

鸡 *Myostatin* 基因单核苷酸多态性与骨骼肌和脂肪生长的关系*

顾志良^{①②⑤} 朱大海^{①**} 李 宁^③ 李 辉^② 邓学梅^④ 吴常信^④

(①哈尔滨工业大学生命科学与工程系分子与细胞发育生物学实验室, 哈尔滨 150001; ②东北农业大学动物科技学院动物遗传与育种实验室, 哈尔滨 150030; ③中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; ④中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; ⑤常熟高等专科学校生物科学与工程系, 常熟 215500)

摘要 肌肉生长抑制素是控制骨骼肌生长发育的重要细胞因子. 采用 PCR-SSCP 和 DNA 测序的方法检测了 *Myostatin* 基因单核苷酸多态性, 利用 CAU 资源家系对所发现的 *Myostatin* 单核苷酸多态性与屠体重、胸肌重、腿肌重、肝重和腹脂重等性状进行了关联分析. 结果表明, P60/61 位点基因型(AA, BB 和 AB 型)对 12 周龄腹脂重、腹脂率、初生重、胸肌率有影响($P < 0.05$): AA 型腹脂重显著高于 BB 型($P < 0.05$); AA 和 AB 型腹脂率显著高于 BB 型($P < 0.05$); AA 型的初生重显著高于 BB 型($P < 0.05$); AA 型胸肌率显著高于 AB 型($P < 0.05$). P80/P81 位点基因型(CC, DD 和 CD 型)与胸肌重($P < 0.05$)和胸肌率($P < 0.01$)相关: CC 型与 DD 型之间的胸肌重差异显著($P < 0.05$), CC 型的胸肌重较高; CC 型与 DD 型之间的胸肌率差异极显著($P < 0.01$), CC 型和 CD 型之间差异显著($P < 0.05$), CC 型比 CD 和 DD 型的胸肌率高, 而 CD 型的胸肌率也比 DD 型的高($P < 0.05$). P93/94 位点基因型(EF 和 EE 型)与胸肌率有显著相关($P < 0.05$): EF 型比 EE 型具有更高的胸肌率. 研究表明, *Myostatin* 基因的功能不但与骨骼肌的生长发育有关, 而且, 更重要的是可能参与脂肪的代谢与沉积.

关键词 肌肉生长抑制素 SNPs 骨骼肌生长 脂肪代谢

肌肉生长抑制素(myostatin, *MSTN*)又称 GDF-8(growth differentiation factor 8), 是 McPherron 等人^[1]首先从小鼠骨骼肌 cDNA 文库中克隆的一个新基因. 蛋白质同源性比较证明, 肌肉生长抑制素属于 TGF- β (transforming growth factor β , 转化生长因子 β)超家族中的一个新成员, 但不属于已发现的亚家族. 进一步研究发现, 肌肉生长抑制素主要在小鼠的骨骼肌中表达, 而且利用基因敲除技术研究它的功能发现, *MSTN* 基因敲除鼠的骨骼肌是正常野生型小鼠的 3 倍以上, 其肩、臀部的肌肉明显肥大, 整个身体的骨骼肌都比野生型的小鼠大得多, 单块肌肉的重量约为野生小鼠的 2~3 倍, 从而导致了体重的增加. 突变型小鼠骨骼肌肌纤维的数目比野生小鼠高出 86%($P < 0.01$), 表明突变小鼠骨骼肌肥大的原因既有肌细胞的增生也有肌纤维的肥大^[1,2], 但在其他生长发育性状上没有发现任何表现型的差异. 以上结果表明, *MSTN* 在调控骨

2002-09-29 收稿, 2003-02-10 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号: 30170462)、国家杰出青年基金(批准号: 300250)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2001AA222031)资助项目

** 联系人, E-mail: dahaizhu@hotmail.com

酪肌肉的生长发育中起着十分重要的作用^[3,4].

