DOI:10.16016/j.1000-5404.201609118

Myostatin 基因敲除对哺乳期幼鼠骨骼肌生长的影响

罗 婷,刘 军,周云飞,魏诺言,陈济安 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院健康教育学教研室)

[**摘要**] **目的** 构建稳定的肌肉生长抑制素(*myostatin*,MSTN)基因敲除小鼠模型,观察敲除 *MSTN* 基因对哺乳期幼鼠骨骼肌生长的影响,并初步探讨其相关机制。**方法** 采用 Cre-LoxP 系统建立 *MSTN* 基因敲除的小鼠模型,通过 PCR 法鉴定子代小鼠基因型;比较 *MSTN* 基因敲除后小鼠体质量及腿部骨骼肌质量的变化;免疫荧光法检测野生型小鼠与 *MSTN* 基因敲除小鼠腿部骨骼肌纤维横截面积;qPCR 法检测 *MSTN* 基因敲除小鼠 *Atrogin-1* 和 *MuRF-1* mRNA 的表达。**结果** PCR 结果显示:子代小鼠的基因型符合 MSTN-loxP$^{+/+}$ MCK-Cre$^{+/-}$;与野生型小鼠(WT)相比,*MSTN* 敲除小鼠(KO)体质量及骨骼肌质量显著增加,在出生第 7、21 天差异均具有统计学意义($P<0.05$),腿部骨骼肌纤维显著增粗,差异具有统计学意义($P<0.01$);而 *MSTN* 基因敲除后小鼠 *Atrogin-1* 和 *MuRF-1* 的 mRNA 表达较野生型小鼠显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 利用 Cre-loxP 系统成功建立稳定的 *MSTN* 基因敲除的小鼠模型,该小鼠腿部骨骼肌纤维增粗,其质量以及小鼠体质量显著增加,其机制可能与泛素连接酶 *Atrogin-1* 和 *MuRF-1* 的表达下调有关。

[**关键词**] 小鼠,肌肉生长抑制素,Cre-loxP 系统,基因敲除
[**中图法分类号**] R-332;R322.74;R394.1 [**文献标志码**] A

Effect of *myostatin* knockout on skeletal muscle growth in mice

Luo Ting, Liu Jun, Zhou Yunfei, Wei Nuoyan, Chen Ji'an (Department of Health Education, College of Preventive Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a *myostatin* (*MSTN*) knockout mice, determine the effect of the gene knockout on the skeletal muscle growth in lactating mice, and investigate the relative mechanism. **Methods** The Cre-loxp system was used to generate Mstn knockout mice (*Mstn*$^{-/-}$ mice), and then the genotype of the offspring was identified by PCR. The weight of body and leg skeletal muscles of *Mstn*$^{-/-}$ mice were compared with those of the wild-type mice. The sizes of leg skeletal muscle fibers were tested in the *Mstn*$^{-/-}$ and wild-type mice by immunofluorescence assay. The mRNA expression levels of *Atrogin-1* and *MuRF-1* were detected by qPCR. **Results** The results of PCR showed that the genotype of the offspring of *Mstn*$^{-/-}$ mice was in accordance with *MSTN*-loxP$^{+/+}$ MCK-Cre$^{+/-}$. Compared with the wild-type mice, the body weight *Mstn*$^{-/-}$ mice were significantly heavier on the 7th and 21st days ($P<0.05$), and the weight and sizes of leg skeletal muscle fibers were also bigger ($P<0.01$). Besides, the mRNA levels of *Atrogin-1* and *MuRF-1* of were significantly decreased after knocking out of *Mstn* ($P<0.01$). **Conclusion** A *Mstn* knockout mice model is successfully constructed. *Mstn*$^{-/-}$ mice have thickening skeletal muscle fibers, higher weight of leg skeletal muscle and significantly increased body weight, which may be mediated by down-regulation of ubiquitin ligase *Atrogin-1* and *MuRF-1*.

