



李隐侠,刘伟佳,张晨俭,等. *MSTN* 基因编辑湖羊胫腓肌的转录组分析[J]. 南京农业大学学报,2024,47(2):342-350.

LI Yinxia, LIU Weijia, ZHANG Chenjian, et al. Transcriptome analysis of tibiofibular muscle of Hu sheep edited by *MSTN* gene[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(2): 342-350.

## *MSTN* 基因编辑湖羊胫腓肌的转录组分析

李隐侠,刘伟佳,张晨俭,舒嘉傲,桂红兵,王慧利,  
孟春花,张俊,张建丽,钱勇,曹少先\*

(江苏省农业科学院畜牧研究所/江苏省畜禽精准育种工程研究中心/  
农业农村部种养结合重点实验室,江苏 南京 210014)

**摘要:** [目的] 本文旨在探索肌肉抑制素基因(myostatin, *MSTN*) 调控肌肉生长发育的分子机制。[方法] 以 3 月龄 *MSTN* 基因编辑湖羊(试验组)和野生型湖羊(对照组)胫腓肌为对象,采用 PCR 和 Western blot 方法验证 *MSTN* 编辑湖羊编辑形式,在此基础上开展转录组测序和分析,并用 real-time PCR 方法对差异表达基因进行结果验证。[结果] 对照组和试验组共有 149 个差异表达基因,其中 65 个基因上调,84 个基因下调,GO 注释和 KEGG 富集分析表明,差异表达基因显著富集在氧化磷酸化、果糖和甘露糖代谢、生热作用、FOXO 和 AMPK 信号通路,表明 *MSTN* 基因可能通过以上信号通路参与湖羊生长发育调控。[结论] *MSTN* 基因编辑湖羊可能通过 FOXO 和 AMPK、氧化磷酸化、果糖和甘露糖代谢、生热作用等与动物代谢相关的信号通路调控其生长发育。

**关键词:** 湖羊; *MSTN* 基因; CRISPR/Cas9; 转录组测序

中图分类号: S852.6

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2024)02-0342-09

## Transcriptome analysis of tibiofibular muscle of Hu sheep edited by *MSTN* gene

LI Yinxia, LIU Weijia, ZHANG Chenjian, SHU Jia'ao, GUI Hongbing, WANG Huili,  
MENG Chunhua, ZHANG Jun, ZHANG Jianli, QIAN Yong, CAO Shaoxian\*

(Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Provincial Engineering  
Research Center for Precision animal Breeding/Key Laboratory of Crop and Animal  
Integrated Farming, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** [Objectives] This article aimed to explore the molecular mechanisms of Myostatin gene (*MSTN*) regulating muscle growth and development. [Methods] Based on the tibiofibular muscles of 3-month-old *MSTN* editing Hu sheep (experiment group) and wild type Hu sheep (control group), PCR and Western blot were used to detect the editing form of *MSTN* editing Hu sheep, then transcriptome sequencing were carried out to find differentially expressed genes (DEG) and qPCR was used to verify the results of DEG. [Results] A total of 149 DEG were found between wild type and *MSTN* editing group, of which 65 DEG were upregulated and 84 DEG were downregulated. GO annotation and KEGG enrichment analysis showed that the DEG were significantly enriched in oxidative phosphorylation, fructose and mannose metabolism, thermogenesis, FOXO and AMPK signaling pathways, indicating that the *MSTN* gene might participate in the regulation of growth and development of Hu sheep through above signaling pathways. [Conclusions] *MSTN* editing Hu sheep might regulate growth and development through FOXO and AMPK, oxidative phosphorylation, fructose and mannose metabolism, thermogenesis, and other signal pathways related to animal metabolism.

**Keywords:** Hu sheep; *MSTN* gene; CRISPR/Cas9; transcriptome sequencing

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  $\beta$  超家族成员, 主要在骨骼肌中表达, 是骨骼肌发育的重要调节因子<sup>[1]</sup>。*MSTN* 基因过表达抑制骨骼肌增殖分化, 而功能缺失或者表达降低则导致肌肉肥大, 呈现双肌现象<sup>[2]</sup>。比利时蓝牛 *MSTN* 基因编码区 11 bp 缺失造成蛋白翻译提前终止, 形成截短的 *MSTN* 蛋白, 出现双肌臀表型<sup>[2]</sup>; *MSTN* 基因缺失小鼠全身骨骼肌重显著增加, 单个肌肉细胞生长到正常大小的 2 倍左右<sup>[3]</sup>, 表明 *MSTN* 在肌肉发育的负调

收稿日期: 2023-03-21

基金项目: 江苏省重点研发计划(现代农业)重点项目(BE2019373)

\*通信作者: 曹少先, 博士, 研究员, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: sxcao@jaas.ac.cn。

控过程中发挥重要作用。

随着基因编辑技术的飞速发展,研究者利用 CRISPR/Cas9 技术获得了多种基因编辑动物。罗琪<sup>[4]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术制备了 TBXT 和 FecB 基因编辑滩羊,为创制优质滩羊育种群体奠定了坚实的基础;Wang 等<sup>[5]</sup>利用 CRISPR/Cas9 方法获得 *MSTN* 功能缺失的山羊,此山羊表现出体重增加及肌肉纤维变大的表型。Zhou 等<sup>[6]</sup>利用 CRISPR/Cas9 技术获得  $\beta$ -乳球蛋白敲除山羊,为提高羊奶质量奠定了基础。Song 等<sup>[7]</sup>得到酪氨酸酶(*Tyr*)基因敲除兔,证明 CRISPR/Cas9 介导的基因非编码区大片段缺失表型研究的可行性。

在 *MSTN* 基因编辑方面,滩羊<sup>[4]</sup>、猪<sup>[8]</sup>、牛<sup>[9]</sup>、兔<sup>[10]</sup>等动物的 *MSTN* 编辑动物均已成功获得,这些动物大多表现出生长加快或者双肌表型。传统观点认为,*MSTN* 基因可能通过影响生肌调节因子 MyoD 和 Pax3 及肌萎缩相关基因 *ERK1/2*、*MuRF-1* 的表达,使肌纤维数量减少,体积减小,从而抑制肌肉生长发育<sup>[11-12]</sup>。朱琳等<sup>[13]</sup>通过对 *MSTN* 基因编辑牛骨骼肌的组学研究发现,*MSTN* 可能通过 PI3K-AKT、MAPK 和 AMPK 等信号通路参与调控肌卫星细胞增殖与分化等。本课题组前期利用 CRISPR/Cas9 技术成功获得 *MSTN* 基因编辑湖羊,其生长速度显著提升。本研究以 *MSTN* 编辑湖羊和野生型湖羊后腿胫腓肌为对象,进行转录组测序分析,为阐明 *MSTN* 编辑湖羊生长和肌肉发育的分子机制提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

