

综述

doi: 10.7541/2015.159

肌肉特异表达 microRNA 的功能研究

石 军 褚武英 张建社

(长沙学院生物与环境科学系, 长沙 410003)

摘要: MicroRNA 作为非编码小 RNA 分子在转录和后转录水平调控基因表达过程中扮演重要角色, 已成为当前分子生物学的研究热点之一。近期已有研究证实, 一些在肌肉细胞中特异表达 microRNA 包括 miR-1、miR-206 和 miR-133 可能对肌肉生长和发育很关键。众所周知, 肌肉不仅是机体重要结构组织和运动器官, 而且还是水产畜牧产品的重要蛋白源。聚焦这些肌肉特异 myomiRs 在肌肉生长和发育中的功能机理研究, 不仅有助于揭示某些疾病的分子机制和解决医学上基因治疗难题; 同时也为畜牧水产养殖提供科学应用理论依据。综述我们概括了 miR-1、miR-206 和 miR-133 最新研究进展, 这将有助于深入了解其作用于肌肉生长和发育的功能和分子机制。

关键词: 肌肉干细胞(肌卫星细胞); 生长与发育; 基因调控; microRNA

中图分类号: Q344 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2015)06-1224-07

MicroRNAs (miRNAs) 作为内源非编码小 RNA 分子(-22 bp)与特定基因 mRNA 的 3' UTR 模板序列互补退火, 从而在转录后水平上抑制靶基因 mRNA 的翻译或促使 mRNA 的降解^[1]。在人基因组中含有相当于转录因子的 miRNAs 多达上千种^[2]。单个的 miRNA 能够有多个靶 mRNA, 并且单个 mRNA 可以成为多个 miRNA 靶目标, 这使得调控潜在基因的表达更加复杂多样。在大多情况下, miRNA 微调基因表达, 但是也是某些基因表达的开关, 参与发育、新陈代谢和免疫反应等多种生物过程。许多病理现象都与 miRNAs 的错误表达相关, 如癌症、心血管病、心肌梗塞等^[3-6]。因此, miRNA 的研究成为近年来的生命科学研究热点之一。

Bernstein 等^[7]通过敲除小鼠 Dicer 基因研究了 miRNA 在发育过程中整体功能。众所周知, Dicer 是 miRNA 的前体(pre-miRNA)加工形成成熟 miRNA (mature miRNA) 这一过程关键的蛋白, 敲除 Dicer 能阻断功能性成熟 miRNA 分子的形成。实验发现胚胎 7.5d 出现致命性后果, 原肠胚形成期发育停止^[7]。

O'Rourke 等^[8]、Chen 等^[9]以及 Zhao 等^[10]采用组织特异的 Dicer 缺失的方法揭示 miRNA 是使骨骼肌和心脏准确形态发生所必需的。尽管这些实验有力地证明了 miRNAs 在组织和器官发育和生长中不可缺少, 但是并没有阐明单个 miRNA 生物功能和作用机理。

肌肉细胞发育开始于中胚层干细胞响应胞外信号而形成成熟的肌肉细胞或成肌细胞。虽然目前的研究已经能够初步解释参与肌肉细胞增殖分化信号传导过程, 但是这个复杂过程中很多机制还不太清楚。最近的研究表明, 一种在脊椎动物中高度保守的新的 RNA 小分子参与肌肉细胞增殖、分化、收缩和应激反应等过程, 这种小分子就是肌肉特异的 miRNAs^[5]。miRNAs 在所有类型细胞都有发现, 而有一些只在特定的组织内表达。在肌肉组织中存在特异表达的 miRNAs 被称为肌肉 microRNA (myomirs), 如: miR-1、miR-133、miR-206 和 miR-208 等。这些 myomirs 可以划分为不同的家族, 主要为 miR-1 家族和 miR-133 家族。miR-1 家族由

收稿日期: 2014-12-10; 修订日期: 2015-03-11

基金项目: 国家自然科学基金(No. 31402271; 31230076)资助

作者简介: 石军(1983—), 男, 湖北黄冈人; 博士; 主要从事鱼类基因调控研究。E-mail: Junshi@ccsu.edu.cn, Junshistone@gmail.com

