

胰岛素样生长因子系统基因在不同鸭种发育早期肝和肌肉中的表达

束婧婷^{1#}, 朱文奇^{2#}, 单艳菊¹, 陈文峰², 徐文娟¹, 胡艳¹, 宋迟¹, 李慧芳^{1*}, 王金玉²

(1. 江苏省家禽科学研究所, 扬州 225003; 2. 扬州大学动物科技学院, 扬州 225009;

3. 江苏腾达源农牧有限公司, 姜堰 225538)

摘要: 本研究选择生长速度不同的高邮鸭和金定鸭为试验模型, 首次对不同品种鸭胚胎期和出雏早期肌肉和肝中胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factors, IGFs)系统基因的表达及其与体重等指标进行了相关性研究。采用实时荧光定量 PCR 方法研究鸭 13、17、21、25、27 胚龄和出雏后 7 日龄 *IGF-I*、*IGF-IR* 和 *IGFBP-3* 基因表达的发育性变化。结果首次证实鸭肌肉和肝 *IGF-I*、*IGF-IR* 和 *IGFBP-3* 在 13 胚龄已有表达, 并表现出显著的品种和时间特异性。2 品种肝中 *IGF-I* 的表达量在整个胚胎期均维持在极低的水平, 出雏后显著上升; 而肌肉中 *IGF-I* 的表达量要显著地高于肝。*IGF-IR* 基因在肝中表达量高于肌肉组织, 同时在肌肉中表达模式存在品种差异。*IGFBP-3* 在 2 品种肝中的表达量相对较低, 在胸肌中的表达量从胚胎发育末期至出雏早期均表现出上升趋势。*IGF-I* 与 *IGF-IR*、*IGFBP-3* 基因表达水平之间存在负相关关系, 而 *IGFBP-3* 基因与 *IGF-IR* 基因表达水平之间存在极显著的正相关;*IGFs* 系统基因与体重、肝重和胸肌重之间呈现不同程度的线性相关。上述结果首次揭示了鸭胚胎期和出雏早期生长发育过程中 *IGFs* 系统基因表达的发育性变化模式和品种差异, 同时也为深入研究 *IGFs* 系统基因的相互调控机制提供了基础数据。

关键词: 鸭; 早期发育; 基因表达; *IGF-I*; *IGF-IR*; *IGFBP-3*

中图分类号: S834.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)02-0183-08

Expression of Insulin-like Growth Factor System Genes in Liver and Breast Muscle Tissue during Early Development of Different Duck Breeds

SHU Jing-ting^{1#}, ZHU Wen-qi^{2#}, SHAN Yan-ju¹, CHEN Wen-feng²,
XU Wen-juan¹, HU Yan¹, SONG Chi¹, LI Hui-fang^{1*}, WANG Jin-yu²

(1. Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225003, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 3. Jiangsu Tengdayuang Co. Ltd, Jiangyan 225538, China)

Abstract: In the present study, expression of *IGF-I*, IGF type-I receptor (*IGF-IR*), and IGF binding protein (*IGFBP*)-3 genes was quantified by RT-PCR in the liver and muscle tissues on days 13, 17, 21, 25, 27 of embryonic development, as well as at 7 days post-hatching (pH) in Gaoyou and Jinding ducks differing in growth rates. The results showed that *IGF-I*, *IGF-IR* and *IGFBP3* mRNA could be detected as early as on E 13 d in ducks, and showed an extremely significant breed and development differential diathesis. The expression level of *IGF-I* was very low throughout embryonic development before increasing dramatically by E 27 d and 7 days pH in both duck breeds. In contrast, *IGF-I* was expressed in muscle at much higher levels than liver throughout

收稿日期: 2013-07-08

基金项目: 国家自然科学基金(31172194); 国家农业科技成果转化项目(2012GB2C100156); 江苏省科技支撑计划项目(BE2011329); 现代农业品种创新项目(CX(11)1030)

作者简介: 束婧婷(1980-), 女, 江苏泗阳人, 博士, 副研究员, 主要从事家禽分子育种研究, Tel: 0514-85599179, E-mail: shujingting@163.com;

朱文奇(1981-), 男, 江苏苏州人, 博士生, 助理研究员, 主要从事家禽遗传育种研究, E-mail: zwqjs@163.com, # 为并列第一作者

* 通信作者: 李慧芳, 博士, 研究员, 主要从事家禽遗传育种研究, Tel: 0514-85599266, E-mail: feixiong@yzu.edu.cn

development. Expression of liver *IGF-IR* was higher than that in muscle, and differed between breeds in breast muscle. *IGFBP-3* mRNA expression in liver was relatively low in both duck breeds, while in breast muscle increased gradually from the late of the embryonic period to the early post-hatching. Inverse relationships were observed for the expression of *IGF-I* and *IGF-IR*, and *IGF-I* and *IGFBP-3*, while positive relationship was observed for the expression of *IGF-IR* and *IGFBP-3*, meanwhile varying degrees of linear correlation was found between insulin-like growth factor system genes mRNA expression and body weight, liver weight and breast weight in duck. The data indicates differential expression of selected genes that comprise the IGF system in the duck liver tissue during embryonic and early pH growth and development, and provide some data for further study on the mutual regulation mechanism of genes in IGFs system.

