



彭锦洲, 李雅, 窦宇昊, 等. 快型和慢型肉鸡肌纤维发育差异的 IGF1-PI3K/AKT 信号通路调控机制[J]. 南京农业大学学报, 2026, 49(3): 643–652.

Peng J Z, Li Y, Dou Y H, et al. Regulatory mechanisms of the IGF1-PI3K/AKT signaling pathway in myofiber developmental differences between fast- and slow-growing broilers[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2026, 49(3): 643–652.

快型和慢型肉鸡肌纤维发育差异的 IGF1-PI3K/AKT 信号通路调控机制

彭锦洲, 李雅, 窦宇昊, 吉倩昀, 陈兴勇*

(安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230000)

摘要: [目的] 本文旨在探究不同生长速度肉鸡在肌纤维结构及其分子调控机制上的差异, 揭示肌纤维发育特点及分子调控机制。[方法] 选取快速生长的 Cobb500 肉鸡和慢速生长的皖南三黄鸡为研究对象, 分别取 18 胚龄、21 日龄和 42 日龄的快、慢型肉鸡肌肉样本进行苏木精-伊红染色, 通过扫描电镜观察肌纤维形态结构, 利用实时荧光定量 RT-qPCR 和蛋白质免疫印迹检测肌纤维发育关键基因表达。构建胰岛素样生长因子 1 (IGF1) 敲除和过表达质粒并转染至鸡胚成纤维细胞 (DF-1), 验证 IGF1 的作用通路及功能。[结果] 快速型肉鸡 Cobb500 在 18 胚龄肌纤维直径显著低于慢速型肉鸡三黄鸡 ($P < 0.05$), 在 21 和 42 日龄显著高于慢速型肉鸡 ($P < 0.05$)。快速型肉鸡 18 胚龄的肌纤维密度显著高于慢速型肉鸡 ($P < 0.05$), 在 21 和 42 日龄显著低于慢速型肉鸡 ($P < 0.05$)。快速型肉鸡肌纤维中 IGF1 基因和蛋白表达量在 18 胚龄、21 日龄和 42 日龄显著高于慢速型肉鸡 ($P < 0.05$)。与阴性对照组和 IGF1 敲除组相比, 过表达 IGF1 显著增加丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (AKT1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (CDK4) 和 c-Jun N 末端激酶 (JNK) 基因表达 ($P < 0.05$)。在质粒转染 16~40 h, 过表达 IGF1 质粒转染组细胞活力显著高于敲除 IGF1 质粒转染组和空白对照组 ($P < 0.05$)。[结论] 快速型肉鸡肌纤维数量比慢速型肉鸡更多, IGF1 可以通过 PI3K/AKT 信号通路调控成肌纤维细胞的活力, 从而促进肌纤维的发育。

关键词: 快速型肉鸡; 慢速型肉鸡; 肌纤维结构; IGF1; PI3K/AKT1 通路

中图分类号: S834

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2026)03-0643-10

Regulatory mechanisms of the IGF1-PI3K/AKT signaling pathway in myofiber developmental differences between fast- and slow-growing broilers

PENG Jinzhou, LI Ya, DOU Yuhao, JI Qianyun, CHEN Xingyong*

(College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230000, China)

Abstract: [Objectives] This paper aimed to elucidate the differences in myofiber structure and molecular regulatory mechanisms between fast- and slow-growing broilers, with a focus on characterizing myofiber developmental traits and their underlying molecular pathways. [Methods] Fast-growing Cobb500 broilers and slow-growing Wannan Sanhuang chickens were selected. Muscle samples were collected at embryonic 18 days (E18), 21 days post-hatch (D21), and 42 days post-hatch (D42). Myofiber morphology was analyzed using hematoxylin and eosin (HE) staining and scanning electron microscopy (SEM), while key myogenic gene expression was quantified via quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and Western blotting. *In vitro* functional assays demonstrated that knockout and overexpression plasmids of insulin-like growth factor 1 (IGF1) were transfected into chicken embryo fibroblast (DF-1) cells to validate IGF1-mediated signaling pathways and biological functions. [Results] At embryonic 18 days (E18), the fast-growing broilers exhibited significantly smaller myofiber diameters compared to the slow-growing chickens ($P < 0.05$). Conversely, myofiber diameters in the fast-growing broilers surpassed those of slow-growing chickens at 21- and 42-days post-hatch ($P < 0.05$). Muscle fiber density in the fast-growing broilers was significantly higher at E18 ($P < 0.05$) but markedly lower at D21 and D42 compared to the slow-growing chickens ($P < 0.05$). IGF1 mRNA and protein expression levels in the fast-growing broilers were consistently elevated at E18, D21, and D42 relative to the slow-growing chickens ($P < 0.05$). Overexpression of IGF1 significantly upregulated the expression of serine/threonine kinase 1 (AKT1), cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), and c-Jun N-terminal kinase (JNK) genes compared to negative control and IGF1-knockdown groups ($P < 0.05$). During 16–40 hours post-transfection, IGF1-overexpressing cells displayed significantly higher viability

收稿日期: 2024-12-11

基金项目: 安徽省重点研究和开发计划项目 (202004a06020054)

*通信作者: 陈兴勇, 教授, 博导, 研究方向为家禽遗传育种与繁殖, E-mail: chenxingyong@ahau.edu.cn。

than *IGF1*-knockdown and blank control groups ($P<0.05$). [Conclusions] The fast-growing broilers possess a greater myofiber quantity than the slow-growing chickens. *IGF1* enhanced myofiber development by activating the PI3K/AKT signaling pathway, thereby regulating myoblast viability and proliferation.

Keywords: fast-growing broilers; slow-growing broilers; myofiber structure; *IGF1*; PI3K/AKT signaling pathway

肉鸡按生长发育速度分为快速型和慢速型2种,快速型肉鸡通常在42日龄上市,体重为2.5~3.0 kg,而慢速型肉鸡通常在81日龄之后上市,体重为1.8~2.2 kg^[1-2]。作为一种健康动物蛋白来源,肉鸡因其饲养成本低而成为全球消费最广泛的禽类。欧美国家对快速型肉鸡需求旺盛,主要用于集约化生产和快速供应,而亚洲市场对慢速型肉鸡需求增加,特别是在追求高品质和独特风味的消费者群体中^[3]。家禽肌肉生长速度依赖于出雏前肌纤维数量和出雏后肌纤维发育速度,而肌肉肉质与肌纤维总数、横截面积和肌纤维类型密切相关^[4-5]。与慢速型肉鸡相比,快速型肉鸡肌纤维直径更大导致其肉质之间具有显著差异^[6]。肌肉主要由糖酵解型肌纤维和氧化型肌纤维组成,不同类型肌纤维比例直接影响肌肉代谢特性,从而影响肉质风味^[7]。研究表明,快速型肉鸡的剪切力和肌苷酸含量显著低于慢速型肉鸡,而含水量显著高于慢速型肉鸡^[8]。此外,肉鸡胸肌只含有糖酵解型肌纤维,而腿肌富含氧化型肌纤维,比例高达76%~79%^[9]。快速型肉鸡腿肌中氧化型肌纤维数量显著低于慢速型肉鸡,导致其肉质红度值偏低。目前已有多项研究表明,快慢型肉鸡在生长性能、胴体特征和肉品质方面存在显著差异^[10-11]。但其肌纤维发育差异的具体分子机制尚未完全阐明。