MSTN 的功能也在比利时蓝牛得到了验证^[5~8]. 经长期遗传选育的比利时蓝牛具有十分强壮的骨骼肌, 比其他品种高 20%. 对双肌牛品种比利时蓝牛(Belgian Blue)和皮尔蒙特牛(Piedmontese) *MSTN* 基因的分子生物学分析证明, 比利时蓝双肌牛在 *MSTN* 基因外显子Ⅲ缺失 11 bp, 造成移码突变, 使得从缺失后面的第 14 个密码子开始停止翻译, 其结果是 C 端仅 7 个氨基酸得到翻译, 其余 102 个氨基酸全部丢失, 无法产生具有生物学活性的肌肉生长抑制素. 另外, 在皮尔蒙特牛 *MSTN* 基因中检出 2 个点突变, 导致编码的氨基酸由保守的半胱氨酸变为酪氨酸, 结果肌肉生长抑制素的功能全部或几乎全部丧失, 导致肉牛的瘦肉率大大增加.

MSTN 作为骨骼肌生长发育的负调节因子^[9]引起生物界科学家广泛关注. 研究 *MSTN* 基因的结构和功能对阐明骨骼肌生长发育的调控机理具有十分重要理论意义, 同时将为畜牧业肉用类的动物育种开辟一条新途径. 蛋鸡和肉鸡是经过长期遗传选育形成的两个品系, 在骨骼肌生长发育性状上有很大的差异, 肉用仔鸡骨骼肌生长速度远远超过产蛋鸡, 所以蛋鸡和肉鸡是研究骨骼肌生长发育机制的理想模型. 本实验室克隆了鸡 *MSTN* 基因组全序列(GenBank Accession No. AF346599), 初步研究表明, 骨骼肌生长速度存在较大差异的肉鸡和蛋鸡 *MSTN* mRNA 表达水平具有较大的差异, 预示鸡 *MSTN* 可能是与生长发育及肉用性状有关的候选基因.

单核苷酸多态性(SNPs)是生物体基因组中存在的最广泛的一类变异^[10], 称为第 3 代分子标记, 在基因组和基因功能的研究中具有重要的作用. 我们在鸡的 *Myostatin* 基因的 5'-和 3'-调控区发现了 5 个多态位点^[11], 利用中国农业大学研究肉用性状的资源家系, 分析 *MSTN* 的 SNPs 与一些生长性状的遗传关系, 为研究和利用 *MSTN* 作为候选基因进行分子标记辅助选择提供依据, 同时, 为利用鸡作为模型动物研究人类肌肉性疾病奠定理论基础.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验鸡群和基因组 DNA 实验鸡群为中国农业大学的明星肉鸡和丝羽乌骨鸡杂交产生的资源 F₂ 代群体, 其中肉鸡做父本为正交系, 乌骨鸡做父本为反交系. 取正反交各 3 个家系. 翅静脉采血, EDTA 抗凝, 常规方法从鸡血中提取基因组 DNA, TE 溶解后-20℃保存.

1.1.2 主要试剂 引物由上海生物工程公司合成; Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物公司; dNTPs 购自 Promega 公司; T- Easy Vector 购自 Promega 公司; DNA 片段回收纯化试剂盒、质粒提取纯化试剂盒购自上海华舜生物工程公司; 测序反应在上海联合基因公司完成.

1.2 方 法

1.2.1 引物设计 根据本实验室克隆的鸡 *MSTN* 基因, 在 SNPs 分析中发现有 5 对引物存在多态^[11], 对其中的 3 对引物进行了与生产性能的相关分析. 即:

P60 5'-TCCTATCAGGAAAACCTATC-3', P61 5'-ACCTCAAGGAAAATTCTGAG-3';

P93 5'-CAACTTTCAGTAATAATGGAA-3', P94 5'-TGATAGGTTTTCCTGATAGGTA-3';

P80 5'-CTAAACGTAGTAAAACAAAAGGCAGC-3', P81 5'-AACATTTATTTACAAAATA-TTGATG-3'.

