

УДК 576.52;577.352

## MiR-222-3p, ДЕЙСТВУЮЩАЯ НА BTG2, РЕГУЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МИОБЛАСТОВ C2C12<sup>1</sup>

© 2019 г. D. L. Yang<sup>a</sup>, M. L. Gan<sup>a</sup>, Y. Tan<sup>a</sup>, G. H. Ge<sup>a</sup>, Q. Li<sup>b</sup>, Y. Z. Jiang<sup>c</sup>, G. Q. Tang<sup>a</sup>, M. Z. Li<sup>a</sup>, J. Y. Wang<sup>d</sup>, X. W. Li<sup>a</sup>, S. H. Zhang<sup>a, \*</sup>, L. Zhu<sup>a, \*\*</sup>

<sup>a</sup>Farm Animal Genetics Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu, 611130 China

<sup>b</sup>Sichuan Province General Station of Animal Husbandry, Chengdu, 611130 China

<sup>c</sup>College of Life and Science, Sichuan Agricultural University, Chengdu, 611130 China

<sup>d</sup>Chongqing Academy of Animal Sciences, Chengdu, 402460 China

\*e-mail: zhangsh1919@163.com

\*\*e-mail: zhuli7508@163.com

Поступила в редакцию 21.01.2018 г.

После доработки 30.04.2018 г.

Принята к публикации 08.05.2018 г.

MiR-222-3p участвует в пролиферации опухолевых клеток, а также играет важную роль в дифференцировке и созревании мышечных клеток. Однако роль этой микроРНК в пролиферации миобластов скелетных мышц не установлена. Нами показано, что в ходе пролиферации миобластов C2C12 уровень miR-222-3p сначала возрастает, а затем снижается. С использованием синтетических аналогов и ингибиторов микроРНК в экспериментах типа приобретения или потери функции показано, что сверхпродукция miR-222-3p в клетках C2C12 ускоряет пролиферацию миобластов и репрессирует образование мышечных волокон, в то время как снижение уровня miR-222-3p приводит к противоположному эффекту. С помощью программы предсказания мишеней микроРНК обнаружено, что потенциальной мишенью miR-222-3p может быть ген *BTG2*. В процессе формирования мышц синтетические аналоги miR-222-3p снижают уровень мРНК *BTG2*, в то время как ингибиторы miR-222-3p увеличивают содержание этого транскрипта. С использованием репортерной системы на основе генов двух разных люцифераз показано, что miR-222-3p является специфическим регулятором гена *BTG2*. Более того, установлено, что опосредованное малыми интерферирующими РНК снижение количества мРНК *BTG2* в миобластах C2C12 ускоряет пролиферацию и супрессирует дифференцировку. Предложен новый механизм, согласно которому miR-222-3p регулирует пролиферацию и дифференцировку миобластов C2C12, влияя на уровень мРНК, кодируемой геном *BTG2*. Эти данные расширяют наши представления о роли микроРНК в развитии скелетных мышц.

**Ключевые слова:** miR-222-3p, *BTG2*, миобласты C2C12, пролиферация, дифференцировка

**DOI:** 10.1134/S002689841901018X

### ВВЕДЕНИЕ

Миогенез — это многостадийный процесс, включающий пролиферацию миобластов, а также их дифференцировку в мышечные трубочки, в ходе которой происходит специфическое слияние одноядерных миоцитов, образуется многоядерный синцитий, формируются и созревают мышечные волокна. В этом строго контролируемом процессе задействованы множественные регуляторы [1]. Ключевой процесс миогенеза — пролиферация миобластов — регулируется такими генами клеточного цикла, как гены циклинов D1 и E и циклинзависимой киназы 4 (CDK4) [2].

Выход из клеточного цикла и дифференцировка в мышечные трубочки управляется четырьмя миогенными регуляторными факторами: антигеном миогенной дифференцировки (MyoD), миогенным фактором 5 (Myf5), миогенином (MyoG) и миогенным регуляторным фактором 4 (Myf4) [3]. Именно MyoD и Myf5 считаются факторами, детерминирующими миогенез, хотя MyoG и Myf4 присутствуют в больших количествах на терминальной стадии дифференцировки и вызывают слияние миобластов с образованием мышечных трубочек [3]. Миогенез регулируется многими генами, однако регуляторы пролиферации и дифференцировки миобластов пока не идентифицированы.

<sup>1</sup> Статья представлена авторами на английском языке.

Ген белка 2 транслокации клеток (*BTG2*) исходно был описан как опухолевый супрессор. Этот ген кодирует белок, принадлежащий к семейству белков *BTG/TOV*, члены которого регулируют клеточный цикл в различных типах клеток [4, 5]. Белок *BTG2* проявляет антипролиферативную, антиапоптотическую и пролиферативную активность [6]. Последние данные указывают на то, что ген *BTG2* активно экспрессируется в сердечных и скелетных мышцах, причем его экспрессия возрастает при дифференцировке миобластов C2C12 [7]. Более того, снижение экспрессии *BTG2* блокирует дифференцировку миобластов C2C12 [8]. Однако роль *BTG2* в пролиферации и дифференцировке миобластов неясна. В частности непонятно, обладает ли *BTG2* антипролиферативной активностью при дифференцировке миобластов.

