

山柰酚对 TNF- α /INF- γ 诱导 C2C12 细胞炎症及成肌分化的作用

解灿灿^{1,2}, 郝婷婷^{1,2}, 吴春梅², 左建平^{1,2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 目的 探讨山柰酚对 TNF- α /INF- γ 诱导 C2C12 细胞炎症及成肌分化的作用。方法 采用生长培养基培养 C2C12 成肌细胞, 用山柰酚 (10、20、30、40、50、60 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h, CCK8 法检测细胞活力。10 ng/mL TNF- α 和 10 ng/mL INF- γ 与山柰酚 (30、50 $\mu\text{mol/L}$) 共处理 C2C12 细胞 24 h, RT-qPCR 法检测炎症因子 mRNA 表达。采用分化培养基诱导 C2C12 细胞肌分化, 在分化第 5 天, 加入 TNF- α /INF- γ 与山柰酚共处理细胞 24 h, RT-qPCR 法检测生肌调节因子 (MRFs) mRNA 表达, 免疫荧光观察肌管细胞形态, Western blot 法检测 PI3K/Akt 和 MAPKs 相关功能蛋白表达。结果 与刺激组比较, 山柰酚组成肌细胞促炎因子 (*IL-1 β* 、*IL-6*), α 趋化因子 (*CCL2~5*)、 β 趋化因子 (*CCL9~11*) mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 肌管细胞形态萎缩得到改善, *Myogenin*、*Myf6* mRNA 表达和 p-PI3K、p-ERK1/2 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 山柰酚通过降低促炎因子和 α 、 β 趋化因子 mRNA 表达抑制 TNF- α /INF- γ 诱导 C2C12 细胞炎症进程; 山柰酚促进肌源性分化, 其机制可能与上调 PI3K 和 ERK1/2 有关。

关键词: 山柰酚; C2C12 细胞; 炎症; 趋化因子; 成肌分化; PI3K/Akt; MAPK

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)09-3115-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.09.045

特发性炎症性肌病 (idiopathic inflammatory myopathies, IIM) 是一组异质性自身免疫性结缔组织病, 基于其临床和病理特征主要分为皮肌炎、多发性肌炎、免疫介导的坏死性肌病和散发性包涵体肌炎四类, 其共同特征为肌无力和肌活检呈炎性细胞浸润^[1]。疾病发展后期可致肌肉萎缩, 引起不同程度的功能障碍^[2]。研究表明, 炎症是骨骼肌萎缩的主要原因, 炎症因子 TNF- α 是最重要的肌肉消耗细胞因子之一, TNF- α 在 INF- γ 辅助下能够抑制肌纤维再生并损害现有肌纤维^[3-4]。磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路作为受体信号向细胞内传导的重要途径之一, 具有调节细胞增殖、分化及蛋白合成等的功能, 已被证明参与骨骼肌损伤、修复和再生^[5]。PI3K/Akt 信号通路有助于肌源性分化, 阻碍其表达或激活会显著抑制肌细胞转分化, 诱导细胞凋亡^[6]。MAPK 途径是肌原分化所必需的^[7]。山柰酚是一种常见的天然黄酮类化合物, 广泛存在于沙姜、大戟、银杏等传统中草药中, 具有抗炎、抗病毒、抗癌等多种生物活性^[8-9], 但尚未有报道山柰酚治疗肌萎缩的相关研究。因此, 本实验通过构建 TNF- α 和 INF- γ 诱导 C2C12 细胞萎缩模型, 观察山柰酚对细胞活力、炎症因子表达、肌管细胞形态、PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路相关蛋白及下游生肌调节

因子 (myogenic regulation factors, MRFs) 表达的影响, 以期为骨骼肌相关疾病的研究提供实验基础。

1 材料

1.1 细胞 小鼠成肌细胞 C2C12, 由中科院上海药物研究所冷颖研究员课题组提供。复苏细胞, 移入含有生长培养基 (DMEM 高糖培养基+10% 胎牛血清+双抗) 的培养瓶中, 轻轻摇匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中培养, 隔天换液。

