

## Myostatin 基因突变激发骨骼肌发育机制研究进展

高丽<sup>1</sup>, 杨磊<sup>2</sup>, 李光鹏<sup>2\*</sup>

1. 包头师范学院生物科学与技术学院, 内蒙古 包头 014030;

2. 内蒙古大学生命科学学院, 省部共建草原家畜生殖调控与繁育国家重点实验室, 呼和浩特 010030

**摘要:** 肌肉生长抑制素基因(myostatin, *MSTN*)是骨骼肌发育的负调节因子,在不同物种中具有高度保守性。自然突变或通过基因编辑技术对该基因进行操作,均可以获得肌肉异常发达的动物个体。研究表明,*MSTN*基因突变可以通过多种调控途径影响肌肉发育过程。因此,从成肌细胞增殖、分化、蛋白质合成分解代谢、组蛋白修饰以及巨噬细胞极化等5个方面对*MSTN*突变促进肌肉发育的机理进行综述,以期对农业动物育种新材料生产及重大恶病质的治疗提供借鉴。

**关键词:** 基因突变; 细胞增殖; 蛋白质合成; 组蛋白修饰; 巨噬细胞极化

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2021.0053

中图分类号: Q23

文献标识码: A

## Research Progress on the Mechanism of Skeletal Muscle Development Stimulated by Myostatin Gene Mutation

GAO Li<sup>1</sup>, YANG Lei<sup>2</sup>, LI Guangpeng<sup>2\*</sup>

1. School of Biology Science and Technology, Baotou Teacher's College, Inner Mongolia Baotou 014030, China;

2. State Key Laboratory of Reproductive Regulation & Breeding of Grassland Livestock, College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010030, China

**Abstract:** Myostatin (*MSTN*) is a negative regulator of skeletal muscle development, which is highly conserved among different species. Animal individuals with abnormally developed muscles can be obtained by natural mutation or manipulation of the gene by gene editing technology. Studies have shown that *MSTN* gene mutation can affect muscle development through various regulatory approaches. Therefore, the mechanism of *MSTN* mutation promoting muscle development was reviewed from five aspects, such as myoblast proliferation, differentiation, protein synthesis and catabolism, histone modification and macrophage polarization, in order to provide reference for the production of new materials for agricultural animal breeding and the treatment of major cachexia.

**Key words:** gene mutation; cell proliferation; protein synthesis; histone modification; macrophage polarization

肌肉生长抑制素(myostatin, *MSTN*), 转化生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ )超家族成员, 是骨骼肌生长与发育的负调节因子, 在不同物种中具有极强的进化保守性。*MSTN*基因突变通过促进肌纤维数量和肌纤维尺寸的增加导致肌肉肥大。肌肉质量是畜牧生产中重要的性状,

具有重要的经济价值, 因此 *MSTN* 基因受到了广泛关注。

目前已经发现并通过基因编辑技术获得了多种 *MSTN* 基因突变动物, 包括牛<sup>[1-2]</sup>、绵羊<sup>[3]</sup>、狗<sup>[4]</sup>、猪<sup>[5]</sup>、山羊<sup>[6]</sup>和鸟类<sup>[7]</sup>等。在 *MSTN* 基因编辑动物中, 仅对 *MSTN* 基因序列的小片段碱基进行删除,

收稿日期: 2021-04-19; 接受日期: 2021-06-07

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项项目(2020ZD0008); 包头市青年创新人才项目(2010, 6333)。

联系方式: 高丽 E-mail: gaoli8905@163.com; \* 通信作者 李光鹏 E-mail: gpengli@imu.edu.cn.

不会影响其基因的结构完整性和动物基因组结构,却可以使肌肉出现明显的过度生长现象。因而,关于 *MSTN* 基因突变导致肌肉过度发育的作用机理成为研究热点。本文将从成肌细胞增殖、分化、蛋白质合成分解代谢、组蛋白修饰以及巨噬细胞极化等5个方面对 *MSTN* 突变促进肌肉发育的机理进行综述,以期对农业动物育种新材料生产及重大恶病质的治疗提供借鉴。

