

鸭发育早期骨骼肌 *TNNI1* 基因 mRNA 表达 及与肌纤维生长的相关性分析

姬改革, 单艳菊, 章明, 屠云洁, 巨晓军, 张笛, 束婧婷*

(江苏省家禽科学研究所, 扬州 225125)

摘要: 为探讨慢收缩骨骼肌型 Tnl (slow skeletal muscle troponin I, *TNNI1*) 基因在鸭早期肌肉发育中的 mRNA 表达规律及与肌纤维发育的相关性, 以地方品种高邮鸭为素材, 采用实时荧光定量 PCR 方法, 检测胚胎期 21、25、27 胚龄及出雏后 5 日龄时腿肌腓肠肌外侧头中 *TNNI1* 基因 mRNA 表达量, 结果发现, 25 胚龄是 *TNNI1* 基因的表达高峰期, 之后显著下调, 并持续至 5 日龄。肌纤维类型变化则是随着时间的推移, 慢肌纤维比例逐渐升高, 快白肌纤维比例逐渐下调; 25 胚龄时, 慢肌纤维直径和横切面积均出现显著增高 ($P < 0.05$), 快白肌纤维横切面积则出现下调; 之后, 3 种类型肌纤维直径和横切面积在各个时间点之间无显著差异 ($P > 0.05$); 相关性分析结果显示, *TNNI1* 基因 mRNA 表达量与快红肌纤维比例呈显著负相关 ($P < 0.05$), 与肌纤维直径、横切面积均无显著相关性 ($P > 0.05$)。提示 *TNNI1* 可能在鸭发育早期骨骼肌肌纤维类型转换中具有重要的作用。

关键词: *TNNI1*; mRNA 表达; 鸭; 肌纤维

中图分类号: S834.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)06-0992-04

Expression profiles of the *TNNI1* gene in the skeletal muscle and its correlation with the muscle fiber growth in early developmental ducks

Ji Gaige, SHAN Yanju, ZHANG Ming, TU Yunjie, JU Xiaojun, ZHANG Di, SHU Jingting

(Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125)

Abstract: In order to study the relationship between the expression of the slow skeletal muscle troponin I (*TNNI1*) gene and the growth of the muscle fiber in ducks at the early developmental stage, the mRNA of *TNNI1* at embryonic day 21, 25, and 27 and the 5-day-old Gaoyou duck was quantified by RT-PCR in Lateral gastrocnemius muscle. As results, the highest level appeared at embryonic day 25, then significantly decreased to a very low level, and maintained this relative low level until the duck was 5-day-old. As time went on, the proportion of the slow muscle fiber increased gradually, while the fast white muscle fiber gradually decreased. The diameter and cross-sectional area of the slow muscle fiber significantly increased, while the fast white muscle fiber decreased at embryonic day 25. After that, there was no significant difference in the diameter and cross-sectional area among the three muscle fibers ($P > 0.05$). The correlation analysis showed that the expression of *TNNI1* was significantly negatively correlated with the ratio of the fast red muscle fiber and there was no significant correlation between *TNNI1* expression and muscle fiber diameter and cross-sectional area ($P > 0.05$). In conclusion, these results suggested that the *TNNI1* gene might play an important role in transformation of skeletal muscle fiber type involved in the early growth of ducks.

Key words: *TNNI1*; mRNA expression; duck; muscle fibers

肌纤维是肌肉基本组成物质, 占据肌肉总体积的 75%~90%, 其类型的差异是影响肌肉品质的重

要因素。肌纤维类型根据标准不同, 分类方法不同。在禽类, 通常根据颜色、收缩和所含的酶系活性特

收稿日期: 2017-03-27

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK20151316), 江苏省六大人才高峰项目 (2015-NY-026), 扬州市现代农业项目 (YZ2015039) 和扬州市科技公共服务平台建设项目 (YZ2016221) 共同资助。