1.2.2 PCR 扩增 PCR 扩增反应体系为 10 × PCR buffer 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 2 μL, 20

$\mu\text{mol/L}$ 上游引物 1 μL , 20 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 1 μL , Taq 酶 1.0 U, 15 ng/ μL DNA 模板 4.0 μL , ddH₂O 13.3 μL . PCR 程序为 94℃, 5 min 1 个循环; 94℃, 40 s, 57℃, 40 s, 72℃, 40 s 共 35 个循环; 72℃, 8 min 1 个循环; 4℃ 保温.

1.2.3 SSCP 分析 1 μL PCR 产物和 5 μL Loading buffer (98%甲酰胺, 0.025%溴酚蓝, 0.025%二甲苯青, 10 mmol/L EDTA (pH 8.0), 10%甘油)混合, 98℃变性 10 min, 冰浴 5 min, 经 14%非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr : Bis = 29 : 1)电泳分析(10 V/cm, 10 h)后银染显色.

1.2.4 克隆测序 PCR 扩增产物用柱式胶回收试剂盒回收纯化; 回收后的 DNA 片段用 pGEM-T 载体连接, 并转化 DH5 α 菌株, 用上海华舜公司质粒提取试剂盒提取质粒 DNA 作为测序模板, 每一种基因型单独挑两个克隆分别测序.

1.2.5 统计模型建立 根据屠体性状及供试鸡群的特点, 构建如下线性回归模型: $Y = \mu + G + F + S + H + R + e$, Y 为屠体性状观察值, μ 为群体均值, G 为检测的基因型, F 为家系, S 为性别, H 为孵化批次, R 为正反交(组合), e 为剩余值, 计算软件为 SAS(6.12 版).

2 结果

2.1 *Myostatin* SNPs 及测序分析

利用 P60/P61 作为引物, 对该 PCR 产物的 SSCP 分析在 F₂ 中检测到 3 种基因型(图 1(a)). 将两种纯合基因型片段进行回收、克隆和测序比较, 发现该片段中有 3 个核苷酸发生了突变, 分别是 G→A(304 位), A→G(322 位), C→T(334 位), 这些突变导致了 *Myostatin* 5'调控区呈现出多态性(图 1(b)). 将与 GenBank 具有相同序列的定义为 AA 型, 突变型定义为 BB 型. 利用引物 P93/P94, 对该 PCR 产物的 SSCP 分析在 F₂ 中检测到 3 种基因型(图 2(a)). 将两种纯合基因型片段进行回收、克隆和测序比较发现该片段中有 1 个核苷酸是 G→A(167 位)发生了突变(图 2(b)). 同样, 将与 GenBank 具有相同序列定义为 FF 型, 突变型定义为 EE 型. 对引物 P80/P81 进行 PCR-SSCP 分析, 检测到 3 种基因型(图 3(a)). 对两种纯合基因型的片段进行回收、克隆、测序比较发现, 该片段中 A 突变为 T, 因而造成 *Myostatin* 3'调控区的多态性(图 3(b)). 将与 GenBank 序列相同的定义为 CC 型, 突变型定义为 DD 型.

