

研究论文

低温直接作用于骨骼肌细胞并增加IL-6的表达

刘奔¹, 修雯靖¹, 段进杰¹, 王春旻^{1,2,*}

天津医科大学¹基础医学院生理学与病理生理学系; ²护理学院, 天津 300070

摘要: 在环境温度降低时, 骨骼肌可通过寒颤和非寒颤产热维持体温。除了神经体液调节, 有研究表明脂肪细胞可直接对低温产生反应而增加产热, 提示机体对寒冷刺激存在自身调节。但骨骼肌是否存在不依赖于神经体液调节机制而直接对低温起反应的自身调节还未知。瞬时受体电位通道TRPM8和TRPA1是机体感受寒冷的关键蛋白。本研究通过RT-PCR发现, 小鼠骨骼肌组织及离体培养的C2C12肌管细胞可表达TRPM8。将C2C12肌管细胞置于33 °C低温环境培养6 h后, 转录组学表明低温可改变骨骼肌细胞众多基因表达。通过KEGG-Pathway富集分析发现, 低温刺激可改变IL-17、TNF α 、MAPK、FoxO、Hedgehog、Hippo、Toll-like receptor、Notch、Wnt等重要信号通路。蛋白网络互作分析显示IL-6基因是骨骼肌细胞受低温直接影响的关键基因。进一步研究发现, 33 °C低温环境培养可增加C2C12肌管IL-6 mRNA及蛋白质表达。本研究结果表明, 骨骼肌细胞对低温刺激存在自身调节, 低温可直接上调骨骼肌细胞IL-6的表达。

关键词: 骨骼肌细胞; 低温刺激; 白介素-6; 瞬时受体电位通道M8

Low temperature exposure increases IL-6 expression in skeletal muscle cells

LIU Ben¹, XIU Wen-Jing¹, DUAN Jin-Jie¹, WANG Chun-Jiong^{1,2,*}

¹Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences; ²School of Nursing, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: The shivering and nonshivering thermogenesis in skeletal muscles is important for maintaining body temperature in a cold environment. In addition to nervous-humoral regulation, adipose tissue was demonstrated to directly respond to cold in a cell-autonomous manner to produce heat. However, whether skeletal muscle can directly respond to low temperature in an autoregulatory manner is unknown. Transient receptor potential (TRP) channels TRPM8 and TRPA1 are two important cold sensors. In the current study, we found TRPM8 was expressed in mouse skeletal muscle tissue and C2C12 myotubes by RT-PCR. After exposure to 33 °C for 6 h, the gene expression pattern of C2C12 myotubes was significantly changed which was evidenced by RNA-sequencing. KEGG-Pathway enrichment analysis of these differentially expressed genes showed that low temperature changed several important signaling pathways, such as IL-17, TNF α , MAPK, FoxO, Hedgehog, Hippo, Toll-like receptor, Notch, and Wnt signaling pathways. Protein-protein interaction network analysis revealed that IL-6 gene was a key gene which was directly affected by low temperature in skeletal muscle cells. In addition, both mRNA and protein levels of IL-6 were increased by 33 °C exposure in C2C12 myotubes. In conclusion, our findings demonstrated that skeletal muscle cells could directly respond to low temperature, characterized by upregulated expression of IL-6 in skeletal muscle cells.

Key words: skeletal muscle cells; low temperature; IL-6; TRPM8

骨骼肌是产热的重要器官之一。在环境温度降低时, 骨骼肌可通过寒颤和非寒颤产热维持体温^[1]。

皮肤感受低温刺激后将信息整合至下丘脑后, 通过躯体神经促进骨骼肌寒颤产热, 通过交感神经促进

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81822006) and the Natural Science Foundation of Tianjin, China (No. 20JCYBJC01120).

*Corresponding author. Tel: +86-22-83336591; E-mail: wangchunjiong@tmu.edu.cn

非寒颤产热和血管收缩^[1]。

除了骨骼肌的产热,寒冷对棕色脂肪组织和米色脂肪组织的激活是非寒颤产热的重要途径。然而,有研究表明,寒冷刺激时,在 β 肾上腺素受体缺失的情况下,脂肪组织仍然可以感受寒冷进而激活产热反应^[2]。在离体培养的脂肪细胞,将培养温度降低至 33 °C 培养 2 h 即显著增加解耦联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1) 的表达^[2]。皮下脂肪组织位于体内比较浅表的位置,所以容易受到环境温度的影响。这些信息表明,环境温度降低时,机体应对寒冷存在不依赖神经体液因素的自身调节方式。除了皮下脂肪组织,位置表浅的骨骼肌组织的内环境温度也可被环境温度所影响,但骨骼肌细胞是否可以对寒冷存在不依赖神经体液调节的直接反应还需进一步的研究。

