

## 绵羊 *Follistatin* 基因表达及其结构域的功能分析

张宁<sup>1,2</sup>, 张雪梅<sup>1,2</sup>, 刘明军<sup>1,2</sup>, 谭立新<sup>1,2</sup>

1 新疆维吾尔自治区动物生物技术重点开放实验室, 乌鲁木齐 830000

2 新疆畜牧科学院 农业部草食家畜繁育生物技术重点开放实验室, 乌鲁木齐 830000

**摘要:** 为研究羊 *Follistatin* 基因的功能, 提取了绵羊卵巢总 RNA, 通过 RT-PCR 方法获得羊 *Follistatin* cDNA 的完整开放阅读框 (1 038 bp)。去除信号肽序列后与原核表达载体 pET41a 连接, 构建重组表达质粒 pFSsig<sup>-</sup>, 经大肠杆菌诱导表达获得 FS sig<sup>-</sup> 蛋白 (66 kDa)。通过 RT-PCR 克隆了包含 N 端和结构域 1 的 *Follistatin* 突变体 (FS N+D1), 将 FS N+D1 片段插入慢病毒载体 (pLEX-MCS) 构建了 pFS-N+D1 慢病毒重组表达质粒。在 293T 细胞中进行慢病毒的包装, 再感染绵羊肌肉原代细胞, 得到稳定表达 FS N+D1 的肌肉细胞系, 通过细胞生长曲线结果显示稳定表达 FS N+D1 的肌肉细胞明显比正常肌肉细胞增殖快, 且差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 表明绵羊 FS N+D1 结构域有促进肌肉细胞生长的功能。

**关键词:** 绵羊 *Follistatin* 基因, 原核表达, 慢病毒, 细胞生长曲线

## Ovine *Follistatin* gene expression and functional analysis of follistatin domains

Ning Zhang<sup>1,2</sup>, Xuemei Zhang<sup>1,2</sup>, Mingjun Liu<sup>1,2</sup>, and Lixin Tan<sup>1,2</sup>

1 Key Laboratory of Animal Biotechnology of Xinjiang, Urumqi 830000, China

2 Key Laboratory of Livestock Reproduction & Biotechnology of Ministry of Agriculture, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, China

**Abstract:** In order to study ovine follistatin function, we amplified the total of 1 038 base pair of ovine complete follistatin cDNA and cloned into pGEM-T vector by RT-PCR from ovine ovary RNA. After removal of the signal peptide it was subcloned into the pET41a to construct the prokaryotic expression vector, named pFSsig<sup>-</sup>. SDS-PAGE and Western blotting identified the 66 kDa product of the expression of follistatin cDNA. Based on the complete CDS sequence, we cloned follistatin N-terminal domain and domain 1 with PCR and inserted into pLEX-MCS lentiviral vector, named pFS-N+D1. After package and passage of lentivirus in 293T cells, and then infected sheep primary muscle cells (SPMC). The expression of FS N+D1 in SPMC was assayed by Western blotting. The cell growth curve of the infected SPMC and noninfected control cells displayed that FS N+D1 stably transfected SPMC proliferated significantly faster than the control cells ( $P < 0.01$ ). Our data inferred that ovine FS N+D1 domain had the function to stimulate sheep muscle cell growth.