Key words: duck; development; gene expression; *IGF-I*; *IGF-IR*; *IGFBP-3*

中国是世界上最大的水禽生产国和消费国,其中,鸭的存栏量、出栏量以及鸭肉产量、鸭蛋产量等均居世界首位^[1-2]。鸭肉以其脂肪含量低、不饱和脂肪酸含量多等优点正越来越受到人们的青睐,出现供不应求的局面。目前我国肉鸭生产中面临的关键问题:如何在保持品种特色和肉质风味的同时,最大程度发挥骨骼肌的生长能力,培育出优质高品种和品系以满足国内外市场需求。因此,了解鸭生长发育的规律和实现对鸭生长发育的调控逐渐成为家禽育种学家研究的热点。

已有的研究证实,胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factors, IGFs)系统对胚胎、神经、骨骼肌和骨骼的发育、细胞增殖和转化等具有极其重要的作用^[3-4]。肌肉的生长发育与 IGFs 系统基因的时空特异性表达密切相关^[5-6]。IGFs 是介导生长激素(Growth hormone, GH)生物学功能,调控动物生长发育的重要因子,IGF 对肌肉有很强的合成代谢效应,能抑制蛋白质分解,增加氨基酸的摄取和细胞增生,是合成代谢的直接效应物质,已发现的 IGFs 有 2 种,即 *IGF-I* (Insulin-like growth factor-I) 和 *IGF-II* (Insulin-like growth factor-II), *IGF-I* 对动物胚胎以及出生后的生长发育有重要作用,肝脏是产生 *IGF-I* 的主要场所,但许多组织细胞均可产生 *IGF-I* 和 *IGF-II*, 从而发挥自分泌、旁分泌作用^[7]。IGF 生物学功能的发挥是通过与 IGFs 受体(Insulin-like growth factor receptor, IGF-R)结合而实现的^[8-9]。IGFs 在细胞膜上有 I 型(*IGF-IR*)和 II 型(*IGF-IIR*) 2 类糖蛋白受体, *IGF-IR* 与 *IGF-I* 亲和力最大, *IGF-I* 促进细胞生长的长期效应主要是通过 *IGF-IR* 介导的^[10-12]。血液中游离的 IGFs 较少(约占 1%), 97% 以上的 IGFs 与 6 种 IGFs 结

合蛋白(Insulin-like growth factor binding protein, IGFBP 1~6) 结合成复合物,作为 IGFs 的短期贮存库,延长 IGFs 的半衰期,并调节 IGFs 的活性,其中 *IGFBP3* 是最主要的 IGFs 结合蛋白^[13-14]。

IGFs 系统基因在哺乳动物不同发育时期及不同组织中的发育表达模式的研究较为系统^[15-16],而在禽类上关于其发育表达模式的研究还相对较少。在鸭上仅有 *IGF-I* 基因的序列报道(GenBank 登录号:EU031044)。本课题组克隆了鸭 *IGF-IR* 基因的部分序列,并对其在胚胎期和出雏早期高邮鸭胸肌组织中的表达进行了前期研究^[17],但不同品种鸭肝及肌肉中 IGFs 系统基因表达的发育变化模式还有待进一步探讨。

动物的胚胎期是动物生长发育的第 1 个关键阶段,受到遗传物质基础和母源营养环境的共同选择,最终决定子代早期生长发育乃至成年期的表型。高邮鸭(成年平均体重为 2.48 kg)和金定鸭(成年平均体重为 1.54 kg)是我国 2 个重要的地方鸭品种^[18], 2 个品种在生长发育相关性状上存在明显表型差异,是研究肌肉生长发育的理想动物模型。本研究以高邮鸭和金定鸭为研究对象,采用实时荧光绝对定量分析技术,对鸭胚胎中后期和出雏早期 IGFs 系统基因 *IGF-I*、*IGF-IR* 和 *IGFBP-3* mRNA 在肝和胸肌组织中表达的品种、性别和时间特异性进行了分析,并结合体重等发育指标进行相关性分析,为研究 IGFs 系统基因表达的调控机制及中国地方鸭品种资源的合理利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

种蛋来源于江苏高邮鸭集团在相同的日粮水平

下饲养的同日龄高邮鸭(Gaoyou duck, Gaoyou)和金定鸭(Jinding duck, Jinding)种鸭群。种蛋孵化前,进行称重、消毒和编号,品种内蛋重变异系数在2%以内。2个品种种蛋随机置入同一孵化箱,在相同条件下(37.5~37.8℃,相对湿度为50%~70%),同时孵化。孵化后,雏鸭饲喂相同饲料至7日龄。种蛋入孵后的24 h设定为1胚龄,分别于6个时间点(13、17、21、25、27胚龄和出雏后7日龄)采样,胚胎期种蛋用解剖刀刀柄敲碎钝端蛋壳,以无菌镊子移去蛋壳,换一无菌镊子轻夹胚胎颈部取出鸭胚放置准备好的吸水纸上,然后移至称量纸记录胚重(或体重)。肝和胸大肌称重后装管,置于液氮速冻,然后转到-75℃冰箱保存待用。每个时间点每个品种采集16只,公母各半。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