## 1 *MSTN* 基因突变通过调控细胞周期影响肌卫星细胞的增殖分化

骨骼肌中存在未分化的肌源性前体细胞——肌卫星细胞(muscle satellite cells, MSCs)<sup>[8]</sup>,骨骼肌的生长主要依赖于这一类细胞。在幼年生长期,MSCs 保持增殖状态以增加生长的肌纤维中的细胞核,之后,随着肌纤维直径不断增加,MSCs 增殖速度逐渐减慢<sup>[9]</sup>。到成年时期,MSCs 保持静止状态,直到肌肉损伤诱导其活化<sup>[10]</sup>。研究表明,敲除 *MSTN* 会促进细胞增殖,而过表达 *MSTN* 会抑制细胞增殖和 DNA 合成<sup>[9]</sup>。进一步的研究发现, *MSTN* 基因突变可通过调控细胞周期进程,影响 MSCs 的增殖与分化过程,从而实现对肌肉发育的调控。通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术抑制 C2C12 细胞中 *MSTN* 基因的表达,细胞周期显著加快,其中, G0/G1 期细胞减少,而 S 期细胞增加<sup>[11]</sup>。在本团队的研究中得到了一致的结果, *MSTN* 基因被敲除后, G1/S 期细胞比例减少, S 期和 G2 期细胞增加,这一结果表明 *MSTN* 基因敲除可促进 DNA 的合成,激发细胞增殖<sup>[12]</sup>。经过检测细胞周期相关基因的表达情况,发现 *MSTN* 基因敲除可以下调抑制细胞周期的基因的表达,而上调细胞周期蛋白(Cyclin)和周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent protein kinase, CDK)的表达<sup>[13]</sup>。进一步研究其作用机理发现, *MSTN* 基因上调通过增加其下游转录因子 pSMAD3 与 CDK 抑制因子 p15、p16 和 p27 的启动子结合,来上调这些 CDK 抑制因子的表达,进而抑制细胞周期进程<sup>[14]</sup>。同时, *MSTN* 基因会通过 PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  途径降解周期蛋白 D1,从而使细胞周期停滞<sup>[15]</sup>。由此可见, *MSTN* 可通过影响细胞周期来影响肌肉发育。

## 2 *MSTN* 基因通过调节肌肉发育关键基因调控肌肉发育进程

在许多物种中, *MSTN* 突变导致的肌肉异常发达现象是因 *MSTN* 突变而产生的肌纤维数量增多和体积增加共同作用的结果<sup>[3-4]</sup>。肌肉质量是动物生产中的重要指标,因此,为了制备肌肉发达的改良畜牧物种,研究人员在开发有效策略以阻断 *MSTN* 的表达方面做了诸多努力与探索<sup>[6,16-17]</sup>。 *MSTN* 基因被激活后,会与其受体 Act II B 结合,使下游转录因子 SMAD2/3 磷酸化,磷酸化的 SMAD2/3 与 SMAD4 形成复合物<sup>[18]</sup>,随后进入细胞核调控成肌发育关键基因的表达,进而抑制肌肉发育过程<sup>[19]</sup>。研究表明, *MSTN* 过表达会通过下调肌肉发育关键基因 *MyoD* 和 *MyoG* 的 mRNA 水平来抑制肌生成过程,从而阻断成肌分化<sup>[20]</sup>。相反地,干扰内源性 *MSTN* 表达或 *MSTN* 突变会促进成肌分化过程<sup>[21-22]</sup>。 *MSTN* 基因突变的牛 MSCs 成肌分化能力显著增强,成肌关键因子 *MyoD*、*MyoG* 以及 *MYF5* 基因的表达显著上调<sup>[21]</sup>;在猪中,通过 CRISPR/Cas9 技术制备的 *MSTN* 基因突变猪,其背最长肌中成肌分化关键基因 *MyoD*、*MyoG* 以及 *MYF5* 基因的表达显著上调<sup>[22]</sup>。这些研究表明, *MSTN* 基因突变改变了成肌关键因子的表达,从而影响成肌细胞分化及肌肉发育进程。

## 3 *MSTN* 基因通过调控蛋白质合成与降解调节肌肉发育

*MSTN* 缺失导致的肌肉发达同样被认为与蛋白质合成增加有关<sup>[23]</sup>。研究认为, *MSTN* 敲除可能会促进胰岛素样生长因子 1 (insulin like growth factor 1, IGF1) 与其配体结合,从而激活 PI3K/Akt 信号通路,使 Akt 磷酸化; mTOR 是 Akt 下游的一个激酶,会使翻译因子 4E 结合蛋白 1 (4E binding protein 1, 4E-BP1) 和 p70 核糖体蛋白 S6 激酶 (p70 ribosomal protein S6 kinase, p70s6k) 磷酸化,从而诱导蛋白质的合成<sup>[24]</sup>。在体外培养的肌管中过表达 *MSTN* 基因会降低 Akt 磷酸化程度,而抑制 *MSTN* 的表达则会促进 Akt 磷酸化<sup>[25-26]</sup>。在小鼠中, *MSTN* 的过表达同样会降低 Akt 以及其他 Akt/