**Keywords:** ovine *Follistatin* gene, prokaryotes expression, lentivirus, cell growth curve

**Received:** February 9, 2010; **Accepted:** May 13, 2010

**Supported by:** Project of High Technology Research and Development of Xinjiang (No. 200611106).

**Corresponding author:** Mingjun Liu. Tel: +86-991-4813258; Fax: +86-991-4841417; E-mail: xjlmj2004@yahoo.com.cn

新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划 (No. 200611106) 资助。

卵泡抑素 (Follistatin, FS) 是 1987 年自卵泡液中分离的一种前垂体细胞分泌的对卵泡刺激素 (Follicle stimulating hormone, FSH) 起拮抗作用的单链多肽, 富含半胱氨酸, 又名垂体促卵泡素抑制蛋白 (FsH-suppressing protein, FsP), 随后发现 FS 能与激活素 (Activin) 结合, 对卵母细胞的成熟和卵泡的发育<sup>[1]</sup>、精子的生成<sup>[2]</sup>、胚胎发育与分化、催产素的释放等起着重要的调节作用。FS 基因敲除小鼠研究表明 FS 基因的缺失能引起肌肉、皮肤等生长发育的异常<sup>[3]</sup>。FS 对 TGF- $\beta$  超家族许多成员具有拮抗作用, 因此对不同细胞如神经细胞<sup>[4]</sup>、成骨细胞<sup>[5]</sup>、肌肉细胞、红细胞生成<sup>[6]</sup>等有广泛的调节作用, 具有多方面的生物学功能<sup>[7]</sup>。肌肉抑制素基因 (Myostatin, 简称 MSTN) 属转化生长因子- $\beta$  超家族 (Transforming growth factor- $\beta$  super family, TGF- $\beta$ ) 成员, 是一种抑制肌肉细胞生长增殖的负调控基因<sup>[8]</sup>, 也是目前已知的最强的骨骼肌生长抑制物<sup>[9-10]</sup>。该基因的突变失活, 能阻断 MSTN 对肌细胞生长增殖的抑制作用, 引起所谓的“双肌性状”。最近研究表明 FS 与畜禽骨骼肌发育有密切的关系。FS 能与 MSTN C-端竞争性结合, 抑制 MSTN 跟受体结合, 阻断下游信号传导, 减弱 MSTN 对肌肉生长的抑制作用, 引起转基因小鼠肌肉异常增生肥大, 肌纤维的直径增长 28%, 单位面积肌纤维数量增长 66%<sup>[10]</sup>。

对人 FS 晶体结构研究发现 FS 由 3 个结构域、N 端及 C 端区组成, 1~63 位氨基酸为 N 端区, 64~136 位氨基酸为结构域 1 (D1), 137~211 位氨基酸为结构域 2 (D2), 212~288 位氨基酸为结构域 3 (D3), 288~315 位氨基酸为 C 端区<sup>[11]</sup>。FS 的每个结构域都有不同的配体结合活性, FS 结构域 2 与 Activin 结合能力强, 结构域 1 是与 MSTN 结合的最小区域, 且结合能力在 3 个结构域中最强, 删除 FSD2 或用 D1 替代 D2 后仍然表现出与 MSTN 强有力的结合能力<sup>[12]</sup>。目前对人及小鼠 FS 各结构域功能的研究已有很多, 但在家畜方面的研究还未见详细报道, 为进一步研究绵羊 FS 对肌肉细胞生长的调节作用, 本研究克隆了绵羊 FS 全长 ORF, 并在大肠杆菌中进行了表达, 在此基础上克隆了 N 端及结构域 1 (N+D1) 片段并构建了慢病毒表达载体。通过慢病毒载体转

化绵羊肌肉细胞在绵羊肌肉细胞上研究了 FS N+D1 结构域对绵羊肌肉细胞生长的调节功能, 为今后研制促肌肉生长制剂及转基因动物打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种、试剂、质粒

载体 pET41a 为本实验室保存; pLEX-MCS 由美国克罗拉多大学李川源教授实验室赠送; TRIzol、大肠杆菌感受态菌株 BL21 (DE3)、DH5 $\alpha$ 、鼠抗 HIS、HA 单抗均购自北京天根公司; IRDye® 800CW 标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自美国 LI-COR Biosciences 公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、IPTG 等试剂均购自大连 TaKaRa 公司; 反转录酶、小量质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自杭州博日公司; 中量质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司; 高糖 DMEM、Opti-MEM 购自 GIBCO 公司; 胎牛血清购自 HYCLONE 公司; 其他试剂均为国产分析纯产品。

#### 1.1.2 动物材料

实验中所用的绵羊卵巢取自天鹰屠宰厂; 293T 细胞、绵羊肌肉原代细胞由本实验室保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RNA 的提取、全长 cDNA 及 N+D1 结构域的克隆

