

Egr1对小鼠成肌细胞C2C12分化的影响

崔亚凤 严云勤 李树峰 佟慧丽*

(东北农业大学生命科学学院细胞与发育生物学实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 早期生长反应蛋白1(early growth response protein 1, Egr1)作为转录因子在细胞增殖、分化及凋亡等许多生物学过程中都扮演着重要角色, 但是其对小鼠成肌细胞C2C12分化的影响尚不明确。该研究采用Western blot和免疫荧光技术检测Egr1在C2C12细胞分化过程中的表达规律及定位。利用CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9技术分别激活和抑制Egr1的表达, 进而探讨Egr1对C2C12细胞分化的影响。结果显示, 随着C2C12细胞分化的进行, Egr1的表达量在分化的第5 d达到峰值, 随后呈下降趋势。Egr1表达定位于C2C12的细胞核与细胞质中, 随着分化的进行, 其在细胞核和细胞质中的表达量均显著升高。分别激活或抑制Egr1后, C2C12细胞肌管融合率以及肌肉分化标志分子肌细胞生成蛋白(myogenin, MYOG)和肌球蛋白重链2(myosin heavy chain 2, MYH2)水平均显著增加或降低。该研究结果表明, Egr1能够促进体外小鼠成肌细胞C2C12的分化。

关键词 早期生长反应蛋白1; C2C12; 细胞分化

The Effect of Egr1 on C2C12 Differentiation

Cui Yafeng, Yan Yunqin, Li Shufeng, Tong Huili*

(The Laboratory of Cell and Developmental Biology, College of Life Science,
Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract Egr1 (early growth response protein 1), as a transcription factor, plays important roles in many biological processes, such as cell proliferation, differentiation, apoptosis and so on. However, its effect on C2C12 cells differentiation remains unclear. Western blot and immunofluorescence assays were used to determine the protein level and localization of Egr1 in C2C12 during its differentiation. To explore its effect on C2C12 differentiation, Egr1 expression was activated and inhibited using the CRISPR/Cas9 technique. Egr1 protein level reached the peak on the 5th day of differentiation and then gradually decreased during C2C12 differentiation. Egr1 localized in the cytoplasm and nucleus of C2C12 cells. Egr1 level gradually increased when C2C12 induced to differentiation. During the C2C12 differentiation, myotube fusion rate, myogenin (MYOG) and myosin heavy chain (MYH2) levels increased or decreased significantly when Egr1 were up-regulated or down-regulated, respectively. In summary, the results showed that Egr1 promotes C2C12 differentiation *in vitro*.

Keywords Egr1; C2C12; cell differentiation

早期生长反应蛋白1(early growth response protein 1, Egr1), 也被称为NGFI-A、KROX-24、ZIF268或

tis8。Egr1属即刻早期基因家族, 编码cys2-his2型锌指蛋白。作为重要的转录因子, 其广泛表达于从酵母

收稿日期: 2017-07-05

接受日期: 2017-10-30

国家转基因专项“高产优质转基因肉牛新品种培育”(批准号: 2014ZX08007-002)和黑龙江省博士后科研启动金(批准号: LBH-Q14025)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0451-55190846, E-mail: tonghuili2004@163.com

Received: July 5, 2017

Accepted: October 30, 2017

This work was supported by the Breeding Program for High-quality New Varieties of Genetically Modified Bovine from the National Major Transgenic Project (Grant No.2011ZX08007-002) and Heilongjiang Postdoctoral Research Startup Fund (Grant No.LBH-Q14025)

*Corresponding author. Tel: +86-451-55190846, E-mail: tonghuili2004@163.com

网络出版时间: 2018-01-05 17:43:57

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180105.1743.004.html>

到人类的真核细胞中^[1-3]。Egr1通过对基因表达的调控,在细胞生长、增殖、分化、凋亡、细胞周期阻滞及肿瘤进程等众多的生物学过程中发挥重要作用^[4-6]。Zhang等^[7]研究表明, Egr1可结合到MYOG基因启动子区,通过调控MYOG基因的表达促进体外培养的牛骨骼肌卫星细胞分化。这提示, Egr1可能参与调控骨骼肌的发育。但是,小鼠成肌细胞C2C12作为研究肌肉发育理想的细胞模型, Egr1对其分化的影响尚不明确。因此,本研究探讨Egr1在C2C12细胞分化过程中的作用,以期深入揭示肌肉发育的分子机理提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料及设备

pSPgRNA(*Streptococcus pyogenes* guide RNA)质粒、SP-dCas9-VPR质粒、dCas9质粒购于Addgene公司;菌株DH5 α 购于北京全式金生物技术有限公司;小鼠成肌细胞C2C12细胞购于生工生物工程(上海)股份有限公司;PEI转染试剂购于Sigma公司;限制性内切核酸酶(*Bbs* I)购于北京NEB公司;MYOG(sc-576)、MYH2(sc-324154)、LaminB1(sc-20682)购于Santa Cruz公司;Egr1(ab208780)、GAPDH(ab22555)购于Abcam公司;二抗购于北京Biosynthesis公司;FITC标记二抗购于北京博奥森公司;细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒购于碧云天生物技术公司;高糖DMEM培养液购于Gibco公司;胎牛血清、马血清、青霉素、链霉素购自BI公司;细胞培养瓶、细胞培养板购于Corning公司。

