

基于 ATAC-seq 筛选调控肉牛肌肉发育的关键转录因子

楚洪恩¹, 刘源¹, 白雪¹, 杨梦丽¹, 刘涛¹, 李芬², 李兰兰¹✉, 马云¹✉

¹宁夏回族自治区反刍动物分子细胞育种重点实验室/宁夏大学动物科技学院, 银川 750021; ²宁夏大学食品科学与工程学院, 银川 750021

摘要:【目的】牛作为反刍动物, 肌肉生长发育周期长, 但在牛背最长肌发育过程中, 染色质可及性的调控机制尚未明确。通过探究安格斯牛和西门塔尔牛背最长肌中染色质可及性的差异, 筛选影响牛肌肉生长的关键转录因子, 进而构建 TF-gene 调控网络, 为深入研究牛肌肉发育的表观遗传调控机制提供理论依据和新的分子靶点。【方法】采集饲养管理方式相同的 24 月龄安格斯牛和西门塔尔牛各 3 头的背最长肌组织, 依据国家标准《食品中氨基酸的测定》(GB 5009.124-2016) 进行氨基酸含量检测, 利用 SPSS 9.4 软件通过 t 检验进行组间背最长肌氨基酸含量差异显著性分析; 并将采集的背最长肌组织进行 ATAC-seq 测序, 通过识别染色质开放区 (peak), 进行组间差异 peak 分析、GO/KEGG 功能富集分析、转录因子结合位点 (motif) 富集分析; 并结合前期的 RNA-seq 测序得到的差异表达基因 (DEGs), 基于 GTRD 数据库与基迪奥云平台构建转录因子-基因 (TF-gene) 调控网络。【结果】结果表明: (1) AGS 组背最长肌中赖氨酸 (Lys)、丝氨酸 (Ser)、精氨酸 (Arg)、组氨酸 (His)、谷氨酸 (Glu) 含量显著高于 XM 组 ($P < 0.05$); 而脯氨酸 (Pro) 含量则相反 ($P < 0.05$), 说明氨基酸代谢表型在两组间显著差异; (2) 染色质可及性在两组间整体保守, 共检测到安格斯牛 29 140 个 peak, 西门塔尔牛 28 781 个 peak, 两组间染色质开放区域主要分布在转录起始位点 (TSS) ± 2 kb, 且在内含子区、远端基因间区和启动子区占比超过 84.57%。(3) 在两组间鉴定出 6 185 个差异 peak, 其中 5 030 个上调, 1 155 个下调, 将差异 peak 注释到相关基因后, 进行 GO/KEGG 富集分析发现, 差异 peak 相关基因主要富集在解剖结构形态发生、肌肉结构发育、肌动蛋白丝介导过程、Hippo 信号通路、MAPK 信号通路、钙信号通路、肌动蛋白细胞骨架调控等经典肌肉发育相关通路。(4) Motif 富集分析显示, 在显著富集的前 20 个转录因子结合基序中, 排名前 4 位均属于 MEF2 转录家族, 分别是 *MEF2C*、*MEF2A*、*MEF2D* 与 *MEF2B*; 进一步聚焦 AGS 特异性 peak 和前期 RNA-seq 测序得到的差异表达基因交集分析, 发现 *MEF2B* 与 *MEF2D* 结合位点富集程度最高, 成功构建以 *MEF2B* 与 *MEF2D* 为核心转录因子的 TF-gene 调控网络, 共筛选到 *ACTA1*、*CKM*、*CLCN1*、*SLN*、*MYOZ3* 等 13 个参与肌肉发育调控的靶基因; 并利用 IGV 可视化证实上述靶基因启动子区存在 *MEF2B* 和 *MEF2D* 结合基序, 并与 ATAC-seq 开放区域高度重合。【结论】本研究通过 ATAC-seq 和 RNA-seq 数据联合分析, 揭示了安格斯牛和西门塔尔牛在背最长肌发育过程中的染色质可及性差异, 并筛选到 *MEF2B* 和 *MEF2D* 作为调控牛肌肉生长的关键转录因子 (TFs), 构建以 *MEF2B* 与 *MEF2D* 为核心转录因子的 TF-gene 调控网络, 为深入解析肉牛肌肉发育表观遗传机制及 CRISPR-Cas9 功能验证提供了理论基础。

关键词: 染色质可及性; 肌肉发育; 背最长肌; 氨基酸; ATAC-seq

The Key Transcription Factors Regulating Beef Cattle Muscle Development Screened by ATAC-seq

CHU HongEn¹, LIU Yuan¹, BAI Xue¹, YANG MengLi¹, LIU Tao¹, LI Fen², LI LanLan¹✉, MA Yun¹✉

¹Key Laboratory of Molecular Cell Breeding of Ruminants in Ningxia Hui Autonomous Region/College of Animal Science and Technology, Ningxia University, Yinchuan 750021; ²School of Food Science and Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021

收稿日期: 2025-10-27; 接受日期: 2026-06-04

基金项目: 科技创新 2030-重大项目 (2023ZD0404803-02)、宁夏回族自治区重点研发计划 (2023BCF01006, 2024BBF01007)、宁夏回族自治区科技创新领军人才培养项目 (2020GKLRXLX02)

联系方式: 楚洪恩, Tel: 18749831533; E-mail: chuhongen0601@163.com. 通信作者李兰兰, E-mail: llanlan@nxu.edu.cn. 通信作者马云, Tel: 13639508535; E-mail: mayun@nxu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 As a ruminant animal, cattle has a long muscle growth and development cycle. However, the regulatory mechanism of chromatin accessibility on bovine longissimus dorsi is not clear during the development of longissimus dorsi. This study aimed to explore the differential chromatin accessibility of the longissimus dorsi muscle of Angus cattle and Simmental cattle, screen the key transcription factors affecting bovine muscle growth, and then construct the TF-gene regulatory network, so as to provides the theoretical basis and new molecular target for further study of the epigenetic regulation mechanism of bovine muscle development. 【Method】 The longissimus dorsi muscle tissues of 24-month-old Angus cattle (AGS) and Simmental cattle (XM) with the same feeding and management methods were collected, and the amino acid content was detected according to the national standard Determination of amino acids in food (GB 5009.124-2016). SPSS 9.4 software was used to analyze the significant difference of amino acid content in longissimus dorsi muscle between groups by t test. The collected longissimus dorsi muscle tissue was subjected to ATAC-seq sequencing. By identifying the chromatin open area (peak), peak analysis, GO/KEGG functional enrichment analysis, and transcription factor binding site (motif) enrichment analysis were performed. Combined with the differentially expressed genes (DEGs) obtained from the previous RNA-seq sequencing, a transcription factor-gene (TF-gene) regulatory network was constructed based on the GTRD database and the OmicShare Tools. 【Result】 The results showed as follows: (1) The content of lysine (Lys), serine (Ser), arginine (Arg), histidine (His) and glutamic acid (Glu) in longissimus dorsi muscle of AGS group were significantly higher than those of XM group ($P < 0.05$); the content of proline (Pro) was the opposite ($P < 0.05$), indicating that the amino acid metabolic phenotype was significantly different between the two groups. (2) Chromatin accessibility was generally conserved between the two groups. A total of 29 140 peaks were detected in Angus cattle and 28 781 peaks were detected in Simmental cattle. The chromatin open regions between the two groups were mainly distributed at the transcription start site (TSS) ± 2 kb, and accounted for more than 84.57 % in the intron region, distal intergenic region and promoter region. (3) A total of 6 185 differential peaks were identified between the two groups, of which 5 030 peaks were up-regulated and 1155 were down-regulated. After the differential peak were annotated to related genes, GO/KEGG enrichment analysis showed that the differential peak-related genes were mainly enriched in classical muscle development-related pathways, such as anatomical morphogenesis, muscle structure development, actin filament-mediated, Hippo signaling pathway, MAPK signaling pathway, calcium signaling pathway, and actin cytoskeleton regulation. (4) Motif enrichment analysis showed that among the top 20 transcription factor binding motifs, the top four belonged to the MEF2 transcription family, which were *MEF2C*, *MEF2A*, *MEF2D*, and *MEF2B*, respectively. Further focusing on the intersection analysis of AGS-specific peak and differentially expressed genes obtained by previous RNA-seq sequencing, it was found that the binding sites of *MEF2B* and *MEF2D* were the most enriched, and the TF-gene regulatory network with *MEF2B* and *MEF2D* as the core transcription factors was successfully constructed. A total of 13 target genes involved in muscle development regulation were screened, including *ACTA1*, *CKM*, *CLCN1*, *SLN*, and *MYOZ3*. IGV visualization confirmed the presence of *MEF2B* and *MEF2D* binding motifs in the promoter region of the above target genes, and highly overlapped with the open region of ATAC-seq. 【Conclusion】 In this study, the combined analysis of ATAC-seq and RNA-seq data revealed the differences in chromatin accessibility between Angus cattle and Simmental cattle during the development of longissimus dorsi muscle, and screened *MEF2B* and *MEF2D* as key transcription factors (TFs) regulating bovine muscle growth. The TF-gene regulatory network with *MEF2B* and *MEF2D* as core transcription factors was constructed, which provided a theoretical basis for further analysis of the epigenetic mechanism of muscle development in beef cattle and functional verification of CRISPR-Cas9.

