

DOI: 10. 14188/j. ajsh. 2019. 06. 002

肌肉生长抑制素调控动物骨骼肌生长机制的研究进展

唐冬生[†], 詹群美[†], 魏妍妍, 朱向星

(佛山科学技术学院 广东省动物分子设计与精准育种重点实验室/广东省基因编辑工程技术研究中心,
广东 佛山 528225)

摘要: 肌肉生成抑制素(myostatin, MSTN)在动物机体骨骼肌的增殖、分化和生长中起着重要的负调控作用。MSTN基因的过表达会阻碍骨骼肌增殖分化及生长发育,而缺失或表达降低则会导致肌肉肥大,形成双肌现象(double muscle phenomenon, DMP)。MSTN能作用于多个基因及结合多种细胞因子广泛参与生理生化、物质代谢、病理调控等过程,在动物机体生长发育过程中扮演着重要的角色。本文将从MSTN基因的历史渊源、基因定位、时空表达特性、部分相关作用机制等方面进行论述,旨在对MSTN调控动物骨骼肌生长部分机制作梳理,以期为后期研究提供理论依据。

关键词: 骨骼肌;肌肉生成抑制素;生长发育;作用机制

中图分类号: S814. 8

文献标识码: A

文章编号: 2096-3491(2019)06-0486-08

Advances in regulatory mechanism of myostatin on animal skeletal muscle growth

TANG Dongsheng[†], ZHAN Qunmei[†], WEI Yanyan, ZHU Xiangxing

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Molecular Design and Precise Breeding/Guangdong Provincial Research Center of Gene Editing Engineering Technology, Foshan University, Foshan, 528225, Guangdong, China)

Abstract: Myostatin (MSTN) is a negative regulation factor of skeletal muscle growth and development in animals. Overexpression of MSTN gene will hinder the proliferation, differentiation, growth and development of skeletal muscle, while lack or reduced expression of MSTN gene will lead to muscle hypertrophy and the formation of double muscle phenomenon (DMP). MSTN can play an important role in the growth and development of animals by acting on multiple genes and combining with a variety of cytokines to participate in physiological, biochemical, material metabolism, pathological regulation and other processes. This review discusses the historical origin of MSTN gene, gene localization, spatio-temporal expression characteristics, and some relevant mechanisms, aiming to sort out some mechanisms of MSTN regulating skeletal muscle growth in animals, so as to provide theoretical basis for later research.

Key words: skeletal muscle; myostatin; growth and development; action mechanism

0 引言

作为脊椎动物机体内最丰富的组织,骨骼肌的正常生长发育在动物机体发育过程中占据着重要地

位。骨骼肌在生长发育过程中受到复杂的生理信号通路及细胞因子等调控,肌肉生长抑制素(myostatin, MSTN)就是其中一个重要因子。MSTN在骨骼肌增殖、分化和生长发育过程中起着负调控作

收稿日期: 2019-09-05 修回日期: 2019-10-18 接受日期: 2019-11-12

作者简介:唐冬生(1962-),男,教授,博士,研究方向:动物分子遗传与育种。E-mail: tangdsh@163.com;詹群美(1994-),男,硕士生,研究方向:动物分子遗传与育种。E-mail: qmzhan@outlook.com。唐冬生、詹群美对本研究有同等贡献,为本文共同第一作者

基金项目:国家科技重大专项(2014ZX0801012B; 2018ZX08010-08B)、广东省重点领域研发计划(2018B020203003)、佛山市科技创新项目计划(2017AG100111)和广东省动物分子设计与精准育种重点实验室开放课题(2018A05)

引用格式: Tang D S, Zhan Q M, Wei Y Y, et al. Advances in regulatory mechanism of myostatin on animal skeletal muscle growth [J]. Biotic Resources, 2019, 41(6): 486-493.

唐冬生, 詹群美, 魏妍妍, 等. 肌肉生长抑制素调控动物骨骼肌生长机制的研究进展[J]. 生物资源, 2019, 41(6): 486-493.

用, *MSTN* 基因的过表达会阻碍动物机体骨骼肌的生长, 部分、完全缺失或表达降低均会导致动物机体出现双肌现象 (double muscle phenomenon, DMP)^[1,2]。DMP 在比利时蓝牛 (Belgian blue cattle)、皮埃蒙特牛 (Piedmontese cattle)^[3] 和英国惠比特犬 (British whippet)^[4] 等物种中表现突出, 这正是 *MSTN* 基因部分或完全缺失形成的表型 (图 1)。*MSTN* 基因不仅广泛参与物质代谢过程, 而且在胰岛素耐受的调控等生命过程中起着重要作用^[5], 此外在肌肉萎缩^[2]、营养性肌发育不良^[6] 等耗竭型疾病病理过程中也扮演着重要角色。利用以上特点结合现代分子生物学技术对经济动物的 *MSTN* 基因进行突变或缺失, 可使动物机体产生更多的肌肉产品而供人类食用^[7]; 对 *MSTN* 基因引起的耗竭型疾病的相关作用机制进行深入研究, 能提高对人类该类疾病的防治效率。因此, 对 *MSTN* 基因的作用机制进行深入研究, 不论是在动物疾病模型构建领域, 还是在动物经济性状改良方面, 都有重要意义。

