

• 生物技术与方法 •

Mstn 基因干扰通过上调基因 *Cpt1b* 促进肌间脂肪的 β 氧化

郭亚男¹, 杨茹艳¹, 张芷毓¹, 包都兰¹, 孙莹¹, 杨磊², 李光鹏², 高丽¹

1 包头师范学院 生物科学与技术学院, 内蒙古 包头 014030

2 内蒙古大学 省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010070

郭亚男, 杨茹艳, 张芷毓, 包都兰, 孙莹, 杨磊, 李光鹏, 高丽. *Mstn* 基因干扰通过上调基因 *Cpt1b* 促进肌间脂肪的 β 氧化. 生物工程学报, 2022, 38(8): 3076-3089.

GUO YN, YANG RY, ZHANG ZY, BAO DL, SUN Y, YANG L, LI GP, GAO L. *Mstn* knockdown promotes intramuscular fatty acid metabolism by β oxidation via the up-regulation of *Cpt1b*. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 3076-3089.

摘要: 肌生长抑制素 (myostatin, *Mstn*) 也被称为生长/分化因子-8 (GDF-8)。敲减或敲除 *Mstn* 基因可促进肌肉发育、降低脂肪含量。本研究利用 RNA 干扰技术制备 *Mstn* 干扰小鼠, 随后对其骨骼肌形态、骨骼肌甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量、脂肪酸组成及含量进行了分析。结果显示, 与对照组相比, *Mstn* 干扰小鼠肌肉中 *Mstn* 的表达减少。小鼠骨骼肌肌纤维的横截面积显著增大, 而 TG 含量显著降低, *n-3/n-6* 和不饱和/饱和脂肪酸比值显著升高。通过实时荧光定量 PCR 检测脂肪酸代谢相关基因的表达, 结果表明脂肪酸分解和转运相关基因表达上调, 而脂肪酸合成相关基因表达下调。在这些基因中, 与 β 氧化相关的基因 *Cpt1b* 的上调尤为明显。对骨骼肌中 CPT1 的酶活性进行了检测, 结果与基因表达情况一致。为探讨其进一步作用机理, 通过染色质免疫沉淀实验发现, *Mstn* 基因下游转录因子 SMAD3 可与 *Cpt1b* 基因的启动子直接结合。上述结果表明, *Mstn* 敲减后主要通过调控其下游转录因子 SMAD3 与 *Cpt1b* 基因启动子的结合, 上调 *Cpt1b* 的表达, 从而促进肌内脂肪酸的 β 氧化代谢。

关键词: *Mstn* 基因; RNA 干扰; 脂肪酸代谢; β 氧化; *Cpt1b*

Received: December 10, 2021; Accepted: April 6, 2022

Supported by: Inner Mongolia Autonomous Region Natural Science Foundation, China (2021BS08013); Baotou Teachers College High-Level Research Achievement Cultivation Project (BSYKJ2021-ZQ03)

Corresponding author: GAO Li. E-mail: gaoli8905@163.com

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金 (2021BS08013); 包头师范学院高水平研究培育项目 (BSYKJ2021-ZQ03)

Mstn knockdown promotes intramuscular fatty acid metabolism by β oxidation via the up-regulation of *Cpt1b*

GUO Yanan¹, YANG Ruyan¹, ZHANG Zhiyu¹, BAO Dulan¹, SUN Ying¹, YANG Lei², LI Guangpeng², GAO Li¹

1 Faculty of Biology Science and Technology, Baotou Teacher's College, Baotou 014030, Inner Mongolia, China

2 State Key Laboratory of Reproductive Regulation & Breeding of Grassland Livestock, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, Inner Mongolia, China

Abstract: Myostatin (*Mstn*) is known as growth/differentiation factor-8 (GDF-8). Knockout or knockdown of *Mstn* gene promotes muscle development and reduces fat content. Here we prepared *Mstn* knockdown mice by RNA interference, then the morphology of the skeletal muscle, the content of triglyceride (TG), the content and composition of fatty acids in the skeletal muscle were detected. The expression of *Mstn* reduced in muscle of *Mstn* knockdown mice compared to the controls. The cross sectional areas of the skeletal muscle myofibers were significantly larger while the content of TG was less than that of the controls, and the ratios of *n-3/n-6* and *unsat/sat* in the knockdown mice increased significantly. Subsequently, we detected the expression of genes associated with fatty acid metabolism. The expression of the genes associated with lipolysis and fatty acid transportation were up-regulated, while the genes associated with fatty acid synthesis were down-regulated. Of these genes, the up-regulation of a gene associated with β oxidation, *Cpt1b*, was up-regulated remarkably. We further detected the enzyme activity of CPT1 in skeletal muscle and obtained the same results with gene expression. Moreover, chromatin immunoprecipitation assay was performed and we found that SMAD3, a transcription factor downstream of *Mstn*, directly binds to the promoter of *Cpt1b* gene. These results showed that knockdown of *Mstn* up-regulated the expression of *Cpt1b* through the binding of SMAD3 to the promoter of *Cpt1b*, then promoted the β oxidation metabolism of intramuscular fatty acids.

Keywords: *Mstn* gene; RNA interference; fatty acid metabolism; β oxidation; *Cpt1b*

Myostatin (*Mstn*) 又称生长/分化因子 8, 是转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 家族成员之一, 主要表达于骨骼肌, 在肌肉发育的负调控中发挥重要作用^[1]。研究表明, 在包括人类^[2]、绵羊^[3]、小鼠^[4]、狗^[5]和牛^[6]等多个物种中 *Mstn* 基因缺失都会导致由于肌纤维数量和肌纤维大小增加而导致的肌肉肥大, 而不会造成严重的不良后果。此外, 对野生型成年动物使用各种肌生成抑制素抑制剂也

可以导致肌肉过度发育^[7-9], 而 *Mstn* 过表达则会抑制肌肉生长^[10]。由于 *Mstn* 基因的这一特性, 研究者开始致力于开发有效的策略来阻断 *MSTN* 的表达, 以制备肌肉改良动物。Wang 等^[11]通过 CRISPR/Cas9 技术制备了 *Mstn* 基因敲除猪, Yu 等^[12]和 Wang 等^[13]分别通过 TALEN 和 CRISPR/Cas9 技术制备了 *Mstn* 基因敲除山羊, Zhang 等通过 CRISPR/Cas9 技术制备了在 *Mstn* 位点定点整合 *Fat1* 基因的转基因山羊^[14], 所有

Mstn 基因敲除的动物都具有更加发达的骨骼肌。

虽然 CRISPR/Cas9 基因编辑系统发展迅速, 但有时直接敲除基因尤其是致死的基因可能会引起不良后果。Wang 等报道, 斑马鱼 *Mstnb* 的缺失导致了预期的生长性能增强, 但同时导致了几个关键免疫相关基因转录水平下降, 从而导致抵御致病性迟发性大肠杆菌 (*Escherichia tarda*) 的能力显著下降^[15]。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术是一种简单的靶向基因干扰技术。高效 RNAi 载体能快速有效地降解靶基因的 mRNA。重要的是, RNAi 是一种温和抑制基因表达的方式而不是直接敲除, 对于一些关键基因功能的研究具有重要的意义。

在之前的研究中发现, 与野生型动物相比, *Mstn* 的干扰或敲除显著增加了骨骼肌发育, 降低了肌肉脂肪含量。Rooney 等发现, *Mstn* 突变影响马骨骼肌线粒体表型^[16]。Mennerich 等和 Zhang 等发现, 脂肪组织中 *Mstn* 的缺失会导致外周组织脂肪酸氧化增强、线粒体活性增加、脂肪组织质量减少^[17-18]。同样, Fournier 等证实, 抑制棕色脂肪细胞 *Mstn/ActRIIB* 信号通路可增强线粒体功能和呼吸功能^[19]。但是 *Mstn* 在脂肪形成中的调控机制尚不清楚。*Mstn* 的敲除是否会影响脂肪酸的含量和组成也未可知。

