论文

禁饲和重新饲喂对鸡骨骼肌中 *MAFbx* 和 *MuRF1* 基因表达水平的影响

李庆贺^①, 李金秀^①, 兰鹤^① 王楠^②, 陈黎^③, 胡晓湘^①, 李宁^{①*}^① 中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193;^② 中国农业大学动物医学院, 北京 100193;^③ 浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 杭州 310021

* 联系人, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn

收稿日期: 2011-06-28; 接受日期: 2011-08-01

北京市自然科学基金(批准号: 6081003)资助项目

摘要 对禁饲和重新饲喂对鸡骨骼肌中蛋白酶体相关基因及其下游靶基因表达水平的影响进行了研究. *MAFbx* 和 *MuRF1* 基因作为泛素-蛋白酶体系统的 E3 连接酶发挥生物学作用. 对七日龄鸡分别禁饲 24, 48 和 48 h 后重新饲喂 4 h. 测定了上述两个基因 mRNA 和蛋白质水平的表达. *MAFbx* 和 *MuRF1* 的表达量随着禁饲时间的延长而上升, 并且这种上升趋势随着重新饲喂而下调. 同时测定了上述两种 E3 连接酶的靶蛋白, 即 MyoD 和 M-CK 的表达量, 这两种蛋白的表达量随禁食的延长而下降, 并且这种下降趋势会被重新饲喂所阻止. 这些结果表明, 禁饲促进了 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的表达, 并可能导致相应靶蛋白的减少.

关键词禁饲
基因表达
MAFbx
MuRF1
MyoD
M-CK

MAFbx(muscle atrophy F-box)和 *MuRF1*(muscle RING finger 1)是两个编码 E3 泛素连接酶的基因, 在泛素介导的蛋白酶体引起的蛋白质降解中发挥作用. *MAFbx*, 又称为 *atrogen1* 或 *Fbxo32*, 是典型的包含一个 F-box 区域 SCF 类型的 E3 泛素连接酶^[1,2]. *MuRF1* 是肌肉组织特异性的环指蛋白, 可以和半胱氨酸-组氨酸-锌结合模体结合^[3]. *MAFbx* 和 *MuRF1* 在心脏和肌肉组织中特异性表达, 并且在肌肉消耗时蛋白质降解过程中扮演重要角色^[4]. 多项研究表明, 这两个基因的表达在肌肉消耗过程中(如肌肉萎缩、损伤、烧伤、老化、慢性疾病及饥饿)有所上调^[1,5,6].

在生物体内蛋白质主要通过两个系统降解, 即溶酶体系统和泛素-蛋白酶体系统, 它们分别控制细

胞外和细胞内的蛋白质降解. 细胞外和细胞膜上的蛋白质是被包含数种酸性蛋白酶和水解酶的溶酶体蛋白水解系统所降解^[7]. 在另一个蛋白质降解系统中, 胞内蛋白质在 E3 泛素连接酶的催化下, 首先在底物蛋白上共价连接一个含有 76 个氨基酸的泛素蛋白作为降解的标记, 泛素蛋白和底物蛋白由底物蛋白上的赖氨酸的 ϵ -氨基与泛素蛋白的 C 端所形成的异肽键所连接. 更多的泛素分子附着于前一个泛素分子上, 在靶蛋白上形成一条泛素链, 该泛素链可被 26S 蛋白酶体识别并降解成许多小肽^[6]. *MAFbx* 和 *MuRF1* 参与很多蛋白质的降解, 特别是肌原纤维蛋白^[8].

在哺乳动物体内, 骨骼肌是最主要的蛋白储藏

英文版见: Li Q H, Li J X, Lan H, et al. Effects of fasting and refeeding on expression of *MAFbx* and *MuRF1* in chick skeletal muscle. *Sci China Life Sci*, 2011, 54: 904–907, doi: 10.1007/s11427-011-4226-2

库. 骨骼肌蛋白可以转化为自由氨基酸用于肝糖原的合成, 并在饥饿和疾病情况下供能^[5]. 禁饲增加了动物骨骼肌中蛋白降解的速率, 而进食则会抑制蛋白质的降解^[9]. 研究表明, 禁饲能够提高 *MAFbx* 的 mRNA 水平^[9], 但是禁饲对于 *MuRF1* 的表达及 *MAFbx* 蛋白水平的影响仍有待研究.