1.2 药物与试剂 山柰酚 (货号 512-18-3, 纯度 $\geq 98\%$) 购自上海陶素生化科技有限公司。重组小鼠 TNF- α 、INF- γ 蛋白 (货号 554589、554587) 购自美国 BD 公司; 标准胎牛血清 (货号 AHW87326) 购自美国 HyClone 公司; DMEM 高糖培养基、热灭活马血清、0.25% Trypsin-EDTA (货号 23101130、26050070、2186970) 购自美国 Gibco 公司; CCK8 试剂盒 (货号 CK04) 购自日本同仁化学研究所; 无菌 DMSO、胎牛血清白蛋白 (货号 D2650、9048-46-8) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 总 RNA 提取试剂盒 (货号 DP419) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒、HRP 标记羊抗兔 GAPDH 抗体 (货号 23225、34577) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; PI3 kinase p85 (19H8) mAb、phospho-PI3 kinase p85 (Tyr458) /p55 (Tyr199) mAb、Akt mAb、p-Akt (T308)

收稿日期: 2023-05-23

基金项目: 上海市科学技术委员会基金项目 (21S11907700, 22ZR1473700)

作者简介: 解灿灿 (1997—), 女, 硕士生, 从事抗炎免疫药理学研究。E-mail: xcc51217@163.com

* 通信作者: 左建平 (1960—), 男, 博士, 研究员, 从事抗炎免疫药理学研究。E-mail: jjpuzo@simm.ac.cn

网络出版日期: 2023-07-20

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20230720.1408.002.html>

(244F9) mAb、p38 MAPK mAb、p-p38 MAPK (T180/Y182) mAb、p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5) mAb、p-p44/42 MAPK (T202/Y204) (197G2) mAb (货号 4257S、4228S、9272S、4056L、9212、9251L、4695S、4377S) 购自美国 Cell Signaling Technology 公司；HRP 标记羊抗兔二抗 (货号 1705046) 购自美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 C2C12 细胞诱导肌分化培养 待 C2C12 成肌细胞生长融合至 70%~80% 时，弃生长培养基，加入无血清培养基饥饿过夜，继而更换分化培养基 (DMEM 高糖培养基+2% 马血清+双抗) 诱导肌分化 6 d 以形成肌管，间隔 1 d 更换新的分化培养基继续培养。

2.2 细胞分组及给药 将 C2C12 成肌细胞随机分为对照组、TNF- α /IFN- γ 刺激组、山柰酚组 (30、50 $\mu\text{mol/L}$)，每组设置 3 个复孔。对照组加入生长培养基培养 24 h；刺激组加入含 10 ng/mL TNF- α 和 10 ng/mL IFN- γ 的生长培养基培养 24 h；山柰酚组加入含 10 ng/mL TNF- α 、10 ng/mL IFN- γ 和山柰酚 (30、50 $\mu\text{mol/L}$) 的生长培养基培养 24 h。在诱导肌分化第 5 天，各组加入含药或不含药的分化培养基培养 24 h，并于荧光倒置显微镜下实时观察各组肌管细胞形态并拍照。

2.3 CCK8 法检测细胞活力 取对数生长期 C2C12 成肌细胞，以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板，培养过夜至贴壁，加不同浓度山柰酚 (0、10、20、30、40、50、60 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 24 h，每孔加入 20 μL CCK8 试剂继续培养 1 h，采用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔光密度 (OD) 值，计算细胞活力，每组设置 3 个复孔。

2.4 RT-qPCR 法检测成肌细胞炎性因子和分化肌管细胞 MRFs 家族因子 mRNA 表达 细胞按“2.2”项下方法处理，收集成肌细胞和分化肌管细胞，加入 RZ 裂解液，使用总 RNA 提取试剂盒提取 RNA 并逆转录得 cDNA，检测成肌细胞炎性因子 mRNA 表达和分化肌管细胞 MRFs 家族因子 mRNA 表达。以 GAPDH 为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行分析。引物序列来源于 PrimerBank，见表 1，由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