肝和胸大肌总 RNA 提取按 TRNzol-A⁺ 总 RNA 提取试剂(DP421)的说明书进行。RNA 样品经 1.4% 琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳和紫外分光光度计检测,保证 RNA 样品质量可靠,计算样品总 RNA 浓度。取 2 μg 总 RNA, cDNA 第 1 链的合成按照反转录试剂盒(QuantScript RT Kit, KR103-

04)的使用说明书进行,用内参基因 $\beta actin$ 检测 cDNA 合成质量以及是否有基因组 DNA 污染。反转录(RT)产物保存在-20℃,用于 PCR 检测。

1.3 引物设计、目的片段标准品的制备

由于鸡和哺乳动物 IGFBP3 基因核苷酸和氨基酸序列的同源性很低,所以仅根据鸡的 IGFBP-3 基因序列(GenBank 登录号:NM_001101034)设计引物;根据鸭 IGF-I 基因序列(GenBank 登录号:EU031044)设计引物;根据课题组前期克隆的 IGF-IR 基因相关序列设计引物,由上海英骏生物工程有限公司合成。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶鉴定后,用 DNA 产物纯化回收试剂盒纯化回收目的片段,与 pGM-T 载体相连接,然后转化 *E. coli* TOP10 感受态细胞,挑取转化子于含氨苄抗性的 LB 液体培养基中,37℃,200 r·min⁻¹ 振荡培养过夜,用 PCR 鉴定。将鉴定正确的质粒送交上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定,所获序列结果在 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站中用 Blast 程序与 GenBank 数据库中公布的已知基因进行序列同源性比较。比对正确后,用质粒小提试剂盒提取阳性克隆的质粒,用分光光度计测其浓度后作为标准品备用。

表 1 用于定量分析的 IGFs 系统基因的引物序列

Table 1 Gene-specific primers employed for analysis of duck IGF system genes by quantitative RT-PCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物长度/bp Product size	退火温度/℃ Annealing temperature
IGF-I	CTGGTTGATGCTCTTCAGTTCGTAT GCAGACTTAGGTGGCTTTATTGGA	182	60
IGF-IR	TTCAGGAACCAAAGGGCGACA CAACATCAACCATATTCCAGCTATTG	270	55
IGFBP-3	ATGGTCCCTGTCGTAGAG ATCCAGGAAGCGTTGT	195	60

1.4 荧光实时定量 PCR

所用荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 法,将每个待测样品 RT 产物取等体积混合,用混合样(cDNA mix)进行反应条件的优化,包括目的基因和内参基因引物设计和合成、最佳退火温度、引物浓度、模板浓度,确定好最佳反应条件。将上述经测序验证后正确的含目的基因的标准质粒,做 10ⁿ 梯度稀释。将梯度稀释的标准品和待测样品同时进行定量 PCR,每次反应均设阴性对照,每个样品设置 3 个重复。根据标准品构建的标准曲线(标准曲线由

系统软件自动分析获得)计算出待测样品目的基因的拷贝数。

1.5 统计分析

运用 SPSS 软件(IBM SPSS Statistics 20)中 ANOVA 统计,其中性别、品种和日龄间总体差异用双因子分析,同一性别或品种不同日龄间比较,同一日龄不同性别或品种间比较用 LSD Test 确定差异显著性;Bivariate Correlation 用来分析体重、组织重和基因表达之间相关性。所有数据以“Mean±SE”表示, $P < 0.05$,表示差异显著; $P < 0.01$,表示

