

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200324002

http://www.yykxjz.cn/

闫允君, 卢霞, 孟宪红, 栾生, 陈宝龙, 孔杰. 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. 渔业科学进展, 2021, 42(4): 55-63

YAN Y J, LU X, MENG X H, LUAN S, CHEN B L, KONG J. Screening of genes related to muscle growth under the *Myostatin* regulation by RNA-seq in *Fenneropenaeus chinensis*. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(4): 55-63

# 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\*

闫允君<sup>1</sup> 卢霞<sup>2</sup> 孟宪红<sup>2</sup> 栾生<sup>2</sup> 陈宝龙<sup>2</sup> 孔杰<sup>1,2①</sup>

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业资源可持续发展重点实验室  
青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 山东 青岛 266071)

**摘要** *Myostatin* (*Mstn*)即肌肉生长抑制素,在脊椎动物中是胚胎期肌肉形成和成体肌肉生长的主要调控因子之一,通过抑制肌细胞的扩增和分化而抑制肌肉的生长和发育。为了筛选在中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)中 *Mstn* 调控的肌肉生长相关的基因,为肌肉生长调控机理奠定基础,本研究利用 RNA-Seq 技术对 PBS 对照组和 *Mstn* 表达抑制组进行了测序分析。结果显示, *Mstn* 表达被抑制后,共筛选到 1657 个差异表达基因,其中,805 个显著上调,852 个显著下调。参考脊椎动物 *Mstn* 调控的肌肉生长经典信号通路 TGF- $\beta$ /Smad 和 MAPK 通路及差异基因功能已有报道,初步筛选出 29 个 *Mstn* 调控的与肌肉生长相关的基因。在涉及 TGF- $\beta$ /Smad 和 MAPK 通路的 16 个基因中,除 *ActR1* 被检测到略微上调外,其他基因均表现出不同程度的下调;在另外 13 个涉及蜕皮、肌肉生长等过程的基因中,促进肌肉生长的基因显示为上调。前期的研究表明, *Mstn* 可能同脊椎动物功能类似,在中国对虾中负向调控肌肉生长,而本研究结果提供了进一步的证据,为阐明对虾的肌肉发育调控机制提供了重要基础。

**关键词** *Mstn*; 转录组; 基因筛选; 信号通路; 肌肉生长发育

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)04-0055-09

肌肉生长抑制素(*Myostatin*, *Mstn*)基因,也称为生长和分化因子-8(GDF-8),是动物肌肉发育和生长过程中的负调控因子,在脊椎动物的研究中,发现 *Mstn* 主要在肌肉组织中表达,并负向抑制肌肉生长和调节发育(Kambadur *et al.*, 1997; McPherron *et al.*, 1997)。*Mstn* 对肌肉生长发育的作用为促进动物生产、增加

市场利润提供了新途径,随着对 *Mstn* 研究的不断深入,其肌肉调控机制和相关基因功能也越来越完善。*Mstn* 作为胞外信号分子,可与成肌细胞膜上的受体结合引起受体自身的磷酸化,启动细胞内一系列信号传导过程,作用于生肌分化抗原(Myod)靶基因的调控区,进而调控肌肉的形成和分化(Morikawa *et al.*,

\* 国家重点研发计划(2018YFD0900103)和国家自然科学基金联合基金项目(U1706203)共同资助 [This work was supported by National Key R&D Program of China (2018YFD0900103), and Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U1706203)]. 闫允君, E-mail: yanyunjunou@163.com

① 通讯作者: 孔杰, 研究员, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2020-03-24, 收修改稿日期: 2020-04-09

2016)。脊椎动物 *Mstn* 功能的发挥主要通过参与调控 TGF- $\beta$ /Smad 通路活性而参与肌肉的生长和发育。目前,公认的 *Mstn* 的信号传导途径是 *Mstn*-ActR II B 型受体(蛋白激酶受体)-Smad 蛋白信号传导通路。Smads 是细胞质内 TGF- $\beta$  信号转导分子,可直接与 DNA 结合,它们可以将 TGF- $\beta$  信号直接由细胞膜导入细胞核内。Langley 等(2003)研究发现, *Mstn* 对成肌细胞分化的抑制正是通过 Smad3 抑制 MyoD 的活性与表达实现的,其能够使成肌细胞不能分化形成肌管,阻碍了肌肉的形成。除了典型的 Smad 介导的信号途径外, *Mstn* 也通过 MAPK 途径,包括 p38、Erk 1/2 和 JNK 途径参与肌肉发育的信号转导,如成熟的 *Mstn* 可分别通过 TAK1-MKK6、Ras-MEK1 和 TAK1-MKK4 级联激活 p38 MAPK、Erk 1/2 和 JNK 通路,参与调控肌肉发育(Huang *et al.*, 2011)。

*Mstn* 对肌肉生长发育的作用,不仅仅局限于脊椎动物,对无脊椎动物 *Mstn* 的研究也发现其参与并调控无脊椎动物肌肉生长(Li *et al.*, 2016; Zhuo *et al.*, 2017),但与脊椎动物 *Mstn* 调控的肌肉发育机制相比,无脊椎动物的研究相对滞后,目前其调控模式和相关基因功能仍不清楚。转录组分析是揭示分子机制的主流方法,其可以分析特定条件下基因表达情况,挖掘生物网络调控和分子机理,为基因功能研究提供新的思路。RNA 干扰可以有效地沉默靶基因的表达,进而影响通路中基因表达量的变化, RNA 干扰后从转录水平检测基因的表达变化,可以为阐释基因功能及其调控网络提供基础。

