



E2F 家族对肌肉骨骼系统发育和相关疾病的影响*

王舒莞 汪 琢**

(沈阳体育学院运动健康学院, 沈阳 110102)

摘要 E2F 家族是介导腺病毒 E1a 诱导 E2 基因的转录因子家族, 在调控细胞周期进程、调节细胞增殖、诱导细胞凋亡的过程中起着至关重要的作用。鉴于其功能主要与细胞增殖分化有关, 早期关于 E2F 家族的研究多集中于 E2F 与癌症的关系。随着研究范围的不断扩大, 研究者发现, E2F 家族在肌肉骨骼系统的发育过程以及相关疾病的作用机制中独立发挥作用。E2F 家族可以通过调控干细胞、成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞和成肌细胞的细胞周期和增殖过程, 并且作为多个通路下游以及微 RNA (microRNA) 的靶点基因, 减缓或加重肌肉骨骼系统疾病进展。目前关于 E2F 家族在肌肉骨骼系统中的作用还没有系统的总结和梳理, 本文主要就 E2F 家族在肌肉骨骼系统中的生理学功能和 E2F 家族在肌肉骨骼系统相关疾病中的作用机制进行综述, 希望为后续研究和疾病诊疗提供依据。

关键词 E2F 家族, 骨, 肌肉, 骨肉瘤, 骨关节炎

中图分类号 R336

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0446

CSTR: 32369.14.pibb.20240446

E2F 转录因子家族由 8 个基因 (*E2F1~8*) 组成, 编码 10 个蛋白质, 通过调节细胞周期进展、细胞分化、DNA 损伤修复、细胞凋亡和血管生成, 形成负责基因组稳定性的中心转录轴^[1-6]。E2F 家族具有诱导细胞凋亡和调节分化的能力, 它可以阻止不同细胞谱系的终末分化, 包括肌细胞^[7]、表皮角质形成细胞^[8]、粒细胞^[9]、巨核细胞^[10]、巨噬细胞^[11]和前脂肪细胞^[12]。因为其功能与细胞增殖联系密切, 目前研究重点大多集中于 E2F 家族在癌症发生发展中的作用。

E2F 家族是抑癌基因 *pRB* 的主要靶标^[13]。在细胞正常生长过程中, *pRB* 被细胞周期蛋白依赖性激酶失活, 导致 E2F 激活, 促进生长相关基因表达和细胞增殖。癌细胞的特征是由于各种致癌变化引起的 *pRB* 功能丧失, E2F 活性异常增强导致细胞生长不受限制^[14]。这种异常的 E2F 激活会通过影响细胞增殖、凋亡、DNA 损伤反应、上皮-间质转化、转移和化疗耐药性等过程, 在多种癌症^[15-17]中起着促进或抑制肿瘤的作用, 这些作用已被详细综述。

目前 E2F 家族相关的研究多聚焦于肿瘤的研究, 对于肌肉骨骼系统发育、肌肉骨骼系统疾病的

影响以及以 E2F 家族作为治疗方式的研究还比较少。本综述分两个部分, 分别阐述了 E2F 家族在骨代谢、骨骼肌、软骨发生发育过程中的生理作用, 同时也总结了 E2F 家族在骨肉瘤 (osteosarcoma, OS)、类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)、骨质疏松症、肌肉相关疾病的病理进程中的角色。本文致力于归纳梳理现有的相关成果, 以期后续研究的开展以及相关肌肉骨骼系统疾病的治疗手段提供助力。

1 E2F 家族

E2F 为宿主细胞转录因子, 全称为腺病毒 E2 启动子结合因子, 它介导腺病毒 E1a 诱导 E2 基因表达。目前, 哺乳动物细胞中有 8 个 E2F 基因 (称为 *E2F1~8*), 编码 10 种蛋白质。在 E2F 基因中, *E2F3* 和 *E2F7* 基因位点可经过两次替代剪接, 编码

* 2024 年辽宁省自然科学基金计划博士科研启动项目 (2024-BS-273) 和辽宁省教育厅 2022 年基本科研项目 (LJKMZ20221610) 资助。

** 通讯联系人。

Tel: 18841369672, E-mail: wangzhuo_7@126.com

收稿日期: 2024-10-26, 接受日期: 2024-12-30

4种蛋白质异构体：E2F3a、E2F3b、E2F7a和E2F7b^[18-19]（图1）。根据其独特的结构特征，E2F家族可大致分为两类：典型E2Fs（E2F1~6）和非典型E2Fs（E2F7，8）。典型的E2F1~6成员拥有一个DNA结合域，其上游是由亮氨酸拉链（leucine zipper, LZ）和标记盒（marking box, MB）结构域组成的二聚化伙伴结合结构域^[20]。与E2F6不同的是，E2F1~5的C端有一个转录激活结构域，并含有一个口袋蛋白结合区。因此，E2F1~5受口袋蛋白——视网膜母细胞瘤蛋白（retinoblastoma protein, RB）、p107和p130的广泛调控^[21]。此外，E2F1~3的N端有一个核定位信号和一个细胞周期蛋白A结合位点，以确保它们转位到细胞核中，从而调控细胞周期活性^[22-23]。E2F4~5具有双侧核输出信号，可介导其胞质转位^[24-25]。非典型E2F7和E2F8有两个不同的DNA结合域，但缺乏二聚化伴侣蛋白（dimerization partner, DP）结合域、口袋蛋白结合区和转录激活域^[26]。因此，E2F7和E2F8通过DNA结合域以同源二聚体或异源二聚体的形式与DNA结合，调节基因转录^[27]。由于结构上的差异，E2Fs注定要在细胞中发挥不同的功能。

根据其功能特性，E2F通常可细分为两类：转录激活剂（E2F1~3）和抑制剂（E2F4~8）。E2F1~3a的转录活性取决于细胞周期调控及其结合伙伴，其中包括二聚化伙伴和口袋蛋白。口袋蛋白（RB/p107/p130）对E2F亚基具有不同程度的结合特异性^[28]。在细胞周期从G1期进入S期的过程中，RB被活化的细胞周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinases, CDK）磷酸化，导致其从RB-E2F复合物中解离，E2F1~3a的转录激活结构域被解除屏蔽^[29]。E2F4基因可以与3种肿瘤抑制因子结合，但它与p107和p130结合的亲和力更高^[30]。E2F5和E2F4在所有E2F成员中具有最多的结构相似性，并且都在循环细胞中口袋蛋白依赖性G1阻滞做出重要贡献^[31]。E2F6~8被认为是独立于口袋蛋白的抑制因子，其主要功能是调节从S期到G2期的细胞周期进程。E2F6可通过招募染色质重塑复合物抑制转录^[32]，而E2F7~8可直接调节基因转录^[33-34]。E2Fs是细胞周期的关键调节因子，它们通过控制参与DNA复制和细胞周期进展的众多靶基因的转录来调节细胞周期的每个阶段。

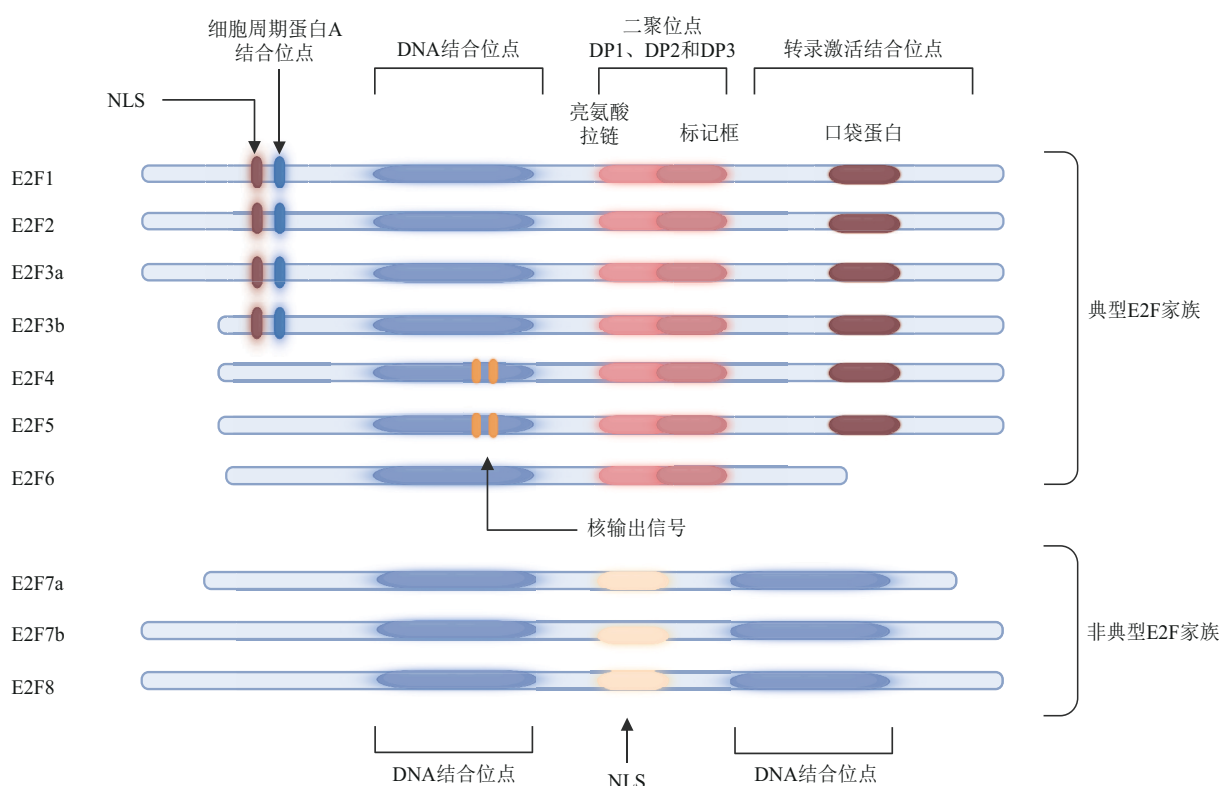


Fig. 1 Schematic diagram of the structure of each factor of the E2F family (created by biorender.com)

