

宋 迟,宋卫涛,胡 艳,等. 鸭肝脏 *IGF1* 基因早期发育表达[J]. 江苏农业科学,2015,43(8):42-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.012

鸭肝脏 *IGF1* 基因早期发育表达

宋 迟,宋卫涛,胡 艳,单艳菊,陶志云,朱春红,束婧婷,李慧芳
(江苏省家禽科学研究所,江苏扬州 225003)

摘要: *IGF1* 是重要的生长调控因子,在胚后生长发育过程中的主要来源为肝脏。以高邮鸭、金定鸭 2 个地方鸭品种为研究对象,对胚胎期和出雏早期鸭肝脏 *IGF1* mRNA 的表达规律进行了比较研究。采用荧光定量 PCR 和原位杂交技术研究了鸭 13、17、21、25、27 胚龄和出雏后 7 d 肝脏 *IGF1* mRNA 的表达情况。结果表明,2 个品种鸭肝脏 *IGF1* mRNA 在 13 胚龄均已少量表达,到出雏前鸭肝脏 *IGF1* 表达量显著增高,7 d 时, *IGF1* mRNA 在高邮鸭肝脏的表达量显著高于金定鸭。原位杂交结果显示,肝脏循环系统中 *IGF1* mRNA 的表达明显高于周边肝脏组织。肝脏 *IGF1* mRNA 的表达可能在鸭早期发育过程中发挥着重要作用。

关键词: 鸭;肝脏; *IGF1* 基因;早期发育;原位杂交

中图分类号: S834.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0042-03

动物骨骼肌的发生、生长在胚胎期即受到严格的调控,生长激素等可通过胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factors, IGFs) 发挥对动物生长的调控作用^[1-3]。 *IGF1* 可以通过与靶器官上的 IGFs 受体 (insulin-like growth factor receptor, IGF-R) 结合,从而促进蛋白合成,影响肌肉干细胞增殖、成肌细胞分化以及肌管融合等,起到促进动物骨骼肌生长发育的作用^[4]。研究表明,在肌肉中过表达 *IGF1* 基因,会引起肌纤维肥大,蛋白合成增加,促进成肌细胞增殖。Mitchell 等在鸡胚发育的 24 期通过逆转录病毒转入 *IGF1* 基因,使基因过表达,结果发现鸡腿肌明显增大,肌纤维数增多^[5]。Scanes 等研究发现,51 d 时快长型雏鸡血清中 *IGF1* 水平显著高于慢长型鸡^[6]。除胚胎期外,肝脏是动物体内 *IGF1* 最主要的来源^[7]。目前,关于鸭胚胎期 *IGF1* 发育变化研究较少。葛盛芳等研究发现,12 d 胚龄的高邮鸭鸭胚血清中可检测到 *IGF1*,生长速度较快的高邮鸭血清中 *IGF1* 浓度高于生长速度较慢的绍兴蛋鸭,但是鸭胚胎期及胚后发育早期肝脏中 *IGF1* mRNA 表达情况尚待研究^[8]。高邮鸭、金定鸭是我国地方鸭品种,这 2 个品种在生长速度上存在明显表型差异。本研究以高邮鸭、金定鸭为研究对象,采用实时荧光定量分析技术、原位杂交技术,对鸭胚胎期肝脏中 *IGF1* mRNA 表达进行探讨,研究我国不同地方鸭品种 *IGF1* 基因在生理水平上的差异,旨在为我国地方鸭品种资源合理利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2014-08-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:31172194);现代农业品种创新项目[编号:CX(11)1030]。

作者简介:宋 迟(1982—),男,山东威海人,博士,助理研究员,主要从事家禽遗传育种研究。Tel:(0514)85599194;E-mail:schi-123@163.com。

通信作者:李慧芳,博士,研究员,主要从事家禽遗传育种与家禽资源保护研究。Tel:(0514)85599266;E-mail:lhxf_002@aliyun.com。

试验种蛋收集自相同日粮水平饲喂的同日龄高邮种鸭、金定种鸭群。2 个品种的种蛋在相同条件下(温度为 37.5 ~ 37.8 ℃,相对湿度为 50% ~ 70%)同时孵化,雏鸭出雏后饲喂相同饲料至 7 d。种蛋入孵后 24 h 设定为 1 胚龄。分别于 13、17、21、25、27 d 胚龄以及出雏后 7 d 等 6 个时间点采集肝脏样品,迅速放于液氮中速冻,之后转入 -80 ℃超低温冰箱保存,每品种在每个采样时间点采集 16 份样品。