通信作者: 张建社, 男, 湖南长沙人; 教授; 主要从事鱼类肌肉发育与基因调控研究。E-mail: jzhang@ccsu.cn

miR-1 和 miR-206 两个亚家族组成; 从低等动物线虫(*Caenorhabditis elegans*)、果蝇(*Drosophila*)到高等脊椎动物体内都能发现进化高度保守的 miR-1 家族成员的表达。miR-206 亚家族目前只发现一个成员, 只在骨骼肌表达, 而不在心肌表达。在线虫和果蝇基因组中只含有单独的 miR-1 基因, 而在鱼类、鸡(*Gallus gallus*)、老鼠(*Mus musculus*)和人(*Homo sapiens*)的基因组中 miR-1 亚家族含有两个相似的转录本 miR-1-1 和 miR-1-2。尽管他们由不同的基因编码, 但是成熟态的 miR-1 序列却完全一致。miR-133 家族由 miR-133a-1、miR-133a-2、miR-133b 和 miR-133c 等组成, 他们序列高度相似。miR-208 作为心肌特异表达的 microRNA 逐渐为人所知, 它由 α -MHC 的一个内含子编码。其他的如 miR-128、miR-302、miR-367 和 miR-499 可能是潜在的心肌特异的 miRNAs, 但他们的功能还有待进一步研究证实^[6]。有意思的是这些肌肉特异的 miR-133、miR-1 和 miR-206 在基因组上呈双顺反子对(Bicistronic pairs)排列。在家鼠中, miR-1-1 和 miR-133a-2 基因簇位于 2 号染色体上, miR-1-2 和 miR-133a-1 基因簇位于 18 号染色体上, miR-206 和 miR-133b 基因簇则位于 1 号染色体上^[11]; 与之对应, 人类 miR-1/133/206 基因簇分别位于 20、18 和 6 号染色体上; 鸡则位于 20、2 和 3 号染色体上; 斑马鱼(*Danio rerio*)位于 23、18、20 号染色体上。值得一提的是斑马鱼 miR-206-2 和 miR-133c 共同位于 17 号染色体上构成额外的双顺反子对。虽然这些 miR-1 与 miR-133 基因簇上位置高度保守, 但是他们种子序列(Seed sequence)不同, 他们功能也各异^[11, 12]。

1 Myomirs 的调控

在骨骼生肌细胞和心肌组织胚胎发育及肌肉分化过程中主要有三种肌肉特异的 microRNA 表达, 分别为 miR-1、miR-206 和 miR-133, 他们受肌肉调节因子(Muscle regulatory factors, MRFs)调控。Sweetman 等^[12]通过成纤维细胞源生长因子(Fibroblast growth factor, FGF) 抑制小鼠 C2C12 肌肉细胞的分化, 从而干扰 MRF 的活性, 导致 miR-1、miR-206 和 miR-133 的表达受到抑制。此外, 在小鼠和鸡胚胎实验中, 过表达 MRFs 可诱导 miR-1 和 miR-206 表达异常, 同时还发现当敲除 Myf5, 导致 miR-1 和 miR-206 表达缺失^[12]。血清效应因子(Serum response

factor, SRF), 肌细胞增强子 2 (Myocyte- enhancer factor 2, Mef2) 和 MyoD 作为主要的肌原分化调节因子, 体外和体内实验证实他们是 miR-1-1 和 miR-1-2 起始所必需的。SRF 能够结合和激活起始区域, 在小鼠实验中发现敲除 SRF 会导致内源的 miR-1-1 和 miR-1-2 的表达缺失^[13]。尽管早先还没有成功敲除小鼠 miR-1 基因的报道, 但通过过表达 miR-1 会导致肌细胞过早分化和增殖缺陷最终导致发育受阻、心室肌壁薄化和心力衰竭等症状^[13]。在体外培养的细胞实验中发现, miR-1 通过靶作用于肌肉分化的压制者组蛋白去乙酰化酶 4 (Histone deacetylase 4, HDAC4), 从而促使肌肉生成^[14]。HDAC4 同样很可能是成骨细胞分化和骨骼基因形成过程中 miR-140 的靶基因^[15]。这表明在细胞分化过程中, 同一个基因可成为两个或多个不同的 miRNA 的靶基因。此外, miR-1、miR-133 和 miR-206 反而抑制自身的调节因子 SRF 和 HDAC4 等的表达, 形成一个负调控回路^[14, 16]。这一负调控回路机制有助于解释 miR-1/206 与 miR-133 的鲜明差异。过表达 miR-1 首先抑制 HDAC4, 随后抑制 MEF2, 增加肌管分化^[14]。与此相反, miR-133 抑制 SRF 的表达, 从而增加成肌细胞增殖, 这一调控回路机制或许是胚胎发育过程中肌肉细胞增殖与分化的特异调控通路^[14]。

