

高表达 *FoxO1* 抑制猪骨骼肌成肌细胞的分化

袁媛, 史新娥, 刘月光, 杨公社

西北农林科技大学动物科技学院 动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100

摘要: FoxO1 (Forkhead box O1) 是调控肌肉生长、代谢和细胞分化的重要转录因子, 但其在成肌细胞分化中的作用还不甚清楚。为了研究 FoxO1 对哺乳动物成肌细胞分化的影响, 以原代培养的长白仔猪成肌细胞作为实验材料, 用 2% 马血清诱导分化, 采用实时荧光定量 PCR、Western blotting 和脂质体转染等方法检测 FoxO1 及早期和晚期生肌调节因子 MyoD 和 myogenin 在猪成肌细胞分化过程中的表达变化。结果显示, 在猪成肌细胞分化过程中, *FoxO1* mRNA 表达量显著增加, 但总蛋白量变化不显著, 其磷酸化水平显著上调。同时, 高表达 FoxO1 的猪成肌细胞中, 生肌调节因子 *MyoD* 和 *myogenin* mRNA 表达受到显著抑制, 而 MyoD 蛋白变化不显著, *myogenin* 却显著下调 ($P < 0.05$)。以上结果表明, FoxO1 能够推迟猪成肌细胞的分化时间并抑制分化; 同时推测, FoxO1 可能通过抑制生肌调节因子的表达控制骨骼肌纤维类型的终末分化。

关键词: FoxO1, 猪, 原代成肌细胞, 分化, 生肌调节因子

Over-expression of *FoxO1* inhibits the differentiation of porcine skeletal muscle myoblast

Yuan Yuan, Xin'e Shi, Yueguang Liu, and Gongshe Yang

Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: The Forkhead box O1 (FoxO1) transcription factor governs muscle growth, metabolism and cell differentiation. However, its role in myoblast differentiation is unclear. To study the biological function of FoxO1 during differentiation in porcine primary myoblast, we constructed stably FoxO1 over-expressed porcine myoblast mediated by liposome and adopted morphological observation, quantitative real-time RT-PCR and Western blotting methods to analyze FoxO1 and early and late myogenic regulation factors MyoD and myogenin expression. During differentiation the mRNA level of *FoxO1* was significantly increased. However, the total protein did not change but the phosphorylation of FoxO1 was upregulated. Furthermore, overexpression of FoxO1 in porcine myoblast decreased *MyoD* and *myogenin* mRNA, whereas MyoD protein changed little and myogenin was significantly suppressed ($P < 0.05$). These results indicated that FoxO1 delays and negatively regulates the porcine myoblast differentiation. Moreover, FoxO1 may play a critical role in muscle fiber-type specification through the inhibition of myogenic regulation factors.

Keywords: FoxO1, porcine, primary myoblast, differentiation, myogenic regulation factors

Received: April 9, 2010; **Accepted:** May 18, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10Z138), Key and Specific National Project for Creating New Biological Species Transgenically (No. 2009ZX08009-157B).

Corresponding author: Gongshe Yang. Tel/Fax: +86-29-87092430; E-mail: gsyang999@hotmail.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA10Z138), 转基因生物新品种培育重大专项 (No. 2009ZX08009-157B) 资助。

FoxO 家族是一群拥有保守的 Fork 区域的转录调控因子,能够和 TTGTTTAC 序列相似性高或一致的序列结合,主要参与 DNA 修复、细胞分化、凋亡和代谢^[1]。FoxOs 作为转录活化因子,其活性受多条信号通路的调节,包括胰岛素、PI3K/Akt 等,其作用方式是对 FoxOs 特定的氨基酸位点进行磷酸化/去磷酸化的调控^[2]。FoxOs 特异性的氨基酸位点一旦被磷酸化后,将从细胞核内转移到胞质中,此时便失去转录调控活性,其功能亦被抑制,因此 FoxOs 在核内外的转位决定了其对靶基因转录的调控^[3]。近几年的研究表明,该家族成员 FoxO1 在骨骼肌的分化、生长与代谢过程中扮演重要角色,但其调控方式仍存在争议,分子机制尚不清楚。