1 *MSTN* 基因特征及其表达特性

1.1 *MSTN* 的发现

1997 年, McPherron 与 Lee 等人在小鼠 cDNA 文库中首次克隆 *MSTN* 基因, 经研究发现, 该基因经转录翻译形成的蛋白具有转化生长因子- β 超家族 (transforming growth factor beta, TGF- β) 成员典型结构, 因此将其命名为转化生长因子-8 (transforming growth factor 8, TGF-8), 鉴于其特殊的生理功能, 亦称其为肌肉生长抑制素或肌抑素 (myostatin), 即 *MSTN*^[8]。

1.2 *MSTN* 基因染色体定位与序列特性

精确的基因定位是研究基因功能的前提。目前, 多个物种 *MSTN* 基因定位已经完成, 例如猪 *MSTN* 基因定位于 15 号染色体 15q2.3^[9]; 牛的定位于 2 号染色体端粒区域 2q14-q15^[10]; 绵羊的定位于 2 号染色体端粒区域^[11]; 鸡的定位于 7 号染色体^[12] 等。此外, 小鼠、大鼠、家兔、斑马鱼和狒狒等不同物种的

MSTN 基因定位也已完成。*MSTN* 基因序列在不同物种间高度保守。克隆人、小鼠、牛、猪、羊、鸡和斑马鱼 *MSTN* 基因 cDNA 序列表明, 就 C-tip 而言, 人、小鼠、大鼠、猪和鸡的同源性为 100%, 牛和绵羊仅相差 1~3 个碱基, 而斑马鱼与小鼠同源性为 88%^[13]。将比利时蓝牛和皮埃蒙特牛 *MSTN* 基因 cDNA 与正常牛基因进行序列分析对照, 结果表明, 在比利时蓝牛中 *MSTN* 基因外显子 3 中存在 11 bp 的纯合性缺失, 提前终止了开放阅读框 (open reading frame, ORF), 导致位于 *MSTN* 生物学效应区的部分氨基酸片段缺失, 丧失抑制肌肉增殖、分化及生长发育的生物功能, 因而比利时蓝牛表现 DMP; 与比利时蓝牛不同, 皮埃蒙特牛的外显子 1 和外显子 3 中各有一处突变, 即外显子 1 中一处 C 核苷酸突变为 A 核苷酸, 导致位于第 94 位苯丙氨酸 (Phe) 被亮氨酸 (Leu) 所取代。而外显子 3 中一 G 核苷酸突变为 A 核苷酸, 导致第 313 位半胱氨酸 (Cys) 替换为色氨酸 (Trp) (图 2)。两处氨基酸的替换正好位于 *MSTN* 生物学效应区, 一处或两处替换均能导致 *MSTN* 生物学作用部分或者完全丧失, 从而导致皮埃蒙特牛出现 DMP^[14~16]。

1.3 *MSTN* 基因 mRNA 表达特性

早期试验证明 *MSTN* 基因在小鼠胚胎发育早期的表达局限于肌节区, 而在成年个体中, *MSTN* 基因主要在骨骼肌中表达^[9]。对处于生长发育期的猪的不同组织中 *MSTN* 基因 mRNA 进行检测发现, *MSTN* 基因 mRNA 存在于在骨骼肌、脂肪组织、心肌、肝脏及肾脏中, 其中骨骼肌中表达量最高, 其他组织相对较低; 进一步研究表明, *MSTN* 基因在哺乳动物脑组织、淋巴组织、胎盘组织、内膜细胞均有表达^[17]。鱼类体内 *MSTN* 基因表达更为广泛, 骨骼肌、鳃、肠、大脑、眼、性腺均能检测到 *MSTN* 基因 mRNA^[18]。此外, *MSTN* 基因 mRNA 含量随着年龄的增长而变化, 从胚胎时期到老年时期呈现先升高、后降低、再升高的趋势^[19]。*MSTN* 在动物机体生长发育过程中, 在各个组织器官的形成、发育、功能发



图 1. 比利时蓝牛、皮埃蒙特牛^[3]和英国惠比特犬^[4]双肌表型

Fig. 1 Belgian blue cattle, Piedmontese cattle^[3] and British whippet^[4] double muscle phenotypes