肌肉生长是一个连续且复杂的过程,涉及多个器官和系统之间的协调作用,并受到多种信号通路的调控^[12]。在早期骨骼肌发育过程中,肌纤维发育受到多种基因调节,如胰岛素样生长因子(*insulin-like growth factor 1*, *IGF1*)、肌生成抑制因子(*myostatin*, *MSTN*)、肌生成调控因子(*myogenic determinant*, *MYOD*)、丙酮酸脱氢酶激酶4(*pyruvate dehydrogenase kinase 4*, *PDK4*)等^[13-16]。*IGF1*通过与其受体结合,激活PI3K/AKT信号通路,从而促进肌纤维增粗和肌肉生长^[17]。相反,*MSTN*通过与2B型受体结合,激活抑制性母体对胚胎发育突变体同源蛋白3(*mothers against decapentaplegic homolog 3*, *Smad3*)磷酸化,抑制肌肉的生长和增粗^[18]。这2条信号通路之间存在复杂的交互作用,*MSTN*通过抑制AKT的活性,阻断*IGF1*诱导的肌纤维生长,而*IGF1*则通过抑制*MSTN*介导的*Smad3*磷酸化来增强肌肉生长^[19]。*MYOD*在肌肉再生过程中起重要作用,可以将静止的卫星细胞转化为成肌细胞,形成新的肌纤维^[20]。在肌肉发育过程中,高水平的*PDK4*促进糖原储存和脂肪酸氧化,从而增加氧化型肌纤维的比例^[21]。这些蛋白及其调控网络在家禽肌肉发育中的具体作用机制仍待深入研究。

皖南三黄鸡是中国安徽省皖南地区传统优质地方鸡种,以其“三黄”特征(羽毛黄、皮肤黄、脚黄色)和优良的肉质风味著称^[22]。皖南三黄鸡生长周期长、耐粗饲和抗病能力强,适合散养和生态养殖^[23]。相比之下,快速型白羽肉鸡是现代商业化养殖的典型代表,生长速度快并且饲料转化率高,广泛用于集约化养殖^[24]。虽然快速型白羽肉鸡的蛋重和初生重略高于皖南三黄鸡,但其屠体重是皖南三黄鸡的2~3倍,两者在生长速度上的差异可能与孵化前肌纤维结构和孵化后发育速度相关。本研究采用苏木精-伊红染色(*hematoxylin and eosin staining*, HE)、扫描电镜观察、蛋白质免疫印迹(*Western blot*, WB)和实时荧光定量PCR(*RT-qPCR*)等多种技术,系统性地比较快慢型肉鸡肌纤维发育及其分子调控机制,旨在为肉鸡品种的改良和生产效率提升提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与样品采集

选取分别饲养在相同环境下全封闭鸡舍中的18胚龄和21日龄、42日龄的快速型肉鸡Cobb500(安徽木子农牧发展有限公司)和慢速型肉鸡皖南三黄鸡母鸡(安徽华栋山中鲜农业开发有限公司)各10只,所有鸡通过性腺性别鉴定,确保性别一致。翅静脉注射戊巴比妥钠麻醉剂(北京方程生物有限公司)麻醉后屠宰,取左侧胸肌、腿肌5 mm×5 mm×10 mm肌肉样本,分别置于4%多聚甲醛固定液和电子显微镜固定液中,用于HE切片制作和扫描电镜观察。取右侧胸肌、腿肌样本置于液氮中冷冻保存,用于核酸和蛋白质提取。

1.2 肌纤维直径与密度测定

按照朱文俊等^[25]的方法制作肌肉组织HE染色切片,具体步骤包括固定、脱水、透明、包埋、切片和染色。

使用光学显微镜(IX73,奥林巴斯)400×放大倍数观察,通过 Image-Pro Plus(6.0, MEDIA CYBERNETICS)分析软件,使用阈值分割方法测量肌纤维直径,通过计数每单位面积内的纤维数量来计算肌纤维密度。具体步骤:从每张图像中随机选择 50 根肌纤维,沿其长轴测量直径,并取平均值,计算每单位面积内的肌纤维数量,并将其除以相应的面积(mm^2)得出肌纤维密度。

1.3 肌纤维超微结构观察

将样本置于含 2.5%戊二醛溶液中固定 2 h,并用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.2)冲洗 3 次。随后,样本使用梯度浓度乙醇(30%、50%、70%、90%、100%)逐级脱水,每级处理 10 min。脱水后,将样本置于导电碳膜双面胶,在离子溅射仪(MSP-2S,奥林巴斯)上处理 30 s。使用扫描电子显微镜(SU8100,日立)观察肌纤维超微结构。

1.4 基因表达量分析

从胸肌、腿肌组织和鸡胚成纤维细胞中提取总 RNA,按照 RNA 提取试剂盒(19203ES,翌圣生物科技股份有限公司)说明书提取 RNA,再使用 RNA 反转录试剂盒(13488ES,翌圣生物科技股份有限公司)逆转录合成 cDNA。肌纤维生长关键基因和 PI3K/AKT 通路基因引物通过 Primer 3.0 在线平台设计用于基因表达分析,引物信息见表 1。RT-qPCR 反应使用 Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(11123ES10,翌圣生物科技股份有限公司)在 ABI 7500 系统(Thermo,美国)上进行,反应体系为 $10 \mu\text{L}$,包括 $1 \mu\text{L}$ cDNA、引物(正、反向)各 $0.5 \mu\text{L}$ 、 $3 \mu\text{L}$ ddH₂O 和 $5 \mu\text{L}$ qPCR SuperMix。RT-qPCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min,随后 40 个循环,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火延伸 20 s;4 °C 保存。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因相对表达水平,以 GAPDH 作为内参基因。

表 1 实时荧光定量 RT-qPCR 所用引物
Table 1 Primer used for quantitative RT-qPCR

基因 Genes	GeneBank 登录号 GenBank ID	引物序列 Primer sequences(5'→3')	退火温度/°C Annealing temperature	片段长度/bp Fragment length
IGF1	NC_052532.1	GCTGGTTGATGCTCTTCAGT/GAGCGTGCAGATTTAGGTGG	57	189
MSTN	NC_052538.1	CAATGCTTGTACGTGGAGA/GTCGTCCTCTGGACATCAT	57	185
MYOD	NC_000073.7	CCAGCCTTCCAGTAACCAAA/GCACTTTGCCAATTTCTTCC	60	158
PDK4	NC_052533.1	AGGACTTCCTTTGCGTTCCT/TTTGTCATCTGGGCTTTTC	60	181
RAS	NC_000073.7	TCCTACAGGAAGCAGGTGGT/AAACACAGAGGAAGCCCTCG	60	130
JNK	NC_000080.7	ATGAAGCTCTCCAACACCCG/CACCTAAAGGAGAGGGCTGC	58	204
P53	NC_000077.7	GGCTGAGACACAATCCTCCC/ACCCTATGAGGGCCCCAAGAT	60	234
PI3K	NC_000079.7	AATGGTGAGCACGGAGATGC/TCCTTGGCTTTGCTCGGTTA	60	265
AKT1	NC_052536.1	GCCGCCTGATCAAGTTCTCC/GCTGCTGCCACAGTAGAAA	60	234
BAD	NC_000085.7	TGCAAGGCGAGGTCTGTAAG/TTCCACGGTGAACACGGATT	60	229
BCL2	NC_052533.1	CGTCGTGACTTCGCAGAGAT/AGTTCCACAAAGGCATCCCA	58	278
CDK2	NC_000076.7	CCCAACTCTGGGGACCTTA/TAAACCTTCCGAGCAAGC	60	243
GAPDH	NC_052532.1	GGACACTTCAAGGGCACTGT/TCTCCATGCTGGTGAAGACA	60	160

