

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2025.07.018

论著 · 基础

仿生物电刺激通过激活 CREB/SHP2/AKT 信号通路介导 5-氮胞苷诱导间充质干细胞向骨骼肌分化及对产后盆底康复的影响

韩晓雯, 郝医书, 王科, 郭娅, 董莉

基金项目: 2021 年石家庄市科学技术研究与发展自筹计划(211200373)

作者单位: 050000 河北石家庄, 石家庄市第三医院妇产科(韩晓雯、郝医书、郭娅、董莉); 石家庄市第四医院产前诊断分中心(王科)

通信作者: 韩晓雯, E-mail: 13623305516@163.com



【摘要】目的 探讨环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(CREB)/含 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶(SHP-2)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路在人骨髓间充质干细胞(BMSCs)分化为骨骼肌细胞中的作用,以及该信号通路对产后盆底康复的影响。方法 于 2022 年 11 月—2023 年 4 月在石家庄市第三医院实验室进行实验。利用人骨髓干细胞成骨分化数据集上的各种分析技术,揭示不同的基因表达模式和调控关系。使用人骨髓间充质干细胞系 CP-H166 进行实验,将细胞分为对照组(NC 组)、5-氮胞苷组、5-氮胞苷+电刺激组、5-氮胞苷+电刺激+CREB 抑制剂组和 5-氮胞苷+电刺激+CREB 激动剂组。通过 Western blot、Fura-2 钙离子荧光染色和免疫荧光染色等方法,检测各组细胞中相关蛋白和钙离子浓度的表达和分布。结果 在成骨分化的 3 或 4 d 与 1 或 2 h 的时间点比较中,火山图和平均差图分析显示 CREB、SHP2、MyoD、MyoG、MYHC 和 TPM1 等基因显著下调。Western blot 检测结果显示,与对照组相比,5-氮胞苷和电刺激处理提高了 CREB、SHP2、AKT、MyoD、MyoG、TPM1 蛋白的表达水平($P<0.05$)。加入 CREB 抑制剂后,SHP2 和 AKT 的表达降低($P<0.05$),进而减少 MyoD、MyoG 和 TPM1 的表达;而加入 CREB 激动剂后,上述蛋白含量升高($P<0.05$)。Fura-2 钙离子荧光染色结果表明,5-氮胞苷和电刺激可提高钙离子浓度($P<0.05$)。免疫荧光染色结果显示,5-氮胞苷和电刺激处理增加了 p-CREB 和 MyoD 的表达和分布($P<0.05$),加入 CREB 激动剂进一步增加了这些蛋白的表达($P<0.05$),而加入 CREB 抑制剂则降低了其表达($P<0.05$)。结论 CREB/SHP2/AKT 信号通路在 BMSCs 分化为骨骼肌细胞过程中具有重要作用。调控该信号通路可以显著影响细胞的分化过程,促进产后盆底康复。

【关键词】盆底肌功能;仿生物电刺激;间充质干细胞;骨骼肌细胞;含 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶-2;环磷酸腺苷效应元件结合蛋白

【中图分类号】R714.69;R454.1

【文献标识码】A

Biomimetic electrical stimulation mediates 5-azacytidine-induced mesenchymal stem cell differentiation to skeletal muscle through activation of the CREB/SHP2/AKT signaling pathway and its effect on postnatal pelvic floor rehabilitation

Han Xiaowen*, Xi Yishu, Wang Ke, Guo Ya, Dong Li.* Department of Obstetrics and Gynecology, The Third Hospital of Shijiazhuang, Hebei, Shijiazhuang 050000, China

Funding program: Self-funded Plan for Scientific and Technological Research and Development of Shijiazhuang City in 2021 (211200373)

Corresponding author: Han Xiaowen, E-mail: 13623305516@163.com

【Abstract】Objective To explore the role of CREB/SHP2/AKT signaling pathway in the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into skeletal muscle cells and the effect of this signaling pathway on postnatal pelvic floor rehabilitation. Methods The experiments were conducted from November 2022 to April 2023 in the Laboratory of the Third Hospital of Shijiazhuang. Using various analytical techniques on the human bone marrow stem cell osteogenic differentiation dataset, different gene expression patterns and regulatory relationships were revealed, shedding light on the underlying mechanisms of the disease. Experiments were performed using the human bone marrow MSC cell line CP-H166, and the cells were divided into a control group (NC group), a 5-azacytidine group, a 5-azacytidine+electrostimulation group, a 5-azacytidine+electrostimulation+CREB inhibitor group, and a 5-azacytidine+electrostimulation+CREB agonist group. The expression and distribution of relevant proteins and calcium ion concentration in cells of each group were detected by Western blot, Fura-2

calcium ion fluorescence staining and immunofluorescence staining. **Results** Western blot assay showed that 5-azacytidine and electrical stimulation treatments increased the expression levels of CREB, SHP2, AKT, MyoD, MyoG, and TPM1 proteins compared with the control group ($P<0.05$). The addition of CREB inhibitor decreased the expression of SHP2 and AKT ($P<0.05$), which in turn decreased the expression of MyoD, MyoG, and TPM1; whereas the addition of CREB agonist increased the level of the above-mentioned proteins ($P<0.05$). The results of calcium fluorescence staining of Fura-2 showed that 5-azacytidine and electrical stimulation increased the calcium ion concentration ($P<0.05$). Immunofluorescence staining showed that 5-azacytidine and electrical stimulation treatments increased the expression and distribution of p-CREB and MyoD ($P<0.05$), and the addition of CREB agonists further increased the expression of these proteins ($P<0.05$), whereas the addition of CREB inhibitors decreased their expression ($P<0.05$). **Conclusion** The CREB/SHP2/AKT signaling pathway has an important role in the differentiation of BMSCs into skeletal muscle cells. Modulation of this signaling pathway can significantly affect the cell differentiation process and promote postnatal pelvic floor rehabilitation.

