

# miR-223 对大鼠心肌细胞中纤维化相关信号通路分子的干预作用及机制

张多多<sup>1</sup> 李宗奇<sup>2</sup> 孔晶晶<sup>3</sup>

<sup>1</sup>大连医科大学附属第一医院心律失常一科,大连 116000;<sup>2</sup>沈阳医科大学临床医疗系,沈阳 110000;<sup>3</sup>大连医科大学附属第一医院老年医学科,大连 116000

张多多和李宗奇对本研究具有同等贡献

通信作者:孔晶晶,Email:jingjingeasy@126.com

**【摘要】目的** 探讨 miR-223 对大鼠心肌细胞纤维化相关通路的保护作用及对 Twist 家族碱性螺旋-环-螺旋转录因子 1 (Twist1)、转化生长因子  $\beta$ 1 受体 2 (TGFB2) 的表达调控。**方法** 体外培养大鼠心肌细胞 H9c2, 以 TGF- $\beta$  人工诱导心肌细胞纤维化相关通路活化, 分为模型组、miR-223 组 (转染 miR-223 过表达慢病毒) 以及 miR-223-NC 组 (转染 miR-223-NC 慢病毒), 同时设立正常细胞对照组。免疫组化检测  $\alpha$ -SMA 的表达情况; 实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 测定心肌细胞 miR-223、collagen I、collagen III、Twist1、TGFB2 mRNA 表达水平; Western 印迹法检测心肌细胞 Twist1、TGFB2、collagen I、collagen III 及  $\alpha$ -SMA 蛋白水平; 双荧光素酶报告基因验证 miR-223 对 Twist1、TGFB2 3' UTR 的靶向调控。**结果** miR-223 组  $\alpha$ -SMA 阳性心肌细胞平均吸光度 ( $0.089 \pm 0.013$ ) 明显低于模型组和 miR-223-NC 组 ( $0.134 \pm 0.018$ ,  $0.132 \pm 0.016$ ); miR-223 组心肌 collagen I、collagen III、Twist1、TGFB2 mRNA 表达水平与模型组及 miR-223-NC 组比较显著下降, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Twist1、TGFB2、collagen I、collagen III 及  $\alpha$ -SMA 蛋白水平较模型组及 miR-223-NC 组显著下降, 且差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); Twist1、TGFB2 3' UTR 野生型双荧光素酶报告质粒与 miR-223 mimics 共转染 293T 细胞, 荧光素酶活性均显著降低 [ $(0.48 \pm 0.06, 0.51 \pm 0.07)$  比  $(0.92 \pm 0.17, 0.94 \pm 0.12)$ ]。**结论** miR-223 可能通过下调 Twist1、TGFB2 基因的表达抑制心肌细胞中纤维化相关信号通路活化。

**【关键词】** 微小 RNA-223; 心肌纤维化; Twist 家族碱性螺旋-环-螺旋转录因子 1; 转化生长因子  $\beta$ 1 受体 2

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20191220-02779

## Effect and mechanism of miR-223 on fibrosis-related signaling pathway in rat cardiomyocytes

Zhang Duoduo<sup>1</sup>, Li Zongqi<sup>2</sup>, Kong Jingjing<sup>3</sup>

<sup>1</sup>1st Department of Arrhythmia, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116000, China; <sup>2</sup>Department of Clinical Medicine, Shenyang Medical University, Shenyang 110000, China; <sup>3</sup>Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116000, China

