

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00637

# PI3K/AKT 信号通路调控 *Myogenin* 和 *MCK* 基因的表达

李晶<sup>1</sup>, 张云生<sup>2</sup>, 李宁<sup>2</sup>, 胡晓湘<sup>2</sup>, 石国庆<sup>1</sup>, 刘守仁<sup>1</sup>, 柳楠<sup>3</sup>

1. 石河子大学动物科技学院, 石河子 832003;
2. 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193;
3. 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109

**摘要:** 骨骼肌分化过程受多个信号通路调控, PI3K/AKT 信号通路是其中最重要的信号转导通路之一。PI3K/AKT 信号通路可以调控骨骼肌分化, 但在染色质水平上的调控机制还不是很清楚。文章以小鼠成肌细胞(C2C12)为研究材料, 采用免疫印迹、染色质免疫共沉淀(Chromatin immunoprecipitation, ChIP)、定量 PCR(Q-PCR)的方法研究 PI3K/AKT 信号通路调控 *Myogenin* 和 *MCK* 基因的表达。研究发现, C2C12 细胞分化过程中添加 PI3K/AKT 信号通路激活剂处理 24 h, *Myogenin* 和 *MCK* 蛋白表达水平显著升高, 组蛋白 H3K27me3 去甲基化酶 UTX 的表达也升高, H3K27me3 在 *Myogenin* 基因启动子区和 *MCK* 基因启动子及增强子区的富集与对照组相比显著降低。用 PI3K/AKT 信号通路抑制剂处理, 结果相反。因此, PI3K/AKT 信号通路可能通过调控组蛋白去甲基化酶 UTX 的表达活性改变靶基因的 H3K27me3 的富集进而调控骨骼肌分化。

**关键词:** PI3K/AKT 信号通路; *Myogenin* 基因; *MCK* 基因; UTX; H3K27me3

## Expression of *Myogenin* and *MCK* genes regulated by PI3K/AKT pathway

LI Jing<sup>1</sup>, ZHANG Yun-Sheng<sup>2</sup>, LI Ning<sup>2</sup>, HU Xiao-Xiang<sup>2</sup>, SHI Guo-Qing<sup>1</sup>, LIU Shou-Ren<sup>1</sup>, LIU Nan<sup>3</sup>

1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;
2. The State Key Lab of Agricultural Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
3. College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

**Abstract:** Many intracellular signaling pathways regulate skeletal muscle differentiation. Among them, PI3K/AKT pathway plays an important role. But the mechanisms of chromatin regulation remain unclear. In this study, the murine C2C12 myoblast cell line was used to investigate the expression of *Myogenin* and *MCK* genes during the skeletal muscle

收稿日期: 2012-11-30; 修回日期: 2013-03-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2006CB102100)和国家自然科学基金项目(编号: 30671496)资助

作者简介: 李晶, 博士研究生, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。Tel: 18610864769; E-mail: lijing811020@163.com

通讯作者: 刘守仁, 院士, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: nkyysb@163.com

柳楠, 教授, 博士, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: nanliu@sina.com

网络出版时间: 2013-3-14 8:47:51

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130314.0847.002.html>

differentiation. Western blotting analysis showed that the expression of Myogenin and MCK protein was increased significantly after PI3K/AKT activator treatment for 24 h during the C2C12 cell differentiation and the expression of H3K27me3 demethylase UTX was also increased. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and quantitative PCR (Q-PCR) analysis showed that the enrichment of H3K27me3 on the promoter regions of *Myogenin* and *MCK* genes and the enhancer region of *MCK* gene were decreased. It was opposite to the PI3K/AKT inhibitor treatment. We concluded that the PI3K/AKT pathway maybe regulate skeletal muscle differentiation by regulating the expression of UTX gene to change the enrichment of H3K27me3 on the target genes.

