浙 江 农 林 大 学 学 报，2017，**34**(6)：1065-1070
Journal of Zhejiang A & F University
doi:10.11833/j.issn.2095-0756.2017.06.014

浙东白鹅骨骼肌发育相关因子 MRFs，*Pax*3 和 *Pax*7 基因的表达规律

王吟方亭[1,2]，任　婷[1,2]，朱松会[1,2]，梁世日[1,2]，何　珂[1,2]，赵阿勇[1,2]

（1. 浙江农林大学 动物遗传育种与繁殖实验室，浙江 杭州 311300；2. 浙江农林大学 动物科学与技术学院，浙江 杭州 311300）

摘要：生肌调节因子家族(myogenic regulatory factors，MRFs)在胚胎期和出壳早期的骨骼肌分化过程中发挥重要作用；PAX 家族中的 2 个转录因子 *Pax*3 和 *Pax*7，被认为在肌纤维的生长发育过程中，指导众多过程的形成。在鹅胚胎发育过程中这些基因的表达变化规律及在肌肉发育过程中的表达变化规律研究甚少。以浙东白鹅 *Anser cygnoides domestica* ‘Zhedong’为研究对象，提取 RNA 合成 cDNA 并采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)研究 MRFs, *Pax*3 和 *Pax*7 在鹅胚胎期(7，11，15，19，23，27 d 胚龄)及出生早期(出雏后 7 日龄)的表达规律，并分析其表达与胸、腿肌发育的相关性。结果显示：MRFs，*Pax*3 和 *Pax*7 基因均和鹅骨骼肌的发育相关，并且存在不同的表达规律。MRFs 和 *Pax*7 基因在 11~15 d 胚龄期间出现表达高峰期，而 *Pax*3 基因在 7 d 胚龄即出现高表达，随后表达下降。通过分析表明：这些基因的表达规律均和它们在肌肉发育过程中的作用密切吻合。图 2 表 1 参 25

关键词：动物学；鹅；骨骼肌发育；MRFs；*Pax*3；*Pax*7
中图分类号：S834　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**2095-0756(2017)06-1065-06

Expression patterns of MRFs, *Pax*3, and *Pax*7 during skeletal muscle development in Zhedong white geese

WANG Yinfangting[1,2], REN Ting[1,2], ZHU Songhui[1,2], LIANG Shiri[1,2], HE Ke[1,2], ZHAO Ayong[1,2]

(1. Genetics, Breeding & Reproduction Laboratory of Animals, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: The family of myogenic regulatory factors (MRFs) played an important role in the process of skeletal muscle differentiation during the embryonic stage and the early stage of hatching with *Pax*3 and *Pax*7, two transcription factors of the PAX family, guiding the formation of various processes during the growth and development of muscle fiber. To determine the expression profiles of these genes during the embryonic and muscle development stages in geese, the expression pattern of MRFs, *Pax*3, and *Pax*7 during the embryonic period (7th, 11th, 15th, 19th, 23th, 27th day in embryonic (E) age) and early birth (7-day-age) in Zhedong White Geese was studied. Analysis included extracting RNA and synthetic DNA along with real-time PCR followed by further analysis on their relationship with the development of breast and leg muscles. We took three samples for tissue of each period, and the significance of expression was analyzed with SASS. Results revealed that MRFs, *Pax*3, and *Pax*7, were all related to the development of skeletal muscles in geese with different expression patterns. MRFs and *Pax*7 showed peak expression during the period from E11 to E15, and the highest expression of *Pax*3 with a declining expression appeared at E7. Findings suggested that the expression patterns of these genes were highly matched with their function during muscle development and provided a theoretical basis for

收稿日期：2016-12-13；修回日期：2017-03-02
基金项目：国家自然科学基金资助项目(31372349)；浙江省自然科学基金资助项目(LQ14C030002)
作者简介：王吟方亭，从事动物遗传育种研究。E-mail: andy_wangyin@163.com。通信作者：赵阿勇，教授，博士，从事动物数量遗传与分子遗传育种研究。E-mail: zay503@zafu.edu.cn

further investigation of the regulatory mechanism of MRFs, *Pax*3, and *Pax*7 during skeletal muscle development in geese. [Ch, 2 fig. 1 tab. 25 ref.]

