DOI:10.16016/j.2097-0927.202111134

甲基转移酶 Dot1L 通过调控启动子甲基化水平促进骨骼肌成肌分化

李程程,周 永,李浩可,邓忠良 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院骨科

[摘要] **目的** 明确甲基转移酶 Dot1L 是否参与成肌分化调控过程,并初步探索其调控成肌分化过程的分子机制。**方法** 应用小鼠体外成肌分化模型 C2C12 细胞系,诱导 C2C12 细胞在 0、1、3、5 d 发生成肌分化,使用 Dot1L 特异性抑制剂抑制其甲基转移酶活性,并应用免疫荧光实验观察 Dot1L 对成肌分化过程的影响;检测成肌分化标志分子肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)和肌细胞调节因子(Myogenin)的蛋白质水平和转录水平及启动子区域的组蛋白甲基化水平;使用 RNA-Seq 基因组范围内检测抑制剂处理与否发生变化的基因阵列;并用 CHIP-qPCR 实验验证 H3K79me2 结合位点。**结果** Dot1L 组蛋白底物 H3K79 的甲基化水平随成肌分化进程逐渐升高($P<0.01$);抑制 Dot1L 酶活性后,成肌分化过程明显受阻;免疫荧光实验显示 C2C12 细胞多核肌管形成显著下降($P<0.01$),MHC 和 Myogenin 的蛋白质水平及转录水平均显著降低($P<0.01$);启动子区域组蛋白 H3K4 甲基化水平降低($P<0.01$);RNA-Seq 显示受 Dot1L 调控的基因阵列主要集中在骨骼肌的成肌分化和肌肉的发育;经 CHIP-qPCR 验证参与成肌分化的部分基因存在 H3K79me2 结合位点。**结论** 甲基转移酶 Dot1L 通过直接调控一群成肌分化相关基因的转录水平参与调控骨骼肌的成肌分化过程。

[关键词] 肌肉减少症;甲基转移酶 Dot1L;成肌分化;转录调控
[中图法分类号] R322.74; R345; R394.1 [文献标志码] A

Methyltransferase Dot1L promotes myogenic differentiation of skeletal muscle by regulating promoter methylation level

LI Chengcheng, ZHOU Yong, LI Haoke, DENG Zhongliang Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To confirm whether methyltransferase Dot1L is involved in the regulation of myogenic differentiation, and explore its molecular mechanism in the regulation process. **Methods** Myoblast differentiation model of mouse C2C12 cell line was used to induce myogenic differentiation for 0, 1, 3 and 5 d. The specific inhibitor of Dot1L was used to inhibit the activity of methyltransferase, and the impacts of Dot1L on the process of myoblast differentiation was observed by immunofluorescence assay. The protein and transcription levels of myosin heavy chain (MHC) and myogenin, markers of myogenic differentiation, were subsequently detected, so was the histone methylation level of the promoter region. Moreover, RNA-Seq analysis was adopted to determine the gene arrays affected by inhibitor treatment in the genome, and chromatin immunoprecipitation coupled with quantitative PCR (CHIP-qPCR) was performed to verify the binding site of H3K79me2. **Results** The methylation level of H3K79, Dot1L histone substrate, was gradually increased with the process of myogenic differentiation ($P<0.01$). With the inhibition of Dot1L activity, the process of myogenic differentiation was obviously suppressed, the formation of multinucleated myotubes in C2C12 cells was significantly decreased ($P<0.01$), the protein and transcription levels of MHC and Myogenin were remarkably reduced ($P<0.01$), and the histone H3K4 methylation level in the promoter region was also declined ($P<0.01$). RNA-Seq analysis indicated that the gene arrays regulated by Dot1L mainly focused on

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31870768)
[通信作者] 邓忠良,E-mail:zhongliang.deng@qq.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the myogenic differentiation and muscle development of skeletal muscle. Finally, CHIP-qPCR verified that some genes involved in myogenic differentiation have H3K79me2 binding sites. **Conclusion** Methyltransferase Dot1L participates in the regulation of the myogenic differentiation process of skeletal muscle by directly affecting the transcription level of myogenic differentiation related genes.

[**Key words**] sarcopenia; Dot1L; myogenic differentiation; transcriptional regulation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31870768). Corresponding author: DENG Zhongliang, E-mail: zhongliang.deng@qq.com

肌肉减少症(sarcopenia)主要以骨骼肌退行性病变为特征,好发于老年群体中,严重影响老年人的运动功能及生活质量,随人口老龄化的加剧受到越来越多的关注[1]。既往研究表明,肌卫星细胞的成肌分化调控在肌肉减少症的发生发展中发挥着重要作用[2-4]。肌卫星细胞是指骨骼肌中位于肌细胞膜和基膜之间具有增殖分化潜能的单能干细胞。生理情况下处于静息状态,受到刺激后被激活,重新进入细胞周期,大量增殖、分化、融合形成新的肌纤维,这一系列过程被称之为成肌分化[5-6]。成肌分化形成新的肌纤维对补充由于衰老或损伤造成的肌肉减少具有重要意义[2]。成肌分化过程作为一个受到精细调控且有序进行的多步骤生物进程,研究较多的调控方式为转录调控,主要包括两大类转录因子家族即生肌调节因子家族(myogenic regulatory factors, MRFs)和肌细胞增强因子2(myocyte enhance factor 2, MEF2)家族[7-8]。MRFs家族主要由MyoD、Myogenin、Myf5、MRF4等基因构成,其中Myogenin的蛋白质水平也被当做是成肌分化过程的早期标志分子[9]。