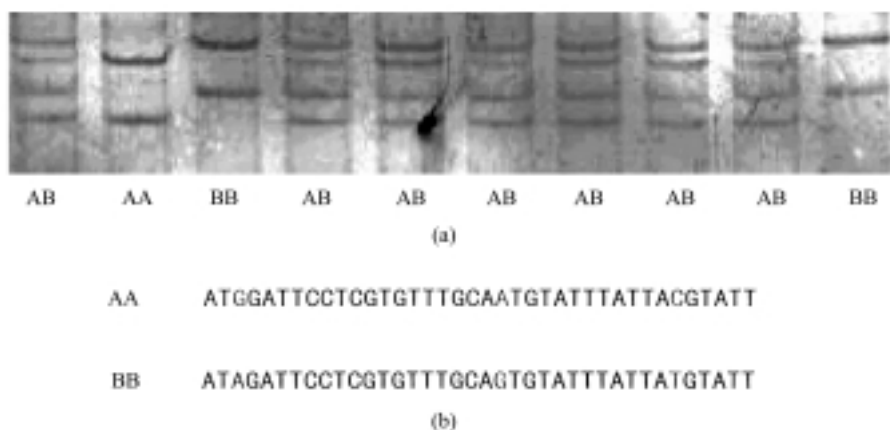


图 1 *Myostatin* 基因 5'调控区(P60/61)的 SNPs 分析((a))和不同基因型的序列比较((b))

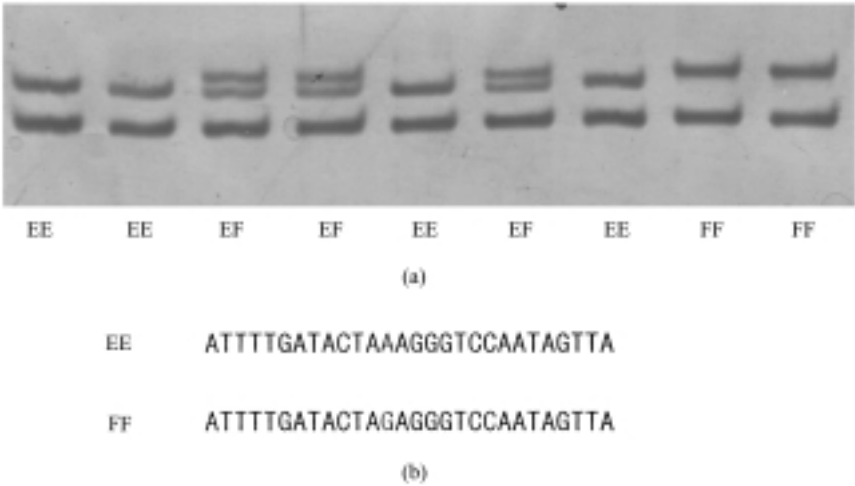


图 2 鸡 *Myostatin* 基因 5'调控区(P93/P94)的 SNPs 分析((a))不同基因型的序列比较((b))

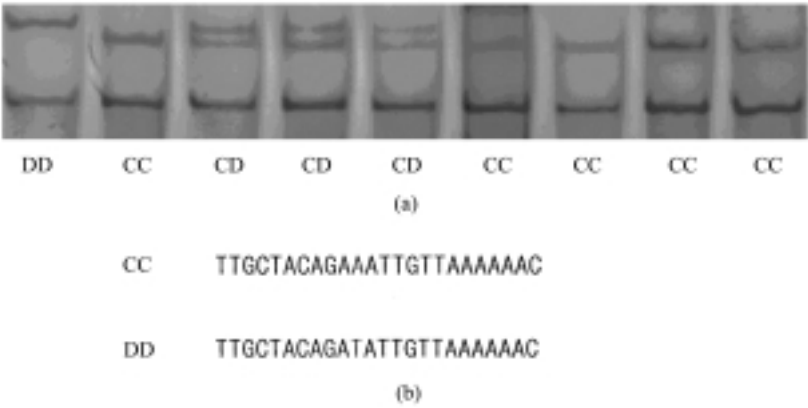


图 3 鸡 *Myostatin* 基因 3'调控区(P80/P81)的 SNPs 分析((a))和不同基因型的序列比较((b))

2.2 *Myostatin* 基因单核苷酸多态性与肌肉和脂肪性状的关系

2.2.1 *Myostatin* 5' 调控区不同基因型与屠体性状的最小二乘分析 利用中国农业大学建立的 CAU 资源家系, 对 *Myostatin* 基因单核苷酸多态性与初生重、屠体重、胸肌重、腿肌重、肝重和腹脂重等性状进行最小二乘方差分析, 发现 P60/61 位点基因型对 12 周龄腹脂重、腹脂率、初生重、胸肌率有影响($P < 0.05$): AA 型腹脂重显著高于 BB 型($P < 0.05$); AA 和 AB 型腹脂率显著高于 BB 型($P < 0.05$); AA 型的初生重显著高于 BB 型($P < 0.05$); AA 型胸肌率显著高于 AB 型($P < 0.05$)(表 1). P93/94 位点与胸肌重显著相关($P < 0.05$): EF 型比 EE 型具有更高的胸肌重(表 2).

