

CaN/NFAT 信号通路相关基因在鸡骨骼肌中的表达规律及关联分析

盛中伟[#], 单艳菊[#], 束婧婷, 章明, 姬改革, 屠云洁, 范建华, 邹剑敏*

(江苏省家禽科学研究所, 扬州 225125)

摘要: 旨在探讨 CaN/NFAT 信号通路相关基因在鸡生长发育早期不同表型骨骼肌中的表达规律以及各基因之间的调控联系。利用荧光定量 PCR 技术检测隐性白羽鸡 2 种表型骨骼肌(腓肠肌外侧头和趾长伸肌)中 CaN/NFAT 信号通路相关基因(*CnA α* 、*CnB1*、*NFATc3*、*MEF2C* 和 *PPARGC1A*) 在出生后不同生长阶段(0、1、3、5、7 和 9 周龄)的相对表达, 并对这些基因的表达进行相关性分析。结果表明, 除 *CnB1* 基因外, 其他 4 个基因 mRNA 在 2 种表型骨骼肌中的表达趋势均较相似; 2 种表型骨骼肌中 5 个基因的表达从 7 周龄到 9 周龄均呈上升的趋势; 同周龄 2 种表型骨骼肌相比, 除腓肠肌外侧头 *PPARGC1A* 基因各周龄表达均高于趾长伸肌外, 其他 4 个基因表达均是在 3 周龄时腓肠肌外侧头高于趾长伸肌, 而在 7 和 9 周龄时则低于趾长伸肌; 相关分析结果表明, 除 *CnA α* 与 *NFATc3*、*CnA α* 与 *PPARGC1A* 基因的表达在 2 种表型肌肉中呈负相关外, 其余各基因表达之间均呈正相关。提示, 鸡骨骼肌 *CnA α* 、*CnB1*、*NFATc3*、*MEF2C* 和 *PPARGC1A* 基因表达发育模式具有年龄和表型特异性, 可能参与调控鸡骨骼肌肌纤维的生长和类型转换。

关键词: 鸡; 肌纤维; CaN/NFAT 信号通路; 基因表达; 相关性

中图分类号: S813.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)10-1825-08

The Expression Profile of CaN/NFAT-Dependent Pathway Genes and Their Correlation Analysis in Chicken Skeletal Muscle

SHENG Zhong-wei[#], SHAN Yan-ju[#], SHU Jing-ting, ZHANG Ming, JI Gai-ge,
TU Yun-jie, FAN Jian-hua, ZOU Jian-min*

(*Jiangsu Institute of Poultry Sciences, Yangzhou 225125, China*)

Abstract: The objective of the present study was to investigate the expression profile of CaN/NFAT-dependent pathway genes, and their correlation analysis in 2 phenotypically distinct skeletal muscles were studied in chicken during the early development. qRT-PCR was used to detect the mRNA expression of *CnA α* , *CnB1*, *NFATc3*, *MEF2C* and *PPARGC1A* genes in lateral gastrocnemius and extensor digitorum longus of Recessive White chicken at 0, 1, 3, 5, 7 and 9 week age, the correlation among expression of these genes was analyzed. The results showed that the expression trends of all the genes between 2 phenotypically distinct skeletal muscles were similar except *CnB1*, and the expression level of these genes in 2 phenotypically distinct skeletal muscles was all raised from 7 to 9 week age. Comparison among the expression of these genes in 2 pheno-

收稿日期: 2017-03-07

基金项目: 国家自然科学基金(31301967; 31572358); 江苏省自然科学基金(BK20161322; BK20151317); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-42); 江苏省农业科技自主创新资金(CX(15)1009); 江苏省重点研发计划(现代农业)(BE2015344); 扬州市科技计划项目(YZ2014144)

作者简介: 盛中伟(1987-), 男, 江苏扬州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事家禽遗传育种研究, Tel: 0514-85599010, E-mail: shengzw@yeah.net; 单艳菊(1982-), 女, 江苏盐城人, 硕士, 副研究员, 主要从事家禽遗传育种研究, Tel: 0514-85599076, E-mail: shanyanjusyj@163.com. 二人并列为第一作者

* 通信作者: 邹剑敏, 研究员, E-mail: jqszm@163.com

typically distinct skeletal muscle showed that the expression level of *PPARGC1A* in the lateral gastrocnemius was higher than that in the extensor digitorum longus at each detected age, and the expression level of other 4 genes in the lateral gastrocnemius was higher at 3 week age and lower at 7 and 9 week age than that in the extensor digitorum longus. Correlation analysis among the 5 genes expression levels in the 2 phenotypically distinct skeletal muscles showed that there was a negative correlation between the *CnA α* and 2 genes (*NFATc3* and *PPARGC1A*), and positive correlations among the expression of other genes. Overall, the expression patterns of *CnA α* , *CnB1*, *NFATc3*, *MEF2C* and *PPARGC1A* genes in chicken skeletal muscle are age and phenotype specific, which may be related to the regulation of the myofiber growth and type transition.