Thermo Forma 3111 CO₂培养箱购于Thermo Elec-tron集团;CKX31倒置显微镜购于Olympus公司;SW-cj生物超净工作台购于苏州净化设备有限公司;MiniChemi™迷你型化学发光成像仪购于北京赛智创业科技有限公司;DYCP-31电泳仪和电泳槽购于

北京市六一仪器厂;激光扫描共聚焦显微镜FV3000购于Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及诱导分化 将C2C12细胞接种于细胞培养板中,用含有10%牛血清的DMEM培养液培养至60%~70%细胞汇合时,弃掉培养液,用PBS清洗2次,加入含2%马血清的DMEM分化培养液,体外分化培养C2C12细胞1、2、3、4、5、6、7 d。

1.2.2 载体构建 通过预测靶位点网站(<http://zifit.partners.org/ZiFiT/CSquare9Nuclease.aspx>),针对Egr1基因启动子区进行靶位点预测,选取Egr1基因的3个靶位点E1、E2、E3(表1),设计相应的寡核苷酸单链,退火后分别与*Bbs* I酶切的pSPgRNA进行连接反应,将连接产物转化到*E. coli* DH5 α 中,挑取细菌单菌落并进行测序鉴定,成功得到pSPgRNA-E1、pSPgRNA-E2和pSPgRNA-E3重组载体。

1.2.3 细胞核和细胞质中蛋白质的提取 取未分化、分化第3 d和第7 d的C2C12细胞,弃掉细胞培养液,用PBS清洗细胞3次。刮取细胞,离心收集细胞沉淀;细胞沉淀加入添加了蛋白酶抑制剂(PMSF)的细胞质蛋白抽提试剂A和细胞质蛋白抽提试剂B,4 °C下16 000 \times g离心5 min,上清即为细胞质蛋白;对于沉淀,完全吸尽残余的上清,加入添加了PMSF的细胞核蛋白抽提试剂,4 °C下16 000 \times g离心10 min,上清即为抽提得到的细胞核蛋白。

1.2.4 细胞转染及Western blot 将对数生长期的C2C12细胞传至细胞培养板中,待细胞达到60%~70%汇合时,采用PEI转染试剂说明书操作流程进行细胞转染。转染24 h后用含2%马血清的DMEM分化培养液诱导分化培养48 h,裂解并收集细胞,采用Western blot检测Egr1及内参GAPDH蛋白水平,以筛选重组载体。

采用Egr1激活及干扰效果最佳的Cas9质粒系统

表1 小鼠Egr1基因靶位点信息

Table 1 The target site information of mouse Egr1 gene

靶位点名称	靶位点(5'→3')	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Target site name	Target site (5'→3')	Sense primer (5'→3')	Antisense primer (5'→3')
E1	GGG CTT CAC TGC	ACA CCG GGC TTC	AAA ACT GAC GCA
	TTG CGT CA	ACT GCT TGC GTC AG	AGC AGT GAA GCC CG
E2	GAA GTG TTA CCC	ACA CCG AAG TGT	AAA ACA GAA TTC
	TGA ATT CT	TAC CCT GAA TTC TG	AGG GTA ACA CTT CG
E3	GTT CTC CCT CAC	ACA CCG TTC TCC	AAA ACT AGA CGC
	TGC GTC TA	CTC ACT GCG TCT AG	AGT GAG GGA GAA CG

进行C2C12细胞转染(方法同上段), 转染24 h后, 分别诱导细胞分化24 h、48 h和72 h, 裂解并收集细胞, 采用Western blot检测Egr1及分化相关蛋白质水平的变化。

通过10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 并将目的条带转移到PVDF膜上, 5%脱脂牛奶封闭1 h, 特异性一抗于37 °C孵育1 h, 二抗于37 °C孵育1 h; 利用化学发光成像仪获得免疫染色条带, 并分析目的基因表达的蛋白质水平。

1.2.5 免疫荧光染色 取诱导分化后的C2C12细胞, 弃掉细胞培养液, PBS缓冲液清洗细胞表面2次, 冷甲醇固定20 min。吸去固定液, 加入PBS缓冲液清洗细胞3次。0.2% Triton X-100的PBS缓冲液(PBST)配制5% BSA作为封闭液, 孵育细胞60 min, 进行封闭; 吸去封闭液, 使用适当浓度的Egr1一抗(封闭液配制)孵育细胞60 min, PBST清洗细胞3次。分别采用FITC-标记的二抗避光孵育60 min后, PBST清洗细胞3次。DAPI染核4 min, PBST清洗3次。滴入适量抗荧光淬灭剂, 于激光扫描共聚焦显微镜下观察, 获取细胞图像。