Zhang Duoduo and Li Zongqi contributed equally to this study

Corresponding author: Kong Jingjing, Email: jingjingeasy@126.com

**【Abstract】Objective** To investigate the protective effect of microRNA 223 (miR-223) on cardiac fibrosis-related signaling pathway and its regulation on expression of Twist family basic helix-loop-helix transcription factor 1 (Twist1) and transforming growth factor- $\beta$ 1 receptor 2 (TGFB2) in rat cardiomyocytes. **Methods** Rat cardiomyocytes (H9c2) were cultured in vitro and treated with TGF- $\beta$  to induce myocardial fibrosis. The miR-223 group was transfected with miR-223 lentivirus and miR-223-NC group was transfected with miR-223-NC lentivirus. Model group and blank control group had no transfection. Immunocytochemistry staining of alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) was used to calculate myocardial fibrosis. The mRNA level of miR-223, collagen I, collagen III, Twist1 and TGFB2 were detected by real-time PCR. The protein level of Twist1, TGFB2, collagen I, collagen III and  $\alpha$ -SMA were detected by Western blot. Target regulation of miR-223 on Twist1 and TGFB2 3'UTR was verified by double luciferase reporter gene system. **Results** The average optical density of  $\alpha$ -SMA-positive cardiomyocytes in miR-223 group ( $0.089 \pm 0.013$ ) was significantly lower than that in model group and miR-223-NC group ( $0.134 \pm 0.018$ ,  $0.132 \pm 0.016$ , respectively). The mRNA level of collagen I, collagen III, Twist1 and TGFB2 in miR-223

group were significantly lower than that in model group and miR-223-NC group (all  $P < 0.05$ ). The protein level of Twist1, TGFBR2, collagen I, collagen III and  $\alpha$ -SMA in miR-223 group was significantly lower than model group and miR-223-NC group (all  $P < 0.05$ ). Twist1, TGFBR2 3' UTR wild-type double luciferase reporter plasmids and miR-223 mimics were co-transfected in 293T cells, and luciferase activity was significantly reduced ( $0.48 \pm 0.06$  vs  $0.92 \pm 0.17$  and  $0.51 \pm 0.07$  vs  $0.94 \pm 0.12$ ). **Conclusion** MiR-223 may inhibit the activation of fibrosis-related signaling pathway in cardiomyocytes by down-regulating the expression of Twist1 and TGFBR2 genes.

**【Key words】** microRNA-223; Myocardial fibrosis; Twist family basic helix-loop-helix transcription factor 1; Transforming growth factor- $\beta$ 1 receptor 2

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20191220-02779

心肌纤维化(MF)是多种心脏疾病如心肌缺血、心力衰竭、心肌梗死及炎性心肌病等的共同病理过程,发生和调控机制较为复杂,临床常用检测方法为血清代谢物检测以及心肌活组织检测,但其限制较多<sup>[1]</sup>。因此,明确心肌细胞纤维化的具体机制,探究可能的分子治疗靶位对心肌纤维化治疗手段的开发至关重要。微小RNA(miRNA)是约22个核苷酸长度的内源性非编码小RNA,可结合至靶基因mRNA的3'非翻译区,在转录后水平调控基因的表达<sup>[2-3]</sup>。研究表明,在多种心脏疾病中,miRNA能够对心肌纤维化的发生与发展过程起到重要的调控作用<sup>[4]</sup>。根据相关文献报道,在心肌梗死及糖尿病心肌病中,抑制miR-143-3p及miR-451的表达能够有效抑制模型动物纤维化瘢痕的形成以及心肌纤维化的发生与发展,对疾病起到一定的改善作用<sup>[5-6]</sup>。我们通过对GEO数据库(GSE34571)筛选以及生物信息学分析发现miR-223在心肌梗死疾病过程中表达显著下调,并对细胞纤维化相关基因Twist家族碱性螺旋-环-螺旋转录因子1(Twist 1)、转化生长因子 $\beta$ 1受体2(TGFBR2)存在潜在靶向调控关系。有研究指出miR-223能够影响心肌细胞的分化,并且与心脏功能以及组织代谢的调控密切相关<sup>[7]</sup>。因此,本研究将初步探讨miR-223对心肌细胞中纤维化相关信号通路的调控作用及分子机制,为进一步了解心肌纤维化的病理机制提供新的理论支持。

## 材料与方 法

### 一、主要试剂

胎牛血清(美国Hyclone公司),DMEM培养基(美国GIBCO公司),转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )试剂(中国义翘神州公司),TGFBR2抗体(美国Boster公司), $\alpha$ -平滑肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)抗体、Twist1抗体、collagen I抗体、collagen III抗体、 $\beta$ -actin抗体、羊抗