挥及生命历程等方面都存在着重要作用,但是其具体相关性、作用机制有待进一步研究。

1.4 MSTN 蛋白表达及功能形成

MSTN 蛋白由肌细胞等组织和器官合成、加工并释放,属于具有 TGF- β 超家族蛋白典型分子结构特征的自分泌或旁分泌蛋白,由 376 个氨基酸组成(图 2)。MSTN 前体蛋白核心主要由 N-tip 附近的氨基酸残基构成,以连续相同氨基酸序列作为分泌信号;前体蛋白 C-tip 附近,存在蛋白水解酶识别位点和半胱氨酸核心结构(Cys knot 结构),MSTN 通过 Cys knot 结构形成二硫键,折叠形成具有生物学活性的二聚体,即成熟 MSTN 蛋白。N-tip 前导肽、N-tip 信号肽及 C-tip 成熟肽三者共同组装形成 MSTN 前体蛋白,其中,N-tip 信号肽主要执行细胞将 MSTN 蛋白自行分泌到细胞外的功能。MSTN 成熟蛋白形成前,需要进行两次水解,第一次水解位于细胞内,主要去掉具有结合能力的 C-tip 片段,第二次水解位于细胞外,主要去掉 N-tip 信号肽序列,此后,两个 MSTN 成熟蛋白在 Cys knot 结构上以二硫键的形式结合,形成 MSTN 成熟蛋白二聚体,经过进一步生化修饰过程后,形成具有真正生物学活性的 MSTN 蛋白,在其与特异性受体结合后,执行相应的生物学作用^[9,20]。MSTN 蛋白形成是一个复杂的调控过程,此过程中将受到多种细胞因子的调控,其具体调控途径及作用机制有待进一步研究。

2 MSTN 作用机制研究进展

机体骨骼肌的生长发育受环境、基因等因素的影响,基因的特异性表达及细胞因子与受体间特异性结合相互促进、相互制约,构成复杂网络促进或抑制骨骼肌的生长发育(图 3)。MSTN 与骨骼肌生长

发育相关的多个信号通路存在联系,尤其与细胞周期、SMADS 家族、MRFs 家族、ActR 家族等联系密切,并且 MSTN 在脂肪沉积^[53]等生理过程中也扮演着重要的角色。

2.1 MSTN 与骨骼肌细胞周期共同调控骨骼肌增殖分化及生长发育

MSTN 主要调节肌细胞从 G1 期到 S 期及从 G2 期到 M 期转变。作为细胞周期调控机制的核心,细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)是关于细胞周期能否顺利完成从 G1~S 期过渡到 G2~M 期的限速酶^[21]。MSTN 能够降低 2 型 CDK(CDK2)的表达量,从而导致周期蛋白依赖激酶抑制因子 p21 的表达量增加,使得细胞周期蛋白复合物 CyclinE-CDK2 含量减少并且活性降低,进而视网膜母细胞瘤抑制蛋白(Rb 蛋白)的磷酸化过程被抑制,最终 MSTN 行使抑制肌细胞增殖分化的生物学作用,使肌细胞分裂停滞在 G1 期,不能进一步增殖分化;分泌到胞外的 MSTN 前体蛋白迅速水解形成活性二聚体,及时与 MSTN 受体结合,从而激活 SMADS 与 P38MAPK 等信号通路,使抑制因子 p21 的转录增强,p21 与 CyclinE-CDK2 复合物结合使其失活,从而达到对肌细胞周期从 G1~S 期过渡到 G2~M 期的抑制作用^[22]。

2.2 MSTN 与 SMADS 蛋白家族结合负调控肌细胞的增殖分化及生长发育

SMADS 蛋白家族是目前唯一被发现的 TGF- β 超家族信号转导受体底物。SMADS 蛋白一方面通过磷酸化形成蛋白信号通道,可将 TGF- β 信号由细胞膜外传递至细胞核内,另一方面可进入细胞核找到 TGF- β 靶点并与之互作,从而激活或抑制靶基因的表达,达到 TGF- β 超家族介导的对细胞的各种调