Key words: chromatin accessibility; muscle development; longissimus dorsi; amino acids; ATAC-seq

0 引言

【研究意义】在畜牧业实际生产中,肌肉发育与日增重指数和胴体品质密切相关,对养殖场的经济收入有直接的影响^[1]。肌纤维的生化特性(如脂肪沉积、纤维类型)直接影响肉质的嫩度、风味和多汁性^[2]。西门塔尔牛是体型大、骨骼粗壮、结缔组织含量高的兼用型经典品种;而安格斯牛具有早熟、高屠宰率的

特性,其背最长肌生长速度快、肌纤维直径大、氧化性肌纤维比例相对较高。背最长肌是牛最重要的骨骼肌之一,其生长发育是一个多阶段、多因子的动态过程,受表观遗传修饰、基因表达调控网络、营养条件 and 环境因素等多层次协同调控^[3-4],但具体的转录调控机制尚未明晰,探明其相关的调控机制对优化牛产肉性状具有关键作用,可为肉牛遗传改良和新品种培育提供理论基础。【前人研究进展】表观遗传修饰与基

因表达直接影响肌纤维类型和生长潜力的上限^[5], YUE 等^[6]研究发现, 在猪胎儿发育过程中, 染色质可及性在猪胚胎肌肉发育中通过影响转录因子的结合, 来调控肌肉发育中关键基因的时空表达模式。MIAO 等^[7]对不同品种猪骨骼肌进行了 ATAC-seq 分析, 发现了转录因子 *TFAP4*、*MAX*、*NHLH1*、*FRX5* 和 *TGIF1* 影响肌肉生长发育。GU 等^[8]通过对不同品种鸡在不同阶段的胸肌进行 ATAC-seq 测序, 揭示了 *ACTC1* 和 *MUSTN1* 作为关键转录因子, 对鸡出生后快速生长期的肌肉生长网络的调控作用。CAO 等^[9]利用 ATAC-seq 对不同阶段湖羊的肌肉组织进行分析, 结果表明, 染色质可及性有助于调节湖羊出生后骨骼肌的生长和肌纤维转化。ZHAO 等^[10]通过对赣南牦牛和 Jeryak 背最长肌进行 ATAC-seq 分析, 筛选到了 *FOXO1*、*ZBED6*、*CRY2* 和 *CFL2* 可能参与骨骼肌发育, 基因和转录因子调控网络图谱发现, *YY1*、*KLF4*、*KLF5* 和 *BACH1* 等转录因子参与骨骼肌发育。综上所述, 染色质可及性在畜禽肌肉生长发育过程中通过调控转录因子的结合, 影响基因的表达。【本研究切入点】尽管在猪、鸡、羊等畜禽中鉴定到潜在调控肌肉发育的转录因子, 但这些关键的转录因子的保守性与物种特异性仍不明确, 而牛作为反刍动物, 肌肉生长发育周期长, 其独特的瘤胃微生物-宿主互作体系影响氨基酸稳态。有研究报道牛成肌细胞在体外增殖和分化过程中, 染色质可及性和基因表达的动态变化与 GWAS 相结合, 发现牛生长发育性状的 GWAS 信号在骨骼肌发育的染色质中显著富集, 阐明了骨骼肌发育相关顺式调节元件中遗传变异的活性^[11], 但在牛背最长肌发育过程中, 染色质可及性的调控机制尚未明确。【拟解决的关键问题】本研究以 24 月龄安格斯牛和西门塔尔牛为研究对象, 聚焦安格斯牛早熟特性, 采集背最长肌进行 ATAC-seq 分析, 旨在探索牛背最长肌组织染色质可及性差异, 以初步筛选影响牛肌肉发育的关键转录因子, 构建 TF-gene 调控网络, 为下一步深入探究牛肌肉发育表观修饰和转录调控机制提供新的分子材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品采集 试验所用牛由内蒙古科尔沁肉牛种业股份有限公司提供, 于 2024 年 7 月分别随机选择 3 头饲养管理水平相同的 24 月龄安格斯牛 (AGS) 和西门塔尔牛 (XM) 公牛进行屠宰。牛屠宰前 24h 禁食, 自由饮水。宰后无菌采集左侧胴体第 12 和 13 根

肋骨之间背最长肌组织, 将收集的样品放入 2 mL 冻存管中, 并进行液氮速冻, 干冰冷冻运输到广州基迪奥生物科技有限公司和苏州梦犀生物医药科技有限公司分别进行 ATAC-seq 和氨基酸含量检测。本试验所有的动物试验均经过宁夏大学科技伦理委员会批准 (NXU-2024-168)。

1.1.2 主要仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 赛分 Amethyst C18-H (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 超声波清洗器, 湘仪高速冷冻离心机, 旋涡混合器, 氮吹仪, 烘箱。

1.1.3 主要试剂 17 种氨基酸标准品 (wako), 色氨酸标准品, HPLC 级乙腈, 盐酸 (国药集团化学试剂有限公司), 正亮氨酸, 三乙胺 (国药集团化学试剂有限公司), 异硫氰酸苯酯 (sigma), 正己烷 (国药集团化学试剂有限公司), 冰醋酸 (上海生工生物有限公司), 无水乙酸钠 (国药集团化学试剂有限公司), 超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 氨基酸含量检测 氨基酸含量测定方法^[12]按照国家标准《食品中氨基酸的测定》(GB 5009.124—2016) 中所述方法进行测定。

1.2.2 ATAC-seq 文库构建与质控 ATAC-seq 测序文库构建主要分 4 步完成, 分别为: 细胞裂解并提取细胞核, 在细胞核悬液中加入 Tn5 转座酶进行转座反应; 反应完成后纯化 DNA 片段, 随后利用扩增产物进行 PCR 扩增, 使用 AMPure XP 磁珠纯化片段 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA); 文库构建完成后, 采用 Agilent 2100 (Agilent, Santa Clara, CA) 进行质量检测; 经质量评估合格的文库用于 NovaSeq X Plus 平台测序, 获得待测开放染色质区域片段序列信息。

