

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201804018

干扰 E2F7 对 C2C12 成肌细胞增殖的影响*

范源¹, 甘麦邻¹, 罗嘉¹, 谭娅^{1,2}, 张顺华^{1**}, 朱砺^{1**}

(1. 四川农业大学 动物科技学院, 四川 成都 611130;

2. 贵州省农业科学院 畜牧兽医研究所, 贵州 贵阳 550005)

摘要:【目的】探究转录因子 E2F7 在骨骼肌细胞发育过程中的作用。【方法】以 C2C12 成肌细胞为研究对象, 通过设计小干扰 RNA 干扰 C2C12 成肌细胞中 E2F7 的表达, 分为干扰组和对照组, 并利用 RT-PCR、CCK-8 和 EdU 等技术检测在 C2C12 成肌细胞中干扰 E2F7 后对成肌细胞增殖的影响。【结果】E2F7 mRNA 表达水平在 C2C12 成肌细胞增殖期极显著高于分化期 ($P<0.01$); 与对照组相比, 干扰组的细胞活率和新生细胞比率皆极显著高于对照组 ($P<0.01$); 干扰 E2F7 显著提升了 C2C12 成肌细胞中 *Cyclin E* 的表达水平 ($P<0.05$), 极显著促进 *Cyclin D* 和 *CDK4* 的表达 ($P<0.01$); 并且干扰 E2F7 可显著促进 E2F2 ($P<0.05$) 和极显著促进 E2F1 及 E2F3 的表达 ($P<0.01$), 同时极显著促进与成肌细胞增殖相关 microRNAs (miR-7、miR-25、miR-27 和 miR-92a) 的表达 ($P<0.01$)。【结论】干扰 E2F7 可促进 C2C12 成肌细胞的增殖, E2F7 可能是通过调控经典 E2Fs 信号通路和成肌细胞增殖相关 microRNA 发挥作用。

关键词: E2F7; C2C12 成肌细胞; 增殖; 小干扰 RNA; 骨骼肌发育

中图分类号: Q 344.5

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 03-0408-06

Effect of Interfering with E2F7 on the Proliferation of C2C12 Myoblasts

FAN Yuan¹, GAN Mailin¹, LUO Jia¹, TAN Ya^{1,2}, ZHANG Shunhua¹, ZHU Li¹

(1. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Guizhou Academy of Agricultural Science, Guiyang 550005, China)

Abstract: [Purpose] To explore the biological role of E2F7 in the development of skeletal muscle cells. [Method] C2C12 myoblasts were used as the research object. Small interfering RNA was designed to interfere with the expression of E2F7 in C2C12 myoblast. C2C12 myoblasts were divided into interfering group and control group. The effect of E2F7 on the proliferation of C2C12 myoblasts was detected by RT-PCR, CCK-8 assay and EdU assay, respectively. [Result] The expression of E2F7 was significantly higher in C2C12 myoblasts during the proliferative phase than that in the differentiation phase ($P<0.01$); the viability and ratio of neoplastic cells of C2C12 myoblasts after E2F7 interference were extremely significantly higher than those of the control group ($P<0.01$). The expression level of *Cyclin E* was significantly increased ($P<0.05$), and the expression of *Cyclin D* and *CDK4*

收稿日期: 2018-04-10

修回日期: 2018-12-26

网络出版时间: 2019-03-09

*基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0501004); 农业农村部农业重大技术协同推广计划试点项目; 四川省科技支撑计划项目(2017NFP0135, 2016NZ0089, 2016NYZ0050)。

