

miR-191-5p靶向*C/EBPβ*抑制C2C12细胞脂质沉积

连欣荣^{1,2} 陈海敏¹ 王佳瑞² 夏静雯² 张瑾^{2,3*} 毋文静^{2*}⁽¹⁾浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; ⁽²⁾嘉兴大学生物与化学工程学院, 嘉兴 314001;⁽³⁾嘉兴爱博生物科技有限公司, 嘉兴 314006)

摘要 该研究旨在探究miR-191-5p对C2C12细胞成肌分化和肌管内异位成脂的作用及其机理。以小鼠成肌细胞系C2C12为材料, 使用马血清以及油酸钠和棕榈酸钠诱导细胞成肌或肌内成脂; 转染miR-191-5p mimic或inhibitor后, 采用qRT-PCR和Western blot检测成肌标志基因(*MyoD*、*MyoG*、*MyHC*、*Myf5*)和成脂标志基因(*FAS*、*PPARγ*、*HSL*)的表达以及相关信号通路的活性; 最后, 利用生物信息学分析和双荧光素酶报告系统对miR-191-5p靶基因进行预测和验证。结果发现, miR-191-5p于小鼠骨骼肌中高表达, 在C2C12细胞成肌分化过程中表达水平先升后降, 推测其参与调控骨骼肌发育; 与对照组相比, 过表达miR-191-5p促C2C12细胞成肌分化, 显著提高*MyoD*、*MyoG*等基因的表达量; 在异位成脂方面, 过表达miR-191-5p可显著抑制细胞内脂滴的沉积, 下调*FAS*、*PPARγ*等基因表达, 同时ERK1/2的磷酸化水平也显著下降; 另外, 共转染psi-CHECK-2-*C/EBPβ* 3'UTR与miR-191-5p mimic会明显降低海肾与萤火虫荧光强度比值, 提示miR-191-5p可直接作用于*C/EBPβ*的3'UTR。综上所述, miR-191-5p可能是通过靶向*C/EBPβ*, 提升ERK1/2信号通路的活性, 促进C2C12细胞成肌和抑制异位脂质沉积。

关键词 miR-191-5p; 骨骼肌; C2C12成肌细胞; 脂质沉积

miR-191-5p Targets *C/EBPβ* to Inhibit Lipid Deposition in C2C12 Cells

LIAN Xinrong^{1,2}, CHEN Haimin¹, WANG Jiarui², XIA Jingwen², ZHANG Jin^{2,3*}, WU Wenjing^{2*}⁽¹⁾College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;⁽²⁾School of Biological and Chemical Engineering, Jiaxing University,Jiaxing 314001, China; ⁽³⁾Jiaxing i-Bio Biotechnology Co., Ltd, Jiaxing 314006, China)

Abstract The aim of this study is to investigate the effects and mechanisms of miR-191-5p on myogenic differentiation and ectopic adipogenesis in C2C12 cells. Using mouse myoblast cell line C2C12 as model, the differentiate into myotubes or to undergo intramyocellular lipid accumulation using horse serum, sodium oleate, and sodium palmitate were conducted. After transfection with miR-191-5p mimic or inhibitors, qRT-PCR and Western blot were performed to assess the expression of myogenic markers (*MyoD*, *MyoG*, *MyHC*, *Myf5*) and adipogenic markers (*FAS*, *PPARγ*, *HSL*), as well as to evaluate the effects on relevant signaling pathways. Furthermore, bioinformatics analysis and dual-luciferase reporter assays were used to predict and validate the target genes of miR-191-5p. The results showed that miR-191-5p was highly expressed in mouse skeletal muscle and exhibited an initial increase followed by a decrease during C2C12 myogenic differentiation, suggesting its involvement in the regulation of skeletal muscle development. Compared to the control group, overexpression of miR-191-5p promoted myo-

收稿日期: 2025-02-29

接受日期: 2025-03-28

国家自然科学基金(批准号: 32102506、32172708)和浙江省自然科学基金重点项目(批准号: LZ23C170002)资助的课题

*通信作者。Tel: 13516831490, E-mail: zhangjin7688@163.com; Tel: 13736433510, E-mail: wuwenjing19851020@163.com

Received: February 29, 2025

Accepted: March 28, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32102506, 32172708), and the Key Project of Zhejiang Province Natural Science Foundation (Grant No.LZ23C170002)

*Corresponding authors. Tel: +86-13516831490, E-mail: zhangjin7688@163.com; Tel: +86-13736433510, E-mail: wuwenjing19851020@163.com

genic differentiation in C2C12 cells, significantly increasing the expression of *MyoD*, *MyoG*, and other myogenic genes. Regarding ectopic adipogenesis, overexpression of miR-191-5p significantly inhibited lipid droplet accumulation and downregulated the expression of *FAS* and *PPAR γ* . Additionally, phosphorylation of ERK1/2 was markedly reduced. Co-transfection with psi-CHECK-2-*C/EBP β* 3'UTR and miR-191-5p mimic resulted in a significant decrease in the ratio of firefly to Renilla luciferase activity, indicating that miR-191-5p directly targets the 3'UTR of *C/EBP β* . In conclusion, miR-191-5p may promote myogenesis and suppress ectopic lipid deposition in C2C12 cells by targeting *C/EBP β* and inhibiting the ERK1/2 signaling pathway.

Keywords miR-191-5p; skeletal muscle; C2C12 myoblasts; lipid deposition

骨骼肌的发育是一个复杂的多阶段过程,由肌前体细胞增殖、分化、迁移和融合构成,受到众多信号通路和基因分子的精细调控,如肌细胞生成素(myogenin, *MyoG*)、肌源性因子5(myogenic factor 5, *Myf5*)和生肌调节因子4(myogenic regulatory factor 4, *MRF4*)等^[1]。正常状态下骨骼肌中没有或有少量脂滴存在,但在营养过剩、衰老、肥胖等生理状态下,肌管内可能会出现脂质沉积过度现象,导致肌肉力量降低、肌肉量减少和分泌异常等问题。在肥胖和2型糖尿病(T2DM)患者中,骨骼肌内的脂肪沉积可能会引起炎症和脂毒性反应,进而干扰胰岛素信号转导,导致胰岛素抵抗性增加^[2-3]。脂肪的异位沉积与脂质合成、分解、转运以及多种信号通路的调控密切相关,脂合成依赖于乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-coA carboxylase, ACC)和脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FASN),由PI3K-Akt-mTOR、过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)、ERK通路等调节,主要在肝脏脂肪组织中完成^[4-5];脂分解通过激素敏感性脂肪酶(hormone-sensitive lipase, HSL)等分解甘油三酯,儿茶酚胺信号激活PKA^[6]。

越来越多的证据表明,miRNA(microRNA)在调控脂肪的异位沉积过程中也发挥着重要作用,主要通过影响脂肪生成和脂质代谢的关键过程,例如调控胆固醇外流和脂肪细胞分化过程^[7-8]。miRNA是一类长度为21~23个核苷酸的内源性小RNA,通过与mRNA的互补结合,导致mRNA沉默或降解,从而调控基因表达^[9-10]。miRNA在骨骼肌发育和肌内脂肪(intramuscular fat, IMF)沉积中主要通过调控肌肉特异性因子的表达,影响骨骼肌的功能和健康,同时直接抑制脂质合成相关基因的表达,调控脂质代谢途径,参与脂质的分解、氧化、转运和储存^[11-13]。例如,miR-378在骨骼肌中高度表达,通过抑制ACC

和FAS的表达,减少脂肪酸合成,从而影响肌肉内脂质的积累^[14];miR-324-5p在小鼠骨骼肌中高表达,通过靶向*Indum*和*Pm20d1*,增强线粒体 β -氧化和脂肪酸合成相关基因的表达,抑制成肌分化并促进脂质积累^[15]。miR-191在动物脂肪代谢和肌肉生长中发挥重要调控作用。对不同绵羊品种研究发现,miR-191在皮下脂肪组织中的表达丰度与脂肪量负相关,预测miR-191靶基因并进行GO分析,发现靶基因与脂肪代谢密切相关^[16]。在猪脂肪代谢的研究中发现,miR-191-5p通过直接靶向*C/EBP β* ,负调控猪前体脂肪细胞的分化;在小鼠前脂肪细胞系3T3-L1的研究中也发现miR-191通过靶向*C/EBP β* 实现抑制脂肪生成^[17-18];在牛原代肌肉细胞的研究中发现,miR-191-5p与circUBE3C竞争性结合p27,进而促进牛成肌细胞的增殖并抑制细胞凋亡^[19]。然而,miR-191-5p在肌细胞异位成脂过程中的作用及其机制尚不清楚。