1.2 主要试剂和仪器

原位杂交试剂盒购自湖北博士德公司,寡核苷酸探针序列为 5' - AAGGAAGTACAAGAACGCAAGTAGA - 3'。TRNzol-A⁺总 RNA 提取试剂(DP421)、SuperReal PreMix (SYBR Green, FP204-01)、Quant cDNA 第一链合成试剂盒(QuantScript RT Kit, KR103-04)、pGM-T 克隆试剂盒(VT302-02)、质粒小提试剂盒(TIANprep Mini Plasmid Kit, DP103-02)、DNA 产物纯化回收试剂盒(TIANquick Midi Purification Kit, DP204-02)等购自天根生化科技(北京)有限公司;DNA Marker DL 2000 购自 TaKaRa 公司;9700PCR 仪、Leica 冰冻切片机、Mx3000p 荧光定量 PCR 仪购自安捷伦公司。

1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

按 TRNzol-A⁺总 RNA 提取试剂操作说明书提取肝脏总 RNA。RNA 样品经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分析和紫外分光光度计测定浓度,保证提取的 RNA 样品质量合格。取 2 μg 总 RNA, cDNA 第一链的合成按照天根生化科技(北京)有限公司的反转录试剂盒说明书进行操作,用内参基因 β -actin 检测 cDNA 合成质量以及是否有基因组 DNA 污染。RT 产物于 -20 ℃保存,用于 PCR 检测。

1.4 引物设计、目的片段标准品的制备

据 GenBank 中鸭 EU031044 序列设计 *IGF1* 定量试验引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列为:上游引物 5' - CTGGTTGATGCTCTTCAGTTCGTAT - 3';下游引物 5' - GCAGACTTAGGTGGCTTTATTGGA - 3',扩增片段为 182 bp。退火温度 60 ℃,PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶鉴定

后回收目的片段,与 pGM-T 载体连接,转化,挑选阳性克隆过夜培养,测序。测序正确的克隆进行质粒提取,测定浓度后作标准品备用。

1.5 荧光实时定量 PCR

荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 法,含 *IGF1* 基因的标准质粒做 10^n ($n=7 \sim 13$) 梯度稀释。将梯度稀释的标准品和待测样品同时进行定量 PCR,每次反应均设阴性对照,每个样品设置 3 次重复。根据由标准质粒构建的标准曲线进行计算,获得待测样品目的基因拷贝数。

1.6 原位杂交

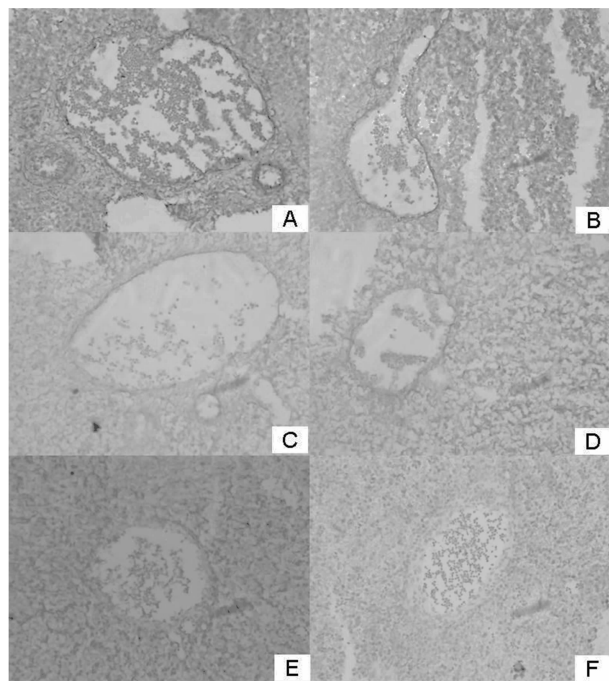
肝脏组织样品的冰冻切片按照原位杂交试剂盒(博士德公司)使用说明进行杂交试验操作,最后进行 DAB 显色液显色并使用苏木精染液复染,封片,保存并拍照。