Key words: chicken; muscle fiber; CaN/NFAT signaling pathway; gene expression; correlation

骨骼肌由具有不同收缩与代谢特性的异源性肌纤维组成,这些异源性肌纤维的特异性基因表达模式受到不同程序的调控^[1-2]。动物肌纤维的生长发育与肉的产量和质量密切相关,肌纤维类型的差异导致骨骼肌在生理与代谢特征上的差异,进而引起肌肉品质的差异。不同表型骨骼肌其纤维类型组成在胚胎期已开始形成,而主要肌肉群肌纤维类型的基因表达模式在出生后早期已经完全建立^[3-5]。已有的研究表明,出生后肌纤维类型的维持和调节主要由神经活性通过特定的信号通路来控制^[6]。其中,钙调神经磷酸酶(Calcinerin, CaN 或 Cn)/NFAT 信号通路被认为是动物出生后维持和调节骨骼肌肌纤维类型特异基因表达的重要通路之一。在骨骼肌中,激活后的 CaN 主要通过活化 T 细胞核因子(Nuclear factor of activated T Cells, NFAT)和肌细胞增强因子 MEF2(Myocyte enhancer factor 2, MEF2)2 类转录因子将细胞外信号传递到细胞核内,从而激活慢肌纤维类型特异基因的表达^[5,7]。另外,CaN/NFAT 信号通路还被认为在促进肌管增值和肥大、调节骨骼肌生长方面起着重要作用^[8]。CaN 是目前已知的唯一依赖于 Ca^{2+} /钙调素(calmodulin, CaM)的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶,由催化亚基 CnA 和调节亚基 CnB 按等比例紧密结合而组成的异源二聚体。CaN 的 2 个亚基均有不同的亚型,但是只有 CnA α 、CnA β 和 CnB1 在骨骼肌中表达^[9]。S. A. Parsons 等^[9]研究表明,小鼠不同表型骨骼肌中 CnA α 含量均显著高于 CnA β 。单艳菊等^[10]研究发现,鸭发育早期骨骼肌中 CnA α 与肌纤维类型和肌纤维生长发育密切相关。NFAT 家族有 5 个成员,但只有 NFATc1、NFATc2、NFATc3 和 NFATc4 受到 CaN 调节,其中 NFATc3 是骨骼肌细胞分化最先被激活的 NFAT 亚型^[11]。脊椎动

物中 MEF2 家族包括 MEF2A、MEF2B、MEF2C 和 MEF2D 4 个成员,MEF2C 是小鼠骨骼肌和心中最先表达的 MEF2 转录因子^[12],在维持生后骨骼肌慢肌纤维比例以及肌细胞成熟中起着重要作用^[13-15]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 alpha, PPARGC1A)作为核转录的辅助化因子,能够与多种不同转录因子结合,参与多种代谢过程。研究表明,在骨骼肌中 PPARGC1A 协同 CaN 的 2 个底物 NFAT 和 MEF2 调控机体肌肉质量和氧化型纤维表型^[16-19]。

目前有关 CaN/NFAT 信号通路在鸡骨骼肌中的研究还很少,因此本研究旨在分析 CaN/NFAT 信号通路相关基因 (*CnA α* 、*CnB1*、*NFATc3*、*MEF2C* 和 *PPARGC1A*) 在隐性白羽鸡不同表型骨骼肌中发育性表达规律,以及通路中各基因表达之间的关联性,为揭示 CaN/NFAT 信号通路在鸡骨骼肌生长发育和肌纤维类型形成中的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验时间和地点

本试验于 2015 年 3-12 月在江苏省家禽科学研究所江苏省家禽遗传育种重点实验室进行。

1.2 试验动物

试验鸡品种隐性白羽鸡来源于法国 SASSO 公司,1999 年引进,现保存于江苏省家禽科学研究所国家地方鸡种资源基因库(江苏)。鸡群饲养管理条件一致,全程自由采食与饮水。营养水平:0~6 周龄:粗蛋白 19.00%、粗脂肪 2.35%、粗纤维 2.20%、粗灰分 4.20%、代谢能 11.54 MJ·kg⁻¹、钙 0.90%、总磷 0.59%、有效磷 0.35%;7~9 周龄:粗

蛋白 14.20%、粗脂肪 2.10%、粗纤维 3.30%、粗灰分 5.10%、代谢能 11.12 MJ·kg⁻¹、钙 0.72%、总磷 0.75%、有效磷 0.30%。

选择 0(初生)、1、3、5、7 和 9 周龄 6 个时间点,每个时间点采样 10 只(公母各半),采集同侧腓肠肌和趾长伸肌后置于液氮保存。

1.3 总 RNA 的提取及反转录

参照 TRNzol-A + 总 RNA 提取试剂 DP421 (TIANGEN, 中国北京)说明书提取总 RNA,凝胶

电泳检测 RNA 样品质量后,用 TGem Plus 全波长分光光度计(TIANGEN, 中国北京)测定其浓度,取 2 μg 总 RNA,按照 QuantScript RT Kit (KR103-04) (TIANGEN, 中国北京)说明书进行反转录。

