

斜带石斑鱼 *mstn* 对其肌肉细胞增殖分化 及相关基因表达的影响*

杨炎¹, 夏俊², 王庆¹, 何颖琳¹, 张勇³, 赵会宏¹, 杨慧荣^{1,4}

1. 华南农业大学海洋学院 / 海洋生物资源保护与利用粤港联合实验室, 广东 广州 510642
2. 新疆畜牧科学院兽医研究所 / 新疆畜牧科学院动物临床医学研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830000
3. 中山大学水生经济动物研究所 / 广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275
4. 华南农业大学中山创新中心, 广东 中山 528400

摘要: 斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 是具有较高经济价值的海水鱼, 如何促进石斑鱼生产性状改良一直是科学研究的重点之一。肌肉生长抑制素(*mstn*, myostatin)是调节肌肉生长的重要转化因子。本研究中, *Mstn* 的亚细胞定位表明 *Mstn* 在斜带石斑鱼细胞质中呈点状分布。利用酶标仪测定被 *Mstn* 重组蛋白刺激肌肉原代细胞 1~5 d 后的 *A* 值, 发现实验组细胞生长明显减缓, 随着处理时间的增加, 细胞活性差异进一步扩大。利用流式细胞仪测定被 *Mstn* 重组蛋白刺激的肌肉原代细胞细胞周期, 发现实验组细胞周期受阻。用 *Mstn* 重组蛋白对肌肉原代细胞进行刺激, 通过 RT-qPCR 检测 *Mstn* 重组蛋白对 *mstn* 信号通路及下游相关基因的影响, 结果表明随着处理浓度的升高, *p21*、*smad3* 和 *mrf4* mRNA 的表达量也逐渐而上升, 其中, *smad3* 和 *mrf4* 表达量的上升不存在显著性差异; 当处理浓度为 100 和 1 000 nmol/L 时, *p21* 存在显著性差异; 随着处理浓度的升高, *myod* 和 *myog* mRNA 的表达量均下降, 但 *myod* mRNA 下降趋势不显著, *myog* mRNA 显著下降, 当处理浓度为 100 和 1 000 nmol/L 时存在显著性差异。本研究揭示了 *Mstn* 定位于斜带石斑鱼 GS 细胞质; *Mstn* 重组蛋白上调 *smad3*、*mrf4* 的表达, 下调 *myod*、*myog* 的表达, 来促进细胞的分化; 同时 *Mstn* 重组蛋白能上调 *p21* 的表达, 抑制细胞的增殖。本研究验证了 *Mstn* 在肌肉发育过程中的生物学功能, 为后续深入开展 *mstn* 对鱼类肌肉发育的影响研究奠定了基础。

关键词: *mstn*; 斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides*; 肌肉; 表达分析

中图分类号: Q175 文献标志码: A 文章编号: 2097-0137(2022)04-0041-08

Effects of *mstn* on proliferation and differentiation of muscle cells and the expression of related genes in *Epinephelus coioides*

YANG Yan¹, XIA Jun², WANG Qing¹, HE Yinglin¹, ZHANG Yong³, ZHAO Huihong¹, YANG Huirong^{1,4}

1. College of Marine Sciences, South China Agricultural University / Joint Laboratory of Guangdong Province and Hong Kong Region on Marine Bioresource Conservation and Exploitation, Guangzhou 510642, China
2. Institute of Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Animal Husbandry / Animal Clinical Medical

* 收稿日期: 2021-07-22

录用日期: 2021-08-23

网络首发日期: 2021-12-13

基金项目: 广东省海洋经济发展(海洋六大产业)专项资金项目(GDNRC[2022]50); 广东省林业科技创新项目(2021KJCX012, 2022KJCX019); 促进经济发展专项资金(现代渔业发展用途)省级项目(SDY-2018-05); 中山市省科技专项资金“大专项+任务清单”项目(2021sdr003); 华南农业大学新农村发展研究院农业科技合作共建项目(2021XNYNYKJHZGJ022)

作者简介: 杨炎(1996年生), 女; 研究方向: 水生经济动物分子内分泌学; E-mail: 20182067006@stu.scau.edu.cn

通信作者: 杨慧荣(1977年生), 女; 研究方向: 水生经济动物分子内分泌学、渔业种质资源和环境关系研究;

