

Myostatin 在地塞米松致肌原纤维损伤中的作用研究

秦 健¹, 杜 荣^{2*}, 杨亚群², 周 英², 张红强², 刘文花²

(1. 山西农业大学信息科学与工程学院, 太谷 030801; 2. 山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘 要: 为阐明 Myostatin 在肌原纤维损伤中的作用, 并探讨提高畜禽肉产(质)量或控制人类肌肉萎缩的方法, 本试验以小鼠为模式动物, 采用高剂量地塞米松构建了严重应激模型, 研究生理剂量胰岛素对地塞米松致肌原纤维损伤的影响及其与 Myostatin 基因表达的关系, 以及 Myostatin 基因免疫对地塞米松致肌原纤维损伤的干预作用。结果表明: 地塞米松诱导 Myostatin 基因表达上调及严重的肌原纤维损伤和线粒体肿胀, 而胰岛素注射明显减弱了这些效应; Myostatin 基因免疫明显抑制了地塞米松对肌原纤维和线粒体的损伤作用。试验结果提示, Myostatin 是参与肌原纤维降解的一个关键因子, 该作用可能与其刺激了线粒体的功能有关。

关键词: Myostatin; 肌原纤维; 地塞米松; 胰岛素; 基因免疫; 线粒体

中图分类号: S852.33

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)03-0482-07

Research on the Role of Myostatin in Dexamethasone-induced Myofibril Damage

QIN Jian¹, DU Rong^{2*}, YANG Ya-qun², ZHOU Ying², ZHANG Hong-qiang², LIU Wen-hua²

(1. College of Information Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: In order to clarify the roles of myostatin in myofibril damage and investigate the measures to improve the production and quality of muscle mass in livestock or control the muscle atrophy in human, the serious stress models of mice were made with high-dose dexamethasone, and the effect of physiological-dose insulin on the dexamethasone-induced myofibril damage and the relationship between the effect and myostatin expression were researched. In addition, the intervention effect of myostatin gene immunization on the dexamethasone-induced myofibril damage was studied. The results showed that: dexamethasone upregulated the expression of myostatin gene and caused the serious damage of myofibril and swelling of mitochondria, while insulin attenuated the effects of dexamethasone; myostatin gene immunization reduced the myofibril and mitochondria damages induced by dexamethasone. The results suggest that myostatin is one of key factors for myofibril degradation and the role of myostatin may be attributed to the stimulation of mitochondrial function by myostatin.

Key words: myostatin; myofibril; dexamethasone; insulin; gene immunization; mitochondria

应激是动物难以避免的一种生理反应, 过强应 激或持续时间过长的应激会导致动物的抗病力和生

收稿日期: 2011-10-14

基金项目: 国家自然科学基金(30771580; 31140074); 教育部科学技术研究重点项目(210027); 山西省自然科学基金(2008011057-2); 山西省高等学校优秀青年学术带头人支持计划; 山西农业大学中青年拔尖创新人才支持计划

作者简介: 秦 健(1971-), 男, 山西壶关人, 博士, 讲师, 主要从事生物技术和细胞超微结构的研究, E-mail: drqinjian@163.com

* 通讯作者: 杜 荣, 女, 博士, 教授, E-mail: durong752@sohu.com Tel: 0354-6289969

产性能下降。糖皮质激素是应激反应的一种主要激素,其过量分泌可影响肌肉的生长发育,严重时导致肌肉萎缩。地塞米松作为一种人工合成的糖皮质激素,是国内外在应激研究中建立动物应激模型常用的手段之一^[1-2]。肌肉生长抑制素(Myostatin, MSTN)又称为生长分化因子 8(GDF-8),是 1997 年被 McPherron 等首次发现的一种肌肉负调控因子,属于转化生长因子 TGF- β 超家族^[3]。Myostatin 基因突变或缺失可以导致动物的双肌现象^[3-5],而其过量表达则可以导致肌肉恶病质^[6]。有研究表明,地塞米松所致的肌肉萎缩与 Myostatin 基因的表达上调有关^[7],Myostatin 基因敲除可以防止地塞米松诱导的小鼠肌肉萎缩^[8]。然而,在超微结构水平直接表明肌原纤维损伤和 Myostatin 关系的研究则鲜见报道,胰岛素或 Myostatin 基因免疫对糖皮质激素致肌原纤维损伤的干预影响也未见报道。为了进一步理解 Myostatin 在肌原纤维损伤中的作用,为畜牧业提高肉产(质)量和医学上控制肌肉萎缩提供依据,本研究以小鼠为模式动物,采用地塞米松构建严重应激模型,旨在研究胰岛素对糖皮质激素致肌原纤维损伤的拮抗作用及其与 Myostatin 基因表达的关系,并初步探讨 Myostatin 基因免疫对糖皮质激素致肌原纤维损伤的干预影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理