瞬时受体电位通道 (transient receptor potential channels, TRP) 家族成员 TRPM8 和 TRPA1 是机体感受寒冷的关键蛋白,在背根神经节中高表达^[3]。但多项研究表明,它们在多种细胞中均有表达,包括脂肪细胞、平滑肌细胞、内皮细胞等^[4-7]。骨骼肌细胞是否有 TRPM8 和 TRPA1 的表达存在争议,有研究表明 TRPM8 在离体培养的骨骼肌细胞中有表达^[8],但也有研究显示在分化为肌管的 C2C12 细胞中没有检测到 TRPA1 和 TRM8 的表达^[9]。白介素 -6 (interleukin-6, IL-6) 是重要的肌肉因子。IL-6 基因敲除小鼠在 4 °C 环境温度时,体核温度和耗氧量均低于正常小鼠,表明 IL-6 是促进产热的关键细胞因子^[10]。而骨骼肌细胞对低温刺激是否也存在自身调节、低温是否可直接影响骨骼肌细胞 IL-6 的表达还未知。

为了探索骨骼肌细胞对低温的直接反应,本研究首先检测了骨骼肌细胞 TRPM8 和 TRPA1 的表达,然后将细胞培养温度从 37 °C 降至 33 °C, RNA 测序检测细胞基因表达谱的变化,再富集出关键的信号通路,通过蛋白相互作用网络分析发现差异基因中的关键分子。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM 培养基 (货号: 2180438) 购自美国 Gibco 公司,胎牛血清 (货号: C4055L1050) 购自上海李记医药科技有限公司,马血清 (货号: 326J051) 购自博士德生物工程有限公司;抗 IL-6 抗体 (货号: AF0201) 购自中国碧云天生物技术有限

公司;BCA 蛋白质定量试剂盒 (货号: A53225)、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (货号: K1622) 购自美国 Thermo Fisher 公司;ECL 化学发光液 (货号: K003, K004) 购自美国 Affinity Biosciences 公司;聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (货号: IPVH00010) 购自美国 Millipore 公司;抗 eIF5 抗体 (货号: sc-28309) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;Trizol RNA 快速提取试剂盒 (货号: ER501)、实时定量 PCR Super Mix (货号: AQ131) 购自北京全式金生物技术有限公司;实时荧光定量 PCR 引物合成于 Invitrogen 公司 (上海)。

1.2 细胞培养和处理 C2C12 肌管细胞购自美国 ATCC, 15 代以内的细胞用于实验;用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 C2C12 细胞。待细胞融合度达到 85% 以上时,换用含 2% 马血清的 DMEM 诱导分化 7 天,期间隔日更换 1 次培养液,直至 90% 以上的成肌细胞分化为肌管细胞,即成熟肌细胞。将分化的肌管细胞分为对照组 (37 °C) 和低温组 (33 °C),分别放入两种不同温度的培养箱中,培养 0~24 h。

1.3 RNA 提取 取 8 周龄的 C57BL/6 雄鼠 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司) 骨骼肌组织,用 Trizol RNA 提取试剂盒提取小鼠骨骼肌总 RNA;并用 Trizol RNA 提取试剂盒提取相应处理的 C2C12 肌管细胞的总 RNA。

1.4 RNA 测序及数据分析 将分化后的 C2C12 肌管细胞置于 33 °C 培养 6 h,对照细胞培养于 37 °C。提取细胞 RNA,进行 RNA 测序分析。RNA 样本在武汉华大基因科技有限公司用 BGISEQ500 平台进行测序。将变化倍数 \log_2 转换后, ≥ 1.25 或 ≤ -1.25 且错误发现率 (false discovery rate, FDR) ≤ 0.001 的基因定义为差异基因。Gene Oncology 数据库分析差异基因的分类。基于 KEGG Pathway 数据库对差异基因进行 KEGG Pathway 富集, Q 值 ≤ 0.05 的信号通路定义为在差异表达基因中显著富集的信号通路^[11]。基于 String 数据库分析差异基因的蛋白质互作网络。

1.5 逆转录和 PCR 用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 将 RNA 逆转录为 cDNA。用 cDNA 进一步进行 PCR 或实时荧光定量 PCR (quantitative PCR, qPCR)。使用 Taq MasterMix 和相应引物对骨骼肌组织或 C2C12 肌管细胞的 cDNA 进行扩增后,用琼脂糖凝胶电泳检测扩增条带。qPCR

用 Super SYBR Green Mix 和相应引物对 cDNA 模板进行扩增后, 检测相应基因的 mRNA 表达水平。所用的引物序列见表 1。

1.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) C2C12 肌管细胞用 33 °C 处理 0、6、12 或 24 h 后, 提取总蛋白质, BCA 法测定蛋白质浓度。蛋白质变性后行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后通过电转将蛋白质转移至 PVDF 膜。转印有蛋白质的 PVDF 封闭后, 用抗 IL-6 和 eIF5 一抗 4 °C 孵育过夜。用相应二抗室温孵育 1 h 后, 用 ECL 化学发光法显色, 用 ImageJ 软件分析蛋白条带。

1.7 数据统计 用 GraphPad Prism 统计软件进行分析。数据以 mean ± SD 表示。两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C2C12肌管细胞中有TRPM8的表达