注:IGF1:胰岛素样生长因子 1 基因 Insulin-like growth factor 1 gene;MSTN:肌抑素基因 Myostatin gene;MYOD:肌分化因子基因 Myogenic differentiation factor;PDK4:丙酮酸脱氢酶激酶 4 基因 Pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene;RAS:大鼠肉瘤原癌基因 RAS proto-oncogene;JNK:c-Jun 氨基末端激酶基因 c-Jun N-terminal kinase gene;P53:肿瘤蛋白 p53 基因 Tumor protein p53 gene;PI3K:磷脂酰肌醇 3-激酶基因 Phosphatidylinositol 3-kinase gene;AKT1:丝氨酸/苏氨酸激酶 1 基因 AKT serine/threonine kinase 1 gene;BAD:Bcl-2 相关凋亡促进因子基因 Bcl-2 associated agonist of cell death gene;BCL2:B 淋巴细胞瘤-2 基因 B-cell lymphoma-2 gene;CDK2:细胞周期蛋白依赖性激酶 2 基因 Cyclin-dependent kinase 2 gene;GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene.

1.5 蛋白定量分析

按照总蛋白提取试剂盒(MA0171,大连美伦生物技术有限公司)说明书从肌肉样本中提取蛋白质,并使用 BCA 蛋白定量试剂盒(20201ES76,翌圣生物科技股份有限公司)对蛋白质浓度进行定量。将提取的蛋白进行 SDS-PAGE,电泳后转印 PVDF 膜;封闭 2 h 后,分别以抗 IGF1(20214-1-AP)、抗 MSTN(19142-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司)和 GAPDH 抗体(AC006,爱博泰克生物科技股份有限公司)作为一抗,稀释倍数均为 1:1 000。二抗为山羊抗兔 IgG(AS014,爱博泰克生物科技股份有限公司),稀释倍数为 1:30 000。孵育后进行洗涤,使用化学发光成像系统 398(Alliance Q9,Uvitec)检测蛋白质条带,并使用 Image J(美国国家卫生研究院)软件定量分析各条带的相对灰度值。

1.6 IGF1 过表达及敲除载体构建

IGF1 编码序列(NM_001004384)由北京擎科生物科技股份有限公司合成,并进行 Nhe I(GCTAGC)和 Age I(ACCGGT)双酶切后克隆至 pcDNA3.1-EGFP 质粒,生成 IGF1 过表达载体(PC)。使用未插入外源基

因的空载体 pcDNA3.1-EGFP 质粒作为阴性对照 (negative control, NC)。以转染等量 PBS 缓冲液 (不含任何质粒) 作为空白处理组, 排除转染试剂干扰 (Mock)。IGF1 敲除载体按照 Wei 等^[26] 的方法, 通过将 pLKO.1-EGFP-puro 质粒的酶切位点和 EcoR I 的另一位点无缝克隆, 得到 shRNA 的 IGF1 敲除载体 (SH), 未插入 shRNA 的 pLKO.1-EGFP-puro 质粒作为空载体对照 (vector control, VC)。

1.7 鸡胚成纤维细胞培养与质粒转染

鸡胚成纤维细胞系 (DF-1) 购自武汉普诺赛生物技术有限公司。细胞培养在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的高糖 DMEM 完全培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。当细胞密度达到 70%~80% 时, 按照 Lipofectamine 3000 试剂盒 (L3000008, 美国英杰生命技术有限公司) 说明书将空白质粒、IGF1 过表达及敲除载体质粒转染细胞。

1.8 细胞增殖活性测定

使用细胞计数试剂盒 (40203ES, 翌圣生物科技股份有限公司) 在不同时间点测定 DF-1 细胞的增殖活性。具体步骤: 将细胞按每孔 5 000 个细胞的密度接种 96 孔细胞培养板, 并在分别培养 8、16、24、32、40 h 后按照细胞计数试剂盒说明书进行检测。每个时间点设置 5 个重复孔, 通过测量吸光值 (D_{450}) 来评估细胞活性。

1.9 数据统计分析

试验数据以均值±标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 使用 SPSS 21.0 软件 (IBM 公司) 进行独立样本 t 检验分析。显著性水平设定为 0.05。

2 结果与分析

2.1 快速型肉鸡和慢速型肉鸡肌纤维结构比较分析

快速型肉鸡在 18 胚龄肌纤维直径显著小于慢速型肉鸡, 在 21 日龄和 42 日龄显著大于慢速型肉鸡 (图 1、图 2-A, $P < 0.05$)。快速型肉鸡在 18 胚龄肌纤维密度显著高于慢速型肉鸡, 在 21 日龄和 42 日龄显

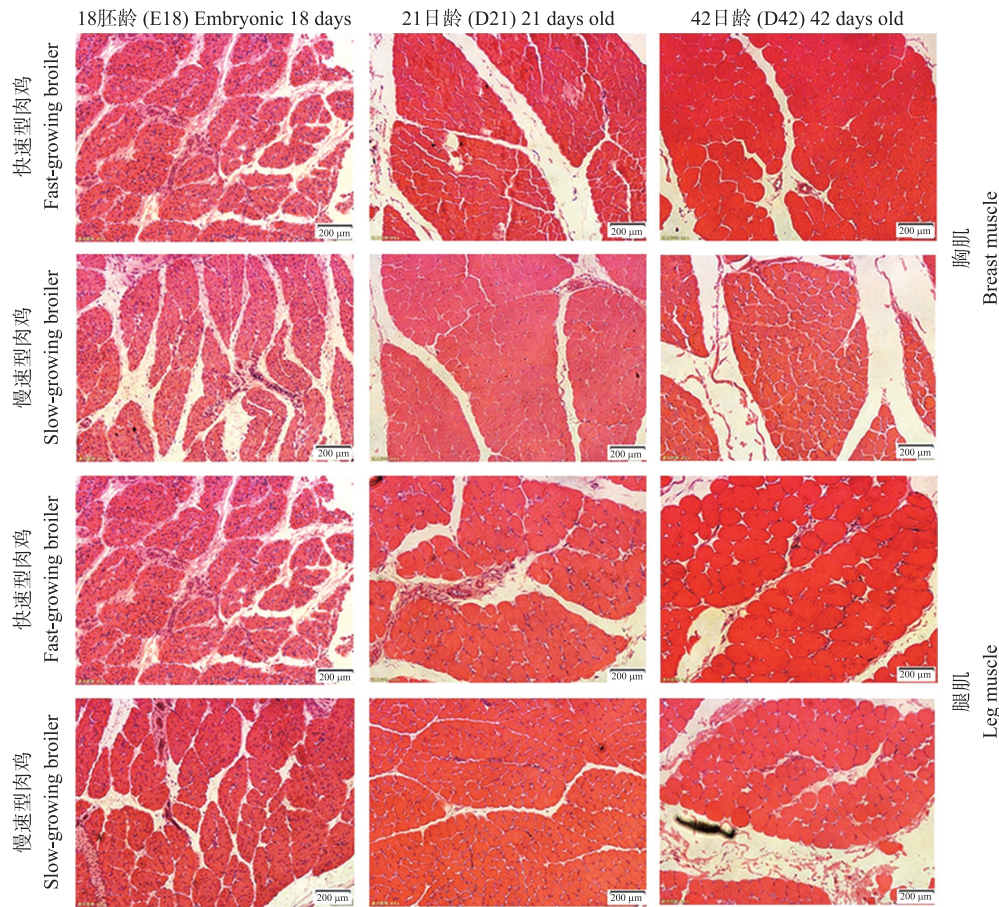


图 1 不同生长阶段快、慢型肉鸡 HE 染色切片

Fig. 1 HE stained sections of fast-growing and slow-growing broilers at different growth periods

