

## CX3CL1 在不同品种鸡骨骼肌发育中的表达模式及相关性分析

刘龙洲<sup>1,2</sup>, 梁忠<sup>2</sup>, 黄华云<sup>2\*</sup>, 赵振华<sup>2</sup>, 黎寿丰<sup>2</sup>,  
杨焱<sup>1</sup>, 王钱保<sup>2</sup>, 李春苗<sup>2</sup>, 黄正洋<sup>2</sup>

(1. 长江大学动物科学学院, 荆州 434025; 2. 江苏省家禽科学研究所, 扬州 225125)

**摘要:** 趋化因子 CX3CL1 (chemokine (C-X3-Cmotif) ligand 1) 与受体 CX3CR1 结合后, 激活 MAPK 通路调控骨骼肌细胞的增殖和分化。以矮小品系 S2 系和隐性白羽鸡作为试验素材, 采用 Q-PCR 技术及 SPSS 分析软件, 研究 CX3CL1 在 2 个品种胚胎期至生长期骨骼肌发育中的表达模式及相关性分析。结果表明, 在 S2 系鸡, CX3CL1 在胚胎期胸肌组织的表达显著低于出雏后的各个发育时期 ( $P < 0.05$ ); 隐性白羽鸡 10 胚龄时 CX3CL1 的表达量显著高于其他胚龄及出雏后 4、6 和 8 周的表达 ( $P < 0.05$ ); 除 16 周龄以外, CX3CL1 在隐性白羽鸡胸肌组织各个时期的表达都显著高于 S2 系 ( $P < 0.05$ ); CX3CL1 的表达与胸肌率的相关性分析表明, CX3CL1 的表达与 2 品种胸肌率呈显著正相关。在腿肌组织中, CX3CL1 在 S2 系和隐性白羽鸡的表达呈现显著的品种差异性, 除 10 胚龄外, CX3CL1 在隐性白羽鸡其他发育时期的表达都显著高于 S2 系。综合 CX3CL1 在 2 品种的胸肌和腿肌组织中的发育模式及相关性分析表明, CX3CL1 在鸡胚胎期和生长期骨骼肌中的表达存在显著的品种和组织差异性。

**关键词:** 鸡; CX3CL1; 骨骼肌

中图分类号: S831.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)06-0996-04

### Expression and correlation of CX3CL1 in skeletal muscles of different breeds during the embryonic and growth period

LIU Longzhou<sup>1,2</sup>, LIANG Zhong<sup>2</sup>, HUANG Huayun<sup>2</sup>, ZHAO Zhenhua<sup>2</sup>, LI Shoufeng<sup>2</sup>,  
YANG Ye<sup>1</sup>, WANG Qianbao<sup>2</sup>, LI Chunmiao<sup>2</sup>, HUANG Zhengyang<sup>2</sup>

(1. College of Animal Science, Yangtze University, Jingzhou 434025; 2. Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125)

**Abstract:** Chemokine CX3CL1 (chemokine (C-X3-Cmotif) ligand 1), combined with receptor CX3CR1, activated the MAPK pathway and regulated the proliferation and differentiation of skeletal muscle cells. In this study, expression pattern of CX3CL1 in skeletal muscles was detected using Q-PCR and SPSS in S2 strain and Recessive White Rock chicken. In breast muscle tissues, CX3CL1 mRNA expression in embryonic period was significantly lower than that after hatching developmental stages ( $P < 0.05$ ) in S2 strain chicken. In Recessive White Rock chicken, CX3CL1 mRNA expression at 10-embryonic age (ED) was significant higher than that of other ED and 4-, 6- and 8-wk after hatching ( $P < 0.05$ ). CX3CL1 mRNA expression in Recessive White Rock chicken was significantly higher than S2 strains at every developmental stage except the stage of 16-wk ( $P < 0.05$ ). CX3CL1 mRNA was positively correlated with the rate of pectoral muscle in two breeds. The CX3CL1 expression in leg muscle presented significant breed difference. CX3CL1 mRNA expression in Recessive White Rock chicken was significantly higher than S2 strains at every developmental stage except the stage of 10-ED ( $P < 0.05$ ). Results from various developmental stages in breast and leg muscle tissues showed CX3CL1 mRNA expression in skeletal muscles presented significant breed and tissue difference.

