

文章编号 1006-8147(2023)01-0041-05

论 著

## 二甲双胍通过调控 MSTN 抑制小鼠骨骼肌细胞 C2C12 分化

郭洋,张露露,牛文彦

(天津医科大学基础医学院免疫学系,天津 300070)

**摘要** 目的:探讨二甲双胍对小鼠骨骼肌细胞 C2C12 分化的影响及其分子机制。方法:将小鼠骨骼肌 C2C12 细胞系分为对照组和二甲双胍(5 mmol/L)组,用含 5% 马血清分化培养基诱导 C2C12 细胞分化,观察肌管形成情况。qPCR 检测肌球蛋白重链(MyHC)和肌肉生长抑制素(MSTN)mRNA 水平。Western 印迹检测 MyHC、I 型肌球蛋白重链(MyHC I)、II a 型肌球蛋白重链(MyHC II a)、II b 型肌球蛋白重链(MyHC II b)、II x 型肌球蛋白重链(MyHC II x)和 MSTN 蛋白表达。应用 siRNA 下调 MSTN 的表达,并将小鼠骨骼肌 C2C12 细胞系分为 MSTN 敲低阴性对照组(siNC 组),MSTN 敲低阴性对照+二甲双胍组(siNC+metformin 组),MSTN 敲低组(siMSTN 组),MSTN 敲低+二甲双胍组(siMSTN+metformin 组),检测二甲双胍是否通过升高 MSTN 抑制 C2C12 细胞分化。结果:显微镜观察显示,与对照组相比,二甲双胍组肌管数量减少、肌管直径较小。qPCR 结果显示,与对照组相比,二甲双胍组 MyHC mRNA 水平降低( $t=29.47, P<0.0001$ ),MSTN mRNA 水平增加( $t=14.14, P<0.001$ )。Western 印迹结果显示,与对照组相比,二甲双胍组 MyHC 蛋白水平降低( $t=12.57, P<0.001$ ),MSTN 蛋白水平升高( $t=6.555, P<0.01$ ),MyHC I、MyHC II a、MyHC II b 和 MyHC II x 蛋白水平降低( $t=9.288, 6.140, 8.348, 14.75$ , 均  $P<0.01$ )。应用 siRNA 下调 MSTN 的表达,与 siNC 组相比,siNC+metformin 组 MyHC 蛋白水平显著降低( $P<0.001$ ),与 siNC+metformin 组相比,siMSTN+metformin 组 MyHC 蛋白水平升高( $F=12.44, P<0.001$ )。结论:二甲双胍通过调控 MSTN,抑制小鼠骨骼肌细胞 C2C12 分化。

**关键词** 二甲双胍;骨骼肌;分化;MSTN

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

### Metformin inhibits the differentiation of C2C12 murine skeletal muscle cells by regulating MSTN

GUO Yang, ZHANG Lu-lu, NIU Wen-yan

(Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effect of metformin on differentiation of murine C2C12 skeletal muscle cells and its potential molecular mechanism. **Methods:** Murine skeletal muscle C2C12 cells were divided into control group and metformin(5 mmol/L) group. The differentiation medium containing 5% horse serum was used to induce the differentiation of C2C12 cells and the formation of myotubes was observed. The mRNA levels of myosin heavy chain(MyHC) and myostatin(MSTN) were detected by qPCR. The protein expression of MyHC I, MyHC II a, MyHC II b, MyHC II x and MSTN were detected by Western blotting. Murine skeletal muscle C2C12 cell lines were divided into MSTN knockdown negative control group (siNC group), MSTN knockdown negative control +metformin group (siNC+metformin group), MSTN knockdown group (siMSTN group), MSTN knockdown+metformin group (siMSTN+metformin group), and the expression of MSTN was down-regulated by siRNA to investigate whether metformin inhibited the differentiation of C2C12 cells by regulating MSTN. **Results:** Compared with the control group, the metformin group had less myotube number and diameter. The qPCR results showed that compared with the control group, the level of MyHC mRNA in metformin group decreased ( $t=29.47, P<0.0001$ ), while the level of MSTN mRNA increased ( $t=14.14, P<0.001$ ). Western blotting results showed that compared with the control group, the expression of MyHC protein in metformin group decreased ( $t=12.57, P<0.001$ ), the expression of MSTN protein increased ( $t=6.555, P<0.01$ ). The protein expression of MyHC I, MyHC II a, MyHC II b and MyHC II x decreased ( $t=9.288, 6.140, 8.348, 14.75$ , all  $P<0.01$ ). The expression of MSTN was down-regulated by siRNA. Compared with siNC group, the expression of MyHC in siNC+metformin group was significantly decreased ( $P<0.001$ ). Compared with siNC+metformin group, the expression of MyHC protein in siMSTN+metformin group was increased ( $F=12.44, P<0.001$ ). **Conclusion:** Metformin inhibits the differentiation of murine C2C12 skeletal muscle cells by regulating MSTN.