Key words: zoology; goose; skeletal muscle development; myogenic regulatory factors (MRFs); *Pax*3; *Pax*7

骨骼肌组织的发生和发育是肉品质形成的重要因素。肌肉生成是一个复杂的程序，包括肌肉先祖细胞的增殖和迁移(或卫星细胞的激活)，成肌细胞的生成、增殖和分化，成肌细胞的融合以及多核肌纤维的形成等过程。骨骼肌的先祖细胞在基因调控下迁移入肢芽间充质，分裂形成肌肉的始祖细胞库，在基因调控下形成成肌细胞进入分化。成肌细胞在基因的调控下分泌特异因子，导致成肌细胞发生融合形成多核肌管。肌小管是初级肌肉纤维的前体细胞，随后形成肌纤维，最后构成复杂的骨骼肌[1-2]。在胚胎发育后期阶段，肌肉进入后期增长，主要包括肌纤维长度的增加和直径的增大[3]。肌肉重生和自我更新来源于骨骼肌中的正常沉默的卫星细胞[4]。在这些过程中，多个调控因子进行双向调节。目前，已确定与肌纤维生长发育相关的基因有 MRFs(myogenic regulatory factors)基因家族、PAX(paired box)基因家族和肌肉生成抑制因子基因(Myostatin，MSTN)[5]等，MRFs 家族包括肌分化因子 *MyoD*，肌细胞生成素 *MyoG*(*Myogenin*)，生肌决定因子 *Myf*6 和 *Myf*5[6]。它们调控前体肌细胞定型、细胞增殖和肌纤维的形成以及机体出生以后肌肉成熟和功能完备等肌肉发生和发育的各个环节[7-9]，对肌细胞的增殖和分化、肌纤维的数量和大小起着关键的调控作用，若该基因家族表达沉默则会导致生肌节形成的失败，最终无法形成肌肉[10]。而 PAX 家族蛋白为一类重要的转录调控因子，在胚胎发育过程中对组织和器官的分化起重要的调控作用。其中，*Pax*3 和 *Pax*7 等 2 个转录因子通过调控 MRFs 基因家族和其他相关基因，被认为在肌纤维的生长发育过程中，指导众多过程的形成[11]。鹅 *Anser cygnoides* 是鸟纲雁形目 Anseriformes 鸭科 Anatidae 的一种动物。鹅肉是理想的高蛋白、低脂肪、低胆固醇的营养健康食品。因此，目前对鹅肉的需求量也日趋上涨，鹅肌肉生长和肉质形成的研究受到一定的关注。如前所述，MRFs 基因家族和 PAX 基因家族参与肌肉的发育过程，与肌纤维的数量和大小有着密切关系。但鹅该基因家族在胚胎期肌肉发育过程中的表达规律及在肌肉发育过程中的调控作用未见报道。中国鹅品种资源非常丰富，记载于《中国禽类遗传资源》上的地方品种共 36 个，培育鹅种 5 个。本研究以浙东白鹅 *Anser cygnoides domestica* ‘Zhedong’为材料，该品种分布于浙江东部地区，为中等体型白色鹅种，其身躯有 2 种，分别是长方形和长尖形，全身羽毛白色，额部有肉瘤，颈部细长腿部粗壮，是中国肉鹅的著名地方品种，可作为研究肌肉生长发育的理想动物模型。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析技术，研究物种胚胎期和胚胎后早期胸肌(breast muscle, BM)，腿肌(leg muscle, LM)中 MRFs 家族以及 *Pax*3 和 *Pax*7 的表达规律，以探索这些基因在肌肉发育过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 试验样品

试验所用鹅个体由浙江天鸿鹅业提供(浙江绍兴)，选取相同批次且孵化条件相同的胚龄分别为 7，11，15，19，23，27 d 的鹅胚各 3 枚(分别以 E7，E11，E15，E19，E23，E27 表示)；同时选取同一批次出壳，并在相同饲养管理条件下饲养的 7 日龄鹅 3 只(以 P7 表示)。迅速分离出鹅胚以及出生后小鹅的胸肌和腿肌组织，置于液氮速冻，然后转入-80 ℃冰箱保存。

1.2 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

肌肉总 RNA 采用 RNAiso plus(TaKaRa，大连)提取，RNA 样品经质量分数为 1%的琼脂糖凝胶电泳检测质量，紫外分光光度计检测计算浓度。采用 PrimeScript™reagent Kit(TaKaRa，大连)合成 cDNA。