mTOR 信号转导成分(包括 TSC2、核糖体蛋白 S6 和 4E-BP1)的磷酸化<sup>[27]</sup>;而敲除 *MSTN*,则会增加 Akt 的磷酸化,促使 S6 和 S6 激酶 S6K 的表达<sup>[25,28]</sup>。此外,*MSTN* 基因突变还可通过调控 SMAD 的磷酸化,激活 Akt/mTOR 途径<sup>[29]</sup>。在培养的日本比目鱼肌肉细胞中,过表达 *MSTN* 基因同样会导致 Akt 磷酸化程度降低,并显著抑制 mTOR 和 Akt/FoxO1 信号通路,激活的 Akt 诱导激活 mTOR 信号通路,导致蛋白质合成增加<sup>[30]</sup>。同样地,在本团队前期的研究中,对 *MSTN* 基因突变牛骨骼肌进行转录组分析,结果显示,差异表达基因显著富集到了蛋白质及其磷酸化信号通路,且同样富集到了 PI3K-Akt 信号通路,表明 *MSTN* 敲除通过该信号通路影响蛋白质合成及其磷酸化,从而导致肌肉发达<sup>[12]</sup>。

肌肉质量是由蛋白质合成和蛋白质降解共同控制的。肌肉萎缩是蛋白质降解增加和蛋白质合成减少所致<sup>[31]</sup>。在蛋白质降解过程中,泛素蛋白酶系统发挥重要作用<sup>[32]</sup>。*MSTN* 基因被发现不仅仅影响蛋白质合成,同时对蛋白质降解具有重要的调控作用。研究表明,在日本比目鱼肌肉细胞中过表达 *MSTN* 基因,会显著上调泛素蛋白酶水解途径的基因表达<sup>[30]</sup>,表明 *MSTN* 基因过表达会促进泛素蛋白酶体系对蛋白质的降解,从而抑制肌肉发育。在癌症引起的恶病质肌细胞中,*MSTN* 基因也被发现可以通过抑制蛋白质合成并激活泛素蛋白酶水解途径和自噬-溶酶体途径降解蛋白质,对肌肉萎缩起到双重作用<sup>[32-33]</sup>。

## 4 *MSTN* 基因通过表观修饰调控影响肌肉发育

### 4.1 表观修饰与肌肉发育的关系

研究表明,表观修饰(如 DNA 甲基化、miRNA、LncRNA 以及组蛋白的甲基化和乙酰化等)都对肌肉发育起着重要的调控作用。研究表明,在鸭胚的发育过程中,温度会调控肌肉发育基因的表达,进而调控肌肉发育过程,而这一作用发生的机制就是通过影响肌肉发育基因的启动子区甲基化实现的<sup>[34]</sup>。面肩肱型肌营养不良症(facioscapulohumeral muscular dystrophy, FHS)的发生是一些重复的卫星序列缺失致使肌肉发育的关键基因

甲基化程度降低,从而导致基因表达失调,影响了肌肉发育过程<sup>[35-37]</sup>。这些研究均显示,在肌肉发育过程中,涉及到一系列肌肉发育相关基因的甲基化与去甲基化导致的基因表达激活和抑制,表明 DNA 甲基化在肌肉发育过程中具有重要作用。

在组蛋白甲基化调控肌肉分化期间,活跃转录的基因被组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸的三甲基化(histone H3 lysine 4 trimethylation, H3K4me3)标记,准备转录的基因被 H3K4me2 标记。组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase, HDAC)和 SIRT 蛋白失活后,可以激活肌肉分化相关的转录因子,从而启动肌肉分化程序<sup>[38]</sup>。研究人员对猪骨骼 MSCs 和分化的肌管进行转录组和染色质免疫共沉淀测序(chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq)技术分析,结果表明在分化的肌管中肌源性基因表达显著上调,其组蛋白 H3K27me3 修饰显著下降,且该修饰同时调控细胞增殖基因的表达<sup>[39]</sup>。