类似的结果在心肌中研究也有发现, Kwon 等^[17]和 Sokol 等^[18]发现抑制果蝇 miR-1 会导致部分心肌细胞不分化, 而缺失会导致未分化的肌原细胞大量积累; 与此相反, 过表达 miR-1 扰乱胚胎心肌结构。有意思的是, 敲除果蝇 miR-1 并不影响幼虫肌肉组织的形成和生理机能, 但是在饲养和生长过程中会出现大量肌肉畸形和死亡个体。因此推断某些 microRNA 并非组织分型所必需的, 但是对随后组织的生长和维持不可缺少^[18]。在小鼠中也有相似结果, 过表达 miR-1, 导致心室细胞减少, 抑制了 Hand2 的表达, 致使心力衰竭^[14]。缺失 miR-1-2, 导致小鼠心脏肿大, 这表明 miR-1-2 负调控心肌增殖。在爪蟾(*Xenopus laevis*)中研究发现, 胚胎注射 miR-1 后会导致心肌发育不正常并且减少心肌细胞增殖; 当注射 miR-133, 则发现心脏高度紊乱, 不能形成心室和心环, 细胞增殖明显提高^[14]。另有多项实验证实, miR-133a 是心肌增殖和心脏发育不可缺少的关键因子, 并研发现心肌传导障碍与 miR-1 和 miR-133 的异常表达有直接关系^[10, 19, 20]。

2 Myomirs 参与肌卫星细胞增殖与分化

脊椎动物肌肉生长分为限定(Determinate)和非限定(Indeterminate)两种生长模式。肌肉限定生长最典型的代表动物就是哺乳类,因为其个体大小是有限的;而鱼类肌肉生长相对来说是非限定的,因为鱼类并没有固定的大小,而有些鱼类在整个生命中都在持续生长^[21]。这两种生长模式最主要的区别在于肌纤维(Muscle fiber)的生长差异。与哺乳类不同的是,鱼类之所以表现为非限定生长主要是因为鱼类可以通过补充新的肌纤维(即为 Hyperplasia)来增加肌肉量,同样也可以增加已有的肌纤维的大小(即为 Hypertrophy)^[22, 23]。鱼类孵化后期的肌细胞增殖也即为肌肉的补充过程使得鱼类肌肉生长模式与其他脊椎动物不同,主要是因为鱼类出生后肌纤维数量不是固定的,而随后伴随着的是肌肉纤维的增粗和肥大过程^[24]。鱼类肌细胞来源于肌肉干细胞(Satellite cells),它是提供肌肉生长和修复过程中新肌纤维的细胞来源。由于该类细胞具有自我分化和更新的能力,因而也被称之为肌肉干细胞^[25]。肌卫星细胞一旦被激活就分化形成肌卫星细胞驱使的成肌细胞,并且进一步增生,分化和融合形成肌管,随后成熟的肌管形成肌纤维。已有的研究表明, *Pax3* 和 *Pax7* 的表达是肌卫星细胞的特异性标志。同时,他们在肌卫星细胞增殖和分化中发挥重要作用^[26]。当 *Pax7* 基因敲除引起肌卫星细胞凋亡,继而导致动物出生后个体瘦小,甚至几乎没有肌肉再生^[27, 28]。*Pax3* 和 *Pax7* 作为转录因子直接调节生肌调节因子 *Myf5* 和 *MyoD* 的表达,继而影响肌细胞分化。通过基因表达和细胞定位研究揭示,肌卫星细胞通过非对称性细胞分裂来维持生肌细胞的激活和自我更新,即一部分来自肌卫星分裂的子细胞维持着干细胞功能,而另一些子细胞则被激活形成肌细胞进而发育成肌纤维^[29—31]。这类维持干细胞特性的子细胞持续保持 *Pax3* 和 *Pax7* 的高量表达,而已激活进入分化肌细胞阶段的子细胞则高量表达 *Myf5* 和 *MyoD*。因此, *Pax3/Pax7* 和 *Myf5/MyoD* 表达量的改变是控制肌卫星细胞增殖和激活分化的关键转折点^[31, 32]。*Chen* 等^[33]发现,肌卫星细胞分化时 *miR-1* 和 *miR-206* 显著上调表达,肌肉损伤时明显下调。实验进一步确认, *miR-1* 和 *miR-206* 促使肌卫星细胞分化是通过直接抑制靶基因 *Pax7* 而发挥作用。体内实验证