图1 E2F家族各因子结构示意图（使用biorender.com绘制）

NLS：核定位信号；DP 1/2/3：二聚化伴侣蛋白1/2/3（dimerization partner 1/2/3）。

2 E2F家族与肌肉骨骼系统

2.1 E2F家族与骨代谢

E2F家族对细胞周期的调控能力使其在干细胞分化方面起到重要作用。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是中胚层来源的非造血组织的一类具有自我更新能力的成体干细胞(somatic stem cells, SSCs),能够分化为骨、脂肪和其他类型的结缔组织。RB与E2F转录因子共同组成了pRB-E2F信号通路,促进瞬时和稳定的细胞静止期,影响MSCs的命运走向分化、衰老或死亡^[35]。E2F3作为miR-34a的靶基因,受其调控影响人基质干细胞的成骨细胞分化和体内骨形成^[36]。同样对骨产生积极影响的还有E2F4,E2F4表达增加可以在异种移植表达端粒酶的人骨髓基质干细胞中,通过抑制低磷酸化的pRB,使细胞周期从G1期进入S期,进而促进成骨分化^[37]。敲除E2F4提高了体内发育中钙质的增长能力,同时体内骨化的早期阶段被延迟^[38]。

破骨细胞分化与代谢与E2F1有关。E2F1与RB的结合形成了RB-E2F1-糖酵解-肌酸激酶B(creatine kinase B,CKB)通路^[39],通过诱导满足破骨细胞生成代谢需求所需基因的表达来促进破骨细胞生成。但在正常条件下,核因子κB受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor-κB ligand,RANKL)只能弱激活这条通路,因为它的激活受到铜代谢结构域蛋白1(copper metabolism murr1 domain containing 1,COMMD1)的抑制。在缺氧条件下通过使上游负调控因子COMMD1失活来诱导E2F1代谢途径,满足生成破骨细胞的环境要求进而促进骨吸收^[39]。

E2F家族的成员与成骨细胞分化和骨的发育独立相关。E2F家族与长链非编码RNA(long non-coding RNA,lncRNA)RP1-85F18.6正相关,RP1-85F18.6促进E2F表达并进一步导致细胞周期蛋白A和细胞CDK1的增多,使S期细胞减少,G2/M期细胞增加,从而提高成骨细胞活力^[40]。在C57BL/6N小鼠中敲除E2F3基因,小鼠表现出成骨细胞分化减少、体重减轻、生长迟缓、骨骼不完善的特点^[41]。E2F6作为成骨细胞分化的负调控因子^[42],通过与一种多聚核小体蛋白Bmi1相互作用促进Hox基因的表达影响中轴骨的发育^[43]。在E2F6^{-/-}小鼠中还发生了骨的同源转变,但仅限于脊椎的腰椎和骶椎区域^[44]。值得思考的是,成骨细

胞和软骨细胞都起源于一个共同的间充质前体细胞。如果E2Fs缺失损害成骨细胞祖细胞的细胞周期退出,从而延迟终末分化为成熟成骨细胞,软骨细胞祖细胞也可能存在同样的问题。

2.2 E2F家族与软骨

E2Fs对不同时期的软骨细胞具有不同的作用。E2F活性被细胞周期蛋白D1抑制后,会降低软骨细胞对有丝分裂刺激的增殖反应^[45]。同时,E2F靶基因的下调,也被认为是导致软骨细胞促进G1/S期转化但未能诱导细胞增殖的原因之一^[46]。E2F家族主要在软骨生长板内表达,生长板是影响软骨内成骨的重要软骨组织。E2F1和E2F3a联合缺失会产生杂乱的生长板和异常的软骨细胞^[47-48]。但是E2F3b的敲除是否会产生影响还没有进行探索。E2F4在增殖的软骨细胞中具有高转录水平^[49],在正常生长板中呈组成型表达^[50],且其mRNA水平随着软骨形成的进展持续增加^[51]。

E2Fs各转录因子与软骨发育独立相关。E2F1过表达显著抑制软骨细胞的早期和晚期分化^[50],且伴随着软骨结节形成减少以及II型胶原、X型胶原和聚集蛋白聚糖基因表达的降低^[52]。而过表达E2F2或E2F3a仅导致软骨细胞成熟的时间延迟,E2F4水平的增加没有影响^[52]。E2F4/p130复合物可以结合cAMP依赖性激活转录因子2(activating transcription factor 2,ATF-2)启动子激活细胞周期蛋白A,从而有效地缓解由成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)诱导的软骨细胞发育停滞^[53]。E2F5负调节软骨细胞增殖,Let-7 miRNAs在软骨细胞中抑制E2F5的表达,当Let-7被沉默后,E2F5的上调会显著抑制软骨细胞增殖^[54]。

2.3 E2F家族与骨骼肌

E2F家族是骨骼肌生成的必要条件。在骨骼肌生成过程中,E2Fs占据了肌肉特异性基因的启动子,直接参与肌纤维生成的调控,并通过多重机制调节肌肉分化过程^[55-57]。E2Fs作用在肌生成晚期,在细胞周期退出和随后的分化过程中,E2F复合物最终会转化为包含p130的E2F复合物,同时E2F介导的转录抑制作用也会增强^[58]。在完全分化的C2C12肌管和新鲜分离的骨骼肌中检测到了低水平的E2F-pRB复合物,E2F-pRB可能在末端分化的发展或维持中发挥特定作用^[59]。E2Fs在肌生成晚期细胞中的定位不同。在终末分化的L6肌管中,E2F1、E2F3和E2F5主要在细胞质中,E2F2在细

胞核中, 而 E2F4 则在细胞质和细胞核之间存在^[60]。E2Fs 家族成员的亚细胞区系化是维持终末分化肌肉有丝分裂后状态的必要条件^[60]。但是当骨骼肌细胞已经达到终末分化状态时, 过量表达 E2F1、E2F2 和 E2F4 均不能重新激活有丝分裂后的骨骼肌细胞(肌管)合成 DNA^[61]。

E2F1 对生肌功能的调节提供了主要贡献^[62]。E2F1 介导的转录在成肌过程中发挥着重要作用^[63], 但需要 pRB 存在^[64-65]。E2F1 可抑制成肌碱性螺旋环螺旋蛋白 MyoD 和成肌蛋白对基因转录的激活^[66]。MyoD 可反式激活 Kelch 重复和 BTB 结构域含蛋白 5 (Kelch repeat and BTB domain containing protein 5, *Kbtbd5*) 基因的表达, *Kbtbd5* 基因通过与 DP 结构域的相互作用破坏 E2F1-DP1 复合物, 从而抑制 E2F1, 形成负反馈循环机制^[56]。E2F1 的表达失调可诱导抑制肌肉的分化^[67]。正常生理状态下, E2F1 受细胞周期蛋白 F 的抑制, 使肌肉干细胞保持静止^[68]。E2F1 表达失调会诱导静止细胞进入 S 期, 并抑制成肌细胞的分化。E2F1 不仅在肌肉干细胞分化的过程中发挥作用, 还受细胞周期蛋白 4 调控, 上调 CDK4/RB/E2F1, 促进肌肉内细胞增殖标记物表达^[69]。同时 E2F1 和 miR-20a-5p/20b-5p 之间存在一个自动调节反馈回路, 这一自动调节回路可能在成肌细胞增殖和分化过程中发挥重要作用^[70]。E2F1 在人体骨骼肌对有氧运动的适应中起着重要的作用^[71]。在基础条件下, E2F1 会抑制肌肉中调节能量平衡和线粒体功能的关键基因, *E2F1*^{-/-}小鼠具有明显的氧化表型^[72-73]。其他因子与运动的关系还不明朗, 有继续探索的价值。

与 E2F1 同样作为转录激活剂的 E2F3 在肌肉分化过程中也起到一定作用。E2F3 是 miR-432 的直接靶点, lncRNA Gm10561 通过抑制 miR-432 促进 E2F3 表达, 从而加速成肌细胞增殖和分化^[74]。与此相同的是, 在 *E2F3* 敲除小鼠中出现线粒体表达降低、肌肉体积减小、线粒体 ATP 含量降低和肌肉耐力下降的表型^[75], 并发现 E2F3 受 p16^{Ink4a} 调控促进成肌细胞增殖和再生活动^[75]。但是 E2F3a 和 E2F3b 之间的碱基序列差异有限, 现有技术无法构建独立的表达载体, 仅有研究曾使用 E2F3a 和 E2F3b 特异性敲除来探索它们的功能^[47]。由于 E2F3a 在分化的肌肉细胞中显著下调, 因此 E2F3 沉默后肌管形成的阻塞和肌生成素表达的下调至少部分是由 E2F3b 表达降低引起的^[76]。E2F3b 被认为

是肌源性分化和发育中的重要参与者。E2F3b 在 C2C12 细胞肌发生过程中受 miR-17 和 miR-20a 的调节, miR-20a 过表达抑制体内 E2F3b 的表达并延迟肌肉分化^[76]。*E2F3*^{+/-}小鼠的瘦体重及握力降低可能与 E2F3b 在肌发生中的特定功能有关^[41]。这些数据表明, 肌细胞的增殖和分化在 E2F 水平上是协调的, 而这些相反的活动是由不同的 E2F 结构域调控的^[77](图 2)。但目前对 E2F 家族的探索仅局限在各因子的独立作用, E2F 家族的其他成员共同构成的调节反馈机制可能也参与了肌肉生成过程, 具体机制还需深入研究。

3 E2F家族与肌肉骨骼系统疾病

3.1 E2F家族与骨肉瘤

骨肉瘤是骨恶性肿瘤中最多见的一种, 是从间质细胞系发展而来, 肿瘤迅速生长是由于肿瘤经软骨阶段直接或间接形成肿瘤骨样组织和骨组织。多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是肿瘤治疗失败的主要原因之一, 但其机制尚不清楚。RB-E2F 通路的失调改变了骨肉瘤的表观遗传景观和生物学行为^[78]。Rb 表达的减少和蛋白质低磷酸化形式的下降, 会提高 E2F 的转录活性, 促进骨肉瘤细胞增殖^[79]。E2F 介导的细胞增殖增强 lncRNA EPEL 在骨肉瘤中上调并促进骨肉瘤细胞的迁移和侵袭, E2F 可能作为骨肉瘤的有前途的诊断和预后标志物^[80]。