1.1.1 试验一 将体质量约 20 g 的雌性昆明白小鼠 18 只随机分为 3 组,每组 6 只,常规饲养和管理。适应饲养 2 d 后,采用腹腔注射方式给各组动物分别注射生理盐水(0.9% NaCl)、地塞米松磷酸钠注射液(Dex,每天 20 mg · kg⁻¹)、地塞米松磷酸钠注射液(每天 20 mg · kg⁻¹) + 胰岛素(Ins,每天 1.5 U · kg⁻¹),每只小鼠注射剂量 0.1 mL,每日 1 次。连续注射 1 周后采样。小鼠称重、脱臼处死后,迅速采取腿部肌肉。部分肌肉迅速投入液氮保存,提取 RNA 和 Myostatin mRNA 检测;部分肌肉用 Bouin's 液固定,石蜡切片及 HE 染色;部分肌肉用 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液固定,进行电镜超薄切片及透射电镜观察分析。

1.1.2 试验二 将体质量约 13 g 的雌性昆明白小鼠 18 只随机分为 3 组,每组 6 只,常规饲养和管理。适应饲养 2 d 后,第 1、2 组暂不处理,对第 3 组用脂质体(Invitrogen 公司)提前孵育好的 pMSTN-

EGFP 表达质粒(即 Myostatin 与增强型绿色荧光蛋白 EGFP 的融合基因表达载体,由本实验室构建并保存)进行肌内多点注射(100 μ g · 只⁻¹),每 2 周免疫 1 次,共 4 次(注:为了提高转染效率,在质粒注射前 0.5 h,用 25% 蔗糖注射质粒待注射部位)。最后一次免疫 1 周后,第 1 组小鼠腹腔注射 0.1 mL 0.9% NaCl,第 2、3 组小鼠腹腔注射 0.1 mL Dex(每天 20 mg · kg⁻¹),每日 1 次,连续注射 1 周。隔周称重,最后将小鼠处死,并迅速采取腿部未经质粒注射的肌肉,采用 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液固定,以备电镜超薄切片制作和进一步的透射电镜观察分析。

1.2 光镜和透射电镜观察

将 Bouin's 液固定的肌肉样品常规制作厚 5 μ m 的切片,HE 染色后采用 OLYMPUS 显微镜观察并采集图像,以 Image-Pro Plus 图像分析软件对肌细胞及细胞间面积进行分析。

将 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液固定的肌肉样品采用 PBS 洗 3 次,1% 锇酸后固定 1 h, PBS 洗 3 次,梯度乙醇脱水,环氧丙烷、环氧丙烷和 Epon812 树脂的混合液过渡,然后用纯 Epon812 树脂包埋,甲苯胺蓝染色半薄切片定位,用 LEICA EM UC6 (Austria)制 50~70 nm 超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,JEOL-1400 透射电镜(日本)观察并采集图像,采用 Gatan Digital Micrograph 软件(Gatan Inc. USA)对肌原纤维 Z 线和线粒体面积定量分析。

1.3 免疫组化染色

取肌肉组织的石蜡切片常规脱蜡,抗原修复,3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,5% 牛血清封闭液封闭,1:500 稀释的 Myostatin 兔源抗体(Abcam 公司)4 °C 孵育过夜,山羊抗兔二抗(天津灏洋公司)37 °C 孵育 30 min, DAB 显色 20 min。苏木精复染。用 PBS 取代一抗作为阴性对照。封片后采用 OLYMPUS 显微镜观察并采集图像,以 Image-Pro Plus 图像分析软件进行平均光密度测定。

