

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.02.0138

论著

环氧化酶 2 抑制剂 parecoxib 对 C2C12 骨骼肌细胞分化的影响及机制研究

倪钰鸽, 盛菲, 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:探讨环氧化酶 2 抑制剂帕瑞昔布(parecoxib)对 C2C12 小鼠骨骼肌细胞分化的影响及其分子机制。方法:CCK-8 法检测不同浓度的 parecoxib 处理后 C2C12 细胞的活力;分化培养基诱导 C2C12 小鼠骨骼肌细胞 48 h 后,将细胞分为对照组(control 组)和 parecoxib 组继续分化 48 h。免疫荧光检测肌管细胞分化成熟的标志蛋白肌球蛋白重链(MyHC),qPCR 和 Western 印迹分别检测 MyHC、肌原纤维 I 型(Myh7)、II a 型(Myh2)、II b 型(Myh4)、II x 型(Myh1)、肌生成决定因子(Myod)、肌生成因子 5(Myf5)、肌生成素(myogenin)的基因和蛋白表达。结果:0、100、150、200、250、300 $\mu\text{mol/L}$ 的 parecoxib 均不影响细胞活力。与对照组相比,parecoxib 组 MyHC 阳性肌纤维数量减少,肌管融合受损,分化程度降低,MyHC、MyHC II a、MyHC II b、MyHC II x、MyoG、MyoD 和 Myf5 的 mRNA 水平降低($t=19.04, 53.93, 72.38, 33.72, 15.32, 3.061, 18$, 均 $P<0.05$),MyHC I 的 mRNA 水平升高($t=17.12, P<0.01$)。Western 印迹结果显示,与对照组相比,parecoxib 组 MyHC、MyHC II a、MyHC II b、MyHC II x、MyoG 和 MyoD 蛋白水平降低($t=7.297, 7.852, 11.43, 227, 80.14, 11.76$, 均 $P<0.01$),MyHC I 蛋白水平升高($t=5.891, P<0.01$)。结论:Parecoxib 可能通过下调 MyoG、MyoD 和 Myf5 的表达,抑制 C2C12 骨骼肌细胞的分化。

关键词 环氧化酶 2 抑制剂;骨骼肌;肌原纤维;细胞分化

中图分类号 R392.1

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)02-0138-06

Study of effect and mechanism of cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib on the differentiation of C2C12 skeletal muscle cells

NI Yuge, SHENG Fei, NIU Wenyan

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

Abstract Objective: To investigate the effect of parecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, on the differentiation of C2C12 skeletal muscle cells and its potential molecular mechanism. **Methods:** The Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect the viability of C2C12 cells treated with different concentrations of parecoxib. C2C12 mouse skeletal muscle cells were incubated with differentiation medium for 48 hours. Then the cells were divided into control group and parecoxib group for further differentiation for 48 hours. Immunofluorescence was used to detect myosin heavy chain (MyHC), a marker of differentiation and maturation of myotubule cells. The mRNA and protein expression of MyHC, MyHC I (Myh7), II a (Myh2), II b (Myh4), II x (Myh1), myogenic determinant (MyoD), myogenic factor 5 (Myf5) and Myogenin were detected by qPCR and Western blotting, respectively. **Results:** 0, 100, 150, 200, 250 and 300 $\mu\text{mol/L}$ parecoxib did not affect cell viability. Immunofluorescence data showed that compared with the control group, the number of MyHC-positive muscle fibers in the parecoxib group was reduced, muscle tube fusion was impaired, and the degree of differentiation was reduced. The results of qPCR showed that compared with the control group, the mRNA levels of MyHC, MyHC II a, MyHC II b, MyHC II x, MyoG, MyoD and Myf5 in the parecoxib group were decreased ($t=19.04, 53.93, 72.38, 33.72, 5.32, 3.061, 18$, all $P<0.05$), and the mRNA level of MyHC I was increased ($t=17.12, P<0.01$). Western blotting results showed that compared with the control group, the protein levels of MyHC, MyHC II a, MyHC II b, MyHC II x, MyoG and MyoD in the parecoxib group were decreased ($t=7.297, 7.852, 11.43, 227, 80.14, 11.76$, all $P<0.01$), and the MYHC I protein level was increased ($t=5.891, P<0.01$). **Conclusion:** Parecoxib may inhibit the differentiation of C2C12 skeletal muscle cells by down-regulating the expression of MyoG, MyoD and Myf5.