E2F1 对骨肉瘤细胞增殖起到不可或缺的作用, 然而 E2F1 的过表达不仅发挥了生长抑制作用, 还促进了化疗药物诱导的细胞凋亡。E2F1 诱导的细胞凋亡依赖于 DNA 损伤, DNA 损伤会改变 E2F1 的翻译后修饰^[81], 然而 E2F1 的磷酸化和乙酰化主要增强其促凋亡活性^[82]。由此可见, E2F1 过度表达所导致的“致癌”或“抑制”的特性, 主要取决于细胞环境或者说是 DNA 损伤反应网络的完整性。E2F1 高表达时通过促进非染色体结构维护亚基凝聚素 I 复合物亚基 G (non-SMC condensin II complex subunit G, NCAPG) 表达激活 Wnt/ β -catenin 通路促进骨肉瘤细胞增殖^[83]。但是当 S 期激酶相关蛋白 2 (recombinant S-phase kinase associated protein 2, SKP2) 与 Rb1 共缺失时, 高水平的 p27 会隔离细胞周期蛋白 A 并阻止其与 E2F1 启动子结合, 从而使 E2F1 达到其全部活性。这会激活 E2F1 靶基因, 并将 E2F1 从致癌因子转化为促凋亡因子, 抑制骨肉瘤进展^[84]。在骨肉瘤细胞中

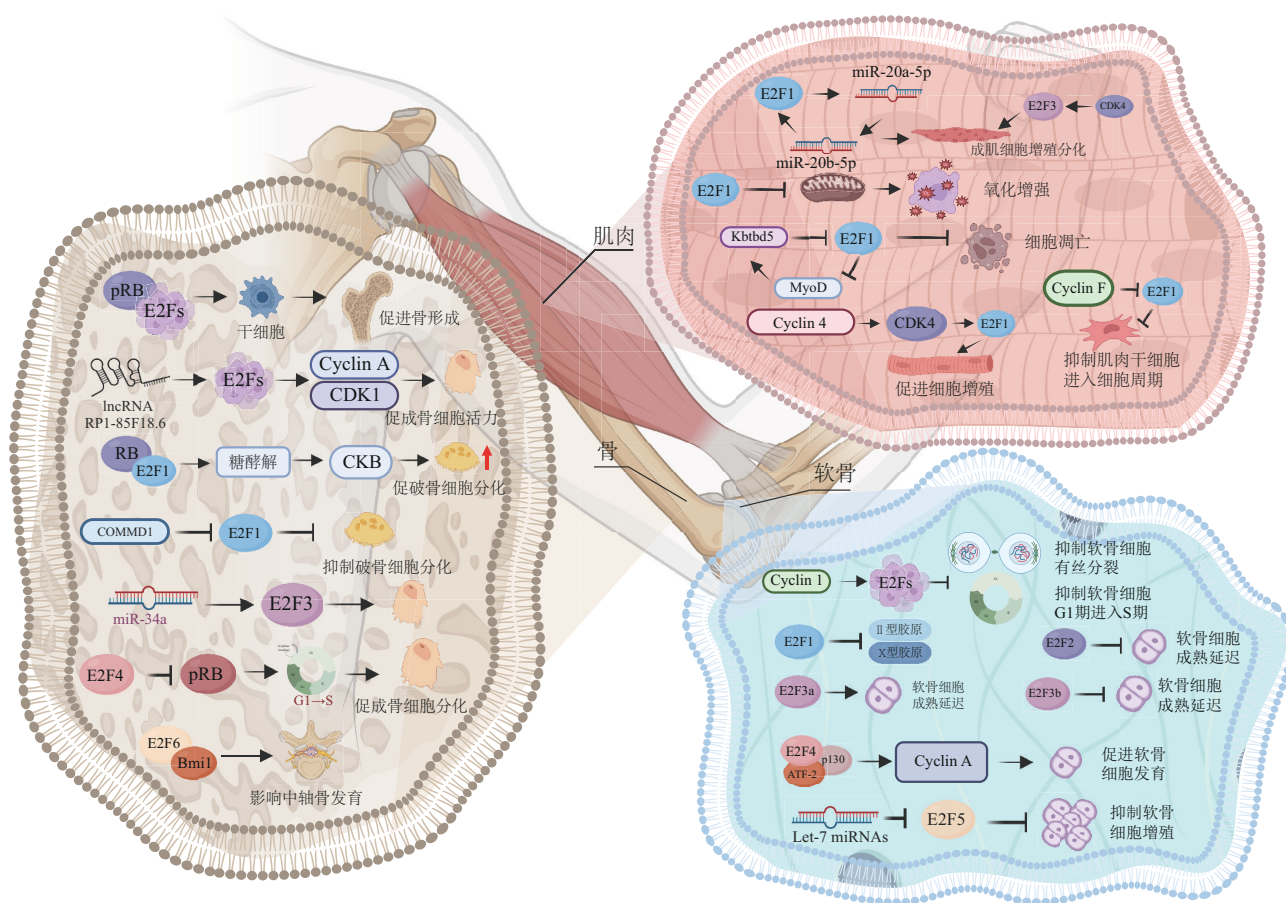


Fig. 2 Physiological mechanisms of action of E2F family transcription factors in the musculoskeletal system (created by biorender.com)

图2 E2F家族各转录因子在肌肉骨骼系统中的生理作用机制 (使用biorender.com绘制)

E2Fs: 转录因子E2F家族 (early 2 factor); RB: 视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma); pRB: 磷酸化视网膜母细胞瘤 (phosphorylation of retinoblastoma); Cyclin: 细胞周期蛋白; CDK: 细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase); COMMD1: 铜代谢结构域蛋白1 (copper metabolism murr1 domain containing 1); Bmi1: B细胞特异性莫洛尼白血病病毒插入位点1 (B-cell-specific moloney leukemia virus insertion site 1); kbtbd5: Kelch重复序列和包含蛋白5的BTB结构域5 (Kelch repeat and BTB domain containing protein 5); MyoD: 成肌分化抗原 (myogenic differentiation antigen); ATF-2: 激活转录因子2 (activating transcription factor 2); p130: 视网膜母细胞瘤样蛋白2。

使用抗生素药物导致E2F1水平降低和线粒体功能障碍, 这表明E2F1水平与骨肉瘤细胞中线粒体的正常功能之间可能存在关联^[85], 可以通过此途径发现可能的药物干预靶点。对Hos细胞系基因表达谱的分析表明, 骨肉瘤细胞系通过E2F1/p73依赖的途径发生凋亡, 而其耐药变体逃避了这一途径。这一结果可以通过p73启动子上不同E2Fs-pRb/p130复合物的存在来解释。即在Hos细胞中, p73转录被E2F1-Rb/p130-p300复合物激活, 从而触发细胞死亡。而在Hos DXR150耐药细胞系中, 转录被E2F4-Rb2/p130-HDAC1复合物抑制, 导致骨肉瘤具有耐药性, 从而无法发生细胞凋亡反应^[86], 这可能是该细胞系逃避化疗药物, 促凋亡

作用的机制。并且, E2F4在SaoS-2骨肉瘤细胞中的表达增加会导致细胞从G1期向S期和G2/M期转变^[87], 这表明E2F-4在骨肉瘤细胞周期进展的调控中也发挥作用, 但具体机制还不明朗。

在骨肉瘤组织和细胞系中, E2F2的表达显著增加, 并且E2F2的上调可促进骨肉瘤细胞增殖^[88]。E2F2是miR-198的直接靶点, miR-198过表达通过下调E2F2在体外调节骨肉瘤细胞的进展^[89-90]。E2F3的作用与E2F2相同, 沉默E2F3可以显著抑制骨肉瘤进展, 而miR-124-3p的靶向衰竭E2F3消除了这种抑制作用^[91]。E2F3受miR-145-5p直接负调控, 过表达miR-145-5p会抑制E2F3的表达, 抑制骨肉瘤细胞增殖和集落形成能

力^[92], 诱导G1相位阻滞并明显减小肿瘤体积^[92]。miR-16-5p与之作用相同, 通过抑制E2F3进而抑制骨肉瘤球体形成^[93]。环状RNA circ_001422抑制miR-497-5p促进骨肉瘤细胞的迁移^[94]。miR-152通过靶向E2F3减少了骨肉瘤的生长和侵袭^[95]。E2F3可能作为诊断骨肉瘤的有用生物标志物及治疗靶点。

E2F5作为多种microRNA的下游指标在骨肉瘤病理进程中发挥作用。*E2F5*被鉴定为miR-513b-5p的下游基因。下调miR-513b-5p/*E2F5*抑制了体内骨肉瘤的肿瘤发生转移^[78]。并且*E2F5*在骨肉瘤中被miR-154-5p直接靶向下调, *E2F5*的表达升高与骨肉瘤患者群的生存率降低有关^[96-97]。miR-34c是骨肉瘤进展过程中的肿瘤抑制因子, 它通过靶向*E2F5*在体外抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭^[96]。miR-20a-5p在骨肉瘤细胞系中表达下调, 而上调miR-20a-5p表达可抑制*E2F5*进而抑制骨肉瘤细胞增殖和侵袭, 并诱导细胞凋亡以上证据提示, *E2F5*可能是骨肉瘤进展和治疗的生物学指标(图3)。

3.2 E2F家族与骨质疏松

骨质疏松症是最常见的代谢性骨骼疾病之一, 其特征是骨量低、骨组织微观结构和骨强度差。*E2F1*主要在破骨细胞的病理性增多方面起作用。破骨细胞的过度生成或破骨细胞活性增加导致病理性骨吸收^[98]。在破骨细胞前体细胞中RANKL以mTOR依赖的方式诱导赖氨酸特异性去甲基化酶1(lysine-specific demethylase 1, LSD1)表达。LSD1促进*E2F1*表达同时减缓常氧状态下缺氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)蛋白的降解, 进而促进破骨细胞生成导致病理性骨吸收^[99]。自噬活性水平的升高有利于破骨细胞的形成和骨吸收功能。*E2F1*过表达导致Beclin 1(Becn1)、B淋巴细胞瘤2基因(B-cell lymphoma-2, BCL2)和微管相关蛋白轻链3II(microtubule-associated protein 1 light chain 3II, LC3II)下调, 在破骨细胞生成过程中下调自噬, 从而发生病理性骨丢失^[100]。这表明*E2F1*抑制剂可能是一种潜在的抗绝经后骨丢失的药物。

