·综　述·

鱼类肌肉组织发生和分化相关基因的研究进展

成　嘉，褚武英，张建社*

（长沙学院 生物工程与环境科学系，中国湖南 长沙 410003）

摘　要：鱼类骨骼肌由两种分布位置不同的肌纤维组成，一种是位于皮下浅层的慢收缩红肌纤维，另一种是构成躯体绝大部分的快收缩白肌纤维. 肌肉组织中含有多种不同类型的蛋白质如具有收缩功能的结构蛋白，可溶性的肌肉蛋白及肌肉特异性的转录因子等，这些所有的肌源蛋白的产生都经过了复杂的肌肉发生与分化过程.基于相关研究近况，分析了多种转录因子的正、负向调控对肌肉分化发育的影响，同时讨论了研究此调控过程的理论价值及未来应用意义.

关键词：鱼类；肌肉发生；肌肉分化；调控基因

中图分类号：Q753　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1007-7847(2010)04-0355-08

Progresses and Perspectives of the Studies on Fish muscle-related Genes and Their Expression

CHENG Jia，CHU Wu-ying，ZHANG Jian-she*

（*Department of Bioengineering and Environmental Science*，*Changsha University*，*Changsha* 410003，*Hunan*，*China*）

Abstract：Fish skeletal muscles are consisted of two spatially separated fibers，white，fast-twitch muscle make up the bulk of the fish's body whereas red，slow-twitch fibers are found in a narrow mid-lateral band just under the skin. A lot of proteins are specifically expressed in muscle tissues and they mainly include structure and contractile proteins（e.g. myosin，actins，troponin) as well as soluble muscle proteins and muscle-specific regulating factors. All of these proteins are encoded by specific genes，or some of proteins are expressed by a same gene through alternative splicing. A brief overview of the effect of regulatory genes related to fish muscle differentiation and development，as well as their relationship between gene expression and regulation，is provided. The significance and potential application of the studies on fish muscle genomics are also discussed.

Key words：fish；myogenesis；muscle differentiation；regulatory gene

（*Life Science Research*，2010，14(4)：355~362）

肌肉发生及分化是动物胚胎早期发育的一个重要的环节，包括从多能干细胞形成肌肉前体细胞开始，到成肌细胞完成终末分化的多个过程. 此过程可分为以下 4 个步骤：首先成肌细胞经细胞决定，定向到分化途径，然后细胞不可逆的退出细胞周期，进而表达肌肉特异的蛋白，如肌球蛋白重链(MHC)及轻链(MLC)基因等，随后分化的肌细胞产生融合，形成多核肌管，发育为成熟的肌纤维，最终产生肌肉组织[1~3]. 研究肌肉的发生及分化对于了解胚胎发育的全过程具有重大意义. 人们对高等脊椎动物如哺乳类的体节和肌肉发育已进行了较多研究，而对鱼类的相关研究相对较少. 同哺乳动物类相似，鱼类肌肉发生的起始即细胞决定过程受到 Shh、Wnts、

收稿日期：2009-08-19；**修回日期**：2010-05-07
基金项目：湖南省教育厅基金资助项目(09A008)；长沙学院校青年基金资助项目(CDJJ-07010106)；长沙学院引进人才科研项目(SF080401)
作者简介：成嘉(1979-)，女，湖南长沙人，硕士，讲师，主要从事分子发育生物学研究；*通讯作者：张建社(1956-)，男，湖南长沙人，博士，长沙学院教授，博士生导师，主要从事营养与分子发育生物学研究，Tel：0731-84261254，E-mail：Jzhang@ccsu.cn.

BMPs、FGFs 等多个信号传导系统的调节，而随后的肌细胞分化是在多种转录因子的正、负向调控及外界环境影响因子的共同作用下进行的. 本文将对鱼类肌肉组织发生及分化相关基因的研究进展作一简要综述.

1 鱼类肌肉组织的分类及功能

鱼类肌肉组织由骨骼肌、心肌和平滑肌这 3 种类型组成，其中骨骼肌构成鱼体躯干主要部分，占鱼体重的约 40%. 骨骼肌大体上可以分为快肌和慢肌两大类. 两者在生理特征（收缩速度）、代谢方式和神经支配这 3 个方面有着很大不同. 而收缩速度不同是二者的本质区别，快、慢肌也因此而得名，这主要是由于组成它们的肌球蛋白分子水解 ATP 的能力不同所造成的. 慢肌细胞富含线粒体、糖原和肌红蛋白，血管分布广泛，通过有氧代谢的途径供应能量，不易疲劳；快肌中则缺少这些物质，依靠无氧糖酵解的途径获得能量，易疲劳. 高等脊椎动物的肌肉通常是嵌合类型的即同时含有快、慢肌原纤维；而低等脊椎动物鱼类的快肌和慢肌一般分布在不同区域. 以斑马鱼为例，其成体的慢肌主要分布在水平肌隔的上下和表皮之间的楔形区域内，而鱼体躯干和尾部肌肉的大部分则为快肌. 也有把鱼类肌肉纤维分成红色慢收缩肌纤维（I 类）、白色快收缩肌(ⅡA)和中间型肌(ⅡB)等 3 类.

鱼类肌肉具有产生收缩、运动和信号传导多种生物学功能，担负这些功能的蛋白质可分为三大类，第一类是结构蛋白，包括肌球蛋白、肌动蛋白、原肌蛋白和肌动球蛋白等，它们构成鱼肌肉总蛋白的 70%~80%；第二类为肌膜蛋白，包括肌清蛋白、球蛋白和多种酶类或结合蛋白，约占总量的 20%~25%；第三类为以胶原蛋白为主的结缔组织蛋白，约占总量的 3%[4-6].