中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)作为无脊椎动物甲壳类的典型代表,具有较高的经济价值,但其海捕量极低,基本依靠养殖供给市场,而养殖产量远远满足不了市场消费的需求,加之群体的生长性状选育进展缓慢且规格整齐度较差,利用分子手段来提高产量已迫在眉睫。我们前期对中国对虾的初步研究表明, *Mstn* 可能与脊椎动物类似,负向调控中国对虾肌肉生长(Kong *et al.*, 2020)。因此,本研究拟通过生物信息学的方法发掘 *Mstn* 调控体系中与肌肉生长发育有关的基因与通路,为探索无脊椎动物 *Mstn* 的作用机制及肌肉发育调控模式提供更多证据。本研究通过 RNA 干扰方法沉默中国对虾 *Mstn* 基因,采用高通量测序技术对其进行转录组测序分析,根据分析结果,参考脊椎动物肌肉发育调控模式和差异基因的功能,初步筛选出受 *Mstn* 调控、与肌肉发育相关的重要基因,了解其在脊椎动物和无脊椎动物中的异同之处,为解析对虾肌肉发育调控机制提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验地点与amp;材料

实验所用中国对虾取自山东省青岛市即墨区鳌山卫镇黄海水产遗传育种中心第 14 代选育群体。养殖期间温度范围为 21 $^{\circ}$ C~24 $^{\circ}$ C,每日换水量 30%,每日投喂配方颗粒饲料和新鲜的菲律宾帘蛤(*Ruditapes philippinarum*),日投喂总量为中国对虾湿重的 5%。将体重无显著差异的中国对虾分成 2 组,分别置于 500 L 养殖箱中暂养 7 d。暂养结束后,分别对实验虾的肌肉尾部注射 PBS (对照组)和 *Mstn*-siRNA [生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成](实验组),于注射后 12 h 取肌肉组织,每组取 6 尾,每尾取 2 份相同的肌肉组织,一份用于抑制效果检测,另一份用于转录组测序分析。所有样品于液氮中保存。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 *Mstn* 基因 RNA 干扰** 中国对虾 *Mstn* 基因干扰实验所用干扰链 siRNA (F: GCUGAAUACCCUA AUGAAATT; R: UUUCAUUAGGGUAGCTT),由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成。以 1  $\mu$ g/g 的剂量通过尾部肌肉注射至中国对虾体内,于注射后 12 h 取肌肉组织,每组取 6 尾,通过 qRT-PCR ( $n=6$ )分别检测相对表达量,计算抑制效率。

**1.2.2 总 RNA 提取和反转录** 用 Trizol (TaKaRa)法提取中国对虾肌肉组织总 RNA,用分光光度计(NanoDrop 2000, 美国)测定  $A_{260\text{ nm}}$  和  $A_{280\text{ nm}}$  值,检测 RNA 纯度和浓度,用 1.5%的琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。使用 PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa)试剂盒,按照说明书进行总 RNA 的反转。反转录完成后,将 cDNA 保存于 -20 $^{\circ}$ C,以进行下一步 qRT-PCR。

**1.2.3 实时相对荧光定量(qRT-PCR)** 根据 Zhang 等(2008)的方法,以 18S 作为内参基因,根据中国对虾 *Mstn* (*FcMstn*) ORF 序列(NCBI 登录号: MG437236)设计 *Mstn* 基因实时相对定量特异性引物(表 1),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

为了验证转录组表达数据,根据转录组测序结果查找到相关基因的序列,通过 PCR 成功扩增并验证 *ActR II*、*Smad1/5*、*Smad3* 和 *Smad6* 基因的编码区序列,根据编码区序列,分别设计引物用于 qRT-PCR 的特异性引物(表 1)。所有引物通过 PCR 检测并测序,确保目的片段特异性扩增和序列的准确性。使用 SYBR PrimeScript<sup>TM</sup> RT 试剂盒(TaKaRa, 日本)置于 ABI QuantStudio 3 系统中进行 qRT-PCR 分析。*FcMstn* 的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算。

表 1 qRT-PCR 所需引物  
Tab.1 Primers used in the qRT-PCR

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
<i>Mstn</i>	qRT-Mstn-F	GATGCGACTGGCTTGAAACT
	qRT-Mstn-R	CGAATGAAGGAAGCTCCGAA
<i>ActR II</i>	qRT-ActR II -F	TGAAGAGCAGCAAGCCACCAAG
	qRT-ActR II -R	CAGCGCCAGGCCAAAGTCAG
<i>Smad1/5</i>	qRT-Smad1-F	ATCAAGCAGACGCAGCAGAC
	qRT-Smad1-R	CCGTGGGCATGAAAGACCTC
<i>Smad3</i>	qRT-Smad3-F	GAAGACCCGAACACTCGCTG
	qRT-Smad3-R	ATGTGCAGTGGTCAAGAGCG
<i>Smad6</i>	qRT-Smad5-F	ATCGTGCACAAGCTTCCTCC
	qRT-Smad5-R	GCACCGAGTTCTGGTCGATG
18S	18S-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
	18S-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