1.2.6 统计分析 本文实验采用*t*检验对数据进行分析, 实验数据以mean±S.D.形式表示, 显著性差异分析用SPSS 17.0软件进行; $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。Western blot条带的灰度扫描用ImageJ软件进行, 数据统计用GraphPad Prism软件进行。

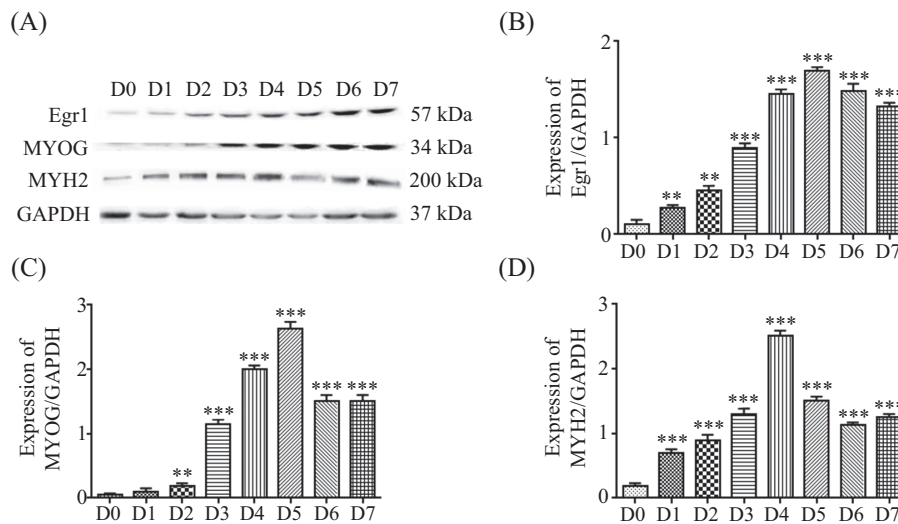
2 结果

2.1 在C2C12分化不同时期的Egr1水平和定位

2.1.1 Egr1在C2C12分化不同时期的表达规律 利用Western blot检测C2C12诱导分化不同时期Egr1和肌肉分化标志分子MYOG、MYH2的表达规律。结果表明, 与未分化的C2C12相比, 随着分化的进行, MYOG、MYH2水平都呈现出先升高后降低的趋势(图1A), 并且在分化第5 d时MYOG水平达到峰值, 在分化第4 d时MYH2水平达到峰值(图1C和图1D)。由此说明, C2C12细胞在诱导分化后的第1 d至第5 d, 分化状态呈快速递增趋势, 并且在第5 d达到了最好的效果, 诱导分化后的第6 d至第7 d, 分化状态呈缓慢降低的趋势。Egr1的表达规律与C2C12细胞分化状态是相对应的, 且在分化第5 d时表达量达到峰值(图1B)。

2.1.2 Egr1在C2C12分化不同时期的细胞定位 利用免疫荧光检测Egr1在未分化、分化第3 d和第7 d的C2C12中的分布情况。结果表明, Egr1在未分化、分化第3 d和第7 d的C2C12细胞核和细胞质中都有分布(图2)。

Western blot检测在未分化、分化第3 d和第7 d的C2C12细胞核和细胞质中Egr1水平。结果表明, Egr1在未分化和分化的C2C12细胞核和细胞质中都有表达, 且随着分化的进行, 在细胞核和细胞质中Egr1水平均呈上升趋势; 分化第7 d时, 在细胞核中Egr1水平



A: Western blot检测分化不同时期Egr1、MYOG、MYH2的蛋白质水平差异; B-D: 为A图灰度扫描及统计结果($n=3$); $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, 分别与未分化细胞(D0)相比较; D0、D1、D2、D3、D4、D5、D6、D7分别代表未分化和分化第1、2、3、4、5、6及第7 d的C2C12细胞。

A: Western blot detected the protein levels of Egr1, MYOG and MYH2 at different stages of differentiation; B-D: quantified data shown in A ($n=3$); $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, compared with undifferentiated cells; D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6 and D7 represented C2C12 cells on undifferentiation, differentiation Day 1, Day 2, Day 3, Day 4, Day 5, Day 6 and Day 7 respectively.

