

网络出版时间:2012-04-16 15:34

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120416.1534.001.html>

绵羊 *MSTN* 基因慢病毒表达载体的构建及其对成肌细胞的分化作用

刘晨曦^{1,2}, 唐 森^{2,3,4}, 李文蓉^{2,3,4}, 刘明军^{2,3,4}

(1 新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2 新疆畜牧科学院动物生物技术研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830000;
3 新疆动物生物技术实验室, 新疆 乌鲁木齐 830000; 4 农业部草食家畜繁育生物技术重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘 要] 【目的】构建新疆细毛羊 *MSTN* 基因慢病毒表达载体, 研究其在细毛羊成肌细胞分化中的作用, 并探讨其作用机制。【方法】采用 RT-PCR 技术, 扩增 *MSTN* 编码区序列, 克隆入 plex-mcs 慢病毒表达载体, 构建 plex-*MSTN* 慢病毒表达载体, 并进行酶切及测序鉴定。将 plex-*MSTN* 包装成 plex-*MSTN* 慢病毒。用酶消化法分离培养新疆细毛羊成肌细胞, 慢病毒感染制备 *MSTN* 过表达成肌细胞系, 通过马血清诱导分化, Western blotting 检测分化细胞 *MSTN* 基因的表达, 免疫荧光分析分化肌管的融合率及肌管直径, Realtime RT-PCR 检测分化相关基因的表达。【结果】克隆的新疆细毛羊 *MSTN* 基因编码区全长序列(1 128 bp) 与 NCBI 上公布的序列 99.9% 同源, 仅在外显子 2 上存在单碱基突变; Western blotting 检测结果显示, *MSTN* 过表达成肌细胞过表达 *MSTN* 蛋白; 免疫荧光检测表明, *MSTN* 过表达成肌细胞的肌管融合率与肌管直径分别为 5.69% 和 12.35 μm , 显著低于非转化成肌细胞(10.21% 和 18.5 μm) ($P < 0.05$); Realtime RT-PCR 结果显示, *MSTN* 过表达成肌细胞中的 *Myogenin*、*p21*、*MyoD* 基因表达显著下调, *Smad3* 基因表达极显著上调 ($P < 0.01$)。【结论】成功构建了细毛羊 *MSTN* 基因慢病毒表达载体, *MSTN* 基因对细毛羊成肌细胞的分化具有显著的抑制作用, 确定了 *MSTN* 基因与 *Myogenin*、*p21*、*MyoD* 及 *Smad3* 基因在成肌细胞分化过程中的调控关系。

[关键词] 新疆细毛羊; *MSTN*; 细胞分化; 慢病毒; 成肌细胞

[中图分类号] Q782; S826.8⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)05-0011-08

Construction of lentiviral vector for sheep *MSTN* gene and its effects on ovine myoblast differentiation

LIU Chen-xi^{1,2}, TANG Sen^{2,3,4}, LI Wen-rong^{2,3,4}, LIU Ming-jun^{2,3,4}

(1 College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830000, China;

2 Animal Biotechnological Research Center, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi, Xinjiang 830000, China;

3 Xinjiang Laboratory of Animal Biotechnology, Urumqi, Xinjiang 830000, China;

4 Laboratory of Grass-fed Animal Genetics, Breeding & Reproduction of Ministry of Agriculture, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: 【Objective】The study was to construct the lentiviral expression vector for *MSTN* gene of Xinjiang Merino Sheep and investigated the influence and mechanism of *MSTN* gene on ovine myoblast differentiation. 【Method】The coding region of *MSTN* gene was amplified by RT-PCR and cloned into lentiviral expression vector plex-mcs. The constructed vector was identified by restrictive enzyme and sequencing. Primary ovine myoblasts of Xinjiang Merino Sheep was cultured by enzyme digestion method, overexpression of *MSTN* cell line by lentiviral transfection primary ovine myoblast was prepared. Through inducing

* [收稿日期] 2011-12-21

[基金项目] 国家转基因重大专项“优质转基因肉羊新品种培育”(2008ZX08008-003)

[作者简介] 刘晨曦(1980—), 男, 湖南冷水江人, 在读博士, 主要从事动物分子生物学研究。E-mail: chenxi_4000@163.com

[通信作者] 刘明军(1965—), 男, 新疆奎屯人, 研究员, 博士生导师, 主要从事动物生物技术研究。

E-mail: xjlmj2004@yahoo.com.cn

differentiation of horse serum, we used Western blotting to detect the MSTN protein expression in differentiated ovine myoblast, immunofluorescence staining to determine the myogenic fusion index and myotube diameter and Realtime RT-PCR to assay the related genes expression in differentiation condition. 【Result】 Cloned MSTN gene (1 28 bp CDs sequence) of Xinjiang Merino Sheep showed 99.9% nucleotide homology with sequence reported in NCBI and existed a single base mutation in exon 2. Western blotting detected the MSTN protein stable expression in overexpression ovine myblast cell line. Immunofluorescence staining determined that the myogenic fusion index and myotube diameter of overexpression ovine myblasts respectively were 5.69% and 12.35 μm , significantly lower than 10.21% and 18.5 μm of non-transfected cells ($P < 0.05$). The Realtime RT-PCR assay indicated that MSTN obviously down-regulated the expression of *MyoD*, *Myogenin* and *p21* genes, but up-regulated *Smad3* expression. 【Conclusion】 Lentiviral expression vector for MSTN gene was successfully constructed, ovine MSTN inhibits differentiation of ovine myoblasts, and ascertained the relationship of expression regulation between *MyoD*, *Myogenin*, *p21*, *Smad3* genes and MSTN gene under differentiation condition.