首先, 我们检测 TRPA1 和 TRPM8 是否在小鼠骨骼肌组织中表达。结果显示, TRPA1 和 TRPM8 在小鼠骨骼肌组织中均有表达, 但 TRPA1 的扩增条带亮度极弱 (图 1A), 提示小鼠骨骼肌组织中 TRPA1 表达极低, 而 TRPM8 的表达量高于 TRPA1。由于骨骼肌组织由多种细胞组成, 为了研究骨骼肌细胞是否表达 TRPA1 和 TRPM8, 我们将 C2C12 成肌细胞分化 7 天, 使其诱导分化为肌管细胞后, 提取 RNA, 并用 PCR 检测 TRPA1 和 TRPM8 的表达 (图 1B、C)。结果显示, C2C12 肌管细胞中有 TRPA1 和 TRPM8 的表达。并且后续通过 RNA 测序检测发现 C2C12 肌管细胞中有 TRPM8 mRNA 表达, 而 TRPA1 由于表达量极低, 未能检测到。TRPM8 在

表1. PCR和qPCR所用的引物序列

Table 1. List of oligonucleotide primer pairs used in PCR and qPCR

Target gene	Sense primer	Antisense primer
<i>TRPM8</i>	5'-CCTTCGTTGTCTTCGCTTAT-3'	5'-AGTTGTCGTTGGCTTTTCGT-3'
<i>TRPA1</i>	5'-GCAAATCCAAACCTCCGAAAT-3'	5'-TCCCTGCTGTAGCCGTTCT-3'
<i>IL-6</i>	5'-ACAACCACGGCCTTCCCTACTT-3'	5'-CACGATTTCCCAGAGAACATGTG-3'
<i>IL-6Ra</i>	5'-CCCTTGCTGGTGGATGTTTC-3'	5'-CCGTTGGTGGTGTGTTGATTTT-3'
<i>KLF2</i>	5'-GGGAAGGATGCGGCTGGAA-3'	5'-AGGTGGTTCGGACCTGGAGAAGG-3'
<i>EP300</i>	5'-CCCAAGCATAGGGAATCAA-3'	5'-TGGTCAGCAGAAGGAGCAG-3'
<i>Fzd1</i>	5'-GGTGGATGGCGACGTACTGA-3'	5'-GTGCGGATGCGGAAGAGTG-3'
<i>Fos</i>	5'-CCGAAGGGAACGGAATAAG-3'	5'-TCTGGGAAGCCAAGGTCAT-3'
<i>JUN</i>	5'-ACCTTCTACGACGATGCCCTCA-3'	5'-GGAAGCGTGTCTGGCTATGC-3'
<i>18S</i>	5'-GGAAGGGCACCACCAGGAGT-3'	5'-TGCAGCCCCGGACATCTAAG-3'

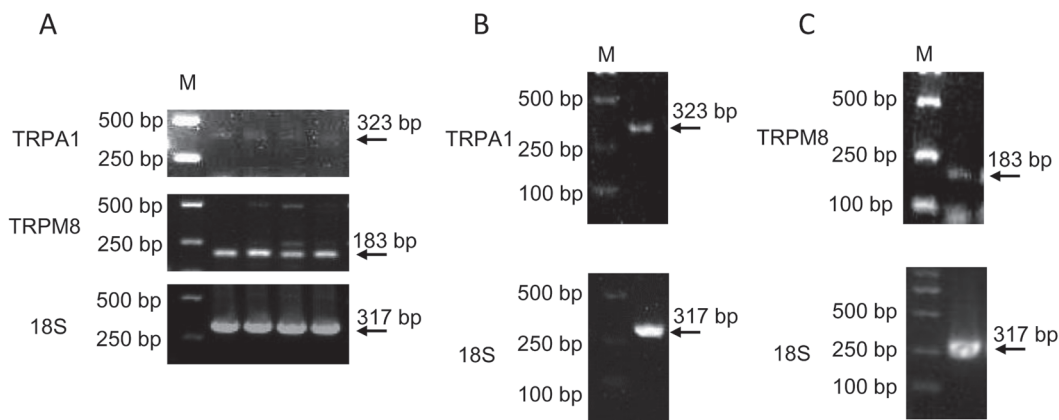


图 1. 小鼠骨骼肌组织以及C2C12肌管中TRPA1和TRPM8的表达

Fig. 1. The expression of TRPA1 and TRPM8 in mouse skeletal muscle tissue (A) and C2C12 myotubes (B–C) detected by RT-PCR followed by agarose gel electrophoresis.

离体 C2C12 肌管细胞中的表达提示骨骼肌细胞能直接感应低温刺激。

2.2 低温处理改变C2C12肌管细胞的基因表达

有研究表明,在寒冷刺激时,人皮下肌肉内的温度可下降 5~7 °C^[12];2013 年的一项研究首次揭示了脂肪细胞可直接感受低温从而影响产热。该研究使用 27~33 °C 处理脂肪细胞,与 37 °C 培养的脂肪细胞相比,UCP1 的表达显著增加^[2]。为了研究低温是否可直接影响骨骼肌细胞的基因表达,我们将分化后的 C2C12 肌管细胞进行 33 °C 的低温培养,对照组持续培养在 37 °C 的环境里。6 h 后提取 RNA,进行 RNA 测序,将变化倍数 log₂ 转换后,≥ 1.25 或 ≤ -1.25 且 FDR ≤ 0.001 的基因定义为差异

基因。结果表明,与 37 °C 培养的细胞相比,33 °C 培养 6 h 后,有 483 个差异表达基因,其中 453 个基因上调,30 个基因下调(图 2A)。用 Gene Ontology 数据库分析差异基因的分类,其中分子功能分类显示,大部分差异基因具有 Binding 功能(图 2B)。