最近发现, 骨损伤模型中, *E2F1*与*E2F2*通过不同方式影响成骨细胞活力。*E2F1*敲除后会增加大孔的皮质骨状结构, 但这可能是终末分化的成骨细胞, 这可能表明细胞周期的缺失导致了细胞的更大分化而不是增殖^[101]。并且*E2F1*敲除后的骨修复效果并不理想, 损伤部位的成骨细胞的数量急剧减

少^[101], 可能与血管生成有关。在创伤性骨折模型中, miR-6089表达下降失去对*E2F2*的抑制作用, 显著降低成骨前体细胞活力、增殖、迁移和成骨分化^[102]。*E2F*家族在骨骼修复中的具体作用机制研究还不甚明朗, 这可能是开发骨质疏松症治疗药物的新途径。

骨质疏松症的临床诊断和评估主要基于骨矿物质密度(bone mineral density, BMD)。全基因组关联分析(genome-wide association study, GWASs)已成功发现了许多与骨质疏松症和BMD相关的易感基因位点^[103]。GWAS已在染色体2q14.2位点的转录因子EN1附近确定了骨质疏松症的多个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。调控元件或功能元件内的SNPs可能通过改变转录因子的结合来改变基因的表达, 从而导致患病风险增加。未甲基化的SNP rs188303909可以结合*E2F6*, 增加EN1的表达, 而上调CCDC170和COLEC10的表达, 促进骨形成, 但其激活在甲基化状态下被消除, 提示rs188303909的差异甲基化可能是骨质疏松易感性影响的原因^[104]。

3.3 E2F家族与关节炎

RA是一种以关节表现为主的全身性自身免疫性疾病, 其特征是与滑膜下层和充满滑液的关节间隙相接的滑膜层增生。位于亚内层中的成纤维细胞亚群发生扩增, 参与疾病进程。*E2F1*与RA高度相关。lncRNA OSER1-AS1通过miR-1298-5p/*E2F1*轴调控RA的生物学过程。抑制lncRNA OSER1-AS1可通过上调miR-1298-5p部分诱导*E2F1*的下调。*E2F1*的过表达抑制了RA成纤维细胞样滑膜细胞的增殖和侵袭, 并通过p53信号通路抑制了促炎细胞因子的产生, 这可能为RA提供新的诊断和治疗靶点^[105]。*E2F1*被募集到炎症基因的启动子上之后, 肽基精氨酸脱亚胺酶4(peptidyl arginine deiminase 4, PAD4)瓜氨酸化*E2F1*, 通过PAD4-*E2F1*轴促进炎症基因表达^[106]。在炎症细胞中, *E2F1*的瓜氨酸化有助于其染色质结合, 同时瓜氨酸化增强了溴结构域和外端结构域(bromodomain and extra terminal domain, BET)家族溴结构域蛋白4(bromodomain-containing protein 4, BRD4)与*E2F1*中乙酰化结构域的结合。抑制PAD和BRD4后, 炎症细胞中染色质结合的*E2F1*以及炎症因子表达都会减少, 联合治疗对防止疾病进展具有显著效果^[106]。

E2F2与RA联系最密切,通过基因芯片检测发现E2F2在RA滑膜组织中过表达^[107],多维分析也检测出E2Fs在RA中高表达^[108]。染色质免疫沉淀(chromatin immuno-precipitation, ChIP)序列分析显示,E2F2影响类风湿关节炎滑膜成纤维细胞(rheumatoid arthritis synovial fibroblasts, RASFs)的代谢、应激反应和核糖体合成,从而影响RA的发生和发展^[109]。E2F2的高表达可减少RASf的细胞凋亡,增加其迁移和管状结构能力,并可能通过上调CC趋化因子受体4(C-C chemokine receptor type 4, CCR4)的表达发挥这一作用,最终导致RA滑膜组织的疾病进展^[110]。E2F2的抑制导致白介素(interleukin, IL)-1 α 和IL-1 β 水平降低^[111]这可能与信号转导子和转录激活因子1(signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)的下调有关。CDK4/6抑制剂通过RB依赖性方式抑制E2F2,从而抑制E2F2诱导的STAT1核易位和PI3K/AKT/NF- κ B通路的激活,抑制IL-1和TNF- α 等炎性细胞因子引起的RA滑膜成纤维细胞增生和关节损伤^[112]。E2F诱饵——寡脱氧核苷酸(oigodeoxynucleotide, ODN)能显著抑制滑膜成纤维细胞的增殖,引入ODN还能显著抑制滑膜组织产生IL-1 β 、IL-6和基质金属蛋白酶1(matrix metalloproteinase 1, MMP-1)。转染了ODN的RA滑膜组织共同植入的软骨没有出现侵袭性和进行性软骨降解。转染ODN可通过抑制滑膜细胞增殖防止软骨破坏,并表明转染ODN可为治疗关节炎的关节破坏提供一种有用的治疗方法^[113]。因此,E2F2很可能成为治疗RA的潜在靶点。

E2F1诱导的成对样同源域转录因子1(paired-like homeodomain transcription factor 1, PITX1)下调与关节软骨细胞凋亡增加和骨关节炎(osteoarthritis, OA)恶化有关,是关节软骨退变的重要标志^[114]。根据OA严重程度,转录因子Dp1(transcription factor Dp-1, *TFDP1*)的mRNA水平在原代软骨细胞中存在差异表达。OA的进展首先表现为TFDP1的下调,然后在晚期上调。E2F1-TFDP1复合物调控PITX1在OA进展过程中显示出类似的表达模式^[114]。敲低E2F1的二聚体伴侣TFDP1抑制了E2F1的激活作用,同时降低了PITX1启动子活性^[114]。mRNA转录过表达E2F1、E2F2或E2F3后,PITX1启动子的基础活性水平升高,与同龄对照小鼠相比,*Pitx1*^{-/-}小鼠出现骨增厚和关节软骨钙化,*Pitx1*基因的完全敲除导致膝关

节软骨成分严重减少^[114]。PITX1的抑制是由E2F1共抑制因子(prohibitin 1, PHB1)在OA关节软骨细胞中的异常核聚积引起的^[114]。不过另有研究表明,PHB1招募到PITX1启动子与E2F无关,因为在OA或非OA关节软骨细胞中,PHB1都没有与PITX1启动子的近端E2F元件共定位^[115]。由于PHB1不能直接与DNA结合,因此需要更多的研究来确定E2F1共抑制因子PHB1与PITX1启动子的明确关系。

3.4 E2F家族与肌肉相关疾病症状

肌肉最为常见的疾病为肌营养不良症,一般与基因有关,属于进行性病变,可分为迪谢内肌营养不良症、贝克肌营养不良症、杜氏肌营养不良等几种类型。杜氏肌营养不良症(duchenne muscular dystrophy, DMD)中,E2F1抑制营养不良的肌肉转向缓慢的、氧化的生肌程序^[116]。*E2F1*^{-/-}小鼠表现出增强的肌肉性能,DMD生理病理体征的显著减少,包括肌肉结构的保留、炎症谱降低、人肌营养相关蛋白(utrophin)表达增加,导致更好的耐力和肌肉收缩参数,与正常小鼠相同^[117]。DBA/2J-mdx小鼠(最理想的DMD模型)遗传背景中的E2F1敲除增加了氧化代谢基因程序、线粒体活性并改善了肌肉功能^[117]。同时,临床实验发现,DMD患者的骨骼肌E2F1蛋白水平的显著增加,并导致糖酵解纤维型表达肌球蛋白重链II-b(myosin heavy chain II-b, MyHCII-b)的增加和氧化纤维型表达肌球蛋白重链I(myosin heavy chain I, MyHC-I)的减少^[117],这表明E2F1可能代表了治疗DMD的一个有希望的靶点。

Emery-Dreifuss肌营养不良(Emery-Dreifuss muscular dystrophy, EDMD)是由X连锁基因emerin(*EMD*)或常染色体层黏连蛋白A/C(lamin A/C, *LMNA*)基因突变引起的。在EMD缺乏小鼠中,E2F2/Rb复合物在肌肉核组织中起作用^[118]。Rb对E2F的异常调节与肌肉相关的病理现象有关^[119],大多数E2F下游靶基因被不恰当地抑制^[119]。LMNA突变体被证明会以依赖Rb的方式损害体外肌肉分化^[118],并且在LMNA突变体内发现E2F2的特异性富集^[118],但这仅可以说明E2F2在肌肉稳态中的独特性作用,具体机制还需深入探讨。强直性肌营养不良(myotonic dystrophy, DM)患者的骨骼肌分化受到影响。对DM患者培养的成肌细胞的分析表明,DM成肌细胞在分化过程中失去了从细胞周期中撤出的能力。DM细胞不

会形成Rb/E2F阻遏蛋白复合物,然而E2F-Rb复合物对细胞周期退出十分重要^[120],DM细胞能够重新进入细胞周期,至少部分是由于细胞周期停滞的CUG三聚体重复RNA结合蛋白1(CUG triplet repeat, RNA binding protein 1, CUGBP1)-p21-cdk4-Rb-E2F通路紊乱。此外,在预分化DM细胞中检测到E2F-p107复合物,E2F-p107复合体的形

成主要发生在S期^[120]。

骨骼肌损伤后的再生主要受到E2F1的调控。骨骼肌的再生依赖于—群静止的干细胞(卫星细胞),这种细胞在患有肌少症的高龄(老年)个体中受损。在老年卫星细胞中表现出RB磷酸化形式减少并伴随着Rb/E2F靶基因的表达降低,进而影响细胞周期进展^[121]。重要的是,当将老年卫星细