兔IgG-HRP(中国万类生物科技公司),生物素标记山羊抗兔IgG(Beyotime公司),DAB显色液(北京索莱宝科技有限公司),TRIpure裂解液(北京百泰克生物技术有限公司),SYBR Green qPCR Mix(北京索莱宝科技有限公司),miR-223 mimics(中国金拓思公司),过表达阴性对照慢病毒、miR-223过表达慢病毒、Twist1、TGFBR2 3' UTR野生型及突变型双荧光素酶报告质粒(中国万类生物科技公司),荧光素酶检测试剂盒(中国凯基生物公司)。

### 二、实验方法

1. 细胞培养:大鼠心肌细胞H9c2细胞使用含10%胎牛血清的DMEM培养基于5% CO<sub>2</sub>、37℃条件下进行常规培养。

2. 模型建立与实验设置:选取对数生长期H9c2细胞,细胞处理分为4组,即正常组,模型组,模型+过表达阴性对照慢病毒(miR-223-NC)组与模型+miR-223过表达慢病毒(miR-223)组,其中,模型组细胞使用50 ng/ml TGF- $\beta$ 孵育24 h建立心肌细胞纤维化模型;miR-223-NC组与miR-223组细胞于心肌细胞纤维化模型建立24 h前使用过表达阴性对照慢病毒或miR-223过表达慢病毒进行慢病毒感染(荧光显微镜下观察记录转染情况,确定慢病毒转染效率),随后与模型组细胞同步建立心肌细胞纤维化模型;正常组细胞仅进行常规细胞培养。心肌细胞纤维化模型建立24 h后,同步收集各组细胞,待用于后续检测。

3. 实时荧光定量(real-time)PCR检测:心肌细胞纤维化模型建立24 h后,同步收集各组H9c2细胞,使用TRIpure试剂盒抽提细胞总RNA,并使用紫外分光光度计NANO 2000测定样本浓度,采用Exicycler™ 96荧光定量PCR仪进行real-time PCR检测,反应条件为:94℃预变性2 min;94℃变性15 s,60℃退火15 s,72℃延伸15 s,共40个循环。其中,miR-223检测以U6 snRNA作为内参,collagen I、collagen III、Twist1与TGFBR2检测以 $\beta$ -actin作

为内参,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算目标基因的相对表达水平。引物序列如下: miR-223 上游引物: 5' TGTCAGTTTGTCAAATACCCCG3'; miR-223 下游引物: 5' GTGCAGGGTCCGAGGTATTC3'; collagen I 上游引物: 5' CAAGGACTATGAAGTTGATGC3'; collagen I 下游引物: 5' ACCAGTAGAGAAATCGCAGT3'; collagen III 上游引物: 5' GCCTCCAG AACATTACATACC3'; collagen III 下游引物: 5' ACTGTCTTGCTCCATTCACCA3'; Twist1 上游引物: 5' CAGTCCGCTGAACGAGGCATTT3'; Twist1 下游引物: 5' TGCAGCTTGCCATCTTGGAGT3'; TGFBR2 上游引物: 5' TGAGAAGCCGCAGGAAGT3'; TGFBR2 下游引物: 5' CAGAGTGAAGCCGTG GTAG3'。

4. 免疫组化检测: H9c2 细胞贴附盖玻片培养, 于心肌细胞纤维化模型建立 24 h 后, 同步收集各组细胞, 经过 4% 多聚甲醛溶液室温固定, 0.5% TritonX-100 室温处理, 3%  $H_2O_2$  室温孵育, 正常血清封闭处理后, 使用  $\alpha$ -SMA 抗体 (1:200) 于 4 °C 条件下孵育过夜, 一抗孵育后, 加入生物素标记的羊抗兔 (1:200) 抗体于 37 °C 条件下孵育 30 min 进行二抗孵育, 经过 PBS 洗涤, DAB 显色, 苏木素染核, 甘油封片, 于显微镜下观察染色效果。

5. Western 印迹检测: 心肌细胞纤维化模型建立 24 h 后, 同步收集各组 H9c2 细胞, 加入相应体积裂解液后, 于 12 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 分离上清为所得的蛋白质抽提物, 使用 BCA 蛋白浓度分析试剂盒测定蛋白浓度。取 40  $\mu$ g 蛋白上样, 采用 10% 分离胶, 5% 浓缩胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿法转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 分别加入一抗 Twist1、TGFBR2、collagen I、collagen III 以及  $\alpha$ -SMA 抗体 (各 1:500 稀释), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤后加入二抗羊抗兔 IgG-HRP (1:5000), 37 °C 孵育 45 min, ECL 法检测。用凝胶图像处理系统 (Gel-Pro-Analyzer 软件) 分析目标条带的光密度值。

