

# 原花青素对小鼠后肢缺血肌肉的作用及 miR-133b 的表达变化

杜超<sup>1)</sup>, 何雪梅<sup>2)</sup>, 施森<sup>3)</sup>, 周翔宇<sup>1)\*</sup>

(<sup>1)</sup>西南医科大学附属医院甲状腺外科, 四川 泸州 646000; (<sup>2)</sup>西南医科大学附属医院医学实验中心, 四川 泸州 64600;

(<sup>3)</sup>西南医科大学附属医院血管外科, 四川 泸州 646000)

**摘要** 肢体缺血后的氧化应激反应将导致肌肉损伤, 刺激肌卫星细胞(satellite cells, SCs)的成肌分化, 从而完成损伤修复, 而肌源性 miRNAs 参与其中。原花青素(proanthocyanidins, PC)来源于植物多酚提取物, 具有抗氧化应激的作用。但原花青素对缺血肌肉的作用和机制尚不明确。本文研究原花青素对小鼠后肢缺血肌肉的作用, 探讨 miR-133b 在其中的表达及作用。雄性 C57/BL6 小鼠经左后肢缺血后随机分为: 对照组(H<sub>2</sub>O)、低浓度 PC(low dose PC, LDPC)组(1 mg/kg)和高浓度 PC(high dose PC, HDPC)组(20 mg/kg)。对缺血肢体运动功能评分: 7 d 时, 对照组为  $1.33 \pm 0.14$ , LDPC 组为  $1.50 \pm 0.15$ , HDPC 组为  $2.08 \pm 0.23$ ; 14 d 时, 对照组为  $2.17 \pm 0.31$ , LDPC 组为  $2.00 \pm 0.37$ , HDPC 组为  $3.83 \pm 0.17$ 。说明高浓度 PC 可促进缺血肢体运动功能恢复( $P < 0.05$ )。测定各组的氧化应激产物丙二醛含量, 在 7 d 时: 血浆中, 对照组为  $32.85 \pm 7.61$  nmol/ $\mu$ L, LDPC 组为  $35.90 \pm 7.45$  nmol/ $\mu$ L, HDPC 组为  $10.46 \pm 2.49$  nmol/ $\mu$ L; 缺血肌肉中, 对照组为  $39.75 \pm 7.61$  nmol/ $\mu$ g, LDPC 组为  $28.75 \pm 7.05$  nmol/ $\mu$ g, HDPC 组为  $15.80 \pm 3.63$  nmol/ $\mu$ g。表明高浓度 PC 可有效降低后肢缺血小鼠体内氧化应激水平( $P < 0.05$ )。HE 染色结果显示, 高浓度组再生肌纤维比例(7 d,  $53.88\% \pm 8.13\%$ ; 21 d,  $39.30\% \pm 0.37\%$ )均明显高于( $P < 0.05$ )对照组(7 d,  $10.61\% \pm 3.00\%$ ; 21 d,  $22.61\% \pm 3.16\%$ )和低浓度组(7 d,  $14.57\% \pm 2.94\%$ ; 21 d,  $18.74\% \pm 4.73\%$ )。RT-qPCR 检测缺血肌肉中 miR-133b-3p 含量, 与对照组相比, 高浓度组的 miR-133b-3p 表达上调(3.26 倍,  $P < 0.05$ )。生物信息学分析发现, *PPP2CA*、*PPP2CB* 和 *MKP-1* 可能是 miR-133b-3p 的靶基因。Western 印迹检测发现, 与对照组相比, 高浓度组 PCNA、MyoD 和 ERK2 表达升高, 而 p-ERK2 表达下降( $P < 0.05$ )。以上结果说明, 高浓度原花青素可降低缺血后的氧化应激反应, 促进缺血肌肉再生, 而 miR-133b-3p 和 ERK 信号通路可能参与其中。

**关键词** 原花青素; miR-133b; 肢体缺血; 肌肉再生

**中图分类号** Q756; R641

## The Role of Proanthocyanidins in the Regeneration of Ischemic Muscle of Mouse Hind Limb and the Expression Change of miR-133b

DU Chao<sup>1)</sup>, HE Xue-Mei<sup>2)</sup>, SHI Sen<sup>3)</sup>, ZHOU Xiang-Yu<sup>1)\*</sup>

(<sup>1)</sup>Department of Thyroid Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 64600, Sichuan, China;

(<sup>2)</sup>Medical Research Center, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 64600, Sichuan, China;

(<sup>3)</sup>Department of Vascular Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 64600, Sichuan, China)

收稿日期: 2018-01-16; 修回日期: 2018-03-12; 接受日期: 2018-04-10

国家自然科学基金项目(No. 81500643)和四川省教育厅科研项目(No. 16ZA0179)资助

\* 通讯作者 Tel: 0830-3165089; E-mail: xiangyuzhou971@vip.126.com

Received: January 16, 2018; Revised: March 12, 2018; Accepted: April 10, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81500643) and Scientific Research Foundation of the Education Commission of Sichuan Province (No. 16ZA0179)

\* Corresponding author Tel: 0830-3165089; E-mail: xiangyuzhou971@vip.126.com

**Abstract** The oxidative stress leads to muscle damage after limb ischemia, and satellite cells (SCs) are activated and participate in regenerative processes, that myomiRNA are involved. Proanthocyanidins (PC) are polyphenol extracts from plant with effects of anti-oxidative stress. However, the mechanisms of PC in the regeneration of ischemic muscle are not yet clear. Hind limb ischemia (HLI) mouse model was established to investigate the role of miR-133b in the impact of PC on regeneration of ischemic muscle. Thirty-six male C57/BL6 mice with left femoral artery ligation were randomly divided into: control group (H<sub>2</sub>O), low dose PC (LDPC) treatment group (1 mg/kg) and high dose PC (HDPC) group (20 mg/kg). Functional limb recovery scores of ischemic limbs showed that HDPC promotes the recovery of movement from motor dysfunction (H<sub>2</sub>O 1.33 ± 0.14, LDPC 1.50 ± 0.15, HDPC 2.08 ± 0.23 at 7 days; H<sub>2</sub>O 2.17 ± 0.31, LDPC 2.00 ± 0.37, 3.83 ± 0.17 at 14 days post surgery; *P* < 0.05). The malondialdehyde (MDA) was measured by thiobarbituric acid (TBA) reactive substance assay. In the HDPC group, the MDA levels at 7 days were significantly decreased as compared to the control group (H<sub>2</sub>O 32.85 ± 7.61 nmol/μL, LDPC 35.90 ± 7.45 nmol/μL, HDPC 10.46 ± 2.49 nmol/μL in plasma samples; H<sub>2</sub>O 39.75 ± 7.61 nmol/μg, LDPC 28.75 ± 7.05 nmol/μg, HDPC 15.80 ± 3.63 nmol/μg in ischemic muscles, respectively; *P* < 0.05). The percentage of regeneration myofibers was calculated by HE staining, and the percentage in the high dose group was significantly higher than the other two groups (H<sub>2</sub>O 10.61% ± 3.00%, LDPC 14.57% ± 2.94%, HDPC 53.88% ± 8.13% at 7 days; H<sub>2</sub>O 22.61% ± 3.16%, LDPC 18.74% ± 4.73%, HDPC 39.30% ± 0.37% at 21 days; *P* < 0.05). The expression level of miR-133b-3p was detected by RT-qPCR, and it was up-regulated in HDPC group when compared to the control at 7 days (3.26 fold changes, *P* < 0.05). By bioinformatics analysis, it was found that *PPP2CA*, *PPP2CB*, and *MKP-1* might be target genes of miR-133b-3p. Western blot was used to evaluate the related proteins expression, and the results showed that PCNA, MyoD and ERK2 levels were increased, but p-ERK2 expression was decreased after 7 days treatment of HDPC (*P* < 0.05). In conclusion, PC with a 20 mg/kg concentration could reduce the oxidative stress and promote muscle regeneration from ischemic injury, and miR-133b-3p and ERK signaling pathway may be involved in this progress.