1.7 统计分析

运用 SPSS 软件分析基因在同一品种不同发育时期以及不同品种同一发育时期表达差异,所有数据以平均值 \pm 标准误差表示, $P < 0.05$ 表示差异显著; $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

鸭早期发育过程中肝脏中 *IGF1* mRNA 的表达如图 1 所示, *IGF1* 基因在肝脏组织不同发育时段均表达,呈持续上升趋势,并且在 2 个品种中的表达量变化趋势较为一致,在 13、17 胚龄时 $1 \mu\text{g}$ 总 RNA 中拷贝数为 10^1 数量级,在 21、25 胚龄时拷贝数上升为 10^2 数量级,27 胚龄时拷贝数上升为 10^3 数量级,出雏后表达量进一步上升。高邮鸭中,27 胚龄的表达量极显著高于之前 4 个时间点,7 d 的表达量极显著高于其他 5 个时间点;金定鸭中,27 胚龄、7 d 的表达量均极显著高于之前 4 个时间点,与高邮鸭不同的是,金定鸭 27 胚龄、7 d 的 *IGF1* mRNA 表达量差异不显著。2 个品种间 7 d 的表达量差异极显著,7 d 高邮鸭肝脏 *IGF-1* 的拷贝数近似于金定鸭的 2 倍。



A—7 d 高邮鸭; B—7 d 金定鸭; C—27 胚龄高邮鸭;
D—27 胚龄金定鸭; E—25 胚龄金定鸭; F—21 胚龄金定鸭
图2 鸭肝脏 *IGF1* 基因原位杂交结果 (200 \times)

检测的 2 个品种鸭肝脏组织中 *IGF1* mRNA 在不同发育时段均表达,呈持续上升趋势,说明不同品种鸭生命早期的肝脏组织中 *IGF1* mRNA 的表达发育模式基本一致。7 d 高邮鸭肝脏 *IGF1* 的拷贝数极显著高于金定鸭,这可能是高邮鸭和金定鸭体质量差异较大的原因之一^[9]。Serrano 等发现,在鸡中直到 18 胚龄时才可以检测到 *IGF1* mRNA 的微量表达^[10]。本研究荧光定量 PCR 检测结果显示,鸭胚肝脏中 *IGF1* mRNA 的表达要早于鸡胚,13 胚龄时鸭胚肝脏已经有 *IGF1* mRNA 的微量表达,胚胎发育末期,肝脏中 *IGF1* mRNA 的表达已经显著提高,这一结果表明,禽类胚胎期肝脏 *IGF1* mRNA 的表达存在一定的种间差异。鸡胚胎发育期间 *IGF1* 主要来源于肝外组织,出雏后 *IGF1* 主要来源于肝组织,在鸭肝脏中 *IGF1* 在临近出雏时开始大量表达,为出雏后成为 *IGF1* 的主要来源打下基础^[11]。*IGF1* 是动物体重要的生长调控因子,通过自分泌及旁分泌方式发挥作用^[12]。因此,对 *IGF1* 在组织器官中的局部表达部位和模式进行研究,有助于解释 *IGF1* 在动物体生长发育中的调控机制。Juengel 等在牛、大鼠的血管壁细胞中检测到 *IGF1* 基因表达产物^[13]。Patrick 等在负鼠卵巢血管壁细胞中发现 *IGF1* 表达^[14]。宋卫涛等在鸭胚胎腿肌中发现, *IGF1* 基因 mRNA 在血管壁周围的表达水平高于血管周边组织^[15]。这些杂交部位主要由纤维细胞或间充质细胞构成,广泛分布并融入各个组织和器官中,是 *IGF1* 通过旁分泌对周围靶细胞发挥作用的理想表达部位^[16]。小鼠模型结果显示,敲除肝脏 *IGF1* 基因的小鼠血液中 *IGF1* 浓度下降 75%,小鼠仍能正常生长^[17],循环系统等肝外组织产生的 *IGF1* 对小鼠生长发育可能有重要影响。本研究所关注的发育时间点中, *IGF1* 在肝脏循环系统中的表达量要高于周边的肝组织,这一表达方式对鸭胚及出雏后生长发育的影响和具体的分子机制还需要进一步研究。