2.3 低温诱导的骨骼肌细胞差异基因可富集到多个重要的信号通路

我们进一步将差异基因进行 KEGG-Pathway 富集,图 3A 显示富集出的前 20 个通路,包括了 IL-17、TNF α 、MAPK、FoxO、Hedgehog、Hippo、Toll-like receptor、Notch、Wnt 等重要信号通路(图 3A)。从差异基因中,我们选取以下基因用 qPCR 对 RNA 测序的结果进行验证:FoxO 通路里的

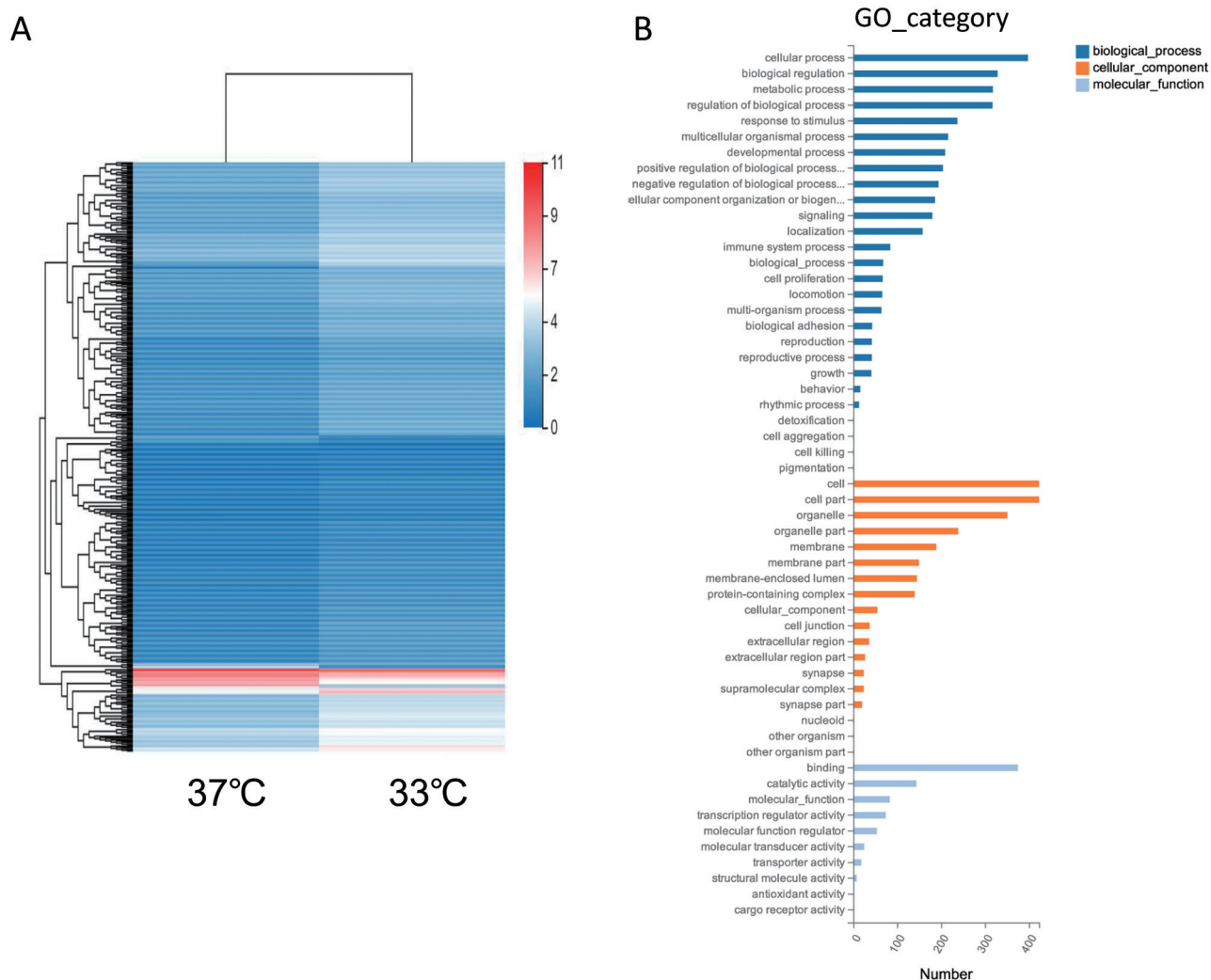


图 2. C2C12肌管在33 °C培养6 h后基因表达变化

Fig. 2. Gene expression was altered in C2C12 myotubes cultured in 33 °C. C2C12 myotubes were cultured in 33 °C for 6 h and control cells were cultured in 37 °C. RNA-sequencing was performed. Heat map (A) and classification (B) of the differentially expressed genes ($|\log_2(\text{fold change})| \geq 1.25$, FDR ≤ 0.001) based on Gene Ontology. FDR: false discovery rate.