本研究旨在探究miR-191-5p对C2C12细胞成肌和肌内脂质沉积的影响及作用机制。C2C12细胞来源于小鼠骨骼肌,通常作为研究体外肌肉细胞生长、分化、代谢的成熟模型,其生理和生物学特征经广泛研究,可确保实验结果的可靠性和重复性^[20]。首先,通过马血清、油酸钠和棕榈酸钠诱导C2C12细胞成肌及肌内成脂,利用qRT-PCR法检测miR-191-5p在小鼠各组织和C2C12细胞分化过程中的表达情况。并在转染miR-191-5p mimic或inhibitor后,通过EdU、CCK8、MyHC免疫荧光染色法确定其在细胞增殖和成肌分化过程中的作用;随后,利用油红O、TG等方法确定miR-191-5p在异位成脂中的作用;最后,借助双荧光素酶报告分析等方法确定miR-191-5p与*C/EBP β* 的靶向作用,以及对信号通路活性的影响。本研究揭示了miR-191-5p在调节C2C12细胞成肌分化和肌管脂质沉积中的重要作用,有助于深入理解miRNAs在肌肉生成和脂质代谢中的功能,

为肌肉与脂肪代谢的交叉调控机制提供了新的分子依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 小鼠成肌细胞C2C12(#C5044)和人胚胎肾细胞HEK293T(#C5004)购于浙江百迪生物科技有限公司。细胞培养使用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM高糖培养基,培养条件为37℃、5% CO₂。每2天可换液1次,待细胞融合率达到80%~90%时可进行传代。

1.1.2 主要试剂与材料 DMEM高糖培养基和胎牛血清购自浙江百迪生物科技有限公司;青霉素-链霉素双抗和CCK-8试剂盒、HRP标记羊抗鼠抗体和HRP标记羊抗兔抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;miR-191-5p mimic、miR-191-5p inhibitor、U6引物和riboFECT™ CP转染试剂购自广州锐博生物科技有限公司;脂质体Lipofectamine 2000、TRIzol试剂和BCA蛋白定量试剂盒购自美国ThermoFisher Scientific公司;甘油三酯检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;EdU检测试剂盒和油红O染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;反转录试剂盒和Premix Ex Taq™购自日本TaKaRa公司;双荧光素酶检测试剂盒购自美国Promega公司;ECL化学发光超敏显色试剂盒购自美国Millipore公司;C/EBP β 一抗购自美迪西生物医药有限公司;CyclinB1、CyclinD1、MyoG、p-HSL、HSL、FABP4和PPAR γ 一抗购自英国Abcam公司;MyHC一抗购自美国DSHB公司;p-PI3K、PI3K、p-AKT和AKT一抗购自美国Cell Signaling Technology公司;GAPDH一抗购自深圳市艾瑞生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染与诱导 当接种于12孔板的细胞汇合率达到30%~50%,使用riboFECT™ CP染试剂将40 μ mol/L的NC、mimic、inhibitor-NC和inhibitor分别转染至C2C12细胞中。转染48 h后提取细胞RNA,检测转染效率。转染24 h后,用含2%马血清(bide)的分化培养基(differentiation medium, DM)代替生长培养基(growth medium, GM)进行诱导细胞成肌分化,每两天换液1次。待诱导成肌4~6天后,若成肌状况良好,将DM换成含0.5%无脂肪牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)和1 mmol/mL油酸钠

与棕榈酸钠的DM中37℃孵育24 h,以诱导肌管中的脂质沉积。

1.2.2 总RNA提取、反转录和实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 利用TRIzol裂解法提取总RNA, NanoDrop one超微量分光光度计检测RNA质量和浓度。参照TaKaRa反转录试剂盒说明进行反转录,采用ThermoFisher QuantStudio 3定量PCR仪检测FABP4的mRNA相对表达水平,以GAPDH和U6为内参基因,以2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算基因相对表达丰度。

1.2.3 活细胞计数法(CCK-8) 融合度达到40%~50%时,分别转染NC mimic、miR-191-5p mimic、NC inhibitor和miR-191-5p inhibitor试剂。培养24 h后每孔加入100 μ L CCK-8检测试剂,每组6个重复并设置4个无细胞孔为空白对照。37℃孵育2 h后于450 nm波长处检测吸光度(D)值,检测细胞增殖活性。

1.2.4 EdU染色(5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶染色) 使用EdU染色试剂盒对样本进行染色,首先用4℃预冷的4%多聚甲醛进行固定30 min,接着使用0.5% Triton X-100进行渗透处理,持续10 min。随后,在室温条件下且避免光照的环境中,使用Apollo染色液进行孵育,时间为30 min。孵育完成后,用0.5% Triton X-100进行3次洗涤。最后,使用Hoechst33342染色液进行2次染色,室温20 min。在荧光倒置显微镜下观察并拍摄图像,每个实验组别设置6次重复实验。

1.2.5 miRNA靶基因预测与生物信息学分析 结合Targetscan、miRBase、miRDB等对miR-191-5p靶基因预测,筛选出多个潜在的一致性较高的靶基因。在NCBI上查找靶基因的功能信息,预测其生物学功能。

1.2.6 质粒构建与报告基因分析 从NCBI数据库中获取C/EBP β 与miR-191-5p的3'端非翻译区(3'UTR)结合的碱基序列,并利用SnapGene软件设计带Xho I、Not I酶切位点的PCR引物。接着,从C2C12细胞cDNA为模板扩增出含有靶基因与miR-191-5p结合区域的DNA片段。利用酶切技术处理psi-CHECK2质粒和靶编码区片段,并通过琼脂糖凝胶电泳及胶回收技术纯化目标DNA片段。之后,在16℃下利用DNA连接酶将靶基因编码区与psi-CHECK2质粒连接,将转化后的大肠杆菌感受态细胞涂布于LB琼脂平板上进行培养。培养完成后,挑选出单克隆菌落,并对这些菌落进行扩增培养以及

表2 引物序列
Table 2 Primer sequences

基因 Gene	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>C/EBPβ</i>	Forward: GGA CTT GAT GCA AAC CGG ATC Reverse: CTG CCC CAA AAA GGC TTT TAA AC
<i>ATGL</i>	Forward: GGA ACC AAA GGA CCT GAT GAC C Reverse: ACA TCA GGC AGC CAC TCC AAC A
<i>C/EBPα</i>	Forward: TGG ACA AGA ACA GCA ACG AG Reverse: TCA CTG GTC AAC TCC AGC AC
<i>Ccl3</i>	Forward: ACT TTG AGA CGA GCA GCC AGT G Reverse: TTT CTG GAC CCA CTC CTC ACT G
<i>Cenpe</i>	Forward: GGA GAA AGA TGA CCT ACA GAG GC Reverse: AGT TCC TCT TCA GTT TCC AGG TG
<i>CyclinB</i>	Forward: AAC TTC AGC CTG GGT CG Reverse: CAG GGA GTC TTC ACT GTA GGA
<i>CyclinD</i>	Forward: TAG GCC CTC AGC CTC ACT C Reverse: CCA CCC CTG GGA TAA AGC AC
<i>FABP4</i>	Forward: TGA AAT CAC CGC AGA CGA CAG G Reverse: GCT TGT CAC CAT CTC GTT TTC TC
<i>FAS</i>	Forward: AGT TGC CCG AGT CAG AGA A Reverse: CGT CGA ACT TGG AGA GAT CC
<i>GAPDH</i>	Forward: TGC TGA GTA TGT CGT GGA GTC T Reverse: ATG CAT TGC TGA CAA TCT TGA G
<i>HSL</i>	Forward: GCT CAT CTC CTA TGA CCT ACG G Reverse: TCC GTG GAT GTG AAC AAC CAG G
<i>Myf5</i>	Forward: GAG CTG CTG AGG GAA CAG GTG GAG A Reverse: GTT CTT TCG GGA CCA GAC AGG GCT G
<i>MyHC</i>	Forward: CGC AAG AAT GTT CTC AGG CT Reverse: GCC AGG TTG ACA TTG GAT TG
<i>MyoD</i>	Forward: GCA CTA CAG TGG CGA CTC AGA T Reverse: TAG TAG GCG GTG TCG TAG CCA T
<i>MyoG</i>	Forward: CCA TCC AGT ACA TTG AGC GCC T Reverse: CTG TGG GAG TTG CAT TCA CTG G
<i>Pax7</i>	Forward: GTT CGG GAA GAA AGA GGA CGA C Reverse: GGT TCT GAT TCC ACA TCT GAG CC
<i>PPARγ</i>	Forward: CCA AGA ATA CCA AAG TGC GAT CA Reverse: CCC ACA GAC TCG GCA CTC AAT

质粒的提取工作。最后,将提取的质粒由上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定,以确保载体构建的准确性。

1.2.7 双荧光素酶报告分析 双荧光素酶实验分为以下两组: NC mimic和*C/EBPβ* 3'UTR、miR-191-5p mimic和*C/EBPβ* 3'UTR, 每组6个重复。在转染前24 h, 将293T细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于24孔板中, 每孔加入1 mL不含抗生素的DMEM培养基(含10%胎牛血清)。第二天, 使用Lipofectamine 3000共转染NC mimic和含有*C/EBPβ*-3'UTR的双荧光素酶报告基因载体(psiCHECK-2-*C/EBPβ*)、miR-191-

