

文章编号 1006-8147(2023)02-0142-06

论 著

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 Chidamide 抑制 C2C12 骨骼肌细胞分化及其机制

张露露¹, 郭洋¹, 王新莉², 牛文彦¹

(1.天津医科大学基础医学院免疫学系,天津 300070;2.天津医科大学朱宪彝纪念医院消化内科,天津 300134)

摘要 目的:探讨组蛋白去乙酰化酶抑制剂西达苯胺(Chidamide)对 C2C12 小鼠骨骼肌细胞分化作用及其分子机制。方法: CCK-8 (cell counting Kit-8)法检测 0、0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ Chidamide 处理后 C2C12 细胞的活力;将 C2C12 骨骼肌细胞分为对照组(control)和 Chidamide 组,Western 印迹检测 Chidamide 处理后组蛋白 H3 乙酰化(Pan-acetyl H3)水平,细胞免疫荧光染色肌管细胞分化成熟标志蛋白肌球蛋白重链(MyHC),检测肌细胞分化,Western 印迹和 qPCR 检测 MyHC、成肌分化抗原(MyoD)、肌细胞生成素(MyoG)的表达及肌原纤维 I 型(Myh7)、II a 型(Myh2)、II b 型(Myh4)和 II x 型(Myh1)的表达。结果:0、0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 的 Chidamide 均不影响细胞活力。Chidamide 升高 Pan-acetyl H3 蛋白水平($t=3.22, P<0.05$)。细胞免疫荧光结果显示,与对照组相比,Chidamide 处理后肌细胞融合受损,分化程度降低。Western 印迹和 qPCR 结果显示,与对照组相比,Chidamide 下调 MyHC、MyoD 和 MyoG 蛋白水平($t=5.71、6.05、7.37$,均 $P<0.01$)和 mRNA 水平($t=26.87、5.81、4.86$,均 $P<0.01$);降低 Myh7 蛋白($t=3.93, P<0.01$)和 mRNA 水平($t=4.85, P<0.01$);降低 Myh1、Myh2 蛋白($t=14.13、5.05$,均 $P<0.01$)和 mRNA 水平($t=15.48、16.82$,均 $P<0.001$),但不影响 Myh4 的蛋白($t=2.19, P>0.05$)和 mRNA 水平($t=1.50, P>0.05$)。结论:Chidamide 可能通过下调 MyoD 和 MyoG 的表达抑制 C2C12 骨骼肌细胞分化,且主要抑制 I 型、II a 和 II x 型肌原纤维,不影响 II b 型肌原纤维。

关键词 组蛋白去乙酰化酶抑制剂;骨骼肌;肌原纤维;分化

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

The inhibitive effect of histone deacetylase inhibitor Chidamide on the differentiation of C2C12 skeletal muscle cells and its mechanism

ZHANG Lu-lu¹, GUO Yang¹, WANG Xin-li², NIU Wen-yan¹

(1.Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Department of Gastroenterology, Chu Hsien-I Memorial Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300134, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of histone deacetylase inhibitor Chidamide on the differentiation of C2C12 skeletal muscle cells and its potential molecular mechanism. **Methods:** The cell counting Kit-8 (CCK-8) method was used to detect the viability of C2C12 cells after 0, 0.5, 1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ Chidamide treatment; C2C12 skeletal muscle cells were divided into control group and Chidamide group. Western blotting was used to detect the acetylation of histone H3 (Pan-acetyl H3) level after Chidamide treatment. Immunofluorescence staining of differentiation and maturation marker proteins myosin heavy chain (MyHC) was used to detect muscle cell differentiation. The protein and mRNA expressions of MyHC, myogenic differentiation antigen (MyoD), myogenin (MyoG), and the type I (Myh7), type II a (Myh2), type II b (Myh4) and type II x (Myh1) of myofibrils were detected by Western blotting and qPCR, respectively. **Results:** 0, 0.5, 1, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ Chidamide did not affect cell viability. Chidamide increased the protein level of Pan-acetyl H3 ($t=3.22, P<0.05$). Immunofluorescence results showed that compared with the control group, myocyte fusion was impaired and the degree of differentiation decreased after Chidamide treatment. Western blotting and qPCR results showed that compared with the control group, Chidamide decreased the protein levels ($t=5.71, 6.05, 7.37$, all $P<0.01$) and mRNA levels ($t=26.87, 5.81, 4.86$, all $P<0.01$) of MyHC, MyoD and MyoG. Chidamide also decreased protein and mRNA levels of Myh7 ($t=3.93, 4.85$, both $P<0.01$), Myh1 ($t=14.13, 15.48$, both $P<0.001$) and Myh2 ($t=5.05, 16.82$, both $P<0.01$). However, Chidamide did not affect the protein ($t=2.19, P>0.05$) and mRNA levels ($t=1.50, P>0.05$) of Myh4. **Conclusion:** Chidamide may inhibit the differentiation of C2C12 skeletal muscle cells by down-regulating the expressions of MyoD and MyoG, and mainly inhibits type I, II a and II x myofibrils, but does not affect type II b myofibrils.

