



胡帅帅, 王文洲, 闫晓荣, 等. 新西兰白兔中 *Myh6* 基因的表达及与肌纤维性状的相关性[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(2): 12-17.

# 新西兰白兔中 *Myh6* 基因的表达及与肌纤维性状的相关性

胡帅帅, 王文洲, 闫晓荣, 赵博昊, 朱 杰, 郝 晔, 陈 阳, 吴信生  
(扬州大学 动物科学与技术学院/江苏省动物繁育与分子设计重点实验室, 江苏 扬州 225009)

**摘要:**【目的】分析 *Myh6* 基因在新西兰白兔 *Oryctolagus cuniculus* 肌肉中的表达规律及与肌纤维特性的相关性, 探究 *Myh6* 基因在肌纤维发育过程中的作用。【方法】利用冰冻切片技术测量了 2、4、6、8、10、12 周龄新西兰白兔背腿肌中不同类型肌纤维的密度、面积、长径和短径等性状, 采用 qRT-PCR 测量了 *Myh6* 基因在不同周龄新西兰白兔背腿肌中的表达量, 分析了上述性状与 *Myh6* 基因表达的相关性。【结果】2~8 周龄新西兰白兔各类型肌纤维的密度逐渐变小, 面积、长径和短径则逐渐变大(白肌纤维短径除外, 仅在 2~6 周龄有变大趋势)。 *Myh6* 基因在 4 周龄表达量最高。 *Myh6* 基因表达量与公兔背部红肌纤维的面积呈极显著负相关 ( $P < 0.01$ ), 与公兔腿部红肌纤维的密度呈极显著正相关 ( $P < 0.01$ )。【结论】 *Myh6* 基因表达与肌纤维类型和肌纤维的生长发育密切相关。

**关键词:** 兔; 肌纤维; 冰冻切片; *Myh6*; 相关性分析  
中图分类号: S828      文献标志码: A      文章编号: 1001-411X(2017)02-0012-06

## *Myh6* gene expression and its correlation with muscle fiber traits of New Zealand white rabbits

HU Shuaishuai, WANG Wenzhou, YAN Xiaorong, ZHAO Bohao, ZHU Jie, HAO Ye, CHEN Yang, WU Xinsheng  
(College of Animal Science and Technology, Yangzhou University/Jiangsu Key Laboratory of Animal Genetics & Breeding and Molecular Design, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:**【Objective】To analyze *Myh6* gene expression and its correlation with the muscle fiber traits of New Zealand white rabbits, and explore the role of *Myh6* gene during the development of muscle fibers.【Method】Density, area, long and short diameters for back and leg muscle fibers were measured for 2-, 4-, 6-, 8-, 10- and 12-week-old New Zealand white rabbits using the frozen section technique. *Myh6* gene expressions in back and leg muscles of rabbits at different ages were estimated using qRT-PCR. The correlations between *Myh6* gene expression and muscle traits were analyzed.【Result】The density of various muscle fibers gradually decreased, but the area, long and short diameters of muscle fibers increased from two to eight weeks, except for the short diameters of white muscle fibers increased from two to six weeks. The expression level of *Myh6* gene was the highest in 4-week-old rabbit. The expression level of *Myh6* gene was significantly ( $P < 0.01$ ) negatively correlated with the red muscle fiber area of male rabbit back muscles, and significantly ( $P < 0.01$ ) positively correlated with the red muscle fiber density of male rabbit leg muscles.【Conclusion】 *Myh6* gene expression is closely related to type and growth of muscle fibers.

**Key words:** rabbit; muscle fiber; frozen section; *Myh6*; correlation analysis

肌纤维是肌肉的基本单位。不同类型肌纤维的收缩、代谢等特性不同,其主要是由肌纤维的生长发育及肌纤维类型的相互转化决定,该因素进一步导致不同类型肌纤维组成的肌肉的差异,最终影响肌肉品质<sup>[1]</sup>。肌纤维性状受到遗传物质基础和营养环境的共同影响,最终决定子代早期生长发育乃至成年期的表型。研究家兔 *Oryctolagus cuniculus* 发育早期与肌肉生长相关基因的表达规律及相关性有助于了解家兔肌纤维形成的分子机制。新西兰白兔是从国外引进的优良肉兔品种,其肉用性能在经过多代选育后得到了提高,具有生长速度快、饲料报酬高、屠宰性能好和适应性较强等优点,同时还作为理想的试验动物,广泛应用于医药学、生物学领域。本研究以新西兰白兔为试验素材,利用冰冻切片技术分析不同周龄背腿肌中肌纤维性状,探明其不同发育阶段肌肉组织结构之间的差异,为优质肉兔品种资源的保护、开发和利用提供参考依据。