试验组 3 只 3 月龄 *MSTN* 编辑杂合型湖羊公羊(为 *MSTN* 基因编辑 g1 代个体),平均体重(23.3±3.05)kg;对照组为 3 只 3 月龄野生型湖羊公羊,平均体重(18.7±2.31)kg。试验组和对照组均饲养在江苏省农业科学院六合动物科学基地羊场,饲喂相同日粮,自由采食和饮水。

### 1.2 样品采集及 DNA 和 RNA 提取与样品检测

利用活体采样技术采集 6 只湖羊后腿胫腓肌同一部位肌肉,立即置于液氮中储存。采用苯酚-氯仿方法提取 DNA,并用 Nanodrop 测 DNA 浓度后备用;采用 Trizol 法提取总 RNA,然后分别采用 Nanodrop、Qubit 2.0 和 Agilent 2100 方法检测 RNA 样品的纯度、浓度和完整性等,符合测序要求的 RNA 送往北京百迈克生物科技股份有限公司进行转录组测序。

### 1.3 引物设计、PCR 扩增和测序

根据绵羊 *MSTN* 基因序列(NC\_056055.1),用 Primer Premier 5.0 软件设计引物进行 *MSTN* 编辑羊靶位点鉴定,同时根据绵羊 *MYOG* (NM\_001174109.1)、*MYOD1* (NM\_001009390.1)、*CCDC8* (XM\_027978517.2)、*FOXO3* (NM\_001267889.1) 基因和内参基因 *GAPDH* (NM\_001190390.1) 序列设计引物,进行实时荧光定量 PCR (qPCR) 试验以验证转录组测序结果。

表 1 本研究用到的引物信息

Table 1 The primers information used in this study

| 目的基因<br>Genes | 引物序列<br>Primer sequence(5'→3')                             | 片段长度/bp<br>Length | 退火温度/℃<br>Annealing temperature | 目的<br>Purpose               |
|---------------|--|-------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| <i>MSTN</i>   | F: AGCCAATCACAGATCCCAGC<br>R: TCTTTGCCCTCCTCCTTACG         | 707               | 55                              | <i>MSTN</i> 第一外显子<br>区域编辑鉴定 |
| <i>MSTN</i>   | F: TTATACTTGATATTTTGCTGTTATG<br>R: ATCTACTGTGAAGACTTCCTGTT | 894               | 55                              | <i>MSTN</i> 第二外显子<br>区域编辑鉴定 |
| <i>MYOG</i>   | F: CCTTGCACTCCTTAGATTTCAA<br>R: TTCTGGTTTCCTTTGTTTGG       | 101               | 60                              | qPCR                        |
| <i>MYOD1</i>  | F: GCTCCAGAACCCGAGTAAGTT<br>R: CGGCGACAGCAGCTCCATA         | 106               | 60                              | qPCR                        |
| <i>CCDC8</i>  | F: CTCAGACCCGAAACCAGTC<br>R: CACTCTCTTGGGTAGCCTGG          | 122               | 60                              | qPCR                        |
| <i>FOXO3</i>  | F: TGCCGGCTGGAAGAACTCTA<br>R: CGCCATCCGGTTGATGAT           | 113               | 60                              | qPCR                        |
| <i>GAPDH</i>  | F: ACTTTGGCATCGTGGAGG<br>R: GAAGACTGAGTCTCGCTGTTG          | 379               | 60                              | qPCR                        |

注: *MYOG*: 肌细胞生成素基因 Myogenin gene; *MYOD1*: 肌源性分化 1 基因 Myogenic differentiation gene; *CCDC8*: 卷曲螺旋结构蛋白 8 基因 Coiled-coil domain containing 8 gene; *FOXO3*: 叉形头转录因子的 O 亚型基因 Forkhead box O3 gene; *GAPDH*: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene.

以野生型和 *MSTN* 编辑湖羊腿肌 DNA 为模板,采用 PCR 方法扩增 *MSTN* 靶位点。反应体系 25  $\mu\text{L}$ : DNA 模板 60 ng, 2 $\times$ T 8 High-Fidelity Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 添加灭菌双蒸水至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 98  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 s, 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

#### 1.4 Western blot

分别取 200 mg 野生型湖羊和 *MSTN* 编辑湖羊后腿胫腓肌肌肉,置于干净的离心管中,加入 1 mL RIPA 裂解液(碧云天公司),于冰上用匀浆器匀浆 2~3 min 后离心并取上清液,使用 BCA 浓度测定试剂盒(碧云天公司)检测蛋白浓度。调整浓度均一后加入上样缓冲液,100  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 进行变性,然后将样品蛋白加入 120  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  预制胶中 140 V 电泳分离,利用湿转法将预制胶上的蛋白转印 PVDF 膜,在 50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的脱脂奶粉中封闭 2 h。4  $^{\circ}\text{C}$  条件下分别孵育一抗 *MSTN* (Proteintech, 1:1 000, 识别 23~375 aa 残基) 和 GAPDH (Proteintech, 1:1 000, 识别 1~335 aa 残基) 12 h, TBST 洗涤后分别孵育山羊抗兔和山羊抗鼠的二抗(南京润研生物科技有限公司, 1:3 000) 1 h, 条带于配制好的 BCL 发光液中避光 1~2 min, 用化学发光凝胶成像系统(思拓凡生物科技公司)扫描检测蛋白条带并计算蛋白水平。

#### 1.5 cDNA 文库构建、质控和测序

样品检测合格后进行文库构建。主要流程: 首先用带有 Oligio (dT) 的磁珠富集 mRNA, 加入 Fragmentation Buffer 将 mRNA 进行随机打断, 以 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物(random hexamers) 合成第 1 条 cDNA 链, 加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第 2 条 cDNA 链, 利用 AMPure XP beads 纯化 cDNA, 最后通过 PCR 富集得到 cDNA 文库。文库构建完成后, 使用 Q-PCR 方法对文库有效浓度(>2 nmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 进行准确定量, 以保证文库质量。库检合格后, 应用 Illumina 平台进行测序。

#### 1.6 RNA-Seq 分析

测序数据经过滤得到 Clean Data, 采用 HISAT2 (2.0.4) 与绵羊参考基因组(Ovis\_aries. Oar\_rambouillet\_V1.0.107.genome.fa) 进行序列比对, 利用 String Tie 将对上的 reads 进行组装, 得到 Mapped Data, 进行插入片段长度检验、随机性检验等文库质量评估; 根据基因在不同样品中的表达量进行差异表达分析、差异表达基因功能注释和功能富集等表达水平分析。使用 DESeq2 软件进行差异分析, 以差异倍数  $\geq 1.5$  且错误发现率(false discovery rate) < 0.01 作为筛选标准。