甲基转移酶Dot1L是人类基因组中发现的唯一负责催化组蛋白H3第79位赖氨酸甲基化(H3K79me1/2/3)的甲基转移酶[10]。根据文献报道[11-13],组蛋白第79位赖氨酸甲基化作为转录调控的重要标记分子(histone code)参与了DNA损伤修复、细胞周期等多个生物学过程。NGUYEN等[14]条件敲除小鼠心肌细胞内的Dot1L基因后,小鼠表现为以心室扩张和收缩功能障碍为主要特征的扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM),表明Dot1L和H3K79甲基化参与了心肌细胞的发育过程,但是Dot1L是否与骨骼肌成肌分化进程有关以及具体调控机制尚不清楚。本研究阐明Dot1L酶活性的变化对骨骼肌再生修复的影响,探索其调控成肌分化过程的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小鼠C2C12细胞株购于中国科学院上海细胞库。胎牛血清、马血清购于Gibco公司;EPZ5676和SGC0946抑制剂购于Selleck公司;Tubulin、HSP90、Dot1L、MHC、Myogenin等抗体购于Santa Cruz公司;H3K79me2抗体购于CST公司。

1.2 细胞培养

小鼠成肌细胞C2C12常规培养于含10%胎牛血清的DMEM中,分化时用含2%马血清的DMEM培养(即分化培养基)。细胞置于5% CO_2 及37℃恒温恒湿孵箱中培养。

1.3 C2C12细胞成肌分化

将C2C12细胞接种于培养皿中,当密度接近80%时,更换为分化培养基,每24 h更换1次,诱导分化0、1、3、5 d。

1.4 RNA提取及mRNA水平检测

C2C12细胞诱导分化后,收取0、1、3、5 d样品,应用RNA提取试剂盒(TaKaRa公司)提取总RNA,并用逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA。以得到的cDNA为模板进行RT-qPCR反应。RT-qPCR反应条件:95 ℃ 10 s,55 ℃ 20 s,60 ℃ 5 s,40个循环。

1.5 Western blot检测

根据C2C12细胞量加入适量RIPA裂解液,提取总蛋白。10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,恒流电转(250 mA/2 h),室温封闭1 h,一抗(1∶1 000)4 ℃过夜,二抗(1∶5 000)室温1h,ECL化学发光剂显影并拍照记录。

1.6 免疫荧光

细胞经4%多聚甲醛固定15 min,0.3% Triton X-100冰上透化10 min。3% GS封闭1 h,MHC抗体(1∶500)4 ℃过夜孵育,荧光二抗1 h,封片后共聚焦显微镜拍照。

1.7 CHIP-qPCR

1%多聚甲醛固定10 min后,加入细胞裂解液超声裂解5 min,4 ℃ 12 000 r/min离心10 min,取20 μL作为Input,加入一抗4 ℃孵育过夜,离心后去上清,加入洗脱缓冲液,室温孵育10 min,离心后收集上清,65 ℃ 6 h,纯化DNA,进行RT-qPCR检测。反应条件:95 ℃ 10 s,55 ℃ 20 s,60 ℃ 20 s,40个循环。

1.8 统计学分析

利用GraphPad Prism 8.0绘制统计图表。应用SPSS 20.0软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析,不同时间点测量的两组间采用重复测量

方差分析,二分类变量资料用卡方检验。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 Dot1L 酶活性后 C2C12 细胞成肌分化过程受阻