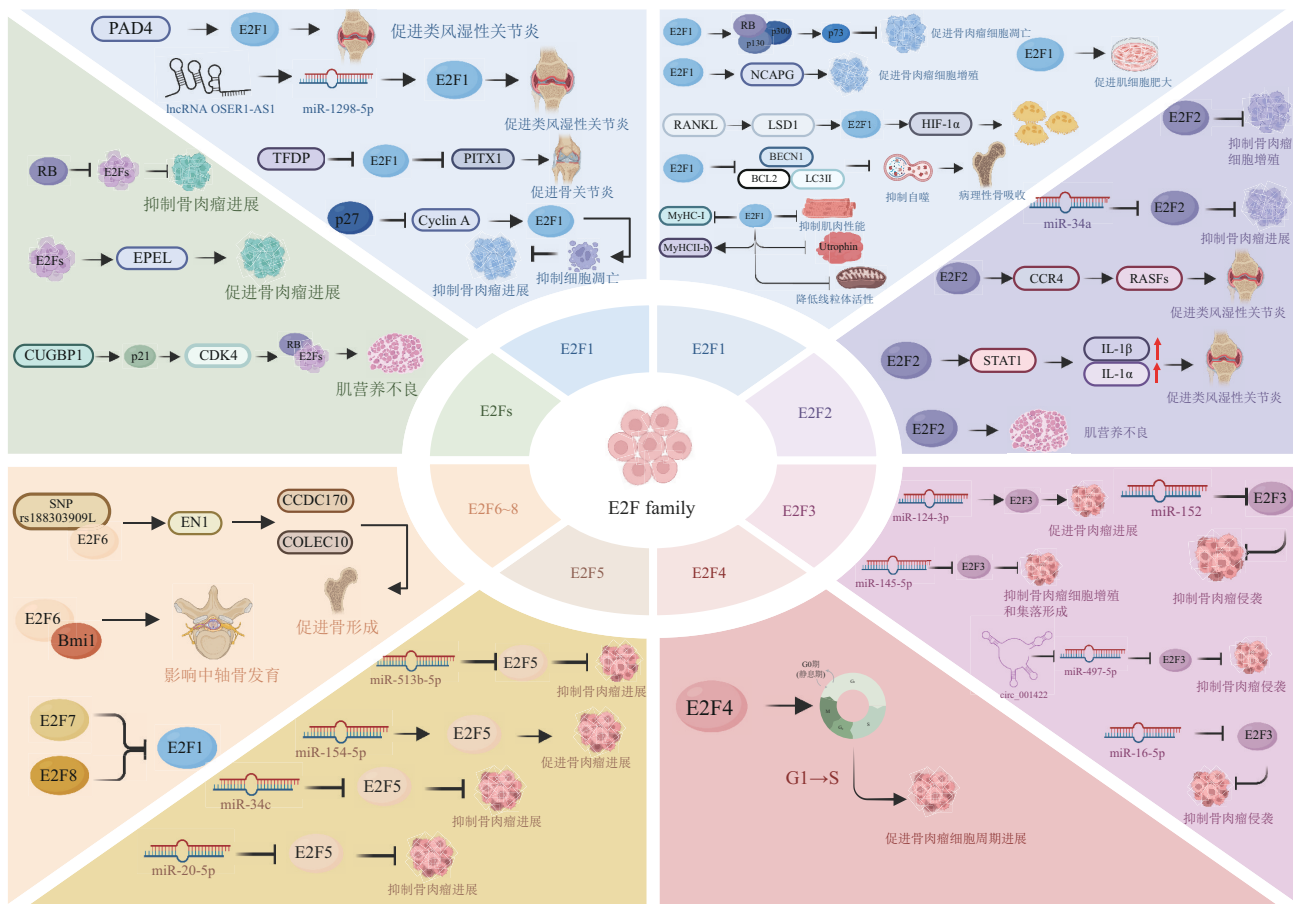


Fig. 3 The mechanism of action of each transcription factor of the E2F family in diseases related to the musculoskeletal system (created using biorender.com)

图3 E2F家族各转录因子在肌肉骨骼系统相关疾病中的作用机制(使用biorender.com绘制)

E2Fs: 转录因子E2F家族(early 2 factor); RB: 视网膜母细胞瘤(retinoblastoma); p130: 视网膜母细胞瘤样蛋白2; p300: 组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase p300); p73: p53蛋白的同源蛋白; p21: 细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子1A(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A); NACPG: 非染色体结构维护亚基凝集素II复合物亚基G(non-SMC condensin II complex subunit G); LSD1: 赖氨酸特异性去甲基化酶(lysine-specific demethylase 1); HIF-1 α : 缺氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor-1 α); BECN1: 芽孢素1(Beclin 1); BCL2: B淋巴细胞瘤2基因(B-cell lymphoma-2); LC3II: 微管相关蛋白轻链3II(microtubule-associated protein 1 light chain 3II); MYHC-1: 肌球蛋白重链(myosin heavy chain); utrophin: 肌营养不良蛋白; CCR4: CC趋化因子受体4(C-C chemokine receptor type 4); RASFs: 类风湿性关节炎滑膜成纤维细胞(rheumatoid arthritis synovial fibroblasts); STAT1: 信号转导子和转录激活因子1(signal transducer and activator of transcription 1); IL-1 β : 白介素-1 β (interleukin-1 β); IL-1 α : 白介素-1 α (Interleukin-1 α); Bmi1: B细胞特异性莫洛尼白血病病毒插入位点1(B-cell-specific moloney leukemia virus insertion site 1); EN1: 同源盒蛋白转录因子1(Engrailed-1); CCDC170: 卷曲螺旋结构域蛋白170(coiled-coil domain-containing protein 170); COLEC10: 集蛋白亚家族成员10(collectin subfamily member 10); CDK4: 细胞周期蛋白依赖性激酶4(cyclin-dependent kinase 4); CUGBP1: CUG三聚体重复RNA结合蛋白1(CUG triplet repeat, RNA binding protein 1); EPEL: E2F介导的细胞增殖增强长链非编码RNA; PAD4: 肽基精氨酸脱亚胺酶4(peptidyl arginine deiminase 4); TFDPI: 转录因子Dp1(recombinant transcription factor Dp1); PITX1: 成对同源异型结构域蛋白转录因子(paired-like homeodomain transcription factor 1); Cyclin A: 细胞周期素A; p27: 周期蛋白依赖性激酶抑制因子1B(cyclin-dependent kinase inhibitor 1B)。

胞移植到损伤的幼年肌肉中时, 这种 Rb/E2F 轴的激活不能被逆转^[121]。最近有报道称 E2F1 在骨骼肌再生过程中发挥作用^[122]。虽然骨骼肌损伤时会诱导 E2F1 和 E2F2 的表达, 但 E2F1 缺失小鼠的再生能力会受到严重影响, 而 E2F2 缺失小鼠的再生能力则不会受到影响^[123]。然而, E2F1 调控肌肉的具体机制尚未得到阐明。

4 总结与展望

本文讨论了 E2F 家族在肌肉骨骼系统发育过程中的作用, 以及 E2F 家族对肌肉骨骼系统相关疾病的影响、治疗作用以及可能的治疗靶点。E2F 家族凭借自己内部不同成员调节细胞周期的重要能力, 在不同的生理过程中都能占有一席之地, 但也正由于其功能庞大, 使其不得不作为“双刃剑”游走于不同疾病之中。因此, 在后续研究中探索出每个 E2F 成员细致的、严谨的、完整的作用, 将会更深刻和全面地了解 E2F 家族。

在骨骼系统中 E2Fs 主要通过影响干细胞分化, 调控成骨细胞和破骨细胞生成的途径, 影响骨骼生成。E2Fs 在软骨细胞中功能较为复杂。E2F1~3 的异常调节会导致软骨细胞凋亡、二型胶原表达下降、生长板异常等负面作用, 而 E2F4,5 会促进软骨细胞增殖。在肌细胞中起到主要作用的是 E2F1 和 E2F3b, E2F1 显著抑制成肌细胞分化、影响肌生成, 而 E2F3b 则抑制肌管阻塞, 促进肌生成素表达、提高肌肉力量与质量。E2Fs 在肌肉骨骼系统疾病中的作用研究还不够深入。在骨肉瘤组织与细胞内, E2Fs 不仅可以通过与 RB 结合在细胞周期中起作用, 还可以作为 miRNA 下游靶点起到抑制或促进骨肉瘤的作用。在骨质疏松症中, 主要研究方向为 E2F1,2 影响成骨细胞和破骨细胞相关的骨代谢及骨折后修复方面, 将这些研究转化为骨质疏松症实际应用的进展较少, 多为 E2F 家族在骨修复中的作用效果, 这可能是 E2F 家族在骨质疏松症方面的可行探索方向。在 OA 和 RA 中, 仅有 E2F1 和 E2F2 促进促炎因子生成, 其他因子还没有明确的研究。目前没有明确的 E2F 家族与肌肉疾病相关的报道, 仅了解 E2F1 和 E2F2 能导致相关肌肉症状, 无法从根本上调控肌肉相关疾病病理过程。

目前, 关于 E2F 家族与肌肉骨骼系统及相关疾病的关系还有几点内容需要深入探索。首先, E2F 家族有 8 个因子, 但是目前在肌肉骨骼系统中研究较多的是 E2F1~3, 而 E2F4~8 相关研究寥寥无几,

应该继续探索其他因子在肌肉骨骼系统中的作用。其次, 有研究证明, 非典型 E2F (E2F7,8) 可以有效抑制 E2F1 表达, 那么 E2F 家族之间的相互作用也可以作为以后的探索方向之一。最后, 肌肉骨骼系统疾病不仅有上文中提到的骨肉瘤、关节炎等疾病, E2F 家族在骨质疏松症、强直性脊柱炎、肌少症、肌肉萎缩等疾病中的作用还需要更多研究来填补空白, 并且 E2F 家族在肌肉骨骼系统和相关疾病中的具体作用机制也需要进一步明确。