E-mail: hry@scau.edu.cn

Research Center, Xinjiang Academy of Animal Husbandry, Urumqi 830000, China

3. Institute of Aquatic Economic Animals / Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

4. Zhongshan Innovation Center of South China Agricultural University, Zhongshan 528400, China

Abstract: *Epinephelus coioides* is a marine fish with high economic value. How to improve the production characteristics of *E. coioides* has always been one of the focuses of scientific research. Myostatin (*mstn*) is an important transforming factor in regulating muscle growth. In this study, we investigated the effects of *mstn* on proliferation and differentiation of muscle cells and its related genes expression. The subcellular localization of Mstn showed that Mstn distributed in the cytoplasm of *E. coioides*. The *A* value of muscle primary cells stimulated by Mstn recombinant protein for 1-5 days was measured by enzyme labeling instrument. It was found that the growth of cells in the experimental group slowed down significantly, and the difference of cell activity further expanded with the increase of treatment time. Primary muscle cells were stimulated with Mstn recombinant protein. The effects of Mstn recombinant protein on *mstn* signal pathway and downstream related genes were detected by RT-qPCR. The results showed that the expression of *p21*, *smad3* and *mrf4* mRNA increased gradually with the increase of treatment concentration, and there was no significant difference in the expression of *smad3* and *mrf4*; When the treatment concentrations were 100 and 1 000 nmol/L, there was a significant difference in *p21*; With the increase of treatment concentration, the expression of *myod* and *myog* mRNA decreased, but the downward trend of *myod* mRNA was not significant. *Myog* mRNA decreased significantly, and there was a significant difference when the treatment concentration was 100 and 1 000 nmol/L. This study revealed that Mstn is localized in the cytoplasm of *E. coioides* GS; the recombinant Mstn protein up-regulates the expression of *smad3* and *mrf4*, and down-regulates the expression of *myod* and *myog* to promote cell differentiation; at the same time, the recombinant Mstn protein can up-regulate the expression of *p21* and inhibit the cell proliferation. The study verified the biological function of Mstn in the process of muscle development, and provided a theoretical foundation for the subsequent in-depth study of the effect of *mstn* on fish muscle development.

Key words: *mstn*; *Epinephelus coioides*; muscle; expression analysis

肌肉生长抑制素(*mstn*, myostatin)又称生长分化因子8(*gdf-8*),抑制肌肉细胞的增殖与分化,是骨骼肌的生长的负调控因子^[1-4]。研究表明,*mstn*在鱼类中的表达与在哺乳动物中主在骨骼肌中的表达不同,目前正在鱼类的多种组织中检测到了*mstn*的表达^[5-8],这表明*mstn*在鱼类中可能存在多种功能。

生肌过程是一个复杂的过程,在此过程中,*mstn*与包括和生肌决定因子-5(*myf5*, myogenic factor 5)、肌分化决定因子(*myod*, myogenic differentiation)、肌肉生成素(*myog*, myogenin)、成肌调节因子(*mrf4*, myogenic regulatory factor 4)在内的肌源性调节因子(*mrfs*, myogenic regulatory factors)在调节肌源性细胞的增殖和分化方面存在相互关系^[4,9-10],而依赖性激酶抑制因子(*p21*)与细胞增殖有关^[11-12]。目前,人们认为Smads是介导*mstn*信

号的介质,Smads蛋白可以协助*mstn*对肌肉细胞的增殖与分化进行调控^[13-15]。一方面,*mstn*通过调节*p21*的表达来调控细胞增殖^[16-18],另一方面,*mstn*可以通过调控*mrfs*的表达进而调控细胞的分化^[19-21]。

在以往关于*mstn*的研究中,研究对象多集中于猪、牛、羊等哺乳动物,针对鱼类的相关研究较少。斜带石斑鱼*Epinephelus coioides*,属于硬骨鱼纲Osteichthyes、鲈形目Perciformes、鲈科Serranidae、石斑鱼亚科Epinephelinae。由于石斑鱼肉质肥美鲜嫩、高蛋白、营养价值较高,是我国南方和东南亚国家和地区大力发展的经济鱼类。因此,本研究以斜带石斑鱼为研究对象。通过石斑鱼的GS细胞系和肌肉原代细胞对*mstn*的功能进行初步探究,揭示了Mstn的亚细胞定位、Mstn重组蛋白对*mstn*信号通路下游及相关基因的影响,初

步推测 *Mstn* 在斜带石斑鱼肌肉细胞增殖分化中的生理功能。

1 材料与方 法

1.1 材 料

斜带石斑鱼体质量(31.6±6.7) g, 体长(12.8±1.0) cm, 购自广东省海洋渔业试验中心; 取样时, 首先用丁香酚将实验鱼麻醉, 然后用 $\varphi=75\%$ 的乙醇擦拭鱼体表, 迅速将部分肌肉组织取下, 一部分保存至含有 Sample Protector for RNA/DNA (TAKARA, Japan) 的 1.5 mL 中; 另一部分保存至含有 $\varphi=10\%$ 双抗(青霉素、链霉素)的 L15 培养液。取样过程所用剪刀、镊子、刀片等用 $\varphi=75\%$ 的乙醇擦拭后全部高压灭菌, 所有的实验用具紫外灭菌 30 min。取样过程于超净台中进行, 所有实验动物操作均在华南农业大学实验动物伦理委员会的相关指导下进行。*Mstn* 重组蛋白交由金斯瑞生物科技有限公司合成, 其生物活性经肌肉原代细胞和 Thermo Varioskan LUX 多功能酶标仪测试。