**Key words** Metformin; skeletal muscle; differentiation; MSTN

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81870547);天津市教委科研项目(2019ZD028)

作者简介 郭洋(1998-),女,硕士在读,研究方向:医学技术(检验方向);通信作者:牛文彦, E-mail:wniu@tmu.edu.cn。

骨骼肌占人体体重的 40%,其基本功能包括促进机体运动、保持身体姿势和参与呼吸<sup>[1]</sup>。此外,骨骼肌是人体关键的代谢器官,通过调节葡萄糖摄取和胰岛素敏感性等过程维持代谢稳态和代谢健康<sup>[2]</sup>。骨骼肌功能受损或丧失会影响其功能,并增加一些疾病的风险,如糖尿病<sup>[3]</sup>、肌肉萎缩<sup>[4]</sup>和肿瘤<sup>[5]</sup>。骨骼肌由含有大量肌纤维的多核细胞组成<sup>[6]</sup>,根据肌球蛋白重链(MyHC)的不同,成熟哺乳动物骨骼肌纤维可分为 I 型(MyHC I)、II a 型(MyHC II a)、II b 型(MyHC II b)和 II x 型(MyHC II x)<sup>[7]</sup>。肌源性分化是肌肉发育的一个重要过程,它决定了成肌细胞的命运、肌肉的形成和再生。随着骨骼肌分化,成肌细胞退出细胞周期,交叉盒 7(Pax7)等干细胞标志物的表达逐渐消失,同时肌细胞生成素(Myog)、MyHC 等分化标志物逐渐升高<sup>[8]</sup>。多种分子参与调控骨骼肌分化,其中肌肉生成抑制素(MSTN)通过抑制肌源性调节因子 Myog 和成肌分化蛋白(MyoD)等抑制成肌细胞分化<sup>[9]</sup>。

二甲双胍是治疗 2 型糖尿病的一线药物,它还可减轻肝脏脂肪含量和体重,并降低服用该药的糖尿病患者的患癌率<sup>[10]</sup>。二甲双胍的主要作用是通过抑制糖异生从而减少肝葡萄糖的产生,其发挥作用涉及多种机制。二甲双胍抑制肝细胞线粒体电子传递链复合物 I<sup>[11]</sup>,导致 ATP 水平降低和 AMP 水平升高,进而激活 AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)<sup>[12-13]</sup>。此外,二甲双胍也被认为通过改变细胞氧化还原状态增加氧化型辅酶 I (NAD<sup>+</sup>)/还原型辅酶 I (NADH) 比值,从而抑制糖异生<sup>[14]</sup>。鉴于二甲双胍作为临床治疗 2 型糖尿病的常用降糖药被广泛使用,了解其对不同组织的不良反应至关重要,本研究旨在研究二甲双胍对小鼠骨骼肌细胞 C2C12 分化的影响,并探讨相应机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 小鼠骨骼肌细胞株 C2C12(美国 ATCC 公司),DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清、马血清(以色列 Bioind 公司),二甲双胍(美国 Sigma 公司),Lipofectamine TM 2000(美国 Invitrogen 公司),Trizol 裂解液(美国 Ambion 公司),逆转录试剂盒(北京 TransGen Biotech 有限公司),实时荧光定量 RT-PCR Mix(北京 TransGen Biotech 有限公司),罗氏 96 实时荧光定量 PCR 仪,Actinin1 抗体(美国 Sigma 公司),MyHC II b 抗体、MyHC II x 抗体、MSTN 抗体(美国 Proteintech 公司),MyHC I 抗体(美国 DSHB 公司),MyHC II a 抗体(美国 Affinity 公司),MyHC 抗体(美