取新鲜绵羊卵巢置于液氮中冷冻并进行研磨后提取总 RNA, 按反转录酶说明书进行 RT-PCR。参照牛 (GenBank Accession No. NM\_175801)、羊 FS 基因序列 (GenBank Accession No. M63123) 进行特异性引物设计。去除信号肽的 FS (FS sig<sup>-</sup>) 上游引物为: 5'-GTAAGCTTTAGGAAATTGCTGGCTCCG-3', 下游引物为 5'-GGCTCGAGAGGGTTTACCACTCTAGAATG-3', 分别引入了 *Hind* III、*Xho* I 酶切位点。FS N+D1 结构域上游引物为: 5'-AAGGATCCCTCAGGATGGCCCGTCCTA-3', 下游引物为: 5'-TTCTCGAGTTAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTATTACATTTGCCCTGGT-3', 分别引入了 *Bam*HI、*Xho* I 酶切位点, 下划线部分为血球凝集素 (HA) 序列。去除信号肽后的 FS PCR 扩增程序为: 95℃预变

性 5 min; 95℃变性 30 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 80 s, 35 个循环; 最后 72℃延伸 5 min。FS N+D1 结构域 PCR 扩增程序为: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s, 57℃退火 40 s, 72℃延伸 60 s, 35 个循环; 最后 72℃延伸 7 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳并观察结果。

### 1.2.2 原核及慢病毒表达质粒的构建

FS 全长片段 PCR 产物经胶回收后, 用 *Hind* III/*Xho* I 酶切, 与同样酶切处理的 pET41a 载体进行连接, FS N+D1 片段 PCR 产物经胶回收用 *Bam* H I/*Xho* I 酶切, 与同样酶切处理的 pLEX 慢病毒载体进行连接, 热击法转化 DH5 $\alpha$ , 挑选克隆进行 PCR、酶切鉴定, 挑选阳性克隆送上海生工生物有限公司进行 DNA 测序分析。重组质粒分别命名为 pFSsig<sup>-</sup>、pFS-N+D1。

### 1.2.3 *Fs sig<sup>-</sup>* 的原核表达及鉴定

将鉴定后的原核重组表达质粒 pFSsig<sup>-</sup> 和空载体质粒 pET41a 分别转化宿主菌大肠杆菌 BL21。分别挑选单菌落接种到 3 mL 含 Kan<sup>+</sup> 的 LB 培养基中, 于 37℃ 剧烈摇动培养 12 h, 取上述培养物按 1:100 的比例接种到 2 个 5 mL 含 Kan<sup>+</sup> 的新鲜 LB 培养基中, 37℃ 剧烈摇动培养 1.5 h, 使菌液的 OD<sub>600</sub> 达到 0.6~0.8。取 1 mL 作为诱导前对照, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37℃ 继续培养 4 h。收集培养液, 6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。用 PBS 漂洗菌体沉淀, 加入适量 PBS 重悬菌体沉淀, 再加入 2×SDS 上样缓冲液混匀, 煮沸 10 min 后, 按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳并以考马斯亮蓝染色。同时进行 Western blotting 免疫印迹, 使用的 His 标签为载体自带, 具体方法如下: 将凝胶放入电转缓冲液中, 湿转法 35 V 转印 110 min 后 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗为鼠抗 HIS 单抗 1:8 000 稀释, 4℃ 过夜孵育, PBST 洗涤 5 次, 每次 10 min, 二抗为 IRDye® 800CW 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 1:12 000 稀释, 室温孵育 50 min, PBST 洗涤 5 次, 每次 10 min, 最后用 PBS 洗涤 1 次, Odyssey 近红外双色激光成像系统 (Li-COR Biosciences) 扫描成像。