IL-6、KLF2 以及 IL-6 的受体 IL6Ra ; FoxO 和 Wnt 通路的 EP300 ; Hippo 及 Wnt 通路的 Fzd1 ; MAPK 和 Toll-like receptor 通路的 Fos 和 JUN。与 RNA 测序结果一致, IL-6 (3.17 倍; $P < 0.05$)、IL-6Ra (1.40 倍; $P < 0.05$)、KLF2 (1.75 倍; $P < 0.05$)、EP300 (2.47 倍; $P < 0.05$)、Fzd1 (1.86 倍; $P < 0.05$) 表达显著上调, Fos (0.49 倍; $P < 0.05$) 和 JUN (0.35 倍; $P < 0.05$) 表达显著下调 (图 3B)。Fos 和 JUN 表达的下调提示了 MAPK 信号通路被抑制。

2.4 蛋白网络互作显示IL-6基因是骨骼肌细胞受低温直接影响的关键基因

将差异基因进行相互作用网络分析, 蛋白网络互作分析展示了每一个差异基因与其他所有差异基因的互作关系, 发现其中 IL-6 基因处于网络的中心位置, 与其他差异基因具有最多的连接数 (图 4A)。骨骼肌组织中释放的 IL-6 除了影响肌肉组织自身的能量代谢和肌蛋白合成以外, 还可以调节脂肪、心脏、脑和免疫系统等多个器官系统的功能^[13]。为了

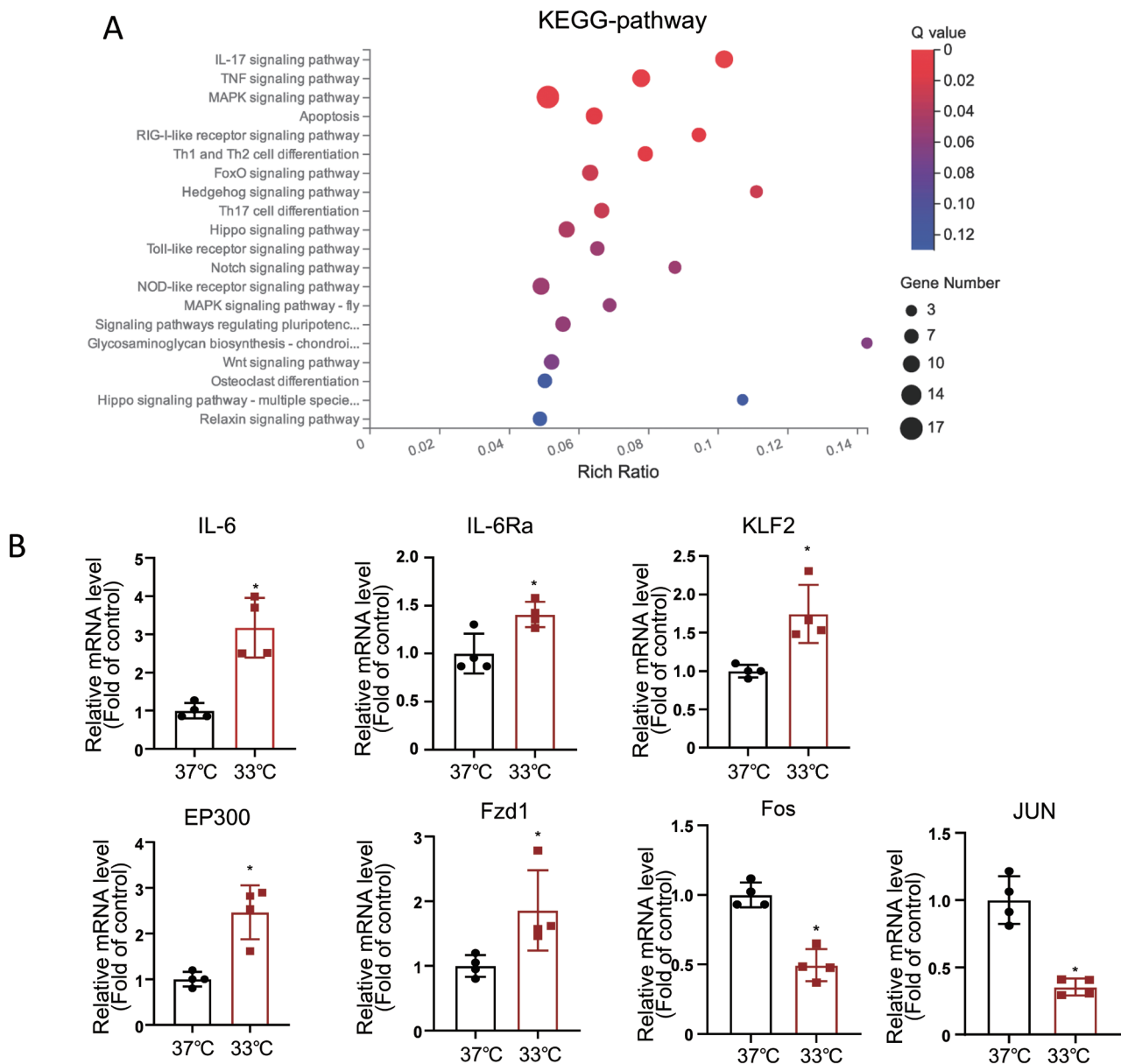


图 3. 低温诱导的骨骼肌细胞差异基因KEGG Pathway富集分析及表达验证

Fig. 3. KEGG Pathway analyses of the differentially expressed genes. A: KEGG Pathway analyses of the differentially expressed genes; top 20 pathways based on the Q value were shown in a bubble chart. B: Validation of the expression level of IL-6, IL-6Ra, KLF2, EP300, Fzd1, Fos and JUN by qPCR. Mean \pm SD, $n = 4$. * $P < 0.05$ vs 37 °C.