Key words: Xinjiang Merino Sheep; MSTN; differentiation; lentiviral; myoblast

肌肉生长抑制素因子(Myostatin, MSTN)又称 GDF-8, 属于 TGF- β 家族成员。MSTN 基因最先于 1997 年在小鼠中发现, 将该基因 C 端编码区部分序列敲除后, 小鼠全身的骨骼肌出现广泛增加, 表明该基因对骨骼肌的生长发育具有负调控作用, 因此被命名为肌肉生长抑制素基因^[1]。同年, 在比利时蓝牛和皮尔蒙特牛中, 发现该基因编码区存在突变, 且该突变与皮尔蒙特牛典型的“双肌”性状密切相关^[2-4]。除了自然突变, 利用基因敲除及 RNAi 技术阻断 MSTN 基因表达获得的转基因小鼠, 也表现出肌纤维直径和肌纤维数量均显著增加的“双肌”性状^[5-6]。反之, MSTN 过表达小鼠则出现了体质量减轻及肌萎缩症状^[7]。

MSTN 蛋白需经过蛋白酶的 2 次切割, 产生成熟肽后方能发挥功能。MSTN 成熟肽与活化素受体 II B (Activin receptor II B, ActR II B) 结合, 诱导磷酸化细胞信号转导分子 (Smad2 和 Smad3) 蛋白磷酸化。磷酸化的 Smad2 和 Smad3 形成复合体从胞质转运至核内, 调节下游成肌分化因子 (*MyoD*) 基因、肌细胞生成素 (*Myogenin*) 基因、细胞周期抑制因子 (*p21*) 基因等的表达^[8-9]。同时, MSTN 成熟肽还能与其前肽、卵泡抑制素 (Follistatin)、卵泡抑制素相关基因 (FLRG) 和 GASP-1 等拮抗蛋白结合^[10-12], 共同调控 MSTN 基因的表达。MSTN 基因与 IGF/AKT 及 WNT 通路相关因子之间也存在相互作用^[13-14]。国内关于 MSTN 基因的研究多见于基因型分析^[15] 及表达^[16-18] 等方面, 而对其功能及作用机制方面的研究较少, 且多数研究主要集中在小鼠和人细胞上, 尚未见关于 MSTN 基因对绵羊肌

肉细胞作用的相关报道。

新疆细毛羊是我国重要的毛肉兼用型羊, 具有产毛量高、毛质好、体大肉多味美等优良品质。本试验以新疆细毛羊为研究对象, 构建其 MSTN 慢病毒表达载体, 制备 MSTN 过表达绵羊成肌细胞系, 通过分析 MSTN 过表达时成肌细胞分化后肌管融合率与直径的变化, 研究 MSTN 基因对绵羊成肌细胞分化的影响, 探讨其作用机制, 确定绵羊 MSTN 基因与分化相关基因 *MyoD*、*Myogenin*、*p21* 及 *Smad3* 在分化过程中的表达调控关系, 为深入了解 MSTN 基因对绵羊肌肉生长发育的作用及其调控机制提供试验依据, 并为以抑制 MSTN 基因功能为目的的转基因优质毛肉兼用羊的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、载体及细胞 DH5 α 感受态细胞购自北京天根公司, pMD20-T 载体购自 TaKaRa 公司, plex-mcs 慢病毒表达载体及其包装质粒 pMD2G、pSPAX 购自 Openbiosystem 公司, 小鼠成肌细胞 C₂C₁₂ 购自上海中国科学院细胞库, 293T 细胞购自 ATCC 公司。

1.1.2 酶及主要试剂 限制性内切酶 *Xho* I、*Bam* H I、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司, *Taq* DNA 聚合酶购自 Promage 公司。Trizol 试剂、Horse serum 和 LipofectamineTM 2000 试剂购自 Invitrogen 公司, IA 型胶原酶、胰酶购自 Sigma 公司, DMEM 培养基和胎牛血清 FBS 购自 GIBCO 公司, Desmin 鼠抗购自 Sigma 公司, 肌球蛋

白重链(Myosin heavy chain, MyHC)鼠抗购自 Santa cruz 公司, DAPI 试剂、HA 抗体购自北京天根公司, IRDye 680 Conjugated Goat Anti-Mouse 荧光二抗 (FITC-IgG) 购自 LI-COR 公司, QuantiTect SYBR Green I 试剂购自 QIAGEN 公司。

1.2 *MSTN* 基因的 RT-PCR 扩增

根据 GenBank 中绵羊 *MSTN* 全长 mRNA 序列 (GenBank 登录号: NM001009428), 设计 *MSTN* 基因编码区序列 (1 128 bp) 的引物, F: 5'-GTCCGG ATCCAAAACCATGCAAAAAGTCAAATCT-3' (斜体为 *Bam*H I 酶切位点); R: 5'-GTTATCTCGA GTCA AGCGTAGTCTGGGACGGTATGGGTAT GAGCACCCACAGCGATCTAC-3' (斜体为 *Xho* I 酶切位点, 下划线部分为 HA 标签序列, TCA 为终止密码子序列)。引物送交上海生工合成。

