

鸡、鹌鹑及其杂交禽胚胎肌肉发育过程中 *MSTN* 和 *p21* 基因的表达规律

梁耀伟, 赵宗胜*, 陈丹盈, 赵松华, 张 慧, 班 谦

(石河子大学动物科技学院, 石河子 832003)

摘要: 旨在研究 *MSTN* 和 *p21* 基因在鸡、鹌鹑和杂交禽胚胎肌肉发育过程中的表达规律, 比较这 2 个基因在杂交禽与亲本鸡和鹌鹑中的差异表达, 探讨 *MSTN* 和 *p21* 基因与肌肉发育的关系。通过人工受精获得鸡(♂)与鹌鹑(♀)杂交禽蛋, 与鸡蛋、鹌鹑蛋按照鸡标准孵化条件同批入孵, 采集第 7~17 天活胚胸肌组织, 应用实时荧光定量 PCR 技术检测 *MSTN* 和 *p21* 基因在 3 个物种中每一天 mRNA 的相对表达量。*MSTN* 和 *p21* 基因在胚胎肌肉发育的第 7~17 天均有表达, 这 2 个基因 mRNA 的表达在鸡胚中第 9 天到达第 1 次峰值, 在鹌鹑中第 7 天到达第 1 次峰值, 后都随胚胎的发育表达水平上升, 并维持相对稳定的高水平表达。杂交禽的表达规律与鸡一致, 也在第 9 天达到峰值, 而 *p21* mRNA 表达极显著高于鸡和鹌鹑 ($P < 0.01$)。*MSTN* mRNA 表达规律与成肌细胞退出细胞周期的时间规律一致; 在胚胎肌肉发育过程中, *MSTN* 基因特异性上调 *p21* 的表达。

关键词: 鸡; 鹌鹑; 杂交禽; 肌肉发育; *MSTN* 基因; *p21* 基因; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S83; Q953.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)06-0997-06

The Expressional Profiles of *MSTN* and *p21* during Embryonic Myogenesis in Chicken, Quail and Hybrids of Chicken-quail

LIANG Yao-wei, ZHAO Zong-sheng*, CHEN Dan-ying, ZHAO Song-hua,
ZHANG Hui, BAN Qian

(College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China)

Abstract: The purpose of this study was to analyze *MSTN* and *p21* mRNA expression profiles and differences among chicken, quail and hybrids of chicken-quail during embryonic myogenesis, and evaluate the potential relationships between their relative expression and myogenesis. The cross-bred eggs of quail (♀) were acquired by artificial insemination with chicken (♂)-semen, the eggs of chicken, quail and hybrid were hatched in one batch according to the standard condition of chicken, the breast muscle tissues was collected from day 7 to 17. The expression of *MSTN* and *p21* mRNA in different species every day was revealed by real-time quantitative PCR. The expression of *MSTN* and *p21* mRNA was detected from day 7 to 17. Peak of *MSTN* and *p21* expression was noticed at day 9 in chicken, and day 7 in quail, with the development of muscle, the expression level was rising, which was almost maintained at this level until day 17. And the peak expression was also noticed at day 9 in hybrid which was in accordance with chicken, however, the expression of *p21* mRNA in hybrid was significantly higher than that in chicken and quail ($P < 0.01$). The expression profile of *MSTN* was in accordance with the profile of the withdrawal of myoblasts from the cell cycle, and *MSTN* could up-regulated the expression of *p21* specifically during embryonic myogenesis.

收稿日期: 2011-09-21

作者简介: 梁耀伟(1986-), 男, 山西孝义人, 硕士, 主要从事动物分子遗传育种方面研究, E-mail: lyw7664@163.com

* 通讯作者: 赵宗胜, E-mail: zhaozongsh@shzu.edu.cn

Key words: chicken; quail; hybrid; myogenesis; *MSTN* gene; *p21* gene; real-time quantitative PCR