【Key words】 Pelvic floor muscle function; Biomimetic electrical stimulation; Mesenchymal stem cells; Skeletal muscle cells; SHP-2; CREB

产后盆底功能障碍是影响女性健康的一个常见问题,主要表现为尿失禁、子宫脱垂和阴道松弛等症状。这些问题不仅严重影响女性的生活质量,还可能导致心理压力和社交障碍^[1]。传统的盆底康复方法包括物理治疗、盆底肌肉锻炼和手术治疗,但这些方法往往需要较长的治疗时间,且效果因人而异。近年来,仿生物电刺激作为一种新兴的治疗手段,逐渐受到关注^[2]。仿生物电刺激通过模拟人体生物电信号,刺激神经和肌肉,已被广泛应用于多种神经肌肉疾病的治疗^[3]。然而,其在产后盆底康复中的作用机制尚不完全明确。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其自我更新和多向分化的潜能,成为组织修复和再生研究中的热点^[4]。研究表明,MSCs可以在特定的条件下分化为骨骼肌细胞,有助于盆底肌损伤组织的修复。5-氮胞苷为一种低甲基化的强效生长抑制剂及细胞毒素剂,抑制 DNA 甲基转移酶。也是作用于 S 期的细胞周期特异性药物,能迅速磷酸化并掺入 RNA,通过破坏核酸顺利翻译为蛋白质,而抑制蛋白质的合成。还可通过抑制乳清酸核苷酸脱羧酶而影响嘧啶的合成,是一种基因表达、基因激活和沉默的重要调节剂,它能够诱导骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)分化为骨骼肌细胞并表达其特异性标志物^[5]。骨骼肌细胞的分化受多种信号通路的调控,其中环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)^[6-7]、含 Src 同源 2 结构域蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase-2, SHP-2)和蛋白激酶 B (AKT)信号通路在肌细胞的分化和功能维持中起着关键作用^[8]。

本研究旨在探索仿生物电刺激对间充质干细胞内 CREB/SHP2/AKT 信号通路的影响及其在骨骼肌分化

过程中的作用,从而揭示其促进产后盆底康复的机制,为产后盆底康复提供一种新颖且有效的治疗策略,同时加深对仿生物电刺激和间充质干细胞在组织修复中的作用机制的理解,报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 5-氮胞苷购自 Selleck 公司;人骨髓间充质干细胞系 CP-H166 与人骨髓间充质干细胞,完全培养基 CM-H166、DMEM 培养基和其他细胞培养试剂均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清 A58G00J 购自 Gemini 公司;CREB 抑制剂(HY-101120)和 CREB 激动剂(HY-151527)均购自美国 MedChemExpress 公司;兔抗 CREB 单克隆抗体、兔抗 SHP2 单克隆抗体、兔抗 AKT 单克隆抗体、兔抗 MyoD 单克隆抗体、兔抗 MyoG 单克隆抗体、兔抗 TPM1 单克隆抗体、GAPDH 抗体均购自英国 Abcam 公司;PVDF 膜 IPVH20200 与 BCA 蛋白定量测定试剂盒均购自美国 Millipore 公司;Fura-2 AM 钙离子荧光探针、结晶紫和 RIPA 裂解液 P0013K 均购自江苏碧云天生物科技有限公司。

1.2 实验方法 于 2022 年 11 月—2023 年 4 月在石家庄市第三医院实验室进行实验。

1.2.1 细胞培养:BMSCs 细胞置于 37℃、5%CO₂ 的培养箱中,加入人骨髓间充质干细胞完全培养基进行培养;人骨髓间充质干细胞完全培养基含 FBS、生长添加剂、Penicillin、Streptomycin 等,当细胞处于对数生长期时使用含有 0.25% EDTA 的胰酶对其进行消化,以进行传代实验。

1.2.2 细胞处理与分组:取正处于对数生长期的 BMSCs 细胞经过胰酶消化后接种于 6 孔培养板中,等到细胞培养密度达到 85%~90%时,将 BMSCs 细胞系分为 5 组:对照组(NC 组)只加入完全培养基不额外

对其进行处理;5-氮胞苷组(诱导 BMSCs 细胞分化)在培养基中加入 5 ml 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-氮胞苷诱导 24 h;5-氮胞苷+电刺激组在 5-氮胞苷组的基础上使用 0.05 V/cm 的电场强度对细胞系施加仿生电刺激;5-氮胞苷+电刺激+CREB 抑制剂组在 5-氮胞苷+电刺激组的基础上加入 CREB 抑制剂(HY-101120)进行处理;5-氮胞苷+电刺激+CREB 激动剂组在 5-氮胞苷+电刺激组的基础上加入 CREB 激动剂(HY-151527)进行处理。