在前期研究中,我们利用基因芯片筛选技术发现的 *Myh6* 基因与肌肉的生长发育密切相关。付睿琦<sup>[2]</sup>通过蛋白质组学技术筛选北京油鸡肌肉发育相关基因,发现 *Myh6* 基因可能参与肌肉细胞骨架结构。斑马鱼 *wea* 突变体由于干扰了斑马鱼 *Myh6* 基因的正常表达导致了心房收缩缺陷<sup>[3]</sup>;射血分数降低的左心房发育不良也与 *Myh6* 隐性突变有关<sup>[4]</sup>; *Myh6* 的变异能引起病态窦房结综合征<sup>[5]</sup>。 *Myh6* 是肌球蛋白重链基因家族的一员,但是该基因家族对骨骼肌影响的研究鲜见报道。本研究采用实时荧光定量 PCR 技术分析 *Myh6* 基因在不同周龄背腿肌中的表达水平,并针对新西兰白兔不同周龄不同类型肌纤维性状与 *Myh6* 基因的表达水平进行相关性分析,以揭示 *Myh6* 基因在新西兰白兔肌肉发育过程中作用,为家兔肉品质的改良提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

新西兰白兔由江苏省南京市金陵总兔场提供,在相同环境条件下饲养,分别于 2、4、6、8、10、12 周龄时屠宰,每个周龄公母兔各取 15 只,取背最长肌(以下简称背肌)和后腿内侧肌肉(即股四头肌,以下简称腿肌)适当大小各 2 块,一块用于冰冻切片制作,另一块用于总 RNA 提取。

1.2 组织学测定

取出样品,修块,放入冰冻切片机的快速冷冻架上,进行切片,切片厚度 5~10 μm。把切片样贴于

载玻片上,染色,封片,显微镜观察,取平均值±标准误用于结果分析。

1.3 RNA 提取及 cDNA 制备

采用 Trizol 法提取肌肉组织总 RNA。再使用 Super RT cDNA Kit(购于北京康为世纪生物科技有限公司)制备 cDNA 样品,置于 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.4 引物设计及合成

根据 GenBank 公布的家兔基因的 mRNA 序列(NC\_013685.1),利用 NCBI 网站 Primer-BLAST 在线引物设计程序设计得到了 *Myh6* 基因的荧光定量引物和内参基因 *GAPDH* 引物序列,由上海生工生物有限公司合成。引物信息见表 1。

表 1 引物信息  
Tab.1 Primer information

| 基因           | 引物序列<br>(5'→3')        | 产物大小<br>/bp | 退火温度<br>/℃ |
|--------------|------------------------|-------------|------------|
| <i>Myh6</i>  | F:TCACCTACCAGACGGAGGAG | 234         | 61         |
|              | R:TTAACAAGAGCGGGGTTCCG |             |            |
| <i>GAPDH</i> | F:TCACCATCTTCCAGGAGCGA | 293         | 60         |
|              | R:CACAATGCCGAAGTGTCGT  |             |            |

1.5 实时荧光定量 PCR

利用染料法(SYBR GreenI)进行实时荧光定量 PCR 分析,预混体系购于北京康为世纪生物科技有限公司,根据说明书优化反应体系后,于冰上配制反应体系。每个样品设置 3 个重复,利用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, USA)分析 PCR 过程中荧光信号值的变化,并获取到各样品基因的 *Ct* 值,用 *GAPDH* 基因作为内参对表达水平均一化处理,并通过  $\Delta\Delta C_t$  方法来计算基因表达的差异倍数。

1.6 数据分析

相对定量的结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行分析。运用 SPSS 软件中 Pearson Correlation 分析 *Myh6* 基因表达和肌纤维性状的相关性,数据图采用平均值±标准误。