1.3 qRT-PCR 及分析

根据已发表的鸭 *Anas platyrhynchos* 和鹅 MRFs 家族、*Pax*3 和 *Pax*7 序列分别设计 qRT-PCR 引物(表 1)，GAPDH 作为内参基因。引物由上海英骏生物工程有限公司合成。qRT-PCR 采用 SYBR®PrimeScript®RT-PCR Kit (TaKaRa，大连)，反应体系和反应条件按试剂盒说明进行，设置技术平行的 3 个·样品$^{-1}$。采用 CT 值(循环数)比较法计算表达量，采用 SASS 分析表达差异是否显著。

表 1　研究采用的 qRT-PCR 引物

Table 1　Primers used for qRT-PCR

基因	参考序列	序列(5′→ 3′)
MyoD	chicken:NM_204214;	F(上游): TGCCGTCGGAGCAGTTGGAG
	duck:JN408699, JN408700	R(下游): GCAACGCCATCCGCTACATCG
MyoG	chicken:NM204184, XM_005013713;	F: CGCCTGAAGAAGGTGAACGAAGC
	duck:NM_001310376	R: GTCCCTCTGCTCCCGCTCCTG
*Myf*5	chicken: NM_001030363;	F: TGAGGAACGCCATCAGATACATCG
		R: AGCTGGAGGTGGGGCTGGTC
*Myf*6	duck: NM_001310793	F: AGCAGGCAAATGGCTCGGACTTC
		R: GCTTGGGCTCGTCGGAGGAAAT
*Pax*3	chicken:AB080581;	F: AGCCATCCTACCAGCCCACCTC
	duck:JQ070187	R: CGAAGGGAGGCTGCTTTGGTGT
*Pax*7	chicken:NM_205065, DQ471304;	F: GCTCAGCGGTGAAAGTGGTTCG
	duck:JQ070188;	R: CGGCATCCTGGGCGACAAAG
GAPDH	参考文献[12]	F: GCCAAAAGGGTCATCATCTC
		R: GTAGAG GCAGGGATGATGTTC

2　结果与分析

2.1　胸肌和腿肌组织中生肌调节因子家族的表达变化

在胸肌和腿肌组织发育的不同阶段均能检测到 *MyoD*(图 1A)，*Myf*5(图 1B)，*MyoG*(图 1C)和 *Myf*6(图 1D)的表达，两者表达模式相似，前 3 种基因均呈现反“√”的模式，而 *Myf*6 的表达则均呈“wave”模式。

MyoD：腿肌(LM)在 E11~E23 阶段维持高表达，显著高于其他阶段($P<0.05$)，在 E15 表达量达到最高；胸肌(BM)则在 E15~E23 阶段维持高表达，显著高于其他阶段($P<0.05$)，同样在 E15 表达量达到最高。

*Myf*5：腿肌在 E11 表达量显著上升($P<0.05$)，达到最高，E15~E19 阶段维持高表达，E19~E23 后显著下降($P<0.05$)，但在 E23~E27 表达量略微回升，出壳后表达量低。胸肌同样在 E11 表达量显著上升($P<0.05$)，达到最高，E15~E19 阶段维持高表达，在 E19~P7 阶段表达量逐渐降低。