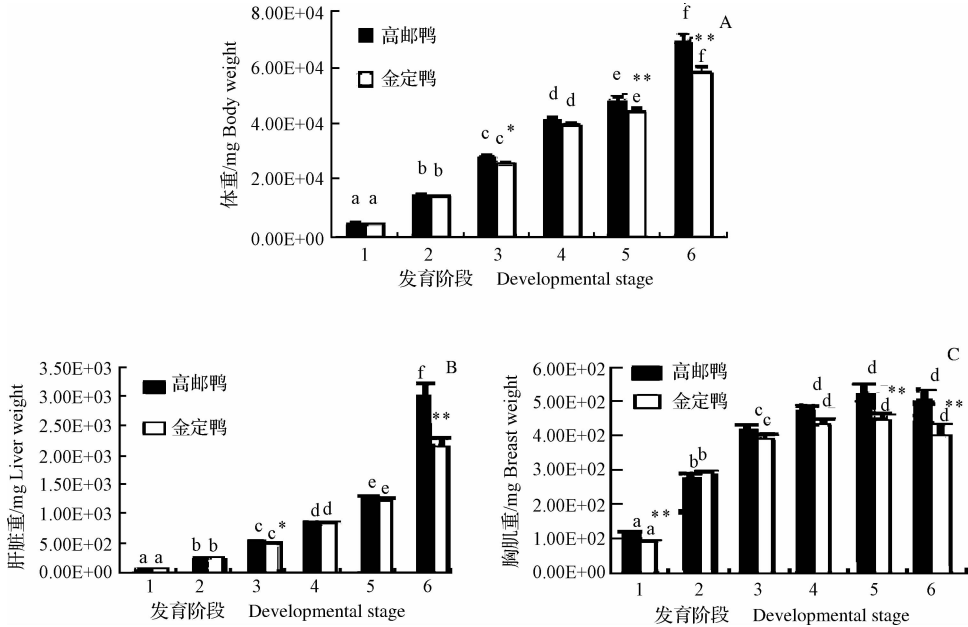
差异极显著。

2 结果与分析

2.1 鸭早期发育过程中体重、肝和胸肌的发育性变化

鸭早期发育过程中体重的变化如图 1A 所示, 2 个品种体重均呈持续上升态势, 在所研究的 6 个发育阶段, 高邮鸭胚重(体重)均高于金定鸭, 且在 21、

27 胚龄和 7 日龄时达到显著水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。2 个品种肝重如图 1B 所示, 2 个品种肝重随体重的增长均呈持续上升态势, 高邮鸭的肝重在 21 胚龄和 7 日龄时显著高于金定鸭($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 2 个品种胸肌重如图 1C 所示, 2 个品种胸肌重随体重的增长呈上升态势, 至出雏前(27 胚龄)达到最大, 出雏后有所降低, 高邮鸭的胸肌重在 27 胚龄和 7 日龄时极显著高于金定鸭($P < 0.01$)。



A. 不同品种鸭在发育早期的体重变化; B. 不同品种鸭在发育早期的肝重变化; C. 不同品种鸭在发育早期的胸肌重变化。eday. 胚龄, day. 日龄; *. 同一胚龄的不同品种间差异极显著($P < 0.05$), ** . 同一胚龄的不同品种间差异极显著($P < 0.01$), 柱形图上字母不同者表示差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), $n = 12 \sim 16$ 。1. 13 胚龄; 2. 17 胚龄; 3. 21 胚龄; 4. 25 胚龄; 5. 27 胚龄; 6. 7 日龄

A. Body weight; B. Liver weight; C. Breast weight. eday. Indicates embryonic days, and day indicates neonatal age. *. Indicates significantly different between Gaoyou ducks and Jinding ducks in the same age at the level of 0.05; superscript ** indicates significantly different between Gaoyou ducks and Jinding ducks in the same age at the level of 0.01. Bar diagram values with the same letter are not significantly different between different age ($P > 0.05$), and values with the different letters are significantly different between different embryo ages ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), $n = 12 \sim 16$. 1. 13 eday; 2. 17 eday; 3. 21 eday; 4. 25 eday; 5. 27 eday; 6. 7 d

图 1 鸭早期发育过程中体重、肝重和胸肌重的变化

Fig. 1 The profiles of body weight, liver weight and breast weight during early development in ducks

2.2 IGF-I 基因在不同鸭种胚胎期和出雏早期肝和胸肌中的表达

多因素方差分析结果发现, IGFs 系统基因在 2 个品种不同胚龄的表达量在性别间的差异均不显著, 故分析时将公母联合在一起进行表达量差异分析, 结果见表 2。在肝中, IGF-I mRNA 的表达存在显著的胚龄效应和品种效应。总体上, IGF-I 基因在 2 个品种中的表达量变化趋势较为一致, 在所研究的发育阶段均能检测到其表达, 但在 25 胚龄前表达量均很低,

到出雏前(27 胚龄)和 7 日龄显著增加。13、21 胚龄和 7 日龄的表达量在品种间差异极显著($P < 0.01$), 7 日龄高邮鸭肝 IGF-I 的拷贝数近似于金定鸭的 2 倍。17、25 和 27 胚龄品种间差异不显著。

在胸肌中, 2 个品种 IGF-I mRNA 的表达变化趋势较为一致, 在 13 胚龄时表达量最高, 到 17 胚龄表达量显著下降, 21 胚龄时表达量又上升, 随后持续下降, 到 27 胚龄降至最低, 出雏后表达量又略有上升。品种间比较发现, 除 27 胚龄外, IGF-I mRNA

NA 在高邮鸭中的表达量都高于金定鸭,且在 17 胚龄时达到显著水平($P<0.05$)。

同时比较了高邮鸭和金定鸭不同组织中 IGF-I 基因的表达量,发现 2 品种胸肌中 IGF-I 基因各阶段的表达量均远远高于肝组织,且肝和肌肉中的表达量变化规律截然相反,说明 IGF-I 基因表达存在组织差异。

2.3 IGF-IR 基因在不同鸭种胚胎期和出雏早期肝和胸肌中的表达

鸭早期发育过程中肝和肌肉中 IGF-IR mRNA 的表达见表 2。在肝中,2 品种鸭的 IGF-IR 基因表

现出相似的表达模式,从 13 胚龄开始持续显著上升($P<0.05$),至 21 胚龄达最高,然后直至 27 胚龄均显著下降($P<0.05$),出雏后又略有下降,但与出雏前(27 胚龄)相比差异不显著($P>0.05$)。同时品种间比较发现,在生长发育早期,金定鸭肝中 IGF-IR mRNA 表达量均高于高邮鸭,且在 27 胚龄时达到显著水平($P<0.05$)。在胸肌中,2 品种鸭的 IGF-IR 基因也表现出相似的表达模式,在 13 胚龄时表达量较高,在 21 胚龄时达到最高,随后下降并维持在相对较低的水平,出雏后表达量略有上升,13 和 21 胚龄的表达量显著高于 17、25、27 胚龄和 7 日