实,抑制 *miR-1* 和 *miR-206* 提高肌卫星的增殖并且增加了 *Pax7* 的蛋白水平。与此相反,过表达 *miR-1* 和 *miR-206* 显性失活突变体(Dominant negative mutant)能够维持 *Pax7* 的表达,最终抑制成肌细胞的分化^[33]。

3 Myomirs 的靶基因

骨骼肌细胞发育源于胚胎中胚层,成肌细胞增殖或最终分化成肌管都依赖此重要阶段。*McCarthy* 等^[34, 35]发现,小鼠错误表达 *miR-206* 和 *miR-133a* 会导致肌肉营养失调(Dystrophy)^[34, 35]。获得或丢失 *miRNA* 靶位点可能会导致一些基因表达失调而产生疾病。*Alex* 等^[36]发现在名为 *Texel* 的羊 *myostatin* 基因 3'UTR 上一位点 G 突变为 A 后,恰好暴露成为 *mir-1* 和 *mir-206* 的靶位点,从而使得 *myostatin* 表达受到抑制,最终导致 *Texel* 羊的肌肉粗大,异常肥胖。*miRNA* 之所以能够抑制靶基因的表达依赖于 mRNA 的 3'UTR 的识别位点与 *miRNA* 的种子序列相匹配的关键的 7 个碱基长度的核苷酸,但是有时这还远不足以有效,还需要其他的额外的特征才能有效抑制 mRNA 的表达。*Andrew* 等^[37]总结出识别序列有效性的 5 个广谱特性:即识别位点附近富含 AU 核苷酸、附近存在可识别多个 *miRNA*(有利于 *miRNA* 协同作用)位点、与 *miRNA* 配对需要 13—16 长度的核苷酸残基、距离 mRNA 3'UTR 终止位点至少 15 bp 长度以及 3'UTR 序列偏长的 mRNA 的识别序列位点距离中间部位也相应偏远。鉴于 *miRNAs* 序列的保守性,为靶基因的预测和鉴定提供了可行性。尽管如此,但真正已确认的靶基因数量仍然有限。目前在哺乳动物中, *miRNA-1* 和 *miRNA-133* 已鉴定出与肌肉细胞增殖和增粗相关的靶基因分别为 *Cdk9*、*Rheb*、*RASA1*、*Calmodulin*、*MEF2A* 和 *SRF* 等;而 *cyclinD2*、*Rho-A*、*Cdc42*、*WHSC2*、*Fstl1*、*Polal* 和 *Utrn* 被鉴定为骨骼肌特异表达的 *miRNA-206* 的靶基因^[11]。*Yuichiro* 等^[38]在模式生物斑马鱼中鉴定出一批 *miRNA-1* 和 133 的靶基因,如 *actr3*、*arpc4l*、*arpc5a*、*arpc5b*、*bactin1*、*bactin2*、*cnn2*、*cnn3a*、*cnn3b*、*coro1c*、*dctn5*、*parva*、*pdlim1*、*pfn2*、*pfn2l* 和 *TPM3* 等,研究表明这些潜在靶基因可能与肌小节(Sarcomere)肌动蛋白(Actin)的组装相关,但是并没有后续报道。*Yin* 等^[39]通过过表达的方法在斑马鱼中鉴定出 *mir-133* 的靶基因,

如 mps1、cdc37、PA2G4、cx43 和 cldn5 等, 并证实 mir-133 限制损伤诱导的心肌细胞(Cardiomyocyte)的增殖。在癌症研究方面, 也鉴定出 myomirs 的靶基因, 如 mir133a 通过靶基因 Bcl-xL 和 Mcl-1 能够抑制骨肉瘤细胞增殖而促使细胞凋亡^[40]; mir133a 还直接作用于靶基因 FSCN1 而扮演胰腺癌肿瘤抑制者的角色^[41]。Mataki 等^[42]发现下调表达 Mir-1/133a 功能基因簇增强肺鳞状上皮癌细胞的迁移和入侵, 当恢复正常表达 Mir-1/133a 后, 通过锚定靶基因冠蛋白 1C (Coronin-1C)抑制癌细胞的增殖、迁移和入侵。Yin 等^[43]发现 mir-133a 通过靶作用于 Prdm16 调控骨骼肌卫星细胞褐色脂肪的分型(Brown adipose determination), 这一研究发现使得 mir-133 成为治疗糖尿病重要药物作用靶点。在研究糖尿病性心肌病例时发现下调 mir-1 的表达, 会增加氧化应激, 导致糖尿病性心肌功能紊乱, 而接头蛋白(Junction)成为 mir-1 的靶蛋白^[44]。