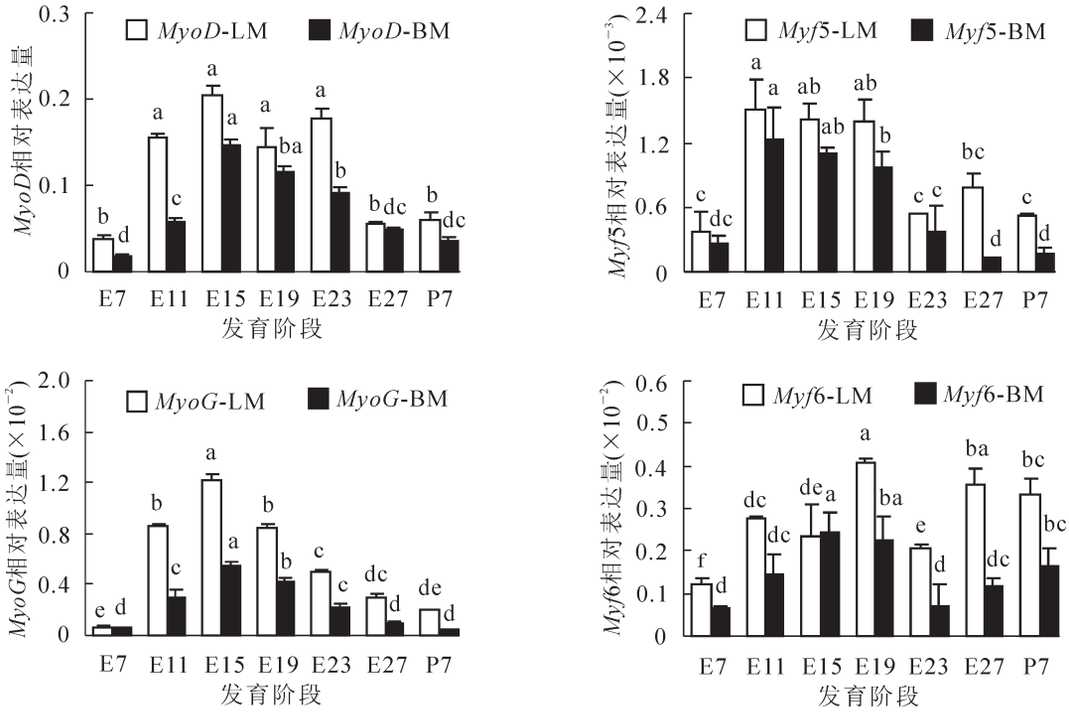
*Myf*6：E7~E15 表达量逐渐上升，E15~P7 表达量逐渐下降。腿肌第 15 胚龄日表达量显著高于其他胚龄日($P<0.05$)，胸肌中 E15 表达量显著高于其他阶段($P<0.05$)，出壳后表达量降低。

*Myf*6：腿肌在 E7~E19 阶段表达量呈上升趋势(E15 和 E11 比较有小回落)，在 E23 显著下降($P<0.05$)，而在 E27~P7 又显著上升($P<0.05$)。胸肌的表达模式类似，E7~E15 阶段表达量呈上升趋势，在 E15 达到表达最高峰，E15~E23 显著下降($P<0.05$)，而 E27~P7 有所上升。该基因在胸肌中早于腿肌达到表达高峰期，并且 P7 阶段达到第 2 高峰阶段时，腿肌的表达显著高于胸肌($P<0.05$)。

2.2　胸肌和腿肌组织中 Pax 家族基因表达变化

在胸肌和腿肌组织发育的不同阶段均可检测到 *Pax*3 的表达(图 2A)，其表达呈逐渐降低模式，在胸肌和腿肌的表达模式相似。在胸肌和腿肌中，均在 E7 检测到表达量最高，随着生长发育，该基因的表达逐渐降低，在 E15~E19 阶段，该基因的表达已显著低于 E7(腿肌在 E15 后表达显著低于 E7，$P<0.05$；胸肌在 E19 后表达显著低于 E7，$P<0.05$)，E23 后该基因表达量持续在较低水平。

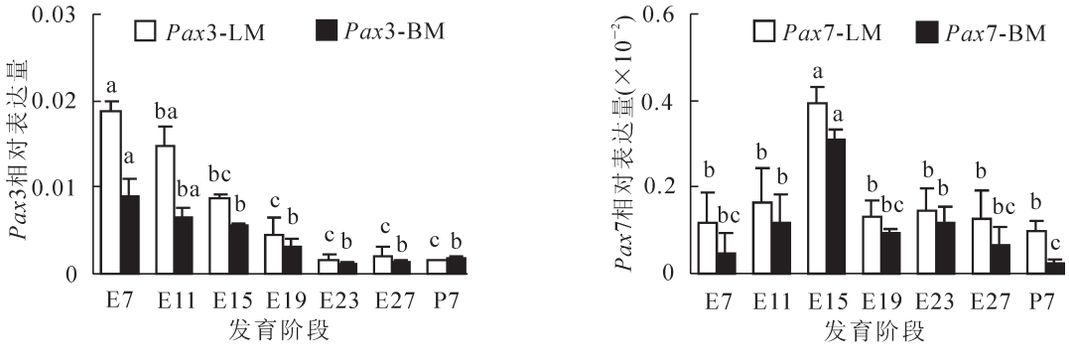
在胸肌和腿肌组织发育的不同阶段均可检测到 *Pax*7 的表达(图 2B)，在 2 个肌肉组织中的表达模式形似，均呈反“√”型。在腿肌中 *Pax*7 基因在 E11 出现上升，并于 E15 达到表达最高时期，显著高于其他阶段($P<0.05$)，在 E15 之后，基因表达保持较低水平。在胸肌中，该基因同样在 E15 出现表达高峰后，保持在较低的表达水平，胸肌中该基因的表达整体低于腿肌。



