畜牧兽医学报 2017,48(10):1833-1842
Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica
doi:10.11843/j.issn.0366-6964.2017.10.006

腺病毒介导 shRNA 干扰绵羊 *MSTN* 基因效果及对生肌调节因子和干扰素反应基因表达的影响

王红娜[1],孙洪新[2],张英杰[1*],刘月琴[1],谷振慧[1],王苏瑶[1]
(1. 河北农业大学动物科技学院,保定 071000;2. 河北省畜牧兽医研究所,保定 071000)

摘　要: 旨在进一步揭示 *MSTN* 在绵羊成肌细胞中的调控机制,制备可有效失活 *MSTN* 基因的工具,为通过 RNA 干扰技术提高绵羊产肉量提供方法和理论依据。本研究以绵羊成肌细胞为试验材料,构建特异靶向绵羊 *MSTN* 基因的 shRNA 干扰质粒载体,将干扰效果好的质粒进一步包装为重组腺病毒,转染细胞后采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 *MSTN* 基因以及生肌调节因子和干扰素反应基因的表达。结果表明,质粒 ShR218 和 ShR511 干扰 *MSTN* 基因效率分别达到 35%和 48%,双元干扰质粒 ShR3+4 干扰效率最高达到 85%。成功包装 shRNA 重组腺病毒载体 Sh511 和 Sh3+4,病毒滴度达到 1×10^8 pfu·mL^{-1},对成肌细胞的感染效率达到 90%以上。Sh511 和 Sh3+4 对 *MSTN* 基因 mRNA 的表达抑制分别达到 53%和 76%,对蛋白表达抑制分别达到 55%和 64%。*MSTN* 基因沉默后,伴随着 *Myf5*、*MyoD*、*MyoG*、*Myf6* 基因 mRNA 水平的极显著性下调($P<0.01$),但只引起 MyoG 蛋白水平极显著升高($P<0.01$),未引起 Myf5、MyoD、Myf6 蛋白水平的显著变化;腺病毒感染成肌细胞未引起 *OAS1* 基因 mRNA 水平的显著变化,但引起 *IFNGR1* 基因 mRNA 水平的极显著升高($P<0.01$),对二者蛋白水平均无显著影响。本研究成功构建靶向 *MSTN* 基因的 shRNA 腺病毒载体,能有效抑制成肌细胞 MSTN 的 mRNA 和蛋白表达,并影响生肌调节因子 *Myf5*、*MyoD*、*MyoG*、*Myf6* 基因和干扰素受体基因 *IFNGR1* 表达。

关键词: 绵羊;MSTN;成肌细胞;RNA 干扰
中图分类号: S826.2　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 0366-6964(2017)10-1833-10

Adenovirus-mediated shRNA Interference of *MSTN* Gene and Its Effect on Expression of Myogenic Regulatory Factor and Interferon Response Gene in Sheep

WANG Hong-na[1], SUN Hong-xin[2], ZHANG Ying-jie[1*], LIU Yue-qin[1], GU Zhen-hui[1], WANG Su-yao[1]
(1. *College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding* 071000, *China*;
2. *Hebei Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Baoding* 071000, *China*)

Abstract: The aim of this study was to further reveal the regulation mechanism of *MSTN* in sheep myoblasts, prepare the tool silencing *MSTN*, and provide the methods and theoretical basis for increasing the yield of muscle mass by using RNA interference technology. In this study, sheep myoblasts were used as experimental materials. The short hairpin RNA (shRNA) expression plasmid vector specific targeting to *MSTN* gene were constructed, then the plasmids with better interference effect were packaged for recombinant adenovirus, the expression of *MSTN*, myogenic

收稿日期: 2017-04-17
基金项目: 国家肉羊产业技术体系资助项目(CARS-39)
作者简介: 王红娜(1985-),女,河北定州人,博士生,主要从事羊遗传繁育研究,E-mail:wanghongna08@163.com
* **通信作者:** 张英杰,教授,博导,主要从事羊遗传育种及营养研究,E-mail:zhangyingjie66@126.com

regulatory factor and interferon response genes in myoblasts after infected by recombinant adenovirus were detected by qRT-PCR and Western blot. The result showed that the interference efficiency of plasmid ShR218, ShR511 were 35% and 48%, respectively, the interference efficiency of ShR3+4 was 85%. Recombinant adenovirus vector Sh511 and Sh3+4 were successfully packaged, the virus titer reached 1×10^{8} pfu·mL^{-1}, the infection rate to myoblasts reached more than 90%. The mRNA expression of *MSTN* gene had been decreased by 53% and 76%, and the protein level had been decreased by 55% and 64% through Sh511 and Sh3+4, respectively. The knockdown of *MSTN* gene was accompanied with expression downregulation of myogenic regulatory factor *Myf*5, *MyoD*, *MyoG* and *Myf*6 at mRNA level($P<0.01$), but at protein level only MyoG was significantly increased($P<0.01$), no significant changes in Myf5, MyoD and Myf6. Adenovirus infecting myoblasts did not cause significant changes at *OAS*1 mRNA level, but caused significant increase at *IFNGR*1 mRNA level ($P<0.01$), while had no significant effect on their protein levels. In this study, shRNA adenovirus vector targeting to *MSTN* gene was successfully constructed, which can effectively inhibit the mRNA and protein expression of MSTN in myoblasts, and affect the expression of *Myf*5, *MyoD*, *MyoG*, *Myf*6 and *IFNGR*1 genes.