4 Myomirs 研究展望

至目前, 有关 myomirs 的研究仅仅局限于过表达和报告基因活性检测来确定靶基因这两种主要研究手段, 而有效的基因敲除技术手段的运用必将极大地提升对 myomirs 的系统研究。目前在哺乳动物和鱼类等脊椎动物中成功敲除 miRNAs 已有少量报道。在小鼠中, 敲除 miRNAs 后有较为明显的表型(Phenotype) 的有 mir-155、mir-17-92、mir-144、mir-143/145、mir-145、mir-451、mir-140、mir-150、mir-223、mir-375 和 mir-126 等, 而单独敲除 mir-106、mir-143 以及 mir-182 并没有明显的表型; 与此相似, 单独敲除 mir-208a、mir-208b、mir-499、mir-133a-1、mir-133a-2 以及 mir-206 也未见明显的表型^[45—50]。有意思的是, 单独敲除 mir-1-2 则导致心肌缺陷, 大约 50%胚胎致死, 这暗示 mir-1 的功能性单倍剂量不足(Haploinsufficiency)。这一结果表明, mir-1 在心肌发育过程中的重要性, 而双敲除 mir-1-1 和 mir-1-2 基因成为必须, 将进一步揭示心肌发育机理^[51]。Srivastava^[51, 52]实验室继敲除小鼠 mir-1-2 后, Heidersbach 等^[52]敲除小鼠 mir-1-1。他们发现 mir-1-1 突变小鼠呈现与 mir-1-2 缺失突变体相似的表型。杂合的(Compound) mir-1 突变体小鼠在断奶前无规律地死亡归因于严重的心肌功能障碍(Dysfunction); 与此同时 mir-1-null 小鼠肌小节不正常组装并且下

调肌球蛋白轻链 2 (Myosin light chain-2, MLC2)的磷酸化; 细胞骨架调节因子(Cytoskeletal regulator) Telokin 作为平滑肌限制的(Muscle-restricted)MLC2 磷酸化的抑制子与其他平滑肌基因在心肌中异常表达; mir-1 压制 Telokin 通过直接靶作用于 Telokin 的转录调控者 myocardin, 抑制 myocardin 的转录, 这些实验证明 mir-1 是心脏发育所必需的, 而且是通过调控平滑肌基因表达网络转录和效应的节点来加强条纹肌肉(Striated muscle)的显型^[52]。在哺乳动物中, 许多 miRNAs 存在基因双拷贝或高度相似性, 使得功能富余和互补。单敲除 mir-133a-1 和 mir-133a-2 未见任何明显的表型; 而同时敲除导致胚胎发育延迟和 50%新生小鼠心室中膈缺损(Ventricular septal defect)和心腔扩张(Cardiac chamber dilation)而死亡^[48]。最新研究表明, 心肌胚胎发育依赖 miR-1-1/133a-2 和 miR-1-2/133a-1 基因簇的协调运作, 双敲除这两个基因簇压制转录共同激活子心肌素蛋白(Myocardin)的表达, 而 myocardin 是平滑肌(Smooth muscle, SM)基因表达的主要的调控者^[53]; DAN 芯片实验证实, 敲除 mir-1/133a 簇导致 Kenmb1、Bmp10、transgelin、myocardin 和 Acta2 等基因显著上调, 而先前推定的 mir-1/133a 的靶基因 Hand2、SRF、IRX5、Cend2、Kend2 和 Hdac4 的表达与对照野生型相比并无明显差异。由此可见, 先前体外实验荧光素酶活性检测预测靶基因的方法的准确性可见一斑, 而体内实验基因敲除成为研究基因功能的首选。Zhang 等^[54]和 Miller 等^[55]在 *Nature biotechnology* 杂志同期报道了从黄单胞菌(*Xanthomonas* sp.)中分离和鉴定出一种能对基因有效修改和编辑的蛋白名为类转录激活效应核酶(Transcription activator-like effectors nucleases, TALEN), 其原理主要是通过 TAL effector DNA 结合区域和 FokI 切割区域两个融合蛋白有效破坏内源靶基因。随后 TALEN 技术相继被广泛运用于哺乳类, 两栖类爪蟾的组织细胞和胚胎基因敲除实验^[56—60]; 而在斑马鱼中 TALEN 技术已越发成熟^[61—64]。此外, 一种从酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)中分离出的核酸内切酶 Cas 蛋白利用 CRISPR/Cas9 系统也能对目的基因在基因组准确位点进行有效切割, 此方法有效率高达 30%以上^[65—68]。目前此两种高效的基因敲除技术纷纷被用于模式生物斑马鱼基因敲除实验, 生命科学从而进入全新的基因敲除时代^[69, 70], 相信 myomirs