Key words histone deacetylase inhibitors; skeletal muscle; myofibrils; differentiation

基金项目 天津市教委科研计划(2017KJ212)

作者简介 张露露(1997-),女,硕士在读,研究方向:免疫学;通信作者:牛文彦, E-mail:wniu@tmu.edu.cn。

骨骼肌是人体最大的组织,重量约占体重的40%,在调节机体的新陈代谢、运动、能量稳态等方面发挥着重要作用^[1]。骨骼肌分化,即成肌,是一个多步骤过程,包括骨骼肌卫星细胞的激活、增殖、分化和多核肌纤维形成^[2]。根据肌球蛋白重链(MyHC)的不同,骨骼肌主要分为四型多核肌纤维,即I型肌原纤维(MyHC I)、IIa型肌原纤维(MyHC IIa)、IIb型肌原纤维(MyHC IIb)和IIx型肌原纤维(MyHC IIx)^[3]。生肌调节因子4(MRF4)、生肌因子5(Myf5)、MyoD和MyoG是基本螺旋-环-螺旋转录因子家族成员,这些因子在胚胎发生和出生后肌发生期间调控骨骼肌细胞的决定和分化^[4]。MyoD和MyoG的激活可促进MyHC的表达,进而促进肌分化^[5]。此外,MyoG在调控肌纤维类型和氧化代谢中也发挥重要作用。

组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases,HDACs)是一类蛋白酶,在染色体结构修饰和基因表达调控中发挥重要作用。人类基因组有18种不同的HDACs,分为4类,I类(HDAC1、2、3、8)、II类(IIa:HDAC4、5、7、9;IIb:HDAC6、10)、III类即沉默信息调节因子2和IV类(HDAC11)。又根据对活性的要求将其分为锌依赖家族和辅因子NAD⁺依赖家族。其中I类、II类和IV类HDACs为锌依赖家族,被广泛研究^[6]。临床研究显示小分子HDAC抑制剂在治疗癫痫、躁郁症、癌症和许多其他疾病时会对骨细胞群产生影响。此外,越来越多的研究证实HDAC在骨发育中发挥重要作用^[7]。西达本胺(Chidamide)是一种新型苯甲酰胺类HDAC抑制剂,在淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、软组织肉瘤^[8]、肺癌^[9]中显示出良好的治疗效果,但是Chidamide对骨骼肌发育的影响尚不明确,本研究旨在探讨Chidamide在体外对C2C12骨骼肌细胞分化及肌纤维类型的影响和其潜在分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 小鼠骨骼肌细胞株C2C12(购自美国ATCC),胎牛血清、马血清(以色列Bioind),DMEM培养基(美国GIBO),二甲基亚砜(西格玛上海有限公司),西达苯胺(中国MCE公司),Trizol裂解液(美国Ambion公司),逆转录试剂盒、实时荧光定量RT-PCR Mix(北京TransGen Biotech),罗氏实时荧光定量PCR仪,Actinin1抗体(美国Sigma),MyHC、MyoG(Santa公司),Pan-acetyl H3抗体(Active Motif公司),Myh7、Myh4、Myh1(Proteintech公司),Myh2(Affinity公司), β -actin抗体(中国Abclonal),DAPI、荧光二抗(天津博诚科技有限公司),耦联HRP的山羊抗鼠抗体和山羊抗兔抗体(美国Jack-

son Immuno Research),增强化学发光底物检测的试剂盒(美国Millipore),Tannon-5200显影仪(北京原平皓生物有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与药物处理 将C2C12细胞接种于细胞培养板中,使用DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清)于37℃,5%CO₂条件下培养,待细胞密度达80%时,换成DMEM高糖培养基(含5%马血清)培养48h,再分别与含有二甲基亚砜(DMSO)和西达苯胺(Chidamide)的分化培养基共培养48h。

1.2.2 CCK-8实验 培养瓶中细胞密度达到90%融合时消化细胞,吸取细胞进行稀释,并在计数板中计数,按照每孔接种 5×10^3 个细胞密度,接种于96孔板中,置于细胞培养箱中培养24h,然后加入不同浓度(0、0.5、1、2、4 μ mol/L)Chidamide孵育,48h后每孔加入10 μ L CCK-8试剂,培养箱中孵育2h,用酶标仪在450 nm波长下检测吸光值。