猪肉是我国肉类生产的主体,目前提高瘦肉率、改善肉品质已成为育种的主要研究方向。骨骼肌是肌肉的主要组成部分,其生长发育非常复杂,涉及到大量基因的表达及网络调控。FoxO1 的表达和活性与骨骼肌的发育密切相关,但目前关于其在肌肉发育中的调控方式仍不十分清楚。因此,本实验诱导体外培养的猪原代骨骼肌成肌细胞分化,检测 FoxO1 在此过程中的表达变化,并通过将 *FoxO1* 基因导入猪成肌细胞,探索 FoxO1 对成肌分化的影响,为进一步揭示 FoxO1 调节肌肉发育的作用机理奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

3 日龄健康长白仔猪由西北农林科技大学种猪场提供,体重 1.5~2.5 kg,取样前用 0.5% 的新洁尔灭清洗 0.5 h 左右,电击处死。

1.1.2 主要试剂

含目的基因 *FoxO1* 的 pcDNA3-FLAG-tagged FoxO1 质粒和空质粒 pcDNA3 由 Haojie Huang 教授 (Minnesota University, USA) 惠赠。脂质体转染试剂 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)、Opti-MEM (Invitrogen)、G418 (Gibco)、DMEM/F12 培养基 (Gibco)、链酶蛋白酶 (Sigma)、胎牛血清 (杭州四季青)、马血清 (Gibco)、Trizol (TaKaRa)、反转录试剂

盒 PrimeScript RT-reagent Kit (TaKaRa)、DNase I (TaKaRa)、实时定量试剂盒 SYBR Premix Ex TaqTM II (Perfect Real Time) (TaKaRa)、抗 FoxO1、P-FoxO1 (Ser256)、MyoD、 β -actin 和 FLAG 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司,抗 myogenin 购自 Millipore 公司。其他试剂为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 猪骨骼肌成肌细胞的原代培养及分化诱导

依照本实验室已建立的方法^[4],培养猪原代骨骼肌成肌细胞。原代细胞以 0.5×10^6 个/cm² 密度接种至六孔培养板内,置于 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱内培养。48 h 后更换培养基,此后每隔 2 d 换液 1 次。当细胞汇合至 60%~70% 时,将含 15% 胎牛血清的培养液换成 2% 马血清的培养基诱导分化,持续培养 5 d,收集细胞进行后续检测。

1.2.2 脂质体介导质粒转染猪原代成肌细胞

原代猪骨骼肌成肌细胞在含 15% 胎牛血清和抗生素的 DMEM/F-12 培养基中常规培养,取对数生长期细胞转入六孔板,加入含 15% 小牛血清而无抗生素的培养基继续培养,当细胞汇合至 60%~70% 时进行转染。转染步骤按说明书进行,先将 4 μ g 的质粒 DNA 稀释于 250 μ L 培养基中,再将 10 μ L 的 Lipofectamine 2000 稀释于 250 μ L 培养基中,5 min 后将二者混合,混匀后室温放置 20 min。更换待转染细胞的培养基为 Opti-MEM (Invitrogen) 培养基,加入 DNA 和 Lipofectamine 2000 的混合物,培养 5 h 后更换为含 15% 胎牛血清无抗生素的培养基。为了获得稳定表达目的基因的细胞株,在培养基中添加 200 μ g/mL 的 G418,继续培养 7~14 d,筛选具有 G418 抗性的细胞。最后用 Western blotting 筛选转染成功的细胞。