**Key words:** chicken; CX3CL1; skeletal muscles

收稿日期: 2017-04-06

基金项目: 十三五科技支撑计划 (2015BAD03B03), 江苏省自然科学基金 (BK20140498 和 BK20151315), 扬州市现代农业项目 (YZ2015041) 和现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-42-Z06) 共同资助。

作者简介: 刘龙洲, 硕士研究生。E-mail: 826062982@qq.com

\* 通信作者: 黄华云, 副研究员。E-mail: huanghuayun520@163.com

肌肉组织的发育过程, 是蛋白质增加和细胞增殖分化的过程, 这个发育到成熟的过程极其复杂<sup>[1]</sup>, 肌肉组织最主要的成分是肌纤维, 所以肌肉的产量主要是由肌纤维的体积和数量决定的。家禽中肌纤维的发育分为 2 个阶段: 胚胎期和出生以后。在胚胎期, 主要是成肌细胞增殖、分化、转移和融合等多个过程形成肌管, 肌管最后分化形成肌纤维。在鸟类中, 肌纤维总数在出雏前就已经确定, 出生以后肌肉量的增加主要是靠已有纤维的卫星细胞相互融合而使纤维膨大<sup>[2-3]</sup>。

趋化因子 *CX3CL1* (chemokine (C-X3-C motif) ligand 1, 也称 fractalkine, FKN), 是 1997 年才发现的 CX3C-类趋化因子中唯一的成员<sup>[4]</sup>, 它所具有的独特黏蛋白样杆状结构决定了 *CX3CL1* 具有游离型和膜结合型 2 种存在形式, 从而具有粘附和趋化双重作用<sup>[5]</sup>。研究表明 *CX3CL1* 是冠状动脉平滑肌 (coronary artery smooth muscle cell, CASMC) 强有效的有丝分裂原, 能抑制 ERK 或 PI3K 信号传导, 调控细胞的抗凋亡作用, 维系细胞的生存<sup>[6]</sup>。

在家禽上, 有研究报道 *CX3CL1* 通过各种信号通路调控鸡不同组织抗炎症以及抗感染作用<sup>[7-8]</sup>。*CX3CL1* 对鸡骨骼肌发育调控的相关报道较少。为此, 本试验采用肌肉发育具有显著性差异的矮小品系 S2 和隐性白羽鸡为试验素材, 测定 *CX3CL1* 在胚胎期及出雏后不同发育时期肌肉组织中的表达变化, 探讨 *CX3CL1* 在鸡不同阶段肌肉发育中的作用, 为进一步研究 *CX3CL1* 在鸡骨骼肌发育中的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验采用的生长速度较慢的地方选育品种矮小品系 S2 (dw) 和生长速度较快的国外品种隐性白羽鸡 (RR) 均来自于江苏省家禽科学研究所邵伯试验基地。分别在试验鸡胚胎期 10 胚龄 (10 Ed), 15 胚龄 (15 Ed), 16 胚龄 (16 Ed), 17 胚龄 (17 Ed), 19 胚龄 (19 Ed); 出生当天 0 日龄 (0 d), 2 周龄 (2 w), 4 周龄 (4 w), 6 周龄 (6 w), 8 周龄 (8 w), 16 周龄 (16 w), 采集鸡的胸肌和腿肌组织, 每个时间点 5 个重复, 采集好的样本迅速放入液氮中冷冻, -80℃ 条件下保存备用。

### 1.2 RNA 的提取

利用总 RNA 提取试剂盒 (天根, DP419, 北京) 提取胚龄以及周龄胸肌和腿肌组织总 RNA。琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性, 并经核酸定量仪

