



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.

LU Jiawei,ZHAO Peng,LIU Yuan,et al. Effect of heat stress on partial miRNA in myoblasts and bioinformatics analysis and target gene prediction of miRNA[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(1):193-204.

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

卢佳伟¹,赵鹏¹,刘媛¹,魏宗友²,李惠侠^{1*}

(1.南京农业大学动物科技学院,江苏 南京 210095;2.太仓市农业农村科技服务中心,江苏 太仓 215400)

摘要:[目的]本文旨在探究热应激对羊成肌细胞部分 miRNA 的影响,并对 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p 和 miR-30a-5p 进行生物信息学分析与靶基因预测,揭示热应激下 miRNA 影响骨骼肌发育的调控机制。[方法]通过 RT-qPCR 技术研究热应激对羊成肌细胞 miRNA 表达量的影响;利用 miRBase 数据库获取不同物种中 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p 和 miR-30a-5p 的前体序列和成熟序列,并利用 MEGA X 软件构建系统进化树进行相似性分析;通过 TargetScan、miRDB、RNA22、miRWalk 对上述 miRNA 进行靶基因预测,使用 DAVID 对预测出的共同靶基因进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析,最后进行 miRNA、共同靶基因与 KEGG 通路的关联分析。[结果]热应激显著下调羊成肌细胞在增殖阶段与分化阶段 miRNA 的表达。miR-23a、miR-24、miR-27a 和 miR-30a 在不同物种间的保守性较高,除了牛的 miR-24 以外,成熟序列基本相同,种子序列完全一致。预测出的共同靶基因主要富集在细胞增殖、分化、周期、凋亡、迁移等 GO 条目,以及 mTOR、TGFβ、MAPK、Ras、ErbB、FoxO 和 PI3K-Akt 等 KEGG 通路。关联分析表明 miR-24 和 miR-27a-3p 可能靶向 *NLK* 和 *TAOK1* 以参与 MAPK 和 FoxO 信号通路来调控骨骼肌的发育。[结论]miR-23a、miR-24、miR-27a 和 miR-30a 在不同物种中保守性较高,热应激下调羊成肌细胞部分 miRNA 的表达,可能影响骨骼肌的发育。

关键词:热应激;成肌细胞;miRNA;生物信息学;靶基因

中图分类号:S852.6

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)01-0193-12

Effect of heat stress on partial miRNA in myoblasts and bioinformatics analysis and target gene prediction of miRNA

LU Jiawei¹,ZHAO Peng¹,LIU Yuan¹,WEI Zongyou²,LI Huixia^{1*}

(1.College of Animal Science and Technology,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China;

2.Taicang Agricultural and Rural Science & Technology Service Center,Taicang 215400,China)

Abstract:[Objectives] This paper aimed to explore the effect of heat stress on partial miRNA in myoblasts, and analyze by bioinformatics and predict the target genes of miR-23a,miR-24,miR-27a-3p and miR-30a-5p,so as to reveal the mechanism of miRNA regulating the development of skeletal muscle under heat stress. [Methods] The expression of miRNA in myoblasts under heat stress was studied by RT-qPCR. The miRBase was used to obtain the precursor sequences and mature sequences of miR-23a,miR-24,miR-27a-3p and miR-30a-5p in different species,then MEGA X software was used to construct the phylogenetic trees for similarity analysis. The target genes of the above miRNA were predicted by TargetScan,miRDB,RNA22 and miRWalk,and the predicted common targets were analyzed by DAVID for GO function and KEGG pathway enrichment. Ultimately,the correlation among miRNA,common target genes and the KEGG pathway was analyzed. [Results] Heat stress significantly decreased the expression of miRNA in myoblasts at the proliferation and differentiation stages. The miR-23a,miR-24,miR-27a and miR-30a showed high conservation among different species,and except for miR-24 of *Bos taurus*,the mature sequences of four miRNA were basically the same,and the seed sequences were completely the same. The predicted common target genes were mainly enriched in the GO items,such as cell proliferation,cell differentiation,cell cycle,cell apoptosis and cell migration,as well as mTOR,TGFβ,MAPK,Ras,ErbB,FoxO,and PI3K-Akt and other KEGG pathways. Additionally,the correlation analysis showed that miR-24 and miR-27a-3p may target *NLK* and *TAOK1* to participate in the MAPK and FoxO signaling pathways to regulate skeletal muscle development. [Conclusions] The miR-23a,miR-24,miR-27a and

收稿日期:2022-10-10

基金项目:国家自然科学基金项目(32172725);江苏现代农业产业技术体系建设专项资金(JATS[2022]145)

*通信作者:李惠侠,教授,主要从事反刍动物生殖生理机制及调控研究,E-mail:lihuixia@njau.edu.cn。

miR-30a were highly conserved in different species and the expression of partial miRNA was down-regulated in myoblasts under heat stress, thereby it might affect the development of skeletal muscle.

Keywords: heat stress; myoblast; miRNA; bioinformatics; target genes

骨骼肌约占机体总体重的 40%~60%,由肌肉纤维(也称为肌纤维或肌细胞)、脂肪组织和相关结缔组织构成,能够维持机体的运动和基础能量代谢^[1]。因此,骨骼肌是动物重要的组织之一。骨骼肌的发育是一个非常复杂且精细的过程,会受到外界环境、遗传特性、基因^[2-3]、短链非编码 RNA (microRNA, miRNA)^[4-5]、长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA)^[6]、环状 RNA (circular RNA, circRNA)^[7-8]、信号通路^[9-10]、转录后修饰的调控^[11-12]。骨骼肌起始于体节干细胞,其分化形成肌肉祖细胞,肌肉祖细胞经过多次的增殖和分裂后,形成成肌细胞^[13]。成肌细胞不断增殖为肌细胞,随后相互融合形成肌管,肌管逐渐汇合形成肌纤维,最终形成骨骼肌^[14]。成肌细胞是肌肉运动和再生的关键组分,其进行增殖和分化,从而融合形成新的肌肉纤维,维持骨骼肌的健康^[15]。

气候和环境条件的变化会导致环境温度的升高,当人类或动物的体温高于其恒温点时,就会出现热应激(heat stress, HS),从而影响生理功能^[16]。严重或者持续的热应激会造成器官损伤甚至是致命的生理功能障碍^[17]。研究发现,持续热应激会抑制小鼠 C2C12 细胞的增殖、分化和迁移,影响肌管的发育^[18]。热应激也会诱导小鼠 C2C12 细胞发生凋亡,通过改变肌源性调节因子 MyoD、myogenin 和 MyHC 的表达扰乱肌管的生成^[19]。持续热应激还会促进鸡成肌细胞的凋亡^[20]。

miRNA 是一种长约 22 个核苷酸、内源性启动的短链非编码 RNA,其广泛表达于动物各种组织和细胞中^[21]。miRNA 通过与靶基因的 3'非翻译区(3'untranslated region, 3'UTR)结合来负调控靶基因的表达,miRNA 还会引导 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结合靶基因的 3'UTR,导致靶基因被降解或其翻译过程被抑制,从而实现基因沉默^[22]。miRNA 能够调控众多细胞过程,如细胞增殖、分化、凋亡和迁移等^[23]。最近,很多研究探明了 miRNA 在骨骼肌发育中的调控作用,如 miR-23a-5p 能够促进 C2C12 成肌细胞的增殖,抑制分化过程^[24];miR-24-3p 可促进 C2C12 细胞的肌发生过程^[25];miR-27a 可促进 C2C12 细胞的增殖和分化^[26];此外,miR-30a-5p 会抑制鸡成肌细胞的增殖,促进分化过程^[27]。由此表明 miRNA 可调控成肌细胞的生长和发育。目前,对热应激下成肌细胞增殖与分化过程的研究主要集中在小鼠 C2C12 细胞上,而在羊等家畜中的研究非常少,热应激对羊成肌细胞 miRNA 影响尚未见报道。因此,本研究以羊成肌细胞 miRNA 为研究对象,利用 RT-qPCR 探究热应激对羊成肌细胞 miRNA 的影响;通过生物信息学方法预测 miRNA 的靶基因,并对共同预测出的靶基因进行 GO 功能与 KEGG 信号通路的富集分析,为进一步探究热应激条件下 miRNA 调控成肌细胞的增殖与分化过程提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验动物