МикроРНК – это малые некодирующие РНК (длиной примерно 22 н.), которые угнетают экспрессию генов на посттранскрипционном уровне, специфически связывая 3'-нетранслируемые участки (3'-UTR) для контроля стабильности мРНК и их трансляционной эффективности [9]. МикроРНК играют важную роль в развитии скелетных мышц, равно как и в регуляции пролиферации и дифференцировки мышечных клеток [10]. Более того, miR-133 ускоряет пролиферацию миобластов C2C12 и ингибирует их дифференцировку, действуя на фактор ответа на сыворотку (SRF) [11]. miR-1 и miR-206 играют противоположные роли, регулируя гены-мишени, кодирующие гистондеацетилазу 4 (HDAC 4) и белок Pax7 соответственно [11, 12]. Кроме того, пролиферацию и дифференцировку миобластов регулирует множество микроРНК.

Согласно новым данным, уровень miR-222-3p, которой приписывали участие в пролиферации опухолевых клеток, снижен в ходе дифференцировки. Эта микроРНК может индуцировать замедление дифференцировки и созревания клеток в процессе гистогенеза мышц [13, 14]. Кроме того, установлено, что синтропин  $\beta 1$  (*Sntb1*) – ингибитор циклинзависимой киназы 1b (*Cdkn1*), факторы транскрипции MyoG и MyoD, нуклеопротеин ANNAK и белок, содержащий РНК-связывающий мотив 24 (*Rbm24*), играют важные роли на многих стадиях миогенеза, и одновременно служат мишенями miR-222-3p в мышечных клетках [13, 15, 16]. Несмотря на сообщения о множестве мишеней, функция miR-222-3p в пролиферации миобластов плохо охарактеризована, и ген *BTG2*, к настоящему времени не входит в список мишеней miR-222-3p.

Нами установлено, что сверхпродукция miR-222-3p ускоряет пролиферацию миобластов C2C12 и супрессирует пролиферацию, в то время

как снижение уровня miR-222-3p оказывает противоположный эффект. По данным биоинформатического анализа *BTG2* является потенциальной мишенью miR-222-3p. Более того, снижение уровня экспрессии *BTG2* ускоряет пролиферацию и супрессирует дифференцировку миобластов C2C12. Эти результаты доказывают, что miR-222-3p регулирует пролиферацию и дифференцировку миобластов C2C12, воздействуя на функции гена *BTG2*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Культура клеток.** Миобласты C2C12 культивировали в среде DMEM (“Hyclone”, США), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Для индукции дифференцировки среду роста миобластов C2C12 по достижении 80% монослоя заменяли на дифференцировочную среду, состоящую из DMEM с 2% лошадиной сыворотки (“Gibco”, США).

**РНК-олигонуклеотиды и трансфекция.** Миобласты C2C12 рассевали по 12-луночным планшетах и культивировали до достижения 20–30% монослоя (в тестах по пролиферации) или до 80–90% (в опытах по дифференцировке) перед трансфекцией аналогами и ингибиторами miR-222-3p, контрольными РНК или малыми интерферирующими РНК (миРНК) к *BTG2* (синтезированы “RiboBio”, Китай) с использованием реагента Lipofectamine 3000 (“Invitrogen”, Китай). При измерении скорости пролиферации и дифференцировки среду заменяли свежей каждые 24 ч, клетки собирали через 96 ч (в опытах по пролиферации) или через 8 дней (в случае дифференцировки).

**Количественная ПЦР в реальном времени.** Суммарную РНК экстрагировали реагентом TRIzol (“TaKaRa”, Китай) в соответствии с рекомендациями производителя. Реакцию обратной транскрипции на мРНК проводили с помощью набора SYBR PrimeScript™ RT (“TaKaRa”) по инструкции производителя. В случае микроРНК реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора Mir-X™ miRNA для синтеза первой цепи (“TaKaRa”) по инструкции производителя. Количественную ПЦР в реальном времени мРНК и микроРНК проводили с помощью прибора CFX96 Real-Time PCR detection system (“Bio-Rad”, США) и красителя Power SYBR Green (“TaKaRa”) по инструкции производителей. В качестве нормировочного контроля при определении уровня мРНК и микроРНК использовали  $\beta$ -актин и U6 соответственно. Дифференциальную экспрессию мРНК и микроРНК анализировали с помощью метода  $\Delta\Delta^{2Ct}$  [17]. Нуклеотидные

**Таблица 1.** Последовательности праймеров, использованных в количественной ОТ-ПЦР, и синтетических РНК-олигонуклеотидов