参 考 文 献

- [1] Yi Z, Wu Y, Zhang Q, *et al.* E2F1-deficient adipose-derived stem cells improve wound closure in mice by up-regulating expression of VEGF and TGF- β 1. *Plast Reconstr Surg*, 2023, **152**(1): 98-107
- [2] Huang J, Zhao Y. E2F transcription factor 1 activates FKBP prolyl isomerase 4 to promote angiogenesis in cervical squamous cell carcinoma *via* the PI3K/AKT signaling pathway. *Reprod Sci*, 2023, **30**(4): 1229-1240
- [3] Niu Y, Li H, Han W, *et al.* Relationship between changes in the expression levels of miR-134 and E2F6 in mediating control of apoptosis in NMDA-induced glaucomatous mice. *J Invest Surg*, 2024, **37**(1): 2389379
- [4] Tran N T, Graf R, Acevedo-Ochoa E, *et al.* *In vivo* CRISPR/Cas9-mediated screen reveals a critical function of TFDPI and E2F4 transcription factors in hematopoiesis. *Leukemia*, 2024, **38**(9): 2003-2015
- [5] Wu H, Zheng B. MiR-195-5p inhibits cisplatin resistance in lung adenocarcinoma by regulating DNA damage *via* targeting E2F7. *J Biochem Mol Toxicol*, 2024, **38**(11): e70015
- [6] Ren B, Cam H, Takahashi Y, *et al.* E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev*, 2002, **16**(2): 245-256
- [7] Raimann A, Dangl A, Javanmardi A, *et al.* Elevation of phosphate levels impairs skeletal myoblast differentiation. *Cell Tissue Res*, 2020, **382**(2): 427-432
- [8] Ma B, Gu C, Lu R, *et al.* Inhibition of KPNA2 by ivermectin reduces E2F1 nuclear translocation to attenuate keratinocyte proliferation and ameliorate psoriasis-like lesions. *Int Immunopharmacol*, 2024, **143**(Pt 1): 113360.
- [9] Strom D K, Cleveland J L, Chellappan S, *et al.* E2F-1 and E2F-3 are functionally distinct in their ability to promote myeloid cell cycle progression and block granulocyte differentiation. *Cell Growth Differ*, 1998, **9**(1): 59-69
- [10] Guy C T, Zhou W, Kaufman S, *et al.* E2F-1 blocks terminal differentiation and causes proliferation in transgenic megakaryocytes. *Mol Cell Biol*, 1996, **16**(2): 685-693
- [11] Amanullah A, Hoffman B, Liebermann D A. Deregulated E2F-1 blocks terminal differentiation and loss of leukemogenicity of M1 myeloblastic leukemia cells without abrogating induction of p15 (INK4B) and p16 (INK4A). *Blood*, 2000, **96**(2): 475-482

- [12] Lluch A, Latorre J, Serena-Maione A, *et al.* Impaired Plakophilin-2 in obesity breaks cell cycle dynamics to breed adipocyte senescence. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 5106
- [13] Chang C H, Liu F, Militi S, *et al.* The pRb/RBL2-E2F1/4-GCN5 axis regulates cancer stem cell formation and G0 phase entry/exit by paracrine mechanisms. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 3580
- [14] Goto H, Kariya R, Kudo E, *et al.* PAX5 functions as a tumor suppressor by RB-E2F-mediated cell cycle arrest in Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma. *Neoplasia*, 2024, **56**: 101035
- [15] Shen H M, Zhang D, Xiao P, *et al.* E2F1-mediated KDM4A-AS1 up-regulation promotes EMT of hepatocellular carcinoma cells by recruiting ILF3 to stabilize AURKA mRNA. *Cancer Gene Ther*, 2023, **30**(7): 1007-1017
- [16] Shao Z, Li C, Wu Q, *et al.* ZNF655 accelerates progression of pancreatic cancer by promoting the binding of E2F1 and CDK1. *Oncogenesis*, 2022, **11**(1): 44
- [17] Kim S, Armand J, Safonov A, *et al.* Sequential activation of E2F via Rb degradation and c-Myc drives resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer. *Cell Rep*, 2023, **42**(11): 113198
- [18] Leone G, Nuckolls F, Ishida S, *et al.* Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**(10): 3626-3632
- [19] Di Stefano L, Jensen M R, Helin K. E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J*, 2003, **22**(23): 6289-6298
- [20] Zheng N, Fraenkel E, Pabo C O, *et al.* Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP. *Genes Dev*, 1999, **13**(6): 666-674
- [21] Konagaya Y, Rosenthal D, Ratnayake N, *et al.* An intermediate Rb-E2F activity state safeguards proliferation commitment. *Nature*, 2024, **631**(8020): 424-431
- [22] Chang Y C, Nakajima H, Illenye S, *et al.* Caspase-dependent apoptosis by ectopic expression of E2F-4. *Oncogene*, 2000, **19**(41): 4713-4720
- [23] Hsieh J K, Yap D, O'Connor D J, *et al.* Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**(1): 78-93
- [24] Verona R, Moberg K, Estes S, *et al.* E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol Cell Biol*, 1997, **17**(12): 7268-7282
- [25] Gaubatz S, Lees J A, Lindeman G J, *et al.* E2F4 is exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(4): 1384-1392
- [26] Logan N, Graham A, Zhao X, *et al.* E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene*, 2005, **24**(31): 5000-5004
- [27] Lv Y, Xiao J, Liu J, *et al.* E2F8 is a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *J Cancer*, 2017, **8**(7): 1205-1213
- [28] Lees J A, Saito M, Vidal M, *et al.* The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol Cell Biol*, 1993, **13**(12): 7813-7825
- [29] Arora M, Moser J, Hoffman T E, *et al.* Rapid adaptation to CDK2 inhibition exposes intrinsic cell-cycle plasticity. *Cell*, 2023, **186**(12): 2628-2643.e21
- [30] Schwemmle S, Pfeifer G P. Genomic structure and mutation screening of the E2F4 gene in human tumors. *Int J Cancer*, 2000, **86**(5): 672-677
- [31] Gaubatz S, Lindeman G J, Ishida S, *et al.* E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol Cell*, 2000, **6**(3): 729-735
- [32] Trimarchi J M, Fairchild B, Wen J, *et al.* The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(4): 1519-1524
- [33] Moon N S, Dyson N. E2F7 and E2F8 keep the E2F family in balance. *Dev Cell*, 2008, **14**(1): 1-3
- [34] Lammens T, Li J, Leone G, *et al.* Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. *Trends Cell Biol*, 2009, **19**(3): 111-118
- [35] Popov B, Petrov N. pRb-E2F signaling in life of mesenchymal stem cells: cell cycle, cell fate, and cell differentiation. *Genes Dis*, 2014, **1**(2): 174-187
- [36] Chen L, Holmström K, Qiu W, *et al.* MicroRNA-34a inhibits osteoblast differentiation and *in vivo* bone formation of human stromal stem cells. *Stem Cells*, 2014, **32**(4): 902-912
- [37] Gronthos S, Chen S, Wang C Y, *et al.* Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of CBFA1, osterix, and osteocalcin. *J Bone Miner Res*, 2003, **18**(4): 716-722
- [38] Miller E S, Berman S D, Yuan T L, *et al.* Disruption of calvarial ossification in E2f4 mutant embryos correlates with increased proliferation and progenitor cell populations. *Cell Cycle*, 2010, **9**(13): 2620-2628
- [39] Murata K, Fang C, Terao C, *et al.* Hypoxia-sensitive COMMD1 integrates signaling and cellular metabolism in human macrophages and suppresses osteoclastogenesis. *Immunity*, 2017, **47**(1): 66-79.e5
- [40] Song J, Song W, Zhang L. LncRNA RP1-85F18.6 affects osteoblast cells by regulating the cell cycle. *Open Life Sci*, 2020, **15**(1): 951-958
- [41] Kim H R, Rahman F U, Kim K S, *et al.* Critical roles of E2F3 in growth and musculo-skeletal phenotype in mice. *Int J Med Sci*, 2019, **16**(12): 1557-1563
- [42] Hu L, Yin C, Chen D, *et al.* MACF1 promotes osteoblast differentiation by sequestering repressors in cytoplasm. *Cell Death Differ*, 2021, **28**(7): 2160-2178
- [43] Courel M, Friesenhahn L, Lees J A. E2f6 and Bmi1 cooperate in axial skeletal development. *Dev Dyn*, 2008, **237**(5): 1232-1242
- [44] Storre J, Elsässer H P, Fuchs M, *et al.* Homeotic transformations of the axial skeleton that accompany a targeted deletion of E2f6. *EMBO Rep*, 2002, **3**(7): 695-700
- [45] Beier F, Ali Z, Mok D, *et al.* TGFbeta and PTHrP control chondrocyte proliferation by activating cyclin D1 expression. *Mol*