本试验所用成肌细胞分离于健康的 1 月龄山羊(江苏南京六合某羊场)。山羊屠宰后立即采集第 13 胸椎至第 3 腰椎的背最长肌,放入含 5%(体积分数)双抗(青霉素/链霉素)的磷酸盐缓冲液(PBS)中,在 1 h 内运回实验室,分离羊的成肌细胞并进行体外培养,以完成后续试验。

1.2 试验方法

1.2.1 羊成肌细胞的分离与体外培养 采取酶消化法和差速贴壁法分离羊的成肌细胞。具体步骤如下:先将肌肉组织在 75%乙醇中浸泡 10 s,用含 5%双抗的 PBS 清洗 3 次,充分去除其表面的血迹;再将肌肉组织置于无菌平皿中,剔除筋膜和脂肪等组织,用眼科剪将肌肉组织充分剪碎,随后转移至无菌 15 mL 离心管中,加入适量 PBS,吹打混匀,静置 3 min 后弃掉上清液;加入适量含 0.1% I 型胶原酶的 DMEM/F12 (DF12),37 °C 水浴锅消化 1 h,每 5 min 上下颠倒 1 次,然后 12 000 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清液;加入适量 0.25%胰蛋白酶,37 °C 水浴锅消化 15 min,弃上清液;经 70 μm 细胞筛过滤后,12 000 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清液;最后用含 20%(体积分数)胎牛血清、10%(体积分数)马血清和 1%(体积分数)双抗的 DF12 培养基进行重悬,接种于 T25 细胞培养瓶,于 37 °C、5%(体积分数)的 CO₂ 培养箱中培养 2.5 h,再将培养液转移至新的 T25 细胞培养瓶中继续培养 2.5 h,最后移至新的 T25 细胞培养瓶,即得到纯净的羊原代成肌细胞。当细胞长满 80%左右时,进行传代;弃掉原有培养基,PBS 洗涤 1 次,加入 1 mL 提前预热的

0.25%胰蛋白酶,放入 37 °C 培养箱中消化 1 min,加入 1 mL 培养液吹打均匀终止消化,300 g 离心 5 min,弃上清液,加入 1 mL 培养液重悬沉淀,1:2 传至新的细胞培养板。

羊成肌细胞增殖阶段使用生长培养液进行培养,即含 20%胎牛血清、10%马血清和 1%双抗的 DF12,隔天换液;当细胞长满 90%时,换用分化培养液诱导分化,即含 2%马血清和 1%双抗的 DF12,隔天换液,观察肌管的生成情况。

1.2.2 羊成肌细胞的热应激处理 增殖阶段热应激处理:当羊成肌细胞长满 90%时,放入 42 °C、5%的 CO₂ 培养箱中培养 3 h;分化阶段热应激处理:当羊成肌细胞分化出明显的肌管时放入 42 °C、5%的 CO₂ 培养箱中培养 3 h。

1.2.3 免疫荧光鉴定羊成肌细胞 将羊成肌细胞传至 35 mm 细胞培养皿中培养,取诱导分化前后的羊成肌细胞,弃掉培养基,在摇床上用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,加入 1 mL 4%多聚甲醛,4 °C 过夜后弃掉多聚甲醛。在摇床上用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,吸干 PBS。加入 0.5% (体积分数) Triton X-100 (1×PBS 配制) 室温通透 20 min;在摇床上用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,吸干 PBS。用 5%牛血清白蛋白 (BSA) 室温封闭 1 h。分别用 PAX7 (Affinity, AF7584, 1:500)、MYF5 (Affinity, DF3089, 1:500) 和 MYHC (Abcam, Ab11083, 1:500) 一抗 4 °C 孵育过夜,在摇床上用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,吸干 PBS。加入荧光二抗室温避光孵育 1 h,在摇床上用 PBS 清洗 2 次,每次 5 min,吸干 PBS。用 DAPI 染核避光孵育 15 min,滴加荧光淬灭剂后,在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.2.4 细胞总 RNA 的提取与反转录 (RT) 热应激后,采用 Trizol 法提取成肌细胞的总 RNA,参照 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by stem-loop) 反转录试剂盒 (南京诺唯赞) 的说明书,采用茎环法合成 miRNA 的 cDNA。试验过程:吸取 1 μg 细胞总 RNA,加入 2 μL 5×gDNA Wiper Mix,再加入 RNase-free ddH₂O 至 10 μL,吹打混匀,42 °C 反应 2 min,去除基因组的 DNA。反应完成后,加入 1 μL Stem-loop primer (2 μmol·L⁻¹), 2 μL 10×RT Mix, 2 μL HiScript II Enzyme Mix 和 5 μL RNase-free ddH₂O,吹打混匀,进行如下反应:25 °C 5 min,50 °C 15 min,85 °C 5 min,即得到 miRNA 的 cDNA。最后用 RNase-free ddH₂O 稀释 3 倍,-80 °C 保存。

1.2.5 miRNA 的引物设计与实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 依据 Cleys 等^[28] 的研究结果,选择 miR-23a、miR-24、miR-26a-5p、miR-27a-5p、miR-27a-3p、miR-29c-3p、miR-30a-5p、miR-30a-3p、miR-379-5p 和 miR-379-3p 来探讨热应激对 miRNA 的影响。在 miRBase 数据库 (<http://www.mirbase.org/>) 中查找 miRNA 的成熟序列,在上海生工生物工程股份有限公司官网合成各 miRNA 的茎环引物、上游引物与下游引物,随后交由北京擎科生物科技有限公司合成。引物序列见表 1。

表 1 各 miRNA 的 RT-qPCR 引物

Table 1 Sequences of RT-qPCR primers for miRNA

引物 Primers	登录号 Accession number	引物序列 Sequences of primers (5'→3')
U6	XM_018062062.1	F: CTCGCTTCGGCAGCACA R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
miR-23a	MIMAT0036087	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGAAAT F: AAGGTGTATCACATFGCC R: CAGTGCAGGGTCCGAGGT
miR-24	MIMAT0036091	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGTTCCCT F: ACGGAACTGGCTCAGTTCAG R: CAGTGCAGGGTCCGAGGT
miR-26a-5p	MIMAT0036101	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGCCTA F: AAGCTGAGTTCAAGTAATCCAGG R: CAGTGCAGGGTCCGAGGT
miR-27a-5p	MIMAT0036105	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTGCTCA F: ATATTCAGAGGGCTTAGCTGCT R: CAGTGCAGGGTCCGAGGT
miR-27a-3p	MIMAT0036106	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGGAAC F: CTGGCTAGTTCACAGTGGCTA R: CAGTGCAGGGTCCGAGGT
miR-29c-3p	MIMAT0036117	RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAACCAA F: AACACGTGTAGCACCATTTGAA R: CAGTGCAGGGTCCGAGGT

续表 1 Table 1 continued

引物 Primers	登录号 Accession number	引物序列 Sequences of primers(5'→3')
miR-30a-5p	MIMAT0036121	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACAGCTTC F:AGCGAATGTAACATCCTCGAC R:CAGTGCAGGGTCCGAGGT
miR-30a-3p	MIMAT0036122	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACCTGCAA F:ACGTATGCCTTTCAGTCCGAT R:CAGTGCAGGGTCCGAGGT
miR-379-5p	MIMAT0036195	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACCCTACG F:CGACGCTTGGTAGACTATGGA R:CAGTGCAGGGTCCGAGGT
miR-379-3p	MIMAT0036196	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACGTTAGT F:AATCGGCGTATGTAACATGGTC R:CAGTGCAGGGTCCGAGGT

注:F:上游引物 Forward primer;R:下游引物 Reverse primer;RT:茎环引物 Stem-loop primer.