Ген	Праймер (5'–3')	$T_{пл}$ , °C
Циклин D1	F-TAGGCCCTCAGCCTCACTC	60
	R-CCACCCCTGGGATAAAGCAC	
Циклин E	F-GCTTGCTCCGGGGATGAAAT	62
	R-GCGAGGACACCATAAGGAAATCTG	
CDK4	F-AGTTTCTAAGCGGCCTGGAT	60
	R-AACTTCAGGAGCTCGGTACC	
BTG2	F- ACAGAAAAGACAAAGGTT	60
	R- TTCACAAGGACAGAAGTAT	
MRF4	F-ATTCTTGAGGGTGCGGATTCCTG	60
	R-AAGACTGCTGGAGGCTGAGGCATC	
MyoG	F-GCCCAGTGAATGCAACTCCCACA	58
	R-CAGCCGCGAGCAAATGATCTCCT	
MyoD	F-AGACTTCTATGATGACCCGTGTT	57
	R-TCAGCGTTGGTGGTCTTGC	
Myf5	F-GAGCTGCTGAGGGAACAGGTGGAGA	57
	R-GTTCTTTCGGGACCAGACAGGGCTG	
MyHC	F-AGCAGCGACACTGAAATGGA	60
	R-GTTGTCGTTCCCTCACGGTCT	
β-актин	F-TGGAATCCTGTGGCATC CATGAAAC	60
	R-TAAAACGCAGCTCAG TAACAGTCCG	
miR-222-3p	F-AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	60
	R- Uni-miR qPCR Primer, в составе набора (TaKaRa)	
U6	F-CTCGCTTCGGCAGCACA	60
	R-AACGCTTCACGAATTTGCGT	
si-BTG2	GCAAGAACCAGATGATGCT	
wt-BTG2 3'-UTR	CAGCTTTATGGACAAATGTAACTTTCTTTTTTGTTTTTA- ATAAAAATGTAGCAGATCGTGTAATGTGTAGAGAAGGT- GGAATCCATAGC	
mut-BTG2 3'-UTR	CAGCTTTATGGACAAATGTAACTTTCTTTTTTGTTTTTAA- TAAAATACATCGAGATCGTGTAATGTGTAGAGAAGGTGG- AATCCATAGC	

Примечание. F – прямой праймер, R – обратный.

последовательности праймеров представлены в табл. 1.

**Определение скорости пролиферации.** Миобласты C2C12 растили в 96-луночных планшетах и трансфицировали аналогами или ингибиторами miR-222-3p, контрольными РНК и миРНК к *BTG2*. Пролиферацию клеток определяли через 0, 24, 48, 72 и 96 ч после трансфекции с помощью набора Cell Counting Kit 8 (ССК-8, “Beoytime”, Китай) в соответствии с инструкциями производителя. Скорость пролиферации клеток оценивали также с использованием EdU. Через 24 ч после трансфекции миобласты C2C12 культивировали в свежей среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 10 мкМ EdU (“RiboBio”), в течение 2 ч. Затем клетки фиксировали, пермеабелизировали и окрашивали в соответствии с инструкцией. Клетки, содержащие EdU, визуализовали с помощью микроскопа Nikon TE2000 (“Nikon”, Япония).

**Определение люциферазной активности с помощью двухлюциферазной репортерной системы.** Клетки HeLa выращивали в 48-луночных планшетах до достижения 80–90% монослоя. Затем клетки котрансфицировали 13 нМ аналога miR-222-3p или контрольной РНК и 0.25 мг плазмиды, содержащей κДНК люциферазы и 3'-UTR гена *BTG2* дикого типа или 3'-UTR с мутацией в участке связывания miR-222-3p. Клетки собирали через 48 ч после трансфекции, активность люцифераз определяли, используя Dual-Glo Luciferase Assay System (“Promega”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Относительную интенсивность флуоресценции рассчитывали, определяя соотношение сигналов люциферазы полипа *Renilla* и люциферазы светлячка.

**Иммунофлуоресценция.** Миогенную дифференцировку клеток C2C12 подтверждали путем иммунофлуоресцентного окрашивания на тяжелую цепь миозина скелетных мышц. Дифференцировку индуцировали в клетках, растущих в 12-луночных планшетах. Затем клетки трансфицировали аналогами и ингибиторами miR-222-3p, контрольными РНК, миРНК к *BTG2* или контролем без РНК. Через 6 дней клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 20 мин, а затем обрабатывали в течение 10 мин 0.2%-ным Тритоном X-100 в PBS при комнатной температуре. После инкубации в растворе 5%-ной нормальной козьей сыворотки в течение 1 ч клетки инкубировали в течение ночи при 4°C с антителами к тяжелым цепям миозина (“Bioss”, Китай), а затем с конъюгатом вторичных IgG (“Bioss”, Китай) при 37°C в течение 1 ч. Ядра клеток окрашивали с помощью DAPI (“Invitrogen”, США) в темноте. Изображения клеток получали с помощью обо-

дованного цифровой камерой флуоресцентного микроскопа (“Olympus”, Япония). Индекс слияния клеток рассчитывали в программе ImageJ с использованием трех изображений каждого образца.

