

肌肉增强子因子 2 对猪肌肉生长抑制素启动子活性的调节

李佳, 邓捷, 张军林, 成德, 王华岩

西北农林科技大学动物医学院 动物生物技术系, 陕西 杨陵 712100

李佳, 邓捷, 张军林, 等. 肌肉增强子因子 2 对猪肌肉生长抑制素启动子活性的调节. 生物工程学报, 2012, 28(8): 918-926.

Li J, Deng J, Zhang JL, et al. Regulation of myostatin promoter activity by myocyte enhancer factor 2. Chin J Biotech, 2012, 28(8): 918-926.

摘要: 肌肉生长抑制素 (Myostatin, *Mstn*) 是转化生长因子- β 超家族的成员, 在哺乳动物的骨骼肌生长和分化过程中起负调控作用, 其转录调控受到多个基因的影响, 其中肌肉增强子因子 2 (MEF2) 是重要的调控因子之一。因此, 对猪 *Mstn* 启动子上 MEF2 位点及其作用方式的探讨具有重要意义。首先, 通过 PCR 方法扩增了猪 *Mstn* 基因上游 1 969 kb 的启动子序列, 利用生物信息学方法分析该序列包含 3 个 MEF2 的结合位点; 其次, 采用逐步删除的方法获得 5 个长度不等的启动子, 用荧光素酶报告系统评估了它们在小鼠成肌细胞 C2C12 中的活性。其次, 转入含有 MEF2 结合位点的启动子片段和 MEF2C 表达载体, 可以显著增强启动子活性 2~6 倍, 高表达另一亚型 MEF2A 则启动子活性没有明显改变。最后, 转入 MEF2C 表达载体, 用实时定量 PCR 和 Western blotting 方法检测 *Mstn* 的转录和蛋白水平的变化, 结果发现 mRNA 升高了 2~4 倍; 在肌管细胞中, 蛋白翻译水平也有显著升高。这些结果显示, MEF2C 可以通过激活 *Mstn* 参与猪肌肉生长和发育阶段的调节。研究为 *Mstn* 基因的转录调控提供了有效的作用靶点和效应分子, 为进一步探讨 *Mstn* 的功能调控提供了一种新的思路。

关键词: 猪肌肉生长抑制素, 转录调控, 启动子活性, 肌肉增强子因子 2, C2C12 细胞

Received: February 21, 2012; **Accepted:** April 9, 2012

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2009CB941002, 2011CBA01002).

Corresponding author: Huayan Wang. Tel: +86-29-87080069; Fax: +86-29-87080068; E-mail: hhwang101@163.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2009CB941002, 2011CBA01002) 资助。

Regulation of myostatin promoter activity by myocyte enhancer factor 2

Jia Li, Jie Deng, Junlin Zhang, De Cheng, and Huayan Wang

Department of Animal Biotechnology, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: Myostatin (Mstn) is a member of the transforming growth factor- β superfamily that functions as a negative regulator of skeletal muscle growth and differentiation in mammals. The transcriptional regulation of *Mstn* is controlled by multiple genes including MEF2, which raise the importance of identifying the binding sites of MEF2 on myostatin promoter region and mechanisms underlying. In this study, we investigated the transcriptional regulation of MEF2 on porcine *Mstn* promoter activity in C2C12 cells. Sequence analysis of the 1 969 bp porcine *Mstn* promoter region revealed that it contained three potential MEF2 motifs. Using a serial deletion strategy, we tested the activity of several promoter fragments by luciferase assay. Overexpression of MEF2C, but not MEF2A increased *Mstn* promoter activity in all the promoter fragments with MEF2 motifs by two to six folds, in both C2C12 myoblasts and myotubes. When we transfected exogenous MEF2C, *Mstn* mRNA level was also upregulated in C2C12 cells, but the protein level was only significantly increased in myotubes. Thus, we propose that MEF2C could modulate and restrain myogenesis by *Mstn* activation and *Mstn*-dependent gene processing in porcine. Our research also provided potential targets and an effective molecule to regulate *Mstn* expression and gave a new way to explore the functional performance of *Mstn*.

