

# bFGF通过MAPK信号通路调节Myostatin表达

翟丽丽<sup>1</sup> 王威<sup>2</sup> 余方<sup>2</sup> 张勇<sup>1\*</sup> 朱大海<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005; <sup>2</sup>哈尔滨工业大学, 哈尔滨 150001)

**摘要** 肌肉抑制素Myostatin是TGF- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )超家族成员之一, 在哺乳动物及非哺乳动物中均能够抑制肌细胞的增殖和分化, 是骨骼肌生长的负调控因子。但Myostatin基因自身是如何被调控的目前仍然不十分清楚。该实验发现, 碱性成纤维细胞生长因子bFGF(basic fibroblast growth factor)能够上调Myostatin的表达。进一步分析表明, bFGF对于Myostatin的表达调控存在剂量和时间依赖性。同时实验还发现, MAPK信号通路部分地介导了bFGF对Myostatin基因的表达作用。

**关键词** Myostatin; bFGF; 表达调控

## bFGF Regulates the Expression of Myostatin Partially through MAPK Signal Pathway

Zhai Lili<sup>1</sup>, Wang Wei<sup>2</sup>, Yu Fang<sup>2</sup>, Zhang Yong<sup>1\*</sup>, Zhu Dahai<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China;

<sup>2</sup>Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)

**Abstract** Myostatin (MSTN), a member of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily, is a negative regulator of the skeletal muscle growth by suppressing the proliferation and differentiation of myoblast. In this study, MSTN is up-regulated by basic fibroblast growth factor (bFGF) in a dose and time-point dependent manner. Moreover, MAPK signal pathway is found to partially participate in the effect on Myostatin gene expression induced by bFGF.

**Key words** Myostatin; bFGF; expressional regulation

骨骼肌发育和再生包括肌细胞的增殖、迁移和分化, 是受到精密调控的复杂生物学过程。调控这一过程的因素有很多, 例如肌肉抑制素Myostatin作为TGF- $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ )超家族的成员, 对骨骼肌发育和再生起负调控作用。而一些生长因子, 如碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)则能够促进骨骼肌的再生过程<sup>[1]</sup>。

Myostatin主要在骨骼肌组织中表达, 敲除小鼠骨骼肌比野生型小鼠大2~3倍<sup>[2-3]</sup>。同时多个种属的动物, 例如双肌牛、犬、绵羊和人等Myostatin基因突变后, 骨骼肌均出现与Myostatin基因敲除小鼠骨

骼肌相类似的表型<sup>[4]</sup>, 这表明Myostatin是骨骼肌生长发育的负调控因子。有意义的是, 在肌营养不良小鼠模型(muscular dystrophy murine, mdx小鼠)中, 阻断内源性Myostatin的表达可以改善肌营养不良表型<sup>[5-7]</sup>。在一些慢性废用性肌萎缩病人<sup>[8]</sup>以及HIV感染引起骨骼肌萎缩的病人<sup>[9]</sup>中发现Myostatin异常高表达, 这提示人类中的某些肌萎缩疾病很可能与Myostatin表达异常直接相关。

Myostatin对肌细胞的增殖与分化起重要调控作用。作为TGF- $\beta$ 家族成员, Myostatin通过与ActIIB结合、激活Smad2和Smad3而调控靶基因表达, 最终抑

收稿日期: 2014-03-25 接受日期: 2014-06-03

国家自然科学基金(批准号: 30330430)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-65105081, E-mail: Dr\_zhangyong@126.com; dhzhu@pumc.edu.cn

Received: March 25, 2014 Accepted: June 3, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30330430)

\*Corresponding authors. Tel: +86-10-65105081, E-mail: Dr\_zhangyong@126.com; dhzhu@pumc.edu.cn

网络出版时间: 2014-08-26 14:39 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.09.0089.html>

