

MYCN 基因在鸡成肌细胞和胸肌组织表达及生长发育中变化

崔小燕^{1,2}, 汪芳杰³, 刘冉冉^{1,2}, 郑麦青^{1,2}, 文杰^{1,2}, 付睿琦^{1,2}, 姜润深³, 赵桂苹^{1,2*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193; 2. 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193;

3. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: MYCN 是癌基因中的核蛋白类调控基因。在前期采用 Illumina60kSNP 芯片开展的胴体性状的全基因组关联 (GWAS) 研究中发现, MYCN 基因与胸肌、腿肌重达显著相关。为进一步验证该基因在肌肉发育调控中的作用, 采用 Q-PCR 技术, 系统检测成肌细胞增殖分化期、胚胎发育后期和出生后 98 日龄肌肉组织中 MYCN 基因的 mRNA 表达量, 并比较 12 个组织的特异性表达差异。结果表明, 在鸡成肌细胞增殖、分化过程中, MYCN 基因 mRNA 表达量在分化期显著高于增殖期 ($P < 0.01$), 并随诱导分化时间的延长表达量上升; 在胚胎期 14~21 胚龄, mRNA 表达量随胚龄的延长而持续上升, 18 至 21 胚龄变化显著 ($P < 0.01$); 在出生后 98 日龄生产发育阶段, 在 0~14 日龄的表达量呈急剧下降趋势 ($P < 0.01$), 14 日龄后变化不显著 ($P > 0.05$)。通过 12 个组织特异性表达分析, MYCN 在胸肌、腿肌中的表达量仅次于大脑和下丘脑中中枢神经系统中的表达水平。综合各发育阶段的结果表明, MYCN 基因参与了肌肉组织发育的调控, 其功能主要作用在鸡胚胎发育后期至出生后 14 日龄之内。该研究为阐明鸡肌肉生长发育的遗传机制提供了理论依据。

关键词: 鸡; MYCN; 成肌细胞; mRNA 表达量; 肌肉发育

中图分类号: S831

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)01-0110-05

Developmental changes in the expression of the MYCN gene in chicken myoblast and breast muscle tissues

CUI Xiaoyan^{1,2}, WANG Fangjie³, LIU Ranran^{1,2}, ZHENG Maiqing^{1,2},
WEN Jie^{1,2}, FU Ruiqi^{1,2}, JIANG Runshen³, ZHAO Guiping^{1,2}

(1. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193;

2. State Key Laboratory of Animal Nutrition, Beijing 100193, China;

3. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: MYCN is a nuclear protein regulation gene in the oncogene. In our previous study, the results of genome-wide association studies (GWAS) on the carcass traits using Illumina60k SNP chip revealed that the MYCN gene was significantly correlated to breast and thigh muscle weights. To further validate the gene's role in muscle tissue development, mRNA expression of the MYCN gene in different muscle tissues at different developmental stages was determined using Q-PCR, including the myoblasts proliferation and differentiation stage, the late embryonic stage, and 0 to 98-day-old stage after births. The mRNA expression levels of the MYCN gene in 12 tissues were also compared. Results showed that: during the proliferation and differentiation of chick myoblasts, the mRNA expression level of MYCN was significantly higher in the differentiation stage than in the proliferation stage ($P < 0.01$); the expression level was increasing along with an extension of the embryonic period from the 14th to the 21th day after births. The change in the expression level reached significant between the 18th to the 21th days after births ($P < 0.01$). During the period from birth to the 98th day, the expression was sharply reduced ($P < 0.01$) before the 14th day and no significant change was observed afterwards. Although 12 tissue-specific expression levels were analyzed, MYCN expression levels in the breast and thigh muscles were lower than those in the hypo-

收稿日期: 2014-09-15

基金项目: 国家“863”计划课题 (2013AA102501), 中国农业科学院创新工程 (ASTIP-IAS04) 和营养学国家重点实验室自主课题 (2004DA125184G1101) 共同资助。

共同第一作者简介: 崔小燕, 博士。E-mail: cxyan813@163.com 汪芳杰, 硕士。E-mail: wangfangjie122@163.com

* 通信作者: 赵桂苹, 研究员。E-mail: zhaoguiping@caas.cn

thalamus of brain and central nervous system. Results from various developmental stages showed that the *MYCN* gene is involved in the regulation of muscle development, which plays a major role in chicken development from embryo to birth, especially in the stage from birth to late 14 days old. The study has laid a foundation to elucidate the genetic mechanisms of muscle growth in chicken.

