/s. The shear force, MFI, color, apoptotic rate and caspase-3 activity during postmortem aging were determined. The shear force value in triceps brachi (TB), musculus longissimus (ML) and semimembranosus (SM) after slaughtered of 1~5 d was significantly lower ($p < 0.05$), and MFI significantly increased ($p < 0.01$); L^* , a^* , b^* values were significantly higher at the 3rd d of postmortem aging, a^* , b^* values decreased significantly at 5~7th d of postmortem aging ($p < 0.01$); the cooking loss first increased and then decreased at 1~7th d of postmortem aging; the apoptosis rate in TB and SM had very significant increase in process ($p < 0.01$), the positive nuclei number in TB and ML had difference during postmortem aging ($p < 0.01$); it was detected caspase-3 activity in TB, ML and SM at 0.5 h postmortem, while it was reached the highest in ML at 12 h postmortem. Across correlation analysis, the yak skeletal muscle cell apoptosis and its degree of deepening were related to the changes of tenderness, meat color (L^* , a^* , b^*) and water holding capacity, as well as the yak meat quality change.

Key words: yak; aging; quality; TUNEL; apoptosis

我国是世界上拥有牦牛数量最多的国家, 世界 95% 以上的牦牛主要分布在以我国青藏高原为中心的高山草原上^[1]。高海拔、远离污染、以天然牧草为食的生活环境, 造就牦牛肉蛋白含量高、矿物质丰富、脂肪少, 是消费者青睐的天然绿色食品^[2-3]。

宰后成熟过程中肉的各项品质都会发生变化,

收稿日期: 2014-01-15

基金项目: 中国国家现代农业(肉牛牦牛)产业技术体系资助项目(CARS-38)

和国家科技支撑计划(2012BAD28B01)

作者简介: 孙志昶, 博士生, 主要从事动物食品营养与工程研究

通讯作者: 韩玲, 教授, 主要从事畜产品加工研究

随着成熟时间的延长, 嫩度和风味会逐渐得到改善, 肉的多汁性逐渐降低。Herrera-Mendez^[4]和 Ouali^[5]等发现宰后细胞骨架蛋白的降解是改善牛肉嫩度的主导因素。Kemp^[6]证明肉色变化主要与肌红蛋白和高铁肌红蛋白形态之间的变化、肌纤维类型及水分分布有很大关系。同时, Chen 等^[7]认为动物宰后成熟过程糖酵解的进行导致肉 pH 值的下降, 细胞内外环境发生了变化, 导致肌细胞变形, 决定了肉的系水力和多汁性。由于动物宰后切断了肌肉组织与外界环境的主要沟通, 肌肉中骨骼肌细胞必然发生细胞凋亡^[8], 成熟过程与凋亡过程类似, 所以用细胞凋亡理论去解释肉类

宰后成熟机制是当前研究的新领域。

细胞凋亡 (Apoptosis) 是能量依赖的细胞内死亡程序活化而致的细胞自杀, 由多基因协调控制的细胞自主的、有序的死亡方式^[9]。在 ATP 存在的条件下, 由于线粒体的通透性增加, 细胞色素 C 和促凋亡蛋白因子被释放到胞浆中, 连同其他蛋白激活半胱氨酸蛋白酶家族 (caspase) 下游效应酶 Caspase-3 从而诱导细胞凋亡, 主要表现为细胞膜在凋亡小体形成前保持完整, 染色质凝聚在核膜下呈月牙状, 细胞核浓缩破裂形成凋亡小体, 细胞体积皱缩变小^[10]。Altnauer^[11] 等通过 TUNEL 法分析观察到猪骨骼肌细胞变性过程中 DNA 的降解, 凋亡细胞核的数量占总细胞核的 0.5-2%。Park 等^[12] 研究表明, 肌肉组织中 caspase-3 蛋白的表达量与细胞凋亡量呈显著相关性。

然而, 在肉品科学领域, 与细胞特征性凋亡过程有关的, 以及该过程对牦牛肉宏观品质有怎么样的影响, 国内外鲜有报道。本文研究牦牛肉宰后成熟过程中不同部位肉质、细胞凋亡率和 caspase-3 活力的变化, 从而确认细胞凋亡过程是否发生在宰后成熟过程中的牦牛肉骨骼肌细胞中, 对宰后牦牛肉成熟机制提供一个更加合理、系统的解释途径, 为提高牦牛肉宰后成熟工艺和产业化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料: 牦牛由甘肃临夏康美集团提供, 选取在专门的饲养场, 由同一个饲养员饲养, 自然放养、发育正常、健康无疾病、年龄在 2~4 岁体重均匀的 24 头黑牦牛, 宰前禁食 16~18 h, 只提供水。