鸡(♂)和鹌鹑(♀)属间杂交是典型的远缘杂交,其后代综合了父母双亲的遗传特性。焦丽萍报道的鸡与鹌鹑属间杂交杂种优势的分析结果表明,属间杂交子一代,在生长势、肌肉性能、体型大小等方面综合了鸡属(父本)体型大且比较强壮,鹌鹑属(母本)早熟、生长快、肉质上乘的优点,而且皮肤半透明,较细薄,羽色美观^[1]。然而亲本鸡和鹌鹑与子一代杂交禽胚胎发育时间不同,鸡出壳时间是19~21 d,鹌鹑16~17 d出壳,而杂交禽为17~19 d;而且成年后体型存在明显差异,这就为研究胚胎期各个组织器官发育的调控机理提供了一个很好的模型,肌肉组织也是胚胎发育过程中最早形成的组织之一,本研究以鸡和鹌鹑的杂交种为一种新的动物模型,探讨胚胎期肌肉发育的调控机理。

肌肉生长抑制素(Myostatin, *MSTN*),又称生长/分化因子8(*GDF-8*),属于分泌蛋白转化生长因子 β (*TGF- β*)超家族,*MSTN*基因是Mcpherron等于1997年首次在小鼠骨骼肌中发现的。*MSTN*在胚胎早期的生肌节区表达,成年后该基因继续表达^[2-3],是肌肉生长的负调控因子,调控骨骼肌的生长和分化,抑制成肌细胞的增殖和分化^[4]。Castelhano-Barbosae等研究表明,在鸡胚肌肉发育过程中,*MSTN*基因的mRNA表达模式与肌纤维的形成过程紧密相连^[5]。*MSTN*是通过阻止成肌细胞从G1期到S期的细胞循环^[6],来抑制成肌细胞的增殖^[7]。细胞周期受细胞周期素(Cyclin)、细胞周期素依赖性蛋白激酶(Cdks)、细胞周期素依赖性蛋白激酶抑制因子(CKIs)的共同作用。CKIs家族中的p21抑制Cdk/cyclin复合物,是细胞周期G1期的检查站^[8-9]。体外试验显示,低浓度p21促进G1期到S期的转化;高浓度p21使细胞周期停留在G1期^[10]。黄志清等通过体外试验用C2C12成肌细胞经*MSTN*处理后共同培养于生长介质(含10% FBS)中,从细胞中提取mRNA和p21表达产物,分别进行Northern杂交分析和Western印迹分析,发现*MSTN*可特异性上调p21表达^[11-13]。

对于p21与肌肉发育关系的研究,目前主要集中于体外试验,在生物体内的报道相对较少,尤其是*MSTN*和p21共同调控肌肉的发育。本研究采用实时荧光定量PCR检测*MSTN*和p21基因在鸡、鹌鹑和杂交禽胚胎第7~17天胸肌中的表达水平,

从分子水平上探讨*MSTN*和p21基因mRNA的表达水平与肌肉发育的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取安卡红种公鸡5只,产蛋高峰期朝鲜鹌鹑200只,进行人工杂交,获得的杂交禽受精蛋、受精蛋和鹌鹑受精蛋于小型孵化机中孵化,孵化条件:温度(37.8±0.5)℃,湿度60%~70%。从入孵的第7~17天每天取样1次,每个点取6个平行样,分离出胸肌,立即放入液氮中速冻,-80℃保存,用于提取组织总RNA。

1.2 组织总RNA提取和反转录

采用Trizol一步抽提法提取总RNA。用1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性,并用核酸蛋白仪测定总RNA浓度和纯度($OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \sim 2.0$)。参照PrimeScript RT Master Mix(Perfect Real Time)反转录试剂盒说明书合成cDNA,于-20℃保存备用。

1.3 引物设计

根据GenBank上登录的鸡*MSTN*基因(A Y448007.1)、p21基因(A F513031.1)和内参 β -actin基因(NM_205518.1)序列,利用Primer premier 5.0设计引物,由北京华大基因合成。引物信息见表1。

1.4 *MSTN*、p21和 β -actin基因片段的扩增与重组质粒的构建和鉴定

采用25 μ L体系进行PCR扩增:10×Taq Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 1.3 μ L, dNTP Mixture(2.5 mmol·L⁻¹) 2.0 μ L, Taq DNA polymerase(2.5 U· μ L⁻¹) 0.5 μ L, cDNA 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol·L⁻¹)各1 μ L, ddH₂O补至25 μ L。PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;然后72℃延伸10 min;4℃保存。

PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下切取目的片段,用DNA纯化回收试剂盒回收纯化,将回收的目的基因与pGM-T载体连接,转化至DH5 α 感受态细胞,培养到含AMP的LB培养基上,挑取阳性单克隆菌落后扩大培养提取质粒,经PCR初步鉴定正确后,将重组质粒送北京华大基因测序。

表 1 基因的引物序列

Table 1 Information of primers for the genes tested

序号 No.	基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Product size	退火温度/℃ Tm
1	<i>MSTN</i>	F: ACAGTAGCGATGGCTCTTT R: CCGTTGTAGGTTTTTGGAC	207	55.0
2	<i>p21</i>	F: GAGAAGAGTTGTCCACGATAAGC R: CCATTCCAGTCCCTCCTCAGTC	253	55.0
3	<i>βactin</i>	F: CTGTGCCCATCTATGAAGGCTA R: ATTTCTCTCTCGGCTGTGGTG	139	55.0

1.5 实时荧光定量 PCR

1.5.1 标准曲线绘制 *MSTN*、*p21* 和 β -actin 重组质粒为本研究的阳性标准品,按文献方法^[14]计算重组质粒的拷贝数,然后将重组质粒 10 倍梯度稀释,制作标准曲线。

1.5.2 实时荧光定量 PCR 反应体系为 20 μ L: SYBR Premix Ex TaqTM (2 \times) 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol \cdot L⁻¹) 各 0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 补至 20 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 35 个循环。熔解曲线绘制:95 $^{\circ}$ C 1 min, 35 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 30 s。

1.5.3 数据处理与分析 根据 Pfaffl 法^[15]即双标准曲线法计算出目的基因的相对表达量,定量结果用 SPSS11.0 进行方差分析,Duncan 法进行平均值的多重比较,最后用 Excel 绘制基因的柱状表达量图。

2 结果

2.1 鸡、鹌鹑和杂交禽胸肌组织中 *MSTN* 基因的 mRNA 的表达

2.1.1 *MSTN* mRNA 水平随胚胎发育时间的表达规律 如图 1 所示,鸡胚第 7、8 天 *MSTN* mRNA 表达维持在较低水平,第 9 天极显著升高($P < 0.01$),第 10 天降到低谷,第 11~13 天,*MSTN* mRNA 表达量较前 1 d 都极显著升高($P < 0.01$),后维持相对稳定水平。鹌鹑胚胎第 7 天就有较高水平的表达,达到第 1 次峰值,第 8 天降到低谷,随后其表达量随着胚胎发育而升高,并维持相对稳定的水平。而杂交禽胚胎 *MSTN* mRNA 表达规律与鸡胚相似,第 9 天比第 7、8 天极显著升高($P < 0.01$),

第 10 天降至低谷,随后其表达量也随着胚胎发育而升高,并维持相对稳定的水平。

2.1.2 *MSTN* mRNA 表达的物种差异 第 7 天鹌鹑胚胎 *MSTN* mRNA 就有较高水平的表达,与鸡胚和杂交禽胚胎存在极显著差异($P < 0.01$),随后胚胎的发育过程中,鸡胚 *MSTN* mRNA 表达量比较低,与杂交禽胚胎和鹌鹑胚胎存在极显著差异($P < 0.01$)。在胚胎发育的后期,*MSTN* mRNA 表达量都维持相对稳定的水平。

2.2 鸡、鹌鹑和杂交禽胸肌组织中 *p21* 基因的 mRNA 的表达

2.2.1 *p21* mRNA 水平的胚胎发育时间的表达规律 如图 2 所示,鸡胚第 7、8 天 *p21* mRNA 表达较低水平较低,第 9 天极显著升高到第 1 个峰值($p < 0.01$),第 10 天极显著降低,后每一天 *p21* mRNA 表达量较前 1 d 都极显著升高($p < 0.01$),第 14、15 天达到第 2 个峰值,第 16、17 天表达水平降低。鹌鹑分别在第 7 和第 14 天到达峰值。而杂交禽也是在第 9 天到达第 1 个峰值,第 10 天表达水平降低,后又开始上升,第 15 天到达峰值,第 16、17 天表达水平也降低。

