

不同海拔牦牛快肌、慢肌相关调控基因表达的比较

权君莲 周娟 张勤文*

青海大学农牧学院动物医学系 西宁 810016

摘要: 为了阐明不同海拔牦牛 (*Bos mutus*) 骨骼肌快肌和慢肌调控基因的表达特点及其低氧适应机制, 选取青海省化隆县 (海拔 1 900 m, 以下简称低海拔组)、海晏县 (海拔 3 200 m, 以下简称中海拔组) 及班玛县 (海拔 4 200 m, 以下简称高海拔组) 高原型牦牛作为研究对象, 以低海拔牦牛和低海拔黄牛 (*B. taurus*) 作为对照, 采用实时荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹技术分别检测不同海拔牦牛骨骼肌快肌和慢肌调控基因 mRNA 表达及蛋白含量的变化。结果表明: 随着海拔升高, 调控快肌表达的因子 MyoG mRNA 和 MYOG 蛋白的表达量逐渐增加; 调控慢肌表达的因子 MyoD mRNA 表现为先降低再升高, 而 MYOD 蛋白表达呈现先升高再降低的趋势; PGC-1 mRNA 和 PGC-1 蛋白表达量均逐渐升高 ($P < 0.05$)。以上结果说明, 不同海拔牦牛骨骼肌快肌和慢肌调控基因 MyoG、MyoD 及 PGC-1 的 mRNA 表达量可能与低氧环境有一定联系。为适应高原低氧环境, 高原型牦牛骨骼肌纤维类型及调控基因的表达会发生一定的变化。本研究为深入研究青海省不同海拔地区牦牛的低氧适应机制提供了基础数据。

关键词: 高原牦牛; 骨骼肌; 肌纤维类型; 低氧适应机制

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2024) 06-946-09

Comparison of Gene Expressions of Fast and Slow Skeletal Muscle-Related Regulatory Genes in Yaks at Different Altitudes

QUAN Jun-Lian ZHOU Juan ZHANG Qin-Wen*

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China

Abstract: [Objectives] This study aims to clarify the expression characteristics of genes regulating fast and slow skeletal muscles of Yak *Bos mutus* at different altitudes and their adaptive mechanisms to hypoxia. **[Methods]** The Yaks were selected from Hualong County (1 900 m above sea level, hereinafter referred to as the low altitude group), Haiyan County (3 200 m above sea level, hereinafter referred to as the middle-altitude group) and Banma County (4 200 m above sea level, hereinafter referred to as the high-altitude group), Qinghai, China, with the low-altitude Yak and Cattle *B. taurus* were taken as the control. Real-time quantitative PCR and Western blotting technology were used to detect changes in mRNA expression and

基金项目 青海省自然科学基金项目 (No. 2023-ZJ-722);

* 通讯作者, E-mail: 82321200@qq.com;

第一作者介绍 权君莲, 女, 硕士研究生; 研究方向: 高原家畜形态学结构特点与高原环境的关系; E-mail: 2685770382@qq.com。

收稿日期: 2024-02-28, 修回日期: 2024-06-11 DOI: 10.13859/j.cjz.202424035

protein content of genes regulating fast and slow skeletal muscle in Yak at different altitudes, respectively.

[Results] The results showed that with the increase of altitude, the expression of *MyoG* that regulates the expression of fast muscle, gradually increased, the mRNA of *MyoD* which regulates the expression of slow muscle first decreased and then increased, while the protein expression of slow muscle first increased and then decreased (Fig. 2, 3). In addition, the expression of *PGC-1* mRNA and *PGC-1* protein gradually increased with altitude ($P < 0.05$) (Fig. 4, 5). **[Conclusion]** The above results showed that the mRNA expression of *MyoG*, *MyoD* and *PGC-1* may be associated with the hypoxic environment. The muscle fibre types and the expression of regulatory genes of skeletal muscles changed to adapt to the low oxygen environment. The present study provides basic data for the in-depth study of the mechanism of hypoxia adaptation in Yaks at different altitudes in Qinghai Province.

Key words: Highland Yak; Skeletal muscle; Muscle fiber type; Hypoxia adaptation mechanism

动物机体在低氧环境中组织器官会出现各种适应性改变。平原动物到高原环境中首先会产生生理水平上的变化,如呼吸急促、心跳加快等,随着时间的延长会出现血红蛋白增加、红细胞增多等代偿适应性变化,而高原土生动物在低氧环境中长期生存则表现为适应性变化。这两种变化各有特点,代偿适应性变化是不可遗传的,而适应性变化是可遗传的,这种遗传最终体现在基因水平,因此研究基因在低氧环境中的表达具有重要意义(黄庆愿等 2001,刘燕 2011,刘宝 2017,张卫花等 2018)。无论是肺动脉高压、高原肺水肿、红细胞增多症,还是运动能降低等高原病的发生,均与缺氧时基因的表达改变有关。骨骼肌的调控基因众多,如胰岛素样生长因子 2 (insulin-like growth factor 2, *IGF2*) 对骨骼肌生长发育以及肌肉的重建有重要作用(黄永震 2014); 配对盒转录因子基因 (paired box transcription factors, *PAX*) 家族缺失时,肌肉的发育会停止 (Relaix 2005,王吟方亭等 2017); 生肌调节因子家族 (myogenic regulatory factors, *MRFs*) 在骨骼肌生长发育中起重要的调控作用,其中包括 *MyoD*、*MyoG*、*Myf5* 和 *MRF4* (赵晓等 2011,高玲等 2015); 肌细胞增强因子家族 (myocyte enhancer factor-2, *MEF2*) 在骨骼肌中高表达,可激活肌肉收缩蛋白和特异基因的表达 (陈宝剑 2017); 肌肉生长抑制素

