论文

猪骨骼肌 *MyHC-IIb* 基因上调表达的分子机制张琪[†], 杜胭脂[†], 王鹏飞, 李艳平, 王力圆, 李毅, 孙亿, 姜运良^{*}

山东农业大学动物科技学院&动物医学院, 泰安 271018

[†] 同等贡献^{*} 联系人, E-mail: yljia723@aliyun.com

收稿日期: 2014-04-10; 接受日期: 2014-08-19; 网络版发表日期: 2014-11-26

转基因生物新品种培育科技重大专项(批准号: 2011ZX08009-004)、山东省农业良种工程(2013)和山东省科技发展计划(批准号: 2012GXG11308)资助项目

doi: 10.1360/N052014-00136

摘要 哺乳动物骨骼肌由各种不同类型的肌纤维镶嵌而成, 不同类型肌球蛋白重链的表达是造成不同类型肌纤维的主要原因. 目前已知的肌球蛋白重链家族包含 8 种亚型, 其中长白猪骨骼肌 *MyHC-IIb* 的表达量显著高于中国地方猪, 然而造成这种差异的分子机制未见报道. 本研究用荧光定量 PCR 证明了长白猪背最长肌中 *MyHC-IIb* mRNA 的表达量显著高于莱芜猪($P=0.013$). 删除实验结果表明, 从转录起始位点上游-1024 bp 删除到-187 bp 之后, *MyHC-IIb* 表达量显著下降, 分析发现, 在这段启动子区域内存在 3 个 E-box 序列; 分别突变这 3 个 E-box 序列后, *MyHC-IIb* 启动子驱动的荧光素酶活性显著下降($P=0.036$). 另外, 在 *MyHC-IIb* 上游启动子区-1398 bp 处发现一个 G>T 的突变, 所检测的 64 头莱芜猪在该位点全部为 GG 型, 65 头长白猪中 13 头为 GG 型, 16 头为 TT 型, 36 头为 GT 型. 在 C2C12 细胞系中的转染实验结果显示, G 突变为 T 之后有增加 *MyHC-IIb* 表达的趋势. Western blot 的结果表明, 转录因子 MyoD 在两猪种间表达差异不显著($P=0.136$), 而 Myf-5 在长白猪中的表达量极显著高于其在莱芜猪中的表达量($P=0.0036$). 这些数据表明, Myf-5 是造成猪 *MyHC-IIb* 基因 mRNA 上调表达的重要因素之一.

关键词

猪

MyHC-IIb

上调

启动子

Myf-5

目前已知的哺乳动物肌球蛋白重链家族包含 8 种亚型^[1], 其中 4 种亚型(MyHC-I, MyHC-IIa, MyHC-IIx 和 MyHC-IIb)在成年骨骼肌中表达. MyHC-IIb 型肌纤维为快肌肌球蛋白重链, 是最大、收缩速度最快, 主要以糖酵解为主的肌纤维^[2]. 猪(*Sus scrofa*)的肉质性状越来越受到关注. 莱芜猪是中国优秀地方品种, 具有超强的肌内脂肪沉积能力. 肉质性状除了与肌内脂肪含量有关以外, 也和组成骨骼肌的各种肌纤维的比例有关. Guo 等人^[3]比较了金华猪和长白猪骨

骼肌中 *MyHC-IIb* 基因的表达情况, 证明该基因在中国地方猪种中的表达量低于其在商品猪种中的表达量, 并且 *MyHC-IIb* 的表达量越高, 瘦肉率越高, 产肉能力越强. 呼红梅等人^[4]分析了莱芜猪和杜洛克猪肌肉肌球蛋白重链组成对肉质性状的影响, 认为 *MyHC-IIb* mRNA 的表达量越高, 大理石纹和肌内脂肪越低, 嫩度剪切值和肌纤维直径越高. 可见, *MyHC-IIb* 表达量的高低可以在一定程度上影响肉质性状, 过高的表达虽然使得瘦肉率提高, 却也带来了

引用格式: 张琪, 杜胭脂, 王鹏飞, 等. 猪骨骼肌 *MyHC-IIb* 基因上调表达的分子机制. 中国科学: 生命科学, 2015, 45: 35–42

Zhang Q, Du Y Z, Wang P F, et al. Molecular mechanism of up-regulating the expression of porcine *MyHC-IIb* gene in skeletal muscle. SCIENTIA SINICA Vitae, 2015, 45: 35–42, doi: 10.1360/N052014-00136