取新疆细毛羊后肢股外侧肌块, 迅速置于液氮中冻存, 经液氮研磨后用 Trizol 法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定其 OD₂₃₀、OD₂₆₀ 值, OD₂₃₀/OD₂₆₀ 比值为 1.75。反转录按照 TaKaRa 公司说明书操作, 取 2 μg RNA 进行反转录合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 扩增采用如下体系: *Taq* DNA 聚合酶 (2.5 U/μL) 0.5 μL, 10× Buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, cDNA 模板 2 μL, 补水至 25 μL; 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 80 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

1.3 plex-MSTN 重组慢病毒的制备

1.3.1 *MSTN* 基因慢病毒表达载体 plex-MSTN 的构建 PCR 产物经 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切, 用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收酶切产物。将回收产物于 16 °C 下进行过夜连接 plex-mcs 慢病毒表达载体, 转化 DH5α 感受态细胞, 挑取克隆, 进行菌液 PCR 检测。将检测呈阳性的克隆质粒经 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定后, 送上海生工进行测序, 并将测序结果与 GenBank 中的 *MSTN* 编码区序列进行比对。将构建好的质粒命名为 plex-MSTN。

1.3.2 plex-MSTN 重组慢病毒的制备 在 6 孔培养板中每孔铺 4×10⁶ 个 293T 细胞, 第 2 天细胞汇合度达到 80% 时通过脂质体转染进行病毒包装。分别用 250 μL Opti-MEM 培养基稀释 4 μg 质粒 (表达质粒: plex-MSTN 2 μg; 包装质粒: pSPAX 1.5 μg, pMD2G 0.5 μg) 和 8 μL 脂质体 Lipofectamine™ 2000, 两者混合后室温静置 20 min, 加

入培养皿中; 6 h 后换液, 37 °C 培养箱培养 48 h, 收集细胞上清液, 2 500 r/min 离心 15 min 后, 将上清液用 0.45 μm 过滤器过滤, 收集滤过液, 置于 -70 °C 保存备用。

1.4 成肌细胞的原代培养及鉴定

1.4.1 成肌细胞的原代培养 绵羊成肌细胞的原代培养参照文献[19]的方法。取 2 月龄新疆细毛羊后肢股外侧肌肉少许, 剔除脂肪、结缔组织, 用眼科剪剪成糊状。用胶原蛋白酶消化法消化组织, 分离获得绵羊原代成肌细胞。

1.4.2 成肌细胞的鉴定 原代成肌细胞的鉴定参照文献[20]的方法, 以小鼠成肌细胞 C₂C₁₂ 为阳性对照, 未添加 Desmin 一抗的原代培养绵羊成肌细胞为阴性对照; 取原代培养的绵羊成肌细胞, 将 C₂C₁₂ 细胞铺于预先爬片的 6 孔细胞培养板中, 通过 DAPI 对细胞核进行染色, 并用 Desmin 免疫荧光检测绵羊成肌细胞的纯度。

1.5 *MSTN* 基因过表达成肌细胞系的建立

取原代培养的绵羊成肌细胞, 按 3×10⁵/孔的量接种至 6 孔板中, 培养第 2 天至汇合度达 70% 时, 将 plex-MSTN 重组慢病毒 1 mL 和聚凝胺 (终质量浓度为 10 μg/mL) 加入细胞中, 孵育 16 h 后, 换新鲜 DMEM 完全培养液, 48 h 后加入 2 000 μg/mL 的 puromycin 筛选细胞, 每 2 d 换新鲜完全培养基。以未添加 plex-MSTN 慢病毒细胞为对照, 筛选 10 d 后对照组细胞全部凋亡, 获得 *MSTN* 基因过表达细胞系。

1.6 成肌细胞的诱导分化

消化 *MSTN* 基因过表达细胞及未转染 *MSTN* 的绵羊成肌细胞, 计数后, 按 4×10⁵/孔的量接种至 6 孔板中培养, 24 h 后汇合度达到 80%, 换用含体积分数 2% 马血清的 DMEM 诱导培养基培养 72 h, 备用。

1.6.1 分化肌管融合率及直径的测定 取上述诱导分化 72 h 的细胞, 固定并封闭 (方法同 1.4.2), 加入 anti-MyHC 一抗 (稀释比为 1 : 400) 4 °C 过夜, TBS 冲洗后加入 FITC-IgG 二抗 (1 : 200) 及 100 ng/mL DAPI, 室温作用 1 h, TBS 冲洗, Nikon 荧光显微镜成像。参照文献[21]的方法, 统计视野中每条肌管中细胞核数占整个视野中细胞核数的比例, 即肌管融合率; 测量视野中每条肌管的直径, 取平均值。每孔随机选取 10 个视野, 取其均值, 用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析。

