

姬改革, 胡艳, 陶志云, 等. 蛋内注射 T3 对鸭胚骨骼肌发育和 MSTN mRNA 表达的影响[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1): 164-169.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.01.025

## 蛋内注射 T3 对鸭胚骨骼肌发育和 MSTN mRNA 表达的影响

姬改革, 胡艳, 陶志云, 刘宏祥, 朱春红, 李慧芳  
(江苏省家禽科学研究所, 江苏 扬州 225003)

**摘要:** 为探讨生长因子三碘甲状腺原氨酸(Triiodothyronine, T3)对鸭胚骨骼肌生长发育和肌肉生长抑制素(Myostatin, MSTN) mRNA 表达的影响, 在入孵前的鸭种蛋蛋清内分别注射 100  $\mu$ l 的生理盐水溶液(对照组)和含 0.25  $\mu$ g T3 的生理盐水溶液(注射组), 检测 13、17、21、25、27 胚龄鸭胸肌和腿肌发育及骨骼肌 MSTN mRNA 的表达情况。结果显示, T3 处理极显著提高 27 胚龄鸭胚的胸肌质量, 但对腿肌质量影响不显著; 21 胚龄注射组胸肌 MSTN mRNA 表达显著高于对照组, 27 胚龄则显著低于对照组; 注射组腿肌 MSTN mRNA 表达仅在 25 胚龄显著增加。相关性分析结果显示, 两组骨骼肌质量与 MSTN mRNA 表达呈不同程度的线性相关。表明蛋内注射 T3 能增加鸭胚胸肌质量, 并改变 MSTN mRNA 表达量, MSTN mRNA 的差异表达可能在鸭胚胸肌发育过程中具有重要的作用。

**关键词:** 蛋内注射; T3; 鸭胚; 骨骼肌; MSTN

**中图分类号:** S834.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)01-0164-06

## Effects of *in ovo* injecting triiodothyronine into egg on embryonic skeletal muscle development and expression of myostatin mRNA in duck

Ji Gai-ge, HU Yan, TAO Zhi-yun, LIU Hong-xiang, ZHU Chun-hong, LI Hui-fang  
(Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225003, China)

**Abstract:** In order to investigate the effect of triiodothyronine (T3) on duck embryonic skeletal muscle development and the expression of myostatin(MSTN) mRNA, the 100  $\mu$ l saline solution (control group) and T3 saline solution containing 0.25  $\mu$ g T3 (injection group) were *in ovo* injected into duck eggs before hatching. The skeletal muscle development on embryonic days 13, 17, 21, 25 and 27 were measured and the expression of MSTN mRNA were detected using real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that *in ovo* injection of T3 significantly increased the breast muscle weight in embryonic age 27, but had no significant influence on embryonic leg muscle weight. The expression of MSTN mRNA in injection group was significantly higher at embryonic age 21 than that in control group but lower at embryonic age 27. The MSTN mRNA expression of leg muscle in injection group only increased significantly in embryonic age 25. There were liner correlations between skeletal muscles weights and MSTN mRNA expression. It was concluded that *in ovo* injection of T3 increased the duck embryonic breast muscle weight, along with the changes of MSTN mRNA expression level, and differential expression of MSTN mRNA may play an important role in embryonic breast muscle development.

**收稿日期:** 2015-05-29

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(31172194); 江苏省科技支撑计划项目(BE2014362); 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(14)2079 ]

**作者简介:** 姬改革(1985-), 女, 河南洛阳人, 硕士, 助理研究员, 主要从事家禽遗传育种与资源保护研究。(E-mail) jigaige@126.com

**通讯作者:** 李慧芳, (E-mail) lhxf\_002@aliyun.com

between skeletal muscles weights and MSTN mRNA expression. It was concluded that *in ovo* injection of T3 increased the duck embryonic breast muscle weight, along with the changes of MSTN mRNA expression level, and differential expression of MSTN mRNA may play an important role in embryonic breast muscle development.