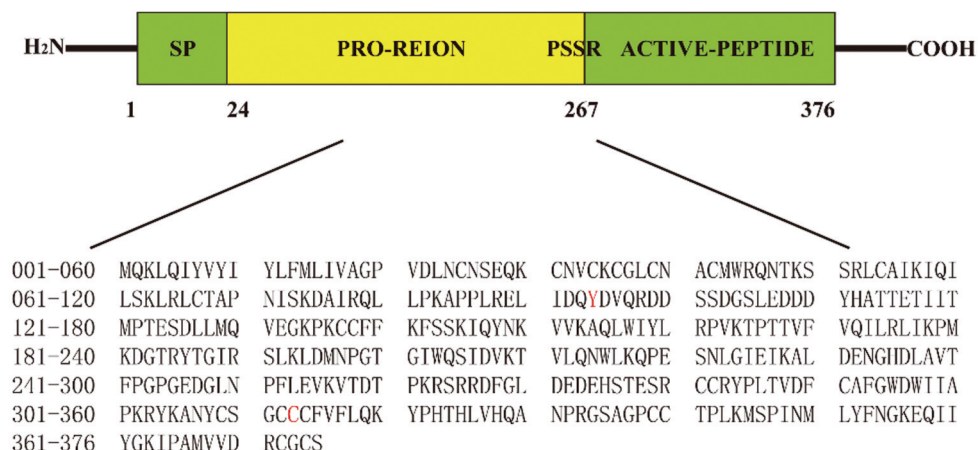


图 2 MSTN 蛋白结构及氨基酸序列

Fig. 2 Structure and amino acid sequence of MSTN protein

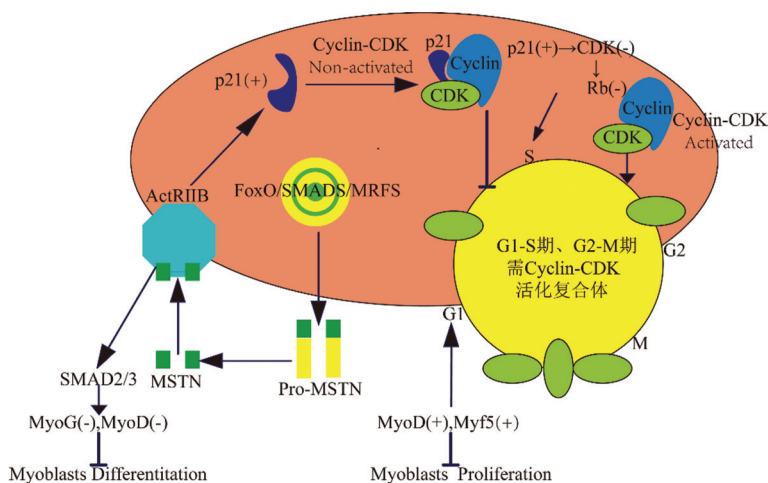


图3 *MSTN* 基因表达相关部分调控网络

Fig. 3 *MSTN* gene expression related part of the regulatory network

控作用的目的^[23]。研究表明,*MSTN*基因的启动子可以与受调控 SMADS 蛋白(regulated SMADS protein, R-SMADS, 如 SMAD2、SMAD3 等)及公共 SMADS 蛋白(common SMADS protein, Co-SMADS, 如 SMAD4 等)相结合,三者均可提高 *MSTN* 基因启动子的活性,从而使得 *MSTN* 基因 mRNA 的表达量显著增加,进而增强 *MSTN* 对骨骼肌细胞增殖分化及生长发育的抑制作用。由此推测,*MSTN* 基因对骨骼肌生长发育的调控作用很可能是通过 SMADS 调节 *MSTN* 靶基因来实现的^[24,25]。进一步研究发现,*MSTN* 基因 mRNA 的表达与 SMAD3 和 SMAD4 的含量呈正相关,推测 SMAD3 对 *MSTN* 基因有正调控作用。目前,R-SMADS 蛋白与 *MSTN* 基因表达相关的研究比较欠缺,其调控作用机制有待进一步研究^[24,26]。

2.3 MSTN 与 ActR 蛋白家族在骨骼肌的增殖分化与生长发育中共同作用

激活素受体 (activin receptor, ActR) 蛋白属于 TGF- β 超家族丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶型受体, 在动物机体细胞分化等生理过程中发挥着重要作用。根据结构和功能主要分为 I 型受体 (ActRI) 和 II 型受体 (ActRII), ActRII 又可分为 ActRIIA 和 ActRIIB 两个亚型, 研究表明, ActRIIB 与 MSTN 的结合能力明显高于 ActRIIA, 由此推测, 研究 ActRIIB 在介导 MSTN 发挥肌肉生长抑制作用过程可能更具有意义。将可溶性 ActRIIB 蛋白注射到野生小鼠体内两周后, 发现小鼠肌肉增重 60%, MSTN 蛋白含量显著下降, 且相同条件下, 肌肉增重量明显高于 MSTN 基因突变小鼠, 推测 ActRIIB 不仅对 MSTN 基因的表达存在明显的抑制作用, 而且在动物机体体内还存