1.6.2 Realtime RT-PCR 检测 (1) 标准曲线的制备。使用标准曲线相对定量法对过表达成肌细胞

MSTN 基因及成肌细胞分化相关基因 *MyoD*、*Myogenin*、*p21*、*Smad3* mRNA 的表达水平进行定量分析。用 geNorm 及 NormFinder 软件分析内参基因 18S rRNA、 β actin 及 *GAPDH* 稳定性,选择 18S rRNA 作为最佳内参进行相对定量分析。针对绵羊 *MSTN*、*MyoD*、*Myogenin*、*p21*、*Smad3*、18S rRNA 基因编码区序列,用 Oligo 6.0 软件设计长度为 120~200 bp 且跨内含子的定量检测引物(表 1),

表 1 基因定量检测的引物序列

Table 1 Amplification primers for Realtime RT-PCR

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
Ovine <i>MSTN</i>	F:ATCCATCTCTGAAACTTGACATG R:CAGTCCATCTTCTTCTGGTTCTG	Ovine <i>MyoD</i>	F:AGGGTCCCTCGCGCCAAAAG R:TGCGGGAGGCGGAAACACAACAGT
Ovine <i>Smad3</i>	F:AGACATTCCACGCCTCCCAG R:GTCAGCTCCACAGCCGCGTT	Ovine <i>Myogenin</i>	F:AGGTGAATGAAGCCTTCGAG R:TCCTGGTTGAGGGAGCTGAG
Ovine <i>p21</i>	F:GCCCAGAGCGATGGAAGCTT R:AGTGGTCTCCTGAGACGTG	Ovine 18S rRNA	F:GCTTGAACCCCATTCGTG R:AGCGACGGCGGTGTG

(2)样本的制备及定量分析。用 Trizol 法提取分化细胞总 RNA,紫外分光光度计测定其 OD₂₃₀、OD₂₆₀ 值,OD₂₃₀/OD₂₆₀ 比值为 1.75。反转录按照 TaKaRa 公司说明书操作,取 2 μg RNA 进行反转录合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,进行 Real-time RT-PCR 检测,反应程序及条件参照文献[22]。结果分析时,引用标准曲线,获得基因的浓度值,将基因浓度值与 18S rRNA 基因浓度值的比值作为基因相对表达量。每个样本重复 3 次,统计分析使用 SPSS13.0 软件。

1.6.3 Western blotting 检测 取诱导分化 72 h 的细胞经 PBS 清洗,用细胞刮刀刮离细胞,收集于 1.5 mL 离心管中,加入 100 μL 细胞裂解液裂解,提取细胞总蛋白。使用 BCA 试剂盒定量总蛋白浓度,取 40 μg 总蛋白进行上样后,转移至 NC 膜,50 g/L 脱脂奶粉封闭过夜,加入 HA 鼠抗(1:5 000)及 β -actin 鼠抗(1:4 000)室温作用 1 h,加入 IRDye 680 Conjugated Goat Anti-Mouse 二抗(1:10 000)室温

送交上海生工公司合成。参照文献[22]的方法,将 PCR 扩增产物克隆入 pMD20-T 载体,构建好的重组质粒经过酶切线性化后,即得各个基因的标准品。将标准品进行梯度稀释,以稀释好的标准品为模板,使用 QuantiTect SYBR Green I 试剂(QIAGEN)进行 Realtime RT-PCR (Light Cycler 2.0,Roche),生成各基因的标准曲线。制备的标准曲线扩增效率均达到 1.90 以上,符合定量分析要求。

作用 1 h,PBST 洗膜后,用 Odyssey 红外荧光扫描成像系统进行成像。同时对 *MSTN* 基因进行 Real-time RT-PCR 检测,方法同上。

2 结果与分析

2.1 *MSTN* 基因的 RT-PCR 扩增

经过 RT-PCR 扩增,获得长度为 1 128 bp 的 *MSTN* 基因片段(图 1),与预期结果一致。

2.2 *MSTN* 基因慢病毒表达载体 plex-*MSTN* 的鉴定

plex-*MSTN* 慢病毒表达载体经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定后,获得了长度约 1 128 和 4 000 bp 的片段(图 2),与预期结果一致,表明 plex-*MSTN* 慢病毒表达载体构建成功。测序结果显示,*MSTN* 基因序列与 NCBI 上已公布的序列同源性达到 99.9%,仅在外显子 2 上有 1 个碱基的差异,与编码成熟肽的外显子 3 序列 100%同源。

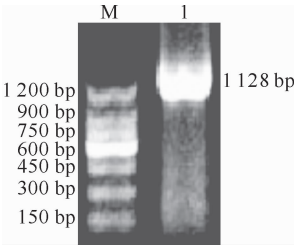


图 1 绵羊 *MSTN* 基因的 RT-PCR 扩增结果

M. DNA marker;1. *MSTN* 基因 RT-PCR 产物

Fig.1 PCR result of sheep *MSTN* gene

M. DNA marker;1. RT-PCR product of ovine *MSTN*

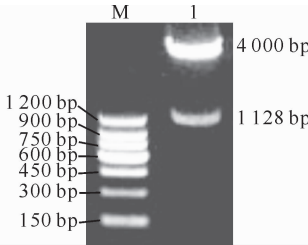


图 2 绵羊 *MSTN* 基因慢病毒表达载体 plex-*MSTN* 的鉴定

M. DNA marker;1. plex-*MSTN* 慢病毒表达载体双酶切产物

Fig.2 Identification of plex-*MSTN* of sheep *MSTN* gene

M. DNA marker;1. plex-*MSTN* digested with *Bam*H I and *Xho* I

2.3 成肌细胞的分离培养与鉴定

结果(图 3)显示,肌肉细胞特异性蛋白 Desmin 在小鼠成肌细胞 C₂C₁₂(图 3A)及绵羊成肌细胞(图 3B)的胞质中均可表达,而阴性对照细胞无 Desmin 的表达,表明分离培养 的细胞为成肌细胞。通过