肉质下降。因此, 探讨 *MyHC-IIb* 基因表达的调控机制对于优质高产肉猪的生产有重要意义。

在哺乳动物 *MyHC-IIb* 基因表达调控的研究方面, 发现其启动子附近有一些肌肉特异性的调控元件, 包括肌原性调控因子(myogenic regulation factors, MRFs)、血清应答因子(serum response factor, SRF)和肌细胞促进因子 2(myocyte enhancer factor 2, MEF-2)可能的结合位点^[5-10]。其中 MRF 家族成员在肌肉生成过程中起着重要的作用, MyoD, Myf-5, myogenin (肌细胞生成素)以及 MRF4 在 C3H10T1/2 (10T1/2)细胞系中调控相应的生肌特异性基因(包括 *MyHC-IIb*)的表达^[11,12]。MRFs 中任意一个过表达将会增强已分化的 C2C12 肌管中 *MyHC-IIb* 启动子的活性^[9]。在调控 *MyHC-IIb* 基因表达的顺式元件方面, 转录起始位点上游 E-box(增强子盒, CANNTG, 潜在的 MyoD, Myf-5 结合位点)的存在对于体内 *MyHC-IIb* 基因的高水平表达是必需的^[10]。

鉴于 *MyHC-IIb* 基因的表达水平会对肉质产生影响, 本研究以瘦肉率和肉质性状存在明显差异的莱芜猪和长白猪为研究对象, 分别分析了调控猪 *MyHC-IIb* 基因表达的顺式作用元件和反式作用因子, 证明了 Myf-5 蛋白的表达量上升是上调猪 *MyHC-IIb* 基因 mRNA 表达的重要因素之一。

1 材料与方法

1.1 实验材料

用于 Western blot 分析的莱芜猪($n=5$)和长白猪($n=4$)分别购自莱芜原种猪场和济南长清猪场, 饲养至 65 天, 屠宰, 取背最长肌于液氮中冻存备用。用于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)检测的 64 头莱芜猪基因组为本实验室保存, 65 头长白猪基因组来自山东省农业科学院畜牧兽医研究所。除特别说明, 所用试剂均购自 TaKaRa 公司(大连)。引物均由生工生物工程股份有限公司(上海)合成。

1.2 总 RNA 的提取和反转录

取 100 mg 背最长肌组织, 用 TRIzol 试剂(Invitrogen, 美国)进行总 RNA 的提取, 使用无 RNase 的 DNase(Promega, 美国)纯化总 RNA。用分光光度计(Eppendorf, 德国)测定总 RNA 在 260 和 280 nm 处的吸光度以检测其纯度和浓度。按 PrimeScriptTM RT

Reagent Kit 逆转录试剂盒说明书中的体系混合 2 μ g 总 RNA, oligo(dT)₁₈, 10 mmol/L dNTPs 和逆转录酶, 然后在 PCR 扩增仪(Eppendorf, 德国)中按照 37°C 15 min, 85°C 15 s 进行反转录, 得到的 cDNA 放在 -20°C 冰箱中备用。

1.3 实时荧光定量 PCR

根据猪 *MyHC-IIb* 基因的 mRNA 序列(GenBank 登录号: NM_001123141.1)设计引物(表 1), 上游引物位于外显子 11, 下游引物位于外显子 12, 扩增片段为 217 bp。在实时荧光定量 PCR 仪 MX3000p (Stratagene La Jolla, 美国)上进行扩增, 15 μ L 反应体系包括 2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq II 7.5 μ L, 50 $\times$ Rox Reference Dy II 0.3 μ L, cDNA 1.0 μ L (1:5 稀释), *GAPDH* 和 *MyHC-IIb* 的上下游引物各 0.5 μ L (10 μ mol/L)。PCR 扩增程序为: 95°C 30 s 激活反应, 然后 95°C 5 s, 57°C 30 s, 72°C 25 s 进行 40 个循环。结果按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行分析。每个反应重复 3 次, 每个样品重复 3 次。