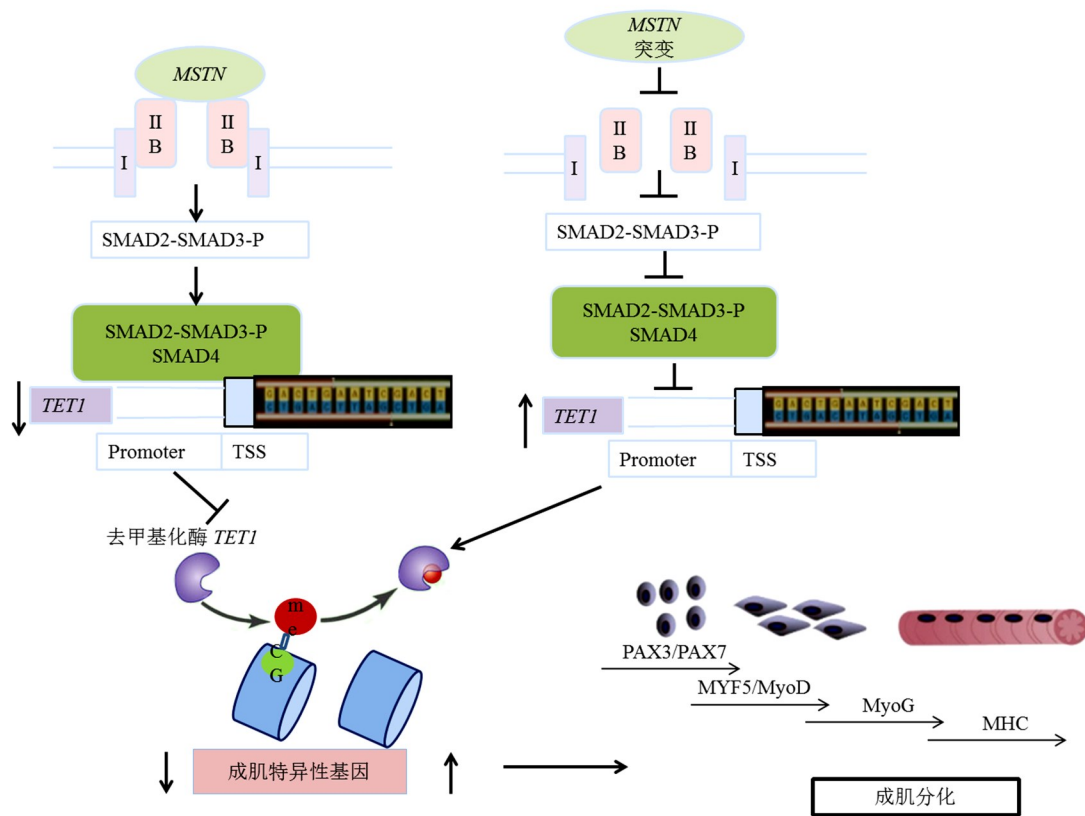
H3K27me3 可通过其与 *MyoG* 基因启动子的结合抑制 *MyoG* 基因的表达,从而维持骨骼肌细胞的增殖。分化前 C2C12 细胞基因组中总体 H3K27me3 修饰水平显著高于分化后细胞<sup>[40]</sup>。在小鼠早期胚胎的肌节中,通过高表达甲基化酶 EZH2 和 H3K27me3 修饰来抑制 *MyoG* 基因的表达,从而抑制成肌细胞分化而促进其增殖<sup>[41]</sup>;绵羊成肌细胞中 *MSTN* 基因敲除后,甲基化酶 EZH2 的表达被上调, H3K27me3 修饰增强,从而抑制分化,促进肌细胞增殖<sup>[42]</sup>;在出生前后的绵羊骨骼肌基因组启动子中,存在大量 H3K27me3 修饰抑制基因的转录<sup>[43]</sup>。这些结果表明, H3K27me3 修饰参与 MSCs 的分化与增殖过程,从而调控肌肉发育过程。

### 4.2 *MSTN* 基因通过调控表观修饰调节肌肉发育进程

研究表明, *MSTN* 基因突变对 DNA 甲基化修饰具有重要作用<sup>[21]</sup>。本团队对 *MSTN* 突变和野生型牛肌肉组织进行转录组测序分析,研究发现富集到的 GO 条目主要包括肌肉发育、成骨分化、细胞增殖分化与凋亡、蛋白质磷酸化以及基因表达的调控等<sup>[12]</sup>。更为重要的是,结果表明 *MSTN* 基因突变会影响 DNA 甲基化相关酶类的表达。这些结果提示 *MSTN* 基因突变可能通过影响 DNA 甲基化修饰调控肌肉发育过程<sup>[12]</sup>。进一步研究发

现, *MSTN* 基因突变后成肌因子发生了显著的去甲基化; *MSTN* 基因突变后 DNA 甲基转移酶 (DNA-methyltransferase, DNMT) 表达下降, 去甲基化酶——甲基胞嘧啶双加氧酶 (tet methylcytosine dioxygenase, TET) 家族中 *TET1* 的表达显著上调, 且其上调程度大于 DNMT 的下调程度<sup>[21]</sup>。这些结果表明 *MSTN* 基因突变可能通过上调去甲基化酶 *TET1* 的表达促使成肌因子发生去甲基化, 从而上

调成肌因子的表达水平。进一步通过 ChIP 及双荧光素酶报告试验证明, *MSTN* 基因下游的转录因子 SMAD2/SMAD3 通过与去甲基化酶 *TET1* 的启动子结合而抑制其表达, 从而调控 *TET1* 介导的去甲基化过程; 当 *MSTN* 基因突变后, 转录因子 SMAD2/SMAD3 对 *TET1* 的抑制作用减弱, *TET1* 基因表达上调, 使成肌因子发生去甲基化, 从而促进成肌分化过程 (图 1)<sup>[12]</sup>。