Keywords: porcine myostatin, transcriptional regulation, promoter activity, MEF2C, C2C12 cells

肌肉生长抑制素 (Myostatin, Mstn) 又称生长分化因子 8 (Growth differentiation factor 8, GDF8), 属于转化生长因子 β (Transforming growth factor beta, TGF- β) 超家族, 是在骨骼肌中广泛表达并且功能专一的一种糖蛋白。*Mstn* 基因在发育早期及成熟期的骨骼肌及乳腺中高表达^[1], 在心肌、脂肪组织和肝脏中低表达^[2-3]。高表达 *Mstn* 的转基因动物会出现肌肉萎缩的现象^[4-5]; 在小鼠、牛、人等动物上, 抑制 *Mstn* 的表达, 则会出现骨骼肌明显增生、肌肉尺寸显著增加等现象^[6-8]。因此, 该基因是骨骼肌生长的抑制因子。研究该基因的转录调控机制, 对提高动物产肉率方面具有重要意义。

相比于 *Mstn* 的基因与蛋白结构和生物学功能, 对 *Mstn* 基因转录和表达的调控机制研究较

少。在小鼠、人类、牛和羊等动物上, 只完成对 *Mstn* 基因启动子一些初步的功能预测, 发现启动子序列上存在糖皮质激素受体结合元件 (GRE)、肌肉调控因子结合元件 (E-box)、叉头蛋白结合元件 (FOXO-box) 和肌肉增强子因子 2 (MEF2) 等因子的结合位点, 它们对 *Mstn* 基因的转录和表达起到一定的调控作用^[7,9-11]。但是, 由于 *Mstn* 基因的转录调控模式在不同动物间存在差异, 这些调控元件在不同物种间, 对 *Mstn* 启动子的调控作用和具体机制还需要继续深入研究^[10,12]。早期研究表明, MEF2 可能通过结合 *Mstn* 启动子的相关位点调节肌纤维类型相互转换^[13]; 在心肌细胞内, MEF2 与 *Mstn* 启动子的结合可以抑制心肌细胞增殖^[14]。但在骨骼肌中, MEF2 怎样调控猪 *Mstn* 启动子活性尚不清楚; 如果调控机制

确实存在, 还需要进一步确定激活 *Mstn* 启动子的 MEF2 亚型和具体的结合位点。

本研究首先通过 PCR 方法扩增出 1 969 kb 猪 *Mstn* 的启动子序列, 利用生物信息学方法分析出启动子全序列中所有的 MEF2 的结合位点; 其次, 比较了 5 个长度不等的启动子在 C2C12 细胞中的活性。本实验还选取含有 MEF2 位点的启动子片段, 与 MEF2C 或 MEF2A 的表达载体共同转入 C2C12 细胞, 检测启动子活性的变化, 确定 MEF2 的主要结合位点。最后探讨 2 个 MEF2 亚型对 *Mstn* mRNA 水平和蛋白水平的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

C2C12 细胞系为西北农林科技大学动物医学院干细胞中心保存; pGEM-T Easy、pGL3-Basic、pCMV-Renilla、Dual Luciferase Reporter Assay System kit、*Kpn* I、*Xho* I、*Sac* I、*Bam*H I、*Sal* I、质粒提取试剂盒购自 Promega 公司; T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; LipofectamineTM 2000 脂质体购自 Invitrogen 公司; RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 和 *Taq* DNA 聚合酶购自 MBI 公司; 兔抗鼠 *Mstn* 抗体购自 Abcam 公司; 兔抗鼠 b-actin 抗体购自 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体购自 SantaCruz 公司; BCA Protein Assay Kit、ECL Western Blotting Substrate 购自 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 *Mstn* 基因启动子片段的克隆

