

赵赶, 甘秀娟, 倪梦茹, 等. 转录因子 *Tgif1* 对猪骨骼肌卫星细胞增殖与分化能力的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (12): 17-26.

ZHAO G, GAN X J, NI M R, et al. The effects of transcription factor *Tgif1* on proliferation and differentiation capacity of skeletal muscle satellite cells in pig [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (12): 17-26.

## 转录因子 *Tgif1* 对猪骨骼肌卫星细胞增殖与分化能力的影响

赵赶<sup>1,2</sup>, 甘秀娟<sup>1,2</sup>, 倪梦茹<sup>1,2</sup>, 李平华<sup>1,2</sup>, 黄瑞华<sup>1,2</sup>, 侯黎明<sup>1,2</sup>, 吴望军<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京农业大学养猪研究所/农业农村部畜禽资源(猪)评价利用重点实验室(南京), 江苏南京 210014;

2. 南京农业大学淮安研究院, 江苏淮安 223005)

**摘要:** 旨在研究 TG 结合因子 1 (TG-interacting factor 1, *Tgif1*) 对猪骨骼肌卫星细胞 (muscle satellite cells, MuSCs) 增殖与分化能力的影响。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 MuSCs 中沉默 *Tgif1* 基因, 并利用 Western blot 和荧光定量 PCR (qPCR) 验证基因编辑效率; 采用免疫荧光染色、Western blot、qPCR 检测细胞分化能力, 5'-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU)、细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 评估沉默 *Tgif1* 基因对 MuSCs 增殖能力的影响; 进一步结合转录组测序技术 (RNA-seq) 对沉默 *Tgif1* 基因的 MuSCs 的基因表达模式变化进行分析, 鉴别出了差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 并进行了基因本体 (GO) 和京都基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。结果: 缺失 *Tgif1* 基因会显著抑制肌管的生成 ( $P < 0.01$ ), 但对 MuSCs 增殖能力没有显著影响 ( $P > 0.05$ )。RNA-seq 分析显示, *Tgif1* 基因缺失导致 434 个基因发生了显著变化, 包括 72 个显著上调表达基因和 362 个显著下调表达基因, 其中包括作用于成肌细胞分化早期并正向调控肌生成的肌生成分化因子 1 (myoblast determination protein, MyoD1), 胆碱能受体烟碱  $\alpha 1$  亚单位 (cholinergic receptor nicotinic alpha 1 subunit, Chrn1), 早期生长反应基因 1 (early growth response 1, Egr1) 和双特异性磷酸酶 1 基因 (dual specificity phosphatases 1, Dusp1), 这些 DEGs 主要富集在细胞迁移功能条目以及 cAMP、PI3K-Akt 和钙信号等信号通路中。综上, 本研究证明了 *Tgif1* 是一个正向调控猪骨骼肌生成的关键因子, 研究结果为猪骨骼肌生长发育的遗传解析提供了新的理论依据, 并为产肉性状的精准遗传调控提供了新的候选靶点。

**关键词:** 猪; TG 结合因子 1; 肌卫星细胞; 肌肉发育; RNA-seq

**中图分类号:** S813 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)12-0017-10

## The effects of transcription factor *Tgif1* on proliferation and differentiation capacity of skeletal muscle satellite cells in pig

ZHAO Gan<sup>1,2</sup>, GAN Xiujuan<sup>1,2</sup>, NI Mengru<sup>1,2</sup>, LI Pinghua<sup>1,2</sup>, HUANG Ruihua<sup>1,2</sup>,  
HOU Liming<sup>1,2</sup>, WU Wangjun<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Swine Science, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Evaluation and Utilization of Live Stock and Poultry (PIG) Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Nanjing), Nanjing 210014, China;

2. Huai'an Academy of Nanjing Agricultural University, Huai'an 223005, China)

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of TG-interacting factor 1 (*Tgif1*) on the proliferation and differentiation capabilities of porcine skeletal muscle satellite cells (MuSCs). CRISPR/Cas9 gene editing technology was employed to silence the *Tgif1* gene in porcine muscle satellite cells, with gene editing efficiency validated via Western blot and quantitative real-time PCR (qPCR). Then, immunofluorescence staining, Western blot, and qPCR were employed to assess cellular differentiation capacity. Next, 5'-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) were used to evaluate the impact of *Tgif1* silencing on MuSCs proliferation. Finally, further analysis of gene expression patterns in *Tgif1*-silenced MuSCs was performed using RNA-sequencing (RNA-seq), identifying differentially expressed genes (DEGs) and conducting Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analyses. The results showed that *Tgif1* gene deletion significantly inhibited myotube formation ( $P < 0.01$ ) but had no significant effect on cell proliferation capacity ( $P > 0.05$ ). RNA-seq analysis revealed that *Tgif1* deletion induced significant changes in 434 genes, including 72

收稿日期: 2025-02-25; 修回日期: 2025-09-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32172710); 江苏省种业振兴工程项目 (JBGS [2021] 024, JBGS [2021] 026); 江苏省农业产业技术体系项目 (JATS [2023] 410, JATS [2023] 186); 常州市生猪种业发展创新中心项目 (CAIC [2024] 001)

第一作者: 赵赶, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 吴望军, 博士, 副教授, 主要从事猪功能基因组学及分子育种研究, E-mail: wuwangjun2012@njau.edu.cn.

significantly upregulated and 362 significantly downregulated genes. Among these were myoblast determination protein 1, the cholinergic receptor nicotinic alpha 1 subunit, early growth response 1, and dual specificity phosphatase 1, which acted early in myocyte differentiation and positively regulates myogenesis. These DEGs were predominantly enriched in cell migration-related functional categories and signaling pathways such as cAMP, PI3K-Akt, and calcium signaling. In summary, this study indicated that *Tgif1* was a key factor positively regulating porcine skeletal muscle development. These findings provided new theoretical support for the genetic analysis of porcine skeletal muscle growth and development, and offered novel candidate targets for the precise genetic regulation of meat production traits.

**Keywords:** pig; *Tgif1*; muscle satellite cells; muscle development; RNA-seq

骨骼肌是哺乳动物体内占比最大的组织,在机体运动调节和代谢稳态维持中具有核心生理功能<sup>[1]</sup>。骨骼肌是家畜肉产品的主要来源,其产量水平和质量参数直接构成畜牧业生产的关键经济指标;同时,肌肉萎缩和损伤被证实是癌症、器官衰竭等多种疾病的不良预后指标。<sup>[2]</sup>。哺乳动物出生后,肌纤维数量不再增加,后续肌肉量的增加主要依赖肌纤维的肥大。当骨骼肌受损时,位于肌纤维肌浆膜和基底膜之间的肌卫星细胞(muscle satellite cells, MuSCs)被激活,启动自我更新程序,经历增殖、分化和融合,最终形成新的肌纤维,修复受损的肌肉组织<sup>[3]</sup>。因此,提高成肌细胞和 MuSCs 的分化潜能,提升肌肉产量和质量,对于优化畜牧业生产性状和开发肌肉退行性疾病治疗策略都至关重要。