试验试剂: 苏木素、伊红、中性树胶、饿酸、环氧树脂、多聚甲醛、H₂O₂、甲醛、TritonX-100、柠檬酸钠、NaCl、KCl、磷酸二钠、磷酸二氢钾 (国药集团), TUNEL 试剂盒 (Roche 公司), Ac-DEVD-AMC; CHAPS, 分析纯; HEPES, 分析纯; 五水硫酸铜, 分析纯; 酒石酸钾钠, 分析纯; 氢氧化钠, 分析纯。

1.2 试验仪器

UV-250 型紫外分光光度计 (日本岛津公司生产), CL-M 嫩度仪 (上海精密科学仪器有限公司), TC-PZA 型全自动测色色差计 (北京鑫奥依克光电技术公司), TGL-24MC 型台式高速冷冻离心机 (长沙英泰仪器有限公司), FA2004B 型电子天平 (上海佑科仪器有限公司), 冰冻切片 (德国莱卡公司), IX71

显微镜 (Olympus 公司), H-7650 透射电子显微镜 (Hitachi 公司)。

1.3 试验设计

选择 24 头年龄体重相近的牦牛为试验对象, 对其进行随机编号, 集中屠宰, 置于 0~4 °C、风速 0.5 m/s 环境下成熟。取每组中的前部肱三头肌 (TB)、中部背最长肌 (ML)、后部半膜肌 (SM) 三种不同部位肉样, 于成熟时间点 (1、3、5、7 d) 进行剪切力、MFI、肉色、蒸煮损失、细胞凋亡率以及 caspase-3 活力测定。

1.4 剪切力

取厚约 4 cm、质量 100 g 左右的肉样 (除去表面脂肪和结缔组织), 装入塑料薄膜袋, 用夹子封口, 放入 80 °C 水浴锅加热肉样到中心温度 75 °C, 取出冷却至室温, 用 1.27 cm 的取样器沿肌纤维方向钻取测定样, 用剪切力仪测定剪切力, 每组作 3 次, 取平均值。

1.5 肌原纤维小片化指数测定

取 1 g 肉样, 用 8 mL 的 MFI 缓冲液 (100 mmol/L KCl、20 mmol/L K₃PO₄、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L NaN₃, pH 值 7.1), 将肉研磨均质化。所得悬浊液在 1000 g 下离心 15 min, 弃去上清液, 沉淀再用 8 mL 的 MFI 缓冲液使之重新处于悬浊态, 再于 1000 g 离心 15 min, 弃去上清液。沉淀用 5 mL 的 MFI 缓冲液使之重新处于悬浊态, 用 200 目尼龙筛网过滤该悬浊液, 另用 5 mL MFI 缓冲液帮助肌原纤维蛋白通过滤网。过滤所得的肌原纤维蛋白悬浊液用双缩脲法测定其蛋白含量, 然后用 MFI 缓冲液将其质量浓度稀释至 0.5 mg/mL, 然后在 540nm 下测定其吸光度, 将结果乘以 200, 就是肌原纤维小片化指数。

1.6 色度

用色差仪测定肉样的 L* (亮度)、a* (红度)、b* (黄度), 平行测定 3 次, 求其平均值。

1.7 蒸煮损失

修整去除肉块表面的脂肪和结缔组织, 称量记为 M_a, 80 °C 恒温水浴加热, 用数显温度计记录加热过程中肉块的中心温度。当中心温度达到 75 °C 时, 恒温保持 5 min 后取出流水冷却至室温, 再次称量记为 M_b, 蒸煮损失计算公式为:

$$C_L = (M_a - M_b) / M_b \times 100\%$$

注: 式中 C_L 为蒸煮损失, %。

1.8 原位末端法 (TUNEL) 检测骨骼肌细胞

凋亡率

在冷冻切片机上将组织块连续切片, 10 μm 的横切片固定于载玻片上, 室温下晾片 5 min, 于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 然后用含 3% H₂O₂ 的甲醛溶液封闭, 浸入含 0.1% Triton X-100 和 0.1% 柠檬酸钠溶液中通透。将通透好的切片用 1 × PBS (37 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L 磷酸二钠, 1.4 mmol/L 磷酸二氢钾, pH 值 7.4) 漂洗, 沥干, 用羊血清封闭 30 min, 漂洗用 1 × PBS (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L 磷酸二钠, 1.4 mmol/L 磷酸二氢钾, pH 值 7.4) 洗 30 min, 按照 1:9 的比例加入末端标记酶和标记液配制成 TUNEL 反应工作液, 将反应工作液滴加覆盖切片, 然后将切片放置于湿盒中, 37℃ 避光孵育 60 min, 阴性对照组不加末端标记酶, 采用标记液替代反应工作液, 阳性对照组在添加 TUNEL 反应混合物之前先用 5.1 U/mL 的 DNase I 室温下孵育 10 min。将处理好的组织用甘油封片, 荧光显微镜观察和计数。每个样本在 200 × 倍镜下至少计算 3 个不同的视野, 最终的凋亡量用平均每个正常细胞所含阳性凋亡细胞核数目来表示。