**Key words** proanthocyanidins(PC); miR-133b; limb ischemia; muscle regeneration

下肢缺血性疾病可引起肌肉损伤、肢体坏疽等,严重者将导致患者截肢<sup>[1]</sup>。因此,保护肌肉功能、促进肌肉修复等,可改善患者生存质量并有效避免截肢。肢体缺血后的氧化应激反应是影响肌肉损伤和修复的主要因素<sup>[2, 3]</sup>。原花青素(proanthocyanidins, PC)是一类植物型多酚,具有抗氧化和清除自由基的作用<sup>[4]</sup>。在小鼠的模型中,PC在20~40 mg/kg剂量时,可有效发挥抗氧化应激的作用<sup>[5-9]</sup>。研究表明<sup>[8, 10]</sup>,原花青素在心肌和骨骼肌的缺血损伤或缺血再灌注损伤中发挥着保护作用,但是原花青素对缺血骨骼肌的具体保护机制尚未阐明。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类非编码小RNA,主要在基因转录后水平起负性调控作用。其中,miR-1/206和miR-133 a/b家族属肌源性miRNA,与肌肉损伤后肌纤维的再生过程密切相关<sup>[11-13]</sup>。它们在人和鼠中由3个基因座所编码,且具有相同的种子区,而差异仅在于种子区外的核苷编码不同<sup>[13-15]</sup>。研究表明<sup>[16, 17]</sup>,这些肌源性miRNA,可下调Pax7的表达,促进下游的生肌调节

因子例如MyoD的表达,进而促进肌纤维表面的肌卫星细胞(satellite cells, SCs)激活,增殖分化后与受损肌纤维融合形成新的肌管,最终完成再生修复。缺血肌肉的氧化应激反应,可导致miR-133b的表达下调,而抑制肌肉的再生过程<sup>[18, 19]</sup>。在Xu等<sup>[20]</sup>的研究中,卡维地洛可上调miR-133的表达,减少因氧化应激导致的心肌凋亡的作用。在Lei等<sup>[21]</sup>的研究中也发现,葡萄籽多酚可增加miR-133b的表达。而miR-133b是否参与原花青素对缺血肌肉的保护机制,未见报道。因此本研究通过构建后肢缺血小鼠模型,研究原花青素对缺血肌肉的作用,检测miR-133b的表达水平,初步探讨miR-133b在原花青素影响下肢缺血肌肉过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

雄性C57/BL6小鼠(成都达硕实验动物公司),体视显微镜(徕卡,德国),显微手术器械(FST,德国),激光多普勒血流仪(Moor,英国),原花青素(Sigma-aldrich,美国),TBARS试剂盒(ENZO,美

国),TRIZOL 裂解液(QIAGEN,美国),miR 反转录及实时荧光定量 PCR 试剂盒(QIAGEN,美国),mmu-U6 引物及 mmu-miR-133b-3p 上游引物(QIAGEN,美国),HE 染色液(碧云天,中国),PCNA 兔抗(稀释比例 1:1 000,碧云天,中国),ERK 兔抗(1:1 000,CST,美国),Pax7 鼠抗(1:500,Santa Cruz,美国),MyoD 鼠抗(1:500,Santa Cruz,美国),GAPDH 鼠抗(1:1 000,中杉金桥,中国),HRP 标记 IgG(羊抗鼠,1:2 000,羊抗兔,1:2 000,碧云天,中国)。

## 1.2 动物组织获取

10~12 周龄、体重 22~25 g 的小鼠共 36 只,用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,置于恒温手术台。体视显微镜下用 8~0 尼龙线结扎左侧后肢的股动脉近心端与远心端,并剪断血管,造成后肢缺血的小鼠模型<sup>[22, 23]</sup>。分别于术前和术后立即,使用激光多普勒仪扫描脚掌缺血情况,证实缺血侧血流值较正常灌注侧血流值下降 75% 以上即为模型成功。将模型小鼠随机平均分为对照组(无菌注射用水)、低浓度 PC 干预组(1 mg/kg)和高浓度干预实验组(20 mg/kg)。于术后 30 min、之后每日晨 8 时,采用腹腔注射药物的方法干预模型小鼠至术后 21 d。分别于术后 7 d 和 21 d 处死小鼠,采集小鼠后腔静脉血(1.5% EDTA 溶液抗凝),收集缺血侧腓肠肌<sup>[23]</sup>,分别用于提取 RNA、提取蛋白质,石蜡包埋切片等。实验动物的使用获得西南医科大学实验动物伦理委员会的审查批准。

## 1.3 运动评分

小鼠于造模前、造模后 30 min,及术后 7 d、14 d、21 d 按照如下标准评估其运动功能<sup>[24]</sup>。拖曳后肢跛行(0 分);足尖垫地跛行(1 分);足掌着地跛行(2 分);足掌行走伴趾尖活动,轻度跛行(3 分);足掌活动正常,正常行走(4 分)。

## 1.4 HE 染色并计数再生肌纤维

组织脱水后石蜡包埋切片(厚度 6  $\mu\text{m}$ ),石蜡切片梯度酒精脱蜡至水,苏木素染色后分化数秒,清洗后伊红染色,清洗后梯度酒精脱水并透明,树胶封片后镜检。使用 OLYMPUS 显微镜系统分析图像。在 100 倍和 400 倍视野下,计数再生肌纤维占整个肌肉横切面肌纤维总数的比例。中心核肌纤维可认为是再生的骨骼肌纤维,而正常肌纤维呈偏心核<sup>[2]</sup>。