按照 Promega 基因组提取试剂盒说明书, 常规提取八眉猪肌肉组织基因组 DNA, 检测核酸

浓度及纯度。根据 *Mstn* 启动子 5'端序列 (GenBank Accession No. AY208121), 设计带有酶切位点 *Kpn* I 和 *Xho* I 的启动子上下游引物并扩增启动子片段为 1 969 bp。PCR 采用 25 μ L 体系, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物连接在 pGEM-T Easy 克隆载体上, 经测序验证后克隆到 pEGFP-1 和 pGL3-Basic 表达载体中, 分别命名为 pE2.0 和 pL2.0。以 PCR 产物为模板, 分别设计带有酶切位点 *Kpn* I 和 *Xho* I 的上下游引物, 扩增 852 bp、466 bp、218 bp 和 137 bp 的启动子片段, 测序后克隆到 pGL3-Basic 表达载体中, 分别命名为 pL0.8、pL0.4、pL0.2 和 pL0.1。引物序列见表 1。

1.2.2 MEF2A 和 MEF2C 真核表达载体的构建

PCR 引物根据 GenBank 中猪 MEF2A 的序列设计, 带有 *Xho* I 和 *Eco*R I 或 *Sal* I 的酶切位点, 上下游引物序列见表 1。按照常规 RT-PCR 方法从 C2C12 细胞中获取 cDNA。按上述 PCR 条件扩增 MEF2A 及 MEF2C 片段。经测序验证后, 将两个片段克隆到 pEGFP-C1 表达载体中, 分别命名为 pE-MEF2A 和 pE-MEF2C。

1.2.3 细胞培养及瞬时转染

C2C12 成肌细胞 (Myoblast), NIH3T3 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37 $^{\circ}$ C、含有 5% CO₂ 的细胞培养箱内培养, 实验时取对数生长期细胞。C2C12 肌管细胞 (Myotube) 是将 C2C12 细胞培养在含 2% 马血清的 DMEM 培养液中 24 h 后获得。按照 Lipofectine 2000 使用说明, 首先将 pE2.0 启动子分别转入 C2C12 成肌细胞和 3T3 细胞, 转染后 30 h 在荧光显微镜下观察绿色荧光。其次, 将 C2C12 成肌细胞或肌

管细胞按 2.4×10^4 /孔接种于 48 孔培养板中,待细胞完全贴壁覆盖率至 50%~60%时,将 pL2.0、pL0.8、pL0.4、pL0.2 或 pL0.1 启动子荧光报告载体 500 ng 和 pCMV-Renilla 表达载体 (内参) 50 ng 共同转入细胞,30 h 后收集细胞并进行荧光素酶活性检测。最后,将上述荧光报告载体分别同 MEF2A 或 MEF2C 表达载体 (4 μ g) 共同转入成肌细胞或肌管细胞,48 h 后检测荧光素酶活性。每种质粒做 3 次独立实验,每次 3 个复孔。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

转染 MEF2A 或 MEF2C 表达载体 60 h 后,Trizol 提取细胞总 RNA,按照 RevertAid™ Frist Strand cDNA Synthesis Kit 相关说明进行反转录获得 cDNA,并设计 qMstn 和 qGAPDH (内参) 引物。荧光定量 PCR 反应体系如下:2 \times SYBR Green Mix 10 μ L, 25 mmol/L dNTPs 1 μ L, 上、下游引物各 0.5 μ L (10 pmol/L), 模板 cDNA 1 μ L, 去离

子水 7 μ L, 共 20 μ L。每个样本设 3 个重复,另设不加模板对照组 (以等体积的去离子水替代)。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 56 $^{\circ}$ C 退火阶段收集荧光信号。实时荧光定量 PCR 引物序列见表 1。