1.2 肌肉原代细胞的培养

将取样的肌肉组织块用含有 $\varphi=10\%$ 双抗的 L15 培养液清洗 3 次, 然后剪成 1 mm×1 mm×1 mm 左右的小块放入培养瓶内。将培养瓶翻转, 放入 28 °C 细胞培养箱 7~8 h。向组织块上滴加含有 $\varphi=4\%$ 双抗以及 $\varphi=20\%$ 胎牛血清(FBS)(Gibco, USA) 的 L15 培养液后正面放入细胞培养箱培养, 待细胞从组织块爬出, 补加培养液至 5 mL。细胞爬满培养瓶后, 用胰酶(Gibco, USA)将细胞消化成细胞悬液, 去掉组织块后离心弃上清, 用 2.5 mL 原来的培养液将剩余细胞吹打均匀, 转至培养瓶中, 补充含 $\varphi=1\%$ 双抗和 $\varphi=20\%$ FBS 的 L15 培养液至 5 mL。定期在显微镜下观察细胞生长情况, 待培养瓶中细胞铺满一层后用胰酶消化, 用含 $\varphi=1\%$ 双抗和 $\varphi=10\% \sim 20\%$ 血清的培养液进行半换液培养。

1.3 肌肉原代细胞的增殖

1.3.1 CCK-8 检测细胞增殖 在 5 个 96 孔板中(100 μ L/孔)接种细胞悬液, 每孔约 2 000 个细胞, 24 h 后用 1 000 nmol/L *Mstn* 处理, 对照组用相同体积的 PBS 处理, 空白组不做处理, 每组 8 个重复。每天同一时间取出 96 孔板, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 在细胞培养箱中孵育 4 h。用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度, 连续 5 d, 然后绘制细胞生长曲线。

1.3.2 流式细胞仪检测细胞周期 在 6 孔板(1.6 mL/孔)接种细胞悬液, 24 h 后用 1 000 nmol/L *Mstn* 蛋白处理, 对照组用相同体积的 PBS 处理, 每组 3 个重复。24 h 后用无 EDTA 的胰酶消化细胞, 800 g 离心 5 min, 去上清。用 4 °C 的 PBS 清洗细胞 2 次, 后加入 250 μ L PBS 重悬细胞, 然后加入 750 μ L 4 °C 无水乙醇, 4 °C 固定过夜。样品离心去上清, 用 4 °C PBS 清洗 1 次, 再次离心去上清。加入 Rnase A 溶液 20 μ L, 37 °C 水浴 30 min。加入 PI 染色液至体积分数为 50 μ L/mL, 缓慢并充分混匀后 4 °C 避光孵育 30 min, 染色完成后在 24 h 内完成流式检测。

1.4 重组质粒的构建与细胞转染

为了构建 *mstn* 的表达载体, 分别用含有限制性酶切位点 *Kpn* I 和 *Bam*h I 的引物扩增。目的基因被插入到 pEGFP-C1 载体中。引物序列见表 1。得到的重组质粒通过 DNA 测序确认。Ezgene Endo-Free Plasmid Kit (BioMIGA, USA) 用于获得无内毒素质粒。Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) 用于质粒转染 GS 细胞。使用详见相关试剂盒说明书。

1.5 实时荧光定量 PCR 技术

分别用 10、100 和 1 000 nmol/L 的 *Mstn* 处理原代细胞。以 PBS 处理作为对照, 每组 4 个重复。24 h 后用胰酶消化收集细胞, 提取 RNA 后利用 ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (TOYOBO, Japan) 反转录。以 β -*actin* 基因为内参, 利用 SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Japan) 进行实时荧光定量, 测定 *p21*、*smad3*、*mrf4*、*myod* 和 *myog* 的表达情况。引物序列见表 1。使用详见相关试剂盒说明书。

1.6 数据处理

利用 Graphpad Prism 8.0 软件对实验数据进行统计分析, 以 β -*actin* 基因为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析。数据以平均值±标准差(means±SD)。当 $P < 0.05$ 时, 认为具有显著性差异。

2 结 果

2.1 斜带石斑鱼 *Mstn* 亚细胞定位分析

为了检测 *Mstn* 在细胞中的定位, 将 pEGFP-MSTN 质粒转染至 GS 细胞中, 转染 pEGFP-C1 质粒至 GS 细胞作为对照。利用荧光显微镜进行观察, 发现 pEGFP-MSTN 过表达细胞的细胞质中都观察到了呈点状分布的绿色荧光(图 1)。这表明 *Mstn* 在 GS 细胞中呈细胞质分布, *Mstn* 蛋白在细胞质中表达。