在着与 ActRIIB 受体相关的其他信号通路,在骨骼肌的增殖分化与生长发育中共同作用,其作用机制有待进一步研究^[27,28]。

2.4 MSTN与FoxO在肌肉生长发育中起着重要的调控作用

叉头转录因子(forkhead box transcription factor, FoxO)是一类关键的细胞增殖分化调控因子,广泛参与细胞增殖分化等重要的生理生化过程。FoxO主要通过胰岛素样生成因子-磷脂酰肌醇3激酶-叉头转录因子(IGF/PI3K/FoxO)信号通路的作用来调控肌肉增殖分化与生长发育。作为IGF/PI3K/FoxO信号通路的关键因子,FoxO活性受IGF-I调控,IGF-I可以与细胞表面受体结合进而激活PI3K/Akt通路,对FoxO活性产生抑制作用^[29,30]。研究表明,MSTN可以抑制Akt磷酸化过程,进而FoxO活性升高,达到抑制肌肉细胞正常生长发育作用^[31]。另外,FoxO可通过与MSTN启动子E-box序列区域结合,使MSTN表达量上调,从而抑制肌遗传因子(myogenic determining factor, MyoD)表达,降低肌酸激酶等参与肌肉增殖分化、生长发育相关调控基因的表达量,达到抑制肌肉细胞分化的目的^[32~34]。因此,FoxO和MSTN在肌肉生长发育通路中起着重要的调控和关联作用。

2.5 MSTN负调控MRFs蛋白家族表达而抑制机体骨骼肌生成

生肌调控因子(myogenic regulatory factors, MRFs)蛋白家族主要由MyoD、肌源蛋白(myogenin, MyoG)等因子组成,促进骨骼肌干细胞和卫星细胞向成肌细胞分化,并融合形成肌纤维。该家族成员均含有螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix,

B-HLH)结构^[35]。在肌细胞中表达的MSTN基因启动子中都有E-box结合序列,MRFs家族的B-HLH结构可与MSTN基因的E-box进行结合以激活MSTN基因的启动子。MSTN能通过SMAD3的介导来抑制MyoD和MyoG的活性及其表达。在MSTN启动子作用过程中发现,MyoD还能激活MSTN基因转录功能,参与肌肉的生长发育作用,而MSTN会抑制MyoD的形成,二者共同调控肌细胞的生成过程取决于MSTN基因E-box序列与MRFs蛋白家族bHLH结构的亲和力。因此,MSTN基因对MRFs家族蛋白的表达起负调控作用,从而抑制骨骼肌增殖分化及生长发育^[36]。

2.6 FST与MSTN结合并解除其肌抑作用

卵泡抑制素(follistatin, FST)与肌肉肥大存在重要联系,FST促进肌肉生长发育的作用主要是通过阻断MSTN/Smad信号通路来减少MSTN对MyoD的抑制作用,从而促进肌肉的生长发育^[37~39]。FST在动物机体骨骼肌增殖、分化、生长、发育过程中的生物学作用与MSTN存在明显的拮抗性。与MSTN-Mutant小鼠的骨骼肌生长发育情况相反,FST-Mutant小鼠骨骼肌生长发育极其缓慢。相同条件下FST-Mutant小鼠个体明显小于FST-wild小鼠,并且小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏等器官明显发育不全;过表达FST的小鼠骨骼肌生长发育较快且肌肉质量明显增加,研究发现FST能够与MSTN直接结合,进而阻止MSTN与其受体结合,解除其肌抑作用^[40,41]。在小鼠C2C12细胞中同时表达FST和MSTN,发现FST与MSTN结合后可抑制MSTN前体蛋白第二次水解过程,使MSTN前体蛋白不能形成具有活性的MSTN成熟蛋白,以降低MSTN成熟蛋白含量,从而解除MSTN抑制骨骼肌生长发育的作用^[42,43]。

2.7 MEF2家族调控MSTN表达参与骨骼肌的增殖分化与生长发育

肌细胞增强因子-2(myocyte enhancer factor-2, MEF2)在脊椎动物中存在MEF2A、MEF2B、MEF2C和MEF2D 4个亚型^[44]。MEF2家族成员均含有SMADS-box结构域,该结构域在提高MSTN等肌源性因子互作方面发挥重要作用^[45]。MSTN基因启动子区域存在MEF2结合位点,研究表明,MEF2在结合MSTN启动子区域E-box区域后能共同控制肌纤维分化类型,并且有抑制心肌细胞的增殖分化的作用,降低心脏质量^[46,47]。MEF2C能增强MSTN转录活性,过表达MEF2C后,MSTN启动子活性显著增强,推测该因子可能通过影响MSTN的

表达过程参与骨骼肌的增殖分化与生长发育;在C2C12细胞中,MEF2C同时激活其他信号通路,与MRFs家族等共同调控MSTN基因的表达^[48]。由此可见,MEF2在MSTN作用过程中起着重要作用,其作用机制有待进一步研究。