作者简介: 范源(1995—), 男, 四川泸州人, 在读硕士研究生, 主要从事猪遗传育种研究。

E-mail: fanyuan0701@163.com

**通信作者 Corresponding authors: 张顺华(1974—), 女, 四川德阳人, 博士, 助理研究员, 硕士生导师, 主要从事猪遗传育种研究。E-mail: 363445986@qq.com; 朱砺(1975—), 男, 四川广元人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事猪遗传育种研究。E-mail: zhuli7508@163.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201804018](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201804018)



was extremely significantly elevated when C2C12 myoblasts interfered with E2F7 ($P<0.01$). Further finding showed that interference with E2F7 significantly promoted E2F2 ($P<0.05$) and extremely significantly promoted the expression of E2F1 and E2F3 ($P<0.01$). At the same time, it extremely significantly promoted the expression levels of microRNAs (miR-7, miR-25, miR-27, and miR-92a) which associated with myoblasts proliferation ($P<0.01$). [**Conclusion**] The results suggest that interference with can promote the proliferation of C2C12 myoblasts, and E2F7 may plays a role through regulating the classical E2Fs signaling pathway and myoblasts proliferation-related microRNAs.

Keywords: E2F7; C2C12 myoblasts; proliferation; siRNA; skeletal muscle development

骨骼肌发育是一个精密且复杂的生物学过程, 主要包含细胞增殖和分化两个过程^[1]。成肌细胞增殖发生于骨骼肌形成的早期阶段, 主要影响肌细胞的数目, 对于生物个体的发育具有重要的影响, 同时也是畜牧研究中提升畜禽肌肉产量的重要突破点。成肌细胞的增殖受到多种转录因子的调控^[2]。前人研究发现: Sox6^[3]及 Notch1^[4]等转录因子可以负调控猪成肌细胞的增殖和分化, 而转录因子 FoxO1^[5]则可以正向调控猪成肌细胞的增殖和分化, 说明转录因子的表达对于猪成肌细胞的发育有重要意义。E2Fs (transcription factor E2F, E2Fs) 家族是一类转录因子, 在胚胎发育和细胞增殖等生命过程中扮演着重要的角色^[6-7]。E2F7 (E2F transcription factor 1, E2F7) 是属于 E2Fs 家族的一类非典型转录因子^[8]。因此, 我们推测 E2F7 可能在骨骼肌细胞增殖过程中也扮演着重要角色。

表观遗传学 (epigenetics) 是指基因的核苷酸序列不发生改变的情况下, 基因的表达却发生了可遗传的变化, 并引起表型的可遗传变化^[9]。microRNA 是表观遗传中重要的一类遗传物质^[10]。MITXELENA 等^[11]研究发现: E2F7 可以通过抑制 miR-7、miR-25、miR-27-3p、miR-27-5p 和 miR-92a 等 microRNA 的转录从而调控细胞增殖。E2F7 是否也会影响这些 microRNA 在 C2C12 成肌细胞中的表达还未见报道。为了探究 E2F7 转录因子对骨骼肌细胞增殖的影响, 本研究以 C2C12 成肌细胞为模型, 检测 E2F7 mRNA 在成肌细胞不同增殖或分化时期的表达水平, 并通过转染 siRNA 干扰 C2C12 细胞系中 E2F7 mRNA 的表达, 观察其对 C2C12 成肌细胞增殖的影响, 意在为与畜禽骨骼肌细胞增殖及骨骼肌发育的相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

C2C12 成肌细胞购自中国科学院昆明细胞库; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、马血清 (horse serum, HS) 购自美国 Gbico 公司; Lipofectamine™ 2000 转染试剂、胰蛋白酶、Opti-MEM 减血清培养基及 DMEM 基础培养基购自美国 Invitrogen 公司; si-E2F7 小干扰 RNA、小干扰 RNA 阴性对照及 EdU 染色试剂盒由锐博生物科技公司 (广州) 设计合成或购买; CCK-8 细胞增殖—毒性检测试剂盒购自日本 DOJINDO 公司; Trizol 试剂、miRNA 反转录试剂盒、mRNA 反转录试剂盒及 RT-PCR 定量试剂均购自日本 TAKARA 公司; RT-PCR 引物合成于擎科生物公司 (成都)。

1.2 C2C12 成肌细胞培养及诱导分化

C2C12 成肌细胞培养条件为 37 ℃, 5% CO₂。增殖培养基 GM: 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基; 分化培养基 DM: 含 2% 马血清的 DMEM 培养基。当细胞密度达到 70% 时, 用 0.25% 胰酶消化, 并将细胞传代或铺板, 增殖细胞在转染后 36 h 进行相应检测; 当细胞密度达到 90% 时, 换为分化培养基 DM 诱导成肌细胞分化, 在分化第 4、6、8 天进行相应检测。