2 结果与分析

2.1 冰冻切片

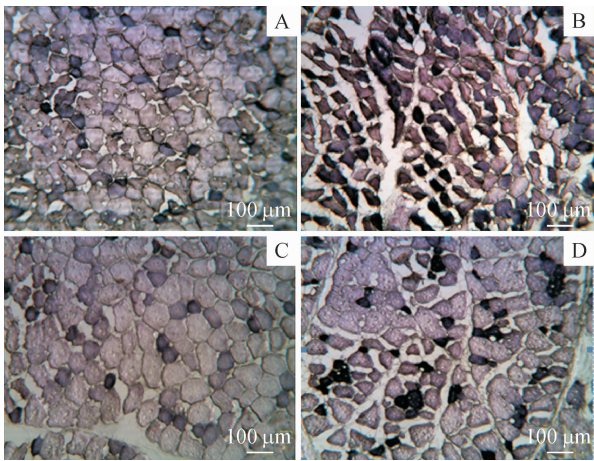
新西兰白兔 2、4、6、8、10 和 12 周龄背腿肌采用冰冻切片制片后,经琥珀酸脱氢酶染色法染色,根据染色的深浅判断不同的肌纤维类型。如图 1 所示,染色最深呈蓝紫色的为红肌纤维,染色最浅的为白肌纤维,染色中等的为中间型肌纤维。研究结果表

明,新西兰白兔2、4、6、8、10和12周龄公母兔的背肌和腿肌均具有红肌纤维、白肌纤维和中间型肌纤维3种肌纤维类型。

2.2 新西兰白兔肌纤维的密度和面积

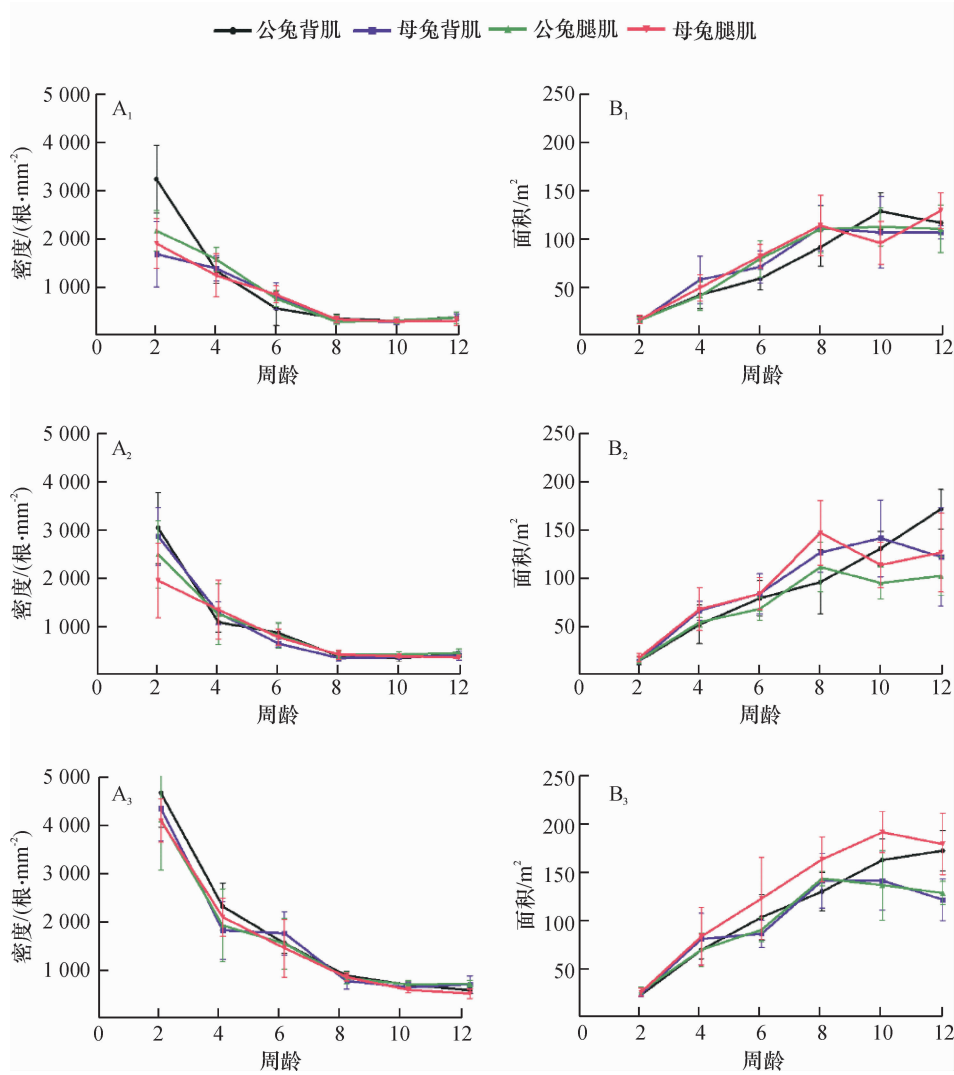
肌纤维密度和面积是重要的肌纤维性状之一。肌纤维密度与肌纤维面积成反比例关系,即肌纤维面积越大,密度越小;肌纤维面积越小,密度越大。不同周龄新西兰白兔肌纤维密度和面积统计结果如图2所示,各类肌纤维的密度随着周龄数的增加而变小,2~8周龄,这种变小的趋势很明显,8~12周龄,趋势越来越小,几乎保持不变。整体来看,随着周龄数的增加,密度逐渐减小,但减小的趋势越来越不明显(图2A<sub>1</sub>、2A<sub>2</sub>、2A<sub>3</sub>)。