以 cDNA 为模板,参照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒(南京诺唯赞)的说明书,对 miRNA 进行定量分析,采用 20 μL 体系:10 μL 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 2 μL cDNA, 0.4 μL 上游引物,0.4 μL 下游引物,7.2 μL RNase-free ddH₂O。RT-qPCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。以 *U6* 为内参基因,每组 3 个重复。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ 法对 miRNA 的相对表达量进行定量分析。

1.2.6 miRNA 的序列分析 在 miRBase 数据库中查找山羊、人、绵羊、小鼠、大鼠、牛、鸡、野猪和家犬的 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p、miR-30a-5p 的成熟序列,并对不同物种 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p、miR-30a-5p 的成熟序列和种子序列进行分析,比较各 miRNA 的保守性。

1.2.7 miRNA 系统进化树的构建 通过 MEGA X 软件对 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p、miR-30a-5p 的前体序列进行比对,计算各模型组合的贝叶斯信息准则分数(Bayesian information criterion, BIC),选择 BIC 最低的组合。miR-23a 选用 Jukes-Cantor 模型,miR-24 和 miR-27a 选用 Kimura 2-Parameter 模型和 Gamma 分布,miR-30a 选用 Kimura 2-Parameter 模型,分别构建 miR-23a、miR-24、miR-27a 和 miR-30a 的系统进化树。

1.2.8 miRNA 的靶基因预测及功能分析 利用 4 个在线网站 TargetScan 8.0 (https://www.targetscan.org/vert_80/)、miRDB (<https://www.mirdb.org/>)、miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de>) 和 RNA22 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/>) 对 hsa-miR-23a、hsa-miR-24、hsa-miR-27a-3p 和 hsa-miR-30a-5p 的靶基因进行预测。

使用 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) 对预测出的共同靶基因进行 GO (gene ontology) 功能分析和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 信号通路富集分析,只保留 $P < 0.05$ 的条目,并利用联川生物 OmicStudio 云工具绘制 GO 富集柱状图和因子图以及 KEGG 富集柱状图和因子图。

1.3 数据分析

试验结果用平均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm SE$)表示,使用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差(ANOVA)分析,并用 Duncan's 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 羊成肌细胞增殖与分化阶段的判定

通过免疫荧光染色检测了成肌细胞增殖标志基因和分化标志基因的蛋白表达。如图 1 所示:成肌细胞增殖标志蛋白 PAX7 和 MYF5 在肌卫星细胞中表达,成肌细胞分化标志蛋白 MYHC 在分化后的细胞中呈阳性表达,并且能看到明显分化的肌管。以上结果表明该细胞为羊的成肌细胞,分别处于增殖阶段与分化阶段。

2.2 热应激对羊成肌细胞 miRNA 的影响

如图 2-A 所示:热应激后,羊成肌细胞增殖阶段 miR-23a、miR-26a-5p、miR-29c-3p、miR-30a-5p、miR-30a-3p 和 miR-379-5p 的相对表达量显著降低($P < 0.05$),miR-24、miR-27a-5p、miR-379-3p($P < 0.01$)和 miR-27a-3p($P < 0.001$)的相对表达量极显著降低。如图 2-B 所示:热应激后,羊成肌细胞分化时期 miR-23a、miR-26a-5p、miR-27a-3p 和 miR-379-5p 的相对表达量显著降低($P < 0.05$),miR-24 和 miR-30a-5p 相对表达

量极显著降低($P<0.01$)。上述结果说明热应激会影响羊成肌细胞部分 miRNA 的表达。

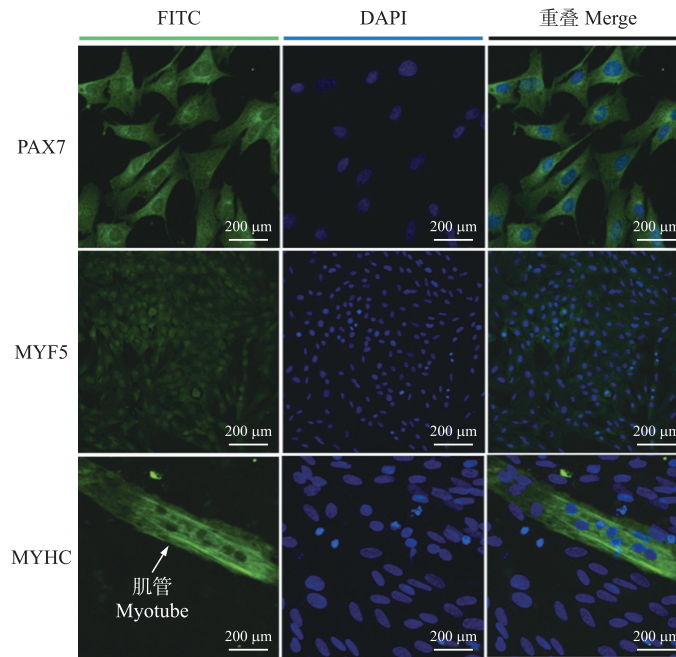


图 1 羊成肌细胞标志蛋白的免疫荧光检测

Fig. 1 Immunofluorescence detection for the marker proteins of the myoblasts

PAX7: 配对盒转录因子 7 Paired box 7; MYF5: 成肌细胞决定蛋白 5 Myogenic differentiation 5; MYHC: 肌球蛋白重链 Myosin heavy chain; FITC: 荧光素 5-异硫氰酸酯 Fluorescein isothiocyanate; DAPI: 4',6-二氨基-2-苯基吡啶 4',6-diamidino-2-phenylindole.

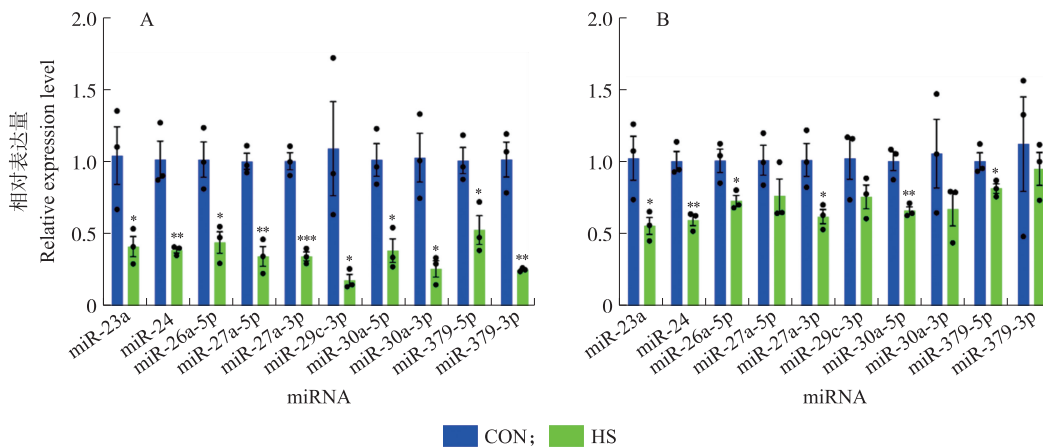


图 2 RT-qPCR 检测热应激下羊成肌细胞 miRNA 的相对表达量

Fig. 2 Relative expression levels of miRNA by RT-qPCR in myoblasts under heat stress

A. 增殖阶段 Proliferation stage; B. 分化阶段 Differentiation stage. 圆点表示每个数值。The dots indicate each value.

CON: 对照组 Control group; HS: 热应激组 Heat-stressed group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

2.3 miR-23a、miR-24、miR-27a 和 miR-30a 的序列分析

根据热应激下羊成肌细胞 miRNA 的 RT-qPCR 结果,我们选择了 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p 和 miR-30a-5p 进行后续的生物信息学分析以及靶基因预测。对不同物种 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p 和 miR-30a-5p 的成熟序列进行比对,结果(表 2)发现,miR-23a 在不同物种的成熟序列基本相同,同源性很高,且序列长度基本相同,均为 19~22 nt,其中有 19 个碱基保守,即第 1~19 位碱基,并且不同物种的 miR-23a 的种子序列完全一致(UCACAUU),仅 3' 端末尾个别碱基存在不同程度的缺失。表 3 展示了不同物种 miR-24 的成熟序列,从表中发现除了牛的成熟序列外,其余物种 miR-24 的成熟序列基本相同,序列长度均为 20~23 nt,其中有 20 个碱基保守,即第 1~20 位碱基,并且这些物种 miR-24 的种子序列完全一致(GGCUCAG),也是 3' 端末尾个别碱基存在缺失情况。如表 4 所示:miR-27a-3p 在不同物种中的成熟序列也基本相同,同源性很高,且序列长度基本相同,均为 20~21 nt,其中有 20 个碱基保守,即第 1~20 位碱