Key words: sheep; *MSTN*; myoblasts; RNAi

肌肉生长抑制素(Myostatin, MSTN),又称为GDF-8,为转化生长因子-β(Transforming growth factor-β,TGF-β)超家族成员之一,是能够在骨骼肌中特异表达的一类糖蛋白,负向调控肌肉的生长和发育。*MSTN* 基因敲除的小鼠骨骼肌是野生型小鼠的 3 倍以上[1]。同样有研究发现,该基因自然突变可导致双肌表型的牛、人、绵羊及犬等[2-5]。有研究表明,*MSTN* 基因在胎儿期及成年期都调控着骨骼肌的数量[6],因此在畜牧生产中可以通过抑制 *MSTN* 基因的表达增加产肉量。

RNA 干扰通过内源性或外源性双链 RNA 诱发同源 mRNA 高效特异性降解,从而阻断基因表达[7]。RNA 干扰的有效性依赖于基因载体转移效率的制约,RNA 干扰的长期性可以通过基因载体产生的 shRNAs 实现。已有研究报道利用 shRNA 质粒载体和慢病毒载体成功干扰绵羊、山羊、鸡、牛等多个物种的 *MSTN*[8-13],但质粒载体的转染效率会受到细胞类型的影响,而慢病毒载体会整合到宿主细胞基因组,并且有潜在的致病风险[14-15]。腺病毒载体无论是对体外培养的细胞还是直接进入活体动物体均具备很多优势,可以高效转染多种细胞类型,且不会引起宿主强烈的免疫反应。

本研究通过构建绵羊 *MSTN* 基因的 shRNA 干扰腺病毒载体,评估干扰 *MSTN* 效果,确定干扰绵羊 *MSTN* 基因对生肌调节因子(MRFs)即生肌决定因子(Myogenic factor 5, Myf5)、成肌分化因子(Myogenic Differentiation Antigen, MyoD)、肌细胞生成素(Myogenin, MyoG)和 Myf6 即肌调节因子 4 (Muscle regulatory factor 4, MRF4)的影响,探讨绵羊成肌细胞中 *MSTN* 的调控机制;同时分析腺病毒载体感染成肌细胞后引起的副作用,检测了干扰素诱导基因 2',5'-寡聚核酸酶(2'-5'-oligoadenylate synthetase1, OAS1)和干扰素受体基因(Interferon gamma receptor 1,IFNGR1)的表达情况,为探索通过腺病毒介导 shRNA 干扰绵羊 *MSTN* 基因提高产肉量提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验室分离纯化的小尾寒羊成肌细胞[16];293T 细胞、工程菌株 DH5α、质粒 Pgenesil 13、pAd/PL-DEST™ Gateway® Vector 腺病毒载体购自武汉淅玛生物技术有限公司。兔抗鼠 MSTN、MyoD、MyoG、IFNGR1 和 OAS1 多克隆抗体购自 Eterlife 公司;兔抗鼠 Myf5、Myf6 多克隆抗体购自 Aviva 公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗购自天德悦生物公司。

1.2 shRNA 干扰质粒载体构建

根据 GenBank 中绵羊 *MSTN* 基因的 mRNA 序列(NM_001009428),利用武汉淅玛生物技术有限公司设计的基因序列分析软件设计 shRNA 靶位点,见表 1,1 条位于 *MSTN* 编码区的 511 位点(表

1 中 MSTN-A 和 MSTN-C 黑体所示序列），另外 1 条参考文献[17]设计，位于编码区的 218 位点（表 1 中 MSTN-B 和 MSTN-D 黑体所示序列）。另外设计无特异性序列作为非靶向的阴性对照（NC1：5′-AGTCGTAGTAGCGATGTGGTT-3′ 及 NC2：5′-GACATTTCGAAGTACTCAGCG-3′）。按照文献[18]所示方法以 pGenesil-13 为底物进行重组 PCR，第一组引物为 A＋B，第二组引物为 C＋D。PCR 产物纯化后用 *Bsa* I 酶切，T4 酶连接，分别构建单元干扰质粒载体 ShR218、ShR511 和双元干扰质粒载体 ShR3＋4 及双元阴性对照质粒载体 ShRNC。

表 1　ShR3＋4 引物序列

Table 1　Primer sequences of ShR3＋4

引物名称 Name	序列（5′-3′） Sequence
MSTN-A	TTT*GGTCTC*CGTTCGAATCCTTC **TGAGTCTCAGGATTTGCAC** TTTTTTAAGCTTCCCG
MSTN-B	TTT*GGTCTC*CGTGGCTTCACTAT **TTGTCTTATAGCATCTTTGC** TCGCTCACTGTCAACA
MSTN-C	TTT*GGTCTC*CGAACCTTCAAGTTT **TGAGTCTCAGGATTTGCA** CGGTGTTTCGTCCTTT
MSTN-D	TTT*GGTCTC*CCCCACAGATGTAT **TTGTCTTATAGCATCTTTGC** CTGCCTACTGCCTCGG

斜体部分为 *Bsa* I 酶切位点；黑体部分为 shRNA 靶位点；下划线部分为 PCR 结合序列

The italic portions are the *Bsa* I endonuclease sites; The black body are the shRNA target sites; The underlined portions are the PCR binding sequences

1.3　干扰质粒载体筛选

转染前 24 h，将状态良好，处于对数生长期的细胞，按照每孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板，待细胞汇合度达到 70%～80%时进行转染，试验分为 RNAi 组（ShR218、ShR511、ShR3＋4），NC 组（阴性对照）和 NT 组（空白对照），每组 3 个重复。将 7.5 μL Lipofectamine 3000 加入到 125 μL Opti-MEM 培养基混匀，将 2.5 μg 质粒 DNA 加入到 125 μL Opti-MEM 培养基，然后加入 5 μL P3000 混匀（6 孔板每孔用量）。将稀释的质粒加入到稀释的 Lipofectamine 3000 试剂中，室温孵育 5 min 后加入到细胞中。48 h 后在荧光显微镜下观察并拍照，用流式细胞仪测定转染效率。通过 qRT-PCR 方法检测干扰质粒载体对 *MSTN* 基因的干扰效果[19]，干扰效率＝基因表达量下调比值/转染效率。

1.4　包装重组腺病毒载体

从质粒载体上通过 LR 体外同源重组将干扰效果好的质粒载体表达框转移至 pAd/PL-DEST™ 腺病毒表达载体上。提取质粒后利用酶切和测序鉴定阳性克隆。用 *Pac* I 酶切线性化重组腺病毒 DNA 转染 HEK 293 细胞放大培养重组腺病毒，利用 TCID50 法检测滴度。