在2~8周龄,肌纤维的面积随着周龄数的增加而逐渐变大,8周龄以后,面积变化的趋势不明显(图2B<sub>1</sub>、2B<sub>2</sub>、2B<sub>3</sub>)。



A: 公兔背肌; B: 公兔腿肌; C: 母兔背肌; D: 母兔腿肌。

图1 新西兰白兔公母兔背肌和腿肌的冰冻切片结果(8周龄)  
Fig.1 Frozen section examination of back muscle and leg muscle of New Zealand white rabbits (8-week-old)



A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 和 A<sub>3</sub> 分别表示红肌纤维、中间型肌纤维和白肌纤维密度;B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 和 B<sub>3</sub> 分别表示红肌纤维、中间型肌纤维和白肌纤维面积。

图2 不同周龄新西兰白兔肌纤维密度和面积  
Fig.2 Muscle fiber density and area of New Zealand white rabbits at different ages

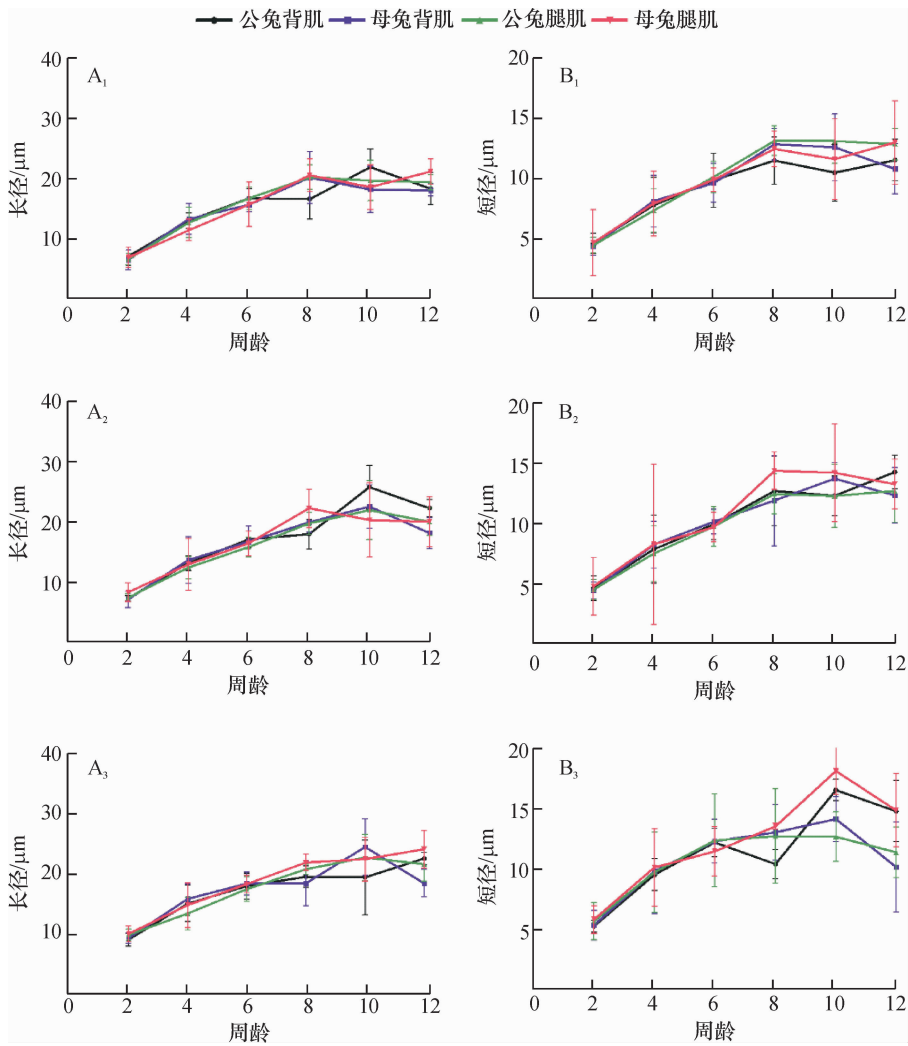
2.3 新西兰白兔肌纤维的长径和短径

随着周龄数的增大,新西兰白兔的背腿部各类肌纤维的长径和短径在2至8周龄(白肌纤维短径在2至6周龄)期间不断变大,在后期变化的趋势不明显(图3)。

2.4 *Myh6* 基因在不同周龄背腿肌中的表达

利用实时荧光定量 PCR 技术,检测了 *Myh6* 基

因在新西兰白兔不同生长发育阶段背腿肌中的表达水平。结果(图4)发现,随着周龄的增大,*Myh6* 基因在新西兰白兔背腿肌中的表达量都呈现出先增大再变小最后趋于稳定的趋势,4周龄表达量最高。*Myh6* 基因在母兔背肌中的表达量在6周龄以后基本趋于稳定,在母兔腿肌及公兔背腿肌中的表达量在8周龄以后趋于稳定。



A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 和 A<sub>3</sub> 分别表示红肌纤维、中间型肌纤维和白肌纤维长径;B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 和 B<sub>3</sub> 分别表示红肌纤维、中间型肌纤维和白肌纤维短径。

图3 不同周龄新西兰白兔肌纤维长径和短径

Fig.3 Long and short diameters for muscle fibers of New Zealand white rabbits at different ages