1.2.3 引物设计

根据 GenBank 已发表的基因序列 (*FoxO1*、*MyoD*、*Myogenin*、 β -actin) 的 GenBank 登录号分别为:NM_214014.2, NM_001002824, NM_001012406, NM_007393),严格按照实时定量引物设计原则,应用 Primer Premier 5.0 软件,设计引物进行目的基因扩增。引物均由上海生物工程技术服务有限公司合成。引物序列见表 1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primers for genes

Gene	Primer	Sequence (5'-3')
<i>FoxO1</i>	S	AGTTGAGAGGAAATCCAAGAT
	A	CTTCAGCTTCAGGTCCTTGAT
<i>MyoD</i>	S	TGCGTATTCTCAACCCCTTC
	A	AGTATGCAAGGGTGGAGTGG
<i>myogenin</i>	S	GAGAAGCGCAGACTCAAGAAG
	A	TCTGTAGGGTCCGCTGGGAGC
β -actin	S	CGTGAAAAGATGACCCAGATC
	A	CACAGCCTGGATGGCTACGT

S: sense; A: antisense.

1.2.4 总RNA的提取及cDNA第一链的合成

按照RNAiso Plus (TaKaRa) 总RNA提取试剂说明书提取诱导分化第0、3、5天的猪原代成肌细胞的总RNA, 用DNase I处理后, 1%琼脂糖凝胶检测RNA的完整性并用Nanodrop ND-1000核酸蛋白定量仪对RNA定量, 随后用反转录试剂盒合成cDNA第一链。

1.2.5 实时荧光定量PCR

利用Smart Cycler II (Cepheid公司) 实时PCR系统进行实时定量扩增。反应总体积25 μ L, 其中: 灭菌的ddH₂O 8.5 μ L, cDNA模板2 μ L, 上游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物(10 μ mol/L) 1 μ L, SYBR Premix Ex TaqTM II (2 \times) 12.5 μ L。采用两步法PCR反应程序: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s, 95 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 共45个循环。基因的相对表达采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算。

1.2.6 Western blotting

去除培养皿中的培养液, PBS洗1遍, 每皿加入200 μ L的细胞裂解液。当细胞充分裂解后, 12 000 \times g离心5 min, 取上清, 以Bradford方法对总蛋白质进行定量。提取的总蛋白95 $^{\circ}$ C加热10 min, 10% SDS-PAGE分离蛋白, 接着以200 mA的电流将蛋白转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭2 h,

用抗FoxO1、P-FoxO1 (Ser256)、MyoD、myogenin、 β -actin和FLAG的抗体(1:200), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜。再与对应的辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:2 000)室温下孵育2 h, 最后利用Bio-Rad GS-800曝光系统检测目的蛋白, 并用Quantity One软件分析蛋白表达量。

1.2.7 数据统计分析

采用SPSS13.0统计分析软件One-way ANOVA进行方差分析与显著性检验。

2 结果与分析

2.1 猪原代成肌细胞的分化

猪原代成肌细胞培养48 h后, 贴壁, 形态呈长梭形(图1A)。2%马血清诱导分化3 d后, 成肌细胞变得细长, 开始融合(图1B)。诱导分化5 d后, 可以看到有肌管形成(图1C)。

2.2 猪原代成肌细胞分化过程中FoxO1的表达变化

检测原代猪成肌细胞FoxO1在分化0、3、5 d表达的变化。实时定量RT-PCR结果表明, 在猪成肌细胞分化过程中, *FoxO1* mRNA表达显著上调(图2A)。然而, Western blotting检测结果发现, 在此过程中FoxO1总蛋白的表达量没有显著变化, 但其磷酸化水平显著增加(图2B-D)。

2.3 FoxO1质粒成功感染猪原代成肌细胞的鉴定

原代猪成肌细胞转染空质粒pcDNA3和pcDNA3-FLAG-tagged FoxO1质粒72 h后, 提取细胞蛋白进行Western blotting, 检测FoxO1蛋白表达情况。如图3所示, 稳定转染pcDNA3-FLAG-tagged FoxO1质粒的猪成肌细胞中FoxO1表达显著提高, 同时也可检测到FLAG标签的表达。