1.4 RNA 提取和定量 PCR

将液氮保存的肌肉样本用 Trizol (TaKaRa 公司)试剂提取总 RNA,然后用反转录试剂(TaKaRa)反转录为 cDNA。为了定量分析 Myostatin 基因 mRNA 的表达,参考 Gilson 设计了特异性引物,分别为 Myostatin (AY204900): GGCTTAACT-GCGATGAGATATAGCATATTAATGGGAGACAT,内参基因 GAPDH(M32599)引物:TGCAC-CACCAACTGCTTAGGATGCAGGGATGATGT-

TC。利用 Real-time PCR 试剂盒 (TaKaRa 公司) 在实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ROCHE 公司) 进行了扩增反应。PCR 扩增体系: 模板 cDNA 溶液 $2 \mu\text{L}$, 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $0.5 \mu\text{L}$, $2 \times \text{SYBR}^{\circledR}$ Premix Ex TaqTM $12.5 \mu\text{L}$, 补水至 $25 \mu\text{L}$; 反应程序: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 总变性 30 s , $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s , $55 \sim 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s , $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 s , 返回 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s , 40 个循环; 熔解程序: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min , $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 。目的基因相对表达量用 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法计算。

1.5 数据分析

数据的多重比较和差异显著性检验采用 SPSS14.0 软件, 以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 作为差异显著性判断标准。统计数据图表的绘制使用 Excel 2010 软件。

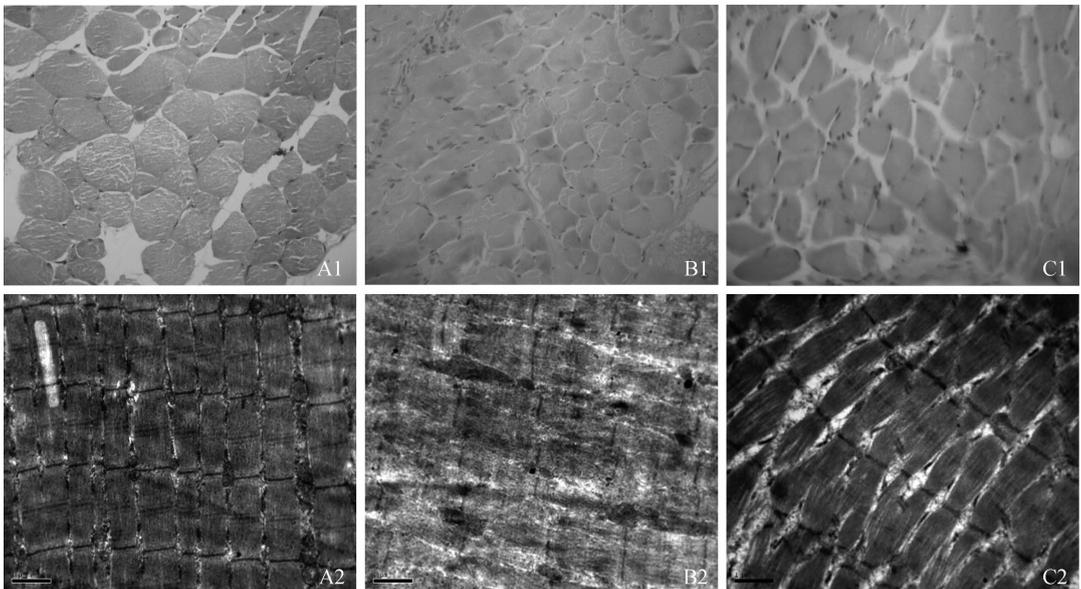
2 结果

2.1 胰岛素对糖皮质激素致肌纤维损伤作用的影响

2.1.1 胰岛素和糖皮质激素对肌肉显微和超微结构的影响 HE 染色图像表明, 与对照组相比, 地塞米松减小了多数肌细胞大小和肌细胞集中区域细胞间的面积, 使细胞呈现拥挤状态, 严重的使肌细胞

