

绵羊肌肉 IGF-I 基因表达的发育性变化研究

黄治国^{1,2}, 谢庄^{2*}

(1. 四川理工学院酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川自贡 643000; 2. 南京农业大学动物科技学院, 江苏南京 210095)

摘要 [目的] 研究哈萨克羊和新疆细毛羊肌肉中胰岛素样生长因子 I (Insulin-like growth factor I, IGF-I) 基因在发育早期的表达, 为绵羊早期生长发育的研究提供资料。[方法] 采用实时定量 PCR 检测 2 个品种羊在 2、30、60、90 和 120 日龄时肌肉中 IGF-I mRNA 的水平, 并用 SPSS 软件进行统计分析。[结果] 绵羊肌肉 IGF-I mRNA 的表达量随着日龄的增加呈现出先升后降的趋势, 哈萨克羊肌肉 IGF-I mRNA 的峰值出现于 30 日龄, 新疆细毛羊出现于 60 日龄; 哈萨克羊的表达量在 2 日龄和 90 日龄时与新疆细毛羊差异不显著 ($P > 0.05$), 在 30~60 日龄期间极显著低于新疆细毛羊 ($P < 0.01$)。[结论] 雄性哈萨克羊和新疆细毛羊肌肉 IGF-I mRNA 表达具有相似发育性变化模式, 但是表达量存在品种间差异。

关键词 绵羊; IGF-I; 表达

中图分类号 S826 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)14-06375-03

Developmental Changes of IGF-I mRNA Expression Level in Sheep Muscle

HUANG Zhi-guo et al (Liquor-making Biotechnology & Application Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong, Sichuan 643000)

Abstract [Objective] To detect the mRNA of muscle insulin-like growth factor I (IGF-I) in the early development of Kazak sheep and Xinjiang fine-wool sheep, so as to provide information for the research about the early growth and development of sheep. [Method] With real-time quantitative PCR, the muscle IGF-I mRNA level was separately detected in two varieties of sheep at 2, 30, 60, 90 and 120 days old peaking at 30 days old in kazak sheep and at 60 days old in xinjiang fine-wool sheep. Then the data was analyzed with SPSS software. [Result] The IGF-I mRNA of sheep muscle first increased and then decreased with ages. The IGF-I expression level of Kazak sheep had no significant difference with Xinjiang fine-wool sheep at 2 days old or 90 days old ($P > 0.05$), but it was lower than that of the latter with extremely significant difference ($P < 0.01$) from 30 to 60 days old. [Conclusion] The male Kazak sheep and Xinjiang fine-wool sheep have similar model of developmental changes of muscle IGF-I mRNA, but there are differences in expression level between these two species.

Key words Sheep; IGF-I; Expression

生长激素 (Growth hormone, GH) 位于生长轴的中心环节, 主要通过靶器官的 GHR (Growth hormone receptor, GHR) 结合发挥对动物生长发育的调控作用^[1-2]。GH 在动物体内主要有两种作用方式: (1) GH 与肝脏等靶器官上的 GHR 结合, 产生胰岛素样生长因子 (Insulin-like growth factor, IGF), 随后 IGF 以内分泌方式进入血液, 与胰岛素样生长因子结合蛋白 (Insulin-like growth factor binding protein, IGFBP) 结合后到达靶器官, 作用于胰岛素样生长因子受体 (Insulin-like growth factor receptor, IGF-R), 从而调节动物生长发育。(2) GH 直接作用于靶器官 GHR, 通过旁分泌或自分泌 IGF 直接影响细胞的代谢, 从而调节机体的生长发育^[3]。除肝脏外, 骨骼肌也是 GH 非常重要的靶器官。GH 可作用于骨骼肌 GHR, 产生旁分泌或自分泌的 IGF-I 调节肌肉的生长发育, 或直接影响细胞的代谢。因此, 肌肉中 IGF-I 的表达水平可能对调控初生动物生长发育有重要的生理作用。该实验采用实时定量 PCR 法, 以处于生长发育早期的雄性哈萨克羊和雌性新疆细毛羊为研究对象, 检测了 IGF-I 基因在肌肉