进一步研究低温对骨骼肌细胞 IL-6 表达的影响, 我们将分化后的 C2C12 肌管细胞在从 37 °C 的培养环境换到 33 °C 培养 0、2、6、12 和 24 h, 发现 33 °C 培养 2 h 后 IL-6 mRNA 水平即开始升高 (4.33 倍; $P < 0.05$), 6 h 达高峰 (6.91 倍; $P < 0.05$), 12 h 回落 (3.85 倍; $P = 0.09$) (图 4B)。我们进一步发现, 33 °C 低温处理在 24 h 内时间依赖性地提高了 C2C12 肌管细胞中 IL-6 蛋白质表达水平, 其中处理 12 h 和 24 h 显著提高 IL-6 的蛋白质表达水平 (12 h: 6.57 倍; 24 h: 7.40 倍; $P < 0.05$) (图 4C)。以上研究表明, 低温刺激可直接促进骨骼肌细胞中 IL-6 的表达。

3 讨论

TRPM8 和 TRPA1 是 TRP 家族成员, TRP 是一类非选择性阳离子通道并具有感受器的功能^[4]。哺乳动物 TRP 家族包括 6 个亚家族: TRPC、TRPV、TRPML、TRPP、TRPA 和 TRPM^[4]。其中, TRPM8 和 TRPA1 可以被低温所激活。TRPM8 可被轻度低温激活, 而相较于 TRPM8, TRPA 的激活则需要更低的温度^[4]。TRPM8 和 TRPA1 被报道在背根神经节中高表达, 可被低温激活, 是机体感受寒冷的关键蛋白^[3]。它们被认为介导了机体通过神经调节对寒冷的反应。但有研究表明, 离体培养的脂肪细胞