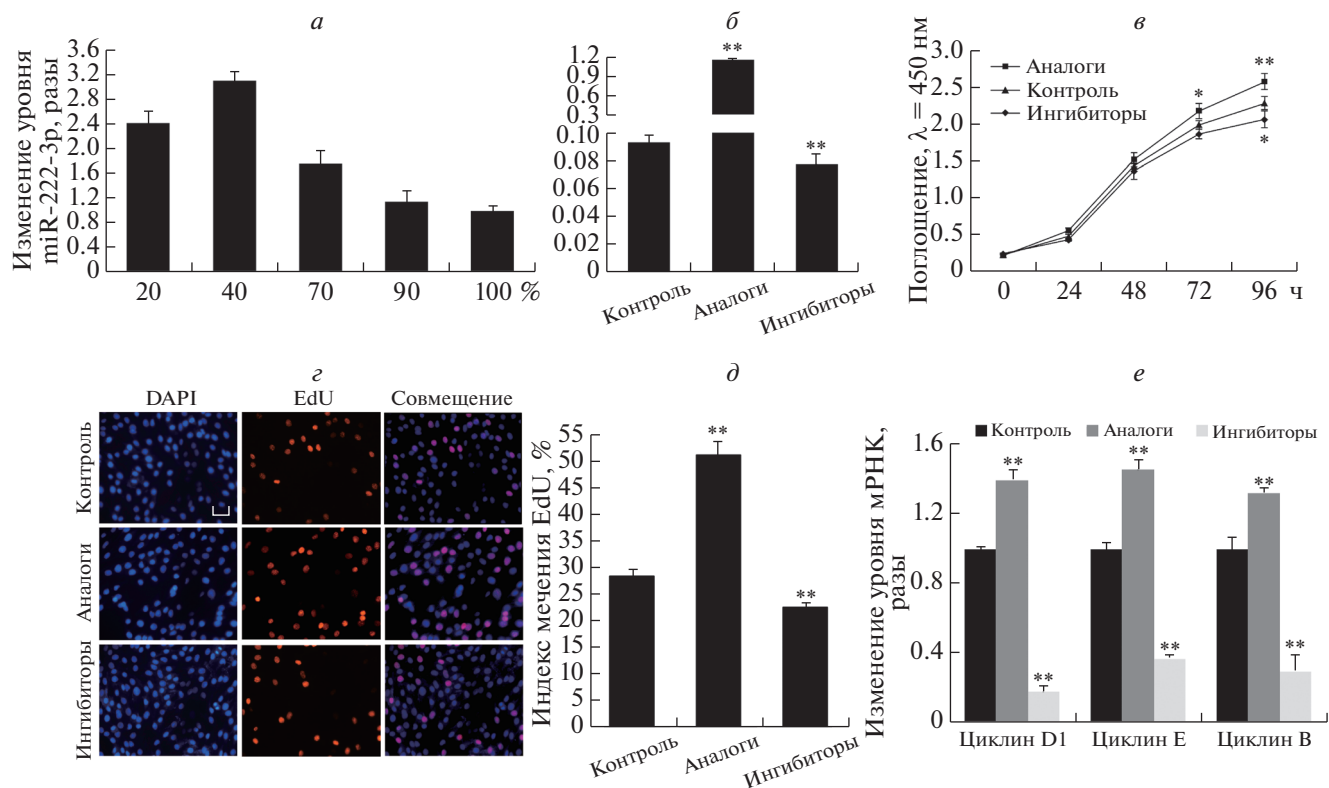
**Статистический анализ.** Все количественные результаты представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка (SEM). Различия между группами анализировали с помощью *t*-теста Стьюдента. Статистическую обработку проводили в программе SPSS 20.0.  $P < 0.05$  считали показателем статистической значимости, а  $P < 0.01$  — показателем высокой статистической значимости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *MiR-222-3p ускоряет пролиферацию миобластов C2C12*

Чтобы понять роль miR-222-3p в пролиферации миобластов C2C12, мы сначала определили уровни экспрессии этой микроРНК при различной плотности пролиферирующих клеток. Экспрессия miR-222-3p увеличивалась при достижении клетками 20–40% монослоя, однако при увеличении плотности клеток с 40 до 100% уровень miR-222-3p снижался (рис. 1а). Эти различия в уровне микроРНК в пролиферирующих клетках послужили основанием для изучения способности miR-222-3p модулировать пролиферацию миобластов. С целью выяснения роли miR-222-3p в пролиферации миобластов клетки C2C12 трансфицировали синтетическими аналогами miR-222-3p, ее ингибиторами, а также РНК-негативным контролем. Как показано на рис. 1б, уровень miR-222-3p возрастал при трансфекции аналогами микроРНК, тогда как ингибиторы этой РНК снижали ее уровень.

В опытах с использованием ССК8 подтверждено, что miR-222-3p усиливает пролиферацию миобластов (рис. 1в). Эти результаты были подтверждены в экспериментах по включению EdU, которые показали, что трансфекция клеток C2C12 синтетическими аналогами miR-222-3p повышает соотношение EdU-позитивных клеток (рис. 1г, д). Более того, уровень транскрипции генов регуляторов клеточного цикла [18], таких как циклин E, циклин D и Cdk4, которые вызывают задержку клеток C2C12 на стадии G0/G1, в группе, сверхпродуцирующей miR-222-3p, был заметно выше, чем в контрольной группе. В то же время, репрессия miR-222-3p вызывала противоположный эффект (рис. 1е). Следовательно, наши результаты указывают на то, что miR-222-3p усиливает пролиферацию миобластов C2C12.



**Рис. 1.** MiR-222-3p усиливает пролиферацию миобластов C2C12. *а* – Уровень miR-222-3p в пролиферирующих миобластах C2C12; *б* – уровень miR-222-3p в миобластах C2C12 после трансфекции аналогами или ингибиторами miR-222-3p; *в* – число клеток, измеренное с помощью Cell Count Kit 8 (ССК8); *г*, *д* – через 24 ч после трансфекции аналогами или ингибиторами miR-222-3p клетки фиксировали и окрашивали на EdU (красный), ядра окрашивали DAPI (синий). Масштаб: 20 мкм. *е* – Экспрессия генов белков-регуляторов клеточного цикла по результатам анализа уровня мРНК методом количественной ПЦР. Данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ,  $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ .

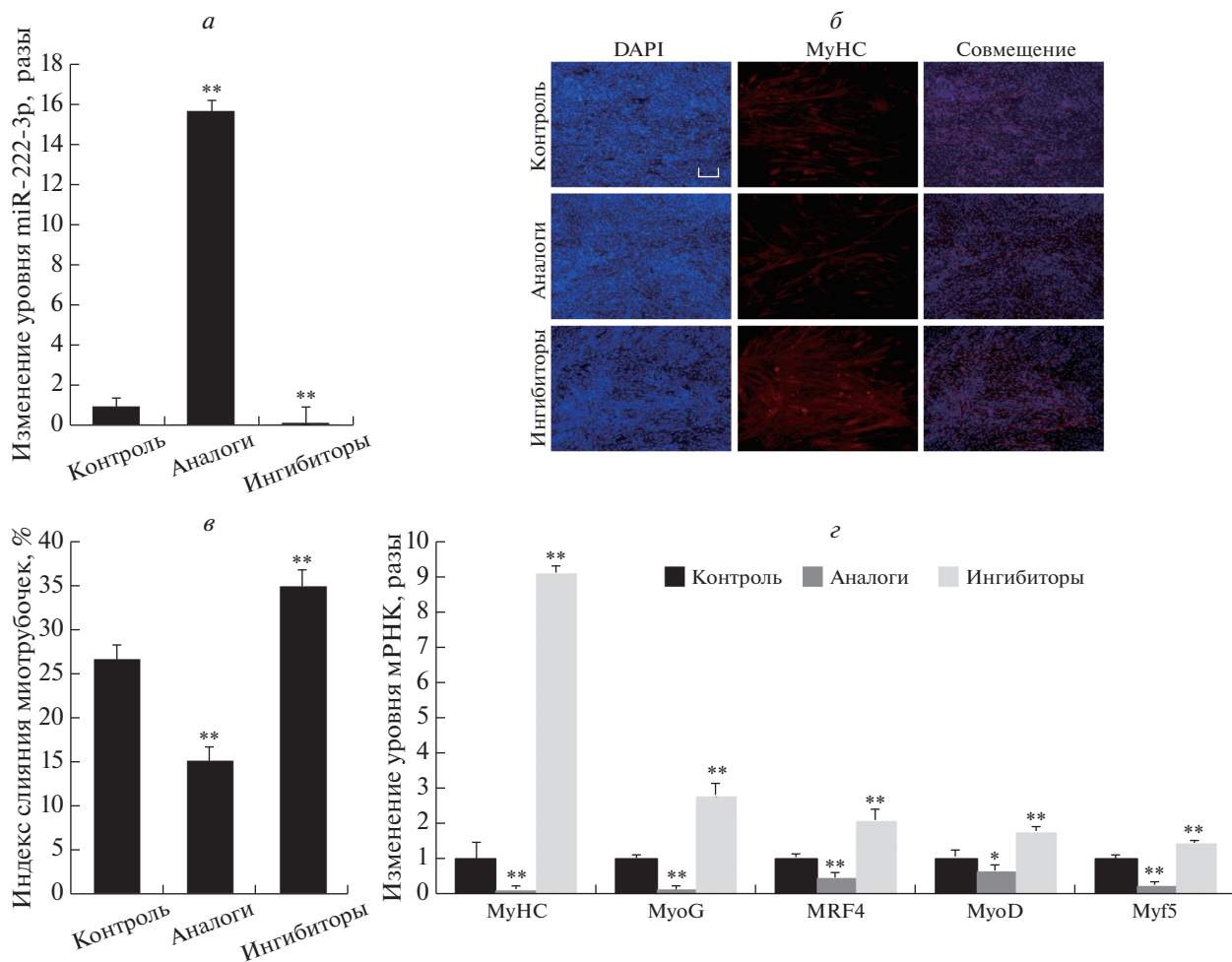
### *MiR-222-3p* супрессирует дифференцировку миобластов C2C12

Дифференцировка миобластов – это еще один критический для миогенеза процесс. Для дальнейшего подтверждения участия miR-222-3p в дифференцировке миобластов, клетки C2C12 успешно трансфицировали аналогами и ингибиторами miR-222-3p, а также контрольными малыми РНК. При этом в зависимости от того, аналоги или ингибиторы использовали для трансфекции, удалось достичь сверхпродукции или снижения уровня miR-222-3p (рис. 2а). Трансфекция C2C12 аналогами miR-222-3p угнетала образование миотрубочек клетками C2C12 по сравнению с негативным контролем. Напротив, ингибиторы miR-222-3p индуцировали формирование более многочисленных и длинных миотрубочек миобластами (рис. 2б, в). Более того, мы проанализировали уровень мРНК тяжелой цепи миозина (MyHC), MyoG, Mrf4, MyoD и Myf5 – маркеров дифференцировки миобластов, в трех группах трансфицированных клеток C2C12 [19]. Уровень мРНК маркеров дифференцировки значительно

снижался в клетках, трансфицированных аналогами miR-222-3p, и очень сильно увеличивался после трансфекции клеток C2C12 ингибиторами, по сравнению с уровнем мРНК соответствующих маркеров в негативном контроле (рис. 2г). В целом, это убедительно показывает, что miR-222-3p супрессирует дифференцировку клеток C2C12, что согласуется с результатами предшествующих исследований [13].