降解, 而胰岛素的注射则使地塞米松的影响明显减弱 (图 1 A1-C1)。透射电镜图像表明, 对照组肌原纤维结构完整, 排列整齐, 肌节粗细均匀, Z 线清晰, 粗细肌丝交错排列, 肌原纤维或肌丝间可见分布均匀的糖原颗粒和线粒体 (图 1 A2); 与对照组相比, 地塞米松严重破坏了肌原纤维的超微结构, 导致肌原纤维结构模糊, 呈拥挤状态, 肌节粗细不均, Z 线不清, 肌丝排列紊乱, 甚至断裂或降解, 线粒体肿胀变大且染色加深, 糖原颗粒难以辨认 (图 1 B2); 而胰岛素则使地塞米松对肌原纤维的损伤作用明显减弱 (图 1 C2)。定量分析结果表明, 胰岛素对地塞米松所致细胞面积减小、细胞间面积减小、Z 线长度减短和线粒体面积增大的减轻效率分别为 81.48% 、 84.13% 、 78.95% 、 98.23% ($P < 0.01$, 图 2)。

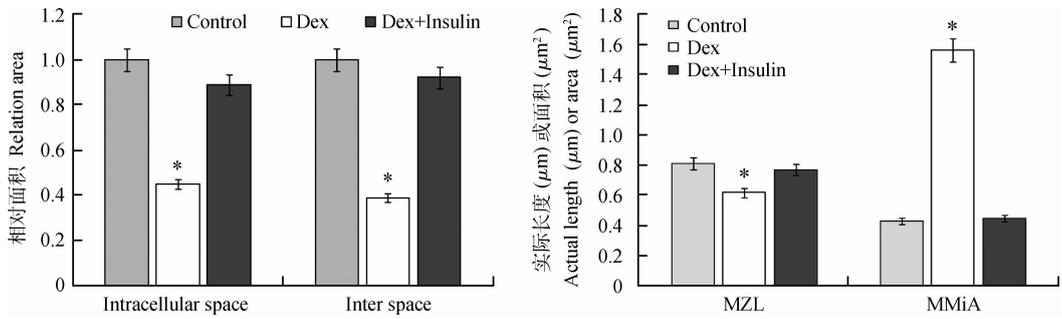
2.1.2 胰岛素和地塞米松对肌肉 Myostatin 蛋白表达的影响 免疫组化结果表明, 正常骨骼肌组织有少量 Myostatin 蛋白的表达, 且分布均匀 (图 3A)。与对照组相比, 地塞米松使 Myostatin 蛋白的表达增加 62.80% ($P < 0.01$, 图 4), 且集中分布在肌纤维损坏和降解的地方 (图 3B)。胰岛素使地塞米松升高明显减弱, Myostatin 蛋白表达 (图 3C), 减弱效率达 98.78% ($P < 0.01$, 图 4)。



A、B 和 C 分别代表对照组、地塞米松组、地塞米松+胰岛素组; A1-C1 ($400 \times$), A2-C2 ($15\ 000 \times$)
A, B and C show respectively the control group, Dex group, Dex+Insulin group. A1-C1 ($400 \times$), A2-C2 ($15\ 000 \times$)

图 1 胰岛素对地塞米松致骨骼肌显微 (A1-C1) 和超微 (A2-C2) 结构改变的影响

Fig. 1 Effects of insulin on the microstructural (A1-C1) and ultrastructural (A2-C2) changes of skeletal muscle fibres induced by dexamethasone (Dex)

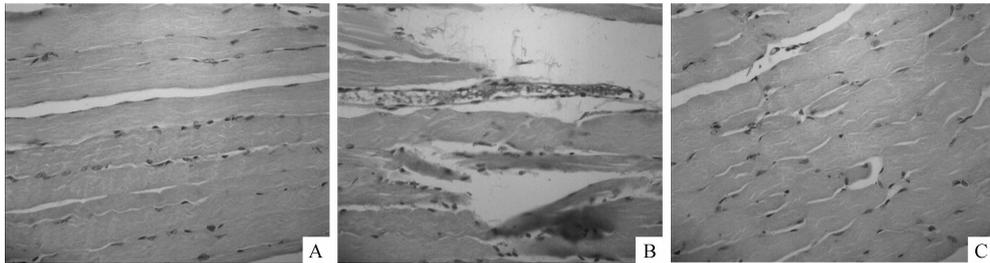


MZL 和 MMiA 分别表示平均 Z 线长度和平均线粒体横截面积。柱形图表示“平均值±平均标准偏差”。含有“*”者表示与对照组或地塞米松+胰岛素组差异显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)

MZL and MMiA are respectively abbreviations of mean Z line length and mean individual mitochondrial area. The bars indicate ‘means±SEM’. Values with ‘*’ above the bar differ significantly from the control group or Dex+Insulin group ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