表 1 引物列表
Table 1 List of primers

引物名称	序列
GFP- <i>mstn</i> - <i>Kpn</i> I-F	CGGGGTACCATGCATCTCTCTCAGATTGTG
GFP- <i>mstn</i> - <i>Bamh</i> I-R	CGCGGATCCAGAGCATCCACAACGGTC
<i>myod</i> -RT-F	CGGCGGCTTGGTAA
<i>myod</i> -RT-R	CATCGGAGCAGTTGGA
<i>p21</i> -RT-F	GGTGGTAGAAAGAAAGAT
<i>p21</i> -RT-R	TTGCCTGTAGAGTCGTA
β - <i>actin</i> -RT-F	TCTTCCAGCCATCCTTCCTTGG
β - <i>actin</i> -RT-R	CTGCATACGGTCAGCAATGCC
<i>myog</i> -RT-F	GATGGGCTTATGTGGG
<i>myog</i> -RT-R	GGTAACCGTCTTCCTTTT
<i>mrf4</i> -RT-F	TACAACGGCAACGACA
<i>mrf4</i> -RT-R	GCCCACATGAGGCACT
<i>smad3</i> -RT-F	GCATAACCATACCCAGAT
<i>smad3</i> -RT-R	CGCAGACTTCGTCCTT