### 1.2.4 绵羊原代肌肉细胞培养

将 2 月龄胎羊用 Hanks 液清洗 3 次, 剪开皮肤

用镊子剪下肌肉组织, 去除结缔组织及脂肪, 剪碎至 2~3 mm<sup>3</sup> 的小块, 加入 0.2% 的 II 型胶原酶 8 mL, 移至 15 mL 离心管中, 37℃ 消化 1.5 h, 每隔 20 min 取出用吸管吹打, 取出消化液镜下观察至消化成单个细胞, 用不锈钢网过滤消化液至 15 mL 离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用含 10% 血清及 1% 双抗的 DMEM 8 mL 重悬细胞, 调整细胞密度至 1.5×10<sup>5</sup> 个/mL, 放入细胞瓶中 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72 h, 按常规方法传代培养。

### 1.2.5 *FS N+D1* 重组慢病毒的包装及稳定表达细胞系的建立

用 DMEM (含 10% FCS) 培养液培养 293T 细胞, 待汇合度达到 90% 时用 0.05% 胰蛋白酶消化传代, 取 5×10<sup>5</sup> 个细胞铺入 6 孔培养板中, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 待细胞汇合度达到 70%~80% 时将 pFS-N+D1 重组质粒 2  $\mu$ g, 包装质粒 pSPAX2 1.5  $\mu$ g, 包膜质粒 pMD2.G 0.5  $\mu$ g, 按 Lipofectamine™2000 说明书进行共转染, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 3 h 后换为正常 DMEM (含 10% FCS) 培养液, 次日上午移至 32℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱, 同时正常细胞作对照。48 h 后收集上清液, 用 0.45  $\mu$ m 过滤器过滤, 收集滤过液保存于 -70℃。

将培养好的绵羊肌肉原代细胞用 0.05% 胰蛋白酶消化后取 5×10<sup>5</sup> 个细胞铺入 6 孔培养板中, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h 后进行病毒感染, 移出正常培养液, 加入解冻的病毒液 1 mL, 按终浓度为 10  $\mu$ g/mL 加入聚凝胺 (Polybrene), 细胞置于 32℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育过夜, 次日上午移回 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育, 8 h 后更换正常培养液, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养。病毒感染 48 h 后, 按常规方法将细胞转入 10 cm 培养皿中, 待细胞贴壁后加入 600 ng/mL 的 puromycin 进行加压筛选, 3 d 后更换含同样浓度的 puromycin 选择性培养液, 同时设置正常细胞对照组, 待 7 d 后即可得到稳定转染的细胞。将稳定转染的绵羊肌肉细胞在 10 cm 培养皿中进行扩大培养, 取细胞裂解物后进行 Western blotting 免疫印迹检测。

### 1.2.6 绵羊肌肉细胞生长曲线的绘制

将稳定转染的细胞更换正常培养液后, 培养至

90%汇合,消化计数铺入24孔培养板,每孔细胞数为 $1 \times 10^4$ 个,分7组,每组3孔,同时设置正常细胞对照组。培养1周,期间3 d换液1次,逐日检测一组,计数。最后把7 d的细胞数值绘成图,即为细胞生长曲线,上述实验重复3次后获得数据用SPSS12.0软件进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 FS sig<sup>-</sup>及FS N+D1结构域的克隆

通过RT-PCR及PCR扩增,获得1 038 bp的FS ORF序列及948 bp的去除信号肽的FS序列(图1),经PCR、酶切及测序鉴定,与GenBank中牛FS cDNA进行Blast比对,结果表明序列一致性为98%。在此基础上扩增的FS N+D1结构域,获得495 bp的DNA片段,大小与预期结果一致(图2)。

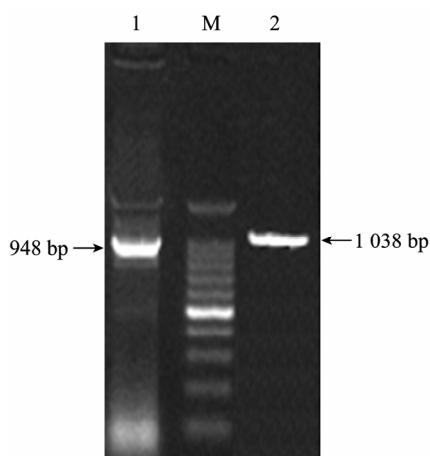


图1 Follistatin ORF及sig<sup>-</sup>的PCR扩增

Fig. 1 PCR products of Follistatin ORF and Follistatin sig<sup>-</sup>. 1: PCR products of FS sig<sup>-</sup>; 2: PCR products of FS ORF; M: 100 bp marker.