制成肌细胞分化<sup>[10]</sup>。同时,其他信号传导通路也介导了Myostatin对肌细胞增殖分化的调控,我们实验室发现,Myostatin通过Ras/Raf/MEK/Erk信号转导通路抑制成肌细胞增殖与分化<sup>[11]</sup>;Myostatin还可以通过调控PI3K/Akt/GST-3 $\beta$ 信号转导通路诱导Cyclin D1降解,阻滞细胞从G<sub>1</sub>期向S期的过度<sup>[12]</sup>;Myostatin通过PI3K/PTEN/Akt信号转导通路诱导p300的降解,下调Cyclin D1的表达而抑制细胞增殖<sup>[13]</sup>。对Myostatin调控的下游靶基因的研究发现,Myostatin可以通过下调Pax3、Myf5和MyoD的表达抑制成肌细胞分化<sup>[14-15]</sup>;Myostatin也可以通过激活p21的表达使细胞退出细胞周期而抑制成肌细胞增殖<sup>[15-19]</sup>。另一方面,研究发现Myostatin对骨骼肌的糖脂代谢平衡起到重要的调控作用<sup>[20]</sup>,Myostatin对骨骼肌发育的调控作用可能与其对骨骼肌代谢的调节具有密切的联系。

尽管在Myostatin发挥功能的信号传导通路和下游靶基因研究方面取得很好的进展,但人们对Myostatin基因自身的表达调控仍知之甚少。发现和鉴定调控Myostatin自身基因表达的因子对于深入理解Myostatin的功能具有十分重要的意义。已知bFGF具有促进肌细胞增殖抑制细胞分化的双重功能<sup>[21-22]</sup>。在骨骼肌损伤-再生过程中,损伤的肌纤维和由于肌纤维损伤募集的单核细胞、巨噬细胞能够分泌大量的bFGF,促进骨骼肌损伤再生修复进程<sup>[1,23]</sup>;bFGF能够促进骨骼肌干细胞的增殖而改善mdx小鼠的肌营养不良表型<sup>[23]</sup>。除了细胞增殖,bFGF对肌细胞分化也发挥重要的调控作用。在小鼠成肌细胞系C2C12中,bFGF通过激活p42/p44 MAPK信号通路而抑制肌细胞分化<sup>[24]</sup>。由于bFGF和Myostatin都对细胞分化有抑制作用,我们提出假设:bFGF介导的信号传导通路是否调节Myostatin基因的表达?

为了探讨bFGF信号通路对Myostatin基因转录水平的调控,本研究以鸡胚成肌细胞(chicken fetal myoblasts, CFMs)为研究对象,在诱导细胞分化(更换分化培养基)的过程中,用bFGF处理,然后检测Myostatin基因的表达水平以及对成肌细胞分化的影响,最后探讨bFGF调节Myostatin基因表达的信号传导通路。结果表明,bFGF能够部分地通过MAPK信号通路上调Myostatin的表达。本研究结果对于理解Myostatin基因的自身表达调控机制具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

1.1.1 实验仪器 普通PCR仪(Perkin elmer公司, PE9700)、温度梯度PCR仪(Biometra公司)、高速冷冻离心机(Beckman公司)、TE300荧光倒置显微镜(Nikon公司)、紫外分光光度计(Unicam公司)、液闪仪LS6500(Beckman公司)、X光-洗片机(上海)、高压蒸汽灭菌锅(SANYO)、超纯水系统(Milli-Q)、制冰机(SANYO)、Fluor-s多功能成像系统(Bio-Rad公司)、二氧化碳培养箱(Forma Scientific公司)、-80 °C低温冰箱(Forma Scientific公司)、HZQ-C空气浴振荡器(哈尔滨东明医疗仪器厂)、分子杂交箱(Thermo BioAnalysis公司)、DYY-III2稳压电泳仪(北京六一仪器厂)等。

1.1.2 实验动物 E11肉鸡种蛋(艾维茵,雌雄不限,E11为孵化第11 d的鸡胚)购自哈尔滨市幸福种鸡场,由本实验室依爱牌箱体孵化器自行孵化。

1.1.3 细胞因子(cytokines)和激素类药物 细胞因子rhLIF(recombinant human leukemia inhibitory factor)购自Sigma公司,用含1% BSA的PBS溶解成储备液,待用;rhbFGF(recombinant human basic fibroblast growth factor)购自Invitrogen公司,用含0.1% BSA的10 mmol/L pH7.6的Tris溶液溶解成储备液,待用;rhIGF-I(recombinant human insulin-like factor-I)购自R&D公司,用含0.1% BSA的10 mmol/L的醋酸溶解成储备液,待用。Dex(Dexamethasone,一种肾上腺皮质激素)为国产地塞米松磷酸钠注射液(豫新国际龙源药业有限公司),开封后直接使用。