**1.2.4 转录组测序分析** 通过 qRT-PCR 分析对照组和实验组相对表达量, 确保实验组中 *FcMstn* 基因表达被有效抑制后, 取出液氮中保存的样品, 使用 RNA 提取试剂盒(TaKaRa)进行总 RNA 的提取, 用 1.5%的琼脂糖电泳检查 RNA 完整性, NanoDrop2000 超微量分光光度计检测 RNA 浓度, 所有指标经检测合格后, 根据 qRT-PCR 的检测结果选取抑制效果最好的 3 个样品, 交送至广州基迪奥生物科技有限公司进行 cDNA 文库的构建以及高通量测序, 产出样品测序原始数据(raw reads), 对原始数据进行接头及低质量 reads 去除处理, 获得高质量的 clean 数据, 使用短 reads 组装软件 Trinity 对高质量 clean 数据进行 *de novo* 组装(Liang *et al*, 2013)得到 unigene。

组装得到的高质量 unigene 按照 Nr、Swissprot、KOG 和 KEGG ( $E$ -value<0.000 01)的优先级进行 Blast 比对, 得到与已有 unigene 具有最高相似性的同源序列, 从而得到该 unigene 的功能注释信息。基因表达量通过 FPKM(Mortazavi *et al*, 2008)方法进行标准化, 差异表达基因的阈值设置为  $P_{adj}$  (矫正后  $P$ -value)<0.05 和  $\log_2$ Fold $\geq$ 1 (C 组和 E 组), 使用 DEGseq (Wang *et al*, 2010)软件对差异表达 unigene 进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 干扰效果分析

通过 qRT-PCR 方法分析检测 C 组和 E 组 *FcMstn* 的相对表达水平, 结果显示, E 组的 *FcMstn* 相对表达量显著低于 C 组, 抑制率达到 76% (图 1)。

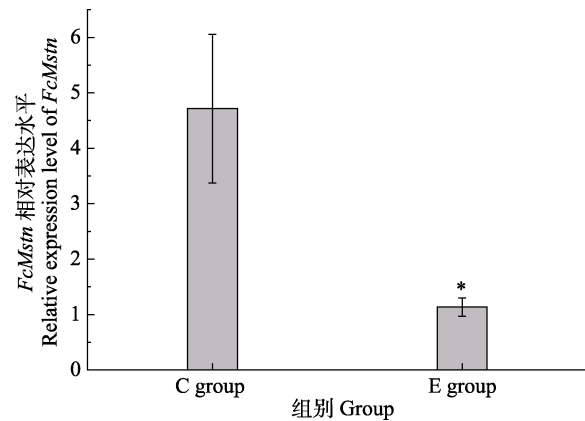


图 1 *FcMstn* 在对照组(C)和实验组(E)肌肉组织中的相对表达水平

Fig.1 Relative expression level of *FcMstn* in muscle in the control (C) and experimental (E) groups

“\*”表示两组间具有显著性差异( $P < 0.05$ )。下同  
“\*” indicates significant difference between two groups ( $P < 0.05$ ). The same as in Fig.4

### 2.2 数据组装和差异基因统计

将符合测序标准的 C 组和 E 组的肌肉组织总 RNA 送至广州基迪奥生物科技有限公司进行高通量测序和质量控制, 结果显示, 共产生 36,605 个 unigenes, Q30 碱基为 94.05%, N50 位 1107 bp, 表明测序质量良好, 组装完整性较高, 可用于后续的分析(表 2)。对获得的全部新基因与 Nr、Swissprot、KOG 和 KEGG 数据库进行比对, 获得注释信息的基因总数为 19,628 个, 占新基因总数的 53.62% (表 3)。在对照组和实验组样品中, 共筛选到 1657 个差异表达基因, 包括 805 个上调基因和 852 个下调基因(图 2)。

表2 转录组组装数据的特性  
Tab.2 Characteristics of assembly data

指标 Parameter	数值 Value
Q30	94.05%
unigene 数目	36.605
unigene GC 含量	49.096
unigene 中位长度	379 bp
unigene N50	1107 bp

表3 四大数据库注释统计  
Tab.3 Annotation statistics of four databases

项目 Items	数值 Value
Total unigenes	36,605
Nr	18,948
Swissprot	12,784
KOG	11,260
KEGG	10,067
Annotation genes	19,628
Without annotation gene	16,977

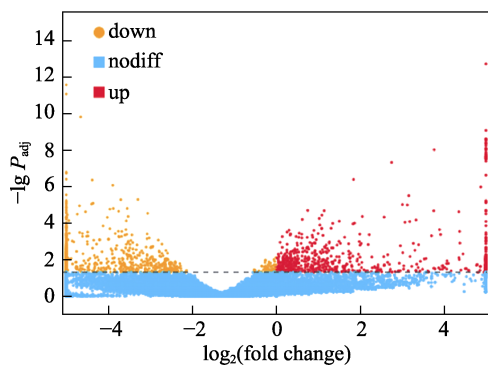


图2 中国对虾 *Mstn* 基因 RNA 干扰转录组差异基因火山图

Fig.2 Volcano plot of differentially expressed gene distribution of *FcMstn* RNA interference transcriptome