2.5 Western blot 法检测分化肌管细胞 PI3K/Akt 和 MAPKs 信号通路蛋白表达 细胞按“2.2”项下方法处理，收集各组细胞，每孔加 100 μL 含蛋白酶抑制剂的 SDS 裂解液，反复吹打至细胞裂解完全，BCA 法进行蛋白定量，100 $^{\circ}\text{C}$ 恒温金属浴加热 10 min 使蛋白变性。10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离目的蛋白，湿转法转至 NC 膜上，5% BSA 室温封闭 1 h，一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，TBST 洗涤，二抗室温孵育 1 h，TBST 洗涤，ECL 法显影曝光，采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析条带灰度值，以 GAPDH 为内参，计算目的蛋白相对表达。

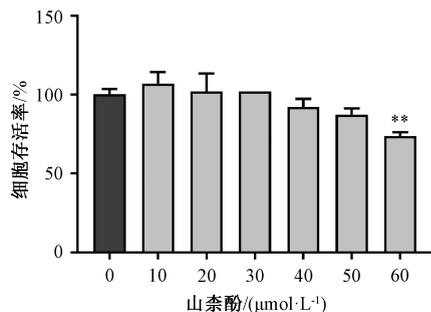
2.6 统计学分析 通过 GraphPad 7.0 软件进行处理，数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用双侧 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 引物序列

基因	序列 (5'→3')
<i>IL-1β</i>	正向 GCAACTGTTCTCTGAACTCAACT 反向 ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>IL-6</i>	正向 CTGCAAGAGACTTCCATCCAG 反向 AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
<i>CCL2</i>	正向 TTA AAAACCTGGATCGGAACCAA 反向 GCATTAGCTTCAGATTACGGGT
<i>CCL3</i>	正向 TTCTCTGTACCATGACACTCTGC 反向 CGTGGAACTCTCCGGCTGTAG
<i>CCL4</i>	正向 TTCCTGTGTTTCTCTTACACCT 反向 CTGTCTGCCTCTTTTGGTCAG
<i>CCL5</i>	正向 CTGTCTTTGCCTACCTCTCC 反向 TCGAGTGACAAAACGACTGC
<i>CXCL9</i>	正向 TCCTTTTGGGATCATCTTCC 反向 TTTGTAGTGATCGTCCTCG
<i>CXCL10</i>	正向 CCAAGTGTGCGCTCATTTTC 反向 GGCTCGCAGGATGATTCAA
<i>CXCL11</i>	正向 GGCTTCCTTATGTTCAAACAGGG 反向 GCCGTTACTCGGGTAAATTACA
<i>MyoD</i>	正向 CCACTCCGGGACATAGACTTG 反向 AAAAGCGCAGGTCTGCTGAG
<i>Myf5</i>	正向 AAGGCTCCTGTATCCCCTCAC 反向 TGACCTTCTTCAGGCGTCTAC
<i>Myogenin</i>	正向 GAGACATCCCCTATTCTACCA 反向 GCTCAGTCCGCTCATAGCC
<i>Myf6</i>	正向 AGAGGGCTCTCCTTTGTATCC 反向 CTGCTTTCCGACGATCTGTGG
<i>GAPDH</i>	正向 TGCTCGCTGTATTCTTGCTG 反向 GGCTCCTCTGTCCAGTGAC

3 结果

3.1 山柰酚对 C2C12 成肌细胞活力的影响 如图 1 所示，与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较，60 $\mu\text{mol/L}$ 山柰酚对 C2C12 成肌细胞存活率有抑制作用 ($P < 0.01$)，故选取 30、50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度用于后续实验。

