

鸭胚胎骨骼肌 $TR-\beta$ mRNA 发育性表达 及与肌重相关性研究

陶志云¹, 单艳菊¹, 朱春红¹, 宋 迟¹, 宋卫涛¹, 陈文峰², 李慧芳¹

(1. 江苏省家禽科学研究所, 江苏 扬州 225125; 2. 江苏腾达源农牧有限公司, 江苏 姜堰 225538)

摘要: 为探讨 $TR-\beta$ 基因在不同品种鸭胚胎期和出雏早期胸肌和腿肌中表达的发育性变化及其对胸腿肌重的影响。采用实时荧光定量 PCR 方法研究了高邮鸭和金定鸭胚胎期(17、21、25、27 胚龄)和出雏早期(7 日龄)胸腿肌中 $TR-\beta$ mRNA 的表达水平。结果表明, $TR-\beta$ mRNA 在 2 个品种鸭肌肉早期发育中表现出一致的表达规律,但在腿肌和胸肌的发育性变化规律稍有不同:在胚胎期胸肌和腿肌中的 $TR-\beta$ mRNA 表达量均呈先低后高的趋势,27 胚龄时表达量最高;但出壳后胸肌中的 $TR-\beta$ mRNA 表达量出现显著下降($P < 0.01$),而腿肌仍维持高水平表达($P > 0.05$)。表明 $TR-\beta$ mRNA 表达具有显著的胚(日)龄依赖性,并存在组织差异,但无品种差异。鸭发育早期胸腿肌中 $TR-\beta$ mRNA 表达量与胸腿肌重的相关性分析表明,两者呈强的正相关,提示胸腿肌中 $TR-\beta$ mRNA 的表达可能在鸭早期胸腿肌发育过程中发挥着正调控作用。

关键词: 鸭; $TR-\beta$ 基因; 胚胎期; 骨骼肌

中图分类号: S858.32 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)06-0015-05

Characteristics of $TR-\beta$ mRNA in Skeletal Muscles of Duck and the Correlation with Muscles Weight

TAO Zhi-yun¹, SHAN Yan-ju¹, ZHU Chun-hong¹, SONG Chi¹,
SONG Wei-tao¹, CHEN Wen-feng², LI Hui-fang¹

(1. Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125, China; 2. Jiangsu Tengda Source Farming Company Limited, Jiangyan 225538, China)

Abstract: The objective of this study was to investigate the developmental changes of $TR-\beta$ gene expression in different duck breeds during embryonic and neonatal period in pectorales and legs and their effects on weight of pectorals and legs. Real time PCR was applied to compare the expression level of thyroid hormone receptor beta ($TR-\beta$) mRNA in pectorales and legs of Gaoyou ducks and Jinding ducks at the 17, 21, 25, 27 embryonic day and the age of 7 d. The results showed that the profiles of $TR-\beta$ mRNA of muscle in two duck breeds were consistent during early development, but there are some different in pectorales and legs. The trend of $TR-\beta$ mRNA is from low to high in pectorales and legs during embryonic, the highest level is in 27 embryonic day. After hatch, the level of $TR-\beta$ mRNA is decline in pectorals ($P < 0.01$), but keep high level in legs ($P > 0.05$). These results indicate that the expression of $TR-\beta$ gene was significantly affected by age and organization, but not affected by breed. During embryonic and neonatal period of ducks, the expression of $TR\alpha$ mRNA in pectorals may play a positive regulatory role on the weight of muscles and embryo or body and the opposite regulatory role in legs. The correlation analysis showed that there was a strong positive linear correlation between the expression of $TR-\beta$ mRNA and muscle weight in early development of duck. The results indicate that during embryonic and neonatal period of ducks, the expression of $TR-\beta$ mRNA in pectorals may have a positive regulatory role on the weight of muscles.