1.4 *MyHC-IIb* 启动子的克隆及多态性分析

根据猪 *MyHC-IIb* 的基因序列 (Gene ID: 100144306)设计引物(表 1), 扩增该基因启动子区片段 2102 bp(-2091~+11 bp)。25 μ L PCR 扩增体系包括 5 $\times$ HF Buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 1.25 μ L, phusionTM High-Fidelity DNA Polymerase(New England, 美国) 0.25 μ L 和基因组 DNA 0.5 μ L。扩增条件为: 98°C 预变性 30 s, 98°C 变性 10 s, 64.5°C 退火 30 s, 72°C 延伸 70 s, 33 个循环, 72°C 10 min。基因组混池由莱芜猪、大蒲莲猪和长白猪、杜洛克猪、大约克猪基因组各 10 个混池而成。将 pGL3-Basic 载体(Promega)和扩增得到的猪 *MyHC-IIb* 启动子分别用 *Kpn* I 和 *Hind* III (Fermentas, 美国)限制性内切酶进行酶切。50 μ L 酶切体系含 10 $\times$ FastDigest[®] Green Buffer(Fermentas) 5 μ L, *Kpn* I 内切酶 3 μ L, *Hind* III 内切酶 3 μ L, pGL3-Basic 载体和 *MyHC-IIb* 启动子片段分别为 5 和 10 μ L, 37°C 酶切 6 h。启动子片段和 pGL3-Basic 载体的连接体系(10 μ L)包括 5 $\times$ Rapid Ligation Buffer(Fermentas) 2 μ L, T4 DNA Ligase(5 U/ μ L)(Fermentas) 0.5 μ L, pGL3-Basic 0.5 μ L, 目的片段 3 μ L, 22°C 连接 30 min。然后按常规方法进行转化和测序, 每个混池 DNA 所获得的克隆至少测

序 10 个以上, 测序结果用 DNAMAN 软件进行序列对比, 筛选多态性位点.

1.5 载体构建及质粒的去内毒素处理

有研究表明, 从转录起始位点上游 1 kb 的启动子区域足够赋予细胞肌肉特异性表达^[13]. 为了确定影响猪 *MyHC-IIb* 基因转录的顺式应答元件, 本研究以上述获得的猪 *MyHC-IIb* 基因启动子区 2102 bp 片段, 构建 pGL3-2.102k 载体, 并以 pGL3-2.102k 载体为骨架载体构建删除载体. 通过对 *MyHC-IIb* 启动子进行酶切位点分析, 筛选可用于删除实验的内切酶如下: (i) *Aat* II; (ii) *Msc* I; (iii) *Pst* I; (iv) *Nsi* I; (v) *Sna* B I (Fermentas). 分别用 *Kpn* I 和筛选得到的 (i)~(v) 内切酶对 pGL3-2.102k 载体进行双酶切和连接, 获得 pGL3-0.146k, pGL3-0.198k, pGL3-0.970k, pGL3-1.035k 和 pGL3-1.098k 载体. 用突变引物 mut-E-box1, mut-E-box2, mut-E-box3, mut-SNP(表 1) 按照以下体系扩增: 2×Primestar GC Buffer 12.5 μ L, dNTP Mixture 2 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, Prime STAR HS DNA Polymerase 0.25 μ L, 得到 4 个突变载体 pGL3-E-box1, pGL3-E-box2, pGL3-E-box3 和 pGL3-SNP. 使用无内毒素质粒提取试剂盒(Qiagen, 美国) 去除内毒素以获得转染用的质粒载体. 将预存的菌液取 200 μ L 转接到 100 mL LB(Luria-Bertani) 液体培养基(含氨苄抗生素)中 37°C 200 r/min 培养 12~16 h. 然后按试剂盒说明书对载体进行去内毒素处理.