## 1.5 硫代巴比妥酸(TBA)法测定丙二醛

丙二醛(malonaldehyde,MDA)是一种脂质氧化终产物。通过硫代巴比妥酸(TBA)法测定 MDA 的

浓度,可检测体内氧化应激水平变化。液氮破碎腓肠肌组织,分为 2 份。1 份破碎后的腓肠肌组织称取干重后用等质量体积的生理盐水重悬测定 MDA 含量,分别取 100  $\mu\text{L}$  的生理盐水重悬液、血浆和标准液,根据说明书加入试剂,95  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h,分光光度计分析吸光度( $A = 532 \text{ nm}$ );另 1 份腓肠肌组织同样称量后等质量体积蛋白质裂解液重悬,制备蛋白质样品,并 BCA 法测定浓度。标准曲线计算 MDA 含量(腓肠肌样本需使用同一样品的蛋白质浓度进行校正)。

## 1.6 荧光定量 PCR

组织从 RNA 保护液取出,剪碎后 TRIZOL 环境下匀浆棒破碎组织,按照说明书提取获得组织总 RNA 溶液。Nanodrop 及琼脂糖凝胶电泳质检 RNA 溶液。按照反转录试剂盒说明书配制逆转录反应体系(20  $\mu\text{L}$ )进行逆转录(加尾法)。逆转录产物稀释 11 倍,遵照荧光定量试剂盒说明书配制 RT-qPCR 体系 20  $\mu\text{L}$ ,进行实时荧光定量扩增,结果以  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法分析计算。

## 1.7 Western 印迹分析

组织经破碎后,加入 RIPA 裂解液,经离心后的上清液加入上样缓冲液,获得蛋白质样品进行 100  $^{\circ}\text{C}$  变性后进行 Western 印迹检测。制备 SDS-PAGE 胶,进行蛋白质样品上样,恒压电泳后转膜(恒流)至 PVDF 膜,经封闭、孵育抗体后,使用 ECL 发光液进行曝光显影。显影条带使用 ImageJ 软件分析灰度值,以 GAPDH 为内参比较各蛋白质的相对含量变化。

## 1.8 生物信息分析

通过 TargetScan 和 miRanda 两个 miRNA 靶基因预测数据库,寻找共同预测交集,进行累积权重( $< 0$ )和 TargetScore( $> 70$ )评分,获得 mmu-miR-133b-3p 的预测靶基因集合。对该集合进行 Gene Ontology 功能富集分析,再进行 KEGG pathway 分析可能参与的信号通路。将预测的靶基因编码的靶蛋白质,纳入 STRING 分析蛋白质间的相互作用,排除无相互关联的靶蛋白质。最后查询文献和 NCBI 数据库,找到增殖、分化相关的基因。

## 1.9 统计学分析

所有的数据均采用  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示,使用 SPSS 19.0 进行统计分析。两组间的比较使用独立样本  $t$  检验;多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),其组间两两比较采用 LSD 检验; $P < 0.05$  认为有统计学差异。Gene Ontology 和 KEGG 分析

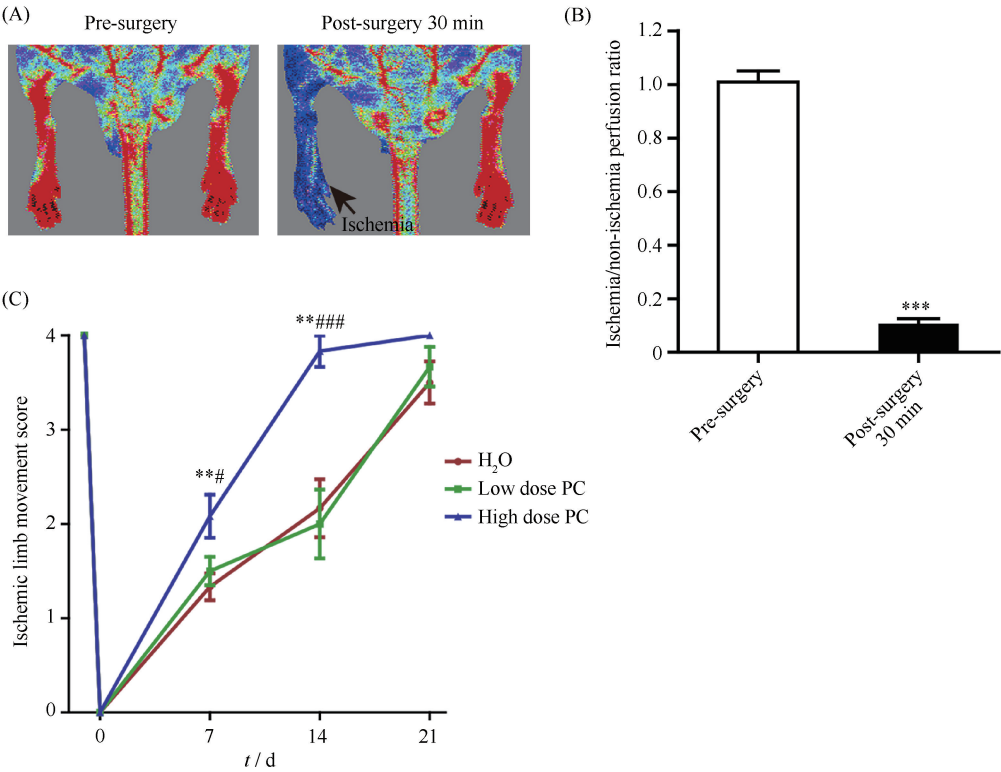
使用 Fisher 精确检验得到  $P$  值, 并使用 Benjamini & Hochberg (1995) 方法确定功能富集的误判率 (false discovery rate,  $FDR < 0.05$ ), 完成功能富集分析及通路分析以推断它们参与的通路。

2 结果

2.1 原花青素促进缺血肢体功能恢复

小鼠结扎左侧股动脉近、远心端后, 出现严重的缺血和运动功能下降。激光多普勒血流仪测定小鼠的术前和术后即时的后肢足掌部的血流值, 左侧肢体血流值与右侧的比值较术前的比值下降 80% 以上, 具有统计学差异 ( $P < 0.001$ ), 模型建立成功