本研究制备了高效 *Mstn* 靶向小发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 载体, 并通过原核注射技术制备了 *Mstn* 干扰小鼠模型。对 *Mstn*

干扰小鼠与野生型 (WT) 小鼠骨骼肌形态、骨骼肌甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量、脂肪酸含量及组成, 以及脂肪酸合成、分解和转运相关基因的表达进行了分析, 来探讨 *Mstn* 基因的抑制是否会影响脂肪酸的含量和组成以及其调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用野生型小鼠 (C57BL/6) 购自内蒙古大学动物中心。所有实验小鼠都被饲养在内蒙古大学 SPF 级鼠房, 所有动物实验均由内蒙古大学动物福利与使用委员会批准 (批准号: SYXK 2014-0002)。光照/暗周期为 12 h, 室温保持在 (25±1) °C, 相对湿度为 70%±4%。可以自由获取食物和水。

1.2 干扰和过表达载体的构建

根据小鼠 *Mstn* 基因 mRNA 序列 (GenBank 登录号: NM_010 834.3) 和 RNA 干扰序列设计原则, 在小鼠基因组内进行同源比对以排除非特异性干扰效应。选择了 3 个区域作为 *Mstn* RNAi 靶点, 以及 1 个阴性对照序列。*Mstn* RNAi 与对照 shRNA 序列见表 1。干扰片段由 TaKaRa 公司合成并退火, 插入 pCDsRed2 载体, 得到干扰载体 (图 1A)。从骨骼肌 cDNA 中获得小鼠 *Mstn* 基因, 扩增 *Mstn* 基因 cDNA 区的引物为 OverMstn-F 和 OverMstn-R。所用引

表 1 *Mstn* RNAi 和对照 shRNA 序列

Table 1 Sequences of the *Mstn* RNAi and the control shRNA

shRNA	Sequences (5'→3')	GenBank Accession No.	Region (bp)
Control	ACACTTTAACAACGGATGT		
shRNA1	TCATTACCATGCCTACAGA	NM_010834.3	356-374
shRNA2	TGAAAGACGGTACAAGGTATA	NM_010834.3	542-562
shRNA3	GCTCAGGAGAGTGTGAATTTG	NM_010834.3	929-949

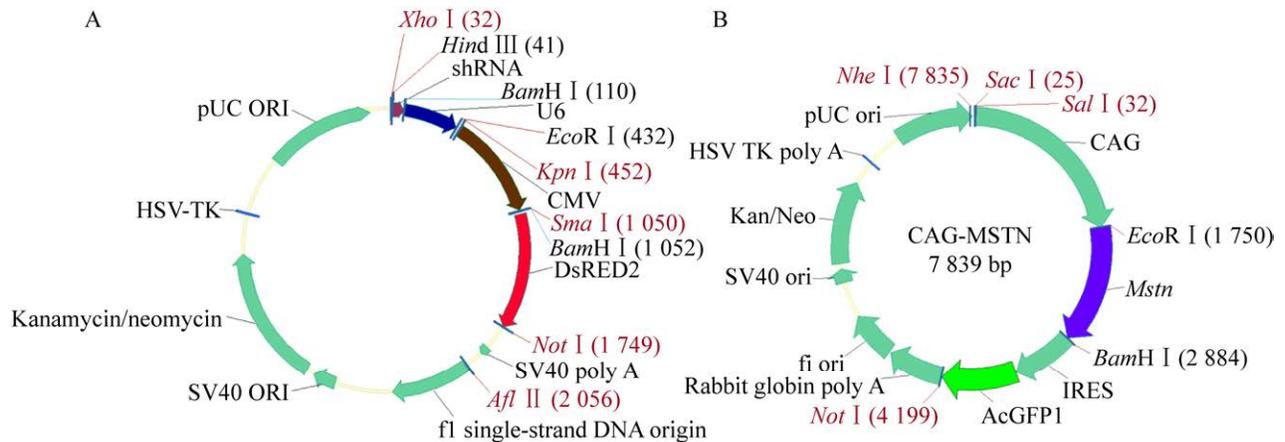


图 1 RNA 干扰 (A) 和 *Mstn* 过表达 (B) 载体

Figure 1 RNAi vector (A) and over-expression vector (B) of *Mstn*.

物序列见表 2。插入 1 131bp *Mstn* cDNA 区到 pCAG-IRES-GFP 载体中, 得到 *Mstn* 过表达载体 pCAG-MSTN (图 1B)。

1.3 干扰载体和过表达载体转染牛胎儿成纤维细胞

由于本实验室获得的牛胎儿成纤维细胞转染效率高, 所以使用牛胎儿成纤维细胞来检测干扰效率。将牛胎儿成纤维细胞接种在 12 孔板中, 然后使用 Lipofectamine LTX 试剂 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad), 按照说明将过表达质粒 (pCAG-MSTN) 和干扰质粒 (pCDsRed-U6-shRNA) 按 1:1 的比例共转染。细胞在 38.5 °C CO₂ 培养箱中孵育 6 h, 然后更换培养基。培养 48 h 后, 提取总 RNA 和蛋白进行 Real-time PCR 和 Western blotting 检测。每组试验重复 3 次。

1.4 *Mstn* 基因 RNAi 转基因小鼠的制备与鉴定

采用原核显微注射法制备 *Mstn* RNAi 转基因小鼠。首先, 准备供体雌性小鼠和假孕雌性小鼠, 分别用于收集受精卵和代孕小鼠。从供体雌性的输卵管中收集受精卵, 将受精卵置于 KSOM-AA 液滴中, 于 37 °C、5% CO₂ 的条件

下培养。选择透明带和极体清晰的受精卵进行原核注射。提取 shRNA 载体质粒, 线性化纯化, 以 3 ng/ μ L 的浓度注入原核。将注入 shRNA 的胚胎培养至 2 细胞期, 第 2 天移植到代孕母

表 2 引物序列

Table 2 Primers used in the study

Genes	Sequences (5'→3')
Over <i>Mstn</i> -F	ATGATGCAAAAAGTCAAAAT
Over <i>Mstn</i> -R	TCATGAGCACCCACAGCGGT
CF1-F	TTAGTGAACCGTCAGATCCC
CF1-R	CCCCGTTGAAAATCATCCAC
<i>Mstn</i> -F	GCTCAAACAGCCTGAATCCAACCTA
<i>Mstn</i> -R	CGCAGTCAAGCCCAAAGTCTC
<i>Scd-1</i> -F	CTCCGAAATGAACGAGAGAA
<i>Scd-1</i> -R	GTAGAGCTTGCAGGAGGGAA
<i>Fasn</i> -F	GCAGCTGTTGGTTTGTCTCTG
<i>Fasn</i> -R	GGGGGCAATTCTTCCATGA
<i>Pparg</i> -F	ATTGAGTGCCGAGTCTGTGG
<i>Pparg</i> -R	GCAAGGCACTTCTGAAACCG
<i>Cpt1b</i> -F	CGTACCAAGTAGCCAAGGCA
<i>Cpt1b</i> -R	CAGGAACGCACAGTCTCAGT
<i>Acox1</i> -F	GAACCTGTTGGCCTCAATTACT
<i>Acox1</i> -R	CCTCGAAGATGAGTTCCGTGG
<i>Fatp1</i> -F	TCCTAAGGCTGCCATTGTGG
<i>Fatp1</i> -R	ACACAGTCATCCAGAAAGCG
<i>Gapdh</i> -F	TGGCCTTCCGTGTTCTCTAC
<i>Gapdh</i> -R	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA

鼠体内。然后将代孕母鼠放入装有棉花的笼子中进行保温。移植 19–21 d 后, 用 PCR 方法对出生的幼鼠进行鉴定, 筛选出转基因阳性小鼠。用于鉴定转基因小鼠的引物为 CF1-F 和 CF1-R, 序列见表 2。

1.5 动物饲养及样本采集

所有实验小鼠和对照组小鼠均饲养在以下条件下: 温度维持在 (25 ± 1) °C, 并以 $70\%\pm 4\%$ 的相对湿度, 自动光照控制。每个笼子中饲养小鼠 ≤ 4 只。小鼠可随意摄取食物和水。所有小鼠在颈椎脱臼法处死前均被麻醉。从转基因和野生型小鼠的前肢和后肢取一小部分肌肉组织。一部分肌肉组织立即投入液氮中, 用于 qPCR、Western blotting、甘油三酯含量、脂肪酸组成和 CPT1 酶活性检测。其他样品用 4%多聚甲醛固定, 用于制备组织切片。

1.6 荧光定量 PCR

使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 从每个样品中提取总 RNA, 使用 PrimeScript RT 试剂盒 (TaKaRa) 进行反转录生成 cDNA。样品用 SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) 进行分析。对于每个样品, 目的基因和内参基因在同一平板和同一试验运行中独立扩增 3 次。PCR 步骤为: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共 40 个循环。扩增后进行溶解曲线分析, 验证反应的特异性, 分析基因表达情况。荧光定量 PCR 3 次, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (*Gapdh*) 基因作为内参基因。Real-time PCR 引物见表 2。

1.7 蛋白质免疫印记 (Western blotting)

将肌肉样品磨碎, 用磷酸盐缓冲液冲洗, 并在 150 μ L 冰浴的 RIPA 缓冲液中裂解。然后将组织裂解液在 4 °C、8 000 \times g 离心 30 min。上清液中的蛋白质在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 上电泳分离, 用电

印迹法转移到 PVDF 膜上。在室温下, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液将膜封闭 1 h, 然后与抗-MSTN (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz) 和抗-CPT1B (Prototech, Beijing, China) 的单克隆抗体 (TBST 1 : 1 000 稀释) 孵育。再用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗在 TBST 中 1 : 10 000 孵育 1 h, 使用化学发光标记检测试剂 ECL Plus (Thermo Scientific) 进行检测。

1.8 肌肉组织石蜡切片

Mstn 干扰小鼠和对照组小鼠后肢肌肉组织在 4%多聚甲醛中固定 24 h, 用乙醇脱水, 并包埋在石蜡中。然后用切片机将样本块切成 5 μ m 的切片, 用苏木精和伊红染色。使用显微镜 (DS-Ri1, Nikon) 拍摄图像。采用成像软件 Leica QWin 测定肌纤维横截面积 (cross sectional area, CSA)。

1.9 甘油三酯含量测定

采用 TG 含量测定试剂盒 (Cominbio, Jiangsu, China) 提取 *Mstn* 干扰和野生型小鼠骨骼肌的甘油三酯, 并测定其含量。将 *Mstn* 干扰和野生型小鼠的 0.1 g 骨骼肌磨碎, 提取甘油三酯, 用酶标仪在 505 nm 吸光度下检测甘油三酯。

1.10 脂肪酸组成检测

对 6 只 *Mstn* 干扰小鼠和 6 只对照组小鼠骨骼肌中 24 种脂肪酸 (12 种饱和脂肪酸和 12 种不饱和脂肪酸) 进行了检测。*N*-3 多不饱和脂肪酸包括 C18:3 *n*-3、C20:3 *n*-3、C20:5 *n*-3 和 C22:6 *n*-3。*N*-6 多不饱和脂肪酸包括 C18:2 *n*-6、C18:3 *n*-6、C20:3 *n*-6 和 C20:4 *n*-6。*N*-9 单不饱和脂肪酸包括 C18:1 *n*-9、C20:1 *n*-9、C22:1 *n*-9 和 C24:1 *n*-9。饱和脂肪酸包括 C12:0、C13:0、C14:0、C15:0、C16:0、C17:0、C18:0、C20:0、C21:0、C22:0、C23:0、C24:0。用研钵研磨约 0.1 g 组织, 匀浆液转入 15 mL 离心管中室温静置, 待液体分层后, 上清液转移至新管, 下层

组织浑浊液再加入 3 mL 氯仿/甲醇 ($V/V=2/1$), 充分混匀后, 静置过夜。合并两次萃取的所有上清液, 氮吹仪 60 °C 水浴吹干溶剂, 得沉淀。沉淀加 2 mL 色谱纯正己烷溶解, 再加 400 μ L 饱和氢氧化钾-甲醇溶液进行甲酯化, 剧烈振荡 2 min, 静置 10 min。吸取 700 μ L 上清加入上样小瓶, 气相色谱检测脂肪酸含量。

1.11 CPT1 酶活性测定

采用肉碱棕榈酰转移酶 (CPT1) 试剂盒 (Cominbio, Jiangsu, China), 按照说明书提取 *Mstn* 干扰和野生型骨骼肌的肉碱棕榈酰转移酶并测定活性。将 0.1 g *Mstn* 干扰小鼠和野生型小鼠骨骼肌磨碎, 冰浴超声破碎, 然后用酶标仪在 412 nm 吸光度处测定吸光值。

1.12 染色质免疫沉淀分析

为进一步探讨 *Mstn* 突变调控 *Cpt1b* 的作用机理, 通过 JASPAR 数据库 (jaspar.genereg.net) 预测 *Mstn* 下游转录因子 SMAD3 与 *Cpt1b* 基因启动子的相互结合, 并通过转录因子 SMAD3 的抗体 (Abcam) 进行染色质免疫沉淀 (chromatin immunoprecipitation assay, ChIP) 实验, 验证 *Mstn* 与 *Cpt1b* 启动子的相互结合。实验步骤按照 ChIP 试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 说明书操作, 简述如下: (1) 取冻存的野生型小鼠肌肉组织 1 g 置于 50 mL 试管中, 加入 10 mL 1 \times PBS; (2) 加甲醛至终浓度为 1% 固定, 室温下转动 15–20 min; (3) 加 2.5 mol/L Glycine 至终浓度为 0.125 mol/L 终止交联; (4) 100 \times g、4 °C 离心样本 5 min, 弃上清, 留沉淀, 用预冷的 1 \times PBS 洗两次; (5) 加入 2 mL 预冷 1 \times PBS, 匀浆机裂解组织; (6) 1 000 r/min、4 °C 离心 5 min, 弃上清, 置于含有 1% Halt Cocktail 的预冷 PBS 中; (7) 用 MNase 裂解和消化 DNA; (8) 在冰上对细胞进行超声处理以破坏细胞核膜; (9) 将裂解物与

SMAD3 抗体和蛋白 G 磁珠在 4 °C 条件下孵育过夜, 以免 IgG 孵育作为阴性对照; (10) 用洗脱缓冲液回收沉降的 DNA, 使用 DNA 纯化试剂盒纯化与 SMAD3 蛋白结合的 DNA。 (11) 利用 qPCR 技术扩增与 SMAD3 蛋白结合的 *Cpt1b* 基因启动子。qPCR 引物通过 Primer Premier 5 软件根据 *Cpt1b* 基因启动子序列设计, 引物序列为: ChCpt1b-F: 5'-TTCTGGCCGACCAGGATAGT-3'; ChCpt1b-R: 5'-CAGGCCTTGTTAGTCCTACCT-3'。