中表达情况, 旨在为绵羊的生长发育研究提供基础资料。

1 材料与与方法

1.1 供试动物与样品采集 选取新疆维吾尔自治区石河子市紫泥泉种羊场的雄性哈萨克羊 (2、30、60 和 90 日龄各 6 只) 和雌性新疆细毛羊 (2、30、60、90 和 120 日龄各 6 只), 称重后屠宰, 采取背最长肌并立即于液氮中快速冷冻, 然后转入 -70 °C 保存。

1.2 主要试剂与仪器 M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶、Ex Taq HS DNA 聚合酶和 pMD18-T Simple Vector 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; V-gene DNA 凝胶回收试剂盒和 V-gene 质粒 DNA 提取试剂盒购自杭州维特洁有限公司; 梯度 PCR 仪购自 BIO-RAD 公司; Opticon 荧光实时定量 PCR 仪购自 MJ 公司。

1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 上发表的绵羊 IGF-I mRNA (M30653) 和 GAPDH mRNA (AF030943) 序列, 用 Primer Premier 5.0 软件分别设计 IGF-I 和 GAPDH 的引物 (表 1), 由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 IGF-I 基因和 GAPDH 基因的引物参数

Table 1 Parameters of specific primers for IGF-I gene and GAPDH gene

目的基因 Target gene	引物序列 Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	产物大小 Size of product
IGF-I	P1: 5'-TATTTCAACAAGCCACG-3'	56	109 bp (32 - 220 nt)
	P2: 5'-ACATCTCCAGCCTCCTCA-3'		
GAPDH	P1: 5'-ACTTTGGCATCGTGAGG-3'	56	379 bp (364 - 742 nt)
	P2: 5'-GAAGAGTGAGTCTGCCTGTTG-3'		

基金项目 新疆生产建设兵团博士基金 (2003-02)。
作者简介 黄治国 (1978 -), 男, 四川广安人, 博士, 副教授, 从事生物技术与分子遗传学研究。* 通讯作者。
收稿日期 2009-02-27

1.4 RNA 的提取和反转录 用异硫氰酸胍 - 酚 - 氯仿一步提取法提取肌肉总 RNA, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度 (OD_{260}/OD_{280} 在 1.8~2.0 之间符合要求)。用随机

引物对总 RNA 进行反转录 (RT), 反应体系为 25 μ l, 其组成为 2 μ g 总 RNA, 1 μ g 随机引物, 0.4 mmol/L dNTP, 20 U RNase inhibitor, 200 U M-MLV 反转录酶, 5 μ l 5 \times RT buffer (250 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/L MgCl₂, 250 mmol/L KCl, 50 mmol/L DTT, 2.5 mmol/L 亚精胺)。反应程序如下: 将总 RNA、dNTP 和随机引物混合均匀, 70 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后立即于冰上冷却; 补加其他试剂, 混匀后依次于 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 95 $^{\circ}$ C 灭活 5 min, 所得产物于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 PCR 扩增与克隆测序 以反转录产物为模板, 分别 PCR 扩增 *IGF-I* 和 *GAPDH* 基因, 反应体系为 10 μ l, 其组成为: 0.5 μ l RT 产物, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 1 μ l 10 \times PCR buffer (0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.3, 0.5 mol/L KCl), 0.25 mmol/L dNTP, 1.25 mmol/L MgCl₂, 0.5 μ mol/L 上游和下游引物。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。PCR 产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染后用凝胶成像系统拍照。

1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 紫外灯下割取目的片段, 用 V-gene DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化目的片段并与 pMD18-T Simple Vector 载体连接, 转化 *E. coli* JM109。用 V-gene 质粒 DNA 提取试剂盒提取质粒, 经 PCR 鉴定阳性的重组质粒分别命名为 *IGF-I*-pMD18-T 和 *GAPDH*-pMD18-T 并送上海英骏生物技术有限公司测序。用 DNASTar 软件对测序结果进行同源性分析。