2.8 MSTN减少脂肪沉积

MSTN基因在脂肪组织维持机体物质与能量代谢过程中起着重要的调控作用。研究表明,在脂肪细胞增殖分化的不同阶段,MSTN基因存在不同的作用效应。MSTN在脂肪细胞分化早期,主要作用是诱导前体脂肪细胞增殖分化成为成熟脂肪细胞,然而在成熟脂肪细胞形成后,MSTN则主要抑制成熟脂肪细胞向具有生物学作用的脂肪细胞进一步增殖分化^[49~51]。由此推测,MSTN可调控脂肪细胞的增殖分化以满足机体能量需要,其作用机制有待进一步研究。通过MSTN基因敲除小鼠研究发现,除表现明显DMP外,该小鼠脂肪沉积、血糖血脂水平都显著低于MSTN-wild小鼠,并能抵抗由高脂饮食诱导型肥胖,并且能通过AMPK信号通路降低胰岛素抵抗。MSTN基因可以直接作用于脂肪组织,参与其代谢功能。研究MSTN过表达成年小鼠模型发现,小鼠摄取的热量主要向肌肉转化而导致脂肪沉积减少,该小鼠表现严重的整体衰竭综合征,肌肉和脂肪体积都急剧减少,并且MSTN可以通过诱导SMAD3磷酸化下调PPAR- γ 含量来抑制脂肪形成^[52~54]。由此推测,MSTN还可能广泛参与代谢调控。

3 结 语

MSTN可以直接或间接参与调控动物机体骨骼肌增殖分化及生长发育,并且能结合多种细胞因子广泛参与糖代谢、脂肪代谢、蛋白质代谢、胰岛素耐受、骨密度调控及雌性哺乳动物生殖调控等生命过程,在肌肉萎缩、营养性肌发育不良、糖尿病、艾滋病、心脏衰竭、肾脏衰竭和癌症等耗竭型疾病病理过程中扮演着重要的角色。因此,MSTN在医学领域的地位不容忽视,但是到目前为止,大部分研究集中于其调控经济动物生长性状改良方面,导致对其作用机制方面的研究还比较欠缺,更没有形成系统信号通路理论。目前随着以CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins 9)、BE(base editing)为代表的基因编辑技术的广泛应用,从而为对MSTN基因进行分子水平操作开辟道路,通过基因编辑技术对MSTN基因进行定点敲除、干扰沉默、基因修饰等操

作,为研究探索 *MSTN* 基因作用机制及相关信号调控通路提供可行的技术支持。因此,开展对 *MSTN* 基因受体、靶基因、互作因子、信号通路、卫星细胞等方面的细致研究,将为进一步探讨 *MSTN* 基因对动物机体骨骼肌生长发育的调控机制提供更为全面、更坚实的理论和研究基础。