1.5　重组腺病毒感染绵羊成肌细胞

铺板前使成肌细胞的生长状态最佳，按 1×10^6 个·孔$^{-1}$ 接种于 6 孔板，使转染时细胞密度达到 80%左右。将腺病毒原液用不含抗生素的培养液稀释 100 倍，转染前将旧的培养基去除，每孔加入 1 mL病毒稀释液。感染 5 h 后进行换液，24 h 后在倒置荧光显微镜下观察细胞生长状况及绿色荧光蛋白表达情况。

1.6　qRT-PCR 检测 *MSTN* 基因及相关基因表达

感染 48 h 后，细胞弃培养液，每孔加入 1 mL Trizol 裂解细胞，按说明书进行总 RNA 抽提及逆转录，以 *GAPDH* 作为内参基因，利用 SYBR Green 法检测 *MSTN* 基因及生肌调节因子 *Myf*5、*MyoD*、*MyoG* 和 *Myf*6，干扰素刺激基因 *OAS*1 和受体基因 *IFNGR*1 mRNA 的表达变化。定量 PCR 引物见表 2。

PCR 反应体系：SybrGreen qPCR Master Mix 10 μL，正、反向引物各 0.5 μL，ROX Reference Dye 0.4 μL，cDNA 模板 1.0 μL，ddH_2O 补至 20 μL。反应程序：95 ℃预变性 10 min；95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 60 s 并收集荧光信号，共 40 个循环；熔解曲线分析：95 ℃ 15 s，60～95 ℃，0.3 ℃·s^{-1}生成熔解曲线。以 *GAPDH* 为内参基因，$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量计算，每个样品重复 3 次，取平均值。

1.7　Western blot 检测 MSTN 及相关基因蛋白水平的表达

感染 72 h 后，每孔加入 100 μL RIPA Buffer 裂

表 2 定量 PCR 引物参数

Table 2 Primer parameters for qRT-PCR

基因 Gene	参考序列 Accession number	引物序列(5′-3′) Primer sequence	产物大小/bp Product size	退火温度/℃ Annealing temperature
MSTN	NM_001009428	F: GGCTCCTTGGAAGACGAT R: CAGTTGGGCCTTTACTACTTTAT	159	60
GAPDH	NM_001190390.1	F: CTGACCTGCCGCCTGGAGAAA R: GTAGAAGAGTGAGTGTCGCTGTT	149	60
MyoD	NM_001009390	F: AGGGTCCCTCGCGCCCAAAAG R: TGCGGGAGGCGGAAACACAACAGT	122	62
Myf5	XM_004006219.1	F: ACCAGCCCCACCTCAAGTTG R: GCAATCCAAGCTGGATAAGGAG	150	60
Myf6(*MRF4*)	NM_001134782.1	F: GCTACAGACCCAAGCAGGAA R: CGAGGCCGATGAATCAATGC	143	60
MyoG	NM_001174109.1	F: AGGTGAATGAAGCCTTCGAG R:TCCTGGTTGAGGGAGCTGAG	139	60
OAS1	XM_004017600	F: CGATTAGCCAATACCTGAGGAG R: ACGAATACTTGAGCCAGACTTTA	147	60
IFNGR1	XM_004011371	F: GTATTTGCTGCGGTAGTCG R: GCTGGTAGGTGATGGGTG	157	60

F. 上游引物;R. 下游引物

F. Forward primer; R. Reverse primer

解细胞,冰上孵育 20 min,4 ℃,12 000 r·min^{-1}离心 20 min,取上清,用 BCA 法测定细胞蛋白质浓度。蛋白样品经 12% SDS-PAGE 分离后湿转硝酸纤维素膜(0.45 μm 孔径),3% BSA-TBST 封闭,与一抗(稀释度 1∶1 000)4 ℃孵育过夜。用 TBST 洗膜 5 次,每次 3 min,加入 HRP 酶标二抗(稀释度 1∶10 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,将 ECL 发光液滴加到膜上,反应 3~5 min。在化学发光成像仪内进行检测。利用 Image JTM 图像分析软件对印迹蛋白进行灰度值统计分析,并用 β-tubulin 进行校准。

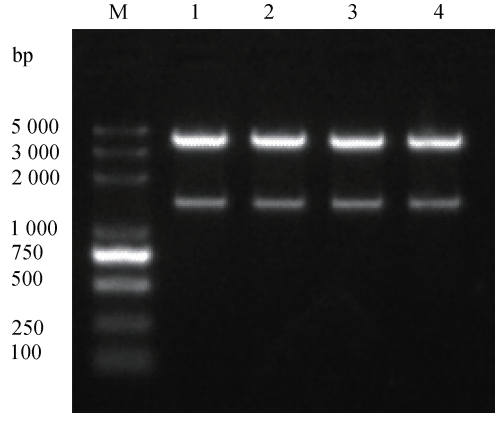
1.8 统计分析

所有试验均重复进行 3 次,采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,数据以"平均值±标准差"表示,组间比较利用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异显著,$P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结 果

2.1 shRNA 干扰质粒载体的构建与验证

2.1.1 shRNA 干扰质粒载体的构建 干扰质粒载体上只有 1 个 *Pst* Ⅰ酶切位点,PCR 引物设计了 1 个 *Pst* Ⅰ酶切位点,而质粒能够被 *Pst* Ⅰ酶切出 1 条带约 1 800 bp 的条带,说明目的基因片段已经插入到载体。图 1 证实本研究插入片段与载体相连,说明成功构建了质粒载体 ShR218、ShR511、ShR3+4、ShRNC。