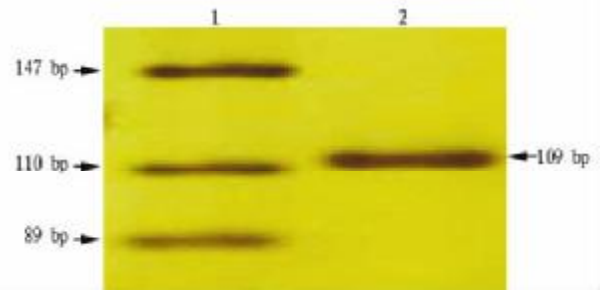
1.6 实时定量 PCR 以梯度稀释的含目的片段的质粒作为标准品, 制作标准曲线。按“1.4”中所述方法提取哈萨克羊和新疆细毛羊肌肉总 RNA 并进行反转录, 以反转录产物为模板, 分别用 *IGF-I* 和 *GAPDH* 基因的引物进行实时定量 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μ l, 其组成为 1 μ l 模板, 1 U *Ex Taq* HS DNA 聚合酶, 4 μ l 5 \times PCR Buffer, 0.3 mmol/L dNTP, 3.75 mmol/L MgCl₂, 0.5 μ mol/L 上游和下游引物, 1 μ l 20 \times SYBR Green I。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 1 min; 45 个循环 (95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s), 读板; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 进行融解曲线分析: 65~94 $^{\circ}$ C, 每隔 0.2 $^{\circ}$ C 读板 1 次 (温度恒定 1 s 后读板)。每个样品设 2 个重复, 取其平均值进行计算。

1.7 数据分析 用 SPSS 11.5 for Windows 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增与克隆测序 以雄性哈萨克羊肌肉总 RNA 为模板, 分别扩增 *IGF-I* 和 *GAPDH* 基因。PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分别获得 109 bp 和 379 bp 的目的条带 (图 1、图 2)。将 *IGF-I* 和 *GAPDH* 基因的扩增片段克隆于 pMD18-T Simple Vector, 经 PCR 鉴定, 均出现与预期大小相符的条带 (图 3、图 4)。测序结果表明: *IGF-I* 和 *GAPDH* 基因扩增片段的序列与引物设计源序列的同源性均为 100%, 进一步证实 PCR 扩增片段为特异的 *IGF-I* 和 *GAPDH* cDNA。

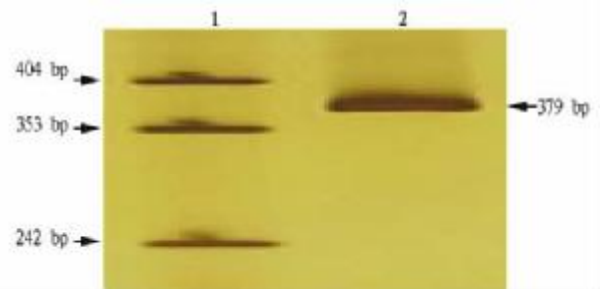
2.2 绵羊肌肉 *IGF-I* 基因表达的发育性变化 采用 Real-time PCR (图 5), 对不同日龄的雄性哈萨克羊和新疆细毛羊肌肉中 *IGF-I* mRNA 的表达进行了定量分析, 结果 (图 6) 表明: 雄性哈萨克羊和新疆细毛羊肌肉中 *IGF-I* mRNA 表达的



注: 1. pUC18 DNA/*Msp* I DNA Ladder; 2. *IGF-I* 扩增产物。
Note: 1. pUC18 DNA/*Msp* I DNA Ladder; 2. Products of *IGF-I*.

图 1 *IGF-I* 基因的 RT-PCR 电泳图

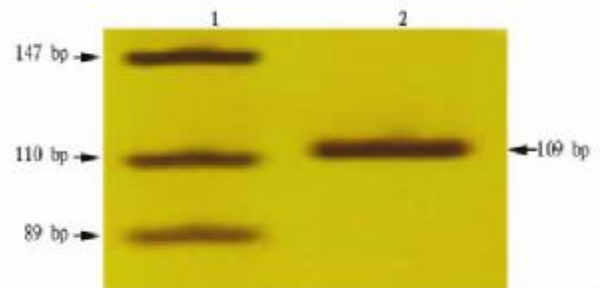
Fig. 1 Gel electrophoresis of *IGF-I* gene amplified by RT-PCR



注: 1. pUC18 DNA/*Msp* I DNA Ladder; 2. *GAPDH* 扩增产物。
Note: 1. pUC18 DNA/*Msp* I DNA Ladder; 2. Products of *GAPDH*.