1.2.5 Western blotting 检测

转染后 72 h 收集细胞,采用细胞裂解液 (Promega 公司) 提取总蛋白。将蛋白样品与等量的 2 \times 上样缓冲液混合,100 $^{\circ}$ C 变性 5 min,冰上完全冷却后上样,进行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳。恒压 80 V 转 PVDF 膜 4 h,用含 5%脱脂奶粉的 PBST 封闭 1 h 后,1:500 稀释的 Mstn 抗体作用于 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜,或以 1:2 000 稀释的 β -actin 抗体室温作用 1 h, PBST 洗膜 3 次后,将膜与 1:5 000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 室温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次后,加入 ECL 化学发光试剂,室温孵育 5 min,暗室曝光,显影定影。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Name	Sequence (5'-3')	Size (bp)
F2.0 (-1 969/+42)	F-GGGTACCAGTTCTAGTTCATGTGGAG R-CCTCGAGCCTGCACTGTCTGAGAG	2 011
F0.8 (-852/+42)	F-GGGTACCACTGGAAATCTGAGGC R-CCTCGAGCCTGCACTGTCTGAGAG	894
F0.4 (-466/+42)	F-GGGTACCTCTGATTACACAGGAC R-CCTCGAGCCTGCACTGTCTGAGAG	508
F0.2 (-285/+42)	F-GGGTACCAAGATTAATAATATTTAAG R-CCTCGAGCCTGCACTGTCTGAGAG	327
F0.1 (-137/+42)	F-GGGTACCTGTTTGGTGACTTGTGAC R-CCTCGAGCCTGCACTGTCTGAGAG	179
MEF2A	F-CCTCGAGCTGCCACCATGGGGAGAAAAAGATTCAG R-GGAATTCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGGTCACCCA TGCGTCCATCC	1 462
MEF2C	F-CCTCGAGCTGTCGCCACCATGGGGAGAAAAAGATTC R-CGTCGACTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATGTTGCCCAT CCTTCAG	1 445
qMstn	F-ACCCATGAAAGACGGTACAAG R-TCATCGCAGTCAAGCCCAAAG	288
qGAPDH	F-GTCTCCTGCGACTTCAAC R-TCATTGTCATACCAGGAAATGAGC	107

1.2.6 统计学分析

所有数据均用平均值±标准偏差表示, 并经双尾 t-test 检验差异是否具有统计学意义。*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 猪 *Mstn* 启动子的构建及相关转录因子位点分析

从猪的基因组 DNA 克隆了 1 969 bp 的 *Mstn* 基因启动子片段, 并通过生物信息学分析猪 *Mstn* 启动子上潜在的转录因子结合位点 (图 1A)。在 *Mstn* 的 5'端侧翼 50 bp 以内存在 2 个独立的 TATA 框; 在 -71 bp 到 -66 bp 存在 1 个 CAAT 框; 整个启动子包括 16 个 E-box, 它的识别位点为 CANNTG 序列, 可以结合成肌分化抗原 (MyoD), 生肌调节因子 5 (MYF5) 和生肌调节因子 6 (MYF6) 等参与肌肉生长发育调节的转录因子。该启动子上还包括 3 个潜在的 MEF2 结合位

点 (TA(A/T)₄TA), 一个近端的位点位于 -189 bp 到 -206 bp (MEF2-1); 两个远端的位点分别位于 -441 bp 到 -449 bp (MEF2-2), -620 bp 到 -628 bp (MEF2-3)。

2.2 猪 *Mstn* 启动子在 C2C12 及 NIH 3T3 细胞中的活性

首先, 将 pE2.0 启动子缺失报告载体分别转入 C2C12 细胞和 3T3 细胞, 30 h 后在荧光显微镜下观察细胞。结果显示, 部分 C2C12 细胞表达绿色荧光而 3T3 细胞没有荧光蛋白的表达 (图 1B)。这一结果证实了 *Mstn* 启动子在肌细胞中表达的特异性。然后, 将 5 个不同长度的启动子片段分别转入 C2C12 成肌细胞和肌管细胞中, 观察这些启动子的活性。在成肌细胞中, 转入不同的 *Mstn* 启动子后, 荧光素酶水平是转入 pGL3-Basic 对照载体细胞的 20~60 倍, 进一步证实该启动子在肌细胞中充分激活 (图 2)。研究检