国 Santa 公司),耦联 HRP 的山羊抗兔抗体和耦联 HRP 的山羊抗鼠抗体(美国 JacksonImmuno Research 公司),增强化学发光底物检测试剂盒(美国 Millipore 公司),Tannon-5200 化学发光成像系统(北京原平皓生物技术有限公司)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 C2C12 细胞接种于培养瓶,使用 DMEM 高糖培养基(含 10%胎牛血清),于 37℃、5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,待细胞密度达到 80%融合时进行细胞传代。传代细胞仍按上述培养条件继续培养,以备后续实验使用。

1.2.2 细胞分化体系的建立及形态学观察 将 C2C12 细胞接种于 12 孔板,待细胞密度达 80%左右时将培养基更换为含 5%马血清(HS)的 DMEM 高糖培养基继续培养,每隔 1 d 换液 1 次,诱导分化 4 d,使用显微镜观察分化后肌管形态并采集图像。药物干预即在基础培养基中加入不同浓度二甲双胍(0.5 mmol/L)。

1.2.3 Western 印迹 收集各组细胞,加入蛋白裂解液置于冰上 15 min,4℃,13 000 r/min,离心 15 min,上清为细胞总蛋白。制备 10%的聚丙烯酰胺凝胶,将 40 μg/孔的蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳。湿转法转膜后,用 3%牛血清白蛋白室温封闭 2 h,加入一抗(Actinin1 按 1:10 000 比例,MyHC I、MyHC II a、MyHC II b、MyHC II x、MSTN 按 1:1 000 比例,MyHC 抗体按 1:500 比例,用 1%BSA 稀释配置),4℃过夜孵育,使用耦联辣根过氧化物酶标记二抗(按 1:5 000 比例,用 1%BSA 稀释配置)室温孵育 2 h。最后 ECL 显色后曝光,Image J 进行定量分析。

1.2.4 RNA 的提取和实时荧光定量 PCR 收集各组细胞,每孔加入 500 μL Trizol 裂解细胞,异丙醇沉淀法提取 RNA。使用分光光度计检测 RNA 浓度后,根据逆转录试剂盒操作步骤逆转录合成 cDNA 并进行 5 倍稀释,按照 cDNA 4 μL,上下游引物各 0.5 μL,2×TransStart Tip Green QpcrSuperMix 10 μL 的体系使用 LightCycler 96 运行程序。具体的程序为:预变性:95℃,300 s;设置 45 个循环:变性:95℃,20 s,退火:60℃,20 s,延伸:72℃,20 s;溶解:95℃,10 s,65℃,60 s,97℃,1 s;冷却:37℃,30 s。根据 qPCR 得出的荧光曲线的 Ct 值,以 β-actin 基因为内参,用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 计算结果。所用到的引物序列见表 1。

1.2.5 siRNA 转染 将 C2C12 细胞接种于 12 孔板,待细胞密度为 50%,进行第 1 次转染。将 siRNA 寡聚物和 Lipofectamine™ 2000 分别加入 Opti-MEM 培养基室温放置 5 min,再混合 siRNA 寡聚物

和 Lipofectamine™ 2000, 室温下孵育 20 min 后加入孔内。待转染 6 h 后弃去转染液, 添加正常培养基进行培养。在 C2C12 细胞分化 24 h 后进行第 2 次转染。引物序列见表 2。