1.2.3 细胞免疫荧光 将不同条件处理的C2C12细胞加入4%多聚甲醛固定,加入含0.1%Trixon的PBS打孔。用1%BSA室温封闭1h,一抗4℃孵育过夜,第2天,荧光二抗室温避光孵育30 min。DAPI避光染核,显微镜下拍照。

1.2.4 组蛋白提取 将各组细胞用含丁酸钠的冰PBS冲洗两次,离心,弃上清,收集细胞。用TEB溶解细胞,离心,弃上清。加入0.2 mol/L的硫酸溶液溶解蛋白,过夜提取组蛋白,然后用TCA溶液沉淀组蛋白。将溶液离心,弃上清,用丙酮溶液冲洗沉淀,离心,弃上清。沉淀干燥,加水溶解。

1.2.5 RNA的提取和实时荧光定量PCR 收集各组细胞,每孔加入500 μ L Trizol裂解细胞,然后收集到RNase free管,加入100 μ L氯仿,混匀后室温静置5 min,然后12 000 r/min 4℃离心15 min,吸取上层透明RNA到新的RNase free管。加入异丙醇,混匀,静置10 min后,离心,吸取消管底的白色胶样RNA,用75%乙醇(DEPC水配置)重复洗两遍后,加入20 μ L无酶水,金属浴助溶,58℃,2 min。然后测RNA浓度。根据逆转录试剂盒的操作步骤合成cDNA并稀释5倍。以逆转录后的cDNA为模板,按照实时荧光定量PCR的说明书配置20 μ L反应体系并进行扩增。根据qPCR得出的荧光曲线Ct值,以GAPDH基因为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算结果。所用的引物序列见表1。

1.2.6 Western印迹 收集各组细胞,用RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂)裂解细胞并提取总蛋白。制备10%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,PVDF转膜,转膜

后,用 5%牛血清白蛋白室温封闭 1 h,一抗(β -actin 按 1:5 000 比例,Actinin1 按 1:5 000 比例,MyHC、MyoG 按 1:500 比例,Myh7、Myh4、Myh1 按 1:1 000 比例,Myh2 按 1:2 000 比例,用 1%BSA 稀释配置)4℃过夜孵育,次日,二抗室温孵育 2 h,然后 ECL 显色后曝光,Image J 进行定量分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism6 统计软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料均以 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Chidamide 对 C2C12 细胞活力和组蛋白乙酰化水平的影响 CCK-8 检测不同浓度(0、0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$) Chidamide 对 C2C12 细胞活力的影响(图 1A),结果显示,不同浓度的 Chidamide 不影响 C2C12 细胞活力($F=0.058, P > 0.05$),选用 4 $\mu\text{mol/L}$ Chidamide 作为后续实验浓度。Western 印迹结果显示,Chidamide 显著升高 Pan-acetyl H3 蛋白水平