#### 1.7 实时荧光定量 PCR (qPCR)

以转录组测序的 RNA 为模板, 用逆转录试剂盒(南京诺唯赞) 将 mRNA 逆转录为 cDNA。采用 ABI7500 (赛默飞科技) 进行 real-time PCR 扩增。20  $\mu\text{L}$  反应体系: 1  $\mu\text{L}$  cDNA, 上游引物和下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ ChamQ universal SYBR qPCR Master mix(南京诺唯赞) 10  $\mu\text{L}$ , 最后加 ddH<sub>2</sub>O 8.2  $\mu\text{L}$  补齐至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序分为 3 步: 第 1 步为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 第 2 步为循环反应: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 共 40 个循环反应; 第 3 步为熔解曲线: 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  60 s, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s。每个样本重复 3 次。

#### 1.8 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析和差异显著性检验(*t* 测验)。数据以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm SD$ ) 表示 ( $P < 0.05$  表示差异显著)。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MSTN* 基因编辑湖羊编辑位点鉴定

根据 *MSTN* 基因 sgRNA 设计的位置, 在其上、下游设计引物, PCR 扩增 *MSTN* 编辑羊 DNA 序列(图 1-A、B), 通过克隆测序发现, 3 只 *MSTN* 编辑湖羊在 *MSTN* 基因外显子 1(编码区第 94 个碱基后) 缺失 9 个碱基(atgtgaaa), 形成一种杂合子基因型+/-9 bp; 在 *MSTN* 基因外显子 2(编码区的第 655 个碱基后) 缺失 11 个碱基(ctgaatccaac)(图 1-C), 形成一种杂合子基因型+/-11 bp; 2 个编辑位点在 3 只 *MSTN* 编辑羊中均为一种杂合单倍型+/-20 bp。

### 2.2 基因编辑湖羊肌肉组织 *MSTN* 蛋白表达分析

经序列分析, *MSTN* 基因编辑使编码区第 655 个碱基后缺失 11 个碱基, 导致移码, 不能形成 ORF, 无 *MSTN* 蛋白翻译, 杂合型编辑有 1/2 的 *MSTN* 基因无 *MSTN* 蛋白翻译。Western blot 结果表明, *MSTN* 编辑羊胫腓肌中 *MSTN* 蛋白表达水平显著下调(图 2), 验证了这一推测。

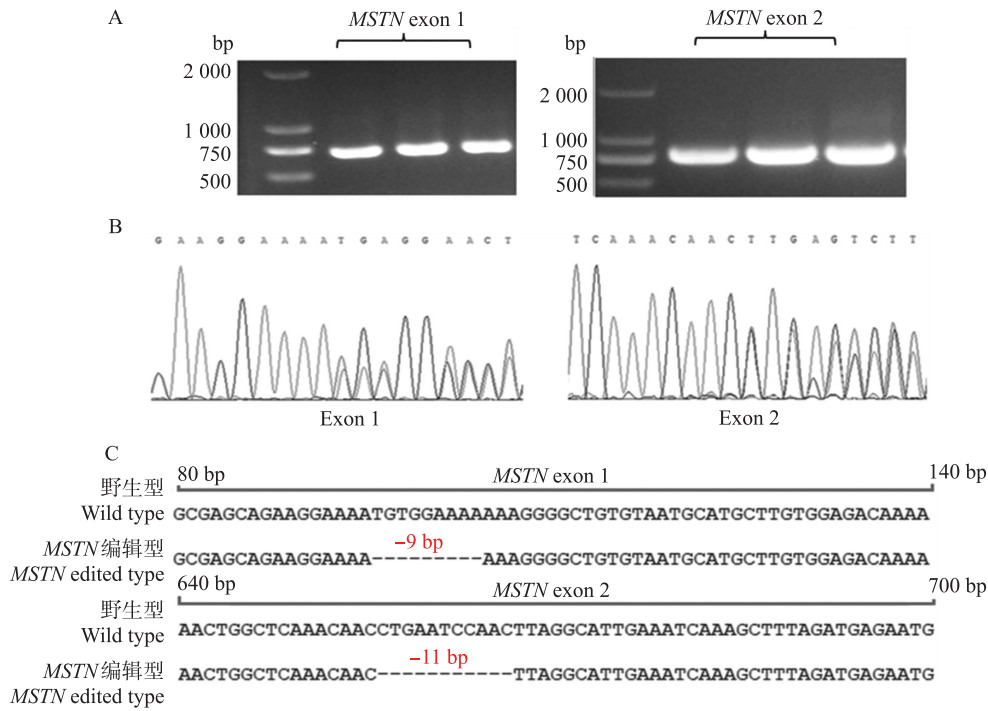


图 1 *MSTN* 编辑湖羊靶位点鉴定

Fig. 1 The target sites identification of *MSTN* editing of Hu sheep

A. *MSTN* 基因外显子 1 和 2 编辑位点 PCR 扩增电泳图; B. *MSTN* 基因外显子 1 和 2 编辑位点测序图; C. *MSTN* 编辑湖羊外显子 1 和 2 位点与野生型湖羊序列比对结果。

A. The PCR amplification electrophoresis of the exon 1 and 2 editing sites of *MSTN* gene; B. The sequencing map of exon 1 and 2 editing sites of *MSTN* gene; C. Sequence alignment of exon 1 and 2 editing site between *MSTN* editing sheep and wild-type sheep.