著低于慢速型肉鸡(图1、图2-B, $P < 0.05$)。

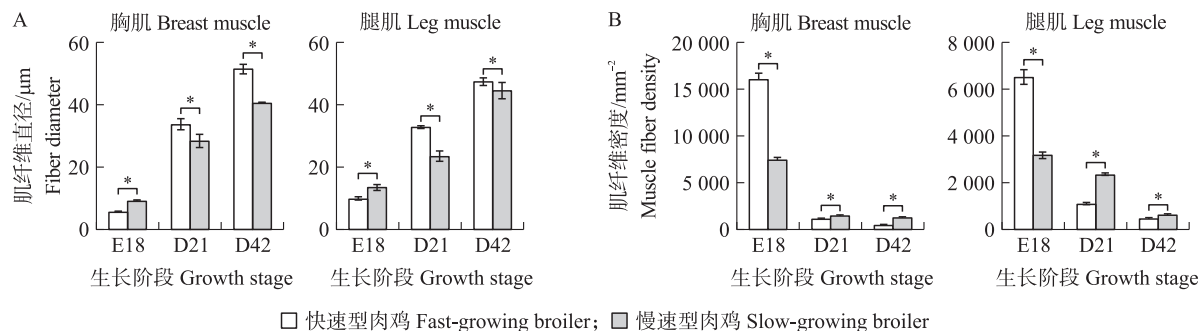


图2 不同生长阶段快、慢型肉鸡肌纤维直径(A)和密度(B)比较($n=5$)

Fig. 2 Comparison of muscle fiber diameter (A) and density (B) in fast-growing and slow-growing broilers at different growth periods

* $P < 0.05$. The same below.

2.2 快速型肉鸡和慢速型肉鸡 18 胚龄超微结构比较分析

肌纤维表面观察到连接和包裹肌纤维束的结缔组织(图3)。慢速型肉鸡胸肌肌纤维排列较快速型肉鸡更平整密集。快速型肉鸡腿肌中可以观察到毛细血管穿插于肌纤维之间,肌纤维束在腿肌中排列比胸肌更紧密。

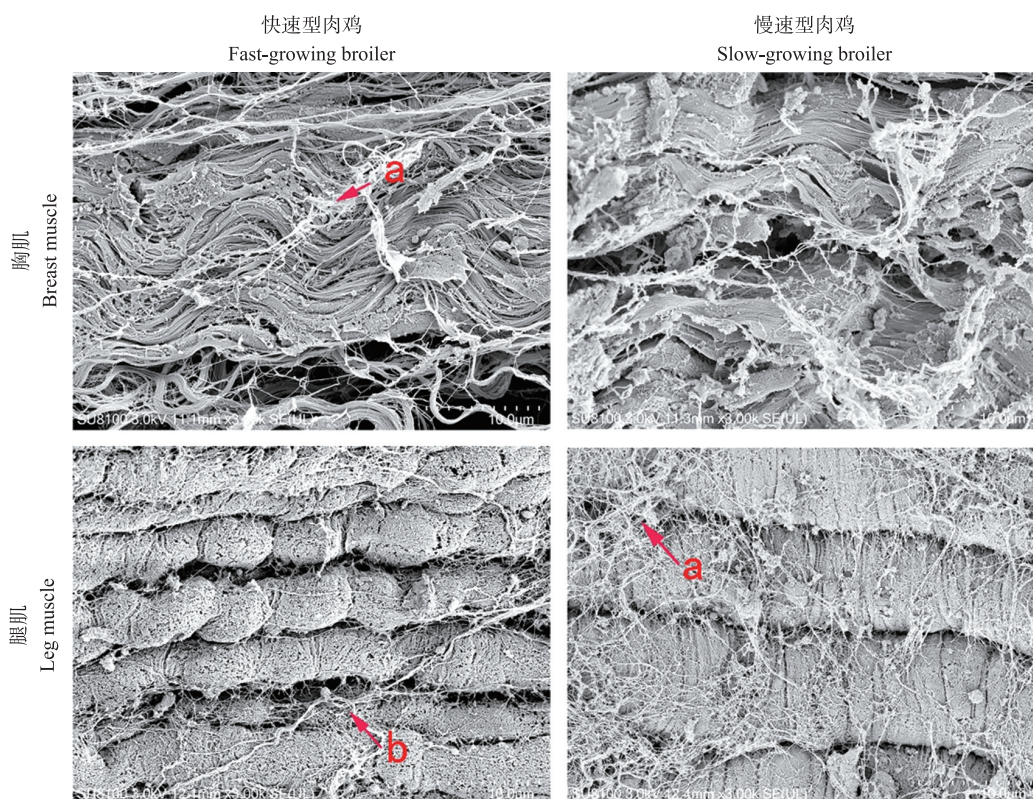


图3 18 胚龄快速型和慢速型肉鸡胸肌和腿肌肌肉纵切面扫描电子显微镜图像($\times 400$, $n=5$)

Fig. 3 Scanning electron microscope of breast and leg muscle by longitudinal section in fast-growing and slow-growing broilers at 18 embryonic days

a. 结缔组织 Connective tissue; b. 毛细血管 Capillary blood vessels.

2.3 快速型肉鸡和慢速型肉鸡肌肉中生长关键基因表达量比较分析

由图4可知:快速型肉鸡胸肌和腿肌中 *IGF1* 基因表达量在 18 胚龄、21 日龄和 42 日龄显著高于慢速型肉鸡($P < 0.05$)。快速型肉鸡胸肌和腿肌中 *MSTN* 基因表达量在 18 胚龄和 21 日龄显著高于慢速型肉鸡($P < 0.05$)。快速型肉鸡胸肌中 *MYOD* 和 *PDK4* 基因表达量在 18 胚龄和 42 日龄显著高于慢速型肉鸡,在 21 日龄显著低于慢速型肉鸡($P < 0.05$)。快速型肉鸡腿肌中 *MYOD* 和 *PDK4* 基因表达量在 18 胚龄显著高

于慢速型肉鸡,在42日龄显著低于慢速型肉鸡($P<0.05$)。快速型生长肉鸡胸肌腿肌中 IGF1 和 MSTN 蛋白表达量在18胚龄、21日龄和42日龄显著高于慢速型肉鸡(图5, $P<0.05$)。