6. 荧光素酶报告基因测定: miR-223 突变型 (MT) (或 NC) 分别与 Twist1、TGFBR2 3' UTR-野生型 (WT)/Mut 双荧光素酶报告质粒共转染 293T 细胞。48 h 后收集细胞, 荧光素酶检测试剂盒分析活性变化情况。

### 三、统计学方法

使用 SPSS 21.0 统计分析软件进行实验数据的统计与分析。正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 并通过 Bonferroni 法进行校正, 进一步两两比较采

用独立样本  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、倒置荧光显微镜观察慢病毒感染结果

miR-223 过表达及对照慢病毒感染细胞 24 h 后, 倒置荧光显微镜下可观察到细胞中存在 GFP 荧光标签蛋白的大量表达 (图 1)。

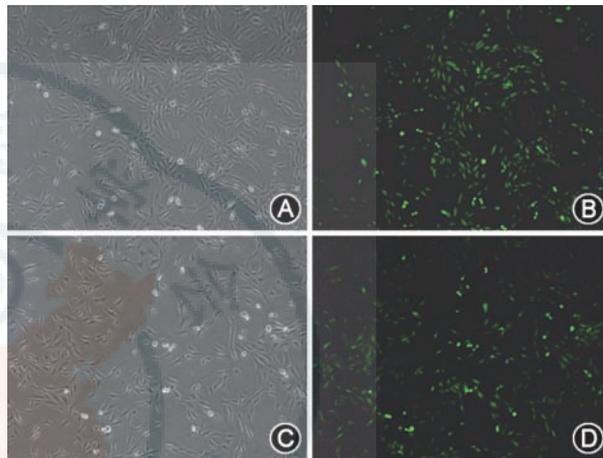


图 1 慢病毒感染后细胞内绿色荧光标签蛋白表达情况 ( $\times 100$ )  
A: 光镜观察下观察 miR-223 过表达细胞; B: 荧光显微镜下观察 miR-223 过表达细胞转染情况; C: 光镜观察下观察对照细胞; D: 荧光显微镜下观察对照细胞转染情况

### 二、miR-223 相对表达量检测

模型组和 miR-223-NC 组细胞 miR-223 相对表达量 ( $0.44 \pm 0.02$ ,  $0.39 \pm 0.03$ ) 显著低于正常组细胞 ( $1.00 \pm 0.06$ ), 且差异具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); miR-223 组细胞 miR-223 相对表达量 ( $1.50 \pm 0.06$ ) 显著高于模型组和 miR-223-NC 组细胞, 且差异具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。

### 三、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达检测

$\alpha$ -SMA 蛋白免疫组化反应阳性颗粒呈棕黄色或棕褐色, 定位于细胞质。免疫组化结果显示, 模型组与 miR-223-NC 组细胞  $\alpha$ -SMA 蛋白阳性细胞平均吸光度 ( $0.134 \pm 0.018$ ,  $0.132 \pm 0.016$ ) 显著高于正常组 ( $0.053 \pm 0.013$ ), 且差异具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); miR-223 组细胞  $\alpha$ -SMA 蛋白阳性细胞平均吸光度 ( $0.089 \pm 0.013$ ) 显著低于模型组或 miR-223-NC 组, 且差异具有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (图 2)。