Key words: chicken; *MYCN* gene; myoblast; mRNA expression; muscle tissue development

MYCN 是癌基因中的核蛋白类调控基因。它是碱性螺旋-环-螺旋转录因子 MYC 家族中的一员。含有螺旋-环-螺旋结构域(helix-loop-helix, HLH)的蛋白质是一类超家族蛋白,从细菌到哺乳动物中都广泛存在,且具有较高的保守性^[1]。在真核生物的生长发育调控过程中,螺旋-环-螺旋蛋白发挥着极为重要的作用。目前,已有很多 bHLH 家族成员被证实对动物肌肉的生长发育有重要作用,如作为 *bHLH* 转录因子家族成员之一的 MyoD 家族,是肌肉发育中特异性调控因子,只在肌肉组织中表达。*GRIP-1* 基因与 *MYCN* 是同属于一类 *bHLH* 转录因子成员。Chen 等人发现 *GRIP-1* 基因,通过作为 MEF-2 转录的一个活化剂,来强化骨骼肌的分化^[2]。目前对于 *MYCN* 的研究主要集中在其对人类肿瘤疾病的影响,而其在动物中的相关功能报道甚少。

在前期研究中,利用中国地方鸡种北京油鸡为素材,采用 Illumina60kSNP 芯片,开展了体重、胴体等重要经济性状全基因组关联(GWAS),结果发现,3号染色体 *MYCN* 基因相近的 Gga_rs14402759 SNP 标记与胸肌和腿肌重达到显著相关^[3],推测 *MYCN* 基因可能会影响鸡肌肉生长发育。为进一步证实 *MYCN* 基因在肌肉发育过程中的作用,本研究系统检测了成肌细胞增殖分化、胚胎发育至 98 日龄肌肉组织中 *MYCN* 基因的 mRNA 表达特性,为阐明鸡肌肉生长发育的遗传机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 成肌细胞的培养与诱导分化

取 16 日龄的 SPF 鸡胚常规消毒后取其胸肌,放入已加 D-Hanks 的培养皿中,剔除血管、脂肪、结缔组织,再将肌肉放入已加 D-Hanks 的锥形瓶

内,将锥形瓶内的肌肉尽量剪碎,吹打混匀,加入体积比 5%~10%的链霉菌蛋白酶(sigma),37℃水浴消化 20 min,然后加入含 15%胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化,依次滤过 200 目和 400 目细胞筛,滤液 1000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清,加入 D-Hanks 重悬细胞。采用 percoll 梯度离心法对细胞进行分离。取玻璃离心管,先加入 60% percoll 1.5 mL,再加 20% percoll 6 mL,最上层 2 mL 细胞悬液,2700 r·min⁻¹ 离心 25 min。吸掉上层细胞及液体,吸取界面处细胞加入另一离心管中。D-Hanks 吹打,1000 r·min⁻¹ 离心 5 min,去上清。加入含 15%胎牛血清的 DMEM/12 培养液重悬细胞接种于 6 孔板中,于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。分离获得的原代成肌细胞培养 72 h,收集细胞。当细胞生长至 80%时,将培养液更换为成肌诱导液:含 5%马血清的 DMEM 培养基。分别收集诱导后 12、24、48、72、96 和 120 h 的成肌细胞。

1.2 不同发育阶段肌肉组织基因表达检测

以北京油鸡为素材,在孵化期 14、16、18 和 21 日龄(分别记作 E14d, E16d, E18d, E21d)分别取各 6 枚鸡胚胸肌组织,用于提取组织 RNA。

在第 0、1、2、3、4、8、10、12 和 14 周龄时,分别随机选择 10 只体重相近的北京油鸡(母)屠宰,迅速采集胸肌和腿肌组织样品,液氮保存,用于提取组织 RNA。

1.3 组织特异性表达检测

随机选择 5 只体重相近的 14 日龄北京油鸡(母),屠宰后迅速采集胸肌、腿肌、心、肝、脾、肺、肾、小肠、肌胃、大脑和下丘脑、腹脂共 12 个组织样,液氮保存,用于提取组织 RNA。