1.13 统计分析

Mstn 干扰组与对照组所有数据均采用 *t* 检验进行统计学分析, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。 *P* 值小于 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 高效干扰载体的筛选

由于 *Mstn* 在牛胎儿成纤维细胞中的低表达和非同源性, 我们将过表达载体和干扰载体共转染, 然后分别通过 qRT-PCR 和 Western blotting 检测小鼠 *Mstn* 的表达情况, 选择最佳 shRNA。结果表明, shRNA3 的干扰效率最高, 与阴性对照相比干扰效率为 90.12%, shRNA2 的干扰效率低于 shRNA3, 但差异不显著 (图 2)。由于 shRNA3 的干扰效率最高, 因此将其用于 *Mstn* 干扰小鼠的制备。

2.2 *Mstn* 基因干扰小鼠的获得和鉴定

分别提取 F0 和 F1 代 *Mstn* RNAi 转基因小鼠的 DNA, 通过 PCR 检测外源质粒的表达情况。共获得 7 只 F0 代转基因小鼠 (图 3A), 选取 1 只 F0 代转基因雄性小鼠与野生型 C57BL/6J 雌性小鼠交配, 获得 2 只 F1 代阳性小鼠 (图 3A)。再将 2 只 F1 代阳性雌性小鼠与 F0 代阳性雄性小鼠回交, 获得 F2 代阳性小鼠 (图 3B), 其中 6 只 F2 代阳性小鼠用于后续研究。小鼠繁殖图

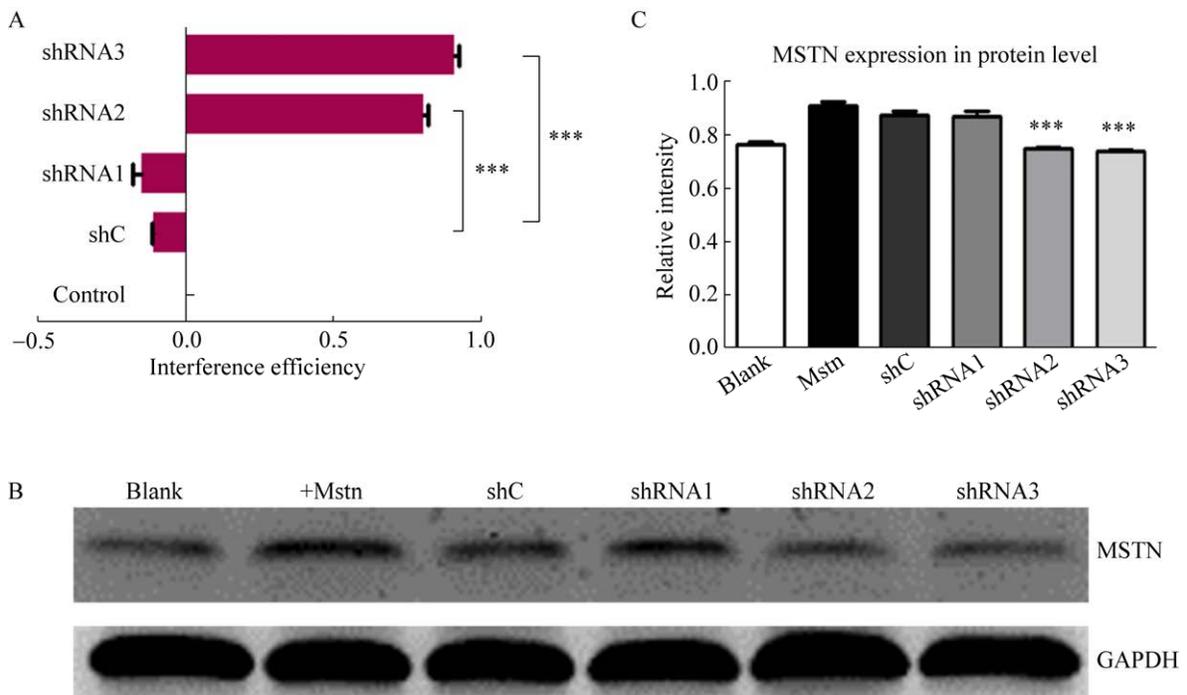


图2 shRNA 干扰效率检测 A: 干扰载体在 mRNA 水平上的干扰效率. 对照: 不转染干扰载体; B: 转染过表达和干扰载体后 MSTN 在蛋白水平上的表达; C: 蛋白表达水平灰度分析结果. Blank: 未转染细胞组; +Mstn: *Mstn* 过表达组, 无干扰; shC: 对照干扰载体组, 过表达+shRNAC; shRNA1-3: shRNA1-3+过表达. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 2 The interference efficiency of the interference vectors. (A) The interference efficiency of the interference vectors at mRNA level. Control: vector without interference segments. (B) The expression of MSTN in protein level after transfected with the interference vectors and quantified in (C). Blank: untransfected cells; +Mstn: *Mstn* overexpression without interference; shC: control shRNA+overexpression. shRNA1-3: shRNA1-3+overexpression. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

如图 3C 所示, 6 只同龄 C57BL/6 野生型小鼠作为对照。

2.3 *Mstn* 基因干扰转基因小鼠肌肉表型变化

如图 4A 所示, 为 *Mstn* 干扰小鼠 (下) 和对照小鼠 (上)。通过 Real-time PCR 和 Western blotting 检测 *Mstn* 干扰小鼠和对照小鼠肌肉中 MSTN 的表达。结果显示, MSTN 在骨骼肌 mRNA 和蛋白水平上的表达分别降低了 43.31% 和 64.51% (图 4B-4D)。阳性小鼠与野生型小鼠生长曲线无明显差异 (图 4E)。RNAi 小鼠前肢和后肢重量分别为 (0.85 ± 0.02) g 和 (1.84 ± 0.18) g, 比野生

型小鼠 (分别为 (0.61 ± 0.04) g 和 (1.13 ± 0.16) g) 重 (图 4F 和 4G)。采用成像软件测定肌肉肌纤维 CSA, 每个样本共测量 15 个横截面面积。RNAi 小鼠和对照组小鼠的肌纤维 CSA 分别为 $(29\ 484.9\pm 135.23)$ μm^2 和 $(22\ 007.9\pm 227.6)$ μm^2 (图 4H、4I), 差异显著。这些结果表明, *Mstn* 干扰可促进肌肉发育。

