

Effect of Neriifolin on Differentiation of C2C12 and Extraocular Muscle Satellite Cells

Jingjing WANG^{1,2}, Ke YU¹, Xuemei ZHAO³, Yuping ZENG^{1*}

¹ Department of Neurology, West China Hospital of Sichuan University,
Chengdu, 610041, China

² Department of Neurology, ³ Department of Outpatient, Chengdu Shangjinnanfu Hospital,
Chengdu, 610041, China

SUMMARY. Paralytic strabismus involves a functional loss of extraocular muscles resulting from muscular or neuronal disorders. Currently, only a limited number of drugs are available for functional repair of extraocular muscles. Here, we investigated the effects of a novel drug, Neriifolin, on the differentiation of extraocular muscles as assessed in both *in vivo* and *in vitro* models. The effect of neriifolin on C2C12 cells was examined *in vitro* as evaluated with use of apoptosis, reactive oxygen species (ROS), and cell viability assays. Then, both *in vivo* and *in vitro* effects of this drug were examined on the differentiation of C2C12 and satellite cells within extraocular muscles in rabbits. For these latter experiments, RT-PCR and Western blot assays were used to determine expression levels of markers for myogenic differentiation. With use of neriifolin concentrations ranging from 0 to 10 μM , no effects were observed upon cell apoptosis, ROS, and cell cycle in C2C12 cells. Based on MTT assay results, neriifolin was shown to increase C2C12 cell proliferation. Moreover, neriifolin promoted the differentiation of C2C12 and satellite cells within extraocular muscles in rabbits, which were verified as based on cell morphology and expression levels of mRNA and protein markers of myogenic differentiation. Finally, neriifolin treatment also increased gene expressions of Myh3, Myog, and MCK. The capacity for Neriifolin to upgrade the differentiation of both C2C12 and satellite cells within extraocular muscles in rabbits at concentrations producing no adverse effects suggest that this drug may provide a safe and effective means to promote repair of damaged extraocular muscles.

RESUMEN. El estrabismo paráltico implica una pérdida funcional de los músculos extraoculares como resultado de trastornos musculares o neuronales. Actualmente, solo se dispone de un número limitado de fármacos para la reparación funcional de los músculos extraoculares. Aquí, investigamos los efectos de un nuevo fármaco, Neriifolina, en la diferenciación de los músculos extraoculares evaluados en modelos *in vivo* e *in vitro*. El efecto de neriifolina en las células C2C12 se examinó *in vitro* según se evaluó con el uso de ensayos de apoptosis, especies reactivas de oxígeno (ROS) y viabilidad celular. Luego, se examinaron los efectos *in vivo* e *in vitro* de este fármaco sobre la diferenciación de C2C12 y células satélite dentro de los músculos extraoculares en conejos. Para estos últimos experimentos, se utilizaron ensayos de RT-PCR y Western blot para determinar los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación miogénica. Con el uso de concentraciones de neriifolina que oscilan entre 0 y 10 μM , no se observaron efectos sobre la apoptosis celular, ROS y ciclo celular en células C2C12. Según los resultados del ensayo MTT, se demostró que neriifolina aumenta la proliferación de células C2C12. Además, neriifolina promovió la diferenciación de C2C12 y células satélite dentro de los músculos extraoculares en conejos, que se verificaron en función de la morfología celular y los niveles de expresión de ARNm y marcadores proteicos de diferenciación miogénica. Finalmente, el tratamiento con neriifolina también aumentó las expresiones génicas de Myh3, Myog y MCK. La capacidad de neriifolina para mejorar la diferenciación de las células C2C12 y satélite dentro de los músculos extraoculares en conejos en concentraciones que no producen efectos adversos sugiere que este fármaco puede proporcionar un medio seguro y eficaz para promover la reparación de los músculos extraoculares dañados.

KEY WORDS: C2C12, differentiation, *Euphorbia neriifolia*, extraocular muscle satellite cells, neriifolin.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: zengyuping2@sina.com