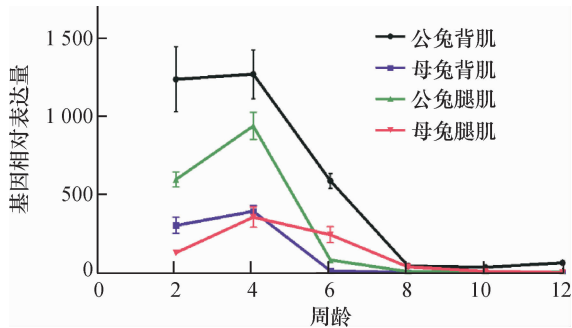


图4 *Myh6* 基因在不同周龄新西兰白兔背腿肌中表达水平  
Fig.4 Expression levels of *Myh6* genes in back and leg muscles of New Zealand white rabbits at different ages

2.5 *Myh6* 基因表达与肌纤维性状的相关分析

*Myh6* 基因在背肌中的表达量与各类肌纤维性状的相关分析结果如表2所示。该基因在公兔背肌中的表达量与红肌纤维的面积呈极显著负相关( $P < 0.01$ );与红肌纤维和中间型肌纤维的密度均呈显著正相关( $P < 0.05$ );与白肌纤维的密度、中间型肌纤维和白肌纤维的面积、3种肌纤维的长径、红肌纤维和中间型肌纤维的短径均呈显著负相关( $P < 0.05$ );该基因在母兔背部中的表达量与红肌纤维的密度呈显著正相关( $P < 0.05$ );与3种肌纤维的面积、长径、

红肌纤维和中间型肌纤维的短径均呈显著负相关( $P < 0.05$ )。该基因在公兔腿肌中的表达量与红肌纤维密度呈极显著正相关( $P < 0.01$ )(表 3)。

表 2 *Myh6* 基因表达量与背部肌纤维性状的相关分析<sup>1)</sup>  
Tab.2 Correlation analysis between *Myh6* gene expression and back muscle fiber traits

| 性别 | 肌纤维类型  | 密度       | 面积        | 长径       | 短径       |
|----|--------|----------|-----------|----------|----------|
| 公兔 | 红肌纤维   | 0.811 *  | -0.929 ** | -0.851 * | -0.898 * |
|    | 中间型肌纤维 | 0.785 *  | -0.868 *  | -0.878 * | -0.898 * |
|    | 白肌纤维   | -0.860 * | -0.928 *  | -0.866 * | -0.784   |
| 母兔 | 红肌纤维   | 0.901 *  | -0.901 *  | -0.843 * | -0.873 * |
|    | 中间型肌纤维 | 0.775    | -0.795 *  | -0.839 * | -0.855 * |
|    | 白肌纤维   | 0.727    | -0.818 *  | -0.876 * | -0.778   |