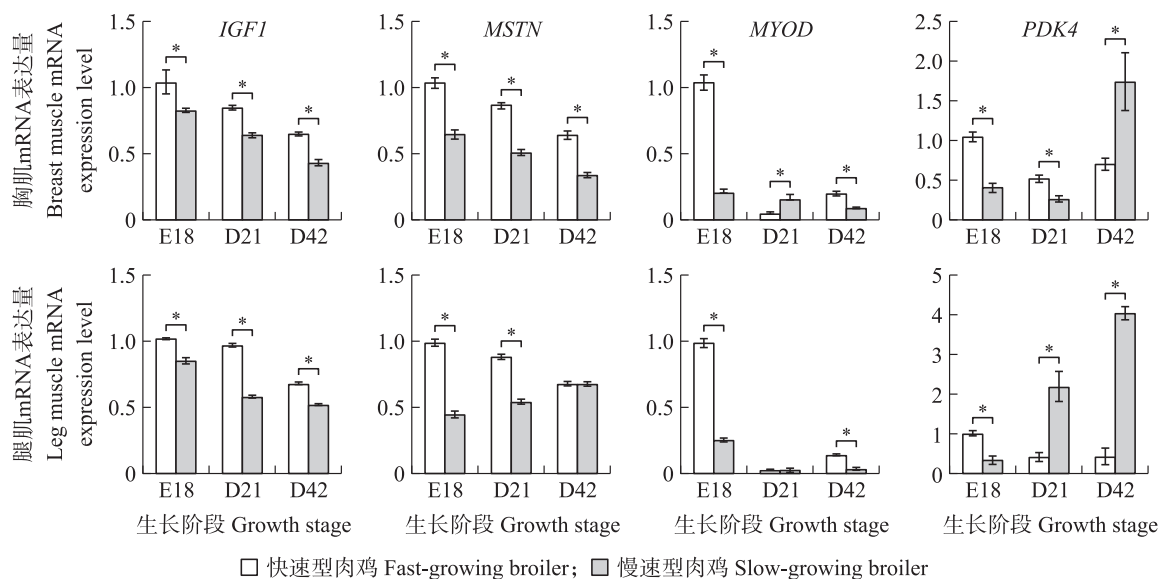


图4 不同生长阶段快、慢型肉鸡肌肉组织中关键基因 mRNA 表达水平比较($n=5$)

Fig. 4 Comparison of mRNA expression levels of key genes in muscle tissue of fast-growing and slow-growing broilers at different growth periods

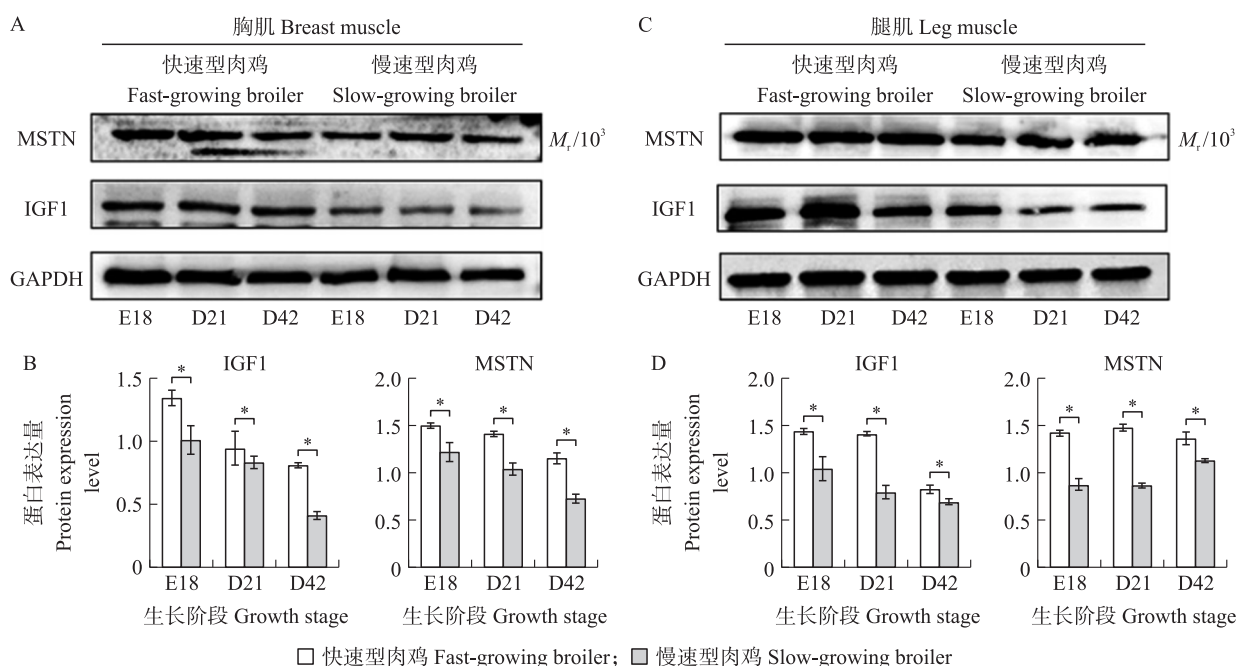


图5 不同生长阶段快、慢型肉鸡胸肌(A、B)和腿肌(C、D)组织中 MSTN 和 IGF1 蛋白表达水平比较($n=5$)

Fig. 5 Comparison of protein expression levels of MSTN and IGF1 in breast muscle(A, B) and leg muscle(C, D) tissue of fast-growing and slow-growing broilers at different growth periods

2.4 IGF1 对成纤维细胞生长相关基因表达的影响

由图6可见:与阴性对照组相比,转染 IGF1 过表达载体的 DF-1 细胞 IGF1 基因表达量更高($P<0.05$),转染敲除 IGF1 载体的 DF-1 细胞 IGF1 基因表达量更低。过表达 IGF1 显著提高了 PI3K/AKT 基因(*PI3K*、*AKT*、*P53*、*CDK2*、*RAS*、*JNK* 和 *BCL2*)的表达,敲除 IGF1 显著增强了 *BAD* 基因表达(图7, $P<0.05$)。经 IGF1 敲除和过表达质粒分别转染 16、24、32 和 42 h 后,与对照组相比,过表达 IGF1 质粒转染的颗粒细胞活力显著升高,敲除 IGF1 质粒转染的细胞活力显著降低(图8, $P<0.05$)。

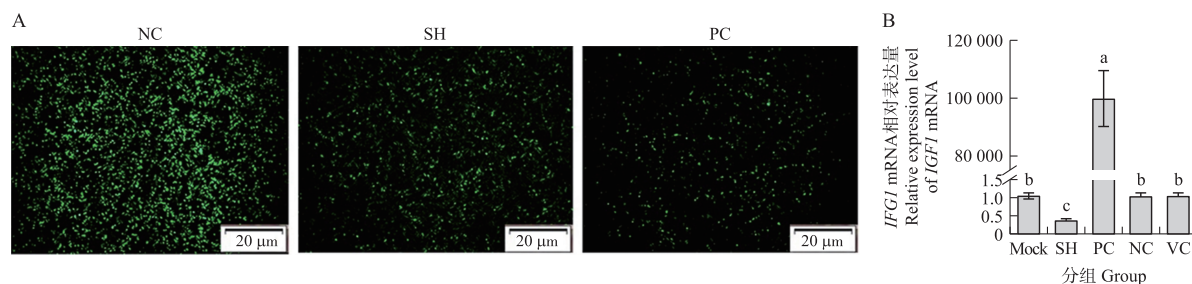


图6 鸡胚胎成纤维细胞中 *IGF1* 过表达和敲除质粒的转染效率观察(A)和 *IGF1* mRNA 表达(B)统计($n=5$)。

Fig. 6 Observation of transfection efficiency (A) and statistics of *IGF1* mRNA expression (B) in chicken embryonic fibroblasts transfected with *IGF1* overexpression and knockout plasmids

