

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

单艳菊 宋迟 束婧婷 刘宏祥 徐文娟 陶志云 胡艳 李慧芳*

江苏省家禽科学研究所 家禽遗传育种重点实验室,扬州 225125

* 通讯作者, lhxf_002@aliyun.com

摘要 钙调磷酸酶催化亚基 A (protein phosphatase 3 catalytic A, PPP3CA) 是 PPP3C 在骨骼肌中的主要亚型, 在肌纤维分化中起重要作用。为研究 *PPP3CA* 基因在不同品种鸭 (*Anas platyrhynchos domestica*) 发育早期肌肉中的表达规律及其与肌纤维特性的相关性, 本研究选用生长速度差异较大的金定鸭和高邮鸭, 采用实时荧光定量 PCR 检测鸭 13、17、21、25 和 27 胚龄及 7 日龄胸肌和腿肌中 *PPP3CA* mRNA 的表达水平。结果表明, 两鸭种同一肌肉组织中 *PPP3CA* mRNA 的表达表现出显著的时间特异性, 而品种和性别效应并不显著。两鸭品种胸肌和腿肌中 *PPP3CA* mRNA 的表达模式虽不同, 但均是在 13 胚龄 (13 embryonic day, E13 d) 时最高, 且在出雏后 7 日龄时极显著高于 27 胚龄 (出雏前) ($P < 0.01$)。胸肌中 *PPP3CA* mRNA 在 21 胚龄时显著低于其他各胚龄或日龄 ($P < 0.01$); 腿肌中 *PPP3CA* mRNA 在 21 胚龄时表达量较高, 27 胚龄时降到最低, 且极显著低于其他各胚龄或日龄 ($P < 0.01$)。相关性分析结果显示, 两鸭品种腿肌 *PPP3CA* mRNA 表达量与本研究前期检测的肌纤维类型、直径、面积和密度等肌纤维特性呈现不同程度的线性相关; 两鸭品种胸肌和腿肌 *PPP3CA* mRNA 表达量与均与本研究前期检测的类胰岛素生长因子 (insulin-like growth factor- I, *IGF- I*) mRNA 表达量呈显著的正相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。初步推测鸭发育早期骨骼肌中 PPP3 与肌纤维类型和肌纤维生长发育密切相关, 与 *IGF- I* 可能共同参与了骨骼肌生长发育的调节。本研究结果将有助于了解 PPP3 在鸭肌肉早期发育中的作用, 并为改良鸭肉品质提供理论依据。

关键词 鸭, 钙调磷酸酶催化亚基 A 基因 (*PPP3CA*), 肌肉, 表达, 相关性

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

SHAN Yan-Ju SONG Chi SHU Jing-Ting LIU Hong-Xiang XU Wen-Juan TAO Zhi-Yun HU Yan LI Hui-Fang*

Key Laboratory of Poultry Heredity & Breeding, Jiangsu Institute of Poultry Sciences, Yangzhou 225125, China

* Corresponding author, lhxf_002@aliyun.com

Abstract Protein phosphatase 3 catalytic A (PPP3CA) is a major isozyme of PPP3C in skeletal muscle and plays an important role in myofiber differentiation. In the present study, expression of *PPP3CA* mRNA was quantified by absolute quantitative RT-PCR in the pectorale and leg muscle tissues from Jinding ducks and Gaoyou ducks (*Anas platyrhynchos domestica*) differing in growth rates on days 13, 17, 21, 25, 27 of

embryonic development and 7 days post-hatching (PH). The results showed that there was a significant variation with the age of ducks in the *PPP3CA* mRNA expression profile of the same muscle tissue in 2 duck breeds, but there was no significant breed and sex effect. In both pectoral and leg muscles, the expression peak of *PPP3CA* mRNA appeared at 13 embryonic day (E13 d) and the *PPP3CA* mRNA expression level at 7 d PH was very significantly higher than that at E27 d (before hatching) ($P < 0.01$). In pectoral muscles, the expression of *PPP3CA* mRNA was firstly declined from E13 d to E21 d, then increased from E21 d to 7 d PH, and the lowest point appeared at E21 d which was very significantly lower than that at other embryonic age or day-old ($P < 0.01$). In leg muscles, the expression of *PPP3CA* mRNA was significantly declined from E13 d to E17 d, then significantly increased to E21 d, then decreased gradually to E27 d, and finally increased to 7 d PH; the lowest point appeared at E27 d which was very significantly lower than that at other embryonic ages or day-old ($P < 0.01$), and the expression level was not significantly different among E17 d, E25 d and 7 d PH ($P > 0.05$). The correlation analysis showed that varying degrees of linear correlation were found between the expression of *PPP3CA* mRNA in leg muscles and myofiber types, diameter, cross-sectional area and density the data were detected in former studies in 2 duck breeds; the expression levels of *PPP3CA* mRNA in pectoral and leg muscles of 2 duck breeds were significantly positively correlated with *IGF- I* mRNA expression which was detected by us in former studies ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). These results suggested that PPP3 might have potential functions in controlling myofiber phenotype and development during embryonic and early post-hatch development in ducks and there was a synergistic effect between PPP3 and *IGF- I* which might be involved in the regulation of growth development of duck skeletal muscle. The above results provide some valuable clues for understanding the role of PPP3 in the early development of muscles in ducks and a theoretical basis for improving the meat quality in ducks.