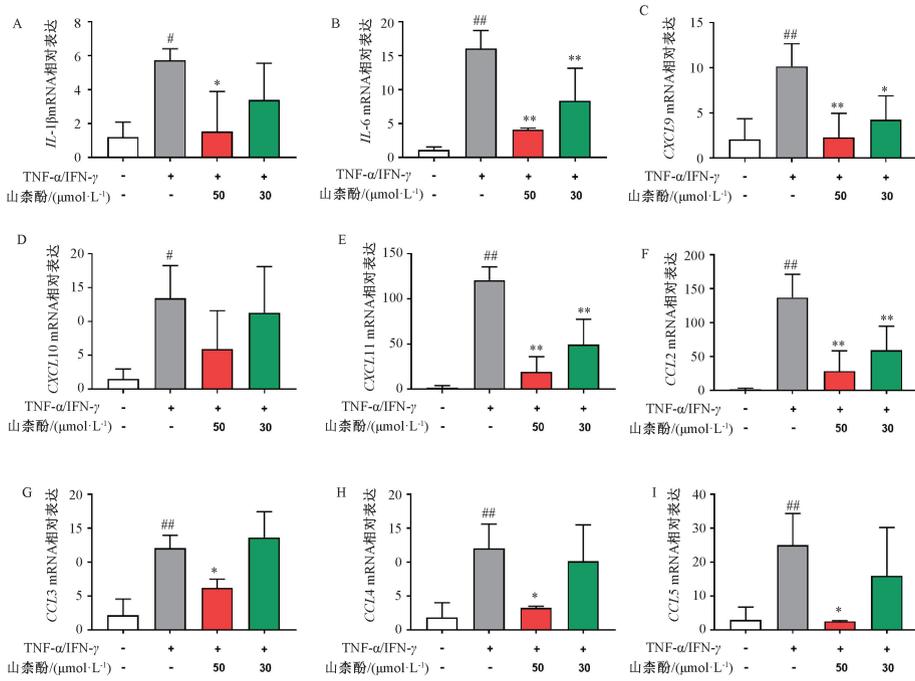


注：与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较，** $P < 0.01$ 。

图 1 不同浓度山柰酚对 C2C12 成肌细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 山柰酚对 TNF- α /IFN- γ 诱导 C2C12 成肌细胞炎性因子 mRNA 表达的影响 与对照组比较，刺激组成肌细胞促炎因子 (*IL-1 β* 、*IL-6*)、 α 趋化因子 (*CXCL9*~*11*) 和 β 趋化因子 (*CCL2*~*5*) mRNA 表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与刺激组比较，山柰酚组 *IL-1 β* 、*IL-6*、*CXCL9*、*CXCL11*、

CCL2~5 mRNA 表达均降低, 其中 50 $\mu\text{mol/L}$ 组作用更显著 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见图 2。

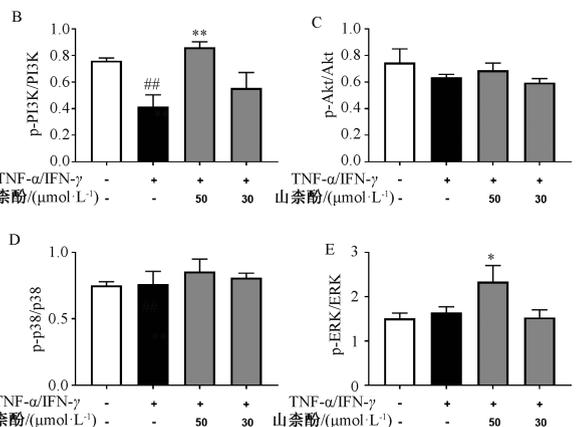
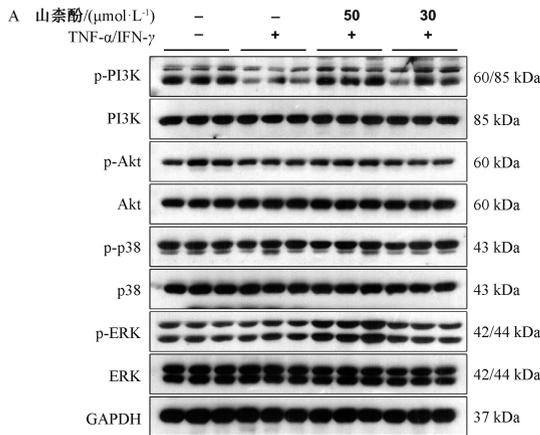


注: A~B 为促炎因子 mRNA 表达, C~E 为 α 趋化因子 mRNA 表达, F~I 为 β 趋化因子 mRNA 表达。与对照组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 与刺激组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 山柰酚对成肌细胞炎症因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.3 山柰酚对分化肌管细胞 PI3K/Akt 和 MAPKs 信号通路蛋白表达的影响 与对照组比较, 刺激组肌管细胞 p-PI3K 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与刺激组比较, 50 $\mu\text{mol/L}$ 山柰