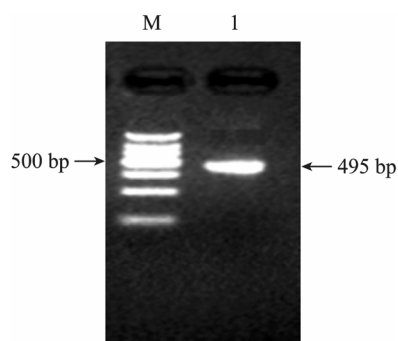


图2 FS N+D1的PCR扩增

Fig. 2 PCR products of Follistatin N+D1. 1: PCR products of FS N+D1; M: 150 bp marker.

### 2.2 FS sig<sup>-</sup>在大肠杆菌中的表达及鉴定

从SDS-PAGE结果(图3)可以看出,诱导后的样品有明显的蛋白表达条带,其表达产物的分子量约为66 kDa,与理论推算值一致。Western blotting免疫印记实验显示:经诱导后的表达产物在66 kDa处呈现阳性结果(图4),说明克隆的FS sig<sup>-</sup>在大肠杆菌得到了高效表达。

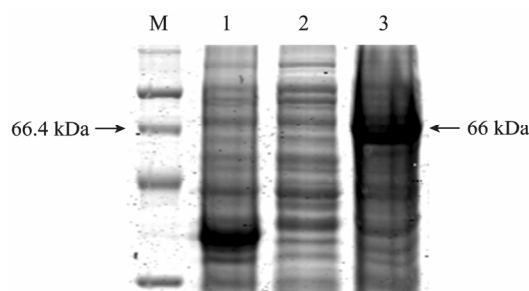


图3 pFS sig<sup>-</sup>的SDS-PAGE检测

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of FS sig<sup>-</sup> expression products in *E. coli*. M: prestained protein ladder; 1: pET41a after IPTG induction; 2: pFS sig<sup>-</sup> His before IPTG induction; 3: pFSsig<sup>-</sup> His after IPTG induction.

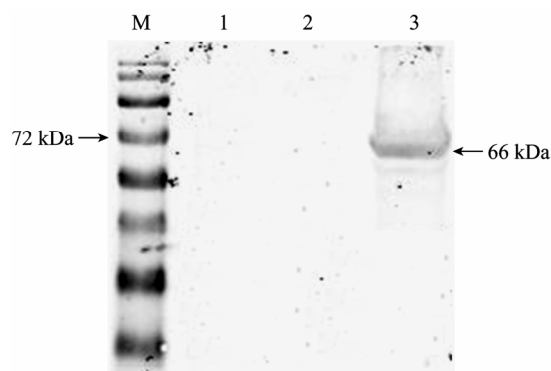


图4 pFSsig<sup>-</sup>的Western blotting检测

Fig. 4 Western blotting analysis of FS sig<sup>-</sup> expression products in *E. coli*. M: prestained protein ladder; 1: pET41a after IPTG induction; 2: pFSsig<sup>-</sup> His before IPTG induction; 3: pFSsig<sup>-</sup> His after IPTG induction.

### 2.3 绵羊原代肌肉细胞培养、重组慢病毒的包装及稳定表达细胞系的建立

37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养72 h后传代培养的绵羊原代肌肉细胞在镜下观察可见形态为长梭形均匀生长,状态良好(图5)。重组质粒pFS-N+D1转染293T细胞48 h后,收集并裂解细胞后用HA单克隆抗体做Western blotting免疫印迹检测,可见在18 kDa处有特异性条带出现,说明病毒包装成功并