1.6 C2C12 细胞培养与转染及 Dual-Luciferase[®] 报告基因检测

在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium)(Gibco, 英国)中培养小鼠 (*Mus musculus*) 成肌细胞系 C2C12, 培养条件为 37°C, 5% CO₂. 细胞转染前 1 天, 铺 0.5×10⁵~2×10⁵ 细胞在 500 μ L 无抗生素的生长培养基中. 细胞达到 90%~95% 融合时按照以下条件转染: Opti-MEM I Reduced Serum Medium(Gibco) 100 μ L, 实验载体 750 ng, 按实验载体: 内参载体为 40:1 的比例加入内参载体 pGL4.74(Promega). 加入 PLUSTM Reagents (Invitrogen) 0.75 μ L, 混匀, 室温静置 5 min, 再加入 LipofectamineTM LTX(Invitrogen) 3 μ L, 室温孵育 30

min, 每个实验载体做 3 个重复. 转染 6 h 后, 吸出原培养基换成 1 mL 新的培养基. 转染 48 h 后检测.

用 ModulusTM 单管型多功能检测仪(Promega)检测荧光素酶报告基因活性. 检测过程为: 吸去细胞培养板中旧的培养基, 用 1×磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)清洗细胞 2 次, 去掉清洗液. 每孔加入 1×PLB(passive lysis buffer; Promega) 100 μ L, 37°C 200 r/min 晃动培养板 15 min, 把裂解液转移到离心管中, 13000×g 离心 1 min, 取上清. 转移 20 μ L 上清到新的离心管中检测. 先加入 LAR II (Promega) 100 μ L 检测萤火虫荧光素酶活性值, 然后再向离心管中加入 Stop & Glo[®] Reagent(Promega) 100 μ L 检测海肾荧光素酶活性值. 两者的比值即载体的相对荧光值.

1.7 总蛋白的提取和蛋白浓度检测

用 Western 及免疫沉淀(immunol precipitation, IP) 细胞裂解液(碧云天公司, 上海)提取总蛋白. 取 100 mg 背最长肌组织研磨成粉末, 放进离心管中, 向离心管中加入 600 μ L 加了蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)的裂解液(裂解液: PMSF=99:1), 然后在超声破碎仪(Sonics, 美国)上进行超声破碎, 最后 4°C 15294×g 离心 5 min, 取上清即可. 提取的蛋白放在 -80°C 冰箱中保存. 用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(碧云天公司)检测蛋白浓度, 过程根据试剂盒中说明书进行. 使用超级酶标仪 Bio Tek Elx808(Gene, 美国)在 570 nm 吸光度下进行读数.

1.8 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹分析(Western blot)

蛋白质变性后上样 20 μ g 进行十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)(5% 上层胶, 12% 分离胶), 80 V 电泳 1 h, 再 120 V 电泳 1 h. SDS-PAGE 结束后 150 mA 转膜 2 h, 将蛋白质条带转移到硝酸纤维素膜上, 封闭液中封闭过夜. 分别以 1:800 比例稀释 GAPDH, MyoD 和 Myf-5 抗体(Santa Cruz, 美国), 用稀释后的抗体覆盖硝酸纤维素膜, 常温下孵育 1 h. Western 洗涤液洗 3 次,

表 1 用于猪 *MyHC-IIb* mRNA 定量及构建表达载体的引物

引物	序列(5'→3')	退火温度(℃)
qRT-PCR-MyHC-II b	F-GGGCTTCACTTCTGACGAA R-TGACAAACTCATTGCCGAC	57
qRT-PCR-GAPDH	F-ACTCACTCTTCTACCTTTGATGCT R-TGTTGCTGTAGCCAAATTCA	57
MyHC-II b-pGL3-2.098k	F-GAAATCTCTCCCTCATTGAGCG R-CTTATGTTACCAGATGAAGACGGT	64.5
mut-E-box1	F-GTATATGTAGAAGAACTGCTAGCTTTGCATCCC R-GGGATGCAAAGCTAGCAGTGTCTTCTACATATAC	64.2
mut-E-box2	F-ATCTCCATCCCTATAATGCCTCAAAGAACCC R-GGGTTCTTTTGAGGCATTATAGGGATGGAGAT	64
mut-E-box3	F-CCCCCAGTGAAAATGTGAGCTCAAGACAGC R-GCTGTCTTGA GCTCACATT TCACTGGGGG	67.5
mut-SNP	F-CAGTATTGTATCAAAATAAATAAAACTATAAA R-TTTATAGTTTTTATTTATTTGATACAATACTG	55

每次 5 min, 再加 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶偶联的二抗室温孵育 1 h. 然后用 Western 洗涤液洗 3 次, 每次 5 min. 最后将膜与化学发光底物室温孵育 2 min, 暗室中压片、显影定影.