1.1.4 重组蛋白Myostatin 重组质粒Myostatin-pET28由本实验室杨威博士构建,该质粒经转化*E.coli*菌株BL21,表达带组氨酸尾的小鼠C-半长Myostatin融合蛋白(His-tagged rmMSTN),经复性、金属螯合亲和层析法纯化,浓度为1~2 mg/mL,以重组蛋白处理CFMs时每10 mL培养基中添加200  $\mu$ L(终浓度20~40  $\mu$ g/mL)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 CFMs的分离和培养 按Konigsberg<sup>[25]</sup>的方法以机械法制备CFMs:按标准方法孵化E11的鸡胚,取出胚胎,分离骨骼肌;用剪刀尽量剪碎肌纤维后加入培养液;吸取胸肌组织悬液,以旋涡混合器高速混合;吸取上清液并在生长培养液中进行第二次振荡;孔径为45  $\mu$ m的Nitex筛网过滤,将细胞悬液的密度

调至 $10^5\sim 10^7$ /mL, 接种在直径为90 mm的培养皿中培养。

**1.2.2 Northern blot** 用Trizol提取细胞总RNA, 取10~15  $\mu$ g的RNA进行MOPs凝胶电泳; 电泳结束后, 将RNA条带转移到裁剪好的尼龙膜上并在80 °C烘箱中烤2 h固定, 备用; 探针用 $^{32}$ P-dCTP标记并纯化; 将已变性的探针加入到含尼龙膜的预杂交液中, 42 °C杂交14~16 h; 洗膜后, 将其置于-70 °C冰箱中放射自显影。

**1.2.3 软件及统计学分析** 用制图软件Image J定量Northern blot结果。实验结果采用Excel软件分析, 组间数据差异分析采用配对样本 $t$ 检验。 $P<0.05$ 为

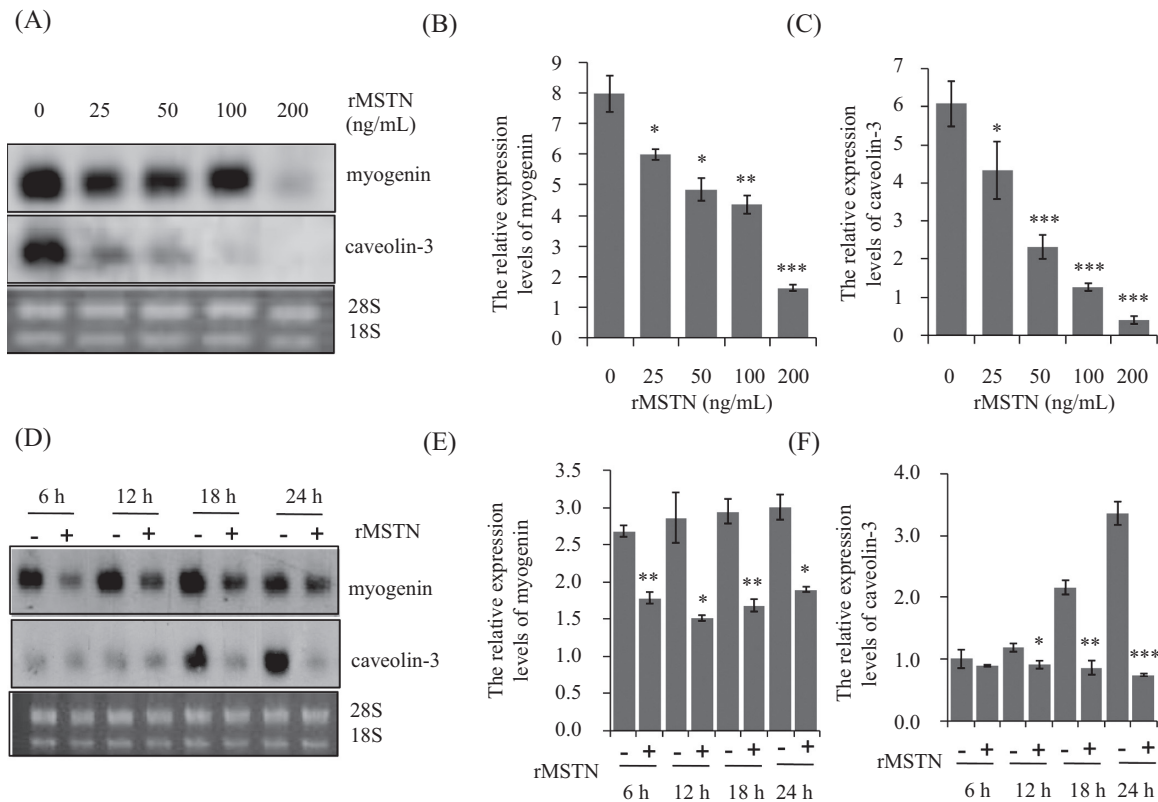
有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 Myostatin抑制CFMs分化