$P_{adj} < 0.05$  为差异基因筛选标准。有显著性差异表达的基因用红色点(上调)和黄色点(下调)表示, 无显著性差异表达的基因用蓝色点表示

The screening standard of differential genes is  $P_{adj} < 0.05$ . Red dots indicate the up-regulated genes with significant differences, yellow dots indicate the down regulated genes with significant differences, and no significant difference in the expression of genes with blue dots

### 2.3 *Mstn* 调控的肌肉发育相关基因的筛选

参考脊椎动物肌肉经典信号通路调控模式和差异基因的功能, 初步筛选出肌肉发育相关的基因(表4和表5)。从中国对虾转录组数据中查找到 *Mstn*, 实验组表达显著降低( $\log_2fc = -4.31$ ), 和定量结果一致, 进一步证明了 RNA 干扰的有效性。参考脊椎动物肌肉经典信号通路调控模式, 从中国对虾转录组数据中

共筛选到 16 个参与其调控通路的基因。其中, 参与 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的筛选到 12 个基因, 除 *Mstn* 外, 其他分别为 3 个卵泡抑素(follistatin, FST)家族成员(FST、FST Like 1 和 FST Like 5)基因, 3 个激活素受体(activin receptor, ActR)成员(ActRIA、ActRIB 和 ActR II)基因, 4 个 Smad 蛋白家族成员(Smad1/5、Smad3、Smad4 和 Smad6)基因和 1 个骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)家族成员(BMP-7)基因。参与 MAPK 信号通路的筛选到 4 个基因, 分别为 *p38*、*Erk*、*Ras* 和 *MAP3K7* 基因。通过基因的功能筛选到的非经典信号通路的与肌肉生长、蜕皮过程等密切相关的基因有 14 个, 其中包括  $\alpha$ -骨骼肌肌动蛋白( $\alpha$ -skeletal muscle actin)、肌球蛋白重链(myosin heavy chain)和肌钙蛋白 C (troponin-C)基因, 涉及蜕皮过程的蜕皮羧肽酶 A(molting fluid carboxypeptidase A)、蜕

表4 筛选到的参与 *Mstn* 调控的 TGF- $\beta$ /Smad 和 MAPK 信号通路的差异基因

Tab.4 Genes screening of TGF- $\beta$ /Smad 和 MAPK signal pathway regulated by *Mstn*

通路 Pathway	基因 Gene	表达模式 Expression pattern( $\log_2fc$ )
TGF- $\beta$ /Smad pathway	Myostatin ( <i>Mstn</i> )	-4.31
	Follistatin ( <i>FST</i> )	-1.81
	Follistatin-like 1 ( <i>FSTL1</i> )	-2.99
	Follistatin-like 5 ( <i>FSTL5</i> )	-8.12
	bone morphogenetic protein 7 ( <i>BMP-7</i> )	-2.19
	Activin receptor IA ( <i>ActR IA</i> )	-1.05
	Activin receptor IB ( <i>ActR IB</i> )	0.87
	Activin receptor II ( <i>ActR II</i> )	-3.36
	<i>Smad 1/5</i>	-0.91
	<i>Smad 3</i>	-0.65
	<i>Smad 4</i>	-0.77
	<i>Smad 6</i>	-2.17
MAPK pathway	<i>P38 MAPK</i>	-1.06
	<i>Ras</i>	-2.70
	<i>MAP3K7</i>	-0.89
	<i>Erk</i>	-9.07

注:  $\log_2fc$  表示 C 组和 E 组表达量的差异倍数, 正值表示 E 组表达量上调, 负值表示下调, 数值的绝对值代表上调或下调程度的大小。下同

Note:  $\log_2fc$  represents the ratio of the expression of C and E group, positive value represents up-regulation and negative value represents down-regulation. The absolute value represents the degree of up-regulation or down-regulation. The same as below

皮质激素受体 HR3、蜕皮激素受体 HR38、几丁质结合蛋白(chitin-binding protein) PCP20 和 CP14.6 型、几丁质酶(chitinase 1)、表皮蛋白(cuticle protein)基因, 参与肌肉生长的锌指蛋白 MLP84B (muscle LIM protein 84B, MLP 84B)、谷氨酰胺合成酶 2 (glutamine synthetase 2)、胰岛素样生长因子结合蛋白(IGF-binding protein)以及其参与脂肪代谢的脂肪酸结合蛋白 7 (fatty acid binding protein 7)基因。这些基因在 *Mstn* 被抑制后, 表现出不同程度的上调或下调表达模式(表 5)。在这些参与信号通路的相关基因中, 除 *ActR1B* 基因表现略微上调外, 其他基因均显示出不同程度的下调, 其中, *Erk*、*Wnt6*、*FSTL5*、*Mstn* 这 4 个基因下调表达变化较大。在非经典信号通路涉及的其他相关基因中, 检测到 8 个基因(谷氨酰胺合成酶 2、胰岛素样生长因子结合蛋白、 $\alpha$ -骨骼肌肌动蛋白、2 种几

丁质结合蛋白、蜕皮激素受体 3、蜕皮羧肽酶 A 和脂肪酸结合蛋白 7)上调, 其中, 几丁质结合蛋白 CP14.6、蜕皮羧肽酶 A、蜕皮激素受体 3 这 3 个与蜕皮相关的基因上调变化较大; 其他 6 个基因表现下调趋势, 其中, 肌钙蛋白 C、肌球蛋白重链、几丁质酶 ChiA 和表皮蛋白下调变化较大。