1.9 数据分析

数据用 $\bar{x} \pm SE$ 表示. 采用 Duncan's Multiple Range Text 统计分析方法, 用软件 SAS 9.2 对各载体的表达水平进行方差分析. 对于 Western blot 的结果, 用软件 ImageJ 1.47v 对灰度值进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结果与分析

2.1 莱芜猪和长白猪背最长肌中 *MyHC-II b* mRNA 表达水平对比

以 *GAPDH* 为内参所得到的莱芜猪和长白猪背最长肌中 *MyHC-IIb* 的 mRNA 的相对表达量如图 1 所示. 长白猪背最长肌中 *MyHC-IIb* mRNA 的表达量显著高于莱芜猪背最长肌中 *MyHC-IIb* mRNA 的表达量($P=0.013$).

2.2 猪 *MyHC-IIb* 启动子区顺式元件的确定

对猪 *MyHC-IIb* 启动子区 2102 bp 的序列进行删除实验, 结果如图 2 所示. 可见, 从转录起始位点上游-1024 bp 删除到-187 bp 之后, *MyHC-IIb* 表达量显著下降. 通过 DNAMAN 对比分析, 猪 *MyHC-IIb* 转录起始位点上游-187~-1024 bp 这段启动子区域内包含 3 个 E-box 序列(CANNTG). 分别对这 3 个 E-box 进行定点突变, 结果显示, 突变任何一个 E-box 序

图 1 猪背最长肌 *MyHC-IIb* mRNA 的表达水平

列, 都会使猪 *MyHC-IIb* 基因的表达量显著下降($P=0.0360$)(图 3).

2.3 猪 *MyHC-IIb* 启动子区多态性及其活性分析

分别对地方猪种和商品猪基因组进行混池和 *MyHC-IIb* 基因启动子的测序, 发现在 *MyHC-IIb* 转录起始位点上游-1398 bp 处存在一个 G 到 T 的突变, 分别检测了 64 头莱芜猪和 65 头长白猪 *MyHC-IIb* 启动子-1398 bp 序列, 结果显示, 莱芜猪全部为 GG 型, 长白猪中 GG 型、GT 型和 TT 型均存在(表 2). 对该位点进行定点突变(G>T), 结果显示, 发现突变前后两个载体的表达量差异并不显著, 等位基因 T 有增加猪 *MyHC-IIb* 表达的趋势(图 4).

2.4 莱芜猪和长白猪背最长肌 MyoD 和 Myf-5 蛋白表达量对比

Western blot 结果显示, 分析灰度值发现转录

图 2 猪 *MyHC-IIb* 基因的启动子活性分析

扩增了猪 *MyHC-IIb* 上游启动子-2102 bp 的序列, 进行删除实验. 所构建的荧光素酶报告基因表达载体转染 C2C12 细胞, 对比荧光素酶活性的不同. 在转录起始位点上游-259, -496 和-935 bp 处存在 E-box

图 3 猪 *MyHC-IIb* 启动子区 E-box 突变载体活性分析

pGL3-0.970k: *MyHC-IIb* 启动子 pGL3-0.970k 表达载体; pGL3-E-box1: 转录起始位点上游-235 bp 处一个 E-box 位点突变后的表达载体; pGL3-E-box2: 转录起始位点上游-496 bp 处一个 E-box 位点突变后的表达载体; pGL3-E-box3: 转录起始位点上游-935 bp 处一个 E-box 位点突变后的表达载体

表 2 猪 *MyHC-IIb* 基因启动子-1398 bp 处 SNP 位点基因型及基因型频率统计分析

猪种	基因型频率(个体数)			基因频率	
	GG	GT	TT	G	T
莱芜猪	1.00(64)	0.00(0)	0.00(0)	1.00	0.00
长白猪	0.2(13)	0.554(36)	0.246(16)	0.4769	0.5231

因子 *MyoD* 在长白猪背最长肌中的表达量比在莱芜猪中的要高, 但是两猪种间表达差异并不显著, 而 *Myf-5* 在长白猪中的表达量极显著高于其在莱芜猪中的表达量($P=0.0013$)(图 5).