表 1 扩增反应所需引物序列

Tab 1 primer sequences for amplification reaction

基因名称	引物序列 (5'→3')	产物(bp)
MyHC	上游 AGCGAATCGAGGCCAGAG	192
	下游 CCTGCTTGCTGATCCACATC	
MSTN	上游 AATCCCGGTGCTGCCGCTACCCCTCA	172
	下游 GAGCCTCTGGGCTTTGCTT	
β-actin	上游 CCTCTATGCCAACACAGTGC	206
	下游 CCTGCTTGCTGATCCACATC	

注: MyHC: 肌球蛋白重链; MSTN: 肌肉生长抑制素; β-actin: 内参基因

表 2 目的基因 siRNA 序列

Tab 2 siRNA oligomer target sequences

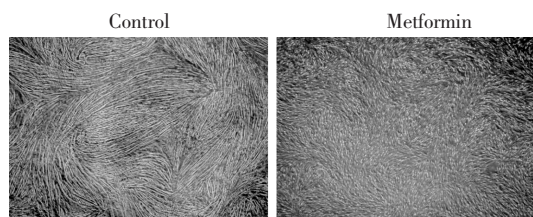
基因名称 siRNA	序列(5'→3')
MSTN	CCCGUCAAGACUCCUACAATT
Negative contro	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT

注: MSTN: 肌肉生长抑制素; Negative control: 阴性对照

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism6 统计软件进行统计学分析, 所有实验数据为重复 3 次实验结果。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间均数比较采用两独立样本均数  $t$  检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

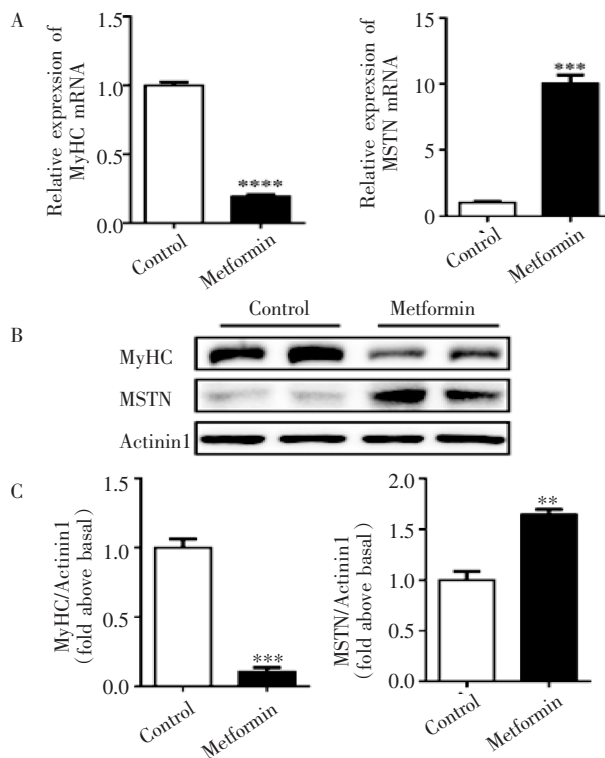
2.1 二甲双胍对 C2C12 细胞分化的影响 显微镜观察 C2C12 细胞分化 4 d 后肌管形态 (图 1), 与对照组相比, 二甲双胍组肌管数量减少、肌管直径较小, C2C12 细胞分化受到抑制。qPCR 和 Western 印迹检测二甲双胍对肌管细胞分化成熟标志蛋白 MyHC 和肌肉生长抑制素 MSTN mRNA 和蛋白水平的作用。如图 2A 和图 2C 所示, 与对照组相比, 二甲双胍组 MyHC mRNA 和蛋白水平均显著降低 ( $t=29.47, 12.57$ , 均  $P < 0.001$ )。同时, 与对照组相比, 二甲双胍组 MSTN mRNA 和蛋白水平均显著升高 ( $t=14.14, 6.555$ , 均  $P < 0.01$ )。



注: Control: 对照; Metformin: 二甲双胍; 比例尺=200 μm

图 1 显微镜观察 C2C12 细胞形态 (4×)