(myostatin, *MSTN*) 是骨骼肌生长的负性调节因子,其功能与 *MRFs* 相反,即抑制骨骼肌的生长; 钙激活蛋白酶 3 (Calpain 3) 能促进肉质嫩化; 过氧化物酶体增殖物受体 γ 共激活分子 1 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1, *PGC-1*) 能促进线粒体的发生,与肌纤维类型有密切关系。其中,与高原低氧以及肌纤维类型相关的因子主要有 *MYOD*、*MYOG* 和 *PGC-1* 等(潘同斌 2007)。

MRFs 家族的主要功能是调控骨骼肌特异性基因表达,被 *MRFs* 识别的肌肉特异基因具有一段共同的结构,称为 E-box,序列为 -CANNTG- (N 为任何一种碱基),调控肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, *MYHC*) 基因各亚型的表达 (Zierath et al. 2004)。据报道,*MYOD* 通过与基因启动子上的转录元件 E-box 结合激活启动子 *MYH4* 基因的表达 (黄兴等 2018)。*MYOG* 在肌纤维类型基因的表达和氧化代谢方面发挥重要作用,此外,*MYOG* 在成肌细胞分化过程中可能改变 *MYH1* 的表达,由此影响体内从糖酵解代谢向氧化代谢的转变 (Berkes et al. 2005)。有研究表明,低氧对 *MRFs* 家族的影响是通过加速降解 *MYOD* 的表达,从而抑制成肌细胞的分化完成的 (Di Carlo et al. 2004)。此外,*PGC-1* 也是骨骼肌发生和发育的候选基因之一,*PGC-1* 的诱导表达对骨骼肌肌纤维类型具有调节作用,且不同类型肌

纤维中所含线粒体的数目不同,慢肌中线粒体数目较多,而快肌中含量较少。有学者通过促进线粒体的生成,发现体外培养的肌细胞 PGC-1 的表达水平增高,线粒体数目也随之增加,由此可以说明 PGC-1 与肌纤维类型的组成有密切的关系 (Wu et al. 1999)。在缺氧、寒冷的条件下,通过增强脂肪代谢能力,机体无氧代谢能力增强,控制线粒体的发生,使肌纤维类型改变或发生转化。但已有研究多集中在常氧地区及小鼠 (*Mus musculus domesticus*) 等模式动物,关于低氧对这些骨骼肌肌纤维类型相关因子的影响报道较少,因此本文运用分子生物学方法检测不同海拔牦牛 (*Bos mutus*) *MyoD*、*MyoG* 和 *PGC-1* 的 mRNA 和蛋白表达水平,阐述低氧下这些候选基因对牦牛骨骼肌的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及处理

成年牦牛选自青海省班玛县(栖息地海拔 4 200 m,以下简称高海拔组)、海晏县(栖息地海拔 3 200 m,以下简称中海拔组)及化隆县(栖息地海拔 1 900 m,以下简称低海拔组),所有牦牛均为雄性,采样时间均为 2021 年 10 月,年龄均 5 岁左右,临床健康。另选取化隆县习服黄牛 (*B. taurus*),栖息地海拔 1 900 m,采样时间为 2021 年 10 月,与低海拔组牦牛比较。每个地区实验动物各取 5 头。将实验动物

颈部放血处死后采取骨骼肌组织(股四头肌)大约 50 g,置于液氮中保存备用。

1.2 *MyoD*、*MyoG*、*PGC-1* 三种基因引物的设计与合成

于 GenBank 查询牦牛 *MyoD* (XM_005895606)、*MyoG* (XM_005895606)、*PGC-1* 基因 (XM_005897078) 以及 *TUBB* 内参基因 (XM_005906954) 序列,利用 Oligo7 软件设计特异性引物(表 1),由生工生物工程有限公司合成。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

称量 100 mg 骨骼肌组织样品,在 RNAiso Plus 中充分裂解,经过氯仿、异丙醇溶液的沉淀得到总 RNA。RNA 经核酸蛋白检测仪 (NanoPhotometer-N50, 购自 Lifes Biological 公司)测定浓度后,取 2 μ g A_{260}/A_{280} 值介于 1.8~2.0 之间的 RNA 样品,用 1%琼脂糖凝胶电泳验证 RNA 完整性。使用反转录试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,货号 KR118]反转录出 cDNA,置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存、备用。

1.4 实时荧光定量 PCR 扩增

以合成的 cDNA 为模板,选择 2 $\times$ *Tap* PCR MasterMix II [天根生化科技(北京)有限公司,货号 KT211]进行 PCR,反应完成后使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测引物特异性及产物大小。为比较三个海拔牦牛及低海拔黄牛 *MyoD*、*MyoG* 和 *PGC-1* mRNA 的表达水平,选择 TB Green Premix Ex *Taq* II [宝生物工程(大连)有

表 1 牦牛 *MyoD*、*MyoG* 和 *PGC-1* 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of *MyoD*, *MyoG* and *PGC-1* genes of Yak