(Fig. 1 A, Fig. 1 B)。将模型小鼠分别给予无菌注射用水、低浓度 PC 和高浓度 PC 干预, 分为三组模型小鼠。结果显示三组小鼠缺血后肢的血供和运动机能均逐渐恢复, 且在 21 d 时基本完全恢复。术后 7 d 时, 对照组小鼠运动评分是  $1.33 \pm 0.14$ , 低浓度组  $1.50 \pm 0.15$ , 高浓度组  $2.08 \pm 0.23$ ; 14 d 时, 对照组运动评分  $2.17 \pm 0.31$ , 低浓度组  $2.00 \pm 0.37$ , 高浓度组  $3.83 \pm 0.17$ 。结果表明, 高浓度组可有效促进小鼠缺血后肢的运动机能恢复, 在术后 14 d 左右基本完全恢复功能, 且明显快于对照组和低浓度组 (Fig. 1 C), 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。而低浓度组 and 对照组之间无明显差异。



**Fig. 1 The effect of PC on the functional movement of ischemic limb** Thirty-six male C57/BL6 mice were used to establish HLI models, and then divided into 3 groups: H<sub>2</sub>O group, low dose (1 mg/kg) PC treatment group and high dose (20 mg/kg) PC group. (A) The blood flow of the paws before and after surgery immediately was measured by Laser Doppler Imager. (B) The ischemia/non-ischemia perfusion ratio was calculated at pre- and post-surgery 30 minutes. \*\*\* $P < 0.001$ , compared with pre-surgery group. (C) We recorded the movement scores of groups treated with H<sub>2</sub>O, low dose PC or high dose PC. ( \*\* $P = 0.005$  (high dose group *vs.* H<sub>2</sub>O group at 7 days), \* $P = 0.027$  (high dose *vs.* low dose group at 7days), \*\* $P = 0.001$  (high dose group *vs.* H<sub>2</sub>O group at 14 days) and \*\*\* $P < 0.001$  (high dose *vs.* low dose group at 14 days)). All data shown are representation of three independent experiments, and presented as mean  $\pm$  SD, with (B) independent sample *t*test, (C) one way ANOVA and LSD test. All animal experiments shown in this manuscript were approved by the Animal Ethics Committee of SWMU, China

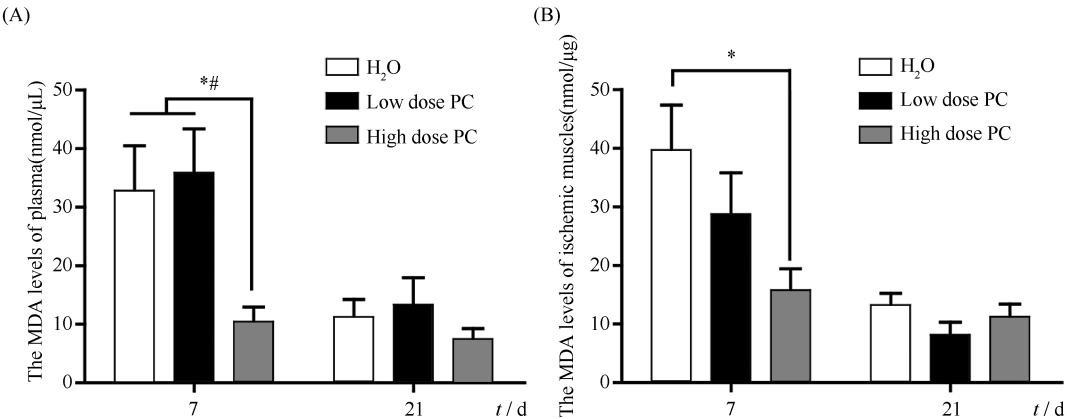
2.2 原花青素可降低缺血小鼠氧化应激水平

PC 具有抗氧化、清除自由基等作用, 测定模型小鼠体内 MDA 的含量, 可以反应原花青素抗氧化的作用。在小鼠后腔静脉血浆中 (Fig. 2A), 对照组

MDA 含量为  $32.85 \pm 7.61$  nmol/ $\mu$ L, 低浓度 PC 组  $35.90 \pm 7.45$  nmol/ $\mu$ L, 高浓度组为  $10.46 \pm 2.49$  nmol/ $\mu$ L。高浓度 PC 组的 MDA 含量较对照组和低浓度组明显减少, 具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。在



这 3 组缺血侧腓肠肌样品中 (Fig. 2B), 术后第 7 d 对照组 MDA 含量为  $39.75 \pm 7.61$  nmol/ $\mu$ g, 低浓度组为  $28.75 \pm 7.05$  nmol/ $\mu$ g, 高浓度组为  $15.80 \pm 3.63$  nmol/ $\mu$ g, 且高浓度组比对照组具有统计学差



**Fig. 2 High dose PC reduced the oxidant stress of ischemic limbs** We measured the MDA levels with thiobarbituric acid (TBA) reactive substance assay in plasma (A) and in muscle tissues (B) at 7 days and 21 days post surgery. Values are presented as the mean  $\pm$  SD with one way ANOVA and LSD test. ((A) \*  $P = 0.046$ , high dose group vs. H<sub>2</sub>O group, #  $P = 0.029$ , high dose group vs. low dose PC group; (B) \*  $P = 0.037$  high dose group vs. H<sub>2</sub>O group)

2.3 原花青素促进缺血肌肉肌纤维再生

取术后 7 d 和 21 d 三组小鼠的缺血侧腓肠肌做 HE 染色,结果显示,三组小鼠在术后第 7 d 的缺血侧腓肠肌中,不仅存在大量的坏死肌纤维和炎症细胞浸润,还有形态不规则的中央核肌纤维形成。成熟骨骼肌表现为偏心核肌纤维,而再生骨骼肌则表现为中央核纤维。在术后第 21 d,缺血腓肠肌横切面未见炎症细胞的浸润,同时中央核肌纤维的形态规则,接近正常肌纤维水平 (Fig. 3A)。经计数再生肌纤维占横截面所有肌纤维的比例 (Fig. 4B),发现高浓度组小鼠在术后 7 d 为  $53.88\% \pm 8.13\%$ , 21 d 时为  $39.30\% \pm 0.37\%$ ,均明显高于对照组 (7 d 为  $10.61\% \pm 3.00\%$ ; 21 d 为  $22.61\% \pm 3.16\%$ ) 和低浓度组 (7 d 为  $14.57\% \pm 2.94\%$ ; 21 d 为  $18.74\% \pm 4.73\%$ ),且均有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。同样,未发现低浓度组和对照组间存在统计学差别。