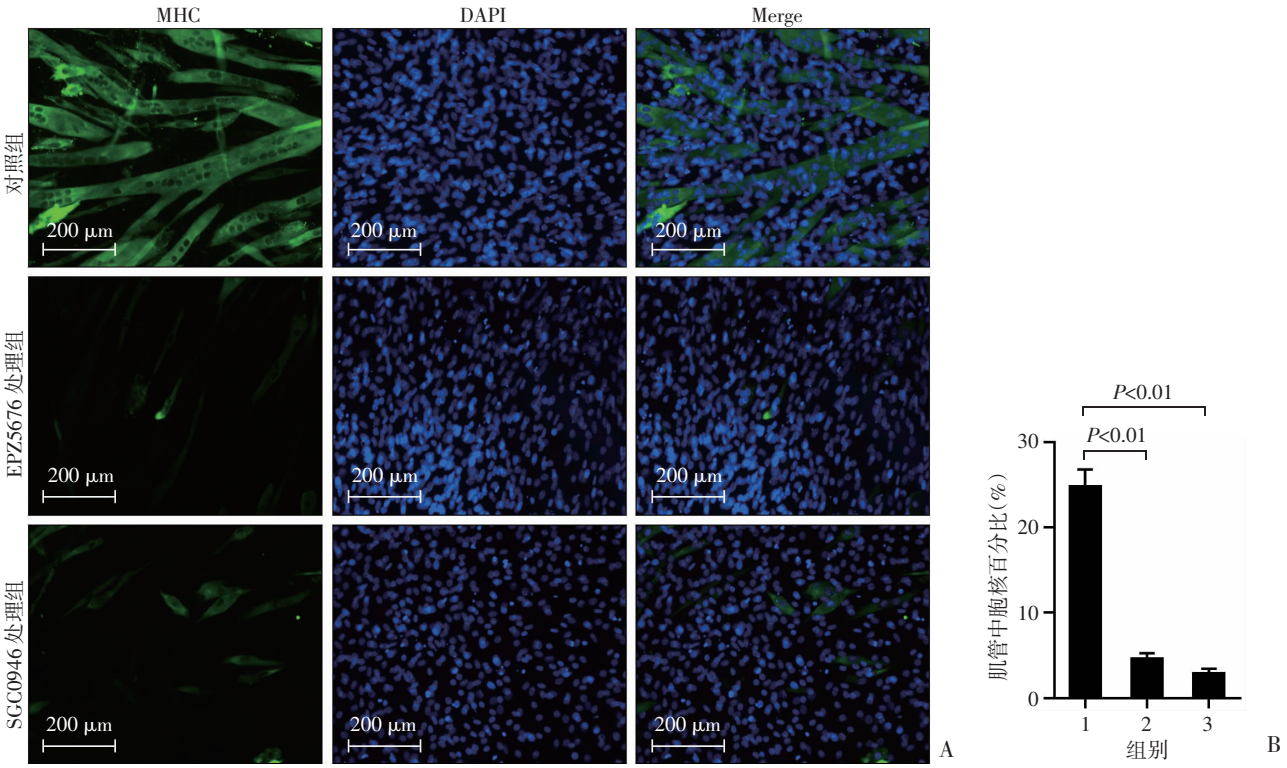
在小鼠体外成肌分化模型 C2C12 细胞中,使用 Dot1L 特异性抑制剂 EPZ5676 和 SGC0946 抑制其酶活性后,用免疫荧光实验检测多核肌管形成的百分比以及成肌分化末期标志分子肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)的表达水平。与对照组相比,Dot1L 抑制剂处理组中,MHC 阳性细胞的比例显著降低,多核肌管的形成明显减少(图 1A)。融合指数降低显著,由 25%降至 5%($P<0.01$,图 1B),表明 Dot1L 参与成肌分化过程的调控。

2.2 Dot1L 调控成肌分化标志物 MHC 与 Myogenin 的蛋白质水平

为进一步明确 Dot1L 对成肌分化过程调控的机制,检测成肌分化过程中 MHC 和 Myogenin 的蛋白质水平(图 2A)。结果表明,Dot1L 特异性抑制剂(SGC0946)处理 C2C12 细胞后,Dot1L 底物 H3K79 甲基化水平显著降低($P<0.01$,图 2B)。MHC 和 Myogenin 的蛋白质水平在对照组中随着分化进程逐渐升高($P<0.01$),在抑制剂处理组中各个对应的时间点均显著降低(图 2C、D),且未观察到有升高的趋势。