### 2.4 转录组数据的验证

为了验证转录组数据, 本研究根据转录组数据相关基因的序列, PCR 成功扩增并测序验证了 *ActR II*、*Smad1/5*、*Smad3* 和 *Smad6* 的编码区序列, 并进一步设计特异性引物检测了这些基因在 PBS 对照组和 RNA 实验组 12 h 的表达。结果显示, *ActR II*、*Smad1/5*、*Smad3* 和 *Smad6* 的表达量均显著下调, 这与转录组数据的下调趋势是一致的, 但下调程度有所差异。

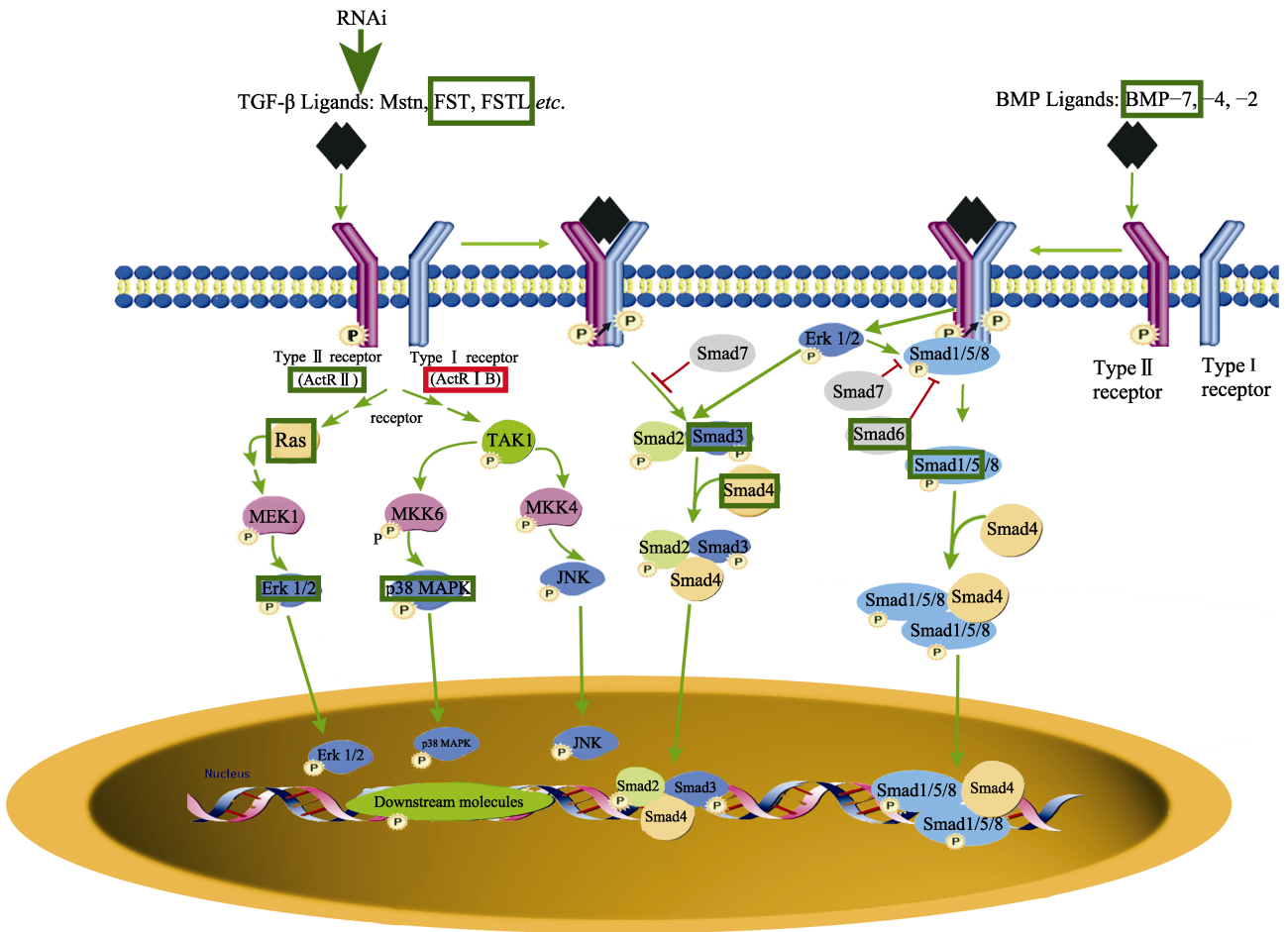


图 3 脊椎动物肌肉发育 TGF-β/Smad 信号通路

Fig.3 TGF-β/Smad signaling pathway related to muscle development in vertebrates

在中国对虾转录组数据中查找的基因用方框框出, 其中, 绿色框表示下调, 红色框表示上调

The genes from the transcriptome data of *F. chinensis* were boxed, in which the green box indicated down regulation and the red box indicated up regulation



表 5 筛选到的 *Mstn* 调控的肌肉生长发育相关的差异基因  
Tab.5 Screening of other genes related to muscle development regulated by *Mstn*