1.4 实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

根据 GenBank 中相关基因序列设计引物,交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

Table 1 Primers sequence of the studied genes for qRT-PCR

基因 Gene	参考序列 Reference sequence	引物序列(5'-3') Primer sequence	产物长度/bp Products size	T _m /°C
<i>ACTB</i>	NM_205518.1	5' primer: GTCCACCTTCCAGCAGATGT 3' primer: ATAAAGCCATGCCAATCTCG	169	60
<i>CnAα</i>	XM_004935968.1	5' primer: TGGTCCTTGCCGTTTGTG 3' primer: AGTCAGCCCTTTCAGCGTCA	228	60
<i>CnB1</i>	AY336970.1	5' primer: AATGTGCTCGCACTTTGATG 3' primer: CATGAACTCTTCCACGCTCA	103	60
<i>MEF2C</i>	XM_015280565.1	5' primer: TTTGGGAATGAACAACCGTA 3' primer: GGAAACCACTGGAGTAGCC	133	60
<i>NFATc3</i>	XM_015292362.1	5' primer: ACCATGTGCGATTTCATCTCC 3' primer: GGCTGGTATTCCAGGTCAGA	149	60
<i>PPARGC1A</i>	NM_001006457.1	5' primer: AAGCAATTGAAGAGCGTCGT 3' primer: CTGTGCACTCCTCGATTTC	111	60

在 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪上采用 SYBR Green I 法进行 qRT-PCR,鸡 *ACTB* 基因作为内参基因,按照 SuperRealPreMixSYBR Green (FP204-01)(TIANGEN, 中国北京)试剂盒推荐的体系,对退火温度、引物浓度和模板稀释倍数等进行优化。20 μL 反应体系包括:2×SYBR Green Real-time PCR Master Mix 10 μL,50×ROX Reference Dye 0.4 μL,上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.4 μL,10 倍稀释的 cDNA 模板 1 μL,加 ddH₂O 7.8 μL。反应条件:95 °C 20 s,60 °C 20 s,72 °C 20 s,共 40 个循环。每个样品做 3 管平行试验,每次反应均使用纯水替代模板的阴性对照。

1.5 统计分析

将隐性白羽鸡 0 周龄腓肠肌外侧头设为对照组,用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法^[20]计算相对表达量。运用 SPSS16.0 软件 ANOVA 统计分析,其中用 Univariate 分析表

达量在性别、日龄间的总体差异,用 Least significant difference (LSD) Test 确定同一种肌肉表型不同周龄间或者同一周龄不同表型肌肉间的表达差异显著性,用 Bivariate Correlation 来分析基因表达量之间的相关性,所有数据以“平均值±标准误”表示。

2 结果

2.1 CaN/NFAT 信号通路相关基因 mRNA 在不同表型肌肉中的发育性表达

多因素方差分析结果发现,*CnA α* 、*CnB1*、*NFATc3*、*MEF2C* 和 *PPARGC1A* 基因 mRNA 在隐性白羽鸡 2 种表型肌肉不同周龄的表达量在性别间的差异均不显著(腓肠肌外侧头: $F_{CnA\alpha} = 1.263$, $P > 0.05$; $F_{CnB1} = 2.002$, $P > 0.05$; $F_{NFATc3} = 0$, $P > 0.05$; $F_{MEF2C} = 0.228$, $P > 0.05$; $F_{PPARGC1A} = 0.942$, $P > 0.05$; 趾长伸肌: $F_{CnA\alpha} = 0.117$, $P > 0.05$; $F_{CnB1} =$

0.37, $P > 0.05$; $F_{NFATc3} = 1.006, P > 0.05$; $F_{MEF2C} = 0.058, P > 0.05$; $F_{PPARGC1A} = 0.103, P > 0.05$), 因此将公母联合在一起进行表达量差异分析。

2.1.1 *CnA α* 基因 mRNA 在隐性白羽鸡腓肠肌外侧头和趾长伸肌中的发育性表达 *CnA α* 基因 mRNA 在隐性白羽鸡腓肠肌外侧头和趾长伸肌中的发育性表达结果见图 1A。从 0 到 9 周龄, 总体上 *CnA α* mRNA 在 2 种肌肉表型肌肉中呈“先上升后下降再上升”的趋势, 腓肠肌外侧头 *CnA α* mRNA 表达在 0 周龄时最低, 1 周龄显著上升 ($P < 0.05$), 并维持在相对稳定水平, 至 7 周龄时下降至较低水平后又显著上升, 9 周龄时达到最高表达量, 显著高于 0、1 和 7 周龄 ($P < 0.05$); 趾长伸肌 *CnA α* mRNA 表达在 0 周龄时相对较低, 1 周龄时急剧上升至最高水平, 显著高于其他各周龄 ($P < 0.05$), 3 周龄时又显著下降, 至 5 周龄下降至最低水平, 表达量显著低于其他各周龄 ($P < 0.05$), 7 周龄再次显著上升 ($P < 0.05$), 9 周龄继续上升到较高水平。2 种表型肌肉相比, 在 0、1、7 和 9 周龄时, 腓肠肌外侧头 *CnA α* mRNA 表达低于趾长伸肌, 且在 1 周龄时达极显著水平 ($P < 0.01$); 在 3 和 5 周龄时, 腓肠肌外侧头 *CnA α* mRNA 表达则高于趾长伸肌, 且在 5 周龄时达极显著水平 ($P < 0.01$)。