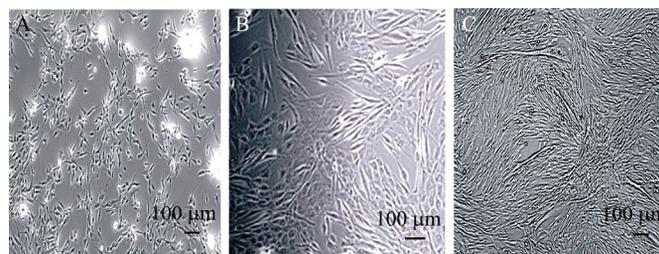


图1 猪原代成肌细胞体外培养及诱导分化形态图

Fig. 1 Differentiation and morphometric analysis of pig skeletal muscle myoblast differentiation at 0 day (A), 3 day (B) and 5 day (C).

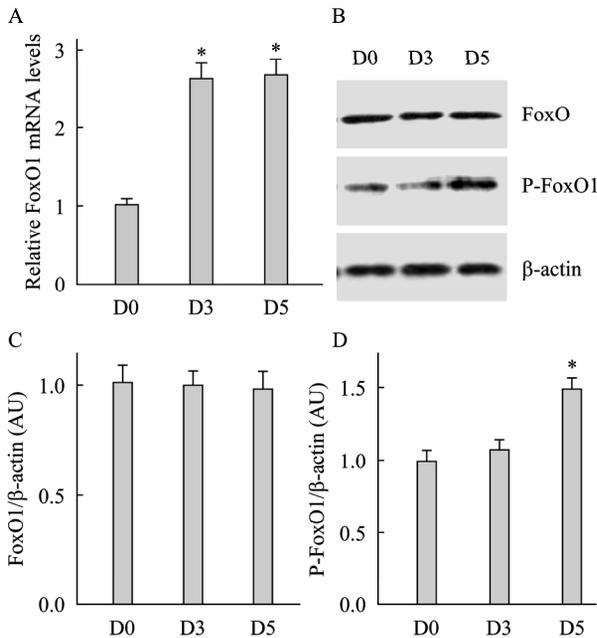


图2 猪原代成肌细胞分化过程中 FoxO1 的表达变化
Fig. 2 FoxO1 expression pattern during pig myoblast differentiation. Real-time PCR (A) and Western blotting (B) were performed to quantify the time-course expression of FoxO1 during myoblast differentiation. (C-D) Densitometric analysis of total FoxO1 and FoxO1 phosphorylation normalized against β-actin, respectively. * $P < 0.05$.

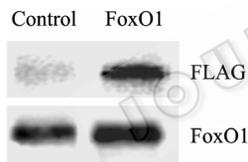


图3 质粒成功导入猪成肌细胞的鉴定
Fig. 3 Identification of plasmids transfected into porcine myoblasts successfully by Western blotting.

2.4 FoxO1 过表达对猪原代成肌细胞分化的影响

对稳定转染空质粒 pcDNA3 和 pcDNA3-FLAG-tagged FoxO1 质粒的猪成肌细胞进行分化诱导, 观察诱导分化第 5 天时细胞的形态学变化。结果发现, 对照组空质粒在诱导 5 d 后, 细胞正常分化, 并有肌管形成 (图 4B)。然而, 过表达 FoxO1 的猪成肌细胞虽也进行分化并呈现梭形生长, 但成肌分化进程被明显推迟, 未能形成肌纤维 (图 4D)。