5p mimic和psiCHECK-2-*C/EBPβ*。转染后24 h后, 轻轻去除DMEM培养基, 利用Dual-Luciferase Reporter Assay System试剂盒收取样品, 加入100 μ L $1 \times$ 被动裂解缓冲液, 在轨道摇床上室温孵育15 min以裂解细胞。随后, 将100 μ L荧光素酶检测试剂II(LAR II)加入发光检测管中, 再加入20 μ L细胞裂解物, 混匀后在TECAN多功能酶标仪上测量萤火虫荧光素酶发光值。接着, 向同一试管中加入100 μ L Stop & Glo[®]试剂, 混匀后测量海肾荧光素酶发光值。通过萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性比值来反映miR-191-5p与*C/EBPβ*基因的靶向关系。

1.2.8 免疫荧光染色 将细胞接种于玻片并培养至适宜密度,随后通过使用4%多聚甲醛进行细胞常温固定以保持细胞结构的完整性。细胞通透液使用0.1% Triton X-100,以便抗体能够渗透细胞内部。洗涤液使用5% BSA,抑制非特异性结合。在抗体孵育阶段,细胞首先与针对特定分化标志物的一抗接触,一抗稀释浓度按照说明书中比例稀释于含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液,一般为1:1 000~1:5 000。洗涤后,再与经1:1 000稀释的荧光标记二抗孵育以增强检测信号。最终洗涤步骤去除未结合的抗体,确保信号的特异性。通过荧光显微镜观察染色结果,并利用ImageJ软件对拍摄的图像进行荧光强度和分布的定量分析。

1.2.9 油红O染色 待细胞密度达到80%,使用分化培养基诱导细胞成肌,待肌管清晰可见,使用油酸钠和棕榈酸钠诱导细胞成脂,待细胞脂滴形成明显后,使用4℃预冷的多聚甲醛固定细胞15 min后,通过油红O染料特异性结合脂质,PBS清洗多余染料后显微镜下观察细胞内脂滴的分布情况。

1.2.10 细胞总蛋白提取和蛋白质印迹(Western blot)实验 用RIPA缓冲液补充蛋白酶抑制剂提取总蛋白。裂解液在9 000 r/min下4℃离心7 min,上清液加入6×SDS上样缓冲液混匀后煮沸10 min。使用12% SDS-PAGE分离胶和5% SDS-PAGE浓缩胶分离,100 V电泳2 h。将目的条带转移到PVDF膜上,4℃、200 mA转移2 h。将膜在含有5%脱脂牛奶的溶液中进行封闭处理。接着,在4℃的条件下与一抗孵育10~12 h,一抗稀释浓度按照说明书中比例稀释于含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液,一般为1:1 000~1:5 000。孵育完成后,再将膜与辣根过氧化物酶标记的二抗(HRP-conjugated secondary antibody, 1:20 000稀释于含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液)在室温下进行1 h的孵育。使用Bio-Rad ChemiDocXRS+曝光系统检测蛋白水平,并使用ImageJ图像软件进行分析灰度值。

1.2.11 甘油三酯(TG)含量测定 将制备好的细胞蛋白离心取上清,实验组每孔加入1 μ L蛋白悬液和100 μ L TG测试盒工作液,每组4个重复,37℃孵育10 min,波长500 nm下使用Eppendorf酶标仪测定各孔吸光度值。以校准品组为对照,计算样品TG含量。

1.2.12 实验数据统计分析方法 使用Graph Pad Prism 8软件进行数据分析和图表制作,实验结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)的方式呈现。通过Student's *t*-

test来评估数据间的显著性差异,当 $P<0.05$ 时,认为结果具有统计学上的显著性。具体来说,* $P<0.05$,表示统计差异显著;** $P<0.01$,表示统计差异极显著,*** $P<0.001$,表示统计差异高度显著。

2 结果

2.1 miR-191-5p在小鼠各个组织和成肌细胞中的表达模式

本研究分析了miR-191-5p在小鼠不同组织中的表达模式,发现miR-191-5p在骨骼肌组织中的表达水平较高(图1A)。在C2C12细胞成肌分化过程中,miR-191-5p表达量呈现先上升后下降的趋势,并在分化第6天表达量最高(图1B)。这些结果提示miR-191-5p可能在肌肉发育中扮演着重要角色。

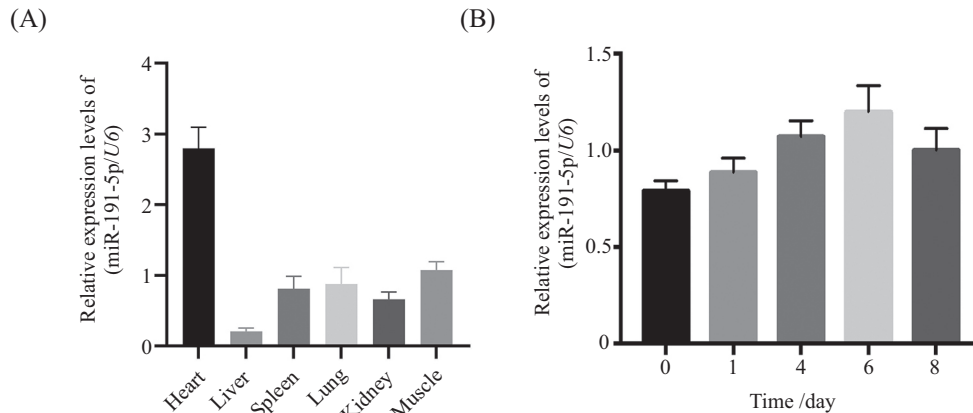
2.2 miR-191-5p促进C2C12细胞的增殖

为研究miR-191-5p在C2C12细胞增殖中的作用,分别转染miR-191-5p mimic和NC mimic至C2C12细胞,在转染48 h后,检测发现miR-191-5p mimic组miR-191-5p表达水平较NC mimic组升高50倍(图2A)。EdU染色和CCK-8法检测均显示过表达miR-191-5p后细胞增殖能力增强(图2B和图2C)。与NC mimic组相比,miR-191-5p mimic可显著提高细胞周期调控基因*Cenpe*、*CyclinB1*和*CyclinD1*的表达(图2D)。

为了验证上述结果,在C2C12细胞中转染miR-191-5p inhibitor,转染后检测结果显示miR-191-5p抑制剂能显著降低C2C12细胞中miR-191-5p的表达水平,降低细胞增殖(图2B和图2C)和细胞周期相关基因及蛋白表达量(图2E和图2F)。总之,miR-191-5p可促进C2C12细胞增殖。

2.3 miR-191-5p促进C2C12细胞的成肌分化

为探究miR-191-5p在C2C12成肌细胞分化中的作用,在C2C12细胞进行诱导成肌分化过程中,转染miR-191-5p mimic或miR-191-5p抑制剂,通过免疫组化检测肌管形成情况,并收集总RNA检测成肌标志基因的表达丰度。结果显示,miR-191-5p mimic组在分化第6天形成了更多的肌管,且肌管的数量显著高于对照组(图3A),并且成肌标志基因*MyoD*、*MyoG*、*MyHC*和*Myf5*的mRNA表达水平显著上升(图3B),*MyoG*、*MyHC*蛋白表达水平同样显著上升(图3C)。而miR-191-5p inhibitor组在细胞分化过程中显示肌管形成数量显著减少(图3A),成肌标志基因和蛋白



A: miR-191-5p在小鼠各个组织中的表达水平; B: miR-191-5p在C2C12细胞成肌过程中的表达水平变化。

A: expression levels of miR-191-5p in various mouse tissues; B: changes in miR-191-5p expression levels during C2C12 myogenic differentiation.

图1 miR-191-5p在组织和成肌分化过程中的表达

Fig.1 Expression of miR-191-5p in tissues and myogenic differentiation process

的表达水平也显著下降(图3C和图3D)。这些结果表明, miR-191-5p促进了肌细胞的分化及其成熟。

2.4 miR-191-5p对异位脂肪沉积的抑制作用

为研究 miR-191-5p 对异位成脂的影响。先诱导 C2C12 细胞形成明显的肌管结构后, 再加入油酸钠和棕榈酸钠诱导肌管中沉积脂滴, 在此过程中转染 miR-191-5p mimic 或 miR-191-5p 抑制剂, 通过油红 O 染色等方法确定 miR-191-5p 的作用。结果显示, miR-191-5p mimic 可显著抑制细胞内脂质、甘油三酯的积累(图4A和图4B)和成脂关键基因 *PPAR γ* 的表达, 并提高脂解基因 *ATGL* 和 *HSL* 的表达水平(图4C)。而与对照组相比, 抑制 miR-191-5p 可显著促进胞内脂质和甘油三酯的积累(图4A和图4B)和成脂基因 *FAS* 的表达, 同时脂解基因 *ATGL* 和 *HSL* 基因表达水平显著降低(图4D), 蛋白表达情况与基因较为一致(图4E)。综上所述, miR-191-5p 通过调节成脂和脂解相关基因的表达, 显著抑制 C2C12 细胞的异位成脂。