图 2 *GAPDH* 基因的 RT-PCR 电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of *GAPDH* gene amplified by RT-PCR

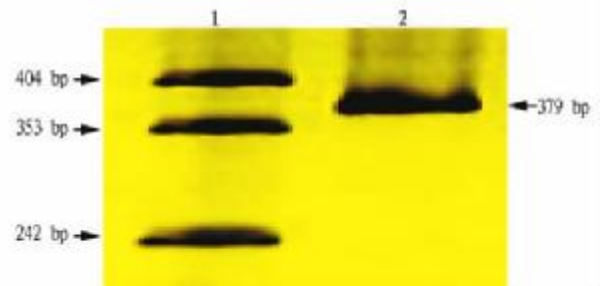


注: 1. pUC18 DNA/*Msp* I DNA Ladder; 2. *IGF-I*-pMD18-T 的 PCR 扩增产物。

Note: 1. pUC18 DNA/*Msp* I DNA Ladder; 2. PCR products of *IGF-I*-pMD18-T.

图 3 重组质粒 *IGF-I*-pMD18-T 的 PCR 鉴定电泳图

Fig. 3 Identification of *IGF-I*-pMD18-T by PCR



注: 1. pUC18 DNA/*Msp* I DNA Ladder; 2. *GAPDH*-pMD18-T 质粒扩增产物。

Note: 1. pUC18 DNA/*Msp* I DNA Ladder; 2. PCR products of *GAPDH*-pMD18-T.

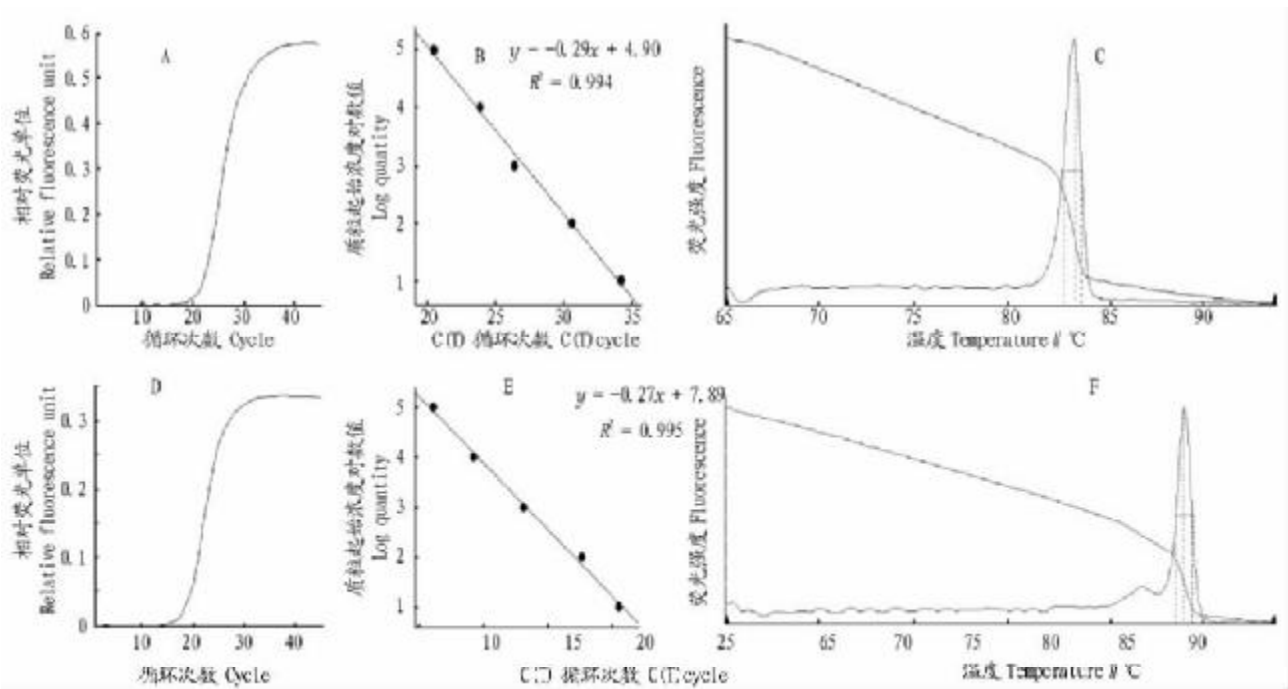
图 4 重组质粒 *GAPDH*-pMD18-T 的 PCR 鉴定电泳图

Fig. 4 Identification of *GAPDH*-pMD18-T by PCR

发育性变化模式基本相似, 都呈先升后降的趋势, 但又略有不同。其中, 哈萨克羊的表达量在 30 日龄上升到最高峰, 然后开始下降, 60 日龄后趋于水平; 新疆细毛羊的表达量从 2