图 2 胰岛素对地塞米松致骨骼肌显微(左)和超微(右)结构改变影响的定量分析

Fig. 2 Quantitative analysis for the effects of insulin on the microstructural (left) and ultrastructural (right) changes of skeletal muscle fibres induced by dexamethasone (Dex)

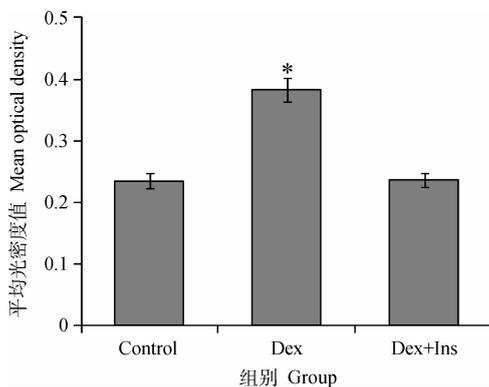


A、B 和 C 分别代表对照组、地塞米松组、地塞米松+胰岛素组

A, B and C show the control group, Dex group, Dex+Insulin group, respectively

图 3 肌肉组织 Myostatin 免疫组化染色

Fig. 3 Immunohistochemical stain of myostatin (MSTN) protein in skeletal muscle



柱形图表示“平均值±平均标准偏差”。含有“*”者表示与对照组或地塞米松+胰岛素组差异显著($P < 0.01$)

The bars indicate ‘means±SEM’. Values with ‘*’ above the bar differ significantly from the control group or Dex+Insulin group ($P < 0.01$)

图 4 地塞米松及其与胰岛素对肌肉 Myostatin 蛋白表达的影响

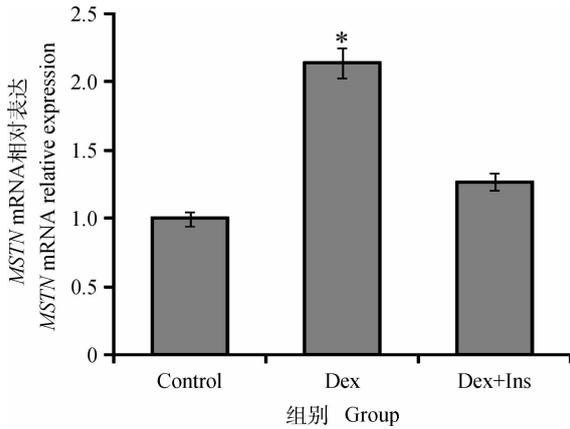
Fig. 4 Effects of dexamethasone (Dex) alone or with insulin (INS) on the myostatin (MSTN) protein expression in skeletal muscle

2.1.3 胰岛素和地塞米松对肌肉 Myostatin 基因 mRNA 的影响 定量 PCR 结果表明,地塞米松使 Myostatin mRNA 的表达增加 114% ($P < 0.01$),胰岛素对地塞米松所致的 Myostatin mRNA 表达上调有明显的抑制作用,抑制效率达 76.32% ($P < 0.01$,图 5)。

2.2 Myostatin 基因免疫对肌肉萎缩的干预影响

地塞米松导致小鼠的体质量明显下降,比对照组降低 14.66% ($P < 0.05$),而 Myostatin 基因免疫组的小鼠在注射地塞米松之前比对照组有较为明显的升高趋势,注射地塞米松后仍有轻微的升高趋势(图 6)。可见,Myostatin 基因免疫防止了地塞米松导致的小鼠体质量下降。电镜检测结果表明,地塞米松导致小鼠严重的肌原纤维损伤以及线粒体病变,而 Myostatin 基因免疫组的小鼠在注射地塞米松后其肌原纤维和线粒体的损伤程度比未经免疫的小鼠明显减轻(图 7)。定量分析结果表明,Myosta-