图1 C2C12分化不同时期Egr1、MYOG和MYH2的蛋白质水平

Fig.1 The protein levels of Egr1, MYOG and MYH2 at different stages of C2C12 differentiation

与细胞质相比达到最高,且差异极显著(图3)。

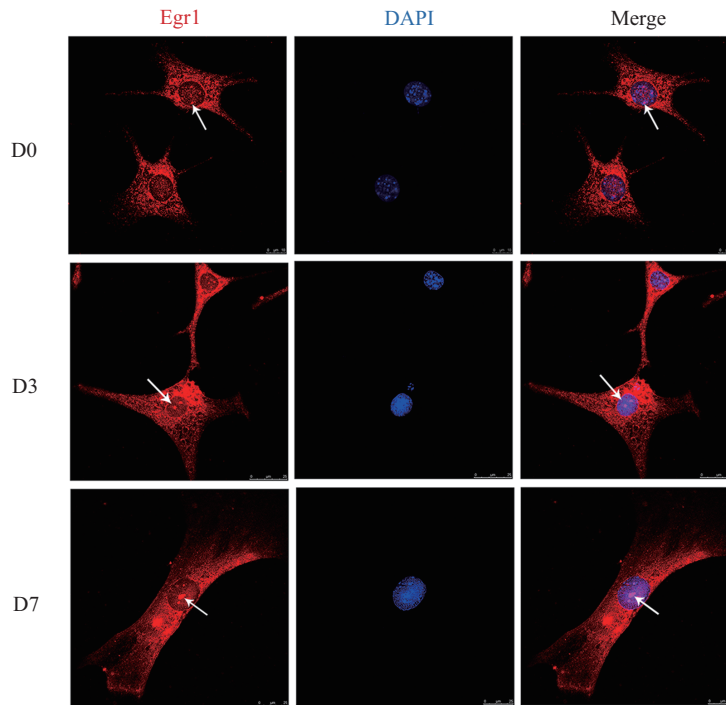
2.2 Egr1激活和抑制

转染pSPgRNA-E2激活载体后发现, Egr1水平与其他处理组相比最高,为对照组(pSPgRNA)的1.9倍(图4B);转染pSPgRNA-E2抑制载体后, Egr1水平与其他处理组相比最低,为对照组(pSPgRNA)的0.37倍(图4C)。此结果表明, pSPgRNA-E2载体能够有效地激活或抑制Egr1的表达。因此,选择pSPgRNA-E2进行后

续激活和抑制实验研究。

2.3 激活和抑制Egr1对C2C12分化的影响

将pSPgRNA-E2分别与SP-dCas9-vpr和dCas9共转染C2C12细胞24 h、48 h和72 h后,通过结蛋白(desmin)免疫荧光检测C2C12分化过程中肌管融合率。实验结果表明,激活Egr1表达后,实验组(sgRNA+VPR)肌管融合率为34%,对照组(E2+VPR)肌管融合率为14%,实验组为对照组的2.4倍(图5A和图5B)。抑制

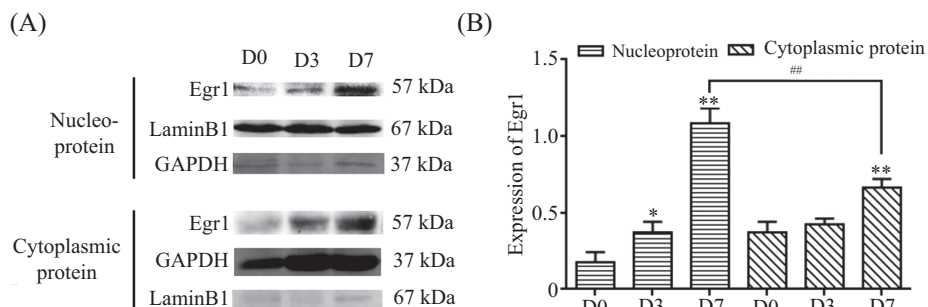


D0: 未分化; D3: 分化第3 d; D7: 分化第7 d; 红色为Egr1阳性信号, 蓝色为DAPI染色的细胞核。白色箭头指示细胞核中Egr1阳性信号。

D0: undifferentiation; D3: differentiation on Day 3; D7: differentiation on Day 7; Red represented Egr1 positive signal and blue represented nuclei stained by DAPI. White arrows showed Egr1 positive signal in nuclei.

图2 C2C12分化前后Egr1的定位

Fig.2 Egr1 localization before and after C2C12 differentiation

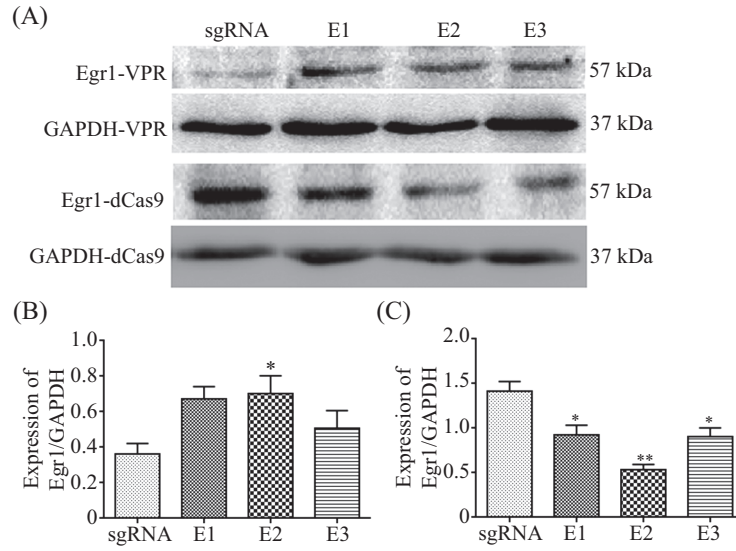


A: Western blot测定分化前后细胞核和细胞质中Egr1蛋白质水平差异; B: 为图A灰度扫描结果($n=3$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 每组实验分别与未分化细胞相比较; # $P<0.01$; D0、D3、D7分别代表未分化、分化第3 d和第7 d的C2C12细胞。