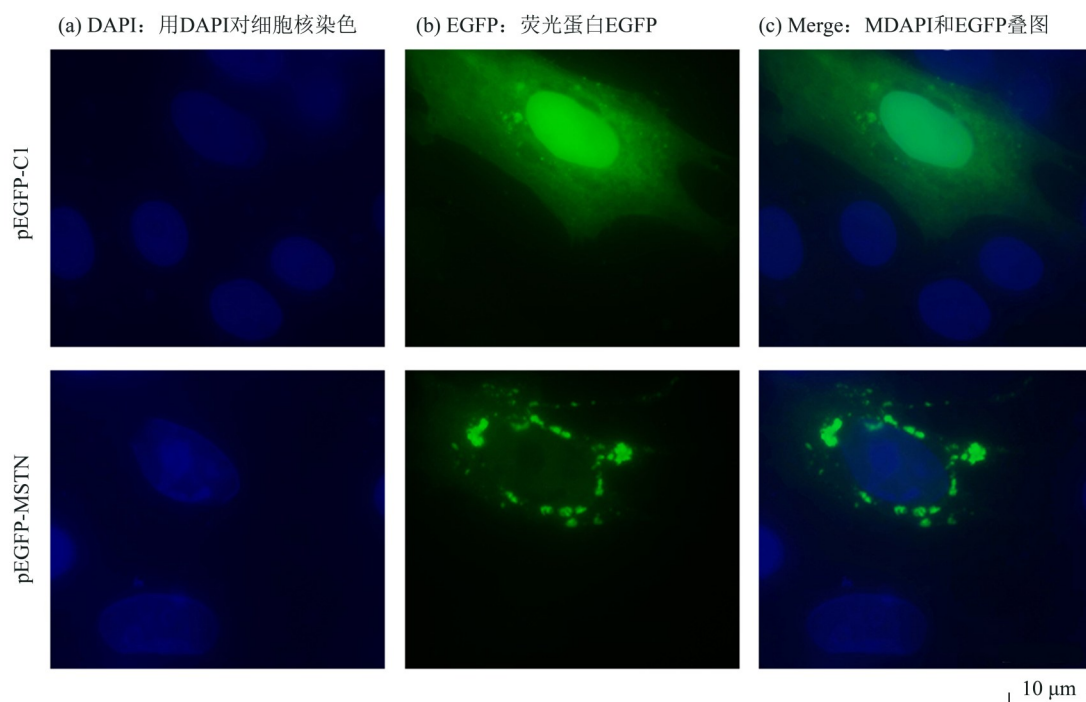


图 1 Mstn 亚细胞定位

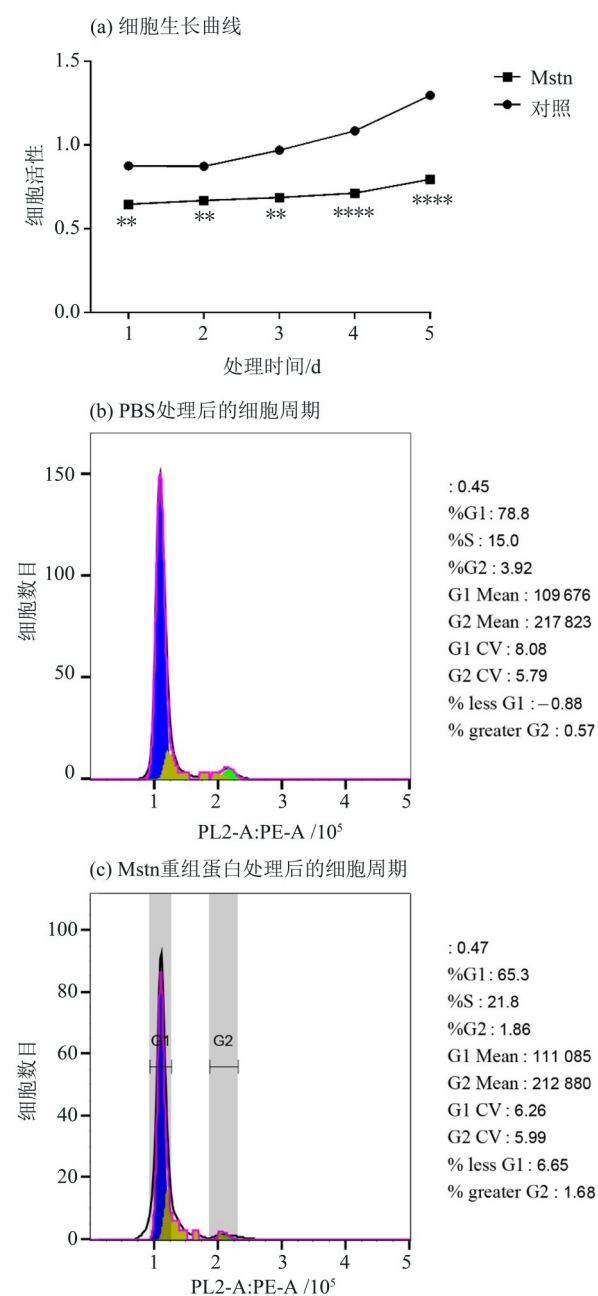
Fig. 1 Subcellular localization of Mstn

2.2 Mstn 重组蛋白对肌肉原代细胞增殖的影响

为了检测 *mstn* 对肌肉细胞增殖的影响, 本研究用 Mstn 重组蛋白分别刺激肌肉原代细胞 1、2、3、4 和 5 d, 通过用酶标仪测定肌肉原代细胞每天的 *A* 值, 再绘制细胞生长曲线。研究发现, 用 Mstn 重组蛋白处理的实验组细胞生长明显减缓,

第 1 天时, 对照组和实验组细胞的活性差异就达到了显著性水平, 并且随着处理时间的增加, 细胞活性差异进一步扩大 (图 2a)。同时, 在用 Mstn 重组蛋白刺激肌肉原代细胞 24 h 后, 收集 6 孔板中的细胞制作细胞悬液, 固定后染色, 用流式细胞仪对处理后的样品进行检测。结果表明, 与对照组

相比(图2b), *Mstn*重组蛋白处理后的细胞在S期受阻, 细胞周期受阻(图2c)。



数值的显示用平均值 \pm SD表示 ($n=4$);

*表示 $P<0.05$, 差异显著; *越多差异性越显著。

图2 *Mstn*重组蛋白对肌肉原代细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of *Mstn* recombinant protein on proliferation of muscle primary cells

2.3 *Mstn*重组蛋白对 *mstn* 信号通路下游及相关基因的影响

为了检测 *mstn* 对肌肉原代细胞分化的影响, 本研究设计了斜带石斑鱼 *myod*、*myog*、*smad3*、*mrf4*、*p21* 等增殖分化相关的定量引物, 在用不同