2.4 原花青素促进缺血肌肉 miR-133b-3p 的表达

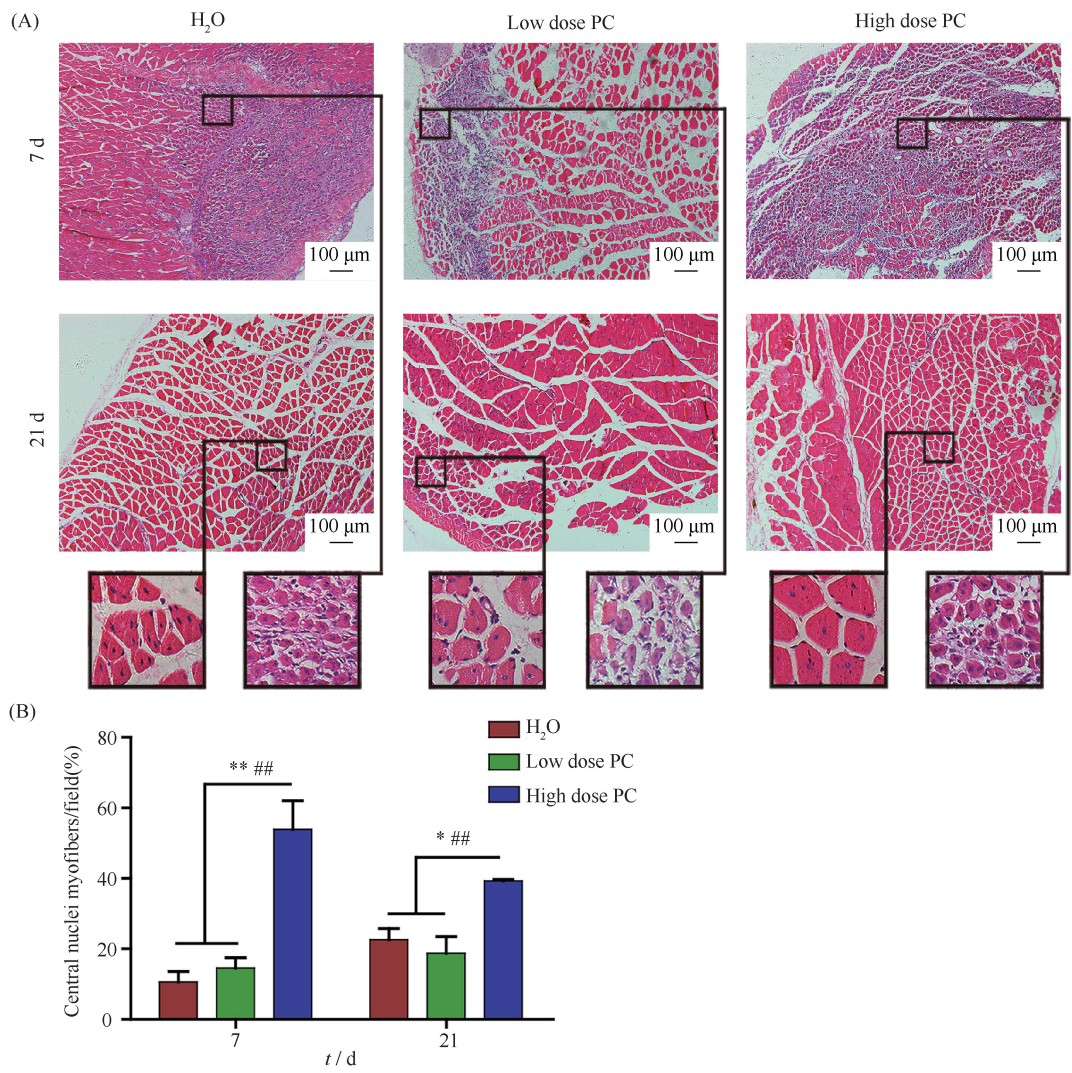
因低浓度组和对照组在运动功能评分、再生肌纤维比例和机体 MDA 含量方面无统计学差异,因此放弃低浓度组的进一步实验。同时,术后第 7 d 时,高浓度 PC 促进肌肉再生的变化最明显。在术后 21 d 时,缺血肌肉中炎症细胞消失,且形态结构恢复正常,说明可能损伤修复已经完成。由此,仅检测了 7 d 对照组和高浓度组小鼠缺血侧腓肠肌的 miR-133b-3p 的表达差异 (Fig. 4),发现高浓度 PC

异 ( $P < 0.05$ )。而在术后 21 d 的血浆和肌肉标本中,MDA 含量在三组间无明显差别。说明,高浓度 PC 可有效降低机体的氧化应激反应,而低浓度 PC 组与对照组无明显差别。

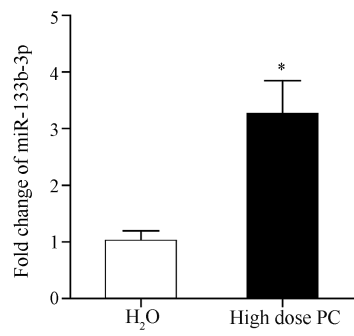
干预组小鼠的缺血侧腓肠肌 miR-133b-3p 的表达明显增加,变化倍数约为对照组的 3.26 倍,并具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

2.5 miR-133b-3p 靶基因预测

为了进一步探索 miR-133b-3p 在缺血肌肉中的作用,本文进行了生物信息学分析预测其靶基因。通过查询 TargetScan 和 miRanda 两个 miRNA 靶基因预测数据库,找到了共同预测的 112 个 mmu-miR-133b-3p 的靶基因集合,并绘制 miRNA-靶基因表达网络 (Fig. 5A)。经对该靶基因集合进行 Gene Ontology (Fig. 5B) 和 KEGG pathway (Fig. 5C) 分析,并纳入 STRING 分析蛋白质间的相互作用 (Fig. 5D)。如图所示,miR-133b-3p 主要参与了富集于代谢过程、细胞组份和蛋白质锚定等功能,而富集的信号通路主要与自噬、蛋白质运输、紧密连接、Notch 信号通路等相关。在 STRING 分析中发现,蛋白磷酸酶 2 (protein phosphatase 2A, PP2A) 的催化亚基 PPP2CA 和 PPP2CB 在相互作用网络中处于核心地位,且丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1 (mitogen-activated protein kinase phosphatase 1, MKP-1) 亦与之联系紧密。而这两种蛋白质,在 MAPK/ERK 信号通路中发挥着重要作用。基于此,本文测定了术后第 7 d 缺血肌肉 PCNA、MyoD、ERK1/2 和 p-ERK1/2 的表达变化。在高浓度 PC 组,PCNA、MyoD 和 ERK2 表达增高,而 p-ERK2 的表达却下降,均具有统计学



**Fig. 3 High dose PC promotes muscle regeneration** (A) Representative images of hematoxylin- eosin (HE) staining with ischemic gastrocnemius from HLI model at 7 days and 21 days post surgery. Regenerating myofibers, characterized by central nucleus location. The central nucleus of ischemic gastrocnemius was counted under microscope. (B) The percentages of central nuclei myofibers per cross-section in the groups treated with H<sub>2</sub>O and low dose PC were significantly lower than that in group with high dose PC treatment at 7 days or 21days after ischemia (Data are presented as mean  $\pm$  SD, with one way ANOVA and LSD test. \*\* $P=0.001$ , compared with H<sub>2</sub>O group, ### $P=0.002$ , compared with low dose PC group at 7 days; \* $P=0.012$  compared with H<sub>2</sub>O group, ### $P=0.004$  compared with low dose PC group at 21 days).