### 2.3 高通量测序数据的统计分析

对 6 只湖羊胫腓肌组织的转录组进行测序,共获得 40.53 Gb Clean data,各样品 Clean data 均高于 6.16 Gb, Q30 碱基比例均在 92.13% 以上,GC 含量为 51.24% ~ 52.30%,分别将各样本 Clean reads 与绵羊参考基因组进行序列比对,比对效率为 94.71% ~ 95.31% (表 2)。分析差异表达基因后发现,湖羊胫腓肌 *MSTN* 编辑组与对照组差异表达基因 149 个,其中 65 个基因表达上调,84 个基因表达下调(图 3)。

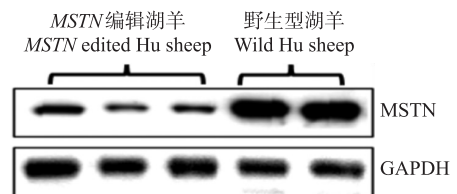


图 2 *MSTN* 基因编辑湖羊胫腓肌中 *MSTN* 蛋白的 Western blot

Fig. 2 Western blot of *MSTN* protein expression of *MSTN* edited Hu sheep

表 2 转录组测序数据的 Clean reads、GC 含量和 Q30 的统计

Table 2 Statistics of clean reads, GC content, and the percentage of Q30

| 组别<br>Group                                     | 羊编号<br>No. of sheep | Clean reads | Clean data    | GC 含量/%<br>GC content | Q30 碱基比例/%<br>Q30 base ratio |
|---|---------------------|-------------|---------------|-----------------------|------------------------------|
| 野生湖羊<br>Wild Hu sheep                           | 1                   | 21 796 014  | 6 524 630 384 | 51.52                 | 92.98                        |
|   | 2                   | 21 450 961  | 6 421 952 802 | 51.67                 | 92.60                        |
|   | 3                   | 20 573 674  | 6 159 407 858 | 51.85                 | 92.13                        |
| <i>MSTN</i> 编辑湖羊<br><i>MSTN</i> edited Hu sheep | 1                   | 28 683 475  | 8 586 847 918 | 51.24                 | 93.14                        |
|   | 2                   | 21 506 432  | 6 433 577 984 | 52.30                 | 94.53                        |
|   | 3                   | 21 319 022  | 6 375 595 360 | 52.44                 | 93.50                        |

### 2.4 差异基因的 GO (Gene Ontology) 分类富集分析

为了比较 *MSTN* 编辑湖羊与野生型湖羊肌肉发育的差异机制,对二者差异表达基因进行 GO 注释分析。结果显示,149 个差异表达基因富集到 3 大类基因本体共计 40 个条目中,包括细胞组分 13 个,分子功能 9 个,生物学过程 18 个。注释到细胞组分中的差异表达基因主要分布在细胞和细胞部分,共包含

158 个基因;注释到生物学过程中的差异表达基因主要参与细胞过程、单一生物过程和代谢过程,共包含 209 个基因;注释到分子功能中的差异表达基因主要行使结合的功能,包含 73 个基因(图 4)。这说明湖羊 *MSTN* 编辑通过影响基因在细胞中定位和行使不同功能以及参与多种生物学过程从而调控湖羊肌肉发育。

### 2.5 差异基因的 KEGG 富集分析

为了鉴定 *MSTN* 调控湖羊肌肉生长发育的生物学通路,采用 KEGG 信号通路数据库进行差异表达基因的通路富集分析。结果(图 5)显示,差异表达基因显著富集在氧化磷酸化、果糖和甘露糖代谢、生热作用、FOXO 和 AMPK 信号通路( $P < 0.05$ ),提示这些信号通路可能参与 *MSTN* 编辑湖羊肌肉发育的调控。

KEGG 分类(包括细胞过程、环境信息加工、遗传信息加工、新陈代谢和生物体系统)分析发现:*MSTN* 编辑湖羊与对照组湖羊间生物体系统中共有 47 个

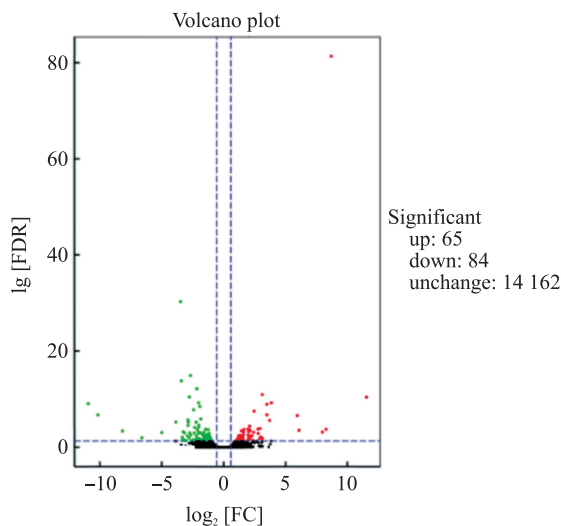


图 3 差异表达基因鉴定

Fig. 3 Identification of differentially expressed genes  
FDR: 错误发现率 False discovery rate; FC: 差异倍数 Fold change.