### 四、collagen I、collagen III、Twist1、TGFBR2 基因相对表达量检测

模型组与 miR-223-NC 组细胞 collagen I、collagen III、Twist1 及 TGFBR2 基因的相对表达量显

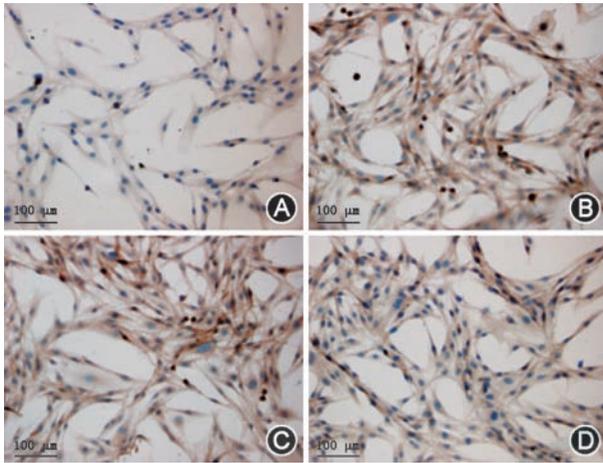
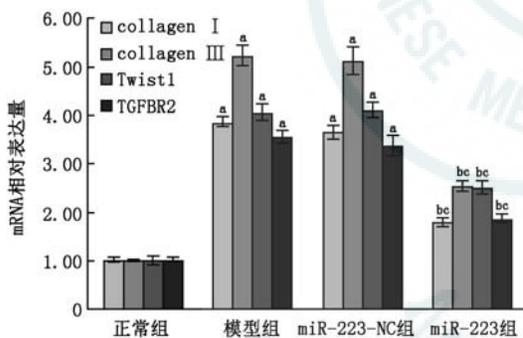


图 2 H9c2 细胞  $\alpha$ -SMA 蛋白表达检测( $\times 200$ )免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP)分析 A: 正常组细胞  $\alpha$ -SMA 蛋白表达免疫组化检测; B: 模型组细胞  $\alpha$ -SMA 蛋白表达免疫组化检测; C: miR-223-NC 组细胞  $\alpha$ -SMA 蛋白表达免疫组化检测; D: miR-223 组细胞  $\alpha$ -SMA 蛋白表达免疫组化检测

著高于正常组细胞,且差异具有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); miR-223 组细胞 collagen I、collagen III、Twist1 及 TGFBR2 基因的相对表达量显著低于模型组和 miR-223-NC 组细胞,且差异具有统计学意义(均  $P < 0.05$ )(图 3)。



注:与正常组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 miR-223-NC 组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$

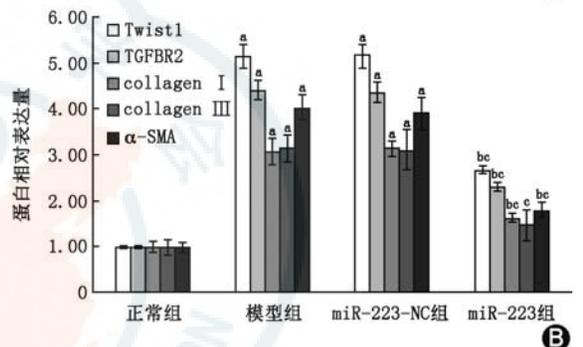
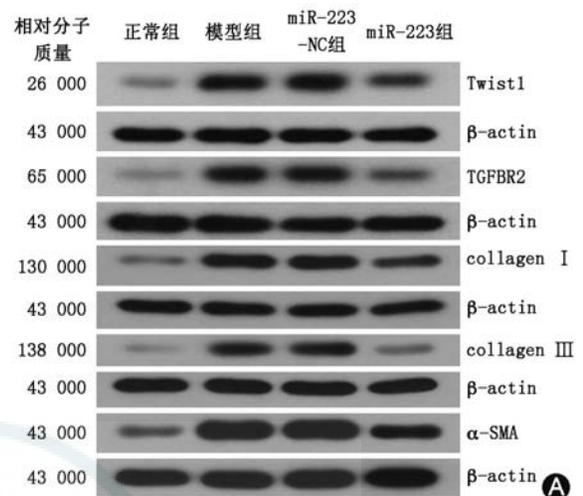
图 3 H9c2 细胞 collagen I、collagen III、Twist1 与 TGFBR2 基因相对表达量检测

### 五、Twist1、TGFBR2、collagen I、collagen III 及 $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量检测

与正常组细胞相比,模型组与 miR-223-NC 组细胞中 Twist1、TGFBR2、collagen I、collagen III 及  $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量显著升高,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组或 miR-223-NC 组细胞相比,miR-223 组细胞各检测指标蛋白相对表达量显著降低,且差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )(图 4)。