1.2.3 生物信息学分析:人骨髓干细胞成骨分化过程中的 mRNA 表达谱被纳入数据集 GSE80614。从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中获取数据集,通过 GEO2R(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)在线分析工具,分析不同时间点(3 d 和 4 d 与 1 h 和 2 h)差异表达的 mRNA。设置阈值为 $|\log\text{FC}| > 1, P < 0.05$ 。

1.2.4 Western blot 检测相关蛋白水平:使用 RIPA 裂解缓冲液分别从对照组、5-氮胞苷组、5-氮胞苷+电刺激组、5-氮胞苷+电刺激+CREB 抑制剂组、5-氮胞苷+电刺激+CREB 激动剂组 BMSCs 细胞中提取总蛋白,并使用 BCA 蛋白检测试剂盒对蛋白浓度进行定量测量。随后,蛋白质通过 8%~12% SDS-PAGE 凝胶进行分离,并转移到 PVDF 膜上,在室温下用 5%脱脂牛奶在 TBST 中孵育 1 h,然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用一抗孵育过夜:CREB、SHP2、AKT、MyoD、MyoG。随后,用二抗在室温下孵育膜 2 h,并用增强化学发光法显现蛋白条带。最后,使用 ImageJ 软件分析蛋白条带强度,并以 GAPDH 作为内参进行比较分析。

1.2.5 Fura-2 钙离子荧光染色:将对照组、5-氮胞苷组、5-氮胞苷+电刺激组中活率>90%的人骨髓间充质干细胞分别重悬于 2%BSA 缓冲 Hanks 液,并调整细胞密度至 3×10^6 个/ml,加入 5-氮胞苷终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Fura-2/AM,37 $^{\circ}\text{C}$,避光振荡孵育 30 min。将每组负载后的细胞悬液用 0.2%BAS 缓冲 Hanks 液洗涤 3 次,25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min,保证 Fura-2/AM 完全去酯化。测定前用含 0.2%BSA 缓冲 Hanks 液调整每组细胞密度为 1.5×10^6 个/ml,每次取 2 ml 细胞悬液进行测定。使用荧光显微镜通过 340 和 380 nm 附近的激发波长激发 Fura-2,然后测量 510 nm 附近的荧光信号。

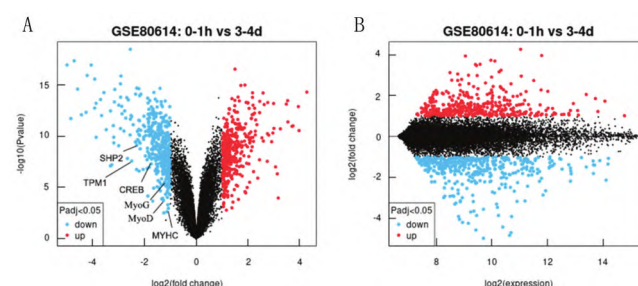
1.2.6 BMSCs 细胞免疫荧光染色:BMSCs 细胞样品用 4%PFA 固定 20 min,随后用 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 5 min,用 0.1%Triton X-100 透化 2 min。然后用 10%山羊血清阻断,并用兔抗 CREB 和兔抗 MyoD 抗体检测在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗涤切片后,在室温下用相应的

Alexa Fluor 抗体标记。在荧光显微镜上进行成像。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 21.0 软件对数据进行处理分析。正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验,多组之间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析结果 通过对数据集 GSE80614 的分析,笔者观察到在 BMSCs 的成骨分化过程中,不同时间点的基因表达存在显著差异。具体而言,在成骨分化的 3 或 4 d 与 1 或 2 h 的时间点比较中,火山图和平均差图分析显示 CREB、SHP2、MyoD、MyoG、MYHC 和 TPM1 等基因显著下调,见图 1。