基因 Gene	表达模式 Expression pattern (log <sub>2</sub> fc)	功能 Function
锌指蛋白(肌肉 LIM 蛋白 84B) Zinc finger protein (Muscle LIM protein 84B, MLP 84B)	-1.17	参与肌肉生成过程中基因转录的调控
谷氨酰胺合成酶 2 Glutamine synthetase 2	2.05	促进肌肉生长, 防止肌肉蛋白分解
胰岛素样生长因子结合蛋白 IGF-binding protein	0.88	与胰岛素样生长因子结合, 促进生长
$\alpha$ -骨骼肌肌动蛋白 $\alpha$ -Skeletal muscle actin	0.43	骨骼肌纤维的主要蛋白质, 调节肌肉运动
肌钙蛋白 C Troponin-C	-4.36	参与肌肉收缩和放松
肌球蛋白重链 Myosin heavy chain	-3.89	肌肉的主要组成蛋白质, 为肌肉收缩提供力
几丁质结合蛋白(PCP20) Chitin-binding protein (PCP20)	3.92	在表皮形成、维护及功能的调节中起重要作用
几丁质结合蛋白 (CP14.6) Chitin-binding protein (CP14.6)	13.94	在表皮的形成、维护以及功能的调节中起重要作用
蜕皮激素受体 3 HR3	6.11	蜕皮调节转录因子, 调控蜕皮过程中相关基因的表达
蜕皮激素受体 38 HR38	-2.41	调控蜕皮激素早期应答基因、碳水化合物的代谢、表皮的形成
几丁质酶(查尔酮黄烷酮异构酶) Chitinase (ChiA)	-9.04	消化吸收老的角质层, 参与蜕皮过程
蜕皮羧肽酶 A molting fluid carboxypeptidase A	5.16	降解旧表皮, 参与蜕皮过程
表皮蛋白 Cuticle protein	-7.90	与几丁质结合形成纤维骨架控制表皮的钙化, 对新表皮的形成起到极其重要的作用, 参与蜕皮过程
脂肪酸结合蛋白(脂肪酸结合蛋白 7) Fatty acid binding protein (FABP7)	0.02	能结合及溶解长链多不饱和脂肪酸, 具有脂肪酸摄取及向胞内转运等功能, 调控细胞内的脂质代谢平衡

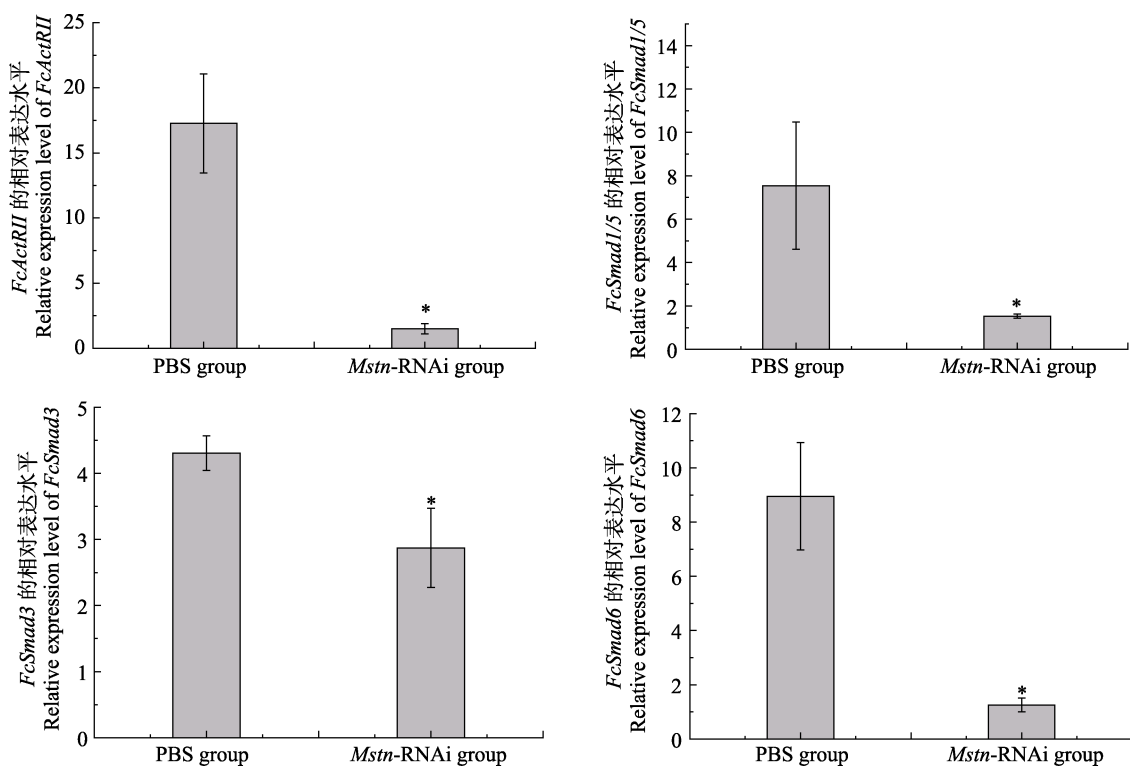


图 4 对照组和实验组肌肉中 *FcActR II*、*Smad1/5*、*Smad3* 和 *Smad6* mRNA 的相对表达

Fig.4 Relative expression of *FcActR II*, *Smad1/5*, *Smad3*, and *Smad6* mRNA in muscle in control and experimental groups