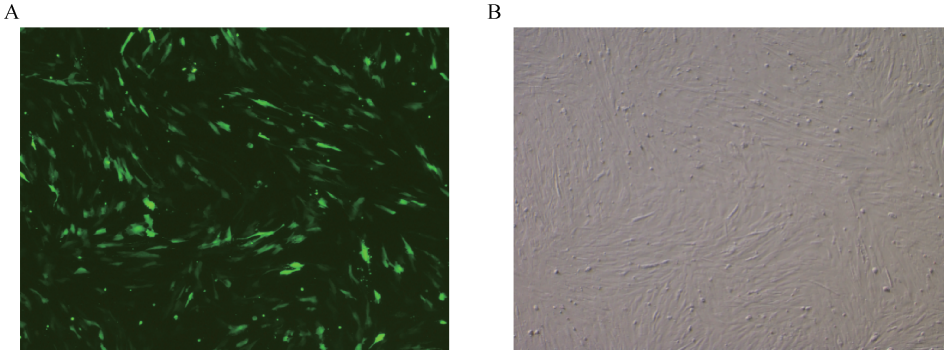
M. DL2000 marker; 1. ShR218; 2. ShR511; 3. ShR3+4; 4. ShRNC

图 1 重组质粒酶切鉴定图

Fig. 1 The result of recombinant plasmid by digestion

2.1.2　干扰质粒载体转染成肌细胞及干扰效果

质粒转染成肌细胞 48 h 后，荧光显微镜下拍照，结果如图 2 所示。转染效率经流式细胞仪测定为 35.36%。荧光定量 PCR 检测结果显示，与空白对照组相比，ShR218 对 *MSTN* 基因的干扰效率达到 35%，ShR511 干扰效率达到 48%，双元干扰载体 ShR3+4 抑制效率最高达到 85%，双元干扰效果更明显（图 3）。

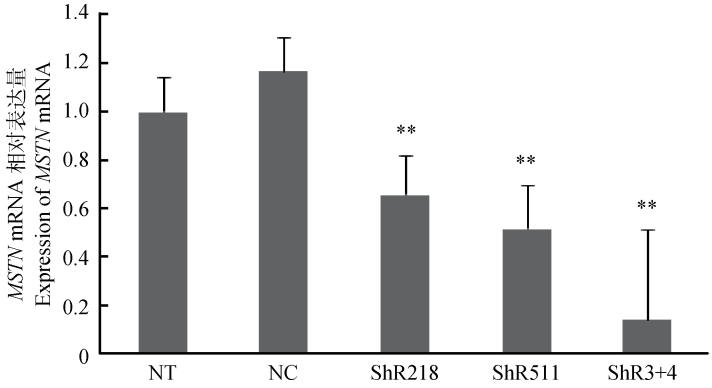


A. 荧光条件；B. 明场条件

A. Fluorescence field; B. Bright field

图 2　质粒瞬时转染绵羊原代成肌细胞后荧光蛋白的表达（40×）

Fig. 2　The expression of fluorescent protein in sheep myoblasts after transfected with plasmids（40×）



与对照组相比，* * 表示差异极显著（$P<0.01$）。下同

Compared with the control group, * * indicate extremely significant difference ($P<0.01$). The same as below

图 3　ShRNA 质粒在绵羊成肌细胞中的干扰效果

Fig. 3　Interfered effects in myoblasts by ShRNA plasmid

2.2　重组腺病毒载体构建与验证

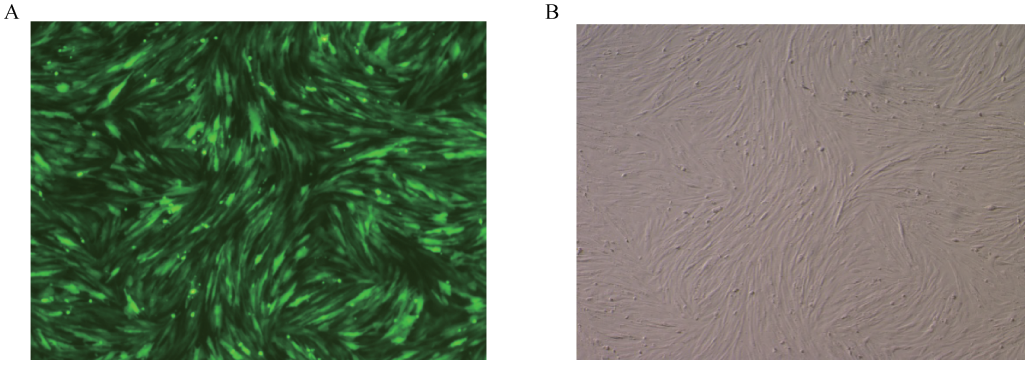
2.2.1　重组腺病毒载体构建与转染　用 *Pac* Ⅰ 酶切重组腺病毒质粒，回收 DNA 大片段并转染 HEK 293 细胞。培养过程中可见明显的绿色荧光蛋白表达，收集病毒上清，经过滤、浓缩后，测定病毒滴度为 1×10^9 pfu·mL^{-1}。重组腺病毒感染绵羊成肌细胞 24 h 后，通过荧光显微镜可以观察到绿色荧光，感染 48 h 后荧光强度达到最高，经流式细胞仪测定感染效率可以达到 90%以上（图 4）。

2.2.2　重组腺病毒感染绵羊成肌细胞对 *MSTN* 基因 mRNA 表达的影响　从定量结果柱形图（图 5）可以看出，*MSTN* 基因的表达量与空白对照组（NT）相比，腺病毒载体 Sh511 干扰效率为 53%（$P<0.01$），Sh3+4 为 76%（$P<0.01$），双元干扰效果更明显。空白组和阴性对照组间无显著差异。

2.2.3　重组腺病毒感染绵羊成肌细胞对 MSTN 蛋白表达的影响　经 Western blot 检测，证实干扰组 Sh511 和 Sh3+4 的蛋白表达量相对于空白对照极显著降低（$P<0.01$），结果如图 6 所示，干扰组 Sh511 和 Sh3+4 对蛋白的抑制率分别达到 55%和 64%。空白组和阴性对照组间无显著差异。

2.3　*MSTN* 基因沉默对生肌调节因子基因表达的影响

2.3.1　*MRFs* 基因 mRNA 的表达变化　*MSTN* 基因被干扰后，4 个生肌调节因子在干扰组中均呈



A. 荧光条件;B. 明场条件
A. Fluorescence field; B. Bright field
图 4 腺病毒载体感染绵羊原代成肌细胞后荧光蛋白的表达(40×)
Fig. 4 The expression of fluorescent protein in sheep myoblasts after transfected with adenovirus vector(40×)