基因 Gene	引物类型 Primer type	序列 (5'-3') Sequence	产物大小 (bp) Product size	退火温度 ($^{\circ}$ C) Annealing temperature
<i>MyoD</i>	正向引物 Forward	GCTTCTTCGAGGACCTGGATC	293	60
	反向引物 Reverse	GCTAGACGTGCAGCGTTTGA		
<i>MyoG</i>	正向引物 Forward	AGAACTACCTGCCTGTCCAC	184	52
	反向引物 Reverse	TCCACAGACACCGACTTCC		
<i>PGC-1</i>	正向引物 Forward	CCGACCCGTGTACCTGAGAG	130	52
	反向引物 Reverse	GCTTGACTGGGATGACCGAAGTG		
<i>TUBB</i>	正向引物 Forward	CCCTCGTGCTATCTTGGT	155	52
	反向引物 Reverse	GCTCGGCTCCCTCTGTAT		

限公司，货号 RR420Q]进行实时荧光定量 PCR。实验中内参基因为 *TUBB*，并且内参基因和目的基因分别设 3 个平行。实时荧光定量 PCR 扩增程序：95 ℃预变性 30 s；95 ℃变性 5 s；*MyoD* (60 ℃)和 *MyoG*、*PGC-1* 以及 *TUBB* (52 ℃) 退火 30 s；72 ℃延伸 30 s。共 40 个循环，在每个循环结束后进行荧光信号检测，待循环结束后进行熔解曲线分析，获得每个反应管中标本的 Ct 值，采用相对 $\Delta\Delta C_t$ 法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)对 *MyoD*、*MyoG* 和 *PGC-1* 相关基因 mRNA 在不同海拔牦牛骨骼肌组织中的转录水平进行分析。

1.5 Western-blot 分析

准确称量 1 g 肌肉组织，研磨，匀浆后离心提取上清液。利用全蛋白提取试剂盒（江苏凯基生物技术有限公司，货号 KGP250）提取骨骼肌组织总蛋白，并测定蛋白吸光度值，计算浓度。将蛋白样品与 4 × 蛋白溶液以 3：1 的比例混合，然后将其加热到 100 ℃ 5 min。对 40 μg 的骨骼肌变性蛋白进行变性。取 40 μg 变性后的蛋白质上样，经过 SDS-PAGE 电泳（5%浓缩胶，8%和 15%分离胶）跑胶、转膜，在转膜完成后，使用转膜液清洗 PVDF 膜，然后用 5%的脱脂牛奶封闭 3 h。4 ℃条件下一抗孵育 15 h，购自北京博奥森生物技术有限公司的目的蛋白一抗分别为：兔抗 MYOD 抗体（货号 bs-2442R，浓度 1：1 500）、兔抗 MYOG 抗体（货号 bs-3550R；浓度 1：1 200）和兔抗 PGC-1 抗体（货号 bs-1832R；浓度 1：1 800）。内参蛋白一抗鼠抗 Beta tubulin 抗体（货号 bsm-33034M，浓度 1：1 000）；一抗孵育后用 1 × TBST 洗涤 2 次，7 min/次；再将 PVDF 膜与二抗进行孵育，25 ℃条件二抗孵育 90 r/min 2 h；购自武汉赛维尔生物科技有限公司的目的蛋白二抗为山羊抗兔 IgG H&L (HRP)（货号 ab6721，浓度 1：20 000），内参二抗为山羊抗小鼠 IgG H&L (HRP)（货号 ab205719，浓度 1：10 000）；1 × TBST 洗涤 10 次，10 min/次；最后使用 ECL 试剂(Immobilon Western Chemilum

HRP Substrate; Millipore 公司,货号 WBKLSO500) 进行曝光，待条带清晰呈现拍照。使用 AlphaView 软件测得光密度值，对目的蛋白条带进行量化，每个样品做 3 次重复。

1.6 统计分析

利用 SPSS 23.0 软件对相关数据进行单因素方差分析，实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹的结果以平均值 ± 标准误 (Mean ± SE) 表示。

2 结果

2.1 MyoD、MyoG、PGC-1 引物特异性验证

目的基因和内参基因条带单一且清晰明亮（图 1），引物特异性良好，所用 4 对引物可以作为 qRT-PCR 的引物。

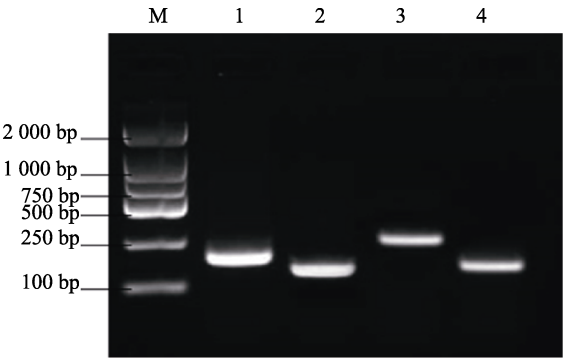


图 1 低海拔牦牛 *MyoD*、*MyoG* 和 *PGC-1* 基因普通 PCR 扩增结果

Fig. 1 The results of general PCR amplification of *MyoD*, *MyoG* and *PGC-1* genes in low-altitude Yak