1.3 小干扰 RNA 的合成及序列

小干扰 RNA 交由广州市锐博生物科技有限公司设计并合成。序列如下:

si-E2F7-1: GCATCTATGACATCGTAAA;

si-E2F7-2: GCATCCATCTTACCAGAAT;

si-E2F7-3: GCAGCCATGGTCAATCCAA。

阴性对照同样由锐博合成提供。

1.4 细胞转染

将 C2C12 成肌细胞铺入 12 孔板或 96 孔板中, 当细胞融合度达到 30% 时, 参照 Lipofecta-

mine™2000 转染试剂说明书, 使用 Lipofectamine™2000 将 siRNA 或阴性对照转入细胞。将被转入细胞分为干扰 E2F3-1 组、干扰 E2F3-2 组、干扰 E2F3-3 组及阴性对照组, 并在转染 6 h 后更换培养液。

1.5 CCK-8 及 EdU 检测细胞增殖

小干扰 RNA 转染细胞 36 h 后进行检测, 检测前将培养液换为新鲜培养液, 加入 10 μ L CCK-8 检测试剂于培养板中, 孵育 2 h, 孵育结束后利用分光光度计于 450 nm 波长下进行检测。小干扰 RNA 转染细胞 36 h 后, 加入 EdU 10 μ mol/L, 孵育 2 h, 按照说明书进行 EdU 染色, EdU 图片利用 ImageJ 软件进行组合分析, 阳性细胞比例利用 PS 软件进行统计。

1.6 实时荧光定量 PCR

1.6.1 RNA 提取

按 Trizol 试剂盒说明提取细胞总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性后用 Nano-drop2000/2000c 分光光度计对 RNA 的质量和浓度进行检测。

1.6.2 RNA 反转录

按 Takara PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis 和 One Step PrimeScript® miRNA cDNA Synthesis 说明书配制 mRNA 和 miRNA 的反转反应体系, 进行相应的反转录。

1.6.3 实时荧光定量 PCR

按照 SYBR Premix Ex Taq II (2 $\times$) 说明书配制 RT-PCR 反应体系, 检测 E2F7、E2F1、E2F2、E2F3、CyclinD、CDK4、CyclinE、miR-7、miR-25、miR-27-3p、miR-27-5p 及 miR-92a 的表达量。

反应体系 (10 μ L): SYBR® Premix Ex Taq™ II (2 $\times$) 5 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L (miRNA 引物为上下游各 0.2 μ L), cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 补足至 10 μ L。

反应程序: 95 $^{\circ}$ C、10 s 预变性, 95 $^{\circ}$ C、5 s 变性, 60 $^{\circ}$ C (或其他 mRNA 的最佳退火温度, miRNA 均为 60 $^{\circ}$ C)、30 s 退火, 72 $^{\circ}$ C、1 min 延伸, 重复 2~4 步 40 次, 添加溶解曲线 (95 $^{\circ}$ C、15 s 变性, 60 $^{\circ}$ C、1 min 退火, 95 $^{\circ}$ C、15 s 变性)。

mRNA 采用 GAPDH 作为内参, miRNA 采用 U6 作为内参, 数据采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法分析, 计算 mRNA 或 miRNA 的相对表达量。引物见表 1。