成肌细胞和 MuSCs 都起源于间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)<sup>[4]</sup>,其增殖分化能力构成肌肉组织发育的生物学基础。肌肉生长发育是一个多阶段的复杂过程,涉及细胞周期调控、肌肉特异性基因转录程序启动、细胞融合等多个关键生物学事件。这一复杂的调控过程是多种调控因子<sup>[5]</sup>和信号通路<sup>[6]</sup>相互作用的结果。在这些因子中,肌生成调节因子(myogenic regulatory factors, MRFs)包括肌生成分化因子 1(myoblast determination protein 1, MyoD1),肌生成因子 5(myogenic factor 5, Myf5),肌生成因子(myogenin, MyoG)和肌生成调节因子 4(muscle regulatory factor 4, MRF4),在肌生成中起着核心调控的作用<sup>[7]</sup>。MRFs 具有基本螺旋-环-螺旋(basic Helix-Loop-Helix, bHLH)结构,可通过结合 E 蛋白形成二聚体,在其调控区域内结合 E 盒(CANNTG)元件,促进骨骼肌特异性基因的转录<sup>[8]</sup>。这些调控因子呈现严格的时序性表达模式,调控成肌细胞和 MuSCs 的成肌分化过程。MyoD1、Myf5 和 MRF4 作为肌原分化的早期调节因子,介导前体细胞向肌原细胞定向分化。MyoG 作为末端分化的晚期调节因子,与 MyoD1 和 MRF4 协同作用,在细胞融合和肌纤维形成中发挥关键作用<sup>[9]</sup>。调节肌生成的信号通路包括转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )信号通路,其中肌生长因

子(myostatin, MSTN)是该超家族中最著名的成员,研究发现 MSTN 基因敲除小鼠表现出显著的肌肉肥大<sup>[10]</sup>。磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K-Akt)信号通路,活化的 Akt 可通过多靶点调控机制促进肌细胞分化,同时协调蛋白质合成与分解代谢的动态平衡<sup>[11]</sup>。环磷酸腺苷(adenosine 3', 5'-monophosphate, cAMP)是一种重要的细胞内第二信使,通过激活蛋白激酶 A(cAMP-dependent protein kinase, PKA)和下游信号分子,在肌肉再生和代谢等生物学过程中发挥重要调控作用。研究发现,参与 cAMP 信号转导的几种蛋白质,包括受体、G 蛋白和 cAMP 激活的转录因子,可促进肌肉再生<sup>[12-13]</sup>和损伤后的功能恢复<sup>[14]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路,包括 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK),c-Jun 氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, Jnk)和细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, Erk) 1/2 这 3 个主要分支,介导多种信号通路,均与肌肉发育和肌细胞分化有关;Erk1/2 可使核视黄醇-X 受体(RXR)磷酸化,从而抑制其转录激活潜能,而肌母细胞中的 RXR 活性可通过调节 *MyoD1* 基因的表达并作为 *MyoG* 基因的辅助因子促进肌生成<sup>[15-18]</sup>。Notch 信号通路可诱导双特异性磷酸酶 1 基因(dual specificity phosphatase 1, Dusp1)的表达,可阻断 MAPK 家族成员 p38 的活性<sup>[19]</sup>。

*Tgif1* 是 3 个氨基酸环延伸家族的成员,其分子结构特征包含 bHLH 结构域<sup>[20]</sup>。研究发现 *Tgif1* 通过招募 SIN3 转录调节因子家族成员 A(SIN3 transcription regulator family member A, mSin3A)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDACs)到激活的 Smad 复合物或促进 Smad2 的泛素化降解途径来调节 TGF- $\beta$  信号传导,并通过与 RXR- $\alpha$  的配体结合域相互作用来调节视黄酸信号传导<sup>[21]</sup>。最新的研究表明, *Tgif1* 基因在脂肪细胞和成骨细胞分化过程中起关键调控作用。在脂肪细胞分化方面, *Tgif1* 基因通过双重机制发挥作用:一方面通过诱导 CCAAT/增强子结合蛋白  $\beta$ (CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$ ,

C/ebp $\beta$ ) 表达, 促进有丝分裂克隆扩增 (mitotic clonal expansion, MCE) 进程; 另一方面通过解除过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , Ppar $\gamma$ ) 信号通路的抑制效应, 从而协同促进脂肪细胞分化<sup>[22]</sup>。在成骨细胞分化方面, *Tgif1* 的缺乏会导致 p21 (RAC1) 激活激酶 3 (p21 (RAC1) activated kinase 3, Pak3) 表达量增加, 从而导致细胞形态改变、对 I 型胶原包被表面的附着能力降低以及迁移能力受损<sup>[23]</sup>。利用 RNA-seq 在 mRNA 水平描述鸽子骨骼肌发育和生长过程中的基因表达模式, *Tgif1* 被确定为影响骨骼肌发育和生长的候选基因<sup>[24]</sup>。对陆川猪和杜洛克猪长肌的 ATAC-seq 和 RNA-seq 分析也发现了类似的结果<sup>[20]</sup>。因此, 推测 *Tgif1* 可能是影响猪骨骼肌分化的一个关键因素。

综上, *Tgif1* 基因是脂肪生成、骨生成等过程中的重要调控因子, 并且是一个影响肌肉发育的候选因子, 但 *Tgif1* 基因在肌肉生成中的具体调控机理尚不清楚。本文旨在探究 *Tgif1* 基因对猪 MuSCs 增殖和分化能力的影响, 并挖掘其潜在的下游基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 MuSCs 分离与培养

MuSCs 分离自 1 日龄苏淮猪, 其来源于江苏省淮安市淮阴新淮种猪场。动物试验遵循南京农业大学动物福利与伦理委员会制定的《实验动物护理与使用指南》进行。

将剥离的背最长肌置于 75% 乙醇中和 2% 100 $\times$  青霉素-链霉素 (双抗, Gibco) 的 PBS (Biosharp) 溶液中各清洗 3 次, 剪碎, 加入 2 倍组织体积的 0.28% I 型胶原酶 (Gibco), 在 37  $^{\circ}$ C, 90~120 r/min 水浴摇床中消化 2~2.5 h。消化至溶液变成黄色黏稠状, 4  $^{\circ}$ C, 1 000 r/min 离心 10 min, 去除上层胶原酶, 加 3 倍组织体积的 0.25% 胰蛋白酶 (Gibco), 在 37  $^{\circ}$ C, 90~120 r/min 水浴摇床中消化 30 min。分别用 100、70 和 40  $\mu$ m 的分样筛过滤, 收集滤液, 终止消化。将过滤液 4  $^{\circ}$ C, 1 000 r/min 离心 10 min, 吸去上清液, 保留沉淀。用 PBS 清洗细胞, 4  $^{\circ}$ C, 1 000 r/min 离心 5 min, 丢弃上清液, 保留沉淀, 该步骤重复 2 次。接种于 T25 细胞培养瓶中, 使用生长培养基在 5% CO<sub>2</sub>, 37  $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中培养 2 h 后, 吸出上层液体, 接种至新的 T25 细胞培养瓶中, 48 h 后换液, 贴壁的细胞即为 MuSCs。MuSCs 生长后, 对其感染表达 SV40 T 抗原的慢病毒载体, 建立体外可多次传代的猪肌卫星细胞系。MuSCs 分离与永生具体参考 Ni 等的方法<sup>[25]</sup>。