基,并且不同物种的 miR-27a-3p 的种子序列完全一致(UCACAGU),只是 3' 端末尾 C 碱基存在缺失情况。表 5 展示了不同物种 miR-30a-5p 的成熟序列,从表中发现不同物种 miR-30a-5p 的成熟序列基本相同,序列长度均为 22~24 nt,其中有 22 个碱基保守,即第 1~22 位碱基,并且这些物种 miR-30a-5p 的种子序列完全一致(GUAAACA),也是 3' 端末尾个别碱基存在缺失情况。由此说明 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p 和 miR-30a-5p 具有较高的保守性。

表 2 不同物种 miR-23a 的序列信息

Table 2 Information on miR-23a sequences in different species

miRNA	登录号 Accession number	物种名称 Names of species	成熟序列 Mature sequences(5'→3')
chi-miR-23a	MIMAT0036087	山羊 <i>Capra hircus</i>	<u>AUCACAUU</u> GCCAGGGAUUUCC
hsa-miR-23a	MIMAT0000078	人 <i>Homo sapiens</i>	<u>AUCACAUU</u> GCCAGGGAUUUCC
oar-miR-23a	MIMAT0000532	绵羊 <i>Ovis aries</i>	<u>AUCACAUU</u> GCCAGGGAUUUCCA
mmu-miR-23a	MIMAT0030048	小鼠 <i>Mus musculus</i>	<u>AUCACAUU</u> GCCAGGGAUUUCC
rno-miR-23a	MIMAT0000792	大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	<u>AUCACAUU</u> GCCAGGGAUUUCC
bta-miR-23a	MIMAT0003827	牛 <i>Bos taurus</i>	<u>AUCACAUU</u> GCCAGGGAUUUCCA
ssc-miR-23a	MIMAT0002133	野猪 <i>Sus scrofa</i>	<u>AUCACAUU</u> GCCAGGGAUUUCC
cfa-miR-23a	MIMAT0006640	家犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	<u>AUCACAUU</u> GCCAGGGAUUU

注:下划线表示 miRNA 的种子序列。下同。

Note: The underlines indicate the seed sequences of miRNA. The same as follows.

表 3 不同物种 miR-24 的序列信息

Table 3 Information on miR-24 sequences in different species

miRNA	登录号 Accession number	物种名称 Names of species	成熟序列 Mature sequences(5'→3')
chi-miR-24	MIMAT0036091	山羊 <i>Capra hircus</i>	<u>UGGCUCAGU</u> UACAGCAGGAAC
hsa-miR-24	MIMAT0000080	人 <i>Homo sapiens</i>	<u>UGGCUCAGU</u> UACAGCAGGAACAG
mmu-miR-24	MIMAT0000219	小鼠 <i>Mus musculus</i>	<u>UGGCUCAGU</u> UACAGCAGGAACAG
rno-miR-24	MIMAT0000794	大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	<u>UGGCUCAGU</u> UACAGCAGGAACAG
ssc-miR-24	MIMAT0002143	野猪 <i>Sus scrofa</i>	<u>UGGCUCAGU</u> UACAGCAGGAACAG
cfa-miR-24	MIMAT0006614	家犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	<u>UGGCUCAGU</u> UACAGCAGGAACAGG
gga-miR-24	MIMAT0001188	鸡 <i>Gallus gallus</i>	<u>UGGCUCAGU</u> UACAGCAGGAACAG
bta-miR-24	MIMAT0009250	牛 <i>Bos taurus</i>	<u>GUGCCUACU</u> GAGCUGAUUACAGU

表 4 不同物种 miR-27a-3p 的序列信息

Table 4 Information on miR-27a-3p sequences in different species

miRNA	登录号 Accession number	物种名称 Names of species	成熟序列 Mature sequences(5'→3')
chi-miR-27a-3p	MIMAT0036106	山羊 <i>Capra hircus</i>	<u>UUCACAGUGGCU</u> AAGUCCG
hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	人 <i>Homo sapiens</i>	<u>UUCACAGUGGCU</u> AAGUCCGC
oar-miR-27a-3p	MIMAT0030053	绵羊 <i>Ovis aries</i>	<u>UUCACAGUGGCU</u> AAGUCCGC
mmu-miR-27a-3p	MIMAT0030053	小鼠 <i>Mus musculus</i>	<u>UUCACAGUGGCU</u> AAGUCCGC
rno-miR-27a-3p	MIMAT0000799	大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	<u>UUCACAGUGGCU</u> AAGUCCGC
bta-miR-27a-3p	MIMAT0003532	牛 <i>Bos taurus</i>	<u>UUCACAGUGGCU</u> AAGUCCG
ssc-miR-27a-3p	MIMAT0002148	野猪 <i>Sus scrofa</i>	<u>UUCACAGUGGCU</u> AAGUCCGC
cfa-miR-27a-3p	MIMAT0006641	家犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	<u>UUCACAGUGGCU</u> AAGUCCG

表 5 不同物种 miR-30a-5p 的序列信息

Table 5 Information on miR-30a-5p sequences in different species

miRNA	登录号 Accession number	物种名称 Names of species	成熟序列 Mature sequences(5'→3')
chi-miR-30a-5p	MIMAT0036121	山羊 <i>Capra hircus</i>	<u>UGUAAACA</u> UCCUCGACUGGAAGCU
hsa-miR-30a-5p	MIMAT0000087	人 <i>Homo sapiens</i>	<u>UGUAAACA</u> UCCUCGACUGGAAG
oar-miR-30a-5p	MIMAT0030055	绵羊 <i>Ovis aries</i>	<u>UGUAAACA</u> UCCUCGACUGGAAG
mmu-miR-30a-5p	MIMAT0000128	小鼠 <i>Mus musculus</i>	<u>UGUAAACA</u> UCCUCGACUGGAAGC
rno-miR-30a-5p	MIMAT0000808	大鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	<u>UGUAAACA</u> UCCUCGACUGGAAG
gga-miR-30a-5p	MIMAT0001135	鸡 <i>Gallus gallus</i>	<u>UGUAAACA</u> UCCUCGACUGGAAG
bta-miR-30a-5p	MIMAT0003841	牛 <i>Bos taurus</i>	<u>UGUAAACA</u> UCCUCGACUGGAAGCU
ssc-miR-30a-5p	MIMAT0010193	野猪 <i>Sus scrofa</i>	<u>UGUAAACA</u> UCCUCGACUGGAAG
cfa-miR-30a-5p	MIMAT0006604	家犬 <i>Canis lupus familiaris</i>	<u>UGUAAACA</u> UCCUCGACUGGAAG

2.4 miR-23a、miR-24、miR-27a 和 miR-30a 的系统进化树

利用 MEGA X 软件对 miR-23a、miR-24、miR-27a 和 miR-30a 在山羊、人、绵羊、小鼠、大鼠、鸡、牛、野猪和家犬等物种的前体序列进行比对分析,构建系统进化树,发现 miR-23a、miR-24、miR-27a 和 miR-30a 在进化中保守性较高,成熟序列基本相同(图 3)。