2.5 miR-191-5p 靶向抑制 *C/EBP β* 的表达

为了筛选与 miR-191-5p 靶向互作的基因, 利用 Targetscan、miRBase、miRDB 等数据库预测显示 *C/EBP β* 可能是 miR-191-5p 的靶基因(图5A)。过表达 miR-191-5p 后, *C/EBP β* 的表达量显著下降 ($P < 0.05$) (图5B)。为了验证 miR-191-5p 是否直接靶向 *C/EBP β* 。PCR 扩增得到 *C/EBP β* 的启动子区序列, 构建 psiCHECK-2 双荧光素酶报告载体, 共转染 miR-191-5p mimic 与 psiCHECK-2-*C/EBP β* 结果表明, miR-191-5p mimic 和 psiCHECK-2-*C/EBP β* 共转染组的荧光强度显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图5C)。同时过表达 miR-

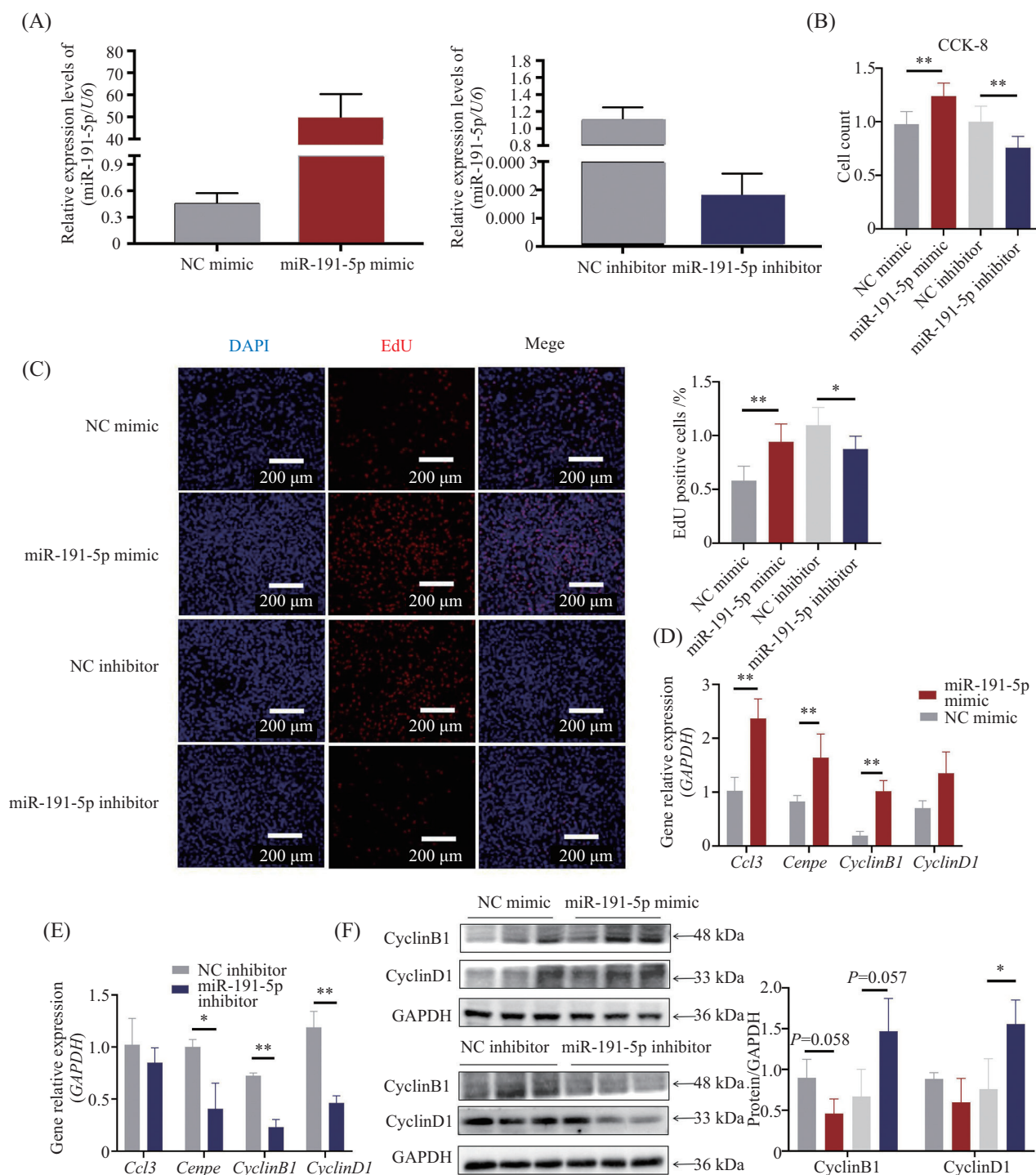
191-5p 后, *C/EBP β* 蛋白表达量也显著下降(图5D)。上述结果确定了 *C/EBP β* 为 miR-191-5p 的靶基因。

2.6 miR-191-5p 通过 ERK1/2 信号通路调控细胞脂质积累

ERK1/2 细胞信号通路在调控脂肪沉积方面起到重要作用。为了探究 miR-191-5p 是否通过 ERK1/2 信号通路发挥作用, 我们在诱导细胞成脂后提取细胞蛋白, 通过 Western blot 检测 miR-191-5p-NC 和 miR-191-5p mimic 组中蛋白表达情况, 结果发现敲低 miR-191-5p 可显著抑制 ERK1/2 的磷酸化(图6), 这表明 miR-191-5p 可促进 ERK1/2 信号通路的活性调控细胞脂质积累。

3 讨论

骨骼肌细胞内脂质沉积是重要的科学问题, 一方面是肌肉卫星细胞功能受损的一个特征, 同时肌肉内脂肪含量也可作为农业动物的肉质指标中的关键参数, 直接影响肌肉的肉色、嫩度和多汁性^[21]。近年来, 大量研究发现, miRNA 在肌肉发育和肌肉脂肪沉积过程中发挥重要作用^[22-23]。miR-191-5p 是一种重要的 miRNA, 在癌症、心血管疾病、代谢性疾病及炎症与免疫反应中发挥双重调控作用。在癌症中, 它既可促进肿瘤进展, 也可抑制肿瘤生长, 具体作用因癌症类型而异^[24-25]。在心血管疾病中, 它通过调控血管生成和炎症等过程影响疾病发展^[26]。此外, miR-191-5p 还参与代谢性疾病如糖尿病和肥胖的调控, 并可能通过调节炎症因子和免疫细胞功能影响炎症和免疫相关疾病^[27-29]。由于其在不同疾病中的