1.2.3 ATAC-seq 数据分析 通过使用 FASTP^[13] (Version: 0.19.5) 对下机的 clean reads 再进行更严格的过滤, 得到高质量读段 (high quality clean reads)。质控合格后得到的高质量读段使用对比软件 Bowtie2 (Version: 2.2.8)^[14] 比对到参考基因组 (GCF_002263795.2_ARS-UCD1.3), 最终比对到基因组上唯一位置的 reads 利用 MACS2 (version: 2.1.2)^[15] 分析软件在全基因组范围进行开放染色质富集区域扫描 (peak calling), 默认阈值为 $q < 0.05$, 并对 peak 在基因组上的位置信息、peak 区域序列信息等进行分析, 剔除远端基因间区 (peak 位于基因组上游 2 kb 以外或基因下游 500 bp 以外) 的 peak 后, 筛选对应的 peak

相关基因。利用 DiffBind^[16]软件对比较组间的所有 peak 进行差异分析,选择丰度差异倍数 $\log_2 \text{FC} > 1$, $\text{FDR} < 0.05$, 并注释到差异 peak 的相关基因。利用在线工具 GO (Gene Ontology) (<https://www.geneontology.org/>) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<https://www.genome.jp/kegg/>) 数据库对差异 peak 相关基因进行富集分析,显著富集标准为 $P < 0.05$ 。利用在线工具 MEME Suite (<http://meme-suite.org/>) 中 motif 富集分析 (analysis of motif enrichment, AME) 对各样本中已知的 TF-motif 进行富集分析, motif 显著富集标准为 $E < 10$, $P < 0.05$ 。利用 JASPAR 数据库 (<https://jaspar.elixir.no/>) 将富集到的 motif 进行检索最有可能与 motif 结合的转录因子。使用在线的基因转录调控数据库 GTRD (v20.06) (<http://gtrd20-06.biouml.org/>) 预测转录因子的靶基因及其相互作用关系,使用基迪奥云平台 ([omicshare.com/\) 绘制 TF-gene 调控网络图。](https://www.</p></div><div data-bbox=)

1.3 数据统计分析

数据采用 SPSS 9.4 软件进行单因素方差分析,氨基酸含量用“平均值±标准差”表示,通过 t 检验进行组间差异显著性分析;相关性分析用 Pearson 相关系数进行计算。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 背最长肌氨基酸含量分析

由表 1 可知, AGS 组和 XM 组背最长肌中检测到 17 种氨基酸,其中必需氨基酸 8 种、非必需氨基酸 9 种。其中 AGS 组背最长肌中赖氨酸 (Lys)、丝氨酸 (Ser)、精氨酸 (Arg)、组氨酸 (His)、谷氨酸 (Glu) 含量显著高于 XM 组 ($P < 0.05$), 而 XM 组背最长肌中脯氨酸 (Pro) 含量显著高于 AGS 组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组背最长肌氨基酸含量统计

Table 1 Statistics of amino acid content in longissimus dorsi muscle of each group

必需氨基酸 EAA($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	安格斯牛 AGS	西门塔尔牛 XM	非必需氨基酸 NEAA($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ FW)	安格斯牛 AGS	西门塔尔牛 XM
甲硫氨酸 Met	10.89±1.85	9.49±0.22	甘氨酸 Gly	77.44±2.88	70.17±7.14
赖氨酸 Lys	68.80±13.04a	28.12±6.85b	丙氨酸 Ala	258.28±26.76	281.53±24.40
苯丙氨酸 Phe	19.67±4.45	17.53±1.42	丝氨酸 Ser	127.76±3.62a	95.19±8.68b
色氨酸 Trp	9.24±0.76	6.18±1.29	脯氨酸 Pro	38.03±1.44b	46.59±1.83a
缬氨酸 Val	35.45±6.92	30.50±6.58	酪氨酸 Tyr	25.64±3.68	22.47±4.76
苏氨酸 Thr	37.63±4.74	27.88±0.31	精氨酸 Arg	82.59±2.36a	38.97±2.27b
亮氨酸 Leu	42.08±6.55	36.40±0.35	组氨酸 His	102.6±2.29a	46.05±7.47b
异亮氨酸 Ile	28.54±4.29	24.24±2.72	天冬氨酸 Asp	7.24±1.1	5.85±0.91
			谷氨酸 Glu	94.63±3.33a	34.67±3.46b

在同一组数据中,不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 无字母或相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)

In the same set of data, different letters showed significant differences ($P < 0.05$); No letter or the same letter indicated no significant difference ($P > 0.05$)

2.2 背最长肌组织的 ATAC-seq 测序结果及质量评估

本研究选用 24 月龄 AGS 和 XM 背最长肌进行 ATAC-seq, 共设 AGS 组和 XM 组两个处理组, 每组 3 个生物学重复。对测序结果进行分析 (表 2), 每个处理组至少获得了 14 105 058 600 个碱基, 对原始数据进行质控后, 每个样品最少保留了 10 980 107 923 bp 个符合要求的碱基, 将质控合格的碱基对比到牛参考基因组 (GCF_002263795.2_ARS-UCD1.3) 后, 每个文库至少得到了 63 286 080 个能正确比对到参考基因组的高

质量读段, 且文库的唯一比对率均大于 66.33%。综上所述, 表明测序数据可用于后续数据分析。

2.3 背最长肌组织的全基因组染色质可及性检测

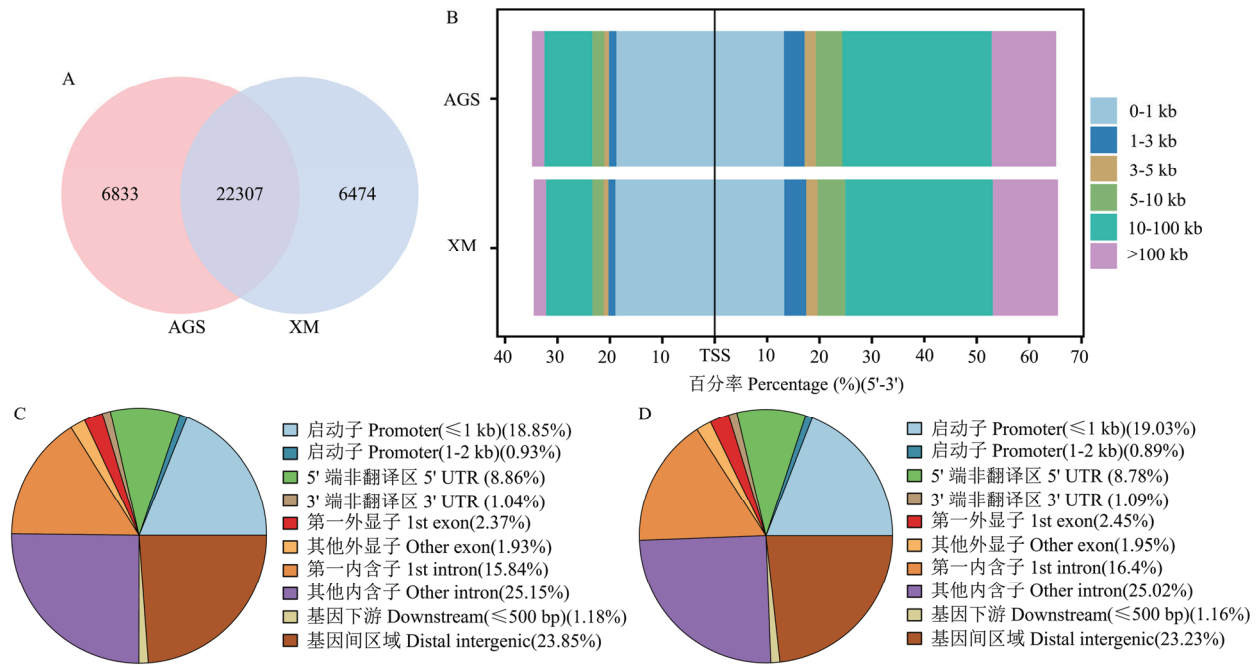
利用 MACS2 对全基因范围进行 peak (染色质开放区) 扫描 (peak calling), 在 AGS 组中扫描到 29 140 个 peak, XM 组中扫描到 28 781 个 peak (图 1-A), 对富集在 TSS 区域的 peak 进行统计, 发现富集在 $\text{TSS} \pm 2 \text{ kb}$ 区域富集密度最高 (图 1-B), 说明这个区域的染色质处于高度开放状态。