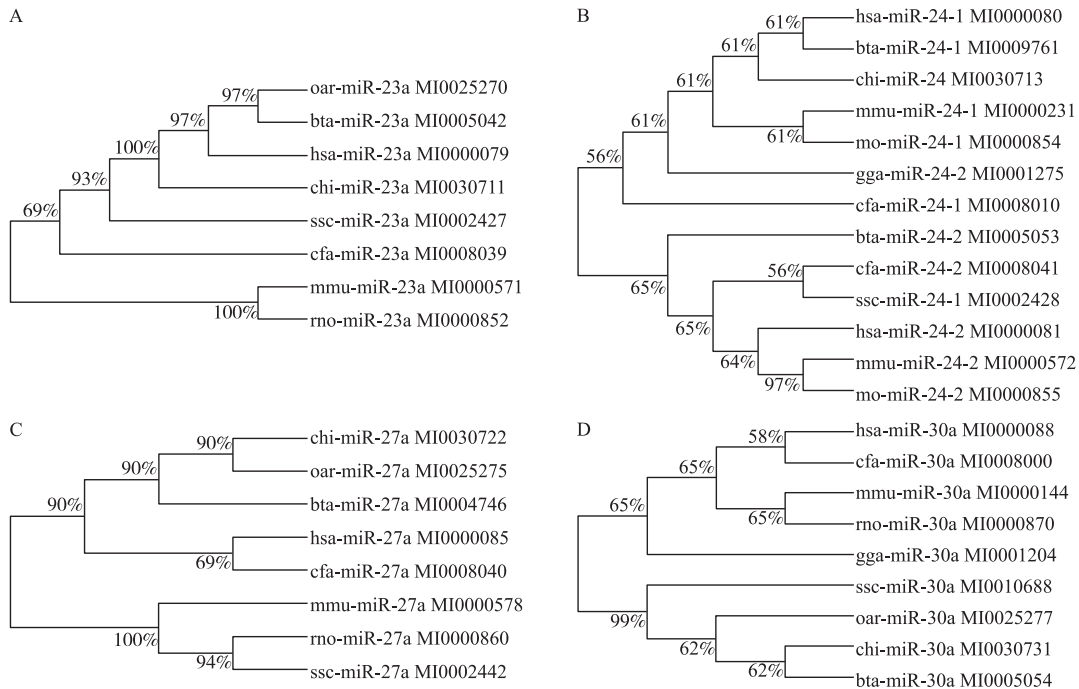


图 3 miR-23a(A)、miR-24(B)、miR-27a(C)和 miR-30a(D)的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic trees of miR-23a(A), miR-24(B), miR-27a(C) and miR-30a(D)

oar: 绵羊 *Ovis aries*; bta: 牛 *Bos taurus*; hsa: 人 *Homo sapiens*; chi: 山羊 *Capra hircus*; ssc: 野猪 *Sus scrofa*; cfa: 家犬 *Canis lupus familiaris*; mmu: 小鼠 *Mus musculus*; rno: 大鼠 *Rattus norvegicus*; gga: 鸡 *Gallus gallus*.

2.5 hsa-miR-23a、hsa-miR-24、hsa-miR-27a-3p 和 hsa-miR-30a-5p 的靶基因预测

通过 4 个在线网站工具 TargetScan、miRDB、RNA22 和 miRWalk 对 hsa-miR-23a、hsa-miR-24、hsa-miR-27a-3p 和 hsa-miR-30a-5p 进行靶基因的预测,分别预测到 141、317、383 和 11 个共同靶基因(图 4)。

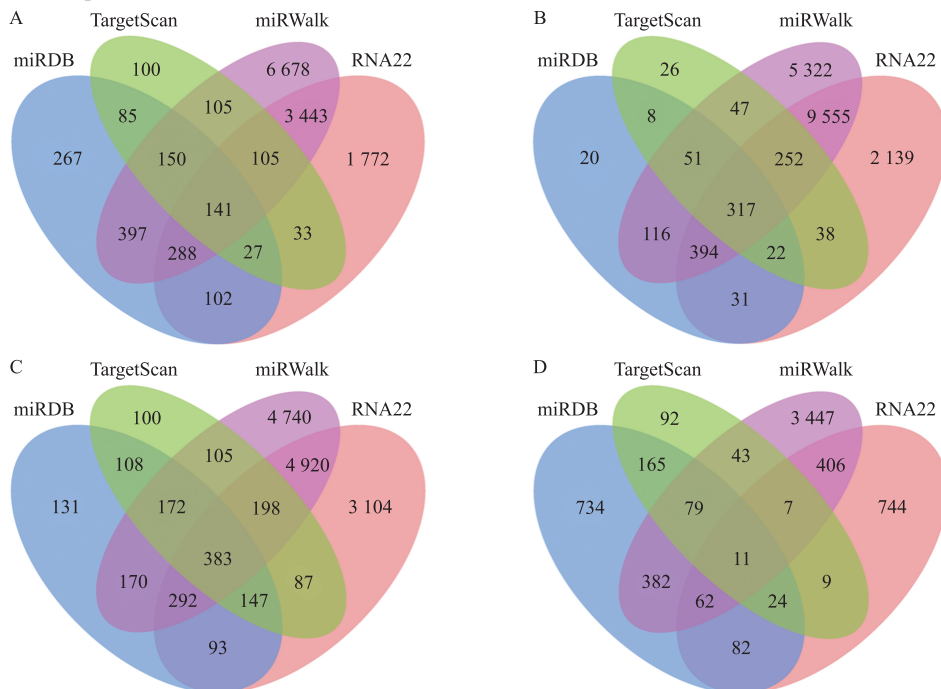


图 4 hsa-miR-23a(A)、hsa-miR-24(B)、hsa-miR-27a-3p(C)和 hsa-miR-30a-5p(D)的靶基因预测

Fig. 4 Target gene prediction of hsa-miR-23a(A), hsa-miR-24(B), hsa-miR-27a-3p(C) and hsa-miR-30a-5p(D)

2.6 hsa-miR-23a、hsa-miR-24、hsa-miR-27a-3p 和 hsa-miR-30a-5p 的靶基因 GO 功能分析

分别对预测出的 hsa-miR-23a、hsa-miR-24、hsa-miR-27a-3p 和 hsa-miR-30a-5p 的靶基因进行 GO 功能分析,结果如图 5 所示。141 个 hsa-miR-23a 靶基因显著富集在 51 个 GO terms ($P < 0.05$), 其中生物过程 29 个、细胞组分 11 个、分子功能 11 个(图 5-A), 并且主要富集在细胞增殖的负向调控、细胞周期和细胞