### 六、荧光素酶报告基因活性检测结果

参考生物信息学数据库 TargetScan 及 RNA22



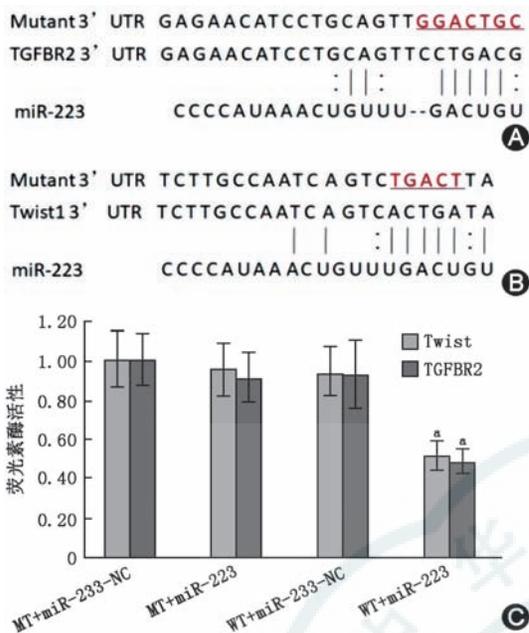
注: Twist 1 为 Twist 家族碱性螺旋-环-螺旋转录因子 1; TGFBR2 为转化生长因子  $\beta 1$  受体 2; 与正常组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 miR-223-NC 组相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$

图 4 Twist1、TGFBR2、collagen I、collagen III 及  $\alpha$ -SMA 蛋白相对表达量检测 A: Western 印迹法检测各指标蛋白表达水平; B: 各指标蛋白相对表达量统计分析

预测 miR-223 与 TGFBR2、Twist1 3' UTR 结合区域见图 5; 在转染 TGFBR2、Twist1 3' UTR 野生型(WT)的细胞中比较, WT+miR-223 组荧光素酶活性( $0.48 \pm 0.06, 0.51 \pm 0.07$ )显著低于 WT + tmiR-223-NC 组( $0.92 \pm 0.17, 0.94 \pm 0.12$ )( $P < 0.05$ ), 在转染 TGFBR2、Twist1 3' UTR 突变型(MT)的细胞中, MT+miR-223 组荧光素酶活性( $0.91 \pm 0.12, 0.95 \pm 0.13$ )与 MT+miR-223-NC 组( $1.00 \pm 0.13, 1.00 \pm 0.14$ )比较差异无统计学意义(图 5)。

## 讨 论

TGF- $\beta$  广泛表达于心脏组织, 在心脏疾病过程中, 包括心肌细胞和成纤维细胞在内的众多类型均可表达和分泌 TGF $\beta 1$ , 通过作用与细胞表面的 II 型受体激活 TGF $\beta 1$ /Smad 信号通路, 促进细胞外基质的异常沉积, 导致心肌纤维化<sup>[8]</sup>。有研究发现, 在



注: Twist 1 为 Twist 家族碱性螺旋-环-螺旋转录因子 1; TGFBR2 为转化生长因子  $\beta$ 1 受体 2; MT 为突变型, WT 为野生型; 与 WT+miR-233-NC 组相比,  $^a P < 0.05$

图 5 TGFBR2 及 Twist1 3' UTR 双荧光素酶活性分析 A: miR-223 与 TGFBR2 结合位点; B: miR-223 与 Twist1 结合位点预测; C: 荧光素酶实验分析 miR-223 对 TGFBR2 3' UTR 及 Twist1 3' UTR 的靶向调控

心肌缺血时,首先是 TGF- $\beta$  表达增加,继而 I、III 型胶原表达增加, TGF- $\beta$  可能通过自分泌和旁分泌调控胶原蛋白基因的表达<sup>[9]</sup>。 $\alpha$ -SMA 在心脏、肾脏、皮肤等损伤时均有表达,参与纤维化的发生发展并且与 TGF- $\beta$  表达相关。本研究结果表明,经过外源性 TGF- $\beta$  诱导刺激后, H9c2 细胞 collagen I、collagen III 与  $\alpha$ -SMA 基因及蛋白表达水平均显著升高,这与心肌纤维化的病理进程表现相吻合。