[**Key words**] *myostatin*; Cre-loxP system; gene knockout; mice

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81372944). Corresponding author: Chen Ji'an, E-mail: cjatmmu@hotmail.com

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81372944)
[**通信作者**] 陈济安,E-mail:cjatmmu@hotmail.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20161209.1608.016.html

肌肉生长抑制素(*Myostatin*,*MSTN*)又名生长分化因子8(growth differentiation factor 8,GDF8),属于转化生长因子β(transforming growth factor-β,TGF-β)超家族成员[1]。1997年*MSTN*首次被Mcpherron等[2]发现,它主要在骨骼肌中表达,控制成肌细胞的增殖和分化,是骨骼肌发育过程的一个重要负性调控因子。研究发现:敲除*MSTN*基因或*MSTN*自然突变会导致哺乳动物(鼠、兔、猪、牛等)骨骼肌纤维数量增多,肌细胞肥大,出现"双肌"表型。目前有大量关于成年*MSTN*敲除动物的研究,成年*MSTN*敲除动物的体质量、肌肉质量增加,肌纤维增粗[1,3-5]。导致该表型的可能机制在于过表达*MSTN*基因会导致生肌调节因子*MyoD*和*Pax3*的表达下调以及肌萎缩相关基因*Atrogin-1*,*MuRF-1*和*ERK1/2*的表达上调,从而使肌纤维数量减少,体积减小。近年来,随着研究的不断深入,有研究发现*MSTN*除了影响骨骼肌的发育,还对脂肪分化、脂质聚集有一定的抑制作用,且与肌肉萎缩症、AIDS、心力衰竭等肌肉相关的疾病有关[6-9]。因此,研究*MSTN*基因的功能及其调控机制不仅有助于阐明骨骼肌生长发育和相关的调控机理,而且对肌肉相关疾病的诊断、治疗和预后有非常重要的临床意义。目前,利用各种基因敲除技术研究*MSTN*基因功能的报道很多,但主要是成年鼠的研究。本研究拟利用Cre-loxP技术构建*MSTN*基因敲除小鼠模型,研究*MSTN*基因敲除对哺乳期幼鼠骨骼肌生长的影响,并初步探讨其相关机制,为后续进行*MSTN*基因的功能研究提供一个良好的平台。

1 材料与方法

1.1 转基因鼠

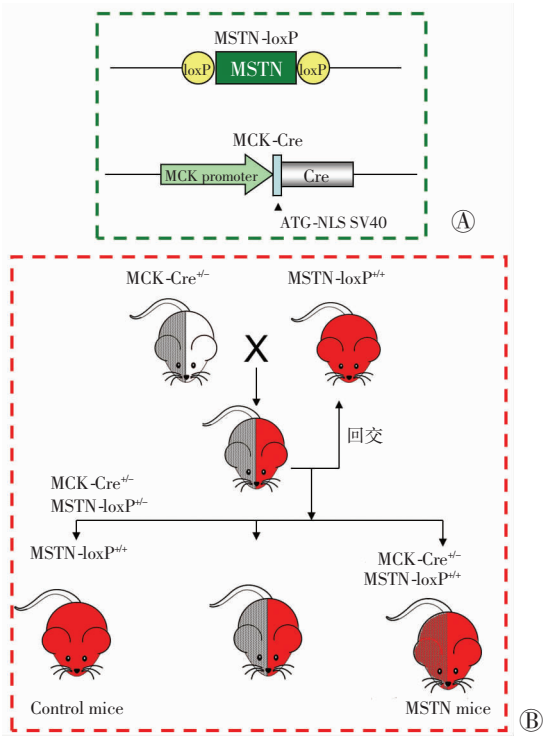
MSTN-loxP $^{+/+}$和MCK-Cre $^{+/-}$基因鼠通过北京维通利华实验动物技术有限公司从美国Jackson lab购买,货号分别为012685和006405。关于两种转基因鼠的属性详见Jackson lab网站介绍(http://jaxmice.jax.org/strain/012685.html,http://jaxmice.jax.org/strain/006405.html)。

1.2 主要试剂

DNA提取试剂盒购自美国KAPA公司;逆转录试剂盒购自日本TaKaRa公司;SYBR Mix、TRIzol购自美国Life Technologies公司;Laminin抗体购自美国Sigma公司;引物由上海生工生物有限公司合成;牛血清白蛋白购自武汉博士德生物工程有限公司;免疫荧光染色试剂盒-抗兔Alexa Fluor 488、抗荧光淬灭剂购自碧云天生物技术研究所;枸橼酸盐抗原修复液购自北京中杉生物技术有限公司。