1) \* 和 \*\* 分别表示相关性达 0.05 和 0.01 的显著水平。

表 3 *Myh6* 基因表达量与腿部肌纤维性状的相关分析<sup>1)</sup>  
Tab.3 Correlation analysis between *Myh6* gene expression and leg muscle fiber traits

| 性别 | 肌纤维类型  | 密度       | 面积     | 长径     | 短径     |
|----|--------|----------|--------|--------|--------|
| 公兔 | 红肌纤维   | 1.000 ** | -0.750 | -0.716 | -0.735 |
|    | 中间型肌纤维 | 0.689    | -0.748 | -0.732 | -0.759 |
|    | 白肌纤维   | 0.431    | -0.691 | -0.638 | -0.638 |
| 母兔 | 红肌纤维   | 0.577    | -0.595 | -0.606 | 0.561  |
|    | 中间型肌纤维 | 0.561    | -0.548 | -0.591 | -0.629 |
|    | 白肌纤维   | 0.727    | -0.609 | -0.661 | -0.566 |

1) \*\* 表示相关性达 0.01 的显著水平。

### 3 讨论与结论

各类肌纤维经琥珀酸脱氢酶染色法染色后均表现出不同的颜色。解祥学等<sup>[6]</sup>研究得出,不同类型肌纤维的琥珀酸脱氢酶活性不同,导致染色的结果不同,红肌纤维琥珀酸脱氢酶活性最强,染成蓝紫色,白肌纤维琥珀酸脱氢酶活性很低,不着色或者着色非常淡,而中间型纤维着色处于两者之间。不同品种肉牛,同一部位的肌纤维类型比例、肌纤维直径和肌纤维密度是存在差异的;6 个品种牛不同部位均是白肌纤维直径 > 中间纤维直径 > 红肌纤维直径,肉牛与新西兰白兔 3 种肌纤维直径大小之间的差异趋势基本一致。陈岩锋等<sup>[7]</sup>在闽西南黑兔 70、90、120 日龄时测得背最长肌肌纤维直径分别为 38.48、34.67、42.28  $\mu\text{m}$ ,背最长肌肌纤维面积分别为 1 095.49、879.15、1 322.39  $\mu\text{m}^2$ ,背最长肌肌纤维密度分别为 419.09、418.88、332.10 根· $\text{mm}^{-2}$ ,并指出背最长肌的密度随着日龄数的增加而逐渐变

<http://xuebao.scau.edu.cn>

小。本试验测得 10 周龄新西兰白兔背部和腿部红肌纤维、中间型肌纤维和白肌纤维的面积长径的结果与以上结果基本一致。赵海全等<sup>[8]</sup>对 56 日龄的天农草鸭的胸肌、腿肌肌纤维直径进行测定,测得公鸭胸肌、腿肌肌纤维直径分别为 37.84、50.76  $\mu\text{m}$ ,母鸭胸肌、腿肌肌纤维直径分别为 32.78、43.62  $\mu\text{m}$ 。本试验测得的 8 周龄新西兰白兔背部和腿部红肌纤维、中间型肌纤维和白肌纤维的长径结果与以上结果差异不明显,说明该试验结果的可靠性。另外,骨骼肌纤维的长短和粗细随肌肉的种类和生理状况而异,一般长 1~40  $\mu\text{m}$ ,直径 10~100  $\mu\text{m}$ <sup>[9-12]</sup>。在本试验中测得的各周龄新西兰白兔背部和腿部红肌纤维、中间型肌纤维和白肌纤维的长径和短径结果基本在这一范围内。