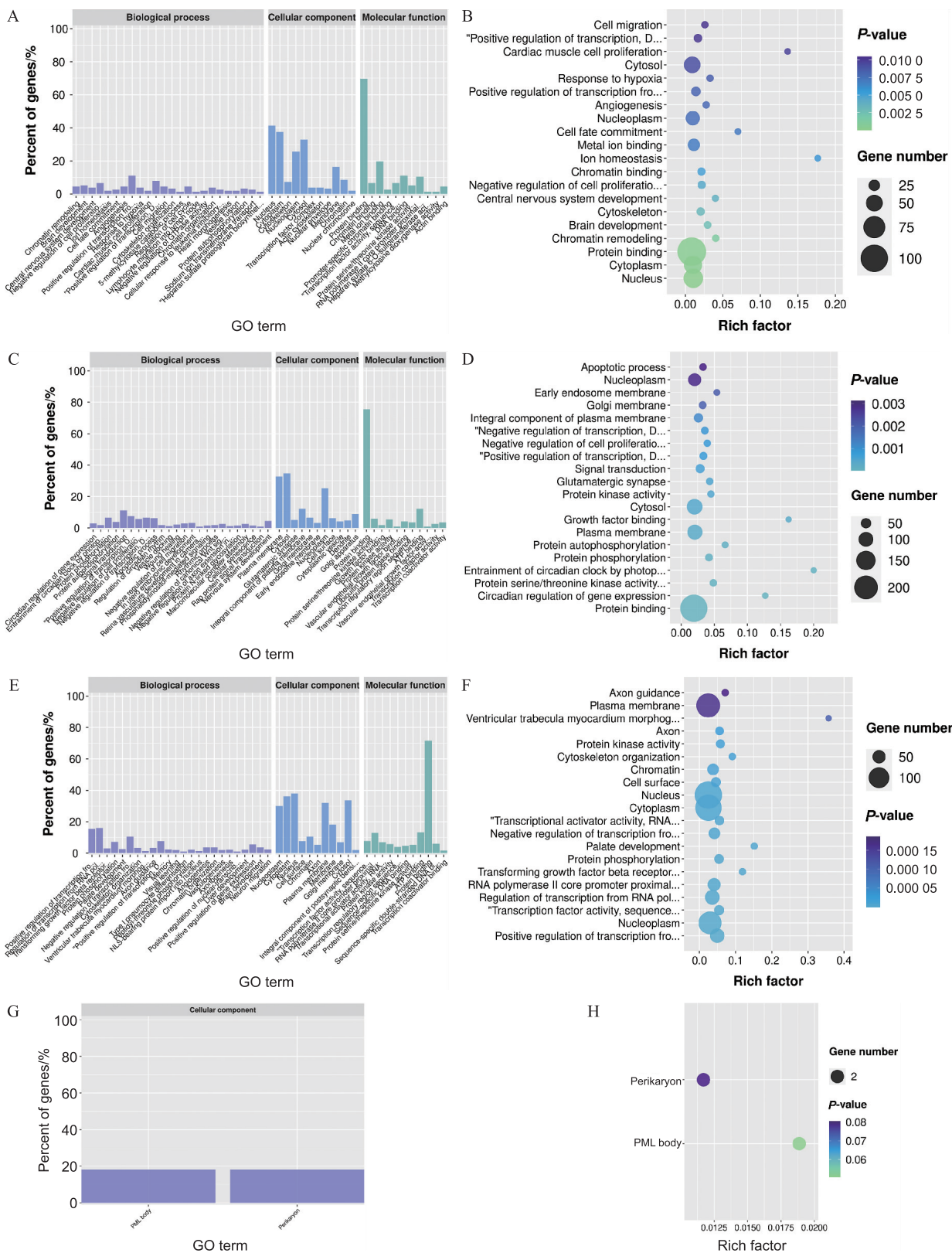


图 5 hsa-miR-23a、hsa-miR-24、hsa-miR-27a-3p 和 hsa-miR-30a-5p 的靶基因 GO 功能分析
Fig. 5 GO function analysis of target genes of hsa-miR-23a, hsa-miR-24, hsa-miR-27a-3p and hsa-miR-30a-5p
A, B. hsa-miR-23a; C, D. hsa-miR-24; E, F. hsa-miR-27a-3p; G, H. hsa-miR-30a-5p.

迁移等过程(图 5-B)。317 个 hsa-miR-24 靶基因显著富集在 123 个 GO terms ($P < 0.05$), 其中生物过程 73 个、细胞组分 28 个、分子功能 22 个(图 5-C), 并且主要富集在细胞增殖的负向调控、细胞凋亡和迁移等(图 5-D)。383 个 hsa-miR-27a-3p 靶基因显著富集在 185 个 GO terms ($P < 0.05$), 其中生物过程 110 个、细胞组分 37 个、分子功能 38 个(图 5-E), 并且主要富集在细胞增殖、周期、迁移和骨骼肌细胞分化等(图 5-F)。11 个 hsa-miR-30a-5p 靶基因富集在 2 个 GO terms ($P < 0.10$, 图 5-H), 即细胞组分 2 个(图 5-G)。GO 功能分析结果提示 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p 和 miR-30a-5p 可能参与调控成肌细胞的增殖、分化、周期、凋亡、迁移等过程, 进而调控骨骼肌的发育。

2.7 hsa-miR-23a、hsa-miR-24、hsa-miR-27a-3p 和 hsa-miR-30a-5p 的靶基因 KEGG 通路富集分析

KEGG 通路富集分析结果如图 6 所示。hsa-miR-23a 的靶基因显著富集在 2 条通路上 ($P < 0.05$, 图 6-B)。hsa-miR-24 的靶基因显著富集在 19 条通路 ($P < 0.05$, 图 6-D), 如 MAPK、Ras、ErbB、FoxO 和 PI3K-Akt 信号通路。hsa-miR-27a-3p 的靶基因显著富集在 31 条通路 ($P < 0.05$, 图 6-F), 如 mTOR 信号通路、TGFβ 信

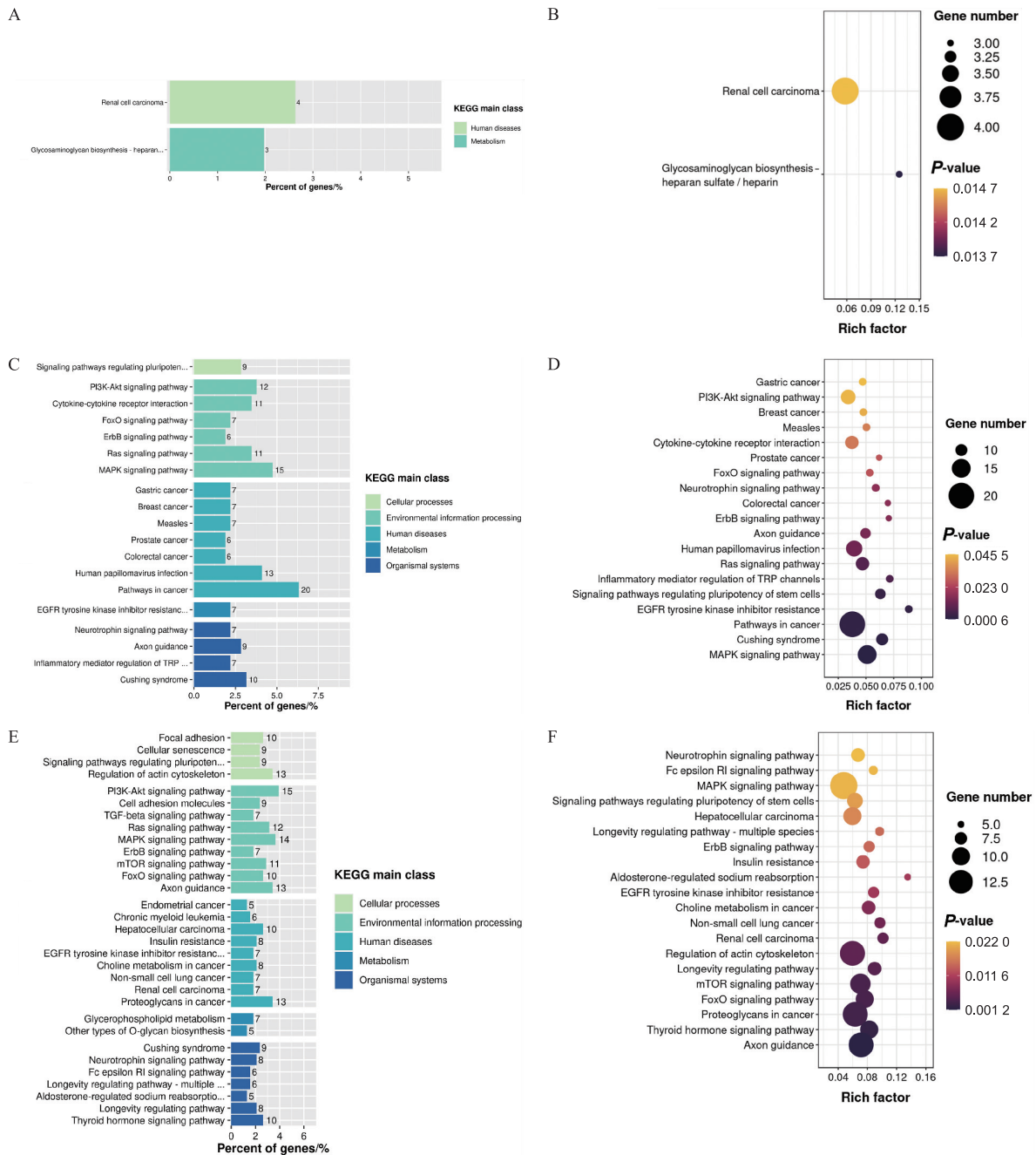


图 6 hsa-miR-23a、hsa-miR-24、hsa-miR-27a-3p 的靶基因 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis of hsa-miR-23a, hsa-miR-24 and hsa-miR-27a-3p

A, B. hsa-miR-23a; C, D. hsa-miR-24; E, F. hsa-miR-27a-3p.