Keywords Duck, Protein phosphatase 3 catalytic A gene (*PPP3CA*), Muscle, Expression, Correlation

蛋白磷酸酶 3 (protein phosphatase 3, PPP3) 又称钙调磷酸酶 (calcineurin, CaN), 是迄今发现的唯一受 Ca^{2+} /钙调素 (calmodulin, CaM) 调节的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶, 广泛存在于真核生物的多种细胞中, 在 Ca^{2+} /CaN/NFAT 信号通路介导的细胞应答中起关键作用 (Rusnak, Mertz, 2000; 谷婧, 田丽军, 2011)。研究表明, 在哺乳动物中 PPP3 参与调节骨骼肌肌纤维分化、肥大及类型转换, 介导骨骼肌多种适应性变化, 如慢肌纤维的基因表达、肌小管分化、肌纤维生长和再生、卫星细胞的增殖与分化等 (Parson et al., 2003; Eizema et al., 2007; Mallinson et al., 2009; Horsley et al., 2001; Hudson et al., 2014); Mitchell 等 (2002) 用 PPP3 特异性抑制剂环孢菌素 A (cyclosporin A, CsA) 对小鼠 (*Mus musculus*) 不同部位骨骼肌作用的研究表明, PPP3 调节多种表型骨骼肌的生长, 且其调节的机制依赖于骨骼肌的表型和肌纤维的生长阶段。Talmadge 等 (2004) 通过对能高表达 PPP3 活性区域的转基因小鼠和野生型小鼠不同部位肌肉的肌纤维类型比例、肌肉质量以及肌纤维横

截面积的比较, 得出了和 Mitchell 等 (2002) 同样的结论。另外, Alfieri 等 (2007) 和 Valdés 等 (2013) 分别用小鼠和大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的成肌细胞证实, PPP3 与影响成肌细胞生长的另一重要信号分子-类胰岛素生长因子 (insulin-like growth factor- I, *IGF- I*) 相互作用, 共同调节肌纤维分化与肥大。

PPP3 是由一个催化亚单位 PPP3C 和一个调节亚单位 PPP3R 组成的异源二聚体, 在脊椎动物中, *PPP3C* 基因有 *PPP3CA*、*PPP3CB* 和 *PPP3CC* 3 种亚型, *PPP3R* 基因有 *PPP3R1* 和 *PPP3R2* 2 种亚型, 但只有 *PPP3CA*、*PPP3CB* 和 *PPP3R1* 主要在骨骼肌中表达 (Hudson, Price, 2013; 王建华, 2010; Parsons et al., 2004, 2003); 用蛋白质印迹法分析小鼠不同类型骨骼肌中 PPP3CA 和 PPP3CB 的含量, 结果表明, PPP3CA 是所有类型骨骼肌的主要催化亚基 (Parsons et al., 2003)。在人 (*Homo sapiens*)、大鼠、小鼠和猪 (*Sus scrofa*) 等哺乳动物中已发现的 *PPP3CA* 基因有 $\text{CaNA}\alpha 1$ 和 $\text{CaNA}\alpha 2$ 两个转录本, 其中 $\text{CaNA}\alpha 2$ 比 $\text{CaNA}\alpha 1$ 少 10 个氨基酸, 缺失的氨基酸位置靠近羧基端, 位于 CaM 结