MuSCs 生长培养基由 76% DMEM/F12 培养基

(Gibco), 15% 澳洲胎牛血清 FBS (Gibco), 1% 双抗 (Gibco), 1% 谷氨酸钠 (GlutaMAX, Gibco), 1% 非必需氨基酸 (NEAA, Gibco), 1% 丙酮酸钠 (SP, Gibco) 和 2 ng/mL 生长因子 (bFGF, Peprotech) 配制而成。MuSCs 分化 5 d, 分化培养基由添加 2% 马血清 (HS, Gibco) 和 1% 双抗的 DMEM 培养基 (Gibco) 组成。

### 1.2 单细胞转录组数据来源

苏淮猪单细胞转录组数据来自课题组前期发表文章<sup>[26]</sup>。猪各组织基因表达量数据来源公共数据库网站 (<https://www.farmgtex.org/>), 该网站包含了 9 530 个 RNA 测序数据和 1 602 个全基因组测序数据<sup>[27]</sup>。

### 1.3 *Tgif1* 基因沉默

利用 CHOPCHOP 网站 (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) 设计靶定猪 *Tgif1* 基因第二外显子的 sgRNA 序列, 选择评分较高的候选序列, 并在 sgRNA 基础上在 3' 端设计延伸序列, 详细 sgRNA 序列见表 1。将 sgRNA 序列克隆到 Cas9-sgRNA 表达载体 (pSpCas9 (BB)-2A-Puro 购自 Addgene 公司) 中, 并用 Neon NxT 电穿孔系统 (Invigentech) 转染到 MuSCs 细胞中 (参数为 Pulse voltage: 1 650 V, Pulse width: 10 ms, Pulse number: 3), 设置绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, eGFP) 组和空载体组同时转染, 分别作为电转染效率评价组和对照组 (Ctrl)。然后用添加了 10  $\mu$ g/ml 盐酸嘌呤霉素 (puro, Beyotime) 的生长培养基筛选稳定转染的细胞系 7 d。获得了 *Tgif1* 基因沉默 (TG-KO) 细胞, 并通过 Western blot 验证了 *Tgif1* 蛋白基本不表达。

表 1 沉默 *Tgif1* 基因的 sgRNA 序列

名称	sgRNA 序列
TG-KO1	F: CACCGGGTTCATACAGCCAATCG
	R: AAACCGATTGGCTGTATGAACACCc
TG-KO2	F: CACCGGTTTCATACAGCCAATCGCGG
	R: AAACCGCGATTGGCTGTATGAACc

### 1.4 免疫荧光染色

室温下用 4% 多聚甲醛 (PFA, Biosharp) 固定细胞 15 min 后, 用 PBS 清洗 3 次, 每次 3~5 min; 然后用 0.3% Triton X-100 通透细胞 10 min, 用 PBS 清洗 3 次后使用快速封闭液 (Beyotime) 孵育 1 h。孵育完成后加入稀释好的一抗, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。后用 PBS 清洗 3 次, 加入稀释后的二抗, 室温下暗处孵育 1 h, 除去二抗后, PBS 清洗 3 次, 用含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片 (Biosharp) 染色细胞核。使用荧光 Nexcope NIB610-FL 显微镜 (Novel) 采集图像。分

化指数按随机选取的 5 个视野中阳性细胞核占细胞核总数的百分比计算。本研究使用的一抗包括抗肌球蛋白重链 (anti-myosin heavy chain, antiMHC) (MF-20, 1:100, Developmental Studies Hybridoma Bank), 使用的二抗是 Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:1000, Beyotime)。

### 1.5 Western blot

用预冷的 PBS 冲洗 3 次六孔板中的细胞, 然后用每孔 200  $\mu$ L 含 1% 苯甲基磺酰氟 (PMSF, Beyotime) 的蛋白 RIPA 裂解缓冲液 (Beyotime) 裂解细胞, 收集总蛋白。总蛋白浓度用双喹啉酸法 (Yeasten) 定量。将等量的蛋白质样品与 5 $\times$ SDS-PAGE 样品缓冲液 (Beyotime) 混合, 95  $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。处理好的蛋白质样品使用 4%~20% Tris-Glycine PAGE (生工生物) 分离, 堆积凝胶电压条件为 80 V, 400 mA, 30 min; 分离凝胶条件为 120 V, 400 mA, 60 min。电泳完成后, 将凝胶中的蛋白质转移到聚偏氟乙烯膜 (Millipore) 上。室温下, 用 5% 脱脂奶/PBST (Beyotime) 封闭 1 h, 后用稀释好的一抗孵育, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。然后用 TPBS 洗膜 3 次, 二抗室温孵育 1 h。本研究使用的一抗包括 antiTgif1 (Abcam)、antiMHC (Developmental Studies Hybridoma Bank)、antiMyoD1 (Proteintech)、antiMyoG (Proteintech) 和 antiGAPDH (Proteintech), 二抗包括山羊抗兔 IgG (Proteintech) 或抗鼠 IgG (Proteintech)。

### 1.6 总 RNA 提取与荧光定量 PCR (qPCR) 验证

使用 TRIzol (Ambion) 提取总 RNA, 并使用反转录试剂盒 (Accurate) 按照生产商的说明合成 cDNA。以猪甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参, 进行 qPCR, 检测基因的 mRNA 表达。qPCR 程序: 95  $^{\circ}$ C, 2 min; 95  $^{\circ}$ C, 10 s, 60  $^{\circ}$ C, 30 s, 40 个循环。基因的相对表达采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[28]</sup>。本研究使用的引物如表 2 所示。

### 1.7 5'-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 染色

等量细胞在 12 孔板中生长 24 h 后, 在培养基中加入 EdU (10  $\mu$ mol/L) 孵育 2 h, 完成后用 4% PFA 固定细胞 15 min。随后, 使用 0.3% Triton X-100 中通透细胞 15 min, 并用 Click 反应液染色 30 min。用 TPBS 清洗 3 次后, 用 DAPI 染色细胞核 10 min。用 Nexcope NIB610-FL 显微镜 (Novel) 对细胞进行成像, 随机选取约 1000 个细胞进行分析。

表 2 qPCR 引物信息

基因	引物序列 (5'→3')
<i>Tgif1</i>	F: TTGAATCCACCCAAGGAGCG
	R: ACACGGCAACAACACCTTCT
<i>Chrna1</i>	F: TCGTCTGAAACAGCAATGGGT
	R: CGTGATGTGGCCAGTGTAGT
<i>Egr1</i>	F: CACCTGACCGCAGAGTCTTT
	R: TTTGGCTGGGGTAACTCGTC
<i>Dusp1</i>	F: GTCGGCTCCTTCTCGCTTTC
	R: AAAAGCTTCATATCCTCCTTTGAGC
<i>Myod1</i>	F: GCTCCGGACGTAGATTTGA
	R: GGAGTCGAAACACGGGTCAT
<i>MyoG</i>	F: AGGCTACGAGCGGACTGA
	R: GCAGGCTGCTCCTCTTCA
<i>MHC</i>	F: GATCGGAGATGGCCGCATT
	R: GACTTTGCCACCCTCTCGAGACA
<i>GAPDH</i>	F: CCTCCCGTTTCGACAGAC
	R: GCGGCCAAATCCGTTCA

### 1.8 CCK-8 染色

等量细胞分别在 96 孔板中生长 12、24、36、48、60、72 h, 然后与 CCK-8 试剂孵育 2 h, 用 Thermo Scientific™ Multiskan™ FC (Thermo) 在 450 nm 波长下测量吸光度。