DAPI 对细胞核进行染色,鉴定成肌细胞的纯度,结果(图 3D—F)显示,分离培养的绵羊成肌细胞 Desmin 表达阳性率为(94.3±3.2)%,细胞纯度较高。

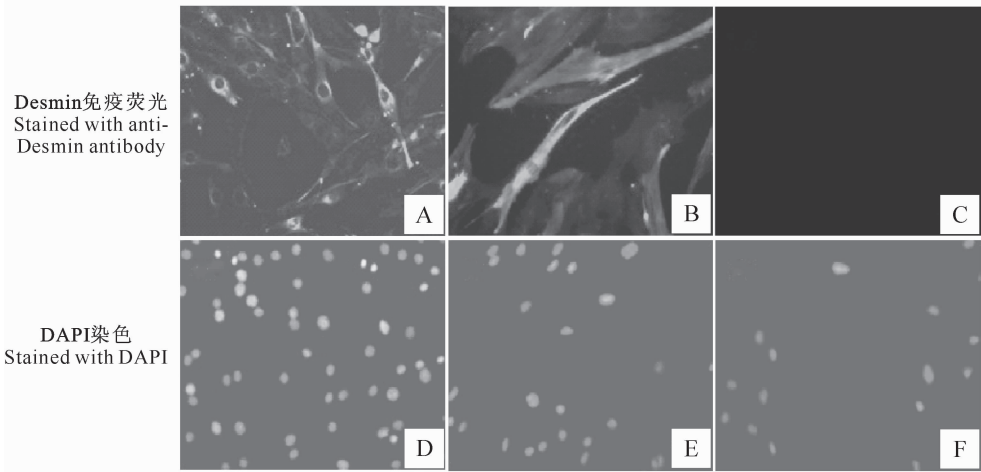


图 3 绵羊原代成肌细胞的 Desmin 免疫荧光鉴定及 DAPI 染色检测(200×)
A—C. 分别为小鼠 C₂C₁₂ 细胞(阳性对照)、绵羊成肌细胞及无 Desmin 抗体反应的绵羊成肌细胞(阴性对照)的免疫荧光鉴定结果;D—F. 分别为 A—C 细胞的 DAPI 染色结果

Fig. 3 Immunofluorescent analysis of Desmin and stained with DAPI in primary ovine myoblasts (200×)
A—C. Cells represented the mouse myoblasts (C₂C₁₂) (positive control), primary ovine myoblasts and primary ovine myoblasts stained without anti-Desmin antibody (negative control), respectively; D—F. Cells shown in panels A—C were stained with DAPI

2.4 *MSTN* 基因对绵羊成肌细胞分化的影响

结果(图 4)显示,诱导分化 72 h 后,在明场下可见非转化成肌细胞形成了大量长条状肌管,而 *MSTN* 过表达成肌细胞几乎无长条状肌管出现,表明 *MSTN* 过表达成肌细胞分化程度明显低于非转化成肌细胞。分化肌管融合率及直径测定结果(图

5)显示,过表达 *MSTN* 成肌细胞融合率和肌管直径分别为 5.69%和 12.35 μm,均显著低于非转化细胞(10.21%和 18.5 μm),表明 *MSTN* 过表达细胞的分化程度显著低于非转化成肌细胞,*MSTN* 基因过表达显著抑制了绵羊成肌细胞的分化。

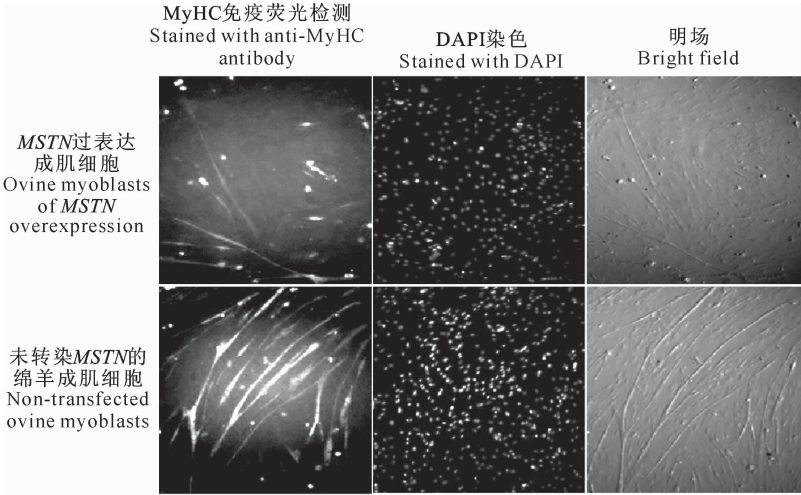


图 4 绵羊成肌细胞分化 72 h 后的 MyHC 免疫荧光结果(100×)
Fig. 4 Ovine myoblasts stained with anti-MyHC antibody at 72 h in differentiation medium(100×)