1.9 Caspase-3 活力测定

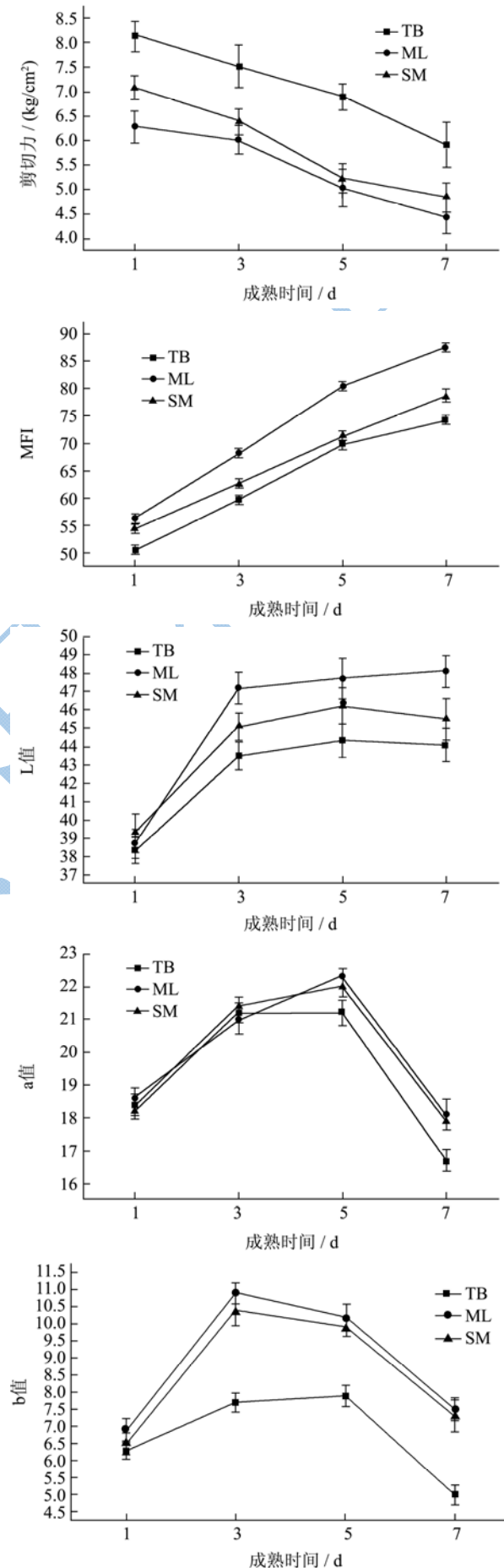
取冷冻样品 200 mg, 在冷冻条件下 0.5 mL, 100 mol/L mhepes (pH 值 7.5, 10% 蔗糖, 0.1% NP-40, 10 mol/L mDTT) 的裂解液中破碎, 匀浆, 反复冻融 3 次 (冷冻条件为 -20℃), 18000 g 离心 30 min, 取上清液, 置于 4℃ 条件下备用。由 20 μL 裂解物上清液、0.2 mL 反应缓冲液 (10% sucrose, 0.1% CHAPS, 100 mmol/L HEPES, pH 值 7.5) 和 5 μL 重建的荧光底物构成反应液。caspase-3 的底物分别是 Ac-DEVD-AMC。将反应液置于 96 孔板的酶标仪中在 37℃ 条件下孵化 1 h, 然后分别于 360 和 460 nm 的激发和发射波长下读取荧光强度。酶活力单位用每分钟每毫克肉样的相对荧光强度表示。