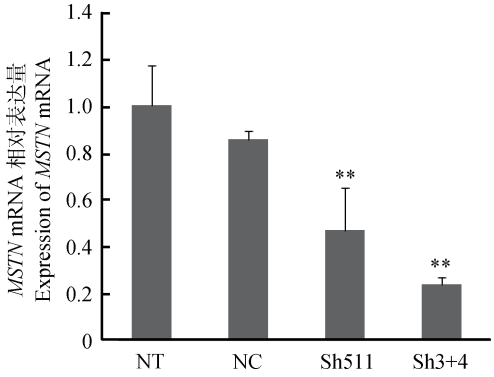
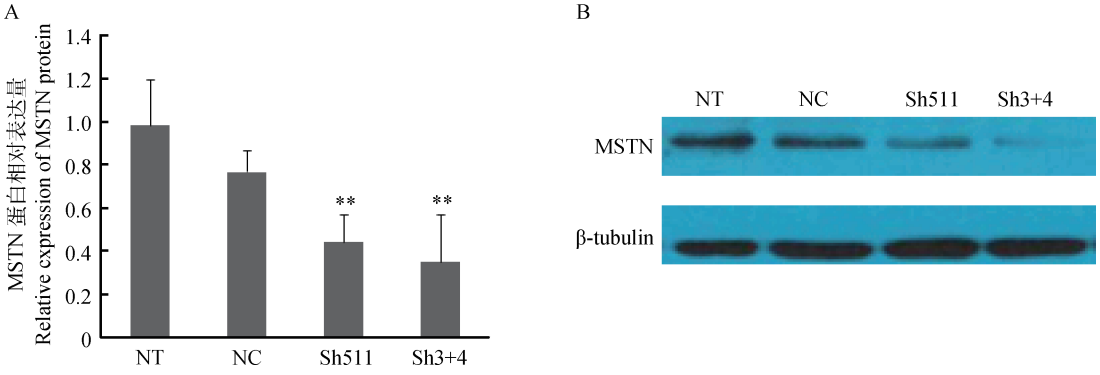


图 5 重组腺病毒感染绵羊成肌细胞对 *MSTN* 基因相对表达量的影响
Fig. 5 Expression of *MSTN* gene in myoblasts infected by recombinant adenovirus vector

下降趋势并且达到极显著水平($P<0.01$)。相对于空白对照组,在 Sh511 和 Sh3+4 干扰组中 *Myf5* 表达量分别降低了 65%和 79%,*MyoD* 分别降低了 79%和 72%,*MyoG* 分别降低了 59%和 70%,*Myf6* 分别降低了 60%和 67%(图 7)。空白组和阴性对照组间无显著差异。

2.3.2 MRFs 蛋白的表达变化 由图 8 可见,Sh511、Sh3+4 干扰 *MSTN* 后引起 MyoG 在蛋白表达水平上的极显著升高($P<0.01$),分别增加了 143%和 153%,但未引起 Myf5、MyoD、Myf6 蛋白表达的显著性变化。空白组和阴性对照组间无显著差异。



A. 各组 MSTN 蛋白相对表达量;B. Western blot 检测 MSTN 蛋白表达
A. The relative expressions of MSTN in different groups; B. Western blot analysis of MSTN protein expression
图 6 重组腺病毒感染绵羊成肌细胞对 MSTN 蛋白表达量的影响
Fig. 6 Expression of MSTN protein in myoblasts infected by recombinant adenovirus vector

2.4 *MSTN* 基因沉默对干扰素相关基因表达的影响

2.4.1 干扰素相关基因 mRNA 的表达变化 腺病毒干扰载体感染成肌细胞引起的副作用,检测了干扰素刺激基因 *OAS1* 和受体基因 *IFNGR1* 的表达变化。发现未引起 *OAS1* 基因表达量的显著变化(图 9),但引起 *IFNGR1* 基因表达量极显著升高($P<0.01$),与空白对照相比阴性对照上调了 1.2 倍,Sh511 上调了 1.36 倍,Sh3+4 上调了 0.56 倍。

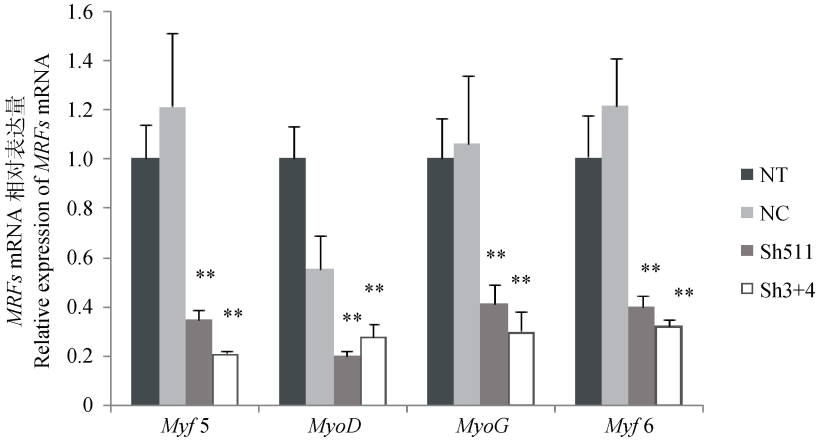
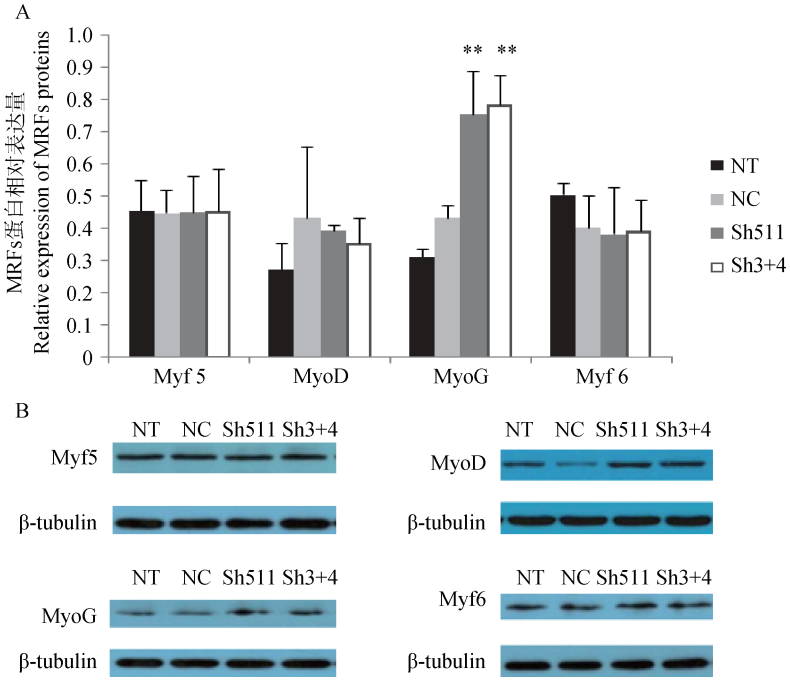