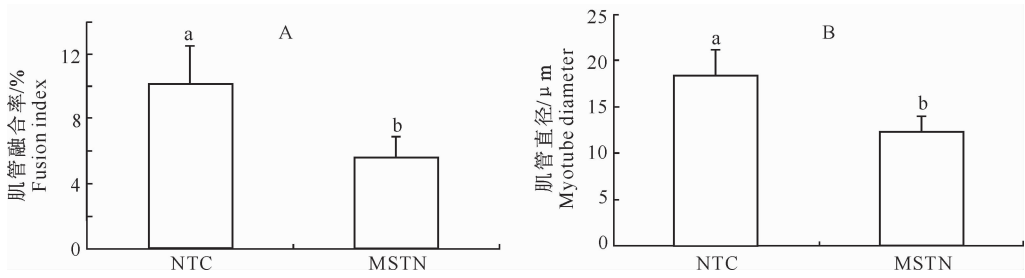


图 5 绵羊成肌细胞肌管融合率(A)与肌管直径(B)的测定结果
不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$);
NTC. 未转染 MSTN 的绵羊成肌细胞;MSTN. MSTN 过表达成肌细胞;下图同

Fig. 5 Result of fusion index and myotube diameter
Different small letters are considered as significant ($P < 0.05$),different capital letters are considered as extremely significant($P < 0.01$);
NTC. Non-transfected ovine myoblasts;MSTN. Ovine myoblasts of MSTN overexpression;the same as the following figure

2.5 MSTN 基因对绵羊成肌细胞分化相关基因的表达调控

MSTN 基因过表达显著抑制了绵羊成肌细胞的分化,为了揭示其作用机制,利用 Realtime RT-PCR 检测分化相关基因 *MyoD*、*Myogenin*、*p21* 及 *Smad3* 的表达。结果(图 6)显示,绵羊成肌细胞分化后,*MyoD*、*Myogenin* 和 *p21* 基因在非转化绵羊

成肌细胞中的相对表达量显著高于 MSTN 过表达成肌细胞($P < 0.05$),表明 MSTN 基因过表达可显著下调 *MyoD*、*Myogenin* 和 *p21* 的表达;而 *Smad3* 基因在 MSTN 过表达成肌细胞中的相对表达量极显著高于非转化细胞($P < 0.01$),表达量高出近 7 倍,表明 MSTN 基因过表达可显著上调 *Smad3* 的表达。

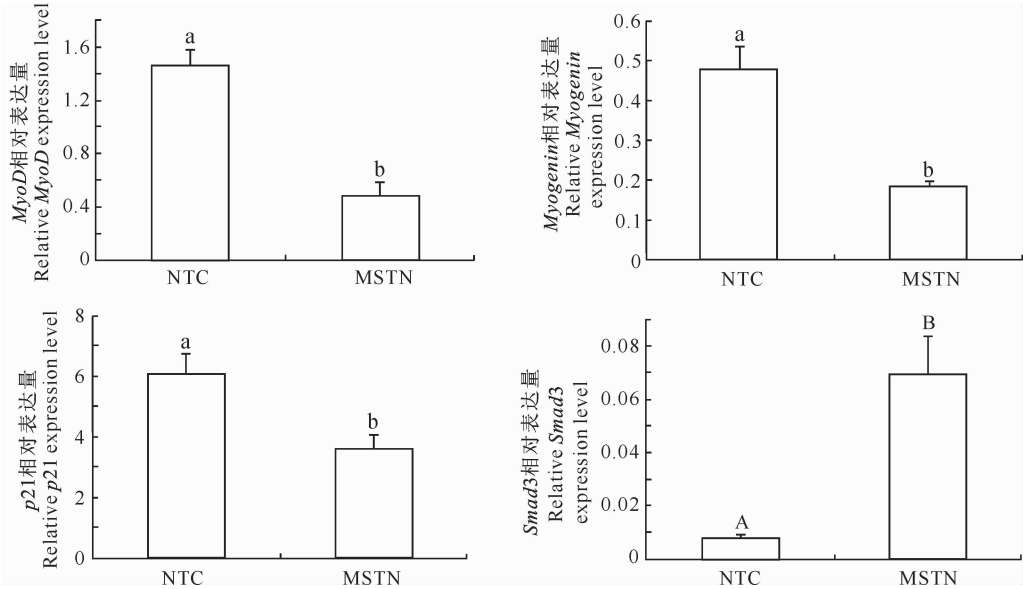


图 6 绵羊成肌细胞分化相关基因表达的 Realtime RT-PCR 检测

Fig. 6 Realtime RT-PCR analysis of the expression of genes involved in ovine myoblasts differentiation

2.6 绵羊成肌细胞诱导分化后 MSTN 基因的表达

结果显示,诱导分化 72 h 后,过表达 MSTN 基因的成肌细胞可检测到 MSTN 蛋白的表达,而非转化细胞未检测出 MSTN 蛋白(图 7A);过表达 MSTN 基因绵羊成肌细胞中 MSTN mRNA 的表达水平较非转变成肌细胞提高了近 30 倍(图 7B),表明 MSTN 成功导入原代培养的绵羊成肌细胞中,