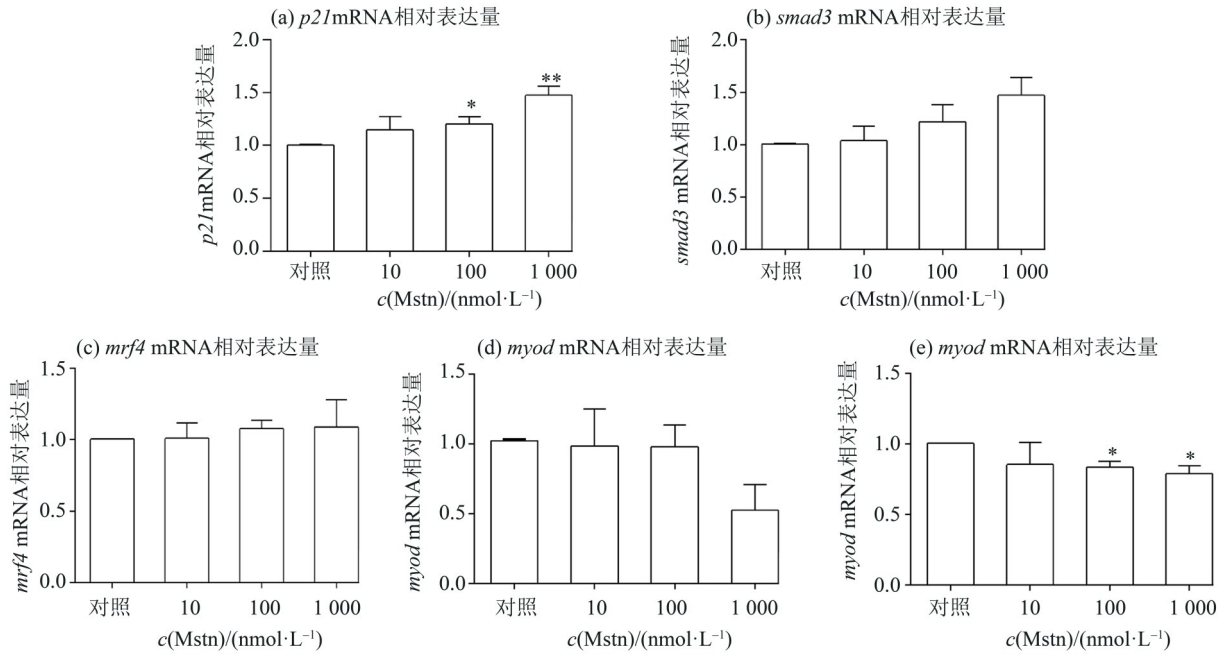
浓度的 *Mstn* 重组蛋白处理后, 通过 RT-qPCR 来测定这些基因的表达。结果如图3所示, 与对照组相比, *p21* mRNA 的表达随着处理浓度的升高而上升, 当处理浓度为 100 和 1 000 nmol/L 时存在显著性差异; *smad3* mRNA 和 *mrf4* mRNA 的表达均随着处理浓度的升高而上升, 但趋势并不明显, 始终不存在显著性差异; *myod* mRNA 和 *myog* mRNA 的表达均随着处理浓度的升高而下降, 但 *myod* mRNA 下降趋势并不显著, *myog* mRNA 则有着明显的下降, 在处理浓度为 100 和 1 000 nmol/L 时存在显著性差异。

3 讨论

在肌肉细胞中, *mstn* 被认为是抑制肌肉生长的强负调节因子^[2,13,22-23]。研究证明, *mstn* 的负调节作用主要是抑制细胞尤其是抑制肌肉细胞的增殖和分化^[16,24-27]。

在本次研究中, 亚细胞定位分析结果表明, 绿色荧光在细胞质中呈点状分布, 表明 *Mstn* 蛋白在细胞质中表达。在山羊中, 亚细胞定位预测 *Mstn* 定位于高尔基体、质膜和内质网膜^[28], 证明 *Mstn* 定位于细胞质的结果是可靠的。

通过对 *mstn* 信号通路下游及相关基因进行 RT-qPCR 检测, 结果表明实验组 *p21*、*smad3* 和 *mrf4* 的表达量均高于对照组, 而实验组 *myod* 和 *myog* 的表达量均低于对照组。经过统计学分析, 其中 *p21* 的表达量在 *Mstn* 处理浓度为中浓度和高浓度时与对照组相比具有显著性差异, 而 *smad3* 和 *mrf4* 虽然具有升高的趋势, 但与对照组相比不具有显著性差异, 表达量下降的 *myod* 和 *myog* 与对照组相比也不具有显著性差异。许多研究表明, *Mstn* 结合跨膜受体结合来触发信号传导^[13-14,19,29]。在受体下游, *Smads* 被证明是 *mstn* 信号的典型介体^[13-15,30-31], 因此认为 *mstn* 是通过经典的 *Smads* 信号通路起作用。*Smad3* 转导 TGF- β 的信号, 属于受体激活的 *Smads*。本研究中, 用 *Mstn* 刺激肌肉原代细胞之后, 我们检测到 *smad3* mRNA 的表达升高, 进一步证明 *mstn* 对 *smad3* 具有调节作用。*Mrf4* 家族相关基因是肌源性调节因子, 它们对肌肉细胞增殖与分化具有重要影响, 在不同的发育时期按照一定的顺序进行表达, 对肌肉细胞的分化进行调节^[32-33]。本研究中, 在 *Mstn* 刺激后, *mrf4* 的表达有了一定程度的上升, *myod* 和 *myog* 表达量有一定程度的下降。已有研究证明, *mstn* 信号传导诱导



数值的显示用平均值±SD表示 ($n=4$); *表示 $P<0.05$, 差异显著; **表示 $P<0.01$, 差异极显著。

图3 不同浓度 Mstn 重组蛋白处理对 *mstn* 信号通路下游及相关基因的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of Mstn recombinant protein treatment on downstream *mstn* signaling pathway and related genes