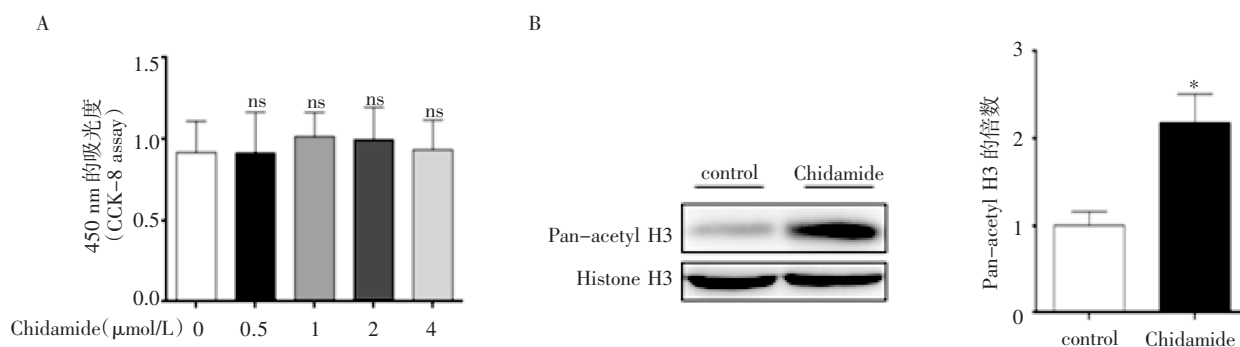
表 1 扩增反应所需引物序列

Tab 1 Primer sequences for amplification reaction

基因名称	引物序列(5'→3')	产物(bp)
MyHC	上游 AGCGAATCGAGGCCAGAG	192
	下游 TGTCTACTTTGGGAGGGTTCA	
MyoD	上游 GTGGCAGCGAGCACTACAGT	177
	下游 ACACAGCCGCACTCTTCCT	
MyoG	上游 GCACTGGAGTTCGGTCCCAA	112
	下游 TATCCTCCACCGTGATGCTG	
Myh7	上游 GCCAACTATGCTGGAGCTGATGCCC	136
	下游 GGTGCGTGGAGCGCAAGTTTGTCTATAAG	
Myh2	上游 CCAAGAAAGGTGCCAAGAAG	147
	下游 CGGGACTCTTGTTTCATTG	
Myh4	上游 ACGCTTGCACACAGAGTCAG	139
	下游 CTTGGACTCTTCTCTAGCTGCC	
Myh1	上游 ACCAAGGAGGAGGAACAGCAGC	144
	下游 GAATGCCTGTTTGGCCCTGGAG	
GAPDH	上游 CATGGCCTTCCGTGTTCTTA	104
	下游 CCTGCTTCAACACCTTCTTGAT	

注:MyHC:肌球蛋白重链;MyoD:成肌分化抗原;MyoG:肌细胞生成素;Myh7: I 型肌原纤维;Myh2: II a 型肌原纤维;Myh4: II b 型肌原纤维;Myh1: II x 型肌原纤维;GAPDH:3-磷酸甘油醛脱氢酶

($t=3.22, P < 0.05$)(图 1B)。



注:A:CCK8 检测不同浓度 Chidamide 对 C2C12 细胞活力的影响;B:Western 印迹检测 Chidamide 对组蛋白 H3 乙酰化的影响;control:对照组;Chidamide:西达苯胺组;Histon H3:组蛋白 H3;Pan-acetyl H3:组蛋白 H3 乙酰化;ns:差异无统计学意义; * $P < 0.05$

图 1 Chidamide 对细胞活力和 Pan-acetyl H3 水平的影响

Fig 1 Effects of Chidamide on cell viability and Pan-acetyl H3 levels

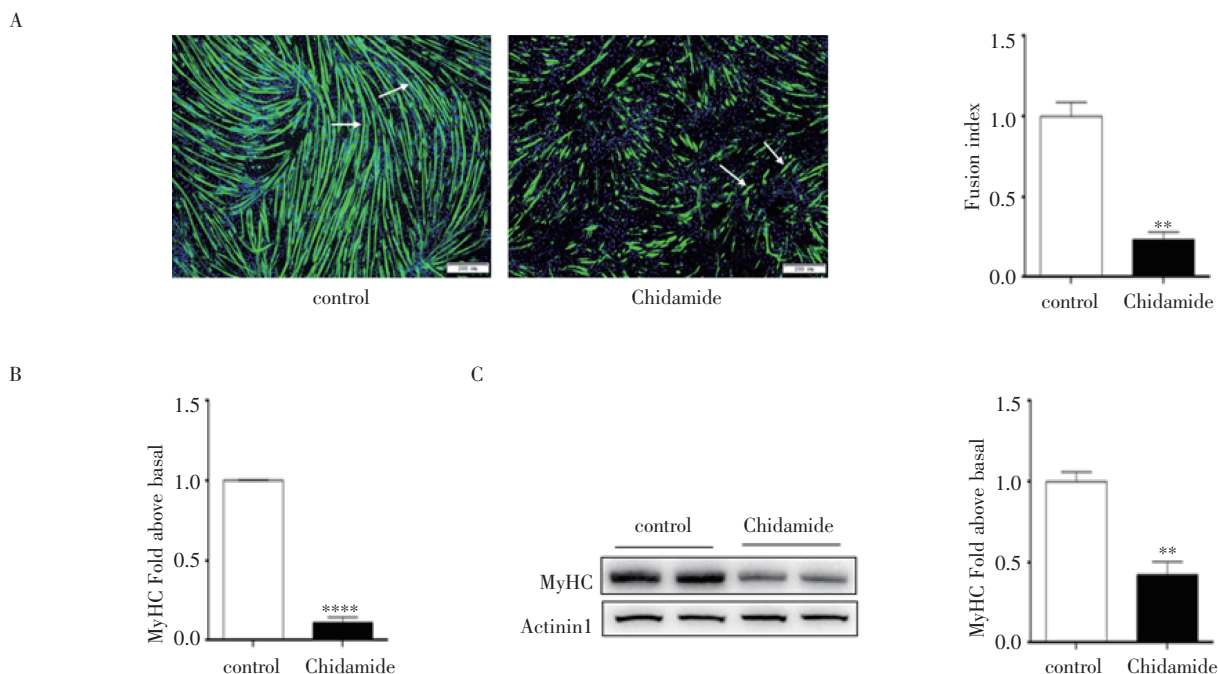
2.2 Chidamide 对 C2C12 细胞分化的影响 结果显示,与对照组相比,Chidamide 组 MyHC 阳性的肌纤维明显减少,肌细胞融合受损,融合指数降低,推测 Chidamide 可能抑制 C2C12 细胞的分化(图 2A)。进一步检测 MyHC 的蛋白和 mRNA 的表达,发现与对照组相比,Chidamide 组 MyHC 的 mRNA 水平显著降低($t=26.87, P < 0.01$),MyHC 蛋白水平也显著降低($t=5.71, P < 0.01$,图 2B、2C)。