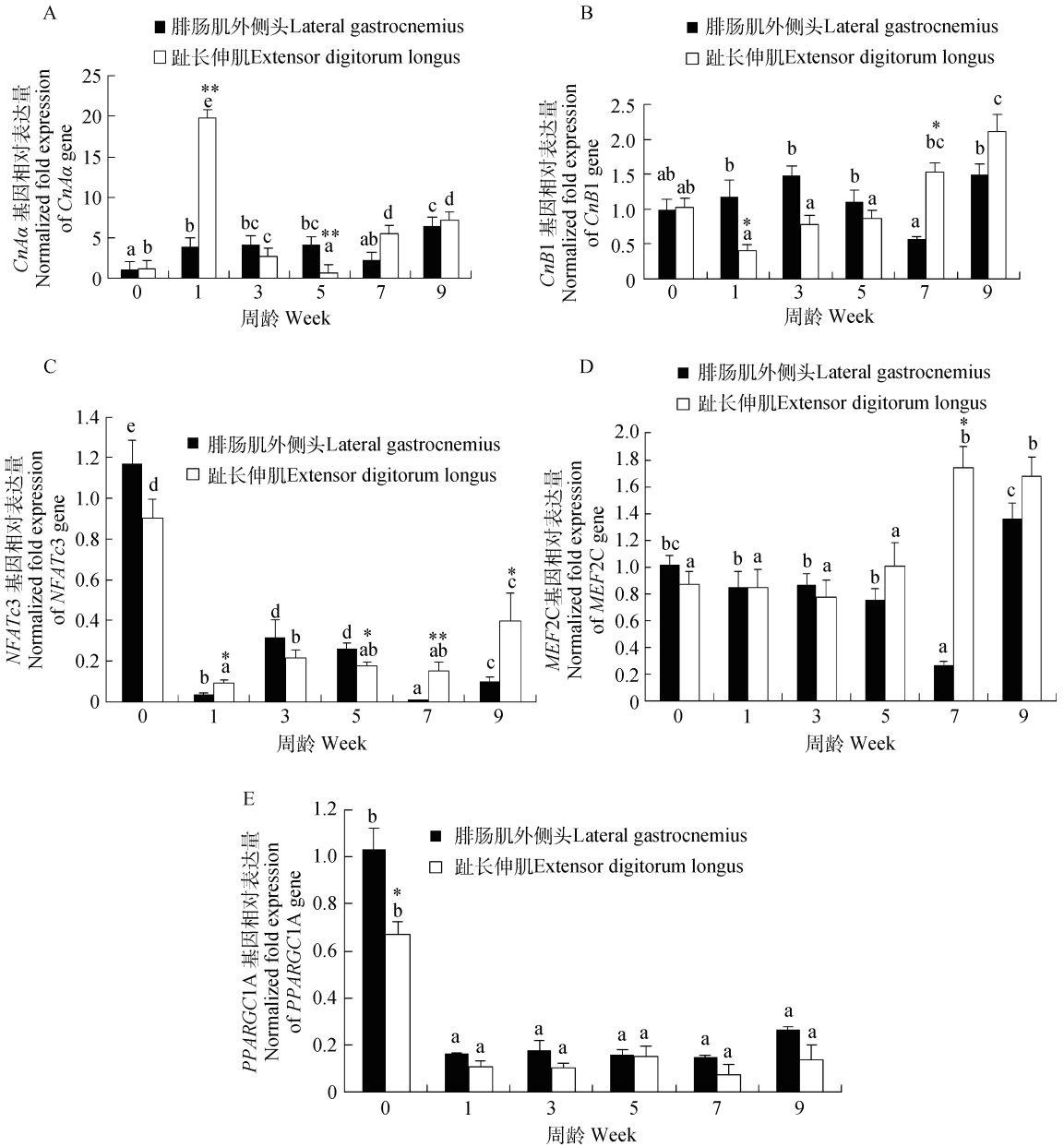
2.1.2 *CnB1* 基因 mRNA 在隐性白羽鸡腓肠肌外侧头和趾长伸肌中的发育性表达 *CnB1* 基因 mRNA 在隐性白羽鸡腓肠肌外侧头和趾长伸肌中的发育性表达结果见图 1B。从 0 到 9 周龄, *CnB1* mRNA 在 2 种表型肌肉中的表达趋势并不一致, 腓肠肌外侧头 *CnB1* mRNA 表达在 0 周龄时相对较低, 然后逐渐上升, 至 5 周龄时开始逐渐下降, 7 周龄时降至最低水平, 9 周龄时又显著上升到最高水平 ($P < 0.05$); 趾长伸肌 *CnB1* mRNA 表达呈现先下降后上升的趋势, 1 周龄时表达水平最低, 9 周龄时表达水平最高。2 种表型肌肉相比, 在 0、7 和 9 周龄时, 腓肠肌外侧头 *CnB1* mRNA 表达低于趾长伸肌, 且在 7 周龄时达显著水平 ($P < 0.05$); 在 1、3 和 5 周龄时, 腓肠肌外侧头 *CnB1* mRNA 表达则高于趾长伸肌, 且在 1 周龄时达显著水平 ($P < 0.05$)。