表 2 ATAC-seq 测序数据统计
Table 2 ATAC-seq sequencing data statistics

样品 Sample	下机数据碱基总数 Clean date (bp)	过滤后有效碱基总数 HQ clean date (bp)	唯一比对的 reads 数目 Unique mapped reads	唯一比对的 reads 比例 Unique mapped rate (%)
AGS-1	14541584400	10980107923	65580095	67.92
AGS-2	14919508800	11321472992	66649331	67.33
AGS-3	16304789400	12394515837	74550934	68.88
XM-1	17579211000	13510839920	80089254	68.68
XM-2	14105058600	11076552540	63286080	67.66
XM-3	15497562000	11696995991	68232416	66.33

将基因组划分为启动子区域 (promoter) (基因上游 2 kb 以内)、5'非翻译区 (5' UTR)、3'非翻译区 (3' UTR)、外显子区域(exon)、内含子区域(intron)、基因下游区域 (downstream) (基因下游 500 bp 以内)和基因间区域 (distal intergenic) (基因上游 2 kb 以外或基因下游 500 bp 以外)7 类不同区域。对 peak 进行富集分析发现 (图 1-C、D), 在 AGS 组中, 被注释到内含子区域的 peak 最多, 占比达到 40.99%, 其次是位于基因间区、启动子区、分别占比 23.85%、

19.78%; 在 XM 组中, 内含子区仍然是开放性最强的区域, 有 41.42%的 peak 被注释到该区域, 另有 23.23%和 19.92%分别被注释到基因间区和启动子区。与 XM 组相比, AGS 组中富集在内含子、启动子的 peak 比例减少, 而基因间区富集增多; 总体而言, 各组 peak 在基因组功能元件上的分布高度相似, 各组 peak 富集最多的区域是内含子区、远端基因区和启动子区, 这三类区域的 peak 占到了各组 peak 总数的 84.57%以上。



A: AGS VS XM 背最长肌染色质开放区扫描; B: AGS VS XM 相对 TSS 距离分布比例图; C: AGS 组 peak 在基因功能元件上分布比例图; D: XM 组 peak 在基因功能元件上分布比例图
A: AGS VS XM Peak Calling; B: AGS VS XM relative TSS distance distribution ratio map; C: AGS peak distribution on gene functional elements; D: XM peak distribution on gene functional elements .

图 1 染色质可及性检测
Fig. 1 Chromatin accessibility detection

2.4 差异 peak 相关基因功能富集分析

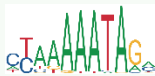
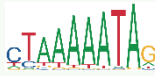
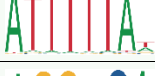
利用 DiffBind 软件, 以 $\log_2 FC > 1$, $FDR < 0.05$ 为筛选标准, 在 AGS 和 XM 组间进行差异 peak 分析, 共筛选到 6 185 个差异 peak, 其中 5 030 个上调, 1 155 个下调 (图 2-A)。火山图显示共鉴定到了大量差异 peak, 其中显著上调的 peak 数量远多于下调的 peak, 与柱状图结果一致 (图 2-B)。将筛选到的差异 peak 注释到相关基因, 剔除远端基因间区的 peak 对应的相关基因后, 将注释到的相关基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析表明 (图 2-C), 在显著性排列 TOP20 的生物学进程条目中, 与肌肉发育相关的条目被大量富集, 例如: 解剖结构形态发生 (GO:0009653, anatomical structure morphogenesis)、系统发育 (GO:0048731, system development)、组织发育 (GO:0009888, tissue development)、肌肉结构发育 (GO:0061061, muscle structure development)、动物器官发育 (GO:0048513, animal organ development)、细胞分化 (GO:0030154, cell differentiation)、肌动

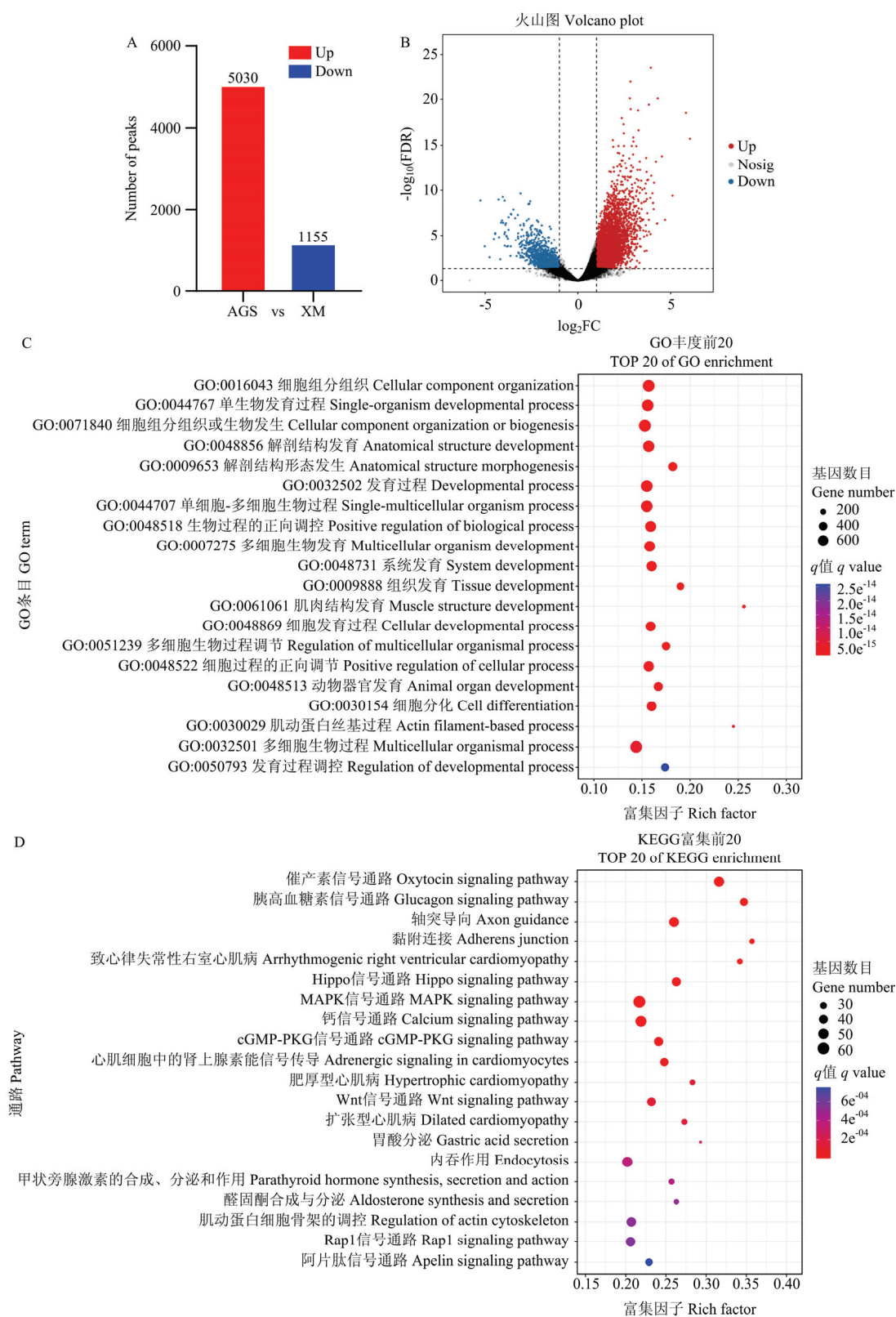
蛋白丝介导过程 (GO:0030029, actin filament-based process)。KEGG 富集分析表明 (图 2-D), 在显著性 TOP20 的信号通路中, 差异 peak 相关基因与肌肉发育途径密切相关, 包括: Hippo 信号通路 (ko04390, Hippo signaling pathway)、MAPK 信号通路 (ko04010, MAPK signaling pathway)、钙信号通路 (ko04020, Calcium signaling pathway)、cGMP-PKG 信号通路 (ko04022, cGMP-PKG signaling pathway)、Wnt 信号通路 (ko04310, Wnt signaling pathway)、肌动蛋白细胞骨架调控 (ko04810, Regulation of actin cytoskeleton)。