酚组 p-PI3K、p-ERK 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), p-Akt 和 p-p38 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$), 见图 3。



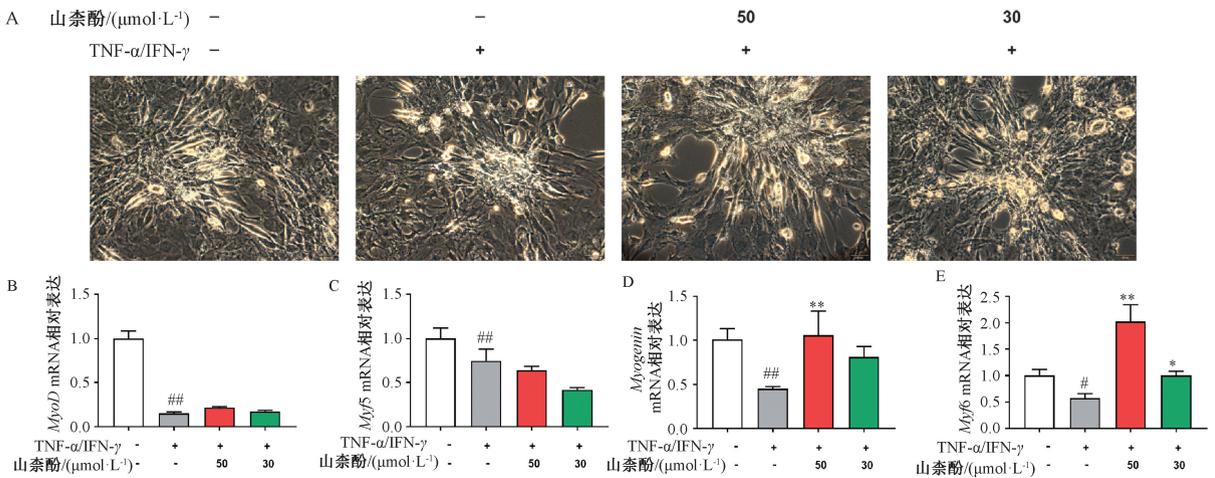
注: A 为蛋白条带图, B~E 为蛋白表达统计图。与对照组比较, ## $P<0.01$; 与刺激组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 3 山柰酚对分化肌管细胞 PI3K/Akt 和 MAPKs 信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.4 山柰酚对分化肌管细胞形态和 MRFs 基因表达的影响 与对照组比较, 刺激组肌管细胞核融合减少, 形态萎缩, 直径和长度缩小, *MyoD*、*Mrf5*、*Myogenin*、*Myf6* mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与刺激组比较, 山柰酚 50 $\mu\text{mol/L}$ 组肌管细胞形态改善, *Myogenin*、*Myf6* mRNA 表达升高 ($P<0.01$), *MyoD*、*Mrf5* mRNA 表达无明显变化 ($P>0.05$), 见图 4。

4 讨论

骨骼肌作为人体最大的组织, 约占体质量的 40%, 在维持机体生长发育、运动、甚至糖代谢和脂肪代谢活动中具有不可或缺的作用, 骨骼肌损伤或弱化严重影响机体的正常运动和生产生活。IIM 是一组累及肌肉和四肢的慢性炎症性肌病, 疾病进展后期会导致严重的肌肉无力和萎缩。炎症所导致的骨骼肌弱化是许多骨骼肌疾病的典型后果,



注: A 为各组分化肌管细胞形态 ($\times 200$), B~E 为肌管细胞 *MyoD*、*Mrf5*、*Myogenin*、*Myf6* mRNA 表达。与对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与刺激组比较, ** $P < 0.01$ 。

图4 山柰酚对分化肌管细胞形态和 MRFs 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

减轻炎症反应、改善肌肉萎缩可能是治疗 IIM 以及其他骨骼肌相关疾病的有效手段之一。

C2C12 成肌细胞常被广泛用于阐明骨骼肌细胞生长、发育和分化的生物学功能特征, 是一个良好的细胞模型。TNF- α 能通过激活 NF- κ B 信号通路抑制 C2C12 细胞的分化, 而 IGF-1 能够抵消 TNF- α 引起的分化受阻。TNF- α 与 IFN- γ 的组合导致 MyoD 的下调和肌管功能障碍^[4], 因此本实验采用 TNF+IFN 处理的细胞系来阐明与山柰酚对 C2C12 成肌细胞炎症损伤的保护作用及成肌分化的作用。