2.4 *Mstn* 基因干扰转基因小鼠骨骼肌肌内脂肪及脂肪酸含量检测

对 *Mstn* 基因干扰的转基因小鼠骨骼肌肌内脂肪及各类脂肪酸含量进行了检测, 结果显

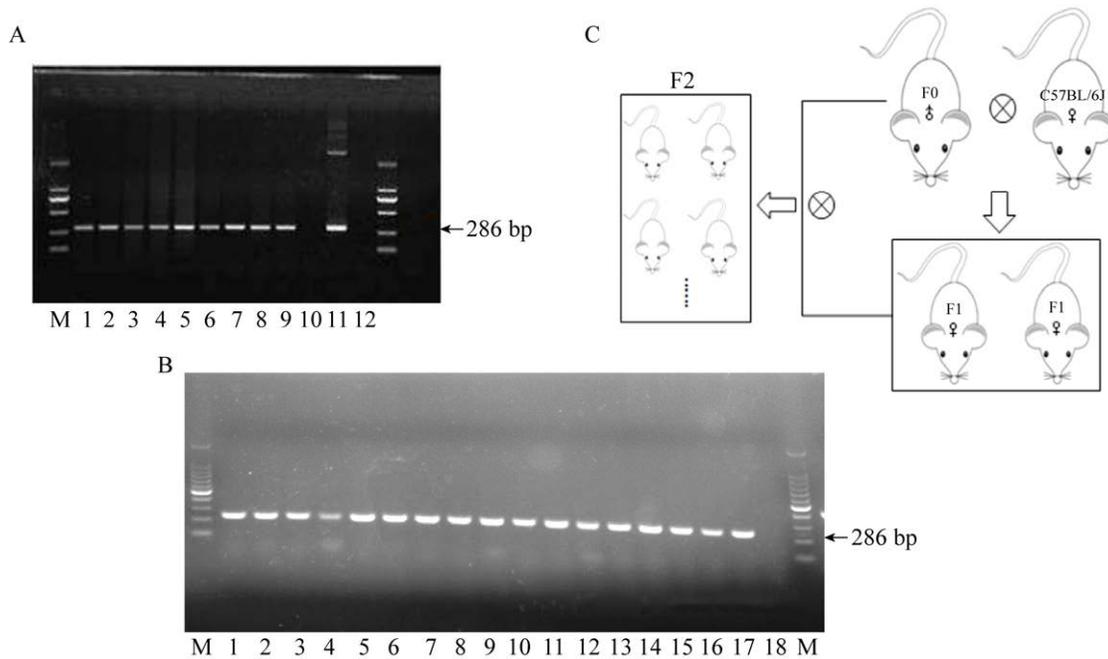


图 3 转基因小鼠的鉴定 A: F0 代转基因小鼠和 F1 代转基因小鼠的鉴定. M: DL 2000 Marker; 1–7: *Mstn* RNAi F0 代转基因小鼠; 8–9: F1 代转基因小鼠; 10: 非转对照基因阴性小鼠; 11: 阳性质粒对照; 12: ddH₂O. B: F2 代转基因小鼠的鉴定. M: 100 bp Marker; 1–17: F2 代转基因小鼠; 18: 非转基因阴性小鼠对照. C: 转基因小鼠的繁殖图

Figure 3 Identification of the transgenic mice. (A) Identification of the F0 transgenic mice and F1 transgenic mice. M: DL 2000 Marker; 1–7: the F0 transgenic mice of *Mstn* RNAi; 8–9: F1 transgenic mice; 10: the negative control of non-transgenic mouse; 11: the plasmid of positive control; 12: ddH₂O. (B) Identification of the F2 transgenic mice. M: 100 bp Marker; 1–17: F2 transgenic mice; 18: the negative control of non-transgenic mouse. (C) Reproduction diagram of the transgenic mice.

示, *Mstn* 基因下调降低了肌内甘油三酯的含量(图 5A), 这说明 *Mstn* 干扰减少了肌内脂肪含量。然后检测 *Mstn* 干扰小鼠和野生型小鼠肌肉中 *n-3/n-6*、*n-6/n-9* 和 *unsat/sat* 脂肪酸(4 种 *n-3* 多不饱和脂肪酸、4 种 *n-6* 多不饱和脂肪酸、4 种 *n-9* 单不饱和脂肪酸和 12 种饱和脂肪酸)的含量和比值。肌肉中各类脂肪酸含量见表 3。结果显示, *Mstn* 干扰小鼠肌肉中 *n-3/n-6* 比值显著上调, *n-6/n-9* 比值无显著变化, 不饱和脂肪酸/饱和脂肪酸比值 (*unsat/sat*) 显著上调(图 5B)。表明 *Mstn* 基因的下调促进了 *omega-6* 脂肪酸降解为 *omega-3* 脂肪酸, 并促进饱和脂

肪酸降解为不饱和脂肪酸。

2.5 *Mstn* 敲低通过上调 *Cpt1b* 促进肌内脂肪酸 β 氧化代谢

为了进一步研究 *Mstn* 基因干扰影响脂肪酸代谢的机理, 采用 qRT-PCR 检测了脂肪酸代谢相关基因的表达。结果显示, 脂肪酸合成基因 *Scd-1*、*Fasn*、*Pparg* 表达下调, 脂肪酸分解基因 *Cpt1b*、*Acox1*、转运基因 *Fatp1* 表达显著上调(图 6A)。在这些基因中, 与 β 氧化相关的 *Cpt1b* 基因的上调尤为明显。*Mstn* 敲低后, CPT1B 在蛋白水平上表达也上调(图 6B 和 6C)。同时检测了骨骼肌中 CPT1 酶的活性, 结果显示 *Mstn*