合区和自抑区 (autoinhibitory, AI) 之间, 但关于这两个转录本的具体功能还未阐明 (Rusnak, Mertz, 2000; Depreux et al., 2010)。对 PPP3CA 的研究在禽类要比哺乳动物滞后很多。Liberatore 和 Yutzey (2004) 对鸡 PPP3CA 的研究表明, 在鸡胚胎早期 PPP3CA 基因只有一个转录本, 其氨基酸序列与哺乳动物 CaNA α 2 的氨基酸序列同源性 100%。到目前为止尚未见有关鸭 (*Anas platyrhynchos domestica*) PPP3CA 的研究。

胚胎期是动物生长发育的重要阶段, 在胚胎晚期大部分脊椎动物的肌纤维数目已经固定下来; 而肌纤维类型却不是固定不变的, 在生长发育过程中, 年龄、营养的变化以及外界的刺激等都会引起肌纤维类型相应的改变。金定鸭和高邮鸭是中国著名的两个地方鸭品种, 其生长速度相差较大, 是研究地方鸭肌肉生长发育的理想实验模型 (朱春红等, 2013; 胡艳等, 2013)。禽类胸肌和腿肌分别由不同肌纤维类型组成, 腿肌主要由慢肌纤维构成, 而胸肌主要由快肌纤维构成, 这两种肌纤维在蛋白构成、生理特点和口味等方面都不相同 (Li et al., 2009; Li et al., 2010)。慢肌纤维又叫红肌纤维、I 型纤维、氧化型纤维, 直径较细, 含有更多的线粒体和肌红蛋白, 收缩缓慢而持久, 含慢性纤维较多的肌肉嫩度高、口感好; 快肌纤维分为快红肌纤维 (II a 型纤维、快速氧化型纤维) 和快白肌纤维 (II b 型纤维、快速酵解型纤维), 主要进行酵解代谢, 收缩速度快, 持续时间短, 含快白肌纤维较多的肌肉肉色苍白, 肉质粗糙 (Li et al., 2009; 单艳菊等, 2014)。Li 等 (2010) 对胚胎期和初生早期北京鸭胸肌和腿肌发育特点研究表明, 胚胎期胸肌的发育要晚于腿肌。本研究首次研究了 PPP3CA mRNA 在不同地方品种鸭发育早期肌肉中的表达规律, 并分析其与肌纤维特性的相关性, 为研究 PPP3 在鸭肌肉早期发育中的作用以及改良鸭肉品质提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

金定鸭和高邮鸭 (*Anas platyrhynchos domestica*) 的种蛋由江苏省高邮鸭集团提供。将两鸭种种蛋称重、编号和消毒后置入同一孵化箱孵化, 品种内蛋质量变异系数 $\leq 2\%$, 入孵 24 h 时设为 1 胚龄

(1 embryonic day, E1 d), 其他胚龄依此类推。出雏后, 两鸭种雏鸭饲养于同一鸭舍, 饲喂相同的饲料至 7 日龄 (7 day)。分别在 13、17、21、25、27 胚龄和出雏后 7 日龄时采集两个品种鸭胸肌和腿肌样品, 置于液氮速冻后转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 鸭解剖后鉴定其性别, 每个时间点各品种均采集 16 只, 公母各半。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的制备

按 TRNzol-A+ 总 RNA 提取试剂 (DP421, TIANGEN) 的说明书提取胸肌和腿肌总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和完整性后, 核酸含量测定仪测定浓度。按照反转录试剂盒 (KR103-04, TIANGEN) 说明书进行 cDNA 第一链的合成, 每个样品取 $2\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA。持家基因 β -肌动蛋白 (β -actin, ACTB) 检测 cDNA 第一链的合成质量。反转录产物 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 引物设计和标准品制备

由于 GenBank 中尚未有鸭 PPP3CA 基因的参考序列, 因此, 本研究以鸡 (*Gallus gallus*) PPP3CA mRNA 序列 (GenBank 登录号: XM_420664) 为靶序列, 用 BioEdit 软件 7.0 对鸭的 cDNA 文库进行本地 BLAS, 推测 ENSAPLT0000003884 ENSAP-LG0000003728 scaffold1751: 338195-396260 1 为鸭 PPP3CA 基因的 cDNA 序列, 与其他物种 PPP3CA 基因序列比对后, 证实该序列为鸭 PPP3CA 基因的 cDNA 序列, 以此序列为参考序列设计引物, 引物序列为:

Forward: 5'-CGAATGCCTCCACGCAGA-3';