Fig 1 The morphology of C2C12 cells observed by microscope (4×)



注: A: qPCR 检测 C2C12 细胞中 MyHC 和 MSTN 的 mRNA 水平; B: Western 印迹检测 C2C12 细胞中 MyHC 和 MSTN 的蛋白水平; C: 3 次 Western 印迹统计分析结果; Control: 对照; Metformin: 二甲双胍; MyHC: 肌球蛋白重链; MSTN: 肌肉生长抑制素; Actinin1: 内参蛋白; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

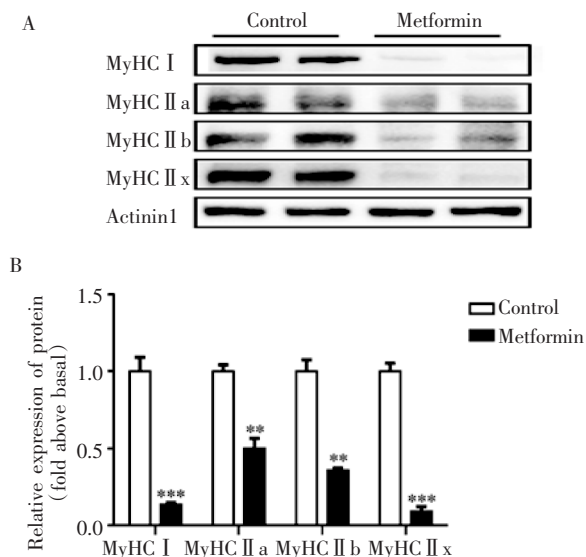
图 2 C2C12 细胞中 MyHC 和 MSTN 的表达

Fig 2 The expression of MyHC and MSTN in C2C12 cells

2.2 二甲双胍对 C2C12 细胞的肌原纤维类型的影响 Western 印迹检测二甲双胍对 C2C12 细胞 MyHC I、MyHC II a、MyHC II b、MyHC II x 蛋白水平的影响, 结果见图 3A 和 3B, 与对照组相比, 二甲双胍组 MyHC II、MyHC II a、MyHC II b、MyHC II x 的蛋白水平均降低 ( $t=9.288, 6.140, 8.348, 14.75$ , 均  $P < 0.01$ )。此外, MyHC I、MyHC II x 较 MyHC II a、MyHC II b 蛋白水平降低更多。

2.3 敲低 MSTN 对二甲双胍抑制 C2C12 细胞分化的影响 Western 印迹检测 C2C12 细胞 MyHC 和 MSTN 蛋白水平。如图 4B 所示, 应用 siMSTN 转染 C2C12 细胞后, 与 siNC+metformin 组相比, siMSTN+metformin 组 MSTN 蛋白水平显著降低 ( $F=15.65$ ,  $P < 0.001$ )。同时, 与 siNC 组相比, siNC+metformin 组 MyHC 蛋白水平显著降低 ( $P < 0.001$ ), 而下调 MSTN 蛋白后, 与 siNC+metformin 组相比, siMSTN+metformin 组 MyHC 蛋白水平升高 ( $F=12.44$ ,  $P < 0.001$ )。显微镜下观察 C2C12 细胞肌管形态, 结果见图 5, 与 siNC 组相比, siNC+metformin 组 C2C12 细胞后肌管直径减小, 敲降 MSTN 后, 与 siNC+metformin 组相比, siMSTN+metformin 组肌管直径增加。