3 讨论

本研究选择了莱芜猪和长白猪这两个猪种来研究影响长白猪骨骼肌中 *MyHC-IIb* 基因表达上调的

图4 猪 *MyHC-IIb* 转录起始位点上游-1398 bp 处 G 到 T 的突变对启动子活性的影响

pGL3-2.102 载体代表突变前的基因型, 相当于莱芜猪中的基因型; pGL3-SNP 载体代表 SNP 位点突变(G>T)之后的基因型, 相当于长白猪中出现等位基因的情况

因素。莱芜猪是中国山东境内有代表性的一个中型猪种, 该品种猪具有性成熟早、繁殖率高、利用年限长、肉色鲜红、肉嫩味香等优异种质特性^[14]。长白猪原产于丹麦, 是世界上分布最广的瘦肉型猪种之一, 具有生长发育快、胴体瘦肉率高、屠体较长、屠宰率高等优点^[15]。已有研究证实, 商品猪中 *MyHC-IIb* 的表达量显著高于中国地方猪种中 *MyHC-IIb* 的表达量^[3,16,17], 本研究使用荧光定量 PCR 的方法比较了 65 日龄的莱芜猪和长白猪背最长肌中 *MyHC-IIb* mRNA

的表达情况, 发现其在长白猪中的表达量显著高于莱芜猪, 这样的结果也证实了之前的研究。

已有研究对心肌 *MyHC* 基因的上游启动子区进行了分析^[18-25], 对哺乳动物成年骨骼肌 *MyHC-IIb* 基因启动子区也有一些描述^[5,7-10]。但是, 对于 *MyHC-IIb* 基因在不同猪种间表达差异的机制并没有做深入探讨。影响长白猪骨骼肌中 *MyHC-IIb* 基因 mRNA 高表达的因素有很多, 本研究首先分析了猪 *MyHC-IIb* 上游启动子区的序列。删除实验显示, pGL3-0.198k 载体的表达量与 pGL3-1.035k 载体的表达量差异显著, 分析发现, 在 *MyHC-IIb* 转录起始位点上游 -187~-1024 bp 存在 3 个 E-box。E-box(增强子盒)是在一些真核生物启动子区上游发现的 DNA 序列, 作为一种蛋白结合位点, 在神经元、肌肉和其他组织中调控基因的表达^[26]。先前的研究已证明, 转录起始位点上游 E-box 的存在对于猪体内 *MyHC-IIb* 基因的高水平表达是必需的^[10]。本研究分别突变了这 3 个 E-box, 发现突变后 *MyHC-IIb* 的表达量都明显下降, 并且活性都非常低。可见 E-box 序列的存在对猪 *MyHC-IIb* 基因的高表达起着至关重要的作用。

另外通过测序, 还发现在 *MyHC-IIb* 基因转录起始位点上游-1398 bp 存在一个 G>T 的突变, 并且在所分析的 2102 bp 长度的启动子中只找到了这一个 SNP, 因此本研究认为这个突变位点的存在可能是导致长白猪中 *MyHC-IIb* 表达量高于莱芜猪的一个重要的原因。对该 SNP 位点进行突变(G>T), 发现长白猪中出现的这个等位基因有增加 *MyHC-IIb* 表达的

图5 猪背最长肌 *MyoD* 及 *Myf-5* 表达水平的对比分析

A: 转录因子 *MyoD* Western blot 的结果图, 编号 1~5 为莱芜猪个体, 编号 6~9 为长白猪个体; B: 转录因子 *Myf-5* Western blot 的结果图, 编号 1~5 为莱芜猪个体, 编号 6~9 为长白猪个体; C: *MyoD* 灰度值分析结果; D: *Myf-5* 灰度值分析结果

趋势, 但是这种差异并不显著.