**Keywords:** PI3K/AKT pathway; *Myogenin* gene; *MCK* gene; UTX; H3K27me3

骨骼肌分化的过程是一个严格的程序化过程,成肌细胞不可逆的退出细胞周期、迁移、融合为多核体细胞(又称肌管<sup>[1]</sup>)。在这个融合的过程中,与骨骼肌发育及其功能相关的各种骨骼肌特异性基因(即肌性基因)开始表达, *Myogenin* 基因(肌细胞生成素)和 *MCK* 基因(肌酸激酶)是其中比较关键的两个基因。研究发现, *Myogenin* 基因敲除的小鼠出生后会因为严重的骨骼肌发育缺陷致死,在本应发育为骨骼肌的部位只发现正常数量的单核细胞或者少量的肌纤维<sup>[2]</sup>, *MCK* 基因编码的肌酸激酶,主要在骨骼肌和心肌内大量表达,是骨骼肌发育和分化主要的标志<sup>[3]</sup>。PI3K/AKT 信号通路是调控骨骼肌分化的重要的信号转导通路,参与调控肌性基因的表达<sup>[4]</sup>,但在染色质水平 PI3K/AKT 信号通路调控 *Myogenin* 和 *MCK* 基因表达的机制还不是很清楚。已有研究报告,在人的胚胎成纤维细胞 *Myogenin* 基因位点存在抑制性染色质标记 H3K27me3,而在肌肉干细胞 *MCK* 基因位点同样检测到了 H3K27me3 的存在<sup>[5]</sup>。骨骼肌分化过程中,组蛋白去甲基化酶 UTX(KDM6A)被募集到这两个基因,移除 H3K27me3 标记,促进靶基因的表达<sup>[6]</sup>。本研究主要证明 PI3K/AKT 信号通路可能通过调控组蛋白去甲基化酶 UTX 的表达改变 H3K27me3 的富集进而调控骨骼肌分化,为进一步研究骨骼肌发育和分化机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司(美国);马血清购自 Gibco 公司(美国);DMEM 细胞培养液购自 Invitrogen 公司(美国);二甲基亚砷(DMSO)购自

Sigma 公司(美国);鼠单克隆抗 P-AKT 抗体购自 Cell Signaling 公司(美国);UTX 抗体购自 Bethyl 公司(美国);MyHC 抗体、Myogenin 抗体、*MCK* 抗体均购自 Abcam 公司(美国);H3K27me3 抗体(ChIP)购自 Millipore 公司(美国);GAPDH 抗体购自 cell signaling 公司(美国);Tubulin 抗体购自碧云天公司。山羊抗兔和山羊抗小鼠 HRP 标记的二抗购自中杉金桥公司。SYBR® Green PCR Master mix 和 DNAaseI 购自 Roche 公司(德国);Western blotting 化学发光检测试剂盒购自 Thermo 公司(美国)。细胞裂解液 IP、蛋白浓度测定试剂盒(BCA)、一抗稀释液和一抗二抗去除液购自碧云天公司;细胞蛋白提取试剂盒、显影粉和定影粉购自普利莱公司。ChIP 试剂盒购自 Millipore 公司(美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞分化

C2C12 细胞(小鼠成肌细胞,购自北京协和医科大学)接种在直径为 10 cm 的培养皿(每皿  $1 \times 10^6$  个细胞)。用含 10% (V/V)胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 ng/mL 链霉素的高糖 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,待细胞长满 80%~90%左右,换成分化培养基(2%浓度马血清的高糖 DMEM 培养基),继续培养。

#### 1.2.2 细胞吉姆萨染色

取出分化不同阶段的细胞,倒掉细胞培养液,用 PBS 洗两次,加入 I 液(1 g 迈格染料和 100 mL 甲醇配制成的染色液,蒸馏水稀释 10 倍),染色 20 min;倒弃,蒸馏水漂洗干净;再加入 II 液(0.6 g 姬氏染粉、50 mL 甘油、100 mL 甲醇配制成的染色液,蒸

馏水稀释 10 倍), 染色 20 min; 倒弃, 蒸馏水漂洗干净, 镜检。

### 1.2.3 药物处理

C2C12 细胞生长到 80%~90%, 换成分化培养基继续培养 3 d 后, 分别加入 DMSO、抑制剂 Ly294002 (40  $\mu$ mol/L) 和激活剂 IGF-1 (100 ng/mL), 刺激 24 h, 收集细胞, 提取蛋白, 其中空白组和加了 DMSO 组作为对照。