2.2.2 *Myostatin* 3' 非编码区不同基因型与屠体性状的最小二乘分析 对 *Myostatin* 基因 3'非编码区单核苷酸多态性与屠体重、胸肌重、腿肌重、肝重和腹脂重最小二乘方差分析显示, 该位点与胸肌重($P < 0.05$)和胸肌率($P < 0.01$)相关: CC 型与 DD 型之间的胸肌重差异显著($P < 0.05$), CC 型的胸肌重较高; CC 型、DD 型之间的胸肌率差异极显著($P < 0.01$), CC 型和

CD 型之间差异显著($P < 0.05$), CC 型比 CD 和 DD 型的胸肌率高, 而 CD 型的胸肌率比 DD 型的高($P < 0.05$)(表 3).

表 1 AA, AB, BB 基因型对腹脂重、腹脂率、初生重和胸肌率的影响^{a)}

基因型	个体数	基因型频率	腹脂重	腹脂率	初生重	胸肌率
AA	116	0.340	52.55 ± 3.38 ^a	0.0354 ± 0.0022 ^a	30.79 ± 0.28 ^a	0.0613 ± 0.001 ^a
AB	187	0.548	49.10 ± 3.32 ^{ab}	0.0353 ± 0.0022 ^a	30.35 ± 0.21 ^{ab}	0.0592 ± 0.001 ^b
BB	38	0.111	43.34 ± 5.02 ^b	0.0294 ± 0.0038 ^b	29.51 ± 0.45 ^b	0.0586 ± 0.0015 ^{ab}

a) 均值比较时同一列字母相同者差异不显著($P > 0.05$)

表 2 EE, EF, FF 基因型对胸肌重的影响^{a)}

基因型	个体数	基因型频率	胸肌重
EE	170	0.499	86.70 ± 3.32 ^b
EF	131	0.384	93.23 ± 3.50 ^a
FF	40	0.117	90.16 ± 4.56 ^{ab}

a) 均值比较时同一列字母相同者差异不显著($P > 0.05$)

表 3 CC, CD, DD 基因型对胸肌重和胸肌率的影响^{a)}

基因型	个体数	基因型频率	胸肌重	胸肌率
CC	213	0.617	95.37 ± 1.57 ^a	0.0634 ± 0.00058 ^a
CD	126	0.365	89.93 ± 2.12 ^{ab}	0.0614 ± 0.00078 ^b
DD	6	0.017	84.49 ± 7.29 ^b	0.0544 ± 0.00269 ^c

a) 均值比较时同一列字母相同者差异不显著($P > 0.05$)

3 讨论

利用中国农业大学农业生物技术国家重点实验室建立的 CAU 资源家系, 对 *Myostatin* 基因单核苷酸多态性与初生重、屠体重、胸肌重、腿肌重、肝重和腹脂重等性状进行最小二乘方差分析, 结果表明, P60/61 位点基因型对 12 周龄腹脂重、腹脂率、初生重、胸肌率有影响($P < 0.05$). P93/94 位点与胸肌重有显著相关($P < 0.05$): EF 型比 EE 型具有更高的胸肌重. P80/P81 位点与胸肌重($P < 0.05$)和胸肌率($P < 0.01$)相关.