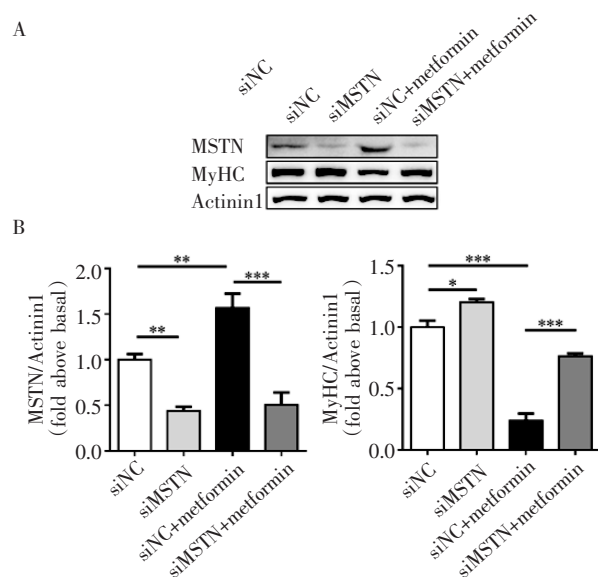




注:A:Western 印迹检测 C2C12 细胞中 MyHC I、MyHC II a、MyHC II b 和 MyHC II x 的蛋白水平;B:3 次 Western 印迹统计分析结果;Control:对照;Metformin:二甲双胍;MyHC I:I 型肌原纤维、MyHC II a:II a 型肌原纤维、MyHC II b:II b 型肌原纤维、MyHC II x:II x 型肌原纤维;Actinin1:内参蛋白;\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

图 3 C2C12 细胞中 MyHC I、MyHC II a、MyHC II b 和 MyHC II x 的表达

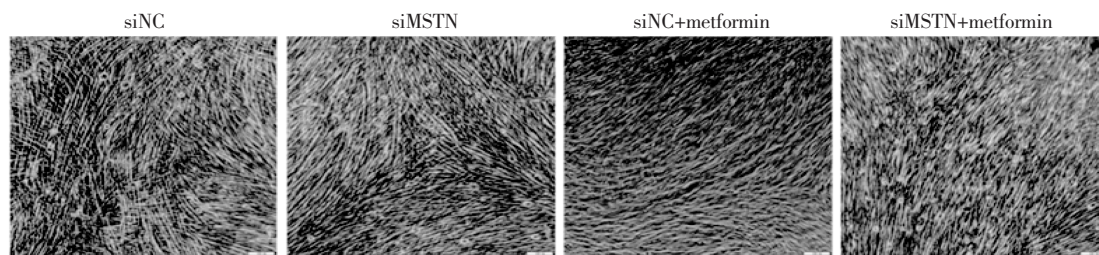
Fig 3 The expression of MyHC I, MyHC II a, MyHC II b and MyHC II x in C2C12 cells



注:A:Western 印迹检测敲低 MSTN 后 C2C12 细胞中 MyHC 和 MSTN 的蛋白水平;B:3 次 Western 印迹统计分析结果;Metformin:二甲双胍;siMSTN:肌肉生长抑制素敲低;siNC:肌肉生长抑制素敲低阴性对照;MSTN:肌肉生长抑制素;MyHC:肌球蛋白重链;Actinin1:内参蛋白;\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

图 4 敲低 MSTN 后 C2C12 细胞中 MyHC 和 MSTN 的表达

Fig 4 The expression of MyHC and MSTN in C2C12 cells after MSTN knockdown



注:Metformin:二甲双胍;siMSTN:肌肉生长抑制素敲低;siNC:肌肉生长抑制素敲低阴性对照;比例尺=100  $\mu\text{m}$

图 5 敲低 MSTN 后显微镜观察 C2C12 细胞形态(10 $\times$ )

Fig 5 The morphology of C2C12 cells observed by microscope after MSTN knockdown(10 $\times$ )

### 3 讨论

二甲双胍是 2 型糖尿病患者使用最广泛的降糖药物,但长期服用会引起多种不良反应,包括影响肌肉功能,二甲双胍对肌肉的作用还存在争议。最近一项研究表明,二甲双胍对健康老年人抗阻力训练的肌肉肥大反应有负面影响,与二甲双胍治疗组相比,安慰剂组的身体和大腿的肌肉质量增加更多<sup>[15]</sup>。而先前研究表明,接受二甲双胍治疗的糖尿病患者肌肉质量增加<sup>[16]</sup>。因此,深入了解二甲双胍对肌肉的作用,并寻找相关分子机制,可为临床用药提供指导。本研究用二甲双胍处理小鼠骨骼肌细胞 C2C12 分化 4 d,与对照组相比,二甲双胍组肌管数量减少、肌管直径较小,肌管分化成熟标志蛋白 MyHC mRNA 和蛋白水平降低,表明二甲双胍对