本研究还考虑了转录因子对 *MyHC-IIb* 基因表达的影响. 前面的研究已经证实 E-box 对 *MyHC-IIb* 基因的高表达有重要作用. 而 E-box 又是转录因子 Myf-5 和 MyoD 的结合位点. Myf-5 和 MyoD 是调节肌肉分化或肌肉发育的关键作用的蛋白, 它们属于一个被称为成肌调节因子(MRFs)的蛋白质家族, MRF 家族的成员包括 Myf-5, MyoD(Myf3), myogenin (肌细胞生成素)及 MRF4(Myf6)^[27]. 这些螺旋-环-螺旋(basic-helix-loop-helix, bHLH)转录因子在成肌细胞分化过程中先后起着重要的作用. 在大多数的肌肉祖细胞中, Myf-5 和 MyoD 对肌肉的调控都是有等级的, MyoD 都是在下游起作用, 而 Myf5, 根据其所处

的环境, 可以通过调控 MyoD 从而调控肌肉的发育, 也可以直接调控肌肉的发育^[28-30]. Western blot 的结果显示, 长白猪背最长肌中 Myf-5 的表达量极显著高于莱芜猪, MyoD 在两猪种间的表达水平虽然差异不显著, 但是在长白猪中也有增高的趋势. 因此, Myf-5 和 MyoD 蛋白在长白猪中的含量高于莱芜猪, 这可能是造成长白猪中 *MyHC-IIb* 基因高表达的另一个重要因素.

综上所述, 本研究认为转录因子 Myf-5 和 MyoD 通过与猪 *MyHC-IIb* 上游启动子区 E-box 的结合, 调控 *MyHC-IIb* 基因的高表达. 另外, 长白猪 *MyHC-IIb* 基因上游启动子区-1398 bp 处出现的等位基因(G>T), 也有增强 *MyHC-IIb* 表达的趋势.

参考文献

- Weiss A, Leinwand L A. The mammalian myosin heavy chain gene family. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, 12: 417-439
- Talmadge R J, Roy R R, Edgerton V R. Persistence of hybrid fibers in rat soleus after spinal cord transection. *Anat Rec*, 1999, 255: 188-201
- Guo J, Shan T, Wu T, et al. Comparisons of different muscle metabolic enzymes and muscle fiber types in Jinhua and Landrace pigs. *J Anim Sci*, 2011, 89: 185-191
- 呼红梅, 王继英, 朱荣生, 等. 莱芜猪和杜洛克猪肌肉肌球蛋白重链组成对肉质性状的影响. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2008, 38: 60-65
- Diagana T T, North D L, Jabet C, et al. The transcriptional activity of a muscle-specific promoter depends critically on the structure of the TATA element and its binding protein. *J Mol Biol*, 1997, 265: 480-493
- Lakich M M, Diagana T T, North D L, et al. MEF-2 and Oct-1 bind to two homologous promoter sequence elements and participate in the expression of a skeletal muscle-specific gene. *J Biol Chem*, 1998, 273: 15217-15226
- Swoap S J. *In vivo* analysis of the myosin heavy chain IIB promoter region. *Am J Physiol*, 1998, 274: C681-C687
- Takeda S, North D L, Lakich M M, et al. A possible regulatory role for conserved promoter motifs in an adult-specific muscle myosin gene from mouse. *J Biol Chem*, 1992, 267: 16957-16967
- Takeda S, North D L, Diagana T, et al. Myogenic regulatory factors can activate TATA-containing promoter elements via an E-box independent mechanism. *J Biol Chem*, 1995, 270: 15664-15670
- Wheeler M T, Snyder E C, Patterson M N, et al. An E-box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is required for gene expression in fast muscle. *Am J Physiol*, 1999, 5: C1069-C1078
- Edmondson D G, Olson E N. Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J Biol Chem*, 1993, 268: 755
- Olson E N, Klein W H. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev*, 1994, 8: 1-8
- Allen D L, Sartorius C A, Sycuro L K, et al. Different pathways regulate expression of the skeletal myosin heavy chain genes. *J Biol Chem*, 2001, 276: 43524-43533
- 曾勇庆. 山东地方猪种资源的现状和养猪业的发展. *中国畜牧杂志*, 2004, 40: 33-35
- 周立平. 长白猪主要性能测定及遗传参数估计研究. *湖南农业科学*, 2011: 122-124
- Xu Y J, Jin M L, Wang L J, et al. Differential proteome analysis of porcine skeletal muscles between Meishan and Large White. *J Anim Sci*, 2009, 87: 2519-2527
- 杨晓静, 赵茹茜, 陈杰, 等. 猪背最长肌肌纤维类型的发育性变化及其品种和性别特点. *中国兽医学报*, 2005, 25: 89-94
- Gustafson T A, Markham B E, Bahl J J, et al. Thyroid hormone regulates expression of a transfected α -myosin heavy-chain fusion gene in fetal heart cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987: 3122-3126
- Molkentin J D, Markham B E. Myocyte-specific enhancer-binding factor (MEF-2) regulates alpha-cardiac myosin heavy chain gene expression *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem*, 1993, 268: 19512-19520