2.1.3 *NFATc3* 基因 mRNA 在隐性白羽鸡腓肠肌外侧头和趾长伸肌中的发育性表达 *NFATc3* 基因 mRNA 在隐性白羽鸡腓肠肌外侧头和趾长伸肌中的发育性表达结果见图 1C。2 种表型肌肉中

NFATc3 mRNA 表达趋势相似, 呈现“波浪形”, 即均是在 0 周龄时表达最高, 显著高于其他周龄 ($P < 0.05$), 然后显著下降并维持在相对较低的水平, 腓肠肌外侧头 *NFATc3* mRNA 表达在 7 周龄时最低, 趾长伸肌 *NFATc3* mRNA 表达在 1 周龄时表达最低。2 种表型肌肉相比, 在 1、7 和 9 周龄时, 腓肠肌外侧头 *NFATc3* mRNA 表达低于趾长伸肌, 且在 1 和 9 周龄时差异呈显著水平 ($P < 0.05$), 在 7 周龄时差异呈极显著水平 ($P < 0.01$); 而在 0、3 和 5 周龄时, 腓肠肌外侧头 *NFATc3* mRNA 表达则高于趾长伸肌, 且在 5 周龄时差异呈显著水平 ($P < 0.05$)。

2.1.4 *MEF2C* 基因 mRNA 在隐性白羽鸡腓肠肌外侧头和趾长伸肌中的发育性表达 *MEF2C* 基因 mRNA 在隐性白羽鸡腓肠肌外侧头和趾长伸肌中的发育性表达结果见图 1D。从 0 到 9 周龄, 2 种表型肌肉中 *MEF2C* mRNA 表达总体上呈“先下降后上升”的趋势, 腓肠肌外侧头 *MEF2C* mRNA 表达在 0 周龄时相对较高, 1 周龄时开始下降, 至 7 周龄时下降至最低水平, 显著低于其他各周龄 ($P < 0.05$), 9 周龄时快速上升至最高水平, 显著高于 1、3、5 和 7 周龄 ($P < 0.05$); 趾长伸肌 *MEF2C* mRNA 表达在 0 周龄时相对较低, 1 周龄时开始下降, 至 3 周龄时下降至最低水平后, 5 周龄开始上升, 7 周龄时上升至最高水平后, 9 周龄略有下降, 但仍保持较高水平, 显著高于 0、1、3 和 5 周龄 ($P < 0.05$)。2 种表型肌肉相比, 在 0、1 和 3 周龄时, 腓肠肌外侧头 *MEF2C* mRNA 表达高于趾长伸肌, 但差异不显著 ($P > 0.05$); 而在 5、7 和 9 周龄时, 腓肠肌外侧头 *MEF2C* mRNA 表达则低于趾长伸肌, 且在 7 周龄时差异呈显著水平 ($P < 0.05$)。

2.1.5 *PPARGC1A* 基因 mRNA 在隐性白羽鸡腓肠肌外侧头和趾长伸肌中的发育性表达 *PPARGC1A* 基因 mRNA 在隐性白羽鸡腓肠肌外侧头和趾长伸肌中的发育性表达结果见图 1E。0~9 周龄, 2 种表型肌肉中 *PPARGC1A* mRNA 表达趋势比较一致, 即均在 0 周龄时最高, 显著高于其他各周龄 ($P < 0.05$), 1 周龄时开始下降, 随后维持在相对较低的表达水平, 至 9 周龄时略有上升, 但与 1、3、5 和 7 周龄间相差不显著 ($P > 0.05$)。2 种表型肌肉相比, 腓肠肌外侧头 *PPARGC1A* mRNA 表达在各周龄时均高于趾长伸肌, 且在 0 周龄时差异呈显著水平 ($P < 0.05$)。



不同小写字母表示同一表型肌肉不同周龄间差异显著 ($P < 0.05$); * 表示同一周龄不同表型肌肉间差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示同一周龄不同表型肌肉间差异极显著 ($P < 0.01$)