**Key words:** *in ovo* injection; triiodothyronine; duck embryo; skeletal muscle; myostatin

甲状腺激素 (Thyroid hormones, THs) 与动物肌肉生长发育密切相关<sup>[1]</sup>。T3 和四碘甲状腺原氨酸 (Thyroxine, T4) 是 THs 的两种形式。T3 是活性形式,是 T4 经脱碘酶的作用转化而来,调节基因的转录<sup>[2]</sup>。T3 和 T4 是由甲状腺分泌,对刚出生的大鼠切除甲状腺,肌肉组织会变薄,变灰,变松弛<sup>[3]</sup>。T3 注射的大鼠,肌纤维数量和类型都会发生改变<sup>[4]</sup>。细胞水平的试验结果表明,经 T3 处理的小鼠<sup>[5]</sup>和鹌鹑<sup>[6]</sup>的成肌细胞中,生肌调节因子 (Myogenic determination gene, MyoD) 基因家族的 *Myod* 和 *Myog* 的表达水平发生了改变。

MSTN 属于转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 超家族,主要在骨骼肌表达。前期研究发现<sup>[7]</sup>,在鸭的胚胎期,MSTN 在胸、腿肌中持续表达,各自表达转折时间点与胸、腿肌绝对生长和相对生长的时间点吻合。Ma 等研究发现<sup>[8]</sup>,在 *MSTN* 基因的启动子区域有 THs 的反应元件,因此推测 THs 可能在调节 *MSTN* 的表达方面有重要的作用。对成年大鼠注射 T4,可以改变骨骼肌 *MSTN* 基因的表达水平<sup>[9]</sup>。T3 能否对骨骼肌 *MSTN* 的表达产生影响尚待研究。胸肌和腿肌是禽类主要的产肉部位,关于 T3 对禽类肌肉发育及 *MSTN* 基因表达的影响,目前尚未发现相关的报道。

胚胎期是动物肌肉形成的重要时期,肌纤维细胞的数量基本固定下来,出生后数量不再增加。蛋内注射技术是通过向蛋内注射外源物质,干预胚胎生长,是研究禽类胚胎发育及特定营养素功能的常用技术<sup>[10-11]</sup>。高邮鸭和金定鸭是体型、外貌、生长速度差异较大的 2 个地方品种,在胚胎期高邮鸭的体质量、胸肌质量和腿肌质量已经显著高于金定鸭<sup>[7]</sup>。前期检测发现<sup>[12]</sup>,高邮鸭种蛋蛋清内的 T3 含量极显著高于金定鸭,推测增加蛋清内 T3 的含量可能会对鸭胚胸肌和腿肌生长发育产生影响。本试验通过孵化前在金定鸭种蛋蛋清内注射 T3,研究蛋内 T3 对鸭胚胎期骨骼肌发育及 *MSTN* mRNA 表达的影响,以期从分子水平探讨蛋内 T3 是否通过 *MSTN* 基因参与骨骼肌的发育调控。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物及处理

1.1.1 T3 注射试剂 采用 0.9% 生理盐水为稀释

液,将甲状腺激素 T3 (T2877, Sigma USA) 配制成终浓度为 0.002 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的注射液。

1.1.2 蛋内注射和样品采集 从江苏省家禽研究所金定鸭试验群体,选取种蛋 500 枚,常规孵化。孵化前,将种蛋随机分成两组,分别为对照组和注射组,进行消毒,编号,称质量,品种内蛋质量变异系数在 2% 以内。

用 2% 碘酊对种蛋小头端进行消毒,用 75% 酒精脱碘,用蟾蜍脊髓穿刺针轻轻在消毒部位钻孔,对照组用 1 ml 注射器向蛋清内导入 100.0  $\mu\text{l}$  的生理盐水,注射组蛋清内导入 100.0  $\mu\text{l}$  的 T3 注射试剂,石蜡封口。

两组种蛋随机置入同一孵化箱,在相同条件 (温度为 37.5~38.2  $^{\circ}\text{C}$ ,相对湿度为 50%~70%) 下同时开始孵化。种蛋入孵后 24 h 设定为 1 胚龄,分别于 5 个时间点 (13 胚龄、17 胚龄、21 胚龄、25 胚龄、27 胚龄) 时分离胸肌和腿肌,称质量后,置于液氮速冻,然后转到 -75  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。每个时间点各组随机采集样本 16 只,公母各半。体质量等的测定及度量统计方法按《NYT 823-2004》中的方法进行<sup>[13]</sup>。