A. NC:空白质粒对照组;SH:*IGF1* 敲除组;PC:*IGF1* 过表达组;B. 通过 RT-qPCR 检测,转染效率通过绿色荧光蛋白(GFP)荧光强度评估,由荧光显微镜观察,绿色表示成功转染的细胞(Mock:空白对照组;VC:空白对照组),图中柱上标不同字母表示组间差异显著($P<0.05$)。下同。

A. NC:Blank plasmid control group;SH:*IGF1* knockout group;PC:*IGF1* overexpression group;B. The mRNA expression levels were detected by RT-qPCR. Transfection efficiency was evaluated by the fluorescence intensity of green fluorescent protein (GFP) and observed under a fluorescence microscope;green signals indicate successfully transfected cells(Mock:Blank control group;VC:Blank control group). Bars labeled with different letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$). The same below.

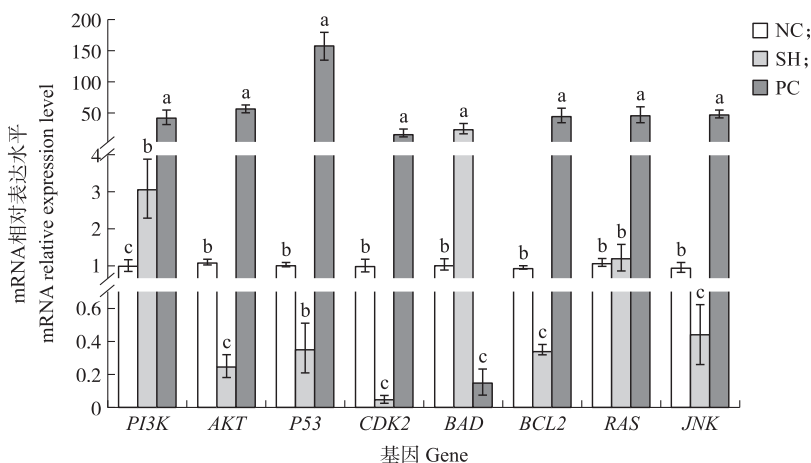


图7 鸡胚胎成纤维细胞中 PI3K/AKT 通路相关基因 mRNA 表达量分析($n=5$)

Fig. 7 Analysis of mRNA expression of PI3K/AKT pathway-related genes in chicken embryonic fibroblasts

3 讨论

胚胎期单核成肌细胞融合形成的肌纤维是骨骼肌最重要组成部分,占肌肉质量的75%~90%^[27]。在胚胎期,肌纤维的数量已经确定,出生后的肌肉发育主要依赖于既有肌纤维的增粗和延长^[28]。Hou 等^[27]研究表明1日龄慢速型肉鸡肌纤维密度显著高于快速型肉鸡,而糖蛋白含量则显著低于快速型肉鸡。然而,出生后随着日龄增加,快速型肉鸡的肌纤维逐渐变得粗长,肌肉间结缔组织和脂肪组织的增加导致了肌纤维密度的下降。本研究发现,快速型肉鸡在18 胚龄时肌纤维直径显著低于慢速型肉鸡,且肌纤维密度显著高于慢速型肉鸡。根据肌纤维发育的形态学特征,密度增加通常提示单位面积内肌纤维

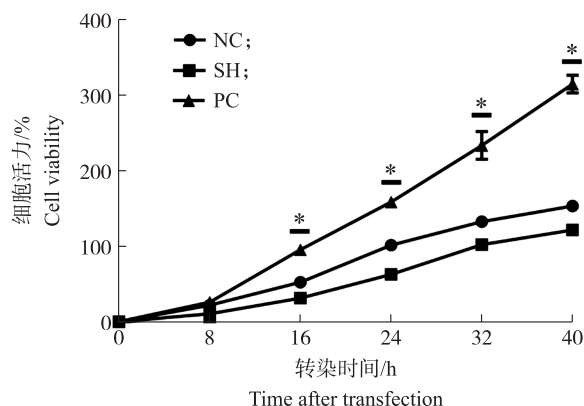


图8 *IGF1* 质粒转染鸡 DF-1 细胞后的细胞活力($n=5$)

Fig. 8 Cell viability after transfection of *IGF1* plasmids into chicken DF-1 cells

* 表示相同转染时间组间差异显著 ($P<0.05$)。

* means significant differences among the groups at the same transfection time ($P<0.05$).

维数量较多^[29-30]。这一结果与 Scheuermann 等^[31]关于快速型肉鸡胚胎期肌纤维数量优势的研究结论一致,但其与生长速度的关联需进一步验证。值得注意的是,肌纤维数量本身并非决定生长速率的唯一因素,肌纤维肥大潜能、卫星细胞活性及代谢调控可能协同作用^[32]。此外,慢速型肉鸡胚胎期肌肉组织中结缔组织占比显著高于快速型肉鸡,这可能与更发达的毛细血管网络和能量供应模式相关。结缔组织的空间分布可能影响肌肉纹理结构,从而间接调控肉质的咀嚼性^[33]。但肉质风味(如香气、鲜味)的形成主要取决于肌内脂肪含量、脂肪酸组成及风味前体物质(如肌苷酸、谷氨酸)的积累,需通过后续代谢组学分析明确品种间差异^[34]。

胰岛素样生长因子 1 通过促进成肌细胞增殖和分化促进肌纤维发育,从而促进肌肉生长^[35]。研究表明,IGF1 可以通过 AKT/mTOR 信号通路激活蛋白合成,同时抑制肌肉分解,从而促进肌肉生长^[36]。IGF1 与 MSTN 在调控肌肉生长中的作用密不可分,IGF1 的上调有助于肌纤维的增殖,而 MSTN 则通过负向调控,防止肌纤维的过度生长^[37-38]。Liu 等^[39]通过在鸭蛋中添加 IGF1,发现鸭成肌细胞中 MYOD 基因的表达显著增加,进而促进了肌纤维发育。同样,雏鸡体内注射 IGF1 后观察到肌纤维发育明显加快,表明 IGF1 对早期肌肉发育具有促进作用^[40]。此外,IGF1 在不同生长速度的家禽肌肉发育中表现出不同的作用机制。IGF1 虽然主要由肝脏合成并通过血液循环作用于靶组织(内分泌途径),但近年研究表明,肌肉组织可局部表达 IGF1,通过自分泌/旁分泌机制直接调控肌纤维分化与肥大^[41]。在禽类中,胸肌和腿肌的 IGF1 mRNA 水平已被证实与肌肉生长速率正相关^[42]。本研究结果表明,胚胎期快速型肉鸡中 IGF1 表达显著高于慢速型肉鸡,这可能是其快速生长的基础之一。Liu 等^[43]还发现 MSTN 通过抑制骨骼肌细胞中 mTOR 信号通路和 MYOD 表达,激活了泛素-蛋白酶系统,从而抑制细胞的增殖。本研究结论与这一结果一致,即 MYOD 的表达受 MSTN 调控。Zhu 等^[44]发现,PKD4 在鸡、鹌鹑及其杂交品种胚胎发育全程中均有表达,且在胚胎后期表达最为显著。本研究也发现,胚胎期快速型肉鸡 PKD4 表达量显著高于慢速型肉鸡,表明 PKD4 在胚胎肌肉生长和发育中具有重要作用。