1.3 肌肉中*MSTN*基因敲除小鼠模型构建

肌肉中*MSTN*基因敲除小鼠模型的构建过程如图1所示。图1A为两个品系基因鼠的转基因示意图:MSTN-loxP基因鼠是在*MSTN*基因外显子3两端插入loxP片段;MCK-Cre基因鼠是将MCK(一种肌肉特异性肌酐激酶,又称Ckmm)的启动子和Cre相连,克隆到小鼠染色体上。由于MCK只在骨骼肌细胞中表达,因此,只有骨骼肌细胞中的Cre能够被启动,从而发挥Cre对loxP的切除作用,特异地敲除骨骼肌细胞内*MSTN*基因。图1 B展示了*MSTN*基因敲除小鼠的培育过程:MSTN-loxP $^{+/+}$小鼠与MCK-Cre $^{+/-}$小鼠杂交,得到MSTN-loxP $^{+/-}$MCK-Cre $^{+/-}$小鼠,用该基因型小鼠与MSTN-loxP $^{+/+}$小鼠再次杂交则有可能获得基因型为MSTN-loxP $^{+/+}$MCK-Cre $^{+/-}$的实验小鼠。



A:两个品系基因鼠的转基因示意图;B:*MSTN*基因敲除小鼠的培育过程 红色代表loxP,灰色代表Cre

图1 肌肉中*MSTN*基因特异性敲除鼠模型的培育示意图

1.4 基因型鉴定

操作步骤:(1)小鼠耳洞打孔做标记;(2)剪取小鼠尾巴0.5~1.0 cm;(3)DNA提取及PCR:按照KAPA HS Mouse Genotyping Kit说明书进行操作。实验所用引物包括MSTN-LoxP(上游:5′-GCTGCAAACCATCCATTCTAA-3′,下游:5′-TCAATCGTTCATCCTAACAGG-3′,300 bp)、MCK-Cre(上游:5′-ACAAAAGGTTTTGCCCTCCT-3′,下游:5′-ACAAAAGGTTTTGCCCTCCT-3′,650 bp)以及内参IPC(上游:5′- CAAATGTTGCTTGT-

CTGGTG-3′,下游:5′-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3′,200 bp)。PCR 反应:KAPA Mix 12.5 μL、上下游引物各 1.25 μL、样品 DNA 1 μL、加 ddH_2O 至总体积 25 μL。反应条件为 95 ℃预变性 3 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 15 s,72 ℃延伸 10 s,共 35 个循环,72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃保持;(4)电泳:根据电泳条带确定小鼠的基因型。

1.5 小鼠体质量与骨骼肌质量检测

在特定时间点(第 0、7、14、21 天)分别称量野生型和 *MSTN* 基因敲除组小鼠的体质量,并进行比较;待 21 d 断奶时取小鼠腿部股四头肌、腓肠肌和胫骨前肌,称取质量,并测量胫骨长度,各块肌肉再分别与胫骨长度标化,比较小鼠肌肉质量。

1.6 采用 RT-qPCR 检测股四头肌 *Atrogin-1*、*MuRF-1* 表达

使用 TRIzol 法提取小鼠股四头肌总 RNA,用核酸蛋白检测仪测定样品 RNA 纯度和浓度,$D(260)/D(280)$ 在 1.8~2.0 为合格样本。将 mRNA 反转录为 cDNA,RT-qPCR 检测肌肉萎缩盒 F 基因(muscle atrophy F-box, MAFbx, *Atrogin-1*)(上游:5′-GCAAACACTGCCACATTCTCTC-3′,下游:5′-CTTGAGGGGAAAGTGAGACG-3′,93 bp)、肌肉环状指基因 1(muscle ringfinger-1,*MuRF-1*)(上游:5′-GCTGGTGGAAAACATCATTGACAT-3′,下游:5′- CATCGGGTGGCTGCCTTT-3′,76 bp)的表达,反应条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,总 40 个循环。以 β-actin(上游:5′- GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG-3′,下游:5′-ATGCCACAGGATTCCATACC-3′,174 bp)为内参,采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法相对定量,每组设 2 个复孔,重复 3 次,计算平均值。