注: 左侧为野生型个体; 右侧为 *MSTN* 基因突变模型。

图 1 *MSTN* 基因突变调控 *TET1* 介导的去甲基化作用机制<sup>[12]</sup>

Fig. 1 The possible mechanism of *MSTN* mutant regulated the *TET1* mediated demethylation<sup>[12]</sup>

关于 *MSTN* 基因与组蛋白修饰之间的关联性也有一些研究, 研究人员发现敲除原代分离的绵羊成肌细胞中的 *MSTN* 基因, 会导致 H3K27me3 的甲基化酶 EZH2 的表达上调, 并促进肌细胞的增殖过程<sup>[44]</sup>。在 C2C12 成肌细胞向成脂细胞转分化过程中, 当 *MSTN* 基因的表达被敲减后, 会通过调控组蛋白去甲基化酶 *JMJD3* 的表达来调控成脂基因的表达, 从而调控成脂转分化过程<sup>[45]</sup>。上述研究表明, *MSTN* 基因突变可以通过影响表观修饰调控肌肉发育过程。关于 *MSTN* 基因突变与

miRNA、LncRNA、组蛋白乙酰化等修饰之间的相互作用尚未见报道, 随着进一步的研究可能会发现更多 *MSTN* 基因突变调控表观修饰的证据。

## 5 *MSTN* 基因通过影响巨噬细胞极化促进损伤骨骼肌的修复再生

### 5.1 巨噬细胞极化在骨骼肌损伤修复中的作用

骨骼肌损伤是运动医学中最常见的一种损伤, 对损伤修复机理的研究以及损伤修复手段的

探索是该领域的研究热点<sup>[46]</sup>。骨骼肌中存在一类静止的卫星细胞,当骨骼肌受到急性损伤时,这类静止的卫星细胞便会被激活、增殖、分化,进而融合形成肌管,完成损伤肌肉的修复<sup>[47]</sup>。近年来研究表明,在骨骼肌损伤修复过程中,除 MSCs 外,巨噬细胞的极化,即巨噬细胞对不同表型的获取<sup>[48]</sup>同样发挥重要作用<sup>[49]</sup>。在肌纤维损伤和再生过程中,巨噬细胞存在 2 种亚型——具有促炎属性的 M1 型和抗炎属性的 M2 型<sup>[50-51]</sup>。在骨骼肌损伤后,促炎因子和趋化因子释放招募骨髓源性单核细胞进入损伤区域,并成熟为巨噬细胞,之后,巨噬细胞极化为 M1 型巨噬细胞,通过一氧化氮体系在肌肉损伤部位促使炎症加重<sup>[52]</sup>,同时激活 MSCs 使其大量增殖。随后转换为 M2 型巨噬细胞,消除炎症并介导组织再生和血管生成,促进受损骨骼肌成肌细胞分化融合,完成损伤修复<sup>[53]</sup>。

## 5.2 *MSTN* 基因与巨噬细胞源性因子之间的相互作用

关于 *MSTN* 基因在骨骼肌损伤修复中与巨噬细胞之间的相互作用,尚未见报道。但有许多研究已经表明, *MSTN* 基因与巨噬细胞分泌的促进肌肉损伤修复的细胞因子之间存在重要相互作用。IGF1 是由巨噬细胞分泌的,是肌肉生长的一个主要的正调控因子<sup>[54]</sup>,与 *MSTN* 基因之间存在相互作用,在肌肉损伤修复中发挥重要功能。在正常条件下,IGF1 信号会阻断 *MSTN* 的通路;IGF1 与其受体结合激活 PI3K/Akt 信号通路,使 Akt 磷酸化,使下游 *FoxO* 基因停留在细胞质中并抑制其表达。而 *MSTN* 基因可以通过抑制 Akt 的磷酸化提高 *FoxO* 的活性,增强肌肉萎缩相关基因的表达。因此,IGF-1 与其受体结合后可以抑制 *FoxO* 的活性,抑制肌肉萎缩基因的表达<sup>[55]</sup>,从而促进肌肉发育。

在骨骼肌损伤修复中,炎性细胞因子发挥重要作用,且巨噬细胞是主要的炎性细胞。如白细胞介素 IL-6 等因子会通过经典的 NF- $\kappa$ B 以及 Notch 信号通路参与骨骼肌损伤修复。TGF- $\beta$  信号通路与 Notch 信号通路之间也存在相互作用,激活 Notch 信号通路会抑制 TGF- $\beta$  信号,下调 *MSTN* 的转录,从而导致肌肉增加<sup>[56]</sup>。

除 IGF1 和 Notch 信号通路外, *MSTN* 基因与巨噬细胞分泌的肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 之间同样具有相互调控作用。