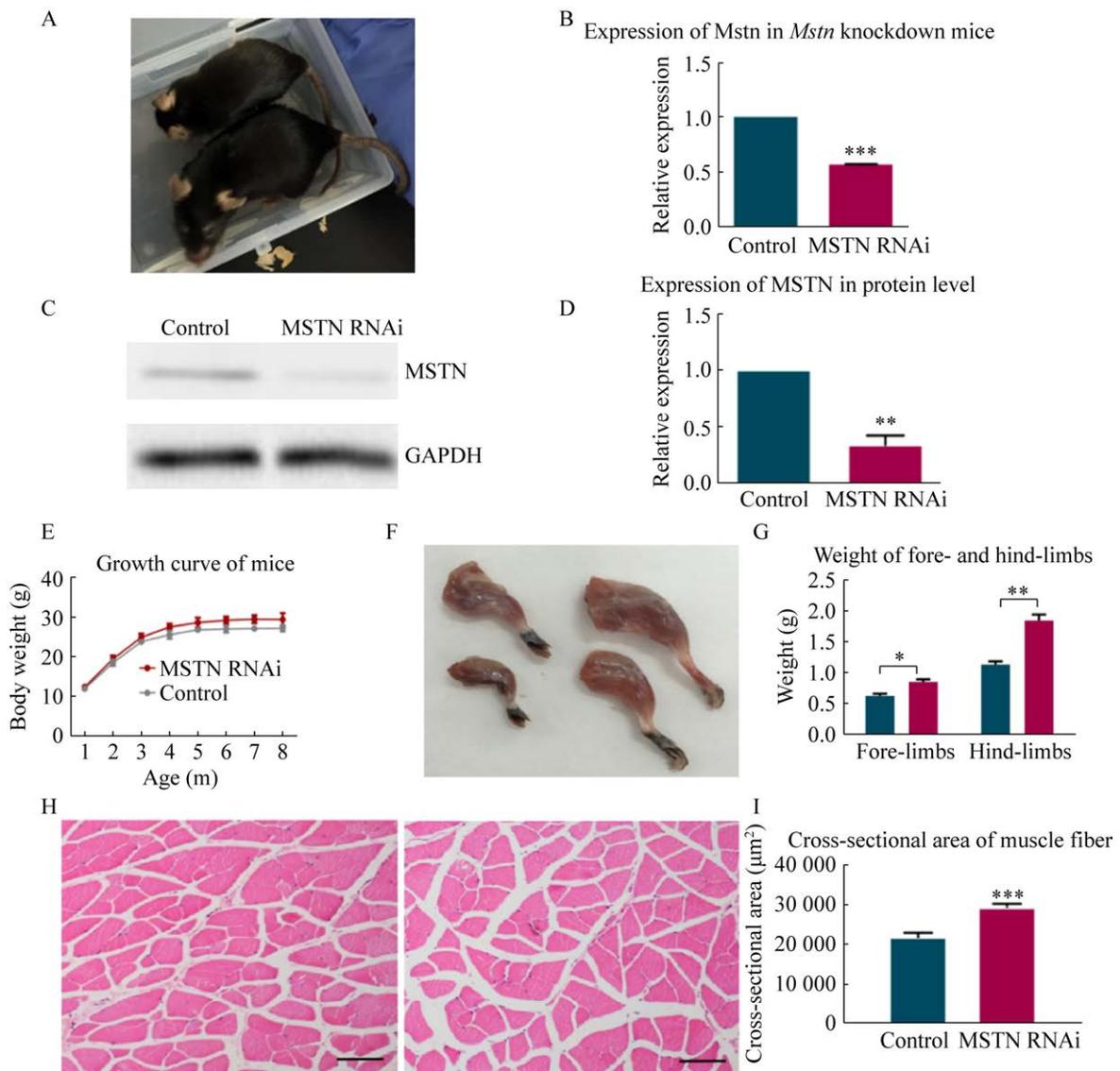


图 4 *Mstn* 基因干扰导致肌肉发达 A: *Mstn* 干扰 (下) 和野生型 (上) 小鼠; B: *Mstn* 在 mRNA 水平的表达; C: Western blotting 检测 MSTN 在蛋白水平上的表达; D: 蛋白灰度分析; E: *Mstn* 干扰小鼠和对照组小鼠的生长曲线; F: *Mstn* 干扰小鼠 (上) 和野生型小鼠 (下) 的前肢 (左) 和后肢 (右); G: *Mstn* 干扰小鼠和野生型小鼠前肢和后肢重量, $n=6$; H: *Mstn* 干扰小鼠 (左) 和对照组小鼠 (右) 的肌肉组织切片 (Bar=100 μm); I: 肌纤维横断面积 (CSA) ($n=15$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 4 *Mstn* knockdown induced strong muscle development. (A) *Mstn* RNAi (down) and control (up) mice. (B) Expression of *Mstn* at mRNA level. (C) Expression of MSTN at protein level detected by western blotting and quantified in (D). (E) Growth curve of the *Mstn* knockdown mice and the control. (F) The fore-limbs (left) and the hind-limbs (right) of *Mstn* knockdown (up) and wild-type mice (down). (G) Weight of fore- and hind-limbs of *Mstn* knockdown and wild-type mice, $n=6$. (H) Paraffin section of muscle from *Mstn* knockdown (left) and control (right) mice (Bar=100 μm). (I) Cross-sectional area (CSA) of muscle myofibers ($n=15$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

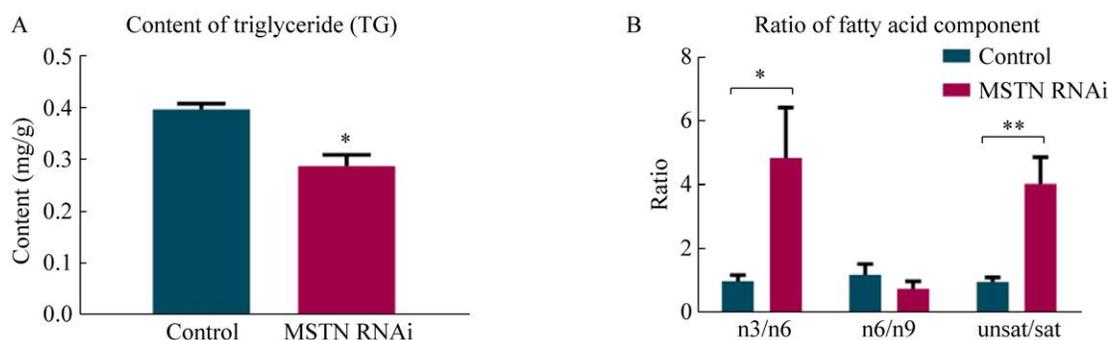


图5 *Mstn* 基因下调对骨骼肌内脂肪含量及脂肪酸组成的影响 A: *Mstn* 敲低和对照小鼠骨骼肌中甘油三酯含量; B: *Mstn* 基因干扰小鼠骨骼肌中脂肪酸组分与对照组的比值 ($n=6$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 5 Effect of *Mstn* knockdown on the content and the composition of intramuscular fat in skeletal muscles. (A) The content of triglyceride in *Mstn* knockdown and control mice skeletal muscle. (B) Ratio of fatty acid component in skeletal muscle of *Mstn* knockdown and the control mice ($n=6$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

表3 肌肉组织中脂肪酸含量

Table 3 The content of fatty acids in muscles

Sample	<i>n</i> -3 (mg/g)	<i>n</i> -6 (mg/g)	<i>n</i> -9 (mg/g)	unsat (mg/g)	sat (mg/g)
Control-1	3.37±0.82	8.84±0.94	7.85±2.98	20.07±3.84	52.80±0.95
Control-2	7.53±0.48	9.58±0.75	8.52±1.06	25.63±3.02	10.51±2.09
Control-3	23.42±1.55	14.02±1.74	31.35±0.57	68.79±6.87	44.73±1.06
Control-4	54.77±0.69	49.82±0.24	18.73±0.25	123.32±5.32	98.66±0.78
Control-5	75.51±0.80	111.16±0.74	80.63±1.82	267.31±1.71	239.78±1.89
Control-6	67.13±0.75	53.28±0.79	159.43±2.74	279.84±2.56	434.94±6.45
RNAi-1	41.07±4.04	14.37±1.34	71.44±6.49	126.88±8.84	30.15±5.54
RNAi-2	86.22±4.65	27.70±0.71	154.84±0.91	268.77±4.27	74.64±8.67
RNAi-3	13.68±2.67	9.91±0.89	24.11±2.93	47.71±0.65	2.96±0.58
RNAi-4	78.04±1.22	18.07±0.54	52.14±2.45	52.14±2.45	34.92±1.26
RNAi-5	102.70±2.82	27.73±0.98	33.86±2.62	164.27±4.53	64.89±0.86
RNAi-6	123.37±1.69	9.77±0.33	8.11±0.58	141.24±3.94	52.14±2.45

基因被敲减后 CPT1 酶活性显著增强 (图 6D)。这些结果表明, *Mstn* 的下调主要通过上调 *Cpt1b* 基因表达促进 β 氧化来促进脂肪酸代谢。

2.6 *Mstn* 调控 *Cpt1b* 基因表达的机制研究

SMAD3 是 *Mstn* 基因下游信号通路中最重要的转录因子, 为探讨 *Mstn* 基因调控 *Cpt1b* 基因表达的作用机理, 使用 JASPAR 数据库预测转录因子 SMAD3 与 *Cpt1b* 基因的启动子之间

的结合, 预测结果显示, SMAD3 转录因子可能与 *Cpt1b* 基因启动子-1 674 至-1 665 区域结合 (图 7A), 表明 *Mstn* 基因可能通过下游 SMAD3 转录因子与 *Cpt1b* 基因启动子的结合来调控 *Cpt1b* 基因的表达, 从而调控脂肪酸 β 氧化代谢。因此使用 SMAD3 单克隆抗体进行 ChIP 检测, 沉降与 SMAD3 结合的 DNA, 并以此 DNA 作为模板进行 qPCR 检测, 结果在 SMAD3 蛋