NanoDrop2000 (Thermo scientific, 美国) 测定浓度及根据  $A_{260}/A_{280}$  值确定 RNA 纯度。

### 1.3 Q-PCR 引物设计

在 NCBI 上查找 *CX3CL1* (AM398231) 和 *HSP70* (AY143693) 序列, 根据实时荧光定量 PCR 引物设计原则, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *CX3CL1* 基因引物 (F: 5'-TGCTGTGACATCGGGAGT-3' 和 R: 5'-CCGCAGCACTTGTAGCAT-3') 以及 *HSP70* 基因引物 (F: 5'-TCTGCTCCTGTTGGATGTC-3' 和 R: 5'-TGGAATGGTGGTGTACG-3'), 扩增片段大小分别为 191bp (*CX3CL1*) 和 95 bp (*HSP70*), 并由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。

### 1.4 cDNA 的合成和 Real-Time PCR

cDNA 反转录根据 PrimerScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 说明书进行, 反应温度设置为 37℃ (15 min), 85℃ (5 s), 4℃ (1 min), -20℃ 保存备用。

Q-PCR 参照 QuantiNova SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, 美国) 试剂盒说明进行。采用 10 μL 体系 (Mix: 5 μL; ROX: 1 μL; Primer A<sup>+</sup>: 0.5 μL; Primer B<sup>+</sup>: 0.5 μL; ddH<sub>2</sub>O: 1 μL; cDNA: 2 μL), 反应条件为: 95℃ 预变性 2 min, 然后 40 个循环 (95℃: 5 s; 60℃: 10 s), 扩增结束后进行溶解曲线分析, 每个样品 3 个技术重复。以隐性白羽鸡 0 日龄 (0 d) 的表达量作为参照日龄, *HSP70* 作为内参基因。

### 1.5 数据统计与分析

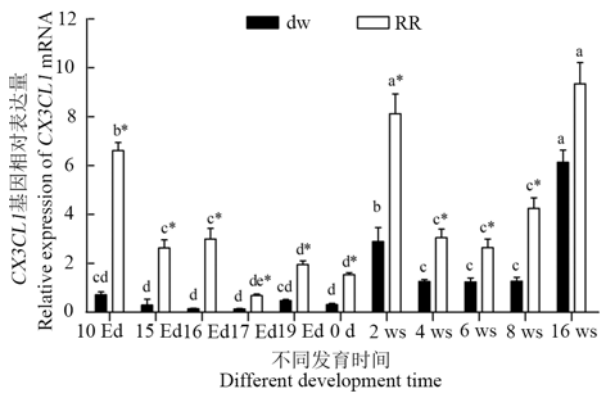
基因相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法计算, 其中  $\Delta C_T =$  目的基因的  $C_T$  值 - 内参基因的  $C_T$  值,  $\Delta\Delta C_T =$  目的基因的  $\Delta C_T$  值 - 内参基因的  $\Delta C_T$  值。定量结果以  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  相对定量的方法进行显著性分析<sup>[9]</sup>。

运用 SPSS20.0 软件中 One-way ANOVA 分析品种和组织对基因表达的影响。所有数据以 Mean ± SD 表示,  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 *CX3CL1* 在不同品种胚胎期及出雏后不同发育时期胸肌组织的表达变化

Q-PCR 结果表明, *CX3CL1* 在胸肌组织中的表达模式存在一定的品种差异性。在 S2 系鸡, *CX3CL1* 在胚胎期的表达显著低于出雏后的各个发育时期 ( $P < 0.05$ ), 到 2 周龄时表达量出现上升趋势, 到 16 周龄至表达高峰。隐性白羽鸡中, 在 10 胚龄时 *CX3CL1* 的表达量显著高于其他胚龄 ( $P < 0.05$ ), 也是在 16 周龄表达至高峰。除 16 周龄以外, *CX3CL1* 在隐性白羽鸡各个时期表达都显著高于 S2 系鸡 ( $P < 0.05$ )。



dw 表示矮小品系 S2, RR 表示隐性白羽鸡。相同字母表示同一品种不同发育时间 CX3CL1 在胸肌中表达差异不显著 ( $P>0.05$ ), 不同字母表示同一品种不同时期 CX3CL1 表达差异显著 ( $P<0.05$ ); “\*”表示不同品种同一发育时期差异显著 ( $P<0.05$ ), 下同。

dw shows the S2 strain, RR shows Recessive White Rock chicken. Bar diagram values with the same letter is not significant ( $P>0.05$ ), and the different letter are significant ( $P<0.05$ ) between different ages in the same breed ( $P<0.05$ ); “\*” notes significant difference at the same age and different breeds. The same below.