Reverse: 5'-TGCTGCTATTACTGCCGTTG-3'。

扩增片段预计长度为 109 bp, 引物由生工生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增体系为: Master Mix $12.5\text{ }\mu\text{L}$, 上下游引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 各 $0.8\text{ }\mu\text{L}$, cDNA 模板 $2\text{ }\mu\text{L}$, 加水至总体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 32 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。琼脂糖凝胶鉴定 PCR 产物, 用 DNA 产物纯化回收试剂盒 (DP204-02, TIANGEN) 纯化回收目的片段, 将其与 pGM-T 载体连接、转化, 挑选阳性转化子送生工生物工程技术有限公司进行测序。质粒小提试剂盒 (DP103-02, TIANGEN) 提取

测序正确的克隆质粒,核酸含量测定仪测定浓度后,将其做 10 的倍数系列稀释,作为标准品备用。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

qRT-PCR 采用 SuperReal PreMix 试剂盒(SYBR Green, TIANGEN),引物同普通 PCR 的引物。将每个待测样品取等量混合后,以混合池为模板优化 qRT-PCR 的退火温度、引物浓度和模板浓度等条件,确保 qRT-PCR 扩增效率接近 100%,曲线拟合度 R^2 接近 1。PCR 扩增体系: SuperReal PreMix(2×)10 μ L, Rox Reference Dye(50×) 0.4 μ L, 上下游引物(10 μ mol/L)各 0.8 μ L, cDNA 模板 2 μ L,加水至总体积为 20 μ L。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 进行溶解曲线分析。将 1.2.2 节制备的标准品做 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 和 10^9 系列稀释后和待测样品按照优化的条件同时进行 qRT-PCR,每个样品设置 3 个重复,每次反应均设用水替代模板的阴性对照,根据系统软件自动分析获得的标准曲线计算出待测样品目的基因的拷贝数(单艳菊等, 2012, 2013)。

1.3 统计分析

运用 SPSS 20.0 软件中 One-way anova 和 Univariate 分析日龄、性别、品种等对鸭肌肉组织中 *PPP3CA* mRNA 表达的影响,用 Bivariate Correlation 分析鸭肌肉组织中 *PPP3CA* mRNA 表达和肌纤维性状、肌肉 *IGF- I* mRNA 表达的相关性。用平均值 \pm 标准误表示所有数据, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 标准品的制备

PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。PCR 扩增产物条带特异,片段大小与预计片段长度 109 bp 相符。将 PCR 鉴定正确的阳性转化子送生工生物工程技术服务有限公司测序,测序结果与从鸭 cDNA 文库中推测为鸭 *PPP3CA* 基因的序列同源率为 100%,表明标准品构建成功。

2.2 鸭发育早期胸肌组织中 *PPP3CA* mRNA 的表达

多因素方差分析结果表明,胸肌 *PPP3CA*

mRNA 在两个品种鸭中均没有显著的性别差异,所以将每个品种鸭的公母联合在一起进行表达量差异分析,结果见图 2。从 13 胚龄到 7 日龄,两个品种鸭胸肌组织 *PPP3CA* mRNA 的表达均呈先降后升的趋势,即在 13 胚龄时最高,17 胚龄时显著下降 ($P < 0.05$), 21 胚龄时极显著下降至最低水平后 ($P < 0.01$), 25 胚龄时又开始逐渐上升,出雏后 7 日龄时已上升到较高水平,极显著高于 27 胚龄(出雏前) ($P < 0.01$)。品种间比较发现,同一胚龄或日龄时均是金定鸭高于高邮鸭,但差异均没达到显著水平 ($P > 0.05$)。

2.3 鸭发育早期腿肌组织 *PPP3CA* mRNA 的表达

多因素方差分析结果表明,腿肌 *PPP3CA* mRNA 在两个品种鸭中均没有显著的性别差异,所以将每个品种鸭的公母联合在一起进行表达量差异分析,结果见图 3。从 13 胚龄到 7 日龄,两个品种鸭腿肌组织 *PPP3CA* mRNA 表达均呈“降-升-降-升”趋势,即在 13 胚龄时最高,17 胚龄时快速下降到较低水平后,21 胚龄时极显著上升 ($P < 0.01$), 25 胚龄时又极显著下降 ($P < 0.01$), 27 胚龄时(出雏前)降至最低水平,出雏后 7 日龄时又极显著上升 ($P < 0.01$), 17、25 胚龄以及 7 日龄差异不显著 ($P > 0.05$)。品种间比较发现,高邮鸭在 13、21 和 25 胚龄时表达量略高于金定鸭,而在 17 胚龄、27 胚龄和 7 日龄时表达量则略低于金定鸭,但差异均不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 腿肌组织中 *PPP3CA* mRNA 表达量与其肌纤维性状关联分析