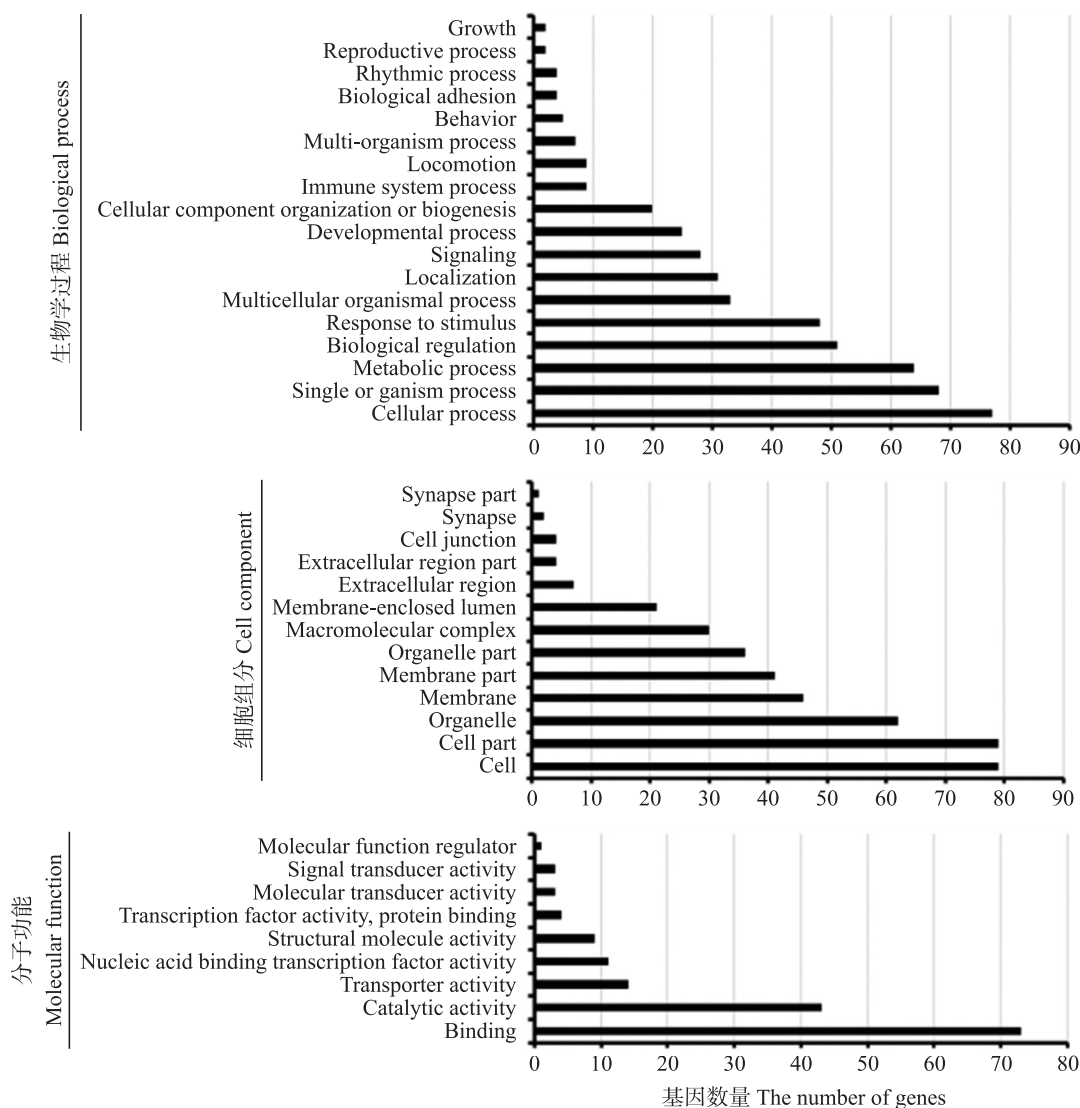


图 4 差异表达基因 GO 注释

Fig. 4 The GO annotation of differentially expression genes

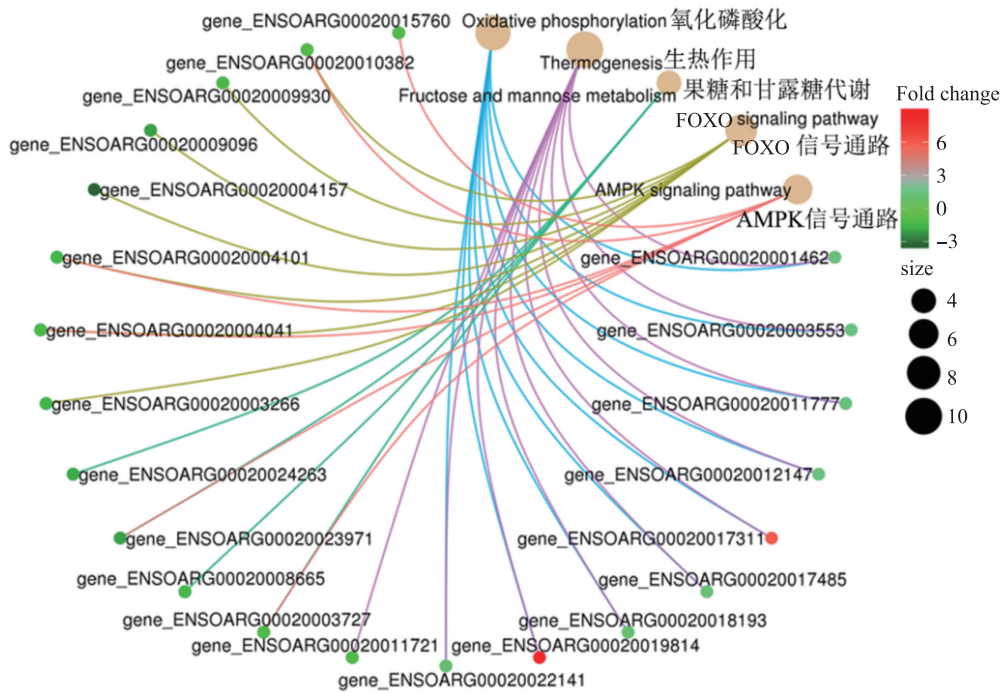


图 5 差异表达基因与 KEGG 通路的网络图

Fig. 5 Network diagram of differentially expressed genes and KEGG pathways

差异表达基因,其中 10 个差异表达基因与生热作用(thermogenesis)相关;环境信息加工中有 20 个基因表达模式发生改变,主要包括 FOXO 信号通路(7 个基因)、AMPK 信号通路(6 个基因)、MAPK 信号通路(3 个基因)以及神经活性的配体和受体间相互作用(4 个基因)。*MSTN* 编辑湖羊中核糖体(ribosome)相关 7 个基因表达模式发生改变,新陈代谢中氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)相关 9 个基因表达模式发生改变(图 6)。以上结果说明湖羊 *MSTN* 基因编辑通过多种途径参与调控肌肉的生长发育。

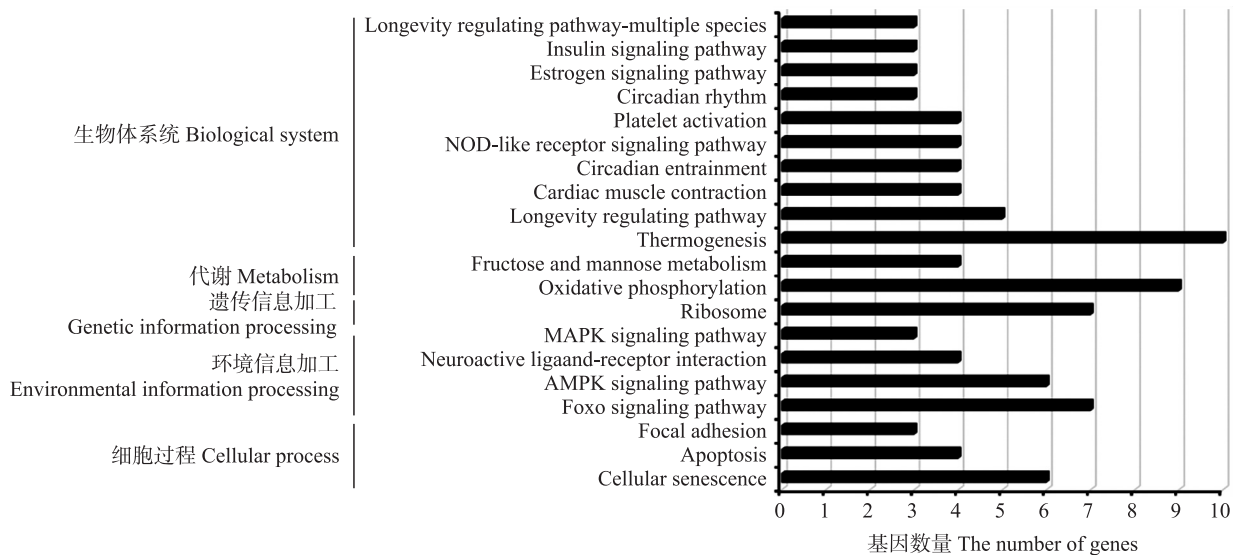


图 6 差异表达基因 KEGG 分类图

Fig. 6 KEGG classification of differentially expressed genes

### 2.6 转录组测序可靠性的 qPCR 验证

为了验证转录组测序结果的可靠性,随机挑选 5 个差异表达基因,用 qPCR 方法验证表达趋势的变化。结果(图 7)显示,*MSTN* 编辑湖羊胫腓肌中 *MYOD*、*MYOG*、*MYH1* 和 *CCDC8* 基因表达水平显著上升,*FOXO3* 基因表达水平显著下调,表达趋势与转录组测序结果完全一致。