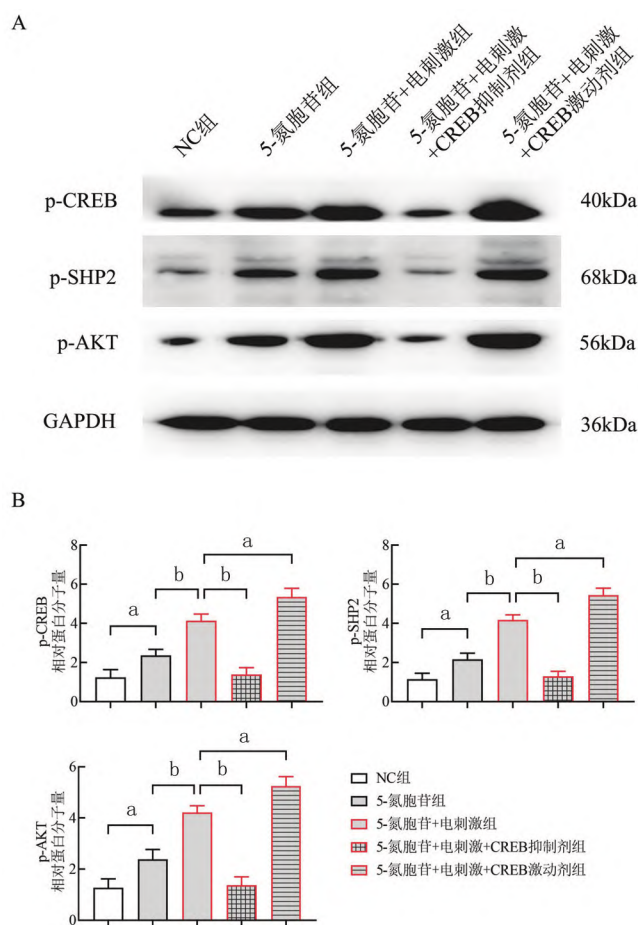
注: A.差异基因火山图;B.差异基因平均差图。

图 1 生物信息学分析 CREB、SHP2、MyoD、MyoG、MYHC 和 TPM1 等基因在成骨分化过程中的作用

Fig. 1 Bioinformatics analysis of the roles of CREB, SHP2, MyoD, MyoG, MYHC, and TPM1 genes in osteogenic differentiation process

2.2 Western blot 检测 BMSCs 细胞 p-CREB、p-SHP2、p-AKT、MyoD、MyoG、TPM1 蛋白水平 Western blot 检测结果显示:与对照组相比,5-氮胞苷组 p-CREB、p-SHP2、p-AKT、MyoD、MyoG、TPM1 的相对蛋白表达水平升高($P < 0.05$);与 5-氮胞苷组相比,5-氮胞苷+电刺激组 p-CREB、p-SHP2、p-AKT、MyoD、MyoG、TPM1 的相对蛋白表达水平升高($P < 0.05$);与 5-氮胞苷+电刺激组相比,5-氮胞苷+电刺激+CREB 激动剂组 p-CREB、p-SHP2、p-AKT、MyoD、MyoG、TPM1 的相对蛋白表达水平升高($P < 0.05$),5-氮胞苷+电刺激+CREB 抑制剂组 p-CREB、p-SHP2、p-AKT、MyoD、MyoG、TPM1 的相对蛋白表达水平降低($P < 0.05$),见图 2、3。以上结果表明 5-氮胞苷可以为 BMSC 分化为骨骼肌细胞提供环境进行诱导,适当的电刺激促进 Ca^{2+} 内流导致 BMSC 中 CREB 表达提高,在加入 CREB 抑制剂后 p-SHP2 的表达量降低,进而减少 AKT、MyoD 与 MyoG 的表达,最终减少了骨骼肌细胞标志物的 TPM1 表达;

反之在使用 CREB 激动剂后,以上蛋白水平明显高于 5-氮胞苷+电刺激组,见图 2、3。

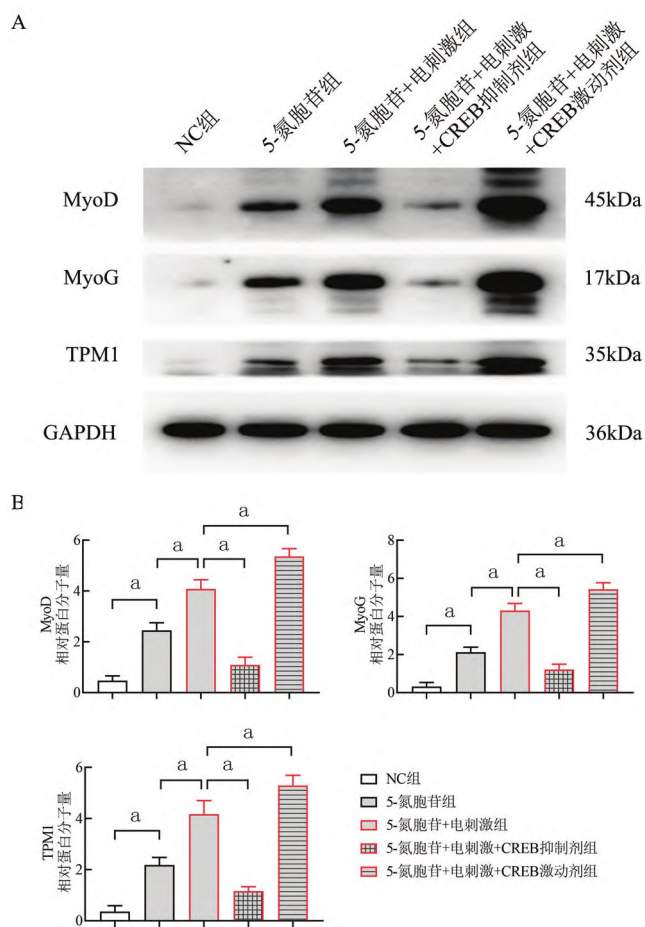


注: A. Western blot 蛋白检测; B. Western blot 蛋白检测结果统计; * $P < 0.05$, $^b P < 0.01$ 。

图 2 5 组 BMSCs 细胞中 CREB/SHP2/AKT 相关蛋白表达比较
Fig.2 Comparison of CREB/SHP2/AKT related protein expression in 5 groups of BMSCs cells

2.3 Fura-2 钙离子荧光染色检测 BMSCs 细胞中钙离子相对浓度 Fura-2 钙离子荧光染色检测结果显示:与对照组相比,5-氮胞苷组中的钙离子浓度升高 ($P < 0.05$);与 5-氮胞苷组相比,5-氮胞苷+电刺激组钙离子浓度升高 ($P < 0.05$),见图 4。