作为肌肉特异性的转录因子, *MyoD* 参与细胞周期调控并在骨骼肌的分化过程中发挥重要作用^[10]. 肌肉肌酸激酶(M-CK)是能量代谢中的一个关键酶, 它可以催化 MgATP 和肌氨酸向 MgADP 和磷酸肌酸的可逆转化^[11]. 先前研究表明, 在骨骼肌中 *MAFbx* 和 *MuRF1* 分别降解 *MyoD* 和 M-CK^[10,12].

利用 7 日龄鸡, 检测到了 *MAFbx* 和 *MuRF1* 在鸡骨骼肌中的特异表达. 观察到禁饲对于 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的上调作用, 以及重新饲喂对于上述效应的抑制作用, 另外检测到 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的靶蛋白 *MyoD* 和 M-CK 在禁饲过程中的减少.

1 材料与方法

1.1 动物准备

一日龄雌性 AA 肉鸡购自北京华都肉鸡公司. 连续 7 天给予玉米大豆半混饲料和水. 第 7 天, 挑选体重相似(约 70 g)的鸡分为 4 组: 正常饲喂组(NF)、禁饲 24 h 组(24F)、禁饲 48 h 组(48F)及禁饲 48 h 后重新饲喂组(RF); 每组包含 3 个生物学重复. 取出的骨骼肌组织迅速冻于液氮中, 随后放入 -80℃ 冰箱长期保存.

1.2 提取 RNA

每个组织样品在液氮中磨碎, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 将其分为 30 μg 每份, 并用不含有 RNase 的 DNase I (NEB)于 37℃ 消化 15 min, 然后用苯酚-氯仿提取并用乙醇沉淀以去除 DNA. 用 Nanodrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific)以及甲醛-琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的纯度及质量.

1.3 实时定量 PCR

每个样品利用 M-MLV 反转录酶, 寡聚核苷酸(dT)引物(Promega)以及约 1.5 g 的总 RNA 进行 cDNA 第一条链的反转录. 利用 Oligo 6.0 设计定量 PCR 引物, 实验中所用引物如下所示. *MAFbx*, 上游引物:

5'-AGGCCGCAGTGTGTTGTTCT-3', 下游引物: GTGTGAATGGCTGGTTGCAT; *MuRF1*, 上游引物: GCCAAGCAGCTCATTAAAACG, 下游引物: CATGTTCTCATAGCCTTGCTCAAT; M-CK, 上游引物: CGGAGCACCTGGGTTACATC; 下游引物: GGGGTGCTGGCTGAGTTTG; *MyoD*, 上游引物: CAACAGCAGTGGTGTGACAGAT; 下游引物: CAAAGCAACTCTTATTTACAATTATACAGAPDH, 上游引物: CGATCTGAACCTACATGGTTTACATGTT, 下游引物: CCCGTTCTCAGCCTTGACA. 利用 ABI7900-HT 仪器及 SYBR®Green 系统(Applied Biosystems)对定量 PCR 中 mRNA 的水平进行测定. PCR 扩增条件: cDNA 在 95℃ 下变性 10 min, 然后 95℃ 30 s, 60℃ 1 min 进行 40 个循环. 用持家基因 *GAPDH* 的表达量作为参考对模板 cDNA 进行矫正. 相对表达量的值通过比较 C_t 值的方法进行分析.

1.4 Western blotting

首先, 将动物组织用 Tissue Lyzer(Qiagen)在 1 mL 的细胞裂解液(150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris(pH 7.4), 5 mmol/L EDTA (pH 8.0), 1% Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, 20 mg/mL 抑肽酶, 50 mg/mL 亮抑酶肽, 1 mmol/L 联苯胺, 1 mg/mL 胃酶抑制剂)中裂解; 裂解产物在室温下孵育 30 min, 然后 13000×g 离心 5 min. 蛋白质浓度用 BCA 试剂盒测定(Beyotime Biotechnology). 每个泳道加入 50 μg 蛋白, 用 15% SDS-PAGE 进行分离, 并将其转印至干净的确化纤维膜(Millipore)上. 利用含 5%(质量体积比)脱脂牛奶的 TBST(100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 0.1% Tween20, 0.9%NaCl)转印 1 h 后, 将膜分别用 *MAFbx* (Abcam), *MuRF1*(Santa Cruz)和 α -tubulin (Beyotime Biotechnology)的一抗孵育 2 h. 随后将它们分别用相应的二抗孵育 1 h. 在用 TBST 洗涤 3 次后, 利用 Chemiluminescence ECL Western blotting 系统(Roche)将其曝光于 Autoradiographic 胶片(Hyperfilm ECL, Amersham)上进行观察.

1.5 数据分析

结果以 $\bar{x} \pm SD$ 的形式表示. 组间总体差用 ANOVA 法进行分析. 如差异显著, 群体间的差异则用 Student-Newman-Keuls multiple comparison post-hoc test 进行评估, $P < 0.05$ 示差异显著.