表 1 实验所用引物相关信息

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequence of the primer	产物长度/bp Length	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>β-actin</i>	F: GAGAAATTGTGCGTGACATCA R: CCTGAACCTCTCATTGCCA	152	60
<i>MYCN</i>	F: AAACCCATGATCCAACCAAA R: ACGTGGTCCCTTAACGTGAG	146	60

1.4 引物设计

从 GenBank 获取红色原鸡 *MYCN* 基因(NM_

001031091.1),内参基因 *β-actin* (NM_205518.1) 的序列,应用 Primer premier 5.0 设计引物,由北京

华大基因合成。引物信息见表1。

1.5 RNA提取和cDNA第一链的合成

采用Invitrogen公司的TRizol试剂盒,根据说明提取总RNA,并取出1 μ L在1%琼脂糖凝胶上电泳测定其完整性,并用核酸蛋白仪测定总RNA浓度和纯度。利用反转录酶的反转录活性,将mRNA转录成cDNA第一链。反转录反应体系为25 μ L。包括总RNA 2 μ L, Oligo dT18(25 μ mol \cdot L $^{-1}$) 2 μ L; DEPC(0.1%)处理水 12.75 μ L; M-LV(200 U \cdot L $^{-1}$)反转录酶 1 μ L; RNA酶抑制剂 1 μ L, 10 mmol \cdot L $^{-1}$ 。dNTP Mix 1.25 μ L; 5 \times RT Buffer 5 μ L。样品总RNA、OligodT(18)和dNTPs在反转录前70 $^{\circ}$ C变性5 min,冰上放置5 min,再加入其余试剂,混匀后于42 $^{\circ}$ C反应60 min,95 $^{\circ}$ C变性5 min。反转录产物-20 $^{\circ}$ C保存备用。

1.6 实时荧光定量PCR

按SYBRGreen荧光定量PCR试剂盒的要求配置定量PCR反应体系:cDNA模板2.0 μ L,2 \times SYBR Green master Mix 10 μ L,上、下游引物(5 μ mol \cdot L $^{-1}$)各1 μ L,Rox reference Dye II(50 \times) 0.4 μ L, ddH $_2$ O补至20 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C,30 s;(95 $^{\circ}$ C,5 s;60 $^{\circ}$ C,34 s)40个循环,最后做溶解曲线收集信号的程序为95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s。基因相对表达量用2 $^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算;其中 ΔCT =目的

基因的 C_T 值-相应cDNA模板的 β -actin内参的 C_T 值, $\Delta\Delta CT$ =目的基因的 ΔCT 值-参照基因的 ΔCT 值。

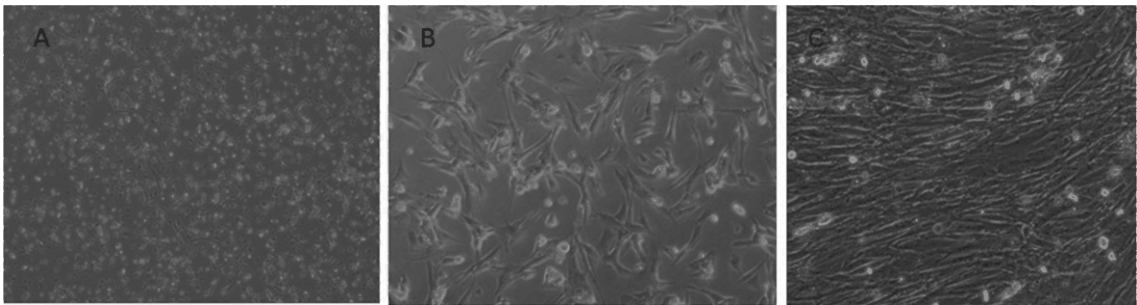
1.7 数据处理与分析

数据统计用SAS(V8.0)统计软件做单因子方差分析和相关性分析。数据均以“平均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)”表示,当 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 时认为具有统计学意义上的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 在成肌细胞增殖、分化过程中的表达变化

成肌细胞的增殖分化如图1所示。刚刚分离纯化的成肌细胞为圆形,24 h开始贴壁,大多数为圆形,少部分伸展为梭形,48 h后大部分细胞完全贴壁,大多数伸展为梭形,部分为圆形,而后逐渐都变为梭形细胞。分化期:加入诱导分化液第3天就开始有肌管形成,以后肌管(多于2个核)逐渐增多。本试验检测了培养72 h即肌细胞增殖期和诱导分化120 h成肌细胞中mRNA表达丰度的差异。结果显示在增殖期的成肌细胞中表达量显著低于分化后期的成肌细胞中的表达量($P<0.05$) (图2)。5%马血清的诱导分化后12至120 h的不同时期,MYCN基因的表达量随着诱导时间的延长而逐渐升高,96 h达到顶峰(图3)。