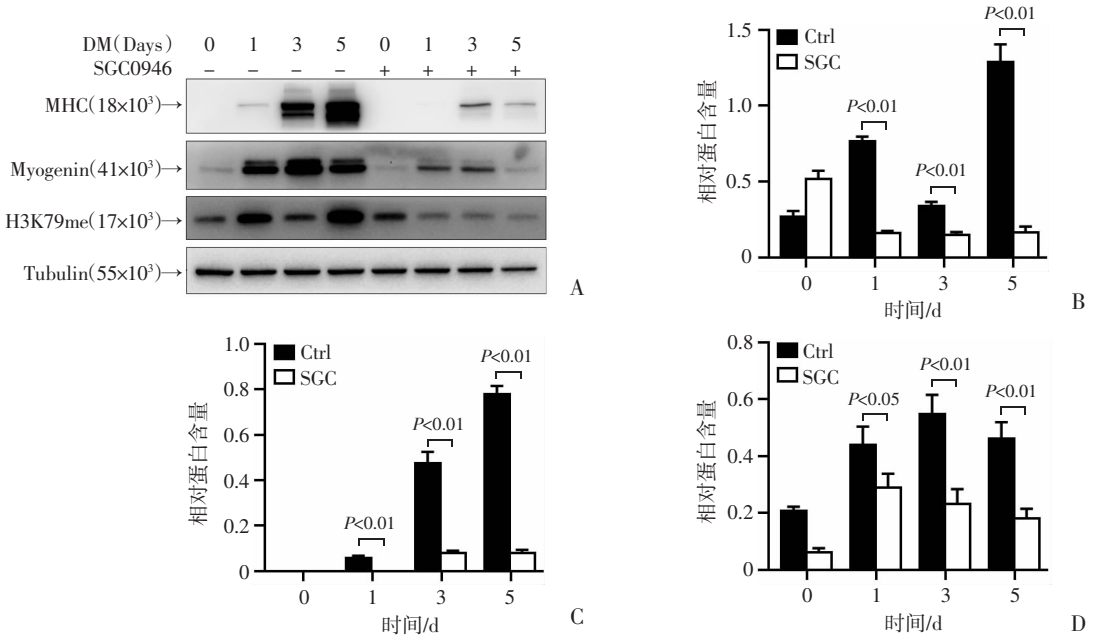
2.3 抑制 Dot1L 酶活性后 MHC 与 Myogenin 转录水平下降

为进一步探索 Dot1L 抑制剂导致 MHC 和 Myogenin 蛋白质水平降低的原因,检测不同抑制剂处理条件下 MHC 和 Myogenin 的 mRNA 水平。RT-qPCR 结果显示 MHC 和 Myogenin 的 mRNA 水平在对照组中随着分化进程逐渐升高,抑制剂处理组各个对应的时间点均显著降低($P<0.01$,图 3A、B),表明 Dot1L 调控 MHC 和 Myogenin 的转录水平。为进一步验证此调控过程与转录调节有关,采用 CHIP-qPCR 实验分别检测 MHC 和 Myogenin 启动子区域的转录激活标志 H3K4 甲基化水平、转录抑制标志 H3K9 甲基化水平。结果如图 3C 所示,MHC 启动子区域的 H3K4 甲基化水平在 Dot1L 抑制剂处理后降低($P<0.01$),H3K9 甲基化变化不明显。Myogenin 启动子区域 H3K4 甲基化水平也降低显著($P<0.01$),H3K9 甲基化变化不明显,表明成肌分化标志物 MHC 和 Myogenin 的转录水平受到 Dot1L 的间接调控。



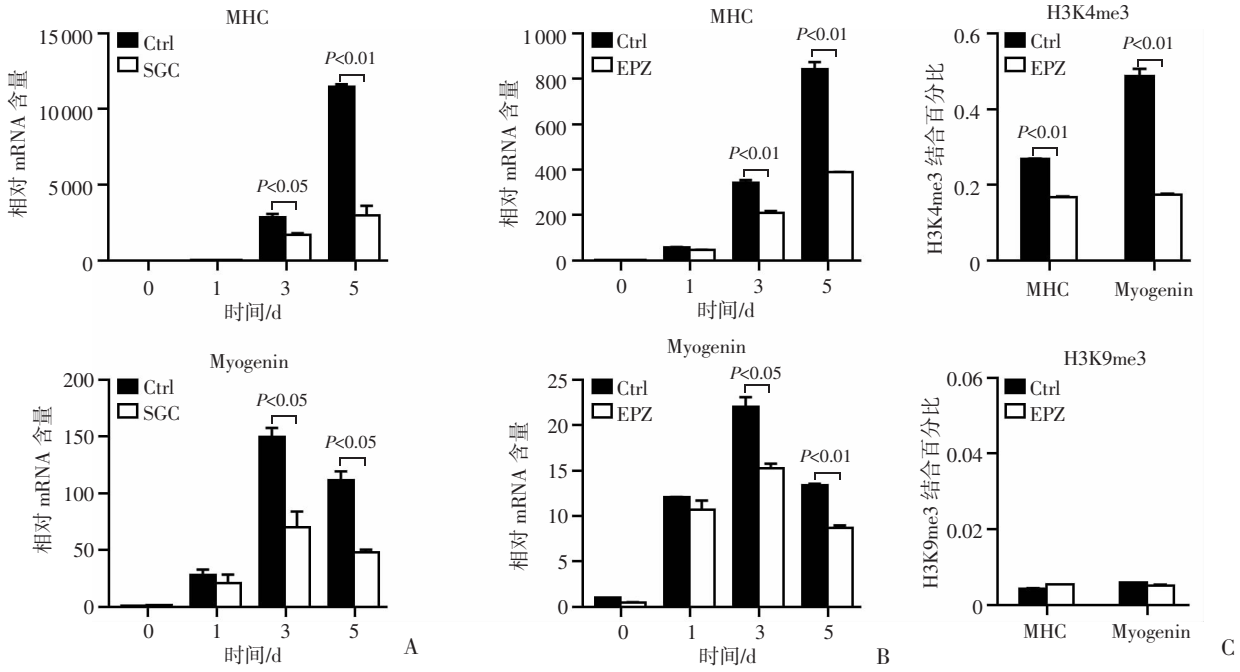
A:Dot1L 抑制剂处理后免疫荧光检测 C2C12 细胞的分化情况;B:Dot1L 抑制剂处理后 C2C12 细胞分化 5d 融合指数 1:对照组;2:EPZ5676 处理组;3:SGC0946 处理组

图 1 Dot1L 参与调控成肌分化过程



A:Western blot 检测 SGC0946 处理后成肌分化标志物 MHC、Myogenin 的蛋白质水平变化;B:H3K79me2 蛋白定量分析;C:MHC 蛋白定量分析;D:Myogenin 蛋白定量分析

图 2 Dot1L 调控成肌分化标志物 MHC 与 Myogenin 的蛋白质水平



A:RT-qPCR 检测 SGC0946 处理后 MHC、Myogenin 的 mRNA 水平变化;B:RT-qPCR 检测 EPZ5676 处理后 MHC、Myogenin 的 mRNA 水平变化;C:CHIP-qPCR 检测 C2C12 细胞分化 3 d MHC 与 Myogenin 基因启动子区域 H3K4me3、H3K9me3 水平变化