能表达 FS N+D1 重组蛋白, 且与预期大小一致 (图 6)。用包装病毒感染绵羊肌肉原代细胞加压筛选 7 d 后, 正常细胞对照组全部死亡, 而经感染的绵羊肌肉原代细胞生长良好; 收集并裂解细胞进行 Western blotting 免疫印迹检测, 结果显示在 18 kDa 处有特异性条带出现, 说明在绵羊肌肉原代细胞中可以稳定表达 FS N+D1 重组蛋白, 即得到稳定表达的绵羊肌肉细胞系 (图 7)。

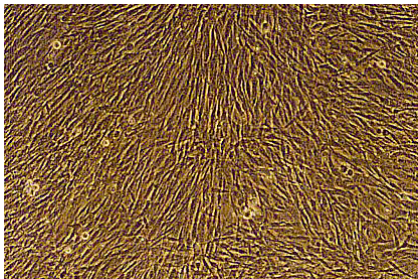


图 5 绵羊原代肌肉细胞 (100×)  
Fig. 5 Sheep primary muscle cells (100×).

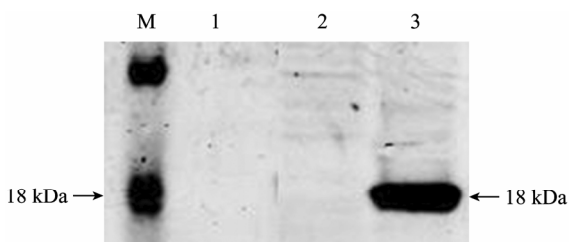


图 6 pFS-N+D1 转染 293T 细胞 Western blotting 检测  
Fig. 6 Western blotting analysis of 293T cell by pFS-N+D1 transfection. 1: 293T cell; 2: pLEX-MCS transfected 293T cell; 3: pFS-N+D1 transfected 293T cell; M: prestained protein ladder.

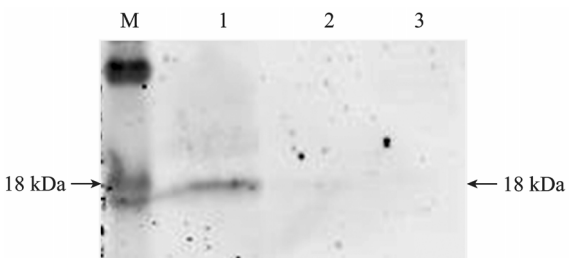


图 7 pFS-N+D1 感染绵羊原代肌肉细胞 Western blotting 检测  
Fig. 7 Western blotting analysis of sheep primary muscle cell by pFS-N+D1 infection. 1: pFS-N+D1 infected sheep primary muscle cell; 2: pLEX-MCS infected sheep primary muscle cell; 3: sheep primary muscle cell; M: prestained protein ladder.

## 2.4 绵羊肌肉细胞生长曲线的绘制

将稳定表达肌肉细胞系与正常肌肉细胞传至 24 孔培养板, 其起始细胞数量一致, 将 7 d 的计数结果绘制成图, 细胞生长曲线结果显示表达了 FS N+D1 蛋白的肌肉细胞在第 3~7 天增殖较正常肌肉细胞快, 在细胞对数生长期中第 3 天差异显著 ( $P < 0.05$ ), 第 4~7 天均差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 说明在 FS N+D1 过量表达的情况下能显著促进绵羊肌肉细胞生长 (图 8)。

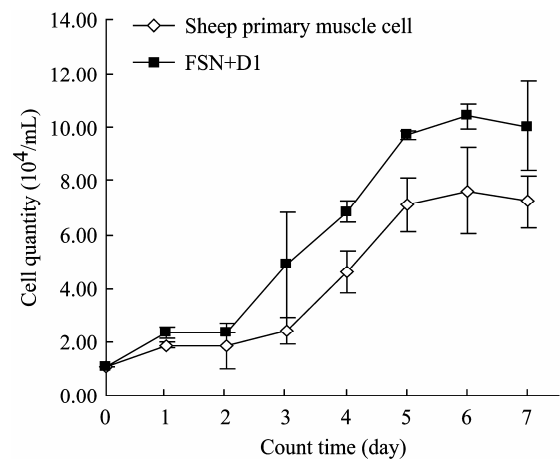


图 8 绵羊肌肉细胞生长曲线  
Fig. 8 Growth curve of sheep primary muscle cell.