1.7 免疫荧光法检测肌纤维横截面积

分别在 21 d 将野生型和 *MSTN* 基因敲除组小鼠颈椎脱臼处死,固定双下肢,用镊子、剪刀剥离皮毛暴露腿部肌肉,取股四头肌样品,10% 福尔马林固定,包埋制成 5 μm 厚的石蜡切片。切片经脱蜡处理后进行抗原修复 92 ℃ 15 min,PBS 漂洗后用 5% 牛血清白蛋白封闭 15 min,倒掉封闭液,加入一抗 Laminin(兔源,浓度 1∶200) 4 ℃孵育过夜,PBS 漂洗后二抗 Alexa Fluor 488(抗兔,浓度 1∶300) 37 ℃孵育 1 h,然后 PBS 漂洗后抗荧光淬灭剂封片,奥林普斯 BX51 荧光显微镜下高倍视野观察照相。Image J 1.41 软件计算股四头肌纤维横截面积。

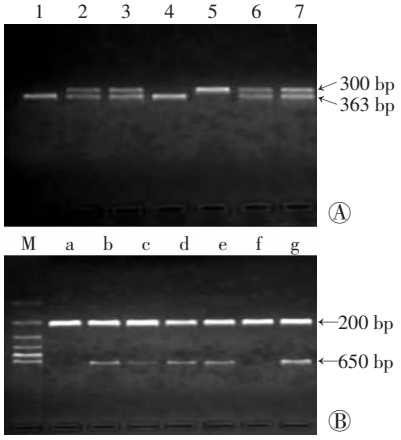
1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用 Origin 8.0 软件作图,SPSS 19.0 统计软件进行数据分析;组间比较采用两独立样本 t 检验,$P<0.05$ 定为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 肌肉中 *MSTN* 基因敲除小鼠的鉴定

肌肉中 *MSTN* 基因特异性敲除鼠的基因型为 MSTN-loxP$^{+/+}$MCK-Cre$^{+/-}$,鉴定如图 1 所示。若 PCR 产物仅 300 bp 条带,说明基因型为 MSTN-loxP$^{+/+}$,即 loxP 纯合子(图 A 中条带 5);若 PCR 产物出现 300 bp 和 363 bp 条带,说明基因型为 MSTN-loxP$^{+/-}$,即 loxP 杂合子(图 A 中条带 2、3、6、7);若 PCR 产物仅出现 363 bp 条带,说明基因型为 MSTN-loxP$^{-/-}$,即为野生型小鼠(图 A 中条带 1、4)。同理,若 PCR 扩增出 650 bp 条带,说明含有 MCK-Cre(图 B 中条带 b、c、d、e、g),反之,则为野生型小鼠(图 B 中条带 a、f)。因此,若 PCR 扩增既表现为 loxP 纯合型又含有 MCK-Cre,则表示其为 *MSTN* 基因敲除小鼠,基因型为 MSTN-loxP$^{+/+}$MCK-Cre$^{+/-}$。



A:loxP 基因型鉴定 1、4:野生型(WT);2、3、6、7:loxP 杂合型(MSTN-loxP$^{+/-}$);5:loxP 纯合型(MSTN-loxP$^{+/+}$);B:Cre 基因型鉴定 M:600 bp DNA 标准;a、f:野生型(WT);b、c、d、e、g:MCK-Cre$^{+/-}$

图 2 PCR 法鉴定肌肉中 *MSTN* 基因特异性敲除鼠基因型

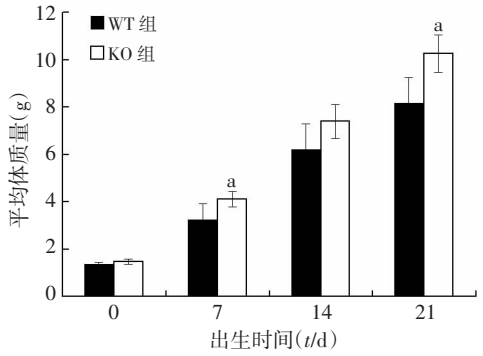
2.2 敲除 *MSTN* 基因对小鼠体质量的影响

仔鼠经鉴定分型后,分别在不同时间点(出生 0、7、14、21 d)对野生型对照组(WT)和 *MSTN* 基因敲除组(KO)观察称量,*MSTN* 基因敲除组小鼠从出生第 1 天开始体质量高于对照组,在第 7、21 天 *MSTN* 基因敲除组体质量明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 3)。表明敲除 *MSTN* 使小鼠体质量显著增加。