图 3 Dot1L 对成肌分化标志物 MHC 与 Myogenin 的转录调控

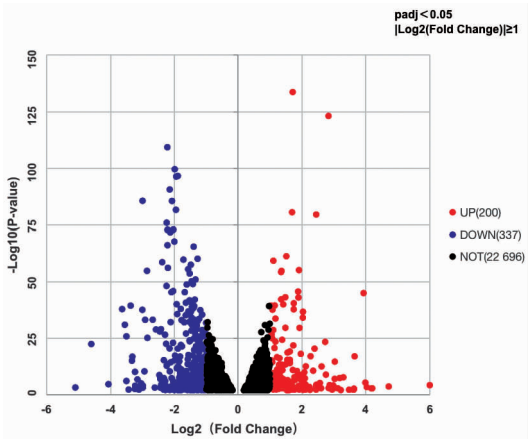
2.4 抑制 Dot1L 酶活性后对成肌分化表达谱的影响

为进一步在全基因组范围内探索 Dot1L 参与调控的基因阵列,我们对分化 3d 的 C2C12 细胞进行转录组测序分析。结果显示,共检测到 23 233 个基因的表达,然后按照 FDR 校正的 P 值(padj)<0.05 及 Log2(Fold Change)≥1 为阈值筛选表达差异基因。相较于

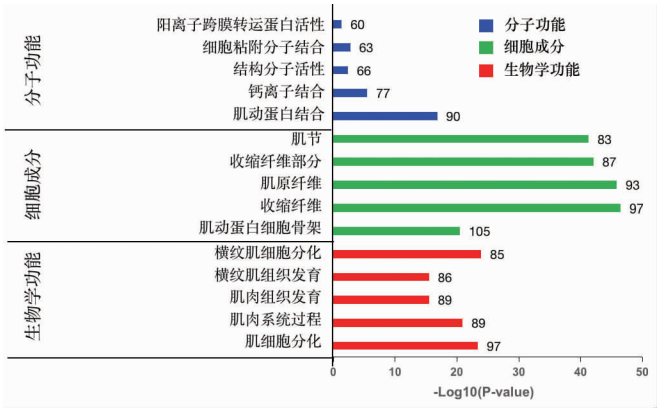
对照组,EPZ5676 抑制组基因表达水平显著升高的基因共有 200 个,显著下降的基因有 337 个(图 4A、B)。因此,我们着重关注抑制剂处理组中表达显著下降的基因。对表达下降的基因进行基因富集 GSEA 分析和 Reactome 通路分析,结果发现此部分基因主要涉及骨骼肌的成肌分化、肌纤维的收缩、肌动蛋白的结合以及肌肉的发育,尤其是集中在肌肉调节系统的通路(GO:0090257),与成肌分化有直接调控关系(图 4C、D)。

2.5 部分受 Dot1L 直接调控基因的验证

将表达水平显著下降的基因与 GEO 数据库中 H3K79me2 CHIP-Seq(GSE22268)进行联合分析,发现在表达显著下降的 337 个基因中,转录起始位点上下游 2Kb 以内,有 H3K79me2 结合位点的基因约 200 个,部分基因 CHIP-Seq 结果如图 5A 所示。选择已知参与成肌分化调控过程或有可能参与成肌分化调控过程的基因如 SMYD1、RASSF3 等,验证 H3K79me2 是否结合在其基因启动子区域。结果如图 5B 所示,SMYD1 基因启动子区存在 H3K79me2 的结合位点,加入 Dot1L 抑制剂后结合强度降低,表明 SMYD1 的转录水平直接受到 Dot1L 调控。