~60 日龄期间持续上升,60 日龄时上升到最高峰,然后在 90 日龄时下降到最低点,在 120 日龄时又出现一个大的回升。哈萨克羊的表达量在 2 日龄和 90 日龄时与新疆细毛羊差异

不显著 ($P > 0.05$),在 30~60 日龄期间极显著低于新疆细毛羊 ($P < 0.01$)。

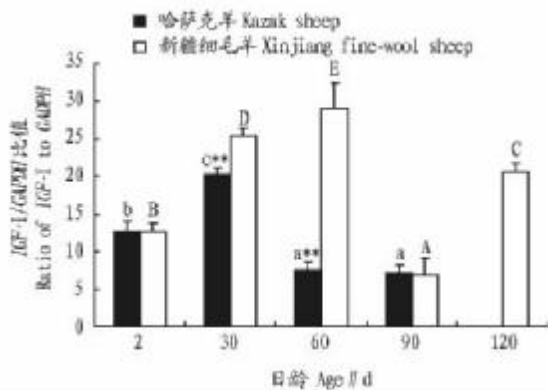


注: A、B 和 C 分别为 IGF-I 基因的扩增曲线、标准曲线和熔解曲线; D、E 和 F 分别为 GAPDH 基因的扩增曲线、标准曲线和熔解曲线。

Note: A, B and C are respectively the amplification curve, standard curve and melting curve of IGF-I gene; D, E and F are respectively the amplification curve, standard curve and melting curve of GAPDH gene.

图 5 肌肉 IGF-I 和 GAPDH 基因的扩增曲线、标准曲线和熔解曲线

Fig.5 Amplification curve, standard curve and melting curve of muscle IGF-I and GAPDH



注:小写字母表示哈萨克羊不同日龄间的差异;大写字母表示新疆细毛羊不同日龄间的差异;不含相同字母表示差异显著 ($P < 0.05$);**表示同日龄的品种间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: The lowercase letters indicate the difference of Kazak sheep at different ages; the uppercase letters indicate the difference of Xinjiang fine-wool sheep at different ages; the two without common letters are significantly different ($P < 0.05$); the double stars “**” indicate extremely significant differences of IGF-I mRNA at different ages ($P < 0.01$).

图 6 哈萨克羊和新疆细毛羊肌肉 IGF-I 基因表达的发育性变化

Fig.6 Developmental changes of muscle IGF-I mRNA expression in Kazak sheep and Xinjiang fine-wool sheep

3 讨论

已有研究表明,IGF-I 对断奶前幼年动物的生长发育起着重要作用^[4],到成年时,IGF-I 的分泌量迅速下降^[5-6],其

基因表达的发育性变化模式存在物种的差异和组织的差异。Richards 等研究表明,火鸡出壳后,肝脏和大脑的 IGF-I 基因的表达水平逐渐增长,到第 3 周开始下降^[7];Pfaffl 等研究表明刚出生小牛的肝脏和回肠 IGF-I 基因的表达量存在组织差异和个体差异^[8]。目前,对动物肌肉中 IGF-I 基因表达的报道不多。Gerrard 等研究发现猪胎儿半腱肌 IGF-I mRNA 水平从怀孕 44 天到怀孕末期随着胎龄的增加而增加,出生后进一步增加,21 日龄时最高,成年时下降^[9];胥清富观察到二花脸猪和大约克猪背最长肌 IGF-I mRNA 表达从出生到 30 日龄无明显变化,30~90 日龄显著增加,随后保持在较高水平,无明显的品种差异^[3]。