2.3 Chidamide 对 C2C12 细胞分化相关蛋白的影响 与对照组相比,Chidamide 组 MyoD 和 MyoG 的 mRNA 水平显著降低($t=5.81、4.86$,均 $P < 0.01$),蛋

白水平也显著降低($t=6.05、7.37$,均 $P < 0.01$),见图 3。

2.4 Chidamide 对 I 型肌原纤维的影响 与对照组相比,Chidamide 组 Myh7 的 mRNA 水平显著降低($t=4.85, P < 0.01$),其蛋白水平也显著降低($t=3.93, P < 0.01$),见图 4。

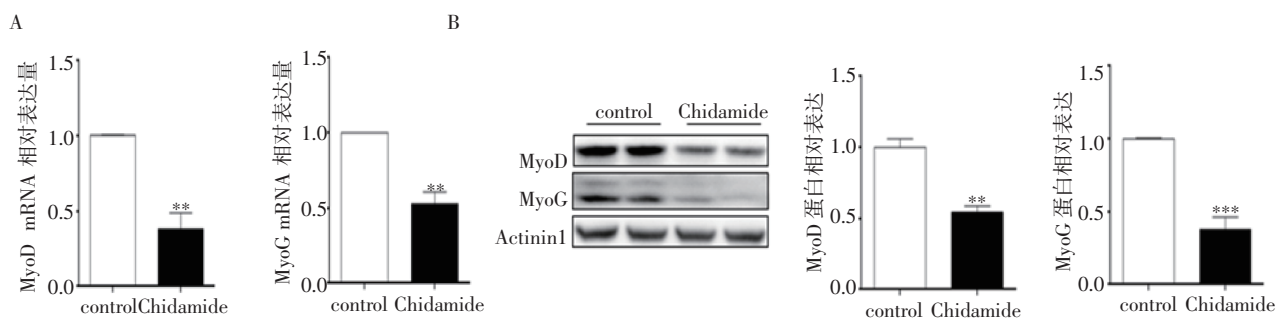
2.5 Chidamide 对 II 型肌原纤维的影响 与对照组相比,Chidamide 组 Myh1 和 Myh2 的 mRNA 水平显著降低($t=15.48、16.82$,均 $P < 0.001$,图 5A),蛋白水平也显著降低($t=14.13、5.05$,均 $P < 0.01$,图 5B),但 Chidamide 不影响 Myh4 的 mRNA 水平($t=1.50, P > 0.05$,图 5C)和蛋白水平($t=2.19, P > 0.05$,图 5D)。



注:A:细胞免疫荧光检测 MyHC 的表达(4 \times),比例尺=200 μ m;B:qPCR 检测 MyHC 的 mRNA 水平;C:Western 印迹检测 MyHC 的蛋白表达水平;control:对照组;Chidamide:西达苯胺组;Fusion index:融合指数;MyHC:肌球蛋白重链;Actinin1:内参蛋白;箭头所指表示肌纤维; $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$

图2 Chidamide 对 MyHC 表达的影响

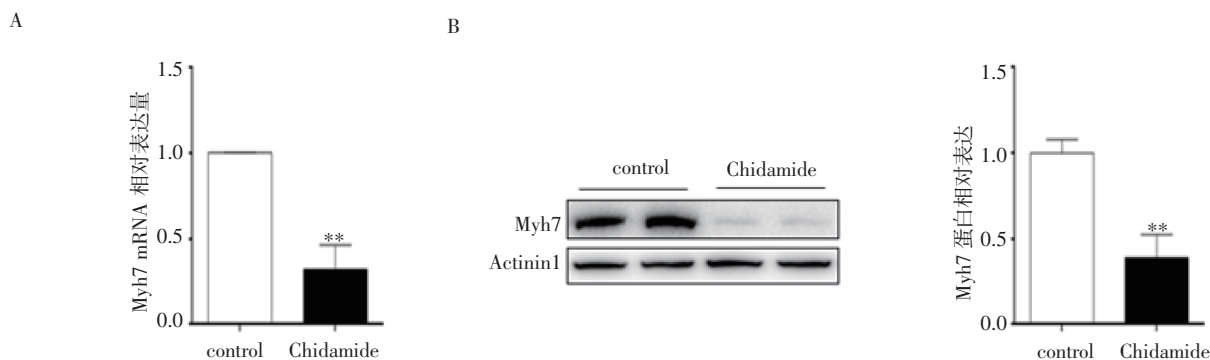
Fig 2 Effect of Chidamide on MyHC expression