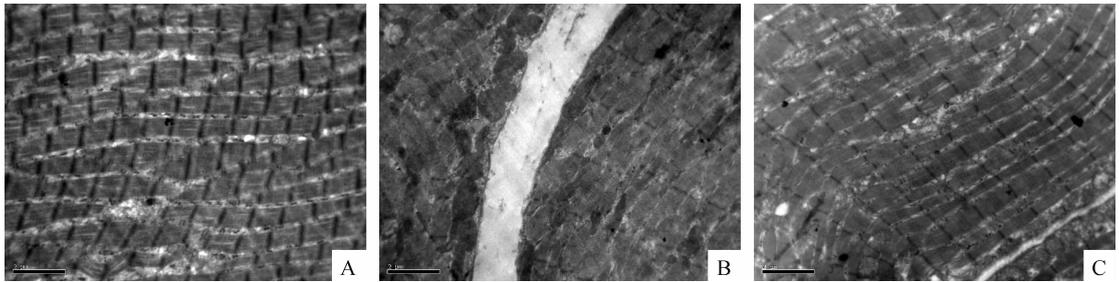
tin 基因免疫对地塞米松所致 Z 线长度减短和线粒体面积增大的减轻效率分别为 58.33% 和 91.80% ($P < 0.01$, 图 8)。



柱形图表示“平均值±平均标准偏差”。含有‘*’者表示与对照组或地塞米松+胰岛素组差异显著($P < 0.01$)。The bars indicate “means ± SEM”. Values with ‘*’ above the bar differ significantly from the control group or Dex+Insulin group ($P < 0.01$)

图 5 地塞米松及其与胰岛素对肌肉 *Myostatin* mRNA 表达的影响

Fig. 5 Effects of dexamethasone (Dex) alone or with insulin (INS) on the *Myostatin* (MSTN) mRNA expression in skeletal muscle



A 表示对照组, B 表示地塞米松组, C 表示 myostatin 基因免疫+地塞米松组 (10 000×)

A indicate the control group, B indicate the dexamethasone (Dex) group, and C indicate the myostatin gene immunization+dexamethasone (MSTN VA+Dex) group (10 000×)

图 7 *Myostatin* 基因免疫对地塞米松致小鼠肌肉超微结构病变的影响

Fig. 7 Effect of *Myostatin* gene immunization on the pathological change of muscle ultrastructure induced by dexamethasone

肌丝降解中的作用, 本试验选用与糖皮质激素代谢作用相反的胰岛素, 首次研究表明胰岛素对地塞米松致肌丝损伤(降解)的干预作用与胰岛素对地塞米松致 *Myostatin* 基因表达上调的抑制作用有关。Gilson 等研究表明, *Myostatin* 基因敲除可以防止地塞米松诱导的小鼠肌肉萎缩, 并且减弱地塞米松诱导的肌纤维分解相关基因的表达上调^[8], 本试验首次探讨并表明 *Myostatin* 基因免疫可以明显抑制地塞米松对肌原纤维的病理损伤, 这些结果进一步

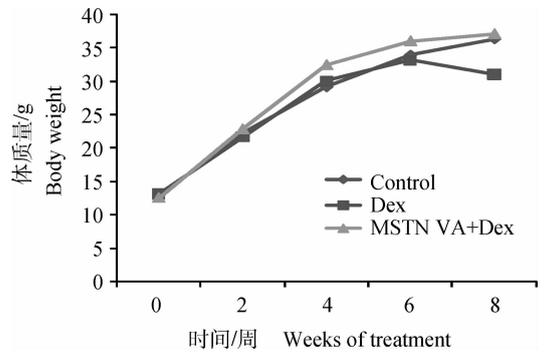


图 6 *Myostatin* 基因免疫对地塞米松致小鼠体质量下降的影响

Fig. 6 Effect of *Myostatin* gene immunization (MSTN VA) on the body weight decrease by dexamethasone (Dex)

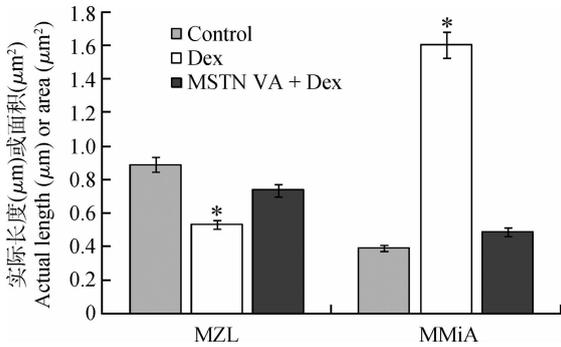
3 讨论

本试验用高剂量地塞米松诱导了 *Myostatin* 基因的表达上调并导致小鼠严重的肌肉萎缩。通过显微和超微结构的观察, 表明地塞米松诱导的肌肉萎缩表现在肌纤维和肌原纤维的缩小, 并伴有肌丝的损伤和降解。这一结果暗示了 *Myostatin* 在促进肌丝降解中的可能作用。为进一步阐明 *Myostatin* 在