### 1.2 主要试剂和仪器

TRNzol-A<sup>+</sup> 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)、pGEM-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) 购自 TIANGEN 公司, DNA Marker DL2000 为 TaKaRa 公司产品。9700PCR 仪和 Max3000P 荧光定量 PCR 仪,凝胶成像系统 (Tanon 2500),紫外分光光度计 (GeneQuant II, Pharmacia Biotech)。

### 1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

金定鸭肌肉总 RNA 提取用 Trizol 法,按总 RNA 提取试剂的说明书进行。RNA 样品经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测,保证 RNA 样品质量可靠,计算样品总 RNA 浓度。检测后,取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA,按照 Quant cDNA 第一链合成试剂盒的使用说明书进行 cDNA 第一链的合成,用内参基因  $\beta$ -actin 检测 cDNA 合成质量以及是否有基因组 DNA 污染。RT 产物保存在 -20

℃ 备用。

#### 1.4 引物设计、目的片段标准品的制备

根据 GenBank 中相关序列设计引物,引物序列为:正向 5'-GCACTGGTATTTGGCAGAGTATT-3',反向 5'-TCACCTGGTCCTGGGAAAGT-3'。扩增片段长度为 143 bp。PCR 反应体系:预混液 10.0  $\mu$ l,上下游引物 10  $\mu$ mol/L 各 0.5  $\mu$ l,模板 cDNA 2.0  $\mu$ l, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 0.7  $\mu$ l;反应条件:95 ℃ 预变性 1 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 25 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶鉴定后,用 DNA 产物纯化回收试剂盒纯化回收目的片段,与 pGEM-T 载体相连接,转化 *Escherichia coli* TOP10 感受态细胞,挑取阳性克隆于含氨苄抗性的 LB 液体培养基中,37 ℃,200 r/min 振荡培养过夜,用 PCR 鉴定。将鉴定正确的质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定,所获序列结果在 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站中用 Blast 程序与 GenBank 数据库中公布的已知基因进行序列同源性比较。比对正确后,用质粒小提试剂盒提取阳性克隆的质粒,用分光光度计测其浓度后作为标准品备用。

#### 1.5 荧光实时定量 PCR

所用荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 法,将每个待测样品 RT 产物取等体积混合,用混合样(cDNA mix)进行反应条件的优化,包括目的基因引物设计与合成、最佳退火温度、引物浓度、模板浓度等,确定好最佳反应条件。将上述经测序验证后正确的含 *MSTN* 基因的标准质粒,做 10<sup>n</sup> 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 个重复。

根据标准品构建的标准曲线(标准曲线由系统软件自动分析获得)计算出待测样品目的基因的拷贝数。

#### 1.6 统计分析

运用 SPSS 软件中 One-way ANOVA、Bivariate Correlation 分析不同胚龄 *MSTN* mRNA 表达的差异及与肌肉质量的相关性。用 Independent samples T test 检测 T3 对肌肉 *MSTN* mRNA 表达的影响。

## 2 结果

#### 2.1 *MSTN* 基因的标准曲线及溶解曲线

*MSTN* 基因标准质粒模板稀释浓度梯度为 10<sup>4</sup>~10<sup>10</sup>,将标准品和样本在同一个试验中运行,得到标准曲线方程为  $Y = -3.203 \lg x + 30.000$ ,相关系数为 1.000,扩增效率为 105.2%,说明线性关系好,扩增效率接近 100%,达到定量要求,可以进行准确定量。溶解曲线只有单一特异性峰,表明反应特异性好,无引物二聚体及非特异性条带形成,符合 SYBR Green 染料的检出要求。