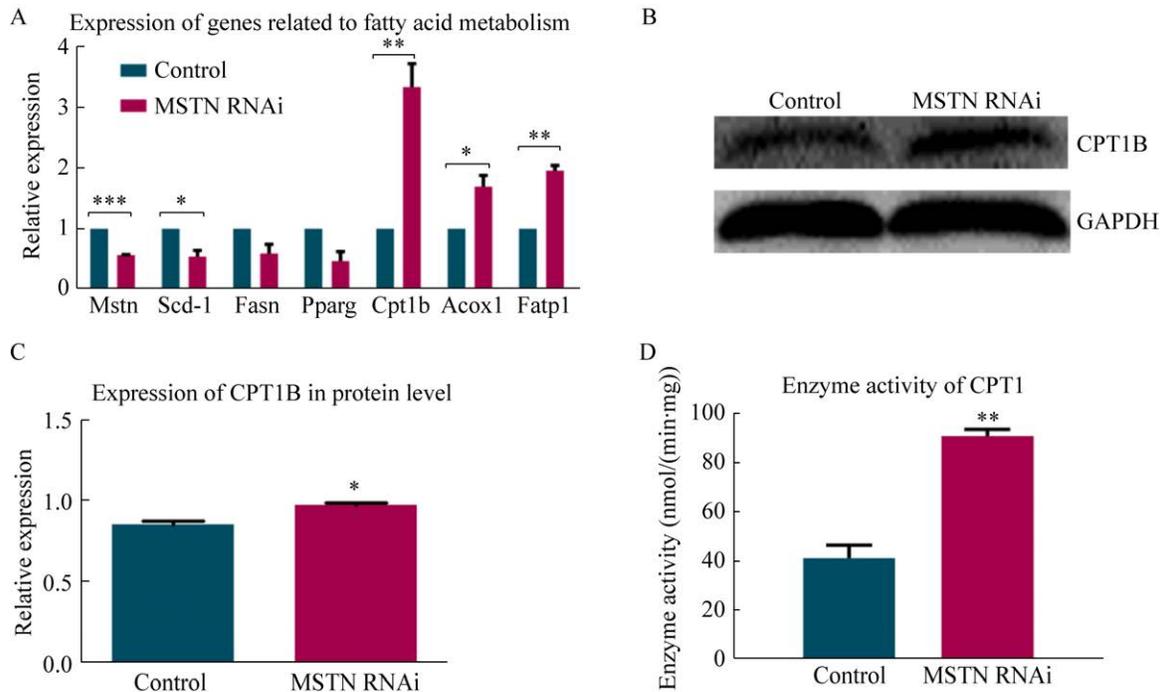


图 6 *Mstn* 干扰可通过 β 氧化促进肌肉内脂肪酸代谢 A: *Mstn* 干扰小鼠和对照组小鼠肌肉中脂肪酸代谢相关基因的表达; B: CPT1B 在蛋白水平上的表达; C: CPT1B 蛋白表达的灰度分析; D: *Mstn* 干扰和对照小鼠骨骼中 CPT1 酶活性的测定. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. Scd-1: 硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1; Fasn: 脂肪酸合酶; Pparg: 过氧化物酶体增殖物激活受体; Cpt1b: 肉碱棕榈酰转移酶 1b; Acox1: 酰基辅酶 a 氧化酶 1; Fatp1: 脂肪酸转运蛋白 1

Figure 6 *Mstn* knockdown promoted the metabolism of intramuscular fatty acid through β oxidation. (A) Expression of genes associated with fatty acid metabolism in the muscles of *Mstn* knockdown mice and the control. (B) Expression of CPT1B at protein level and quantified in (C). (D) Determination of CPT1 enzyme activity in *Mstn* knockdown and control mice skeletal. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. Scd-1: stearyl-coenzyme A desaturase 1; Fasn: fatty acid synthase; Pparg: peroxisome proliferator activated receptor gamma; Cpt1b: carnitine palmitoyltransferase 1b; Acox1: Acyl-CoA oxidase 1; Fatp1: fatty acid transport protein 1.

白沉降下来的 DNA 中扩增出了 *Cpt1b* 启动子 -1 789 至 -1 605 区域的序列 (图 7B 和 7C), 证明 SMAD3 蛋白确实可以与 *Cpt1b* 启动子结合。证明 *Mstn* 基因可以通过调控转录因子 SMAD3 与 *Cpt1b* 基因启动子的结合来调控 *Cpt1b* 基因的表达, 从而调控脂肪酸 β 氧化代谢。

3 讨论

与野生型动物相比, *Mstn* 缺失动物骨骼肌

显著增加, 脂肪含量显著降低^[20-21]。在自然 *Mstn* 突变的牛、羊、狗、人和成年大鼠中也观察到类似的现象^[2-6]。在动物生产中, 脂肪含量与肉质风味、多汁、嫩度等性状密切相关, 是评价动物肉质产品的重要指标。因此, 研究肌肉内脂肪代谢机制对提高动物产品的食用价值具有重要的指导意义。在本研究中, 我们构建了 *Mstn* RNAi 质粒并制备了 *Mstn* 干扰的转基因小鼠, *Mstn* 基因干扰增加了小鼠骨骼肌质量, 但其体

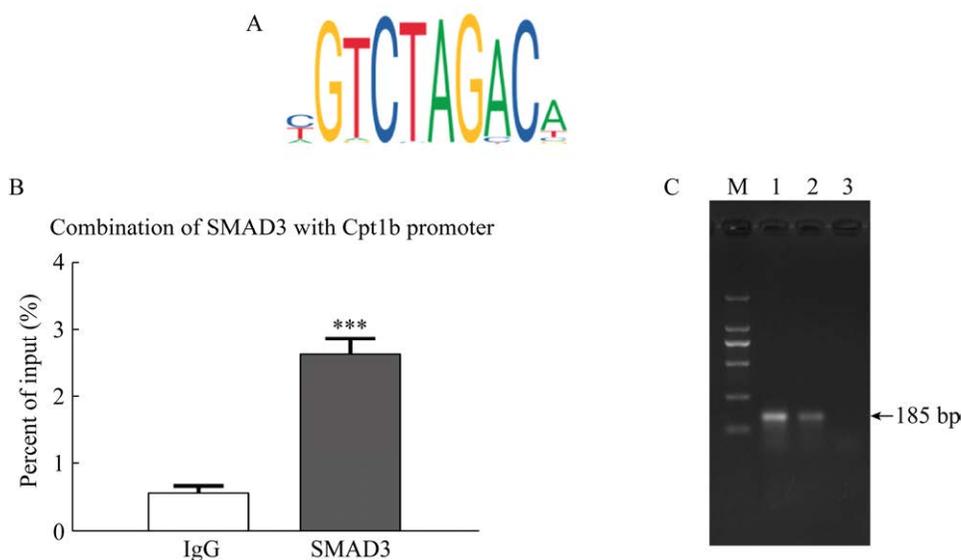


图7 *Mstn* 基因通过转录因子 SMAD3 与 *Cpt1b* 基因启动子的结合调控 *Cpt1b* 基因的表达 A: SMAD3 转录因子的结合基序; B: ChIP-qPCR 检测 SMAD3 转录因子与 *Cpt1b* 基因启动子的结合. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. C: PCR 验证 SMAD3 转录因子与 *Cpt1b* 基因启动子的结合. M: DL 2 000 bp Marker; 1: input-*Cpt1b*; 2: SMAD3-*Cpt1b*; 3: IgG-*Cpt1b*

Figure 7 *Mstn* regulated the expression of *Cpt1b* through the binding of SMAD3 to the *Cpt1b* promoter. (A) The binding motif of the transcription factor SMAD3. (B) Binding of the transcription factor SMAD3 to *Cpt1b* gene promoter detected by ChIP-qPCR. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. (C) The binding of the transcription factor SMAD3 to *Cpt1b* gene promoter detected by PCR. M: DL 2 000 bp Marker; 1: input-*Cpt1b*; 2: SMAD3-*Cpt1b*; 3: IgG-*Cpt1b*.