### 1.9 RNA-seq 文库构建与测序数据分析

从细胞中提取总 RNA, 每个样本共提取 2  $\mu$ g RNA 构建 RNA 测序文库。测序文库按照生产商的建议使用试剂盒 (NEB) 生成, 并为每个样本的序列添加了索引代码。文库由 Annoroad 公司 (中国北京) 在 Illumina 平台上测序, 并生成 150 bp 的成对端读数。组间 DEGs 采用以下条件进行筛选:  $P < 0.01$  且  $|\log_2 FC| \geq 1$ 。然后对筛选到的 DEGs 进行基因本体 (GO) 和京都基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。此外, 还选择了一部分 DEGs, 使用 qPCR 进行验证。

### 1.10 数据统计与分析

使用 GraphPad Prism 8 进行分析,  $t$  检验和单因素方差分析用于分析 2 组之间显著性差异。所有数据均以“平均值 $\pm$ 标准误”表示, 以  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示差异极显著。

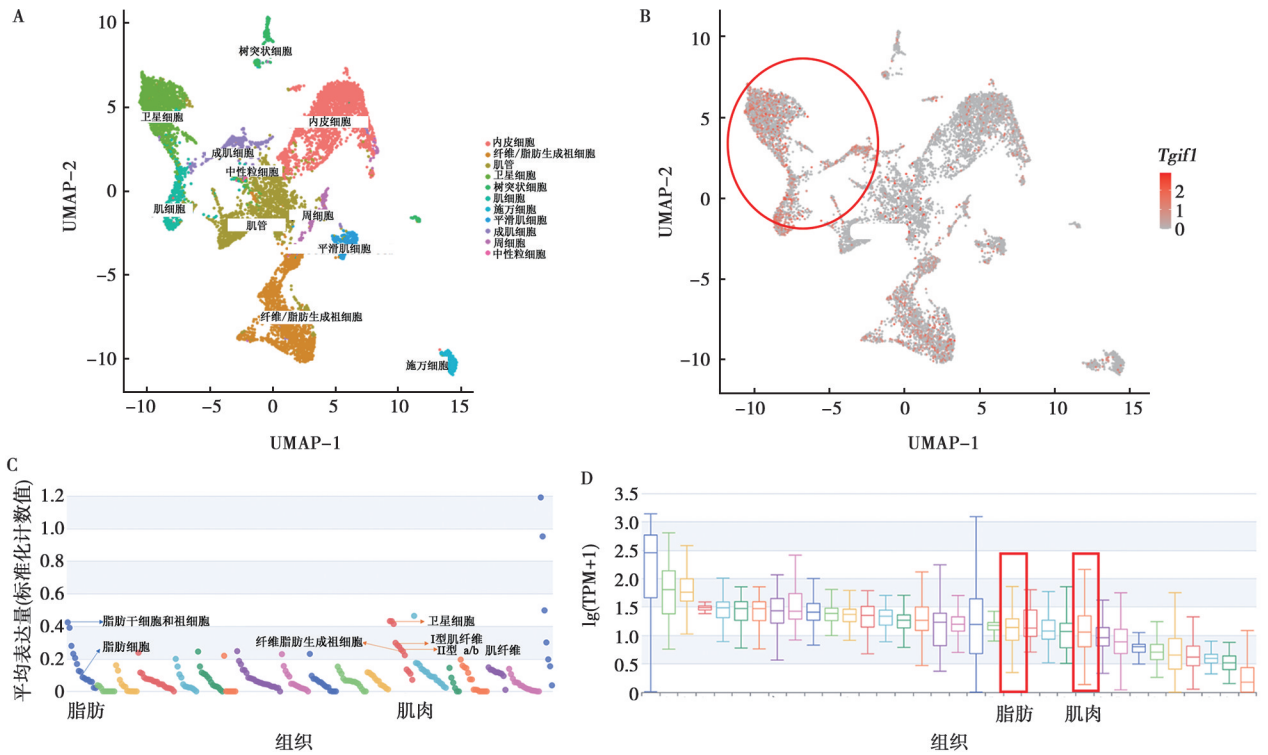
## 2 结果与分析

### 2.1 *Tgif1* 基因表达模式

利用课题组前期采集的 10 日龄苏淮猪背最长肌, 进行单细胞转录组测序数据分析, 结果显示, *Tgif1*

基因在 MuSCs 和成肌细胞、纤维/脂肪生成祖细胞 (fibro/adipogenic progenitors, FAPs) 细胞中高表达 (图 1A 和图 1B)。另外, *Tgif1* 基因在猪群体体内的组织表达模式 (图 1C 和 1D) 分析结果与课题组前

期分析的 *Tgif1* 基因表达模式一致, 即 *Tgif1* 基因在肌肉组织中, 尤其是 MuSCs 中高表达。因此, 推测 *Tgif1* 在肌肉发育过程中发挥重要作用。



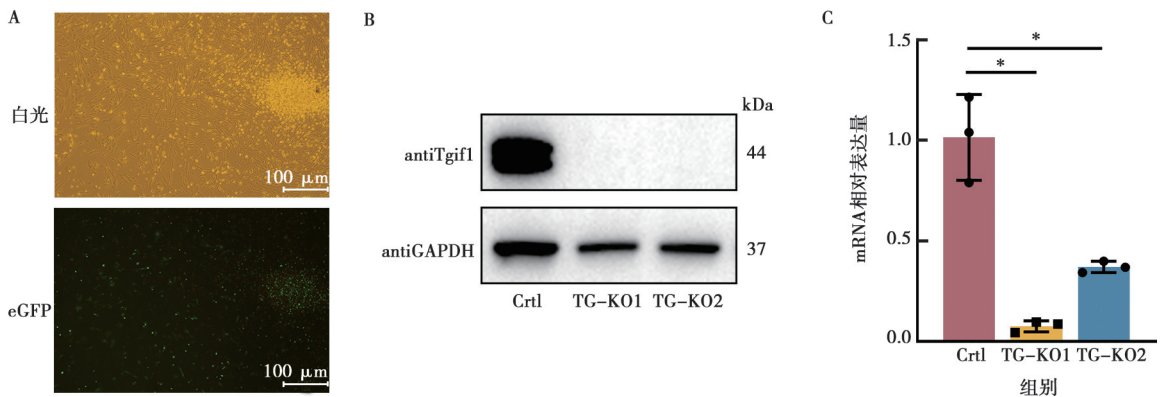
A. 苏淮猪背最长肌单细胞图谱; B. *Tgif1* 基因在苏淮猪背最长肌不同细胞中的表达量; C. *Tgif1* 基因在猪群体各细胞类型中的表达情况; D. *Tgif1* 基因在猪群体各组织中的表达情况。

图 1 *Tgif1* 基因表达模式

### 2.2 *Tgif1* 基因沉默效果评价

电转染 24 h 后, 在荧光显微镜下观察电转染效率 (图 2A), 发现电转染成功并具有一定效率。对电转染后的 MuSCs 细胞 (TG-KO1 和 TG-KO2) 以

及 Ctrl 组中 *Tgif1* 蛋白表达检测 (图 2B) 结果显示, 电转染后的 MuSCs 中 *Tgif1* 蛋白几乎不表达。*Tgif1* 基因 mRNA 表达量检测 (图 2C) 结果显示, *Tgif1* 基因 mRNA 表达量显著下降。上述结果表明基因沉默成功。