1.10 统计分析

用 SASS19.0 统计分析软件进行数据处理, 用 origin8 作图软件进行图形制作。

2 结果与分析

2.1 牦牛肉宰后品质变化



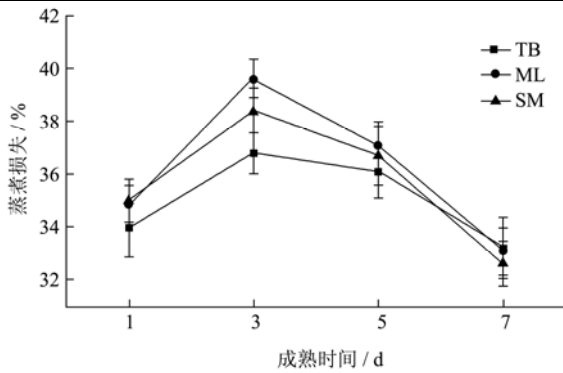


图1 牦牛肉宰后剪切力、MFI、肉色和蒸煮损失变化

Fig.1 The shear force, MFI, color and cooking loss of yak meat during aging

由图1和统计分析可知,牦牛宰后不同部位肉的剪切力值在宰后3d有下降趋势,在5d显著下降(TB, $p<0.05$; ML, $p<0.05$; SM, $p<0.01$),在宰后的各个阶段里,TB的剪切力值始终显著大于SM,而SM的剪切力值始终显著大于ML,宰后7d TB、ML和SM的剪切力值相较宰后1d分别下降了27.4、28.03和31.5%。MFI在宰后3d没有显著变化,而在第5、7d显著升高(TB, $p<0.01$; ML, $p<0.01$; SM, $p<0.05$)。宰后不同部位肉的L*值于宰后3d均显著升高($p<0.01$),之后无显著变化,宰后5d SM的L*值呈下降趋势;TB、ML和SM的a*值于宰后3d均显著上升,TB、ML和SM在宰后5、7d显著下降($p<0.01$)。TB、ML和SM的b*值均于宰后3d显著上升,宰后5、7d,TB、ML和SM的b*值显著降低($p<0.01$)。蒸煮损失于宰后3d显著增大(TB, $p<0.05$; ML, $p<0.01$; SM, $p<0.05$),此后开始下降,宰后5~7d显著下降(TB, $p<0.05$; ML, $p<0.01$; SM, $p<0.01$)。

2.2 牦牛肉宰后骨骼肌细胞凋亡数量分析

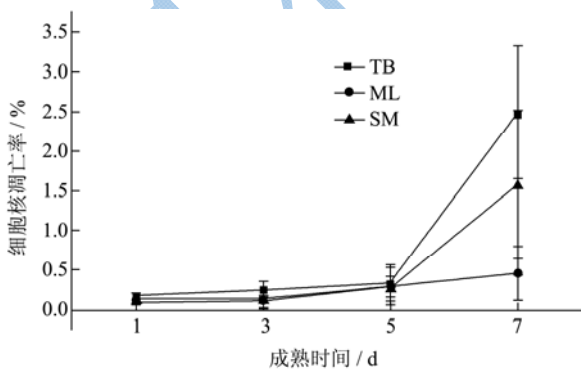


图2 牦牛肉宰后骨骼肌细胞凋亡率分析

Fig.2 The rate of apoptosis in muscles during aging

如图2所示,采用原位末端(TUNEL)染色法对宰后不同部位牦牛肉骨骼肌细胞的细胞凋亡率进行了检测,发现TB的凋亡细胞核的数量从宰后1d到宰

后5d呈缓慢的线性增多,宰后5d以后迅速增多。在宰前后3d的ML和SM中几乎检测不到阳性细胞核,从宰后3d开始ML和SM中的阳性细胞核逐渐增加,宰后5d后TB和SM中阳性细胞核显著增多($p<0.01$)。宰后7d,TB和SM中阳性细胞核显著增加($p<0.01$),TB和ML中阳性细胞核数量差异极显著($p<0.01$)。