表 1 试验选用基因及 microRNA 的引物序列和退火温度

Tab. 1 The primer sequences and annealing temperatures

基因 gene	引物序列 (5'→3') primer sequence	退火温度/ $^{\circ}$ C T_m
E2F1	F: GAGAAGTCACGCTATGAAACCTC	62
	R: CCCAGTTCAGGTCAACGACAC	
E2F2	F: ACGGCGCAACCTACAAAGAG	62
	R: GTCTGCGTGTAAGCGAAGT	
E2F3	F: AAACGCGGTATGATACGTCCC	62
	R: CCATCAGGAGACTGGCTCAG	
E2F7	F: GCTTTGGGAACTTGGGATAG	62
	R: CAGTGTGGCTTCAGTCATAGA	
Cyclin D	F: GCTTGCTCCGGGGATGAAAT	60
	R: GCGAGGACACCATAAGGAAATCTG	
CDK4	F: AGTTTCTAAGCGGCCTGGAT	60
	R: AACTTCAGGAGCTCGGTACC	
Cyclin E	F: TAGGCCCTCAGCCTCACTC	62
	R: CCACCCCTGGGATAAAGCAC	
GAPDH	F: TGCTGAGTATGTCGTGGAGTCT	60
	R: ATGCATTGCTGACAATCTTGAG	
miR-7	F: CAACAAATCACAGTCTGCCATA	60
miR-25	F: AGGCGGAGACTTGGGCAATTGC	
miR-27-3p	F: TTCACAGTGGCTAAGTTCTGC	60
miR-27-5p	F: AGAGCTTAGCTGATTGGTGAAC	
miR-92a	F: AGGTTGGGATTTGTGCGCAATGCT	60
	R: Uni-miR qPCR Primer, included in kit (miRNA Universal Downstream Primer, TaKaRa)	
miRNA 通用下游引物	F: CTCGCTTCGGCAGCACA	60
U6	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT	

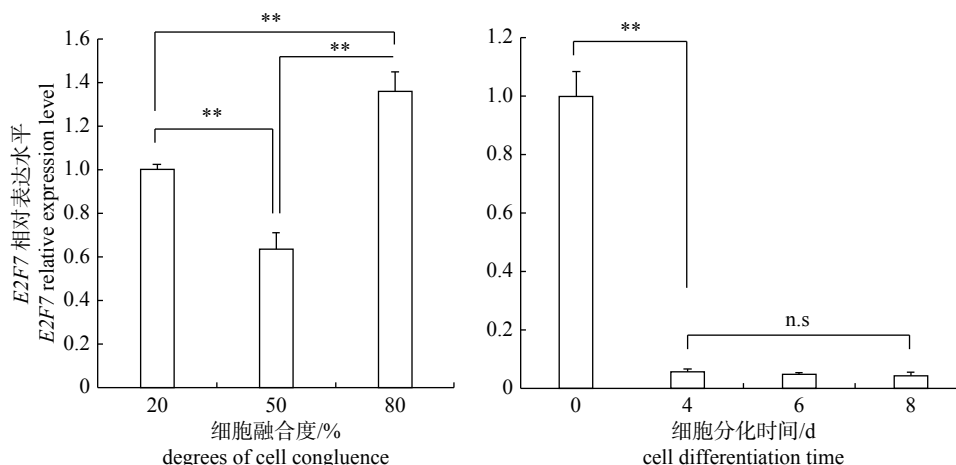
1.7 统计分析

通过 SPSS 22.0 软件完成对各干扰组和对照组数据平均值间的 t 检验、多组平均值间的方差分析和多重比较, 数值以平均值 $\pm$ 标准误差表示。

2 结果与分析

2.1 E2F7 在 C2C12 成肌细胞不同时期的表达水平

为了检测 E2F7 基因 mRNA 在 C2C12 成肌细胞不同时期的表达水平, 对生长密度为 20%、50% 及 80% 的增殖期成肌细胞和分化第 4、6 和 8 天的成肌细胞进行实时荧光定量检测。结果 (图 1) 显示: E2F7 mRNA 的表达水平在增殖期先下降再上升, 在 50% 左右密度时表达量最低; 而在分化过程中 E2F7 mRNA 的表达量极显著低于增殖期 ($P<0.01$), 分化期内的表达量极低且差异不显著。



注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; n.s. 无显著相关性; 下同。

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; n.s. no significant; the same as below.