2.5 组间差异 peak 的 motif 富集分析

利用 AME 软件对组间差异 peak 进行 motif 富集分析, 在 AGS-XM 组间富集到了 173 个已知转录因子, 在显著富集前 20 个转录因子 motif 中, 前 5 个转录因子中分别是 *MEF2C*、*MEF2A*、*MEF2D*、*MEF2B*、*NR4A1*, 其中有 4 个 (*MEF2C*、*MEF2A*、*MEF2D*、*MEF2B*) 属于 MEF2 转录因子家族 (表 3)。

表 3 组间显著性排序 TOP20 的 motif 统计
Table 3 Motif statistics of TOP20 in order of significance between groups

序号 Rank	结合基序 Binding motif	转录因子 TF	E 值 E-value	序号 Rank	结合基序 Binding motif	转录因子 TF	E 值 E-value
1		<i>MEF2C</i>	3.10e-37	11		<i>NR2F2</i>	1.32e-4
2		<i>MEF2A</i>	7.04e-35	12		<i>Nr1H2</i>	1.34e-4
3		<i>MEF2D</i>	7.48e-19	13		<i>SIX1</i>	1.60e-4
4		<i>MEF2B</i>	2.19e-17	14		<i>TBP</i>	1.73e-4
5		<i>NR4A1</i>	3.80e-16	15		<i>CDX1</i>	1.86e-4
6		<i>NR4A2</i>	9.85e-16	16		<i>PBX2</i>	2.28e-4
7		<i>SIX2</i>	3.64e-11	17		<i>HOXD12</i>	2.74e-4
8		<i>MEIS2</i>	3.70E-6	18		<i>NFIX</i>	4.56e-4
9		<i>Hmgal</i>	4.75e-6	19		<i>Ppara</i>	2.41e-6
10		<i>Nr1h3</i>	5.35e-6	20		<i>FOXL1</i>	7.47e-4



A: 差异 peak 柱状图; B: 差异 peak 火山图; C: GO 功能富集分析; D: KEGG 功能富集分析

A: Difference peak histogram; B: Peak difference volcano map; C: GO functional enrichment analysis; D: KEGG functional enrichment analysis

图 2 差异 peak 相关基因富集分析

Fig. 2 Differential peak-related gene enrichment analysis

2.6 牛背最长肌差异 motif 与差异表达基因联合分析

使用 DESeq2 软件, 对从 ATAC-seq 相同样品上测序得到的 AGS 组和 XM 组差异表达基因 (数据未发表), 以 $\log_2 FC>1$, $P<0.05$ 为标准筛选到了 214 个差异表达基因 (DEGs)。使用 ChIPseeker 工具将 AGS 组特有 peak 注释到相关基因, 共注释到了 4 781

个相关基因。进一步将 RNA-seq 差异基因与 AGS 组特有 peak 注释到的相关基因进行联合分析, 结果显示, 有 51 个 DEGs 的表达受到 AGS 组特有 peak 的影响 (图 3-A)。在此基础上, 笔者对这 51 个 DEGs 进行 peak 提取, 再次利用 AME 软件对提取到的 peak 进行 motif 富集分析, 结果显示富集程度最高的 2 个转录因子是 *MEF2B* 和 *MEF2D* (图 3-B)。

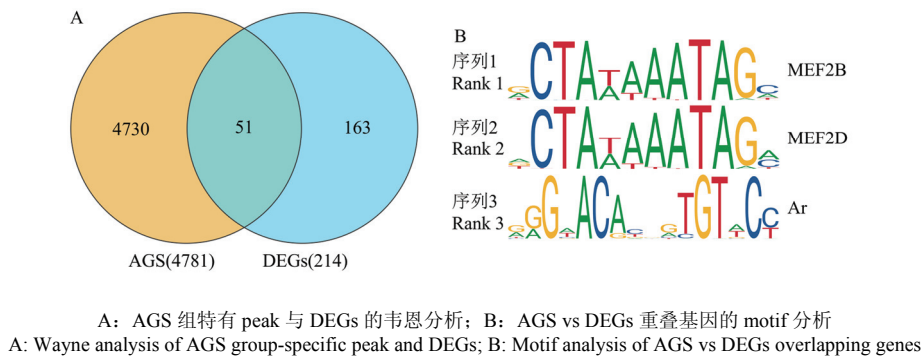


图 3 AGS 组特有 peak 与 DEGs 的联合分析

Fig. 3 Joint analysis of AGS-specific peak and DEGs

为了进一步探索关键转录因子与 DEGs 的靶向关系, 本研究将 ATAC-seq 和 RNA-seq 的重叠基因提交到 GTRD 基因转录调控数据库, 筛选出 *MEF2D* 和

MEF2B 的靶基因, 并进一步使用基迪奥云平台绘制转录因子-靶基因 (TF-gene) 调控网络图 (图 4-A)。结果发现, 在安格斯牛背最长肌发育过程中共有 13 个