2.3 牦牛肉宰后Caspase-3活力变化

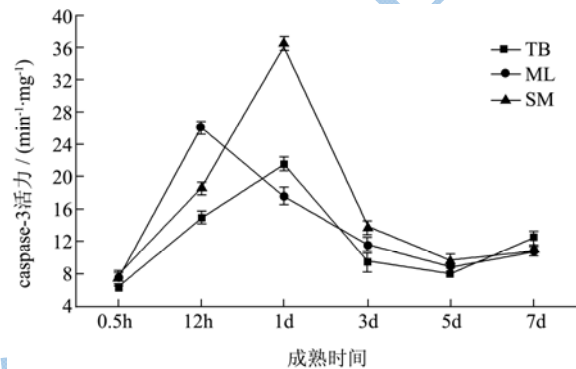


图3 牦牛肉宰后Caspase-3活力变化

Fig.3 Caspase-3 activity change of yak meat during aging

Caspase-3为细胞凋亡的重要执行分子,在细胞凋亡过程中起着关键性作用^[13]。如图3所示,宰后0.5h,TB、ML和SM中caspase-3没有显著差异($p>0.05$),宰后12h caspase-3活力显著高于宰后0.5h的活力(TB, $p<0.01$; ML, $p<0.001$; SM, $p<0.01$)。宰后12h ML的caspase-3达到最高活力,较宰后0.5h酶活力升高273.01%;TB和SM在宰后1d达到最高活力,较宰后0.5h酶活力分别升高了273.93%和386.17%。之后,TB、ML和SM的caspase-3活力出现显著下降趋势,宰后3d ML的caspase-3活力趋于平稳,差异不显著($p>0.05$)。宰后5d TB、ML和SM的caspase-3活力下降到最小值。

2.4 牦牛肉宰后细胞凋亡率和caspase-3活力

与剪切力、MFI、肉色和蒸煮损失相关分析

如表1所示,宰后TB凋亡率与剪切力值变化呈极显著负相关($R=-0.643$, $p<0.001$);与MFI极显著相关($R=0.931$, $p<0.01$);与肉色变化均呈显著相关,其中L*值($R=0.803$, $p<0.05$),a*值($R=0.835$, $p<0.001$),b*值($R=0.844$, $p<0.001$);与蒸煮损失变化呈显著相关($R=0.579$, $p<0.05$);宰后ML凋亡率与剪切力值变化呈极显著负相关($R=-0.712$, $p<0.001$);与MFI显著相关($R=0.047$, $p<0.05$);与肉色变化均呈显著相关,

其中 L*值 ($R=0.794$, $p<0.001$), a*值 ($R=0.860$, $p<0.001$), b*值 ($R=0.733$, $p<0.001$); 与蒸煮损失变化呈显著相关 ($R=0.647$, $p<0.05$); 宰后 SM 凋亡率与剪切力值变化呈极显著负相关 ($R=-0.677$, $p<0.001$);

与 MFI 显著相关 ($R=0.038$, $p<0.05$); 与肉色变化均呈显著相关, 其中 L*值 ($R=0.787$, $p<0.001$), a*值 ($R=0.866$, $p<0.05$), b*值 ($R=0.659$, $p<0.001$); 与蒸煮损失变化呈显著相关 ($R=0.710$, $p<0.001$).

表1 牦牛肉宰后细胞凋亡率与剪切力、MFI、肉色和蒸煮损失相关分析

Table 1 The correlation among apoptotic nuclei and other indicat es in TB, ML and SM muscle

相关性项目	剪切力	MFI	L*	a*	b*	蒸煮损失
TB 凋亡率	$R=-0.643$	$R=0.931$	$R=0.803$	$R=0.835$	$R=0.844$	$R=0.579$
	$p<0.001$	$p=0.009$	$p=0.028$	$p<0.001$	$p<0.001$	$p=0.034$
ML 凋亡率	$R=-0.712$	$R=0.883$	$R=0.794$	$R=0.860$	$R=0.733$	$R=0.647$
	$p<0.001$	$p=0.047$	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$	$p=0.019$
SM 凋亡率	$R=-0.677$	$R=0.812$	$R=0.787$	$R=0.866$	$R=0.659$	$R=0.710$
	$p<0.001$	$p=0.038$	$p<0.001$	$p=0.015$	$p<0.001$	$p<0.001$

表2 牦牛肉宰后 Caspases-3 活力与剪切力、MFI、肉色和蒸煮损失相关分析

Table 2 The correlation among Caspases-3 and other indicat es in TB, ML and SM muscle

相关性项目	剪切力	MFI	L*	a*	b*	蒸煮损失
TB Caspases-3 活力	$R=-0.621$	$R=0.939$	$R=0.767$	$R=0.729$	$R=0.652$	$R=0.683$
	$p=0.007$	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$
ML Caspases-3 活力	$R=-0.717$	$R=0.922$	$R=0.683$	$R=0.803$	$R=0.664$	$R=0.691$
	$p<0.001$	$p=0.001$	$p<0.001$	$p=0.002$	$p<0.001$	$p=0.021$
SM Caspases-3 活力	$R=-0.639$	$R=0.916$	$R=0.654$	$R=0.874$	$R=0.668$	$R=0.672$
	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.001$	$p=0.008$