图1 E2F7在C2C12成肌细胞不同时期的表达水平

Fig. 1 The expression levels of E2F7 mRNA in different phases of C2C12 myoblasts

2.2 转染不同小干扰RNA对E2F7基因的干扰效率

为了选取最佳的 siRNA, 试验设计 3 段 siRNA 分别转染进增殖期的 C2C12 细胞, 在转染 36 h 时收集细胞并在 mRNA 水平上检测 E2F7 mRNA 的表达量。结果(图2)显示: si-E2F7-1、si-E2F7-2 和 si-E2F7-3 的干扰效率分别为 61.57%、54.25% 及 38.75%, 3 段干扰片段均能够有效干扰 E2F7 的表达, 且其中 si-E2F7-1 干扰效率最佳。因此在后续试验中, 主要转染 si-E2F7-1。

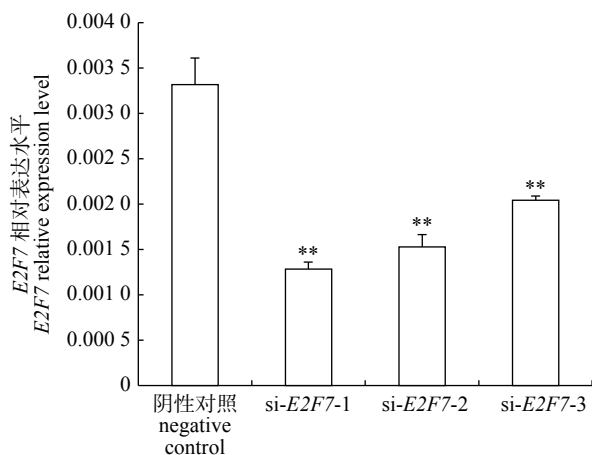


图2 转染不同小干扰RNA对E2F7基因的干扰效率

Fig. 2 The interference efficiency of different siRNAs for E2F7

2.3 干扰E2F7基因促进C2C12成肌细胞增殖

利用 CCK-8 试剂盒检测细胞活率, 结果显示: 干扰 E2F7 之后, 450 nm 处吸光度值极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 且增加 30% 以上(图3a)。