2.3 敲除 *MSTN* 基因对小鼠骨骼肌质量的影响

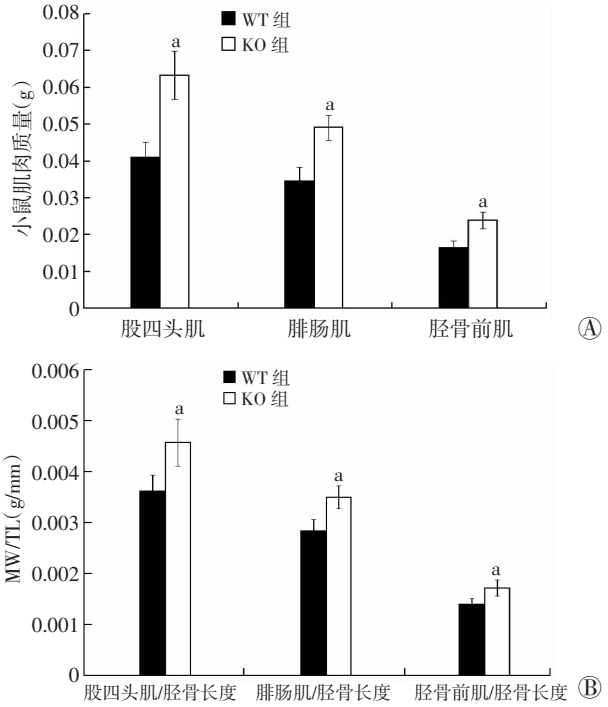
与野生型对照组(WT)相比,*MSTN* 基因敲除组(KO)腿部股四头肌、腓肠肌、胫骨前肌的质量明显增加,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 4A),且分别与

胫骨长度标准化后,KO 组腿部股四头肌、腓肠肌、胫骨前肌质量显著高于 WT 组,两者差异具有统计学意义($P<0.01$,图 4B)。



a:$P<0.05$,与 WT 组比较

图 3 *MSTN* 基因特异性敲除小鼠与野生型小鼠生长体质量变化

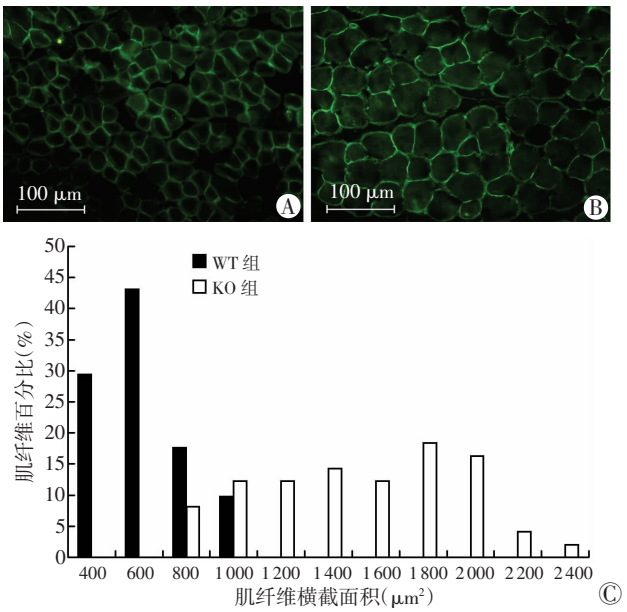


A:WT 组和 KO 组腿部肌肉质量比较;B:WT 组和 KO 组腿部肌肉质量分别与胫骨长度标化后进行比较 a:$P<0.01$,与 WT 组比较;MW:肌肉质量;TL:胫骨长

图 4 *MSTN* 基因特异性敲除小鼠与野生型小鼠腿部肌肉质量变化

2.4 敲除 *MSTN* 基因对小鼠肌纤维大小的影响

荧光显微镜下(40×)观察股四头肌石蜡切片(图 5A、B),经 Laminin 染色后,形态上 *MSTN* 基因敲除小鼠(KO)肌纤维与野生型小鼠(WT)相比,肌纤维显著增粗;利用 Image J 1.41 软件计算两组小鼠肌纤维横截面积,从肌纤维分布(图 5C)发现,与 WT 组相比,KO 组肌纤维分布明显向右偏移,表示横截面积大的肌纤维数量比例增多;KO 组肌纤维横截面积均值较 WT 组增大了 149.18%,差异具有统计学意义[(1 535.46 ± 411.67) μm^2 *vs* (616.22 ± 179.09) μm^2, $P<0.01$]。表明敲除 *MSTN* 会使小鼠骨骼肌纤维显著增粗(肌肥大)。