号通路、MAPK 信号通路、Ras 信号通路、ErbB 信号通路、FoxO 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路。hsa-miR-30a-5p 的靶基因无显著富集的通路。以上结果表明 miR-24 和 miR-27a-3p 可能参与调控相关信号通路,从而影响骨骼肌的发育过程。

2.8 hsa-miR-24 和 hsa-miR-27a-3p 与靶基因、KEGG 通路的关联分析

将 hsa-miR-24 和 hsa-miR-27a-3p 与靶基因、KEGG 通路进行关联分析,从结果(图 7)中发现:NLK 与 TAOK1 是 hsa-miR-24 和 hsa-miR-27a-3p 的共同靶基因,可能调控 MAPK 与 FoxO 信号通路。此外,hsa-miR-24 还可能通过调控 PI3KR3 基因的表达,来参与 Ras、ErbB、FoxO、PI3K-Akt 和 mTOR 信号通路。NARS、KRAS 和 SOS1 作为信号通路的交互靶基因,hsa-miR-27a-3p 可能靶向 NARS、KRAS 和 SOS1 调控 MAPK、Ras、ErbB、FoxO、PI3K-Akt 和 mTOR 信号通路。以上结果说明 miR-24 和 miR-27a-3p 可能通过调控靶基因影响相关信号通路,进而调控成肌细胞的增殖、分化、凋亡、迁移等过程,从而影响骨骼肌的发育。miR-23a、miR-24、miR-27a-3p 和 miR-30a-5p 对热应激下成肌细胞增殖、分化、凋亡、迁移等调控作用还需要后续的试验来深入探究。

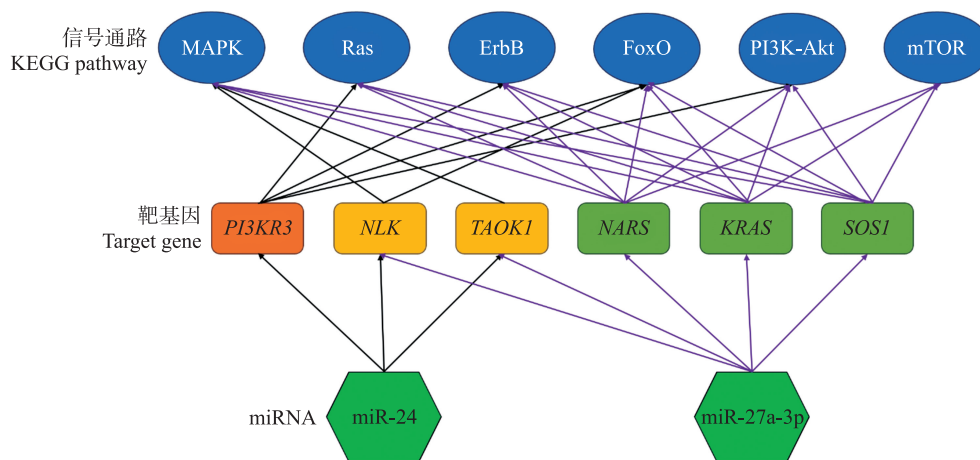


图 7 hsa-miR-24 和 hsa-miR-27a-3p 与靶基因、KEGG 通路的关联分析

Fig. 7 Correlation analysis of hsa-miR-24, hsa-miR-27a-3p with target genes and KEGG pathway

PI3KR3: 磷酸肌醇 3 激酶基因 Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 gene; NLK: Nemo 样激酶基因 Nemo-like kinase gene; TAOK1: TAO 激酶 1 基因 TAO kinase 1 gene; NARS: Asparaginyl-tRNA 合成酶基因 Asparaginyl-tRNA synthetase gene; KRAS: Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 Kirsten rats arcomaviral oncogene homolog; SOS1: 七子基因编码因子基因 Son of sevenless gene encoding factor.

3 讨论

miR-23a 抑制 C2C12 细胞的肌分化^[29], miR-24 促进肌分化^[30], miR-27a 通过靶向肌生长抑制素基因来促进猪成肌细胞的增殖^[31], miR-30a 家族会促进小鼠 C2C12 细胞的分化过程^[32]。然而,目前有关热应激是否会影响 miRNA 表达的研究鲜有报道,热应激如何通过调控 miRNA 的表达来影响成肌细胞的增殖、分化、凋亡等过程也尚不清楚。本研究通过 RT-qPCR 技术发现热应激抑制羊成肌细胞增殖阶段和分化阶段大部分 miRNA 的表达,其中,miR-27a-3p 的表达极显著降低。由此表明热应激会影响羊成肌细胞 miRNA 的表达,进而影响成肌细胞的各种生物学过程。

通过 RT-qPCR 试验结果,本研究筛选了 4 个 miRNA (miR-23a、miR-24、miR-27a-3p 和 miR-30a-5p) 进行后续的生物信息学分析与靶基因预测,并利用 miRBase 数据库查询山羊、人、绵羊、小鼠、大鼠、牛、鸡、野猪和家犬的 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p、miR-30a-5p 的成熟序列,经过序列比对后发现 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p、miR-30a-5p 的成熟序列在各物种中基本相同,种子序列完全一致。miRNA 的种子序列是 miRNA 5' 端第 2~8 个核苷酸,通常与靶基因 3'UTR 完全互补^[33]。本研究结果表明 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p 和 miR-30a-5p 的保守性较强,其在不同物种的进化中发挥着重要作用。生物信息学分析表明山羊、人、绵羊、小鼠、大鼠、牛、鸡、野猪和家犬的 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p、miR-30a-5p 的成熟序列都只有 1 条。通过 miRDB、TargetScan、miRWalk 和 RNA22 预测 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p、miR-30a-5p 的靶基因,分别预测到 141、317、383 和 11 个共同靶基因。因上述数据库没有羊的 miRNA 信息,且羊的这 4 个 miRNA 的成熟序列与人的基本相同,故而以人 miRNA 的成熟序列进行预测。

GO 富集分析结果表明 hsa-miR-23a、hsa-miR-24、hsa-miR-27a-3p 和 hsa-miR-30a-5p 的靶基因主要富集在细胞增殖的负向调控、细胞周期、细胞凋亡、骨骼肌细胞分化和细胞迁移等生物学过程。已有相关研究报道了上述 miRNA 能够调控小鼠 C2C12 细胞的增殖、分化、凋亡和迁移等^[5,10,24]。本研究 KEGG 通路富集分析结果表明靶基因主要富集在 MAPK、Ras、ErbB、FoxO、PI3K-Akt 和 mTOR 信号通路。MAPK 能够调控细胞的增殖和分化等过程,细胞外信号相关激酶(extracellular signal-related kinases, ERK1/2/5)、P38 MAPK 和 Jun 氨基末端激酶(Jun amino-terminal kinases, JNK1/2/3)都属于 MAPK 家族^[34]。PI3K-Akt 也是细胞生长的重要信号因子^[35]。研究表明 P38 MAPK 和 PI3K-Akt 信号通路调控 C2C12 成肌细胞的增殖^[36]。哺乳动物中有 4 个 FOXO 基因,即 *FOXO1*、*FOXO3*、*FOXO4* 和 *FOXO6*,这 4 种转录因子参与多种细胞生物学途径^[37]。Ras(H-、K-或 N-Ras)是许多小 GTP-结合蛋白中的一种,作为分子开关调节活性 GTP-和非活性 GDP 的结合状态。在骨骼肌成肌细胞中,Ras 被认为是一种强烈的肌生成抑制剂,调节骨骼肌祖细胞的迁移。成红细胞癌基因 B(erythroblastic oncogene B, *ErbB*)属于表皮生长因子受体酪氨酸激酶受体家族(epidermal growth factor receptor, EGFR),该家族由 ErbB1(也称为 EGFR)、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 组成,能够调节细胞的生长、凋亡和分化^[38]。由此表明 miR-23a、miR-24、miR-27a-3p 和 miR-30a-5p 可能通过参与 MAPK、Ras、ErbB、FoxO、PI3K-Akt 和 mTOR 信号通路,来调控成肌细胞的增殖、凋亡和分化等过程,从而影响骨骼肌的发育。

本研究发现,hsa-miR-24 和 hsa-miR-27a-3p 可能都会调控 *NLK* 与 *TAOK1* 基因,参与 MAPK、Ras、ErbB、FoxO、PI3K-Akt 和 mTOR 信号通路。研究发现 Ras/ERK/SRF/ELK 信号传导需要 NLK(Nemo-like kinase)通过磷酸化 SRF 和拮抗 SRF/MKL 途径来调节骨骼肌发育,在 *NLK* 敲除小鼠中,肌纤维会肥大生长,增加肌肉和体重,表明 *NLK* 能够调节体内肌肉发育^[39]。*TAOK1*(thousand and one amino-acid kinase 1)是步骤 20p 蛋白激酶家族的一部分,在丝裂原活化蛋白激酶级联的上游发挥重要作用,参与多个细胞生物学过程。*TAOK1* 也称为 *PSK2*、*TAO1* 或 *MARKK*,通过 c-Jun N 末端激酶和 Rho 激酶 1 参与凋亡^[40]。*TAOK1* 在炎症反应和癌症的调节过程中发挥着重要作用,已被广泛证实为癌症药物的潜在靶点^[41]。然而,*TAOK1* 是否调控骨骼肌的发育还不清楚。