分别用浓度25, 50, 100, 200 ng/mL Myostatin重组蛋白处理在分化培养基中培养的鸡胚成肌细胞, 未处理细胞作为对照, 处理时间24 h。随着Myostatin浓度的增加, 骨骼肌细胞分化相关的标志基因myogenin(图1A和1B)以及caveolin-3(图1A和1C)的表达量逐渐减少。此结果表明, Myostatin以剂量依赖的方式抑制CFMs分化。

用重组蛋白Myostatin处理CFMs, 使其在培养



A: Northern blot方法检测浓度25, 50, 100, 200 ng/mL rMyostatin对鸡胚成肌细胞分化24 h时相关基因myogenin以及caveolin-3的表达, 28S rRNA和18S rRNA作为上样量对照; B: 图A中Northern杂交信号强度用软件定量, 用28S rRNA的信号强度标准化以后的myogenin的表达; C: 图A中Northern杂交信号强度用软件定量, 用28S rRNA的信号强度标准化以后的caveolin-3的表达; D: Northern方法检测200 ng/mL Myostatin对鸡胚成肌细胞分化6, 12, 18, 24 h时分化标志基因myogenin以及caveolin-3的表达, 28S rRNA和18S rRNA作为上样量对照; E: 图D中Northern杂交的信号强度用软件定量, 用28S rRNA的信号强度标准化以后的myogenin的表达; F: 图D中Northern杂交的信号强度用软件定量, 用28S rRNA的信号强度标准化以后的caveolin-3的表达。“-”代表以PBS处理的鸡胚成肌细胞, “+”代表rMyostatin处理的鸡胚成肌细胞。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ 。

A: the expression of myogenin and caveolin-3 in chicken fetal myoblasts treated with different dosages of rMyostatin was analyzed by Northern blot. 28S and 18S rRNA served as loading control; B: myogenin expressions were normalized using 28S rRNA by quantifying the signal intensity of the blot in A; C: normalized caveolin-3 expressions using 28S rRNA by quantifying the signal intensity of the blot in A; D: the expression of myogenin and caveolin-3 in chicken fetal myoblasts treated with 200 ng/mL rMyostatin for the indicated time points was analyzed by Northern blot. 28S and 18S rRNA served as loading control; E: the normalized expressions of myogenin using 28S rRNA based on the quantified signal intensity in D; F: caveolin-3 expressions were normalized using 28S rRNA by quantifying the signal intensity of the blot in D. “-” stands for chicken fetal myoblasts treated with recombinant myostatin (rMyostatin). “+” represents chicken fetal myoblasts treated with PBS as control.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ .

图1 Myostatin以剂量和时间依赖的方式抑制CFMs的分化

Fig.1 Myostatin inhibits CFMs differentiation in a dose and time-dependent manner

基中终浓度为200 ng/mL, 分别处理6, 12, 18, 24 h, 以未处理的CFMs作为对照。Myostatin处理的细胞分化程度比对照低, 细胞几乎无肌管形成(结果未显示); 肌细胞分化标志基因myogenin(图1D和1E)以及caveolin-3(图1D和1F)的表达与对照组相比均下调。此结果表明, Myostatin以时间依赖的方式抑制CFMs分化。

## 2.2 bFGF促进Myostatin的表达

为了探讨bFGF信号通路是否对Myostatin基因转录水平具有调控作用, 我们用重组的人碱性成纤维细胞生长因子(rhbFGF)处理在分化培养基中培养的CFMs, 同时采用另外三种细胞因子作对照: rhLIF、Dex和rhIGF-I。采用rhLIF(25 ng/mL)、rhbFGF(100 ng/mL)、Dex(100 nmol/L)和rhIGF-I(100 ng/mL)分别处理CFMs, 处理24 h后检测内源性Myostatin的表达水平。只有bFGF处理后, Myostatin的表达水平显著上升(图2A和2B)。此研究结果表明, bFGF可以上调Myostatin基因的表达。

## 2.3 bFGF部分地通过MAPK信号通路上调Myostatin的表达

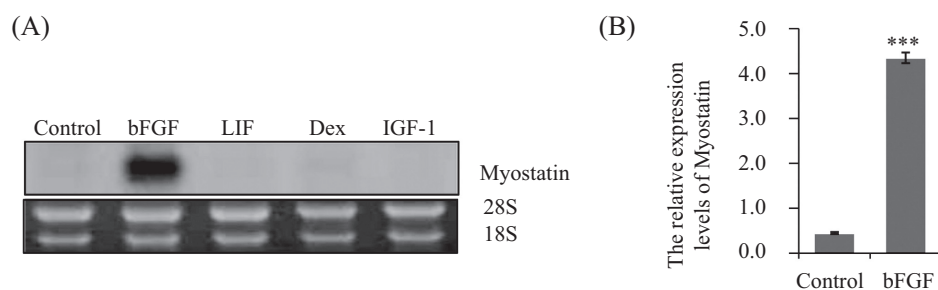
为了进一步探索bFGF对Myostatin的表达调控作用, 我们分别检测了bFGF在不同剂量以及不同作用时间时Myostatin的表达水平。首先, 分别用10, 50, 100, 150 ng/mL的bFGF处理CFMs, 处理24 h后检测Myostatin的转录水平变化。对照组细胞用0.1% BSA溶液处理。结果发现, bFGF对Myostatin的转录调控呈剂量依赖方式: bFGF浓度为10 ng/mL时, 可以检测到Myostatin表达开始升高(信号较弱); 随着bFGF浓度的增加, Myostatin表达升高趋势逐渐显

著。bFGF浓度为100 ng/mL时达到峰值, 并维持恒定(图3A和3B)。此结果表明, bFGF以剂量依赖的方式调节Myostatin基因的表达。

随后, 我们采用了50 ng/mL bFGF处理CFMs, 在处理6, 12, 24, 48 h后分别检测Myostatin的转录水平变化。结果与对照组相比, bFGF处理6 h后基本检测不到Myostatin的表达; 处理12 h后Myostatin开始表达, 并在处理24 h达到峰值; 处理48 h后, Myostatin的表达下调(图3C)。此结果表明, bFGF以时间依赖的方式调节Myostatin基因的表达。

由于在6 h时Northern杂交没有检测到bFGF对Myostatin表达的明显影响, 因此我们采用敏感的Real-time RT-PCR方法进一步检测bFGF处理细胞6 h后对细胞分化和Myostatin的表达情况(图3C和3D)。结果表明, bFGF处理6 h细胞分化相关基因myogenin没有显著变化(图3C), 而Myostatin表达显著上调(图3D)。这说明, bFGF对Myostatin表达上调的作用不是由于bFGF对分化影响导致的。