Different lowercase letters indicate that the expression in the same phenotype muscle is significantly different among different week ages ($P < 0.05$); * indicates the expression is significantly different between phenotypically distinct muscles at the same week age ($P < 0.05$), ** indicates the expression is extremely significantly different between phenotypically distinct muscles at the same week age ($P < 0.01$)

图 1 CaN/NFAT 信号通路相关基因在隐性白羽鸡 2 种不同表型肌肉中的表达

Fig. 1 Expression of CaN/NFAT-dependent pathway genes in 2 phenotypically distinct muscles in Recessive White chicken

2.2 CaN/NFAT 通路相关基因表达的协同关系

隐性白羽鸡腓肠肌外侧头和趾长伸肌中 *CnAα*、*CnB1*、*NFATc3*、*MEF2C* 及 *PPARGC1A* 基因表达的关联分析结果见表 2 和表 3。由表 2 和表 3 可知, 2 种表型肌肉中除 *CnAα* 与 *NFATc3* 基因的表达以及 *CnAα* 与 *PPARGC1A* 基因的表达呈负

相关外, 其余各基因表达之间均呈正相关, 且 2 种表型肌肉中 *NFATc3* 与 *PPARGC1A* 基因的表达以及 *CnB1* 与 *MEF2C* 基因的表达均呈极显著正相关 ($P < 0.01$)。另外, 在腓肠肌外侧头中, *CnAα* 与 *NFATc3* 以及 *PPARGC1A* 基因的表达呈显著负相关 ($P < 0.05$), 与 *CnB1* 基因的表达呈显著正相

关($P < 0.05$),与 *MEF2C* 基因的表达呈极显著正相关($P < 0.01$)。在趾长伸肌中,*CnB1* 与 *NFATc3* 及 *PPARGC1A* 基因的表达均呈显著正相关($P < 0.05$)。

表 2 腓肠肌外侧头中 CaN/NFAT 信号通路相关基因表达的关联性

Table 2 Correlation of CaN/NFAT-dependent pathway genes expression in extensor digitorum longus

基因 Gene	<i>CnAα</i>	<i>CnB1</i>	<i>NFATc3</i>	<i>MEF2C</i>
<i>CnAα</i>	—			
<i>CnB1</i>	0.713*	—		
<i>NFATc3</i>	-0.309*	0.119	—	
<i>MEF2C</i>	0.633**	0.666**	0.186	—
<i>PPARGC1A</i>	-0.307*	0.08	0.936**	0.252

—. 未做相关分析;*. 相关显著($P < 0.05$);**. 相关极显著($P < 0.01$)。下表同

—. No correlation analysis;*. Significant correlation ($P < 0.05$);**. Highly significant correlation ($P < 0.01$). The same as below

表 3 趾长伸肌中 CaN/NFAT 信号通路相关基因表达的关联性

Table 3 Correlation of CaN/NFAT-dependent pathway genes expression in lateral gastrocnemius

基因 Gene	<i>CnAα</i>	<i>CnB1</i>	<i>NFATc3</i>	<i>MEF2C</i>
<i>CnAα</i>	—			
<i>CnB1</i>	0.042	—		
<i>NFATc3</i>	-0.19	0.318*	—	
<i>MEF2C</i>	0.256	0.517**	0.025	—
<i>PPARGC1A</i>	-0.085	0.278*	0.851**	0.127

3 讨论

动物出生后肌肉的发育不仅包括肌纤维肥大,还伴随着肌纤维类型转换。出生后早期是肌纤维类型转换的重要阶段^[21-22]。已有的研究表明,CaN/NFAT 信号通路在哺乳动物出生后骨骼肌中起着维持和调节肌肉表型、促进不同类型肌纤维生长、维持肌肉质量的作用^[23-25]。但目前对于 CaN/NFAT 信号通路的作用方式还存在争议。U. Dellling 等^[11]研究发现,NFATc3 是成肌细胞分化时 Cn 最先激活的底物,但 NFATc3 却没有促进慢肌纤维肌球蛋白重链的表达,推测 Cn 通过 NFATc3 促进成肌细胞分化,但通过其他因子促进慢肌纤维肌球蛋白重链的表达。S. A. Parsons 等^[9]也通过 Cn 转基因小鼠表明,Cn 通过非依赖于 NFAT 的机制调节肌纤维类型转换。D. L. Allen 等^[26]发现,在快型肌纤维 MHC II a、II x 和 II b 的启动子区域存在多种 NFAT 结合位点,且超表达 CaN 可以活化这些快肌纤维基因。但 E. Calabria 等^[4]最新研究表明,Cn