的功能将会得到进一步阐释。当前我们承担鱼类 miRNA-1/133a 在肌肉发育与生长中的功能研究课题, 通过最新基因敲除技术建立突变模型, 试图解释鱼类 miRNA-1/133a 基因簇的协同作用机制。当前斑马鱼中已有 miRNAs 敲除的成功报道, Xiao 等^[71]采用 CRISPR/Cas9 和 TALEN 系统成功敲除 miR-126a/b 和 1 号, 9 号染色体 miRNAs 基因簇, 这将为 miRNA 功能研究提供重要参考价值和技术支撑。

参考文献:

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, **116**(2): 281—297
- [2] Berezikov E, Guryev V, Van de Belt J, *et al.* Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes [J]. *Cell*, 2005, **120**(1): 21—24
- [3] Lee C T, Risom T, Strauss W M. Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny [J]. *DNA and Cell Biology*, 2007, **26**(4): 209—218
- [4] Stark A, Brennecke J, Bushati N, *et al.* Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution [J]. *Cell*, 2005, **123**(6): 1133—1146
- [5] Van Rooij E, Liu N, Olson E N. MicroRNAs flex their muscles [J]. *Trends in Genetics*, 2008, **24**(4): 159—166
- [6] Latronico M V, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology [J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2009, **6**(6): 418—429
- [7] Bernstein E, Kim S Y, Carmell M A, *et al.* Dicer is essential for mouse development [J]. *Nature Genetics*, 2003, **35**(3): 215—217
- [8] O'Rourke J R, Georges S A, Seay H R, *et al.* Essential role for Dicer during skeletal muscle development [J]. *Developmental Biology*, 2007, **311**(2): 359—368
- [9] Chen J F, Murchison E P, Tang R, *et al.* Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, 2008, **105**(6): 2111—2116
- [10] Zhao Y, Ransom J F, Li A, *et al.* Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 [J]. *Cell*, 2007, **129**(2): 303—317
- [11] Townley-Tilson W H, Callis T E, Wang D. MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2010, **42**(8): 1252—1255
- [12] Sweetman D, Goljanek K, Rathjen T, *et al.* Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133 [J]. *Developmental Biology*, 2008, **321**(2): 491—499
- [13] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [J]. *Nature*, 2005, **436**(7048): 214—220
- [14] Chen J F, Mandel E M, Thomson J M, *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. *Nature Genetics*, 2006, **38**(2): 228—233
- [15] Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, *et al.* The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells [J]. *FEBS Letters*, 2006, **580**(17): 4214—4217
- [16] Lu J, McKinsey T A, Zhang C L, *et al.* Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases [J]. *Molecular Cell*, 2000, **6**(2): 233—244
- [17] Kwon C, Han Z, Olson E N, *et al.* MicroRNA1 influences cardiac differentiation in Drosophila and regulates Notch signaling [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(52): 18986—18991
- [18] Sokol N S, Ambros V. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth [J]. *Genes & Development*, 2005, **19**(19): 2343—2354
- [19] Yang B, Lin H, Xiao J, *et al.* The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2 [J]. *Nature Medicine*, 2007, **13**(4): 486—491
- [20] Xiao J, Luo X, Lin H, *et al.* MicroRNA miR-133 represses HERG K⁺ channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(17): 12363—12367
- [21] Mommsen T P. 4 Growth and Metabolism [C]. *The Physiology of Fishes*. 1997, 65
- [22] Greer-Walker M. Growth and development of the skeletal muscle fibres of the cod (*Gadus morhua* L.) [J]. *Journal du Conseil*, 1970, **33**(2): 228—244
- [23] Stickland N C. Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Journal of Anatomy*, 1983, **137**(Pt 2): 323
- [24] Johnston I A. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish [J]. *Aquaculture*, 1999, **177**(1): 99—115
- [25] Alexander M S, Kawahara G, Kho A T, *et al.* Isolation and transcriptome analysis of adult zebrafish cells enriched for skeletal muscle progenitors [J]. *Muscle & Nerve*, 2011, **43**(5): 741—750
- [26] Oustanina S, Hause G, Braun T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification [J]. *The EMBO Journal*, 2004, **23**(16): 3233—3243