C2C12 细胞分化具有抑制作用,这与之前的研究结果一致<sup>[17]</sup>。接下来,笔者进一步研究了二甲双胍对 C2C12 细胞肌原纤维类型的影响以及二甲双胍抑制 C2C12 细胞分化相关机制。

骨骼肌由含大量的肌纤维的多核细胞组成<sup>[6]</sup>,根据肌球蛋白重链的不同,成熟哺乳动物骨骼肌纤维可分为 MyHC I、MyHC II a、MyHC II b 和 MyHC II x<sup>[7]</sup>。慢肌纤维主要由 MyHC I、MyHC II a 肌原纤维组成,富含肌红蛋白和线粒体,抗疲劳能力强。MyHC II b 肌原纤维主要存在于快收缩肌中,其肌红蛋白和线粒体含量低,抗疲劳能力弱<sup>[18]</sup>。骨骼肌纤维类型转化与人体肌肉和代谢性疾病有直接关系。例如 2 型糖尿病患者的骨骼肌中,慢肌纤维的比例下降,导致氧化酶活性下降<sup>[19]</sup>。慢性肝病中,肌原纤维从

MyHC II b 向 MyHC I 转化<sup>[20]</sup>。本研究进一步检测了二甲双胍对小鼠骨骼肌细胞 C2C12 肌原纤维类型的影响。与二甲双胍处理抑制 C2C12 细胞分化表型一致,二甲双胍处理使 MyHC I、MyHC II a、MyHC II b 和 MyHC II x 的蛋白水平均降低。此外,与 MyHC II a、MyHC II b 相比,MyHC I、MyHC II x 蛋白水平降低更多,提示二甲双胍可能对各肌原纤维类型有着不同的影响。

MSTN 是转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族成员之一,对肌肉量起负调节作用<sup>[21]</sup>。在 C2C12 细胞中过表达 MSTN 可通过丝裂原活化蛋白激酶激酶 (MEK)/细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)通路下调 MyoD 和 MyoG 基因表达,抑制成肌细胞分化<sup>[22]</sup>。此外,MSTN 可通过抑制成肌细胞中的蛋白激酶 B (Akt)的活化,减少蛋白质的合成,增加蛋白质的分解,从而抑制分化<sup>[23]</sup>。在本研究中,二甲双胍处理使 C2C12 细胞 MSTN 的蛋白表达升高,根据过表达 MSTN 对小鼠骨骼肌细胞分化的抑制作用<sup>[22]</sup>,推测二甲双胍可能通过升高 MSTN 抑制 C2C12 细胞分化。为验证此推测,笔者应用 siMSTN 转染 C2C12 细胞,转染后 MSTN 蛋白水平显著降低,说明 siMSTN 成功下调 MSTN 蛋白水平。接着使用显微镜观察肌管形态,发现二甲双胍处理后肌管直径减小,下调 MSTN 蛋白表达后肌管直径增加。此外,二甲双胍处理后 MyHC 蛋白水平显著降低,下调 MSTN 蛋白表达后 MyHC 蛋白水平升高,说明二甲双胍部分通过升高 MSTN 抑制 C2C12 细胞分化。