并获得了较高水平的表达。

3 讨论

在早期胚胎中,来自于生肌节区的中胚层细胞转移至胚性结缔组织附近,生成骨骼肌成肌细胞。成肌细胞增殖后,彼此融合分化形成多核的肌纤维^[23]。在肌细胞生长过程中,MSTN、细胞周期调

控因子(*p21*、*p53*)及生肌决定因子(*Myf5*、*MyoD*、*MRF4*、*Myogenin*)基因均参与肌细胞的增殖与分化^[24]。*MSTN* 基因最早在胚胎吻体节中表达,随后在生肌节区及发育中的各个阶段均有表达^[1],表明 *MSTN* 基因参与调控各个时期的肌细胞生长。

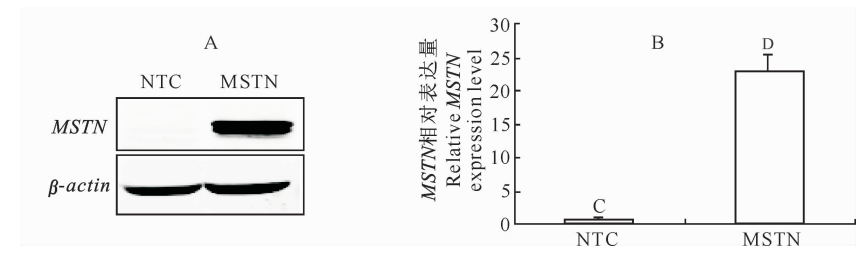


图 7 原代培养绵羊成肌细胞诱导分化 72 h 后 *MSTN* 基因的表达检测
A. Western blotting 检测 *MSTN* 基因的表达;B. Realtime RT-PCR 检测 *MSTN* 基因的表达
Fig. 7 *MSTN* expression in primary ovine myoblasts at 72 h in differentiation medium
A. Western blotting analysis of *MSTN* expression;B. Realtime RT-PCR analysis of *MSTN* expression

研究发现,小鼠 *MSTN* 基因通过 Smads 途径进行信号传导,上调 *p21* 基因的表达,抑制成肌细胞的增殖;下调 *MyoD*、*Myogenin* 基因的表达,抑制成肌细胞的分化^[25]。但 *MSTN* 基因抑制成肌细胞增殖及分化的作用机制目前尚不明确。本试验构建了新疆细毛羊 *MSTN* 基因慢病毒表达载体,建立了 *MSTN* 过表达成肌细胞系,经诱导分化,发现 *MSTN* 过表达成肌细胞的肌管融合率及直径均显著低于非转化成肌细胞,表明 *MSTN* 过表达成肌细胞的分化程度显著低于非转化成肌细胞。

为了进一步探讨 *MSTN* 基因抑制成肌细胞分化的作用机制,笔者对分化相关基因 *MyoD*、*Myogenin*、*Smad3* 及 *p21* 在分化细胞中的表达进行了定量分析。*MyoD*、*Myogenin* 均为 MRFs 家族成员,在肌细胞的分化过程中发挥着关键作用。*MyoD* 可与 *MSTN* 启动子上的 E-box 6 (E6)位点结合,促进 *MSTN* 基因的转录,并通过 *MSTN* 基因的负反馈通路,调节 *MyoD* 基因的表达^[26]。本研究表明, *MSTN* 基因的过表达可显著下调 *MyoD* 和 *Myogenin* 的表达水平,这与 Langley 等^[27]在小鼠上的报道相一致。提示 *MSTN* 基因抑制绵羊成肌细胞的分化,可能是通过抑制 *MyoD* 和 *Myogenin* 基因的表达而实现的。*Smad3* 是 Smads 家族成员,参与 TGF- β 信号通路,*MSTN* 信号通过 *Smad2* 和 *Smad3* 磷酸化传导至下游基因。本研究表明, *MSTN* 过表达可极显著上调 *Smad3* 基因的表达,该结果与 Sartori 等^[28]在人上的研究结果相同。*p21* 作为细胞周期依赖激酶(CDKs)抑制因子,Yang 等^[29]发现, *MSTN* 可特异性上调 *p21* 基因的表达,抑制肌细胞从 G1-S 期过渡到 G2-M 期;但本研究发现,在分化细胞中, *p21* 的表达受到 *MSTN* 调控后下调;而在小鼠 *C₂C₁₂* 细胞增殖时期, *MSTN* 基因可以特异性上调 *p21* 基因的表达^[24],提示在成肌细胞增殖和分化时期, *MSTN* 基因对 *p21* 的调控机制存在差异。

综上所述,本试验证实了 *MSTN* 基因对绵羊成肌细胞的分化具有抑制作用,确定了 *MSTN* 基因与 *MyoD*、*Myogenin*、*p21* 及 *Smad3* 之间的表达调控关系;本研究发现, *MSTN* 基因在分化过程中对 *p21* 基因的表达具有抑制作用,为研究 *MSTN* 基因对绵羊肌肉生长发育的作用及调控机制提供了试验依据,并为转基因毛肉兼用羊新品种的相关研究奠定了理论基础。

[参考文献]

[1] McPherron A, Lawler, Lee. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member [J]. Nature, 1997, 387(6628): 83-90.