### 3 讨论

前期研究表明, 中国对虾 *Mstn* 可能与脊椎动物类似, 负向调控中国对虾肌肉生长(Kong *et al*, 2020)。鉴于目前尚不清楚在无脊椎动物中 *Mstn* 调控的肌肉生长相关的基因, 本研究以中国对虾为材料, 利用转录组分析的方法筛选了 *Mstn* 调控的肌肉生长相关的重要基因。

在脊椎动物中, 肌肉生长发育主要涉及到 TGF- $\beta$ /Smad (Thomas *et al*, 2000)、MAPK (Freudenberg *et al*, 2004)、Hedgehogs(Hh) (Munsterberg *et al*, 1995)、Wnt (Logan *et al*, 2004)等经典信号通路。在脊椎动物 *Mstn* 介导的 Smad 信号通路中, *Mstn* 能够结合多种蛋白, 如其前肽、FST、FSTL, 以及能阻断 *Mstn* 信号转导的其他物质, 如 ActR II B 等拮抗剂, 从而调节自身的激活, 随后通过 Smad2 和 Smad3 参与的 Smad 信号通路激活细胞核内相关靶基因发挥对肌肉的调控作用(Huang *et al*, 2011)。在脊椎动物 BMP 介导的 Smad 信号通路中, BMP 家族成员配体通过 Smad1/5/8 参与的 Smad 信号通路进入细胞核内, 最终启动靶基因转录。除了典型的 Smad 介导的信号途径外, MAPK 途径包括 p38、Erk1/2 和 JNK 途径, 也参与了肌肉发育的信号转导。在本研究中, 参考脊椎动物肌肉生长发育较为经典的 TGF- $\beta$ /Smad 和 MAPK 通路筛选到包含 *Mstn* 在内的 16 个相关信号通路基因, 其中只有 *ActR IB* 表现出轻微上调, 其他基因均表现出不同程度的下调, 表明 *Mstn* 被抑制后, 存在的上下游关系可能与脊椎动物类似, 进一步说明中国对虾肌肉生长涉及的 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路和 MAPK 信号通路可能与脊椎动物大体类似。脊椎动物中, FST 和 FSTL 具有促进肌肉生长的功能, 但其功能的发挥依赖于其与 *Mstn* 蛋白的 C 端配基结合, 从而抑制 *Mstn* 与其受体结合, 负性调节 *Mstn* 的功能(Matzuk *et al*, 1995; Lee *et al*, 2001; Li *et al*, 2011), 因此, 本研究 *Mstn* 基因被抑制也可能导致 FST 家族蛋白的下调。

不同于脊椎动物生长, 中国对虾的肌肉生长发育是经过多次蜕皮实现的, 蜕皮过程伴随着旧表皮的脱落、新表皮的形成和肌肉的收缩舒张等过程。除了参与经典的肌肉发育信号通路基因外, 本研究也筛选出一些与蜕皮、肌肉生长和肌肉收缩等相关的基因, 可见这些基因对肌肉的生长发育和蜕皮也起着至关重要的作用。本研究根据差异基因的功能初步筛选出 14 个与肌肉生长、肌肉运动和蜕皮相关的基因。其中, 锌指蛋白 MLP84B、谷氨酰胺合成酶 2、胰岛素样生长因子结合蛋白与肌肉发育密切相关, 促进肌肉

生长和发育的谷氨酰胺合成酶和胰岛素样生长因子结合蛋白基因被检测到上调, 提示 *Mstn* 的抑制可能会促进肌肉的生长。蜕皮羧肽酶 A、蜕皮激素受体 HR3、蜕皮激素受体 HR38、几丁质结合蛋白、几丁质酶、表皮蛋白可能与蜕皮过程密切相关, 甲壳动物通过周期性蜕去旧的表皮, 产生新表皮来进行生长发育。甲壳类蜕皮过程是一个有众多基因互相作用协同的复杂过程, 中国对虾 *Mstn* 被抑制后, 蜕皮相关的基因也出现了不同程度的上下调表达, 表明由 *Mstn* 抑制引起的相关肌肉应答系统的改变也能引起蜕皮相关基因的变化, 而具体这些基因如何作用于蜕皮过程还需要更多的研究。脊椎动物中研究报道  $\alpha$ -骨骼肌肌动蛋白、肌球蛋白重链和肌钙蛋白 C 参与肌肉收缩和放松(Rayment *et al*, 1993; Polyakov *et al*, 1997; Farah *et al*, 1999), 中国对虾的生长发育、运动觅食和蜕皮等生命活动都离不开肌肉收缩与舒张, 中国对虾 *Mstn* 的抑制能够引起这些基因的差异表达, 表明这些基因很可能在中国对虾肌肉生长和蜕皮中发挥着关键的作用。

综上所述, 本研究通过 RNA 干扰有效沉默 *Mstn* 基因, 利用转录组测序分析, 参考脊椎动物肌肉发育调控模式和差异基因功能, 首次在无脊椎动物中筛选出了 *Mstn* 调控的与肌肉生长发育相关的基因, 这些基因将为后续深入解析无脊椎动物肌肉调控网络和调控机制提供有价值的信息, 关于这些基因在对虾中的生理功能及其 *Mstn* 调控的肌肉发育调控模式还需开展更多探索。