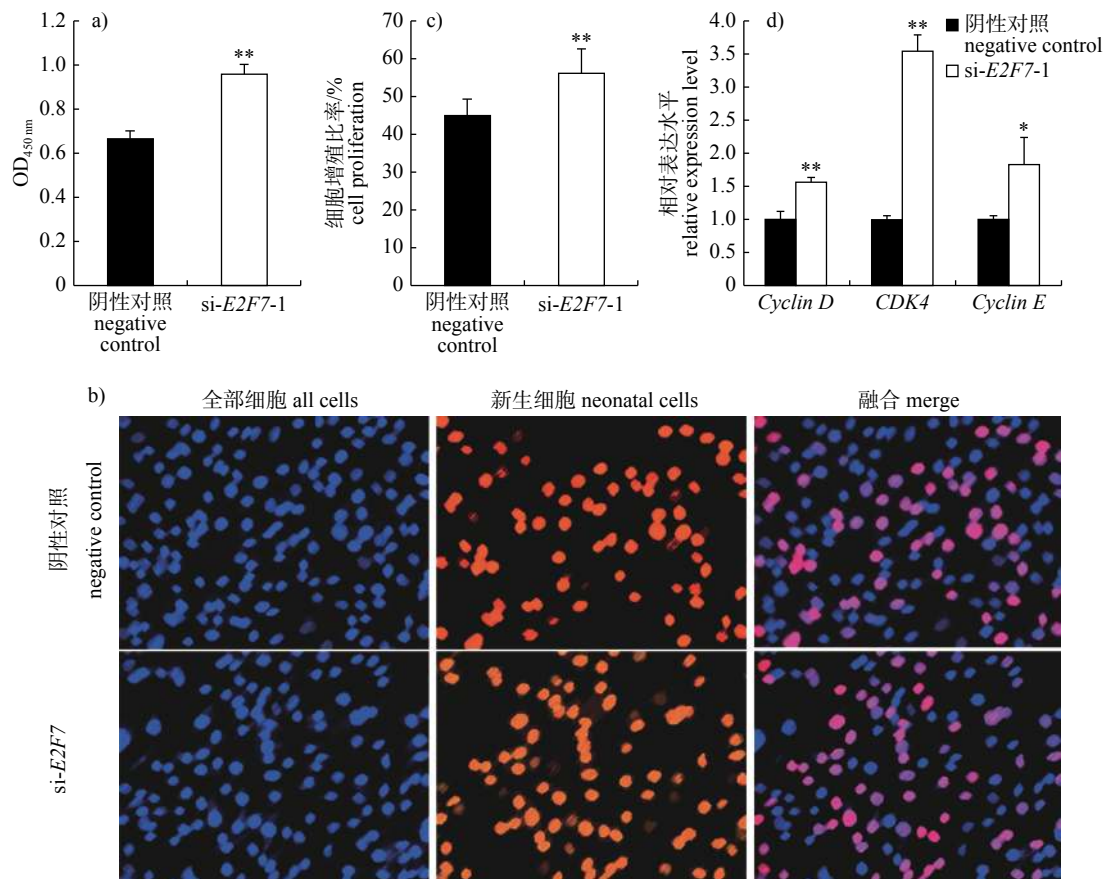
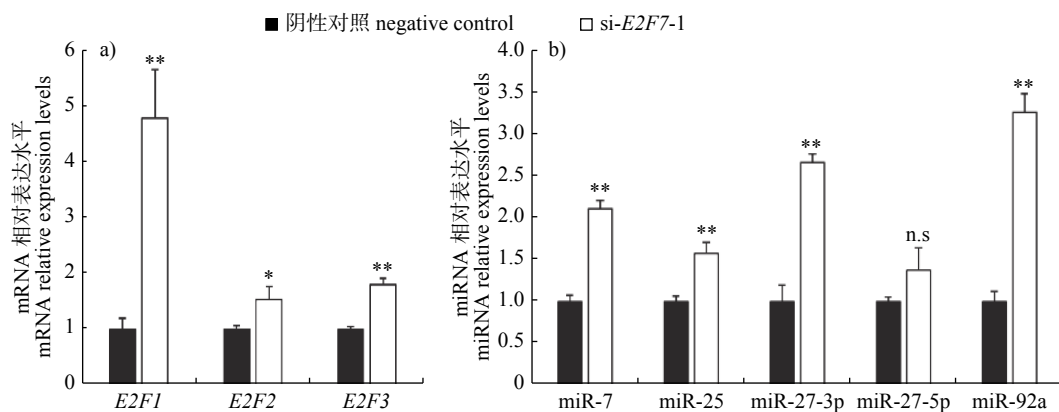
利用 EdU 细胞增殖试剂盒检测新生细胞数, 结果显示: si-E2F7-1 处理组中 EdU 阳性细胞率极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 处理组与对照组 EdU 细胞阳性率分别为 $(55.99 \pm 6.60)\%$ 和 $(44.83 \pm 4.40)\%$ (图3b、c)。实时荧光定量 PCR 检测与细胞增殖相关基因 (Cyclin D、CDK4 和 Cyclin E) 的表达, 结果(图3d)显示: 干扰 E2F7 能够极显著地提高 Cyclin D 和 CDK4 的表达 ($P < 0.01$), 并且显著提高 Cyclin E 的表达 ($P < 0.05$)。以上结果表明: 干扰 E2F7 能够促进 C2C12 成肌细胞增殖。

2.4 干扰E2F7基因对其效应因子的影响

由图4可知: 干扰 E2F7 极显著 ($P < 0.01$) 促进 E2F1 和 E2F3 的表达, 显著 ($P < 0.05$) 促进 E2F2 的表达; 对增殖相关 microRNA 的定量结果显示: 干扰 E2F7 能极显著增加 miR-7、miR-25、miR-27-3p 和 miR-92a 的表达 ($P < 0.01$), 但 miR-27-5p 的差异不显著。以上结果表明: 在 C2C12 成肌细胞干扰 E2F7 能促进 E2F1-3 mRNA 及 miR-7、miR-25、miR-27-3p 和 miR-92a 的表达。