### 1.2.4 蛋白印记分析

取出细胞, 将培养液吸弃, 用预冷的 PBS 清洗 2 次, 每孔加入 120  $\mu$ L 细胞裂解液, 在冰面上裂解 10 min, 用细胞刮刮下细胞, 4  $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清。测定蛋白质浓度, 取等量蛋白 (50  $\mu$ g) 进行 SDS-PAGE 电泳分离, 先在恒压 50 V 电泳约 30 min, 随后 80 V 电泳 60 min; 然后在 300 mA 的条件下电转膜 60 min, 将蛋白转移至 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉和 0.1% Tween20 室温封闭 1 h, 分别加入相应的 I 抗 P-AKT、T-AKT、MyHC、UTX 的稀释浓度均为 1 : 1000; Myogenin、MCK 稀释浓度均为 1 : 2000; GAPDH、Tubulin 的稀释浓度均为 1 : 4000。4  $^{\circ}$ C 过夜; TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次室温摇动洗涤 10 min。加入封闭液稀释的 HRP 标记的兔抗小鼠或羊抗兔 IgG 抗体均为 1 : 20000, 室温摇动 1 h, 再用 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次室温摇动洗涤 10 min。ECL 化学发光, 于暗室压 X 底片曝光, 显影、定影, 水洗胶片晾干后保存。以 GAPDH 或者 Tubulin 为内参照。实验在相同的条件下重复 3 次。

### 1.2.5 染色质免疫共沉淀

取出细胞, 按照 Millipore 公司 ChIP 试剂盒说明书, 直接在细胞培养液中加入适量 37% 甲醛, 致其终浓度 1%, 37  $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 进行交联。加入 1 mL 甘氨酸 (10 $\times$ ), 轻轻混匀, 室温放置 5 min。弃去液体,

将培养皿置于冰上, 用预冷的含 1 mmol/L PMSF 的 PBS 洗涤细胞, 再加入 1 mL 预冷的含 1 mmol/L PMSF 的 PBS, 用细胞刮子将细胞刮下, 收集细胞, 分装每个离心管含细胞大约  $1 \times 10^6$  个。4  $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 5 min 去上清, 收集细胞。加入 0.2 mL 含 1 mmol/L PMSF 的 SDS 裂解液重悬。用超声破碎仪破碎 DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳检测多数 DNA 在 200~1 000 bp。超声处理后, 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 将上清移至 2 mL 离心管中, 置于冰上。取出 20  $\mu$ L 样品做为 Input 组。加入 70  $\mu$ L Protein A+G Agrose/Salmon Sperm DNA, 4  $^{\circ}$ C 摇匀 30 min。4  $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 5 min, 取上清移至另一 2 mL 离心管内, 然后加入 ChIP 级的 H3K27me3 抗体, 用正常小鼠 IgG 抗体沉淀作为阴性对照, Input 组不加任何抗体, 4  $^{\circ}$ C 缓慢摇匀过夜。加入 60  $\mu$ L Protein A+G Agrose/Salmon Sperm DNA 4  $^{\circ}$ C 缓慢摇匀 60 min, 4  $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 5 min, 小心去除液体, 所获沉淀进行洗涤, 纯化最后获得 DNA。

### 1.2.6 定量 PCR

ChIP 实验获得最后的 DNA 为 Q-PCR 的模板, *Myogenin* 基因启动子区和 *MCK* 基因启动子区和增强子区设计引物<sup>[6]</sup>, 引物序列见表 1 (引物由上海生物工程技术有限公司合成)。

Q-PCR 反应体系 15  $\mu$ L, 设 3 个复孔, 扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s 共 44 次循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 吉姆萨染色鉴定成肌细胞分化

显微镜下观察细胞, 分化 0 d 的 C2C12 细胞都为单个细胞核, 分化 3 d 后, 细胞融合越来越多, 一部分细胞已分化为两个核以上的多核细胞, 另一部分仍为单核细胞, 分化 7 d 后, 细胞拉长拉伸, 细胞

表 1 *Myogenin* 基因和 *MCK* 基因引物序列

引物名称	上游引物序列(5'→3')	下游引物序列(5'→3')
Myogenin promoter (-1489) (1)	GCCCAGGACAGACAAATGATGCAA	AATGCCTTCTGGCACTAGAACCGT
Myogenin promoter (-145) (2)	TCACATGTAATCCACTGGAAACG	CCTGAGCCCCCTCTAAGC
MCK promoter (-54)	TAGTCACACCCTGTAGGCTCCTCTAT	ATTCTCTCAGTCCCTACCTGGCT
MCK enhancer (-1340)	GCTCCTGTCATATTGTGTCCTGCT	TTATAACCAGGCATCTCGGGTGTC