2.5 FoxO1 过表达对猪原代成肌细胞分化标志基因的影响

对稳定转染空质粒 pcDNA3 和 pcDNA3-FLAG-tagged FoxO1 质粒的猪成肌细胞进行分化诱导, 分

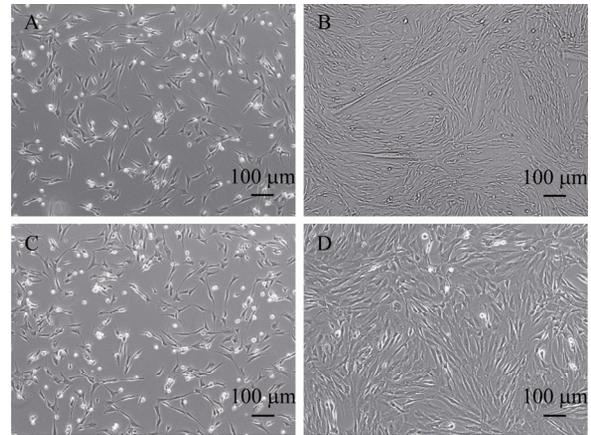


图4 高表达 FoxO1 推迟猪成肌细胞的分化进程
Fig. 4 Over-expression of FoxO1 delayed pig myoblast terminal differentiation. Differentiation and morphometric analysis of pig skeletal muscle myoblast differentiation at 0 day and 5 day in control (A and B) and FoxO1-infected cells (C and D), respectively.

别检测诱导分化第 3 天 (D3) 和第 5 天 (D5) 时, 成肌分化早期标志基因 *MyoD* 和晚期标志 *myogenin* 的表达变化。如图 5A 所示, 对照组细胞中 *MyoD* 在成肌细胞早期表达, 分化第 3 天达到峰值, 分化末期 (D5) 表达量回到基础水平。成肌分化晚期标志 *myogenin* 随着分化时间的推移逐渐升高 (图 5C)。高表达 FoxO1 的猪成肌细胞中, *MyoD* 和 *myogenin* mRNA 含量均显著降低 ($P < 0.05$) (图 5A、5C)。Western blotting 检测结果发现高表达 FoxO1 的猪成肌细胞中 *MyoD* 蛋白表达量略有下降, 但差异并不显著, 而 *myogenin* 蛋白表达量与转录水平保持一致, 受到显著抑制 (图 5B、5D、5E)。

3 讨论

FoxO1 是多条信号通路中重要的转录因子, 调控细胞增殖、分化和凋亡等生理过程, 其活性受到磷酸化/去磷酸化的调控^[5-6]。本实验室庞卫军及其他学者的研究表明, FoxO1 广泛表达于各种组织器官中, 包括脂肪、骨骼肌和肝脏等并能够抑制脂肪细胞的分化^[7-8]。众多研究证实, FoxO1 在肌肉发育与分化中起到重要作用。Bois 等研究指出 FoxO1 可以促进小鼠原代成肌细胞的终末分化^[9], 同年又有研究发现 C2C12 小鼠成肌细胞系的分化受到 FoxO1 转录因子的抑制^[10]。Kamei 等构建了骨骼肌特异的