已知, 在小鼠中bFGF通过MAPK信号通路影响肌细胞分化, 所以为了进一步探索在CFMs中bFGF是如何调控Myostatin表达的, 我们用MAPK信号通路的特异性阻断分子——PD98059处理CFMs, 然后检测Myostatin的表达变化。实验首先采用PD处理CFMs, 作用时间30 min, 阻断细胞内MAPK信号通路后, 再用bFGF处理细胞。结果发现, bFGF对Myostatin基因的转录激活作用明显减弱。因此, 本实验说明MAPK信号通路介导了(至少部分介导了)bFGF对于Myostatin的转录激活效应(图3E)。

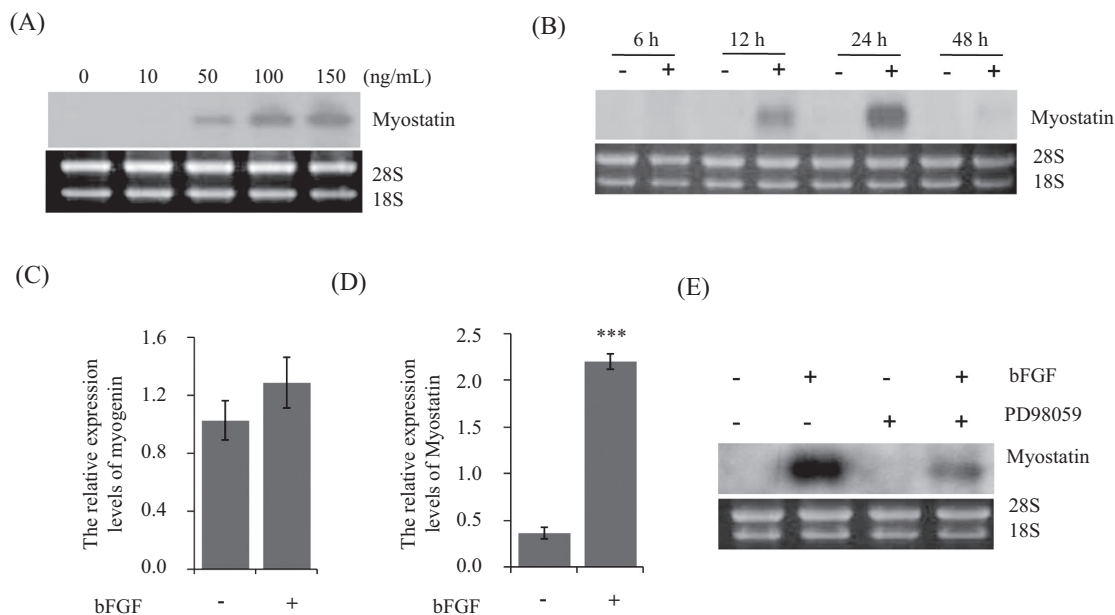


A: Northern blot方法检测bFGF、rhLIF、Dex和rhIGF-I处理CFMs 24 h后内源性Myostatin的表达, 28S rRNA和18S rRNA作为上样量对照; B: Northern blot杂交信号强度用软件定量, 28S rRNA的信号强度标准化后的内源性Myostatin的表达。\*\*\* $P < 0.001$ , 与control组相比较。

A: Northern blot was applied for analysis of Myostatin expression in chicken fetal myoblasts treated with bFGF, rhLIF, Dex and rhIGF-I in differentiation medium for 24 hours (DM 24 h). 28S and 18S rRNA served as loading control; B: the normalized expressions of the endogenous Myostatin using 28S rRNA based on the signal intensity in A. \*\*\* $P < 0.001$  compared with control group.