Key words: $TR-\beta$ gene; Embryonic period; Skeletal muscles

收稿日期: 2012-09-10

基金项目: 国家自然科学基金(31172194); 现代农业品种创新项目(CX(11)1030); 江苏省科技支撑计划项目(BE2011329); 扬州市科技攻关项目(YZ2010048)

作者简介: 陶志云(1979-),女,安徽凤阳人,助理研究员,硕士,主要从事动物免疫学方面的研究。

通讯作者: 李慧芳(1974-),女,山西孟县人,研究员,博士,主要从事家禽遗传育种与家禽资源保护研究。

甲状腺激素(Thyroid hormones, THs)是由甲状腺合成和分泌,它通过调节下游基因的表达影响大量的生物功能^[1],已有研究表明,THs对肌肉组织的正常发育必不可少^[2-3],骨骼肌是THs作用的主要靶组织^[4]。在禽类,THs不足会影响处于发育中的运动肌肉质量和肌肉线粒体酶的最大活性^[5-6]。研究表明,在脊椎动物,THs在出生前后均发挥重要作用^[7]。THs产生的生物学效应主要是通过甲状腺激素受体(Thyroid hormones receptors, TRs)介导的,THs通过与TRs结合,调节相关基因的表达,从而发挥其生物学作用^[1,8],如维持机体内环境的稳定、促进细胞增殖和组织器官的成熟分化等。

TRs是核受体家族的一个成员,通过与广泛分布在各种组织中的甲状腺激素受体结合,作用于转录过程实现其对靶基因的正性/负性调节,对于机体的正常分化发育和代谢平衡具有十分重要的作用。*TRβ*基因产生的转录本(Transcript)因选择性剪接或转录起始位置的不同而产生若干同功体(Iso-form)^[9]。目前在禽类已发现的TRs包括TR-α、TR-β0和TR-β2共3种同功体^[4,10]。

目前,对哺乳动物TRs的研究较多,但对家禽TRs基因的研究相对较少,尚未见有关鸭胚胎期骨骼肌组织中*TRβ* mRNA表达规律的研究报道。本试验采用实时荧光定量PCR的方法检测了生长速度差异较大的高邮鸭和金定鸭胚胎期和出雏早期腿肌和胸肌中*TRβ* mRNA的表达量,分析比较2个品种的胸腿肌中*TRβ* mRNA的表达量变化,同时对胸腿肌中*TRβ* mRNA表达量与胸腿肌重的相关性进行了分析,探索*TRβ*基因在鸭早期发育过程中的作用,为进一步揭示*TRβ*基因的表达调控机制及在生产实践中调控鸭生长发育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验动物

分别选用高邮鸭和金定鸭作为生长速度差异较大的鸭种的代表。种母鸭产蛋期在相同的日粮水平下,收集种蛋,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组种蛋随机置入同一孵化箱,在相同条件下同时孵化。种蛋入孵后24 h设定为1胚龄,分别于5个时间点(17、21、25、27胚龄和出雏后7日龄)采集胸肌和腿肌组织样品,置于液氮速冻,然后转入-80℃冰箱保存。每个时间点每个品种采集16只,公母各半。

1.2 主要试剂和仪器

Trnzol-A+总RNA提取试剂(DP421)、SuperRe-

al Pre Mix(SYBR Green, FP204-01)、Quant cDNA第1链合成试剂盒(QuantScript RT Kit, KR103-04)、pGM-T克隆试剂盒(VT302-02)、质粒小提试剂盒(TIAN prep Mini Plasmid Kit, DP103-02)、DNA产物纯化回收试剂盒(TIAN quick Midi Purification Kit, DP204-02)购自TIANGEN公司;DNA Marker DL2000为TakaRa公司产品;琼脂糖和DEPC为Promega公司产品。

荧光定量分析采用Stratagene公司的Mx3000P型PCR仪,PCR仪(Eppendorf mastercycler);凝胶成像系统(Tanon 3500R);紫外分光光度计(GeneQuant II, Pharmacia Biotech);高速冷冻离心机(Eppendorf centrifuge 5417R)。孵化采用德州科裕孵化有限公司的孵化器。

1.3 试验方法

1.3.1 RNA提取和质量检测 采用TRnzol法提取胸肌和腿肌组织的总RNA;组织总RNA提取按照Trnzol-A+总RNA提取试剂的说明书进行,提取的RNA沉淀用适量的DEPC水溶解后,进行琼脂糖电泳检测,分光光度计检测RNA纯度和含量,保证RNA样品质量可靠。

1.3.2 cDNA第一链的合成 经检测合格并定量的总RNA参照cDNA第一链合成试剂盒说明书逆转录成cDNA,在冰浴的试管中加入如下反应混合物:模板RNA 1 μg, 10×RT mix 2 μL, Oligo-dT(18)(1 μmol/L) 2 μL, 超纯dNTP Mix(0.25 mmol/L each dNTP) 2 μL, Quant Reverse Transcriptase 1 μL, 加水至20 μL, 37℃孵育60 min, 置冰上进行后续试验或冷冻保存。用管家基因*GAPDH*检测cDNA合成质量以及是否有基因组DNA残留。