细胞因子和趋化因子是 IIM 发生和发展的重要参与者。趋化因子根据保守的半胱氨酸残基周围氨基酸的定位被细分为家族, 并且大多数属于 α 和 β 家族, 大多数趋化因子可以与一种以上的受体结合^[10]。已有研究表明, IFN- γ 诱导的 α 趋化因子 (CXCLs) 在 IIM 中具有重要作用, CXCL9 和 CXCL10 mRNA 表达在 sIBM 患者肌肉中上调^[11]。 β 趋化因子 (CCLs) 能够激活和趋化 T 细胞和单核细胞, 在 IIM 慢性炎症性疾病中具有重要的促炎和调节作用^[12]。体外研究表明, 骨骼肌细胞暴露于 TNF- α 导致许多炎症蛋白的合成增加, 包括 CCL2、CCL5、CXCL5、VCAM-1 和 IL-6^[13-14]; IFN- γ 诱导的成肌细胞和肌管细胞中的促炎细胞因子 IL-1、IL-6、IL-18 和趋化因子 CCL2 mRNA 表达^[15]。以上研究提示, 抑制促炎因子和趋化因子表达是治疗肌炎的有效手段之一。本研究发现, 山柰酚干预能够抑制 TNF- α /IFN- γ 诱导的成肌细胞促炎因子、 α 和 β 趋化因子基因表达上调, 提示山柰酚可能通过抑制肌细胞分泌促炎因子和趋化因子发挥抗炎的作用。

骨骼肌的分化和成熟需要信号通路之间的相互作用^[16]。胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 在控制发育过程中骨骼肌生长中起着至关重要的作用^[17], 而 PI3K/Akt, MAPK 是 IGF-1 代谢途径的主要效应物^[18]。IGF-1 与其受体结合诱导 PI3K/Akt 途径磷酸化, 诱导肌母细胞分化和存活。此外, Akt 激活哺乳动物雷帕霉素靶标 (mTOR), 并通过激

活核糖体蛋白 S6 激酶 (S6K) 来增加蛋白质合成使肌纤维肥大^[19]。丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 家族成员主要包括 ERK1/2、JNK/SAPK、p38 MAPK、ERK5/BMK1 以及非典型 MAPK^[20]。p38 MAPK 和 ERK1/2 MAPK 在肌肉细胞增殖和分化机制中起着关键作用, 具有促进人卫星细胞成肌分化, 抑制移植卫星细胞增殖的能力^[7,21]。最新文献报道, 山柰酚通过 JAK2/AMPK 和 PI3K 信号通路促进肌管中的葡萄糖摄取^[22]。生肌调节因子家族 (MRFs), 包括成肌分化抗原 (MyoD)、生肌素 (Myogenin)、Myf5 和 Mrf6 四种肌肉特异性转录因子, 控制着肌细胞增殖和分化, 与肌纤维的数量、大小有着密切的关系^[23]。MyoD 在肌肉特异基因转录调控中起着总开关作用, Myf5 协同 MyoD 在肌肉形成过程中发挥作用。Myogenin 位于 MyoD 下游, 具有抗增殖活性, 促使成肌细胞退出细胞周期进入分化阶段。Myf6 位于其他生肌因子的下游, Myogenin 与 Myf6 具有同源性, 二者协同控制肌肉分化。研究表明, MyoD 和 Myogenin 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与受损骨骼肌的修复^[24]。本研究发现, 山柰酚通过上调 PI3K 和 ERK 蛋白磷酸化, 促进 *Myogenin*、*Myf6* 基因表达, 从而影响 C2C12 细胞中的肌源分化。