注:A:qPCR 检测 MyD、MyoG 的 mRNA 水平;B:Western 印迹检测 MyD、MyoG 的蛋白表达水平;control: 对照组;Chidamide: 西达苯胺组;MyHC: 肌球蛋白重链;MyoG: 肌细胞生成素;Actinin1: 内参蛋白; $**P < 0.01$, $***P < 0.001$

图3 Chidamide 对 MyoD 和 MyoG 的影响

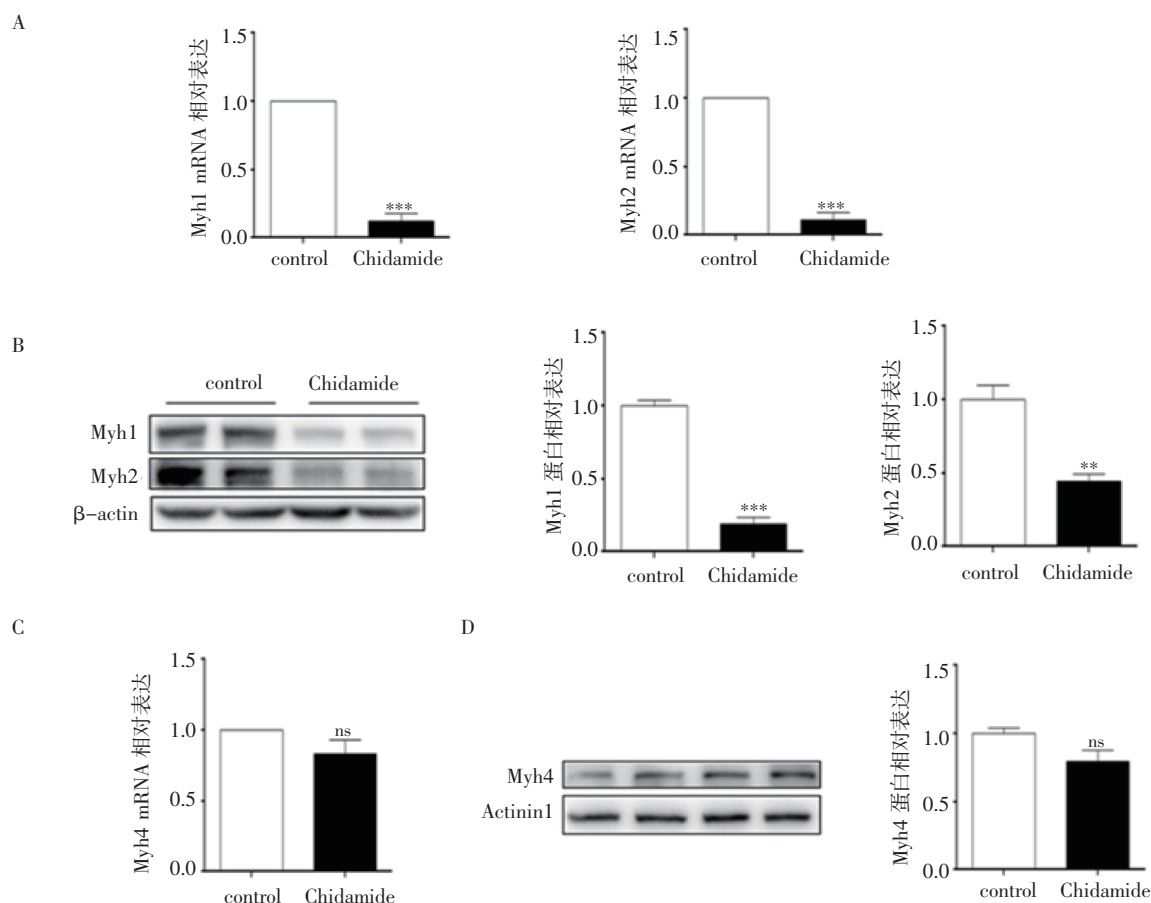
Fig 3 Effect of Chidamide on MyoD and MyoG expression



注:A:qPCR 检测 Myh7 的 mRNA 水平;B:Western 印迹检测 Myh7 的蛋白表达水平;control:对照组;Chidamide:西达苯胺组;Myh7: I 型肌原纤维;Actinin1:内参蛋白; $**P < 0.01$