- Biol Cell, 2001, **12**(12): 3852-3863
- [46] Ito K, Maruyama Z, Sakai A, *et al.* Overexpression of Cdk6 and Ccnd1 in chondrocytes inhibited chondrocyte maturation and caused p53-dependent apoptosis without enhancing proliferation. *Oncogene*, 2014, **33**(14): 1862-1871
- [47] Danielian P S, Friesenhahn L B, Faust A M, *et al.* E2f3a and E2f3b make overlapping but different contributions to total E2f3 activity. *Oncogene*, 2008, **27**(51): 6561-6570
- [48] Tsai S Y, Opavsky R, Sharma N, *et al.* Mouse development with a single E2F activator. *Nature*, 2008, **454**(7208): 1137-1141
- [49] Dagnino L, Fry C J, Bartley S M, *et al.* Expression patterns of the E2F family of transcription factors during mouse nervous system development. *Mech Dev*, 1997, **66**(1/2): 13-25
- [50] Jiang Z, Derrick-Roberts A L K, Reichstein C, *et al.* Cell cycle progression is disrupted in murine MPS VII growth plate leading to reduced chondrocyte proliferation and transition to hypertrophy. *Bone*, 2020, **132**: 115195
- [51] Yanagino T, Yuasa K, Nagahama M, *et al.* Transcriptional regulation of fibrillin-2 gene by E2F family members in chondrocyte differentiation. *J Cell Biochem*, 2009, **106**(4): 580-588
- [52] Scheijen B, Bronk M, van der Meer T, *et al.* Constitutive E2F1 overexpression delays endochondral bone formation by inhibiting chondrocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(10): 3656-3668
- [53] Kolupaeva V, Basilico C. Overexpression of cyclin E/CDK2 complexes overcomes FGF-induced cell cycle arrest in the presence of hypophosphorylated Rb proteins. *Cell Cycle*, 2012, **11**(13): 2557-2566
- [54] Papaioannou G, Inloes J B, Nakamura Y, *et al.* Let-7 and miR-140 microRNAs coordinately regulate skeletal development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(35): E3291-E3300
- [55] Guasconi V, Pritchard L L, Fritsch L, *et al.* Preferential association of irreversibly silenced E2F-target genes with pericentromeric heterochromatin in differentiated muscle cells. *Epigenetics*, 2010, **5**(8): 704-709
- [56] Gong W, Gohla R M, Bowlin K M, *et al.* Kelch repeat and BTB domain containing protein 5 (Kbtbd5) regulates skeletal muscle myogenesis through the E2F1-DP1 complex. *J Biol Chem*, 2015, **290**(24): 15350-15361
- [57] 范源, 甘麦邻, 罗嘉, 等. 干扰E2F7对C2C12成肌细胞增殖的影响. 云南农业大学学报: 自然科学, 2019, **34**(3): 408-413
Fan Y, Gan M L, Luo Jia, *et al.* *J Yunnan Agric Univ Nat Sci*, 2019, **34**(3): 408-413
- [58] Shin E K, Shin A, Paulding C, *et al.* Multiple change in E2F function and regulation occur upon muscle differentiation. *Mol Cell Biol*, 1995, **15**(4): 2252-2262
- [59] Corbeil H B, Whyte P, Branton P E. Characterization of transcription factor E2F complexes during muscle and neuronal differentiation. *Oncogene*, 1995, **11**(5): 909-920
- [60] Gill R M, Hamel P A. Subcellular compartmentalization of E2F family members is required for maintenance of the postmitotic state in terminally differentiated muscle. *J Cell Biol*, 2000, **148**(6): 1187-1201
- [61] Tiainen M, Pajalunga D, Ferrantelli F, *et al.* Terminally differentiated skeletal myotubes are not confined to G0 but can enter G1 upon growth factor stimulation. *Cell Growth Differ*, 1996, **7**(8): 1039-1050
- [62] Zappia M P, Frolov M V. E2F function in muscle growth is necessary and sufficient for viability in *Drosophila*. *Nat Commun*, 2016, **7**: 10509
- [63] Nalbandian M, Zhao M, Kato H, *et al.* Single-cell RNA-seq reveals heterogeneity in hiPSC-derived muscle progenitors and E2F family as a key regulator of proliferation. *Life Sci Alliance*, 2022, **5**(8): e202101312
- [64] Zappia M P, Rogers A, Islam A B M M K, *et al.* Rbf activates the myogenic transcriptional program to promote skeletal muscle differentiation. *Cell Rep*, 2019, **26**(3): 702-719.e6
- [65] Hlaing M, Shen X, Dazin P, *et al.* The hypertrophic response in C2C12 myoblasts recruits the G1 cell cycle machinery. *J Biol Chem*, 2002, **277**(26): 23794-23799
- [66] Wang J, Huang Q, Tang W, *et al.* E2F1 inhibition of transcription activation by myogenic basic helix-loop-helix regulators. *J Cell Biochem*, 1996, **62**(3): 405-410
- [67] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297
- [68] Salvi J S, Kang J, Kim S, *et al.* ATR activity controls stem cell quiescence via the cyclin F-SCF complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, **119**(18): e2115638119
- [69] Hsu T H, Wu T J, Tai Y A, *et al.* The combination of quercetin and leucine synergistically improves grip strength by attenuating muscle atrophy by multiple mechanisms in mice exposed to cisplatin. *PLoS One*, 2023, **18**(9): e0291462
- [70] Luo W, Li G, Yi Z, *et al.* E2F1-miR-20a-5p/20b-5p auto-regulatory feedback loop involved in myoblast proliferation and differentiation. *Sci Rep*, 2016, **6**: 27904
- [71] Popov D V, Makhnovskii P A, Shagimardanova E I, *et al.* Contractile activity-specific transcriptome response to acute endurance exercise and training in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2019, **316**(4): E605-E614
- [72] Blanchet E, Annicotte J S, Lagarrigue S, *et al.* E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat Cell Biol*, 2011, **13**(9): 1146-1152
- [73] Wang J, Helin K, Jin P, *et al.* Inhibition of *in vitro* myogenic differentiation by cellular transcription factor E2F1. *Cell Growth Differ*, 1995, **6**(10): 1299-1306
- [74] Wang S, Tan B, Xiao L, *et al.* Long non-coding RNA Gm10561 promotes myogenesis by sponging miR-432. *Epigenetics*, 2022, **17**(13): 2039-2055
- [75] Bahn Y J, Yadav H, Piaggi P, *et al.* CDK4-E2F3 signals enhance oxidative skeletal muscle fiber numbers and function to affect myogenesis and metabolism. *J Clin Invest*, 2023, **133**(13): e162479
- [76] Tang Z, Liu N, Luo L, *et al.* MicroRNA-17-92 regulates the

- transcription factor E2F3b during myogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Int J Mol Sci*, 2017, **18**(4): 727
- [77] Guo K, Walsh K. Inhibition of myogenesis by multiple cyclin-Cdk complexes. Coordinate regulation of myogenesis and cell cycle activity at the level of E2F. *J Biol Chem*, 1997, **272**(2): 791-797
- [78] Scott M C, Sarver A L, Tomiyasu H, *et al*. Aberrant retinoblastoma (RB)-E2F transcriptional regulation defines molecular phenotypes of osteosarcoma. *J Biol Chem*, 2015, **290**(47): 28070-28083
- [79] Tang H, Ji F, Sun J, *et al*. RBEL1 is required for osteosarcoma cell proliferation *via* inhibiting retinoblastoma 1. *Mol Med Rep*, 2016, **13**(2): 1275-1280
- [80] Chen S, Liu Z, Lu S, *et al*. EPEL promotes the migration and invasion of osteosarcoma cells by upregulating ROCK1. *Oncol Lett*, 2019, **17**(3): 3133-3140
- [81] Stevens C, Smith L, La Thangue N B. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*, 2003, **5**(5): 401-409
- [82] Galbiati L, Mendoza-Maldonado R, Gutierrez M I, *et al*. Regulation of E2F-1 after DNA damage by p300-mediated acetylation and ubiquitination. *Cell Cycle*, 2005, **4**(7): 930-939
- [83] Luo G, Cheng H, Fan J, *et al*. Up-regulation of NCAPG mediated by E2F1 facilitates the progression of osteosarcoma through the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Transl Cancer Res*, 2024, **13**(5): 2437-2450
- [84] Wang J, Ferrena A, Zhang R, *et al*. Targeted inhibition of SCF (SKP2) confers anti-tumor activities resulting in a survival benefit in osteosarcoma. *Oncogene*, 2024, **43**(13): 962-975
- [85] Cao C, Yu H, Wu F, *et al*. Antibiotic anisomycin induces cell cycle arrest and apoptosis through inhibiting mitochondrial biogenesis in osteosarcoma. *J Bioenerg Biomembr*, 2017, **49**(6): 437-443
- [86] La Sala D, Macaluso M, Trimarchi C, *et al*. Triggering of p73-dependent apoptosis in osteosarcoma is under the control of E2Fs-pRb/p130 complexes. *Oncogene*, 2003, **22**(23): 3518-3529
- [87] Walsh M J, Shue G, Spidoni K, *et al*. E2F-1 and a cyclin-like DNA repair enzyme, uracil-DNA glycosylase, provide evidence for an autoregulatory mechanism for transcription. *J Biol Chem*, 1995, **270**(10): 5289-5298
- [88] Tao T, Shen Q, Luo J, *et al*. MicroRNA-125a regulates cell proliferation *via* directly targeting E2F2 in osteosarcoma. *Cell Physiol Biochem*, 2017, **43**(2): 768-774
- [89] Liu J, Zhao J, Feng G, *et al*. Silencing of circ-CDK14 suppresses osteosarcoma progression through the miR-198/E2F2 axis. *Exp Cell Res*, 2022, **414**(1): 113082
- [90] Iwasaki T, Tanaka K, Kawano M, *et al*. Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation *via* targeting of E2F2 in osteosarcoma cells. *Int J Oncol*, 2015, **46**(4): 1543-1550
- [91] Wang L, Wang L, Zhang X. Knockdown of lncRNA HOXA-AS2 inhibits viability, migration and invasion of osteosarcoma cells by miR-124-3p/E2F3. *Onco Targets Ther*, 2019, **12**: 10851-10861
- [92] Li H, Pan R, Lu Q, *et al*. MicroRNA-145-5p inhibits osteosarcoma cell proliferation by targeting E2F transcription factor 3. *Int J Mol Med*, 2020, **45**(5): 1317-1326
- [93] Li Y, Wu Z, Shen J. Downregulation of hsa_circ_0000885 suppressed osteosarcoma metastasis and progression *via* regulating E2F3 expression and sponging miR-16-5p. *Regen Ther*, 2022, **21**: 114-121
- [94] Li X, Zhao X, Li J, *et al*. Circ_001422 aggravates osteosarcoma progression through targeting miR-497-5p/E2F3 axis. *J Biochem Mol Toxicol*, 2023, **37**(8): e23392
- [95] Ma C, Han J, Dong D, *et al*. MicroRNA-152 suppresses human osteosarcoma cell proliferation and invasion by targeting E2F transcription factor 3. *Oncol Res*, 2018, **26**(5): 765-773
- [96] Bae Y, Zeng H C, Chen Y T, *et al*. miRNA-34c suppresses osteosarcoma progression *in vivo* by targeting Notch and E2F. *JBM R Plus*, 2022, **6**(5): e10623
- [97] 李彦华, 田青, 韩奇财. 微小RNA-154-5p通过靶向作用于E2F5对骨肉瘤细胞生物活性的影响及其机制. *肿瘤基础与临床*, 2024, **37**(2): 131-134
- Li Y H, Tian Q, Han Q C. J Basic Clin Oncol, 2024, **37**(2): 131-134
- [98] Pan C, Wang K, Hong R, *et al*. Chronic microcystin-leucine-arginine exposure induces osteoporosis by breaking the balance of osteoblasts and osteoclasts. *Environ Res*, 2024, **263**(Pt 2): 120098.
- [99] Doi K, Murata K, Ito S, *et al*. Role of lysine-specific demethylase 1 in metabolically integrating osteoclast differentiation and inflammatory bone resorption through hypoxia-inducible factor 1 α and E2F1. *Arthritis Rheumatol*, 2022, **74**(6): 948-960
- [100] Xie X, Hu L, Mi B, *et al*. Metformin alleviates bone loss in ovariectomized mice through inhibition of autophagy of osteoclast precursors mediated by E2F1. *Cell Commun Signal*, 2022, **20**(1): 165
- [101] Premnath P, Lun T, Siddiqui H, *et al*. Absence of E2f1 negates pro-osteogenic impacts of p21 absence. *Calcif Tissue Int*, 2024, **114**(6): 625-637
- [102] Dong R, Liu M Y, Zhu G B, *et al*. Modulation of the microRNA-6089/E2F transcription factor2 axis by quercetin: implications for osteoblast viability, proliferation, migration, and osteogenic differentiation in fracture healing. *J Physiol Pharmacol*, 2024, **75**(2): 173-183
- [103] He D, Liu H, Wei W, *et al*. A longitudinal genome-wide association study of bone mineral density mean and variability in the UK Biobank. *Osteoporos Int*, 2023, **34**(11): 1907-1916
- [104] Wang Y, Huang X, Zhang Q, *et al*. The osteoporosis susceptibility SNP rs188303909 at 2q14.2 regulates EN1 expression by modulating DNA methylation and E2F6 binding. *J Mol Med (Berl)*, 2024, **102**(2): 273-284
- [105] Fu Q, Song M J, Fang J. LncRNA OSER1-AS1 regulates the inflammation and apoptosis of rheumatoid arthritis fibroblast like synoviocytes *via* regulating miR-1298-5p/E2F1 axis. *Bioengineered*, 2022, **13**(3): 4951-4963
- [106] Ghari F, Quirke A M, Munro S, *et al*. Citrullination-acetylation interplay guides E2F-1 activity during the inflammatory response. *Sci Adv*, 2016, **2**(2): e1501257
- [107] Zhang R, Wang L, Pan J H, *et al*. A critical role of E2F transcription factor 2 in proinflammatory cytokines-dependent proliferation and