2 肌肉的起源和发生

脊椎动物的骨骼肌来源于神经管两侧轴旁中胚层的部分体节，与神经管相邻的体节的中央背部细胞迁移到真皮生肌节下面形成生肌节. 此区域的肌节间质细胞将发育为肌肉前体细胞，再经过一系列增殖、分化最终形成骨骼肌. 背部的生肌节后来形成背部的轴上肌. 来源于真皮生肌节侧面的细胞将迁移到四肢或形成轴下躯干肌. 鱼类(如斑马鱼)的躯干肌和其它脊椎动物一样来源于中胚层分化形成的体节，有两种类型的肌前体细胞分别对应快肌细胞和慢肌细胞，慢肌由原本靠近脊索的近轴细胞迁移形成，其肌肉发生甚至早于体节的形成；快肌则由原本靠近体外侧的前体细胞分化而来，其肌肉发生明显要晚于慢肌.

鱼类肌细胞的发育与脊椎动物的类似，大体可划分为 4 个阶段：1）细胞决定阶段：间质中胚层细胞经细胞决定，定向到分化途径；2）早期分化阶段：间质中胚层细胞发生终端分化，开始合成肌肉特异性蛋白（如 α-肌动蛋白）；3）成熟阶段：肌肉特异性蛋白大量合成，这些蛋白包括收缩蛋白如肌动蛋白和肌球蛋白，调节蛋白如原肌球蛋白和肌原蛋白，肌肉细胞质的酶类如磷酸肌酸激酶等；4）后期分化阶段：肌肉细胞为适应不同肌纤维类型合成不同的蛋白同工型，调制成收缩强度、耐力和疲劳后恢复能力不同的各类肌肉[7].

3 鱼类肌肉组织发生的特化信号诱导

发育过程中，胚胎的体轴和侧面区域表达的几个因子在体节形成和肌肉细胞谱系的决定方面有很重要的作用. 这些结构分泌的因子包括 Sonic hedgehog（Shh）、Wnts 和转化生长因子-β（TGF-β）样分子如骨形成蛋白(BMPs)等. 所有这些因子对肌肉的发生和分化都起到了重要的调节作用(如图 1、表 1 所示).

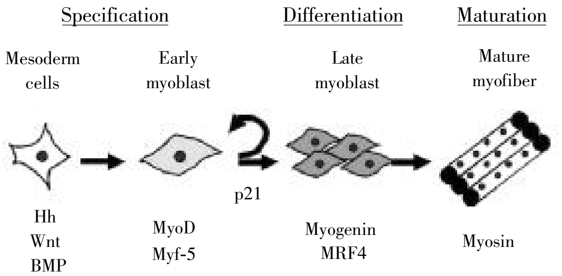

图 1 肌肉发育的过程以及调节因子[8]

Fig.1 The process of myogenesis and regulatory factors[8]

3.1 Sonic Hedgehog(SHH)信号

由脊索和底板产生的 SHH（Sonic hedgehog）在控制体节和神经管模式及分化中起着诱导和信号的作用. 斑马鱼的慢肌前体与脊索邻近，表明脊索的信号可能会诱导慢肌的形成. 首先，脊索表达的 Shh 信号，可激活生肌调节因子 *MyoD* 以及 *Myf5* 的表达，促进肌肉的形成[10,11]. Couttle O 证明：斑马鱼近轴成肌因子中，Hedgehog 信号通

路是维持 *Myf*5 和 *MyoD* 表达以及及时终止分化所必须的[12]. 而且野生型胚胎中 *SHH* mRNA 的过表达会导致慢肌过大的膨胀,从而使快肌减少,还可能影响到骨骼的发育. 不仅如此,*SHH* mRNA 的过量表达可以纠正脊索突变体中慢肌发育的缺陷[13]. 当 SHH 信号途径被阻断时,胚胎出现慢肌纤维丧失或减少等缺陷[14]. Du 等[15]研究证实,鱼类胚胎肌纤维的分化发育还直接受 SHH 信号系统和 TGF-beta 信号的竞争性影响而调节,TGF 信号对 SHH 信号有拮抗作用.

表 1　信号系统对胚胎发育过程肌原纤维的影响[9]
Table 1　Factors that regulate myofibre formation during development[9]

	对肌原纤维形成的影响 Biological effects on myofiber formation		
	激活基因表达 Stimulation of related gene expression	刺激增殖抑制分化 Stimulation of proliferation and inhibition of differentiation	拮抗因子 Inhibition of TGFβ family of factors
胚胎发育期 Embryogenesis	SHH 激活 Myf5 表达 Wnt 激活 Myf5/MyoD 表达	BMP (TGFβ 样因子) FGF	Noggin/Chordin/Follistatin 抑制 TGFβ 家族因子

3.2　Wnt 信号

Wnt 家族基因产物及与其相关的蛋白质组成的信号传导途径在胚胎发育、细胞分化以及组织器官形态发生中起着重要的作用. *Wnt*1 和 *Wnt*3*a* 在小鼠背部神经管表达,当把它们和小鼠未分节的近轴中胚层和体节共培养时,这两个因子都能诱导肌肉形成[16]. 如果异位移植 *Wnt*-1、*Wnt*-3*a* 和 *Wnt*4 的表达细胞则会破坏体节内信号分子的平衡,导致更多的体节细胞发育成成肌细胞系[17]. 同其他的脊椎动物中一样,斑马鱼的 *Wnt*11 基因在发育的体节中表达,且对体节模式的建立起重要作用[18]. Wnt 信号通路中的 β-caternin 蛋白,对于诱导细胞培养中骨骼肌的形成是必须的[19].