表 2 高邮鸭和金定鸭不同发育时期肝和胸肌中基因 IGF-I、IGF-IR($\times 10^5$)和 IGFBP-3($\times 10^3$) mRNA 表达量

Table 2 IGF-I, IGF-IR($\times 10^5$) and IGFBP-3($\times 10^3$) mRNA expression level in liver and breast muscle of Jinding duck and Gaoyou duck at different developmental stages

基因 Gene	组织 Tissue	品种 Breed	13 胚龄 13 eday	17 胚龄 17 eday	21 胚龄 21 eday	25 胚龄 25 eday	27 胚龄 27 eday	7 日龄 7 day
IGF-I ($\times 10^5$)	Liver	高邮鸭 Gaoyou	46.02±	38.41±	246.23±	220.22±	1 927.04±	4 320.31±
		金定鸭 Jinding	4.74 ^{a*}	6.40 ^a	50.21 ^b	33.00 ^b	428.30 ^c	479.09 ^{d**}
	Breast muscle	高邮鸭 Gaoyou	22.45±	39.82±	188.86±	251.87±	1 774.37±	2 335.09±
		金定鸭 Jinding	2.57 ^a	9.54 ^a	38.91 ^b	60.19 ^b	309.34 ^c	222.77 ^d
		高邮鸭 Gaoyou	2.15±0.17 ^e	0.77±0.08 ^{bc*}	1.76±0.13 ^d	0.94±0.07 ^c	0.30±0.03 ^a	0.43±0.05 ^{ab}
		金定鸭 Jinding	1.81±0.16 ^d	0.68±0.05 ^b	1.32±0.10 ^c	0.84±0.06 ^b	0.30±0.03 ^a	0.36±0.04 ^a
IGF-IR ($\times 10^5$)	Liver	高邮鸭 Gaoyou	8.70±1.53 ^a	34.32±9.70 ^b	87.28±11.60 ^c	53.61±10.98 ^b	6.24±1.65 ^{a*}	5.72±1.50 ^a
		金定鸭 Jinding	10.38±	47.32±	108.62±	56.05±	11.11±	9.27±
	Breast muscle	高邮鸭 Gaoyou	1.17 ^a	21.58 ^b	18.18 ^c	9.29 ^b	1.99 ^a	1.93 ^a
		金定鸭 Jinding	7.95±0.58 ^b	2.65±0.51 ^a	7.08±1.07 ^b	2.75±0.27 ^a	1.87±0.28 ^a	2.90±0.39 ^a
		高邮鸭 Gaoyou	7.90±0.58 ^b	3.31±0.60 ^a	8.78±0.97 ^b	2.50±0.32 ^a	2.42±0.35 ^a	4.10±0.56 ^a
		金定鸭 Jinding	0.26±0.05 ^a	0.90±0.13 ^b	3.71±0.60 ^c	9.35±2.13 ^d	0.91±0.17 ^{b*}	2.26±0.71 ^{b*}
IGFBP-3 ($\times 10^3$)	Liver	高邮鸭 Gaoyou	0.36±0.07 ^a	0.89±0.14 ^b	4.22±0.63 ^c	8.17±1.24 ^c	1.73±0.28 ^c	3.70±0.84 ^c
		金定鸭 Jinding	10.47±	3.37±	10.62±	5.69±	12.29±	15.59±
	Breast muscle	高邮鸭 Gaoyou	1.38 ^{c*}	0.43 ^a	1.39 ^{cd}	0.86 ^b	2.03 ^c	2.27 ^c
		金定鸭 Jinding	16.01±2.61 ^b	4.02±0.68 ^a	12.25±1.37 ^b	5.08±0.65 ^a	13.78±1.50 ^b	18.43±2.30 ^b

同一品种不同胚龄或日龄间比较,字母不同表示差异显著($P<0.05$);同一组织相同胚龄不同品种间比较,* . 差异显著($P<0.05$),** . 差异极显著($P<0.01$)

In the same breed, values with different lower case letter are significantly different ($P<0.05$) between different embryo age; in the same embryo age; * . Indicates there is significantly different between breeds in the same tissue ($P<0.05$); ** . Indicates there is extremely significantly different ($P<0.01$)

龄($P < 0.05$)其余各胚龄间差异均不显著($P > 0.05$)。胸肌中 *IGF-IR* mRNA 表达量在品种间差异均不显著,金定鸭除 13 和 25 胚龄略低于高邮鸭外,其它阶段高于高邮鸭。

比较不同组织间 *IGF-IR* 基因表达变化发现,2 品种各阶段肝中 *IGF-IR* 基因的表达量均高于肌肉组织。金定鸭肝和肌肉中 *IGF-IR* 的表达高峰均出现在 21 胚龄,高邮鸭肝中也是 21 胚龄时表达量最高,而肌肉中则是 13 胚龄时表达量最高。