图2 bFGF上调Myostatin的表达

Fig.2 Expression of Myostatin is up-regulated in CFMs treated with bFGF



A: Northern方法检测浓度10, 50, 100和150 ng/mL的bFGF处理细胞24 h后Myostatin的转录水平变化, 28S rRNA和18S rRNA作为上样量对照; B: 50 ng/mL bFGF处理细胞, 在处理6, 12, 24, 48 h后采用Northern方法分别检测Myostatin的转录水平变化; C: Real-time RT-PCR方法检测bFGF处理细胞6 h后对细胞myogenin的表达; D: Real-time RT-PCR方法检测bFGF处理细胞6 h后对细胞Myostatin的表达; E: Northern方法检测Myostatin的表达变化, 28S rRNA和18S rRNA作为上样量对照。\*\*\* $P < 0.001$ , 与control组相比较。

A: the expression of Myostatin in CFMs treated with different dosages of bFGF for 24 hours was analyzed by Northern blot. 28S and 18S rRNA served as loading control; B: the expression of Myostatin in CFMs treated with 50 ng/mL bFGF for the indicated time points was analyzed by Northern blot. 28S and 18S rRNA served as loading control; C: the relative expression of myogenin in CFMs treated with 50 ng/mL bFGF for 6 hours was analyzed by Real-time RT-PCR; D: Real-time RT-PCR was applied to examine the relative expression of the endogenous Myostatin in CFMs treated with 50 ng/mL bFGF for 6 hours. E: the expression of the endogenous Myostatin in CFMs treated with FGF and PD98059 was analyzed by Northern blot. 28S and 18S rRNA served as loading control. \*\*\* $P < 0.001$  compared with control group.

图3 bFGF部分地通过MAPK信号通路上调Myostatin的表达

Fig.3 Myostatin is up-regulated by bFGF partially through MAPK signal pathway

### 3 讨论

Myostatin通过调节肌细胞的增殖、分化和代谢, 对骨骼肌发育和再生起到重要的负调控作用。目前, 对Myostatin发挥功能的分子机制研究已取得较好的进展。但是, 对Myostatin基因自身的表达调控研究报道较少, 具体的表达调控机理也不十分清楚。由于bFGF信号通路也对肌细胞分化具有抑制作用, 因此, 我们探讨了bFGF信号通路是否通过调节Myostatin基因的表达调控肌细胞的分化。本文的研究结果发现, bFGF可以上调Myostatin基因的表达, MAPK信号通路部分地介导了bFGF对Myostatin基因的调节作用。

bFGF处理CFMs后, 和未处理组比Myostatin基因的表达水平显著上调。进一步分析表明, bFGF对于Myostatin的表达调控存在剂量和时间依赖性。bFGF的生物学功能由其受体所介导多条信号通路来完成, 已知bFGF通过Ras/Raf/MEK/Erk信号传导通路抑制肌细胞分化。为探讨bFGF对Myostatin基因表达调控的信号通路, 我们采用MEK的抑制剂PD98059预处理

细胞再加bFGF, 最后检测Myostatin的表达水平。结果发现, 当MEK/MAPK信号通路被阻断以后, 显著抑制了bFGF对Myostatin表达的促进作用。此结果表明, MAPK信号通路部分地介导了bFGF对Myostatin基因的调节作用。

bFGF与细胞表面的酪氨酸激酶受体结合并引发MAPK信号通路, 促进细胞增殖、抑制肌细胞分化。尽管我们的实验结果表明, bFGF能够部分地通过MAPK信号通路(主要通过MEK)上调Myostatin的表达, 但bFGF是否通过上调Myostatin的表达进而抑制了CFMs的分化, 需要敲低Myostatin的方法进一步验证。另一方面, MAPK家族成员包括ERK1/2、c-JNK和P38等, bFGF究竟通过哪个MAPK调控Myostatin基因的转录也有待进一步研究。

关于Myostatin基因的表达调控机制研究, 除了考虑直接影响细胞增殖与分化的信号传导通路外, 其他信号通路也可能参与肌细胞增殖分化过程中Myostatin基因转录水平的调控。有研究表明, 在小

鼠骨骼肌细胞中, AMP活性蛋白激酶(AMP-activated protein kinase)能够激活Myostatin的表达而抑制肌细胞增殖<sup>[26]</sup>。猪的Myostatin基因启动子序列分析和表达调控研究表明, IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)、PPAR $\gamma$ (peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$ )和MyoD(myogenic differentiation)均可以上调Myostatin的表达, 而C/EBP $\alpha$ 和C/EBP $\beta$ 能够下调Myostatin的表达<sup>[27]</sup>。这些研究结果提示, 受代谢信号调控表达的Myostatin影响了肌细胞的增殖与分化。代谢信号对基因表达调控的研究是一个非常重要的新的研究领域, Myostatin基因表达受代谢信号调控的研究可能为这一领域提供重要信息。