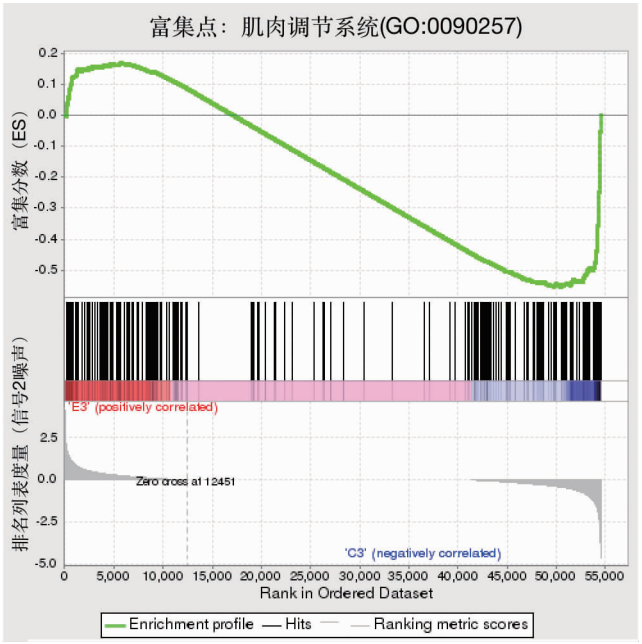
A



C

基因	Log2(FC)	P-value	基因概述	
Map3k19	-4.625807623	0.000735958	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19	
Cd36	-3.856083394	6.32E-23	CD36 molecule	←
Dmd	-3.394884806	0.000109137	dystrophin, muscular dystrophy	←
Ntn5	-3.079554358	0.0035482	netrin 5	
Fgf13	-2.939680638	0.003859332	fibroblast growth factor 13	
Myh7	-2.885266065	1.94E-15	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	
Tspan32	-2.882462526	7.13E-23	tetraspanin 32	
Pacsin1	-2.74502017	0.004907092	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	←
Pkhd1	-2.631197615	2.17E-17	polycystic kidney and hepatic disease 1	
Igfn1	-2.602101341	1.95E-11	immunoglobulin-like and fibronectin type III domain containing 1	
Smpx	-2.40678915	7.23E-18	small muscle protein, X-linked	
Pygm	-2.109497661	1.95E-30	muscle glycogen phosphorylase	
Myh2	-2.077896999	7.68E-07	myosin, heavy polypeptide 2, skeletal muscle, adult	
Ckm	-2.074889909	7.13E-44	creatine kinase, muscle	
Mybpc1	-2.065574812	0.000666195	myosin binding protein C, slow-type	
Rbfox1	-2.055886583	0.004577372	RNA binding protein, fox-1 homolog (C. elegans) 1	
Mylf-ps	-2.04408896	3.64E-67	myosin light chain, alkali, fast skeletal muscle, pseudogene	
Gja5	-1.9076576	1.52E-08	gap junction protein, alpha 5	←
LDB3	-1.508231048	9.80E-31	LIM domain binding 3	
Tas1r1	-1.506504856	2.47E-08	taste receptor, type 1, member 1	
Dnase1l3	-1.50354183	0.000275667	deoxyribonuclease 1-like 3	
Itgb1bp2	-1.499297614	1.06E-20	integrin beta 1 binding protein 2	
Popdc2	-1.496460291	0.000952619	popeye domain containing 2	←
Rassf3	-1.398365301	4.59E-29	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 3	←
Myom1	-1.394678757	2.05E-18	myomesin 1	←
Smyd1	-1.36426724	1.98E-22	SET and MYND domain containing 1	←
Iffo1	-1.057985181	3.31E-21	intermediate filament family orphan 1	←
Tmem47	-1.055235992	1.61E-10	transmembrane protein 47	
Akap6	-1.023286413	2.30E-16	A kinase (PRKA) anchor protein 6	←
Itgb6	-1.017710488	9.05E-05	integrin beta 6	←

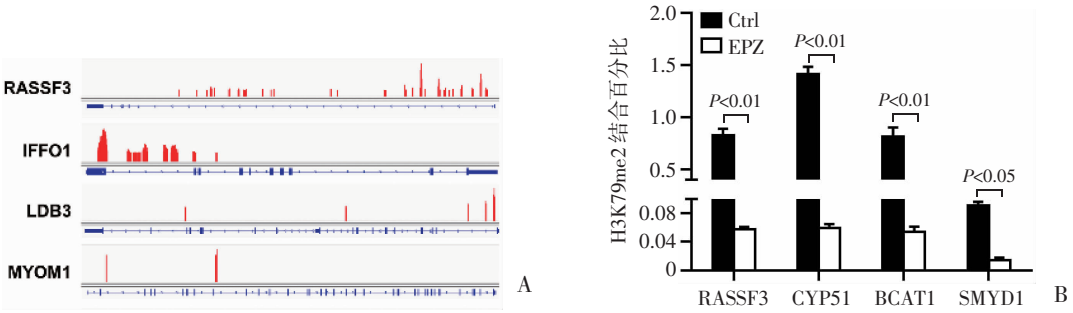
B



D

A:火山图:以 padj<0.05 及 Log2(Fold Change)≥1 为阈值,表达显著升高的基因用红色圆点表示,表达显著下降的基因用蓝色圆点表示,其余用黑色圆点表示;B:表达差异前 30 基因列表[依据 Log_2(Fold Change)由大到小],箭头标注为存在 K3K79me2 结合位点的基因;C:表达下调基因富集 Reactome 通路分析;D:表达下调基因的 GSEA 分析

图 4 成肌分化过程中受 Dot1L 调控的基因阵列



A:部分表达下降基因 H3K79me2 CHIP-SeqIGV 筛选结果;B:C2C12 细胞中 H3K79me2ChIP-qPCR 结果

图 5 Dot1L 直接调控的部分基因验证

3 讨论

肌卫星细胞成肌分化过程的调控机制研究对于干预肌肉减少症发生以及促进骨骼肌损伤后修复都发挥着重要的作用[2,4]。我们利用成肌分化体外模型 C2C12 细胞系,发现 Dot1L 的组蛋白底物 H3K79 的甲基化水平在成肌分化过程中逐渐升高。应用 Dot1L 特异性抑制剂 EPZ5676[15]和 SGC0946 处理后,C2C12 细胞融合指数及成肌分化标志分子 MHC 和 Myogenin 的蛋白质和 mRNA 水平均显著下降。因此,表观遗传调控酶 Dot1L 对于骨骼肌的成肌分化过程具有正向调控作用。