明确了 *Myostatin* 在肌丝损伤(降解)中的作用。

体外试验表明, 地塞米松诱导 *Myostatin* 基因表达上调的部分机制: 地塞米松通过其受体(糖皮质激素受体)介导结合于 *Myostatin* 基因 5' 调控区的相应元件(糖皮质激素反应元件)而促进 *Myostatin* 基因的转录^[9-10]。另外, 地塞米松诱导 *Myostatin* 基因表达上调的机制还涉及到 microRNA-27a 的转录后调控机制^[11] 以及其它的非直接调控机制。关于胰岛素对 *Myostatin* 基因表达调控的研究报道很

少,而且结果有所差异。Barazzoni 等研究表明胰岛素缺乏糖尿病大鼠的 *Myostatin* 基因表达并未增加,而且补充胰岛素后也没有改变 *Myostatin* 基因的转录水平^[12]。Chen 等的研究则表明胰岛素明显减弱了由链脲霉素诱导的 1 型糖尿病小鼠的 *Myostatin* 基因表达上调^[13]。本试验发现胰岛素对地塞米松导致的小鼠 *Myostatin* 基因表达上调有明显的抑制作用。可见,胰岛素对 *Myostatin* 基因表达的调控作用受多种因素的影响。通过生物信息学分析,在 *Myostatin* 基因的 5' 调控区并未发现胰岛素反应元件的存在^[14-15],意味着胰岛素对 *Myostatin* 基因表达的调控作用可能是通过其它间接途径而实现的。具体机制和调控模式还有待进一步深入研究。



MZL 和 MMiA 分别表示平均 Z 线长度和平均线粒体横截面积。柱形图表示“平均值±平均标准偏差”。含有‘*’者表示与对照组或 *Myostatin* 基因免疫组差异显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

MZL and MMiA are respectively abbreviations of mean Z line length and mean individual mitochondrial area. The bars indicated “means ± SEM”. Values with ‘*’ above the bar differ significantly from the control group or *Myostatin* gene immunization group ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

图 8 *Myostatin* 基因免疫对地塞米松致小鼠肌肉超微结构病变影响的定量分析

Fig. 8 Quantitative analysis for the effects of *Myostatin* gene immunization (MSTN VA) on the pathological change of muscle ultrastructure induced by dexamethasone (Dex)

本试验中,无论是胰岛素还是 *Myostatin* 基因免疫,在它们对地塞米松致肌丝损伤(降解)的干预作用中,线粒体超微结构的变化是一个值得注意的细节。线粒体依赖性坏死体现了肌肉萎缩的一个主要发病机制^[16]。从本试验结果中,可以推测 *Myostatin* 与线粒体功能之间的关系:*Myostatin* 可能通过刺激线粒体功能而促进了肌丝的氧化分解,进而

引发肌原纤维损伤。Steelman 等和 Amthor 等研究表明 *Myostatin* 基因缺失小鼠的线粒体数量、线粒体 DNA 和线粒体功能相关蛋白下调^[17-18]。*Myostatin* 基因缺失小鼠肌肉团的增加与氧化代谢能力的严重损失(如线粒体氧化潜能标志琥珀酸盐脱氢酶活性的降低)有关^[19-20]。Puddick 和 Martinus 在 *Myostatin* 基因缺失小鼠发现 1 个明显上调的新的线粒体蛋白,序列分析表明该蛋白与醛还原酶 (Aldehyde reductase) 相似^[21]。这些关于 *Myostatin* 基因缺失与线粒体关系的研究,以不同的方法诠释了以上推测。本实验室在另一个试验中已经初步表明 *Myostatin* 基因过表达可以改变肌肉线粒体的超微结构,有关 *Myostatin* 对线粒体功能的影响及其机制尚在进一步探讨中。