#### 2.2 蛋内注射 T3 对鸭胚胎期胸肌和腿肌发育的影响

蛋内注射 T3 对鸭胚胎期胸肌质量和腿肌质量的影响结果见表 1,随着胚龄的增加,两组的胸肌质量逐渐增大,但从 21 胚龄开始,胸肌质量增长减慢,两组之间无显著差异;27 胚龄时,注射组胸肌质量极显著高于对照组。腿肌质量随胚龄增长而持续增加,各个发育阶段,对照组和注射组之间均无差异显著性。

表 1 蛋内注射 T3 对鸭胚胎期胸肌质量和腿肌质量的影响

Table 1 The effect of *in ovo* injecting T3 on breast muscle weight and leg muscle weight of duck embryos

指标	组别	13 胚龄	17 胚龄	21 胚龄	25 胚龄	27 胚龄
胸肌质量(g)	对照组	29.36 ± 1.12	153.93 ± 5.57	227.31 ± 9.76	225.69 ± 9.26	184.38 ± 9.61
	注射组	28.94 ± 1.74	152.38 ± 6.84	230.44 ± 7.56	238.00 ± 8.01	212.47 ± 7.02 **
腿肌质量(g)	对照组	84.80 ± 5.33	340.93 ± 10.11	862.00 ± 40.01	1 656.2 ± 100.54	2 324.7 ± 119.41
	注射组	87.06 ± 4.53	331.12 ± 13.58	851.38 ± 25.03	1 718.4 ± 86.54	2 432.8 ± 131.95

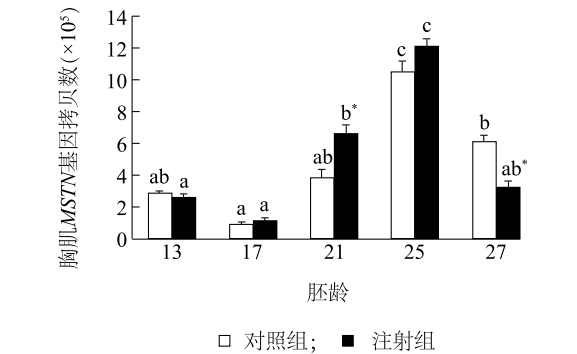
\*\* 表示同指标同胚龄对照组与注射组间差异达 0.01 显著水平。

#### 2.3 蛋内注射 T3 对鸭胚胎期胸肌 *MSTN* mRNA 表达的影响

从图 1 可知,两组的 *MSTN* mRNA 变化趋势基

本一致,呈前低后高的趋势。13 至 17 胚龄时,表达量较低;21 胚龄时,表达上升,注射组的表达量显著高于对照组;25 胚龄时,上升至最高水平,显著高于

其他胚龄;随后至 27 胚龄时,显著下调,且注射组显著低于对照组。



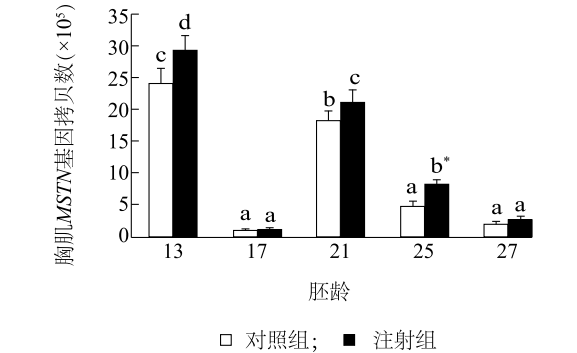
不同小写字母表示同一组内不同胚龄之间差异达 0.05 显著水平。\* 表示同胚龄对照组与注射组之间差异达 0.05 显著水平。

图 1 蛋内注射 T3 对鸭胸肌不同发育阶段 MSTN mRNA 表达的影响

Fig.1 The effect of *in ovo* injection of T3 on MSTN mRNA expression of duck breast muscle at different development phases

2.3 蛋内注射 T3 对鸭胚胎期腿肌 MSTN mRNA 表达的影响

从图 2 可知,两组的 MSTN mRNA 表达量变化趋势基本一致。13 胚龄时,MSTN mRNA 表达量最高,显著高于其他胚龄;17 胚龄时显著下降;21 胚龄时,又显著升高,随后开始显著下降;至 27 胚龄时,表达量维持在较低水平。25 胚龄时,注射组腿肌中 MSTN mRNA 表达量显著高于对照组,其他胚龄在两组之间均无显著差异。