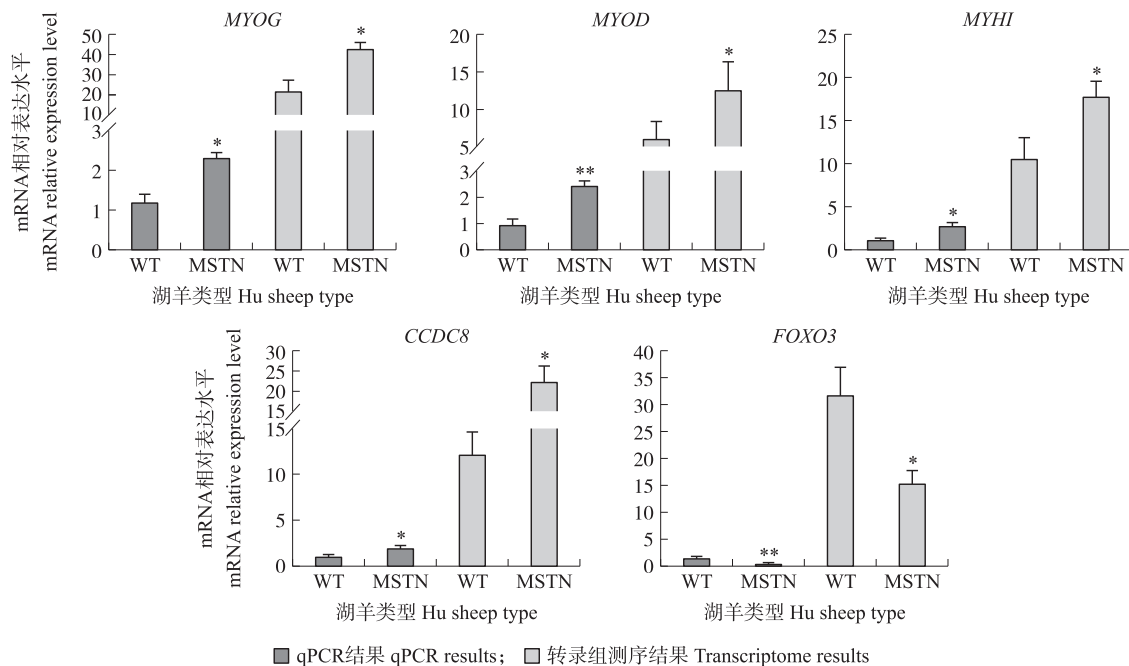


图 7 real-time PCR 方法验证转录组测序结果

Fig. 7 Validation of transcriptome results using real-time PCR

转录组结果以 FPKM 值显示。FPKM values represent the transcriptome results.

WT:野生湖羊 Wild Hu sheep; MSTN: *MSTN* 编辑湖羊 *MSTN* edited Hu sheep

### 3 讨论

*MSTN* 是家畜骨骼肌生长的重要负调节因子<sup>[14]</sup>,其功能最初在小鼠中被发现和证实,随后在牛、猪、羊、鸡和人类中被进一步证实<sup>[15]</sup>。*MSTN* 基因敲除小鼠体重及骨骼肌重显著增加,腿部骨骼肌纤维显著增粗<sup>[16]</sup>; *MSTN* 自然突变的比利时蓝牛、安格斯牛和南德温牛胴体重量和屠宰率高于非突变牛; *MSTN* 突变型牛表现为骨骼肌发达, *MSTN* 表达下调,促进骨骼肌卫星细胞的增殖,肌管数量和直径均呈现增大趋势<sup>[17]</sup>;在绵羊骨骼肌卫星细胞研究后发现,与对照组相比, *MSTN* 基因敲除组的肌管形成效率从  $(11.2 \pm 1.3)\%$  提升到  $(19.5 \pm 2.1)\%$ ,肌体的平均长度从  $(22 \pm 5.3) \mu\text{m}$  增加到  $(47 \pm 3.6) \mu\text{m}$ <sup>[18]</sup>。

CRISPR/Cas9 技术被广泛用于哺乳动物基因编辑,包括基因敲除、位点特异性敲除和多位点同时敲除等<sup>[19-20]</sup>。利用 CRISPR/Cas9 技术获得了一系列的 *MSTN* 基因编辑羊;Crispo 等<sup>[21]</sup> 2015 年采用 CRISPR/Cas9 和纤维注射技术得到 *MSTN* 敲除的绵羊;Zhang 等<sup>[18]</sup> 利用 CRISPR/Cas9 技术介导绵羊 *MSTN* 基因敲除;He 等<sup>[22]</sup> 利用 CRISPR/Cas9 方法通过显微注射得到 *MSTN* 编辑山羊,且出现双肌现象。本研究中采用 CRISPR/Cas9 技术获得的 *MSTN* 编辑湖羊初生重和断奶重均高于对照组湖羊,但调控机制尚待研究。

前人研究发现, *MSTN* 调控细胞增殖、分化和肌肉发育的信号通路主要集中在 TGF- $\beta$ /Smad、AMPK 和 MAPK 信号通路上。在牛骨骼肌卫星细胞的研究中发现, *MSTN* 可能通过介导肌动蛋白细胞骨架调节通路影响牛骨骼肌卫星细胞增殖和成肌分化<sup>[23]</sup>;高丽等<sup>[24]</sup> 研究发现, *MSTN* 突变通过下调 SMAD2/SMAD3 转录因子与 *CDKN1C* 启动子结合,抑制 *CDKN1C* 基因表达,上调 *CyclinA-CDK2* 表达,最终促进 DNA 合成和细胞周期进程,促进肌肉发育。Myostatin 缺失可通过 SMAD-AMPK-G6PD 途径增强牛肌肉的抗氧化能力<sup>[25]</sup>。在中国对虾的研究中发现, *MSTN* 通过 TGF- $\beta$ /Smad 和 MAPK 信号通路参与调控中国对虾肌肉生长<sup>[26]</sup>;在鸡胎儿成肌细胞中敲除 *MSTN* 后,转录组测序发现差异表达基因主要集中在 MAPK、PI3K-AKT 和 STAT3 信号通路<sup>[27]</sup>。本研究以 *MSTN* 编辑湖羊和野生型湖羊胫腓肌为研究对象,转录组测序发现的差异表达基因除了富集在前人已鉴定的 AMPK 信号通路外,还显著富集在 FOXO 信号通路、氧化磷酸化、果糖和甘露糖代谢、生热作用等通路,差异表达基因并未显著富集到 Smad 信号通路,这可能与选择的试验羊的生长阶段有关,因为有研究显示 SMAD 家族在湖羊不同发育阶段和不同组织中与 *MSTN* 表达的相关性不同<sup>[28]</sup>。