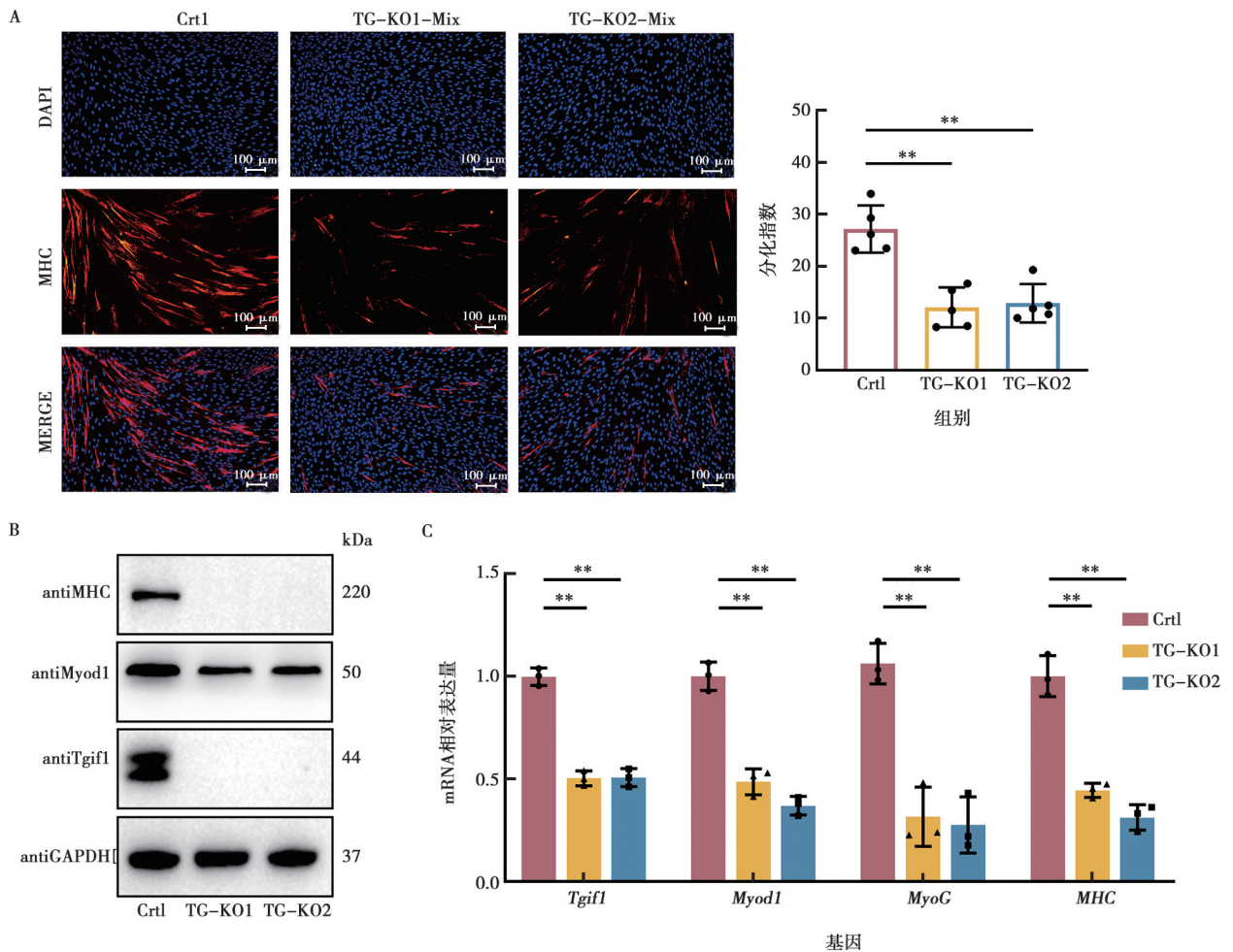
A. eGFP 电转染效率; B. 电转染后蛋白表达量; C. 电转染后 mRNA 表达量, \* 表示  $P < 0.05$ 。

图 2 沉默 *Tgif1* 基因的电转染效率

### 2.3 *Tgif1* 基因沉默对猪 MuSCs 分化能力的影响

免疫荧光染色结果显示, *Tgif1* 沉默导致肌管形成被显著抑制 (图 3A), TG-KO 细胞中 MHC 的蛋白表达和肌肉生成标志基因 (*Myod1*、*MyoG*、*MHC*) 的

mRNA 表达显著下降 ( $P < 0.01$ ) (图 3B 和图 3C)。以上结果进一步证实了 *Tgif1* 基因在 MuSCs 分化中起着关键作用, *Tgif1* 沉默会显著抑制 MuSCs 的分化能力。



A. 培养 Ctrl 和 TG-KO1/2, 待细胞汇合后诱导分化 5 d, 使用 MHC 抗体进行细胞的免疫荧光染色, \*\* 表示  $P < 0.01$ , 下同; B. 诱导分化 5 d 后蛋白表达; C. 诱导分化 5 d 后 mRNA 表达量。

图 3 沉默 *Tgif1* 基因对 MuSCs 分化的影响

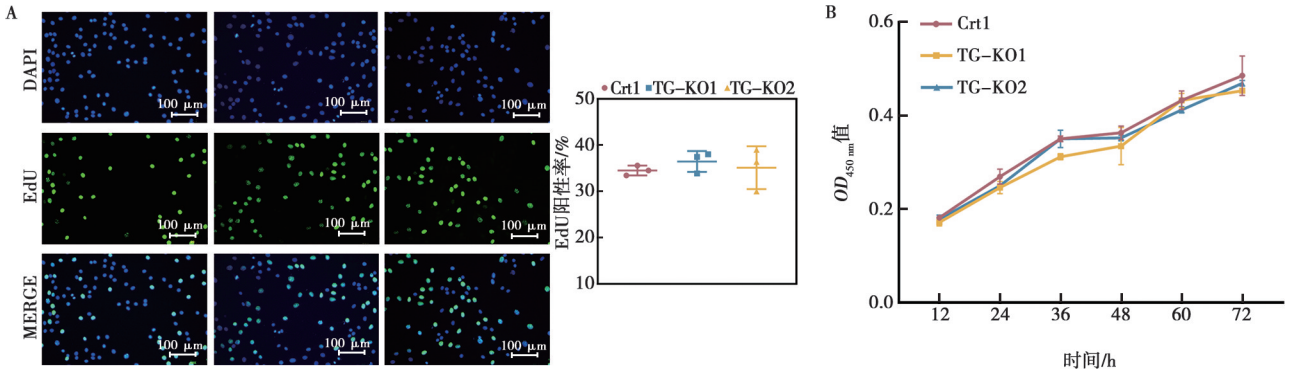
### 2.4 *Tgif1* 基因沉默对猪 MuSCs 增殖能力的影响

由图 4 可知, 在细胞增殖期间, *Tgif1* 基因的沉默对细胞增殖没有显著影响 ( $P > 0.05$ )。上述结果表明, 沉默 *Tgif1* 基因的 MuSCs 分化能力虽然显著降低, 但细胞增殖能力没有显著变化。