HGF 通过调控 MSCs 的增殖、分化、迁移等功能参与骨骼肌再生<sup>[57]</sup>。HGF 对 *MSTN* 基因表达起负向调节作用,从而正向调控 MSCs 的激活<sup>[58]</sup>。这些研究表明, *MSTN* 基因与巨噬细胞源性细胞因子之间具有重要的相互作用,而这些巨噬细胞源性因子都会通过影响巨噬细胞 M1/M2 极化参与骨骼肌的修复损伤。上述结果提示, *MSTN* 基因突变可能通过调控巨噬细胞 M1/M2 极化来促进骨骼肌的损伤修复。对 *MSTN* 基因突变牛肌肉组织的转录组测序分析发现,差异表达基因最显著富集的 GO 条目是“调节免疫系统过程”“免疫系统过程”,同时也富集到了“细胞因子产生的调节”“巨噬细胞激活”等条目;在差异表达基因中,显著富集到了巨噬细胞 M1 和 M2 极化相关的基因<sup>[12]</sup>。由此可以推测, *MSTN* 基因突变对于巨噬细胞 M1/M2 极化具有重要作用, *MSTN* 基因突变可能通过调控巨噬细胞的极化促进肌肉发育,从而在骨骼肌损伤修复过程中发挥作用。

## 6 展望

自然界中存在许多 *MSTN* 自然突变导致肌肉肥大的动物<sup>[3-4]</sup>, *MSTN* 基因在肌肉发育中起到的重要的调控作用,使其对于农业生产甚至疾病治疗具有重要意义,基于此,研究人员通过基因编辑技术制备了许多人工编辑的 *MSTN* 动物突变<sup>[16-17]</sup>。随着其作用机理研究的不断深入,发现 *MSTN* 不仅调控肌肉发育,对于脂肪合成代谢<sup>[59]</sup>、糖代谢<sup>[11]</sup>以及骨骼发育<sup>[60]</sup>等生理过程都具有重要作用。对 *MSTN* 基因突变影响肌肉发育机理的深入揭示,对于农业动物产肉性能提升及重大疾病治疗具有重要的指导意义。通过基因编辑技术制备的 *MSTN* 突变个体,不仅可以用作培育优良动物的育种材料,还可以将其作为肌肉萎缩及恶病质等疾病的药物筛选模型,对于治疗相关疾病具有重要作用。未来对于 *MSTN* 基因的研究也应着重探索 *MSTN* 控制肌肉发育与其他组织代谢通路之间的相互作用,以及 *MSTN* 基因引起的肌肉过度发育与组织微环境之间的关系,比如 *MSTN* 基因突变对巨噬细胞的影响等。只有把机体不同组织之间以及与组织微环境之间的相互关联研究清楚后,才能够更好的应用于动物生产与临床实践中。