A: Western blot detected Egr1 level in nucleus and cytoplasm before and after C2C12 differentiation; B: quantified data shown in A ($n=3$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, each group was compared with undifferentiated cells; # $P<0.01$; D0, D3 and D7 represented C2C12 cells on undifferentiation, differentiation Day 3 and Day 7, respectively.

图3 C2C12分化前后细胞核和细胞质中Egr1水平

Fig.3 Egr1 level in nucleus and cytoplasm before and after C2C12 differentiation

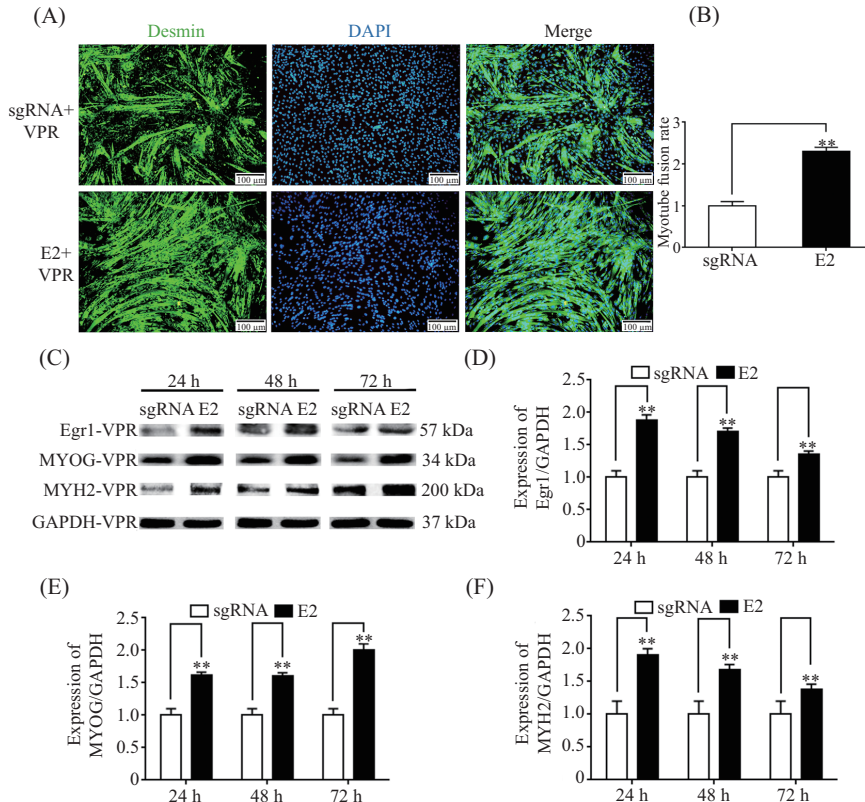


A: Western blot测定CRISPRi激活和抑制后Egr1蛋白质水平; E1、E2、E3分别代表pSPgRNA-E1、pSPgRNA-E2和pSPgRNA-E3载体。B、C: 分别为图A中激活和抑制Egr1蛋白水平后灰度扫描结果($n=3$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 实验组与对照组sgRNA相比。

A: Western blot detected the protein level of Egr1 after CRISPRi activation and inhibition; E1, E2 and E3 represented pSPgRNA-E1, pSPgRNA-E2 and pSPgRNA-E3 vector respectively. B,C: represented quantified data of the protein level of Egr1 after CRISPRi activation and inhibition respectively shown in A ($n=3$); * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the control group sgRNA.