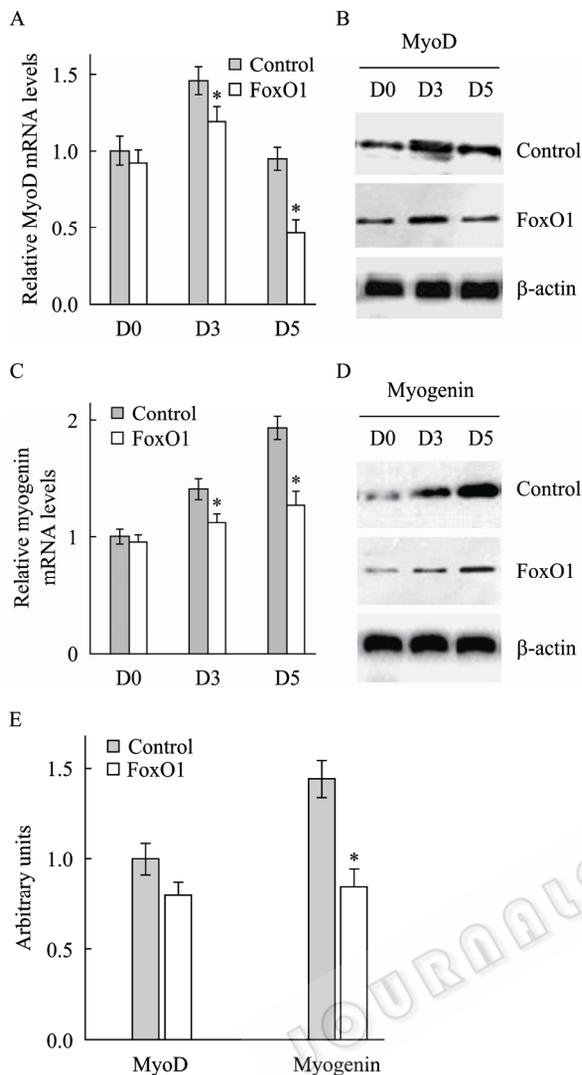


图5 高表达 FoxO1 对猪成肌细胞分化标志基因的影响
 Fig. 5 Over-expression of FoxO1 inhibited pig myoblast terminal differentiation. Real-time PCR (A and C) and Western blotting (B and D) showed the changes of early and late myogenic factors (MyoD and myogenin) in control and FoxO1-infected cells. (E) Densitometric analysis of MyoD and myogenin at 5 days differentiation (D5) normalized against β -actin. * $P < 0.05$.

FoxO1 转基因小鼠, 发现骨骼肌重量明显减少^[11]。这些研究均表明, FoxO1 转录因子在骨骼肌的分化中扮演重要角色, 但调控方式仍存在争议, 需要进一步的研究证实。因此, 我们首先检测了猪原代成肌细胞分化过程中 FoxO1 的表达情况。结果显示, 在猪成肌细胞的分化过程中, FoxO1 基因的表达量显著上调, 而总蛋白表达量变化并不显著, 其磷酸化水平呈现上升趋势, 表明 FoxO1 的失活状态对于成肌细胞的分化是非常必要的。

MyoD 和 myogenin 属于生肌调节因子家族 (Myogenic regulation factors, MRFs), 可激活肌肉的基因转录, 抑制肌细胞增殖, 促进分化, 在骨骼肌发生早期起到重要的调节作用^[12-13]。本实验室杨燕军等^[14]通过对不同品种猪背最长肌的组织差异分析发现 FoxO1 和 MyoD 基因的表达在肌肉发育中存在负相关 ($P < 0.05$)。为了进一步证明 FoxO1 在成肌分化中的作用, 我们构建了稳定表达 FoxO1 的猪原代成肌细胞株, 并检测了早期和晚期成肌标志分子 MyoD 和 myogenin 的表达情况。与对照组成肌细胞相比, 过表达 FoxO1 的猪成肌细胞中, MyoD 和 myogenin 基因在转录水平的表达量受到显著抑制 ($P < 0.05$)。同时, Western blotting 结果显示早期成肌标志 MyoD 蛋白表达量虽受到抑制但变化不明显, 然而晚期标志 myogenin 蛋白表达与其基因表达保持一致, 显著下调 ($P < 0.05$)。这些结果表明, FoxO1 可以通过抑制早期标志基因 MyoD 推迟成肌细胞的分化, 并进一步通过抑制肌肉形成的晚期标志分子 myogenin 阻遏肌肉的分化。