1.3.3 引物设计、目的片段的克隆和标准质粒制备

根据GenBank中鸭*TRβ* mRNA序列(登录号为:Z49151)设计引物,采用Primer Premier 5.0软件在外显子区设计*TRβ*基因PCR引物。

上游引物序列:5'-TATGTGTAGTATGTGGGGACAAAGC-3'

下游引物序列:5'-CTGGCACTGATTTCTTGTTACTTTG-3'

目的序列长度约170 bp。PCR反应体系总体积20 μL,退火温度60℃,35个循环,72℃延伸10 min。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测、回收纯化后与pGM-T载体连接构建重组质粒,转化感受态大肠杆菌(*E. coli*) TOP10,挑取转化子于含氨苄抗性的LB液体培养基中,37℃ 200 r/min振摇培养过夜,用PCR鉴定。将鉴定正确的质粒送上海生工

公司进行测序,引物序列合成及序列测定由上海生物工程技术有限公司完成。

1.3.4 荧光定量 PCR 反应 用 SYBR Green I 法进行荧光定量 PCR,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,20 μL 反应体系为: cDNA 2 μL,2 × SYBR Real-time PCR premix 10 μL,50 × ROX Reference Dye 0.4 μL,上下游引物各 0.8 μL,ddH₂O 6.8 μL。40 个 PCR 循环(95℃ 20 s;60℃ 15 s;72℃ 15 s),将标准质粒进行 10 倍梯度稀释制作标准曲线。扩增后进行溶解曲线分析。

Real-time PCR 反应为三步法:95℃ 15 min;95℃ 20 s,60℃ 15 s,72℃ 15 s,40 个循环;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s。每次反应均设阴性对照,用于标准曲线的标准品和待测样品(各重复 3 次,取 Ct 平均值)。

1.3.5 标准曲线的建立 将上述经测序验证后正确的含 *TR-β* 基因的质粒,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,做系列稀释,分别含有标准质粒的 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 倍拷贝数。以其作为模板,进行荧光定量 PCR 反应,反应条件同上,设置 3 个重复,建立标准曲线。标准曲线由系统软件自动分析,获得标准曲线方程、扩增效率及曲线拟合度(R^2)。

1.3.6 数据处理和统计分析 样本拷贝数的计算:

标准品拷贝数计算 样本分子量 = 碱基数 × 324

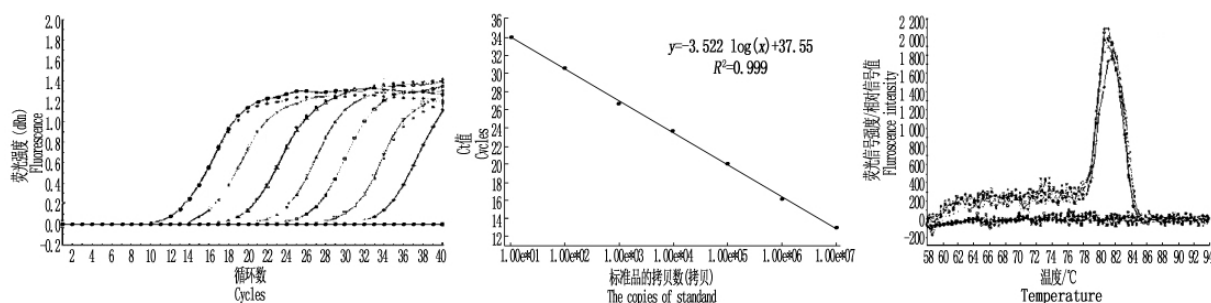


图1 *TR-β* mRNA 基因的标准曲线、融解曲线和扩增曲线

Fig.1 Standard curve, dissociation curve and amplification plots of *TR-β* gene

2.2 发育早期胸、腿肌的发育性变化

高邮鸭和金定鸭发育早期胸肌和腿肌的发育性变化如图2所示,2个品种胸肌和腿肌的发育总体均呈上升趋势。同一品种不同胚龄/日龄的胸肌重差异极显著或显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),腿肌重差异均极显著($P < 0.01$)。同一胚龄不同品种中,除7日龄的腿肌差异显著外,其他各发育时期差异均不显著。