参考文献

- [1] Cao T, Zhou H L, Xun W J, *et al.* The effect of *MSTN* gene on the regulation of skeletal muscle development of pig and its research progress [J]. *Genom Appl Biol*, 2017, 36(4): 1511-1517.
曹婷,周汉林,荀文娟,等. *MSTN* 基因对猪骨骼肌发育调控的作用及其研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(4): 1511-1517.
- [2] Fan X L, Gaur U, Sun L, *et al.* The growth differentiation factor 11 (GDF₁₁) and myostatin (MSTN) in tissue specific aging [J]. *Mech Ageing Dev*, 2017, 164: 108-112.
- [3] Kambadur R, Sharma M, Smith T P L, *et al.* Mutations in myostatin (GDF₈) in double-muscling Belgian blue and Piedmontese Cattle [J]. *Genome Res*, 1997, 7(9): 910-915.
- [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]. *PLoS Genet*, 2007, 3(5): e79.
- [5] Dong J, Dong Y, Dong Y, *et al.* Inhibition of myostatin in mice improves insulin sensitivity via irisin-mediated cross talk between muscle and adipose tissues [J]. *Int J Obes*, 2016, 40(3): 434-442.
- [6] Desguerre I, Arnold L, Vignaud A, *et al.* A new model of experimental fibrosis in hindlimb skeletal muscle of adult mdx mouse mimicking muscular dystrophy [J]. *Muscle Nerve*, 2012, 45(6): 803-814.
- [7] Rao S B, Fujimura T, Matsunari H, *et al.* Efficient modification of the myostatin gene in *Porcine* somatic cells and generation of knockout piglets [J]. *Mol Reprod Dev*, 2016, 83(1): 61-70.
- [8] McPherron A C, Lawler A M, Lee S. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387(6628): 83-90.
- [9] Bi Y Z, Hua Z D, Liu X M, *et al.* Isozygous and selectable marker-free *MSTN* knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31729.
- [10] Gao F, Sun B X, Xing S Y, *et al.* The effect of leader peptide mutations on the biological function of bovine myostatin gene [J]. *Gene*, 2014, 540(2): 171-177.
- [11] Liu C X, Li W R, Zhang X M, *et al.* Knockdown of endogenous myostatin promotes sheep myoblast proliferation [J]. *In Vitro CellDevBiol-Animal*, 2014, 50(2): 94-102.
- [12] Dushyanth K, Bhattacharya T K, Shukla R, *et al.* Gene expression and polymorphism of myostatin gene and its association with growth traits in chicken [J]. *Animal Biotechnol*, 2016, 27(4): 269-277.
- [13] Song X C, Xu C, Yue Z G, *et al.* Bioinformatic analysis based on the complete coding region of the *MSTN* gene within and among different species [J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2): gmr.15025031.
- [14] McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(23): 12457-12461.
- [15] Grobet L, Poncelet D, Royo L J, *et al.* Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle [J]. *Mamm Genome*, 1998, 9(3): 210-213.
- [16] Sonstegard T S, Kappes S M, Keele J W, *et al.* Refinement of bovine chromosome 2 linkage map near the mh locus reveals rearrangements between the bovine and human genomes [J]. *Animal Genet*, 1998, 29(5): 341-347.
- [17] Stinckens A, Luyten T, Bijttebier J, *et al.* Characterization of the complete porcine *MSTN* gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity [J]. *Animal Genet*, 2008, 39(6): 586-596.
- [18] Kerr T, Roalson E H, Rodgers B D. Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish [J]. *Evol Dev*, 2005, 7(5): 390-400.
- [19] Parsons S A, Millay D P, Sargent M A, *et al.* Age-dependent effect of myostatin blockade on disease severity in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(6): 1975-1985.
- [20] Boman I A, Klemetsdal G, Blichfeldt T, *et al.* A frameshift mutation in the coding region of the myostatin gene (*MSTN*) affects carcass conformation and fatness in Norwegian white sheep (*Ovis aries*) [J]. *Animal Genet*, 2009, 40(4): 418-422.
- [21] Nigg E A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle [J]. *BioEssays*, 1995, 17(6): 471-480.
- [22] Shin S, Song Y, Ahn J, *et al.* A novel mechanism of myostatin regulation by its alternative splicing variant during myogenesis in avian species [J]. *Am J Physiol - Cell Physiol*, 2015, 309(10): C650-C659.
- [23] Horbelt D, Boergemann J H, Chaikuad A, *et al.*