图 7　qRT-PCR 检测 *MRFs* 基因的表达

Fig. 7　qRT-PCR analysis of the expression of *MRFs* genes



A. 各组 MRFs 蛋白相对表达量;B. Western blot 检测 MRFs 蛋白表达

A. The relative expressions of MRFs protein in different groups; B. Western blot analysis of MRFs proteins expression

图 8　各组 MRFs 蛋白的表达

Fig. 8　The expression of MRFs proteins in different groups

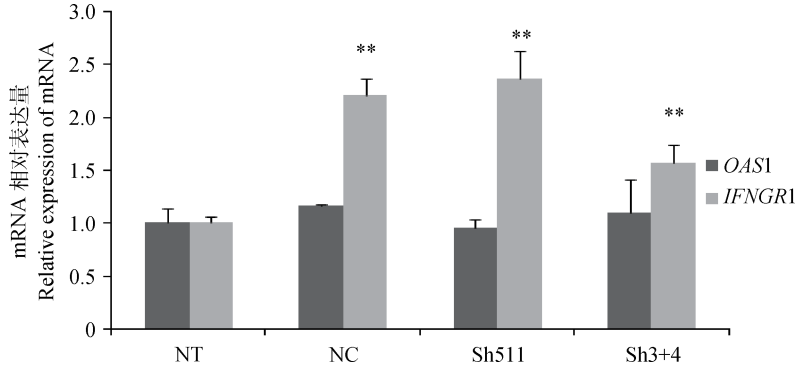
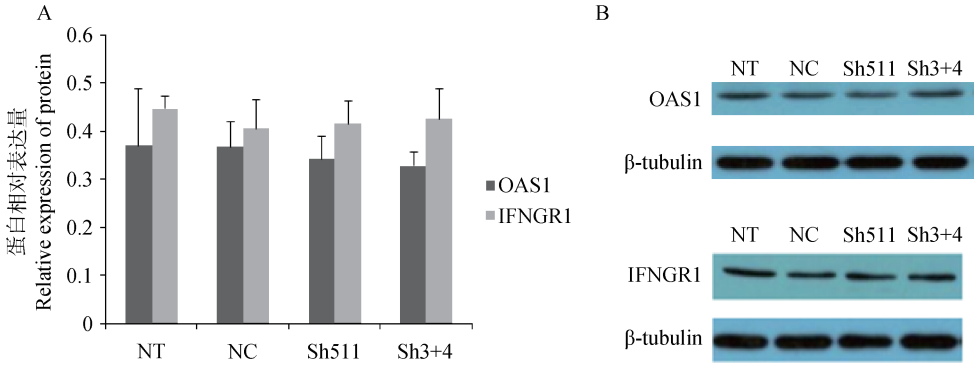


图 9　qRT-PCR 检测干扰素相关基因的表达

Fig. 9　qRT-PCR analysis of the expression of interferon related genes

2.4.2 干扰素相关基因蛋白的表达变化

Western blot 结果表明，腺病毒转染成肌细胞后未引起 IFNGR1 和 OAS1 在蛋白表达水平上的显著变化(图 10)。



A. 各组 OAS1 和 IFNGR1 蛋白相对表达量；B. Western blot 检测 OAS1 和 IFNGR1 蛋白表达

A. The relative expression of OAS1 and IFNGR1 proteins in different groups; B. Western blot analysis of IFNGR1 and OAS1 protein expressions

图 10 各组 OAS1 和 IFNGR1 蛋白的表达

Fig. 10 The expression of OAS1 and IFNGR1 proteins in different groups

3 讨 论

RNAi 是一种转录后水平的基因沉默，可以使特定基因低表达，通过载体表达 shRNA 可以长期抑制基因和蛋白表达。*MSTN* 基因负向调控肌肉的生长，因此可以利用 RNAi 抑制 MSTN 的功能，得到双肌表型的动物，增加肌肉产量。

本研究首先构建 shRNA 质粒干扰载体，通过常规转染试剂 Lipofectamine TM 2000 转染绵羊成肌细胞，发现转染效率特别低，不足 2%，原代细胞本就转染率较低，成肌细胞可能更加难以转染。本研究发现，利用新型脂质体 Lipofectamine 3000 介导 ShRNA 质粒载体转染原代成肌细胞，转染效率能达到 35%。Lipofectamine 3000 是一种新型脂质体，其活性不受血清和双抗的影响并且对细胞毒性小。不过本研究中采用无血清无双抗培养基培养细胞，利用 Opti-MEM 培养基混匀脂质体和质粒得到的转染效率更高。为以后原代成肌细胞的质粒转染试剂的选择和方法提供了借鉴。

本研究发现，质粒介导的 shRNA 干扰效率不稳定，难以进行后续研究，但腺病毒作为基因载体有以下优势：可以感染分裂和非分裂的多种类型细胞，低致病性，低免疫原性，高转染效率以及高效表达外源基因。有报道表明，可以直接通过体内注射或血液注射质粒 DNA，腺病毒相关载体(AAV)和腺病毒载体将外源基因导入到肌肉或心肌中[8,20-21]。本研究首次利用腺病毒载体介导 shRNA 干扰体外成肌细胞 *MSTN* 基因表达，可为今后通过 shRNA 干扰绵羊 *MSTN* 基因提高其产肉量提供技术支持。