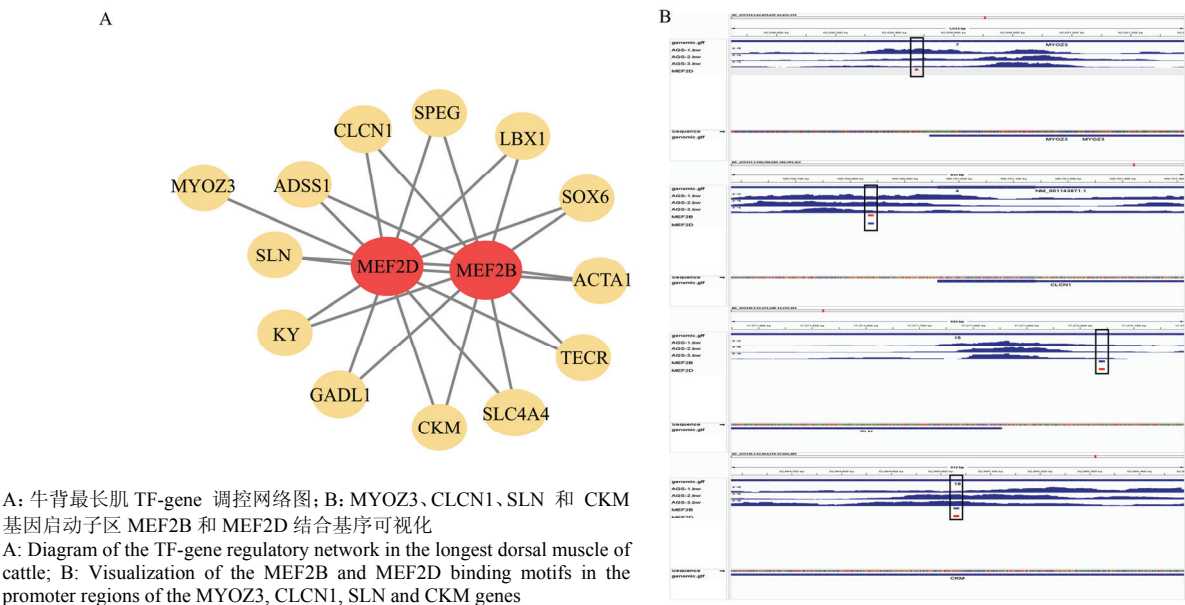


图 4 牛背最长肌的 TF-gene 调控网络图及 IGV 可视化

Fig. 4 TF-gene regulatory network diagram and IGV visualization of bovine longissimus dorsi muscle

DEGs 受转录因子 *MEF2B* 和 *MEF2D* 潜在调控, 其中 *ACTA1*、*CKM*、*CLCN1*、*SLN* 等 12 个 DEGs 同时是转录因子 *MEF2B* 和 *MEF2D* 的潜在靶基因, 只有 *MYOZ3* 受转录因子 *MEF2D* 潜在调控。选取 *MYOZ3*、*CLCN1*、*SLN* 和 *CKM* 的启动子区域, 进行 motif 扫描分析, 图 4-B 显示, 在 *MYOZ3*、*CLCN1*、*SLN* 和 *CKM* 基因启动子区均鉴定出 *MEF2B* 和 *MEF2D* 结合基序, 与 ATAC-seq 开放染色质区域高度一致, 说明 *MEF2B* 和 *MEF2D* 可直接结合这些基因的启动子并调控其转录。

3 讨论

肌肉发育直接影响畜牧业的肉产量和经济收益, 研究表明, 肌肉发育是决定畜禽肉产量及肉品质的关键因素^[17-18], 通过遗传选择或营养管理可以显著提升畜禽的生长性能^[19]。

3.1 背最长肌氨基酸差异对肌肉发育的协同调控机制

氨基酸是蛋白质的基本单位, 通过蛋白合成、调节代谢通路、影响肌卫星细胞活性等多种机制调控肌肉发育^[20]。本研究发现安格斯牛背最长肌中赖氨酸 (Lys)、丝氨酸 (Ser)、精氨酸 (Arg)、组氨酸 (His)、谷氨酸 (Glu) 的含量显著高于西门塔尔牛。提示上述差异氨基酸可能通过参与特定代谢通路和信号传导, 协同调控肌肉发育。Jin 等^[21]研究揭示了赖氨酸通过结合 *FZD7* 受体激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 促进卫星细胞 (MuSCs) 的增殖和肌生成分化的分子机制, 表明赖氨酸通过 *FZD7*- β -catenin 轴显著促进肌肉生长; Baráth 等^[22]研究发现丝氨酸生物合成途径中的磷酸丝氨酸氨基转移酶 (Psat1), 在肌肉干细胞 (MuSCs) 中通过产生 α -酮戊二酸 (α -KG) 和谷氨酰胺, 促进细胞扩增和骨骼肌再生。Gong 等^[23]发现精氨酸通过上调 *RyR1* 和电压门控钙通道表达, 增加胞质 Ca^{2+} 浓度, 进而激活 mTOR-AKT 等下游通路, 协同调控肌源性分化与肌管形成; 而组氨酸代谢中间体组氨酰二肽参与钙瞬变的维持, 通过和精氨酸互补的分子机制, 协同促进肌肉发育^[24]。此外, 本研究还发现西门塔尔牛背最长肌中脯氨酸 (Pro) 含量显著高于安格斯牛, 有研究表明大量摄入脯氨酸能够促进肌肉结缔组织蛋白合成^[25], 推测这可能是和西门塔尔牛的结缔组织含量较高的肉质特性相关^[26]。

3.2 背最长肌差异 peak 在肌肉发育相关信号通路富集分析

GO 富集分析显示, 在显著性排序 TOP20 的生物学进程条目中, 解剖结构形态发生、肌动蛋白丝介导过程等多个与肌肉发育相关的条目被显著富集^[27-29], KEGG 富集分析发现 Hippo 信号通路^[30-31]、MAPK 信号通路^[32]、钙信号通路^[33]、Wnt 信号通路^[34-35]、cGMP-PKG 信号通路^[36]和肌动蛋白细胞骨架调控通路^[37]共同构成了一个复杂的调控网络, 协调肌肉组织的发育和功能维持。

3.3 核心转录因子 *MEF2B*、*MEF2D* 及其调控靶基因功能分析

本研究通过差异 motif 与差异表达基因联合分析, 进一步证实了 *MEF2B* 和 *MEF2D* 是背最长肌发育过程中核心转录因子, 可能通过表观遗传修饰调控下游靶基因表达。进一步分析发现, *MEF2B* 和 *MEF2D* 共同调控 12 个 DEGs, 与肌肉收缩和能量代谢相关。骨骼肌 α -肌动蛋白 (*ACTA1*) 作为肌肉结构蛋白, 其主要通过肌丝组装完整性和钙敏感性调节来调控肌肉发育。在肌肉纤维化模型中, AMPK 激活可抑制 *TGF- β 1* 诱导的 Smad2/3 磷酸化, 减轻肌纤维及肌源性挛缩; 而 *ACTA1* 突变导致肌节结构破坏, 可激发 AMPK 信号抑制、*TGF- β /Smad* 通路过度活化, 进而加剧线粒体功能障碍与纤维化^[38]。肌酸激酶 M 型 (*CKM*) 作为能量代谢酶, 在肌肉收缩过程中通过磷酸肌酸系统维持 ATP 水平, 维持细胞能量稳态^[39]。在 *CKM* 功能缺陷疾病模型 (*CKM-TD*) 骨骼肌中, 泛素-蛋白酶体系、氧化应激和自噬通路显著上调, AMPK 和 ULK1 信号通路被激活; 因此 *CKM* 可能通过 AMPK/ULK1 自噬通路、蛋白酶体降解通路及氧化应激通路来维持肌肉稳态^[40]。*CLCN1* 编码 CIC-1 氯离子通道, 通过稳定肌细胞静息膜电位、调控动作电位后复极化过程, 维持骨骼正常兴奋性^[41], 其表达变化可能影响肌肉电生理特性。值得注意的是, *MYOZ3* (肌脂蛋白 3) 仅受 *MEF2D* 特异性调控, 有研究报道在鸡胚胎肌母细胞中, *MYOZ3* 过表达显著上调肌母细胞的增殖, 上调快肌基因的表达; 并富集在 PPAR 信号通路, 暗示 *MYOZ3* 可能通过 PPAR 信号通路调控肌纤维类型的转变^[42]。*SLN* 作为调控肌肉钙循环的关键基因, 受 *MEF2B* 和 *MEF2D* 潜在调控, 这一发现为后续使用 CRISPR/Cas9 系统敲除 *SLN* 基因, 探究其在肌肉发育中钙信号通路的转录调控提供了理论支撑^[43]。