M. DL 2 000 DNA 分子量标准；1~4 分别代表为 *MyoG*、*PGC-1*、*MyoD* 和 *TUBB* 的 PCR 扩增产物。

M. DL 2000 DNA marker; 1 - 4 represent PCR amplification products of *MyoG*, *PGC-1*, *MyoD* and *TUBB*.

2.2 不同海拔牦牛和低海拔黄牛骨骼肌中 *MyoD*、*MyoG* mRNA 和蛋白结果

牦牛骨骼肌中 *MyoD* mRNA 的表达随海拔的升高呈现先降低后升高的趋势（低海拔 vs. 中海拔： $F_{1,2} = 208.286, P < 0.05$ ；中海拔 vs. 高海拔： $F_{1,2} = 13.064, P > 0.05$ ）（图 2），而 MYOD 蛋白表达表现为先升高后降低的趋势（低海拔

vs. 中海拔: $F_{1,4} = 100.776$, $P < 0.01$; 中海拔 vs. 高海拔: $F_{1,4} = 131.149$, $P < 0.01$) (图 3), 其中, 中海拔牦牛与高海拔组和低海拔组牦牛均差异显著。低海拔黄牛骨骼肌中 *MyoD* mRNA 和 MYOD 蛋白表达均显著低于低海拔牦牛 (*MyoD* mRNA: $F_{1,2} = 297.140$, $P < 0.01$; MYOD 蛋白: $F_{1,2} = 32.052$, $P < 0.05$)。

牦牛骨骼肌中 *MyoG* mRNA 和蛋白水平表达一致, 均表现为随海拔升高, 其表达量逐渐升高 (图 2, 3), 高海拔牦牛骨骼肌中 *MyoG* 基因和 MYOG 蛋白水平均显著高于低海拔牦牛 (*MyoG* mRNA: $F_{1,4} = 19.532$, $P < 0.01$; MYOG 蛋白: $F_{1,4} = 159.370$, $P < 0.01$)。低海拔黄牛骨骼肌中 *MyoG* mRNA 显著低于低海拔牦牛 ($F_{1,4} = 13.772$, $P < 0.01$), 其二者间蛋白表达差异不显著 ($F_{1,4} = 5.911$, $P > 0.05$)。

2.3 不同海拔牦牛和低海拔黄牛骨骼肌中 PGC-1 基因和蛋白结果

PGC-1 mRNA 和蛋白均是随海拔的升高其表达量逐渐升高, 高海拔牦牛骨骼肌中 *PGC-1* 基因水平高于低海拔和中海拔牦牛 (低海拔 vs. 高海拔: $F_{1,6} = 99.514$, $P < 0.01$; 中海拔 vs. 高海拔: $F_{1,6} = 94.605$, $P < 0.01$),

同样蛋白水平显著高于低海拔和中海拔牦牛 (低海拔 vs. 高海拔: $F_{1,4} = 586.933$, $P < 0.01$; 中海拔 vs. 高海拔: $F_{1,4} = 166.210$, $P < 0.01$), 中海拔与低海拔牦牛相比差异不显著 (低海拔 vs. 中海拔: $F_{1,4} = 105.930$, $P < 0.01$; 图 4, 5)。低海拔黄牛骨骼肌中 *PGC-1* mRNA 与低海拔牦牛相比差异不显著 ($F_{1,6} = 3.490$, $P > 0.05$), 但其蛋白表达量显著低于低海拔牦牛 ($F_{1,4} = 52.989$, $P < 0.05$)。

3 讨论

氧浓度的改变是维持机体正常功能的重要调节因素。空气中的氧浓度为 20.9%, 机体内氧气浓度显著低于空气中, 成年哺乳动物组织中平均氧浓度为 3% 左右, 骨骼肌中氧浓度在 1% ~ 10% 左右 (Allen et al. 2001, Zhu et al. 2013)。骨骼肌中的成肌细胞具有分化为肌纤维的能力, 在整个生命过程中成肌细胞发挥着维持骨骼肌功能和损伤修复的重要功能, *MRFs* 参与原始成肌细胞早期分化, 对肌纤维的表达起重要作用, 尤其是 MYOD 和 MYOG 的表达是肌肉表型的决定性因素 (苏艳红 2005)。

已有研究表明 (Richardson et al. 1998), 成

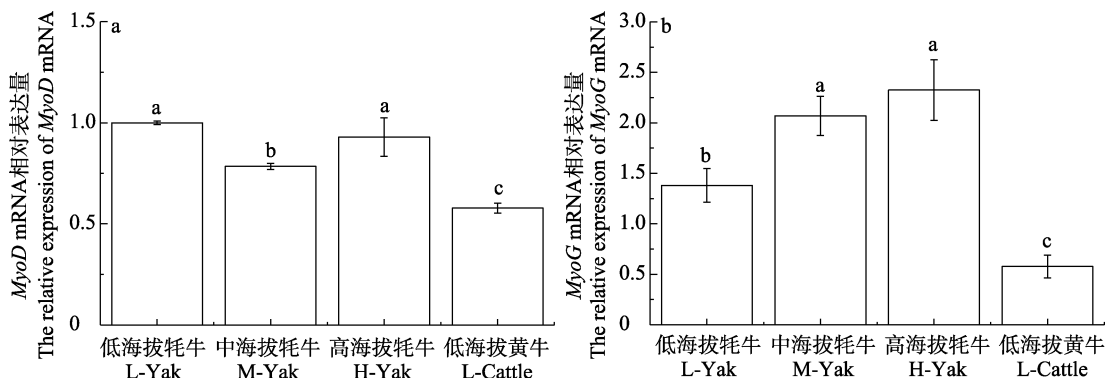


图 2 不同海拔牦牛和低海拔黄牛骨骼肌中 *MyoD* (a) 和 *MyoG* (b) mRNA 相对定量结果

Fig. 2 Relative quantitative results of *MyoD* (a) and *MyoG* (b) mRNA in skeletal muscle of *Bos mutus* at different altitudes and low-altitude *B. taurus*