3.3　骨形成蛋白 4 (bone morphogenic protein 4,BMP4)信号

BMP4 是转化生长因子-β(TGF-β)家族的成员,控制侧板中胚层体节模式的形成,也是维持体节侧面成肌细胞所必须的. Pourquie 等的研究结果表明侧面体节标记物 bHLH 转录因子基因—*cSim*1 的表达需要 BMP4 的存在[20]. 而 Currie 等发现特定位置 BMP4 能抑制中间体节内肌肉特异性基因转录因子——bHLH 基因的表达[21]. Du 等已经证实慢肌前体细胞可能由体节中靠近背部和腹部部分表达的一个或多个 Hh 蛋白和 BMP 蛋白之间的竞争性差异来决定. 编码 BMP4 相关蛋白的 *Dorsalin*-1 将抑制脊索附近的近轴细胞发育为肌肉前体细胞. 且在 BMP4 相关基因表达的生肌节的背部和腹部部分,肌肉前体细胞也不能正常发育[15].

4　鱼类肌肉组织分化的基因调控

胚胎肌肉细胞系由 Hh、Wnt、BMP 等信号决定后,只有经过复杂的分化过程,表达肌肉特异的因子发生一系列形态、细胞和分子的变化,才能成为多种类型的肌肉纤维. 这些变化是由各种转录因子以多种多样的方式组合后进行基因表达调控所产生的,而且在某一时期以及某一特定的发育阶段具有特定的组合,形成了包含位置、时间和数量等多种形式信息组成的复杂信号系统. 对这一过程的具体机制的研究才刚刚起步,近年来由于 DNA 重组技术、基因敲除技术以及转基因技术等的应用,对胚胎肌肉生成的调控机制的研究取得了长足的进展,鉴定出了多种顺式和反式调节肌肉特异性转录的基因,其中的正向调节因子主要有生肌调节因子家族(MRFs)、肌细胞增强子因子 2 (MEF2)、胰岛素样生长因子(IGFs)等,而 Id(分化抑制因子)、MSTN(肌肉生长抑制素)、Twist、I-mfa、原癌基因等对肌肉的分化有负调控作用.

4.1　正向调节因子

4.1.1　生肌调节因子家族(MRFs)

生肌调节因子 (myogenic regulatory factor,MRF)——MyoD 转录因子家族成员的发现使人们对肌肉分化及发育机制的研究取得了很大进展. 这组转录因子属于碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)蛋白质家族(结构如图 2

所示)，在脊椎动物中已经发现了以下 4 个成员：MyoD、Myf5、生肌蛋白（myogenin，MyoG）和 MRF4. 这 4 种肌源性的 bHLH 蛋白只在骨骼肌中表达，并且在各种培养细胞的异位表达可以导致这些细胞向肌细胞分化. MRF 通过 HLH 结构域和其他 HLH 蛋白(如 E12 和 E47、E2A 基因的产物)形成异源二聚体，再经 MRF 的碱性结构区域与 DNA 上骨骼肌特异的增强子中 E 盒(CANNTG)序列结合，从而激活肌肉特异性的基因表达[22].

图 2 bHLH 蛋白家族结构示意图[23]

b：与 DNA 结合的碱性区域.

Fig.2 Schematic structure of bHLH protein families[23]

b：the basic DNA binding region.

MyoD、MyoG、Myf5 和 MRF4 这 4 种转录调节因子，都参与了骨骼肌肌肉发生、分化的复杂过程，但各成员的时空表达具有特异性，其中的 *MyoD* 基因是脊椎动物胚胎期肌肉发育的主导调控基因之一，对骨骼肌的形成和分化起关键作用，并可通过多个途径激活肌肉特异性基因的转录，从而促进成肌细胞的分化. 小鼠中的研究表明，相对其他生肌调节因子，*MyoD* 和 *Myf*5 主要在早期的成肌过程中表达，其产物对成肌细胞的决定和维持起重要作用. *Myf*5 在胚胎发育时期的肌原细胞中最早被诱导表达，因它缺失所引起的障碍可由随后表达的 *MyoD* 补偿，反之 *MyoD* 的缺失大体上也不影响肌肉分化，说明两者在功能上有所重叠. 当两者均缺失时则成肌细胞和分化的骨骼肌细胞都不出现. MyoG 和 MRF4 参与骨骼肌肌肉细胞的终末分化过程，在晚期形成的肌管中表达，是骨骼肌特异基因的主要调节因子.

在斑马鱼发育早期，快肌和慢肌以及鳍肌肉在 24 h 内即由胚胎中胚层前体细胞发育形成，为幼鱼肌肉运动做好了准备. 通常 *MyoD* 和 *Myf*5 的表达被作为早期胚胎肌肉前体细胞的识别标志. 原肠胚晚期时，慢肌前体细胞(轴细胞)中的 *MyoD* 和 *Myf*5 即被激活. 近轴细胞分化为单核肌细胞，开始表达慢肌球蛋白，之后反射状迁移形成生肌节侧面的慢肌纤维. 所有的近轴细胞都表达 *MyoD* 和 *Myf*5，而在分节前中胚层的侧面细胞中也有 *Myf*5 的单独表达. 体节形成和分化开始后，*Myf*5 的表达下调，而 *MyoD* 在分化的表达 *MyoG* 的近轴慢肌和体节快肌中的表达保持不变[24].