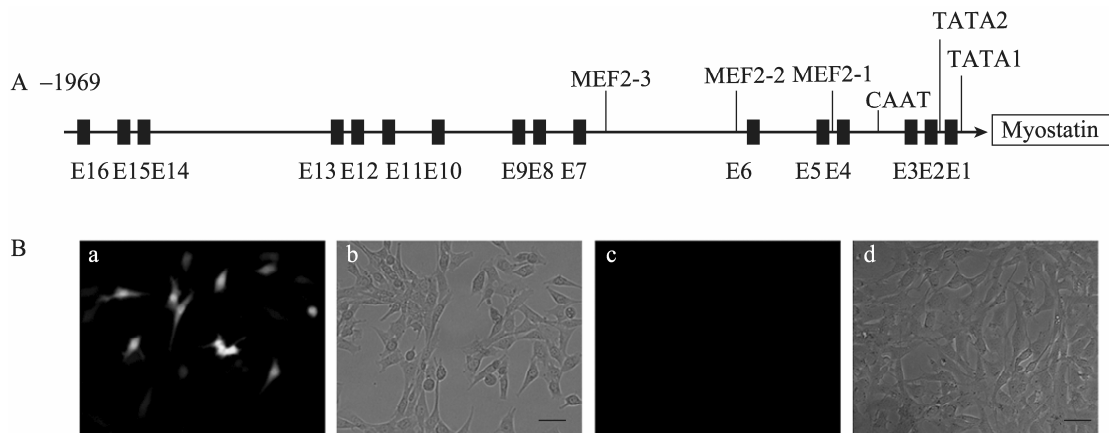


图 1 猪 *Mstn* 启动子的序列分析及启动子缺失载体 pE2.0 在 C2C12 细胞和 NIH 3T3 细胞中的激活

Fig. 1 Sequence analysis of porcine *Mstn* promoter and the activation of promoter-less vector pE2.0 in C2C12 cells and NIH 3T3 cells. (A) The 1 969 bp porcine *Mstn* promoter was analyzed by MatInspector software. 16 E-Boxes were indicated by black box. (B) C2C12 (a and b) and NIH 3T3 cells (c and d) were transfected with pE2.0 constructs. a and c are fluorescent images; b and d are phase-contrast images. Scale bars=10 μm .

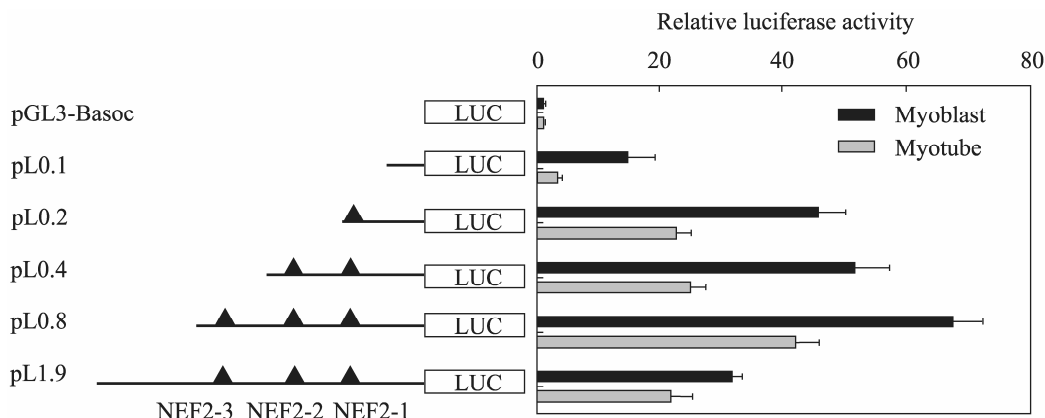


图 2 不同片段猪 *Mstn* 启动子成肌细胞及肌管细胞的活性检测

Fig. 2 Luciferase activity of five constructs with different sized *Mstn* promoter in myoblasts and myotubes.

测的 5 个启动子, 它们的活性在成肌细胞中比在肌管细胞中要高 2~3 倍 (图 2), 这可能是因为成肌细胞中高表达一系列限制肌肉分化发育的转录因子, 对 *Mstn* 启动子发挥了一定的协同激活作用。