综上所述,本研究证明二甲双胍抑制小鼠骨骼肌细胞 C2C12 分化,其机制与二甲双胍升高 MSTN 的蛋白表达有关。

#### 参考文献:

- [1] KAMEI Y, HATAZAWA Y, UCHITOMI R, et al. Regulation of skeletal muscle function by amino acids[J]. *Nutrients*, 2020, 12(1): 261.
- [2] MERZ K E, THURMOND D C. Role of skeletal muscle in insulin resistance and glucose uptake[J]. *Compr Physiol*, 2020, 10(3): 785–809.
- [3] WELCH A A, HAYHOE R P G, CAMERON D. The relationships between sarcopenic skeletal muscle loss during ageing and macronutrient metabolism, obesity and onset of diabetes [J]. *Proc Nutr Soc*, 2020, 79(1): 158–169.
- [4] YIN L, LI N, JIA W, et al. Skeletal muscle atrophy: from mechanisms to treatments[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 172: 105807.
- [5] MARTIN A, FREYSSINET D. Phenotypic features of cancer cachexia-related loss of skeletal muscle mass and function: lessons from human and animal studies[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2021, 12(2): 252–273.
- [6] MORGAN J, PARTRIDGE T. Skeletal muscle in health and disease[J]. *Dis Model Mech*, 2020, 13(2): dmm042192.
- [7] MURGIA M, NOGARA L, BARALDO M, et al. Protein profile of fiber types in human skeletal muscle: a single-fiber proteomics study[J]. *Skelet Muscle*, 2021, 11(1): 24.
- [8] BURKLY L C. Regulation of tissue responses: the TWEAK/Fn14 pathway and other TNF/TNFR superfamily members that activate non-canonical NF $\kappa$ B signaling[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 92.
- [9] GAO L, YANG M, WEI Z, et al. MSTN mutant promotes myogenic differentiation by increasing demethylase TET1 expression via the SMAD2/SMAD3 pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(8): 1324–1334.
- [10] FORETZ M, GUIGAS B, VIOLLET B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(10): 569–589.
- [11] FENG J, WANG X, YE X, et al. Mitochondria as an important target of metformin: the mechanism of action, toxic and side effects, and new therapeutic applications[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 177: 106114.
- [12] HUNTER R W, HUGHEY C C, LANTIER L, et al. Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase[J]. *Nat Med*, 2018, 24(9): 1395–1406.
- [13] HAWLEY S A, ROSS F A, CHEVETZOFF C, et al. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation[J]. *Cell Metab*, 2010, 11(6): 554–565.
- [14] ALSHAWI A, AGIUS L. Low metformin causes a more oxidized mitochondrial NADH/NAD redox state in hepatocytes and inhibits gluconeogenesis by a redox-independent mechanism[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(8): 2839–2853.
- [15] WALTON R G, DUNGAN C M, LONG D E, et al. Metformin blunts muscle hypertrophy in response to progressive resistance exercise training in older adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial: the MASTERS trial[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(6): e13039.
- [16] LEENDERS M, VERDIJK L B, VAN DER HOEVEN L, et al. Patients with type 2 diabetes show a greater decline in muscle mass, muscle strength, and functional capacity with aging[J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2013, 14(8): 585–592.
- [17] PAVLIDOU T, ROSINA M, FUOCO C, et al. Regulation of myoblast differentiation by metabolic perturbations induced by metformin[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182475.
- [18] CHEN X, GUO Y, JIA G, et al. Arginine promotes skeletal muscle fiber type transformation from fast-twitch to slow-twitch via Sirt1/AMPK pathway[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 61: 155–162.
- [19] DAMER A, EL MENIAWY S, MCPHERSON R, et al. Association of muscle fiber type with measures of obesity: a systematic review[J]. *Obes Rev*, 2022, 23(7): e13444.
- [20] AGUIRRE F, ABRIGO J, GONZALEZ F, et al. Protective effect of angiotensin 1–7 on sarcopenia induced by chronic liver disease in mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3891.
- [21] ESPOSITO P, PICCIOTTO D, BATTAGLIA Y, et al. Myostatin: basic biology to clinical application[J]. *Adv Clin Chem*, 2022, 106: 181–234.
- [22] YANG W, CHEN Y, ZHANG Y, et al. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3): 1320–1326.
- [23] BATAILLE S, CHAUVEAU P, FOUQUE D, et al. Myostatin and muscle atrophy during chronic kidney disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2021, 36(11): 1986–1993.

(2022-07-22 收稿)