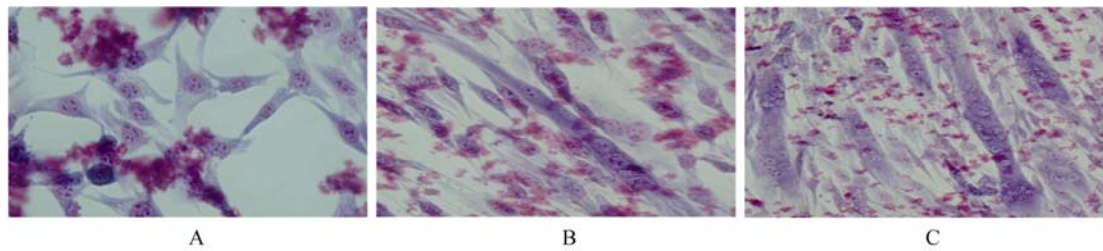


图 1 C2C12 细胞分化

A: 分化 0 d 的形态; B: 分化 3 d 的形态; C: 分化 7 d 的形态。图像放大 200 倍。

基本分化为多核细胞, 形成条状肌管(图 1)。

## 2.2 C2C12 细胞分化过程中 MyHC、Myogenin、MCK 和 P-AKT 蛋白的表达

C2C12 细胞分化 0 d、1 d、3 d、5 d、7 d 检测 MyHC、Myogenin、MCK 蛋白表达, 发现蛋白表达水平逐渐升高(图 2)。在这个过程中 P-AKT 蛋白表达水平也逐渐升高, T-AKT 蛋白表达没有发生变化(图 3)。

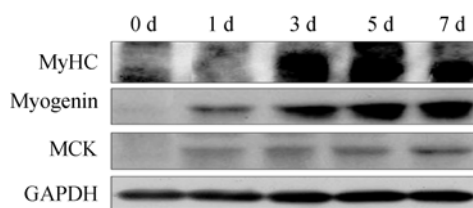


图 2 C2C12 细胞分化过程中 MyHC、Myogenin、MCK 蛋白表达

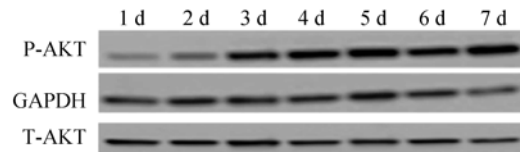


图 3 C2C12 细胞分化过程中 P-AKT 蛋白的表达

## 2.3 PI3K/AKT 激活剂和抑制剂处理分化 3 d 的 C2C12 细胞相关蛋白的表达

添加 PI3K/AKT 激活剂 IGF-1 刺激分化 3 d 的 C2C12 细胞 24 h 后, Western blotting 检测, P-AKT、UTX、Myogenin 和 MCK 蛋白表达水平与对照组相比都显著升高, T-AKT 蛋白表达没有发生变化; PI3K/AKT 抑制剂 Ly294002 处理后, 结果与其相反(图 4)。