如表2所示, 宰后 TB caspase-3 活力与剪切力值变化呈极显著负相关 ($R=-0.621$, $p<0.01$); 与 MFI 极显著相关 ($R=0.939$, $p<0.001$); 与肉色变化均呈显著相关, 其中 L*值 ($R=0.767$, $p<0.001$), a*值 ($R=0.729$, $p<0.001$), b*值 ($R=0.652$, $p<0.001$); 与蒸煮损失变化呈极显著相关 ($R=0.683$, $p<0.001$); 宰后 ML 凋亡率与剪切力值变化呈极显著负相关 ($R=-0.717$, $p<0.001$); 与 MFI 极显著相关 ($R=0.922$, $p<0.001$); 与肉色变化均呈极显著相关, 其中 L*值 ($R=0.683$, $p<0.001$), a*值 ($R=0.803$, $p<0.01$), b*值 ($R=0.664$, $p<0.001$); 与蒸煮损失变化呈显著相关 ($R=0.691$, $p<0.05$); 宰后 SM 凋亡率与剪切力值变化呈极显著负相关 ($R=-0.639$, $p<0.001$); 与 MFI 显著相关 ($R=0.916$, $p<0.001$); 与肉色变化均呈显著相关, 其中 L*值 ($R=0.654$, $p<0.001$), a*值 ($R=0.874$, $p<0.05$), b*值 ($R=0.668$, $p<0.001$); 与蒸煮损失变化呈极显著相关 ($R=0.672$, $p<0.01$).

3 讨论

图1显示, 宰后5d剪切力值显著降低 ($p<0.05$), MFI显著上升 ($p<0.01$), Harwood^[14]研究发现肌肉成熟过程中在内源性蛋白酶的作用下将肌纤维蛋白降解, 原本完整的肌原纤维断裂成含不同数目肌节的小

片, MFI逐渐上升, 剪切力值下降, 与本研究结果类似。颜色是肉的重要食用品质之一, 肉色变化主要是由肌红蛋白在脱氧、氧合和高铁肌红蛋白三种形态之间的变化所决定^[15], 本研究中, 宰后TB、ML和SM的L*、a*、b*值在宰后3d显著升高, 这表明在这个阶段肌红蛋白正在迅速氧合, 肌肉表面的氧合肌红蛋白层正在向肌肉内部扩散, 肉色变得更加鲜亮。在随后的成熟过程中, 不同部位肉的a*、b*值在宰后5、7d显著下降 ($p<0.01$), 表明在这个阶段灰褐色的高铁肌红蛋白正在逐渐积累。蒸煮损失可以反映肉的持水力情况, 宰后TB、ML和SM的蒸煮损失都是先上升后下降的趋势, 这在很大程度上受到pH值的影响, Porn-Ares^[16]研究发现牛肉在成熟过程中pH在第3d下降到最低点随后呈上升趋势, 由于pH值对肌肉持水力影响的实质是蛋白质分子的静电荷效应, 当pH值下降到或接近等电点时, 肌肉蛋白的净电荷减少, 蛋白质分子之间的静电斥力减小, 使其网状处于紧缩状态, 所容纳的水就少, 所以持水力就小。

细胞发生凋亡的过程中, 由于骨骼肌细胞中DNA的降解和出现碎片化, 从而产生大量的粘性3'-OH末端, 可用荧光标记的末端脱氧核糖核苷酸转移酶(TdT)介导dUTP (fluorescein-d UTP) 缺口末端标记(TUNEL)法进行凋亡细胞核的检测^[17], 被认为是定

性检测细胞凋亡的经典方法,具有灵敏性高、针对性强和可量化凋亡程度的特点。图2显示,宰后5、7 d TB、SM的细胞凋亡率是一个极显著增加的过程($p<0.01$),由此可以推测宰后牦牛肉骨骼肌细胞中必然存在一个细胞凋亡的过程,并可能于宰后7 d达到凋亡的高峰。宰后7 d, TB和ML中阳性细胞核数量差异极显著($p<0.01$), TB中的凋亡细胞核数量最多,其次是SM,最后是ML,这说明阳性细胞核数量的多少与特定的肌纤维组成有关。Koochmarai^[18]研究证明肌纤维类型反应的是肌肉代谢特性,氧化型肌纤维(I型)的比例不同,导致糖酵解和有氧代谢率不同,而Delgado^[19]发现肌肉中高比例的氧化型肌纤维(I型)构成的肌肉线粒体对细胞凋亡更加敏感,说明肌肉组织中氧化型肌纤维(I型)的比例与细胞凋亡存在某种联系。