综上,本研究首次探明了热应激对羊成肌细胞部分 miRNA 的影响并进行了生物信息学分析,预测了靶基因与调控成肌细胞的生物学功能与信号通路,但是热应激条件下 miRNA 的具体作用机制及其与靶基因的靶向关系还有待于深入研究。

参考文献 References:

- [1] Frontera W R, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function[J]. *Calcified Tissue International*, 2015, 96(3): 183-195.
- [2] Luo W, Chen J H, Li L M, et al. C-Myc inhibits myoblast differentiation and promotes myoblast proliferation and muscle fibre hypertrophy by regulating the expression of its target genes, miRNAs and lincRNAs[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2019, 26(3): 426-442.
- [3] Ma J Y, Ren C F, Yang H, et al. The expression pattern of p32 in sheep muscle and its role in differentiation, cell proliferation, and apoptosis of myoblasts[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(20): 5161.
- [4] Wei Y Y. Role of miR-181a-5p and endoplasmic reticulum stress in the regulation of myogenic differentiation[J]. *Gene*, 2016, 592(1): 60-70.
- [5] Ye Z J, Shi J, Ning Z C, et al. MiR-92b-3p inhibits proliferation and migration of C2C12 cells[J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(21): 2906-2917.
- [6] Song C C, Wang J, Ma Y L, et al. Linc-smad7 promotes myoblast differentiation and muscle regeneration via sponging miR-125b[J]. *Epigenetics*, 2018, 13(6): 591-604.
- [7] Lyu M, Wang X, Meng X Y, et al. Chi-miR-487b-3p inhibits goat myoblast proliferation and differentiation by targeting IRS1 through the IRS1/PI3K/Akt signaling pathway[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 23(1): 115.
- [8] Chen M J. Circular RNA circMYBPC1 promotes skeletal muscle differentiation by targeting MyHC[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2021, 24: 352-368.
- [9] Che J, Xu C D, Wu Y Y, et al. MiR-1290 promotes myoblast differentiation and protects against myotube atrophy via Akt/p70/FoxO3 pathway regulation[J]. *Skeletal Muscle*, 2021, 11(1): 6.
- [10] Jia L, Li Y F, Wu G F, et al. MiRNA-199a-3p regulates C2C12 myoblast differentiation through IGF-1/AKT/mTOR signal pathway[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 15(1): 296-308.
- [11] Deng K P, Zhang Z, Ren C F, et al. FTO regulates myoblast proliferation by controlling CCND1 expression in an m⁶A-YTHDF2-dependent manner[J]. *Experimental Cell Research*, 2021, 401(2): 112524.
- [12] Deng K P. FTO-mediated demethylation of GADD45B promotes myogenesis through the activation of p38 MAPK pathway[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2021, 26: 34-48.
- [13] Singh G B, Cowan D B, Wang D Z. Tiny regulators of massive tissue: microRNAs in skeletal muscle development, myopathies, and cancer Cachexia[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 598964.

- [14] Romagnoli C, Iantomasi T, Brandi M L. Available *in vitro* models for human satellite cells from skeletal muscle[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(24):13221.
- [15] Bolus D J, Shanmugam G, Narasimhan M, et al. Recurrent heat shock impairs the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts[J]. Cell Stress and Chaperones, 2018, 23(3):399-410.
- [16] López-Gatius F. Local cooling of the ovary and its implications for heat stress effects on reproduction[J]. Theriogenology, 2020, 149:98-103.
- [17] Dehbi M, Baturcam E, Eldali A, et al. Hsp-72, a candidate prognostic indicator of heatstroke[J]. Cell Stress and Chaperones, 2010, 15(5):593-603.
- [18] Tang J Y, He A H, Yan H, et al. Damage to the myogenic differentiation of C2C12 cells by heat stress is associated with up-regulation of several selenoproteins[J]. Scientific Reports, 2018, 8:10601.
- [19] Chen K L, Wang Y, Lin Z P, et al. The protective effect of rosmarinic acid on myotube formation during myoblast differentiation under heat stress[J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 2020, 56(8):635-641.
- [20] Siddiqui S H, Allur Subramaniyan S, Kang D, et al. Modulatory effect of heat stress on viability of primary cultured chicken satellite cells and expression of heat shock proteins *ex vivo*[J]. Animal Biotechnology, 2021, 32(6):774-785.
- [21] Cai Y, Yu X, Hu S, et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation[J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2009, 7(4):147-154.
- [22] Chendrimada T P, Gregory R I, Kumaraswamy E, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing[J]. Nature, 2005, 436(7051):740-744.
- [23] O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation[J]. Frontiers in Endocrinology, 2018, 9:402.
- [24] Zhao X, Gu H, Wang L H, et al. MicroRNA-23a-5p mediates the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts[J]. Molecular Medicine Reports, 2020, 22(5):3705-3714.
- [25] Holstein I, Singh A K, Pohl F, et al. Post-transcriptional regulation of MRTF-a by miRNAs during myogenic differentiation of myoblasts[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(16):8927-8942.
- [26] Chen X L, Huang Z Q, Chen D W, et al. Role of microRNA-27a in myoblast differentiation[J]. Cell Biology International, 2014, 38(2):266-271.
- [27] Li Y, Yuan P, Fan S, et al. MiR-30a-3p can inhibit the proliferation and promote the differentiation of chicken primary myoblasts[J]. British Poultry Science, 2022, 63(4):475-483.
- [28] Cleys E R, Halleran J L, McWhorter E, et al. Identification of microRNAs in exosomes isolated from serum and umbilical cord blood, as well as placentomes of gestational day 90 pregnant sheep[J]. Molecular Reproduction and Development, 2014, 81(11):983-993.
- [29] Wang L, Chen X, Zheng Y Y, et al. MiR-23a inhibits myogenic differentiation through down regulation of fast myosin heavy chain isoforms[J]. Experimental Cell Research, 2012, 318(18):2324-2334.
- [30] Wang J, Yang L Z, Zhang J S, et al. Effects of microRNAs on skeletal muscle development[J]. Gene, 2018, 668:107-113.
- [31] Yang T, Chen X L, Huang Z Q, et al. MicroRNA-27a promotes porcine myoblast proliferation by downregulating myostatin expression[J]. Animal: an International Journal of Animal Bioscience, 2014, 8(11):1867-1872.
- [32] Guess M G, Barthel K K B, Harrison B C, et al. MiR-30 family microRNAs regulate myogenic differentiation and provide negative feedback on the microRNA pathway[J]. PLoS One, 2015, 10(2):e0118229.
- [33] Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell, 2005, 120(1):15-20.
- [34] Xiao W L, Zhang D Z, Fan C H, et al. Intermittent stretching and osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells via the p38MAPK-osterix signaling pathway[J]. Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, 2015, 36(3):1015-1025.
- [35] Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models[J]. Skeletal Muscle, 2011, 1(1):1-14.
- [36] Liu S F, Gao F, Wen L, et al. Osteocalcin induces proliferation via positive activation of the PI3K/Akt, P38 MAPK pathways and promotes differentiation through activation of the GPRC6A-ERK1/2 pathway in C2C12 myoblast cells[J]. Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, 2017, 43(3):1100-1112.
- [37] Murtaza G, Khan A K, Rashid R, et al. FOXO transcriptional factors and long-term living[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2017, 2017:3494289.
- [38] Figeac N, Serralbo O, Marcelle C, et al. ErbB3 binding protein-1(Ebp1) controls proliferation and myogenic differentiation of muscle stem cells[J]. Developmental Biology, 2014, 386(1):135-151.
- [39] Li S Z, Zhang Z Y, Chen J, et al. NLK is required for Ras/ERK/SRF/ELK signaling to tune skeletal muscle development by phosphorylating SRF and antagonizing the SRF/MKL pathway[J]. Cell Death Discovery, 2022, 8:4.
- [40] Zihni C, Mitsopoulos C, Tavares I A, et al. Prostate-derived sterile 20-like kinase 2(PSK2) regulates apoptotic morphology via C-Jun N-terminal kinase and Rho kinase-1[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(11):7317-7323.
- [41] Chen L. TAOK1 promotes proliferation and invasion of non-small-cell lung cancer cells by inhibition of WWC1[J]. Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2022, 2022:3157448.