研究表明, miRNA 能够通过调控成纤维细胞增殖和分化、胶原代谢、细胞因子分泌等相关生物学过程,在心肌纤维化的发生发展中发挥重要的调控作用<sup>[10]</sup>。miR-223 能够通过靶向调控自噬,对心肌梗死起到一定的改善作用;在肥厚性心肌病中, miR-223 能够通过抑制靶基因 STIM1 的表达,缓解肥厚性心肌病<sup>[11-12]</sup>。此外,在心肌纤维化中, Liu 等<sup>[13]</sup>的研究结果显示, miR-223 能够通过靶向抑制 RASA1 的表达,进而促进心肌纤维化的发生与发展,这与我们的研究结果相矛盾。我们的研究结果显示,过表达 miR-223 能够有效抑制 collagen I、collagen III 与  $\alpha$ -SMA 基因与蛋白水平的表达,进而对心肌纤维化的病理进程起到一定的抑制作用。我们认为,在心肌组织中,由于 miR-223 具有多个

靶基因,其发挥作用的机制可能各不相同,也可能与其存在的相对水平有关,而究其主要通过哪些靶基因在心肌纤维化中发挥调控作用,仍有待进一步的研究和探讨。

Twist1 属于碱性螺旋-环-螺旋结构转录因子家族,在心脏瓣膜发育过程中 Twist1 能够促进细胞增殖、迁移以及细胞外基质相关基因的表达<sup>[14]</sup>。此外, Twist1 也能通过介导 EMT 过程促进心外膜源性细胞迁移到瓣环部位合成纤维化相关蛋白<sup>[15]</sup>。TGFBR2 是 TGF- $\beta$  信号通路的重要组成部分,活化的 TGFBR2 能够激活 TGFBR1 丝/苏氨酸激酶激活,影响转录、翻译过程进而影响心肌细胞纤维化的进展<sup>[8]</sup>。我们通过生物信息学方法分析发现, miR-223 对 Twist1 与 TGFBR2 存在潜在靶向调控关系,而本研究结果显示,过表达 miR-223 能够显著抑制 Twist1 与 TGFBR2 基因及蛋白水平的表达,表明 Twist1 与 TGFBR2 可能是 miR-223 的靶基因,并通过荧光素酶体系实验验证了这一推测。此外,本研究结果还表明,经过外源性 TGF- $\beta$  诱导刺激后, H9c2 细胞 Twist1 与 TGFBR2 基因及蛋白水平的表达水平显著升高,而过表达 miR-223 抑制 Twist1 与 TGFBR2 表达之后,心肌纤维化相关因子 collagen I、collagen III 与  $\alpha$ -SMA 的表达受到了显著的抑制,这与现阶段相关研究报道的结果及 Twist1 与 TGFBR2 在心肌纤维化中的作用机制相一致。

综上所述,本研究以 TGF- $\beta$  为刺激因子干预大鼠心肌细胞模型,检测发现作为心肌细胞纤维化的负向调节因子, miR-223 阻遏 TGF- $\beta$  诱导的心肌细胞中纤维化相关通路分子的表达,其机制涉及 miR-223 对 Twist1、TGFBR2 基因的下调。因此, miR-223 有可能作为心肌纤维化的潜在临床治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89(4): 744-753. DOI: 10.1093/cvr/cvq329.
- [2] Lee S, Vasudevan S. Post-transcriptional stimulation of gene expression by microRNAs[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 768: 97-126. DOI: 10.1007/978-1-4614-5107-5\_7.
- [3] Ul Hussain M. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(2):405-413. DOI: 10.1007/s00441-012-1438-0.
- [4] 李宁, 段明霞, 唐其柱. miR-22 在心肌重构中的作用[J]. 中