鸭发育早期 21、25、27 胚龄及 7 日龄腿肌 *PPP3CA* mRNA 的表达与其肌纤维性状的相关性

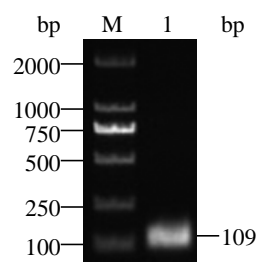


图 1 PCR 扩增 *PPP3CA* 基因

Figure 1 PCR products of *PPP3CA* gene

M: DL2000; 1: PCR 产物

M: DL2000; 1: PCR products

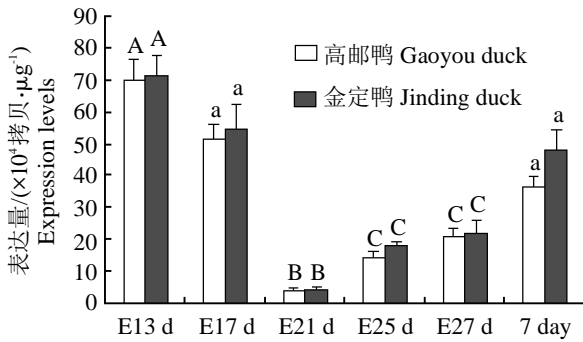


图2 PPP3CA mRNA在金定鸭和高邮鸭胸肌中的发育性变化

Figure 2 The expression of PPP3CA mRNA in pectoral muscles of Jinding ducks and Gaoyou ducks during early development

E13 d~E27 d: 分别为13~27 胚龄; 7 d: 7 日龄。品种内胚龄间相同字母表示差异不显著($P>0.05$), 大小写字母表示差异显著($P<0.05$), 不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。下同

E13 d~E27 d: 13~27 embryonic day, respectively; 7 d: 7 days post-hatching. In the same breed, values with the same letters have no significant difference between different embryo ages ($P>0.05$), values with uppercase and lowercase are significant different at $P<0.05$, and values with different upperletters are very significant different at $P<0.01$. The same below

分析结果见表1。两个品种鸭腿肌 PPP3CA mRNA 的表达与快白肌纤维(II b 型)比例呈正相关, 而与慢肌纤维(I 型)以及中间型(II a 型)纤维比例均呈负相关, 高邮鸭除腿肌中 PPP3CA mRNA 的表达与 II b 型比例呈极显著水平外($P<0.01$), 其他均未达到显著水平。两个品种鸭腿肌 PPP3CA mRNA 的表达与肌纤维密度呈正相关, 但均未达到显著水平; 而与肌纤维直径和肌纤维横截面积呈负相关, 且在金定鸭中分别达到了极显著水平($P<0.01$)和

表1 PPP3CA mRNA在腿肌发育早期与肌纤维性状的相关系数

Table 1 Correlation coefficient between PPP3CA mRNA expression and myofiber traits during early development in leg muscles

| 品种 Breeds | 肌纤维类型 Fiber-type | | | 肌纤维直径 Diameter of myofiber | 肌纤维横切面积 Cross-section area of myofiber | 肌纤维密度 Density of myofiber |
|------------------|---------------------|--------|---------|-------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------|
| | I | II a | II b | | | |
| 高邮鸭 Gaoyou duck | -0.268 | -0.277 | 0.522** | -0.347 | -0.362 | 0.377 |
| 金定鸭 Jinding duck | -0.315 | -0.229 | 0.373 | -0.532** | -0.415* | 0.328 |

I : 慢肌纤维; II a: 中间型纤维; II b: 快白肌纤维。*: 显著相关($P<0.05$), **: 极显著相关($P<0.01$), 下同

I : Slow myofiber; II a: Intermediate myofiber; II b: Fast white myofiber. * : Significant correlation ($P<0.05$), **: Very significant correlation ($P<0.01$), the same below

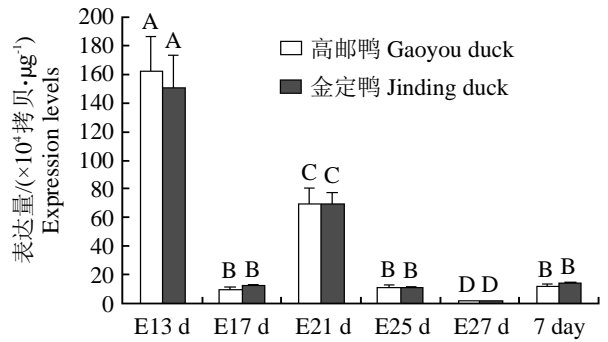


图3 PPP3CA mRNA在金定鸭和高邮鸭腿肌中的发育性变化

Figure 3 The expression of PPP3CA mRNA in leg muscles of Jinding ducks and Gaoyou ducks during early development