3 讨论

E2F 家族是普遍存在于高等真核生物且进化保守度高的一类重要转录因子^[12]。根据 E2F 转录因子的蛋白结构差异, 拥有 1 个高度保守 DNA (DNA-binding domain, DBD) 结合域的 E2F 转录因子被定义为典型 E2F 转录因子 (E2F1~E2F6); 根据对下游基因的转录作用, 典型 E2F 转录因子又分为激活转录型 (E2F1~E2F3) 和抑制转录型

图 3 干扰 *E2F7* 基因促进 C2C12 成肌细胞增殖Fig. 3 Interference *E2F7* mRNA promoting C2C12 myoblasts proliferation图 4 干扰 *E2F7* 基因对其效应因子的影响Fig. 4 Effect of interfering *E2F7* on its effector factors

(E2F4~E2F6)^[13]。而拥有 2 个高度保守 DBD 的 E2F 转录因子则被定义为非典型 E2F 转录因子 (E2F7~E2F8)^[8, 14]。

两类 E2F 转录因子在结构、功能上有一定的差异^[15]。前人的研究利用染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation assay, ChIP) 发现 E2F1/3/4/7 可结合在 E2F7 和 E2F8 的启动子^[16]; CHRIS-

TENSEN 等^[17]和 LI 等^[18]也证实 E2F7 和 E2F8 也可以结合在 E2F1 的启动子上, 对其进行调控。而本试验也发现: 在干扰 *E2F7* 之后, *E2F1-3* 的表达量也出现了不同程度的上升。因此, 本研究结果也说明了典型 E2F 转录因子和非典型 E2F7 转录因子之间存在极其精密的反馈调节。

成肌细胞的增殖和分化密切相关, 本研究通

过CCK8及EdU等技术发现干扰组的细胞活率和新生细胞比率均极显著低于对照组,说明干扰E2F7可以抑制成肌细胞的增殖,使得成肌细胞提前退出增殖期。因此,我们推测E2F7也可能参与成肌细胞的分化。microRNAs是一类在转录后水平调控基因表达的微小非编码,大量的miRNA被证明能参与骨骼肌的生成^[19]。本研究发现在干扰E2F7的情况下,miR-7、miR-25、miR-27-3p和miR-92a的表达量极显著上升,且miR-27-3p和miR-92a已被证明参与了成肌细胞的增殖和分化^[20-21]。因此我们推测E2F7可能会通过miRNA对成肌细胞分化造成影响。鉴于E2F7 mRNA在分化期极低的表达量,我们下一步可以通过构建E2F7过表达载体对于C2C12成肌细胞分化的作用。

本研究结果表明:E2F7在骨骼肌细胞增殖过程中发挥着重要作用,干扰E2F7能促进成肌细胞的增殖,调控E2F家族经典转录因子E2F1~3和影响成肌细胞增殖相关microRNAs是其可能的作用机制。接下来,对E2F7的上下游调控机制还需要进一步的研究,以期研究骨骼肌发育调控和提高畜禽肌肉产量提供新的思路。

[参考文献]