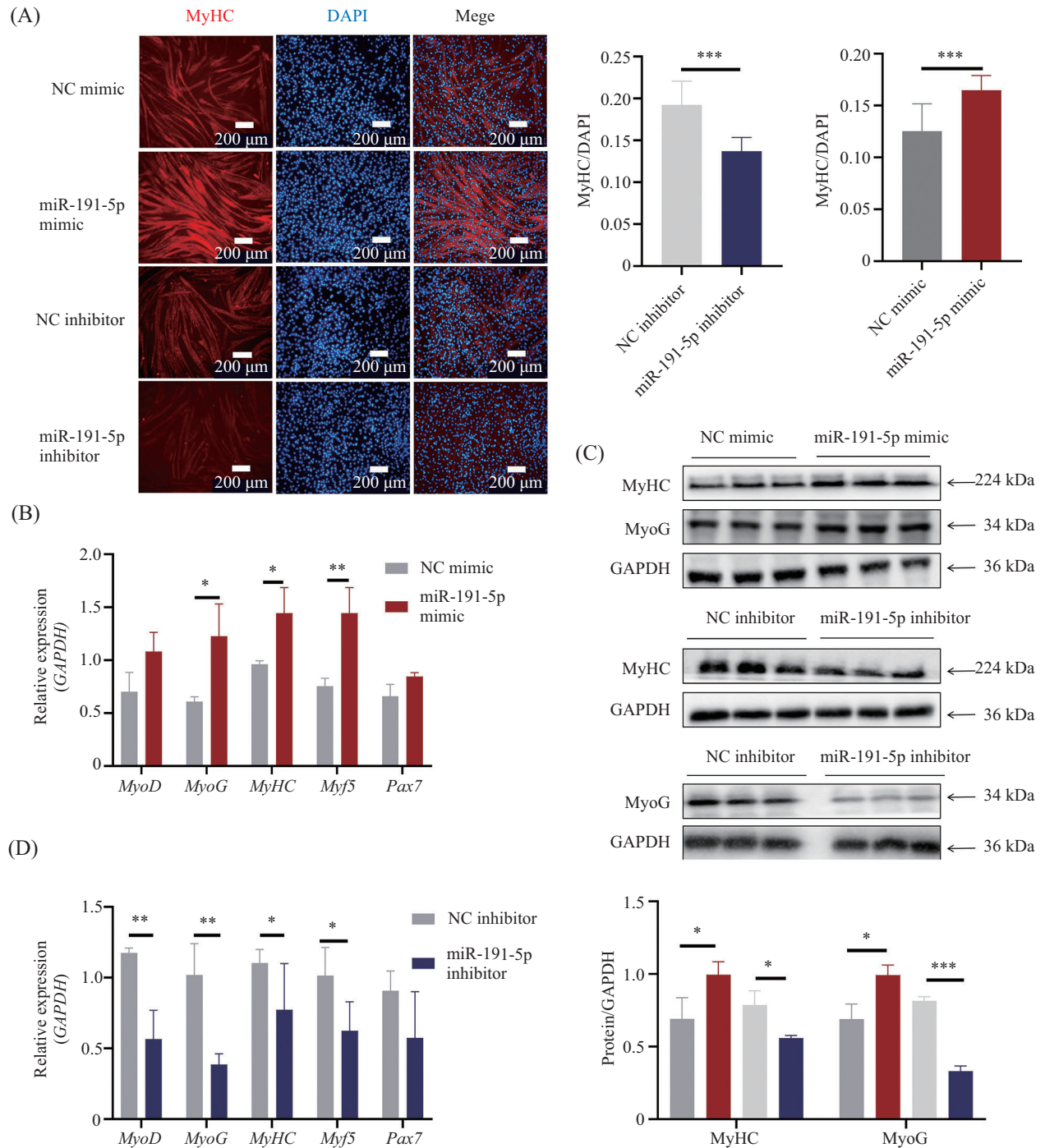


A: qRT-PCR法检测miR-191-5p在C2C12细胞中的过表达和敲低效率; B: CCK8法检测miR-191-5p对细胞增殖的影响; C: EdU检测miR-191-5p对C2C12细胞增殖的影响; D、E: Real-Time PCR法检测细胞增殖基因表达水平; F: Western blot法检测细胞中增殖蛋白表达水平。 $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

A: the overexpression and knockdown efficiency of miR-191-5p in C2C12 cells were detected by qRT-PCR; B: the effect of miR-191-5p on cell proliferation was detected by CCK8 assay; C: the effect of miR-191-5p on the proliferation of C2C12 cells was detected by EdU assay; D,E: the expression levels of cell proliferation genes were detected by Real-Time PCR; F: the expression levels of proliferation proteins in cells were detected by Western blot. $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$.

图2 miR-191-5p对C2C12细胞增殖的影响

Fig.2 Effect of miR-191-5p inhibition on C2C12 cell proliferation



A: MyHC免疫荧光染色检测细胞肌纤维分化情况; B、D: qRT-PCR法检测细胞分化基因表达水平; C: Western blot法检测细胞中分化相关蛋白表达水平。n=3, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

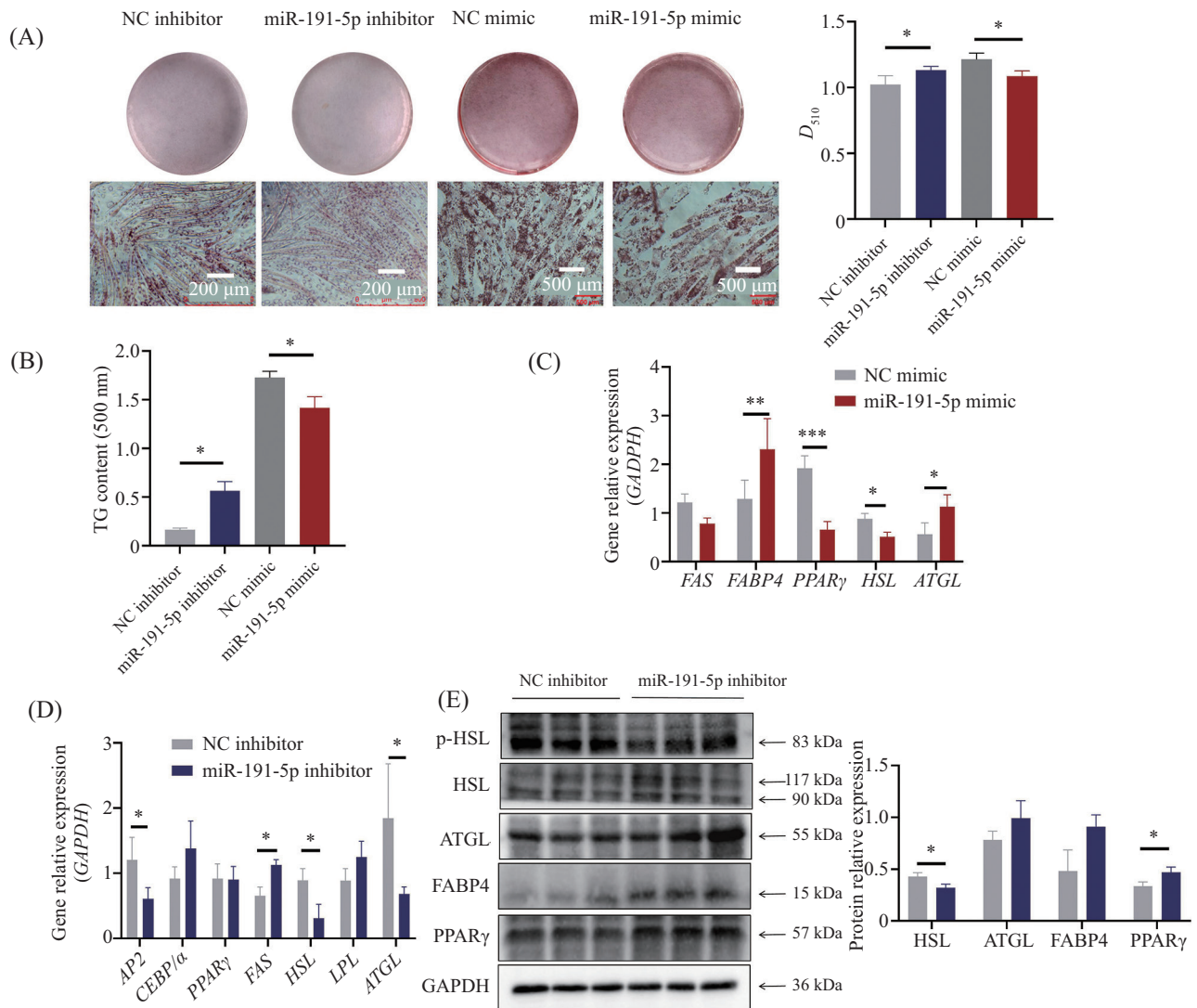
A: MyHC immunofluorescence staining was used to assess the myofiber differentiation of cells; B,D: the expression levels of cell differentiation genes were detected by qRT-PCR; C: the expression levels of differentiation-related proteins in cells were detected by Western blot. n=3, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图3 miR-191-5p对C2C12细胞分化的影响

Fig.3 Effect of miR-191-5p inhibition on C2C12 cell differentiation

表达变化, miR-191-5p被视为潜在的生物标志物和治疗靶点,但其具体机制和临床应用仍需进一步研究。在本研究前期发现miR-191-5p在肌肉组织中表

达丰富,并且其表达水平随着C2C12细胞的成肌分化而显著上升。生物信息学分析进一步揭示,miR-191-5p可能靶向调控多个与脂肪代谢相关的关键基因,



A: 油红O检测miR-191-5p对细胞脂滴形成的影响; B: miR-191-5p对细胞TG含量的影响; C: qRT-PCR法检测miR-191-5p过表达对细胞成脂基因表达的影响; D: miR-191-5p敲低对细胞成脂基因表达的影响; E: Western blot检测miR-191-5p对细胞成脂蛋白表达的影响。 $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