研究表明,*Myh6* 基因在心肌发育过程中发挥了重要作用。*Myh6* 基因表达的下调可能会引起心房间隔缺陷<sup>[13]</sup>,*Myh6* 等位基因的突变能抑制肥大型心肌病<sup>[14]</sup>,该基因表达变化对左心室的结构和功能改变有一定的影响<sup>[15]</sup>,*Mef2* 缺失的果蝇 *Myh6* 基因表达下调,可出现肌球蛋白重链缺失<sup>[16]</sup>,表明 *Myh6* 基因对肌肉发育至关重要。在前期研究中,我们筛选的差异基因 *Myh6* 与家兔肌肉发育密切相关。本研究利用实时荧光定量 PCR 法对新西兰白兔不同周龄背部和腿部肌肉中 *Myh6* 基因的表达规律进行了相对定量分析,发现 *Myh6* 基因在该家兔品种中表达是随着周龄数的增加表达量先变大后变小最后趋于稳定,但是尚未发现这种表达量变化发生的机制。通过其表达量结果与切片结果的联合分析可以看出,该基因与肌纤维发育相关。该基因在 4 周龄表达量最高,与新西兰白兔在 4 周龄左右处于发育高峰期、肌肉的生长速度较快相一致。家兔在 8 周龄以后肌肉发育相对平缓,该基因在 8 周龄以后表达量趋于稳定。该基因在新西兰白兔母兔背肌中的表达量在 6 周龄后基本趋于稳定,在公兔背肌中的表达量在 8 周龄之后趋于稳定,公兔在 6~8 周龄时肌肉发育的速度大于母兔。根据 *Myh6* 基因表达量与新西兰白兔背腿部肌纤维性状的关联分析结果,说明家兔肌纤维的生长发育可能受 *Myh6* 基因表达的调控。

#### 参考文献:

[1] 郑洁, 邝良德, 张翔宇, 等. 兔肌纤维组织特性对肉质影响的研究进展[J]. 中国养兔, 2014(4): 31-33.  
[2] 付睿琦. 利用蛋白质组学技术研究北京油鸡肌肉发育

和肌内脂肪沉积的分子机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.

[3] BERDOUGO E, COLEMAN H, LEE D H, et al. Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish[J]. *Development*, 2003, 130(24): 6121-6129.

[4] THEIS J L, ZIMMERMANN M T, EVANS J M, et al. Recessive *MYH6* mutations in hypoplastic left heart with reduced ejection fraction [J]. *Circ-Cardiovasc Gene*, 2015, 8(4): 564-571.

[5] HOLM H, GUDBJARTSSON D F, SULEM P, et al. A rare variant in *MYH6* is associated with high risk of sick sinus syndrome[J]. *Nat Genet*, 2011, 43(4): 316-320.

[6] 解祥学, 孟庆翔, 任丽萍, 等. 我国 6 个肉牛品种肌肉纤维特征研究[J]. *中国农业大学学报*, 2011, 16(1): 66-72.

[7] 陈岩锋, 陈冬金, 孙世坤, 等. 闽西南黑兔肌纤维特性与肉质关系的研究[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(20): 26-31.

[8] 赵海全, 李华, 刘为民, 等. 天农草鸭肌纤维直径与嫩度关系研究[C]//中国畜牧兽医学动物解剖学与组织胚胎学分会. 中国畜牧兽医学动物解剖学及组织胚胎学分会第十六次学术研讨会论文集. 西宁: 中国畜牧兽医学动物解剖学与组织胚胎学分会, 2010:6.

[9] 朱淑斌, 赵旭庭, 周春宝, 等. 姜曲海猪肌肉组织学特性与肉质性状的相关性[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(4): 205-207.

[10] 魏法山, 康相涛, 李国喜, 等. 固始鸡生长过程中不同类型肌纤维面积比的变化[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2006, 34(2): 7-11.

[11] 张丽, 孙宝忠. 肌纤维类型与生理代谢、生长性能及肉质的关系[J]. *肉类研究*, 2013, 27(8): 25-30.

[12] 高儒松, 张春霞, 赵红艳. 肌肉组织学特性与肉品质的关系[J]. *肉类研究*, 2009 (5): 11-15.

[13] 宋怀婷, 梁洁, 莫小阳, 等. Nodal 蛋白的表达、纯化及多克隆抗体制备[J]. *激光生物学报*, 2010, 19(6): 813-816.

[14] JIANG J M, WAKIMOTO H, SEIDMAN J G, et al. Allele-specific silencing of mutant *Myh6* transcripts in mice suppresses hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Science*, 2013, 342(6154): 111-114.

[15] MOHAMMAD F. The effect of endurance exercise on *Myh6* gene expression and structural and functional changes of left ventricular[J]. *Qom Univ Med Sci J*, 2016, 9(11): 22-32.

[16] LIN Q, SCHWARZ J, BUCANA C, et al. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C [J]. *Science*, 1997, 276 (5317): 1404-1407.

【责任编辑 庄 延】