IGF1 与其受体结合后,激活胰岛素受体底物 1(IRS-1)和磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)。PI3K 将磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP2)转化为磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(PIP3),进而激活 3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1(PDK1)和蛋白激酶 B(AKT)。AKT 通过激活靶蛋白复合体 1 下游的核糖体蛋白 S6 和翻译起始因子 eIF4E,同时抑制糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β),从而促进蛋白质合成,推动成肌纤维细胞的发育^[45]。此外,IGF-1 结合其受体后,通过 IGF-1R 磷酸化 IRS-1,进一步激活 MAPK 信号通路^[46]。活化的 MAPK 磷酸化转录激活因子,诱导 IGF-1 的生物活性^[47]。Wimmer 等^[48]研究表明,IGF1 通过 PI3K/AKT 通路正向调控成肌细胞的发育,表现出抗凋亡作用。IGF-1 的过度表达还会增加抗凋亡蛋白 BCL2 的表达,同时降低促凋亡蛋白 BAD 的表达。Yu 等^[49]发现,在 IGF-1 存在时,AKT 磷酸化水平显著增加,而使用抑制剂则消除了 IGF-1 对成肌细胞的促进作用,这表明 IGF-1 通过 PI3K/AKT 信号通路在肌生成过程中促进成肌细胞的增殖。Codina 等^[50]发现 IGF-1 与 IGF-2 具有相似功能,都能激活 PI3K/AKT 通路,从而促进成肌细胞和早期肌纤维的分化。本研究与这些研究结果一致,IGF-1 过表达显著增强了 PI3K/AKT 通路相关基因的表达,并加快了细胞增殖速度,表明 IGF-1 通过 PI3K/AKT 通路调控细胞增殖,从而影响肌纤维的生长。

综上所述,胚胎期快速型肉鸡的肌纤维直径比慢速型肉鸡更小,肌纤维密度更高。此外,IGF1 可以通过激活 PI3K/AKT 通路,提高成肌纤维细胞活力进而促进肌纤维的发育。

参考文献 References:

- [1] Dalle Zotte A, Gleeson E, Franco D, et al. Proximate composition, amino acid profile, and oxidative stability of slow-growing indigenous chickens compared with commercial broiler chickens[J]. Foods, 2020, 9(5): 546.
- [2] Chabault M, Baéza E, Gigaudo V, et al. Analysis of a slow-growing line reveals wide genetic variability of carcass and meat quality-related traits[J]. BMC Genetics, 2012, 13: 90.
- [3] Huo W R, Weng K Q, Li Y, et al. Comparison of muscle fiber characteristics and glycolytic potential between slow-and fast-growing broilers[J]. Poultry Science, 2022, 101(3): 101649.
- [4] Joo S T, Kim G D, Hwang Y H, et al. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics[J]. Meat Science, 2013, 95(4): 828-836.
- [5] Ismail I, Joo S T. Poultry meat quality in relation to muscle growth and muscle fiber characteristics[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2017, 37(6): 873-883.

- [6] Petracci M, Sirri F, Mazzoni M, et al. Comparison of breast muscle traits and meat quality characteristics in 2 commercial chicken hybrids[J]. Poultry Science, 2013, 92(9): 2438–2447.
- [7] Berri C, Wacrenier N, Millet N, et al. Effect of selection for improved body composition on muscle and meat characteristics of broilers from experimental and commercial lines[J]. Poultry Science, 2001, 80(7): 833–838.
- [8] Weng K Q, Huo W R, Gu T T, et al. Effects of marketable ages on meat quality through fiber characteristics in the goose[J]. Poultry Science, 2021, 100(2): 728–737.
- [9] Du Y F, Ding Q L, Li Y M, et al. Identification of differentially expressed genes and pathways for myofiber characteristics in soleus muscles between chicken breeds differing in meat quality[J]. Animal Biotechnology, 2017, 28(2): 83–93.
- [10] Weng K Q, Huo W R, Li Y, et al. Fiber characteristics and meat quality of different muscular tissues from slow-and fast-growing broilers[J]. Poultry Science, 2022, 101(1): 101537.
- [11] Zou X, Liu Q, Guan Q Q, et al. Muscle fiber characteristics and transcriptome analysis in slow-and fast-growing *Megalobrama amblycephala*[J]. Genes, 2024, 15(2): 179.
- [12] Anh N T L, Kunhareang S, Duangjinda M. Association of chicken growth hormones and insulin-like growth factor gene polymorphisms with growth performance and carcass traits in Thai broilers[J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2015, 28(12): 1686–1695.
- [13] Chen W T, Tu Y A, Cai P R, et al. Melatonin supplementation promotes muscle fiber hypertrophy and regulates lipid metabolism of skeletal muscle in weaned piglets[J]. Journal of Animal Science, 2023, 101: skad256.
- [14] Liu H H, Mao H G, Dong X Y, et al. Expression of *MSTN* gene and its correlation with pectoralis muscle fiber traits in the domestic pigeons (*Columba livia*) [J]. Poultry Science, 2019, 98(11): 5265–5271.
- [15] Ehlers M L, Celona B, Black B L. NFATc1 controls skeletal muscle fiber type and is a negative regulator of MyoD activity[J]. Cell Reports, 2014, 8(6): 1639–1648.
- [16] Sinam I S, Chanda D, Thoudam T, et al. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 promotes ubiquitin-proteasome system-dependent muscle atrophy[J]. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2022, 13(6): 3122–3136.
- [17] Rommel C, Bodine S C, Clarke B A, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways[J]. Nature Cell Biology, 2001, 3(11): 1009–1013.
- [18] Winbanks C E, Weeks K L, Thomson R E, et al. Follistatin-mediated skeletal muscle hypertrophy is regulated by Smad3 and mTOR independently of myostatin[J]. The Journal of Cell Biology, 2012, 197(7): 997–1008.
- [19] Morissette M R, Cook S A, Buranasombati C, et al. Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt[J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2009, 297(5): C1124–C1132.
- [20] Xu K, Han C X, Zhou H, et al. Effective *MSTN* gene knockout by AdV-delivered CRISPR/Cas9 in postnatal chick leg muscle[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 2584.
- [21] Zhang L, Zhou Y, Wu W J, et al. Skeletal muscle-specific overexpression of PGC-1 α induces fiber-type conversion through enhanced mitochondrial respiration and fatty acid oxidation in mice and pigs[J]. International Journal of Biological Sciences, 2017, 13(9): 1152–1162.
- [22] 李三军, 李俊营, 戚仁荣, 等. 绿茶粉对产蛋后期皖南三黄鸡生产性能、屠宰性能和血液生化指标的影响[J]. 家禽科学, 2024(5): 7–13.
Li S J, Li J Y, Qi R R, et al. Effect of green tea powder on laying performance, slaughtering performance and blood biochemical indexes of wannan yellow chicken during late laying period[J]. China Poultry Science, 2024(5): 7–13 (in Chinese with English abstract).
- [23] 陈政昆, 陈兴勇, 陈玉飞, 等. 皖南三黄鸡 S3 品系连产性状及其遗传参数估测[J]. 甘肃农业大学学报, 2023, 58(5): 25–31, 41.
Chen Z K, Chen X Y, Chen Y F, et al. Heritability estimation for egg production traits in S3 line selected from Chinese indigenous Wannan yellow chicken[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2023, 58(5): 25–31, 41 (in Chinese with English abstract).
- [24] 张群, 刘艳, 方艳平. 白羽肉鸡中后期采食量不增的原因分析[J]. 家禽科学, 2024(5): 70–72.
Zhang Q, Liu Y, Fang Y P. Analysis on the reasons why the feed intake of white feather broilers did not increase in the middle and late stage[J]. China Poultry Science, 2024(5): 70–72 (in Chinese).
- [25] 朱文俊, 陈兴勇, 刘乐, 等. 番鸭产蛋各期肝脂脂肪酸组成及 AMPK 信号通路基因表达研究[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(9): 2429–2438.
Zhu W J, Chen X Y, Liu L, et al. Fatty acid composition and gene expression of AMPK signaling pathway in liver of Muscovy duck at different egg-laying stages[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2021, 52(9): 2429–2438 (in Chinese with English abstract).
- [26] Wei C C, Chen X Y, Peng J Z, et al. BMP4/SMAD8 signaling pathway regulated granular cell proliferation to promote follicle development in Wanxi white goose[J]. Poultry Science, 2023, 102(1): 102282.
- [27] Hou X H, Liu Q F, Meng Q S, et al. TMT-based quantitative proteomic analysis of porcine muscle associated with postmortem meat quality[J]. Food Chemistry, 2020, 328: 127133.
- [28] Zampiga M, Soglia F, Baldi G, et al. Muscle abnormalities and meat quality consequences in modern Turkey hybrids[J]. Frontiers in Physiology, 2020, 11: 554.
- [29] le Bihan-Duval E, Debut M, Berri C M, et al. Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics [J]. BMC Genetics, 2008, 9: 53.
- [30] Casas G A, Overholt M F, Dilger A C, et al. Effects of full fat rice bran and defatted rice bran on growth performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs[J]. Journal of Animal Science, 2018, 96(6): 2293–2309.
- [31] Scheuermann G N, Bilgili S F, Tuzun S, et al. Comparison of chicken genotypes: myofiber number in pectoralis muscle and myostatin ontogeny