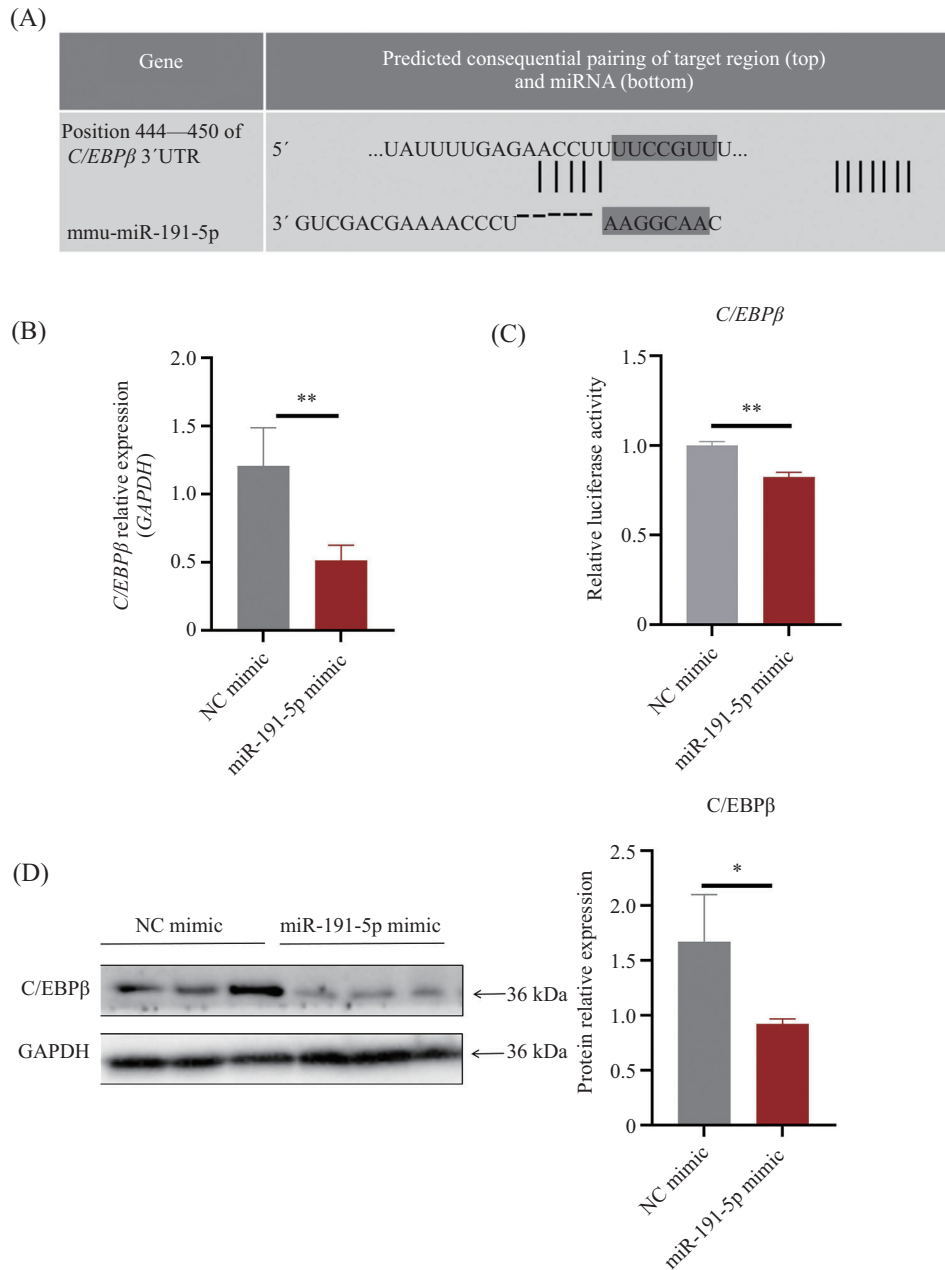
A: oil red O staining to assess the effect of miR-191-5p on lipid droplet formation in cells; B: effect of miR-191-5p on triglyceride (TG) content in cells; C: qRT-PCR analysis of the effect of miR-191-5p overexpression on adipogenic gene expression in cells; D: effect of miR-191-5p knockdown on adipogenic gene expression in cells; E: Western blot to detect the effect of miR-191-5p on adipogenic protein expression in cells. $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

图4 miR-191-5p对C2C12异位成脂的影响

Fig.4 Effect of miR-191-5p on ectopic adipogenesis in C2C12 cells

其中*C/EBPβ*是重要的靶基因之一。基于这些发现,我们推测miR-191-5p可能在成肌过程以及异位成脂现象中发挥重要作用。实验结果证实miR-191-5p不仅具有显著的促进成肌作用,还能通过靶向*C/EBPβ*并调控ERK1/2信号通路,有效抑制肌内脂肪沉积。这一发现为理解肌肉-脂肪平衡调控机制提供了新的理论依据,也为改善肉质性状提供了潜在的分子靶点。

在骨骼肌细胞的增殖过程中,细胞周期蛋白(Cyclin)通过与细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)形成复合物,推动细胞周期的进程,直接调控细胞增殖^[30-31]。其中,CyclinD1通过激活CDK4和促使Rb蛋白磷酸化,释放E2F转录因子,推动细胞从G₁期进入S期,促进细胞周期的进展^[32-33]。CyclinB1与CDK1结合,在G₂/M转换和有丝分裂过程中激活,确保染色体正确分离^[34]。Cenpe在维持中



A: miR-191-5p与*C/EBPβ*的靶向序列; B: qRT-PCR法检测miR-191-5p过表达与敲低时*C/EBPβ*的表达水平; C: 双荧光素酶法检测miR-191-5p与*C/EBPβ*的靶向关系; D: Western blot检测miR-191-5p对*C/EBPβ*蛋白表达的影响。n=3, **P*<0.05, ***P*<0.01。

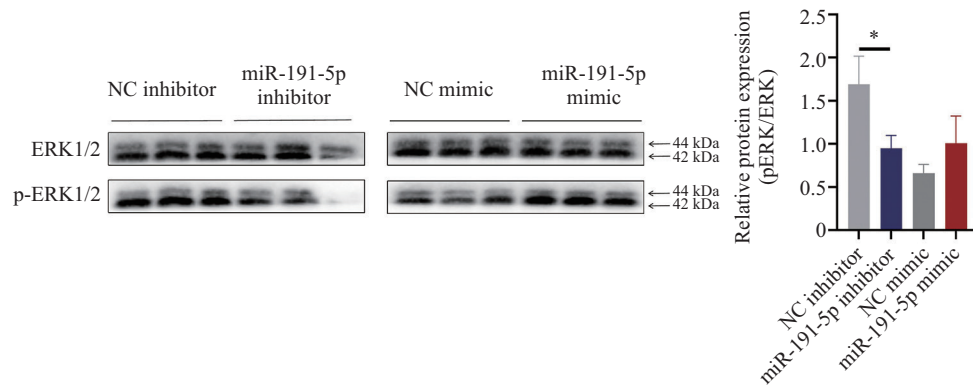
A: target sequence of miR-191-5p in the 3'UTR of *C/EBPβ*; B: qRT-PCR analysis of *C/EBPβ* expression levels upon miR-191-5p overexpression or knockdown; C: dual luciferase reporter assay to detect the targeting relationship between miR-191-5p and *C/EBPβ*; D: Western blot was performed to examine the effect of miR-191-5p on *C/EBPβ* protein expression. n=3, **P*<0.05, ***P*<0.01.

图5 miR-191-5p与*C/EBPβ*的靶向关系

Fig.5 The target relationship between miR-191-5p and *C/EBPβ*

心粒蛋白复合体结构和纺锤体方向上发挥作用,对细胞分裂至关重要^[35]。本实验结果表明,miR-191-5p可以促进*CyclinB1*、*CyclinD1*、*Cenpe*、*Ccl3*等细胞增殖相关基因的表达,由此推断miR-191-5p是通过促进这些增殖基因的表达进而对细胞周期精确调控,进而推动骨骼肌细胞的增殖的。

此外,miR-191-5p可显著促进MyoD、MyoG、MyHC和Myf5等成肌分化因子的表达。肌生成是一个复杂的多步骤过程,MRFs对肌肉发育、发生和再生等多个阶段起作用,协调从成肌细胞增殖、融合及肌管成熟等骨骼肌发育的各个阶段。在骨骼肌发育的早期,Myf5和MRF4作为决定因素,引导前体细



Western blot法检测细胞中ERK1/2信号通路蛋白水平。n=3, *P<0.05。

Western blot was used to detect the protein levels of ERK1/2 signaling pathway in cells. n=3, *P<0.05.

图6 miR-191-5p通过ERK1/2信号通路调节细胞脂质积累

Fig.6 miR-191-5p regulates cellular lipid accumulation through the ERK1/2 signaling pathway

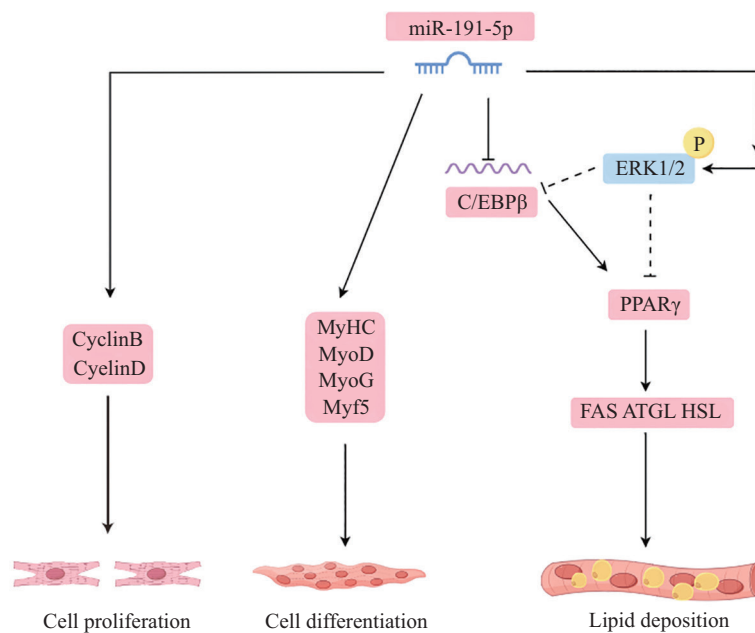


图7 miR-191-5p/C/EBPβ/ERK1/2轴在成肌与脂代谢中的调控网络

Fig.7 The miR-191-5p/C/EBPβ/ERK1/2 axis in the regulatory network of myogenesis and lipid metabolism