A.24h 细胞贴壁,呈圆形,少部分开始变为梭形;B.细胞贴壁延展成梭形或纺锤形;C.肌管形成

A: After cultivated for 24 h, cells appeared adherent and became round, and a few began to become fusiform; B: Adherent cells extended into spindle or fusiform; C: Myotube formation

图1 成肌细胞增殖和分化期电镜图

Figure 1 Proliferation and differentiation of myoblast under electron micrographs

2.2 在胚胎发育后期胸肌组织中表达变化

MYCN基因在14至21胚龄4个阶段胸肌组织中的表达变化见图4。由图4可见,mRNA表达量在4个胚龄间呈显著差异($P<0.05$),并呈逐步上升趋势,其中18 d至21 d变化幅度最大。

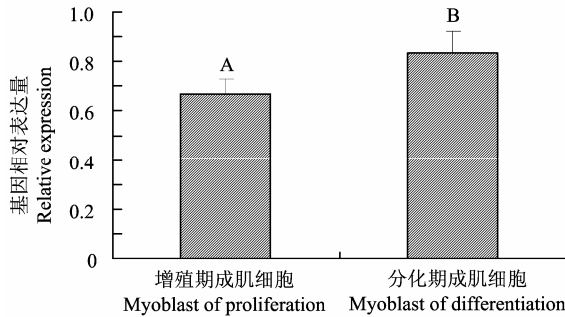
2.3 在不同生长发育阶段的表达变化

MYCN基因在鸡出雏至98日龄(14周龄)9

个阶段胸肌组织中的表达变化见图5。由图5可知,在9个时间点,出雏即0日龄mRNA表达量最高,28日龄表达丰度最低,从变化趋势分析,0~98日龄整体呈现下降趋势,0~14日龄下降幅度明显,0日龄与14日龄表达量差异极显著($P<0.01$)。14日龄后变化幅度不大,并维持较低表达水平。

以不同日龄的表达量与胸肌重进行相关分析发

现,二者呈中等程度的负相关($r=-0.56304^{**}$),与下降的表达趋势相吻合。



图中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

The different letters in the figure mean significant difference at the 0.05 level. The same below

图 2 *MYCN* mRNA 在增殖期成肌细胞与分化期成肌细胞中的表达量

Figure 2 The relative mRNA expression levels of *MYCN* gene in chicken myoblast of proliferation and differentiation

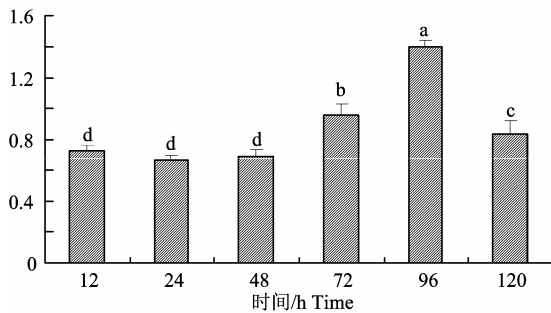


图 3 鸡 *MYCN* 基因在成肌细胞分化过程中的表达规律

Figure 3 The relative mRNA expression levels of *MYCN* gene in chicken myoblast at different differentiation stages

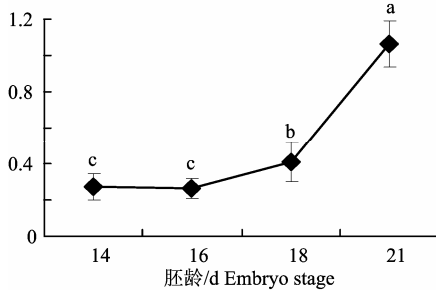


图 4 *MYCN* 基因在鸡胚胸肌组织中的表达特性

Figure 4 The relative mRNA expression levels of *MYCN* gene in chick embryo breast muscle at different development stages