本研究发现，以质粒载体形式进行干扰试验，ShR218 干扰效率达到 35%左右，ShR511 干扰效率达到 48%，双元干扰载体 ShR3+4 对基因的抑制效率高达 85%，但质粒干扰结果并不稳定，差异较大。将 ShR511 和 ShR3+4 重组包装为腺病毒后结果与质粒结果相似，腺病毒载体 Sh511 干扰效率达到 53%，Sh3+4 干扰效率达到 76%，双元干扰载体效果更好，经 Western blot 检测结果类似，并且结果重复性高，稳定性强，可以进行后续研究。本研究构建验证了针对 *MSTN* 的双元干扰载体，为以后利用一个载体沉默 2 个不同的基因提供了方法参考。

本试验选定了 4 个与生肌相关的调节因子 *Myf5*、*MyoD*、*MyoG*、*Myf6*，*MSTN* 被干扰后影响了其 mRNA 的表达，*Myf5* 下降的结果与 J. Lu 等[22-23]对绵羊和山羊成纤维细胞的研究结果一致，与 A. K. Patel 等[24]在山羊成肌细胞的研究结果类似，但与 U. A. Patel 等[25]在山羊成纤维细胞的研究结果不同。*MyoD* 与 *MyoG* 降低的趋势与 C. X. Liu 等[13]对绵羊成肌细胞的研究结果一致，A. K. Patel 等[24-25]在山羊成肌细胞及成纤维细胞的研究也得出类似的结果，而 R. Kumar 等[26]对山羊成肌细胞的研究结果为 *MyoG* 表达量是下降的，*MyoD* 表达量是上升的。本研究中，*Myf6* 基因的变化与 U. A. Patel 等[25]在山羊成纤维细胞的研究结果一致，与 A. K. Patel 等[24]在山羊成肌细胞的结果不同。

出现结果不一致的原因可能是选择的羊品种不同以及细胞类型不同导致的。另外,本研究通过 Western blot 检测了 *MSTN* 基因被干扰后这 4 个生肌调节因子的表达变化,结果与 qRT-PCR 检测结果并不一致,并未引起 Myf5、MyoD、Myf6 蛋白水平的显著性变化,而 MyoG 的蛋白水平极显著升高。出现差异的原因可能是真核基因表达的转录和翻译发生的时间和位点存在时空间隔,而转录后又会有转录后加工,转录产物的降解、翻译、翻译后加工及修饰等多个环节,所以转录水平和翻译水平并不一定完全一致[27]。

shRNA 介导的基因沉默的副作用之一是诱导干扰素反应,是宿主防御表达双链 RNA 的一种应答机制[28]。因此为了评价通过腺病毒介导 shRNA 干扰 MSTN 引起的干扰素反应,本研究检测了干扰素诱导基因 *OAS*1 和受体基因 *IFNGR*1 的表达情况。OAS 是动物感染病毒后产生干扰素诱导生成的一种抗病毒蛋白,参与介导干扰素反应,在此过程中干扰素结合到受体发挥作用[29]。A. K. Tripathi 等[30]研究发现,shRNA 质粒载体瞬时转染鸡成纤维细胞抑制 *MSTN* 基因后引起 *OAS*1 和 *IFN-β* 基因表达量 3.7～6.4 倍的升高,N. K. Singh 等[31]研究发现,干扰山羊成纤维细胞后引起 *OAS*1 基因 1.64～6.83 倍的升高,在 A. K. Tripathi 等[32]的研究中发现,利用 shRNA 质粒载体抑制山羊成肌细胞中的 *MSTN* 的表达,引起 *OAS*1 基因表达量 5～11 倍的升高。本研究发现,利用腺病毒干扰载体抑制绵羊成肌细胞中 *MSTN* 表达后,未引起 *OAS*1 基因 mRNA 表达的变化,但引起了 *IFNGR*1 基因 mRNA 表达的升高,暗示有干扰素反应发生,但不是由 *OAS*1 途径介导,具体介导途径需要进一步研究。同时研究发现,在蛋白水平上均未引起二者显著性变化,由此可见,此腺病毒载体介导 shRNA 引起细胞的干扰素反应较小。

4 结 论

本研究成功构建靶向 *MSTN* 的 shRNA 重组腺病毒载体,对成肌细胞的感染效率在 90%以上,腺病毒介导的 shRNA 可以有效的降低成肌细胞内 *MSTN* 的表达。腺病毒介导 shRNA 干扰 *MSTN* 基因表达可下调 4 个生肌调节因子 *Myf*5、*MyoD*、*MyoG*、*Myf*6 mRNA 水平的表达,上调 MyoG 蛋白的表达,但对 Myf5、MyoD、Myf6 蛋白表达水平影响不大;对 *OAS*1 基因 mRNA 表达水平无显著影响,但可引起 *IFNGR*1 基因 mRNA 表达水平的升高,对 OAS1 和 IFNGR1 基因蛋白表达水平均无显著影响。

参考文献(References):

[1] 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): 83-90.

[2] ARTHUR P F. Double muscling in cattle: a review[J]. *Aust J Agr Res*, 1995, 46(8): 1493-1515.

[3] WILLIAMS M S. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child[J]. *N Engl J Med*, 2004, 351(10): 1030-1031.

[4] CLOP A, MARCQ F, TAKEDA H, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(7): 813-818.

[5] MOSHER D S, QUIGNON P, BUSTAMANTE C D, et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs[J]. *PLoS Genet*, 2007, 3(5): e79.

[6] WELLE S, BHATT K, PINKERT C A, et al. Muscle growth after postdevelopmental myostatin gene knockout[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(4): E985-E991.

[7] UEDA R. RNAi: a new technology in the post-genomic sequencing era[J]. *J Neurogenet*, 2001, 15(3-4): 193-204.