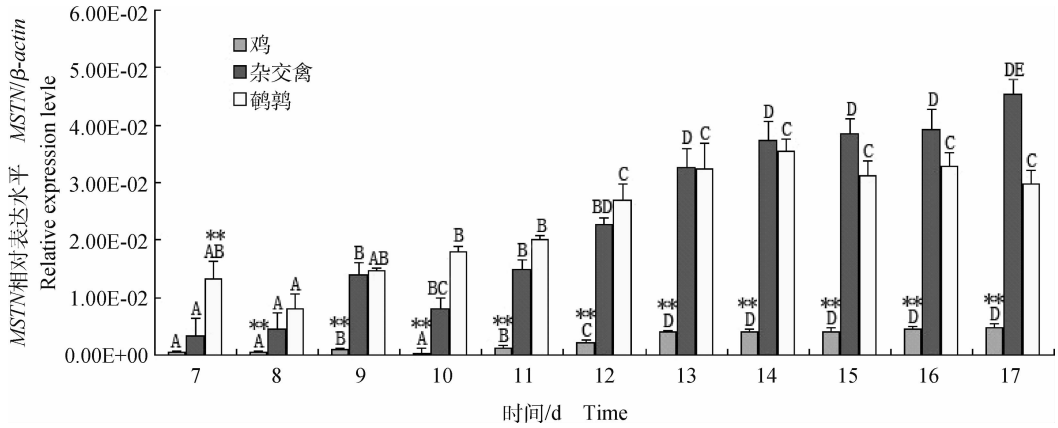
2.2.2 *p21* mRNA 水平的物种差异 在胚胎发育的第 7~17 天,杂交禽胚胎的 *p21* mRNA 表达水平极显著高于鸡胚和鹌鹑胚胎($P < 0.01$)。

3 讨论

畜禽生产的目标之一就是选择生长速度快、肌肉产量高而肉质良好的品系。骨骼肌是动物肌体最主要的组成部分,研究调控肌肉发育的机制对农业生产有重要的启示。本研究以杂交禽为一种新的动物模型,探讨 *MSTN* 和 *p21* 基因在胚胎肌肉发

育过程中的调控作用,旨在为进一步明确肌肉发育

的调控机理提供有力证据。



同一物种不同发育时期相同字母之间表示差异不显著($P>0.05$);不同字母之间代表差异极显著($P<0.01$)。

**表示同一时期不同物种间差异极显著($P<0.01$)。下同

The values of the same species at different stages with the same letter were not significantly different ($P>0.05$), and values with the different letters were significantly different at the level of 0.01. ** Indicate significant difference at the same stage of the different specieses at the level of 0.01. The same as below

图1 MSTN 基因 mRNA 在鸡、鹌鹑和杂交禽胸肌组织中不同发育时期的表达丰度

Fig. 1 The abundance of MSTN mRNA in breast muscle tissues of different stages of chicken, quail and hybrids

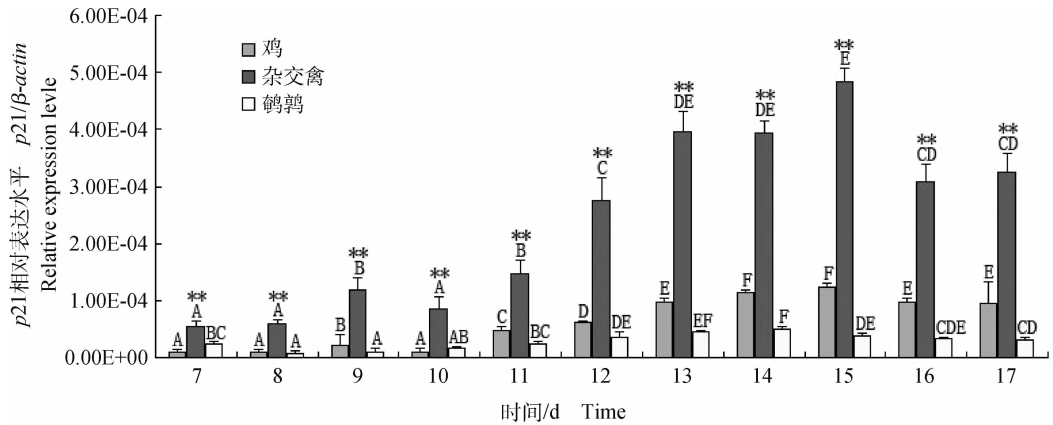


图2 p21 基因 mRNA 在鸡、鹌鹑和杂交禽胸肌组织中不同发育时期的表达丰度

Fig. 2 The abundance of p21 mRNA in breast muscle tissues of different stages of chicken, quail and hybrids