## 3 讨论

MSTN 是目前已知的最强的骨骼肌生长抑制物<sup>[10]</sup>, 通过生物技术手段阻断 MSTN 对肌细胞的抑制作用来促进肌肉的生长、减少脂肪的生成已成为目前动物生物技术的热点, 国内目前只对猪、牛等动物的 FS 进行了克隆, 何新等<sup>[13]</sup>克隆了全长 1 038 bp 猪 FS cDNA 的完整开放阅读框, 在大肠杆菌表达了 63 kDa 的 GST-FS 融合蛋白, 该表达产物可作为饲料添加剂, 以期达到促进猪肌肉持续增长的目的。赵振春等<sup>[14]</sup>克隆了牛 FS cDNA 并在大肠杆菌中表达 44 kDa 的 HIS-FS 融合蛋白, 为促进家畜肌肉的生长提供了一定的实验基础。本实验首次克隆了绵羊 FS cDNA, 与人、牛、鼠的标准序列进行比对, 同源性分别为 93%、98%、90%。信号肽去除后构建重组表达质粒 pFSsig<sup>-</sup>进行原核表达得到了 66 kDa 的融合蛋白, 并以包涵体形式存在, 为后

续在体外研究 FS 各结构域的功能做好前期准备。

本研究为在短时间内筛选到稳定表达细胞系, 选择使用的 pLEX 慢病毒载体是第 2 代慢病毒表达系统, 该载体系统由包装质粒、包膜质粒及载体质粒组成。将慢病毒载体分成 3 个质粒, 使其共同重叠序列最小化, 降低了产生具有复制能力病毒的可能性, 同时可获得较高滴度的慢病毒<sup>[15]</sup>, 因其缺乏 HIV-1 增强子及启动子序列, 即使存在所有的病毒蛋白也不能转录出病毒 RNA, 因此该载体系统比第一代载体更安全可靠。慢病毒颗粒感染细胞快速、稳定并且效率可高达 90% 以上, 筛选时间一般在 7~10 d 左右, 可保证细胞的稳定表达及良好状态。基于以上慢病毒系统的优点, 本实验将 FS N+D1 片段克隆至 pLEX 载体的多克隆位点上, 构建重组表达质粒与其包装质粒、包膜质粒一起共转染 293T 细胞 48 h, 得到病毒颗粒。因为原代细胞不能无限传代, 筛选时间长短决定细胞状态的好坏, 细胞代次高会导致细胞核型发生改变, 无法进行后续转基因研究, 因此我们用病毒颗粒感染绵羊原代肌肉细胞, 筛选 7 d 即得到了稳定表达的绵羊肌肉细胞系, 大大缩短筛选时间, 提高筛选效率, 避免细胞核型变化及细胞老化。

国外对 FS 的研究开始于 20 世纪 90 年代, 用 FS 进行了小鼠的转基因研究, Lee<sup>[16]</sup>于 2007 年在肌肉专一性启动子的调控下将 FLRG (Follistatin related protein) 及 FS 分别进行小鼠转基因实验, 在转基因小鼠肌肉组织都能检测到 FLRG 或 FS 的表达, 而在非肌肉组织中无表达, 且肌肉明显增重, 说明 FS 或 FLRG 都有抑制 MSTN 的功能。由于 FS 有多种多样的生物学功能, 为了避免 FS 对其他生物学功能和繁育能力的影响, 国外大多学者开始了 FS 结构域的功能研究。Nakatani 等<sup>[17]</sup>克隆了小鼠 FS 的各个结构域, 比较了 FS 结合 Activin 和 MSTN 的活性, 根据 FS 的晶体结构发现结合 MSTN 最小结构域为 FSD1。而 Schneyer 等<sup>[12]</sup>分析 FS-ACT 复合体, 发现 FSD2 与 ACT 结合力强, 另外还证实了 FSD1 与 MSTN 结合能力强。而在牛、羊等大动物上至今仍没有对 FS 的各个结构域进行研究的报道, 因此本实验利用慢病毒系统建立了稳定表达 FS