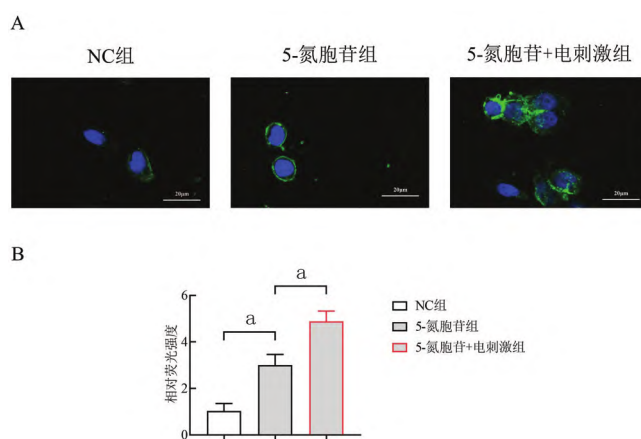
2.4 细胞免疫荧光染色观察 BMSCs 细胞中 Merge、p-CREB、DAPI、MyoD 表达和分布 免疫荧光染色结果显示:5-氮胞苷组 Merge、p-CREB、DAPI、MyoD 的分布数量多于 NC 组 ($P < 0.05$);5-氮胞苷+电刺激组 Merge、p-CREB、DAPI、MyoD 的分布数量多于 5-氮胞苷组 ($P < 0.05$);5-氮胞苷+电刺激+CREB 激动剂组 Merge、p-CREB、DAPI、MyoD 的分布数量多于 5-氮胞苷+电刺



注: A. Western blot 蛋白检测; B. Western blot 蛋白检测结果统计; * $P < 0.01$ 。

图 3 5 组 BMSCs 细胞中骨骼肌细胞标志物 MyoD/MyoG/TPM1 蛋白表达比较

Fig.3 Comparison of MyoD/MyoG/TPM1 protein expression in skeletal muscle cell markers among 5 groups of BMSCs



注: A. 3 组 BMSCs 细胞中钙离子浓度检测 (Fura-2, $\times 400$); B. 3 组 BMSCs 细胞中钙离子浓度比较; * $P < 0.01$ 。

图 4 3 组 BMSCs 细胞中钙离子浓度比较
Fig.4 Comparison of calcium ion concentrations in three groups of BMSCs cells

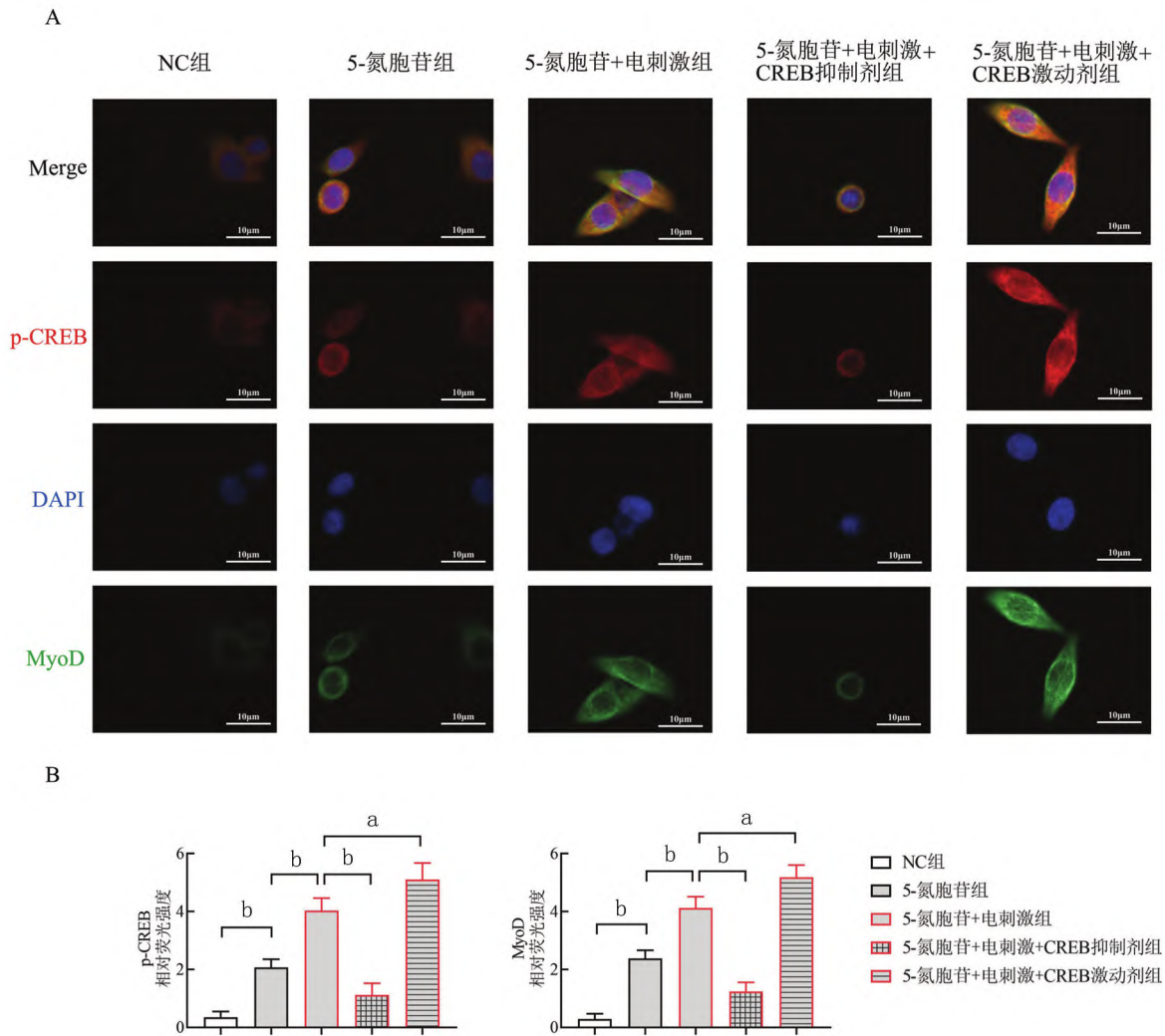
激组 ($P<0.05$) ; 5-氮胞苷+电刺激+CREB 抑制剂组 Merge、p-CREB、DAPI、MyoD 的分布数量少于 5-氮胞苷+电刺激组 ($P<0.05$) , 见图 5。实验结果表明 p-CREB 的高表达可以促进 MyoD 高表达, 进而促进 BMSCs 分化为骨骼肌细胞。从而促进产后盆底康复, 见图 6。