2.3 发育早期胸、腿肌中 *TR-β* mRNA 表达的发育性变化

采用绝对定量方法,将每个样本的 Ct 值代入标

拷贝数($\text{Copies}/\mu\text{L}$) = 标准品浓度/样本分子量 $\times 6 \times 10^{14}$

根据得到的标准曲线方程: $y = -3.441 \log(x) + 38.71$,将得到的未知样本的 Ct 值代入线性方程即可得出未知样本的拷贝数。

运用 SPSS 软件中 One-way ANOVA 和 Bivariate Correlation 分析胸腿肌中 *TR-β* mRNA 表达量变化及其与胸腿肌重的相关性。所有数据以 Mean \pm 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 Real-time PCR 标准曲线、扩增曲线和溶解曲线

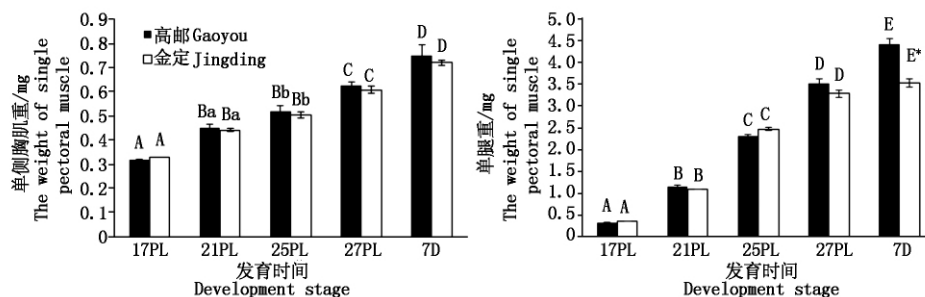
将计算好拷贝数的含 *TR-β* mRNA 基因的标准品质粒梯度稀释后进行定量 PCR 反应,得到标准曲线,曲线拟合度(R^2)达到 0.999,说明具有非常好的线性关系,可以进行准确的定量。溶解曲线峰形单一,说明反应特异性好,符合 SYBR Green 染料的检出要求。*TR-β* mRNA 基因的特异性扩增产物具有相同的峰值,重复性好,且无引物二聚体和非特异性峰的存在,说明产物的特异性较好,达到了荧光定量的要求(图1)。将标准品和样本在同一试验中运行,得到标准曲线方程: $y = -3.522 \log(x) + 37.55$ 。

准曲线方程,从而得到样本的拷贝数。不同发育时期两品种中 *TR-β* mRNA 在胸肌和腿肌中的表达量变化见图3。从图3可以看出,该基因在所检测的2个品种胸、腿肌组织不同发育时段均有表达,胸肌中的表达量极显著低于腿肌($P < 0.01$),拷贝数差异达2个数量级。

胸肌和腿肌中 *TR-β* mRNA 表达的发育性变化规律稍有不同。在胚胎期前期和中期,胸肌(至21胚龄)和腿肌(至25胚龄)中的 *TR-β* mRNA 表达量基本保持稳定上升趋势,胚胎后期均出现极显著的表达量增加($P < 0.01$)。但出壳后胸肌中的 *TR-β*

mRNA 表达量出现显著下降 ($P < 0.01$), 而腿肌仍维持高水平表达 ($P > 0.05$)。这种变化趋势在 2 个

品种间保持一致。

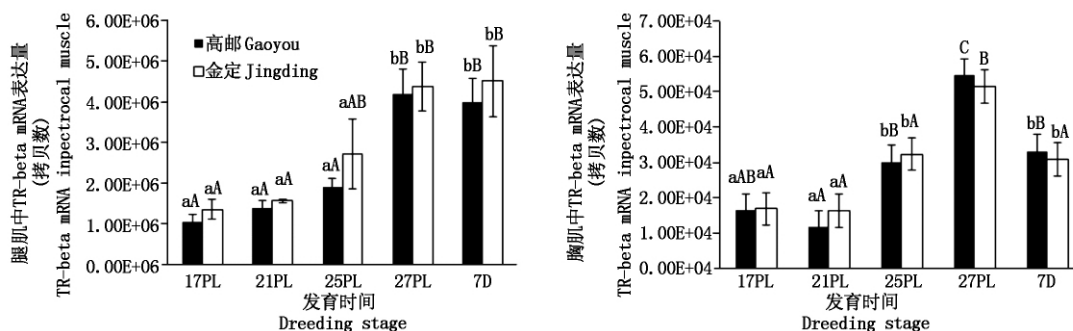


同一品种不同胚龄/日龄间不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。* 表示同一胚龄、日龄不同品种差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$); Different capital letters mean extreme significant difference ($P < 0.01$) in different early stage of the same breed. * Means significant difference ($P < 0.05$) in same early stage of the different breed.