不同小写字母表示同一组内不同胚龄之间差异达 0.05 显著水平。\* 表示同胚龄对照组与注射组之间差异达 0.05 显著水平。

图 2 蛋内注射 T3 对鸭腿肌不同发育阶段 MSTN mRNA 表达的影响

Fig.2 The effect of *in ovo* injection of T3 on MSTN mRNA expression of duck leg muscle at different development phases

2.4 鸭胚骨骼肌 MSTN mRNA 表达与胸肌和腿肌质量的相关性

鸭胚胎期骨骼肌 MSTN mRNA 表达与肌肉质量相关性分析(表 2)发现,对照组胸肌 MSTN mRNA 表达与胸肌质量呈显著正相关,腿肌 MSTN mRNA 表达与腿肌质量呈显著负相关。注射组胸肌 MSTN mRNA 表达与胸肌质量呈显著正相关,腿肌则呈显著负相关。

表 2 鸭胚骨骼肌 MSTN mRNA 表达与胸肌和腿肌质量的相关性  
Table 2 The correlation between MSTN mRNA expression and weights of breast muscle and leg muscle

组别	相关系数		P 值	
	胸肌	腿肌	胸肌	腿肌
对照组	0.270	-0.521	0.032	0
注射组	0.382	-0.563	0.001	0

3 讨论

禽类胚胎发育是在一个封闭的环境中进行,与母体没有直接的联系。胚胎生长所需的基因和非基因的信息都储存在种蛋中,蛋的组分对胚胎的发育极为重要。本试验以鸭为对象,在金定鸭种蛋蛋清内注射 T3,结果发现,T3 对鸭胚各检测时间点的腿肌质量无显著影响,但是显著增加了 27 胚龄时的胸肌质量,与王勇<sup>[14]</sup>在孵化前的鸡蛋中注入 T3 溶液,提高了出雏后雄性雏鸡胸肌质量的结果一致。在鹌鹑中,母鹌鹑被给予高剂量的 T4,会提高蛋黄中 T4 的沉积,但含高 T4 的种蛋,胚胎期的体质量、体长等并没有出现显著增高<sup>[15]</sup>。对雄性大鼠连续注射 T4<sup>[9]</sup>,则出现体质量下降的情况。研究结果不一致可能与品种、物种不同有关,也可能与激素形式不同、研究的发育时期不同有关。胰岛素样生长因子(IGFs)被认为在肌肉细胞的分化和生长过程中具有重要正向调控作用。Liu 等<sup>[16]</sup>通过在蛋内注射 IGF-I,同样提高了 27 胚龄时鸭胚的胸肌质量,同时发现肌纤维数量和直径都出现上调。THs 可以调节禽类血清内 IGF-I 水平<sup>[17]</sup>,在胚胎发育后期,各组织器官逐渐发育成熟,T3 也可能通过调节 IGF-I 的分泌,调节肌纤维数量和直径,进而调节肌肉的发育。

在孵化前的种蛋内注射 T3,显著提高了 21 胚



龄胸肌和 25 胚龄腿肌 *MSTN* mRNA 的表达水平。对成年雄性大鼠连续注射 14 d T4<sup>[9]</sup>, 骨骼肌 *MSTN* 基因的 mRNA 和蛋白质水平显著提高, 说明尽管物种不同, THs 可以上调 *MSTN* 基因表达。之前的研究结果表明<sup>[7]</sup>, 鸭胚胎期 *MSTN* 的表达趋势可能和肌纤维数量形成同步高峰, 随着肌纤维数量形成高峰的启动, 其表达量逐渐上升, 至肌纤维数量形成高峰结束上升至最高点, 随后伴随着肌纤维的肥大其表达量迅速下降。21 胚龄是胸肌 *MSTN* mRNA 表达的转折点, 之后在 25 胚龄时出现表达高峰, 25 胚龄时, 腿肌 *MSTN* mRNA 表达开始下降, 至 27 胚龄时, 一直处于低水平的表达。21 胚龄和 25 胚龄可能是胸腿肌 mRNA 低表达与肌纤维肥大同步的时期。在本试验中, 注射外源 T3 后, 这两个时间点的 *MSTN* mRNA 表达显著增高, 使肌纤维肥大的程度进一步提高。*MSTN* mRNA 表达的上升, 也可以上调 *p21* 基因的表达<sup>[18]</sup>。*p21* 是细胞周期的检查站, 浓度升高可以降低 G0/G1 期细胞在细胞群中的比例<sup>[19]</sup>, 抑制胚胎期成肌细胞增殖, 成肌细胞退出细胞周期, 分化为肌纤维。*MSTN* 基因可能通过调节骨骼肌前体细胞的增殖与分化, 在胚胎期肌肉发育过程中起作用。