Dot1L 作为目前为止发现的唯一负责组蛋白 H3K79 甲基化(H3K79me1/2/3)的甲基转移酶[10],抑制其酶活性后,细胞内总 H3K79 的甲基化水平显著降低。结合 H3K79 的甲基化水平在成肌分化过程中逐渐升高的表型以及抑制剂处理细胞融合指数和 MHC 表达降低的现象,支持 Dot1L 通过调控 H3K79me 水平,参与成肌分化调控的推断。根据文献报道,H3K79 的甲基化与转录激活密切相关[16],我们对分化的 C2C12 细胞进行转录组测序,Dot1L 抑制剂处理后,表达水平下降的有 337 个基因,显著多于上升的 200 个基因。RNA-Seq 显示受 Dot1L 调控的基因阵列主要集中在成肌转录因子、细胞成肌分化标志物、肌细胞功能标志物、肌肉细胞能量代谢等。其中成肌转录因子如 Myogenin 是一种肌肉组织特异性表达的转录因子,与 MYF5 和 MYOD1 一起共同结合在如 MCK 和 MHC Ⅱb 等肌肉特异性基因的启动子区域,调控相关基因的转录水平,是成肌分化过程中的重要标志物[7,17]。调控肌细胞功能的基因如 Mybpc1[18]和 Dmd、Mybpc1 编码肌球蛋白结合蛋白,在肌肉收缩过程中发挥将肌酸激酶募集到肌球蛋白丝的作用[19]。Dmd 作为一种锚定蛋白,通过 F-肌动蛋白将细胞外基质固定在细胞骨架上发挥稳定肌膜结构的功能[20],该基因的缺失将导致杜氏肌营养不良症(DMD)或心肌病的发生[21],并且有文献证明[14],其在心肌组织中同样受 Dot1L 的转录调控。肌肉细胞能量代谢相关基因如 Cd36、Bcat1 和 Cd36[22]是一种清道夫受体,在肌细胞摄取长链脂肪酸(FA)的过程中发挥作用[23]。Bcat1[24]作为启动支链氨基酸分解代谢的限速酶,在肌肉的能量代谢中发挥重要作用。

结合 H3K79me2 CHIP-Seq 数据,在 200 个基因周围找到 H3K79me2 的结合位点,表明这一部分基因直接受 Dot1L 的调控。我们挑选 RASSF3、Cyp51、Bcat1、Smyd1 等基因进行验证,在这些基因周围确实找到了 H3K79me2 的结合位点,且结合强度受 Dot1L 酶活性调控。相对于这些直接被 Dot1L 调控的基因,我们发现 Dot1L 同时会通过间接方式调控其他基因的转录,Dot1L 调控成肌分化标志分子 MHC 和 Myogenin 的转录水平,但是在 H3K79me2 CHIP-Seq 中,MHC 和 Myogenin 基因启动子上下游 2 kb 范围内均未发现 H3K79me2 的结合信号,这与我们推测 Dot1L 对 MHC 和 Myogenin 的转录调控属于间接调控过程相符合。

SMYD1 基因在成肌分化过程中受到 Dot1L 直接调控。根据已有文献,SMYD1 属于 SMYD 家族,在心脏发育和心肌生成中发挥重要作用[25-26]。SMYD1 全身敲除小鼠在出生后第 10.5 天死亡[27]。SMYD1 在心肌细胞中的靶向缺失会干扰心肌细胞成熟的过程和右心室的正常形成。SMYD1 对心肌发育的影响在斑马鱼模型中同样也得到了验证[28-29]。因此 SMYD1 将被作为 Dot1L 调控成肌分化过程的重要候选基因进一步探索。

本研究通过研究 Dot1L 影响成肌分化的机制,揭示了成肌分化过程中 H3K79me2/3 的变化规律及其在重要基因转录调控区的分布规律,加深了对成肌分化过程中基因转录模式转变的认识,为预防、诊断和治疗肌肉减少症提供了新的理论基础。

参考文献:

[1] TSEKOURA M, KASTRINIS A, KATSOULAKI M, *et al*. Sarcopenia and its impact on quality of life[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 987: 213-218. DOI 10.1007/978-3-319-57379-3_19.

[2] FRY C S, LEE J D, MULA J, *et al*. Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia[J]. Nat Med, 2015, 21(1): 76-80. DOI:10.1038/nm.3710.

[3] LA COLLA A, PRONSATO L, MILANESI L, *et al*. 17β-Estradiol and testosterone in sarcopenia: role of satellite cells [J]. Ageing Res Rev, 2015, 24(Pt B): 166-177. DOI: 10.1016/j.arr.2015.07.011.

[4] FOCHI S, GIURIATO G, DE SIMONE T, *et al*. Regulation of microRNAs in satellite cell renewal, muscle function, sarcopenia and the role of exercise[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): E6732. DOI:10.3390/ijms21186732.

[5] LI P H, LIU A L, LIU C W, *et al*. Role and mechanism of catechin in skeletal muscle cell differentiation[J]. J Nutr Biochem, 2019, 74: 108225. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2019.108225.

[6] CHANG N C, RUDNICKI M A. Satellite cells: the architects of skeletal muscle[J]. Curr Top Dev Biol, 2014, 107: 161-181. DOI:10.1016/B978-0-12-416022-4.00006-8.

[7] ZAMMIT P S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF_4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis[J]. Semin Cell Dev Biol, 2017, 72: 19-32. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.11.011.

[8] LIU Y B, CHU A, CHAKROUN I, *et al*. Cooperation between myogenic regulatory factors and SIX family transcription factors is important for myoblast differentiation [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(20): 6857-6871. DOI: 10.1093/nar/gkq585.

[9] LAMARCHE É, ALSUDAIS H, RAJGARA R, *et al*. SMAD2 promotes myogenin expression and terminal myogenic differentiation [J]. Development, 2021, 148(3): dev195495. DOI:10.1242/dev.195495.