胞建立骨骼肌谱系^[36]。随后, MyoD的表达被Wnt和BMP4信号激活, MyoD作为肌肉特异性基因转录调控的关键因子, 能够促使多种细胞类型向成肌细胞转化, 通常被视为调节分化程序的“主开关”^[37-38]。随后, MyoD起到关键作用, 它能够激活MyoG的表达, 并同时抑制Myf5的表达^[39]。这种从Myf5到MyoG的表达变化标志着细胞周期的退出和分化过程的正式启动, 使得成肌细胞得以进一步分化并融合形成肌管。MyoD与MyoG的协同作用能够促进*MRF4*基因的表达, 这对于维持肌管融合后肌纤维的稳态至关重要。而Myf6则与MyoG共同控制肌肉分化, MyoG

的表达能够控制成肌细胞融合的发生并促进成肌细胞的增殖^[40]。先前的研究发现, *C/EBPβ*异位表达通过降解MyoD蛋白、上调Pax7和干扰MyoD活性影响其功能, 导致分化缺陷^[41]。因此, miR-191-5p可能通过下调*C/EBPβ*的表达, 促进肌源性因子如MyoD、MyoG、MyHC和Myf5的活性来促进肌细胞的分化。

骨骼肌内的脂质代谢调节包括脂肪生成和脂肪分解两个相反的过程, 受FAS、ATGL、HSL和FABP4等关键酶的调控。FAS在脂肪生成中起核心作用; ATGL是甘油三酯水解为甘油二酯的主要酶; HSL可同时水解甘油二酯和甘油三酯; FABP4能够与

p-HSL结合并移位到脂滴区域以调节HSL的脂解活性^[42-43]。在骨骼肌异位成脂研究中发现miR-191-5p的靶基因是*C/EBPβ*, 而*C/EBPβ*在脂肪生成过程中发挥着早期诱导因子的重要作用。具体而言是指在脂肪细胞分化的起始阶段, *C/EBPβ*的表达迅速上调, 直接结合到*PPARγ*基因启动子区域促进其转录, 激活脂肪细胞分化关键转录因子*PPARγ*, 进而调控与脂肪细胞功能和脂质代谢相关的基因表达。同时, *C/EBPβ*还能激活*C/EBPα*, *C/EBPα*与*PPARγ*协同作用, 进一步增强脂肪细胞中参与脂肪酸合成、转运和储存的特异性基因(如*FAS*、*LPL*等)表达, 进而促进脂肪细胞的成熟和脂质积累, 最终促进成熟脂肪细胞表型的基因表达^[44-46]。因此, miR-191-5p靶向*C/EBPβ*, 抑制关键成脂基因, 减少了油酸诱导的骨骼肌内脂质沉积, 而miR-191-5p的抑制则导致脂质沉积增加。

除了转录因子的连续诱导外, 细胞内信号分子的调节对脂肪细胞分化同样重要。ERK1/2属于有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK), ERK1/2信号转导可诱导cAMP反应元件结合蛋白(the cAMP response element-binding protein, CREB)的激活, 而活化的CREB能够通过直接结合*C/EBPβ*基因的启动子区, 调控其转录过程, 影响体外前脂肪细胞的成脂分化^[47]。此外, p-ERK1/2是众所周知的*PPARγ*负调节剂, 特别是在有丝分裂克隆扩增(mitotic clonal expansion, MCE)阶段^[48]。有研究表明ERK1/2信号通路负向调节脂质沉积和类固醇生成。甜菜碱通过抑制ERK1/2通路促进C2C12细胞中*PPARγ*的表达和脂质积累^[49]; 肌肉生长抑制因子(myostatin, MSTN)通过激活ERK1/2信号通路减少了猪皮下前脂肪细胞(porcine subcutaneous preadipocytes, PSPA)中的脂质积累, 而在添加ERK1/2抑制剂后, 这种减少现象得以逆转^[50]。综上所述, miR-191-5p不仅可以直接靶向*C/EBPβ*调控异位成脂, 也可能通过上调ERK1/2通路的磷酸化, 进而抑制*C/EBPβ*和*PPARγ*的活性, 降低C2C12细胞异位脂质沉积。

综上所述, miR-191-5p在C2C12成肌细胞的增殖分化和肌内脂质沉积过程中发挥着关键调控作用, 这为理解miRNA在肌肉生物学和代谢性疾病中的作用提供了新的见解, 并为未来针对肌肉疾病的治疗提供了潜在的分子靶点。然而, 本实验仅初步分析了miR-191-5p调控C2C12细胞异位成脂的分子机制和信号通路, 尚未探讨其细胞增殖和分化的下

游信号通路网络。另外, 尽管C2C12成脂分化模型为肌肉和脂肪代谢研究提供了高效工具, 尤其适用于机制初步解析和药物筛选, 但在疾病建模和转化研究中生理相关性不足。因此, 未来需结合原代肌细胞实验进一步验证核心结论, 并通过多组学技术揭示其在体内复杂微环境中的调控模式。

参考文献 (References)

- [1] 曹梦瑶, 周楠, 李晓南. 骨骼肌生长发育特点及影响因素的研究进展[J]. 发育医学电子杂志(CAO M Y, ZHOU N, LI X N. Research progress on growth and development characteristics of skeletal muscle and its influencing factors [J]. Journal of Developmental Medicine, Electronic Version), 2022, 10(6): 456-62.
- [2] HE F, HUANG Y R, SONG Z, et al. Mitophagy-mediated adipose inflammation contributes to type 2 diabetes with hepatic insulin resistance [J]. J Exp Med, 2021, 218(3): 27.
- [3] TANIGAKI K, SACHARIDOU A, PENG J, et al. Hyposialylated IgG activates endothelial IgG receptor FcγRIIB to promote obesity-induced insulin resistance [J]. J Clin Invest, 2018, 128(1): 309-22.
- [4] 李娟, 徐家新, 王春, 等. 利拉鲁肽通过AMPK/mTOR信号通路诱导自噬改善肝脂肪变性[J]. 蚌埠医科大学学报(LI J, XU J X, WANG C, et al. Liraglutide induces autophagy through AMPK/mTOR signaling pathway and improves hepatocyte steatosis [J]. Journal of Bengbu Medical University), 2022, 47(10): 1336-41.
- [5] 汪远远, 邹艳, 刘朝霞, 等. 猪去氧胆酸对脂肪变性肝细胞活性的影响及其机制[J]. 临床肝胆病杂志(WANG Y Y, ZOU Y, LIU Z X, et al. Effect of hyodeoxycholic acid on the activity of steatosis hepatocytes and its mechanism [J]. Journal of Clinical Hepatology), 2024, doi:10.13865/j.cnki.cjhbmb.2024.10.1244.
- [6] CAMELL C D, SANDER J, SPADARO O, et al. Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing [J]. Nature, 2017, 550(7674): 119-23.
- [7] 王艳, 宋志勇, 艾卫敏, 等. miR-193a-5p通过HDAC9-ABCA1/G1途径抑制巨噬细胞脂质蓄积[J]. 中国生物化学与分子生物学报(WANG Y, SONG Z Y, AI W M, et al. Mir-193a-5p inhibits macrophage lipid accumulation via the HDAC9-ABCA1/G1 pathway [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology), 2024, doi: 10.13865/j.cnki.cjhbmb.2024.10.1244.
- [8] 崔帅帅, 杨晓红. miRNA在骨髓间充质干细胞自我更新、多向分化及命运和功能调控中的作用[J]. 中国组织工程研究(CUI S S, YANG X H. Role of miRNA in self-renewal, multidirectional differentiation, and fate and functional regulation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research), 2022, 26(1): 101.
- [9] CATALANOTTO C, COGONI C, ZARDO G. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(10): 1712.
- [10] WU W, XU K, LI M, et al. MicroRNA-29b/29c targeting CTRP6 influences porcine adipogenesis via the AKT/PKA/MAPK signalling pathway [J]. Adipocyte, 2021, 10(1): 264-74.
- [11] KOOPMANS P J, ISMAEEL A, GOLJANEK-WHYSALL K, et al. The roles of miRNAs in adult skeletal muscle satellite cells [J]. Free Radic Biol Med, 2023, 209: 228-38.