图中字母不同代表差异性显著 ($P < 0.05$), 相同字母代表差异性不显著 ($P > 0.05$); 误差线代表标准误差。

L-Yak. Yaks of the low-altitude group; M-Yak. Yaks of the medium-altitude group; H-Yak. Yaks of the high-altitude group; L-Cattle. Cattle of the low-altitude group. Different letters above figure represent significant differences ($P < 0.05$), and the same letters represent insignificant differences ($P > 0.05$). Error bar shows standard error.

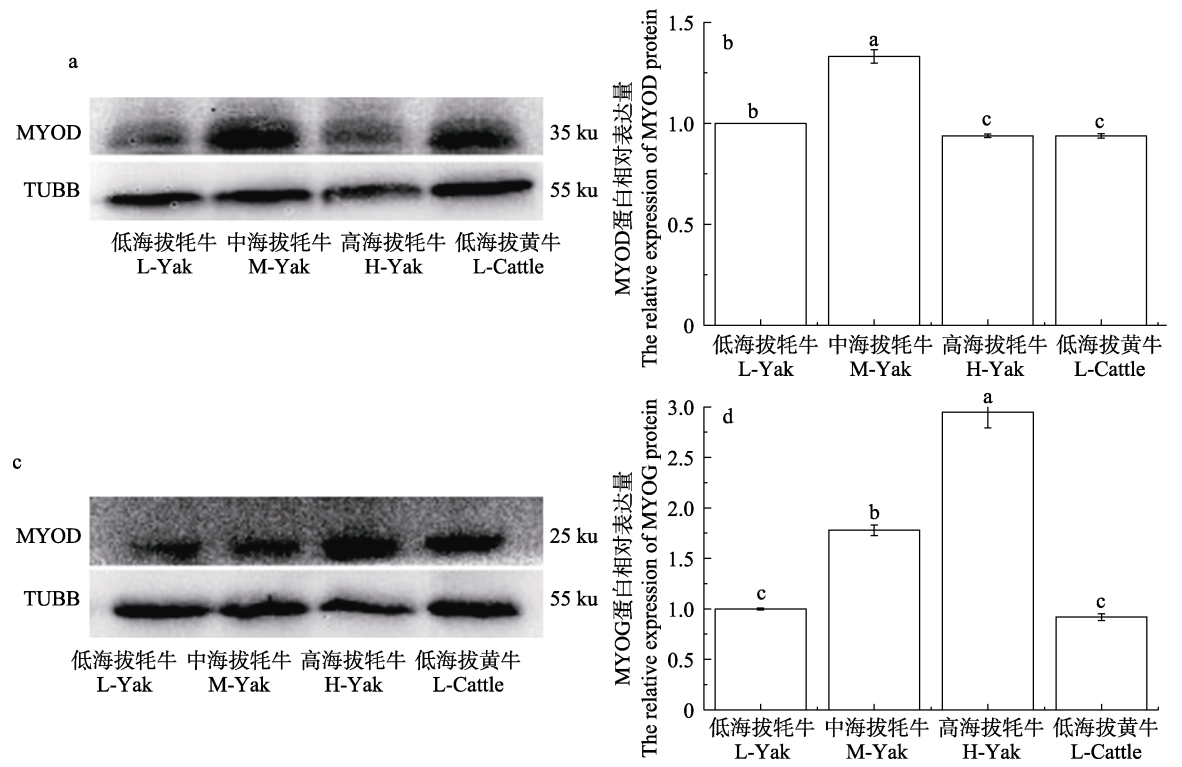


图 3 不同海拔牦牛和低海拔黄牛骨骼肌中 MYOD 和 MYOG 蛋白相对表达量

Fig. 3 The relative expression of MYOD and MYOG proteins in skeletal muscle of *Bos mutus* at different altitudes and low-altitude *B. taurus*

a. MYOD 蛋白印记; b. MYOD 蛋白相对表达量; c. MYOG 蛋白印记; d. MYOG 蛋白相对表达量。图中字母不同代表差异性显著 ($P < 0.05$), 相同字母代表差异性不显著 ($P > 0.05$); 误差线代表标准误差。

a. Western blot of MYOD; b. Relative expression of MYOD; c. Western blot of MYOG; d. Relative expression of MYOG. L-Yak. Yaks of the low-altitude group; M-Yak. Yaks of the medium-altitude group; H-Yak. Yaks of the high-altitude group; L-Cattle. Cattle of the low-altitude group. Different letters above figure represent significant differences ($P < 0.05$), and the same letters represent insignificant differences ($P > 0.05$). Error bar shows standard error.