显著水平($P<0.05$)。

2.5 鸭发育早期肌肉组织中 PPP3CA 与 IGF- I mRNA 表达量的相关性

两个品种鸭发育早期肌肉组织中 PPP3CA 与 IGF- I mRNA 表达量的相关性分析结果见表2。高邮鸭胸肌、腿肌 PPP3CA mRNA 表达量均与其 IGF- I mRNA 表达量呈极显著正相关($P<0.01$); 金定鸭胸肌 PPP3CA mRNA 表达量与其 IGF- I mRNA 表达量呈显著正相关($P<0.05$), 腿肌 PPP3CA mRNA 表达量与其 IGF- I mRNA 表达量呈极显著正相关($P<0.01$)。胸肌和腿肌中 PPP3CA 与 IGF-I mRNA 的相关性均是高邮鸭高于金定鸭。

3 讨论

Ca²⁺/CaN/NFAT 信号通路在肌肉生长发育中起着非常重要的作用, 作为该信号通路中的重要一员, PPP3 在调控骨骼肌肌纤维的大小及肌纤维类

表 2 鸭发育早期肌肉组织中 *PPP3CA* 与 *IGF- I* mRNA 表达量的相关系数

Table 2 Correlation coefficient between expression level of *PPP3CA* and *IGF- I* mRNA in pectoral and leg muscles of two duck breeds during early development

| 品种 Breeds | 胸肌 Pectoral muscles | 腿肌 Leg muscles |
|------------------|---------------------|----------------|
| 高邮鸭 Gaoyou duck | 0.331** | 0.894** |
| 金定鸭 Jinding duck | 0.257* | 0.805** |

型分子机制中的作用已成为研究热点,但对 PPP3 如何调控胚胎期肌纤维发育的研究还比较少。Oh 等(2005)以在肌肉特异性过表达 PPP3 抑制剂的转基因小鼠为实验模型研究 PPP3 在慢肌纤维中的作用,结果表明,慢肌纤维在成年期的表型维持需要 PPP3 的参与,但其在胚胎期的发育却不依赖于 PPP3 的活性。de Jonge 等(2006)用免疫荧光技术分析猪胚胎后期和出生时半腱肌 PPP3 蛋白表达规律,结果表明,虽然胚胎期 PPP3 的分布没有肌纤维类型特异性,但出生时 PPP3 的表达明显比胚胎期增多,推测胚胎期 PPP3 活性可能仅起着维持肌肉钙离子动态平衡的作用,出生后才参与肌纤维分化。本研究结果表明, *PPP3CA* mRNA 在金定鸭和高邮鸭同一肌肉组织中表达规律一致,同一胚龄或日龄时两个品种鸭比较,胸肌和腿肌中均没有显著差异。这与本研究前期比较两鸭种胚胎期和出雏早期腿肌的肌纤维平均直径、平均面积、密度及不同肌纤维类型比例等肌纤维特性均没有显著的品种差异结果相符(单艳菊, 2014)。本研究发现,两个品种鸭胸肌和腿肌中 *PPP3CA* mRNA 的表达模式虽不同,但均是在 13 胚龄时最高,出雏后 7 日龄的表达水平极显著高于 27 胚龄(出雏前)($P < 0.05$),这与本研究前期检测 *IGF- I* mRNA 在这两鸭种的胸肌和腿肌中发育性变化的结果相似(单艳菊等, 2013)。本研究进一步分析了胚胎期和出雏早期胸肌、腿肌组织中 *PPP3CA* 与 *IGF- I* mRNA 表达量的相关性,结果表明,两个品种鸭胸肌、腿肌 *PPP3CA* mRNA 表达量均与其 *IGF- I* mRNA 表达量呈显著正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示,在鸭发育早期肌肉中 PPP3 与 *IGF- I* 存在协同效应,两者可能共同参与了对肌肉生长发育的调节。