通过激活不同 NFAT 亚型,从而促进不同类型肌纤维肌球蛋白重链基因的表达。

J. T. Shu 等^[27]研究发现,IGF-I-CaN-NFAT 信号通路在鸭早期骨骼肌纤维类型转换中可能发挥着调控作用。目前有关 Cn 信号通路在鸡骨骼肌中的研究还很少。本研究发现,CaN/NFAT 信号通路相关基因 *CnA α* 、*CnB1*、*NFATc3*、*MEF2C* 和 *PPARGC1A* mRNA 在出生后早期隐性白羽鸡腓肠肌外侧头(混合型肌肉)和趾长伸肌(快肌)中的发育表达模式具有年龄和表型特异性,但不存在性别特异性。除 *CnB1* 基因外,其他 4 个基因 mRNA 在 2 种表型骨骼肌中表达趋势均较相似。*NFATc3* 和 *PPARGC1A* 基因 mRNA 在 2 种表型骨骼肌中均在 0 周龄时最高,显著高于其他周龄($P < 0.05$);*CnA* mRNA 在趾长伸肌 1 周龄时出现了急速上升,显著高于其他各周龄($P < 0.05$);这可能与出雏后早期肌纤维类型发生转换有关。2 种表型骨骼肌中 5 个基因 mRNA 的表达从 7 到 9 周龄均呈上升趋势,这可能与 CaN/NFAT 信号通路在肌纤维发育

后期主要起促进肌纤维肥大有关。另外,本研究发
现,同周龄 2 种表型肌肉相比,除腓肠肌外侧头
PPARGC1A 基因各周龄表达均高于趾长伸肌外,
其他 4 个基因表达均是在 3 周龄时腓肠肌外侧头高
于趾长伸肌,而在 7 和 9 周龄时低于趾长伸肌;这可
能与 CaN/NFAT 信号通路根据肌肉表型和生长阶
段,调节肌纤维生长发育有关^[28-31]。

CaN 在肌肉中的活性不仅与其催化亚单位
CnA 有关,还与其调节亚单位 CnB 有关^[27]。本研
究对隐性白羽鸡 2 种表型骨骼肌中 *CnA α* 、*CnB1*、
NFATc3、*MEF2C* 及 *PPARGC1A* 基因表达的关
联分析结果发现,虽然 2 种表型骨骼肌中除 CaN 的
催化亚单位 *CnA α* 基因的表达与其作用底物
NFATc3 基因的表达以及协同因子 *PPARGC1A*
基因的表达呈负相关,但其余各基因表达之间均呈
正相关,初步揭示了这些基因间的共表达调控关系。

4 结 论

本试验研究了 CaN/NFAT 信号通路 5 个基因
在鸡不同表型肌肉早期发育中的表达规律,发现 5
个基因 mRNA 的表达存在着共性,存在着发育时段
和部位的差异,但尚未表现出性别差异,且 5 个基因
之间存在着协同表达关系,提示 CaN/NFAT 信号
通路可能参与调控了鸡骨骼肌肌纤维的生长和类型
转换。

参考文献 (References):

- [1] 占思远, 李 利, 王林杰, 等. 骨骼肌发育调控相关
lncRNAs 研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(4):
637-644.
ZHAN S Y, LI L, WANG L J, et al. Research pro-
gress of long noncoding RNAs in the regulation of
skeletal muscle development[J]. *Acta Veterinaria et
Zootechnica Sinica*, 2016, 47(4): 637-644. (in Chi-
nese)
- [2] SCHIAFFINO S, REGGIANI C. Molecular diversity
of myofibrillar proteins: gene regulation and functional
significance[J]. *Physiol Rev*, 1996, 76(2): 371-423.
- [3] GARRY D J, BASSEL-DUBY R S, RICHARDSON
J A, et al. Postnatal development and plasticity of
specialized muscle fiber characteristics in the hindlimb
[J]. *Dev Genet*, 1996, 19(2): 146-156.
- [4] CALABRIA E, CICILIOT S, MORETTI I, et al.
NFAT isoforms control activity-dependent muscle fi-
ber type specification[J]. *Proc Natl Acad Sci U S
A*, 2009, 106(32): 13335-13340.
- [5] WU H, NAVA F J, MCKINSEY T A, et al. MEF2
responds to multiple calcium-regulated signals in the
control of skeletal muscle fiber type[J]. *EMBO J*,
2000, 19(9): 1963-1973.
- [6] SCHIAFFINO S, SANDRI M, MURGIA M. Activi-
ty-dependent signaling pathways controlling muscle
diversity and plasticity[J]. *Physiology (Bethesda)*,
2007, 22(4): 269-278.
- [7] CHIN E R, OLSON E N, RICHARDSON J A, et
al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway
controls skeletal muscle fiber type[J]. *Genes Dev*,
1998, 12(16): 2499-2509.
- [8] HUDSON M B, PRICE S R. Calcineurin: a poorly
understood regulator of muscle mass[J]. *Int J Bio-
chem Cell Biol*, 2013, 45(10): 2173-2178.
- [9] PARSONS S A, WILKINS B J, BUENO O F, et al.
Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin A α
and A β gene-targeted mice[J]. *Mol Cell Biol*, 2003,
23(12): 4331-4343.
- [10] 单艳菊, 宋 迟, 束婧婷, 等. 钙调磷酸酶催化亚基
A 基因(*PPP3CA*)在不同品种鸭发育早期肌肉中的
表达及其与肌纤维特性的相关性[J]. 农业生物技术
学报, 2015, 23(2): 236-243.
SHAN Y J, SONG C, SHU J T, et al. Expression
profile of protein phosphatase 3 catalytic A Gene
(*PPP3CA*) mRNA in muscles of two duck breeds
(*Anas platyrhynchos domestica*) and its relationship
with myofiber traits during early development[J].
Journal of Agricultural Biotechnology, 2015, 23
(2): 236-243. (in Chinese)
- [11] DELLING U, TURECKOVA J, LIM H W, et al. A
calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skele-
tal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain
expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20 (17):
6600-6611.
- [12] EDMONDSON D G, LYONS G E, MARTIN J F, et
al. Mef2 gene expression marks the cardiac and skele-
tal muscle lineages during mouse embryogenesis[J].
Development, 1994, 120(5): 1251-1263.
- [13] POTTHOFF M J, WU H, ARNOLD M A, et al.
Histone deacetylase degradation and MEF2 activation
promote the formation of slow-twitch myofibers[J].
J Clin Invest, 2007, 117(9): 2459-2467.
- [14] POTTHOFF M J, ARNOLD M A, MCANALLY J,
et al. Regulation of skeletal muscle sarcomere integrity