2 实验结果

2.1 骨骼肌中 *MAFbx* 与 *MuRF1* 的特异性表达

首先通过 Western blotting 测定了不同组织中 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的表达量, 这些组织包括心肌、肝脏、肺脏、骨骼肌、大肠、小肠、腺胃、肌胃及肾脏. 结果发现, 仅在骨骼肌中可见 *MAFbx* 和 *MuRF1* 蛋白质水平的表达. *MAFbx* 和 *MuRF1* 均显示了骨骼肌组织特异性表达; 而用相同量的心肌组织蛋白进行凝胶电泳时并未检测到 *MAFbx* 和 *MuRF1* 蛋白的表达 (图 1).

2.2 禁饲对 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的 RNA 和蛋白质水平的影响

通过定量 PCR 和 Western blotting 研究禁饲和重新饲喂对鸡骨骼肌中 *MAFbx* 和 *MuRF1* 在 mRNA 和蛋白水平上的影响. 鸡群被分为 4 组: 正常饲喂组 (NF)、禁饲 24 h 组 (24F)、禁饲 48 h 组 (48F) 及禁饲 48 h 后重新饲喂组 (RF). 禁饲使 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的 mRNA 水平显著增加. 对于 *MAFbx*, 24F 组的表达水平和正常饲喂组相比提高了 5 倍 ($P < 0.01$), 48F 组的表达水平提高了 6 倍 ($P < 0.01$), 当禁饲 48 h 之后重新饲喂 4 h, *MAFbx* 的表达量急剧下降至低于 NF 组的水平 (图 2(A)). 对于 *MuRF1*, 24F 组的表达水平和正常饲喂组相比提高了 7 倍 ($P < 0.01$), 48F 组的表达量提高了 34 倍 ($P < 0.01$), 而重新饲喂之后表达量也降至较低的水平 (图 2(B)). 对于 *MAFbx* 和 *MuRF1* 而言, 重新饲喂可以使 mRNA 显著降低至相对较低的水平 (图 2). 同时, Western blotting 分析显示, 骨骼肌中 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的蛋白表达量随着禁饲的延续显著增加, 而重新饲喂可以抑制 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的这种效应 (图 3). 禁饲所致的蛋白质水平降低的速率并不及 mRNA 水平降低的明显, 这可能归因于蛋白质降解的滞后

作用.

2.3 禁饲骨骼肌组织中 *MyoD* 和 *M-CK* 的下调

E3 泛素连接酶参与蛋白质的降解, 禁饲和重新饲喂的处理使 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的表达变化十分显著, 但是对它们下游靶蛋白的表达量在禁饲过程中的变化情况却了解较少. 有研究表明, 体内 *MyoD* 和 *M-CK* 通过泛素-蛋白酶体系统分别被 *MAFbx* 和 *MuRF1* 降解^[8-10,12]. 因此, 利用 Western blotting 研究在禁饲和重新饲喂的情况下鸡骨骼肌中 *MyoD* 和 *M-CK* 表达量的变化. 结果发现, *MyoD* 和 *M-CK* 的表达量与 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的表达趋势呈负相关 (图 4). 当鸡禁饲 24 h 后, *MyoD* 和 *M-CK* 的蛋白水平下降, 禁饲 48 h 后下降更明显, 这种趋势可被重新饲喂所逆转 (图 4). 但当测定 *MyoD* 和 *M-CK* 的 mRNA 水平

图 2 禁饲对于 *MAFbx* 和 *MuRF1* mRNA 水平的影响

(A) *MAFbx*; (B) *MuRF1*. 每组 3 个重复

图 1 Western blotting 测定鸡不同组织中 *MAFbx* 和 *MuRF1* 的表达水平

图 3 禁饲对于 *MAFbx* 和 *MuRF1* 蛋白的影响

(A) *MAFbx*; (B) *MuRF1*

时, 发现在禁饲和重新饲喂的情况下这两个基因的 mRNA 未见明显变化(图 5).

3 讨论

本实验旨在研究禁饲和重新饲喂对鸡骨骼肌蛋白质代谢的短期影响. 研究了禁饲和重新饲喂对两

图 4 禁饲对 MyoD 和 M-CK 的下调作用

图 5 禁饲对 MyoD 和 M-CK mRNA 水平的影响

(A) MyoD; (B) M-CK

种 E3 连接酶 MAFbx 和 MuRF1 表达的影响. 结果发现, 下游相应的靶蛋白 MyoD 和 M-CK 在禁饲时, 在蛋白水平而非 mRNA 水平表达量下调.