A:WT 组;B: KO 组;C:肌纤维分布

图 5 免疫荧光观察敲除 *MSTN* 基因对小鼠肌纤维大小的影响

2.5 敲除 *MSTN* 基因对小鼠肌肉相关基因表达的影响

qPCR 检测 *Atrogin-1* 和 *MuRF-1* 表达,发现 *MSTN* 基因敲除组(KO)的 *Atrogin-1* 和 *MuRF-1* 表达显著低于对照组,差异具有统计学意义(WT)[(1.00 ± 0.05) *vs* (0.30 ± 0.04)、(1.01 ± 0.15) *vs* (0.31 ± 0.07), $P<0.01$]。*Atrogin-1* 和 *MuRF-1* 均属于泛素蛋白连接酶,它们与骨骼肌蛋白质的分解代谢关系最为密切。因此,敲除 *MSTN* 后小鼠的体质量增加,原因可能与 *Atrogin-1* 和 *MuRF-1* 的 mRNA 水平显著下调从而使骨骼肌的分解代谢减少有关。

3 讨论

基因编辑技术是对基因进行精确定点改造的一项新手段,也是研究基因生物学功能的一个重要方法。该技术具有构建时间短、花费成本低、应用范围广等优点。目前常用的基因编辑技术有 Cre-loxP 重组酶系统、锌指蛋白核酸酶(zinc finger nuclease ,ZFN)、类转录激活样因子效应物核酸酶(transcription activator 1ike effector nuclease,TALEN)和成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palin-

dromic repeats/CRISPR-Associated Proteins, CRISPR)技术等,其中对于转基因动物的构建应用最广泛的是Cre-loxP重组酶系统[10]。Cre-LoxP重组酶系统包括Cre重组酶和含LoxP位点的基因两个组成部分,其原理是Cre重组酶首先识别同向排列的34 bp大小LoxP序列,然后将两个位点之间的序列删除,造成移码突变,使目的基因不表达或无功能表达从而达到敲除基因的目的[11]。本研究将引进的MSTN-loxP $^{+/-}$小鼠采用自交和回交的方法得到基因型为MSTN-loxP$^{+/+}$ MCK-Cre$^{+/-}$的小鼠,成功地构建了*MSTN*基因敲除的小鼠模型,为下一步进行该基因功能研究创造了一个良好平台。

*MSTN*作为TGF-β超家族成员之一,对于骨骼肌的发育至关重要。相关研究表明,*MSTN*基因的缺失会使其对成肌细胞增殖和分化的抑制作用消失,在动物上表现出明显的双肌表型[12-13]。与普通动物相比,含有双肌表型的动物不仅生长速度快、瘦肉含量高、脂肪低等特点,还具有采食量低、饲料利用率高等特点[14-16]。因此,在畜牧业方面,敲减或敲除*MSTN*基因已经成为培育高产肉量家畜品种的一种有效技术手段。Guo T等[17]研究表明,敲除*MSTN*使小鼠肌肉含量增加,脂肪含量减少,其原因可能与Mstn$^{-/-}$小鼠的葡萄糖利用率和胰岛素敏感性增加有关。与上述研究结果一致,本研究将小鼠*MSTN*基因敲除后,其体质量显著增加,同时免疫荧光结果显示敲除*MSTN*会使小鼠骨骼肌纤维显著增大。此外,关于肌肉表型与小鼠性别的关系,我们研究发现,与野生型小鼠相比,*MSTN*基因敲除后雌雄小鼠体质量及骨骼肌质量均有增加,且有统计学差异,而敲除组中雌雄两种性别小鼠相比,体质量却无统计学差异(具体数据未列出),说明敲除*MSTN*后,雌雄两种性别小鼠均存在肌肉表型。因此,文中后续研究并未区分雌雄小鼠性别。