AMPK 信号通路是细胞发育过程中重要的调控通路,通过细胞增殖、分化、能量等途径影响肌肉发育

和代谢<sup>[29]</sup>。对不同生长发育阶段藏猪背最长肌的转录组测序发现,差异表达基因主要富集在 AMPK、PI3K-AKT 等与生长和发育相关的通路中<sup>[30]</sup>,AMPK 信号通路还参与调控山羊骨骼肌的发育<sup>[31]</sup>,以及 T3 诱导的大鼠心肌细胞的生长<sup>[32]</sup>。本研究也发现 AMPK 信号通路参与 *MSTN* 编辑湖羊肌肉生长发育的调控,与前人的研究结果一致。有研究表明,FOXO 转录因子参与调控心肌细胞增殖和心肌生长<sup>[33]</sup>,FOXO1 和 FOXO3 通过 SIRT1 参与调控肌肉萎缩和生长<sup>[34]</sup>。本研究发现 FOXO 信号通路参与调控 *MSTN* 编辑湖羊胫腓肌的生长和发育,可能有类似的机制。

*MSTN* 编辑湖羊与野生型湖羊间差异表达基因显著富集的糖代谢途径、氧化磷酸化途径和产热等通路均与动物代谢息息相关<sup>[35-36]</sup>。有研究发现,在同等条件下动物代谢速率与动物的发育速率成正比,低代谢速率通过下调蛋白合成速率而降低动物的发育速率<sup>[37]</sup>。Chen 等<sup>[38]</sup>研究发现,果糖和甘露糖代谢途径参与脂质和碳水化合物代谢的调节,进而调控肉鸡的生长;商鹏<sup>[39]</sup>研究发现氧化磷酸化通路可能通过调控慢生长、体型偏小的藏猪和快生长、体型正常的大约克猪的代谢从而调控细胞的增殖与分化;在肉牛中检测到适应性产热途径通过 *PPARGC1A*、*MAP2K6* 和 *UCP2* 基因调控肉牛的体重、背部脂肪厚等胴体表型<sup>[40]</sup>,且产热通路参与服用抗精神病药物后动物体重增加的调控<sup>[41]</sup>。本研究通过转录组测序发现,*MSTN* 基因可能通过影响与动物代谢相关的氧化磷酸化、果糖和甘露糖代谢、产热作用等通路参与调控 *MSTN* 编辑羊肌肉的生长发育。

综上,本研究在验证湖羊 *MSTN* 基因编辑位点的基础上,以野生型湖羊和 *MSTN* 编辑湖羊胫腓肌为对象,开展了转录组测序分析,发现差异表达基因除了显著富集到 AMPK 和 FOXO 信号通路外,还显著富集到氧化磷酸化、果糖和甘露糖代谢、生热作用等与动物代谢相关的信号通路,研究结果为解析 *MSTN* 调控动物生长发育提供新的视角。

#### 参考文献 References:

- [1] Chen M M,Zhao Y P,Zhao Y, et al. Regulation of myostatin on the growth and development of skeletal muscle [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*,2021,9:785712.
- [2] Kambadur R,Sharma M,Smith T P, et al. Mutations in myostatin(GDF8)in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle[J]. *Genome Research*,1997,7(9):910-916.
- [3] McPherron A C,Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member[J]. *Nature*,1997,387(6628):83-90.
- [4] 罗琪. CRISPR 技术介导的 TBXT 和 FecB 基因编辑滩羊的制备[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2022.  
Luo Q. Preparation of Tan sheep with TBXT and FecB gene editing mediated by CRISPR technology[D]. Yangling:Northwest A&F University, 2022(in Chinese with English abstract).
- [5] Wang X,Niu Y,Zhou J, et al. CRISPR/Cas9-mediated *MSTN* disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass[J]. *Animal Genetics*,2018,49(1):43-51.
- [6] Zhou W J,Wan Y J,Guo R H, et al. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9[J]. *PLoS One*,2017,12(10):e0186056.
- [7] Song Y N,Xu Y X,Deng J C, et al. CRISPR/Cas9-mediated mutation of tyrosinase(Tyr)3'UTR induce graying in rabbit[J]. *Scientific Reports*, 2017,7:1569.
- [8] Zhu X X,Zhan Q M,Wei Y Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated *MSTN* disruption accelerates the growth of Chinese *Bama* pigs[J]. *Reproduction in Domestic Animals*,2020,55(10):1314-1327.
- [9] Zhao Y F,Yang L,Su G H, et al. Growth traits and sperm proteomics analysis of myostatin gene-edited Chinese yellow cattle[J]. *Life*,2022, 12(5):627.
- [10] Lv Q Y,Yuan L,Deng J C, et al. Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR/Cas9[J]. *Scientific Reports*,2016,6:25029.
- [11] Gao L,Yang M M,Wei Z Y, et al. *MSTN* mutant promotes myogenic differentiation by increasing demethylase *TET1* expression via the SMAD2/SMAD3 pathway[J]. *International Journal of Biological Sciences*,2020,16(8):1324-1334.
- [12] Yang W,Chen Y,Zhang Y, et al. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression[J]. *Cancer Research*,2006,66(3):1320-1326.
- [13] 朱琳,谷明娟,王丽娜,等. Myostatin 基因编辑牛骨骼肌组织学结构与转录组分析[J]. *农业生物技术学报*,2020,30(10):1903-1912.  
Zhu L,Gu M J,Wang L N, et al. Histological structure and transcriptome analysis of skeletal muscle in myostatin gene editing cattle(*Bos taurus*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*,2022,30(10):1903-1912(in Chinese with English abstract).
- [14] Matsakas A,Diel P. The growth factor myostatin,a key regulator in skeletal muscle growth and homeostasis[J]. *International Journal of Sports Medicine*,2005,26(2):83-89.
- [15] Bass J,Oldham J,Sharma M, et al. Growth factors controlling muscle development[J]. *Domestic Animal Endocrinology*,1999,17(2/3):191-197.
- [16] 罗婷,刘军,周云飞,等. Myostatin 基因敲除对哺乳期幼鼠骨骼肌生长的影响[J]. *第三军医大学学报*,2017,39(5):401-406.