N+D1 绵羊原代肌肉细胞系, 在此基础上绘制了正常细胞与稳定表达 FS N+D1 细胞系的生长曲线, 根据生长曲线, 第 1、2 天细胞增殖缓慢, 第 3 天开始进入对数生长期并快速增殖, 第 5 天后趋于稳定, 符合细胞生长规律。比较 FS N+D1 稳定表达肌肉细胞系与正常肌肉细胞, 结果显示第 1 天与第 2 天没有明显差异。在细胞对数生长期, 转化细胞系的细胞增殖速度比正常肌肉细胞明显加快, 从第 3 天开始差异显著 ( $P<0.05$ ), 到第 4~7 天差异变为极显著 ( $P<0.01$ ), 说明 FS N+D1 的表达对细胞增殖有明显的促进作用, 证明了绵羊 FSD1 的功能与小鼠 FSD1 功能相似, 能与 MSTN 结合并对细胞增殖起到促进作用。但对于结合能力的强弱没有与其他结构域进行比较, 有待于进一步研究。本项研究为下一步在绵羊上分析 FS 各结构域的功能和转基因动物的研究打下了基础。

## REFERENCES

- [1] Silva CC, Knight PG. Modulatory action of activin A and follistatin on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Biol Reprod*, 1998, **58**: 558–565.
- [2] Boitani C, Tefanini M, Fragale A, *et al.* Activin stimulates sertoli cell proliferation in a defined period of rtestis development. *Endocrinol*, 1995, **136**: 5438–5444.
- [3] Matzuk MM, Lu N, Vogel H, *et al.* Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*, 1995, **374**: 360–363.
- [4] Hashimoto M, Nakamura T, Inoue S, *et al.* Follistatin is developmentally regulated cytokine in neural differentiation. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 7203–7206.
- [5] Hashimoto M, Shoda A, Inoue S, *et al.* Functional regulation of osteoblastic cells by the interaction of activin-A with follistatin. *J Biol Chem*, 1991, **267**: 4999–5004.
- [6] Shiozaki M, Sakai R, Tabuchi M, *et al.* Evidence for the participation of endogenous activin-A/erythroid differentiation factor in the regulation of erythro-poiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **82**: 1553–1556.
- [7] DePaolo LV, Biasak TA, Eriksson GF, *et al.* Follistatin and activin: a potent intrinsic regulatory system within diverse tissue. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1991, **198**: 500–512.
- [8] Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, *et al.* Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin

- increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J*, 2008, **22**: 477–487.
- [9] Wehling M, Cai B, Tidball JG. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB J*, 2000, **14**: 103–110.
- [10] Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 9306–9311.
- [11] Keutmann HT, Schneyer AL, Sidis Y. The role of follistatin domains in follistatin biological action. *Mol Endocrinol*, 2004, **18**(1): 228–240.
- [12] Schneyer AL, Sidis Y, Gulati A. Differential antagonism of activin, myostatin and growth and differentiation factor 11 by wild-type and mutant follistatin. *Endocrinology*, 2008, **149**: 4589–4595.
- [13] He X, Qi B, He LQ, *et al.* Porcine Follistatin cDNA cloning and expression in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2006, **22**: 677–681.
- 何新, 齐冰, 何立千, 等. 猪 Follistatin cDNA 克隆及在大肠杆菌中的表达. *生物工程学报*, 2006, **22**: 677–681.
- [14] Zhao ZC. Cloning and prokaryotic expression of the bovine follistatin cDNA gene [D]. Beijing: China Agricultural University, 2004.
- 赵振春. 牛卵泡抑素 cDNA 的克隆及其原核表达[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [15] Higashikawa F, Chang L. Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology*, 2001, **280**: 124–131.
- [16] Lee SJ. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF- $\beta$  signaling pathways. *PLoS ONE*, 2007(**8**): e789.
- [17] Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, *et al.* Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J*, 2008, **22**: 477–487.