Mateescu 等研究发现,青春期陶赛特公羊的肌肉中的 IGF-I mRNA 表达水平差异显著,表明 IGF-I 基因的表达对肌肉的发育可能具有重要意义^[10]。贾斌研究发现,哈萨克羊皮肤 IGF-I mRNA 的表达在 30~90 日龄期间维持较高水平,135~255 日龄时则逐渐下降;罗米丽 (Romilly Hillys) × 中国美丽奴 (新疆军垦型) 杂交一代优质细毛羊 IGF-I mRNA 的表达随日龄增加逐渐下降,在 90 和 135 日龄时雌性显著高于雄性^[11]。刘国庆等研究表明,绵羊肝脏 IGF-I mRNA 的表达量呈先升后降的趋势,哈萨克羊在 60 日龄时出现峰值,新疆细毛羊在 90 日龄时出现峰值;哈萨克羊的表达量在 30~90 日龄期间显著高于新疆细毛羊^[12]。该研究发现,绵羊肌肉 IGF-I mRNA 的表达都呈先升后降的趋势,其中哈萨克羊

(下转第 6415 页)

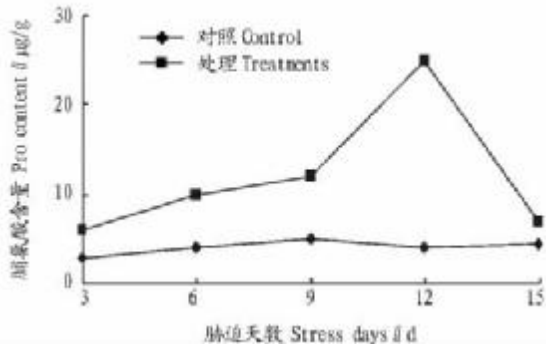


图3 盐胁迫期间脯氨酸含量的变化

Fig. 3 The Pro content change under salt stress

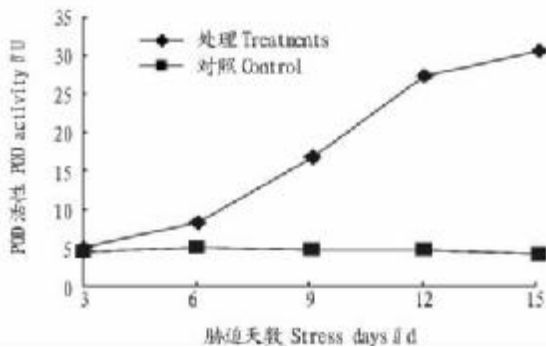


图4 盐胁迫期间POD活性变化

Fig. 4 The POD activity change under salt stress

度增加,到胁迫12 d时POD活性缓慢增加。在盐胁迫的15 d时,处理组的叶片的POD活性始终高于对照组。

3 讨论

在盐胁迫过程中,叶片受害程度呈先加深随后稳定然后又恢复的趋势,表明大穗结缕草在盐分浓度为土壤干重1.0% NaCl的胁迫下,首先表现出受害症状,到了9~12 d已经对盐胁迫有一定的适应,受害症状没有进一步加深,并且

在12~15 d有一定的恢复;叶片相对含水量是植物体内各种生理指标的综合体现,结合叶片相对含水量表现出先降低随后基本保持平稳然后又增加的趋势,这基本与叶片的在盐胁迫条件下的形态表现相吻合。可溶性总糖和脯氨酸是植物体内广泛存在的渗透调节物质,它们在大穗结缕草体内的积累,将会使细胞内的渗透调节能力增加,增加细胞的持水能力,减小盐胁迫造成的伤害;在盐胁迫过程中,POD活性的增加,有助于清除因盐胁迫而产生大量的氧自由基(活性氧),减少活性氧对植物的伤害。因此,盐胁迫条件下,大穗结缕草体内渗透调节物质(可溶性总糖和脯氨酸)的积累以及抗氧化酶POD酶活性的增加,可能是大穗结缕草抵抗盐胁迫的生理机制。