[8] MAGEE T R, ARTAZA J N, FERRINI M G, et al. Myostatin short interfering hairpin RNA gene transfer increases skeletal muscle mass[J]. *J Gene Med*, 2006, 8(9): 1171-1181.

[9] SATO F, KUROKAWA M, YAMAUCHI N, et al. Gene silencing of myostatin in differentiation of chicken embryonic myoblasts by small interfering RNA[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291(3): C538-C545.

[10] JAIN H, SINGH S, KADAM M, et al. Knockdown of the myostatin gene by RNA interference in caprine fibroblast cells[J]. *J Biotechnol*, 2010, 145(2): 99-102.

[11] TESSANNE K, GOLDING M C, LONG C R, et al. Production of transgenic calves expressing an shRNA targeting myostatin[J]. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(3): 176-185.

[12] 盛鹏程,朱瑞良,苗向阳. 绵羊 Myostatin 基因 shRNA 慢病毒载体的构建与鉴定[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(4): 628-632.
SHENG P C, ZHU R L, MIAO X Y. Construction

and identification of lentivial RNA interference vector of sheep myostatin receptor gene[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, 32(4): 628-632. (in Chinese)

[13] LIU C X, LI W R, ZHANG X M, et al. Knockdown of endogenous myostatin promotes sheep myoblast proliferation[J]. *In vitro Cell Dev Biol Anim*, 2014, 50(2): 94-102.

[14] WALTHER W, STEIN U. Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases[J]. *Drugs*, 2000, 60(2): 249-271.

[15] THOMAS C E, EHRHARDT A, KAY M A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy[J]. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(5): 346-358.

[16] 王红娜，张英杰，刘月琴. 绵羊成肌细胞的纯化、培养、鉴定及其成肌诱导分化研究[J]. 河北农业大学学报，2016，39(1)：94-98，102.
WANG H N, ZHANG Y J, LIU Y Q. A study of purification, culture, identification and differentiation of sheep myoblast cells[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2016, 39(1): 94-98, 102. (in Chinese)

[17] LIU C X, LI W R, ZHANG X M, et al. The critical role of myostatin in differentiation of sheep myoblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 422(3): 381-386.

[18] 孔庆辉，晁　燕，夏明哲，等. 黄河裸裂尻鱼 *MSTN* 基因 RNA 干扰研究[J]. 中国实验动物学报，2016，24(4)：344-350.
KONG Q H, CHAO Y, XIA M Z, et al. Inhibitory effect of RNA interference of *MSTN* gene expression on the downstream genes in *Schizopygopsis pylzovi* [J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2016, 24(4): 344-350. (in Chinese)

[19] 刘建军，张茂雷，朱芳芳. 实时荧光定量 PCR 筛选有效 RNA 干扰方法的建立[J]. 检验医学与临床，2010，7(10)：903-905.
LIU J J, ZHANG M L, ZHU F F. Establishment of a method in detecting the effect of RAN interference on time flurogenic quantitative polymerase chain reaction[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2010, 7(10): 903-905. (in Chinese)

[20] LOUBOUTIN J P, WANG L L, WILSON J M. Gene transfer into skeletal muscle using novel AAV serotypes[J]. *J Gene Med*, 2005, 7(4): 442-451.

[21] MERENTIE M, LOTTONEN-RAIKASLEHTO L, PARVIAINEN V, et al. Efficacy and safety of myocardial gene transfer of adenovirus, adeno-associated virus and lentivirus vectors in the mouse heart[J]. *Gene Ther*, 2016, 23(3): 296-305.

[22] LU J, REN H X, SHENG X H, et al. Transcript characteristic of myostatin in sheep fibroblasts[J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(8): 2652-2660.

[23] LU J, WEI C H, ZHANG X N, et al. The effect of myostatin silencing by lentiviral-mediated RNA interference on goat fetal fibroblasts[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(6): 4101-4108.

[24] PATEL A K, TRIPATHI A K, PATEL U A, et al. Myostatin knockdown and its effect on myogenic gene expression program in stably transfected goat myoblasts[J]. *In vitro Cell Dev Biol Anim*, 2014, 50(7): 587-596.

[25] PATEL U A, PATEL A K, JOSHI C G. Stable suppression of myostatin gene expression in goat fetal fibroblast cells by lentiviral vector-mediated RNAi [J]. *Biotechnol Prog*, 2015, 31(2): 452-459.

[26] KUMAR R, SINGH S P, KUMARI P, et al. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of myostatin Influences the expression of myogenic regulatory factors in caprine foetal myoblasts[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 172(3): 1714-1724.

[27] 孙洪新，王红娜，张英杰，等. *BMPR-IB* 基因的克隆及其在绒山羊成纤维细胞中的表达[J]. 畜牧兽医学报，2016，47(6)：1124-1132.
SUN H X, WANG H N, ZHANG Y J, et al. Cloning and expression of *BMPR-IB* gene in cashmere goat fibroblast cells[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(6): 1124-1132. (in Chinese)

[28] GANTIER M P, WILLIAMS B R G. The response of mammalian cells to double-stranded RNA[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007, 18(5-6): 363-371.

[29] 张义兵，桂建芳. 鱼类干扰素反应及分子调控[J]. 生物工程学报，2011，27(5)：675-683.
ZHANG Y B, GUI J F. Fish interferon response and its molecular regulation: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27(5): 675-683. (in Chinese)

[30] TRIPATHI A K, APARNATHI M K, VYAVAHARE S S, et al. Myostatin gene silencing by RNA interference in chicken embryo fibroblast cells[J]. *J Biotechnol*, 2012, 160(3-4): 140-145.

[31] SINGH N K, SINGH S, JAIN S K, et al. Evaluation of interferon response induced by anti-myostatin shRNA constructs in goat (*Capra hircus*) fetal fibroblasts by quantitative real time-polymerase chain reaction[J]. *Anim Biotechnol*, 2012, 23(3): 174-183.

[32] TRIPATHI A K, RAMANI U V, PATEL A K, et al. Short hairpin RNA-induced myostatin gene silencing in caprine myoblast cells *in vitro*[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169(2): 688-694.

（编辑　郭云雁）