已有的研究表明, PPP3 在维持和诱导慢肌纤维(I 型)表型中起着重要作用(Oh et al., 2005; Alfieri et al., 2007; Mallinson et al., 2009; Talmadge et

al., 2004)。本研究结果表明,两个品种鸭腿肌 *PPP3CA* mRNA 的表达均与肌纤维直径和面积存在负相关,与肌纤维密度存在正相关,这与慢肌纤维(I 型)相对于快肌纤维(II 型)具有直径小、面积小、密度大等特点相符。两个品种鸭腿肌 *PPP3CA* mRNA 的表达与肌纤维类型相关的分析结果表明, *PPP3CA* mRNA 的表达与快白肌纤维比例呈正相关,而与慢肌纤维以及中间型纤维比例均呈负相关,这与其他学者研究小鼠(Parsons et al., 2003; Mitchell et al., 2002)、猪(Depreux et al., 2010)和山羊(*Capra hircus*)(Wan et al., 2014)不同表型肌肉中 *PPP3CA* 含量的结果一致,即 *PPP3CA* 在不同肌肉部位中的表达水平不同,快肌 *PPP3CA* 的含量要高于慢肌,之所以出现这种现象, Mitchell 等(2002)认为肌肉中 PPP3 的活性还与 PPP3 的调节亚单位 PPP3R 含量有关。

4 结论

本研究采用 qRT-PCR 法首次检测了 *PPP3CA* mRNA 在鸭发育早期肌肉组织中的表达,并分析其与本研究前期检测的 *IGF- I* mRNA 表达量的相关性,另外还对两鸭种腿肌 *PPP3CA* mRNA 表达量与本研究前期检测的肌纤维类型、直径、面积和密度等肌纤维特性的相关性进行分析。结果提示,在鸭发育早期肌肉中 PPP3 与 *IGF- I* 存在协同效应,两者可能共同参与了对肌肉生长发育的调节。本研究结果将有助于了解 PPP3 在鸭肌肉早期发育中的作用,并为改良鸭肉品质提供理论依据。

参考文献

- 谷婧, 田丽军. 2011. 钙调神经磷酸酶在运动中的作用及调节[J]. 山西大同大学学报(自然科学版), 27(1): 55-57.
(Gu J, Tian L J. 2011. Role and regulation of calcineurin in exercise[J]. Journal of Shanxi Datong University (Natural Science), 27(1): 55-57.)
胡艳, 徐文娟, 刘宏祥, 等. 2013. 鸭发育早期下丘脑-垂体生长轴相关基因 mRNA 的表达特异性分析[J]. 中国农业科学, 46(17): 3712-3720. (Hu Y, Xu W J, Liu H X, et al. 2013. The profiles of related genes mRNA expression in duck hypothalamus-pituitary growth axis during early development[J]. Scientia Agricultura Sinica, 46(17): 3712-3720.)