Key words cyclooxygenase-2 inhibitors; skeletal muscle; myofibril; cell differentiation

骨骼肌是人体的重要器官,约占人体重量的40%~50%^[1-2]。其正常功能受损会增加许多疾病的风

险,如糖尿病、肌肉萎缩和癌症^[1]。肌发生包括成肌细胞的增殖、迁移和分化以及多细胞肌管融合成可收缩的骨骼肌纤维^[1]。骨骼肌分化主要由肌生成调节因子(MRFs)调节。肌生成决定因子(Myod)和肌生成因子 5(Myf5)通过促进成肌祖细胞的增殖和向

基金项目 国家自然科学基金面上项目(82270856)

作者简介 倪钰鸽(1998-),女,硕士在读,研究方向:医学检验技术;

通信作者:牛文彦, E-mail:wniu@tmu.edu.cn。

成肌细胞的分化,参与骨骼肌发育的第一阶段。肌生成素(myogenin)在成肌细胞向肌管分化的过程中起着至关重要的作用。肌球蛋白重链(MyHC)是肌源性分化的最终标志^[3]。根据 MyHC 亚型的表达,肌纤维大致可分为 4 种类型: I 型(Myh7,慢氧化型)、II a 型(Myh2,快氧化型)、II b 型(Myh4,快速糖酵解型)和 II x 型(Myh1,快速氧化-糖酵解型)^[4]。

环氧化酶(COX)有 3 种亚型,即 COX-1、COX-2 和 COX-3。其中 COX-2 是前列腺素(PG)合成的关键酶,负责生成 PGE2 等,是缓解疼痛和治疗炎症的靶标。有研究表明,COX-2 在癌症的治疗^[5]、动脉粥样硬化等心血管疾病^[6]以及代谢综合征中起着重要的作用。近年研究发现,COX-1 和 COX-2 对骨骼肌的形成以及潜在的肌肉修复和再生非常重要^[9]。帕瑞昔布(parecoxib)是一种非甾体抗炎药(NSAID),可选择性阻断 COX-2 的作用,在临床实践中广泛用于术后疼痛缓解,但对骨骼肌分化的影响未见研究。本研究探讨了 parecoxib 在 C2C12 骨骼肌细胞分化以及肌纤维类型转换中的作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 小鼠骨骼肌细胞株 C2C12(ATCC),DMEM 培养基(GIBO),胎牛血清(FBS)、马血清(HS)(Vivacell),胰酶(新赛美),二甲基亚砜(Sigma),parecoxib(MCE),CCK-8 试剂盒(爱必信),Trizol(Ambion),逆转录试剂盒,qPCR Mix(全式金),罗氏 96 qPCR 仪,Actinin 1(sigma),MyHC、MyoG、MyoD(Santa),MYH I、MYH II b、MYH II x(Protein-tech),MYH II a(Affinity),DAPI,荧光二抗(博诚科技),山羊抗兔和抗鼠抗体(CST),化学发光底物显影液(GenStar),Tannon-5200。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 液氮中取出冻存的 C2C12 细胞于 37℃恒温槽中迅速融化,置于含 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基中,放于 37℃,5% CO₂ 的孵箱中,等细胞生长到 80%~90%融合时使用胰酶消化传代,接种到培养板中。

1.2.2 诱导分化与药物处理 C2C12 细胞传代后接种于 12 孔板中,等到细胞生长至融合度约 80%时,换诱导分化培养基(DMEM+5%HS),后续每 24 h 换 1 次分化液,分化 4 d,在显微镜下观察细胞形态和生长状况。药物处理即在分化培养基中分别加入二甲基亚砜和 300 μmol/L parecoxib。

1.2.3 CCK-8 实验 C2C12 细胞传代后接种于 96 孔板,每 100 μL 接种 5×10³ 个细胞,在培养箱中预培养 2~6 h 使细胞贴壁,然后加入 0、100、150、200、

250、300 μmol/L parecoxib 共孵育 48 h,避光条件下每孔加入 100 μL 培养基和 CCK-8 试剂的混合液(比例为 9:1),1 h 后,450 nm 检测吸光度。

1.2.4 细胞免疫荧光 C2C12 细胞使用分化培养基诱导分化 48 h 后,分别使用 DMSO 和 300 μmol/L 的 parecoxib 处理 48 h。弃去培养基,PBS 缓冲液冲洗细胞两次,吸净 PBS 后,使用 4%PFA 固定 C2C12 细胞,1%Triton X-100(用 PBS 配制)打孔。使用 PBS 配制的 1%BSA 作为封闭液,室温下封闭 1 h。用 MyHC 抗体在 4℃摇床孵育 12~16 h。在避光的条件下,用山羊抗鼠(GM)荧光二抗室温孵育 30~60 min。将 DAPI 稀释 1 000 倍,染色细胞核 10 min,荧光显微镜收集图片。