总之, Myostatin作为非常重要的骨骼肌生长发育和代谢调控因子, 它自身的表达调控机理研究为深入理解Myostatin的生理功能及其在骨骼肌相关性疾病中的作用机制具有重要意义。

### 参考文献 (References)

- Lefaucheur JP, Sebille A. Muscle regeneration following injury can be modified *in vivo* by immune neutralization of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor beta 1 or insulin-like growth factor I. *J Neuroimmunol* 1995; 57(1/2): 85-91.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997; 387(6628): 83-90.
- Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 1997; 7(9): 910-6.
- Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 61-86.
- Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, *et al.* Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 2002; 420(6914): 418-21.
- Wagner KR, McPherron AC, Winik N, Lee SJ. Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol* 2002; 52(6): 832-6.
- Whittemore LA, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, *et al.* Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300(4): 965-71.
- Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* 2001; 24(7): 893-9.
- Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, *et al.* Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(25): 14938-43.
- Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 2002; 277(51): 49831-40.
- Yang W, Chen Y, Zhang Y, Wang X, Yang N, Zhu D. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer Res* 2006; 66(3): 1320-6.
- Yang W, Zhang Y, Li Y, Wu Z, Zhu D. Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. *J Biol Chem* 2007; 282(6): 3799-808.
- Ji M, Zhang Q, Ye J, Wang X, Yang W, Zhu D. Myostatin induces p300 degradation to silence cyclin D1 expression through the PI3K/PTEN/Akt pathway. *Cell Signal* 2008; 20(8): 1452-8.
- Amthor H, Huang R, McKinnell I, Christ B, Kambadur R, Sharma M, *et al.* The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. *Dev Biol* 2002; 251(2): 241-57.
- Manceau M, Gros J, Savage K, Thome V, McPherron A, Paterson B, *et al.* Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. *Genes Dev* 2008; 22(5): 668-81.
- Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, *et al.* Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 2000; 275(51): 40235-43.
- Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DH Jr, *et al.* Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280(2): E221-8.
- Ríos R, Carneiro I, ArceVM, Devesa J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282(5): C993-9.
- Jouliá D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B, Cabello G. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res* 2003; 286(2): 263-75.
- Chen Y, Ye J, Cao L, Zhang Y, Xia W, Zhu D. Myostatin regulates glucose metabolism via the AMP-activated protein kinase pathway in skeletal muscle cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42(12): 2072-81.
- Clegg CH, Linkhart TA, Olwin BB, Hauschka SD. Growth factor control of skeletal muscle differentiation: Commitment to terminal differentiation occurs in G<sub>1</sub> phase and is repressed by fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1987; 105(2): 949-56.
- Schofield JN, Wolpert L. Effect of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and bFGF on chick cartilage and muscle cell differentiation. *Exp Cell Res* 1990; 191(1): 144-8.
- Lefaucheur JP, Sebille A. Basic fibroblast growth factor promotes *in vivo* muscle regeneration in murine muscular dystrophy. *Neurosci Lett* 1995; 202(1/2): 121-4.
- Tortorella LL, Milasincic DJ, Pilch PF. Critical proliferation-independent window for basic fibroblast growth factor repression of myogenesis via the p42/p44 MAPK signaling pathway. *J Biol Chem* 2001; 276(17): 13709-17.
- Konigsberg IR. Skeletal myoblasts in culture. *Meth Enzymol* 1979; 58: 511-27.
- Das AK, Yang QY, Fu X, Liang JF, Duarte MS, Zhu MJ, *et al.* AMP-activated protein kinase stimulates myostatin expression in C2C12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 427(1): 36-40.
- Deng B, Wen J, Ding Y, Gao Q, Huang H, Ran Z, *et al.* Functional analysis of pig myostatin gene promoter with some adipogenesis- and myogenesis-related factors. *Mol Cell Biochem* 2012; 363(1/2): 291-9.