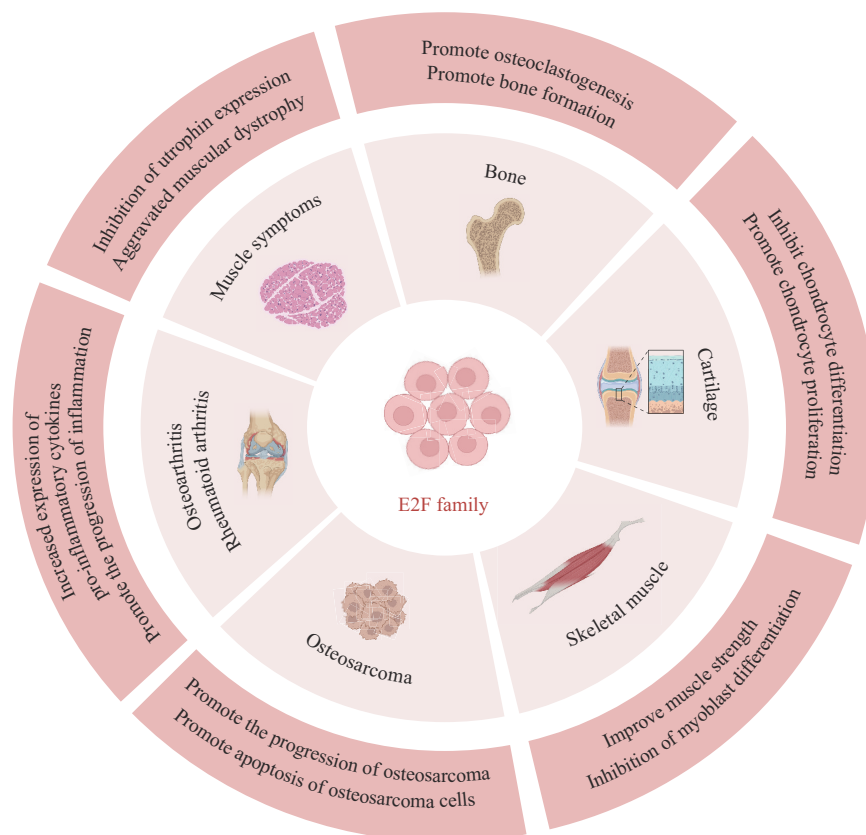
- invasiveness of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 2623
- [108] Takeshita M, Suzuki K, Kondo Y, *et al.* Multi-dimensional analysis identified rheumatoid arthritis-driving pathway in human T cell. *Ann Rheum Dis*, 2019, **78**(10): 1346-1356
- [109] Li L, Zhang Y, Wang L, *et al.* ChIP-sequencing analysis of E2F transcription factor 2 reveals its role in various biological processes of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Biosci Trends*, 2021, **15**(2): 132-134
- [110] Xu W, Li S, Chang X. E2F2 stimulates CCR4 expression and activates synovial fibroblast-like cells in rheumatoid arthritis. *Cent Eur J Immunol*, 2021, **46**(1): 27-37
- [111] Chang X, Yue L, Liu W, *et al.* CD38 and E2F transcription factor 2 have uniquely increased expression in rheumatoid arthritis synovial tissues. *Clin Exp Immunol*, 2014, **176**(2): 222-231
- [112] Skafida E, Andrikopoulou A, Terpos E, *et al.* Impact of CDK4/6 inhibitors on aromatase inhibitor-associated musculoskeletal syndrome (AIMSS) in the adjuvant setting. *Breast J*, 2023, **2023**: 3614296
- [113] Tomita T, Kunugiza Y, Tomita N, *et al.* E2F decoy oligodeoxynucleotide ameliorates cartilage invasion by infiltrating synovium derived from rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med*, 2006, **18**(2): 257-265
- [114] Pellicelli M, Picard C, Wang D, *et al.* E2F1 and TFDP1 regulate PITX1 expression in normal and osteoarthritic articular chondrocytes. *PLoS One*, 2016, **11**(11): e0165951
- [115] Picard C, Pellicelli M, Taheri M, *et al.* Nuclear accumulation of prohibitin 1 in osteoarthritic chondrocytes down-regulates PITX1 expression. *Arthritis Rheum*, 2013, **65**(4): 993-1003
- [116] Ljubic V, Burt M, Jasmin B J. The therapeutic potential of skeletal muscle plasticity in Duchenne muscular dystrophy: phenotypic modifiers as pharmacologic targets. *FASEB J*, 2014, **28**(2): 548-568
- [117] Blanchet E, Annicotte J S, Pradelli L A, *et al.* E2F transcription factor-1 deficiency reduces pathophysiology in the mouse model of Duchenne muscular dystrophy through increased muscle oxidative metabolism. *Hum Mol Genet*, 2012, **21**(17): 3910-3917
- [118] Harr J C, Schmid C D, Muñoz-Jiménez C, *et al.* Loss of an H3K9me anchor rescues laminopathy-linked changes in nuclear organization and muscle function in an Emery-Dreifuss muscular dystrophy model. *Genes Dev*, 2020, **34**(7/8): 560-579
- [119] Melcon G, Kozlov S, Cutler D A, *et al.* Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Hum Mol Genet*, 2006, **15**(4): 637-651
- [120] Timchenko N A, Iakova P, Cai Z J, *et al.* Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol*, 2001, **21**(20): 6927-6938
- [121] Sousa-Victor P, Gutarra S, García-Prat L, *et al.* Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature*, 2014, **506**(7488): 316-321
- [122] Yan Z, Choi S, Liu X, *et al.* Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *J Biol Chem*, 2003, **278**(10): 8826-8836
- [123] Hlaing M, Spitz P, Padmanabhan K, *et al.* E2F-1 regulates the expression of a subset of target genes during skeletal myoblast hypertrophy. *J Biol Chem*, 2004, **279**(42): 43625-43633

Effects of E2F Family on Musculoskeletal System Development and Related Diseases*

WANG Shu-Wan, WANG Zhuo**

(School of Sports Health, Shenyang Sport University, Shenyang 110102, China)

Graphical abstract



Abstract The E2F family consists of transcription factors that mediate the induction of the E2 gene by adenovirus E1a and play a vital role in regulating cell cycle progression, cell proliferation, and cell apoptosis. Given its primary functions in cell proliferation and differentiation, early studies on the E2F family focused on its relationship with cancer. However, as research has expanded, the E2F family has been found to play an independent role in the development of the musculoskeletal system and the mechanisms of related diseases. The E2F family can influence the progression of musculoskeletal diseases by regulating the cell cycle and proliferation of stem cells, osteoblasts, osteoclasts, chondrocytes, and myoblasts, acting as a target gene for various

* This work was supported by grants from the Liaoning Provincial Natural Science Foundation Doctoral Research Start-up Fund (2024-BS-273) and the Basic Scientific Research Project of The Educational Department of Liaoning Province (LJKMZ20221610).

** Corresponding author.

Tel: 86-18841369672, E-mail: wangzhuo_7@126.com

Received: October 26, 2024 Accepted: December 30, 2024

downstream pathways and microRNAs. This review is divided into two parts: the first elaborates on the physiological roles of the E2F family in bone metabolism, skeletal muscle, and cartilage development, while the second summarizes its roles in the pathological processes of osteosarcoma, rheumatoid arthritis, osteoporosis, and muscle-related diseases. During musculoskeletal system development, the E2F family affects bone metabolism by regulating stem cell differentiation, promoting osteoclast differentiation and metabolism, and increasing osteoblast activity or inhibiting osteoblast differentiation. It also regulates mitosis in cartilage, influencing chondrocyte proliferation and differentiation. Additionally, the E2F family is essential for skeletal muscle development, controlling muscle differentiation and myogenesis. In the pathological mechanisms of musculoskeletal diseases, most E2F family members act as downstream targets of various microRNAs, regulating osteosarcoma progression. Some members function independently through their ability to control cell proliferation. The E2F family also contributes to osteoporosis progression by promoting pathological increases in osteoclast activity and affecting osteoblast function. In rheumatoid arthritis and osteoarthritis, E2F family members aggravate inflammation by increasing inflammatory factors through multiple pathways. Moreover, the E2F family plays a crucial role in muscle-related diseases, influencing skeletal muscle regeneration after injury and affecting symptoms of muscular dystrophies. This review provides a comprehensive overview of the physiological roles of the E2F family in the musculoskeletal system and its mechanisms of action in related diseases. By offering a systematic summary and analysis, this article aims to provide a foundation for future research as well as insights for disease diagnosis and treatment.

Key words E2F family, bone, muscle, osteosarcoma, osteoarthritis

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0446

CSTR: 32369.14.pibb.20240446