1.2.5 RNA 提取和 qPCR C2C12 细胞诱导分化 48 h 后,分别使用 DMSO 和 300 μmol/L parecoxib 处理细胞 48 h,弃去培养基,用预冷的 PBS 冲洗细胞,吸净 PBS 后,12 孔板每孔加入 0.5 mL Trizol 裂解细胞,之后加入 0.1 mL 氯仿取代物抽提 RNA。12 000×g,4℃离心 15 min,收集透明层,使用与上清同等量的异丙醇沉淀 RNA,75%乙醇清洗,8 000×g,4℃离心 5 min,重复 3 次。用高压水溶解沉淀,测定 RNA 浓度。以 RNA 为模板,使用随机引物逆转录合成 cDNA 双链。按照全氏金说明书配制 20 μL 的扩增体系,使用罗氏 PCR 仪扩增。根据仪器所得的熔解曲线确定数据的可用性,导出 Ct 值,以 β-actin 为内参,2^{-ΔΔCt} 法计算结果。引物序列见表 1。

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 AGCGAATCGAGGCCAAGA	192
	下游 TGTCTACTTGGGAGGTTCA	
Myh7	上游 GCCAACTATGCTGGAGCTGATGCCC	136
	下游 GGTGCGTGGAGCGCAAGTTTGTCTATAAG	
Myh2	上游 CCAAGAAAGGTGCCAAGAAG	147
	下游 CGGGAGTCTTTGTTTCATTG	
Myh4	上游 ACGCTTGACACAGAGTCAG	139
	下游 CTTGGACTCTTCCTCTAGCTGCC	
Myh1	上游 ACCAAGGAGGAGGAACAGCAGC	144
	下游 GAATGCCTGTTTGGCCCTGGAG	
MyoD	上游 GTGGCAGCGAGCACTACAGT	177
	下游 ACACAGCCGCACTCTTCCCT	
Myf5	上游 CTTTCTGTGAGAACTGGACCG	118
	下游 TCCTTTCTGAGGCTTGGCTCT	
MyoG	上游 GCACTGGAGTTCGGTCCCAA	112
	下游 TATCCTCCACCGTGATGCTG	
β-actin	上游 AGCGAATCGAGGCCAAGA	192
	下游 CTGCTTGCTGATCCACATC	

注:MyHC:肌球蛋白重链;MyoD:肌生成决定因子;Myf5:肌生成因子 5;MyoG:肌生成素;Myh7: I 型肌原纤维;Myh2: II a 型肌原纤维;Myh4: II b 型肌原纤维;Myh1: II x 型肌原纤维;β-actin:内参基因

1.2.6 Western 印迹 C2C12 细胞在分化培养基中

诱导分化48 h后,使用DMSO和300 $\mu\text{mol/L}$ parecoxib处理细胞48 h,弃去培养基,用预冷的1 \times PBS冲洗细胞,用含有蛋白酶抑制剂PIC、PMSF、氟化钠和钒酸钠的蛋白裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白。配制10%聚丙烯酰胺凝胶,蛋白上样量为30 μg ,电泳,转膜。1 \times PBST配制浓度5%牛血清白蛋白作为封闭液,室温条件下封闭1.5 h。1% BSA配制一抗(Actinin 1按1:5 000, MyHC、MyoG、MyoD按1:500, MyHC I、II a、II b、II x按1:1 000),分别用相应的抗体在4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上孵育12~16 h。1 \times PBST洗膜10 min,共重复4次,使用耦联HRP的二抗(按1:5 000, 1% BSA配制)室温条件下孵育2 h。洗膜后用ECL液(A液与B液按1:1混合)孵育,化学发光成像仪显影。条带使用Image J分析。

1.3 统计学处理 使用GraphPad Prism9进行分析,实验数据均重复3次及以上。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 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 Parecoxib对C2C12细胞的毒性检测 CCK-8检测一定浓度梯度(0、100、150、200、250、300 $\mu\text{mol/L}$)

parecoxib是否对C2C12产生毒性。结果如图1所示,各浓度的parecoxib对C2C12细胞没有毒性作用($F=0.5771$, $P>0.05$),选择300 $\mu\text{mol/L}$ parecoxib作为后续实验浓度。