图 2 高邮鸭和金定鸭胸腿肌的发育变化

Fig. 2 Development change of pectoral and thigh muscle in Gaoyou and Jinding duck breeds



同一品种不同胚龄间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 ($P < 0.01$)。表达量为 $1 \mu\text{g}$ mRNA 中所含拷贝数。Different lowercase letter means significant difference ($P < 0.05$); Different capital letter means extreme significant difference ($P < 0.01$) in different embryo stage of the same breed. Expression level is copies of $1 \mu\text{g}$ mRNA.

图 3 胸肌和腿肌在两品种的不同发育时期 $TR\beta$ mRNA 表达量

Fig. 3 $TR\beta$ mRNA abundance of pectoral and thigh muscle in two duck breeds at different developmental stages (copies)

2.4 鸭发育早期胸腿肌中 $TR\beta$ mRNA 表达量与胸腿肌重的相关性

的表达与胸肌和腿肌重呈现程度不一的正相关, 2 个品种中腿肌的相关强度均略高于胸肌。

如表 1 所示, 不同品种鸭胸腿肌中 $TR\beta$ mRNA

表 1 鸭发育早期胸腿肌中 $TR\beta$ mRNA 表达量与胸腿肌重变化的相关性分析

Tab. 1 Correlation analysis of $TR\beta$ mRNA level with muscles weight in early development of duck pectorales and leg

参数	高邮鸭 Gaoyou		金定鸭 Jinding	
	胸肌 Pectoral muscle	腿肌 Leg muscle	胸肌 Pectoral muscle	腿肌 Leg muscle
相关系数 Correlation coefficient	0.473	0.508	0.541	0.557
P 值 P value	0.001	0.000	0.000	0.000

3 讨论

肉用型的高邮鸭和蛋用型的金定鸭是我国 2 个重要的地方鸭品种, 它们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。因此本研究以高邮鸭和金定鸭为研究素材, 首次分析不同品种鸭胚胎期和初生早期胸肌和腿肌中 $TR\beta$ mRNA 的表达规律, 以探讨 $TR\beta$ 在鸭肌肉早期生长发育中的作用。

有研究表明, 水禽被家养驯化之前, 是迁徙类动

物, 它们的子代为了适应长距离飞行, 在出生后不久会快速生长^[11-12]。特别是 1~7 周龄时, 幼雏刚刚开始飞行, 它们主要用于飞行的肌肉(胸肌)质量呈指数级增长。在藤壶鹅(黑雁), 胸肌快速生长的同时血液中甲状腺激素水平也相应地增加^[13-14]。Bishop 等^[4]用 RT-PCR 方法检测 8 周龄北京鸭胸肌、腿肌、心肌、肝、垂体、脑皮质等 6 个组织的 TRs mRNA, 结果发现各组织中均可检测到 $TR\beta$ mRNA 的表达量, 但腿肌中的表达量高于胸肌中的表达量。实验室在鸭繁殖期胸肌和腿肌等组织中也检测到

$TR\beta$ mRNA 的表达^[15],但未见有关鸭胚胎期骨骼肌组织中 $TR\beta$ mRNA 表达规律的研究报道。本研究首次比较了胚胎期和发育早期鸭胸腿肌中 $TR\beta$ mRNA 表达量的差异,结果表明,胚胎期和发育早期鸭胸腿肌中均表达 $TR\beta$ mRNA,但腿肌中的表达量显著高于胸肌中的表达量,差 2 个数量级,暗示 $TR\beta$ mRNA 的表达对水禽的运动肌肉(胸肌和腿肌)的发育,尤其是腿肌的发育可能具有重要作用。本研究结果显示,初生后 7 日龄时,腿肌 $TR\beta$ mRNA 表达量维持在较高水平,而胸肌中的 $TR\beta$ mRNA 表达量显著下降,进一步说明 $TR\beta$ 可能对水禽的腿肌发育具有重要作用。这种胸腿肌中 $TR\beta$ mRNA 发育性变化规律在 2 个品种间一致,表明 $TR\beta$ mRNA 表达具有显著的胚(日)龄依赖性,并存在组织差异,但无品种差异。