- 3430—3439
- [27] Kuang S, Chargé S B, Seale P, *et al.* Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2006, **172**(1): 103—113
- [28] Relaix F, Montarras D, Zaffran S, *et al.* Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2006, **172**(1): 91—102
- [29] Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, *et al.* A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells [J]. *Nature*, 2005, **435**(7044): 948—953
- [30] Seale P, Sabourin L A, Girgis-Gabardo A, *et al.* Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells [J]. *Cell*, 2000, **102**(6): 777—786
- [31] Zammit P S, Partridge T A, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold [J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2006, **54**(11): 1177—1191
- [32] Shi J, Chu W Y, Zhang J S. Muscle growth, differentiation and gene expression regulation in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(6): 1145—1152 [石军, 褚武英, 张建社. 鱼类肌肉生长分化与基因表达调控. 水生生物学报, 2013, **37**(6): 1145—1152]
- [33] Chen J F, Tao Y, Li J, *et al.* microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7 [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2010, **190**(5): 867—879
- [34] McCarthy J J, Esser K A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy [J]. *Journal of Applied Physiology*, 2007, **102**(1): 306—313
- [35] McCarthy J J, Esser K A, Andrade F H. MicroRNA-206 is over-expressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse [J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007, **293**(1): C451—C457
- [36] Clop A, Marcq F, Takeda H, *et al.* A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep [J]. *Nature Genetics*, 2006, **38**(7): 813—818
- [37] Grimson A, Farh K K H, Johnston W K, *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing [J]. *Molecular Cell*, 2007, **27**(1): 91—105
- [38] Mishima Y, Abreu-Goodger C, Staton A A, *et al.* Zebrafish miR-1 and miR-133 shape muscle gene expression and regulate sarcomeric actin organization [J]. *Genes & Development*, 2009, **23**(5): 619—632
- [39] Yin V P, Lepilina A, Smith A, *et al.* Regulation of zebrafish heart regeneration by miR-133 [J]. *Developmental Biology*, 2012, **365**(2): 319—327
- [40] Ji F, Zhang H, Wang Y, *et al.* MicroRNA-133a, downregulated in osteosarcoma, suppresses proliferation and promotes apoptosis by targeting Bcl-xL and Mcl-1 [J]. *Bone* 2013, **56**(1): 220—226
- [41] Qin Y, Dang X, Li W, *et al.* miR-133a functions as a tumor suppressor and directly targets FSCN1 in pancreatic cancer [J]. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 2013, **21**(6): 353—363
- [42] Mataka H, Enokida H, Chiyomaru T, *et al.* Downregulation of the microRNA-1/133a cluster enhances cancer cell migration and invasion in lung-squamous cell carcinoma via regulation of Coronin1C [J]. *Journal of Human Genetics*, 2015, **60**(2): 53—61
- [43] Yin H, Pasut A, Soleimani V D, *et al.* MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16 [J]. *Cell Metabolism*, 2013, **17**(2): 210—224
- [44] Yildirim SS, Akman D, Catalucci D, *et al.* Relationship between downregulation of miRNAs and increase of oxidative stress in the development of diabetic cardiac dysfunction: junctin as a target protein of miR-1 [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, **67**(3): 1397—1408
- [45] Park C Y, Choi Y S, McManus M T. Analysis of microRNA knockouts in mice [J]. *Human Molecular Genetics*, 2010, **19**(R2): R169—R175
- [46] Van Rooij E, Sutherland L B, Qi X, *et al.* Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA [J]. *Science*, 2007, **316**(5824): 575—579
- [47] Callis T E, Pandya K, Seok H Y, *et al.* MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2009, **119**(9): 2772—2786
- [48] Liu N, Bezprozvannaya S, Williams A H, *et al.* microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart [J]. *Genes & Development*, 2008, **22**(23): 3242—3254
- [49] Van Rooij E, Quiat D, Johnson B A, *et al.* A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance [J]. *Developmental Cell*, 2009, **17**(5): 662—673
- [50] Williams A H, Valdez G, Moresi V, *et al.* MicroRNA-206 delays ALS progression and promotes regeneration of neuromuscular synapses in mice [J]. *Science*, 2009, **326**(5959): 1549—1554
- [51] Zhao Y, Ransom J F, Li A, *et al.* Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 [J]. *Cell*, 2007, **129**(2): 303—317
- [52] Heidersbach A, Saxby C, Carver-Moore K, *et al.* microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart [J]. *Elife*, 2013, **2**: e01323
- [53] Wystub K, Besser J, Bachmann A, *et al.* miR-1/133a clusters cooperatively specify the cardiomyogenic lineage by adjustment of myocardin levels during embryonic heart development [J]. *PLoS Genet*, 2013, **9**(9): e1003793
- [54] Zhang F, Cong L, Lodato S, *et al.* Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, **29**(2):