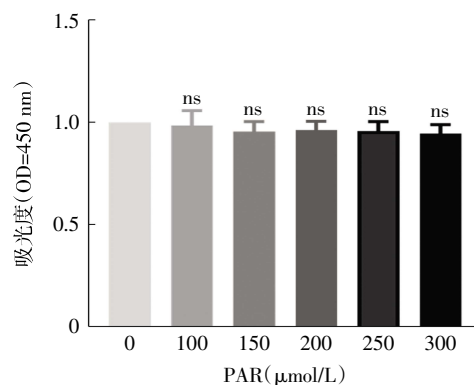
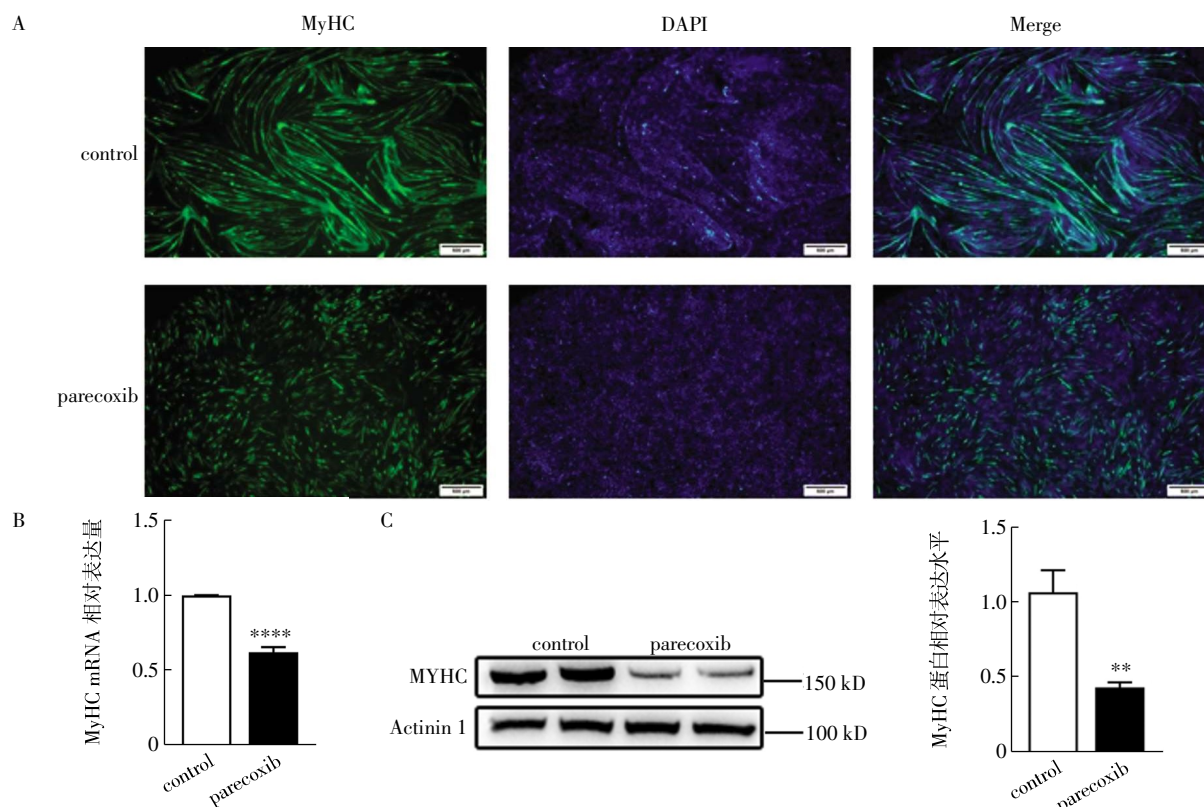


图1 Parecoxib对细胞活力的影响

Fig.1 Effect of parecoxib on cell viability

2.2 Parecoxib对C2C12细胞分化的影响 荧光显微镜观察MyHC阳性肌纤维,结果如图2A所示,与对照组相比,parecoxib组MyHC阳性的肌纤维明显减少,肌管融合受损。qPCR和Western印迹检测肌球蛋白重链MyHC的mRNA和蛋白水平。结果如图2B、C所示,与对照组相比,parecoxib显著降低MyHC mRNA和蛋白水平($t=19.04$, 7.297 , 均 $P<0.01$)。