- [12] XU K, JI M, HUANG X, et al. Differential regulatory roles of microRNAs in porcine intramuscular and subcutaneous adipocytes [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(13): 3954-62.
- [13] ZHANG T, ZHANG Y, LIU J, et al. MicroRNA-377-3p inhibits hepatocellular carcinoma growth and metastasis through negative regulation of CPT1C-mediated fatty acid oxidation [J]. *Cancer Metab*, 2022, 10(1): 2.
- [14] ZHANG Y, LI C, LI H, et al. miR-378 activates the pyruvate-PEP futile cycle and enhances lipolysis to ameliorate obesity in mice [J]. *EBioMedicine*, 2016, 5: 93-104.
- [15] YANG Y, LI W, WEI B, et al. MicroRNA let-7i inhibits histone lysine demethylase KDM5B to halt esophageal cancer progression [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 22: 846-61.
- [16] 潘洋洋, 景灵婕, 乔利英, 等. 绵羊miR-191靶基因预测、功能分析及在脂肪组织中的表达[A]. 中国畜牧兽医学会信息技术分会第十届学术研讨会论文集(PAN Y Y, JING J J, QIAO L Y, et al. Target gene prediction, functional analysis and expression of ovine miR-191 in adipose tissue [A]. *Chinese Association of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*), 2015: 153-60.
- [17] 刘帅, 宁小敏, 李美航, 等. miR-191通过调控C/EBP β 转录影响猪前体脂肪细胞分化[J]. *生物化学与生物物理进展*(LIU S, NING X M, LI M H, et al. miR-191 affects porcine preadipocyte differentiation by regulating C/EBP β transcription [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*), 2013, 40(2): 165-76.
- [18] JI S, LI W, BAO L, et al. Pu.1 promotes miR-191 to inhibit adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 451(2): 329-33.
- [19] YANG H Y, YUE B L, YANG S L, et al. circVBE3C modulates myoblast development by binding to mir-191 and upregulating the expression of p27 [J]. *J Cell Physiol*, 2024, 239(2): e31159.
- [20] MORI K, SUN H K, MIURA K, et al. Involvement of DPY19L3 in myogenic differentiation of C2C12 myoblasts [J]. *Molecules*, 2021, 26(18): 5685.
- [21] YAN E F, SUN H J, HE L J, et al. Dietary inositol supplementation improves meat quality by modulating amino acid metabolism and gut microbiota composition of finishing pigs [J]. *Animal Nutrition*, 2024, 19: 180-91.
- [22] 岳永起, 华永琳, 熊燕, 等. microRNA调控动物皮下脂肪组织和肌内脂肪沉积的研究进展[J]. *畜牧兽医学报*(YUE Y Q, HUA Y L, XIONG Y, et al. Research progress on the regulation of subcutaneous and intramuscular fat deposition by microRNA in animals [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*), 2021, 52(10): 2698-709.
- [23] 何玉琳, 靳建军, 李栋, 等. MicroRNA调控猪骨骼肌发育的研究进展[J]. *生物工程学报*(HE Y L, JIN J J, LI D, et al. Research progress on the regulation of porcine skeletal muscle development by microRNA [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*), 2023, 39(4): 1514-24.
- [24] 佟雪溪, 赵刚. miR-191-5p通过靶向TJP1调控Cal-27细胞增殖、侵袭和迁移的体外研究[J]. *口腔医学杂志*(TONG X X, ZHAO G. *In vitro* study on miR-191-5p targeting TJP1 to regulate the proliferation, invasion and migration of Cal-27 cells [J]. *Journal of Oral Science Research*), 2023, 43(11): 981-8.
- [25] 吕俊, 吴森, 杨晓波, 等. 血清miR-191-5p、miR-101-3p与胃癌患者临床病理特征、PI3K/Akt信号通路及预后的关系研究[J]. *现代生物医学进展*(LÜ J, WU M, YANG X B, et al. Study on the relationship between serum miR-191-5p, miR-101-3p and clinicopathological features, PI3K/Akt signaling pathway and prognosis in gastric cancer patients [J]. *Progress in Modern Biomedicine*), 2024, doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.17.033.
- [26] GUO J, DING Q, LIU Z, et al. Biological characteristics and immunoregulation of exosomes derived from mesenchymal stem cells [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26(7): 1093.
- [27] TIAN Y, LI X, BAI C, et al. lncRNA miR503HG targets miR-191-5p/PLCD1 axis and negatively modulates apoptosis, extracellular matrix disruption, and inflammation in abdominal aortic aneurysm [J]. *Mediat Inflamm*, 2023, 2023(1): 4003618.
- [28] CARPI S, POLINI B, NIERI D, et al. Extracellular vesicles induce nuclear factor- κ B activation and interleukin-8 synthesis through miRNA-191-5p contributing to inflammatory processes: potential implications in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(8): 1030.
- [29] GUZ M, MAĐRO A, CYBULSKI M, et al. Correlations of miR-1290 and miR-191-5p with laboratory parameters as a useful test to differentiate pancreatic cancer from chronic pancreatitis: preliminary study [J]. *Med Stud*, 2023, 39(2): 114-21.
- [30] BERGMAN M T, ZHANG W, LIU Y, et al. Binding modalities and phase-specific regulation of cyclin/cyclin-dependent kinase complexes in the cell cycle [J]. *J Phys Chem B*, 2024, 128(39): 9315-26.
- [31] GHAFOURI-FARD S, KHOSHBAKHT T, HUSSEN B M, et al. A review on the role of cyclin dependent kinases in cancers [J]. *Cancer Cell International*, 2022, 22(1): 325.
- [32] KAULICH M, LINK V M, LAPEK J D, et al. A CDK4/6-dependent phosphorylation gradient regulates the early to late G₁ phase transition [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 14736.
- [33] ZIEGLER D V, PARASHAR K, FAJAS L. Beyond cell cycle regulation: The pleiotropic function of CDK4 in cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2024, 98: 51-63.
- [34] LI J, ZHANG H Y, WANG F, et al. The cyclin B2/CDK1 complex conservatively inhibits separase activity in oocyte meiosis ii [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.648053.
- [35] FANG H, ZHANG Y, LIN C, et al. Primary microcephaly gene CENPE is a novel biomarker and potential therapeutic target for non-WNT/non-SHH medulloblastoma [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 14: 1227143.
- [36] SHIRAKAWA T, TOYONO T, INOUE A, et al. Factors regulating or regulated by myogenic regulatory factors in skeletal muscle stem cells [J]. *Cells*, 2022, 11(9): 1493.
- [37] 付玉, 张博, 凌遥, 等. 骨骼肌生长发育过程及调控研究现状[J]. *中国畜牧兽医*(FU Y, ZHANG B, LING Y, et al. Reviews on process and regulation of skeletal muscle growth and development [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*), 2021, 48(10): 3565-74.
- [38] HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ J M, GARCÍA-GONZÁLEZ E G, BRUN C E, et al. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration [C]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 72: 10-18.
- [39] 罗敬, 雷开英, 石嵩, 等. 顺式调控元件在动物骨骼肌纤维类型决定和转化中的作用[J]. *遗传*(LUO J, LEI K Y, SHI S, et al. Role of cis-regulatory elements in determination and transformation of animal skeletal muscle fiber types [J]. *Hereditas*), 2025, 47(4): 437-47.
- [40] 程春芳, 万娟, 丁恺志, 等. 成肌细胞增殖与分化及其调控机

- 制[J]. 中国组织工程研究(CHENG C F, WAN J, DING K Z, et al. Proliferation and differentiation of myoblasts and their regulatory mechanisms [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research), 2023, 27(14): 2200.
- [41] LALA-TABBERT N, ALSUDAIS H, MARCHILDON F, et al. CCAAT/enhancer binding protein β is required for satellite cell self-renewal [J]. Skeletal muscle, 2016, 6: 1-11.
- [42] MA Q, MENG Z, MENG Y, et al. A moonlighting function of choline kinase alpha 2 in the initiation of lipid droplet lipolysis in cancer cells [J]. Cancer Commun, 2021, 41(10): 933.
- [43] HABIB S, JOHNSON A. An overview of pathogenesis of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease [J]. Explor Dig Dis, 2024, 3(6): 459-73.
- [44] MURUGANANDAN S, IONESCU A M, SINAL C J. At the crossroads of the adipocyte and osteoclast differentiation programs: future therapeutic perspectives [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2277.
- [45] YAN H, LI Q, LI M, et al. Ajuba functions as a co-activator of C/EBP β to induce expression of PPAR γ and C/EBP α during adipogenesis [J]. Mol Cell Endocrinol, 2022, 539: 111485.
- [46] 刘可可, 钟洁, 李红强, 等. 猪脂肪酸结合蛋白4启动子的克隆及转录活性分析[J]. 中国细胞生物学学报(LIU K K, ZHONG J, LI H Q, et al. Cloning and transcriptional activity analysis of porcine fatty acidbinding protein 4 promoter [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2022, 44(2): 283-9.
- [47] LIU Y, HE T, LI Z, et al. TET2 is recruited by CREB to promote Cebpb, Cebpa, and Pparg transcription by facilitating hydroxy-methylation during adipocyte differentiation [J]. Iscience, 2023, 26(11): 108312.
- [48] YU H, GUO J, LI B, et al. Erucic acid promotes intramuscular fat deposition through the PPAR γ -FABP4/CD36 pathway [J]. Int J Biol Macromol, 2025, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.140121.
- [49] WU W, WANG S, XU Z, et al. Betaine promotes lipid accumulation in adipogenic-differentiated skeletal muscle cells through ERK/PPAR γ signalling pathway [J]. Mol Cell Biochem, 2018, 447: 137-49.
- [50] PAN S, ZHANG L, LIU Z, et al. Myostatin suppresses adipogenic differentiation and lipid accumulation by activating crosstalk between ERK1/2 and PKA signaling pathways in porcine subcutaneous preadipocytes [J]. J Anim Sci, 2021, 99(12): skab287.