图4 Chidamide 对 Myh7 的影响

Fig 4 Effect of Chidamide on Myh7 expression



注:A:qPCR 检测 Myh1、Myh2 的 mRNA 水平;B:Western 印迹检测 Myh1、Myh2 的蛋白表达水平;C:qPCR 检测 Myh1 的 mRNA 水平;D:Western 印迹检测 Myh1 的蛋白表达水平;control:对照组;Chidamide:西达苯胺组;Myh2:Ⅱa 型肌原纤维;Myh4:Ⅱb 型肌原纤维;Myh1:Ⅱx 型肌原纤维; β -actin:内参蛋白;*** P <0.01, ** P <0.001,ns:差异无统计学意义

图 5 Chidamide 对 Myh1、Myh2 和 Myh4 的影响

Fig 5 Effect of Chidamide on the expression of Myh1, Myh2 and Myh4

3 讨论

在表观遗传机制中,组蛋白去乙酰化已被证明影响肌肉再生^[10]。有文献报道,HDAC1 通过叉头盒蛋白 3a(FoxO3a)诱导肌肉萎缩^[11];HDAC3 调节骨骼肌能量代谢^[12];敲降 HDAC4 通过抑制 MyoG 依赖性萎缩基因激活来缓解去神经诱导的肌肉萎缩^[13]。组蛋白去乙酰化酶抑制剂 MS-275 通过下调破骨细胞生成转录因子(c-Fos)表达,防止破骨细胞生成并抑制小鼠骨质流失。组蛋白去乙酰化酶抑制剂丙戊酸通过抑制癌症恶病质中 CCAAT/增强子结合蛋白 β (C/EBP β)调节的萎缩基因 1(Atrogin1)表达,减轻骨骼肌萎缩^[14]。组蛋白去乙酰化酶抑制剂曲古抑菌素 A 通过凋亡信号调节激酶 1(ASK1)-丝裂原活化蛋白激酶 3/4/6(MKK3/4/6)-c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)途径在分化的 C2C12 肌细胞中转录激活肌肉生长抑制素(MSTN)^[15]。

Chidamide 是 I 类(HDAC1、2、3)和 II b 类

(HDAC10)HDAC 抑制剂,对骨骼肌细胞分化的影响未见报道。本研究检测了不同浓度 Chidamide 对细胞活力的影响,发现 Chidamide 不影响细胞活力并且使组蛋白乙酰化水平升高。通过细胞免疫荧光 MyHC 染色,发现 Chidamide 使 MyHC 阳性肌纤维的比例降低,使肌细胞融合受损,推测 Chidamide 可能抑制 C2C12 细胞分化。接下来笔者进一步检测了 MyHC 的 mRNA 和蛋白水平,发现 Chidamide 处理后显著降低 MyHC 的表达,结果与其免疫荧光染色结果一致,说明 Chidamide 抑制 C2C12 细胞分化。

肌源性分化是骨骼肌发育的一个重要过程,它决定了成肌细胞命运、肌肉形成和再生。肌源性调节因子 Myf5、MyoD、MyoG、MRF4 调控骨骼肌细胞增殖、分化和融合^[16]。MyoD 在肌分化早期表达,结合下游靶基因启动子中的 E-box 序列,从而与肌细胞增强因子 2(Mef2)转录因子协同驱动肌肉相关基因的转录,进而促进肌分化;MyoG 表达较晚,是骨骼肌分化所必需的因子,通过促进成肌细胞融合和肌

纤维形成来促进分化。根据文献报道,C2C12 细胞中 MyoG 的转录激活会增强肌分化^[17]; HDAC11 通过抑制 MyoD 依赖性转录来抑制成肌细胞分化^[18]。因此,笔者检测了 MyoD、MyoG 的 mRNA 和蛋白水平,发现 Chidamide 显著下调 MyoD 和 MyoG 的表达,鉴于 MyoD 和 MyoG 在 C2C12 细胞分化中发挥正调控作用,提示 Chidamide 可能通过下调 MyoD 和 MyoG 的表达抑制 C2C12 细胞分化。

根据收缩特性,哺乳动物肌纤维分为慢氧化型(MyHC I 型)、快氧化型(MyHC II a 型)、中间型(MyHC II x 型)和快速糖酵解型(MyHC II b 型)肌纤维。与糖酵解或中间型肌纤维相比,氧化型肌纤维富含线粒体和毛细血管,抗疲劳能力更强,更依赖氧化磷酸化产生能量。骨骼肌纤维类型转化与人体肌肉和代谢性疾病有直接关系。肌肉废用,如脊髓损伤,导致 I 型纤维萎缩,纤维类型从慢到快转变,而癌症恶病质导致 II 型纤维优先萎缩,纤维类型从快到慢转变^[19]。因此,本研究进一步检测 Chidamide 处理 C2C12 细胞后对肌原纤维的影响。结果显示,与对照组相比,Chidamide 显著降低 Myh7、Myh1 和 Myh2 的表达,但不影响 Myh4 的表达。表明 Chidamide 抑制 I 型、II x 型、II a 型肌原纤维,不影响 II b 型肌原纤维,提示 Chidamide 对各型肌纤维类型有不同的影响。