27 胚龄时, 鸭胚胎期胸肌 *MSTN* mRNA 表达在注射组中出现下降, 与负调控作用相一致, 胸肌质量在注射组是升高的。腿肌 *MSTN* mRNA 表达在注射组没有升高的现象, 腿肌质量与基因表达相一致, 在两组之间无显著差异, 这可能与机体内 T3 的生理浓度有关。Cogburn 等<sup>[20]</sup>研究发现维持禽类正常生长发育对 THs 的需求有一个正常的生理波动范围, 对正常的肉鸡饲料中添加 T3 则会抑制鸡的生长。27 胚龄时, 除了种蛋内储存的 THs 外, 下丘脑-垂体-甲状腺轴的逐渐发育成熟, 胚胎自身也会产生 THs, 当胚胎中的 THs 含量超过波动范围时, 可能会对 *MSTN* mRNA 表达产生抑制作用, 表达量在注射组出现下降。*MSTN* mRNA 表达下降, 成肌细胞进一步分化为肌纤维, 使 27 胚龄时胸肌质量升高。21 胚龄后, 两组的胸肌质量升高减缓, 基因表达量则是先升后降, 呈正线性相关; 腿肌质量呈逐渐上升的趋势, 基因表达量则是逐渐下降, 因此呈负线性相关, 与 *MSTN* 的负调控作用一致。由此可见, 胚胎期骨骼肌 *MSTN* mRNA 的表达水平的差异变化与其肌肉质量变化相一致, 说明蛋清内 T3 含量与 *MSTN*

mRNA 表达水平密切相关。

此外, 研究发现<sup>[8]</sup>在 *MSTN* 基因的启动子区域除了有 THs 的反应元件, 也有其他与肌肉生长有关的转录因子的反应元件。在小鼠中发现<sup>[21]</sup>, 骨骼肌中 D2(II 型脱碘酶) 活性可以改变 T4 到 T3 转变效率, 调节下游生肌因子 *Myod* 的表达。同时, 研究发现 *Myog* 的表达与 *MSTN* 表达的变化密切相关<sup>[19,22]</sup>。*Myod* 和 *Myog* 是调节肌细胞生成的基因家族成员, 与肌肉的发育紧密相关, 可激活静止状态的肌肉特有基因与肌肉特有的增强子结合共同促进转录。肌肉细胞分化生长同时受正向调控因子和负向调控因子双向调节。*MSTN* 作为肌肉发育的负调控因子, T3 与 *MSTN*、*MyoD* 家族基因之间的相互作用及调控肌肉发育的机理, 需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] SALVATORE D, SIMONIDES W S, DENTICE M, et al. Thyroid hormones and skeletal muscle-new insights and potential implications [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(4): 206-214.
- [2] GALTON V A. The history of 3,5,3'-triiodothyronine [J]. *Thyroid*, 2013, 23(1): 9-13.
- [3] SCPW R O. Effect of growth hormone on muscle and skin collagen in neonatal thyroidectomized rats [J]. *Endocrinology*, 1951, 49(5): 641-646.
- [4] NICOL C J, BRUCE D S. Effect of hyperthyroidism on the contractile and histochemical properties of fast and slow twitch skeletal muscle in the rat [J]. *Pflugers Arch*, 1981, 390(1): 73-79.
- [5] CARNAC G, AIBAGLI-CURIEL O, VANDROMME M, et al. 3, 5, 3'-Triiodothyronine positively regulates both *MyoD1* gene transcription and terminal differentiation in C2 myoblasts [J]. *Mol Endocrinol*, 1992, 6(8): 1185-1194.
- [6] MARCHAL S, CASSAR-MALEK I, PONS F, et al. Triiodothyronine influences quail myoblast proliferation and differentiation [J]. *Biol Cell*, 1993, 78(3): 191-197.
- [7] HU Y, LIU H X, SHAN Y J, et al. The relative expression levels of insulin-like growth factor 1 and myostatin mRNA in the asynchronous development of skeletal muscle in ducks during early development [J]. *Gene*, 2015, 567(2): 235-243.
- [8] MA K, MALLIDIS C, ARTAZA J, et al. Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone *in vitro* [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281(6): 1128-1136.
- [9] MA Y, CHEN X Q, LI Q, et al. Effect of thyroid hormone on the gene expression of myostatin in rat skeletal muscle [J]. *Asian-Aust J Anim Sci*, 2009, 22: 275-281.
- [10] SHAFHEY T M, AL-BATSHAN H A, AL-OWAIMER A N, et al. Effects of *in ovo* administration of L-carnitine on hatchability per-