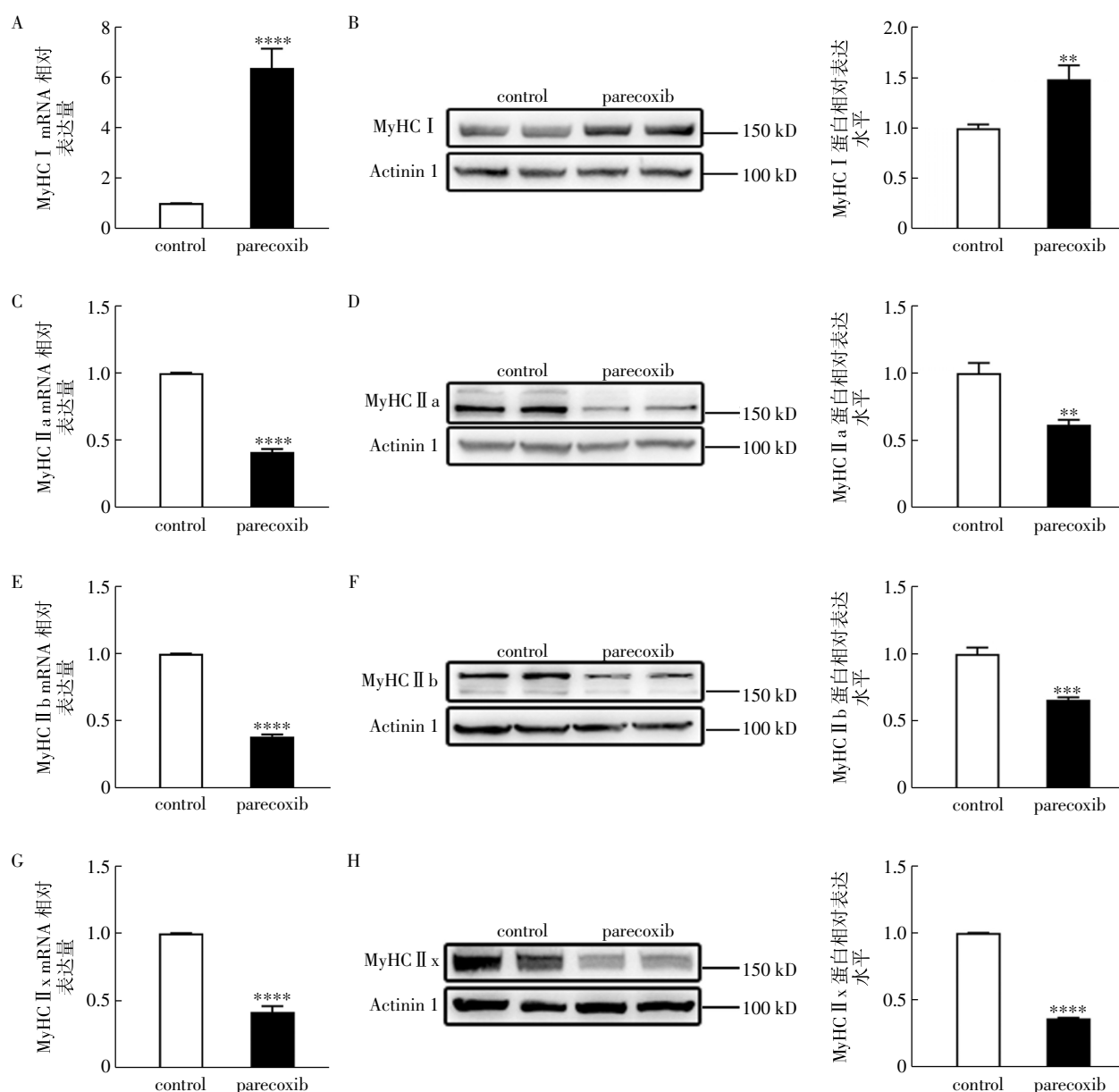
注:A:细胞免疫荧光检测MyHC阳性肌纤维(4 \times),比例尺=500 μm ;B:qPCR检测C2C12肌管中MyHC的mRNA水平($n=3$);Western印迹检测C2C12肌管中MyHC的蛋白水平($n=3$);control:对照组;parecoxib:帕瑞昔布组;MyHC:肌球蛋白重链;Actinin 1:内参蛋白;** $P<0.01$, **** $P<0.0001$