### 参 考 文 献

- FARAH C S, REINACH C F. The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB Journal*, 1999, 9: 755-767
- FREUDENBERG J A, CHEN D, CHEN W T. Stable suppression of membrane type 1 matrix metalloproteinase impairs MMP-2 activation, cell invasion, and tumorigenesis. *Cellular, Molecular, and Tumor Biology*, 2004, 64(S7): 529-530
- HUANG Z, CHEN X, CHEN D. Myostatin: A novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. *Cellular Signalling*, 2011, 23(9): 1441-1446
- KAMBADUR R, SHARMA M, SMITH T P L, *et al*. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 1997, 7(9): 910
- KONG J, YAN Y, LU X, *et al*. Integrative phenotypic and gene expression data identify myostatin as a muscle growth inhibitor in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 5985

- LANGLEY B, THOMAS M, BISHOP A, *et al.* Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 277(51): 49831–49840
- LEE S J, MCPHERRON A C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2001, 98(16): 9306–9311
- LI S, ZHOU Z, DONG Y, *et al.* Molecular characterization, expression analysis of the myostatin gene and its association with growth traits in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 201: 12
- LI X, NIE F, YIN Z, *et al.* Enhanced hyperplasia in muscles of transgenic zebrafish expressing Follistatin1. *Science China Life Sciences*, 2011, 54(2): 65–71
- LIANG C, LIU X, YIU S M, *et al.* De novo assembly and characterization of *Camelina sativa* transcriptome by paired-end sequencing. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 146
- LOGAN C Y, NUSSE R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004, 20(1): 781–810
- MATZUK M M, LU N, VOGEL H, *et al.* Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*, 1995, 374(6520): 360–363
- MCPHERRON A C, LEE S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(23): 12457–12461
- MORIKAWA M, DERYNCK R, MIYAZONO K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2016, 8(5): a021873
- MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Natural Methods*, 2008, 5(7): 621–628
- MUNSTERBERG A E, KITAJEWSKI J, BUMCROT D A, *et al.* Combinatorial signaling by sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes and Development*, 1995, 9(23): 2911–2922
- POLYAKOV A A, GUSEV N B. Utilization of troponin C as a model calcium-binding protein for mapping of the calmodulin-binding sites of caldesmon. *Biochemical Journal*, 1997, 321(3): 873–878
- RAYMENT I, HOLDEN H, WHITTAKER M, *et al.* Structure of the actin- myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*, 1993, 261(5117): 58–65
- THOMAS M, LANGLEY B, BERRY C, *et al.* Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(51): 40235–40243
- WANG L, FENG Z, WANG X, *et al.* DEGseq: An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 136–138
- ZHANG Q, LI F, ZHANG X, *et al.* cDNA cloning, characterization and expression analysis of the antioxidant enzyme gene, catalase, of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2008, 24(5): 584–591
- ZHUO R Q, ZHOU T T, YANG S P, *et al.* Characterization of a molt-related myostatin gene (*FmMstn*) from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*. *General and Comparative Endocrinology*, 2017, 248: 55–68

(编辑 冯小花)



## Screening of Genes Related to Muscle Growth under the *Myostatin* Regulation by RNA-Seq in *Fenneropenaeus chinensis*

YAN Yunjun<sup>1</sup>, LU Xia<sup>2</sup>, MENG Xianhong<sup>2</sup>, LUAN Sheng<sup>2</sup>, CHEN Baolong<sup>2</sup>, KONG Jie<sup>1,2</sup><sup>①</sup>

(1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi, Jiangsu 214081, China; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao); Key Laboratory of Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

**Abstract** *Myostatin (Mstn)* is one of the main regulatory factors of embryonic muscle formation and adult muscle growth in vertebrates, which inhibits muscle growth and development by inhibiting the expansion and differentiation of muscle cells. Our previous researches have preliminarily suggested that *Mstn* involved in myogenesis and muscle growth probably as a negative regulator in *Fenneropenaeus chinensis* like vertebrates. In order to screen genes related to muscle growth regulated by *Mstn* in *F. chinensis* and understand the mechanism of muscle growth regulation, RNA-Seq technology was used to sequence control group injected PBS and experimental group injected siRNA for inhibition of *Mstn* expression. The results showed that a total of 36,605 unigenes were produced and 19,628 genes were annotated by transcriptome analysis. Under the inhibition of *Mstn* expression by RNAi, a total of 1657 differentially expressed genes were screened, of which 805 genes were significantly up regulated and 852 genes were significantly down regulated. Referring to the previous reports of TGF- $\beta$ /Smad and MAPK pathways as well as function of differential genes, 29 genes related to muscle growth regulated by *Mstn* were preliminarily screened. In these genes, 16 genes were involved in TGF- $\beta$ /Smad and Mapk pathways. Among the 16 genes, only the ActRI was detected to be slightly up-regulated and other genes showed different degrees of down-regulation. The other screened 13 genes were involved in molting, muscle growth and other processes related muscle such as muscle contractions, of which the genes correlated with promoting muscle growth were detected up-regulation. The results of this study provided further evidence for our previous studies that *Mstn* probably negatively regulates muscle growth in a similar way to vertebrate in *F. chinensis*. Our results will also provide important theoretical basis for the regulation mechanism of muscle development in invertebrate.

**Key words** *Mstn*; Transcriptome; Gene screening; Signal pathway; Muscle growth and development

① Corresponding author: KONG Jie, E-mail: kongjie@ysfri.ac.cn