同一组织类型不同发育阶段字母不同表示表达差异显著($P<0.05$)

图 1 鹅胸肌和腿肌不同发育阶段生肌调节因子家族基因表达情况

Figure 1 Expression profile of MRFs gene in breast muscle and leg muscle



同一组织类型不同发育阶段字母不同表示表达差异显著($P<0.05$)

图 2 鹅胸肌和腿肌不同发育阶段 Pax 家族基因表达情况

Figure 2 Expression profile of Pax gene in breast muscle and leg muscle

3 讨论

3.1 MRFs 家族对于鹅胚胎期及出生早期胸肌腿肌生长发育的作用

MRFs 家族成肌因子均属于碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)转录因子，转移非分化的细胞进入生肌系统，通过与参与骨骼肌分化的 E12，E47，HEB 等 E 蛋白形成异源二聚体识别 DNA 序列，从而激活肌酸激酶、肌球蛋白等与肌肉生成相关的特异性基因[13-15]。在肌肉生成过程中，MRFs 家族并不同时表达，其成员在功能上表现出特有的表达模式。初级肌肉发育阶段，涉及到了成肌前体细胞的命运决定和成肌细胞的大量增殖。该过程与 *MyoD* 和 *Myf*5 的作用有关。在次级肌肉发育过程中涉及到了成肌细胞融合为肌管和肌管进一步分化为肌纤维的过程，该过程中 *MyoG* 和 *Myf*6 扮演了重要的角色。有研究认为：在 *Pax*3 基因调控肌源性祖细胞迁移到目标位置后，*Myf*5 率先开始表达，调节体节在轴下部位和肢芽中分化、增殖；接着 *MyoD* 在 *Myf*5 和 *Pax*3 的协调下被刺激表达，使成肌细胞退出细胞周期；*MyoG*同样也在早期激活，作为肌肉分化因子调控肌肉进入分化形成阶段；*Myf*6 最终表达，并且在出生后成为主要转录产物，促使肌小管的形成[16-20]。

本研究发现：鹅胚胎期 MRFs 家族基因表达为(1)*Myf*5 基因在胸肌和腿肌中有相似的表达规律，为

先上升后下降的模式，并且其在胸肌和腿肌中均在 E11 到达表达的最高峰，并维持 4~7 d，但也有不同之处，腿肌中发育的后期阶段 *Myf*5 的表达略有回升，然而胸肌中 *Myf*5 呈现出持续下降的模式。一些研究认为，不同肌纤维类型的肌组织中，*Myf*5 的表达模式有所差异。这是由于胸肌和腿肌在胚胎早期发生的起源中存在一定差异，胸肌主要起源于轴下生肌节的成肌细胞，腿肌虽然也主要起源于轴下生肌节，但是主要来源于迁移到肢芽处的成肌细胞[21]。高邮鸭 *Anas platyrhynchos* ‘Gaoyou Breed’ 和金定鸭 *Anas platyrhynchos domestica*‘Jinding’ 的相关研究中也表明：*Myf*5 在胚胎发育早期出现高表达[21]。(2)*MyoD* 在鹅胸肌腿肌中的表达规律跟 *Myf*5 极为相似，也是先升高后降低的趋势，但也存在明显的不同。*MyoD* 在胸肌和腿肌中均在 E15 到达表达的最高峰，比 *Myf*5 到达最高峰的时间晚。该结果说明，虽然 *MyoD* 和 *Myf*5 均在肌肉发育的初级阶段发挥作用，但还是存在不同的作用模式。朱文奇等[22]研究发现：在鸭中 *MyoD* 基因在 E13~E21 维持高表达，这和我们的研究结果基本保持一致的。(3)*Myf*6 基因在 E15(甚至腿肌 E19)中出现表达高峰，并且在出壳后也出现较高的表达，这和朱文奇[22]报道的 *Myf*6 在 E21 出现表达高峰保持一致，该现象和 *Myf*6 基因参与肌小管的形成有关。*MyoG* 和 *Myf*6 基因在成肌细胞的融合和分化中起作用, 但是其表达规律不尽相同，这说明 *MyoG* 和 *Myf*6 有不同的功能。*MyoG* 和 *Myf*6 在表达规律与它们的功能密切相关。