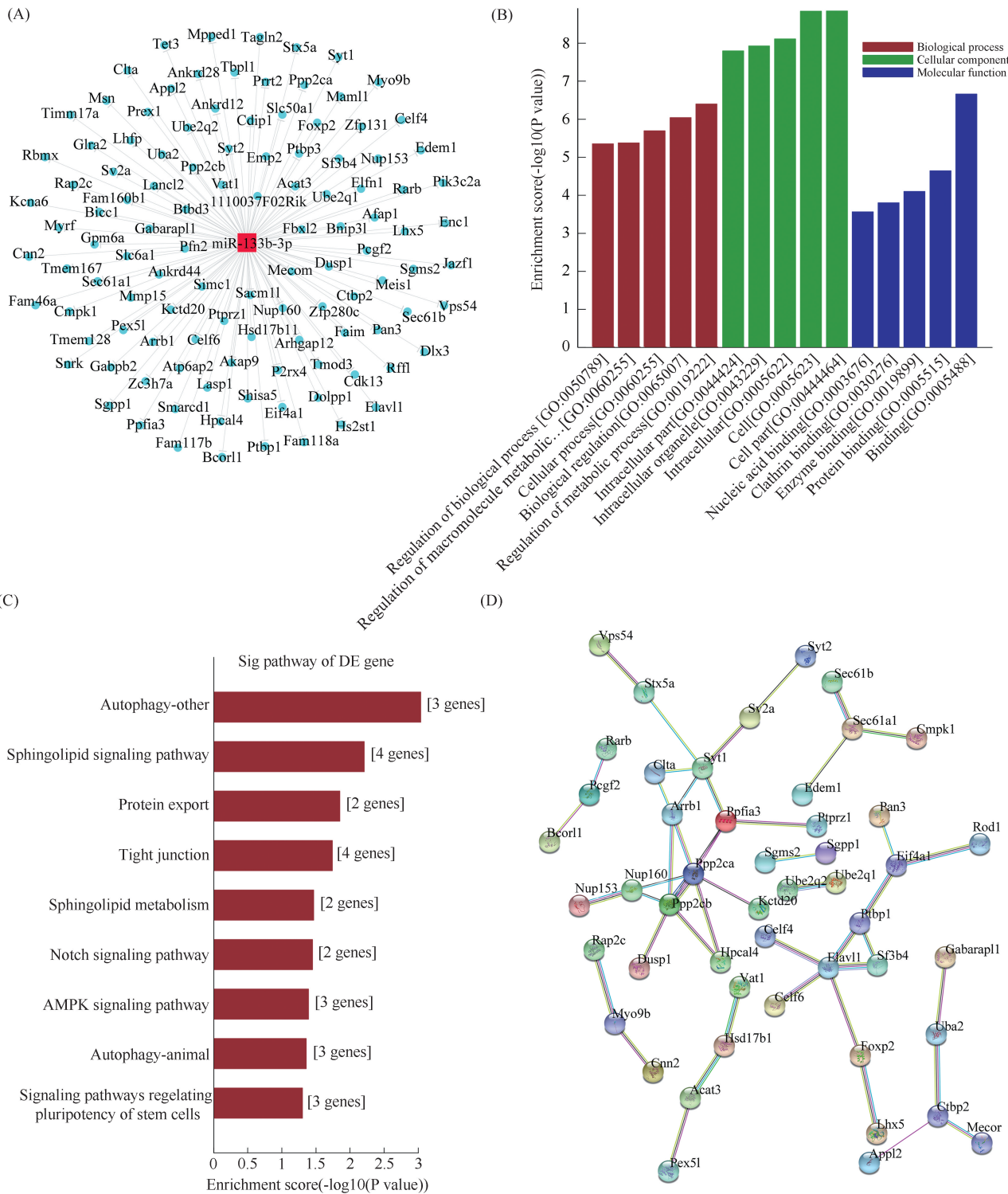


**Fig. 4 High dose PC up-regulates miR-133b-3p expression** The expression of miR-133b-3p in ischemic gastrocnemius was detected by RT-qPCR, and it was up-regulated by high dose PC treatment at 7 days post surgery. \* $P=0.021$ , compared with H<sub>2</sub>O group. (mean  $\pm$  SD, independent sample t test).

差异( $P<0.05$ )。结果表明,当骨骼肌发生缺血损伤后,PC可促进肌肉中miR-133b的表达,促使骨骼肌干细胞进入细胞周期,并向肌源性转化,从而发挥促进肌肉再生的作用。在这个过程中MAPK/ERK信号通路的磷酸化激活被PC抑制,可能与miR-133b的靶基因PP2A或MKP1有关。

3 讨论

在本研究中,我们发现高浓度原花青素(PC)可以减轻小鼠缺血损伤后的氧化应激反应,促进缺血肌纤维再生,加快骨骼肌缺血性损伤修复的速度。其中,miR-133b-3p介导的信号相关通路可能参与



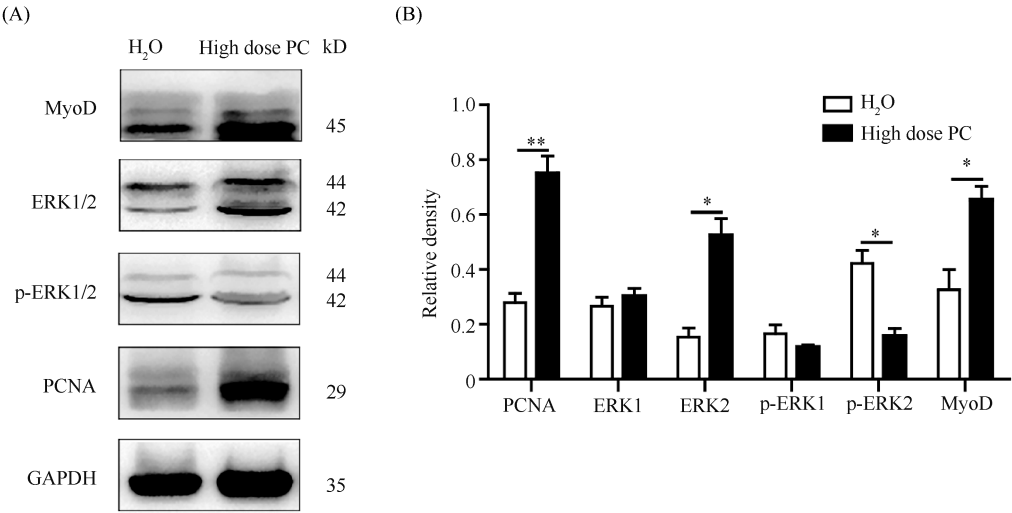
**Fig. 5 Using bioinformatic analysis to predicted the target genes of miR-133b-3p** We performed bioinformatics analysis for target genes of miR-133b-3p. By searching TargetScan and miRanda databases, we have found a intersection set of 112 target genes and mapped miRNA-target gene expression networks (A). The Gene Ontology analysis (B) covers three domains: Biological Process, Cellular Component and Molecular Function. (C) Pathway analysis is a functional analysis in mapping genes to KEGG pathways. (*FDR* < 0.05 is recommended). (D) The STRING database was used to predict the target protein-protein interactions encoded by the target genes and unrelated proteins were excluded. It was found that *PPP2CA*, *PPP2CB*, and *MKP-1* might be the target genes of miR-133b-3p