图4 Egr1激活和抑制载体筛选

Fig.4 Screening for Egr1 activation and inhibitory vector

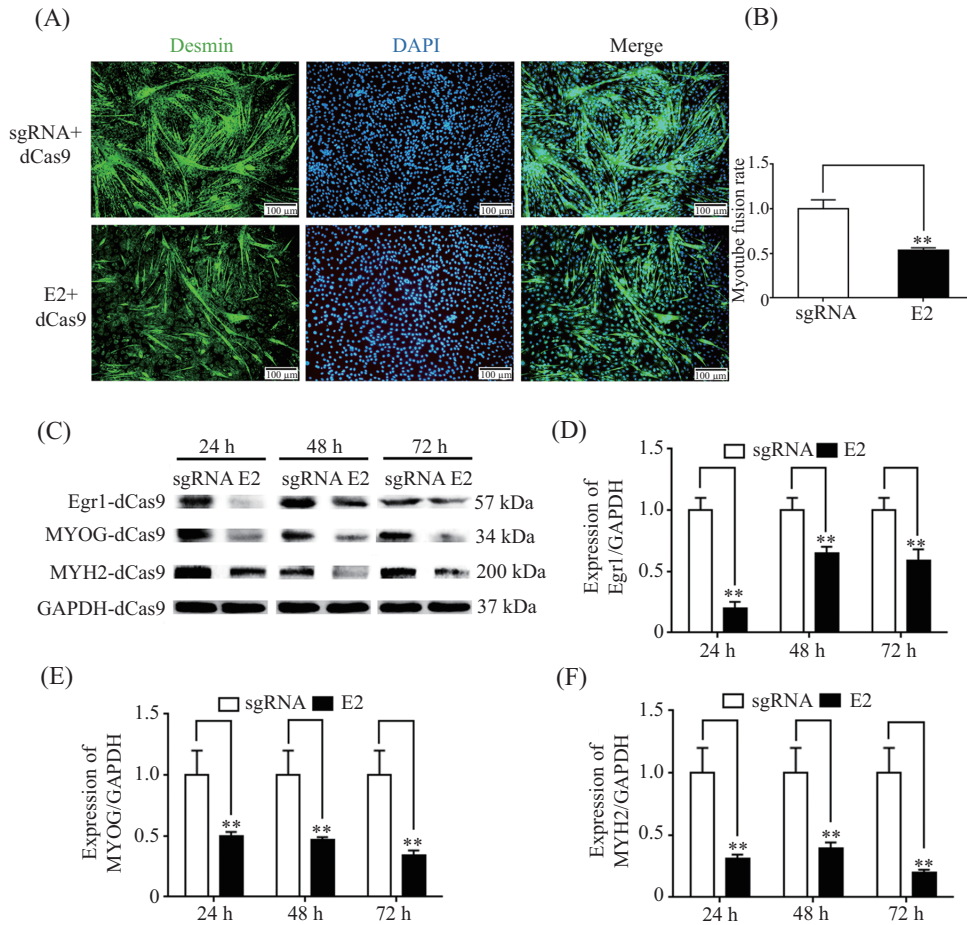


A: 免疫荧光观察CRISPRi激活Egr1后细胞形态; 绿色为分化细胞中的结蛋白, 蓝色为DAPI染色的细胞核; B: 为A图肌管融合率统计; C: Western blot测定CRISPRi激活Egr1、MYOG和MYH2蛋白水平差异; D-F: 为C图灰度扫描结果($n=3$); ** $P<0.01$ 。

A: immunofluorescence observation of desmin after CRISPRi activation; Green represented desmin positive signal and blue represented nuclei stained by DAPI; B: myotube fusion rate according to desmin staining presented in A; C: Western blot detected the difference of Egr1, MYOG and MYH2 protein level after CRISPRi activation; D-F: quantified data shown in C ($n=3$); ** $P<0.01$.

图5 激活Egr1可促进C2C12分化

Fig.5 Activation of Egr1 to promote C2C12 differentiation



A: 免疫荧光观察, CRISPRi抑制Egr1后细胞形态; 绿色为分化细胞中的结蛋白, 蓝色为DAPI染色的细胞核; B: 为A图肌管融合率统计; C: Western blot测定CRISPRi抑制Egr1、MYOG和MYH2蛋白水平差异; D~F: 为C图灰度扫描结果($n=3$); $**P<0.01$ 。

A: immunofluorescence observation of desmin after CRISPRi inhibition; Green represented desmin positive signal and blue represented nuclei stained by DAPI; B: myotube fusion rate according to desmin staining presented in A; C: Western blot detected the difference of Egr1, MYOG and MYH2 protein levels after CRISPRi inhibition; D-F: quantified data shown in C ($n=3$); $**P<0.01$.

图6 抑制Egr1可抑制C2C12分化

Fig.6 Inhibition of Egr1 to inhibit C2C12 differentiation

Egr1表达后, 实验组(sgRNA+dCas9)肌管融合率为7%, 对照组(E2+dCas9)肌管融合率为14%, 实验组为对照组的0.5倍(图6A和图6B)。通过Western blot检测分化标志分子MYOG和MYH2水平的变化, 结果表明, 当Egr1水平升高后(图5C和图5D), MYOG水平增加, 24 h为对照组的1.6倍, 48 h为对照组的1.6倍, 72 h为对照组的2.0倍(图5E); MYH2水平也增加, 24 h为对照组的1.9倍, 48 h为对照组的1.6倍, 72 h为对照组的1.3倍(图5F)。此结果表明, 激活Egr1表达可促进C2C12细胞分化。当Egr1水平降低后(图6C和图6D), MYOG水平下降, 24 h为对照组的0.5倍, 48 h为对照组的0.4倍, 72 h为对照组的0.3倍(图6E); MYH2水平也下降, 24 h为对照组的0.3倍, 48 h为对照组的0.3倍, 72 h为对照组的0.2倍(图6F)。此结果表明, 抑制Egr1可抑制C2C12细胞分化。