图2 Parecoxib对C2C12细胞分化的影响

Fig.2 Effect of parecoxib on differentiation of C2C12 cells

2.3 Parecoxib 介导 C2C12 细胞肌原纤维类型的转换 qPCR 和 Western 印迹分别检测 parecoxib 对 C2C12 肌管中 MyHC I、II a、II b、II x 的 mRNA 和蛋白水平。结果如图 3 所示,与对照组相比,parecoxib 明显升高 MyHC I 的 mRNA 和蛋白水平($t=17.12、5.891$, 均 $P<0.01$)。相反,parecoxib 组 MyHC II a、MyHC II b、MyHC II x 的 mRNA 和蛋白水平均降低($t=53.93、72.38、33.72、7.852、11.43、227$, 均 $P<0.01$)。

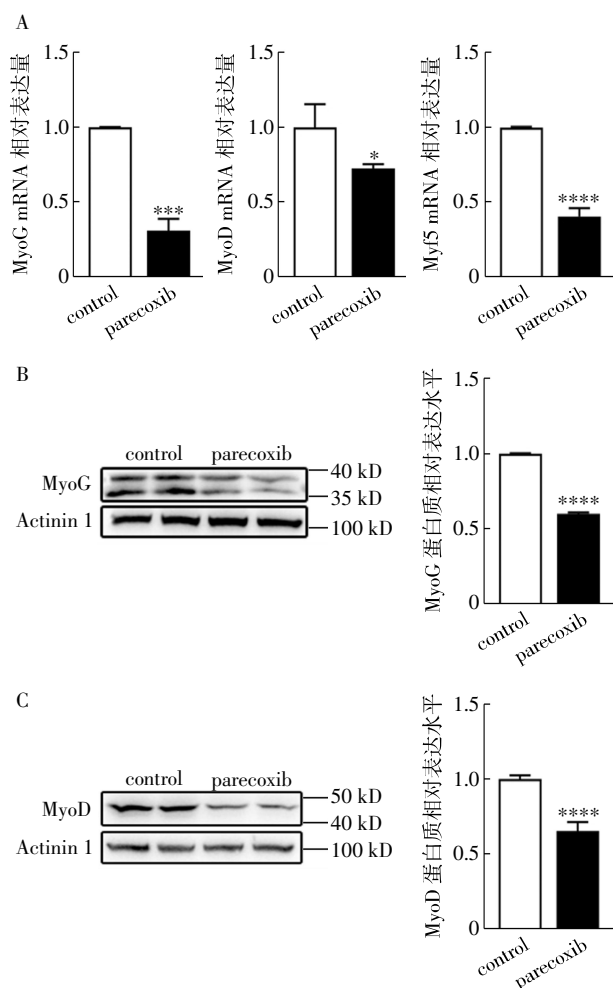
2.4 Parecoxib 对 MRFs 的影响 qPCR 检测 parecoxib 对 C2C12 肌管中 MyoG、MyoD 和 Myf5 的 mRNA 水平的影响。与对照组相比,parecoxib 组 MyoG、MyoD 和 Myf5 的 mRNA 水平均降低($t=15.32、3.061、18$, 均 $P<0.05$),见图 4A。Western 印迹检测 parecoxib 对 C2C12 肌管中 MyoG 和 MyoD 的蛋白水平的影响,与对照组相比,parecoxib 组 MyoG 和 MyoD 的蛋白表达水平也降低($t=80.14、11.76$, 均 $P<0.0001$),见图 4B、4C。



注:A:qPCR 检测 MyHC I 的 mRNA 水平($n=6$);B:Western 印迹检测 MyHC I 的蛋白水平($n=3$);C:qPCR 检测 MyHC II a 的 mRNA 水平($n=5$);D:Western 印迹检测 MyHC II a 的蛋白水平($n=3$);E:qPCR 检测 MyHC II b 的 mRNA 水平($n=3$);F:Western 印迹检测 MyHC II b 的蛋白水平($n=3$);G:qPCR 检测 MyHC II x 的 mRNA 水平($n=6$);H:Western 印迹检测 MyHC II x 的蛋白水平($n=3$);control:对照组;parecoxib:帕瑞昔布组;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;Actinin 1:内参蛋白; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图3 Parecoxib 对 MyHC I、MyHC II a、MyHC II b 和 MyHC II x 的影响

Fig.3 Effect of parecoxib on the expression of MyHC I, MyHC II a, MyHC II b and MyHC II x



注:A:qPCR 检测 MyoG、MyoD 和 Myf5 的 mRNA 水平($n=3$);B:Western 印迹检测 MyoG 的蛋白表达水平($n=3$);C:Western 印迹检测 MyoD 的蛋白表达水平($n=5$);control:对照组;parecoxib:帕瑞昔布组;MyoG:肌细胞生成素;MyoD:肌生成决定因子;Myf5:肌生成因子 5;Actinin 1:内参蛋白;* $P<0.05$, ** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图 4 Parecoxib 对肌生成调节因子的影响