肌肉损耗是烧伤、慢性疾病、损伤、饥饿和老化的重要结果之一^[1]. 首先发现, MAFbx 和 MuRF1 的表达在肌肉萎缩时发生上调, 随后又发现在很多与肌肉退行性变化有关的情况, 如瘫痪、饥饿、糖尿病、脓毒性疾病、肾功能衰竭和糖皮质激素过量等, MAFbx 和 MuRF1 都会过量表达^[1]. 先前研究表明, 很多与泛素-蛋白酶体系统相关的基因, 如 14 kD E2 连接酶、calpain 大亚基和 20S 蛋白酶体亚基在饥饿时都会上调^[4,9]. 本研究发现, 在禁饲 24 和 48 h 后, 鸡骨骼肌中 E3 连接酶 MAFbx 和 MuRF1 同泛素-蛋白酶体系统中的其他成分一样, 在 RNA 和蛋白质水平上都有显著上调. 重新饲喂使这两个基因的表达恢复正常. 本结果表明, 摄食对于生长中的动物的骨骼肌蛋白质的合成和降解速率有很大影响.

研究表明, 在体内 MAFbx 可以抑制 MyoD 的降解从而阻止肌肉萎缩的发生^[10]. 本研究也测定了禁饲和重新饲喂对于 MyoD 和 M-CK 表达水平的影响. 值得注意的是, MAFbx 和 MuRF1 在蛋白质水平与其相应的靶蛋白 MyoD 和 M-CK 的表达呈现出相应的负相关. MyoD 在肌肉损耗时对于参与细胞周期调控和抗凋亡细胞死亡的特定基因的转录有必要的维持作用. 这些基因包括细胞周期蛋白依赖的激酶抑制剂 p21 及其下游靶蛋白视网膜神经胶质瘤蛋白 (Rb)^[13,14]. M-CK 是骨骼肌中参与细胞间能量传递的关键酶之一. 因此推测, 在禁饲情况下 MyoD 和 M-CK 的下调是由 MAFbx 和 MuRF1 的上调所致. 泛素-蛋白酶体系统在骨骼肌蛋白质损耗中的关键作用被广泛关注, 但其具体机制有待进一步研究.

参考文献

- 1 Bodine S C, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 2001, 294: 1704–1708
- 2 Ilyin G P, Rialland M, Pigeon C, et al. cDNA cloning and expression analysis of new members of the mammalian F-box protein family. *Genomics*, 2000, 67: 40–47
- 3 Spencer J A, Eliazar S, Ilaria R L, et al. Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol*, 2002, 150: 771–784
- 4 Kee A J, Combaret L, Tilignac T, et al. Ubiquitin-proteasome-dependent muscle proteolysis responds slowly to insulin release and refeeding in starved rats. *J Physiol*, 2003, 546: 765–776
- 5 Gomes M D, Lecker S H, Jagoe R T, et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl*

- Acad Sci USA, 2001, 98: 14440–14445
- 6 Zhao W, Wu Y, Zhao J, et al. Structure and function of the upstream promotor of the human *Mafbx* gene: the proximal upstream promotor modulates tissue-specificity. *J Cell Biochem*, 2005, 96: 209–219
 - 7 Jackman R W, Kandarian S C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287: C834–C843
 - 8 Witt S H, Granzier H, Witt C C, et al. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol*, 2005, 350: 713–722
 - 9 Nakashima K, Yakabe Y, Yamazaki M, et al. Effects of fasting and refeeding on expression of atrogen-1 and Akt/FOXO signaling pathway in skeletal muscle of chicks. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70: 2775–2778
 - 10 Lagirand-Cantaloube J, Cornille K, Csibi A, et al. Inhibition of atrogen-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy *in vivo*. *PLoS One*, 2009, 4: e4973
 - 11 Zhao T J, Yan Y B, Liu Y, et al. The generation of the oxidized form of creatine kinase is a negative regulation on muscle creatine kinase. *J Biol Chem*, 2007, 282: 12022–12029
 - 12 Koyama S, Hata S, Witt C C, et al. Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. *J Mol Biol*, 2008, 376: 1224–1236
 - 13 Ishido M, Kami K, Masuhara M. Localization of MyoD, myogenin and cell cycle regulatory factors in hypertrophying rat skeletal muscles. *Acta Physiol*, 2004, Scand180: 281–289
 - 14 Ishido M, Kami K, Masuhara M. *In vivo* expression patterns of MyoD, p21, and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287: C484–C493