2.4 *IGFBP-3* 基因在不同鸭种胚胎期和出雏早期肝和胸肌中的表达

鸭早期发育过程中肝和肌肉中 *IGFBP-3* mRNA 的表达见表 2。*IGFBP-3* 基因在所检测的肝和胸肌组织不同发育时段都表达,并且在 2 个品种中的表达量变化趋势较为一致。在胚胎期和出雏早期肝脏中的表达量相对较低,13 胚龄时表达量最低,然后持续上升,从 17 胚龄开始显著上升($P < 0.05$),表达量高峰出现在 25 胚龄,然后在出雏前(27 胚龄)迅速下降($P < 0.05$),出雏后又略有上升。除 25 胚龄外,金定鸭 *IGFBP-3* 基因的表达量均高于高邮鸭,并且在 27 胚龄和 7 日龄达到显著水平($P < 0.05$)。胸肌中 *IGFBP-3* 基因在 2 品种鸭中也表现出相似的表达规律,从胚胎发育末期至出雏早期均表现出上升趋势,并达到了显著水平($P < 0.05$)。除 25 胚龄外,金定鸭

IGFBP-3 mRNA 表达量均高于高邮鸭,且在 13 胚龄时达到显著水平($P < 0.05$)。

比较不同组织间 *IGFBP-3* 基因表达变化发现,2 品种鸭各阶段肌肉中 *IGFBP-3* 基因的表达量均高于肝组织,表达变化规律存在组织差异,在肝的表达高峰均出现在 25 胚龄,而在胸肌中的表达高峰则出现在出雏后 7 日龄。

2.5 肝 IGFs 系统基因之间及其与组织重量的关联分析

据 P. A. Weller 等^[19]研究,肝中产生的内源 *IGF-I* 对调节肌肉的生成起重要作用。故本研究同时分析肝组织 IGFs 系统基因表达之间的关系及其对体重、肝重和胸肌重的影响。结果见表 3。2 个品种中均表现出 *IGF-I* 基因与 *IGF-IR* 基因表达水平之间存在极显著的负相关($P < 0.01$),与 *IGFBP-3* 基因表达水平之间也存在负相关关系,但未达到显著水平($P > 0.05$);而 *IGFBP-3* 基因与 *IGF-IR* 基因表达水平之间存在极显著的正相关($P < 0.01$)。2 品种中,*IGF-I* 基因表达水平与胚重、肝重和胸肌重均呈正相关,除与高邮鸭胸肌重未达到显著外,其他均达到了极显著水平($P < 0.01$)。而 *IGF-IR* 基因表达与胚重和肝重之间呈负相关,与胸肌重却存在正相关。*IGFBP-3* 基因的表达水平与胚重、肝重和胸肌重之间均呈正相关,且在金定鸭中达到了显著水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 *IGFs* 系统基因之间及其与胚重、肝重及胸肌重的相关性

Table 3 Correlation between *IGFs* genes and body weight, liver weight and breast muscle weight

品种 Breed	基因 Gene	胚重 BW	肝重 LW	胸肌重 BMW	<i>IGF-IR</i>	<i>IGFBP-3</i>
高邮鸭 Gaoyou	<i>IGF-I</i>	0.687**	0.730**	0.195	-0.312**	-0.057
	<i>IGF-IR</i>	-0.143	-0.254**	0.365**	1	0.304**
	<i>IGFBP-3</i>	0.143	0.006	0.125		1
金定鸭 Jinding	<i>IGF-I</i>	0.660**	0.772**	0.365**	-0.296**	-0.038
	<i>IGF-IR</i>	-0.107	-0.206**	0.152	1	0.327**
	<i>IGFBP-3</i>	0.363**	0.198*	0.396**		1

*, 显著相关($0.01 < P < 0.05$); **, 极显著相关($P < 0.01$)

*, There are significant relationship between two different index ($0.01 < P < 0.05$); **, That there are extreme significant relationship between two different index ($P < 0.01$)

3 讨论

本研究选用高邮鸭和金定鸭作为研究鸭肌肉生长发育的试验模型,发现鸭胚体重和肝重呈持续增长态势,这与景栋林等测定的仙湖肉鸭胚胎期的发育变化基本相符^[20],说明不同品种鸭生命早期的体重发育模式基本一致。而胸肌重在出雏前表现为持续增长,而出雏后略有下降,这也与 W. Chen 等^[21]

的报道相一致,推测为了适应初生后环境,在鸭胚胎发育后期至新生期,胸肌组织存在先萎缩后肥大的发育性转变。本试验发现鸭早期发育过程中体重、肝重和胸肌重变化呈现显著的品种和时间特异性,而且受到品种和日龄交互作用的极显著影响,高邮鸭体重和组织重的增长在发育早期已经远远超过金定鸭,说明由于遗传背景的差异,禽类不同的种属和品种胚胎的生长发育会呈现出一定的差异。