肌细胞暴露于低氧会抑制多核肌管的形成和分化标志物的表达, 而低氧通过诱导 MYOD 的降解阻止早期成肌分化标志物的积累, 如 p21 (CDK 抑制蛋白) 和 Rb (Rb 肿瘤抑制蛋白) 等, 阻止了永久性细胞周期退出和终末分化, 确认 *MyoD* 降解是缺氧的一个相关靶点。但未见低氧程度对 MYOD 的影响, 本研究结果表明, 高海拔牦牛骨骼肌中 MYOD 蛋白的相对表达量低于低海拔牦牛可能是因为氧浓度的降低加速了 MYOD 的降解, 这与苏艳红 (2005) 对大鼠 (*Rattus norvegicus*) 模拟海拔 4 000 m 的低压舱结果一致, 低氧导致 *MyoD* mRNA 显

著下降, 并且认为 MYOD 通过调控 MYHC 亚型中 *MYH1* 的表达引起肌纤维表型的改变。MYOG 也在肌纤维类型基因的表达和氧化代谢方面发挥重要作用, *MyoG* mRNA 和蛋白水平平均随着海拔的升高而逐渐升高, 低氧处理和常氧组大鼠对比后发现, 低氧时 *MyoG* 基因和蛋白水平显著升高 (Greenbaum et al. 1997, 苏艳红 2005), 可见低氧对 *MyoD* 和 *MyoG* mRNA 以及蛋白的表达影响较大, 即低氧分别通过降解 MYOD 和促进 MYOG 的表达, 共同参与抵抗低氧导致的骨骼肌萎缩。目前发现, *MyoD* 和 *MyoG* 调控与肌纤维类型相关的基因

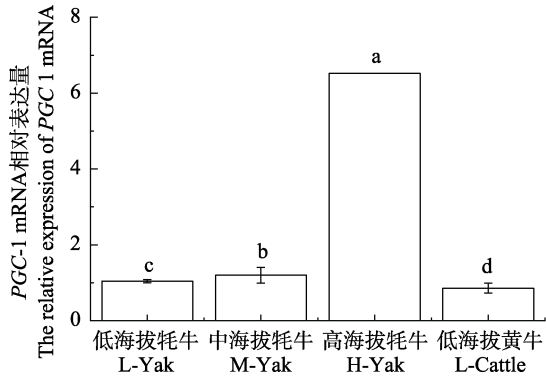


图4 不同海拔牦牛和低海拔黄牛骨骼肌中 PGC-1 mRNA 相对定量结果

Fig. 4 Relative quantitative results of PGC-1 mRNA in skeletal muscle of *Bos mutus* and low-altitude *B. taurus* at different altitudes

图中字母不同代表差异性显著 ($P < 0.05$), 相同字母代表差异性不显著 ($P > 0.05$); 误差线代表标准误差。

L-Yak. Yaks of the low-altitude group; M-Yak. Yaks of the medium-altitude group; H-Yak. Yaks of the high-altitude group; L-Cattle. Cattle of the low-altitude group. Different letters above figure represent significant differences ($P < 0.05$), and the same letters represent insignificant differences ($P > 0.05$). Error bar shows standard error.

MYHC 的表达, 可调控骨骼肌表型的改变, Hughes 等 (1997) 提出 *MyoD* 和 *MyoG* 在快肌

和慢肌纤维中选择性表达, 在慢肌中 *MyoG* 基因水平最高, 而在快肌中 *MyoD* 基因水平最高, MYOD 与 MYOG 的相对表达是肌肉表型表达的决定因素 (李翔等 2007, 潘同斌等 2010)。本课题组研究了快肌、慢肌纤维在牦牛骨骼肌中的分布类型及含量变化特点, 发现慢肌纤维数量与占比及其相对应的 MYH7 mRNA (I 型肌纤维) 随海拔升高逐渐升高, 与本结果中 *MyoG* mRNA 和蛋白表达趋势一致, 结合上述结果以及 *MyoD* 与快肌纤维中的 MYH1 mRNA (IIx 型肌纤维)、MYH4 mRNA (IIb 型肌纤维) 随海拔升高逐渐下降趋势一致, 可得出 MYOD 的低表达和 MYOG 的高表达导致了随海拔升高快肌向慢肌的转化。

本研究中, *MyoD* 的表达没有随海拔升高呈现出基因和蛋白水平不同步的趋势, 可能是不同海拔中氧浓度不同导致其 mRNA 和蛋白的表达不一致, Di Carlo 等 (2004) 调查缺氧对 *MyoD* 的下调机制时, 也发现 MYOD 蛋白的显著下降与其 mRNA 水平的表达并不平行, 缺氧诱导的 *MyoD* 丢失与泛素-蛋白酶体系统途径的降解有关, 认为转录后修饰参与了缺氧介导的 MYOD 抑制, 关于不同海拔牦牛骨骼