基于荧光素酶检测的结果, 研究发现在 1 969 bp *Mstn* 基因启动子片段中, 包含了 5 个活性调控区域, 包括 3 个活性上调区 (1 bp 至 -137 bp、-137 bp 至 -218 bp、-218 bp 至 -466 bp 和 -466 bp 到 -852 bp) 和 1 个活性下调区域 (-852 bp 至 -1 969 bp)。其中, 在第一个区域, 结果显示仅 137 bp 的启动子片段 (pL0.1) 足以激活启动子活性 (该片段活性是对照载体的 15 倍)。在 -137 bp 至 -218 bp 区域和 -466 bp 至 -852 bp 区域, 荧光素酶活性显著增加。在成肌细胞和肌管细胞中, 报告载体 pL0.2 的活性分别是 pL0.1 的 2 倍和 4 倍, 表明在 -137 bp 到 -218 bp 这一区域有重要的正调控转录因子参与 *Mstn* 启动子活性调节。从 -218 bp 至 -466 bp, 启动子活性没有明显改变, 提示这一区域可能不是 *Mstn*

启动子的关键调控区。

2.3 MEF2 对猪 *Mstn* 启动子活性的影响

在 C2C12 细胞上, 进一步探讨了转录因子 MEF2 对猪 *Mstn* 启动子活性的调控。分别将 MEF2A 和 MEF2C 两个亚型的表达载体与不同的启动子片段共同转染成肌细胞或肌管细胞, 60 h 后检测荧光素酶活性。分析发现, 在高表达 MEF2C 基因后, 含有 MEF2 结合位点的启动子片段 (pL2.0、pL0.8、pL0.4 和 pL0.2) 活性明显增强, 不含有 MEF2 结合位点的启动子片段 (pL0.1) 活性没有显著变化 (图 3A、B)。其中, 含有 MEF2-1 位点的 pL0.2 活性变化最为明显: 在成肌细胞和肌管细胞, 启动子活性分别升高了 6 倍和 5 倍。含有全部 3 个 MEF2 位点的 pL2.0 和 pL0.8, 在加入 MEF2C 表达载体后, 活性也显著上升了 2~3 倍; 含有 MEF2-1 和 MEF2-2 位点的 pL0.4 片段, 其活性的增加只有 pL0.2 片段的 50%。该结果表明, 不同的 MEF2 结合位点对 MEF2C 的易感性不同, 以近端的 MEF2-1 位

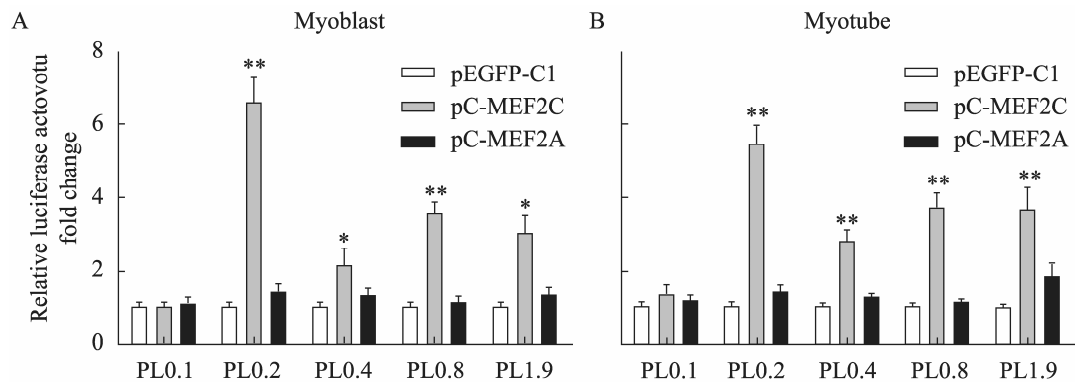


图3 MEF2A 和 MEF2C 对不同片段的猪 *Mstn* 启动子活性的影响

Fig. 3 Luciferase activity of different porcine *Mstn* promoter fragment response to MEF2A or MEF2C overexpression in myoblasts and myotubes.