4 结论

地塞米松致肌丝损伤的作用与 *Myostatin* 基因表达之间的关系、胰岛素对地塞米松致肌丝损伤的干预作用与 *Myostatin* 基因表达之间的关系、*Myostatin* 基因免疫对地塞米松致肌丝损伤的干预作用、以及与这些过程相关的线粒体结构变化表明: *Myostatin* 是肌原纤维损伤的一个关键因子,其促进肌丝氧化分解的作用可能与刺激了线粒体的功能有关。本试验为进一步深入研究 *Myostatin* 促进肌丝氧化分解的分子细胞机制奠定了基础,也为畜牧业提高肉产(质)量和医学上控制肌肉萎缩提供了依据。

参考文献:

- [1] 李家驹,蔡辉益,刘国华,等. 地塞米松对肉仔鸡小肠小肽吸收的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2010, 41(1): 39-45.
- [2] 孔雪,宋志刚,焦洪超,等. 糖皮质激素及灌注色氨酸对肉仔鸡下丘脑代谢物变化的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(16): 3440-3446.
- [3] MCPHERRON A C, LAWLER A M, LEE S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387: 83-90.
- [4] MCPHERRON A C, LEE S J. Double muscling in cattle due to mutations in the *myostatin* gene [J]. *PNAS*, 1997, 94: 12457-12461.
- [5] GROBET L, MARTIN L J R, PONCELET D, et al. A deletion in the bovine *myostatin* gene causes the

- double-muscle phenotype in cattle [J]. *Nat Genet*, 1997, 17: 71-74.
- [6] ZIMMERS T A, DAVIES M V, KONIARIS L G, et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin [J]. *Science*, 2002, 296: 1486-1488.
- [7] MA K, MALLIDIS C, BHASIN S, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285: E363-E371.
- [8] GILSON H, SCHAKMAN O, COMBARET L, et al. *Myostatin* gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy[J]. *Endocrinology*, 2007, 148: 452-460.
- [9] MA K, MALLIDIS C, ARTAZA J, et al. Characterization of 5'-regulatory region of human *myostatin* gene: regulation by dexamethasone in vitro [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metabol*, 2001, 281: E1128-E1136.
- [10] DU R, AN X R, CHEN Y F, et al. Some motifs were important for myostatin transcriptional regulation in sheep [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40: 547-553.
- [11] ALLEN D L, LOH A S. Post-transcriptional mechanisms involving MicroRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300: C124-137.
- [12] BARAZZONI R, ZANETTI M, BOSUTTI A, et al. Myostatin expression is not altered by insulin deficiency and replacement in streptozotocin-diabetic rat skeletal muscles[J]. *Clin Nutr*, 2004, 23(6): 1413-1417.
- [13] CHEN Y W, CAO L Z, YE J W, et al. Upregulation of myostatin gene expression in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice is attenuated by insulin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(1): 112-116.
- [14] DU R, CHEN Y F, AN X R, et al. Cloning and sequence analysis of myostatin promoter in sheep [J]. *DNA Seq*, 2005, 16(6): 412-417.
- [15] 杜 荣, 安晓荣, 陈永福, 等. 绵羊 Myostatin 基因启动子的功能分析[J]. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2007, 37(5): 551-557.
- [16] MILLAY D P, SARGENT M A, OSINSKA H, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy [J]. *Nat Med*, 2008, 14(4): 442-447.
- [17] STEELMAN C A, RECKNOR J C, NETTLETON D, et al. Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy [J]. *FASEB J*, 2006, 20: 580-582.
- [18] AMTHOR H, MACHARIA R, NAVARRETE R, et al. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation [J]. *PNAS*, 2007, 104(6): 1835-1840.
- [19] MATSAKAS A, MOUISEL E, AMTHOR H, et al. Myostatin knockout mice increase oxidative muscle phenotype as an adaptive response to exercise[J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2010, 31(2): 111-125.
- [20] BALIGAND C, GILSON H, MÉNARD J C, et al. Functional assessment of skeletal muscle in intact mice lacking myostatin by concurrent NMR imaging and spectroscopy [J]. *Gene Ther*, 2010, 17(3): 328-337.
- [21] PUDDICK J, MARTINUS R D. Comparative proteomics of skeletal muscle mitochondria from myostatin-null mice [J]. *Cell Biol Int Rep*, 2011, 18(2): art: e00013. doi: 10. 1042/ CBR20110006 (published online).

(编辑 白永平)