## 2.4 组蛋白 H3K27me3 富集

ChIP 实验检测 *Myogenin* 基因启动子、*MCK* 基

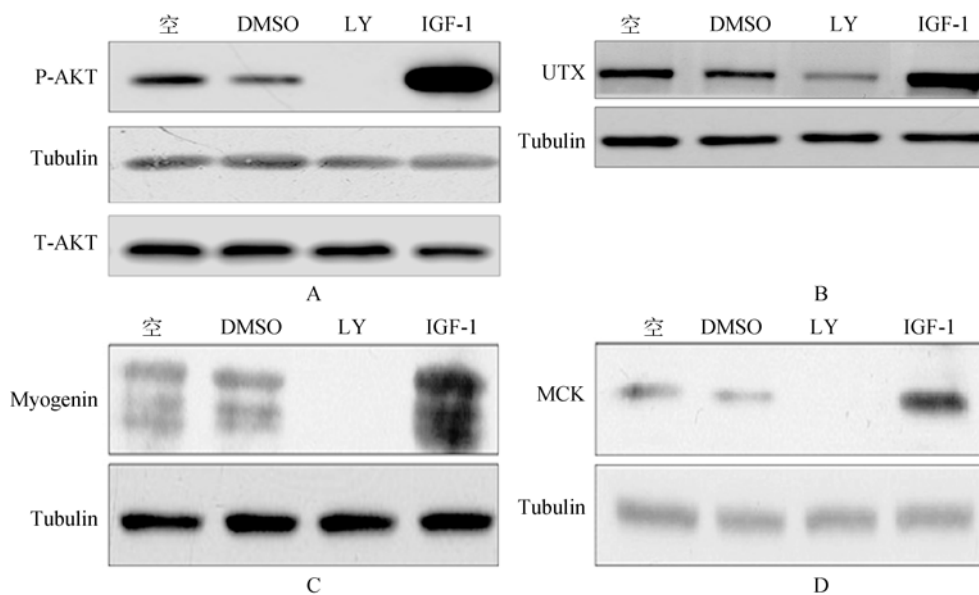


图 4 C2C12 细胞分化过程中添加 PI3K/AKT 激活剂和抑制剂相关蛋白的表达

A: P-AKT 蛋白的表达; B: UTX 蛋白的表达; C: Myogenin 蛋白的表达; D: MCK 蛋白的表达。

因启动子和增强子区 H3K27me3 的富集度。PI3K/AKT 信号通路抑制剂 Ly294002 和激活剂 IGF-1 分别处理分化 0 d 的 C2C12 细胞 24 h 和分化 3 d 的 C2C12 细胞 24 h。检测发现,在这些位点,用 Ly294002 处理 H3K27me3 富集与对照的比值明显升高,用 IGF-1 处理后, H3K27me3 富集与对照的比值明显降低(图 5)。

### 3 讨论

肌肉分化是一个复杂过程,受多条细胞信号转导通路的调控,其中 PI3K/AKT 信号通路是非常关键的一条。AKT 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可以通过催化自身丝氨酸 Ser473 和苏氨酸 Thr308 位点的磷酸化被激活,在细胞的生长、增殖、分化、凋亡等生命活动中起着重要的作用[7,8]。早在 1999 年已经研究发现,肌浆蛋白的形成离不开 PI3K/AKT 信号通路的调控[9]。添加 PI3K/AKT 信号通路激活剂处理 C2C12 细胞可以促进肌肉的分化和肥大[10],加入 PI3K/AKT 信号通路抑制剂处理 C2C12 细胞抑制骨骼肌的分化,这与我们的实验结果一致,而且细胞分化过程中加入 PI3K/AKT 激活剂或抑制剂后,检测 P-AKT 表达变化与 *Myogenin*、*MCK* 基因蛋白表达变化趋势是一致的,重新验证了 PI3K/AKT 信号

通路在调控骨骼肌分化中的重要作用。

骨骼肌分化过程除了需要在全基因组水平上进行重新编程启动、维持新的基因表达模式外,在分化过程中特定位点组蛋白修饰的改变对基因的激活或抑制也具有重要作用[11]。染色质水平上 PI3K/AKT 信号通路调控骨骼肌分化的机制已有报道,加入 PI3K/AKT 信号通路抑制剂可以减少骨骼肌调控基因染色质区组蛋白乙酰化水平,从而抑制骨骼肌分化[5]。全基因组分析表明,在基因转录的起始区如果出现 H3K27me3 的表观修饰,基因表达就会受到抑制[12]。已有文献报道,在人的胚胎成纤维细胞的 *Myogenin* 基因和肌肉干细胞的 *MCK* 基因位点都存在 H3K27me3 标记[5]。为验证 H3K27me3 是否参与调控骨骼肌分化,我们在 C2C12 细胞分化 0 d 和分化 3 d 后,添加 PI3K/AKT 激活剂 IGF-1,检测到 H3K27me3 在 *Myogenin* 基因启动子区和 *MCK* 基因启动子及增强子区富集与对照相比降低,添加 PI3K/AKT 抑制剂,检测到 H3K27me3 在这些位点富集与对照相比升高。所以在骨骼肌细胞分化开始和分化过程中, H3K27me3 都参与骨骼肌分化的调控,而且 H3K27me3 在骨骼肌分化特异基因位点的富集的变化趋势也基本一致,这说明,虽然在分化开始 *Myogenin* 和 *MCK* 基因没有被激活表达,但是