### *MiR-222-3p* влияет на пролиферацию и дифференцировку миобластов C2C12, регулируя *BTG2*

MiR-222-3p может способствовать пролиферации миобластов C2C12 и супрессировать их дифференцировку в ходе миогенеза скелетных мышц, однако механизм, лежащий в основе этого влияния, пока не установлен. Чтобы изучить молекулярный механизм, с помощью которого miR-222-3p влияет на пролиферацию и дифференцировку миобластов C2C12, для поиска генов, регулируемых miR-222-3p, мы использовали программы TargetScan и miRanda. Объединив

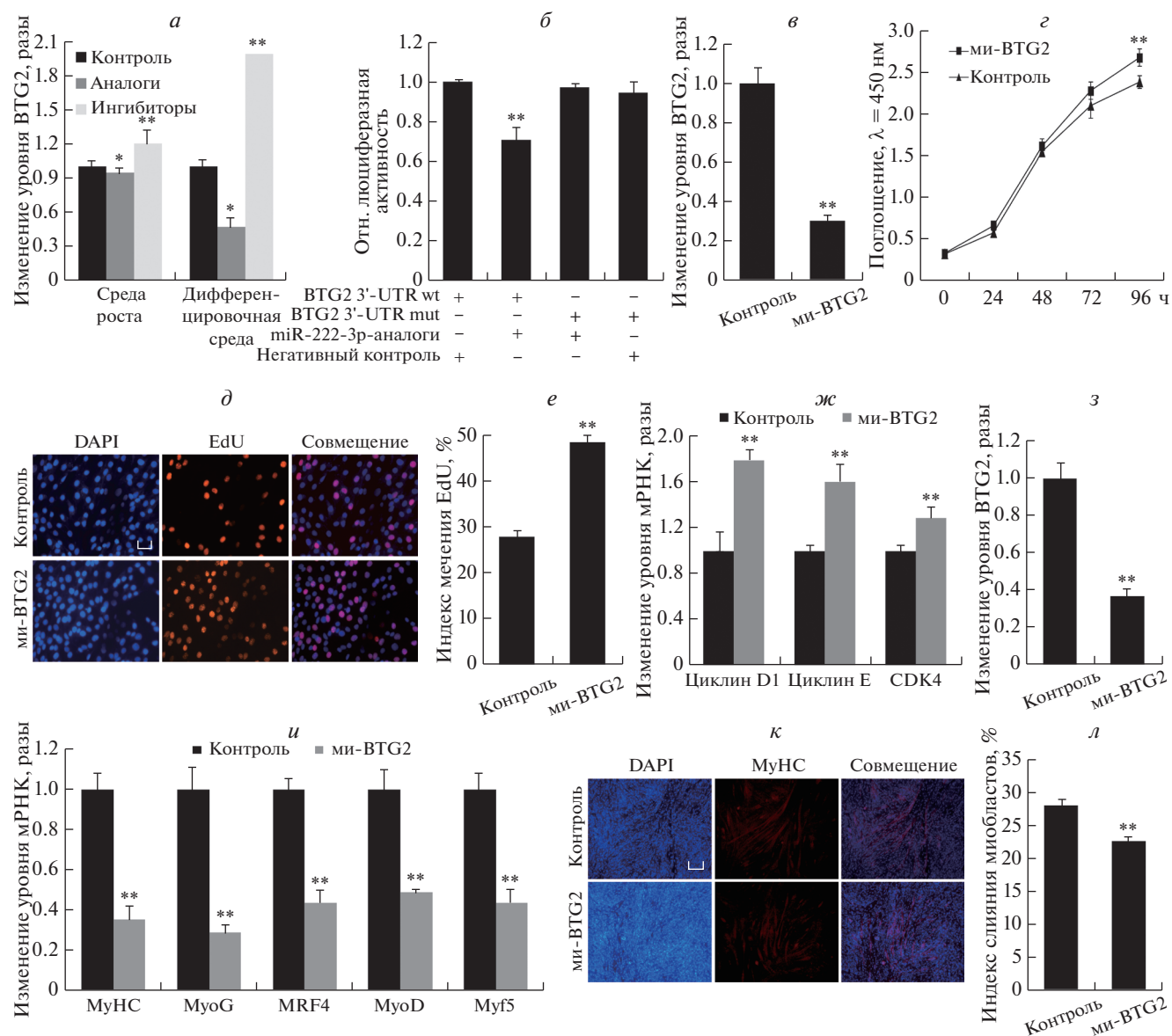


**Рис. 2.** MiR-222-3p супрессирует дифференцировку миобластов C2C12. *а* – Изменение уровня miR-222-3p (разы) после трансфекции клеток аналогами и ингибиторами miR-222-3p по сравнению с негативным контролем; *б, в* – влияние miR-222-3p на образование миотрубочек клетками C2C12. Окрашивание антителами к MyHC (красный) миобластов C2C12, трансфицированных аналогами, ингибиторами miR-222-3p и контрольными РНК, через 7 дней с момента начала дифференцировки. Масштаб – 20 мкм. *г* – Относительный уровень транскриптов генов маркеров дифференцировки миобластов (MyHC, MyoG, MRF4, MyoD и Myf5), определенный с помощью количественной ПЦР. Данные представлены как средние значения ± SEM. *n* = 3. \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01.

результаты поиска с помощью разных программ, мы получили огромное число потенциальных мишеней miR-222-3p, включая ген *BTG2*, негативный регулятор пролиферации клеток. Как и ранее, мы трансфицировали клетки C2C12 аналогами, ингибиторами miR-222-3p и контрольными РНК во время пролиферации и дифференцировки миобластов. Оказалось, что уровень мРНК гена *BTG2* существенно снижался при трансфекции клеток аналогами miR-222-3p, в то время как ингибиторы miR-222-3p, наоборот, увеличивали ее уровень по сравнению с негативным контролем (рис. 3а). Поэтому мы предположили, что miR-222-3p может влиять на дифференцировку и пролиферацию миобластов C2C12, действуя на ген-мишень *BTG2*. Чтобы проверить, является ли ген *BTG2* “прямой” мишенью miR-222-3p, мы использова-

ли два разных репортерных гена люциферазы. Клетки HeLa котрансфицировали конструкциями, которые содержали мутированный или немодифицированный 3'-UTR *BTG2* и люциферазный репортер, и аналогами miR-222-3p и соответствующими контрольными РНК. Оказалось, что сверхпродукция miR-222-3p эффективно репрессирует относительную люциферазную активность, в то время как при использовании мутантного 3'-UTR *BTG2* такой эффект не был выявлен (рис. 3б). Эти результаты поддерживают предположение, что ген *BTG2* – это мишень miR-222-3p.