3.2　*Pax*3 和 *Pax*7 基因对于鹅胚胎期及出生早期胸肌腿肌生长发育的作用

对于 *Pax*3，首先，非分化的前体细胞转化成肌细胞过程中，受到 *Pax*3 和 *Foxc*2 的互惠调控。其次，在肌肉肌细胞形成过程中，*Pax*3 通过控制 *Myf*5 基因的增强子区域，从而控制 MRFs 基因家族的转录，调节细胞分化进入成肌细胞和肌丝层[23-24]。该现象表明：*Pax*3 基因在胚胎发育早期就开始发挥作用。研究显示，鸭在胚胎早期，*Pax*3 基因表达最强，随着时间增加而递减。本研究中无论在胸肌还是在腿肌中，*Pax*3 均是在 E7 表达量最高，随着肌肉的生长发育，该基因的表达逐渐降低，这与已有的研究结果保持一致。

*Pax*7 被认为是出生后肌肉发育即损伤肌肉修复过程中的标志基因。该基因通过与细胞生长、黏连等相关的特定基因结合来促进细胞增殖，抑制其分化[25]。在胚胎期，肌卫星细胞增殖并融合到已存在的肌管中，促进出生后肌纤维的增长。本研究中发现在鹅胸肌和腿肌发育过程中，该基因表达高峰期出现在 E11~E15 阶段。可以认为，*Pax*7 在调控肌祖细胞进入骨骼肌发生的过程中具有重要的作用。

本研究通过 qRT-PCR 研究了 MRFs，*Pax*3 和 *Pax*7 在鹅骨骼肌胚胎期以及出生早期的表达规律，发现这些基因均与鸟类的骨骼肌生成密切相关，并且总体上胸肌发育晚于腿肌，这可能与鸟类腿肌的特殊性有关，也和陈禧[12]的报道相一致。肌肉生成是一个复杂的程序，在胚胎期包括肌母细胞的增殖、退出细胞周期、最终分化导致生成多核肌纤维等步骤。本研究的结果，有助于更加具体和深入地了解鹅胚胎期肌肉发育相关基因的表达规律，为鹅骨骼肌发育过程中的调控机理提供理论依据。

4　参考文献

[1] ROMERO N B, MEZMEZIAN M, FIDZIASKA A. Main steps of skeletal muscle development in the human: morphological analysis and ultrastructural characteristics of developing human muscle [J]. *Handb Clin Neurol*, 2013, **113**(2): 1299 – 1310.

[2] PICARD B, LEFAUCHEUR L, BERRI C, *et al.* Muscle fibre ontogenesis in farm animal species [J]. *Reprod Nutr Develop*, 2002, **42**(5): 415 – 431.

[3] SCHIAFFINO S, DYAR K A, CICILIOT S, *et al.* Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy [J]. *FEBS J*, 2013, **280**(17): 4294 – 4314.

[4] CRIST C G, MONTARRAS D, BUCKINGHAM M. Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of *Myf*5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, **11**(1): 118 – 126.

[5] CAMPOREZ J-P G, PETERSEN M C, ABUDUKADIER A, *et al.* Anti-myostatin antibody increases muscle mass and strength and improves insulin sensitivity in old mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(8): 2212 – 2217.

[6] MONCAUT N, RIGBY P W J, CARVAJAL J J. Dial M (RF) for myogenesis [J]. *FEBS J*, 2013, **280**(17): 3980 – 3990.

[7] BUCKINGHAM M, RIGBY P W J. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis [J]. *Dev Cell*, 2014, **28**(3): 225 – 238.

[8] CAO Yi, YAO Zizhen, SARKAR D, *et al*. Genome-wide *MyoD* binding in skeletal muscle cells: a potential for broad cellular reprogramming [J]. *Dev Cell*, 2010, **18**(4): 662 – 674.

[9] RELAIX F, DEMIGNON J, LACLEF C, *et al*. Six homeoproteins directly activate *MyoD* expression in the gene regulatory networks that control early myogenesis [J]. *PLoS Genet*, 2013, **9**(4): e1003425. doi: 10. 1371/journal. pgrn. 1003425.