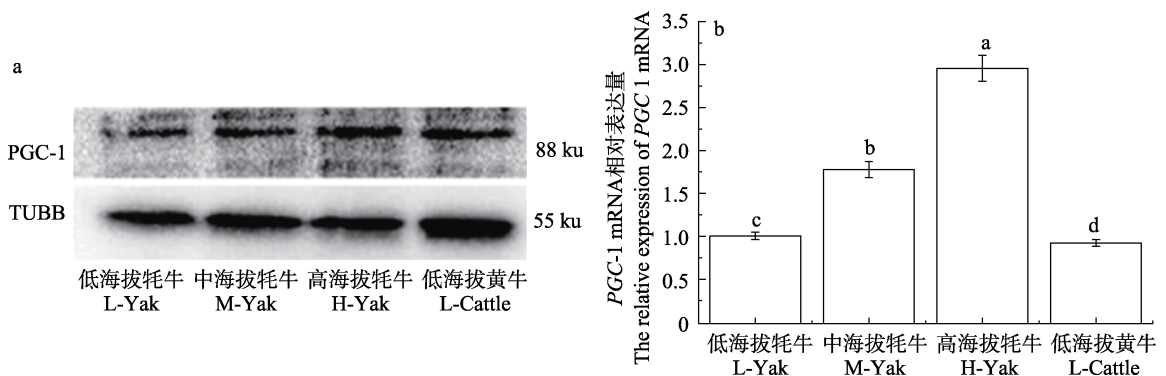


图5 不同海拔牦牛和低海拔黄牛骨骼肌中 PGC-1 蛋白 (a) 和 mRNA (b) 相对表达量结果

Fig. 5 Relative expression of PGC-1 protein (a) and mRNA (b) in skeletal muscle of *Bos mutus* and low-altitude *B. taurus* at different altitudes

上图字母不同代表差异性显著 ($P < 0.05$), 相同字母代表差异性不显著 ($P > 0.05$)。误差线代表标准误差。

L-Yak. Yaks of the low-altitude group; M-Yak. Yaks of the medium-altitude group; H-Yak. Yaks of the high-altitude group; L-Cattle. Cattle of the low-altitude group. Different letters above figure represent significant differences ($P < 0.05$), and the same letters represent insignificant differences ($P > 0.05$). Error bar shows standard error.

肌中缺氧介导的 MYOD 下调是发生在转录水平还是转录后水平还有待于进一步研究证明。

本研究结果显示, *PGC-1* 基因和蛋白表达量均随海拔的升高逐渐升高, 高海拔牦牛骨骼肌中 *PGC-1* 基因和蛋白水平均显著高于低海拔和中海拔牦牛, 说明氧分压降低促进 *PGC-1* 高表达。这与吴菊花(2016)研究低氧运动对肥胖大鼠的影响中得到的结果一致, 其提出 *PGC-1* 与线粒体含量密切相关。*PGC-1* 是线粒体功能发生的关键因子, 也是肌纤维转化的重要开关之一(张云霞 2015), 与本课题组之前研究的慢肌纤维数量和占比中, 骨骼肌中线粒体的体积、数量及体密度随海拔升高而增加的结果一致(周娟等 2022)。推测低氧程度的加重会刺激骨骼肌纤维类型转化和代谢方式的改变, 这种变化对维持骨骼肌氧供应和能量代谢提供帮助, 并对骨骼肌形态结构和功能的维持具有重要意义。

综上所述, 调控慢肌表达的 *MyoG* mRNA 和蛋白的表达量随着海拔的增加而增加, 调控快肌表达的 *MyoD* mRNA 随海拔升高表现为先降低再升高, 而 MYOD 蛋白表达表现为先升高再降低的趋势; *PGC-1* mRNA 和蛋白的表达量均随海拔的升高而逐渐升高。同时, 以上牦牛骨骼肌快肌、慢肌的调控基因在不同海拔的表达特点也是影响牦牛骨骼肌肌纤维类型转化的重要因素。

参 考 文 献

- Allen D L, Sartorius C A, Sycuro L K, et al. 2001. Different pathways regulate expression of the skeletal myosin heavy chain genes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47): 43524–43533.
- Berkes C A, Tapscott S J. 2005. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16(4/5): 585–595.
- Di Carlo A, De Mori R, Martelli F, et al. 2004. Hypoxia inhibits myogenic differentiation through accelerated MyoD degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(16): 16332–16338.
- Greenbaum A R, Etherington P J, Manek S, et al. 1997. Measurements of oxygenation and perfusion in skeletal muscle using multiple microelectrodes. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 18(2): 149–159.
- Hughes S M, Koishi K, Rudnicki M, et al. 1997. MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. *Mechanisms of Development*, 61(1/2): 151–163.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, et al. 2005. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*, 435(7044): 948–953.
- Richardson R S, Noyszewski E A, Leigh J S, et al. 1998. Lactate efflux from exercising human skeletal muscle: role of intracellular PO₂. *Journal of Applied Physiology*, 85(2): 627–634.
- Wu Z D, Puigserver P, Andersson U, et al. 1999. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1): 115–124.
- Zhu L N, Ren Y, Chen J Q, et al. 2013. Effects of myogenin on muscle fiber types and key metabolic enzymes in gene transfer mice and C2C12 myoblasts. *Gene*, 532(2): 246–252.
- Zierath J R, Hawley J A. 2004. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biology*, 2(10): e348.
- 陈宝剑. 2017. 巴马香猪与长白猪肌肉生长发育相关基因的研究. 南宁: 广西大学博士学位论文.
- 高玲, 谷大海, 徐志强, 等. 2015. MRFs 基因家族对肉品质影响的研究进展. *黑龙江畜牧兽医*, (9): 65–67.
- 黄庆愿, 高钰琪, 史景泉, 等. 2001. 低氧习服过程中大鼠心脏的适应性改变. *中国病理生理杂志*, 17(7): 606–609.
- 黄兴, 柴志欣, 王会, 等. 2018. 类乌齐牦牛乳酸脱氢酶基因克隆及组织表达. *西北农业学报*, 27(10): 1405–1415.
- 黄永震. 2014. 黄牛肌肉生长发育相关基因甲基化鉴定及 IGF2 和 ZBED6 基因的转录调控研究. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文.
- 李翔, 朱玲玲, 陈晓萍, 等. 2007. HIF-1 通路在低氧对成肌细胞增殖分化影响中的作用. *生理科学进展*, 38(3): 224–228.
- 刘宝. 2017. 高原习服及习服不良过程中基因表达特征及其病理生理学意义研究. 重庆: 第三军医大学博士学位论文.