2.4 组织表达特异性检测

为进一步验证 *MYCN* 基因的功能,比较了该基因在鸡 12 个组织的表达差异。由图 6 可见, *MYCN*

基因在 12 个组织中均有表达。mRNA 表达水平总体表现为: 大脑>下丘脑>腿肌>胸肌>脾脏>肺>肾>心脏>肝脏>肌胃>小肠>腹脂,其中在脑,下丘脑,胸肌和腿肌组织中显著地高于其他组织($P<0.05$)。

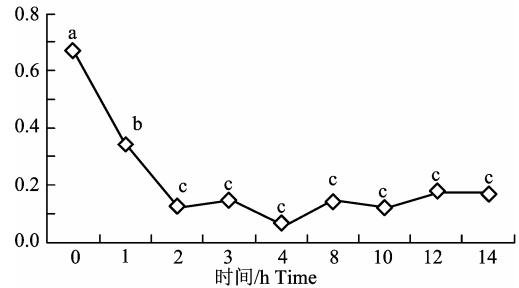


图 5 *MYCN* 基因在鸡胸肌组织中的表达特性

Figure 5 The relative mRNA expression levels of *MYCN* gene in chicken breast muscle at different development stages

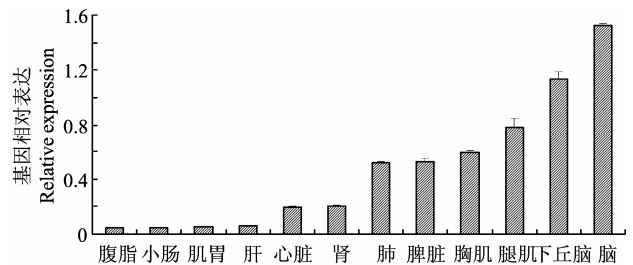


图 6 *MYCN* 基因在鸡各个组织中的相对表达量

Figure 6 The relative mRNA expression levels of chicken *MYCN* gene in different tissues

3 讨论

螺旋-环-螺旋家族成员以同源或异源二聚体的形式通过结合特异性 DNA 序列(E-Box)在动物的生长发育过程中起关键的调控作用,已知这些家族成员中有很多对于肌肉发育起到重要的作用,如作为 *bHLH* 转录因子家族成员之一的 *MYOD* 家族,是肌肉发育中特异性调控因子,其家族成员包括 *MyoD*、*Myogenin* 等,分别在肌管、肌源纤维形成等过程中发挥重要的作用^[4-5],幼鼠 *Myogenin* 的缺失会导致个体骨骼肌发育的受阻^[6]。有研究发现, *bHLH* 转录因子之一的 *Delilah* 能够与 E12 蛋白以异二聚体的形式结合到肌酸激酶启动子上,激活一部分表皮细胞基因的表达,在果蝇表皮细胞向肌肉附着位点的分化过程中起重要作用^[7]。*GRIP-1* 基因与 *MYCN* 是同属于一类 *bHLH* 转录因子成员。*Chen* 等人^[2]发现 *GRIP-1* 基因,通过作为 *MEF-2* 转录的一个活化剂,来强化骨骼肌的分化。

最早的螺旋-环-螺旋结构是在 *myc* 蛋白中发现

的^[8]。*MYCN* 是原癌基因家族 *MYC* 家族(*c-myc*, *MYCN* 和 *Myc1*)中的一员。因为 *MYCN* 本身具有很强的致癌潜能, 所以目前的研究都集中在其对肿瘤疾病方面的作用。在哺乳动物中的研究发现, *MYCN* 表达仅限于胚胎发育中, 小鼠 *MYCN* 基因的敲除可导致胚胎的死亡, 而转基因大鼠模型中过度表达 *MYCN* 导致肿瘤, 提示 *MYCN* 在胚胎和肿瘤发生发展中发挥重要作用。*N-MYC* 和 *C-MYC* 在小鼠中共同对造血干细胞的增殖、分化与存活发挥调控作用。*N-MYC* 和 *C-MYC* 的同时缺失会导致各类血细胞减少及个体的快速死亡^[9]。本实验中对 *MYCN* 基因的组织表达特性研究结果发现, *MYCN* 在大脑、下丘脑组织中均有高水平的表达。SAWAI 等人^[10]通过免疫印迹的方法对 3.5 日龄的鸡胚进行原位杂交分析结果显示, *MYCN* 在中枢神经系统, 胚芽间质中有高水平的表达。本研究结果与 SAWAI 等人的结果一致, 发现在鸡中枢神经系统中 *MYCN* 也有较高的表达。