作者简介: 姬改革, 助理研究员。E-mail: jigaige@126.com

* 通信作者: 束婧婷, 副研究员。E-mail: shujingting@163.com

点, 可分为慢肌纤维 (I 型、红肌纤维、氧化型)、快红肌纤维 (IIa 型、快速氧化型) 和快白肌纤维 (IIb 型、快速酵解型)。大多数肌肉都是由氧化型和酵解型肌纤维共同组成的, 通常认为红肌比例较高的肉质相对较好。肌纤维类型并不是固定不变的, 受到品种、营养、运动和年龄等的影响而发生改变。胚胎期和出雏后早期, 是禽类肌肉生成和肌纤维类型转变的重要阶段^[1-2]。

研究发现, *TNNI1* 属于肌钙蛋白 I 的亚单位, 主要功能是通过与 Ca^{2+} 结合来调节肌肉的收缩^[3]。O'Mahoney 等^[4]研究发现, 给大鼠注射 *TNNI1* 报告基因质粒, 能够优先赋予慢收缩骨骼肌活性。Li 等^[5]对猪的研究发现, *TNNI1* 可能在肌肉发育和脂肪沉积方面具有重要作用。对羊的研究显示^[6], *TNNI1* 表达量与肌纤维的直径、横切面积等具有相关性。研究表明不同发育时期的蛋鸡骨骼肌中 *TNNI1* 基因表达量显著高于肉鸡^[7]。本课题组在前期研究中发现, *TNNI1* 可能在鸭早期肌肉发育中具有重要的作用。鉴于此, 用荧光定量 PCR 技术对 *TNNI1* 在鸭胚胎发育期及出雏后早期 5 日龄时腿肌腓肠肌外侧头中的表达量进行检测, 并与肌纤维性状进行关联分析, 为进一步深入研究该基因在鸭肌肉生长发育中的作用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

种蛋来源于江苏省高邮鸭集团饲喂的高邮鸭种群, 收集种蛋 80 个, 消毒后进行常规孵化。入孵后的 24 小时设定为 1 胚龄 (embryonic day, Ed), 出雏后当天记为 0 日龄 (day), 分别于 21 胚龄、25 胚龄、27 胚龄和 5 日龄时采集鸭两侧腿肌部位的腓肠肌外侧头, 置于液氮速冻, 然后转入 -80°C 冰箱保存。每个时间点采集 10 只, 公母各半。

1.2 试剂和仪器

5'-三磷酸腺苷二钠盐三水 (ATP disodium salt) 购自生工生物 (上海) 股份有限公司, 总 RNA 提取试剂, SuperReal PreMix (SYBR Green), Quant cDNA 第一链合成试剂盒购自 TIANGEN 公司; DNA Marker DL2000 为 TaKaRa 公司产品, 其他试剂自行配制。恒温冷冻切片机 (Leica CM 1805, Germany); 生物显微镜 (Leica DM1000, Germany), 显微数码摄影系统 (Leica DFC290, Germany); 9700PCR 仪和 Max3000P 荧光定量 PCR 仪 (爱普拜斯); 凝胶成像系统 (Tanon2500); 紫外分光光度计 (Nanodrop2000, Thermo Fisher Scientific)。

1.3 肌纤维组织学测定

采用肌球蛋白 ATPase 碱孵育法染色, 确定肌纤维类型, 具体方法参照 Guth 等^[8-9]的方法。每个样品做 5~10 张横切切片, 选取 7 个完整肌束, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析肌纤维类型、肌纤维直径和横切面积。

1.4 引物设计

根据 GenBank 中鸭的 *ACTB* mRNA 序列 (GenBank 登录号: NM_001310421) 和 *TNNI1* (GenBank 登录号: XM_005013734) 相关 mRNA 序列设计引物, 由上海英骏生物工程有限公司合成。*ACTB* 上游引物序列为 5'-CAAATGCTTCTAAACC GGAC-3', 下游引物序列为 5'-AACCTTCACCATTC CAGTTTT-3', 片段大小为 151 bp; *TNNI1* 上游引物序列为 5'-CTGCACGAGAAGGTTGAG-3', 下游引物序列为 5'-GCAGGTCAAGCACTTTGAT-3', 片段大小为 109 bp。