### 2.5 *Tgif1* 基因沉默对猪 MuSCs 分化阶段基因表达模式的影响

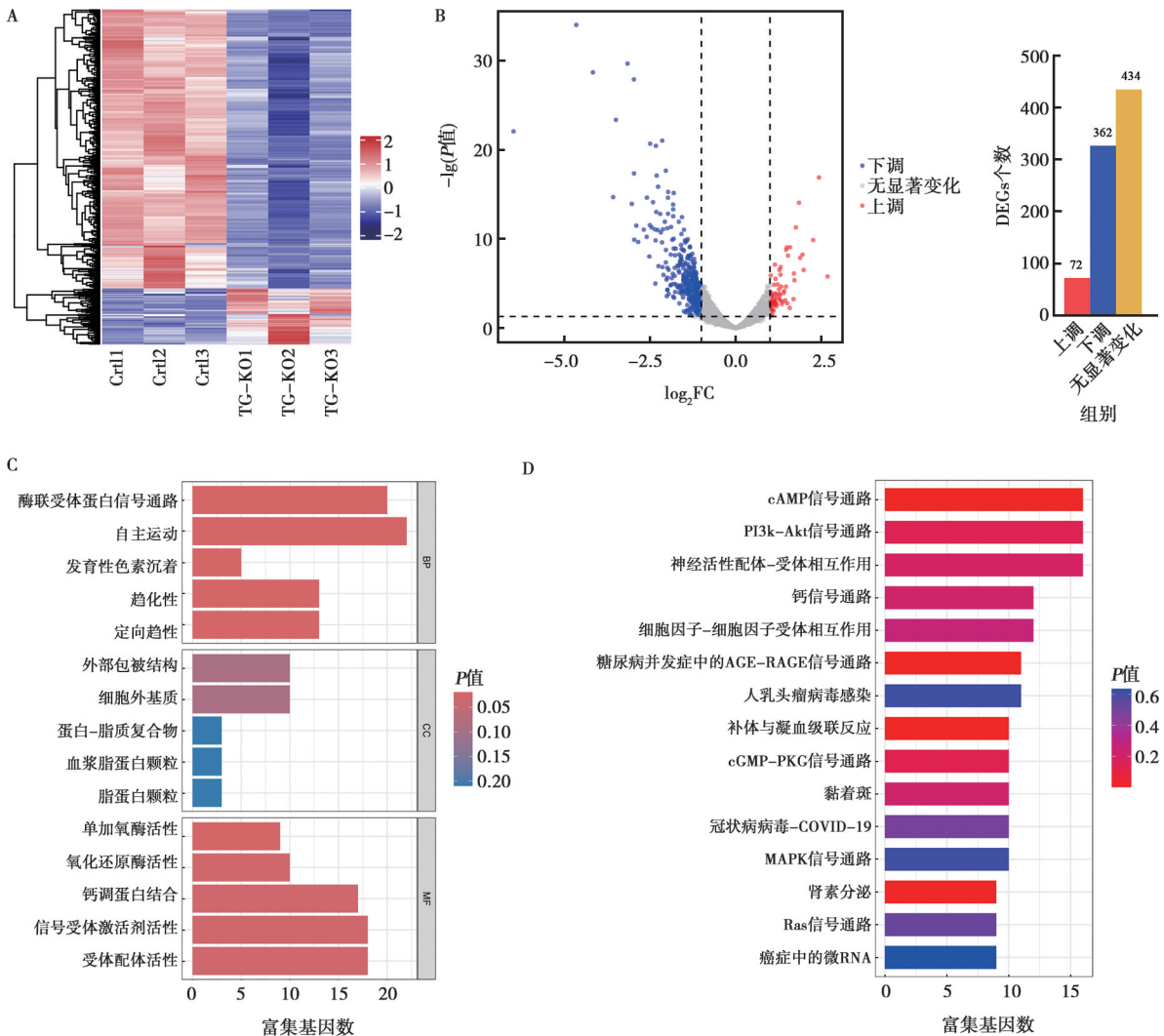
由图 5 可知, TG-KO 组和 Ctrl 组相比, 共鉴定

到 434 个 DEGs, 其中 72 个基因显著上调, 362 个基因显著下调。关注到了 *Myod1*、*Chrna1*、*Egr1* 和 *Dusp1* 等基因被鉴定。此外, GO 和 KEGG 分析结果表明, 富集到的 GO 条目和 KEGG 通路与肌肉分化相关过程密切相关, 如 cAMP 信号通路、Pi3k-Akt 信号通路和钙信号通路等。



A. EdU 染色检测，绿色为 EdU 标记的细胞核，蓝色为 Hoechst 33342 标记的细胞核；B. CCK-8 检测。

图 4 沉默 *Tgif1* 基因对 MuSCs 增殖能力的影响



A. DEGs 聚类热图；B. DEGs 的火山图；C. DEGs GO 富集分析；D. DEGs KEGG 富集分析。

图 5 RNA-seq 数据分析

**2.6 *Tgif1* 基因沉默对肌分化关键基因表达的影响**  
 为了验证 RNA-seq 测序数据的可靠性，本研究

对差异基因 *Myod1*、*Chrna1*、*Egr1* 和 *Dusp1* 基因在 Ctrl 组与 TG-KO1/2 细胞中的表达量进行了检测（图

6), 检测结果显示, 其表达量变化趋势与转录组测序结果一致。

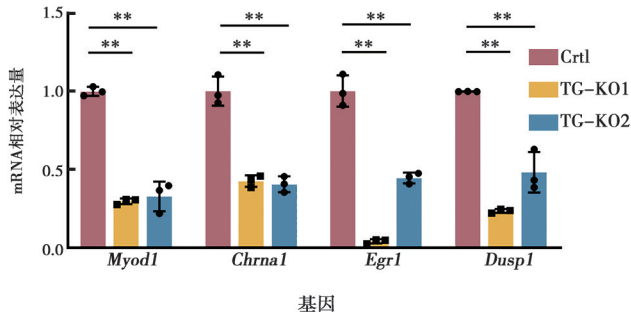


图6 *Tgif1* 基因沉默对肌分化关键基因 qPCR 验证

### 3 讨论

骨骼肌是家畜肉产品的主要来源, 是畜牧业中最重要的经济价值来源。肌生成涉及一系列复杂的有序级联反应, 包括成肌细胞的定向迁移、增殖、启动分化、分化、融合和肌纤维成熟等阶段。因此, 挖掘肌生成的关键调控因子并深入解析其分子调控机制对提高畜牧业生产性能具有十分重要的意义。

*Tgif1* 是同源框架蛋白 TALE 家族的成员, 在不同物种间高度保守, 该蛋白含有一个 DNA 结合结构域, 能够直接结合染色质并与多种经典转录抑制因子直接互作<sup>[21]</sup>。研究发现, *Tgif1* 作为 Smad 蛋白的协同受体, 抑制 Smad 蛋白的磷酸化水平, 抑制 E2/P4 的分泌以及卵巢颗粒细胞的凋亡<sup>[29]</sup>; 近期对小鼠心肌细胞的研究也发现, 敲除 *Tgif1* 基因并不影响 Smad2 和 Smad3 的表达, 但会增加 p-Smad2 和 p-Smad3 的水平, 这表明 *Tgif1* 主要通过抑制 Smad2/3 磷酸化来抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号转导<sup>[30]</sup>。基于高通量测序研究发现, *Tgif1* 被确定为影响鸽子<sup>[24]</sup> 和鸡<sup>[31]</sup> 骨骼肌生长的候选基因。然而, *Tgif1* 在肌生成中的具体作用机制仍有待阐释。