3 讨 论

产后盆底功能障碍传统治疗方法效果有限。研究发现, 仿生物电刺激作为新疗法, 通过模拟生物电信号刺激神经肌肉, 但其在盆底康复中的作用机制尚不明确。MSCs 能分化为骨骼肌细胞, 有助于修复盆底肌。5-氮胞苷可诱导 MSCs 分化为骨骼肌细胞, 而骨骼肌细胞的分化受多种信号通路的调控, 探索仿生物电刺

激通过信号通路的具体影响机制就显得尤为重要。本研究探讨了 CREB/SHP2/AKT 信号通路在 BMSCs 分化为骨骼肌细胞中的关键作用, 并评估了电刺激与 5-氮胞苷联合使用对细胞分化和钙离子浓度的影响。研究结果表明, 5-氮胞苷和电刺激均显著促进了 BMSCs 的分化, 且 CREB/SHP2/AKT 信号通路在这一过程中发挥了重要作用。

CREB 是细胞内重要的转录因子, 参与多种细胞生理活动, 如生长、分化和存活^[9]。本实验结果显示, 5-氮胞苷处理提高了 CREB 的表达水平, 电刺激进一步增强了这一效果。CREB 激动剂的加入进一步上调了 CREB 的表达, 而 CREB 抑制剂则降低了其表达。这些结果表明, CREB 在 BMSCs 向骨骼肌细胞分化中



注: A. Merge、p-CREB、DAPI、MyoD 的荧光强度与分布检测; B. p-CREB、MyoD 蛋白相对荧光强度比较; ^a $P<0.05$; ^b $P<0.01$ 。

图 5 5 组 BMSCs 细胞中 p-CREB、MyoD 蛋白的表达及分布与相对荧光强度比较

Fig.5 Comparison of expression and distribution of p-CREB and MyoD proteins with relative fluorescence intensity in 5 groups of BMSCs cells

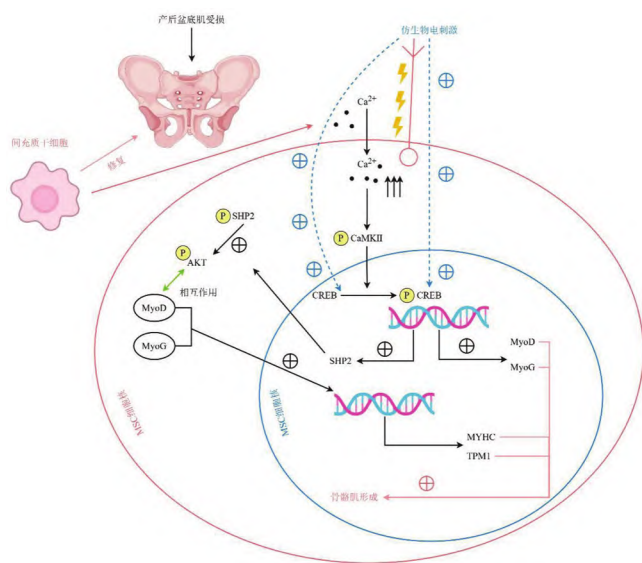


图6 调控 CREB/SHP2/AKT 信号通路在 BMSCs 分化为骨骼肌细胞过程、促进产后盆底康复机制示意图

Fig.6 Schematic diagram of regulating the CREB/SHP2/AKT signaling pathway in the differentiation of BMSCs into skeletal muscle cells and promoting postpartum pelvic floor rehabilitation mechanism