目前国内外研究 MSTN 基因功能的资料较多,主要集中于人、牛、小鼠和猪这些物种,但在整个胚胎肌肉发育过程中对 MSTN 的研究相对较少。Saxena 等以印度肉鸡为材料,发现 MSTN 在腿肌第 7 天有相对较高的表达水平,并维持相对稳定的表达水平到第 18 天^[16]。而胡兰等以大骨鸡为材料,从胚胎发育第 14 天开始检测 MSTN 的表达量,发现在第 14 天出现峰值,到出壳前该基因的表达量下降到最低值,出壳后其表达量逐渐上升到相对较高的水平,但始终低于出壳前的表达量^[17]。本研究发现,在胚胎肌肉发育的前期,其 MSTN 的表达水平较低,到后期其表达水平都上升到相对较高的水

平,并且维持稳定的表达水平,而 Saxena 等研究结果也显示同一结果。

肌肉发育是通过成肌细胞增殖、迁移、黏附、融合为肌管,肌管进一步分化为成熟的肌纤维^[18]。O'Neill 研究发现,在胚胎肌肉发育过程中,成肌细胞退出细胞周期停止增殖集中在 2 个时期,第 1 个时期主要集中在鸡胚发育的第 7~9 天,退出细胞周期的成肌细胞从 30% 上升到 72%。在随后的 2 d,没有退出细胞周期的成肌细胞开始快速分裂增殖,建立 1 个新的成肌细胞群体^[19]。本研究结果表明,鸡胚 MSTN mRNA 表达水平在第 9 天达到第 1 次峰值,与 O'Neill 研究发现的退出细胞周期的成肌

细胞在第 9 天达到第 1 个高峰期相吻合,而 *MSTN* 是通过阻止成肌细胞从 G1 期到 S 期的细胞循环来抑制成肌细胞增殖的,*MSTN* 在成肌细胞退出细胞周期这个时期起着关键性作用。而鹌鹑 *MSTN* mRNA 表达水平在第 7 天就到达峰值,可能是由于胚胎发育早期的生长曲线本身有所不同,鹌鹑比鸡出壳早 3~4 d,肌肉发育也比鸡早,导致其 *MSTN* mRNA 表达水平比鸡提前 2 d 到达峰值。其杂交禽 *MSTN* mRNA 表达水平与鸡一样,也是第 9 天到达峰值,因此可以认为杂交禽在肌肉发育的前期更接近于父本鸡。O'Neill 还报道,成肌细胞退出细胞周期的第 2 个时期开始于第 11 天,从第 11 天的 14% 到第 13 天的 72%,并伴随着肌管的融合,O'Neill 猜测这个时期很可能是肌管产生的最主要时期^[19]。本研究发现鸡 *MSTN* mRNA 表达水平到达峰值后开始显著性降低,到第 11 天又开始显著性上升,并持续到第 13 天,随后维持相对稳定的高水平表达,这一结果也与 O'Neill 报道的成肌细胞退出细胞周期的第 2 个时期的规律一致,同样鹌鹑 *MSTN* mRNA 表达水平比鸡提前 2 d,杂交禽与鸡相似,由此猜测 *MSTN* 在肌肉发育的这个时期也起着关键性作用。本研究还发现,鸡胚 *MSTN* mRNA 表达水平极显著低于鹌鹑和杂交禽,*MSTN* 是通过阻止成肌细胞从 G1 期到 S 期的细胞循环^[6],来抑制成肌细胞的增殖,而成肌细胞退出细胞周期的同时,肌管开始大量融合,进一步分化为成熟的肌纤维^[18],在肌纤维的生成过程中,导致了肌纤维组织学特性的差异,即鸡比鹌鹑直径粗、密度小,说明 *MSTN* 不仅在肌肉发育的这个时期也起着关键性作用,而且对肌纤维组织学特性的差异也有一定的影响。