5' 调控区是基因表达调控的重要部位, 在该区有很多转录因子的结合部位, 这些单碱基的突变可能导致某个转录因子的结合部位发生改变, 从而导致了 *Myostatin* 的表达水平发生变化, 最后表现在生产性能的变化. 在人的 *Myostatin* 基因发现了 5 个多态性位点, 其中外显子 I 和 II 的两个位点在 Caucasians 和 African American 中的频率存在明显差异, 因此可将这两个位点作为个体间肌肉量的指示标记^[12]. 双肌臀比利时蓝牛具有十分强壮的骨骼肌, 由于肌肉增生(肌纤维数目增加)使这种牛的肌肉比其他品种的高 20%. 尽管人们已知双肌牛是由常染色体上隐性基因控制的, 但其分子遗传的机理直到 *Myostatin* 基因的发现后才有所揭示. Grobet 等人^[8]用候选位置克隆的方法证明牛的 *Myostatin* 基因与双肌牛表型有关, *Myostatin* 基因编码区 11 bp 缺失引起比利时蓝牛和 Asturiana 牛肌肉的增生. 比利时蓝牛的 *Myostatin* 基因有一个无义突变, 不能合成有活性的 *Myostatin*. Kambadur 等人^[5]也发现了比利时蓝牛的 *Myostatin* 基因第 3 外显子的 11 bp 缺失, 而在皮尔蒙特牛的该区域存在 G 突变为 A, 导致编码的氨基酸由保守的半胱氨酸变为酪氨酸, 结果肌肉生长抑制素的功能全部或几乎全部丧失.

对非双肌牛生长抑制素基因进行分析,未发现肌肉生长抑制素基因在比利时蓝牛和皮尔蒙特牛检出的突变.根据这一结果推测,肌肉生长抑制素基因的突变是造成双肌的原因,比利时蓝牛骨骼肌的超量生长可能是由于在骨骼肌细胞中缺少 *Myostatin* 抑制作用的缘故.本研究的结果也进一步证明了 *Myostatin* 在骨骼肌生长发育中的功能.

更为重要的是,最近发现 *Myostatin* 除控制肌肉生长外,还与脂肪的代谢有关^[13~15].当用 *Myostatin* 处理 3T3-L1 细胞时发现, *Myostatin* 抑制前脂肪细胞的分化是由(或部分)C/EBP α 和 PPAR- γ 的调控介导的^[13]. McPherron 等人^[14]研究了 *Myostatin* 基因与脂肪沉积的关系,对敲除 *Myostatin* 的小鼠观察发现,相比野生的小鼠,它的脂肪沉积的能力随年龄的增加而降低. Lin 等人^[15]研究了 *Myostatin* 基因敲除的小鼠的肌生成和脂肪形成,发现敲除 *Myostatin* 基因的小鼠肌肉发育增加相关联的是脂肪形成降低,随后导致瘦蛋白分泌下降.同时分析 *Myostatin* 突变在两种肥胖遗传模型(ob/ob, A(y))中的效果,发现失去 *Myostatin* 后脂肪沉积和异常糖代谢受到部分抑制.而本实验得到的 *Myostatin* 多态位点与腹脂和腹脂率相关,不仅仅是验证了上面的结果,更重要的是本研究利用 SNPs 分析方法从群体遗传学角度对 *Myostatin* 这一功能提供了新的证据.