- 单艳菊, 顾华兵, 宋卫涛, 等. 2013. 不同鸭种胚胎期和出雏早期肌肉组织中 *IGF- I* 基因 mRNA 的差异表达分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 41(3): 1-6. (Shan Y J, Gu H B, Song W T, et al. 2013. Expression analysis of *IGF- I* gene mRNA in muscles of different ducks at embryonic and neonatal periods[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 41(3): 1-6.)
- 单艳菊, 束婧婷, 胡艳, 等. 2014. 不同鸭种肌纤维早期发育特性及其与骨骼肌生长发育的相关性研究[J]. 农业生物技术学报, 22(2): 225-231. (Shan Y J, Shu J T, Hu Y, et al. 2014. Study on myofiber characteristics during early development stage and associations with skeletal growth and development in different duck breeds (*Anas platyrhynchos domestica*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 22(2): 225-231.)
- 单艳菊, 束婧婷, 徐文娟, 等. 2012. 不同鸭种胚胎期和出雏早期生长轴 *GH*、*GHR*、*IGF- I* 基因 mRNA 差异表达分析[J]. 农业生物技术学报, 21(4): 421-427. (Shan Y J, Shu J T, Xu W J, et al. 2012. The expression analysis of growth axis genes (*GH*, *GHR* and *IGF- I*) during embryonic and post-hatch development in different duck breeds[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 21(4): 421-427.)
- 王建华. 2010. 肌纤维类型转化通路 CaN/NFAT 相关基因的表达分析及 *CAML* 基因的分选鉴定[D]. 硕士学位论文, 华中农业大学, 导师: 雷明刚. (Wang J H. 2010. Expression analysis of genes involved in myofiber transformation pathway of CaN/NFAT and the isolation of *CAML* gene[D]. Thesis for M.S., Huangzhong Agricultural University, Supervisor: Lei M G.)
- 朱春红, 徐文娟, 胡艳, 等. 2013. 高邮鸭和金定鸭发育早期骨骼肌发育及胰岛素样生长因子 1 受体基因(*IGF- I R*)表达分析[J]. 农业生物技术学报, 21(2): 192-198. (Zhu C H, Xu W J, Hu Y, et al. 2013. Early development and developmental expression of insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF- I R*) mRNA in Gaoyou duck and Jinding duck (*Anas platyrhynchos domestica*) skeletal muscle[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 21(2): 192-198.)
- Alfieri C M, Evans-Anderson H J, Yutzey K E. 2007. Developmental regulation of the mouse *IGF- I* exon 1 promoter region by calcineurin activation of NFAT in skeletal muscle[J]. The American Journal of Physiology-Cell Physiology, 292(5): C1887-C1894.
- de Jonge H W, van der Wiel C W, Eizema K, et al. 2006. Presence of SERCA and calcineurin during fetal development of porcine skeletal muscle[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 54(6): 641-648.
- Depreux F F, Scheffler J M, Grant A L, et al. 2010. Molecular cloning and characterization of porcine calcineurin- α subunit expression in skeletal muscle[J]. Journal of Animal Science, 88(2): 562-571.
- Eizema K, van der Wal D E, van den Burg M M, et al. 2007. Differential expression of calcineurin and SR Ca^{2+} handling proteins in equine muscle fibers during early postnatal growth[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 55(3): 247-254.
- Horsley V, Friday B B, Matteson S, et al. 2001. Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway[J]. The Journal of Cell Biology, 153(2): 329-338.
- Hudson M B, Price S R. 2013. Calcineurin: A poorly understood regulator of muscle mass[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 45(10): 2173-2178.
- Hudson M B, Woodworth-Hobbs M E, Zheng B, et al. 2014. miR-23a is decreased during muscle atrophy by a mechanism that includes calcineurin signaling and exosome-mediated export[J]. The American Journal of Physiology-Cell Physiology, 306(6): C551-C558.
- Liberatore C M, Yutzey K E. 2004. Calcineurin signaling in avian cardiovascular development[J]. Developmental Dynamics, 229(2): 300-311.
- Li L, Liu H H, Xu F, et al. 2010. MyoD expression profile and developmental differences of leg and breast muscle in Peking duck (*Anas platyrhynchos domestica*) during embryonic to neonatal stages[J]. Micron, 41(7): 847-852.
- Li X, Yang X, Shan B, et al. 2009. Meat quality is associated with muscle metabolic status but not contractile myofiber type composition in premature pigs[J]. Meat Science, 81(1): 218-223.
- Mallinson J, Meissner J, Chang K C. 2009. Chapter 2. Calcineurin signaling and the slow oxidative skeletal muscle fiber type[J]. International Review of Cell and Molecular Biology, 277: 67-101.
- Mitchell P O, Mills S T, Pavlath G K. 2002. Calcineurin differentially regulates maintenance and growth of phenotypically distinct muscles[J]. The American Journal of Physiology-Cell Physiology, 282(5): C984-C992.
- Oh M, Rybkin I I, Copeland V, et al. 2005. Calcineurin is necessary for the maintenance but not embryonic develop-

- ment of slow muscle fibers[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 25(15): 6629-6938.
- Parsons S A, Millay D P, Wilkins B J, et al. 2004. Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload-induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25): 26192-26200.
- Parsons S A, Wilkins B J, Bueno O F, et al. 2003. Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin Aalpha and Abeta gene-targeted mice[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 23(12): 4331-4343.
- Rusnak F, Mertz P. 2000. Calcineurin: Form and function[J]. *Physiological Reviews*, 80(4): 1483-1521.
- Talmadge R J, Otis J S, Rittler M R, et al. 2004. Calcineurin activation influences muscle phenotype in a muscle-specific fashion[J]. *BioMed Central Cell Biology*, 5: 28.
- Valdés J A, Flores S, Fuentes E N, et al. 2013. IGF-1 induces IP3 - dependent calcium signal involved in the regulation of myostatin gene expression mediated by NFAT during myoblast differentiation[J]. *Journal of Cell Physiology*, 228(7): 1452-1463.
- Wan L, Ma J, Xu G, et al. 2014. Molecular cloning, structural analysis and tissue expression of protein phosphatase 3 catalytic subunit alpha isoform (*PPP3CA*) gene in Tianfu goat muscle[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2): 2346-2358.

(责任编辑 靳晓霞)