[10] VAN WELSEM T, KORTHOUT T, EKKEBUS R, *et al*. Dot1 promotes H2B ubiquitination by a methyltransferase-independent mechanism[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(21): 11251-11261. DOI:10.1093/nar/gky801.

[11] KARI V, RAUL S K, HENCK J M, *et al*. The histone methyltransferase DOT1L is required for proper DNA damage response, DNA repair, and modulates chemotherapy responsiveness[J]. Clin Epigenetics, 2019, 11(1): 4. DOI:10.1186/s13148-018-0601-1.

[12] KANG J Y, PARK J W, HAHM J Y, *et al*. Histone H3K79 demethylation by KDM2B facilitates proper DNA replication through PCNA dissociation from chromatin[J]. Cell Prolif, 2020, 53(11): e12920. DOI:10.1111/cpr.12920.

[13] BARRY E R, KRUEGER W, JAKUBA C M, *et al*. ES cell cycle progression and differentiation require the action of the histone methyltransferase Dot1L[J]. Stem Cells, 2009, 27(7): 1538-1547. DOI:10.1002/stem.86.

[14] NGUYEN A T, XIAO B, NEPPL R L, *et al*. DOT1L regulates dystrophin expression and is critical for cardiac function[J]. Genes Dev, 2011, 25(3): 263-274. DOI: 10.1101/gad.2018511.

[15] WOOD K, TELLIER M, MURPHY S. DOT1L and H3K79 methylation in transcription and genomic stability [J]. Biomolecules, 2018, 8(1): 11. DOI: 10.3390/biom8010011.

[16] MALEKI S J, ROYER C A, HURLBURT B K. Analysis of the DNA-binding properties of MyoD, myogenin, and E12 by fluorescence anisotropy [J]. Biochemistry, 2002, 41(35): 10888-10894. DOI:10.1021/bi025528q.

[17] HA K, BUCHAN J G, ALVARADO D M, *et al*. MYBPC1 mutations impair skeletal muscle function in zebrafish models of arthrogryposis[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(24): 4967-4977. DOI:10.1093/hmg/DDT344.

[18] CHEN Z, ZHAO T J, LI J, *et al*. Slow skeletal muscle myosin-binding protein-C (MyBPC1) mediates recruitment of muscle-type creatine kinase (CK) to myosin [J]. Biochem J, 2011, 436(2): 437-445. DOI: 10.1042/BJ20102007.

[19] KENDALL G C, MOKHONOVA E I, MORAN M, *et al*. Dantrolene enhances antisense-mediated exon skipping in human and mouse models of Duchenne muscular dystrophy [J]. Sci Transl Med, 2012, 4(164): 164ra160. DOI:10.1126/scitranslmed.3005054.

[20] SALVADORI L, CHIAPPALUPI S, ARATO I, *et al*. Sertoli cells improve myogenic differentiation, reduce fibrogenic markers, and induce utrophin expression in human DMD myoblasts[J]. Biomolecules, 2021, 11(10):

1504. DOI:10.3390/biom11101504.

[21] LOPEZ-YUS M, LOPEZ-PEREZ R, GARCIA-SOBREVIELA M P, *et al*. Adiponectin overexpression in C2C12 myocytes increases lipid oxidation and myofiber transition[J]. J Physiol Biochem, 2021. DOI:10.1007/s13105-021-00836-7.

[22] KATO H, WATANABE H, IMAFUKU T, *et al*. Advanced oxidation protein products contribute to chronic kidney disease-induced muscle atrophy by inducing oxidative stress *via* CD36/NADPH oxidase pathway[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2021, 12(6): 1832-1847. DOI:10.1002/jcsm.12786.

[23] JIANG Z, ZHENG J, LIU J, *et al*. Novel branched-chain amino acid-catabolism related gene signature for overall survival prediction of pancreatic carcinoma[J]. J Proteome Res, 2021: 2021Nov24. DOI: 10.1021/acs.jproteome.1c00607.

[24] WARREN J S, TRACY C M, MILLER M R, *et al*. Histone methyltransferase Smyd1 regulates mitochondrial energetics in the heart[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(33): E7871-E7880. DOI:10.1073/pnas.1800680115.

[25] JIAO S, XU R, DU S J. Smyd1 is essential for myosin expression and sarcomere organization in craniofacial, extraocular, and cardiac muscles[J]. J Genet Genom, 2021, 48(3): 208-218. DOI:10.1016/j.jgg.2021.03.004.

[26] GOTTLIEB P D, PIERCE S A, SIMS R J, *et al*. Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis[J]. Nat Genet, 2002, 31(1): 25-32. DOI:10.1038/ng866.

[27] LI H, ZHONG Y, WANG Z, *et al*. Smyd1b is required for skeletal and cardiac muscle function in zebrafish[J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(22): 3511-3521. DOI:10.1091/mbc.e13-06-0352.

[28] TAN X G, ROTLLANT J, LI H Q, *et al*. Sm_yD1, a histone methyltransferase, is required for myofibril organization and muscle contraction in zebrafish embryos[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(8): 2713-2718. DOI:10.1073/pnas.0509503103.

(**收稿**:2021-11-18;**修回**:2022-01-07)

(编辑 张 维)