Затем мы определили роль miR-222-3p в регуляции *BTG2* в ходе пролиферации и дифференцировки миобластов. Во-первых, чтобы уменьшить уровень мРНК *BTG2* и понять его непосредственную функцию в пролиферации и дифферен-



**Рис. 3.** MiR-222-3p влияет на дифференцировку и пролиферацию миобластов C2C12, регулируя уровень мРНК *BTG2*. *а* – Изменение уровня miR-222-3p (разы) после трансфекции клеток аналогами и ингибиторами miR-222-3p, по сравнению с негативным контролем. *б* – Относительная активность люциферазы в клетках HeLa, трансфицированных одновременно аналогами miR-222-3p или контрольной РНК, и репортерными конструкциями, несущими 3'-UTR *BTG2* дикого типа или контрольный 3'-UTR с мутацией. *в* – Изменения в уровне мРНК *BTG2* (разы), миРНК к мРНК *BTG2* в пролиферирующих миоблестах C2C12 по сравнению с негативным контролем (неспецифическим дуплексом). *г* – Число клеток, измеренное с помощью Cell Count Kit 8 (ССК8). *д*, *е* – EdU-тест на пролиферацию. *ж* – Количественная оценка экспрессии генов белков-регуляторов клеточного цикла. *з* – Изменение количества мРНК *BTG2* после трансфекции пролиферирующих миобластов C2C12 миРНК к *BTG2*. *и* – Изменение количества мРНК маркеров дифференцировки миобластов (Myf5, MyoD, MRF4, MyoG и MyHC; разы) в трансфицированных клетках. *к*, *л* – Влияние миРНК к мРНК *BTG2* на формирование миотрубочек миоблестами C2C12. Масштаб 20 мкм. При проведении экспериментов по определению активности люциферазы использовали трипликаты биологических образцов. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM.  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

цировке миобластов, мы использовали миРНК. Обнаружено, что миРНК к *BTG2* эффективно снижает уровень мРНК *BTG2* при пролиферации миобластов (рис. 3в). Тесты ССК-8 и EdU показали, что группа образцов, в которой использовали

миРНК, уровень пролиферации был выше, чем в негативном контроле (рис. 3г–е). Более того, уровень мРНК генов-регуляторов клеточного цикла (циклина E, *CDK4*, циклина D1) также был снижен (рис. 3ж). Кроме того, трансфекция миРНК

к *BTG2* дифференцирующихся клеток C2C12 также значительно снижала уровень мРНК *BTG2* (рис. 3з). Уровень мРНК генов маркеров мышечной дифференцировки (*MyHC*, *MyoG*, *MRF4*, *MyoD* и *Myf5*) также был снижен через 6 дней (рис. 3и). Более того, при ингибировании *BTG2* очевидным было снижение числа мышечных миотрубочек (рис. 3к, л). Эти результаты указывают на то, что, воздействуя на ген *BTG2*, miR-222-3p может влиять на пролиферацию и дифференцировку миобластов C2C12.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе выявлена важная роль miR-222-3p как в пролиферации миобластов, так и в их дифференцировке. Сверхэкспрессия miR-222-3p способствует пролиферации и репрессирует дифференцировку миобластов C2C12, а снижение уровня этой микроРНК оказывает противоположный эффект. Более того, снижение уровня мРНК *BTG2* ускоряет пролиферацию и супрессирует дифференцировку клеток C2C12. Кроме того, miR-222-3p специфически регулирует уровень мРНК *BTG2* во время пролиферации и дифференцировки клеток C2C12.