3 讨论

Egr1作为重要的转录因子, 其在细胞分化中的作用成为近年来的研究热点, 如miR-124通过靶向Egr1的表达而抑制人肌腱的分化^[8]。Egr1通过BMP12(bone morphogenic proteins 12)/Smad1/5/8信号通路诱导兔肌腱干细胞的分化, 并促进肌腱的损伤修复^[9]。本研究以C2C12细胞作为成肌细胞分化的模型, 结果显示, 分化标志分子MYOG和MYH2分别在C2C12细胞分化的第5 d和第4 d达到峰值, 说明C2C12在第5 d时分化程度最高。此外, Egr1蛋白水平检测结果表明, 其在C2C12分化第5 d, 即分化程度较高时其水平达到峰值。因此, Egr1的表达与C2C12细胞分化呈正相关, 推测Egr1蛋白质水平可能参与C2C12细胞分化的调控。进一步研究表明, 当C2C12分化进入第7 d时, 细胞核中Egr1的表达

量显著高于细胞质。由此推测,其作为转录因子在C2C12分化过程中入核,并可能参与调节细胞分化等生物学过程的进行。虽然有研究表明,Egr1通过C-端与ARF相互作用从而定位于核仁^[10],但是Egr1在C2C12分化过程中如何入核及入核后如何调节C2C12细胞的分化过程尚未见报道,其具体分子机制不明确,有待进一步研究。

为进一步探讨Egr1对C2C12细胞分化的调节,本研究采用CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)技术对Egr1进行转录干扰及激活研究。CRISPR作为高效的基因功能研究工具,近年来获得了广泛的应用。由sgRNA引导的CRISPRi(CRISPR interference)基因沉默是高效的^[11]。研究表明,在HeLa细胞中,采用CRISPRi技术靶向干扰人内源基因转铁蛋白CD71(cluster of differentiation 71)和趋化因子CXCR4[chemokine (C-X-C motif) receptor 4]的效率可达80%^[12]。此外,在人293细胞中,可以直接将dCas9-VP64转录激活结构域融合到单个或多个gRNA中,进而显著增加血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)和神经生长因子3(neurotrophin 3, NTF3)的表达^[13]。本研究构建的Egr1的CRISPR激活和抑制载体,在C2C12细胞中实现了对Egr1良好的激活和抑制效果。

对于细胞分化的研究,本研究检测了MYOG和MYH2的蛋白质水平及肌管融合率。众所周知,MYOG是一种重要的生肌调节因子,对肌细胞的分化和骨骼肌的功能发展是必要的^[14]。肌球蛋白重链与肌纤维的特性相关,其中MYH2表达于成熟的骨骼肌中^[15]。MYOG和MYH2作为小鼠成肌细胞C2C12的成肌分化标志分子,能够准确地反映C2C12细胞的分化程度^[16]。因此,本研究通过激活Egr1后,肌管融合率显著增加,MYOG和MYH2水平显著升高;而抑制Egr1后,肌管融合率显著减少,MYOG和MYH2水平显著降低。MYOG和MYH2水平及肌管融合率实验结果进一步表明,Egr1的表达与C2C12细胞的分化呈正相关。

Figliola等^[17]研究表明,Egr1作为MYOD的转录调节因子,其与细胞周期调节因子p57Kip2启动子的甲基化程度有关,从而调节成肌细胞的分化。嵌合蛋白PAX3(paired box 3)-FOXO1(forkhead box O1)与Egr1结合能力的减弱、Egr1的转录水平降低使p57Kip2无法正常转录,导致小鼠的成肌细胞无法

正常分化为肌细胞^[18]。最新研究表明,Egr1可以与MYOG基因的启动子区结合,并通过调节MYOG的表达而促进牛成肌细胞分化为肌细胞^[7]。此外,Egr1表达上调能够诱导p35基因表达,随之激活周期素依赖性蛋白激酶5(cyclin-dependent kinase 5, Cdk5)的活性,从而促进大鼠成肌细胞L6的分化^[19]。本研究结果说明,Egr1蛋白质水平的降低可能会阻碍肌肉分化的进程。反之,Egr1转录的激活能够促进肌肉分化的进行,这与本实验结果相符合。但是,也有研究显示,钙调神经磷酸酶(calcineurin)可能通过下调Egr1的表达降低抑制蛋白Id(inhibitor of DNA binding)的表达,从而间接激活MYOD转录因子的活性,以诱导MYOG基因的表达^[20]。因此,Egr1对于分化基因表达的调控可能受到多种因素的影响,其如何通过调节MYOD或MYOG的表达来调控C2C12细胞分化的分子机制仍需深入探讨。