目前已有多种鱼类的 *MyoD* 基因被克隆. Zhang 等从牙鲆（Flounder）中分离克隆了 *MyoD* 基因，将其与河鲀和罗非鱼中的 *MyoD* 基因序列比较，发现它们有很高的同源性. 牙鲆此基因在慢肌和快肌中均有表达，说明它们在肌肉发生分化中具有重要调节功能[25]. 大西洋拟庸鲽斑鱼(*H. hippoglossus*)的 *MyoD* 基因在体节形成过程中呈两侧非对称型表达，直接与体节形成相关[26]. Tan 等直接从额鲷(*Sparus aurata*)中分离克隆了 *MyoD*1 和 *MyoD*2 两个 *MyoD* 非等位基因，研究发现 MyoD1 是指导慢缩肌的产生和侧部体节细胞形成的收缩剂，而 MyoD2 仅前期在两类肌肉纤维的产生中发挥作用，而在 10~15 个体节形成后逐渐失去功能[27].

4.1.2 肌细胞增强子因子 2 (MEF2)

另一类调节肌肉特异基因表达的调节因子是属于 MADs 盒蛋白的肌细胞增强因子 2 (myocyte enhancer factor 2，MEF2). 脊椎动物的 MEF2 有 4 个成员：MEF2A、MEF2B、MEF2C、MEF2D，它们都可以借助 MADs 盒结构形成同源二聚体或异源二聚体再与骨骼肌特异基因启动子的 $CTA(A/T)_4$ TAG / A 序列结合，促进正在分化的肌管表达肌肉特异性基因(如肌球蛋白重链基因：MHC). 此外，MEF2 还可以作为生肌作用的一种强制性辅助因子，与 MyoD/E12 杂合二聚体发生相互作用，促进骨骼肌特异基因的表达[28]. 与 *MRFs* 不同的是，*MEF*2 不仅在骨骼肌中表达，在心肌、内脏平滑肌、脑、神经嵴及其他组织中也有表达. 由于在肌肉发生中，*MEF*2 的表达在时间上滞后于 *MRF*，因此认为，*MRFs* 启动 *MEF*2 表达，而 *MEF*2 的作用是放大和维持 *MRF* 的表达水平[29].

MEF2 可以激活多种肌肉发生相关基因的表达，这些基因的表达产物对于肌肉组织的分化、维持和再生等有重要作用. 例如：肌球蛋白与肌动蛋白[30]是引起肌肉收缩与舒张的主要蛋白质；原肌球蛋白与肌钙蛋白的多种同工型构成的复合体，在调节肌球蛋白与肌动蛋白引起的肌肉收缩及舒张中起主要作用[31].

4.1.3 胰岛素样生长因子(IGFs)

胰岛素样生长因子（IGFs）也叫生长介素

(somatomedins),因其在结构上与胰岛素前体有高度同源性且可作用于胰岛素受体,因而称之为胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factors,IGFs),在肌肉细胞的分化和生长过程中具有重要正向调控作用. IGFs 系统由两个促进细胞分裂的多肽类生长因子 IGF-Ⅰ、IGF-Ⅱ及其受体(IGF-ⅠR 和 IGF-ⅡR),IGF 结合蛋白(IGFBPs)和 IGF 蛋白水解酶组成,它们之间的相互作用可调节动物的生理功能[32]. 其中 ICF-Ⅱ是重要的胚胎生长和发育的调节因子,主要在胚胎期发生作用,不受生长激素(GH)的调节,而 ICF-Ⅰ则在生长和发育过程中通过调节 *GH* 的表达来促进生长.

目前已克隆出了马苏大麻哈鱼、银大麻哈鱼、虹鳟、罗非鱼、斑马鱼等的 *IGF*-Ⅰ和 *IGF*-Ⅱ cDNA 序列. 不同鱼之间 *IGF*-Ⅰ和 *IGF*-Ⅱ的 cDNA 序列基本相同,蛋白质一级结构高度相似. 硬骨鱼的脑、鳃、胃、肠、肾和胰腺以及视网膜等组织中都发现有 *IGF*-Ⅰ和 *IGF*-Ⅱ的表达,且和其它组织相比,*IGF*-Ⅰ在视网膜中的表达相对较高[33].

IGFs 对硬骨鱼肌肉的生长发育具有明显的促进作用. Castillo 等在研究 IGF-Ⅰ和胰岛素对虹鳟肌肉的代谢和促有丝分裂作用时发现,IGF-Ⅰ比胰岛素更能有效地促进虹鳟肌细胞吸收 2-脱氧葡萄糖,当肌细胞分化至肌管时,这种刺激作用会增强. 同时,IGF-Ⅰ能刺激体外虹鳟肌细胞分化,胰岛素无此功能,说明前者在鱼类肌肉生长和代谢中具有重要作用[34]. IGF-Ⅱ能启动自分泌扩增级联反应,促进 MyoD 诱导的肌肉特异性基因的转录[35]. 大西洋鲑鱼中 *IGF*-Ⅰ及相应的结合蛋白 *IGFBP*-5.2 和 *IGFBP*-4 的上调表达可促使其骨骼肌快速生长[36]. 鱼类 *IGFs* 的表达还受营养状况、生长环境和激素水平等多种因素的影响:饥饿的虹鳟鱼中 *IGF*-Ⅰ和 *IGF*-Ⅱ表达下降,重新投喂后两者表达量增加,并恢复肌源活动[37].

4.1.4　Six1 及 Pax3/Pax7 蛋白

*Six*1 基因是 sine oculis/six 家族的一员,在动物形态发生、器官生成及细胞分化上有重要作用. *Six*1 可在斑马鱼所有头部肌肉前体细胞中表达,若抑制 *six*1 的转录,鱼体胸骨舌骨肌、中直肌、下直肌及所有咽弧肌均不能形成. *Pax* 属于配对结构域家族基因,其中的 *pax*3 与 *pax*7 同属此家族的Ⅲ组,表达于胚胎的背侧神经管、轴旁中胚层和体节的生皮肌节,它们通过与靶基因的启动子区域结合,激活靶基因的转录,促进肌肉形成,是肌形成必需的上游调节子. 若用抑制剂阻止斑马鱼 *pax*3 基因的表达,会造成鱼体头部、侧鳍及后轴下肌的缺失. *Six*1 和 *pax*3 均可调节斑马鱼头部肌肉发育,但不属于同一基因调控网络[38].