4 结论

本研究通过 ATAC-seq 结合 RNA-seq 联合分析, 揭示了牛背最长肌发育过程中染色质开放性差异及其调控机制, 发现 *MEF2B* 和 *MEF2D* 结合位点在安格斯牛特异性染色质开放区域富集程度最高; TF-gene 调控网络显示 *MEF2B* 和 *MEF2D* 通过靶基因 *ACTA1*、*CKM*、*CLCN1*、*SLN*、*MYOZ3* 对肌肉发育进行调控。本研究为肉牛肌肉发育的表观遗传图谱提供新视角, 更为下一步利用 CRISPR-Cas9 敲除 *MEF2B*、*MEF2D* 下游通路的研究, 以及优质肉牛新种质资源创制提供了新的分子靶点。

参考文献 References

- [1] Chen F X, Wu P F, Shen M M, He M L, Chen L, Qiu C, Shi H Q, Zhang T, Wang J H, Xie K Z, Dai G J, Wang J Y, Zhang G X. Transcriptome analysis of differentially expressed genes related to the growth and development of the Jinghai yellow chicken [J]. *Genes*, 2019, 10(7): 539.
- [2] Muyyarikkandy M S, Schlesinger M, Ren Y Y, Gao M R, Liefeld A, Reed S, Amalaradjou M A. In ovo probiotic supplementation promotes muscle growth and development in broiler embryos [J]. *Poultry Science*, 2023, 102(7): 102744.
- [3] Han L, Yu Y, Fu R Q, Fu B L, Gao H, Li Z, Liu D H, Leng J. Impact of various ration energy levels on the slaughtering performance, carcass characteristics, and meat qualities of Honghe yellow cattle [J]. *Foods*, 2024, 13(9): 1316.
- [4] Li J S, Chen Z C, Bai Y B, Wei Y L, Guo D S, Liu Z X, Niu Y M, Shi B G, Zhang X L, Cai Y, Zhao Z D, Hu J, Wang J Q, Liu X, Li S B, Zhao F F. Integration of ATAC-seq and RNA-seq analysis to identify key genes in the longissimus dorsi muscle development of the Tianzhu white yak [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 25(1): 158.
- [5] 张维, 崔清明, 任慧波, 陈晨, 李华丽, 胡雄贵, 朱吉, 杨仕柳, 李述初, 张四阳, 彭英林, 刘莹莹. 基于转录组学研究宁乡猪肌肉的生长发育[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2025, 51(2): 80-88. Zhang W, Cui Q M, Ren H B, Chen C, Li H L, Hu X G, Zhu J, Yang S L, Li S C, Zhang S Y, Peng Y L, Liu Y Y. Study on muscle growth and development in Ningxiang pigs based on transcriptomics [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2025, 51(2): 80-88. (in Chinese)
- [6] Yue J W, Hou X H, Liu X, Wang L G, Gao H M, Zhao F P, Shi L J, Shi L Y, Yan H, Deng T Y, Gong J F, Wang L X, Zhang L C. The landscape of chromatin accessibility in skeletal muscle during embryonic development in pigs [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2021, 12(1): 56.
- [7] Miao W W, Ma Z Q, Tang Z Y, Yu L, Liu S Q, Huang T D, Wang P, Wu T, Song Z Y, Zhang H J, Li Y X, Zhou L. Integrative ATAC-seq and RNA-seq analysis of the longissimus muscle of Luchuan and duroc pigs [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 742672.
- [8] Gu S, Huang Q, Jie Y C, Sun C J, Wen C L, Yang N. Transcriptomic and epigenomic landscapes of muscle growth during the postnatal period of broilers [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2024, 15(1): 91.
- [9] Cao Y T, Ai Y, Zhang X S, Zhang J L, Long X L, Zhu Y N, Wang L L, Gu Q Y, Han H B. Genome-wide epigenetic dynamics during postnatal skeletal muscle growth in Hu sheep [J]. *Communications Biology*, 2023, 6: 1077.
- [10] Zhao Z D, Guo D S, Wei Y L, Li J S, Jia X, Niu Y M, Liu Z X, Bai Y B, Chen Z C, Shi B G, Zhang X L, Hu J, Wang J Q, Liu X, Li S B. Integrative ATAC-seq and RNA-seq analysis of the longissimus dorsi muscle of Gannan yak and jeryak [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(11): 6029.
- [11] Li Q, Wang Y H, Hu X, Zhang Y P, Li H W, Zhang Q, Cai W T, Wang Z Z, Zhu B, Xu L Y, Gao X, Chen Y, Gao H J, Li J Y, Zhang L P. Transcriptional states and chromatin accessibility during bovine myoblasts proliferation and myogenic differentiation [J]. *Cell Proliferation*, 2022, 55(5): e13219.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.124—2016 食品安全国家标准: 食品中氨基酸的测定. 2016: 12. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. GB 5009.124-2016 National food safety standard: Determination of amino acids in food. 2016: 12. (in Chinese)
- [13] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, Gu J. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [14] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2 [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(4): 357-359.
- [15] Zhang Y, Liu T, Meyer C A, Eeckhoutte J, Johnson D S, Bernstein B E, Nusbaum C, Myers R M, Brown M, Li W, Liu X S. Model-based analysis of ChIP-seq (MACS) [J]. *Genome Biology*, 2008, 9(9): R137.
- [16] Bressan D, Fernández-Pérez D, Romanel A, Chiacchiera F. SpikeFlow: Automated and flexible analysis of ChIP-Seq data with spike-in control [J]. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2024, 6(3): lqae118.
- [17] Huang Z W, Dai H J, Li S M, Wang Z, Wei Q W, Ning Z H, Guo Y M,