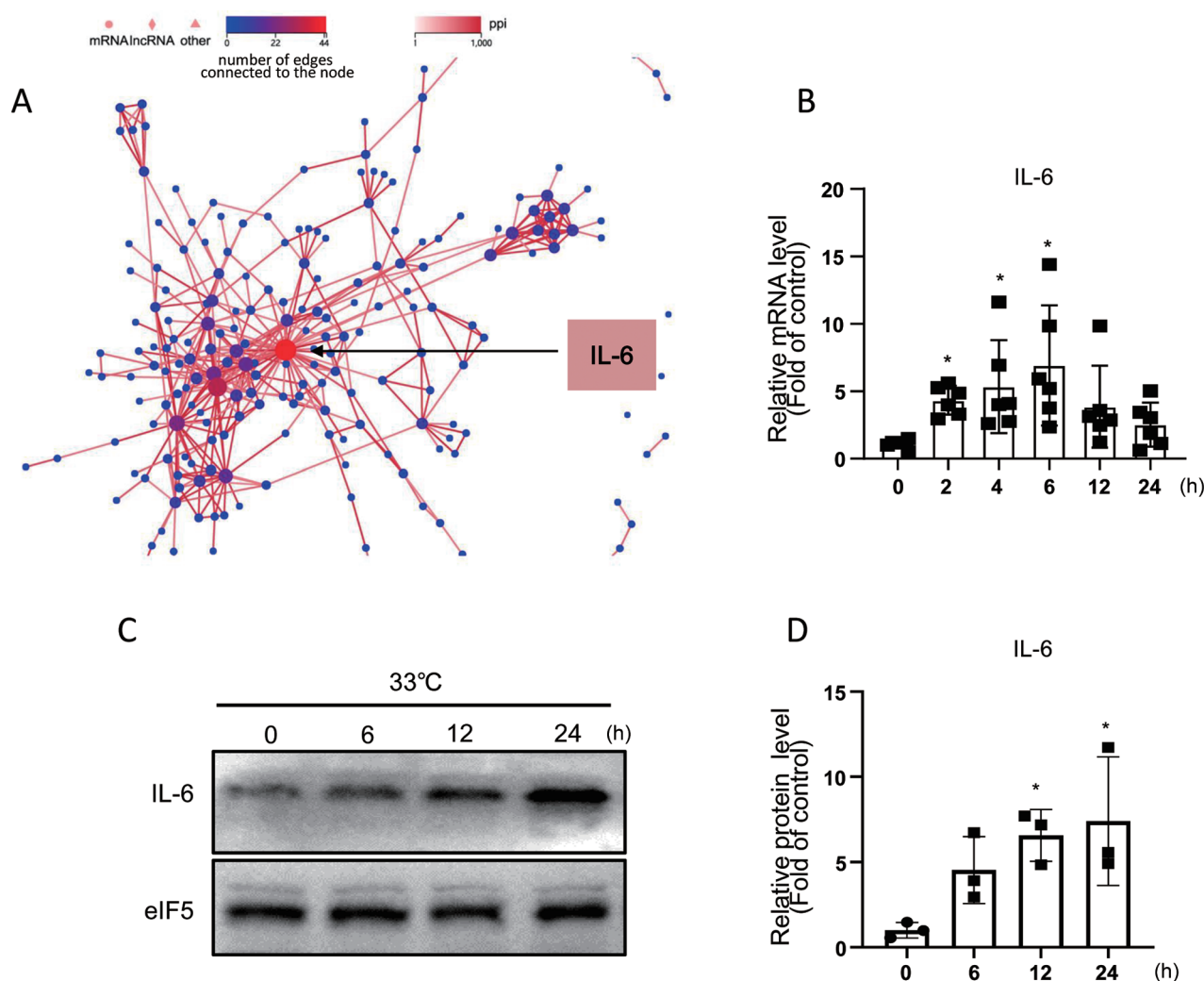


图 4. 蛋白网络互作分析以及低温处理不同时间 IL-6 的表达变化

Fig. 4. Protein-protein interaction network (PPI) of the differentially expressed genes and the change of IL-6 expression by 33 °C treatment with different time-course. *A*: PPI analysis of the differentially expressed genes induced by 33 °C culture. *B*: C2C12 myotubes were cultured in 33 °C for 0, 2, 4, 6, 12 and 24 h and the mRNA level of IL-6 was determined by qPCR. $n = 6$. *C*: C2C12 myotubes were cultured in 33 °C for 0, 6, 12 and 24 h and the protein level of IL-6 was determined by Western blot. $n = 3$. $P < 0.05$ vs 0 h. Mean \pm SD.

有 TRPM8 和 TRPA1 的表达^[5], 并且低温培养可改变离体培养的脂肪细胞的基因表达, 促进 UCP1 的表达, 进而促进脂肪细胞的产热^[2]。TRPM8 的激动剂 menthol 也被证实可上调脂肪细胞 UCP1 的表达并促进产热^[4]。所以在脂肪细胞已经有证据表明其对寒冷存在不依赖神经体液因素的直接反应。但骨骼肌是否也存在对寒冷的自身调节还需要进一步研究。由于 TRPM8 和 TRPA1 在骨骼肌细胞中是否有表达还存在争议, 我们首先检测了小鼠骨骼肌组织以及骨骼肌细胞中 TRPA1 和 TRPM8 的表达。结果显示小鼠骨骼肌组织和离体培养的 C2C12 成熟肌管细胞有 TRPM8 的表达, 但 TRPA1 的表达极低。这提示骨骼肌对寒冷的应答不是通过 TRPA1 介导的, 而可能由 TRPM8 介导。

为了研究骨骼肌细胞的基因表达是否受低温培养的直接影响, 我们将分化成熟的 C2C12 肌管细胞置于 33 °C 培养 6 h 后, 进行转录组学分析。我们通过 RNA 测序发现大量被低温培养影响表达的基因。差异基因富集在 IL-17、TNF α 、MAPK、FoxO、Hedgehog、Hippo、Toll-like receptor、Notch、Wnt 等信号通路。大部分差异基因被上调, 而 MAPK 信号通路的关键基因 Fos 和 JUN 均被下调。通过对差异基因进行蛋白互作网络分析发现, IL-6 基因与其余差异基因存在最多的相互作用, 位于网络的中心位置。

我们进一步研究发现 33 °C 培养 2 h 即可显著提高 C2C12 肌管细胞中 IL-6 的 mRNA 表达水平。C2C12 肌管细胞中 IL-6 的蛋白质水平在 33 °C 培养 24 h 内, 呈现时间依赖性地升高。IL-6 是最早发现的肌肉因子, 可促进米色脂肪形成^[15]。骨骼肌收缩时 IL-6 大量分泌, 运动可使循环中的 IL-6 水平提高 100 倍以上^[16]。IL-6 可促进脂肪分解、游离脂肪酸氧化以及增加脂肪组织 UCP-1 的表达^[16]。腹腔注射 IL-6 可增加小鼠皮下白色脂肪组织中 UCP1 的表达, IL-6 敲除可抑制寒冷刺激引起的皮下白色脂肪组织 UCP1 蛋白水平的升高^[17], 该研究在在体水平证实了 IL-6 对脂肪组织产热的影响。有研究表明, 小鼠饲养于 4 °C 的寒冷环境 21 天, 可提高血浆中 IL-6 的水平^[18]。以上研究可证明寒冷与血浆中 IL-6 水平的关系, 但寒冷对骨骼肌细胞的直接作用需要在可排除神经体液调节的离体水平进行研究。本研究发现低温可直接上调离体骨骼肌细胞 IL-6 表达, 这提示在寒冷刺激下, 骨骼肌细胞通过释放 IL-6 促

进脂肪组织产热, 骨骼肌细胞对低温的自身调节参与了此过程。与我们的研究类似, 一项近期的研究发现 18 °C 的低温刺激提高了人肌管中 IL-6 mRNA 表达水平^[19], 该研究使用了更为剧烈的低温刺激。与该研究相比, 我们的研究使用的 33 °C 低温, 是皮下肌肉更容易在环境温度下降时达到的温度环境。此外, 我们通过 RNA 测序系统描绘了骨骼肌细胞对低温产生应答时基因表达的变化, 并且通过蛋白互作网络分析发现了 IL-6 在骨骼肌响应低温刺激时差异表达的基因中处于关键地位。