*MSTN*由376个氨基酸组成,包含3个外显子和2个内含子,结构具有典型的TGF-β家族特征。活化的*MSTN*可与细胞膜上的activin ⅡA型受体(ActR-ⅡA)或ActR-ⅡB结合,通过信号通路进入细胞核,从而对靶基因进行调控。*MSTN*参与的信号通路主要有三条:第一条是Smad途径。*MSTN*与ActR-ⅡB结合后,导致Smad磷酸化使Smad7与其相结合并转入细胞核,从而抑制生肌调节因子MRF家族成员如*MyoD*、Myf5等的表达,进而抑制肌细胞的分化。第二条是PI3K/Akt/Foxo途径。*MSTN*可通过调控IGF-1抑制PI3K的活性,从而使AKT磷酸化减少,叉头型转录因子(Foxo)表达上调,进而诱导E3泛素连接酶*MuRF-1*和*Atrogin-1*的表达增加,使肌球蛋白合成减少。第三条是MAPK途径。*MSTN*可分别通过JNK/P38MAPK/$ERK_{1/2}$途径进入细胞核,抑制肌肉增生相关基因的表达。另外,*MSTN*还能调控肌腱组织的结构与功能。*MSTN*缺失型动物的肌腱较野生型的小,且Ⅰ型胶原表达量以及成纤维细胞的密度均低,容易造成动物肌肉拉伤[18]。

为了进一步研究*MSTN*敲除导致小鼠骨骼肌纤维及体质量变化的具体机制,本研究采用qPCR法检测了肌肉中相关基因的表达,发现*MSTN*敲除组小鼠中泛素连接酶*Atrogin-1*和*MuRF-1* mRNA的表达水平较野生型小鼠显著降低,分别降低了70%和69%。骨骼肌含量的维持主要通过两种方式:蛋白质合成和降解。体内蛋白质降解主要有3种途径:溶酶体-蛋白酶体途径、泛素-蛋白酶体途径和钙依赖-蛋白酶体途径。参与泛素-蛋白酶体途径的泛素连接酶*MuRF-1*和*Atrogin-1*,受Akt/Foxo信号通路的调控。而*MSTN*激活后可抑制PI3K活性以及Akt的磷酸化,从而激活Foxo[19-20]。本研究将小鼠*MSTN*敲除后,由于可能解除了*MSTN*对PI3K活性的抑制,促进了Akt的磷酸化,从而抑制了Foxo的活性,导致泛素连接酶*MuRF-1*和*Atrogin-1*表达下调,最终导致蛋白降解减少。因此,敲除小鼠*MSTN*会导致小鼠骨骼肌纤维增粗,体质量增加。此外,Zhu X等[21]研究发现,虽然敲除*MSTN*基因导致了大鼠骨骼肌纤维数量增多,肌纤维增粗,但其肌肉力量反而减弱。其可能的机制主要有两个方面:一方面,*MSTN*失活后会解除其对肌肉增生相关基因表达的抑制,从而使动物骨骼肌增生或肌细胞肥大;另一方面,*MSTN*基因缺陷却会造成肌肉中线粒体DNA减少,使肌肉有氧呼吸减弱,进而导致肌力下降。Amthor等[22]研究发现*MSTN*突变型小鼠虽然肌纤维数量大量增加,但肌肉的最大强直性张力并没有增加,且肌肉收缩与舒张速率增加,肌肉力量减弱。

下一步我们还将继续检测*Pax7*、*Myf5*、*MyoD*等生肌相关调节因子以及Smad和PI3K/AKT信号通路的表达情况,验证*MSTN*基因敲除后小鼠肌力及肌张力等肌肉功能的变化,以便更深入了解敲除*MSTN*后导致小鼠骨骼肌生长的相关机制。

综上所述,本研究利用Cre-loxP系统成功构建了*MSTN*基因敲除的小鼠模型,并发现敲除*MSTN*使哺乳期幼鼠骨骼肌纤维增粗,体质量增加,其机制可能与泛素连接酶*MuRF-1*和*Atrogin-1*的表达下调有关。该研究结果将为下一步进行*MSTN*功能的研究提供一个良好的平台,也为后续进一步研究*MSTN*调控骨骼肌生长的具体机制打下了基础。

参考文献:

[1] Gu H, Cao Y, Qiu B, *et al*. Establishment and phenotypic analysis of an Mstn knockout rat[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 477(1): 115-122. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.06.030.