胚胎是动物个体发育的特殊阶段,一些生长因子和激素家族协调控制动物胚胎生长发育,其中 IGFs 的作用成为近年来关注的焦点,在体和离体研究表明胚胎的许多组织表达 IGFs,IGFs 对细胞增殖和分化产生重要影响,敲除 IGF 系统基因严重损害了胚胎生长^[22],因此人们确信 IGFs 在胚胎期较之生后期具有更重要的作用。其中 IGF-I 对禽类胚胎分化、发育及孵化后都具有重要的调节作用。本研究首次分析不同品种鸭胚胎期和出雏早期肝和胸肌中 IGF-I mRNA 的表达规律,发现该基因在 13 胚龄即有表达,与鸡上的研究结果有悖。K. Kikuchi 等^[23]在研究 IGF-I 在鸡的生长发育中表达模式时发现,17 和 20 胚龄时可以在鸡胚的眼睛、骨骼肌和脑组织中检测到 IGF-I mRNA 的表达,而在整个胚胎期都未检测到肝和心组织中 IGF-I mRNA 的表达,同时认为胚胎期的 IGF-I 对鸡胚的发育起一定的作用。P. F. De 等^[24]研究认为,禽类胚胎期血液中 IGF-I 的来源与出雏后的来源不同,出生后 IGF-I 的主要来源是肝组织,而在胚胎发育期间 IGF-I 主要来源于肝外组织。这些结果提示禽类胚胎期肝 IGF-I mRNA 的表达可能存在极端的种属效应,但鸭胚胎期肝源性的 IGF-I 的含量和作用尚待进一步研究。不同组织间比较发现,IGF-I 基因表达量存在组织差异,高邮鸭和金定鸭胸肌中各阶段 IGF-I 基因表达量均远远高于肝中表达量,说明鸭胚胎期 IGF-I 主要来源于肝外组织。同时品种间比较发现,IGF-I 基因在高邮鸭中的表达水平要高于金定鸭,这与 2 品种鸭在体重上存在差异的事实相符合,说明 IGF-I mRNA 有可能是造成生长速度表现出品种差异的因素之一。同时,IGF-I 基因的表达水平与体重之间显著的正相关关系也说明在鸭胚胎期生长发育过程中,IGF-I 可能发挥了重要作用。

IGF-I 促进细胞生长的长期效应主要是通过 IGF-IR 介导的^[25],近来还有研究结果表明,IGF-IR 能启动最重要的 Ras 途径,Ras 是目前所知最保守的一族癌基因,对细胞生长、增殖、发育、分化及癌细胞产生有重要作用。目前对鸭 IGF-IR 基因表达的发育性变化研究也不多,本课题组克隆了该基因部分序列,并对其在肌肉中的表达进行了前期研究^[17]。本研究发现,IGF-IR 基因在肝中的表达高峰值出现在 21 胚龄,然后快速下降,这与鸡^[26]和火鸡^[27]等禽类上的研究结果不一致,鸡和火鸡胚胎发育全期肝和脑中均能检测到高水平的 IGF-IR 基因

的表达。同时,还发现在 2 品种鸭中 IGF-I 与 IGF-IR 的表达水平存在负相关,说明这 2 个基因在鸭早期发育过程肝中存在抑制表达的现象。IGF-IR 基因在 2 品种胸肌中均呈相似的表达趋势,在 13 胚龄表达量较高,随后在 17 胚龄时显著下降,表达高峰出现在 21 胚龄,随后下降,并维持在相对较低的水平,这与 M. Peng 等^[28]研究发现猪背最长肌 IGF-IR mRNA 的表达随年(胎)龄增加而减少并不一致,表明 IGF-IR 基因在不同物种肌肉中的表达模式可能存在差异。相同胚龄时的品种间比较发现,IGF-IR 表达量在品种间差异均不显著,表明 IGF-IR mRNA 的表达在所研究品种的胸肌中相对稳定。2 品种均在 21 胚龄时 IGF-IR mRNA 的表达量最高,说明该胚龄可能是鸭胚胎期肌肉生长发育最快的时期,这点从胸肌重的相对生长率也可以得到验证,说明该基因在鸭早期肌肉生长发育中发挥了重要作用。组织间比较发现,2 品种各阶段肝中 IGF-IR 基因的表达量均高于肌肉组织,说明该基因的表达也存在明显的组织差异。

IGFs 的作用受到 IGFBPs 的影响,IGFBPs 具有延长 IGFs 的半衰期、调节 IGFs 的生物学活性、转运血浆中的 IGFs 和调节其在血液中的分配等作用。现已发现 6 种 IGFBP,每种 IGFBP 的表达与分布都受到严格精细的调控。肌肉组织中存在 IGFBP-3、-4、-5 和 -6,其中以 IGFBP-3 和 IGFBP-5 为主^[28],目前尚未见对鸭的 IGFBP-3 基因及其在不同组织中的表达规律报道。本研究显示,2 个品种均是肌肉中表达量高于肝表达量,在肝中的表达水平相对较低,IGFBP-3 基因在 2 品种肝中表达量高峰均出现在 25 胚龄,而在胸肌中高峰则出现在 7 日龄,说明该基因的表达同样存在种属、组织和年龄特异性。与此同时,IGFBP-3 与 IGF-IR 基因表达之间极显著的正相关关系也与 IGFBP-3 在抑制依赖 IGF 机制的细胞生长的同时促进了不依赖 IGF 机制的细胞生长的结论吻合^[29]。同时,IGFs 系统基因在所研究的高邮鸭和金定鸭同一组织中的表达趋势均是一致的,说明在鸭早期发育过程中,IGFs 系统基因对不同品种具有相似的调控机制。

参考文献:

- [1] 吴荣富. 推进水禽产业集聚的路径研究[J]. 中国畜牧杂志, 2009, 45(24): 28-32.
- [2] 沈广, 宫桂芬, 吕淑艳, 等. 我国水禽业的发展状况及趋势展望[J]. 水禽世界, 2009, 增刊: 3-17.