目前,对单个 TR 同功体作用于机体的具体功能尚不清楚,但 TRs 在肌肉组织中的特异性差异表达与获得和维持骨骼肌最佳功能有关^[16]。本研究中,不同品种鸭胚胎期和出生后早期胸肌和腿肌组织中 $TR\beta$ mRNA 表达水平分别与胸肌和腿肌重的相关性分析表明,不同遗传背景的品种鸭发育早期胸肌和腿肌组织 $TR\beta$ mRNA 表达与胸腿肌重的发育趋势一致,且呈显著正相关。揭示了在鸭胚胎期和发育早期 $TR\beta$ 对胸腿肌发育正调节作用。

由于 TRs 受 THs 本身的调节分成转录和转录后 2 个环节^[7],本试验仅在转录水平上对 $TR\beta$ 基因在鸭胚胎期和发育早期骨骼肌中的发育性变化及其对骨骼肌生长性状的影响进行研究,课题组还将进一步在蛋白水平上研究 TRs 在鸭骨骼肌生长发育中的变化及其对骨骼肌生长性状的影响。

参考文献:

- [1] Lazar M A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities [J]. *Endocrine Reviews*, 1993, 14 (2): 184 - 193.
- [2] Everts M E. Effects of thyroid hormones on contractility and cation transport in skeletal muscle [J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1996, 156: 325 - 333.
- [3] Harrison A P, Tivey D R, Clausen T *et al.* Role of thyroid hormones in early postnatal development of skeletal muscle and its implications for undernutrition [J]. *British Journal of Nutrition*, 1996, 76: 841 - 855.
- [4] Bishop C M, McCabe C J, Gittos N J L *et al.* Tissue-specific regulation of thyroid hormone receptor mRNA isoforms and target gene proteins in domestic ducks [J]. *Journal of Endocrinology*, 2000, 165: 607 - 615.
- [5] Deaton K E, Bishop C M, Butler P J. The effect of thyroid hormones on the aerobic development of locomotor and cardiac muscles in the barnacle goose [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 1997, 167(5): 319 - 327.
- [6] Deaton K E, Bishop C M, Butler P J. Tissue-specific effects of hypothyroidism on post-hatch muscle development in the barnacle goose [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1998, 201(6): 827 - 836.
- [7] Darras V M, Van Herck S L, Heijlen M *et al.* Thyroid hormone receptors in two model species for vertebrate embryonic development: chicken and zebrafish [J]. *Journal of Thyroid Research*, 2011, Article ID 402320.
- [8] 田娟. 鲟类变态发育基因($TR\alpha$ 、 $TR\beta$ 和 ALP) 的表达及其与甲状腺激素的关系 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2010.
- [9] 刘颖. 甲状腺激素受体新亚型 $TR\beta\Delta$ 的组织分布研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2009.
- [10] Sjoberg M, Vennstrom B, Forrest D. Thyroid hormone receptors in chick retinal development: differential expression of mRNAs for α and N-terminal variant β receptors [J]. *Development*, 1992, 114(1): 39 - 47.
- [11] Sedinger J S. Growth and development of Canada goose goslings [J]. *The Condor*, 1996, 88(2): 169 - 180.
- [12] Bishop C M, Butler P J, Egginton S *et al.* Development of metabolic enzyme activity in locomotor and cardiac muscles of the migratory barnacle goose [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269: 64 - 72.
- [13] Bishop C M, Butler P J, El Haj A J *et al.* The morphological development of the locomotor and cardiac muscles of the migratory barnacle goose (*Branta Leucopsis*) [J]. *Journal of Zoology*, 1996, 239(1): 1 - 15.
- [14] Bishop C M, Butler P J, El Haj A J *et al.* Comparative development of captive and migratory populations of the barnacle goose [J]. *Physiological Zoology*, 1998, 71(2): 198 - 207.
- [15] 李亨, 陈宽维, 李慧芳, 等. NPY 、 $TSH\beta$ 、 $CaBP-28K$ 基因在鸭繁殖期组织中的表达水平分析 [J]. *中国畜牧杂志*, 2011(17): 6 - 9.
- [16] Whitehead P, Dauncey M J. Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms is strikingly related to cardiac and skeletal muscle phenotype during postnatal development [J]. *J Mol Endocrinol*, 1999, 23(2): 241 - 254.