重没有显著变化,这可能是由于 *Mstn* 干扰减少了小鼠的脂肪含量^[20-21]。为了研究 *Mstn* 基因下调对肌内脂肪的影响,我们检测了骨骼肌中甘油三酯的含量,结果表明 *Mstn* 基因下调降低了骨骼肌中甘油三酯的含量,即 *Mstn* 基因干扰的转基因小鼠肌内脂肪含量减少。然后我们检测了 *Mstn* 敲低和对照组小鼠的脂肪酸组成,发现 *n-3/n-6* 和 *unsat/sat* 的比值显著上调, *n-6/n-9* 的比值没有显著变化,说明 *Mstn* 敲低促进了饱和脂肪酸向不饱和脂肪酸的分解,并促进 *n-6* 多不饱和脂肪酸生成 *n-3* 多不饱和脂肪酸。这些结果表明, *Mstn* 的下调促进了脂肪酸的代谢。

对脂肪代谢相关基因的表达进行了检测,结果表明 *Mstn* 的下调下调了脂肪合成相关基

因,上调了脂肪分解相关基因。这说明 *Mstn* 的下调抑制了脂肪酸的合成,促进了脂肪酸的分解。根据这些结果,我们推测这可能是由于 *Mstn* 敲低会产生更多的肌肉,更多的肌肉促进更多的脂肪酸进入线粒体,为机体活动提供更多的能量^[18]。Fournier 等研究发现,抑制棕色脂肪细胞 *Mstn/ActRIIB* 信号通路可增强线粒体功能和呼吸功能,消耗能量,减少脂肪沉积^[19],这与我们的研究结果一致。在 *Mstn* 基因干扰后,与脂肪酸分解相关的基因中, *Cpt1b* 的上调尤为明显,提示 *Cpt1b* 可能是 *Mstn* 调控脂肪代谢的关键基因^[22-23]。然后我们测定了 *Mstn* 干扰和对照组小鼠骨骼肌中 CPT1 酶的活性,结果也表明 *Mstn* 干扰小鼠骨骼肌中 CPT1 酶的活性高于

对照组。*Cpt1b* 允许胞质酰基辅酶 A 与肉碱结合形成酰基肉碱, 进入线粒体内膜, 发生 β 氧化降解以获取能量。这也说明 *Mstn* 干扰主要通过 β 氧化促进脂肪酸代谢。

为了进一步探讨 *Mstn* 基因调控 *Cpt1b* 基因表达从而调控脂肪酸 β 氧化的作用机理, 我们检测了 *Mstn* 基因下游重要的转录因子 SMAD3 是否与 *Cpt1b* 基因的启动子结合, 首先 JASPAR 数据库预测结果显示, SMAD3 转录因子与 *Cpt1b* 启动子具有结合的可能, 随后我们通过 ChIP-qPCR 证明了其结合。这一结果表明, *Mstn* 基因可以通过转录因子 SMAD3 与 *Cpt1b* 基因启动子的结合调控 *Cpt1b* 基因的表达, 从而调控脂肪酸 β 氧化代谢。在我们的研究中, *Mstn* 基因表达被抑制后, *Cpt1b* 基因表达显著上调, 而根据前人研究结果显示 *Mstn* 基因表达下调后 SMAD3 活性下降^[24-25], 因此我们推测 SMAD3 转录因子对 *Cpt1b* 基因表达具有抑制作用。当 *Mstn* 基因表达被抑制后, SMAD3 活性下降, 所以其对于 *Cpt1b* 基因表达的抑制作用被减弱, 从而导致 *Cpt1b* 基因表达上调, 从而促进脂肪酸 β 氧化, 促进脂肪酸代谢。

4 结论

本研究通过 RNA 干扰 (RNAi) 法制备 *Mstn* 干扰小鼠, *Mstn* 干扰可促进肌肉发育, 减少肌肉脂肪含量, 并显著上调 *n-3/n-6* 和 *unsat/sat* 比值。通过对脂肪酸代谢相关基因表达的检测可知, *Mstn* 基因下调会促进脂肪酸分解和运输相关基因的表达, 而抑制脂肪酸合成相关基因的表达。在这些基因中, 与 β 氧化相关的基因 *Cpt1b* 的上调尤为明显。*Mstn* 敲低后骨骼肌中 CPT1 酶活性也高于对照组。进一步开展 ChIP 实验发现, *Mstn* 基因下游转录因子 SMAD3 可与 *Cpt1b* 基因的启动子直接结合。表明 *Mstn* 下调

后主要通过调控其下游转录因子 SMAD3 与 *Cpt1b* 基因启动子的结合, 促进 *Cpt1b* 基因的表达, 从而促进肌肉内脂肪酸的 β 氧化代谢。本研究发掘了 *Mstn* 调控肌肉内脂肪酸代谢的主要途径, 为制备高产优质转基因动物新品种提供了理论依据。

REFERENCES

- [1] McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. PNAS, 1997, 94(23): 12457-12461.
- [2] Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, et al. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. N Engl J Med, 2004, 350(26): 2682-2688.
- [3] Clop A, Marcq F, Takeda H, et al. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nat Genet, 2006, 38(7): 813-818.
- [4] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature, 1997, 387(6628): 83-90.
- [5] 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 Genet, 2007, 3(5): e79.
- [6] Kambadur R, Sharma M, Smith TP, et al. Mutations in myostatin (*GDF8*) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. Genome Res, 1997, 7(9): 910-916.
- [7] Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. PNAS, 2001, 98(16): 9306-9311.
- [8] Lee SJ, Reed LA, Davies MV, et al. Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. PNAS, 2005, 102(50): 18117-18122.
- [9] Whittemore LA, Song KN, Li XP, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 300(4): 965-971.
- [10] Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, et al. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296(6): C1258-C1270.
- [11] Wang KK, Tang XC, Xie ZC, et al. CRISPR/Cas9-mediated knockout of myostatin in Chinese indigenous

- Erhualian pigs. *Transgenic Res*, 2017, 26(6): 799-805.
- [12] Yu BL, Lu R, Yuan YG, et al. Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats. *BMC Dev Biol*, 2016, 16(1): 26.
- [13] Wang X, Niu Y, Zhou J, et al. CRISPR/Cas9-mediated *MSTN* disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass. *Anim Genet*, 2018, 49(1): 43-51.
- [14] Zhang J, Cui ML, Nie YW, et al. CRISPR/Cas9-mediated specific integration of fat-1 at the goat *MSTN* locus. *FEBS J*, 2018, 285(15): 2828-2839.
- [15] Wang C, Chen YL, Bian WP, et al. Deletion of *mstna* and *mstnb* impairs the immune system and affects growth performance in zebrafish. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 72: 572-580.
- [16] Rooney MF, Porter RK, Katz LM, et al. Skeletal muscle mitochondrial bioenergetics and associations with myostatin genotypes in the Thoroughbred horse. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0186247.
- [17] Mennerich D, Braun T. Activation of myogenesis by the homeobox gene *Lbx1* requires cell proliferation. *EMBO J*, 2001, 20(24): 7174-7183.
- [18] Zhang C, McFarlane C, Lokireddy S, et al. Inhibition of myostatin protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation and promoting a brown adipose phenotype in mice. *Diabetologia*, 2012, 55(1): 183-193.
- [19] Fournier B, Murray B, Gutzwiller S, et al. Blockade of the activin receptor II b activates functional brown adipogenesis and thermogenesis by inducing mitochondrial oxidative metabolism. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(14): 2871-2879.
- [20] McPherron AC, Lee SJ. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest*, 2002, 109(5): 595-601.
- [21] Hamrick MW, Pennington C, Webb CN, et al. Resistance to body fat gain in 'double-musced' mice fed a high-fat diet. *Int J Obes (Lond)*, 2006, 30(5): 868-870.
- [22] Weis BC, Esser V, Foster DW, et al. Rat heart expresses two forms of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I. The minor component is identical to the liver enzyme. *J Biol Chem*, 1994, 269(29): 18712-18715.
- [23] Britton CH, Schultz RA, Zhang B, et al. Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene. *PNAS*, 1995, 92(6): 1984-1988.
- [24] Langley B, Thomas M, Bishop A, et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating *MyoD* expression. *J Biol Chem*, 2002, 277(51): 49831-49840.
- [25] Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, et al. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(20): 7230-7242.

(本文责编 郝丽芳)