- Luo T, Liu J, Zhou Y F, et al. Effect of myostatin knockout on skeletal muscle growth in mice[J]. Journal of Third Military Medical University, 2017, 39(5): 401-406 (in Chinese with English abstract).
- [17] 朱菲菲, 张俊星, 张林林, 等. 干扰 MSTN 对牛骨骼肌卫星细胞增殖分化的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(2): 479-487.  
Zhu F F, Zhang J X, Zhang L L, et al. Effect of interfering with MSTN on the proliferation and differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(2): 479-487 (in Chinese with English abstract).
- [18] Zhang Y N, Wang Y J, Bi Y L, et al. CRISPR/Cas9-mediated sheep *MSTN* gene knockout and promote sSMCs differentiation[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2019, 120(2): 1794-1806.
- [19] Niu Y Y, Ding Y, Wang X L, et al. Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 system in sheep[J]. Bio-protocol, 2017, 7(13): e2385.
- [20] 蒙亚琦, 姚旭东, 任秀美奥, 等. 利用 CRISPR/Cas9n 系统编辑绵羊成纤维细胞生长因子 5 (*FGF5*) 基因[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(1): 8-15.  
Meng Y Q, Yao X D, Ren X, et al. Editing the *FGF5* gene in the fibroblasts of *Ovis aries* using the CRISPR/Cas9n system[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 54(1): 8-15 (in Chinese with English abstract).
- [21] Crispo M, Mulet A P, Tesson L, et al. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136690.
- [22] He Z Y, Zhang T, Jiang L, et al. Use of CRISPR/Cas9 technology efficiently targeted goat myostatin through zygotes microinjection resulting in double-muscling phenotype in goats[J]. Bioscience Reports, 2018, 38(6): BSR20180742.
- [23] 盛辉, 郭益文, 张林林, 等. MSTN 基因对牛肌动蛋白细胞骨架调节通路的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(10): 3554-3564.  
Sheng H, Guo Y W, Zhang L L, et al. Effect of *MSTN* gene on actin cytoskeleton regulatory pathway[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(10): 3554-3564 (in Chinese with English abstract).
- [24] 高丽, 谷明娟, 杨苗苗, 等. MSTN 基因突变通过 SMAD2/SMAD3-CDKN1C 调控牛肌肉卫星细胞增殖分化[J]. 农业生物技术学报, 2022, 30(6): 1128-1139.  
Gao L, Gu M J, Yang M M, et al. MSTN mutation regulates proliferation and differentiation of bovine (*Bos taurus*) muscle-derived satellite cells through SMAD2/SMAD3-CDKN1C[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2022, 30(6): 1128-1139 (in Chinese with English abstract).
- [25] Zhu L, Wang X Q, Wei Z Y, et al. Myostatin deficiency enhances antioxidant capacity of bovine muscle via the SMAD-AMPK-G6PD pathway[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2022, 2022: 3497644.
- [26] 闫允君, 卢霞, 孟宪红, 等. 基于转录组分析对中国对虾 Myostatin 基因调控的肌肉生长相关基因的筛选[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 55-63.  
Yan Y J, Lu X, Meng X H, et al. Screening of genes related to muscle growth under the myostatin regulation by RNA-seq in *Penaeus chinensis*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 55-63 (in Chinese with English abstract).
- [27] Xu K, Zhou H, Han C X, et al. Transcriptomic analysis of *MSTN* knockout in the early differentiation of chicken fetal myoblasts[J]. Genes, 2021, 13(1): 58.
- [28] Wang Q Z, Su R, Lv X Y, et al. Analysis of the spatiotemporal expression of major genes in the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway and correlation analysis using Hu sheep muscle tissue[J]. Genetics and Molecular Research, 2016, 15(2): 8133.
- [29] Thomson D M. The role of AMPK in the regulation of skeletal muscle size, hypertrophy, and regeneration[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(10): 3125.
- [30] Wang Y P, Wang J Y, Hu H M, et al. Dynamic transcriptome profiles of postnatal porcine skeletal muscle growth and development[J]. BMC Genomic Data, 2021, 22(1): 32.
- [31] Zhan S Y, Zhao W, Song T Z, et al. Dynamic transcriptomic analysis in hircine longissimus dorsi muscle from fetal to neonatal development stages[J]. Functional & Integrative Genomics, 2018, 18(1): 43-54.
- [32] Takano A P C, Diniz G P, Barreto-Chaves M L M. AMPK signaling pathway is rapidly activated by T3 and regulates the cardiomyocyte growth[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2013, 376(1/2): 43-50.
- [33] Evans-Anderson H J, Alfieri C M, Yutzy K E. Regulation of cardiomyocyte proliferation and myocardial growth during development by FOXO transcription factors[J]. Circulation Research, 2008, 102(6): 686-694.
- [34] Lee D, Goldberg A L. SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(42): 30515-30526.
- [35] Franko K L, Forhead A J, Fowden A L. Differential effects of prenatal stress and glucocorticoid administration on postnatal growth and glucose metabolism in rats[J]. The Journal of Endocrinology, 2010, 204(3): 319-329.
- [36] Vander Heiden M G, Cantley L C, Thompson C B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation[J]. Science, 2009, 324(5930): 1029-1033.
- [37] Diaz-Cuadros M, Miettinen T P, Skinner O S, et al. Metabolic regulation of species-specific developmental rates[J]. Nature, 2023, 613: 550-557.
- [38] Chen C W, Li J, Li Z X. Sustained injection of miR-499-5p alters the gastrocnemius muscle metabolome in broiler chickens[J]. Archives Animal Breeding, 2022, 65(3): 275-284.
- [39] 商鹏. 基于胚胎肌肉组织转录组和蛋白质组数据鉴定猪生长性状相关基因[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.  
Shang P. Identification of candidate genes on growth traits intergrating transcriptome and proteome of embryonic muscle in pigs[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [40] Ryu J, Kim Y, Kim C, et al. Association of bovine carcass phenotypes with genes in an adaptive thermogenesis pathway[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(2): 1441-1445.
- [41] Stefanidis A, Verty A N A, Allen A M, et al. The role of thermogenesis in antipsychotic drug-induced weight gain[J]. Obesity, 2009, 17(1): 16-24.