4.1.5　肌肉的 LIM 蛋白(MLP)

LIM 结构域是一种双锌指结构,属于与细胞分化和生长控制有关的蛋白质家族. 肌肉 LIM 蛋白(muscle LIM protein, MLP)是横纹肌特有的,含有 LIM 模体的蛋白质. MLP 可对细胞周期进行负调控,允许细胞退出细胞周期,进行终末分化. Artier 等发现 MLP 在鼠肌原细胞 C2C12 中过度表达可促进成肌细胞的分化,而且它如果被抑制,则会阻断终极分化[39]. 在骨骼肌的发育过程中,MLP 的出现与肌细胞的分化相一致,并在肌纤维的形成过程中逐渐积累,在成体骨骼肌中表达下调. Kong 等证明,MLP 的 LIM 模体和生肌调节因子 MyoD、MyoG 以及 MRF4 存在相互作用,MLP 可增强 MyoD-E47 二聚体与其 DNA 靶点的结合,由此促进肌肉特异性蛋白的表达,引起肌细胞的终端分化[40].

4.2　负向调节因子

4.2.1　分化抑制因子(Id)

分化抑制因子(inhibitors of differentiation,Id),即 DNA 结合抑制因子(inhibitors of DNA binding),属螺旋-环-螺旋(HLH)转录因子家族(如图 3),可与碱性 HLH(bHLH)转录因子结合,形成异源二聚体,对 bHLH 活性起负调节作用. bHLH 转录因子是由一群以同源二聚体或异源二聚体形式与 DNA 结合的蛋白质家族,能活化与细胞(包括肌细胞)分化有关的基因转录. Id 分子由于本身缺乏与 DNA 结合必需的碱性氨基酸序列,它和 bHLH 结合成异源二聚体后,可抑制 bHLH 与 DNA 及其他组织特异性 bHLH 转录因子结合,从而抑制细胞分化[23]. 增殖过程中的骨骼肌成肌细胞 *Id* 高水平表达,肌肉基因转录下降. 而分化时,*Id* 表达下降,MRFs 和 E 蛋白表达上调,表明正效应的 bHLH 蛋白因子与 Id 及其它负效应调节因子的相对含量可能决定是否基因转录[41].

哺乳动物中含 4 种 Id 因子,即 Id1~Id4. 已有实验证明该分子参与细胞生长、分化、死亡以及胚胎发育等过程. *Id*1、*Id*2 在鱼类中的同源基因已被克隆,它们在发育中的生肌节内高表达,从而调节早期成肌因子的表达. *Id*1 和 *Id*2 mRNAs

在鳟鱼胚胎的生肌节肌肉中累积，也存在于在鳟鱼成体的氧化型慢肌中，而糖酵解的快肌中没有，这可能表明 Id 蛋白除了可以调节早期的肌肉形成，还能维持肌肉纤维类型的稳定[42]. 鱼类腹部及背部体节发育的过程中，*Id*1、*Id*2 及两个等位基因 *Id6a* 和 *Id6b* 的表达具有时间和空间上的差异，随着这些基因的表达，该区域的肌肉特异性基因表达被抑制[43].

图 3 Id HLH 结构示意图[23]
Id HLH 缺少可与 DNA 结合的碱性区域.
Fig.3 Schematic structure of Id HLH protein families[23]
The Id HLH lacks the basic DNA binding region.

4.2.2 肌肉生长抑制素(MSTN)

肌肉生长抑制素（Myostatin，MSTN），即 GDF-8(Growth differentiation factor 8)，它是转化生长因子(Transforming growth factor-β，TGF-β)家族成员，是一种重要的肌细胞生长负性调控因子. 1997 年，McPherron 发现 *MSTN* 基因敲除的小鼠由于肌细胞的增生与肥大导致骨胳肌的量大大增加，其大小是正常小鼠的 2~3 倍，首次证实MSTN 是肌肉生长的负调控因子[44].

目前，斑马鱼、虹鳟鱼、大麻哈鱼等多种鱼类的 *MSTN* 基因已被克隆. 其中虹鳟鱼中有两种基因异构体(*rtMSTN*-la 和 *rtMSTN*-lb)，分别在胚胎和成鱼肌肉组织中表达[45]. 研究表明，哺乳动物中的 MSTN 主要在骨胳肌中表达，而鱼类的 MSTN 除了在骨骼肌表达外，还在脑、肠、鳃、肾、性腺等多个组织中表达[46]，在鱼类的某些组织中还有 MSTN 前体的存在. 斑马鱼中，MSTN 在早期胚胎发育中少量表达，而在幼鱼游泳期和成鱼骨骼肌中高度表达，它的主要功能是抑制超弹性肌肉的生长. 鱼类 MSTN 的作用机理与哺乳动物的类似：MSTN 前肽是 MSTN 的主要负调控因子，它与 MSTN 结合可抑制 MSTN 的活性. 一旦生肌过程和肌肉生长中起重要抑制作用的 MSTN 被抑制，肌肉的量将大大增加. 研究表明，MSTN 前肽在转基因斑马鱼胚胎发育过程中过表达，将导致其骨胳肌纤维数目增加[47]. 采用 RNAi 的方法抑制斑马鱼 MSTN 活性，可诱发斑马鱼早期胚胎肌肉增生或肥大[48]. 通过对 *Myostatin*1 基因敲除，可正性调节肌球蛋白发生特异转录因子的作用[46]. Myostatin 还可通过调节 *MEF*2 及 *MyoD* 基因的表达来调节骨骼肌纤维的表达类型[49].