1.5 实时荧光定量 PCR

肌肉总 RNA 提取, 采用 Trizol 法。用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测提取的 RNA 样品质量和浓度。检测合格后, 取 2 μg 总 RNA, 反转录为 cDNA, 用内参基因检测 cDNA 合成质量以及是否有基因组 DNA 污染。合格后进行荧光定量 PCR 试验。目的基因和管家基因荧光定量 PCR 扩增采用 SYBR Green I 法, 反应总体积 20 μL 。反应体系如下: 2 \times SYBR Green Realtime PCR Master Mix 10 μL , 上下游引物各 0.4 μL ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), cDNA 模板 2 μL , 50 \times Rox Reference Dye 0.4 μL , 加 ddH₂O 6.8 μL 补足 20 μL 。反应条件为: 95°C 2 min; 95°C 20 s, 60°C 20 s, 72°C 60 s, 共 35 个循环; 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s。每次反应均设空白样品 (不含模板的反应体系) 为阴性对照, 每个样品设置 3 个重复。

1.6 统计分析

相对定量的结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行处理。采用 SPSS 20.0 统计分析软件中的 One-way ANOVA, LSD Test 进行组间差异显著性统计分析。基因表达与不同类型肌纤维比例、直径和横切面积等的相关性用 Bivariate Correlation 分析。

2 结果与分析

2.1 鸭发育早期骨骼肌中 *TNNI1* mRNA 的表达变化

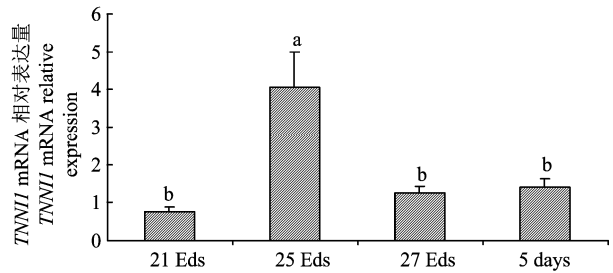
以 5 日龄肌肉中的 mRNA 表达量为对照, *TNNI1* 基因 mRNA 表达在鸭胚发育后期和出雏后早期腿肌腓肠肌外侧头中的变化规律如图 1 所示, 21 胚龄时

表达量较低, 25 胚龄时出现显著增高 ($P < 0.05$), 27 胚龄时显著降低, 并持续至出雏 5 日龄; 除 25 胚龄显著高于其他胚龄外, 其他胚龄之间差异均不显著 ($P < 0.05$)。

2.2 鸭发育早期骨骼肌中不同类型肌纤维比例, 直径和横切面积的变化

从表 1 可以看出, 总体上, 随着日龄的增长, 慢肌纤维比例逐渐增高, 快白肌纤维比例逐渐降低, 快红肌纤维比例变化不大。25 胚龄时, 慢肌纤维比例出现显著增高 ($P < 0.05$), 27 胚龄时则出现小幅下调, 5 日龄时, 又出现上升; 慢肌纤维直径、横切面积在 25 胚龄都出现显著增高 ($P < 0.05$), 之后变化不大, 至 5 日龄时, 各个时间点之间无显著差异 ($P > 0.05$)。快白肌纤维比例则是 21 胚龄最高, 25 胚龄显著下调 ($P < 0.05$), 至 5 日龄时, 下调至最低; 肌纤维直径无显著变化, 各个时间点之间无显著差异 ($P > 0.05$); 面积则是在 25 胚龄出现下调, 27 胚龄出现显著提高 ($P < 0.05$), 5 日龄时与 27 胚龄无显著差异 ($P > 0.05$)。快红肌纤维比例、直径