图3显示,宰后0.5 h检测到caspase-3活力,宰后12 h ML的caspase-3达到最高活力,Costelli^[20]研究显示,在羊肉的整个成熟过程中只检测到凋亡效应酶3的酶原而没有检测到其激活片段,与本研究结果相反。Kemp^[21]在宰后1 h猪背最长肌中检测到caspase-3的酶原片段,宰后8 h猪背最长肌中caspase-3活力达到最高值,与本研究结果相似,说明caspase-3参与了牦牛肉宰后成熟过程。Gupta^[22]研究表明细胞色素C能与Apaf-1(凋亡酶激活因子-1)、caspase-9前体和ATP/dATP形成凋亡小体(apoptosome),激活凋亡caspase-3,从而引发caspase级联反应,导致细胞发生凋亡,由此判断出牦牛肉宰后骨骼肌细胞中发生了细胞凋亡。

相关性分析中宰后不同部位肉凋亡率与剪切力值极显著负相关($p<0.01$),与MFI值变化均呈显著相关($p<0.05$);宰后caspase-3活力变化均与MFI值呈显著相关($p<0.001$),与剪切力值变化均呈极显著负相关($p<0.01$)。Kemp^[23]研究显示细胞凋亡过程中随着caspase-3表达水平的升高和肌细胞凋亡小体的形成使凋亡程度加深,对肌原纤维结构有破坏作用;Degterev等^[24]发现,caspase-3可以降解伴肌动蛋白和伴肌球蛋白等蛋白,同时还发现其可以将I带和Z线结合的部分弱化,从而有助于嫩度的提高。凋亡率变化与肉色(L*、a*、b*值)的变化均呈极显著相关性($p<0.05$),caspase-3活力与肉色(L*、a*、b*值)均呈极显著相关性($p<0.01$),随着细胞凋亡的发生及其程度的加深,且在宰后1 d是caspase-3酶活力的最高值,随着凋亡程度的不断加深和ATP含量的迅速消耗,细胞色素-C逐渐释放到胞浆里,线粒体电子传递链受到了严重破坏而可能导致了肉色的进一步褐变^[25],Talanian证明细胞线粒体氧气消耗能力与膜电子传递

功能的削弱程度,决定了肌红蛋白的氧化及氧合形式,进而决定了肉的颜色变化^[26]。凋亡率的变化与蒸煮损失的变化呈显著相关($p<0.05$),caspase-3酶活力与蒸煮损失的变化均呈极显著相关性($p<0.01$),这可能是由于线粒体细胞色素-C的大量释放凋亡细胞核的急速增加,Caspase-3的充分激活,并作用于肌原纤维骨架蛋白发生降解而造成包围在每个肌原纤维周围的肌质网状结构崩溃,完整性遭到破坏,水分不断损失^[27];随着宰后凋亡程度的不断加深,肌细胞皱缩,细胞内外空间发生变化共同作用的结果导致了宰后保水性逐渐下降^[28]。

4 结论

4.1 TB、ML和SM在宰后5 d剪切力值显著降低($p<0.05$),MFI显著上升($p<0.01$);L*、a*、b*值在宰后3 d显著升高,a*、b*值在宰后5~7 d显著下降($p<0.01$);蒸煮损失在宰后1~7 d呈先上升后下降的趋势;宰后5~7 d TB、SM的细胞凋亡率是一个极显著增加的过程($p<0.01$),宰后7 d, TB和ML中阳性细胞核数量差异极显著($p<0.01$);TB、ML和SM在宰后0.5 h检测到caspase-3活力,宰后12 h ML的caspase-3达到最高活力。

4.2 中凋亡率与剪切力值极显著负相关($p<0.01$),与MFI值变化均呈显著相关($p<0.05$),与肉色(L*、a*、b*值)的变化均呈极显著相关性($p<0.05$),与蒸煮损失的变化呈显著相关($p<0.05$);宰后caspase-3活力变化与剪切力值变化均呈极显著负相关($p<0.01$),与MFI值呈显著相关($p<0.001$),与肉色(L*、a*、b*值)均呈极显著相关性($p<0.01$),与蒸煮损失的变化均呈极显著相关性($p<0.01$)。

参考文献

- [1] 孙志昶,冯晓琴,韩玲,等.牦牛肉宰后成熟嫩化与细胞凋亡酶活力变化研究[J].农业机械学报,2014,45(1):191-196
SUN Zhi-chang, FENG Xiao-qin, HAN Ling, et al. Tenderness and Apoptotic Activity of Yak Meat during Postmortem Aging [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(1): 191-196
- [2] 田甲春,师希雄,韩玲.牦牛宰后成熟机理与肉用品质研究[J].农业机械学报,2012,43(12): 34-40
TIAN Jia-chun, SHI Xi-xiong, HAN Lin. Ageing Mechanism and Meat Quality during Postmortem Ageing of Yak Meat [J]. Transaction of Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(12): 34-40
- [3] 孙志昶.冷热剔骨工艺对牛肉品质的影响[J].农业工程学