本研究分析了 *Tgif1* 基因在不同组织和细胞中的表达量, 结果显示, *Tgif1* 在猪肌肉组织和 MuSCs 中高表达, 这暗示 *Tgif1* 基因在肌肉生成过程中的潜在作用。为了解 *Tgif1* 基因对 MuSCs 分化能力的影响, 本研究利用 CRISPR/Cas9 系统沉默了 *Tgif1* 基因并分析 *Tgif1* 基因对 MuSCs 分化能力的影响, 结果显示, *Tgif1* 基因的沉默虽然对 MuSCs 的增殖能力没有显著影响, 但显著抑制了 MuSCs 的分化能力, 表明 *Tgif1* 基因是一个影响肌管形成的关键因子。另外, 本研究对 *Tgif1* 基因沉默的 MuSCs 进行了分化, 并利用 RNA-seq 技术对 *Tgif1* 基因潜在的下游基因进行了鉴定, 结果显示, *Tgif1* 基因沉默导致了一系列基因表

达的显著变化, 包括显著上调或下调表达的基因, 表明 *Tgif1* 不仅是一个转录协同抑制因子, 还可能作为转录协同激活因子调控基因表达。值得注意的是, 本研究发现 *Tgif1* 沉默后导致了許多肌分化调控因子, 如 *Myod1*、*Chrna1*、*Egr1* 和 *Dusp1* 等表达量出现了显著下调, 这进一步证明了 *Tgif1* 是一个影响肌生成的关键调控因子。

研究发现, 编码乙酰胆碱受体特异性亚单位之一的 *Chrna1* 基因与小鼠 *MSTN* 基因的蛋白表达呈显著负相关<sup>[32]</sup>, 从而在骨骼肌的发育调控中至关重要, 在本研究中, 在猪 MuSCs 中沉默 *Tgif1* 基因使得 *Chrna1* 基因表达下调, 并抑制肌管生成, 这与之前的研究结果是一致的。*Dusp1* 可使参与信号转导通路的多个分子去磷酸化, 如 *p38*、*Jnk* 和 *Erk*, 从而调控肌肉生成过程<sup>[33-35]</sup>, 与 *Tgif1* 基因对肌肉生成的正调控作用是一致的。*Tgif1* 基因沉默后, *Egr1* 基因在 MuSCs 中的表达下调, 与报道中干扰 *Egr1* 基因的表达会抑制 C2C12 细胞的分化的结果一致<sup>[36]</sup>, 也有研究证实, *Egr1* 是猪胚胎肌形成的关键调控因子<sup>[37]</sup>。

对 *Tgif1* 基因沉默组和对照组 MuSCs 的 DEGs 进行 KEGG 信号通路富集分析发现, cAMP 信号通路、PI3k-Akt 信号通路和钙信号通路等肌生成相关通路显著富集。研究证实, 儿茶酚胺<sup>[38]</sup> 或前列腺素 E1<sup>[39]</sup> 会刺激细胞内 cAMP 的产生, 从而促进原代鸡肌母细胞的融合; 在脊椎动物的肌肉发育过程中, cAMP-PKA 动态调节环磷腺苷效应元件结合蛋白 (Creb) 依赖性转录。Chen 等<sup>[40]</sup> 通过一系列试验表明, 缺乏 Creb 的小鼠胚胎体节较小, 成肌决定因子 Pax3 (Paired Box 3) 和 *Myf5* 的表达量大幅减少, 证明了 cAMP 信号通路对哺乳动物肌肉发育至关重要。在骨骼肌细胞之前的研究中证实, Akt 会通过直接磷酸化 p300, 增强 *Myod1* 转录活性, 并促进 *MyoG* 表达<sup>[41-43]</sup>, 在本研究中, 通过 RNA-seq 分析发现, 在猪 MuSCs 中沉默 *Tgif1* 基因后, *Myod1* 基因表达量下调, 由此推测, *Tgif1* 基因通过 PI3k-Akt/Myod1 调节骨骼肌分化。研究也发现 PI3K-Akt 信号激活的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 (mTORC1) 是 MuSCs 从  $G_0$  过渡到  $G_{Alert}$  状态的必要条件和充分条件。 $G_{Alert}$  是一种介于静止  $G_0$  和周期性  $G_1$  之间的中间状态,  $G_{Alert}$  状态的 MuSCs 能够在受到损伤时迅速被激活<sup>[44]</sup>, 另有研究发现, PI3K-Akt-mTORC1 信号通路对于通过激活 *Jun* 转录来退出静止和细胞周期重入至关重要<sup>[45]</sup>。同样, 钙和钙调蛋白 (CaM) 参与了  $G_0$  期的重返、 $G_1$  检查点、 $G_{1/S}$  和  $G_{2/M}$  过渡、M 期的进展以及有丝分裂的退出<sup>[46]</sup>, 钙通道耗竭可诱导细胞周期停滞在  $G_0/G_1$  状态<sup>[47]</sup>。在分化的初始阶段, 钙会激活

几种肌生成转录因子, 如 MyoG 和肌细胞增强因子-2 (MEF2), 然后触发肌肉特异基因的表达<sup>[48]</sup>。上述研究证明了 PI3k-Akt 信号通路和钙信号通路对调节 MuSCs 细胞周期进程从而调控 MuSCs 分化能力的重要作用。综上所述, *Tgif1* 不仅能够直接调控细胞分化的基因如 *Myod1*、*Chrna1* 和 *Egr1* 作用从而正调控猪 MuSCs 分化, 并且可能通过作用与潜在的下流基因 *Dusp1* 以及 PI3K-Akt 信号通路和钙信号通路调控细胞周期从而影响骨骼肌分化。

本研究首次证明了 *Tgif1* 是一个骨骼肌发育的新型调控因子, 其在骨骼肌组织中呈现高表达模式, 体外试验表明 *Tgif1* 基因主要在肌管生成过程中发挥调控作用。另外, 发现了一系列 *Tgif1* 基因的潜在下游靶基因, 为后期深入开展 *Tgif1* 基因在肌肉生长发育中的分子机制研究提供了理论基础。