和面积的变化趋势基本一致, 都是 21 胚龄最低, 之后逐渐增高, 25 胚龄至 5 日龄时, 肌纤维比例、直径和面积在各个时间点之间无显著差异 ($P > 0.05$)。



Ed 表示胚龄, day 表示日龄; 柱形图上字母相同者表示差异不显著 ($P > 0.05$), 字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)

Ed indicates embryonic day, day indicates neonatal age. Different letters in the same line mean significant difference ($P < 0.05$). Bar diagram values with the same letter are not significantly different among ages ($P > 0.05$), and values with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

图 1 *TNNI1* 基因 mRNA 在鸭发育早期骨骼肌的表达情况
Figure 1 The profiles of *TNNI1* mRNA expression in ducks skeletal muscle during early development

表 1 鸭发育早期骨骼肌不同类型肌纤维比例、直径和横切面积的变化

Table 1 Changes of proportion, diameter and cross sectional area of different muscle fibre types in ducks during early development

肌纤维类型 Myofiber type	项目 Item	21 胚龄 21-Ed	25 胚龄 25-Ed	27 胚龄 27-Ed	5 日龄 5 days
慢肌纤维 Slow muscle fibers	比例/% Ratio	15.36 ^b ± 2.47	25.57 ^a ± 3.17	22.70 ^{ab} ± 0.76	32.23 ^a ± 3.92
	直径/ μm Diameter	4.20 ^b ± 0.57	6.28 ^a ± 0.47	6.29 ^a ± 0.59	6.62 ^a ± 0.30
	横切面积/ μm^2 Cross-section	27.07 ^b ± 4.43	39.93 ^a ± 4.87	41.00 ^a ± 5.47	42.38 ^a ± 4.35
快白肌纤维 Fast white muscle fibers	比例/% Ratio	55.74 ^a ± 3.80	46.32 ^{ab} ± 2.03	43.75 ^b ± 2.57	37.44 ^b ± 2.66
	直径/ μm Diameter	5.11 ^a ± 0.48	5.73 ^a ± 0.46	6.92 ^a ± 0.66	6.61 ^a ± 0.35
	横切面积/ μm^2 Cross-section	31.72 ^{ab} ± 3.38	28.32 ^b ± 2.41	46.32 ^a ± 6.87	46.09 ^a ± 6.19
快红肌纤维 Fast red muscle fiber	比例/% Ratio	28.90 ^a ± 2.29	28.10 ^a ± 4.10	33.57 ^a ± 2.58	30.32 ^a ± 4.21
	直径/ μm Diameter	4.84 ^b ± 0.43	5.71 ^{ab} ± 0.44	6.22 ^{ab} ± 0.59	6.69 ^a ± 0.37
	横切面积/ μm^2 Cross-section	27.47 ^b ± 2.37	35.41 ^{ab} ± 3.32	45.13 ^a ± 5.43	45.75 ^a ± 6.07

注: Ed 表示胚龄, day 表示日龄; 同一行内字母不同者表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Ed indicates embryonic day, day indicates neonatal age. Different letters in the same line mean significant difference among ages ($P < 0.05$).

2.3 鸭发育早期骨骼肌 *TNNI1* 基因 mRNA 表达量与肌纤维性状的相关性

从表 3 中可知, *TNNI1* 基因 mRNA 表达量与 3 种类型肌纤维的直径和横切面积均无显著相关 ($P > 0.05$); 与快白肌纤维比例呈正相关, 但相关性不显著 ($r = 0.095, P > 0.05$), 与慢肌纤维比例呈正相关, 相关性尚不显著 ($r = 0.390, P = 0.089$), 与快红肌纤维比例呈显著负相关 ($r = -0.442, P = 0.030$)。

3 讨论

本课题组在前期的研究中, 通过 RNA-Seq 技术对不同品种鸭 21 胚龄、27 胚龄及 5 日龄的胸肌组织进行了差异表达基因的筛选, 通过 GO 和 KEGG 分