综上,本研究表明,随着C2C12分化的进行,Egr1蛋白质水平增加且能够入核。调控Egr1水平可促进或抑制C2C12细胞的分化,提示Egr1在C2C12细胞分化过程中发挥重要的调控作用,其具体分子机制有待进一步探索。

参考文献 (References)

- 1 Shelly C, Petruzzelli L, Herrera R. K562 cells resistant to phorbol 12-myristate 13-acetate-induced growth arrest: dissociation of mitogen-activated protein kinase activation and Egr-1 expression from megakaryocyte differentiation. *Cell Growth Differ* 2000; 11(9): 501-6.
- 2 Ferguson J, Bird C, Wadhwa M, Burns C. Detection of neutralizing antibodies to erythropoietin by inhibition of rHuEPO-stimulated EGR1 gene expression in the UT-7/EPO cell line. *J Immunol Methods* 2013; 387(1/2): 191-8.
- 3 Wang D, Guan MP, Zheng ZJ, Li WQ, Lyv FP, Pang RY, *et al.* Transcription factor Egr1 is involved in high glucose-induced proliferation and fibrosis in rat glomerular mesangial cells. *Cell Physiol Biochem* 2015; 36(6): 2093-107.
- 4 Sun M, Nie FQ, Zang C, Wang Y, Hou J, Wei C, *et al.* The pseudogene DUXAP8 promotes non-small-cell lung cancer cell proliferation and invasion by epigenetically silencing EGR1 and RHOB. *Mol Ther* 2017; 25(3): 739-51.
- 5 Kumar SS, Tomita Y, Wrin J, Bruhn M, Swalling A, Mohammed M, *et al.* High early growth response 1 (EGR1) expression correlates with resistance to anti-EGFR treatment *in vitro* and with poorer outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Clin Transl Oncol* 2017; 19(6): 718-26.
- 6 Adams KW, Kletsov S, Lamm RJ, Elman JS, Mullenbrock S, Cooper GM. Role for Egr1 in the transcriptional program associated with neuronal differentiation of PC12 cells. *PLoS One* 2017; 12(1): e0170076.

- 7 Zhang W, Tong H, Zhang Z, Shao S, Liu D, Li S, *et al.* Transcription factor EGR1 promotes differentiation of bovine skeletal muscle satellite cells by regulating MyoG gene expression. *J Cell Physiol* 2017; 233(1): 350-62.
- 8 Wang B, Guo J, Feng L, Suen CW, Fu WM, Zhang JF, *et al.* MiR124 suppresses collagen formation of human tendon derived stem cells through targeting *egr1*. *Exp Cell Res* 2016; 347(2): 360-6.
- 9 Tao X, Liu J, Chen L, Zhou Y, Tang K. EGR1 induces tenogenic differentiation of tendon stem cells and promotes rabbit rotator cuff repair. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35(2): 699-709.
- 10 Ponti D, Belenchi GC, Puca R, Bastianelli D, Maroder M, Ragona G, *et al.* The transcription factor EGR1 localizes to the nucleolus and is linked to suppression of ribosomal precursor synthesis. *PLoS One* 2014; 9(5): e96037.
- 11 Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 2013; 31(7): 397-405.
- 12 Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, Doudna JA, Weissman JS, Arkin AP, *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 2013; 152(5): 1173-83.
- 13 Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods* 2013; 10(10): 977-9.
- 14 Meadows E, Cho JH, Flynn JM, Klein WH. Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. *Dev Biol* 2008; 322(2): 406-14.
- 15 Lim KS, Lee SH, Lee EA, Kim JM, Hong KC. Effects of intergenic single nucleotide polymorphisms in the fast myosin heavy chain cluster on muscle fiber characteristics and meat quality in Berkshire pigs. *Meat Sci* 2015; 110: 224-9.
- 16 Chen Y, Stegaev V, Kouri VP, Sillat T, Chazot PL, Stark H, *et al.* Identification of histamine receptor subtypes in skeletal myogenesis. *Mol Med Rep* 2015; 11(4): 2624-30.
- 17 Figliola R, Busanello A, Vaccarello G, Maione R. Regulation of p57(KIP2) during muscle differentiation: role of Egr1, Sp1 and DNA hypomethylation. *J Mol Biol* 2008; 380(2): 265-77.
- 18 Roeb W, Boyer A, Cavenee WK, Arden KC. PAX3-FOXO1 controls expression of the p57Kip2 cell-cycle regulator through degradation of EGR1. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2007; 104(46): 18085-90.
- 19 Lee KY. L6 myoblast differentiation is modulated by Cdk5 via the PI3K-AKT-p70S6K signaling pathway. *Oncogene* 2004; 23(36): 6064-70.
- 20 Mitchell PO, Kegley KM, Pavlath GK. Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation* 2003; 71(3): 217-27.