[10] FONG A P, TAPSCOTT S J. Skeletal muscle programming and re-programming [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2013, **23**(5): 568 – 573.

[11] BUCKINGHAM M, RELAIX F. *PAX*3 and *PAX*7 as upstream regulators of myogenesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, **44**(9): 115 – 125.

[12] 陈禧. 鸭 *Pax*3/7 cDNA 序列克隆及表达特性研究[D]. 雅安：四川农业大学, 2012.
CHEN Xi. *Characterization of Duck Pax*3/7 *and Its Expression Patterns* [D]. Ya'an: Sichuan Agricultrual University, 2012.

[13] GRUBIŠIĆ V, GOTTIPATI M K, STOUT R Jr, *et al*. Heterogeneity of myotubes generated by the *MyoD* and E12 basic helix-loop-helix transcription factors in otherwise non-differentiation growth conditions [J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(7): 2188 – 2198.

[14] MACQUARRIE K L, YAO Zizhen, FONG A P, *et al*. Genome-wide binding of the basic helix-loop-helix myogenic inhibitor musculin has substantial overlap with *MyoD*: implications for buffering activity [J]. *Skeletal Muscle*, 2013, **3**(1): 26. doi: 10.1186/2044-5040-3-26.

[15] SIMIONESCU-BANKSTON A, PICHAVANT C, CANNER J P, *et al*. Creatine kinase B is necessary to limit myoblast fusion during myogenesis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, **308**(11): C919 – C931.

[16] AVEROUS J, GABILLARD J C, SEILIEZ I, *et al*. Leucine limitation regulates *myf*5 and *MyoD* expression and inhibits myoblast differentiation [J]. *Exper Cell Res*, 2012, **318**(3): 217 – 227.

[17] DEMMERLE J, KOCH A J, HOLASKA J M. Emerin and histone deacetylase 3 (HDAC3) cooperatively regulate expression and nuclear positions of *MyoD*, *Myf*5, and *Pax*7 genes during myogenesis [J]. *Chrom Res*, 2013, **21**(8): 765 – 779.

[18] ZHANG Zhentao, XU Feng, ZHANG Yani, *et al*. Cloning and expression of *MyoG* gene from Hu sheep and identification of its myogenic specificity [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, **41**(2): 1003 – 1013.

[19] CONERLY M L, YAO Ziahen, ZHONG Junwen, *et al*. Distinct activities of *Myf*5 and *MyoD* indicate separate roles in skeletal muscle lineage specification and differentiation [J]. *Dev Cell*, 2016, **36**(4): 375 – 385.

[20] CALHABEU F, HAYASHI S, MORGAN J, *et al*. Alveolar rhabdomyosarcoma-associated proteins PAX3/FOXO1A and PAX7/FOXO1A suppress the transcriptional activity of *MyoD*-target genes in muscle stem cells [J]. *Oncogene*, 2013, **32**(5): 651 – 62.

[21] 陶志云, 邹剑敏, 宋迟，等. 鸭胚骨骼肌生肌调节因子 *MyoD*1 和 *Myf*5 发育性变化研究[J]. 中国家禽, 2012, **34**(17): 16 – 19.
TAO Zhiyun, ZOU Jianmin, SONG Chi, *et al*. Developmental changes of myogenic regulatory factors *MyoD*1 and *Myf*5 in skeletal muscle of duck embryo [J]. *China Poult*, **34**(17): 16 – 19.

[22] 朱文奇. 高邮鸭、金定鸭胚胎期骨骼肌生长发育的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2014.
ZHU Wenqi. *The Research on Growth and Development of Embryonic Skeletal Muscle in Two Duck Breeds of Gaoyou and Jinding* [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2014.

[23] DAUBAS P, BUCKINGHAM M E. Direct molecular regulation of the myogenic determination gene *Myf*5 by *Pax*3, with modulation by *Six*1/4 factors, is exemplified by the-111kb-*Myf*5 enhancer [J]. *Dev Biol*, 2013, **376**(2): 236 – 244.

[24] PASUT A, RUDNICKI M A. The long, the short, and the micro: a *PolyA* tale of *Pax*3 in satellite cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, **10**(3): 237 – 238.

[25] HIRAI H, VERMA M, WATANABE S, *et al*. *MyoD* regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of *Pax*3 [J]. *J Cell Biol*, 2010, **191**(2): 347 – 365.