图 1 CX3CL1 在胸肌组织中的表达量

Figure 1 The expression of chicken CX3CL1 in breast muscle

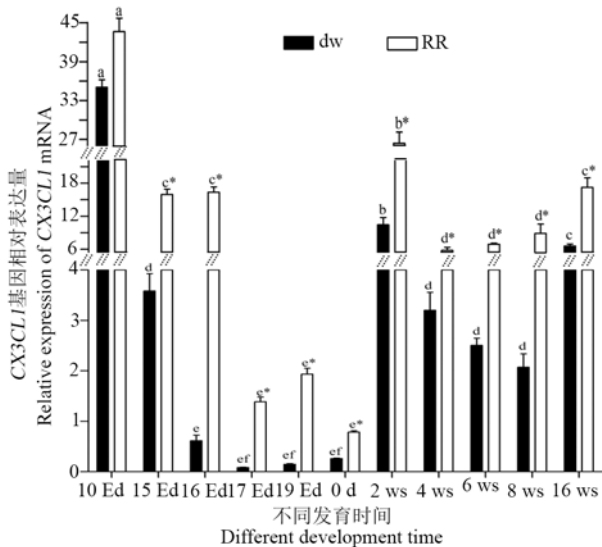


图 2 CX3CL1 在腿肌组织中的表达量

Figure 2 The expression of chicken CX3CL1 in leg muscle

### 2.2 CX3CL1 在不同品种胚胎期及出雏后不同发育时期腿肌组织的表达变化

Q-PCR 结果表明, CX3CL1 在腿肌组织中的表达模式也存在一定的品种差异性。在 S2 系鸡, 10 胚龄时 CX3CL1 的表达显著高于其他胚龄, 并随着胚龄的增加表达量逐渐下降, 但出雏后 2 周龄时出现高表达; 隐性白羽鸡中, 在 10 胚龄时 CX3CL1

的表达显著高于其他发育时期 ( $P<0.05$ ), 这种高表达水平一直持续到 17 胚龄, 2 周龄时出现高表达。除了 10 胚龄以外, CX3CL1 在隐性白羽鸡其他发育时期的表达都显著高于 S2 系鸡 ( $P<0.05$ )。

### 2.3 CX3CL1 的表达与胸肌率和腿肌率相关性分析

分析胸肌中 CX3CL1 表达量与不同品种鸡胸肌率和腿肌率的相关性, 结果表明: 在 S2 系鸡, CX3CL1 表达量与胸肌率呈高度正相关 ( $r=0.847$ ,  $P=0.000$ ), CX3CL1 表达量与腿肌率相关性不显著 ( $P=0.820$ ); 隐性白羽鸡中, CX3CL1 表达量与胸肌率也呈显著正相关 ( $r=0.665$ ,  $P=0.000$ ), CX3CL1 表达量与腿肌率相关性也不显著 ( $P=0.228$ )。

## 3 讨论

CX3CL1 在大鼠的心、脑、肺、肾、骨骼肌及睾丸等组织中都表达<sup>[10]</sup>。CX3CL1 与其特异性受体 CX3CR1 结合后可以激发多通道的信号转导途径, 进而激活许多与肌肉发育相关的蛋白激酶的表达, 如: 酪氨酸蛋白激酶、钙调蛋白、PKC、蛋白激酶 B、MAPK 和 NF- $\kappa$ B<sup>[11]</sup>; 相关研究证实, CX3CL1 与其受体结合激活 MAPK, 从而通过调控基因转录及表达而调控骨骼肌细胞增殖和分化<sup>[12-15]</sup>。综上所述, CX3CL1 可能在骨骼肌发育过程中起重要的作用, 而 CX3CL1 在鸡骨骼肌发育中的作用并未见报道, 本试验研究 CX3CL1 在胚胎期至出雏后不同时期在不同品种骨骼肌中的表达差异, 为进一步探讨 CX3CL1 在肌肉发育中的作用机制奠定基础。