p21 是细胞周期的检查站,低浓度 *p21* 促进 G1 期到 S 期的转化;高浓度 *p21* 使细胞周期停留在 G1 期^[8-9]。本研究结果表明,鸡、鹌鹑和杂交禽 *p21* mRNA 的表达规律与 *MSTN* 相一致,黄志清等通过体外试验发现 *MSTN* 可特异性上调 *p21* 表达,与本研究结果吻合,说明在生物体内肌肉发育过程中,*MSTN* 也可以特异性上调 *p21* 的表达。然而杂交禽中 *p21* 的表达水平极显著高于鸡和鹌鹑,出现这种结果有待进一步研究,也可能是不同于鸡和鹌鹑的影响杂交禽表型的一个关键因子。

4 结 论

本研究利用实时荧光定量 PCR 技术,检测

MSTN 和 *p21* 基因在鸡、鹌鹑和杂交禽胚胎肌肉发育过程中的变化规律及其表达差异,初步证实了 *MSTN* mRNA 表达规律与成肌细胞退出细胞周期的时间规律一致,并且 *MSTN* 基因特异性上调 *p21* 的表达。而且以鸡、鹌鹑及其杂交禽为研究对象,可以为探讨肌肉发育乃至各个器官的发育的机理提供一个很好的试验模型。

参考文献:

- [1] 焦丽萍. 鸡与鹌鹑属间杂交试验及其效果分析 [D]. 新疆:石河子大学,2001.
- [2] MCPHERRON A C, LEE S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94:12457-12461.
- [3] MCPHERRON A C, LAWLER A M, LEE S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387 (6628):83-89.
- [4] LEE S J, MCPHERRON A C. Myostatin and the control of skeletal muscle mass [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9(5):604-607.
- [5] CASTELHANO-BARBOSA E C, GABRIEL J E, ALVARES L E, et al. Temporal and spatial expression of the myostatin gene during chicken embryo development [J]. *Growth Dev Aging*, 2005, 69:3-12.
- [6] THOMAS M, LANGLEY B, BERRY C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:40235-40243.
- [7] BASS J, OLDHAM J, SHARMA M, et al. Growth factors controlling muscle development [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 1999, 17:191-197.
- [8] HARPER J W, ADAMI G, WEI N, et al. The p21 kd Cdk interacting protein Cipl is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases [J]. *Cell*, 1993, 75:805-816.
- [9] XIONG Y, HANNON G, ZHANG H, et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases [J]. *Nature*, 1993b, 366:701-704.
- [10] 张春林. 细胞周期调控基因 *p21*^{WAF1} 与肿瘤 [J]. 肿瘤研究与临床, 2002, 14(2):141-143.
- [11] 黄志清. Myostatin 负调控成肌细胞增殖和分化的信号转导机制研究 [D]. 雅安:四川农业大学, 2008.
- [12] SHEN C J, ROBERTS J M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression [J]. *Genes Dev*, 1999, 13:1501-1512.
- [13] NEVINS J R. E2F: a link between the Rb tuMor sup-

- pressor protein and viral oncoproteins [J]. *Science*, 1992, 258:424-429.
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [15] CHINI V, FOKA A, DIMITRACOPOULOS G, et al. Absolute and relative real-time PCR in the quantification of *tst* gene expression among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation by two mathematical models [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 45(5):479-484.
- [16] SAXENA V K, SUNDARESAN N R, MALIK F. Temporal expression of transforming growth factor- $\beta 2$ and myostatin mRNA during embryonic myogenesis in Indian broilers [J]. *Res Vet Sci*, 2007, 82:50-53.
- [17] 胡 兰, 郭东新, 胡 锐, 等. 大骨鸡中 *MSTN* 基因表达规律性的研究 [J]. *动物科技*, 2003, 20(11):42-44.
- [18] SWARTZ D R, LIM S S, FASEEL T, et al. Mechanisms of myofibril assembly [J]. *Proc Recip Meat Conf*, 1994, 47:141-153.
- [19] O'NEILL J. Growth and differentiation during myogenesis in the chick embryo [J]. *Dev Biol*, 1987, 120:465-540.

(编辑 郭云雁)