尽管 *Myostatin* 对骨骼肌生长的抑制作用已在敲除 *Myostatin* 的小鼠和双肌牛中得到证实,但其抑制肌肉生长分化的分子机理还不清楚. Thomas 等人^[16]研究了 *Myostatin* 与成肌细胞的细胞分裂周期的关系,结果发现 *Myostatin* 可能是通过控制成肌细胞从 G_1 期到 S 期和从 G_2 期到 M 期的转变来实现它的功能的.在这一过程中, *Myostatin* 可能通过增加 p21 和减少 CDK2 的浓度,从而使有活性细胞周期素 Cyclin E-CDK2 复合物减少,而导致 Rb 蛋白的磷酸化受到抑制,最终使得成肌细胞停滞于 G_1 期而抑制了肌细胞的生长.超级小鼠和双肌牛都是由于 *Myostatin* 的功能丧失,加快了成肌细胞的生长速度而导致成肌纤维数量的增多.对此他们提出了 *Myostatin* 作用于肌肉生长的可能模型:胚胎期的肌生成是由于 Myf-5 和 MyoD 特异性作用形成成肌细胞, *Myostatin* 存在时, p21 上调,抑制 Cyclin E-CDK2 活性, Rb 失活, G_1 停滞,从而成肌细胞迁移和增殖受到抑制,形成的肌纤维数减少;相反,当 *Myostatin* 不存在时 p21 失去上调, Rb 处于高度磷酸化的状态,促进成肌细胞增殖,肌纤维数增加.表达突变 *Myostatin* 的转基因小鼠(一种显性负突变)肌肉增加 20%~30%,其原因可能是由于肌纤维的肥大而不是肌纤维的增生^[17].

用重组肌肉生长抑制素蛋白处理 C_2C_{12} 肌细胞,细胞增殖、DNA 和蛋白合成被抑制.由此推断, *Myostatin* 控制肌肉重量是通过抑制肌肉的生长和再生来实现的^[18]. Rios 等人^[19]研究发现 *Myostatin* 这种肌肉生长负调控因子的表达在 C_2C_{12} 细胞的肌生成过程中被上调.用含有编码小鼠 *Myostatin* cDNA 载体瞬时转染 C_2C_{12} 肌细胞,能有效抑制细胞的增殖.矛盾的是 *Myostatin* 的超表达也能提高正在分化的 C_2C_{12} 细胞的存活,可能是通过(至少是部分)p21 mRNA 的上调来实现的.

Lee 等人^[20]在研究 *Myostatin* 的抑制物和 *Myostatin* 信号转导时发现,经过纯化的 C 末端 *Myostatin* 能够结合到苯丙酸诺龙(Activin) II 型受体 ActR II B 和 ActR II A(相对较弱)上, *Myostatin* 对 ActR II B 的结合能被苯丙酸诺龙结合蛋白 follistatin 和高浓度的 *Myostatin* 前肽抑制.体内实验证实转入了前肽、Follistatin 或显性负 ActR II B 的正常小鼠表达高于它们分别在敲除 *Myostatin* 小鼠中的表达水平.这一发现暗示了阻断这一通路的前肽、Follistatin 或其他

的分子可能是在临床和农业上提高肌肉生长的有效药物。

Myostatin 是骨骼肌细胞分泌的一种功能性的蛋白, 因此它可能是采用自分泌的方式作用于骨骼肌细胞本身, 从而发挥其抑制骨骼肌生长和发育的功能。另外 Zimmers 等人^[21]在小鼠的血清中检测到了 *Myostatin* 的前体蛋白, 并通过向小鼠体内注射 *Myostatin* 蛋白的方法证明, 在成年的小鼠中 *Myostatin* 通过内分泌的方式发挥其调控骨骼肌生长发育的功能。目前对 *Myostatin* 控制脂肪代谢的机理一无所知。根据现有的研究结果推测, *Myostatin* 可能作为细胞因子分泌到血液中, 通过血液循环到达脂肪细胞, 而后直接作用于脂肪细胞从而发挥影响脂肪代谢的作用; *Myostatin* 对脂肪细胞的影响也可能是通过合成代谢的间接方式实现的, 即通过调节体内能量代谢的平衡来协调脂肪在体内的沉积; 另外, *Myostatin* 可能通过调节由肌细胞或神经细胞分泌的其他细胞因子来直接或间接的控制脂肪在肌体内的代谢。