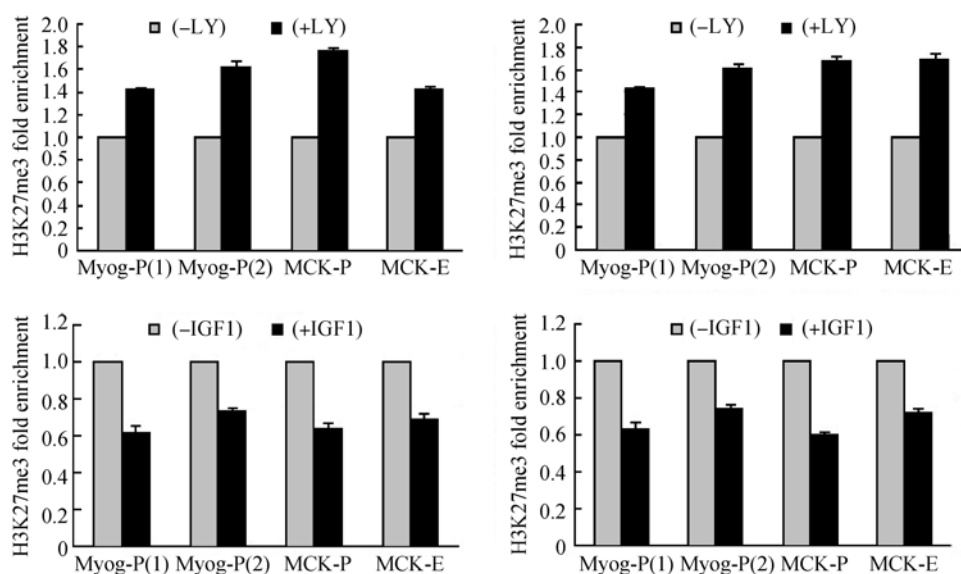


图 5 H3K27me3 在 *Myogenin* 基因启动子、*MCK* 基因启动子和增强子区的富集度

A: PI3K/AKT 信号通路抑制剂 Ly294002 处理分化 0 d 的 C2C12 细胞 24 h; B: PI3K/AKT 信号通路抑制剂 Ly294002 处理分化 3 d 的 C2C12 细胞 24 h; C: PI3K/AKT 信号通路激活剂 IGF-1 处理分化 0 d 的 C2C12 细胞 24 h; D: PI3K/AKT 信号通路激活剂 IGF-1 处理分化 3 d 的 C2C12 细胞 24 h。灰色柱为不加任何药物 H3K27me3 的富集度,黑色柱为加入药物处理后 H3K27me3 的富集度。



PI3K/AKT 信号通路仍然有调控作用, 只有当 H3K27me3 改变达到一定程度才能引起 *Myogenin* 和 *MCK* 基因活性的改变。H3K27me3 在骨骼肌分化中起的作用非常明显, PI3K/AKT 信号通路调控组蛋白 H3K27me3 的机制还不是很清楚, 但组蛋白 H3K27 甲基化酶和去甲基化酶的发现为研究骨骼肌分化调控机制提供了一个新的方向。在人的细胞系中, 研究发现 IGF-1 可以激活 P-AKT, 磷酸化组蛋白 H3K27 甲基化酶 EZH2 第 21 位的丝氨酸, 降低 EZH2 与 H3K27 结合, 从而降低催化形成 H3K27 三甲基化, Ly294002 作用与之相反<sup>[13]</sup>。但 EZH2 只能减少形成新的 H3K27me3, 但细胞染色质中原有存在的 H3K27me3 的去甲基化则需要去甲基酶的调控, UTX 作为组蛋白 H3K27me3 去甲基化酶, 能够去除 H3K27 三甲基化, 使作用的下游靶基因由转录抑制状态向转录激活状态转换<sup>[14]</sup>。骨骼肌分化过程中, 添加 PI3K/AKT 激活剂 IGF-1, UTX 表达升高, 但不是很明显, 添加 PI3K/AKT 抑制剂 Ly294002, UTX 表达降低, 所以我们推测骨骼肌分化过程中, PI3K/AKT 信号转导通路的调控 *Myogenin* 和 *MCK* 基因表达, 其中一部分可能是通过调控组蛋白去甲基化酶 UTX 表达改变 *Myogenin* 基因启动子区和 *MCK* 基因启动子及增强子区组蛋白 H3K27me3 的富集来实现的。当然, PI3K/AKT 信号通路调控 UTX 的过程中, 跟组蛋白相关的其他甲基化酶和去甲基化酶也可能参与调控, 这有待于进一步的研究。