- 刘燕. 2011. 进入高原部队习服状况评价及促进习服的对策研究. 重庆: 第三军医大学硕士学位论文.
- 潘同斌, 毛杉杉, 王瑞元. 2007. 慢性低氧及跑台训练对大鼠骨骼肌成肌调节因子 MyoD 和 myogenin 基因表达的影响. 北京体育大学学报, 30(9): 1209–1211.
- 潘同斌, 孙文杰, 毛杉杉, 等. 2010. 急性低氧及力竭运动对大鼠骨骼肌成肌调节因子 MyoD 和 myogenin 基因表达的影响. 北京体育大学学报, 33(1): 45–47.
- 苏艳红. 2005. MyoD、myogenin 在低氧、运动引起肌球蛋白重链转变中的调节作用. 北京: 北京体育大学博士学位论文.
- 王吟方亭, 任婷, 朱松会, 等. 2017. 浙东白鹅骨骼肌发育相关因子 MRFs, Pax3 和 Pax7 基因的表达规律. 浙江农林大学学报, 34(6): 1065–1070.
- 吴菊花. 2016. 低氧运动对肥胖大鼠骨骼肌 AMPK-PGC-1 α 及其下游分子介导脂代谢的影响. 上海: 上海体育学院博士学位论文.
- 张卫花, 康龙丽. 2018. 高原习服的重要性及研究现状. 国外医学: 医学地理分册, 39(2): 108–112.
- 张云霞. 2015. FHL3 与 MyoD 和 pCREB 蛋白相互作用差异调控 MyHC 各亚型基因表达的分子机制. 武汉: 华中农业大学博士学位论文.
- 赵晓, 莫德林, 张悦, 等. 2011. 猪的骨骼肌生长发育研究进展. 生命科学, 23(1): 37–44.
- 周娟, 孟祥琼, 秦鸿楠, 等. 2022. 不同海拔牦牛骨骼肌纤维类型和 MYHC 基因表达的比较. 中国兽医学报, 42(6): 1263–1269.

(上接第 907 页)

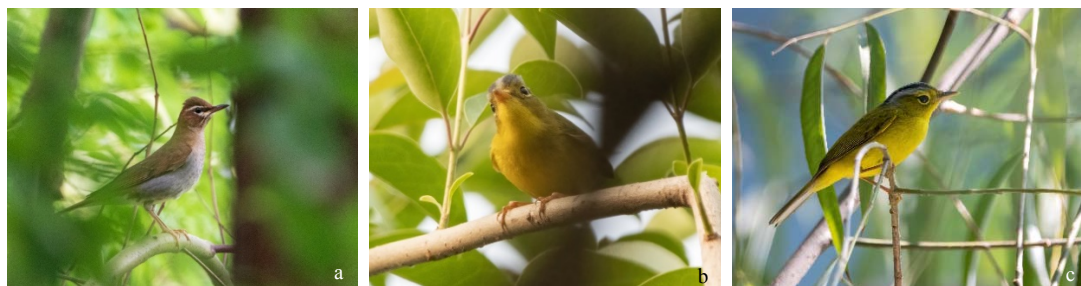


图 1 褐头鹟和灰冠鹟莺

Fig. 1 Grey-sided Thrush *Turdus feae* and Grey-crowned Warbler *Phylloscopus tephrocephalus*

a. 褐头鹟 (摄于 2022 年 9 月 21 日); b. 灰冠鹟莺 (摄于 2022 年 5 月 17 日); c. 灰冠鹟莺 (摄于 2022 年 9 月 30 日)。

a. Grey-sided Thrush (photo on September 21st, 2022); b. Grey-crowned Warbler (photo on May 17th, 2022); c. Grey-crowned Warbler (photo on September 30th, 2022).

2 灰冠鹟莺 (*Phylloscopus tephrocephalus*)

2022 年 5 月 17 日 18 时, 在安徽省合肥市中国科学技术大学东校区校史馆附近发现 1 只小型莺 (图 1b), 下体黄色, 上体灰绿色, 金黄色眼圈, 眼后断开, 顶冠纹灰黑色。发现时, 该莺正处于树冠层鸣叫。经查阅文献 (Alström et al. 1999, 赵正阶 2001), 确认为灰冠鹟莺, 该种无亚种分化。经查阅文献资料 (Alström et al. 1999, 郑光美等 2017, 侯银续等 2018, 刘阳等 2021, eBird 2022, 约翰·马敬能等 2022, 中国观鸟记录中心 2022), 确认其为安徽省鸟类分布新记录种。同年 9 月 28 日 13:30 时左右, 在中国科学技术大学东校区石榴园附近柳树上再次发现灰冠鹟莺 (图 1c), 停留 4 d 后离去。结合两次发现时间, 推测其在安徽境内居留型为旅鸟。

林生富^① 孙浩轩^{2*} 朱震昕^②

① 中国科学技术大学 合肥 230026; ② 中国科学技术大学附属中学 合肥 230051