## 参考文献:

- [1] WANG S, SUN C, LI J, et al. Roles of RNA methylation by means of N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) in human cancers [J]. *Cancer Lett*, 2017, 408: 112-120.
- [2] CHAL J, POURQUIÉ O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Development*, 2017, 144 (12): 2104-2122.
- [3] COLLINS C A, OLSEN I, ZAMMIT P S, et al. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche [J]. *Cell*, 2005, 122 (2): 289-301.
- [4] 卢佳伟, 赵鹏, 刘媛, 等. 热应激对羊成肌细胞部分 miRNA 的影响及其生物信息学分析与靶基因预测 [J]. *南京农业大学学报*, 2024, 47 (1): 193-204.
- [5] DUMONT N A, RUDNICKI M A. Characterizing satellite cells and myogenic progenitors during skeletal muscle regeneration [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1560: 179-188.
- [6] SCHMIDT M, SCHÜLER S C, HÜTTNER S S, et al. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76 (13): 2559-2570.
- [7] WESKAMP K, OLWIN B B, PARKER R. Post-transcriptional regulation in skeletal muscle development, repair, and disease [J]. *Trends Mol Med*, 2021, 27 (5): 469-481.
- [8] PERRY R L, RUDNICK M A. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation [J]. *Front Biosci*, 2000, 5: D750-D767.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] EGERMAN M A, GLASS D J. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014, 49 (1): 59-68.
- [12] MINETTI G C, FEIGE J N, ROSENSTIEL A, et al. Gαi2 signaling promotes skeletal muscle hypertrophy, myoblast differentiation, and muscle regeneration [J]. *Sci Signal*, 2011, 4 (201): ra80.
- [13] STEWART R, FLECHNER L, MONTMINY M, et al. CREB is activated by muscle injury and promotes muscle regeneration [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (9): e24714.
- [14] RYALL J G, SCHERTZER J D, ALABAKIS T M, et al. Intramuscular β2-agonist administration enhances early regeneration and functional repair in rat skeletal muscle after myotoxic injury [J]. *J Appl Physiol*, 2008, 105 (1): 165-172.
- [15] MACORITTO M, NGUYEN-YAMAMOTO L, HUANG D C, et al. Phosphorylation of the human retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs coactivator (s) recruitment and induces hormone resistance to multiple ligands [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (8): 4943-4956.
- [16] KHILJI S, HAMED M, CHEN J, et al. Dissecting myogenin-mediated retinoid X receptor signaling in myogenic differentiation [J]. *Commun Biol*, 2020, 3 (1): 315.
- [17] MAY M L, MACH H, LACROIX N, et al. Contribution of retinoid X receptor signaling to the specification of skeletal muscle lineage [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (30): 26806-26812.
- [18] ZHU G H, HUANG J, BI Y, et al. Activation of RXR and RAR signaling promotes myogenic differentiation of myoblastic C2C12 cells [J]. *Differentiation*, 2009, 78 (4): 195-204.
- [19] KONDOH K, SUNADOME K, NISHIDA E. Notch signaling suppresses p38 MAPK activity via induction of MKP-1 in myogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (5): 3058-3065.
- [20] MIAO W, MA Z, TANG Z, et al. Integrative ATAC-seq and RNA-seq analysis of the longissimus muscle of Luchuan and duroc pigs [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 742672.
- [21] BÜRLIN T R. Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS PBC KNOX Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25 (21): 4173-4180.
- [22] CHANG Y H, TSENG Y H, WANG J M, et al. TG-interacting factor 1 regulates mitotic clonal expansion during adipocyte differentiation [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2024, 1869 (5): 159492.
- [23] BOLAMPERTI S, SAITO H, HEERDMANN S, et al. *Tgif1*-deficiency impairs cytoskeletal architecture in osteoblasts by activating PAK3 signaling [J]. *Elife*, 2024, 13: RP94265.
- [24] DING H, LIN Y, ZHANG T, et al. Transcriptome analysis of differentially expressed mRNA related to pigeon muscle development [J]. *Animals*, 2021, 11 (8): 2311.
- [25] NI M, HE J, LI T, et al. Establishment and characterization of SV40 T-antigen immortalized porcine muscle satellite cell [J]. *Cells*, 2024, 13 (8): 703.
- [26] XIAO W, JIANG N, JI Z, et al. Single-cell RNA sequencing reveals the cellular landscape of longissimus dorsi in a newborn suhai pig [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (2): 1204.
- [27] TENG J, GAO Y, YIN H, et al. A compendium of genetic regulatory effects across pig tissues [J]. *Nat Genet*, 2024, 56 (1):

- 112–123.
- [28] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402–408.
- [29] MA Y, JIANG X D, ZHANG D W, et al. Molecular characterization and effects of the TGIF1 gene on proliferation and steroidogenesis in yak (*Bos grunniens*) granulosa cells [J]. *Theriogenology*, 2023, 211: 224–231.
- [30] MENG L, LU Y, WANG X, et al. NPRC deletion attenuates cardiac fibrosis in diabetic mice by activating PKA/PKG and inhibiting TGF- $\beta$ 1/Smad pathways [J]. *Sci Adv*, 2023, 9 (31): eadd4222.
- [31] YU B, CAI Z, LIU J, et al. Transcriptome and co-expression network analysis reveals the molecular mechanism of inosine monophosphate-specific deposition in chicken muscle [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1199311.
- [32] 刘雪云. 阻血诱导大鼠骨骼肌肥大的基因组学分析研究 (免疫组化部分) [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2015.
- [33] HE F, WU Z, WANG Y, et al. Downregulation of tripartite motif protein 11 attenuates cardiomyocyte apoptosis after ischemia/reperfusion injury via DUSP1-JNK1/2 [J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46 (1): 148–157.
- [34] BLUMER S, FANG L, CHEN W C, et al. IPF-fibroblast Erk1/2 activity is independent from microRNA cluster 17–92 but can be inhibited by treprostinil through DUSP1 [J]. *Cells*, 2021, 10 (11): 2836.
- [35] SHI L, ZHA H, PAN Z, et al. DUSP1 protects against ischemic acute kidney injury through stabilizing mtDNA via interaction with JNK [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14 (11): 724.
- [36] PURI P L, AVANTAGGIATI M L, BURGIO V L, et al. Reactive oxygen intermediates (ROIs) are involved in the intracellular transduction of angiotensin II signal in C2C12 cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 752 (1): 394–405.
- [37] CAI S, HU B, WANG X, et al. Integrative single-cell RNA-seq and ATAC-seq analysis of myogenic differentiation in pig [J]. *BMC Biol*, 2023, 21 (1): 19.
- [38] CURTIS D H, ZALIN R J. Regulation of muscle differentiation: stimulation of myoblast fusion *in vitro* by catecholamines [J]. *Science*, 1981, 214 (4527): 1355–1357.
- [39] ZALIN R J, LEAVER R. The effect of a transient increase in intracellular cyclic AMP upon muscle cell fusion [J]. *FEBS Lett*, 1975, 53 (1): 33–36.
- [40] CHEN A E, GINTY D D, FAN C M. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins [J]. *Nature*, 2005, 433 (7023): 317–322.
- [41] WILSON E M, ROTWEIN P. Control of MyoD function during initiation of muscle differentiation by an autocrine signaling pathway activated by insulin-like growth factor-II [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (40): 29962–29971.
- [42] WILSON E M, ROTWEIN P. Selective control of skeletal muscle differentiation by Akt1 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (8): 5106–5110.
- [43] SERRA C, PALACIOS D, MOZZETTA C, et al. Functional interdependence at the chromatin level between the MKK6/p38 and IGF1/PI3K/AKT pathways during muscle differentiation [J]. *Mol Cell*, 2007, 28 (2): 200–213.
- [44] RODGERS J T, KING K Y, BRETT J O, et al. mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from  $G_0$  to  $G_{Alert}$  [J]. *Nature*, 2014, 510 (7505): 393–396.
- [45] WANG G, ZHU H, SITU C, et al. p110 $\alpha$  of PI3K is necessary and sufficient for quiescence exit in adult muscle satellite cells [J]. *EMBO J*, 2018, 37 (8): e98239.
- [46] 周磊, 李东旭, 冒魏佳, 等. Cas9 和 PE 介导湖羊骨骼肌卫星细胞 MSTN 基因敲除的研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2025, 48 (2): 419–426.
- [47] TAJEDDINE N, GAILLY P. TRPC1 protein channel is major regulator of epidermal growth factor receptor signaling [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (20): 16146–16157.
- [48] MOLKENTIN J D, OLSON E N. Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (18): 9366–9373.