本研究揭示了骨骼肌细胞分化过程中 PI3K/AKT 信号通路对肌肉特异分化基因 *Myogenin* 和 *MCK* 基因表达的调控, 为深入了解染色质水平上骨骼肌发育、分化的机制提供了新的理论依据和手段。

#### 参考文献(References):

- [1] Zetser A, Gredinger E, Bengal E. p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation: Participation of the *mef2c* transcription factor. *Biol Chem*, 1999, 274(8): 5193–5200. DOI
- [2] Himeda CL, Tai PW, Hauschka SD. Analysis of muscle gene transcription in cultured skeletal muscle cells. *Methods Mol Biol*, 2012, 798(7): 425–443. DOI
- [3] Figueroa A, Cuadrado A, Fan JS, Atasoy U, Muscat GE, Muñoz-Canoves P, Gorospe M, Muñoz A. Role of HuR in Skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(14): 4991–5004. DOI
- [4] Kaneko S, Feldman RI, Yu L, Wu ZG, Gritsko T, Shelley SA, Nicosia SV, Nobori T, Cheng JQ. Positive feedback regulation between *Akt2* and *MyoD* during muscle differentiation: Cloning of *Akt2* promoter. *J Biol Chem*, 2002, 277(26): 23230–23235. DOI
- [5] Serra C, Palacios D, Mozzetta C, Forcales SV, Morante I, Ripani M, Jones DR, Du KY, Jhala US, Simone C, Puri PL. Functional interdependence at the chromatin level between the MKK6/p38 and IGF1/PI3K/AKT pathways during muscle differentiation. *Mol Cell*, 2007, 28(2): 200–213. DOI
- [6] Seenundun S, Rampalli S, Liu QC, Aziz A, Palii C, Hong S, Blais A, Brand M, Ge K, Dilworth FJ. UTX mediates demethylation of H3K27me3 at muscle-specific genes during myogenesis. *EMBO J*, 2010, 29(8): 1401–1411. DOI
- [7] 郭芬, 刘兆宇, 李月琴, 李弘剑, 周天鸿. Prosaposin 对细胞增殖和凋亡的调控及其分子机制. *遗传*, 2009, 31(12): 1226–1232. DOI
- [8] 郭云学, 莫德林, 陈瑶生, 张悦, 张云, 肖书奇, 刘小红. PI3K/AKT 抑制剂渥曼青霉素对猪前体脂肪细胞增殖和凋亡的影响. *遗传*, 2012, 34(10): 1282–1290. DOI
- [9] Jiang BH, Aoki M, Zheng JZ, Li J, Vogt PK. Myogenic signaling of phosphatidylinositol 3-kinase requires the serine-threonine kinase Akt/protein kinase B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(5): 2077–2081. DOI
- [10] Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature Cell Biol*, 2001, 3(11): 1009–1013. DOI
- [11] Fuks F. DNA methylation and histone modification: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(5): 490–495. DOI
- [12] Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell*, 2007, 128(4): 669–681. DOI
- [13] Cha TL, Zhou BP, Xia WY, Wu YD, Yang CC, Chen CT, Ping B, Otte AP, Hung MC. AKT-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. *Science*, 2005, 310(5746): 306–310. DOI
- [14] Wang JK, Tsai MC, Poulin G, Adler AS, Chen S, Liu H, Shi Y, Chang HY. The histone demethylase UTX enables RB-dependent cell fate control. *Genes Dev*, 2010, 24(4): 327–332. DOI