[2] Grobet L, Martin L, Poncelet, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle [J]. Nat Genet, 1997, 17(1): 71-74.

[3] McPherron A, Lee S. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(23): 12457-12461.

[4] Kambadur R, Sharma M, Smith T, et al. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle [J]. Genome Res, 1997, 7(9): 910-916.

[5] Liu C M, Yang Z, Liu C W, et al. Myostatin antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice [J]. Gene Ther, 2008, 15(3): 155-160.

[6] Lee S J. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways [J]. PLoS One, 2007, 2(8): e789.

[7] Abe, Soejima, Iwanuma, et al. Expression of myostatin and follistatin in Mdx mice, an animal model for muscular dystrophy [J]. Zoolog Sci, 2009, 26(5): 315-320.

- [8] Walsh F, Celeste A J. Myostatin: A modulator of skeletal-muscle stem cells [J]. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(6): 1513-1517.
- [9] Joulia D, Bernardi H, Garandel V, et al. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 286(2): 263-275.
- [10] Tsuchida K. Targeting myostatin for therapies against muscle-wasting disorders [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2008, 11(4): 487-494.
- [11] Hill J, Davies M, Pearson, et al. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(43): 40735-40741.
- [12] Geng J, Peng F, Xiong F, et al. Inhibition of myostatin promotes myogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(7): 849-863.
- [13] Trendelenburg, Meyer, Rohner, et al. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(6): C1258-1270.
- [14] Bernardi H, Gay S, Fedon Y, et al. Wnt4 activates the canonical beta-catenin pathway and regulates negatively myostatin: Functional implication in myogenesis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300(5): C1122-1138.
- [15] 孟详人, 郭 军, 赵倩君, 等. 11 个绵羊品种 MSTN 基因非翻译区的变异 [J]. *遗传*, 2008, 30(12): 1585-1590.
Meng X R, Guo J, Zhao Q J, et al. Variation of MSTN gene UTR in eleven sheep breeds [J]. *Hereditas*, 2008, 30(12): 1585-1590. (in Chinese)
- [16] 张 锐, 孙美榕, 张红莲, 等. 猪肌生成抑制素基因成熟蛋白编码序列的表达与纯化 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(9): 53-56.
Zhang R, Sun M R, Zhang H L, et al. Expression and purification of mature protein coding sequence of porcine myostatin gene in prokaryotic expression vector [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2004, 32(9): 53-56. (in Chinese)
- [17] 孙 伟, 王 鹏, 丁家桐, 等. 湖羊 Myostatin 和 Myogenin 基因表达的发育性变化及与屠宰性状的关联分析 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(24): 5129-5136.
Sun W, Wang P, Ding J T, et al. Developmental changes of gene expression of Myostatin and Myogenin genes and their association analysis with carcass traits in Hu Sheep [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(24): 5129-5136. (in Chinese)
- [18] 张晓玮, 崔文涛, 伍晓雄, 等. 猪 MSTN 前肽定点诱变载体在 C₂C₁₂ 细胞中的表达 [J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(11): 1588-1593.
Zhang X W, Cui W T, Wu X X, et al. Construction of eukaryotic expression vector with a site-directed mutation of porcine MSTN propeptide gene and its expression in C₂C₁₂ cells [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2009, 40(11): 1588-1593. (in Chinese)
- [19] 张 宁, 张雪梅, 刘明军, 等. 绵羊 Follistatin 基因表达及其结构域的功能分析 [J]. *生物工程学报*, 2010, 26(8): 1050-1056.
Zhang N, Zhang X M, Liu M J, et al. Ovine follistatin gene expression and functional analysis of follistatin domains [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2010, 26(8): 1050-1056. (in Chinese)
- [20] 陈 岩, 王 琨, 朱大海, 鸡骨骼肌卫星细胞的分离培养、鉴定及生物学特性研究 [J]. *遗传*, 2006, 28(3): 257-260.
Chen Y, Wang K, Zhu D H. Isolation, culture, identification and biological characteristics of chicken skeletal muscle satellite cells [J]. *Hereditas*, 2006, 28(3): 257-260. (in Chinese)
- [21] Morissette, Cook, Buranasombati, et al. Myostatin inhibits IGF-I induced myotube hypertrophy through Akt [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(5): C1124-1132.
- [22] Liu M J, Whetstone, Payton, et al. Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter [J]. *Biochem J*, 2004, 383(2): 249-257.
- [23] Yaffe D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968, 61(2): 477-483.
- [24] 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(51): 40235-40243.
- [25] van Hoef V, Breugelmans B, Spit J, et al. Functional analysis of a pancreatic secretory trypsin inhibitor-like protein in insects: Silencing effects resemble the human pancreatic autodigestion phenotype [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2011, 41(9): 688-695.
- [26] Spiller M P, Kambadur R, Jeanplong, et al. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(20): 7066-7082.
- [27] Langley B, Thomas M, Bishop, et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(51): 49831-49840.
- [28] Sartori R, Milan G, Patron M, et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(6): C1248-1257.
- [29] Yang W, Zhang Y, Li Y, et al. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(6): 3799-3808.