4.2.3 锌指蛋白

锌指蛋白是指在分子内含有锌指结构域的一类蛋白质. 部分锌指蛋白是肌肉分化的负向调控转录因子. 如锌指蛋白阴阳 1 可抑制转录因子(SRF)与 α 肌动蛋白基因启动子结合，从而抑制 α 肌动蛋白基因的表达[50]. 结合肌肉特异基因的启动子 E 盒区域的锌指因子——ZEB (zinc finger E box binding factor)可阻止肌源性 bHLH 蛋白发挥作用，抑制肌肉分化. ZEB 在未分化的体节和生皮肌节中的肌肉前体细胞中表达，且在 MRF 出现以前有活性. 随着肌肉分化的进行，肌源性 bHLH 蛋白逐渐积累达到足以从 E 盒上取代 ZEB 的水平，从而使 bHLH 蛋白激活肌肉特异性基因的转录[51]. 锌指蛋白的表达还可控制肌原细胞发育的方向，促进慢肌的生成. 如：肌锌指蛋白 Blimp1(B lymphocyte induced maturation protein1)可以直接结合到快肌特异性表达基因(肌球蛋白轻链基因）的启动子附近，抑制快肌的表达，使肌原细胞发育为慢肌[52].

4.2.4 MyoD 抑制素(I-mfa)

MyoD 抑制素（I-mfa，inhibitor of the MyoD family）属于转录调节因子，高度表达于生骨节，可通过抑制 MyoD 家族成员转录活性从而负向控制肌细胞生长发育. I-mfa 可修饰 MyoD 的核定位信号，使其滞留在胞浆中，还能干扰生肌调节因子(MRF)与 DNA 的结合，抑制肌细胞的生长分化[53].

4.2.5 TWIST 蛋白

有证据表明 TWIST 蛋白是肌肉发生的抑制因子：一方面，TWIST 与 E 蛋白结合使之不能与 bHLH 家族各种生肌调节因子(MRF)形成有活性的异源二聚体或直接与 MRF 结合形成无活性的异源二聚体[54]；另一方面，TWIST 与 MRF 竞争 DNA 结合位点(E 盒)抑制 MRFs 激活靶基因转录的能力[55]. MRF 启动转录能力的下降可导致 MEF2 转录水平下降，从而抑制肌肉分化.

5 结语

肌肉发生与分化本身就是一个非常复杂的网络调控过程，从胚胎早期的细胞决定到最终分化成熟的整个过程中受到众多信号通路及转录

因子的调控，不仅如此它还受到多种外界因子的显著影响. 鱼类个体发育中的表型可随环境因子的影响而频繁变化：各种非生物因素（温度、缺氧情况、日照长短、水流速度等)及生物因素(如食物是否充足、寄生虫的感染等）均可影响胚胎乃至成鱼肌肉发生的机率，肌肉特异性基因的表达模式及肌纤维分布的数量及大小等[57,58].

了解肌肉发生及分化过程中相关调节基因结构、表达调控和遗传变异，加深了我们对细胞决定、细胞分化、形态发生以及生长和分化的拮抗作用等生命现象的认识，无论是在医学上或生产应用中均大有意义. 一方面可以通过现代分子育种技术，挑选出具有优良肉质性状基因（畜禽肉用基因、鱼类的风味基因）的种群大量繁殖，提高肉类生产的产量与品质；另一方面在医疗上将肌细胞作为基因治疗载体的的优点也日益被人们所认识. 经遗传修饰的成肌细胞可与体内的肌纤维融合，分享转基因产物，并能在宿主体内终生存在，因而对肌肉损伤、萎缩等疾病的基因治疗具有非常重要的作用.

参考文献(References)：

[1] ARNOLD H H，WINTER B. Muscle differentiation：more complexity to the network of myogenic regulators[J]. Current Opinion in Genetics & Development，1998，8(5)：539-545.

[2] ZHANG Jian-she，CHU Wu-ying，CHENG Jia，*et al.* cDNA cloning and expression analysis of myosin heavy chain gene (MHC)of the Mandarin fish，*Sniperca kneri*[J]. Aquacuture Research，2009，40(4)：412-418.

[3] 周瑞雪，蒙涛，褚武英，等. 鳜肌球蛋白轻链 2 基因 cDNA 的克隆及其发育表达分析[J]. 湖南师范大学自然科学学报（ZHOU Rui-xue，MENG Tao，CHU Wu-ying，*et al.* cDNA cloning and ontogenetic expression analysis of the myosin light chain 2 gene in *Siniperca Chuasti*[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University)，2009，32 (3)：78-83.

[4] 张建社，夏新界，褚武英，等. 基于异源 cDNA 基因芯片杂交的鳜鱼肌肉组织基因表达谱初步分析[J]. 水生生物学报（ZHANG Jian-She，XIA Xin-jie，CHU Wu-ying，*et al.* Gene expression profiles of the muscle tissues of the Mandarin fish，*Siniperca Chuasti* L. with zebrafish cDNA microarray[J]. Acta Hydrobiologica Sinica)，2009，33(1)：46-53.

[5] 唐建洲，张东裔，成嘉，等. 鳜和鲢肌肉蛋白质氨基酸组成及其蛋白质组成的比较分析[J]. 水产学报（TANG Jian-zhou，ZHANG Dong-yi，CHENG Jia，*et al.* Comparative analysis of the amino acid composition and proteomic patterns of the muscle proteins from two teleosts，*Siniperca chuatsi* L. and *Hypophthalmichthys molitrix* L[J]. Journal of Fisheries of China)，2007，31(3)：361-368.