本研究表明离体的骨骼肌细胞在没有神经体液调节的情况下, 可直接感应低温的刺激, 改变某些基因的表达, 其中 IL-6 作为重要的肌肉因子和产热因子, 是骨骼肌细胞直接响应低温而表达变化的基因中的关键分子。骨骼肌细胞有 TRPM8 的表达, 但其是否介导了低温对骨骼肌基因表达的影响还需要进一步的研究。

参考文献

- 1 Betz MJ, Enerback S. Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14(2): 77–87.
- 2 Ye L, Wu J, Cohen P, Kazak L, Khandekar MJ, Jedrychowski MP, Zeng X, Gygi SP, Spiegelman BM. Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(30): 12480–12485.
- 3 Jang Y, Lee Y, Kim SM, Yang YD, Jung J, Oh U. Quantitative analysis of TRP channel genes in mouse organs. *Arch Pharm Res* 2012; 35(10): 1823–1830.
- 4 Rossato M, Granzotto M, Macchi V, Porzionato A, Petrelli L, Calcagno A, Vencato J, De Stefani D, Silvestrin V, Rizzuto R, Bassetto F, De Caro R, Vettor R. Human white adipocytes express the cold receptor TRPM8 which activation induces UCP1 expression, mitochondrial activation and heat production. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 383(1–2): 137–146.
- 5 Bishnoi M, Kondepudi KK, Gupta A, Karmase A, Boparai RK. Expression of multiple Transient Receptor Potential channel genes in murine 3T3-L1 cell lines and adipose tissue. *Pharmacol Rep* 2013; 65(3): 751–755.
- 6 Huang F, Ni M, Zhang JM, Li DJ, Shen FM. TRPM8 down-regulation by angiotensin II in vascular smooth muscle cells is involved in hypertension. *Mol Med Rep* 2017; 15(4): 1900–1908.
- 7 Negri S, Faris P, Berra-Romani R, Guerra G, Moccia F. Endothelial transient receptor potential channels and vascular remodeling: extracellular Ca²⁺ entry for angiogenesis, arte-

- riogenesis and vasculogenesis. *Front Physiol* 2019; 10: 1618.
- 8 Li C, Li J, Xiong X, Liu Y, Lv Y, Qin S, Liu D, Wei R, Ruan X, Zhang J, Xu L, Wang X, Chen J, Zhang Y, Zheng L. TRPM8 activation improves energy expenditure in skeletal muscle and exercise endurance in mice. *Gene* 2018; 641: 111–116.
- 9 Iannotti FA, Pagano E, Moriello AS, Alvino FG, Sorrentino NC, D’Orsi L, Gazzerro E, Capasso R, De Leonibus E, De Petrocellis L, Di Marzo V. Effects of non-euphoric plant cannabinoids on muscle quality and performance of dystrophic mdx mice. *Br J Pharmacol* 2019; 176(10): 1568–1584.
- 10 Wernstedt I, Edgley A, Berndtsson A, Faldt J, Bergstrom G, Wallenius V, Jansson JO. Reduced stress- and cold-induced increase in energy expenditure in interleukin-6-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 291(3): R551–R557.
- 11 Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, Katayama T, Kawashima S, Okuda S, Tokimatsu T, Yamanishi Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(Database issue): D480–D484.
- 12 Myrer JW, Measom G, Fellingham GW. Temperature changes in the human leg during and after two methods of cryotherapy. *J Athl Train* 1998; 33(1): 25–29.
- 13 Crescioli C. Targeting age-dependent functional and metabolic decline of human skeletal muscle: the geroprotective role of exercise, myokine IL-6, and vitamin D. *Int J Mol Sci* 2020; 21(3): 1010.
- 14 Nilius B. TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(8): 805–812.
- 15 Kristof E, Klusoczki A, Veress R, Shaw A, Combi ZS, Varga K, Gyory F, Balajthy Z, Bai P, Bacso Z, Fesus L. Interleukin-6 released from differentiating human beige adipocytes improves browning. *Exp Cell Res* 2019; 377(1–2): 47–55.
- 16 Rodriguez A, Becerril S, Ezquerro S, Mendez-Gimenez L, Fruhbeck G. Crosstalk between adipokines and myokines in fat browning. *Acta Physiol (Oxf)* 2017; 219(2): 362–381.
- 17 Knudsen JG, Murholm M, Carey AL, Bienso RS, Basse AL, Allen TL, Hidalgo J, Kingwell BA, Febbraio MA, Hansen JB, Pilegaard H. Role of IL-6 in exercise training- and cold-induced UCP1 expression in subcutaneous white adipose tissue. *PLoS One* 2014; 9(1): e84910.
- 18 Nie Y, Yan Z, Yan W, Xia Q, Zhang Y. Cold exposure stimulates lipid metabolism, induces inflammatory response in the adipose tissue of mice and promotes the osteogenic differentiation of BMMSCs via the p38 MAPK pathway *in vitro*. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(9): 10875–10886.
- 19 Krapf S, Schjolberg T, Asoawe L, Honkanen SK, Kase ET, Thoresen GH, Haugen F. Novel methods for cold exposure of skeletal muscle *in vivo* and *in vitro* show temperature-dependent myokine production. *J Therm Biol* 2021; 98: 102930.