点最为敏感,是 MEF2C 调节 *Mstn* 启动子活性的重要位点。而高表达 MEF2A 基因后,各启动子活性没有明显变化,说明 MEF2A 亚型可能在调控猪 *Mstn* 启动子活性方面作用较为薄弱。

2.4 MEF2 对猪 *Mstn* 转录水平及蛋白水平的调控

将 MEF2A 和 MEF2C 的表达载体分别转染 C2C12 成肌细胞和肌管细胞,检测 *Mstn* 的 mRNA 水平和蛋白水平的变化。结果显示,在成肌细胞中,转入 MEF2C 后, *Mstn* 的 mRNA 水平只升高了约 0.5 倍,蛋白水平也变化不明显 (图 4A); 在肌管细胞中, mRNA 水平升高了 4~5 倍,而且蛋白水平也有显著上调 (图 4B)。与前面的结果相似,转入 MEF2A 表达载体后,在两种细胞中, *Mstn* 的转录水平及蛋白水平都没有明显改变 (图 4A、4B)。以上结果提示,在肌肉发育过程中,特别是在分化为肌管细胞的过程中,MEF2C 可能通过调节 *Mstn* 启动子活性从而增加其 mRNA 转录和蛋白翻译。

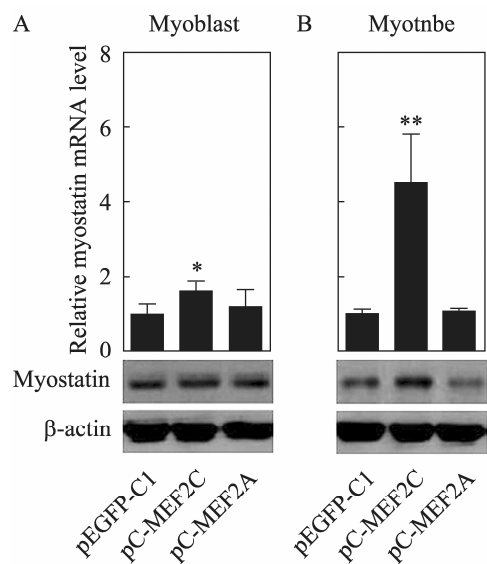


图4 转染 pC-MEF2A 或 pC-MEF2C 后 *Mstn* 的 mRNA 水平和蛋白水平

Fig. 4 *Mstn* mRNA and protein level after transfection of pC-MEF2A or pC-MEF2C in myoblasts and myotubes.

3 讨论

在本研究中,我们首先构建了猪 *Mstn* 启动

子, 并把它克隆到启动子缺失载体 pEGFP-1 中。pE2.0 启动子导入非肌肉细胞后, 猪 *Mstn* 启动子不表达。该结果证实 *Mstn* 启动子在肌肉细胞内特异性表达。这与以前在人和羊上 *Mstn* 启动子的报道一致^[15]。

然后, 我们发现 MEF2C 的表达对猪 *Mstn* 启动子活性有显著上调的作用。MEF2 (MEF2A、MEF2B、MEF2C 和 MEF2D) 是成肌细胞分化为肌肉特异性基因的转录因子^[16]。在成年小鼠, MEF2C 的表达仅限于骨骼肌、脑和脾; 而 MEF2A、MEF2B 和 MEF2D 则广泛表达于身体各个组织^[17-18]。已有的报道发现, MEF2 广泛存在于肌肉细胞中, 是最早被称为具有肌肉特性的 DNA 结合活性因子, 可与大多数肌肉特定基因, 特别是碱性螺旋-环-螺旋蛋白家族成员 (Basic helix-loop-helix protein, BHLH protein) 的启动子或增强子直接结合, 激活骨骼肌相关基因的活性^[19]。近期的研究发现, MEF2 可以与一些负调控肌肉生长发育基因的启动子相结合并增强该启动子的活性, 例如 *Mstn*^[13] 和 *TRIM72*^[20]。在猪 *Mstn* 基因启动子上, MEF2C 结合位点的发现以及 MEF2C 增强 *Mstn* 转录活性的证据表明, 该因子可以通过影响 *Mstn* 的表达来参与骨骼肌生长和分化的调节。此前, 有报道证实, MEF2 可以通过调节 *Mstn* 基因的表达改变小鼠骨骼肌纤维类型的组成^[13]。而在心肌细胞的研究证实, MEF2 通过与 *Mstn* 的启动子 DNA 结合抑制心肌细胞增殖, 并降低心脏重量^[14]。在本实验中, 我们发现 MEF2C 是骨骼肌中发挥该调控机制的亚型。在成肌细胞中和肌管细胞中, 高表达 MEF2C 后, 猪 *Mstn* 启动子活性增加了 3~4 倍。与此相