同时, 生肌调节因子不仅在成肌分化中发挥重要作用, 由于其调控收缩蛋白和调节蛋白同工型在不同时期表达, 也可以促使肌肉细胞向不同类型的肌纤维分化^[15-16]。已有研究证实, MyoD 在快肌纤维中优先表达, 而 myogenin 在慢肌纤维中表达较多^[17]。骨骼肌特异的 FoxO1 转基因小鼠中, 慢肌纤维数量明显减少而快肌纤维数量没有明显改变^[11]。然而小鼠骨骼肌中特异性地敲除 FoxO1 可以改变原有的肌纤维类型组成, 快肌纤维含量上调并伴随慢肌纤维的减少, 同时检测到 MyoD 基因表达量的增加^[18]。本实验所得结果与这些研究一致, 表明 FoxO1 在控制肌纤维分型中也发挥重要作用, 并提示 FoxO1 可能通过调节生肌调节因子控制肌纤维类型的分化。然而, 对于 FoxO1 调控肌纤维类型特异性分化的具体机制还有待深入研究。

综上所述, 本研究表明 FoxO1 转录因子在猪原代成肌细胞分化中发挥负调节作用, 能够推迟并抑制猪成肌细胞的分化, 并可能参与调控骨骼肌纤维类型的终末分化。

REFERENCES

- [1] Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, 2004, **117**(4): 421–426.
- [2] Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 1999, **96**(6): 857–868.
- [3] Van Der Heide LP, Hoekman MF, Smidt MP. The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J*, 2004, **380**(Pt 2): 297–309.
- [4] Wen XH, Luo GF, Sun SD, *et al.* Effects of Leptin on the expression of PGC-1 α and UCPs mRNA in pig myoblasts. *J Agr Biotech*, 2007, **15**(4): 644–648.
文旭辉, 罗桂芬, 孙世铎, 等. Leptin 对猪成肌细胞中 PGC-1 α 和 UCPs mRNA 表达的影响. 农业生物技术学报, 2007, **15**(4): 644–648.
- [5] Van Der Host A, Burgering BMT. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, **8**(6): 440–450.
- [6] Cui M, Zhao Y. Advances in the FoxO class of transcription factors. *China Biotechnol*, 2004, **24**(3): 40–43.
崔旻, 赵勇. FoxO 转录因子. 中国生物工程杂志, 2004, **24**(3): 40–43.
- [7] Pang WJ, Yu TY, Bai L, *et al.* Tissue expression of porcine FoxO1 and its negative regulation during primary preadipocyte differentiation. *Mo Biol Rep*, 2009, **36**(1): 165–176.
- [8] Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, *et al.* The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell*, 2003, **4**(1): 119–129.
- [9] Bois PRJ, Grosveld GC. FKHR (FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts. *EMBO J*, 2003, **22**(5): 1147–1157.
- [10] Hribal ML, Nakae J, Kitamura T, *et al.* Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *J Cell Biol*, 2003, **162**(4): 535–541.
- [11] Kamei Y, Miura S, Suzuki M, *et al.* Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (Slow Twitch/Red Muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem*, 2004, **279**(39): 41114–41123.
- [12] Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*, 2000, **57**(1): 16–25.
- [13] Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2002, **18**: 747–783.
- [14] Yang YJ, Bai L, Pang WJ, *et al.* Comparison of FoxO1 and MyoD mRNA expression in muscle tissues among different pig breeds. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2008, **24**(3): 257–261.
杨燕军, 白亮, 庞卫军, 等. 不同猪品种肌肉组织 FoxO1 与 MyoD 基因 mRNA 的表达及其相关性分析. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, **24**(3): 257–261.
- [15] Yablonka RZ, Rudnicki MA, Rivera AJ, *et al.* The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *Dev Biol*, 1999, **210**(2): 440–455.
- [16] Walters EH, Stickland NC, Loughna PT. MRF-4 exhibits fiber type- and muscle-specific pattern of expression in postnatal rat muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000, **278**(5): R1381–1384.
- [17] Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, *et al.* Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development*, 1993, **118**(4): 1137–1147.
- [18] Kitamura T, Kitamura YI, Funahashi Y, *et al.* A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J Clin Invest*, 2007, **117**(9): 2477–2485.