Fig.4 Effect of parecoxib on the expression of Myogenic regulatory factors

3 讨论

COX 是花生四烯酸合成脂质介质(LM)所必需的酶。有研究报道,依赖于 COX-1 和 COX-2 产生的 PG 参与成肌细胞的增殖、迁移和分化^[10],在肌肉再生过程中发挥重要作用^[11]。此外,COX 可以与其他酶如脂氧合酶(LOXs)和细胞色素 p450(CYPs)相互作用,调节 LM 的信号转导。LM 的变化与骨骼肌中 Itrp1(钙信号)和 Myh7(肌源性分化)等基因的表达有关^[9]。Parecoxib 是 COX-2 的选择性抑制剂,对骨骼肌细胞分化的影响尚未报道。本研究使用 parecoxib 处理 C2C12 骨骼肌细胞,发现 parecoxib 降低 MyHC 阳性肌纤维比例,使肌细胞融合受损,并降低 MyHC mRNA 和蛋白水平,提示 parecoxib 抑制 C2C12 细胞的肌源性分化。

骨骼肌是哺乳动物最大的器官^[12]。肌纤维根据收缩和代谢特性一般分为慢肌纤维(I型)和快肌纤维(II型),I型又称为慢氧化型,II型分为快氧化型(IIa型)、快速糖酵解型(IIb型)和中间型(IIx型)^[13]。I型肌纤维抗疲劳能力强,收缩速度慢,含有较多的线粒体。而II型肌纤维抗疲劳能力弱,收缩速度快,含有少量的线粒体^[12,14]。在线粒体肌病引起的肌肉无力中,I型纤维向II型纤维的转化表明线粒体肌病偏向于糖酵解骨骼肌纤维^[15]。运动训练通过增加慢肌纤维的比例和促进线粒体氧化能力而有效地改善肌肉健康。相反,骨骼肌功能障碍,包括慢肌纤维数量减少和能量利用能力下降,与代谢紊乱、心力衰竭和肌肉萎缩症有关^[14]。骨骼肌纤维类型转化与人体肌肉代谢疾病直接相关^[16]。因此,本研究探讨了 parecoxib 是否介导 C2C12 骨骼肌细胞肌原纤维类型之间的转换,发现 parecoxib 显著降低 MyHC II a (Myh2)、MyHC II b (Myh4) 和 MyHC II x (Myh1) 的表达,但升高 MyHC I (Myh7) 的表达,提示 parecoxib 可能介导 II 型肌纤维向 I 型肌纤维的转换。

骨骼肌的形成是一个复杂的过程,首先由间充质干细胞分化成成肌细胞,后者分化为肌细胞并融合形成多核肌管。然后,多个肌管融合形成肌纤维,最终形成成熟骨骼肌。许多转录因子对肌生成具有调节作用,如肌细胞增强因子 2(MEF2)家族、MRFs 家族、配对盒 7(PAX7)和配对盒 3(PAX3)^[17]。其中 MRFs 由 Myf5、MyoD、MyoG 和肌肉特异性调节因子 4(MRF4)组成,在肌生成过程中起着至关重要的作用^[1]。MyoD 和 Myf5 启动成肌祖细胞向成肌细胞的分化,并激活 MRF4 和 myogenin,使成肌细胞分化为肌管^[18]。MyoD 和 MyoG 等 MRFs 调节 MyHC 的表达^[1]。简而言之,MyoD 和 Myf5 必须正常发挥作用,才能使成肌细胞在肌发生决定过程中正常进展。它们的激活导致成肌细胞退出细胞周期,还启动了与后期肌肉分化过程相关的其他转录因子的表达^[18]。有研究表明,持续升高的乳酸通过增加 MyoD 的表达,促进肌源性的分化以及肌纤维的肥大^[19]。Lnc-GD2H 通过在成肌细胞分化过程中增加生肌标志基因肌细胞生成素(Myog)的表达,促进细胞分化^[20]。因此,为进一步阐明 parecoxib 对 C2C12 细胞分化影响的机制,笔者检测了 MyoD、MyoG 和 Myf5 的 mRNA 水平、MyoD 和 MyoG 的蛋白水平,发现 parecoxib 组显著抑制 MyoD、MyoG 和 Myf5 的表达,提示 parecoxib 可能通过下调 MRFs 的表达水平抑制 C2C12 的分化。