起着促进作用。这一发现与先前研究一致^[10],后者表明 CREB 在肌细胞分化中起关键作用,通过调控下游基因的表达促进肌细胞的形成。

SHP2 是信号转导中的重要调节因子,参与细胞增殖和分化的调控^[11]。AKT 是细胞信号转导中的重要成分,调控细胞生长、存活和代谢^[12]。已有研究表明,AKT 可以通过 PI3K/AKT 信号通路促进细胞存活和分化^[13]。本实验数据显示,电刺激和 5-氮胞苷均显著上调 SHP2 表达进而上调了 AKT 的表达,CREB 激动剂进一步增强了这一效果,而 CREB 抑制剂则显著降低了 SHP2 表达进而降低了 AKT 表达。这些结果表明,SHP2 在 CREB 调控下促进 SHP2/AKT 通路的激活进而促进 BMSCs 的分化,说明 SHP2 与 AKT 信号通路在骨骼肌细胞分化中的关键作用。

电刺激作为一种物理手段,已被广泛用于促进细胞分化和组织再生^[14-15]。本实验结果显示,电刺激提高 BMSCs 分化效率,增加 CREB、SHP2、AKT 等关键蛋白的表达,并提高了钙离子浓度。电刺激与 5-氮胞苷联合使用,进一步增强了这些效果,表明电刺激在促进细胞分化中具有协同作用。这一结果与之前的研究一致^[16],后者表明电刺激通过增加细胞内钙离子浓度,激活下游信号通路,从而促进细胞分化。

钙离子作为第二信使,参与多种细胞生理过程,包

括细胞分化^[17]。本实验结果显示,5-氮胞苷和电刺激处理均提高细胞内钙离子浓度,电刺激的加入进一步增强这一效果。这表明在 BMSCs 向骨骼肌细胞分化过程中,钙离子浓度的增加是一个重要的调控因素。已有研究表明,钙离子通过激活钙依赖性信号通路,促进细胞分化和组织再生^[18],本实验结果支持这一观点,并进一步说明钙离子在骨骼肌细胞分化中的关键作用。

本实验结果显示,CREB、SHP2 和 AKT 在 BMSCs 分化过程中相互协同,构成一个复杂的信号网络。CREB 通过调控 SHP2 和 AKT 的表达,促进细胞分化;SHP2 通过激活 AKT 表达,AKT 通过与 MyoD 相互作用,支持细胞存活和分化。MyoD、MyoG 和 TPM1 作为骨骼肌细胞分化的标志物,各自发挥着不同但互补的重要功能^[19-21]。MyoD 主要在早期分化阶段,通过启动基因表达来促使前体细胞向肌细胞分化;MyoG 则在中晚期分化阶段起作用,促进肌细胞的进一步成熟和融合;TPM1 作为结构蛋白,在成熟肌细胞中发挥关键作用,支持肌纤维的功能性收缩。这些标志物的表达变化反映了骨骼肌细胞分化和成熟的不同阶段,是研究肌生成机制的重要工具。这些结果表明,CREB/SHP2/AKT 信号通路的激活可以提高 MyoD、MyoG 和 TPM1 的表达,进而表明此通路在 BMSCs 向骨骼肌细胞分化中具有关键作用,调控这一信号通路可以显著影响细胞的分化效率。

尽管本研究在 BMSCs 向骨骼肌细胞分化方面取得了一些重要的发现,但仍存在一定的局限性。本实验仅使用了 BMSCs 作为研究对象,未来需要在其他类型的干细胞和原代细胞中验证这些结果,以确定其普遍性和特异性;本研究主要在体外条件下进行,实验结果可能无法完全反映体内环境中的真实情况,需要在体内模型中进一步验证;实验集中于短期观察,长期效应尚不清楚,未来的研究应关注长期处理的效果。信号通路的复杂性也是一个重要的局限性,本研究聚焦于 CREB/SHP2/AKT 通路,但细胞分化涉及多条信号通路的相互作用,未来应探讨其他信号通路(如 Wnt/ β -catenin、Notch、Hedgehog 等)与其相互作用^[22-23]。电刺激参数的选择和细胞响应的个体差异也需要进一步优化和标准化。然而,本研究在创新性方面也取得了显著成果;首次探讨了电刺激与 5-氮胞苷联合使用对 BMSCs 分化的影响,发现二者具有显著的协同作用,显著提高了细胞分化效率;此外,本研究详细揭示了 CREB/SHP2/AKT 信号通路在 BMSCs 向骨骼肌细胞分化中的关键作用,包括钙离子浓度的调控机制。这些发现为产后盆底康复提供了新的理论基础和实践方

法,同时也为再生医学和组织工程的发展提供了重要的技术支持。通过优化电刺激和 5-氮胞苷的使用,未来有望开发更为高效的细胞分化和组织再生技术。

4 结 论

综上所述,CREB/SHP2/AKT 信号通路在 BMSCs 向骨骼肌细胞分化过程中起着重要作用。电刺激和 5-氮胞苷均能显著提高该信号通路中关键蛋白的表达,促进细胞分化。通过调控 CREB/SHP2/AKT 信号通路,可以显著影响 BMSCs 的分化过程,为产后盆底康复提供新的思路和方法。未来的研究可以进一步探索这一信号通路的具体机制及其在其他细胞分化过程中的作用,为再生医学和组织工程提供更为广泛的应用前景。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

韩晓雯:提出研究方向、研究思路,研究选题,设计研究方案、研究流程,论文终审;郝医书:实施研究过程,数据收集,分析整理,进行文献调研与整理;王科:参与设计研究方案、研究流程,论文终审;郭娅:实验操作,设计论文框架,撰写论文,起草论文、修订论文;董莉:实施研究过程,数据收集