有关 *MYCN* 基因的其他功能的研究和报道甚少。吴丹等^[13]在利用 60 K SNP 芯片进行胴体性状全基因组关联分析中发现, *MYCN* 基因附近的 *Gga_rs14402759* SNP 位点与腿肌重、胸肌重显著相关。Wright 等人^[11]通过对鸡 *MYCN* 基因的克隆, 对其序列进行分析发现, *MYCN* 的第九结构域与肌源性调节因子(MRFs)有很高的同源性。本研究中发现, *MYCN* 在胸肌、腿肌中也具有较高表达水平, 仅次于在大脑和下丘脑神经组织中的表达, 与胸肌重的相关分析表明, 二者呈中等程度的显著相关, 因此推测 *MYCN* 基因对于肌肉的生长发育具有重要的调控功能。

成肌细胞的增殖、迁移、黏附和融合形成肌管, 肌管进一步分化为成熟的肌纤维^[12]。肌纤维的发育主要在胚胎期完成。在鸡胚胎期肌肉发育过程中, 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 7~9 d, 第 2 个时期开始于第 11 天。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^[13]。本研究检测了 *MYCN* mRNA 在肌细胞增殖、分化期、胚胎期和生产发育期的表达量, 发现增殖期显著低于分化后期, 且随着分化时间的延长表达量逐渐升高, 此阶段的成肌细胞刚好处于肌管开始大量融合、进一步分化为成熟肌纤维; 而胚胎期 14

日龄后随着胚龄的延长而持续上升, 这一时期刚好处于成肌细胞退出细胞周期之后, 肌管进一步分化为成熟肌纤维的过程; 在出生至 98 日龄的生长发育阶段, *MYCN* 基因在 0~14 日龄的表达量呈急剧下降趋势, 14 日龄后变化不显著, 并维持在较低水平。表明 *MYCN* 基因主要在胚胎期对肌肉组织肌管发育以及肌纤维形成具有调控作用。综上所述, *MYCN* 基因参与了肌肉组织发育的调控, 其功能主要作用在鸡胚胎发育后期至出生后 2 周龄之内。

参考文献:

- [1] 赵晓玲. 螺旋-环-螺旋蛋白家族的分类和功能[J]. 细胞生物学杂志, 2009, 31(2): 205-211.
- [2] Chen S L, Dowhan D H, Hosking B M, et al. The steroid receptor coactivator, GRIP-1, is necessary for MEF-2C-dependent gene expression and skeletal muscle differentiation[J]. *Genes & Development*, 2000, 14: 1209-1228.
- [3] 吴丹. 北京油鸡体重和屠体性状的全基因组关联研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2012, 10.
- [4] Tapscott S J, Davis R L, Thayer M J, et al. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts[J]. *Science*, 1988, 242(4877): 405-411.
- [5] Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, et al. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect[J]. *Nature*, 1993, 364(6437): 532-535.
- [6] Meadows E, Cho J H, Flynn J M, et al. Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells[J]. *Dev Biol*, 2008, 322(2): 406-414.
- [7] Armand P, Knapp A C, Hirsch A J, et al. A novel basic helix-loop-helix protein is expressed in muscle attachment sites of the *Drosophila* epidermis[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(6): 4145-4154.
- [8] Laurenti E, Varnum-Finney B, Wilson A, et al. Hematopoietic stem cell function and survival depend on c-Myc and N-Myc activity[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 611-624.
- [9] Sauvageau G, Perreault C. Killer granzyme B linked to N-myc- and c-myc-dependent HSC survival: isn't that c-myc? [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 579-580.
- [10] Sawai S, Kato K, Wakamatsu Y, et al. Organization and expression of the chicken N-myc gene [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1990, 10: 2017-2026.
- [11] Wright W E, Sassoon D A, Lin V K. Myogenin, a factor regulating myogenesis has a domain homologous to MyoD[J]. *Cell*, 1989, 56: 607-617.
- [12] Swartz D R, Lim S S, Faseel T, et al. Mechanisms of myofibril assembly[J]. *Reciprocal Meat Conf Proc*, 1994, 47: 141-153.
- [13] O'Neill J. Growth and differentiation during myogenesis in the chick embryo[J]. *Dev Biol*, 1987, 120: 465-540.