- [J]. Poultry Science, 2004, 83(8): 1404–1412.
- [32] Secci G, Addeo N F, Rodriguez L F P, et al. *In vivo* performances, ileal digestibility, and physicochemical characterization of raw and boiled eggs as affected by *Tenebrio molitor* larvae meal at low inclusion rate in laying quail (*Coturnix japonica*) diet [J]. Poultry Science, 2021, 100(12): 101487.
- [33] Li J J, Yang C W, Peng H, et al. Effects of slaughter age on muscle characteristics and meat quality traits of Da-Heng meat type birds [J]. Animals, 2020, 10(1): 69.
- [34] Wielogorska E, Ahmed Y, Meneely J, et al. A holistic study to understand the detoxification of mycotoxins in maize and impact on its molecular integrity using cold atmospheric plasma treatment [J]. Food Chemistry, 2019, 301: 125281.
- [35] Zhou Y, Wu P, Jiang W D, et al. Dietary cinnamaldehyde improves muscle protein content by promoting muscle fiber growth via PTP1B/IGF1/PI3K/AKTs-TOR/FOXO3a signaling pathway in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) [J]. Food Chemistry, 2023, 399: 133799.
- [36] Cui C, Bao Z Y, Chow S K, et al. Coapplication of magnesium supplementation and vibration modulate macrophage polarization to attenuate sarcopenic muscle atrophy through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(21): 12944.
- [37] Tang Q, Song C, Zhang S, et al. Gene expression profile of *IGF1* and *MSTN* mRNA and their correlation with carcass traits in different breeds of geese at 70 d of age [J]. British Poultry Science, 2014, 55(1): 76–80.
- [38] Hennebry A, Oldham J, Shavlakadze T, et al. IGF1 stimulates greater muscle hypertrophy in the absence of myostatin in male mice [J]. Journal of Endocrinology, 2017, 234(2): 187–200.
- [39] Liu H H, Wang J W, Zhang R P, et al. *In ovo* feeding of IGF-1 to ducks influences neonatal skeletal muscle hypertrophy and muscle mass growth upon satellite cell activation [J]. Journal of Cellular Physiology, 2012, 227(4): 1465–1475.
- [40] Nagasao J, Fukasawa H, Yoshioka K, et al. Research note: expression of IGF-1 and IGF-1 receptor proteins in skeletal muscle fiber types in chickens with hepatic fibrosis [J]. Poultry Science, 2022, 101(10): 102045.
- [41] Mozzetta C, Minetti G, Puri P L. Regenerative pharmacology in the treatment of genetic diseases: the paradigm of muscular dystrophy [J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2009, 41(4): 701–710.
- [42] 盛中伟, 姬改革, 刘一帆, 等. 鸡生长发育早期骨骼肌 *IGF1R* mRNA 表达规律研究 [J]. 浙江农业学报, 2020, 32(7): 1160–1165.
Sheng Z W, Ji G G, Liu Y F, et al. Study on mRNA expression pattern of *IGF1R* gene in chicken skeletal muscles during early development [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2020, 32(7): 1160–1165 (in Chinese with English abstract).
- [43] Liu J H, Pan M Z, Huang D, et al. Myostatin-1 inhibits cell proliferation by inhibiting the mTOR signal pathway and MRFs, and activating the ubiquitin-proteasomal system in skeletal muscle cells of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Cells, 2020, 9(11): 2376.
- [44] Zhu M T, Wang M Y, Shao Y Y, et al. Characterization of muscle development and gene expression in early embryos of chicken, quail, and their hybrids [J]. Gene, 2021, 768: 145319.
- [45] Bodine S C, Stitt T N, Gonzalez M, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo* [J]. Nature Cell Biology, 2001, 3(11): 1014–1019.
- [46] Peng X D, Xu P Z, Chen M L, et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2 [J]. Genes & Development, 2003, 17(11): 1352–1365.
- [47] Grey F, Meyers H, White E A, et al. A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication [J]. PLoS Pathogens, 2007, 3(11): e163.
- [48] Wimmer R J, Liu Y W, Schachter T N, et al. Mathematical modeling reveals modulation of both nuclear influx and efflux of Foxo1 by the IGF-I/PI3K/Akt pathway in skeletal muscle fibers [J]. American Journal of Physiology Cell Physiology, 2014, 306(6): C570–C584.
- [49] Yu M L, Wang H, Xu Y L, et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes myoblast proliferation and skeletal muscle growth of embryonic chickens via the PI3K/Akt signalling pathway [J]. Cell Biology International, 2015, 39(8): 910–922.
- [50] Codina M, Serrana G D, Sánchez-Gurmaches J, et al. Metabolic and mitogenic effects of IGF-Ⅱ in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myocytes in culture and the role of IGF-Ⅱ in the PI3K/Akt and MAPK signalling pathways [J]. General and Comparative Endocrinology, 2008, 157(2): 116–124.

责任编辑: 周广礼