- Small molecules dorsomorphin and LDN-193189 inhibit myostatin/GDF8 signaling and promote functional myoblast differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(6): 3390-3404.
- [24] MacIas M J, Martin-Malpartida P, Massagué J. Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling [J]. *Trends Biochem Sci*, 2015, 40(6): 296-308.
- [25] Yang Q C. Developmental expression of MSTN/smad signaling pathway related genes in longissimus dorsi tissue of masha and large [D]. Taigu, China: Shanxi Agricultural University, 2016: 1-49.
杨青春. MSTN/Smad 信号通路关键基因在大白猪和马身猪背最长肌中的发育性表达[D]. 太谷: 山西农业大学, 2016: 1-49.
- [26] Yan X H, Liao H W, Cheng M Z, *et al.* Smad7 protein interacts with receptor-regulated smads (R-smads) to inhibit transforming growth factor- β (TGF- β)/smad signaling [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(1): 382-392.
- [27] Lach-Trifilieff E, Minetti G C, Sheppard K, *et al.* An antibody blocking activin type II receptors induces strong skeletal muscle hypertrophy and protects from atrophy [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(4): 606-618.
- [28] Nomura M, Sakamoto R, Morinaga H, *et al.* Activin stimulates CYP19A gene expression in human ovarian granulosa cell-like KGN cells via the Smad2 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436(3): 443-448.
- [29] Fernández-Nocelo S, Gallego R, Costoya JA, *et al.* Expression of myostatin in human hematopoietic cells unveils novel autocrine/paracrine actions for the hormone [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(5): 7236-7246.
- [30] Gao F, Kishida T, Ejima A, *et al.* Myostatin Acts as an autocrine/paracrine negative regulator in myoblast differentiation from human induced pluripotent stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(2): 309-314.
- [31] Brown R E, Buryanek J, Katz A M, *et al.* Alveolar rhabdomyosarcoma: morphoproteomics and personalized tumor graft testing further define the biology of PAX3-FKHR(FOXO1) subtype and provide targeted therapeutic options [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 42391-42401.
- [32] den Kamp C M O, Langen R C, Snepvangers F J, *et al.* Nuclear transcription factor κ B activation and protein turnover adaptations in skeletal muscle of patients with progressive stages of lung cancer cachexia [J]. *Am J Clin Nutr*, 2013, 98(3): 738-748.
- [33] Wilkinson H A. Role of myostatin signaling in aging: applications for age-related sarcopenia [J]. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*, 2010, 10(4): 211-216.
- [34] Wang K Y, Li Z C, Li Y, *et al.* Muscle-specific transgenic expression of *Porcine* myostatin propeptide enhances muscle growth in mice [J]. *Transgenic Res*, 2013, 22(5): 1011-1019.
- [35] Zammit P S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 72: 19-32.
- [36] McFarlane C, Plummer E, Thomas M, *et al.* Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF- κ B-independent, FoxO1-dependent mechanism [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 209(2): 501-514.
- [37] Li X X, Wang J W, Liu H H, *et al.* Construction of a eukaryotic expression vector for pEGFP-FST and its biological activity in duck myoblasts [J]. *Electron J Biotechnol*, 2014, 17(5): 224-229.
- [38] Pang M X, Tong J G, Yu X M, *et al.* Molecular cloning, expression pattern of follistatin gene and association analysis with growth traits in bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) [J]. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol*, 2018, 218: 44-53.
- [39] Terova G, Rimoldi S, Bernardini G, *et al.* Inhibition of myostatin gene expression in skeletal muscle of fish by *in vivo* electrically mediated dsRNA and shRNAi delivery [J]. *Mol Biotechnol*, 2013, 54(2): 673-684.
- [40] Wang C Y, Wang Q, Zheng Y Y, *et al.* Effect of follistatin on skeletal muscle wasting of cancer cachexia mice and its mechanism [J]. *J Jilin Univ Med Ed*, 2016, 42(4): 653-658, 843.
王朝义, 王强, 郑曰勇, 等. 卵泡抑素对肿瘤恶病质小鼠骨骼肌消耗的影响及其作用机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2016, 42(4): 653-658, 843.
- [41] Nicolas N, Michel V, Bhushan S, *et al.* Testicular activin and follistatin levels are elevated during the course of experimental autoimmune epididymo-orchitis in mice [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42391.
- [42] Assi M, Derbré F, Lefeuvre-Orfila L, *et al.* Antioxidant supplementation accelerates cachexia development by promoting tumor growth in C26 tumor-bearing mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 91: 204-214.
- [43] Toledo M, Busquets S, Penna F, *et al.* Complete reversal of muscle wasting in experimental cancer cachexia: additive effects of activin type II receptor inhibition and β -2 agonist [J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(8): 2021-2029.
- [44] Paulin R, Sutendra G, Gurtu V, *et al.* A miR-208-Mef2 axis drives the decompensation of right ventricular function in pulmonary hypertension [J]. *Circ Res*, 2015, 116(1): 101-111.

- 2015, 116(1): 56-69.
- [45] Molkentin J D, Black B L, Martin J F, *et al.* Mutational analysis of the DNA binding, dimerization, and transcriptional activation domains of MEF2C [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(6): 2627-2636.
- [46] Tao Z, Zhu C, Song C, *et al.* Lentivirus-mediated RNA interference of myostatin gene affects *MyoD* and *Myf5* gene expression in duck embryonic myoblasts [J]. *Br Poult Sci*, 2015: 1-8.
- [47] George I, Bish L T, Kamalakkannan G, *et al.* Myostatin activation in patients with advanced heart failure and after mechanical unloading [J]. *Eur J Heart Fail*, 2010, 12(5): 444-453.
- [48] Plewka D, Marczyński J, Morek M, *et al.* Receptors of hypothalamic-pituitary-ovarian-axis hormone in uterine myomas [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 1-13.
- [49] Mahmoudabady M, Mathieu M, Dewachter L, *et al.* Activin-A, transforming growth factor- β , and myostatin signaling pathway in experimental dilated cardiomyopathy [J]. *J Cardiac Fail*, 2008, 14(8): 703-709.
- [50] Uemura K, Hayashi M, Itsubo T, *et al.* Myostatin promotes tenogenic differentiation of C2C12 myoblast cells through Smad3 [J]. *FEBS Open Bio*, 2017, 7(4): 522-532.
- [51] Sciorati C, Clementi E, Manfredi A A, *et al.* Fat deposition and accumulation in the damaged and inflamed skeletal muscle: cellular and molecular players [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(11): 2135-2156.
- [52] Zarfeshani A, Ngo S, Sheppard A M. Leucine alters hepatic glucose/lipid homeostasis via the myostatin-AMP-activated protein kinase pathway - potential implications for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Clin Epigenetics*, 2014, 6(1): 27.
- [53] Mendias C L, Lynch E B, Gumucio J P, *et al.* Changes in skeletal muscle and tendon structure and function following genetic inactivation of myostatin in rats [J]. *J Physiol*, 2015, 593(8): 2037-2052.
- [54] Han H S, Ju F, Geng S. *In vivo* and *in vitro* effects of PTH1-34 on osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells through regulating microRNA-155 [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(4): 3220-3235.

□