- [3] YU H, ROHAN T. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(18):1472-1489.
- [4] RUSSO V C, GLUCKMAN P D, FELDMAN E L, et al. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain [J]. *Endocr Rev*, 2005, 26(7):916-943.
- [5] TILLEY R E, MCNEIL C J, ASHWORTH C J, et al. Altered muscle development and expression of the insulin-like growth factor system in growth retarded fetal pigs [J]. *Domest Anim Endocrinol*, 2007, 32(3):167-177.
- [6] 唐中林, 李勇, 邓宏, 等. IGF2 荧光定量 PCR 方法建立及其在中外猪胚胎骨骼肌中的表达[J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(2):202-207.
- [7] MENULLE P, BABAJKO S, PLAS C. Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins modulate the glucocorticoid-dependent biological effects of IGF-II in cultured fetal rat hepatocytes [J]. *Endocrinology*, 1999, 140(5):2232-2240.
- [8] JENNIFER L J, LISA J H, BRIGITTA M, et al. The role of IGFs in the regulation of ovarian follicular growth in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) [J]. *Reproduction*, 2010, 140:295-303.
- [9] LOUIS D P, WANG X H, ROBERT C B, et al. Amino and carboxyl-terminal fragments of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 cooperate to bind IGFs with high affinity and inhibit IGF receptor interactions [J]. *Endocrinology*, 2003, 144:2797-2806.
- [10] JONES J I, CLEMMONS D R. Insulin like growth factors and their binding proteins; biological actions [J]. *Endocr Rev*, 1995, 16(1):3-33.
- [11] VALENTINIS B, ROMANO G, PERUZZI F. Growth and differentiation signal by the insulin like growth factor binding I receptor in hemopoietic cells a mediated through different pathways [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(18):12423-12430.
- [12] KALISTA S O, SCHAKMAN H G, LAUSE B P, et al. The type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) pathway is mandatory for the follistatin-induced skeletal muscle hypertrophy [J]. *Endocrinology*, 2012, 153:241-253.
- [13] CLEMMONS D R. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1998, 140:19-24.
- [14] FIRTH S M, BAXTER R C. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins [J]. *Endocr Rev*, 2002, 23:824-854.
- [15] ALLAN G J, FLINT D J, PATEL K. Insulin-like growth factor axis during embryonic development [J]. *Reproduction*, 2001, 122:31-39.
- [16] DUPONT J, HOLZENBERGER M. Biology of insulin-like growth factors in development [J]. *Birth Defects Res (Part C)*, 2003, 69:257-271.
- [17] 束婧婷, 单艳菊, 胡艳, 等. 鸭 IGF-IR 基因部分序列克隆、鉴定及在胚胎期胸肌组织中的差异表达分析 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29(2):6-11.
- [18] 国家畜禽遗传资源委员会. 中国畜禽遗传资源志·家禽志[M]. 北京:中国农业出版社, 2011.
- [19] WELLER P A, DICKSON M C, HUSKISSON N S, et al. The porcine insulin-like growth factor-I gene: characterization and expression of alternate transcription sites [J]. *J Mol Endocrinol*, 1993, 11(2):201-211.
- [20] 景栋林, 张绮琼, 岑丽莎, 等. 鸭胚胎及其部分内脏器官生长发育的研究 [J]. *江苏农业科学*, 2007, 1:122-124.
- [21] CHEN W, TANGARA M, XU J, et al. Developmental transition of pectoralis muscle from atrophy in late-term duck embryos to hypertrophy in neonates [J]. *Exp Physiol*, 2012, 97(7):861-872.
- [22] CLAIRE E H, STEWART H, PETER ROTWEI N. Growth differentiation and survival multiple physiological functions for insulin-like growth factors [J]. *Physiol Rev*, 1996, 76:1005-1026.
- [23] KIKUCHI K, BUONOMO F C, KAJIMOTO Y, et al. Expression of insulin-like growth factor-I during chicken development [J]. *Endocrinology*, 1991, 128(3):1323-1328.
- [24] DE P F, ROBICS H L, CALDES T, et al. Insulin-like growth factor-I and insulin as growth and differentiation factors in chicken embryogenesis [J]. *Poult Sci*, 1991, 70(8):1790-1796.
- [25] VALENTINIS B, ROMANO G, PERUZZI F. Growth and differentiation signal by the insulin like growth factor binding I receptor in hemopoietic cells a mediated through different pathways [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(18):12423-12430.
- [26] LU F Z, WANG X X, PAN Q X, et al. Expression of genes involved in the somatotropic, thyrotropic, and Corticotropic Axes during development of Langshan and arbor acres chickens [J]. *Poult Sci*, 2008, 87:2087-2097.
- [27] RICHARDS M P, POCH S M, MCMURTRY J P. Expression of insulin-like growth factor system genes in liver and brain tissue during embryonic and post-hatch development of the turkey [J]. *Comparat Biochem Physiol*, 2005, 141:76-86.
- [28] PENG M, PELLETIER G, PALIN M F, et al. Ontogeny of IGFs and IGFbPs mRNA levels and tissue concentrations in liver, kidney and skeletal muscle of pig [J]. *Growth Dev Aging*, 1996, 60(3):171-187.
- [30] FERRY J R, KATZ L E, GRIMBERG A, et al. Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins [J]. *Horm Metab Res*, 1999, 31:192-202.