综上所述,本研究证明 parecoxib 抑制 C2C12 骨骼肌细胞的分化,介导 II 型肌纤维向 I 型肌纤维的转换,其机制可能与 parecoxib 下调 MyoD、MyoG 和 Myf5 的表达有关。

参考文献:

- [1] LING M, QUAN L, LAI X, et al. VEGFB promotes myoblasts proliferation and differentiation through VEGFR1-PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13352.
- [2] JIANG X, FENG N, ZHOU Y, et al. Slc2a6 regulates myoblast differentiation by targeting LDHB[J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 107.
- [3] JIANG X, JI S, YUAN F, et al. Pyruvate dehydrogenase B regulates myogenic differentiation via the FoxP1-Arh2 axis[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2023, 14(1): 606-621.
- [4] DUAN Y, LI F, TAN B, et al. Metabolic control of myofibers: promising therapeutic target for obesity and type 2 diabetes[J]. *Obes Rev*, 2017, 18(6): 647-659.
- [5] HASHEMI GORADEL N, NAJAFI M, SALEHI E, et al. Cyclooxygenase-2 in cancer: a review[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5683-5699.
- [6] POZNYAK A V, BHARADWAJ D, PRASAD G, et al. Renin-angiotensin system in pathogenesis of atherosclerosis and treatment of CVD[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(13): 6702.
- [7] PAN Y, CAO S, TANG J, et al. Cyclooxygenase-2 in adipose tissue macrophages limits adipose tissue dysfunction in obese mice[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(9): e152391.
- [8] CHAN P C, LIAO M T, HSIEH P S. The dualistic effect of COX-2-mediated signaling in obesity and insulin resistance[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3115.
- [9] MO C, WANG Z, BONEWALD L, et al. Multi-staged regulation of lipid signaling mediators during myogenesis by COX-1/2 pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4326.
- [10] SILVA N C, ALVAREZ A M, DEOCESANO-PEREIRA C, et al. Catalytically active phospholipase A(2) myotoxin from *Crotalus durissus terrificus* induces proliferation and differentiation of myoblasts dependent on prostaglandins produced by both COX-1 and COX-2 pathways[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 187: 603-613.
- [11] ALVAREZ A M, DEOCESANO-PEREIRA C, TEIXEIRA C, et al. IL-1beta and TNF-alpha modulation of proliferated and committed myoblasts: IL-6 and COX-2-derived prostaglandins as key actors in the mechanisms involved[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2005.
- [12] PENG Y, XU M, DOU M, et al. MicroRNA-129-5p inhibits C2C12 myogenesis and represses slow fiber gene expression *in vitro*[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320(6): C1031-C1041.
- [13] ZHANG Y, YANG M, ZHOU P, et al. beta-Hydroxy-beta-methylbutyrate-induced upregulation of mir-199a-3p contributes to slow-to-fast muscle fiber type conversion in mice and C2C12 cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(2): 530-540.
- [14] LIU J, LIANG X, ZHOU D, et al. Coupling of mitochondrial function and skeletal muscle fiber type by a miR-499/Fnrl1/AMPK circuit[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(10): 1212-1228.
- [15] LIU S, YANG D, YU L, et al. Effects of lycopene on skeletal muscle-fiber type and high-fat diet-induced oxidative stress[J]. *J Nutr Biochem*, 2021, 87: 108523.
- [16] HUANG B, JIAO Y, ZHU Y, et al. Mdf1 promotes C2C12 cell differentiation and positively modulates fast-to-slow-twitch muscle fiber transformation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 605875.
- [17] SUN D, AN J, CUI Z, et al. CircCSDE1 regulates proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts by sponging miR-21-3p[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 12038.
- [18] LEE H S, LEE J, LEE S H, et al. 3-MCPD(3-monochloro-1,2-propanediol) inhibit myogenic differentiation in murine skeletal myoblasts[J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 336: 109311.
- [19] TSUKAMOTO S, SHIBASAKI A, NAKA A, et al. Lactate promotes myoblast differentiation and myotube hypertrophy via a pathway involving MyoD *in vitro* and enhances muscle regeneration *in vivo*[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3649.
- [20] CHEN R, LEI S, SHE Y, et al. Lnc-GD2H promotes proliferation by forming a feedback loop with c-Myc and enhances differentiation through interacting with NACA to upregulate Myog in C2C12 myoblasts[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 671857.

(2023-10-13 收稿)

新理念 新定位 新内涵 新医科