析发现 *TNNI1* 基因可能在鸭早期骨骼肌生长发育中具有重要作用。研究结果显示^[10], *TNNI1* 在猪胚胎期 65 d 和出生后至 180 d 的肌肉中都有表达, 表达高峰期出现在胚胎期 65 d 和出生后 35 d; 对羊的研究表明^[6], *TNNI1* 基因在肌肉中的表达量随年龄的增加呈逐渐上升的趋势, 半岁时表达量最低, 2 岁之后趋于平衡; Wang 等^[7]检测了蛋鸡出雏后 2 周和 4 周时骨骼肌 *TNNI1* 基因的表达量, 发现出雏后 4 周龄时 *TNNI1* 基因的表达量显著高于 2 周龄。本试验结果显示, 25 胚龄是 *TNNI1* 基因表达的高峰期, 之后显著下调, 5 日龄时, 表达量有所上调, 但与 27 胚龄差异不显著。研究结果的不同, 可能与物种不同, 研究的发育时期不同有关。进一步对腿肌腓肠肌外

侧头进行肌纤维类型的检测, 结果发现, 在胚胎发育后期, 随着日龄的增长, 肌肉中快白肌纤维比例逐渐下调, 慢肌纤维比例逐渐提高, 至出雏后 5 日龄时, 3 种类型肌纤维比例相近, 说明在鸭发育早期, 骨骼肌肌纤维类型处于动态变化之中。25 胚龄至 5 日龄, 除了快白肌纤维横切面积在 25 胚龄出现下降, 慢肌纤维直径和横切面积在 25 胚龄出现增加外, 其他类型肌纤维的直径和横切面积变化在日龄间差异不显著, 与目前普遍认为的, 胚胎期是鸟类肌纤维数量形成的重要时期, 肌纤维直径的增大和长度的增加主要在出雏后的观点基本一致。

表 2 骨骼肌 *TNNI1* mRNA 表达量与不同类型肌纤维性状的相关性

Table 2 Correlations between *TNNI1* mRNA expression and muscle fiber traits in skeletal muscle

肌纤维类型 Myofiber type	项目 Item	相关系数 Correlation coefficient	P 值 P value
慢肌纤维 Slow muscle fiber	A	0.390	0.089
	B	0.121	0.572
	C	0.047	0.826
快白肌纤维 Fast white muscle fiber	A	0.095	0.659
	B	-0.088	0.682
	C	-0.227	0.287
快红肌纤维 Fast red muscle fiber	A	-0.442	0.030
	B	0.126	0.558
	C	-0.016	0.942

A: 比例/% Ratio; B: 直径/ μm Diameter; C: 横切面积/ μm^2 Cross-section.

TNNI1 基因表达量在 25 胚龄时上升, 而慢肌纤维比例在 25 胚龄时也出现上升, 快白肌纤维比例则出现下调, *TNNI1* 基因表达量在 27 胚龄时出现下降, 慢肌纤维比例也出现下调, 相关性分析也表明, *TNNI1* 基因表达量与快红肌纤维比例呈显著负相关, 与慢肌纤维比例正相关。推测 25 胚龄时, *TNNI1* 基因表达量升高, 加速了部分快白/红肌纤维向慢肌纤维转化, 慢肌纤维比例出现升高, *TNNI1* 基因可能在鸭发育早期慢肌纤维的形成方面具有重要作用。

吴婷婷^[6]在肉羊上的研究表明, *TNNI1* 基因在不同年龄段腹肌上的表达量与肌纤维直径和横切面积呈显著的正相关关系, 与之相反, 本试验结果显示, *TNNI1* mRNA 表达量与各种类型肌纤维的直径和横切面积都无显著相关。在哺乳动物上的研究表明^[11-13], *TNNI1* 基因在骨骼肌不同发育时段, 功能差异较大。在发育的早期阶段, *TNNI1* 基因在心肌和骨骼肌中都表达, 和 *TNNI2* 基因可以相互表达, 之后被限制在慢收缩骨骼肌中表达。在火鸡上的研