参考文献

- [1] 何素云,张霜,谢臻蔚. 产后盆底功能障碍发病机制及康复治疗研究进展[J]. 吉林医学, 2024, 45(10): 2515-2518. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0412.2024.10.060.
- [2] 徐若成,王永,闻先萍,等. 盆底康复治疗研究与进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2024, 45(2): 183-187. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1256.2024.02.018.
- [3] 李欢. 探究电刺激联合腹式呼吸治疗产后腹直肌分离的临床疗效[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2018, 2(7): 51.
- [4] 蔡海军. 间充质干细胞在组织修复和再生中应用的研究进展[J]. 重庆医学, 2023, 52(5): 782-786. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2023.05.030.
- [5] Wang YH, Wang DR, Guo YC, et al. The application of bone marrow mesenchymal stem cells and biomaterials in skeletal muscle regeneration[J]. Regen Ther, 2020, 15: 285-294. DOI: 10.1016/j.reth.2020.11.002.
- [6] Liang MH, Wendland JR, Chuang DM. Lithium inhibits Smad3/4 transactivation via increased CREB activity induced by enhanced PKA and AKT signaling[J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 37(3): 440-453. DOI: 10.1016/j.mcn.2007.10.017.
- [7] Zhu M, Zheng R, Guo Y, et al. NDRG4 promotes myogenesis via Akt/CREB activation[J]. Oncotarget, 2017, 8(60): 101720-101734. DOI: 10.18632/oncotarget.21591.
- [8] Kontaridis MI, Eminaga S, Fornaro M, et al. SHP-2 positively regulates myogenesis by coupling to the Rho GTPase signaling pathway[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(12): 5340-5352. DOI: 10.1128/mcb.24.12.5340-5352.2004.
- [9] Steven A, Friedrich M, Jank P, et al. What turns CREB on and off and why does it matter[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(20):

- 4049-4067. DOI: 10.1007/s00018-020-03525-8.
- [10] Zhou P, Ouyang L, Jiang T, et al. Progesterone and cAMP synergistically induce SHP2 expression via PGR and CREB1 during uterine stromal decidualization[J]. Febs J, 2024, 291(1): 142-157. DOI: 10.1111/febs.16966.
- [11] Wei Q, Luo S, He G. Mechanism study of tyrosine phosphatase shp-1 in inhibiting hepatocellular carcinoma progression by regulating the SHP2/GM-CSF pathway in TAMs[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 9128. DOI: 10.1038/s41598-024-59725-w.
- [12] Chandran R, Knobloch TJ, Anghelina M, et al. Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293(1): C267-276. DOI: 10.1152/ajpcell.00594.2006.
- [13] Lei W, Liu Z, Su Z, et al. Hyperhomocysteinemia potentiates megakaryocyte differentiation and thrombopoiesis via GH-PI3K-Akt axis[J]. J Hematol Oncol, 2023, 16(1): 84. DOI: 10.1186/s13045-023-01481-x.
- [14] Cheng H, Huang Y, Yue H, et al. Electrical stimulation promotes stem cell neural differentiation in tissue engineering[J]. Stem Cells Int, 2021, 2021: 6697574. DOI: 10.1155/2021/6697574.
- [15] Leppik L, Oliveira KMC, Bhavsar MB, et al. Electrical stimulation in bone tissue engineering treatments[J]. Eur J Trauma Emerg Surg, 2020, 46(2): 231-244. DOI: 10.1007/s00068-020-01324-1.
- [16] He X, Li L, Tang M, et al. Biomimetic electrical stimulation induces rat bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte-like cells via TGF-beta 1 in vitro[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2019, 148: 47-53. DOI: 10.1016/j.phiomolbio.2017.09.023.
- [17] 张广伟,梁卓文,杨治. Ca²⁺ 在电磁场调控成骨细胞增殖与分化中的作用[J]. 中国医学物理学杂志, 2024, 41(1): 95-100. DOI: 10.3969/j.issn.1005-202X.2024.01.014.
- [18] Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(4): 2937-2948. DOI: 10.1002/jcp.26042.
- [19] Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis[J]. Semin Cell Dev Biol, 2005, 16(4-5): 585-595. DOI: 10.1016/j.semcdb.2005.07.006.
- [20] Yin Y, Chen G, Lin Z, et al. Natural antisense transcript of MYOG regulates development and regeneration in skeletal muscle by shielding the binding sites of MicroRNAs of MYOG mRNA 3'UTR[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 662: 93-103. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.04.050.
- [21] Lambert MR, Gussoni E. Tropomyosin 3 (TPM3) function in skeletal muscle and in myopathy[J]. Skelet Muscle, 2023, 13(1): 18. DOI: 10.1186/s13395-023-00327-x.
- [22] 靳涛,颜望碧,殷琦. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨子宫内膜来源间充质干细胞抑制子宫内膜纤维化的机制[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(4): 640-646. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.013.
- [23] 刘晏东,邓强,李中锋,等. Hedgehog 信号通路在肌少-骨质疏松症中的肌骨共生作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(16): 2433-2437. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2024.16.028.

(收稿日期:2024-12-30)