综上所述,本研究证明 Chidamide 抑制 C2C12 骨骼肌细胞分化,且主要抑制 I 型、II a 型、II x 型肌原纤维,但不影响 II b 型肌原纤维,其机制可能与 Chidamide 下调 MyoD 和 MyoG 的表达有关。

参考文献:

- [1] CHAL J, POURQUIE O. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*[J]. *Development*, 2017, 144(12): 2104–2122.
- [2] CHEN X, LUO Y, HUANG Z, et al. Akirin2 regulates proliferation and differentiation of porcine skeletal muscle satellite cells via ERK1/2 and NFATc1 signaling pathways[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45156.
- [3] CHEN X, GUO Y, JIA G, et al. Arginine promotes slow myosin heavy chain expression via akirin2 and the AMP-activated protein kinase signaling pathway in porcine skeletal muscle satellite cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(18): 4734–4740.
- [4] HERNANDEZ-HERNANDEZ J M, GARCIA-GONZALEZ E G, BRUN C E, et al. The myogenic regulatory factors, determinants of muscle development, cell identity and regeneration[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 72: 10–18.
- [5] KITAKAZE T, OSHIMO M, KOBAYASHI Y, et al. Lactoferrin promotes murine C2C12 myoblast proliferation and differentiation and myotube hypertrophy[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5912–5920.
- [6] HO T C S, CHAN A H Y, GANESAN A. Thirty years of HDAC inhibitors: 2020 insight and hindsight[J]. *J Med Chem*, 2020, 63(21): 12460–12484.
- [7] SPREAFICO M, CAFORA M, BRAGATO C, et al. Targeting HDAC8 to ameliorate skeletal muscle differentiation in Duchenne muscular dystrophy[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170: 105750.
- [8] QUE Y, ZHANG X L, LIU Z X, et al. Frequent amplification of HDAC genes and efficacy of HDAC inhibitor chidamide and PD-1 blockade combination in soft tissue sarcoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(2): e001696.
- [9] DING N, YOU A, TIAN W, et al. Chidamide increases the sensitivity of non-small cell lung cancer to crizotinib by decreasing c-MET mRNA methylation[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2595–2611.
- [10] PIGNA E, SIMONAZZI E, SANNA K, et al. Histone deacetylase 4 protects from denervation and skeletal muscle atrophy in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *EBio Medicine*, 2019, 40: 717–732.
- [11] BEHARRY A W, SANDESARA P B, ROBERTS B M, et al. HDAC1 activates FoxO and is both sufficient and required for skeletal muscle atrophy[J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(Pt 7): 1441–1453.
- [12] SONG S, WEN Y, TONG H, et al. The HDAC3 enzymatic activity regulates skeletal muscle fuel metabolism[J]. *J Mol Cell Biol*, 2019, 11(2): 133–143.
- [13] MA W, CAI Y, SHEN Y, et al. HDAC4 knockdown alleviates denervation-induced muscle atrophy by inhibiting myogenin-dependent atrogen activation[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 663384.
- [14] SUN R, ZHANG S, HU W, et al. Valproic acid attenuates skeletal muscle wasting by inhibiting C/EBPβ-regulated atrogen1 expression in cancer cachexia[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 311(1): C101–C115.
- [15] HAN D S, HUANG H P, WANG T G, et al. Transcription activation of myostatin by trichostatin A in differentiated C2C12 myocytes via ASK1–MKK3/4/6–JNK and p38 mitogen-activated protein kinase pathways[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(3): 564–573.
- [16] ISHIKAWA K, ARAKI M, NAGANO Y, et al. Knockdown of optineurin controls C2C12 myoblast differentiation via regulating myogenin and MyoD expressions[J]. *Differentiation*, 2022, 123: 1–8.
- [17] CHEN R, LEI S, SHE Y, et al. Lnc-GD2H promotes proliferation by forming a feedback loop with c-Myc and enhances differentiation through interacting with NACA to upregulate myog in C2C12 myoblasts[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 671857.
- [18] BYUN S K, AN T H, SON M J, et al. HDAC11 inhibits myoblast differentiation through repression of MyoD-dependent transcription[J]. *Mol Cells*, 2017, 40(9): 667–676.
- [19] CICILIOT S, ROSSI A C, DYAR K A, et al. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(10): 2191–2199.

(2022-07-26 收稿)