Smad3 磷酸化并增加 Smad3 与 Myod 的相互作用, 同时, *mstn* 通过作用于 Smads 复合物导致 *mrf*s 家族成员如 *myog* 和 *myod* 的表达量下降^[19]; 抑制小鼠中的 *mstn*, 发现 *mrf4* 表达下降^[34]。因此, 推测在用 Mstn 刺激后, 细胞内 *smad3* 表达量上升, 信号转导加强, 作用于 *smad3* 下游影响细胞分化的 *mrf*s 家族, 导致 *myod*、*myog* 表达量下降和 *mrf4* 表达量的上升, 来促进肌肉原代细胞的分化。

另外, 用 Mstn 刺激后, 细胞内的 *p21* 表达量上升。研究表明, *p21* 是细胞增殖的抑制基因^[35-37]。Mstn 可以抑制成肌细胞的增殖^[9,38-41]。Mstn 通过上调 *p21* 的表达来抑制肌肉细胞的增殖^[9]。本研究中用 Mstn 处理肌肉原代细胞后检测, 发现 *p21* 表达呈现上升趋势的结果与已有研究相符。为了进一步验证 *mstn* 对肌肉细胞增殖的影响, 通过用 Mstn 处理肌肉原代细胞, 在酶标仪上检测在不同处理时间的吸光度并绘制细胞生长曲线图, 并通过流式细胞仪检测细胞周期。根据生长曲线

可以看出, 在用 Mstn 刺激后, 细胞的增殖被抑制, 这与此前研究中 *mstn* 抑制肌肉细胞增殖的结果相符^[9,38-41]。而流式细胞仪检测结果也证明, 被 Mstn 重组蛋白处理过后, 细胞停滞在 S 期, G2 期细胞比例减少, 细胞周期受阻。因此, 推测本研究中 Mstn 上调细胞中 *p21* 的表达, 导致细胞周期受阻, 进而导致细胞增殖受阻, 证明 Mstn 抑制肌肉原代细胞的增殖。

本研究以斜带石斑鱼的 GS 细胞和肌肉原代细胞为研究对象, 揭示了 Mstn 的亚细胞定位、Mstn 重组蛋白对 *mstn* 信号通路下游及相关基因及对肌肉细胞增殖的影响。证明了 Mstn 在斜带石斑鱼 GS 细胞中呈点状分布; Mstn 重组蛋白上调 *smad3*、*mrf4* 的表达, 下调 *myod*、*myog* 的表达, 来调节细胞的分化; 同时 Mstn 重组蛋白能上调 *p21* 的表达, 抑制细胞的增殖。验证了 Mstn 在肌肉发育过程中的生物学功能, 为后续深入开展 Mstn 对鱼类肌肉发育的影响研究奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] LEE S J, McPHERRON A C. Myostatin and the control of skeletal muscle mass [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1999, 9(5): 604-607.
- [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.
- [3] LEE J, KIM D H, LEE K. Muscle hyperplasia in Japanese quail by single amino acid deletion in MSTN propeptide [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(4): 1504.
- [4] RIOS R, CARNEIRO I, ARCE V M, et al. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation [J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2002, 282(5): 993–999.
- [5] ACOSTA J, CARPIO Y, BORROTO I, et al. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype [J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 119(4): 324–331.
- [6] de SANTIS C, JERRY D R. Differential tissue-regulation of myostatin genes in the teleost fish *Lates calcarifer* in response to fasting. Evidence for functional differentiation [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2011, 335(2): 158–165.
- [7] SHENG Y, SUN Y, ZHANG X, et al. Characterization of two myostatin genes in pufferfish *Takifugu bimaculatus*: Sequence, genomic structure, and expression [J]. *PeerJ Journals*, 2020, 8: e9655.
- [8] SEGEV-HADAR A, ALUPO G, TAL K, et al. Identification and characterization of a non-muscular myostatin in the Nile Tilapia [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 94.
- [9] THOMAS M, LANGLEY B, BERRY C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(51): 40235–40243.
- [10] MANCEAU M, GROS J, SAVAGE K, et al. Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors [J]. *Genes & Development*, 2008, 22(5): 668–681.
- [11] ZHANG P, WONG C, LIU D, et al. p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step [J]. *Genes & Development*, 1999, 13(2): 213–224.
- [12] PARKER S B, EICHELE G, ZHANG P, et al. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells [J]. *Science*, 1995, 267(5200): 1024–1027.
- [13] LEE S J, McPHERRON A C. Regulation of myostatin activity and muscle growth [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(16): 9306–9311.
- [14] REBBAPRAGADA A, BENCHABANE H, WRANA J L, et al. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(20): 7230–7242.
- [15] ZHU X, TOPOUZIS S, LIANG L F, et al. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism [J]. *Cytokine*, 2004, 26(6): 262–272.
- [16] McCROSKERY S, THOMAS M, MAXWELL L, et al. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2003, 162(6): 1135–1147.
- [17] TAYLOR W E, BHASIN S, ARTAZA J, et al. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells [J]. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2001, 280(2): E221–228.
- [18] SALABI F, NAZARI M, CHEN Q, et al. Myostatin knockout using zinc-finger nucleases promotes proliferation of ovine primary satellite cells in vitro [J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 192: 268–280.
- [19] LANGLEY B, THOMAS M, BISHOP A, et al. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(51): 49831–49840.
- [20] JOULIA D, BERNARDI H, GARANDEL V, et al. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin [J]. *Experimental Cell Research*, 2003, 286(2): 263–275.
- [21] 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]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(3): 1714–1724.
- [22] DANKBAR B, FENNEN M, BRUNERT D, et al. Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice [J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(9): 1085–1090.
- [23] KONG J, YAN Y, LU X, et al. Integrative phenotypic and gene expression data identify myostatin as a muscle growth inhibitor in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 5985.
- [24] GENG J, LIU G, PENG F, et al. Decorin promotes