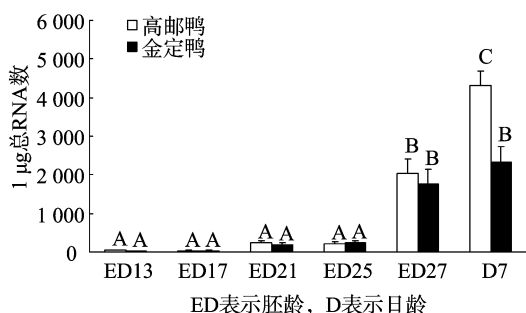


图1 鸭发育早期肝脏中 *IGF1* mRNA 的表达

原位杂交结果显示,7 d 与 27 胚龄 2 个时间点,高邮鸭和金定鸭原位杂交信号较强的部位均为血管组织,25、21 胚龄 2 个时间点的原位杂交则没有明显的阳性信号(图 2)。

3 结论与讨论

本研究探讨高邮鸭、金定鸭 2 个不同品种鸭胚胎期和出雏早期肝脏 *IGF1* mRNA 的表达规律,发现该基因在 13 胚龄已有少量表达,这种低表达状态持续至 25 胚龄,直到 27 胚龄时显著提高,并且出雏后 *IGF1* mRNA 的表达进一步提高。所

参考文献:

- [1] 韦敏, 汝文文, 吕晔. 衰老情况下大鼠卵巢及子宫组织胰岛素样生长因子(IGFs)系统基因的表达变化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 21-24.
- [2] Delafontaine P K E, Alexander R W. Insulin-like growth factor I gene expression in vascular cells[J]. Hypertension, 1991, 17(5): 693-699.
- [3] 俞亚波, 王金玉, 顾玉萍, 等. 鸡IGFBP-3基因C1087T位点遗传多态性及其对京海黄鸡体重和产蛋性能的遗传效应[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(2): 359-364.
- [4] Frost R A, Lang C H. Multifaceted role of insulin-like growth factors and mammalian target of rapamycin in skeletal muscle[J]. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 2012, 41(2): 297-322.
- [5] P J Mitchell S E, Hannon K. Insulin-like growth factor I stimulates myoblast expansion and myofiber development in the limb[J]. Developmental Dynamics, 2002, 223(1): 12-23.
- [6] Scanes C G, Dunnington E A, Buonomo F C, et al. Plasma concentrations of insulin like growth factors (IGF-I and IGF-II) in dwarf and normal chickens of high and low weight selected lines[J]. Growth, Development, and Aging, 1989, 53(4): 151-157.
- [7] Otto A, Patel K. Signalling and the control of skeletal muscle size[J]. Experimental Cell Research, 2010, 316(18): 3059-3066.
- [8] 葛盛芳, 赵茹茜, 陈伟华, 等. 绍兴蛋鸭和高邮鸭胚胎发育过程中激素水平的变化[J]. 南京农业大学学报, 2000, 23(1): 63-66.
- [9] 胡艳, 宋迟, 宋卫涛, 等. 鸭发育早期肝脏IGF-I mRNA的表达特性及其与体质量的相关性分析[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(6): 95-99.
- [10] Serrano J, Shuldiner A R, Roberts C T, et al. The insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene is expressed in chick-embryos during early organogenesis[J]. Endocrinology, 1990, 127(3): 1547-1549.
- [11] Depablo F, Robcis H L, Caldes T, et al. Insulin-like growth factor-I and insulin as growth and differentiation factors in chicken embryogenesis[J]. Poultry Science, 1991, 70(8): 1790-1796.
- [12] Bondy C A, Cheng C M. Signaling by insulin-like growth factor I in brain[J]. European Journal of Pharmacology, 2004, 490(1/2/3): 25-31.
- [13] Juengel J L, Haydon L J, Mester B, et al. The role of IGFs in the regulation of ovarian follicular growth in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) [J]. Reproduction, 2010, 140(2): 295-303.
- [14] Patrick C W J, McIntire L V. Shear stress and cyclic strain modulation of gene expression in vascular endothelial cells[J]. Blood Purification, 1995, 13(3/4): 112-124.
- [15] 宋卫涛, 宋迟, 李慧芳, 等. 鸭出雏前后腿肌IGF-1基因表达规律研究[J]. 云南农业大学学报, 2014, 29(1): 54-57.
- [16] Han V K, D'Ercole A J, Lund P K. Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus[J]. Science, 1987, 236(4798): 193-197.
- [17] Holly J M. Still more questions than answers: report on the 5th International Symposium on insulin-like growth factors, Brighton, UK, 31 October-4 November 1999[J]. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2001, 11(4): 151-153.
- [18] 梅全喜, 董普仁, 王剑, 等. 不同产地艾叶中挥发油和微量元素含量的比较[J]. 中国中药杂志, 1991, 16(12): 718.
- [19] 王剑, 田新村. 栽培蕲艾与野生蕲艾的质量比较研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(8): 15-16.
- [20] 李宏睿, 王新, 张文波, 等. 艾叶多糖提取率影响因素分析及提取条件优化[J]. 植物资源与环境学报, 2012, 21(2): 119-120.
- [21] 袁慧慧, 殷日祥, 陆冬英, 等. 艾叶提取工艺及抗氧化活性的研究[J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2005, 31(6): 768-771.
- [22] 刘军海, 黄宝旭, 蒋德超. 响应面分析法优化艾叶多糖提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 114-118.
- [23] 刘益红, 周建军, 徐顶巧. 响应面分析法优化艾叶中绿原酸提取工艺[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 263-267.
- [24] 孙克年. 艾蒿在水产养殖中的开发与应用[J]. 广东饲料, 2006, 15(3): 36-37.
- [25] 大西基代. 高效液相色谱法对艾蒿及艾的分析[J]. 国外医学(中医中药分册), 1994, 16(1): 47-48.
- [26] 庞蕾蕾, 梅全喜. 艾叶的制剂研究概况[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(11): 56-57.
- [27] 姚勇芳, 石琳, 谭才邓. 艾草中抑菌物质的提取研究[J]. 食品科技, 2011, 36(11): 212-214.
- [28] 王树荣, 孙明江, 郑群. 山东中医药大学药理教研室, 等. 铺灸疗法镇痛机理研究——铺灸对大鼠脑组织 β -内啡肽含量的影响[J]. 山东中医学院学报, 1996(5): 63-64.
- [29] 林锦明, 张东春, 魏红, 等. 热分析技术在药学领域中的应用[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(11): 1043-1044.
- [30] 李虹. 艾灸生成物的研究概况[D]. 北京: 北京中医药大学, 2009: 6-10.
- [31] 欧阳湘云. 艾烟研究概况[J]. 实用中医药杂志, 2010, 26(9): 663-664.
- [32] 陈向华, 张国有, 周美启, 等. 艾灸的现代药学与药理学研究探析[J]. 中国针灸, 2009, 29(5): 428-430.
- [33] 赵红梅, 李小敏, 关丽婵, 等. 爱婴病房艾灸熏蒸对HBsAg灭活效果的研究[J]. 中华护理杂志, 2000, 35(1): 11-12.
- [34] 姜文全, 崔彩萍. 艾叶熏蒸用于母婴同室空气消毒[J]. 西北药学杂志, 2002, 17(2): 80-81.
- [35] 吕炎, 叶春枚, 高建芳, 等. 熏灸治疗外科感染性疾病575例(附艾烟抑菌试验)[J]. 安徽中医学院学报, 1988(4): 36-37.
- [36] 洪宗国. 艾与蕲艾的生药学研究与开发[J]. 中医药学刊, 2003, 21(8): 1356-1357, 1366.
- [37] 喻国雄, 陈汉平, 赵粹英. 隔药灸灸对健康老年人免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 1995(6): 335-336.
- [38] 王臣, 路芳, 关畅, 等. 东北蒿属艾组12种植物核型研究[J]. 植物研究, 2001, 21(2): 215-221.
- [39] 王艳荣, 何云, 苗志国, 等. “绿色”饲料添加剂——艾叶的研究进展[J]. 粮食与饲料工业, 2009, 14(10): 38-40.
- [40] 谢静华. 艾的开发利用前景[J]. 宁夏农林科技, 2004(5): 57-58.
- [41] 江贵波, 郑元滨, 吴练彬. 新型天然植物性抗菌洗洁精及其抗菌试验[J]. 廊坊师范学院学报: 自然科学版, 2012, 12(1): 49-50.
- [42] 胡力川, 梅霜, 杨通秀, 等. 天然中草药提取物用于功能性化妆品的研究[J]. 绵阳师范学院学报, 2013, 32(2): 45-50, 64.

(上接第19页)