这个过程。

PC 是一种天然的生物类黄酮,广泛来源于葡萄籽、茶叶、蜂胶等的多酚提取物,具有保护心血管、改善机体糖耐量、抗癌等作用<sup>[25]</sup>。不仅如此,多酚类物质强大的清除自由基和抗氧化的能力,可清除心肌缺血和骨骼肌缺血损伤中的氧自由基,克服氧化应激对骨骼肌损伤修复的干扰<sup>[26]</sup>,发挥保护作用<sup>[8, 10]</sup>。在 Dargelos 等和 Poussard 等人的两项研究中,多酚提取物可修复因氧化应激引起的肌卫星细胞(SCs)功能受损,发挥肌肉保护作用<sup>[27, 28]</sup>。存在于肌纤维表面的 SCs,具有多功能干细胞性质<sup>[29]</sup>。当骨骼肌发生损伤后,SCs 则被

激活,进行增殖和成肌分化,最终与受损肌纤维融合形成新的肌管完成再生修复过程,形态学上表现为中央核肌纤维。本研究发现在术后 21 d 时三组小鼠的运动机能基本完全恢复,高浓度 PC 组的再生肌纤维比例仍明显高于另外两组。造成这种现象的原因可能是高浓度 PC 减少机体的氧化应激反应,并促进 SCs 的成肌性转化过程,形成更多的再生肌纤维,以促进运动机能快速恢复。当再生肌纤维完成形态重塑后,最终形态规整,但中央核型肌纤维仍被保留<sup>[30]</sup>。因此,高浓度 PC 可能通过促进 SCs 的成肌转化过程,完成损伤肌肉的再生修复过程。



**Fig. 6 High dose PC promotes the expression of ERK1/2 and PCNA in skeletal muscle tissues** (A) The expression of GAPDH, PCNA, MyoD, ERK1/2 and p-ERK1/2 in ischemic gastrocnemius at 7days was detected by Western blot. (B) The relative density of PCNA, ERK1/2, p-ERK1/2 and MyoD was calculated. GAPDH was used as a reference protein. PCNA, \*\* $P = 0.007$ ; ERK2, \* $P = 0.012$ ; p-ERK2, \* $P = 0.014$ ; MyoD, \* $P = 0.026$ . (mean  $\pm$  SD, independent sample  $t$  test)

研究表明,miR-1/206 家族、miR-133 a/133b 家族、miR-208b、miR-486 和 miR-499 在肌肉组织中特异富含表达,属于肌源性 miRNA<sup>[12-14, 31]</sup>。Sjogren 等<sup>[15]</sup>筛选了骨骼肌 SCs 分化期间的 miRNA 表达谱芯片,发现 miR-1/206 和 miR-133 a/b 家族表达上调。miR-133b 还参与 SCs 的氧化应激保护作用<sup>[32]</sup>。在 Kozakowska 等<sup>[19]</sup>研究发现,抗氧化酶类血红素氧合酶 1 (HMOX1) 可通过下调 miR-1/206、miR-133 a/b 的表达,减少 MyoD 的生成,从而抑制成肌细胞的分化能力。而在肌 SCs 的肌源性转化过程中,PCNA 在 24 h 内即表达上升,MyoD 等生肌调节因子在 7 d 时达到顶峰<sup>[33]</sup>。本研究发现,PC 在对缺血骨骼肌发挥抗氧化保护作用的同时,能够上调 miR-133b-3p 的表达。通过对 miR-133b-3p 进行生物信息学分析,发现 PP2A 的 C 亚基和 MKP-1 的编码基因可能是 miR-133b-3p 靶基因。另外,Notch 和

MAPK 信号通路可能参与其中。在 Gagan 等<sup>[34]</sup>的研究中,抑制 MKP-1 的表达可激活 Notch 信号通路,从而在成熟骨骼肌的损伤应答中起保护作用。在 Feng 等<sup>[35]</sup>的研究中,miR-133 可下调 FGFR1 和 PP2A 的表达,同时对 ERK 信号通路起负性调控作用。ERK 信号通路的激活可参与维持 SCs 的干细胞池稳态,而抑制 SCs 的分化过程<sup>[35-37]</sup>。在本研究中,miR-133b-3p、PCNA 和 MyoD 在高浓度组表达上调,总 ERK 水平虽在高浓度组明显升高,p-ERK 的水平反而降低。说明 PC 可促进 miR-133b 的表达,抑制 ERK 通路的磷酸化激活,从而打破 SCs 干细胞池的稳态,促进 SCs 进行增殖和肌源性分化。但是,在 miR-133b-3p 参与 PC 促进缺血肌肉再生过程中,PPP2CA、PPP2CB 和 DUSP-1 是否其直接靶基因有待进一步实验验证。

综上所述,本研究发现低浓度原花青素对缺血



下肢功能无明显影响。高浓度原花青素对缺血骨骼肌起保护作用,可能与 SCs 的增殖和成肌分化有关,以促进缺血肌肉的再生修复。miR-133b-3p 介导的相应信号通路可能参与其中。