Исследование поддержано National Natural Science Foundation of China (31530073), Sichuan Science & Technology Support Program (16ZC2838; 2016NZ0089), Chinese National Science & Technology Support Program (2015BAD03B01-11) и целевым грантом China Agriculture Research System (CARS-36-05B).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ambros V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*. **7006**, 350–355.
- Berkes C.A., Tapscott S.J. (2005) MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **16**, 585–595.
- Cardinali B., Cappella M., Provenzano C., Garcia-Manteiga J.M., Lazarevic D., Cittaro D., Martelli F., Falcone G. (2016) MicroRNA-222 regulates muscle alternative splicing through Rbm24 during differentiation of skeletal muscle cells. *Cell Death Dis.* **7**, e2086.
- Cardinali B., Castellani L., Fasanaro P., Basso A., Alemà S., Martelli F., Falcone G. (2009) MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells. *PLoS One*. **4**, e7607.
- Chen J.F., Mandel E.M., Thomson J.M., Wu Q.L., Callis T.E., Hammond S.M., Conlon F.L., Wang D.Z. (2006) The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genetics*. **38**, 228–233.
- Chen J.F., Tao Y., Li J., Deng Z.L., Yan Z., Xiao X., Wang D.Z. (2010) microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J. Cell Biol.* **190**, 867–879.
- De F.M., De L.A. (2006) Involvement of CDKs and cyclins in muscle differentiation. *Eur. J. Histochem.* **62**, 19–23.
- Elghissassi F., Valsesiawittmann S., Falette N., Duriez C., Walden P. D., Puisieux A. (2002) BTG2(TIS21/PC3) induces neuronal differentiation and prevents apoptosis of terminally differentiated PC12 cells. *Oncogene*. **21**, 6772.
- Evangelisti C., Astolfi A., Gaboardi G.C., Tazzari P., Pession A., Goto K., Alberto M. (2009) TIS21/BTG2/PC3 and cyclin D1 are key determinants of nuclear diacylglycerol kinase-zeta-dependent cell cycle arrest. *Cell. Signal.* **21**, 801–809.
- Feng Z., Tang Z. L., Li K., Liu B., Yu M., Zhao S.H. (2007) Molecular characterization of the BTG2 and BTG3 genes in fetal muscle development of pigs. *Gene*. **403**, 170–177.
- Galardi S., Mercatelli N., Giorda E., Massalini S., Frajese G.V., Ciafrè S.A. (2007) miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J. Biol. Chem.* **282**, 23716–23724.
- Ge Y., Chen J. (2011) MicroRNAs in skeletal myogenesis. *Cell Cycle*. **10**, 441–448.
- Huang W.W., Yang J.S., Pai S.J., Wu P.P., Chang S.J., Chu F.S., Fan M.J., Chiou S.M., Kuo H.M., Yeh C.C., Chen P.Y., Tsuzuki M., Chung J.G. (2012) Bufalin induces G0/G1 phase arrest through inhibiting the levels of cyclin D, cyclin E, CDK2 and CDK4, and triggers apoptosis via mitochondrial signaling pathway in T24 human bladder cancer cells. *Mutat. Res.* **732**, 26–33.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. **25**, 402–408.
- Montarras D., Chelly J., Bober E., Arnold H., Ott M.O., Gros F., Pinset C. (1991) Developmental patterns in the expression of Myf5, MyoD, myogenin, and MRF4 during myogenesis. *New Biologist*. **3**, 592–600.
- Reiter R.J., Tan D.X., Galano A. (2014) Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. *Front. Physiol.* **5**, 377.
- Roy R., Taourit S., Zaragoza P., Eggen A., Rodellar C. (2005) Genomic structure and alternative transcript of bovine fatty acid synthase gene (FASN): comparative analysis of the FASN gene between monogastric and ruminant species. *Cytogenet. Genome Res.* **111**, 65–73.
- Sabourin L.A., Rudnicki M.A. (2000) The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genetics*. **57**, 16–25.
- Tan S.B., Li J.B., Chen X., Zhang W., Zhang D., Zhang C., Li D., Zhang Y. (2014) Small molecule inhibitor of myogenic microRNAs leads to a discovery of miR-221/222-myoD-myomiRs regulatory pathway. *Chem. Biol.* **21**, 1265–1270.



## MiR-222-3p REGULATES THE PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF C2C12 MYOBLASTS BY TARGETING BTG2

D. L. Yang<sup>1</sup>, M. L. Gan<sup>1</sup>, Y. Tan<sup>1</sup>, G. H. Ge<sup>1</sup>, Q. Li<sup>2</sup>, Y. Z. Jiang<sup>3</sup>, G. Q. Tang<sup>1</sup>, M. Z. Li<sup>1</sup>, J. Y. Wang<sup>4</sup>, X. W. Li<sup>1</sup>, S. H. Zhang<sup>1</sup>, \*, L. Zhu<sup>1</sup>, \*\*

<sup>1</sup>*Farm Animal Genetics Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu, 611130 China*

<sup>2</sup>*Sichuan Province General Station of Animal Husbandry, Chengdu, 611130 China*

<sup>3</sup>*College of Life and Science, Sichuan Agricultural University, Chengdu, 611130 China*

<sup>4</sup>*Chongqing Academy of Animal Sciences, Chengdu, 402460 China*

\**e-mail: zhangsh1919@163.com*

\*\**e-mail: zhuli7508@163.com*

MiR-222-3p has been implicated in tumor cell proliferation and has an important role in the differentiation and maturation of myogenic cells. However, its role in skeletal myoblast proliferation is still unclear. In this study, we found that miR-222-3p expression increases initially and then decreases during C2C12 myoblast proliferation. Using synthetic miRNA mimics and inhibitors in gain- or loss-of-function experiments, we showed that miR-222-3p overexpression in C2C12 cells promotes myoblast proliferation and represses myofiber formation, while miR-222-3p downregulation has the opposite effect. Using a prediction program, *BTG2* was identified as a possible target gene of miR-222-3p. During myogenesis, miR-222-3p mimics repress *BTG2* expression, while miR-222-3p inhibitors promote *BTG2* expression. Using dual-luciferase reporter assay, we further demonstrated that miR-222-3p specifically targets *BTG2*. Additionally, we show that siRNA-mediated downregulation of *BTG2* expression in C2C12 myoblasts promotes the proliferation and suppresses differentiation. In conclusion, we provide a novel insight into the mechanism by which miR-222-3p regulates the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts by targeting *BTG2*. This information contributes to our understanding of the role of miRNAs in skeletal muscle development.

**Keywords:** MiR-222-3p, *BTG2*, C2C12 myoblasts, proliferation, differentiation