[6] ZHANG Jian-she，CHU Wu-ying，FU Gui-hong. DNA microarray technology and its application in fish biology and aquaculture[J]. Frontiers of Biology in China，2009，4(3)：305-313.

[7] 邱华玲，于建兴，陈宏权. MyoG 基因结构与功能研究进展[J]. 生物信息学(QIU Hua-ling，YU Jian-xing，CHEN Hong-quan. Advances on structure and function of MyoG [J]. China Journal of Bioinformatics)，2007，5 (4)：190-192.

[8] DAVID C L，STEPHEN F K. Transcription factor families：muscling in on the myogenic program[J]. The FASEB Journal，1995，9 (15)：1595-1604.

[9] ZORZANO A，KALIMAN P，GUMÀA，*et al.* Intracellular signals involved in the effects of insulin-like growth factors and neuregulins on myofibre formation[J]. Cellular Signalling，2003，15(2)：141-149.

[10] LEWIS K E，CURRIE P D，ROY S，*et al.* Control of muscle cell-type specification in the zebrafish embryo by Hedgehog signaling[J]. Developmental Biology，1999，216(2)：469-480.

[11] YANIV H，DANIEL O，SIMON H. Differential requirements for myogenic regulatory factors distinguish medial and lateral somitic，cranial and fin muscle fibre populations[J]. Development，2009，136 (3)：403-414.

[12] COUTELLE O，BLAGDEN C S，HAMPSON R，*et al.* Hedgehog signaling is required for maintenance of Myf-5 and MyoD expression and timely terminal differentiaion in zebrafish adaxial myogenesis[J]. Developmental Biology，2001，236 (1)：136-150.

[13] BLAGDEN C S，CURRIE P D，INGHAM P W，*et al.* Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by sonic hedgehog[J]. Genes & Development，1997，11 (17)：2163-2175.

[14] BARRESI M J，STICKNEY H L，DEVOTO S H. The zebrafish slow-muscle-omitted gene product is required for Hedgehog signal transduction and the development of slow muscle identity[J]. Development，2000，127 (10)：2189-2199.

[15] DU S J，DEVOTO S H，WESTERFIELD M M R T. Positive and negative regulation of muscle cell identity by members of the hedgehog and TGF-beta gene families[J]. The Journal of Cell Biology，1997，139 (1)：145-156.

[16] STERN H M，BROWN A M，HAUSCHKA S D. Myogenesis in paraxial mesoderm：preferential induction by dorsal neural tube and by cells expressing Wnt-1[J]. Development，1995，121 (11)：3675-3686.

[17] WAGNER J，SCHMIDT C，NIKOWITS W Jr，*et al.* Compartmentalizaion of the somite and myogenesis in chick embryos are influenced by Wnt expression[J]. Developmental Biology，2000，228 (1)：86-94.

[18] MAKITA R，MIZUNO T，KOSHIDA S，*et al.* Zebrafish wnt11：pattern and regulation of the expression by the yolk cell and No tail activity[J]. Mechanisms of Development，1998，71 (1-2)：165-176.

[19] PETROPOULOS H，ILONA S S. β-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells[J]. The Journal of Biological Chemistry，2002，277 (18)：15393-15399.

[20] POURQUIE O，FAN C M，COTLEY M，*et al.* Lateral and axial signals involved in avian somite patterning：a role for BMP4[J]. Cell，1996，84 (3)：461-471.

[21] CURRIE P D，IGHAM P W. The generation and interpretation of positional information within the vertebrate[J]. Mechanism of Development，1998，73 (1)：3-21.

[22] BUCKINGHAM M. Molecular biology of muscle development [J]. Cell，1994，78 (1)：15-21.

[23] NORTON J D. Id helix-loop-helix proteins in cell growth differentiation and tumorigenesis[J]. Journal of Cell Science，2000，113 (Pt. 22)：3897-3905.

[24] WEINBERG E S，ALLENDE M L，KELLY C S，*et al.* Developmental regulation of zebrafish MyoD in wild-type，no tail，spadetail embryos [J]. Development，1996，122 (1)：271-280.

[25] ZHANG Y，TAN X，ZHANG P J，*et al.* Characterization of muscle-regulatory gene，MyoD，from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and analysis of its expression patterns during embryogenesis[J]. Marine Biotechnology，2006，8 (2)：139-148.