- myogenic differentiation and mdx mice therapeutic effects after transplantation of rat adipose-derived stem cells [J]. *Cytherapy*, 2012, 14(7): 877-886.
- [25] WAGNER K R, LIU X, CHANG X, et al. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(7): 2519-2524.
- [26] 王红娜, 孙洪兴, 张英杰, 等. 干扰 MSTN 对绵羊成肌细胞增殖分化及相关基因表达的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(1): 46-54.
- [27] 朱菲菲, 张俊星, 张林林, 等. 干扰 MSTN 对牛骨骼肌卫星细胞增殖分化的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(2): 479-487.
- [28] 金鑫燕. 山羊肌生成抑制素 MSTN 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(9): 111-114.
- [29] THIES R S, CHEN T, DAVIES M V, et al. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding [J]. *Growth Factors*, 2001, 18(4): 251-259.
- [30] GE X, McFARLANE C, VAJJALA A, et al. Smad3 signaling is required for satellite cell function and myogenic differentiation of myoblasts [J]. *Cell Research*, 2011, 21(11): 1591-1604.
- [31] LIU D, BLACK B L, DERYNCK R. TGF- β inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3 [J]. *Genes & Development*, 2001, 15(22): 2950-2966.
- [32] RUDNICKI M A, BRAUN T, HINUMA S, et al. Inactivation of *MyoD* in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene *Myf-5* and results in apparently normal muscle development [J]. *Cell*, 1992, 71(3): 383-390.
- [33] RUDNICKI M A, SCHNEGELSBERG P N, STEAD R H, et al. *MyoD* or *Myf-5* is required for the formation of skeletal muscle [J]. *Cell*, 1993, 75(7): 1351-1359.
- [34] CHOI D H, YANG J, KIM Y S. Rapamycin suppresses postnatal muscle hypertrophy induced by myostatin-inhibition accompanied by transcriptional suppression of the Akt/mTOR pathway [J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2019, 17: 182-190.
- [35] KARIMIAN A, AHMADI Y, YOUSEFI B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage [J]. *DNA Repair*, 2016, 42: 63-71.
- [36] LI R, WAGA S, HANNON G J, et al. Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair [J]. *Nature*, 1994, 371(6497): 534-537.
- [37] MANSILLA S F, VEGA M, CALZETTA N L, et al. CDK-Independent and PCNA-Dependent Functions of p21 in DNA Replication [J]. *Genes*, 2020, 11(6): 593.
- [38] GE L, DONG X, GONG X, et al. Mutation in myostatin 3'UTR promotes C2C12 myoblast proliferation and differentiation by blocking the translation of MSTN [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 634-643.
- [39] KUMAR R, SINGH S P, MITRA A. Short-hairpin mediated myostatin knockdown resulted in altered expression of myogenic regulatory factors with enhanced myoblast proliferation in fetal myoblast cells of goats [J]. *Animal Biotechnology*, 2018, 29(1): 59-67.
- [40] ZHANG J, LIU J, YANG W, et al. Comparison of gene editing efficiencies of CRISPR/Cas9 and TALEN for generation of *MSTN* knock-out cashmere goats [J]. *Theriogenology*, 2019, 132: 1-11.
- [41] 孙顺昌, 彭运生, 贺敬波, 等. siRNA 阻断鼠成肌细胞 myostatin 表达对细胞增殖及分化能力的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2011, 31(2): 187-191.

(责任编辑 张冰)