究显示^[14], *TNNI1* 基因在不同品系鸡 16 周龄的心肌中也出现表达。*TNNI1* 基因在鸟类可能存在不同于哺乳动物的功能与作用方式。在鸭发育早期, *TNNI1* 基因可能更多的参与肌纤维的生成与类型的转换, 对肌纤维直径、面积等的影响不大。

本研究通过检测鸭胚胎发育后期和出雏后早期骨骼肌中的 *TNNI1* 基因 mRNA 表达量, 并与肌纤维生长发育相关性状进行关联分析, 表明鸭胚胎发育后期和出雏后早期可能是鸭腿部骨骼肌肌纤维生成和类型转变的重要时期, *TNNI1* 基因可能在其中发挥了重要的作用。

参考文献:

- [1] 姬改革, 宋迟, 陶志云, 等. 外源 T3 对鸭胚骨骼肌发育和 MyoD mRNA 表达的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2015, 42(6): 949-954.
- [2] 李玥, 许雪萍, 杨晓静, 等. 早期限饲对肉鸡肌肉生长及肌纤维类型的影响[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(6): 855-860.
- [3] JURETIĆ N, URZÚA U, MUNROE D J, et al. Differential gene expression in skeletal muscle cells after membrane depolarization[J]. J Cell Physiol, 2007, 210(3): 819-830.
- [4] O'MAHONEY J V, GUVEN K L, LIN J, et al. Identification of a novel slow-muscle-fiber enhancer binding protein, MusTRD1[J]. Mol Cell Biol, 2000, 18(11): 6641-6652.
- [5] LI M, LI X, ZHU L, et al. Differential expression analysis and regulatory network reconstruction for genes associated with muscle growth and adipose deposition in obese and lean pigs[J]. Prog Nat Sci, 2008, 18(4): 387-399.
- [6] 吴婷婷. 天府肉羊 *TNNI1* 和 *TNNI3* 基因的克隆、表达及其与肌肉组织学性状相关性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- [7] WANG X J, YANG N, CHEN Y, et al. Systematic identification of genes involved in divergent skeletal muscle growth rates of broiler and layer chickens[J]. BMC Genomics, 2009, 10(1): 87.
- [8] GUTH L, SAMAHA F J. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase[J]. Exp Neurol, 1970, 28(2): 365.
- [9] 束婧婷, 宋迟, 徐文娟, 等. IGF-I-Ca²⁺-NFATc3 信号通路相关基因在鸭发育早期骨骼肌中的同步表达及其与肌纤维性状相关性[J]. 中国农业科学, 2015, 48(6): 1195-1204.
- [10] XU Z Y, YANG H, LI Y, et al. Temporal expression of TnI fast and slow isoforms in biceps femoris and masseter muscle during pig growth[J]. Animal, 2010, 4(9): 1541-1546.
- [11] MURPHY L M, JR T R, MORRIS M A. Adherence behavior among adolescents with type I insulin-dependent diabetes mellitus: the role of cognitive appraisal processes[J]. J Pediatr Psychol, 1998, 22(6): 811-825.
- [12] MYERS C D, GOH P Y, ALLEN T S, et al. Developmental genetic analysis of troponin T mutations in striated and nonstriated muscle cells of *Caenorhabditis elegans*[J]. J Cell Biol, 1996, 132(6): 1061-1077.
- [13] MULLEN A, BARTON P. Structural characterization of the human fast skeletal muscle troponin I gene (*TNNI2*) [J]. Gene, 2000, 242(1/2): 313-320.
- [14] REED K M. Differential cardiac gene expression in turkeys genetically selected for increased body weight[J]. J Veterinar Sci Technol, 2011, 7: 1-12.