总之, *Myostatin* 的分子作用机制可能是一个较复杂的过程, 而且可能涉及到与其他细胞因子间的相互协调作用。更重要的是受 *Myostatin* 调控的下游因子可能在发挥 *Myostatin* 的功能方面起着更直接的作用。但目前我们对受 *Myostatin* 调控的下游基因一无所知, 本实验室采用 DD-PCR 方法已从鸡原代成肌细胞中得到了几个 *Myostatin* 上调或下调的 ESTs, 对它们的进一步研究将为在分子水平上认识 *Myostatin* 的信号传导通路和整个调控机制提供新的思路。

作为一种经济动物, 鸡的基因组研究最终是以重要经济性状 QTL 定位和重要基因的位置克隆为目标的, 是为研究如产蛋量、产肉量等一些有利数量性状作为主要任务, 而这些性状是由多位点的等位基因作用决定的。寻找畜禽重要经济性状的连锁标记, 候选基因法是非常有效的方法, 它可以更直接地研究基因的多态性与经济性状的关系。肌肉生长抑制素是控制骨骼肌生长发育的重要细胞因子, 在肌肉的生长发育中起着极其重要的作用, 可以认为鸡的 *Myostatin* 基因是影响肉用性状的重要候选基因之一。不同基因的效应在不同群体中由于遗传背景的不同会有所差异, 我们研究了这些单核苷酸多态性位点对肉用性状的效应。鸡又是一种有用的模式动物^[22], 例如, 肉鸡在骨骼肌发生性状上拥有强势, 蛋鸡在繁殖性状上拥有强势, 在基因组水平上具有大体相同的遗传背景和与其特定性状相关的微小差异。这为我们进行比较基因组学研究提供了良好的素材。因此, 研究鸡基因组对揭示人类基因组的结构和功能、人类疾病分子机理和生物进化规律具有重要作用。

参 考 文 献

- 1 McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, 1997, 387: 83~90
- 2 Szabo G, Dallmann G, Muller G, et al. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mamm Genome*, 1998, 9(8): 671~672
- 3 Westhusin M. From mighty mice to mighty cows. *Nat Genet*, 1997, 17(1): 4~5
- 4 Lee S J, McPherron A C. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9(5): 604~607
- 5 Kambadur R, Sharma M, Smith T P, et al. Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res*, 1997, 7(9): 910~916
- 6 McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94 (23): 12457~12461
- 7 Grobet L, Martin L J, Poncelet D, et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in

- cattle. *Nat Genet*, 1997, 17(1): 71~74
- 8 Grobet L, Poncelet D, Royo L J, et al. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the Myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome*, 1998, 9(3): 210~213
- 9 Wehling M, Cai B, Tidball J G. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB J*, 2000, 14(1): 103~110
- 10 The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 2001, 409: 928~930
- 11 顾志良, 张海峰, 朱大海, 等. 鸡 *Myostatin* 基因单核苷酸多态性的群体遗传学分析. *遗传学报*, 2002, 29(7): 599~606
- 12 Ferrell R E, Conte V, Lawrence E C, et al. Frequent sequence variation in the human myostatin (GDF8) gene as a marker for analysis of muscle-related phenotypes. *Genomics*, 1999, 62(2): 203~207
- 13 Kim H S, Liang L, Dean R G, et al. Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281(4): 902~906
- 14 McPherron A C, Lee S J. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest*, 2002, 109(5): 595~601
- 15 Lin J, Arnold H B, Della-Fera M A, et al. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(3): 701~706
- 16 Thomas M, Langley B, Berry C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*, 2000, 275(51): 40235~40243
- 17 Zhu X, Hadhazy M, Wehling M, et al. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Lett*, 2000, 474 (1): 71~75
- 18 Taylor W E, Bhasin S, Artaza J, et al. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 280(2): E221~E228
- 19 Rios R, Carneiro I, Arce V M, et al. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280(2): 561~566
- 20 Lee S J, McPherron A C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16): 9306~9311
- 21 Zimmers T A, Davies M V, Koniaris L G, et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*, 2002, 296(5572): 1486~1488
- 22 顾志良, 张 勇, 朱大海, 等. 鸡基因组研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(3): 363~367