## 参考文献 (References)

- [1] Miyajima S, Shirai A, Yamamoto S, *et al.* Risk factors for major limb amputations in diabetic foot gangrene patients[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2006, **71**(3): 272-279
- [2] Togliatto G, Trombetta A, Dentelli P, *et al.* Unacylated ghrelin promotes skeletal muscle regeneration following hindlimb ischemia via SOD-2-mediated miR-221/222 expression[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, **2**(6): e000376
- [3] Di Filippo E S, Mancinelli R, Marrone M, *et al.* Neuromuscular electrical stimulation improves skeletal muscle regeneration through satellite cell fusion with myofibers in healthy elderly subjects[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2017, **123**(3): 501-512
- [4] Cos P, De Bruyne T, Hermans N, *et al.* Proanthocyanidins in health care: current and new trends[J]. *Curr Med Chem*, 2004, **11**(10): 1345-1359
- [5] Myburgh K H, Kruger M J, Smith C. Accelerated skeletal muscle recovery after in vivo polyphenol administration[J]. *J Nutr Biochem*, 2012, **23**(9): 1072-1079
- [6] Hort M A, Stralio M R, Duz M S, *et al.* Cardioprotective effects of a proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill; focus on atherosclerosis[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, **50**(10): 3769-3775
- [7] Chen F, Ye X, Yang Y, *et al.* Proanthocyanidins from the bark of *Metasequoia glyptostroboides* ameliorate allergic contact dermatitis through directly inhibiting T cells activation and Th1/Th17 responses[J]. *Phytomedicine*, 2015, **22**(4): 510-515
- [8] Kruger M J, Smith C. Postcontusion polyphenol treatment alters inflammation and muscle regeneration[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2012, **44**(5): 872-880
- [9] Song X, Xu H, Feng Y, *et al.* Protective effect of grape seed proanthocyanidins against liver ischemic reperfusion injury: particularly in diet-induced obese mice[J]. *Int J Biol Sci*, 2012, **8**(10): 1345-1362
- [10] Chang W T, Shao Z H, Yin J J, *et al.* Comparative effects of flavonoids on oxidant scavenging and ischemia-reperfusion injury in cardiomyocytes[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, **566**(1-3): 58-66
- [11] 宋维文, 安铁洙, 王春生. microRNAs 在多能干细胞向心肌细胞分化中的作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报* (Song W W, An T Z, Wang C S. microRNAs play roles in differentiation of pluripotent stem cells into myocardial cells[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2015, **31**(3): 244-250
- [12] Callis T E, Chen J F, Wang D Z. MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development[J]. *DNA Cell Biol*, 2007, **26**(4): 219-225
- [13] Mok G F, Lozano-Velasco E, Munsterberg A. microRNAs in skeletal muscle development[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2017, **72**: 67-76
- [14] Aoi W, Ichikawa H, Mune K, *et al.* Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men[J]. *Front Physiol*, 2013, **4**: 80
- [15] Sjogren R J, Egan B, Katayama M, *et al.* Temporal analysis of reciprocal miRNA-mRNA expression patterns predicts regulatory networks during differentiation in human skeletal muscle cells[J]. *Physiol Genomics*, 2015, **47**(3): 45-57
- [16] Hirai H, Verma M, Watanabe S, *et al.* MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3[J]. *J Cell Biol*, 2010, **191**(2): 347-365
- [17] Chen J F, Tao Y, Li J, *et al.* microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7[J]. *J Cell Biol*, 2010, **190**(5): 867-879
- [18] Mancinelli R, Di Filippo E S, Verratti V, *et al.* The regenerative potential of female skeletal muscle upon hypobaric hypoxic exposure[J]. *Front Physiol*, 2016, **7**: 303
- [19] Kozakowska M, Ciesla M, Stefanska A, *et al.* Heme oxygenase-1 inhibits myoblast differentiation by targeting myomirs[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, **16**(2): 113-127
- [20] Xu C, Hu Y, Hou L, *et al.* beta-Blocker carvedilol protects cardiomyocytes against oxidative stress-induced apoptosis by up-regulating miR-133 expression[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, **75**: 111-121
- [21] Lei Y, Chen Q, Chen J, *et al.* Potential ameliorative effects of grape seed-derived polyphenols against cadmium induced prostatic deficits[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, **91**: 707-713
- [22] Hellingman A A, Bastiaansen A J, de Vries M R, *et al.* Variations in surgical procedures for hind limb ischaemia mouse models result in differences in collateral formation[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2010, **40**(6): 796-803
- [23] Limbourg A, Korff T, Napp L C, *et al.* Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia[J]. *Nat Protoc*, 2009, **4**(12): 1737-1746
- [24] Skuli N, Majmundar A J, Krock B L, *et al.* Endothelial HIF-2alpha regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes[J]. *J Clin Invest*, 2012, **122**(4): 1427-1443
- [25] Zhang L, Wang Y, Li D, *et al.* The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins[J]. *Food Funct*, 2016, **7**(3): 1273-1281
- [26] Otrocka-Domagala I. Sensitivity of skeletal muscle to proapoptotic factors[J]. *Pol J Vet Sci*, 2011, **14**(4): 683-694
- [27] Dargelos E, Brule C, Stuelsatz P, *et al.* Up-regulation of calcium-dependent proteolysis in human myoblasts under acute oxidative stress[J]. *Exp Cell Res*, 2010, **316**(1): 115-125
- [28] Poussard S, Pires-Alves A, Diallo R, *et al.* A natural antioxidant pine bark extract, Oligopin(R), regulates the stress chaperone HSPB1 in human skeletal muscle cells: a proteomics approach[J]. *Phytother Res*, 2013, **27**(10): 1529-1535
- [29] Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, *et al.* Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells[J]. *Nature*, 2008, **456**(7221): 502-506
- [30] Pichavanc C, Pavlath G K. Incidence and severity of myofiber branching with regeneration and aging[J]. *Skelet Muscle*, 2014, **4**: 9
- [31] Guller I, Russell A P. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function[J]. *J Physiol*, 2010, **588**(Pt 21): 4075-4087
- [32] Di Filippo E S, Mancinelli R, Pietrangelo T, *et al.* Myomir dysregulation and reactive oxygen species in aged human satellite cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, **473**(2): 462-470
- [33] Kawai M, Aida H, Hiraga A, *et al.* Muscle satellite cells are activated after exercise to exhaustion in Thoroughbred horses[J]. *Equine Vet J*, 2013, **45**(4): 512-517
- [34] Gagan J, Dey B K, Layer R, *et al.* Notch3 and Mef2c proteins are mutually antagonistic via Mkp1 protein and miR-1/206 microRNAs in differentiating myoblasts[J]. *J Biol Chem*, 2012, **287**(48): 40360-40370
- [35] Feng Y, Niu L L, Wei W, *et al.* A feedback circuit between miR-133 and the ERK1/2 pathway involving an exquisite mechanism for regulating myoblast proliferation and differentiation[J]. *Cell Death Dis*, 2013, **4**: e934
- [36] Rahman M M, Ghosh M, Subramani J, *et al.* CD13 regulates anchorage and differentiation of the skeletal muscle satellite stem cell population in ischemic injury[J]. *Stem Cells*, 2014, **32**(6): 1564-1577
- [37] Nagata Y, Honda Y, Matsuda R. FGF2 induces ERK phosphorylation through Grb2 and PKC during quiescent myogenic cell activation[J]. *Cell Struct Funct*, 2010, **35**(1): 63-71