综上所述, 山柰酚能够降低 TNF- α /IFN- γ 诱导的成肌细胞中促炎因子和趋化因子表达, 发挥其抗炎作用; 山柰酚可能是通过调节 PI3K 和 ERK 蛋白磷酸化影响 C2C12 细胞中的肌源分化, 改善成肌分化形态。本研究表明山柰酚可作为保护肌肉免于炎症损伤和促进肌肉分化的功能性候选化合物, 可为临床上炎症性肌病的治疗提供参考依据。

参考文献:

- [1] Lazarou I N, Guerne P A. Classification, diagnosis, and management of idiopathic inflammatory myopathies [J]. *J Rheumatol*, 2013, 40(5): 550-564.
- [2] Jørgensen A N, Aagaard P, Nielsen J L, et al. Physical function and muscle strength in sporadic inclusion body

- myositis[J]. *Muscle Nerve*, 2017, 56(6): E50-E58.
- [3] Jackman R W, Kandarian S C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(4): C834-C843.
- [4] Sheriff S, Kadeer N, Joshi R, et al. Des-acyl ghrelin exhibits pro-anabolic and anti-catabolic effects on C2C12 myotubes exposed to cytokines and reduces burn-induced muscle proteolysis in rats[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 351(2): 286-295.
- [5] 吕欣, 周达岸. PI3K/AKT 信号通路对骨骼肌再生的影响研究进展[J]. *中国运动医学杂志*, 2020, 39(11): 908-912.
- [6] Zanou N, Gailly P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(21): 4117-4130.
- [7] Segalés J, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P. Epigenetic control of adult skeletal muscle stem cell functions[J]. *FEBS J*, 2015, 282(9): 1571-1588.
- [8] Devi K P, Malar D S, Nabavi S F, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 99: 1-10.
- [9] 张雅雯, 邵东燕, 师俊玲, 等. 山奈酚生物功能研究进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(4): 400-405.
- [10] Palomino D C, Marti L C. Chemokines and immunity [J]. *Einstein (Sao Paulo)*, 2015, 13(3): 469-473.
- [11] De Paepe B, Creus K K, De Bleecker J L. Chemokines in idiopathic inflammatory myopathies[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 2548-2577.
- [12] Civatte M, Bartoli C, Schleinitz N, et al. Expression of the beta chemokines CCL3, CCL4, CCL5 and their receptors in idiopathic inflammatory myopathies [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2005, 31(1): 70-79.
- [13] Lightfoot A P, Sakellariou G K, Nye G A, et al. SS-31 attenuates TNF- α induced cytokine release from C2C12 myotubes[J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 253-259.
- [14] Bhatnagar S, Panguluri S K, Gupta S K, et al. Tumor necrosis factor-alpha regulates distinct molecular pathways and gene networks in cultured skeletal muscle cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13262.
- [15] Ding M, Huang T, Zhu R, et al. Immunological behavior analysis of muscle cells under IFN- γ stimulation *in vitro* and *in vivo*[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2018, 301(9): 1551-1563.
- [16] Tureckova J, Wilson E M, Cappalonga J L, et al. Insulin-like growth factor-mediated muscle differentiation: collaboration between phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-signaling pathways and myogenin [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 39264-39270.
- [17] Jacquemin V, Butler-Browne G S, Furling D, et al. IL-13 mediates the recruitment of reserve cells for fusion during IGF-1-induced hypertrophy of human myotubes[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 4): 670-681.
- [18] Schultze S M, Hemmings B A, Niessen M, et al. PI3K/Akt, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2012, 14: e1.
- [19] Kim J, Park M Y, Kim H K, et al. Cortisone and dexamethasone inhibit myogenesis by modulating the Akt/mTOR signaling pathway in C2C12 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2016, 80(11): 2093-2099.
- [20] Cargnello M, Roux P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011, 75(1): 50-83.
- [21] Zeng W, Yan Y, Zhang F, et al. Chrysin promotes osteogenic differentiation *via* ERK/MAPK activation [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(7): 539-547.
- [22] Kitakaze T, Jiang H, Nomura T, et al. Kaempferol promotes glucose uptake in myotubes through a JAK2-dependent pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(47): 13720-13729.
- [23] Zammit P S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, 72: 19-32.
- [24] Elkina Y, von Haehling S, Anker S D, et al. The role of myostatin in muscle wasting: an overview [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2011, 2(3): 143-151.