## 参 考 文 献

- [1] 李光鹏,白春玲,魏著英,等. 黄牛 *Myostatin* 基因编辑研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2020, 51(1):12-32.
- [2] 王鑫,高广琦,魏著英,等. 杂交F1代 *myostatin* 基因编辑肉牛的肉质特性分析[J]. 中国牛业科学, 2018, 44(3):1-7.
- [3] CLOP A, MARCQ F, TAKEDA H, *et al.* A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep[J]. Nat. Genet., 2006, 38: 813-818.
- [4] MOSHER D S, QUIGNON P, BUSTAMANTE C D, *et al.* A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs[J/OL]. PLoS Genet., 2007, 3:e79[2021-06-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1877876/>. DOI: 10.1371/journal.pgen.0030079.
- [5] BI Y, HUA Z, LIU X, *et al.* Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP[J/OL]. Sci. Rep., 2016, 6: 31729[2021-06-10]. <https://doi.org/10.1038/srep31729>.
- [6] WANG X, NIU Y, ZHOU J, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated MSTN disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass[J]. Anim. Genet., 2018, 49(1):43-51.
- [7] LEE J, KIM D H, LEE K, *et al.* Muscle hyperplasia in Japanese quail by single amino acid deletion in MSTN propeptide[J/OL]. Int. J. Mol. Sci., 2020, 21(4): 1504[2021-06-10]. <https://doi.org/10.3390/ijms21041504>.
- [8] 肖卫华,陈佩杰,刘宇. 巨噬细胞在骨骼肌急性损伤修复中的作用研究进展[J]. 中国运动医学杂志, 2014, 33(3): 269-274.
- [9] TAYLOR W E, BHASIN S, ARTAZA J, *et al.* Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells[J]. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 2001, 280(2): E221-E228.
- [10] YABLONKA-REUVENI Z. Development and postnatal regulation of adult myoblasts[J]. Microsc. Res. Tech., 1995, 30(5): 366-380.
- [11] 刘超武,杨倬,赵斌,等. 逆转录病毒载体介导的RNA干扰稳定抑制肌肉生长抑制素GDF-8的表达[J]. 生物工程学报, 2008(2):250-255.
- [12] 高丽. *Myostatin* 基因编辑牛肌肉卫星细胞分化过程中DNA甲基化修饰的作用机制研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 博士学位论文, 2019.
- [13] PATEL A K, TRIPATHI A K, PATEL U A, *et al.* *Myostatin* knockdown and its effect on myogenic gene expression program in stably transfected goat myoblasts[J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim., 2014, 50(7):587-596.
- [14] CARLSON M E, HSU M, CONBOY I M. Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells[J]. Nature, 2008, 454(7203):528-532.
- [15] YANG W, ZHANG Y, LI Y, *et al.* Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1[J]. J. Biol. Chem., 2007, 282(6):3799-3808.
- [16] WANG K, TANG X, XIE Z, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated knockout of *myostatin* in Chinese indigenous Erhualian pigs[J]. Transgenic Res., 2017, 26(6):799-805.
- [17] YU B, LU R, YUAN Y, *et al.* Efficient TALEN-mediated myostatin gene editing in goats[J]. BMC Dev. Biol., 2016, 16(1): 26-33.
- [18] KOLLIAS H D, MCDERMOTT J C. Transforming growth factor-beta and myostatin signaling in skeletal muscle[J]. J. Appl. Physiol., 2008, 104:579-587.
- [19] 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.
- [20] ZHANG Y N, WANG Y J, BI Y L, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated sheep *MSTN* gene knockout and promote sMSCs differentiation[J]. J. Cell. Biochem., 2019, 120:1794-1806.
- [21] GAO L, YANG M M, WEI Z Y, *et al.* *MSTN* mutant promotes myogenic differentiation by increasing demethylase *TET1* expression via the SMAD2/SMAD3 pathway[J]. Int. J. Biol. Sci., 2020, 16(8):1324-1334.
- [22] LI R, ZENG W, MA M, *et al.* Precise editing of myostatin signal peptide by CRISPR/Cas9 increases the muscle mass of Liang Guang Small Spotted pigs[J]. Transgenic Res., 2020, 29(1): 149-163.
- [23] LIPINA C, KENDALL H, MCPHERRON A C, *et al.* Mechanisms involved in the enhancement of mammalian target of rapamycin signaling and hypertrophy in skeletal muscle of myostatin-deficient mice[J]. FEBS Lett., 2010, 584:2403-2408.
- [24] 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]. Nat. Cell Biol., 2001, 3(11):1009-1013.
- [25] MORISSETTE M R, COOK S A, BURANASOMBATI C, *et al.* Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt[J]. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2009, 297(5): 1124-1132.
- [26] TRENDELENBURG A U, MEYER A, ROHNER D, *et al.* Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size[J]. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2009, 296(6):1258-1270.
- [27] AMIROUCHE A, DURIEUX A C, BANZET S, *et al.* Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle[J]. Endocrinology, 2009, 150(1):286-294.
- [28] LIPINA C, KENDALL H, MCPHERRON A C, *et al.* Mechanisms involved in the enhancement of mammalian target of rapamycin signaling and hypertrophy in skeletal muscle of myostatin-deficient mice[J]. FEBS Lett., 2010, 584(11): 2403-2408.
- [29] SARTORI R, MILAN G, PATRON M, *et al.* Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood[J]. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 2009, 296(6):1248-1257.
- [30] LIU J, PAN M, 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/OL]. Cells, 2020, 9(11): 2376[2021-06-10]. <https://doi.org/10.3390/cells9112376>.
- [31] LIU D, QIAO X, GE Z, *et al.* IMB0901 inhibits muscle atrophy induced by cancer cachexia through MSTN signaling pathway[J/OL]. Skelet. Muscle, 2019, 9(1):8[2021-06-10]. <https://doi.org/10.1186/s13395-019-0193-2>.
- [32] HAN H Q, ZHOU X, MITCH W E, *et al.* Myostatin/activin pathway antagonism: molecular basis and therapeutic potential[J]. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2013, 45(10):2333-2347.