[2] Mcpherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member [J]. Nature, 1997, 387(6628): 83-90. DOI: 10.1038/387083a0

[3] Welle S, Bhatt K, Pinkert C A, *et al*. Muscle growth after postdevelopmental myostatin gene knockout[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 292(4): E985-E991. DOI: 10.1152/ajpendo.00531.2006

[4] Jones J C, Kroscher K A, Dilger A C. Reductions in expression of growth regulating genes in skeletal muscle with age in wild type and myostatin null mice[J]. BMC Physiol, 2014, 14: 3. DOI: 10.1186/1472-6793-14-3

[5] Rao S, Fujimura T, Matsunari H, *et al*. Efficient modification of the myostatin gene in porcine somatic cells and generation of knockout piglets[J]. Mol Reprod Dev, 2016, 83(1): 61-70. DOI: 10.1002/mrd.22591

[6] Argiles J M, Orpi M, Busquets S, *et al*. Myostatin: more than just a regulator of muscle mass[J]. Drug Discov Today, 2012, 17(13-14): 702-709. DOI: 10.1016/j.drudis.2012.02.001

[7] Amthor H, Hoogaars W M. Interference with myostatin/ActRIIB signaling as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy[J]. Curr Gene Ther, 2012, 12(3): 245-259. DOI: 10.2174/156652312800840577

[8] Bish L T, George I, Maybaum S, *et al*. Myostatin is elevated in congenital heart disease and after mechanical unloading [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e23818. DOI: 10.1371/journal.pone.0023818

[9] Zhou X, Wang J L, Lu J, *et al*. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival[J]. Cell, 2010, 142(4): 531-543. DOI: 10.1016/j.cell.2010.07.011

[10] Bi Y, Hua Z, Liu X, *et al*. Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP[J]. Sci Rep, 2016, 6: 31729. DOI: 10.1038/srep31729

[11] 李嘉蕙, 葛佳, 汪丽君, 等. Cre/Loxp 系统在转基因拟南芥杂交后代中的删除效率分析[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2015(07): 61-68. DOI: 10.13718/j.cnki.xsxb.2015.07.012
Li Jiahui, Ge Jia, Wang Lijun, *et al*. Recombination Efficiency Analysis of Cre/Loxp System in Hybrid Progenies of Arabidopsis thaliana[J]. Journal of Southwest China Normal University(Natural Science Edition), 2015(07): 61-68. DOI: 10.13718/j.cnki.xsxb.2015.07.012

[12] Hu S, Ni W, Sai W, *et al*. Knockdown of myostatin expression by RNAi enhances muscle growth in transgenic sheep [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58521. DOI: 10.1371/journal.pone.0058521

[13] 高丽, 谌颜, 扈廷茂, 等. 肌肉生长抑制素基因在哺乳动物中的最新研究进展[J]. 生物技术进展, 2014(06): 381-388. DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2014.06.01
Gao Li, Chen Yan, Hu Tingmao, *et al*. The Latest Research Progress of Myostatin in Mammals[J]. Progress in Biotechnology, 2014(06): 381-388. DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2014.06.01

[14] Qian L, Tang M, Yang J, *et al*. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscled phenotype in Meishan pigs[J]. Sci Rep, 2015, 5: 14435. DOI: 10.1038/srep14435

[15] Luo J, Song Z, Yu S, *et al*. Efficient generation of myostatin (MSTN) biallelic mutations in cattle using zinc finger nucleases[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95225. DOI: 10.1371/journal.pone.0095225

[16] Mosher D S, Quignon P, Bustamante C D, *et al*. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs[J]. PLoS Genet, 2007, 3(5): e79. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030079

[17] Guo T, Jou W, Chanturiya T, *et al*. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity[J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4937. DOI: 10.1371/journal.pone.0004937

[18] Mendias C L, Bakhurin K I, Faulkner J A. Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(1): 388-393. DOI: 10.1073/pnas.0707069105

[19] Steculorum S M, Ruud J, Karakasilioti I, *et al*. AgRP Neurons Control Systemic Insulin Sensitivity via Myostatin Expression in Brown Adipose Tissue[J]. Cell, 2016, 165(1): 125-138. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.044

[20] Mcfarlane C, Plummer E, Thomas M, *et al*. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism[J]. J Cell Physiol, 2006, 209(2): 501-514. DOI: 10.1002/jcp.20757

[21] Zhu X, Hadhazy M, Wehling M, *et al*. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle[J]. FEBS Lett, 2000, 474(1): 71-75. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01570-2

[22] Amthor H, Macharia R, Navarrete R, *et al*. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(6): 1835-1840. DOI: 10.1073/pnas.0604893104

(收稿:2016-09-18;修回:2016-11-10)

(编辑 吴培红)