参考文献

- [1] 赵可夫,李法曾. 中国盐生植物[M]. 北京:科学出版社,1999:48-61,328-329.
- [2] KITAMURA F. Studies on the horticultural classification and development of Japanese lawn grasses [J]. Blu Kemigawa Arboretum,1970,3:1-60.
- [3] HONG K H. Studies on interspecific hybridization in Korean lawngrass (*Zoysia* spp.) [J]. J Kor Soc Hort Sci,1985,26(2):169-178.
- [4] CHOI J S, AHN B J, YANG G M. Distribution of native zoysiagrass in the south and west coastal regions of Korea and classification using morphological characteristics [J]. J Kor Soc Hort Sci,1997,38(4):339-407.
- [5] 董令善,田有凤. 胶州市结缕草资源及其开发利用的探讨[J]. 中国草地,1992(1):6-8.
- [6] 刘建秀,刘永东,贺善安,等. 中国暖季型草坪草物种多样性及其地理分布特点[J]. 草地学报,1998,6(1):45-52.
- [7] 王艳,张绵,董厚德,等. 大穗和中华结缕草的群落特征及种内分异研究[J]. 植物研究,2001,21(2):278-284.
- [8] 李亚,耿蕾,刘建秀. 中国结缕草属植物抗盐性评价[J]. 草地学报,2004,12(1):8-12.
- [9] 阮成江. 盐城滩涂草场类型及开发利用研究[J]. 水土保持学报,2002,16(5):56-59.
- [10] 周兴元,曹福亮. NaCl胁迫对几种暖季型草坪草的影响[J]. 草原与草坪,2005(4):66-69.
- [11] 李合生. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:195-260.

(上接第6377页)

的峰值出现于30日龄,新疆细毛羊的峰值出现于60日龄,而且新疆细毛羊的表达在120日龄时开始回升。这种变化模式与刘国庆等的研究^[12]相似,但肌肉IGF-I mRNA表达的峰值出现的时间比肝脏更早,表明绵羊IGF-I基因表达的发育性变化模式可能存在组织差异。该研究还发现,哈萨克羊的表达量在30~60日龄期间极显著低于新疆细毛羊,表明绵羊肌肉IGF-I mRNA的表达存在品种差异。

参考文献

- [1] ETHEBERTON T D, BAUMAN D E. Biology of Somatotropin in growth and lactation of domestic animals [J]. Physiological Reviews, 1998, 78(3):745-761.
- [2] ARGETSINGER L S, CARTER-SU C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor [J]. Physiological Reviews, 1996, 76(4):1089-1107.
- [3] 胥清富. 猪生长轴有关激素和受体基因在肝脏和肌肉上表达的发育性变化及调控[D]. 南京:南京农业大学,2002.
- [4] DICKSON M C, SAUNDERS J C, GILMOUR R S. The ovine insulin-like growth factor-I gene: characterization, expression and identification of a putative promoter [J]. J Mol Endocrinol, 1991, 6:17-31.
- [5] XIAN C J, SHOUBRIDGE C A, READ L C. Degradation of IGF-I in the a-

dult rat gastrointestinal tract is limited by a specific antiserum or the dietary protein casein [J]. J Endocrinol, 1996, 146:215-225.

- [6] RAO R K, PHILLIPS A F, WILLIAMS C S, et al. Luminal stability of insulin-like growth factors 1 and 2 in developing rat gastrointestinal tract [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1998, 26:179-185.
- [7] RICHARDS M, POCH S, CLARKE S, et al. Expression of insulin-like growth factor gene in liver and brain tissue during embryonic and post-hatch development of the turkey [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2005, 141(1):76-86.
- [8] PFAFFL M W, GEORGIEVA T M, GEORGIEV I P, et al. Real time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-I receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species [J]. Domest Anim Endocrinol, 2002, 22(2):91-102.
- [9] GERRARD D E, OKAMURA C S, RANALLETTA M A, et al. Developmental expression and location of IGF-I and IGF-II mRNA and protein in skeletal muscle [J]. J Anim Sci, 1998, 76(4):1004-1011.
- [10] MATEESCU R G, THONNEY M L. Gene expression in sexually dimorphic muscles in sheep [J]. J Anim Sci, 2002, 80(7):1879-1887.
- [11] 贾斌. 新疆绵羊微卫星遗传分析及羊毛生长的神经内分泌调控[D]. 南京:南京农业大学,2003.
- [12] 刘国庆,黄治国,刘振山,等. 羔羊肝脏IGF-I和IGF-IR基因表达的发育性变化研究[J]. 中国农业科学,2006,39(12):2577-2581.