- formance, glycogen status and insulin-like growth factor-I of broiler chickens [J]. Br Poult Sci, 2010, 51(1): 122-131.
- [11] GRODZIK M, SAWKSZ F, SAWOSZ E, et al. Nano-nutrition of chicken embryos. The effect of *in ovo* administration of diamond nanoparticles and L-glutamine on molecular responses in chicken embryo pectoral muscles [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(11): 23033-23044.
- [12] 宋卫涛,李慧芳,胡 艳,等.鸭胚和母体血清甲状腺激素活性的比较研究 [J]. 福建农业学报, 2013,27(11): 1155-1159.
- [13] NYT 823-2004 中华人民共和国农业行业标准-家禽生产性能名词术语和度量统计方法[S].
- [14] 王 勇.半胱胺和母源性甲状腺激素对雏禽生长的影响[D]. 无锡:江南大学, 2009.
- [15] WILSON C M, MCNABB F M. Maternal thyroid hormones in Japanese quail eggs and their influence on embryonic development [J]. Gen Comp Endocrinol, 1997, 107(2): 153-165.
- [16] LIU H H, WANG J W, CHEN X, et al. *In ovo* administration of rhIGF-1 to duck eggs affects the expression of myogenic transcription factors and muscle mass during late embryo development [J]. J Appl Physiol, 2011, 111(6): 1789-1797.
- [17] TSUKADA A, OHKUBO T, SAKAGUCHI K, et al. Thyroid hormones are involved in insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by stimulating hepatic growth hormone receptor (GHR) gene expression in the chicken [J]. Growth Horm IGF Res, 1998, 8(3): 235-242.
- [18] 梁耀伟,赵宗胜,陈丹盈,等.鸡,鹌鹑及其杂交禽胚胎肌肉发育过程中 *MSTN* 和 *p21* 基因的表达规律 [J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(6): 997-1002.
- [19] JOULIA D, BERNARDI H, GARANDEL V, et al. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin [J]. Exp Cell Res, 2003, 286(2): 263-275.
- [20] COGBURN L A, LIOU S S, ALFONSO C P, et al. Dietary thyrotropin-releasing hormone stimulates growth rate and increases the insulin: glucagon molar ratio of broiler chickens [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1989, 192(2): 127-134.
- [21] DENTICE M, MARSILI A, AMBROSIO R, et al. The FoxO3/type 2 deiodinase pathway is required for normal mouse myogenesis and muscle regeneration[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2010, 120(11): 4021.
- [22] KUMAR R, SINGH S P, KUMARI P, et al. Small interfering RNA (siRNA)-mediated knockdown of myostatin influences the expression of myogenic regulatory factors in caprine foetal myoblasts [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(3): 1714-1724.

(责任编辑:袁 伟)