- [1] BENTZINGER C F, YU X W, RUDNICKI M A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012, 4(2): 441. DOI: [10.1101/cshperspect.a008342](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008342).
- [2] BISMUTH K, RELAIX F. Genetic regulation of skeletal muscle development[J]. Experimental Cell Research, 2010, 316(18): 3081. DOI: [10.1016/j.yexcr.2010.08.018](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.08.018).
- [3] WANG X Y, CHEN X L, HUANG Z Q, et al. MicroRNA-499-5p regulates porcine myofiber specification by controlling Sox6 expression[J]. Animal, 2017, 11(12): 1. DOI: [10.1017/S1751731117001008](https://doi.org/10.1017/S1751731117001008).
- [4] ZHANG S R, CHEN X L, HUANG Z Q, et al. Effects of microRNA-27a on myogenin expression and Akt/FoxO1 signal pathway during porcine myoblast differentiation[J]. Animal Biotechnology, 2017, 29(9): 1. DOI: [10.1080/10495398.2017.1348357](https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1348357).
- [5] HOU L J, XU J, LI H Q, et al. MiR-34c represses muscle development by forming a regulatory loop with *Notch1* [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 9346. DOI: [10.1038/s41598-017-09688-y](https://doi.org/10.1038/s41598-017-09688-y).
- [6] CHONG J L, WENZEL P L, SÁENZ-ROBLES M T, et al. E2F1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells[J]. Nature, 2009, 462(7275): 930. DOI: [10.1038/nature08677](https://doi.org/10.1038/nature08677).
- [7] SHATS I, DENG M, DAVIDOVICH A, et al. Expression level is a key determinant of E2F1-mediated cell fate[J]. Cell Death & Differentiation, 2017, 24(4): 626. DOI: [10.1038/cdd.2017.12](https://doi.org/10.1038/cdd.2017.12).
- [8] LAMMENS T, LI J, LEONE G, et al. Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family[J]. Trends in Cell Biology, 2009, 19(3): 111. DOI: [10.1016/j.tcb.2009.01.002](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.01.002).
- [9] ESTELLER M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps[J]. Nature Reviews Genetics, 2007, 8(4): 286. DOI: [10.1038/nrg2005](https://doi.org/10.1038/nrg2005).
- [10] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215. DOI: [10.1016/j.cell.2009.01.002](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002).
- [11] MITXELENA J, APRAIZ A, VALLEJO-RODRÍGUEZ J, et al. E2F7 regulates transcription and maturation of multiple microRNAs to restrain cell proliferation[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(12): 5557. DOI: [10.1093/nar/gkw146](https://doi.org/10.1093/nar/gkw146).
- [12] TRIMARCHI J M, LEES J A. Sibling rivalry in the E2F family[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002, 3(1): 11. DOI: [10.1038/nrm714](https://doi.org/10.1038/nrm714).
- [13] KORENJAK M, ANDERSEN E, RAMASWAMY S, et al. RBF binding to both canonical E2F targets and non-canonical targets depends on functional dE2F/dDP complexes[J]. Molecular & Cellular Biology, 2012, 32(21): 4375. DOI: [10.1128/MCB.00536-12](https://doi.org/10.1128/MCB.00536-12).
- [14] VLIEGHE K, BOUDOLF V, BEEMSTER G T, et al. The DP-E2F-like gene *DEL1* controls the endocycle in *Arabidopsis thaliana*[J]. Current Biology, 2005, 15(1): 59. DOI: [10.1016/j.cub.2004.12.038](https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.12.038).
- [15] MAITI B, LI J, BRUIN A D, et al. Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2005, 280(18): 18211. DOI: [10.1074/jbc.M50141020](https://doi.org/10.1074/jbc.M50141020).
- [16] STEFANO L D, JENSEN M R, HELIN K. E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes[J]. The EMBO Journal, 2003, 22(23): 6289. DOI: [10.1093/emboj/cdg613](https://doi.org/10.1093/emboj/cdg613).
- [17] CHRISTENSEN J, CLOOS P, TOFTEGAARD U, et al. Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(17): 5458. DOI: [10.1093/nar/gki855](https://doi.org/10.1093/nar/gki855).
- [18] LI J, RAN C, LI E, et al. Synergistic function of E2F7 and E2F8 is essential for cell survival and embryonic development[J]. Developmental Cell, 2008, 14(1): 62. DOI: [10.1016/j.devcel.2007.10.017](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.017).
- [19] 汤志雄, 苟德明. miRNA 调控成肌分化的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(10): 103. DOI: [10.13523/j.cb.20171014](https://doi.org/10.13523/j.cb.20171014).
- [20] HUANG Z Q, CHEN X L, YU B, et al. MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2012, 423(2): 265. DOI: [10.1016/j.bbrc.2012.05.106](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.106).
- [21] QIU H, LIU N, LUO L, et al. MicroRNA-17-92 regulates myoblast proliferation and differentiation by targeting the ENH1/Id1 signaling axis[J]. Cell Death & Differentiation, 2016, 23(10): 1658. DOI: [10.1038/cdd.2016.56](https://doi.org/10.1038/cdd.2016.56).

责任编辑: 何馨成