- 20 Thompson W R, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. A MyoD1-independent muscle-specific enhancer controls the expression of the beta-myosin heavy chain gene in skeletal and cardiac muscle cells. *J Biol Chem*, 1991, 266: 22678–22688
- 21 Buttrick P M, Kass A, Kitsis R N, et al. Behavior of genes directly injected into the rat heart *in vivo*. *Circ Res*, 1992, 70: 193–198
- 22 Knotts S, Rindt H, Neumann J, et al. *In vivo* regulation of the mouse beta myosin heavy chain gene. *J Biol Chem*, 1994, 269: 31275–31282
- 23 Rindt H, Gulick J, Knotts S, et al. *In vivo* analysis of the murine beta-myosin heavy chain gene promoter. *J Biol Chem*, 1993, 268: 5332–5338
- 24 Subramaniam A, Jones W K, Gulick J, et al. Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice. *J Biol Chem*, 1991, 266: 24613–24620
- 25 Bouvagnet P F, Strehler E E, White G E, et al. Multiple positive and negative 5' regulatory elements control the cell-type-specific expression of the embryonic skeletal myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol*, 1987, 7: 4377–4389
- 26 Massari M E, Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 429–440
- 27 Sabourin L A, Rudnicki M A. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*, 2000, 57: 16–25
- 28 Bryson-Richardson R J, Currie P D. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet*, 2008, 9: 632–646
- 29 Punch V G, Jones A E, Rudnicki M A. Transcriptional networks that regulate muscle stem cell function. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2009, 1: 128–140
- 30 Bismuth K, Relaix F. Genetic regulation of skeletal muscle development. *Exp Cell Res*, 2010, 316: 3081–3086

Molecular Mechanism of Up-Regulating the Expression of Porcine *Myhc-IIb* Gene in Skeletal Muscle

ZHANG Qi, DU YanZhi, WANG PengFei, LI YanPing, WANG LiYuan, LI Yi, SUN Yi & JIANG YunLiang

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

The mammalian skeletal muscle is embedded by different types of muscle fibers, mainly determined by the expression of different types of myosin heavy chain. Among the eight subtypes in the family of myosin heavy chain, both the mRNA and protein expression of *MyHC-IIb* were significantly higher in the skeletal muscle of Landrace pigs than in Chinese indigenous pigs. However, the mechanism underlying such differences remains largely unknown. In this study, we firstly compared the mRNA expression of *MyHC-IIb* in the *longissimus dorsi* muscle collected from Laiwu and Landrace pigs, and found that the expression level of *MyHC-IIb* mRNA in Landrace is significantly higher than that in Laiwu pigs ($P=0.013$). By transfection and luciferase assay, we found that deletion of the DNA fragment from –1024 to –187 bp in the promoter region and mutation of either of the three E-boxes in this region significantly decreased promoter activity (P). In addition, a mutation (G>T) was found at the site of –1398 bp in the upstream promoter region of porcine *MyHC-IIb* gene, and population genetics analysis in Laiwu ($n=64$) and Landrace ($n=65$) pigs revealed that GG was the only genotype detected in Laiwu pigs, while in Landrace pigs, three genotypes of GG ($n=13$), TT ($n=16$) and GT ($n=36$) were present. Allele T has a trend to increase *MyHC-IIb* expression as tested in C2C12 cell line. Western blotting showed that the expressions of MyoD in two pig breeds were not significantly different ($P=0.136$); however, the expressions of Myf-5 in Landrace were significantly higher than that in Laiwu pigs ($P=0.0036$). These data suggest an important role of Myf-5 in up-regulating the transcription of porcine *MyHC-IIb* gene.

pig, *MyHC-IIb*, up-regulation, promoter, Myf-5

doi: 10.1360/N052014-00136