对应的 mRNA 转录水平和蛋白水平在成肌细胞中只升高了 0.5 倍左右, 实际上不具有真正的生理学意义。该结果提示, 在成肌细胞中, MEF2C 还可能激活了其他信号通路, 调控 *Mstn* 表达; 而在肌管细胞中, mRNA 转录水平和蛋白水平升幅程度与启动子活性的激活程度相似, 提示 MEF2C 可能在肌管发育期对 *Mstn* 的影响更为重要。由于 *Mstn* 的作用是限制骨骼肌生长发育, 在肌管细胞内, MEF2C 激活 *Mstn* 启动子的现象可能是该因子负反馈调节抑制肌细胞增生的机制之一^[20]。

总之, 本研究克隆和分析了猪 *Mstn* 基因启动子序列, 首次发现了并确定了该序列有 3 个 MEF2 结合位点。其中, 近端的 MEF2-1 位点最为重要, 它是 MEF2C 在 C2C12 细胞中上调 *Mstn* 启动子活性的重要结合位点。而且, 在肌细胞中, MEF2C 还可以通过上调 *Mstn* 启动子活性增强该基因的转录和蛋白翻译。本研究结果提示, MEF2C 可以通过激活 *Mstn* 调节猪肌肉生长和发育, 这将为以后通过调控 *Mstn* 基因控制动物肌肉产量等方面提供新的理论依据。

REFERENCES

- [1] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, 1997, 387(6628): 83-90.
- [2] Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, et al. Myostatin, a transforming growth factor- β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol*, 1999, 180(1): 1-9.
- [3] Sundaresan NR, Saxena VK, Singh R, et al. Expression profile of myostatin mRNA during the

- embryonic organogenesis of domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Res Vet Scis*, 2008, 85(1): 86–91.
- [4] Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, et al. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285(4): E876–E888.
- [5] Zhu XY, Topouzis S, Liang LF, et al. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine*, 2004, 26(6): 262–272.
- [6] Grobet L, Martin LJR, Poncelet D, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics*, 1997, 17: 71–74.
- [7] Seoane J, Le HV, Shen LJ, et al. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*, 2004, 117(2): 211–223.
- [8] Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, et al. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genetics*, 2007, 3(5): e79.
- [9] Sandri M, Sandri C, Gilbert A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 2004, 117(3): 399–412.
- [10] Spiller MP, Kambadur R, Jeanplong F, et al. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(20): 7066–7082.
- [11] Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*, 2004, 14(3): 395–403.
- [12] Du R, An XR, Chen YF, et al. Some motifs were important for myostatin transcriptional regulation in sheep (*Ovis aries*). *J Biochem Mol Biol*, 2007, 40(4): 547–553.
- [13] Hennebry A, Berry C, Siriect V, et al. Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(3): C525–C534.
- [14] Wang BW, Chang H, Kuan PL, et al. Angiotensin II activates myostatin expression in cultured rat neonatal cardiomyocytes via p38 MAP kinase and myocyte enhance factor 2 pathway. *J Endocrinol*, 2008, 197(1): 85–93.
- [15] Huang ZQ, Chen XL, Chen DW. Myostatin: a novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. *Cell Signal*, 2011, 23(9): 1441–1446.
- [16] Bryantsev AL, Baker PW, Lovato TL, et al. Differential requirements for Myocyte Enhancer Factor-2 during adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev Biol*, 2012, 361(2): 191–207.
- [17] Sekiyama Y, Suzuki H, Tsukahara T. Functional gene expression analysis of tissue-specific isoforms of *mef2c*. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32(1): 129–139.
- [18] Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*, 2007, 134(23): 4131–4140.
- [19] Olson EN, Perry M, Schulz RA. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol*, 1995, 172(1): 2–14.
- [20] Jung SY, Ko YG. TRIM72, a novel negative feedback regulator of myogenesis, is transcriptionally activated by the synergism of MyoD (or myogenin) and MEF2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 238–245.