- and postnatal muscle function by *Mef2c*[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(23): 8143-8151.
- [15] ANDERSON C M, HU J X, BARNES R M, et al. Myocyte enhancer factor 2C function in skeletal muscle is required for normal growth and glucose metabolism in mice[J]. *Skelet Muscle*, 2015, 5: 7.
- [16] ROBERTS-WILSON T K, REDDY R N, BAILEY J L, et al. Calcineurin signaling and PGC-1 α expression are suppressed during muscle atrophy due to diabetes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803 (8): 960-967.
- [17] BASSEL-DUBY R, OLSON E. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling [J]. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 19-37.
- [18] LIN J D, WU H, TARR P T, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres[J]. *Nature*, 2002, 418(6899): 797-801.
- [19] SHU J T, XU W J, ZHANG M, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 α gene is associated with chicken skeletal muscle fiber types [J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(1): 895-905.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] EIZEMA K, VAN DER WAL D E, VAN DER BURG M M, et al. Differential expression of calcineurin and SR Ca²⁺ handling proteins in equine muscle fibers during early postnatal growth[J]. *J Histochem Cytochem*, 2007, 55(3): 247-254.
- [22] 李 玥, 袁丽霞, 杨晓静, 等. 早期和后期限制肉鸡腓肠肌纤维类型和生长轴相关基因表达的影响 [J]. *动物学报*, 2006, 52(6): 1133-1141.
- LI Y, YUAN L X, YANG X J, et al. Effects of early and late feed restriction on myofiber types and expression of growth-related genes in gastrocnemius of broiler chickens[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, 52(6): 1133-1141. (in Chinese)
- [23] OH M, RYBKIN I I, COPELAND V, et al. Calcineurin is necessary for the maintenance but not embryonic development of slow muscle fibers [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(15): 6629-6638.
- [24] MITCHELL P O, MILLS S T, PAVLATH G K. Calcineurin differentially regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscles [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282(5): C984-C992.
- [25] LOMONOSOVA Y N, TURTIKOVA O V, SHENKMAN B S. Erratum to: reduced expression of MyHC slow isoform in rat soleus during unloading is accompanied by alterations of endogenous inhibitors of calcineurin/NFAT signaling pathway [J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2016, 37(1-2): 53.
- [26] ALLEN D L, SARTORIUS C A, SYCURO L K, et al. Different pathways regulate expression of the skeletal myosin heavy chain genes [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(47): 43524-43533.
- [27] SHU J T, LI H F, SHAN Y J, et al. Expression profile of IGF-I-calcineurin-NFATc3-dependent pathway genes in skeletal muscle during early development between duck breeds differing in growth rates [J]. *Dev Genes Evol*, 2015, 225(3): 139-148.
- [28] WAN L, MA J S, XU G Y, et al. Molecular cloning, structural analysis and tissue expression of protein phosphatase 3 catalytic subunit alpha isoform (*ppp3ca*) gene in Tianfu goat muscle [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2): 2346-2358.
- [29] SCHULZ R A, YUTZEY K E. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development [J]. *Dev Biol*, 2004, 266(1): 1-16.
- [30] SAKUMA K, YAMAGUCHI A. The functional role of calcineurin in hypertrophy, regeneration, and disorders of skeletal muscle [J]. *J Biomed Biot*, 2010, 2010: 721219.
- [31] LIU J, LIANG X J, GAN Z J. Transcriptional regulatory circuits controlling muscle fiber type switching [J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58(4): 321-327.

(编辑 郭云雁)