- 华医学杂志, 2018, 98(21): 1717-1719. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.21.019.
- [5] Li C, Li J, Xue K, et al. MicroRNA-143-3p promotes human cardiac fibrosis via targeting sprouty3 after myocardial infarction[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 129: 281-292. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.03.005.
- [6] Liang C, Gao L, Liu Y, et al. MiR-451 antagonist protects against cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mouse heart[J]. *Life Sci*, 2019, 224: 12-22. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.02.059.
- [7] Lu H, Buchan RJ, Cook SA. MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(3): 410-420. DOI: 10.1093/cvr/cvq010.
- [8] Khalil H, Kanisicak O, Prasad V, et al. Fibroblast-specific TGF- $\beta$ -Smad2/3 signaling underlies cardiac fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(10): 3770-3783. DOI: 10.1172/JCI94753.
- [9] Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, et al. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors[J]. *Circ Res*, 1991, 69(2): 483-490. DOI: 10.1161/01.res.69.2.483.
- [10] Fang L, Ellims AH, Moore XL, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for diffuse myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 314. DOI: 10.1186/s12967-015-0672-0.
- [11] Liu X, Deng Y, Xu Y, et al. MicroRNA-223 protects neonatal rat cardiomyocytes and H9c2 cells from hypoxia-induced apoptosis and excessive autophagy via the Akt/mTOR pathway by targeting PARP-1[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 118: 133-146. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.03.018.
- [12] Zhao ZH, Luo J, Li HX, et al. SOX2-mediated inhibition of miR-223 contributes to STIM1 activation in phenylephrine-induced hypertrophic cardiomyocytes[J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 443(1-2): 47-56. DOI: 10.1007/s11010-017-3209-4.
- [13] Liu X, Xu Y, Deng Y, et al. MicroRNA-223 regulates cardiac fibrosis after myocardial infarction by targeting RASA1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1439-1454. DOI: 10.1159/000489185.
- [14] Shelton EL, Yutzy KE. Twist1 function in endocardial cushion cell proliferation, migration, and differentiation during heart valve development[J]. *Dev Biol*, 2008, 317(1): 282-295. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.02.037.
- [15] Chakraborty S, Wrigg EE, Hinton RB, et al. Twist1 promotes heart valve cell proliferation and extracellular matrix gene expression during development in vivo and is expressed in human diseased aortic valves[J]. *Dev Biol*, 2010, 347(1): 167-179. DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.08.021.

(收稿日期: 2019-12-20)

(本文编辑: 朱瑶)

## ·文献速览·

## 晚期糖尿病周围神经病变的骨骼肌再生

Bohnert KL, Hastings MK, Sinacore DR, et al. Skeletal muscle regeneration in advanced diabetic peripheral neuropathy[J]. *Foot Ankle Int*, 2020, 41(5): 536-548. DOI: 10.1177/10711007209070.

糖尿病周围神经病变(DPN)下肢的肌肉量减少被认为是导致关节负荷增加、稳定性改变和致残的原因,但是其中的机制尚未明了。可能是由于肌纤维体积减少(肌萎缩),肌纤维破坏(变性)或两者兼有。退化性病变需要肌肉干细胞(卫星细胞)参与以再生肌纤维并重塑肌肉量。确定糖尿病周围神经病变肌肉的退化阶段和剩余再生能力将影响针对再生的治疗策略的效用。本研究从接受膝下截肢手术的12例合并或无糖尿病神经病变的个体中获取活肌肉组织,并对其进一步行组织学、转录表达谱分析以及将卫星细胞分离和培养。组织学分析显示,糖尿病周围神经病变者肌肉进行性退化和再生。转录表达谱支持这些发现,表明再生相关通路的显著上调。然而,在表现出最严重的病理结构的样品中,只发现了极少量不成熟的再生肌纤维,生长受

到了限制。卫星细胞的免疫染色表明仅在病理严重的亚组中卫星细胞相对数量才显著降低。同样,该组中培养的卫星细胞融合减少表明严重糖尿病周围神经病变的再生能力受损。

根据以上数据和分析可得,糖尿病周围神经病变肌肉表现出退变性伴再生障碍,在最严重的病变肌肉样本中再生受阻。这可能部分归因于卫星细胞的内源性功能障碍以及外源性结构病理(例如神经损伤)。外科和康复医生的目标是恢复糖尿病周围神经病变肌肉功能以改善生活能力和体力活动。明确肌纤维变性和再生受损是导致功能障碍的原因,提示基于细胞的辅助疗法可能会改善临床结局。

(李梓华编译 上海市同济医院足踝外科)