本研究发现, 在胸肌组织中, 从胚胎期开始在隐性白羽鸡 10 胚龄时 CX3CL1 表达量显著高于 S2 系鸡, 这种差异性趋势一直持续到 8 周龄, 16 周龄至表达高峰; 而在腿肌组织中, 10 胚龄时, CX3CL1 在 2 品种中的表达至高峰; 15 胚龄开始, 隐性白羽鸡 CX3CL1 表达量显著高于 S2 系鸡, 这种显著性差异也是一直持续到 8 周龄。研究表明 CX3CL1 表达呈现明显的品种和组织差异性。隐性白羽鸡在 8 周龄时体重已达到上市日龄<sup>[16]</sup>, 从出生到 8 周龄是隐性白羽鸡快速生长期, 而 16 周龄已到 S2 系的上市日龄, 隐性白羽鸡胸腿肌发育已到平台期, 出现 CX3CL1 在 16 周胸、腿肌都呈现高表达。因此, 推测 CX3CL1 的表达与可能鸡的骨骼肌发育密切相关。CX3CL1 的品种和组织差异性表达, 为进一步研究其调控肌肉发育的分子机制提供了理论依据。

### 参考文献:

[1] TE PAS M F, DE WIT A A, PRIEM J, et al. Transcriptome

- expression profiles in prenatal pigs in relation to myogenesis[J]. *J Muscle Res Cell M*, 2005, 26(2/3): 157-165.
- [2] GROUNDS M D. Towards understanding skeletal muscle regeneration[J]. *Pathol Res Pract*, 1991, 187(1): 1-22.
- [3] REMIGNON H, GARDAHAUT M F, MARCHE G, et al. Selection for rapid growth increases the number and the size of muscle fibres without changing their typing in chickens[J]. *J Muscle Res Cell M*, 1995, 16(2): 95-102.
- [4] BAZAN J F, BANCON K B, HARDIMAN G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif[J]. *Nature*, 1997, 385(6617): 640-644.
- [5] MENDEZ-ENRIQUEZ E, GARCÍA-ZEPEDA E A. The multiple faces of CCL13 in immunity and inflammation[J]. *Inflammopharmacology*, 2013, 21(6): 397-406.
- [6] WHITE G E, TAN T C, JOHN A E, et al. Fractalkine has anti-apoptotic and proliferative effects on human vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor signaling[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85(4): 825-835.
- [7] RANAWARE P B, ANAMIKA M, PERIYASAMY V, et al. Genome wide host gene expression analysis in chicken lungs infected with avian influenza viruses[J]. *Plos One*, 2016, 11(4): e0153671.
- [8] NII T, ISOBE N, YOSHIMURA Y. The effect of estrogen on the early cytotoxic response to IB virus infection in hen oviduct[J]. *Vet Immunol Immunop*, 2015, 164(1): 56-66.
- [9] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] COOLICAN S A, SAMUEL D S, EWTON D Z, et al. The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(10): 6653-6662.
- [11] ADI S, BIN-ABBAS B, WU N Y, et al. Early stimulation and late inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation by IGF-I: a potential mechanism mediating the switch in IGF-I action on skeletal muscle cell differentiation[J]. *Endocrinology*, 2002, 143(2): 511-516.
- [12] GRAHAM G J. D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39(2): 342-351.
- [13] GARCIA G E, XIA Y, CHEN S, et al. NF- $\kappa$ B-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and LPS[J]. *J Leukocyte Biol*, 2000, 67(4): 577-584.
- [14] COTTER R, WILLIAMS C, RYAN L, et al. Fractalkine(CX3CL1) and brain inflammation: Implications for HIV-1-associated dementia[J]. *J Neurovirol*, 2002, 8(6): 585-598.
- [15] CAMBINE B, POMERAANZ M, et al. Signal transduction pathways involved in soluble fractalkine-induced monocyte cell adhesion[J]. *Blood*, 2001, 97(7): 2031-2037.
- [16] 梁忠, 黄华云, 宋迟, 等. *FTO* 基因在不同品种鸡胚胎与生长期骨骼肌中的表达[J]. *安徽农业大学学报*, 2016, 43(5): 694-697.