- 报,2012,28(1):288-293
- SUN Zhi-chang. Effects of hot and cold boning technologies on quality of beef [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2012, 28(1): 288-293
- [4] Herrera-Mendez C H, Becila S, Boudjellal A, et al. Meat ageing: Reconsideration of the current concept[J]. Trends in Food Science & Technology, 2006, 17(8): 394-405
- [5] 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
- [6] Huang M, Huang F, Ma H, et al. Preliminary study on the effect of caspase-6 and calpain inhibitors on postmortem proteolysis of myofibrillar proteins in chicken breast muscle [J]. Meat Science, 2012, 90(3): 536-542
- [7] Chen L, Feng X C, Lu F, et al. Effects of camptothecin, etoposide and Ca²⁺ on caspase-3 activity and myofibrillar disruption of chicken during postmortem ageing [J]. Meat Science, 2011, 87(3): 165-174
- [8] Huff Lonergan E, Zhang W, Lonergan S M. Biochemistry of postmortem muscle - Lessons on mechanisms of meat tenderization [J]. Meat Science, 2010, 86(1): 184-195
- [9] Stennicke H R, Salvesen G S. Properties of the caspases [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1998, 1387(1-2):17-31
- [10] Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, et al. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis [J]. Cell Death and Differentiation, 1999, 6(7): 644-651
- [11] Altnauer F, Conus S, Cavalli A, et al. Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(7): 5947-5957
- [12] Park K M, Pramod A B, Kim J H, et al. Molecular and biological factors affecting skeletal muscle cells after slaughtering and their impact on meat quality: A mini review [J]. Journal of Muscle Foods, 2010, 21(2): 280-307
- [13] Pinton P, Ferrari D, Virgilio F D, et al. Molecular machinery and signaling events in apoptosis [J]. Drug Development Research,2001,52(4): 558-570
- [14] Harwood S M, Yaqoob M M, Allen D A. Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis [J]. Ann Clin Biochem, 2005,42(Pt 6): 415-431
- [15] Becila S, Herrera-Mendez C, Coulis G, et al. Postmortem muscle cells die through apoptosis [J]. European Food Research and Technology, 2010, 231(3): 485-493
- [16] Pom-Ares M I, Samali A, Orrenius S. Cleavage of the calpain inhibitor,calpastatin,during Apoptosis [J]. Cell Death And Differentiation, 1998, 5: 1028-1033
- [17] Kent M P, Spencer M J, Koohmaraie M. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin [J]. Journal of Animal Science, 2004,82(3): 794-801
- [18] Koohmaraie M, Shackelford S D, Wheeler T L, et al. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge):characterization of effects on muscle growth and meat quality traits [J]. Anim. Sci, 1995,73: 3596-3607
- [19] Delgado E F, Geesink G H, Marchello J A, et al. Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep [J]. Journal of Animal Science, 2001, 79(8): 2097-2107
- [20] Costelli P, Reffo P, Penna F, et al. Ca²⁺-dependent proteolysis in muscle wasting [J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, 37(10): 2134-2146
- [21] Kemp C M, King D A, Shackelford S D, et al. The caspase proteolytic system in callipyge and normal lambs in longissimus dorsi, semimembranosus and infraspinatus muscles during postmortem storage [J]. Journal of Animal Science, 2009, 11: 2009-1790
- [22] Gupta S, Gollapudi S. Susceptibility of naive and subsets of memory T cells to apoptosis via multiple signaling pathways [J]. Autoimmunity Reviews, 2007, 6(7): 476-481
- [23] Kemp C M, Bardsley R G, Parr T. Changes in caspase activity during the postmortem conditioning period and its relationship to shear force in porcine longissimus muscle [J]. Journal of Animal Science, 2006, 84(10): 312-316
- [24] Degtarev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury [J]. Nature Chemical Biology, 2005, 1(2): 112-119
- [25] Brunelle J K, Chande N S. Oxygen deprivation induced cell death: an update [J]. Apoptosis, 2002, 7(6): 475-482
- [26] Talanian R, Quinlan C, Trautz S, et al. Substrate specificities of caspase family proteases [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(15): 9677-9682
- [27] Underwood K R, Means W J, Du M. Caspase 3 is not likely involved in the postmortem tenderization of beef muscle [J]. Journal of Animal Science, 2008, 86(4): 28-32
- [28] Kemp C M, Bardsley R G, Parr T. Changes in caspase activity during the postmortem conditioning period and its relationship to shear force in porcine longissimus muscle [J]. Journal of Animal Science, 2006(a), 84: 2841-2846