[26] GALLOWAY T F, BARDAL T, KVAM S N, *et al.* Somite formation and expression of MyoD, myogenin and myosin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) embryos incubated at different temperatures: transient asymmetric expression of MyoD[J]. Journal of Expbrimental Biology, 2006, 209 (Pt 13): 2432-2441.
[27] IGUCHI T, WATANABE H, KATSU Y, *et al.* Developmental toxicity of estrogenic chemicals on rodents and other species[J]. Congenital Anomalies(Kyoto), 2002, 42 (2): 94-105.
[28] MOLKENTIN J, BLACK B, MARTIN J, *et al.* Coperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins[J]. Cel1, 1995, 83 (7): 1125-1136.
[29] MOLKENTIN J D, OLSON E N. Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors[J]. Proceedings of the National Aacdemy Sciences of the United Stated of America, 1996, 93 (18): 9366-9373.
[30] KELLY K K, MEADOWS S M, CRIPPS R M. Drosophila MEF2 is a direct regulator of Actin57B transcription in cardiac, skeletal and visceral muscle lineages[J]. Mechanisms of Development, 2002, 110 (1-2): 39-50.
[31] SPUDICH J A, WATT S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1971, 246 (15): 4866-4871.
[32] 章力，黄希贵，王德寿. 鱼类胰岛素样生长因子(IGF)系统的研究进展[J]. 动物学杂志(ZHANG Li, HUANG Xi-gui, WANG De-shou. Progress in the studies on the IGF system in fishes[J]. Chinese Journal of Zoology), 2005, 40 (2): 99-105.
[33] OTTESON D C, CIRENZA P F, HITCHCOCK P F. Persistent neurogenesis in the teleost retina: evidence for regulation by the growth hormone/insuliin-like growth factor 1 axis[J]. Mechanisms of Development, 2002, 117 (1-2): 137-149.
[34] CASTILLO J, CODINA M, MARTINEZ M L, *et al.* Metabolic and mitogenic effects of IGF-I and insulin on muscle cells of rainbow trout[J]. American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2004, 286 (5): 935-941.
[35] ELIZABETH M W, MARLENE M H, PETER R. Mechanisms of signal transduction: autocrine growth factor signaling by insulin-like growth factor-Ⅱ mediates myod-stimulated myocyte maturation[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (42): 41109-41113.
[36] NEIL B, LI X, RICHARD T, *et al.* Switching to fast growth: the insulin-like growth factor (IGF) system in skeletal muscle of Atlantic salmon[J]. The Journal of Experimental Biology, 2008, 211 (Pt 24): 3859-3870.
[37] GABILLARD J C, KAMANGAR B B, MONTSERRAT N. Coordinated regulation of the GH/IGF system genes during refeeding in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. The Journal of Endocrinology, 2006, 191 (1): 15-24.
[38] LIN C Y, CHEN W T, LEE H C, *et al.* The transcription factor Six1a plays an essential role in the craniofacial myogenesis of zebrafish[J]. Developmental Biology, 2009, 331 (2): 152-166.
[39] ARBER S, HALDER G, CARONI P. Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation[J]. Cell, 1994, 79 (2): 221-231.
[40] KONG Y, FLICK M J, KUDLA A J, *et al.* Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD[J]. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17 (8): 4750-4760.
[41] JEN Y, WEINTRAUB H, BENEZRA R. Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: *in vivo* association of Id with E2A proteins[J]. Genes & Development, 1992, 6 (8): 1466-1479.
[42] RESCAN P Y. Identification in a fish species of two Id (inhibitor of DNA binding / differentiation)-related helix-loop-helix factors expressed in the slow oxidative muscle fibers[J]. European Journal Biochemistry, 1997, 247 (3): 870-876.
[43] RALLIÈRE C, CHAUVIGNÉF, RESCAN P Y. The genes for the helix-loop-helix proteins Id6a, Id6b, Id1 and Id2 are specifically expressed in the ventral and dorsal domains of the fish developing somites[J]. The Journal of Exprimental Biology, 2004, 207 (Pt 15): 2679-2684.
[44] MCPHERRON A C, LAWLER A M, LEE S. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-β superfamily member[J]. Nature, 1997, 387(6628): 83-90.
[45] GARIKIPATI D K, GAHR S A, RODGERS B D. Identification, characterization and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes [J]. The Journal of Endocrinology, 2006, 190 (3): 879-888.
[46] AMALI A A, LIN C T, CHEN Y H, *et al.* Up-regulation of muscle transcription factors during embryomic somitogenesis of zebrafish(*Danio rerio*) by knock-down of myostatin-1[J]. Developmental Dynamics, 2004, 229 (4): 847-856.
[47] XU C, WU G, ZOHAR Y, *et al.* Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish[J]. The Journal of Experimental Biology, 2003, 206 (Pt 22): 4067-4079.
[48] ACOSTA T, CARPIO Y, BORROTO I, *et al.* Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype[J]. Journal of Biotechnology, 2005, 119 (4): 324-331.
[49] ALEX H, CAROLE B, VICTORIA S, *et al.* Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression[J]. Amercian Journal of Physiology-Cell Physiology, 2009, 296 (3): C525-C534.
[50] LEE T C, ZHANG Y, SCHWARTZ R J. Bifunctional transcriptional properties of YY1 in regulating muscle actin and c-myc gene expression during myogenesis[J]. Oncogene, 1994, 9 (4): 1047-1052.
[51] POSTIGO A A, DEAN D C. ZEB, a vertebrate homolog of Drosophila Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation[J]. The EMBO Journal, 1997, 16 (13): 3935-3943.
[52] LIEW H P, CHOKSI S P, WONG K N, *et al.* Specification of vertebrate slow-twitch muscle fiber fate by the transcriptional regulator Blimp1[J]. Developmental Biology, 2008, 324 (2): 226-235.
[53] 王蕾，赵玉莲，安利国，等. 脊椎动物骨骼肌发育的分子机制[J]. 海洋科学(WANG Lei, ZHAO Yu-lian, AN Li-guo, *et al.* Molecular mechanism of vertebrates skeletal muscle cells[J]. Marine Sciences), 2004, 28 (12): 54-58.
[54] HAMAMORI Y, WU H Y, SARTORELLI V, *et al.* The basic domain of myogenic basic helix- loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist[J]. Molecular and Cellular Bio1ogy, 1997, 17 (11): 6563-6573.
[55] HEBROK M, FUCHTBAUER A, FUCHTBAUER E M. Repression of muscle-specific gene activation by the marine Twist protein[J]. Experimental Cell Research, 1997, 232 (2): 295-303.
[56] BENGAL E, RANSONE L, SCHARFAMNN R, *et al.* Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins adirect physical association[J]. Cell, 1992, 68(3): 507-519.
[57] MACQUEEN D J, ROBB D H, OLSEN T, *et al.* Temperature until the 'eyed stage' of embryogenesis programmes the growth trajectory and muscle phenotype of adult Atlantic salmon[J]. Biology Letters, 2008, 4 (3): 294-298.
[58] MACQUEEN D J, ROBB D, JOHNSTON I A. Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. The Journal of Experimental Biology, 2007, 210 (Pt 16): 2781-2794.