- [33] GUTTRIDGE D C. A TGF-beta pathway associated with cancer cachexia[J]. Nat. Med., 2015, 21:1248-1249.
- [34] WANG Y, YAN X, LIU H, *et al.* Effect of thermal manipulation during embryogenesis on the promoter methylation and expression of myogenesis-related genes in duck skeletal muscle[J]. J. Therm. Biol., 2019, 80:75-81.
- [35] JONES T I, KING O D, HIMEDA C L, *et al.* Individual epigenetic status of the pathogenic D4Z4 macrosatellite correlates with disease in facioscapulohumeral muscular dystrophy[J/OL]. Clin. Epigenet., 2015, 7:37[2021-06-10]. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0072-6>.
- [36] JONES T I, YAN C, SAPP P C, *et al.* Identifying diagnostic DNA methylation profiles for facioscapulohumeral muscular dystrophy in blood and saliva using bisulfite sequencing[J/OL]. Clin. Epigenet., 2014, 6:23[2021-06-10]. <https://doi.org/10.1186/1868-7083-6-23>.
- [37] LEMMERS R J, GOEMAN J J, VLIET P J VAN DER, *et al.* Inter-individual differences in CpG methylation at D4Z4 correlate with clinical variability in FSHD1 and FSHD2[J]. Hum. Mol. Genet., 2015, 24:659-669.
- [38] MATTHEW G G, STUART S L, LAURIE A B, *et al.* A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells[J]. Cell, 2007, 130(1):77-88.
- [39] WANG S, SUN Y, REN R, *et al.* H3K27me3 depletion during differentiation promotes myogenic transcription in porcine satellite cells[J/OL]. Genes, 2019, 10: 231[2021-06-10]. <https://doi.org/10.3390/genes10030231>.
- [40] ASP P, BLUM R, VETHANTHAM V, *et al.* Genome-wide remodeling of the epigenetic landscape during myogenic differentiation[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2011, 108(22): E149-E158.
- [41] CARETTI G, DI PADOVA M, MICALES B, *et al.* The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation[J]. Genes Dev., 2004, 18(21): 2627-2638.
- [42] WEI C, REN H, XU L, *et al.* Signals of Ezh2, Src, and Akt involve in myostatin-Pax7 pathways regulating the myogenic fate determination during the sheep myoblast proliferation and differentiation[J/OL]. PLoS ONE, 2015, 10(3): e0120956[2021-06-10]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120956>.
- [43] BYRNE K, MCWILLIAM S, VUOCOLO T, *et al.* Genomic architecture of histone 3 lysine 27 trimethylation during late ovine skeletal muscle development[J]. Anim. Genet., 2014, 45(3):427-438.
- [44] BAAR K. Epigenetic control of skeletal muscle fibre type[J]. Acta Physiol., 2010, 199:477-487.
- [45] GAO L, YANG M M, WANG X Q, *et al.* MSTN knockdown decreases the trans-differentiation from myocytes to adipocytes by reducing Jmjd3 expression via the SMAD2/SMAD3 complex[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2019, 83(11):2090-2096.
- [46] JARVINEN T A, JARVINEN T L, KAARIAINEN M, *et al.* Muscle injuries: biology and treatment[J]. Am. J. Sports Med., 2005, 33(5):745-764.
- [47] CHARGE S B, RUDNICKI M A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration[J]. Physiol. Rev., 2004, 84(1): 209-238.
- [48] MURRAY P J, ALLEN J E, BISWAS S K, *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines[J]. Immunity, 2014, 41(1):14-20.
- [49] 郑莉芳, 陈佩杰, 周永战, 等. 老年骨骼肌再生能力受损的机制研究进展[J]. 生理科学进展, 2017, 48(5):393-397.
- [50] MARTINEZ F O, GORDON S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment[J/OL]. F1000Prime Rep., 2014, 6: 13[2021-06-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24669294/>. DOI: 10.12703/P6-13.
- [51] MILLS C D. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages[J/OL]. Front. Immunol., 2015, 6: 212[2021-06-10]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00212>.
- [52] VILLALTA S A, NGUYEN H X, DENG B, *et al.* Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy[J]. Hum. Mol. Genet., 2009, 18(3):482-496.
- [53] TIDBALL J G, VILLALTA S A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration[J]. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2010, 298(5):1173-1187.
- [54] TIDBALL J G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration[J]. Compr. Physiol., 2011, 1(4):2029-2062.
- [55] BOIS P R, GROSVELD G C. FKHR(FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts[J]. EMBO J., 2003, 22(5):1147-1157.
- [56] MATTHEW G M, DAVID L H, MARK P, *et al.* Inhibition of myostatin signaling through Notch activation following acute resistance exercise[J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(7): e68743[2021-06-10]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068743>.
- [57] ENDO T. Molecular mechanisms of skeletal muscle development, regeneration, and osteogenic conversion[J]. Bone, 2015, 80:2-13.
- [58] WOZNIAK A C, PILIPOWICZ O, YABLONKA-REUVENI Z, *et al.* C-Met expression and mechanical activation of satellite cells on cultured muscle fibers [J]. J. Histochem. Cytochem., 2003, 51(11):1437-1445.
- [59] LIPINA C, KENDALL H, MCPHERRON A C, *et al.* Mechanisms involved in the enhancement of mammalian target of rapamycin signaling and hypertrophy in skeletal muscle of myostatin-deficient mice[J]. FEBS Lett., 2010, 584:2403-2408.
- [60] TANG L, AN S, ZHANG Z, *et al.* MSTN is a key mediator for low-intensity pulsed ultrasound preventing bone loss in hindlimb-suspended rats[J/OL]. Bone, 2021, 143: 115610[2021-06-10]. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115610>.