- Shi F X, Lv Z P. Maternal supplementation with mulberry-leaf flavonoids improves the development of skeletal muscle in the offspring of chickens [J]. *Animal Nutrition*, 2024, 18: 72-83.
- [18] 刘顺德, 刘孟洲, 王玉涛, 韩玲, 孙晓萍, 陈国顺. 宁夏几个主要品种猪背最长肌组织学特性的研究[J]. *农业科学研究*, 2006, 27(2): 33-37.
- Liu S D, Liu M Z, Wang Y T, Han L, Sun X P, Chen G S. Research of the histological characteristic of longissimu dorsi about several main breeds of swine in Ningxia [J]. *Journal of Agricultural Sciences*, 2006, 27(2): 33-37. (in Chinese)
- [19] Zhao L, Liu X D, Gomez N A, Gao Y, Son J S, Chae S A, Zhu M J, Du M. Stage-specific nutritional management and developmental programming to optimize meat production [J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2023, 14(1): 2.
- [20] 来裕婷, 朱菲菲, 王铁敏, 郭宏, 张林林, 李新, 郭益文, 丁向彬. PSMB5 蛋白对牛骨骼肌卫星细胞增殖与成肌分化的影响[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(20): 4287-4296. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.20.016.
- Lai Y T, Zhu F F, Wang Y M, Guo H, Zhang L L, Li X, Guo Y W, Ding X B. Effects of PSMB5 on the proliferation and myogenic differentiation of skeletal muscle satellite cells [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(20): 4287-4296. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.20.016. (in Chinese)
- [21] Jin C L, Ye M, Song Z W, Zhang Z M, Gao C Q, Yan H C, Wang X Q. Lysine interacts with Frizzled7 to activate β -catenin in satellite cell-participated skeletal muscle growth [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(12): 3745-3756.
- [22] Baráth B R, Nagy L. A serine metabolic enzyme is flexing its muscle to help repair skeletal muscle [J]. *Genes & Development*, 2024, 38(3/4): 95-97.
- [23] Gong L, Zhang X, Qiu K, He L J, Wang Y B, Yin J D. Arginine promotes myogenic differentiation and myotube formation through the elevation of cytoplasmic calcium concentration [J]. *Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)*, 2021, 7(4): 1115-1123.
- [24] de Souza Gonçalves L, Sales L P, Saito T R, Campos J C, Fernandes A L, Natali J, Jensen L, Arnold A, Ramalho L, Bechara L R G, Esteca M V, Correa I, Sant'Anna D, Ceroni A, Michelini L C, Gualano B, Teodoro W, Carvalho V H, Vargas B S, Medeiros M H G, *et al.* Histidine dipeptides are key regulators of excitation-contraction coupling in cardiac muscle: Evidence from a novel CARNIS1 knockout rat model [J]. *Redox Biology*, 2021, 44: 102016.
- [25] Holwerda A M, van Loon L J C. The impact of collagen protein ingestion on musculoskeletal connective tissue remodeling: A narrative review [J]. *Nutrition Reviews*, 2022, 80(6): 1497-1514.
- [26] Judge M M, Conroy S, Hegarty P J, Cromie A R, Fanning R, Kelly D, Crofton E, Berry D P. Eating quality of the longissimus thoracis muscle in beef cattle—Contributing factors to the underlying variability and associations with performance traits [J]. *Meat Science*, 2021, 172: 108371.
- [27] Huang C, Dai R F, Meng G Y, Dingkao R Q, Wang X D, Ren W W, Ma X M, Wu X Y, Chu M, La Y F, Bao P J, Guo X, Pei J, Yan P, Liang C N. Transcriptome-Wide Study of mRNAs and lncRNAs Modified by m⁶A RNA Methylation in the *Longissimus Dorsi* Muscle Development of Cattle-Yak [J]. *Cells*, 2022, 11(22): 3654.
- [28] Wang J W, Ren W L, Sun Z W, Han Z X, Zeng Y Q, Meng J, Yao X K. Comparative transcriptome analysis of slow-twitch and fast-twitch muscles in Kazakh horses [J]. *Meat Science*, 2024, 216: 109582.
- [29] Xiao L C, Chen J H, He X Y, Zhang X Q, Luo W. Whole-transcriptome sequencing revealed the *CeRNA* regulatory network during the proliferation and differentiation of goose myoblast [J]. *Poultry Science*, 2024, 103(11): 104173.
- [30] Han J J, Zhang J L, Zhang X Y, Luo W X, Liu L F, Zhu Y Q, Liu Q F, Zhang X N. Emerging role and function of Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in musculoskeletal disorders [J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2024, 15(1): 386.
- [31] 鲍建军, 苏锐, 王庆增, 吕晓阳, 高雯, 于嘉瑞, 王利宏, 陈玲, 吴文忠, 盛水兴, 周洪, 孙伟, 戴国俊. Smads 与 Hippo 通道中 YAP1 基因在湖羊肌肉组织中时空表达研究及关联分析[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(11): 2203-2213. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2016.11.016.
- Bao J J, Su R, Wang Q Z, Lü X Y, Gao W, Yu J R, Wang L H, Chen L, Wu W Z, Sheng S X, Zhou H, Sun W, Dai G J. The temporal and spatial expression and correlation analysis of smads and YAP1 gene in the hippo pathway in sheep muscle tissue [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(11): 2203-2213. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2016.11.016. (in Chinese)
- [32] Chi R Q, Liu Y F, Wang P, Yang F, Wang X Y, He X Y, Di R, Chu M X. Estrogen-induced circFAM171A1 regulates sheep myoblast proliferation through the oar-miR-485-5p/MAPK15/MAPK pathway [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2025, 82(1): 123.
- [33] Qiu K, Xu D D, Wang L Q, Zhang X, Jiao N, Gong L, Yin J D. Association analysis of single-cell RNA sequencing and proteomics reveals a vital role of Ca²⁺ signaling in the determination of skeletal muscle development potential [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 1045.
- [34] Wang M Y, Yang J M, Wu Y, Li H, Zhong Y B, Luo Y, Xie R L.

- Curcumin-activated Wnt5a pathway mediates Ca^{2+} channel opening to affect myoblast differentiation and skeletal muscle regeneration [J]. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2024, 15(5): 1834-1849.
- [35] Hao X, Fu Y, Li S X, Nie J R, Zhang B, Zhang H. Porcine transient receptor potential channel 1 (TRPC1) regulates muscle growth *via* the Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} pathways [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 265: 130855.
- [36] Li J T, Wu Y, Yu X X, Zheng X Y, Xian J C, Li S J, Shi W Y, Tang Y, Chen Z S, Liu G X, Yao S, Xu J, Zheng X W. Isolation, bioassay and 3D-QSAR analysis of 8-isopentenyl flavonoids from *Epimedium sagittatum* maxim. as PDE5A inhibitors [J]. *Chinese Medicine*, 2022, 17(1): 147.
- [37] Nguyen M T, Ly Q K, Ngo T H P, Lee W. Calponin 3 regulates myoblast proliferation and differentiation through actin cytoskeleton remodeling and YAP1-mediated signaling in myoblasts [J]. *Cells*, 2025, 14(2): 142.
- [38] Petrocelli J J, Liu J T, Yee E M, Ferrara P J, Bourrant P E, de Hart N M M P, Tatum S M, Holland W J, Funai K, Drummond M J. Skeletal muscle-specific inducible AMPK α 1/ α 2 knockout mice develop muscle weakness, glycogen depletion, and fibrosis that persists during disuse atrophy [J]. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2024, 326(1): E50-E60.
- [39] Song H X, Tian X X, Liu D, Liu M L, Liu Y X, Liu J, Mei Z, Yan C H, Han Y L. CREG1 improves the capacity of the skeletal muscle response to exercise endurance *via* modulation of mitophagy [J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 4102-4118.
- [40] Cho C S, Kim Y, Park S R, Kim B, Davis C, Hwang I, Brooks S V, Lee J H, Kim M. Simultaneous loss of TSC1 and DEPDC5 in skeletal and cardiac muscles produces early-onset myopathy and cardiac dysfunction associated with oxidative damage and SQSTM1/p62 accumulation [J]. *Autophagy*, 2022, 18(10): 2303-2322.
- [41] Conte E, Fonzino A, Cibelli A, de Benedictis V, Imbrici P, Nicchia G P, Pierno S, Camerino G M. Changes in expression and cellular localization of rat skeletal muscle CIC-1 chloride channel in relation to age, myofiber phenotype and PKC modulation [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 714.
- [42] Ye M S, Ye F, He L T, Luo B, Yang F L, Cui C, Zhao X L, Yin H D, Li D Y, Xu H Y, Wang Y, Zhu Q. Transcriptomic analysis of chicken Myozenin 3 regulation reveals its potential role in cell proliferation [J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(12): e0189476.
- [43] Lai C Y, Chen Y, Han X W, Fu Y, Chen J L, Tan D D, Shan X S, Jiang H Z. Transcription factor *MAFA* regulates muscle growth *via* calcium ion channels and receptor tyrosine kinase activation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 321: 146518.

(责任编辑 林鉴非)