- 149—153
- [55] Miller J C, Tan S, Qiao G, *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, **29**(2): 143—148
- [56] Cermak T, Doyle E L, Christian M, *et al.* Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, **39**(12): e82—e82
- [57] Wood A J, Lo T W, Zeitler B, *et al.* Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs [J]. *Science*, 2011, **333**(6040): 307—307
- [58] Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, *et al.* Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, **29**(8): 731—734
- [59] Bedell V M, Wang Y, Campbell J M, *et al.* *In vivo* genome editing using a high-efficiency TALEN system [J]. *Nature*, 2012, **491**(7422): 114—118
- [60] Lei Y, Guo X, Liu Y, *et al.* Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector nucleases (TALENs) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, **109**(43): 17484—17489
- [61] Sander J D, Cade L, Khayter C, *et al.* Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, **29**(8): 697—698
- [62] Cade L, Reyon D, Hwang W Y, *et al.* Highly efficient generation of heritable zebrafish gene mutations using homo- and heterodimeric TALENs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**(16): 8001—8010
- [63] Huang P, Xiao A, Zhou M, *et al.* Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, **29**(8): 699—700
- [64] Moore F E, Reyon D, Sander J D, *et al.* Improved somatic mutagenesis in zebrafish using transcription activator-like effector nucleases (TALENs) [J]. *PLoS ONE*, 2012, **7**(5): e37877
- [65] Cong L, Ran F A, Cox D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, **339**(6121): 819—823
- [66] Gaj T, Gersbach C A, Barbas III C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends in Biotechnology*, 2013, **31**(7): 397—405
- [67] Shen B, Zhang J, Wu H, *et al.* Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. *Cell Research*, 2013, **23**(5): 720—723
- [68] Chang N, Sun C, Gao L, *et al.* Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos [J]. *Cell Research*, 2013, **23**(4): 465—472
- [69] Joung J K, Sander J D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, **14**(1): 49—55
- [70] Hwang W Y, Fu Y, Reyon D, *et al.* Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system [J]. *Nature Biotechnology*, 2013, **31**(3): 227—229
- [71] Xiao A, Wang Z, Hu Y, *et al.* Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, **41**(14): e141

THE FUNCTIONAL STUDIES OF MUSCLE-SPECIFIC MICRORNAS

SHI Jun, CHU Wu-Ying and ZHANG Jian-She

(Department of Biological and Environmental Science, University of Changsha, Changsha 410003, China)

Abstract: MicroRNAs are small non-coding RNA molecules that play important roles in the transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. MicroRNAs have become one of the hotspot issues in molecular biology. Recently several microRNAs have been identified including miR-1, miR-206 and miR-133 that are specifically expressed in muscle cells and may be crucially involved in the development and growth of muscles. Muscles are an important part of body structure as well as a locomotive organ, and they are also the main protein source in aquaculture and animal husbandry. Therefore, functional studies of the roles of muscle-specific microRNAs will help uncover the mechanisms of certain diseases, facilitate medical gene therapy, and provide guidance for the animal husbandry and fishery. In this review we summarized the latest research on miR-1, miR-206 and miR-133 that shed lights on better understanding of their functions in muscle development and growth.

Key words: Muscle stem cells (satellite cell); Growth and development; Gene regulation; microRNA