

引用:孟姣,张宁,杨光华,等. iPSC-MSCs 联合 HMB 和 D-核糖缓解地塞米松诱导的 C2C12 肌管细胞萎缩[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2025,38(3):464-474.

Citation:MENG Jiao,ZHANG Ning,YANG Guanghua,et al. iPSC-MSCs combined with HMB and D-ribose alleviate dexamethasone-induced C2C12 myotube cell atrophy[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition),2025,38(3):464-474.

文章编号 1672-6634(2025)03-0464-11

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2024100004

iPSC-MSCs 联合 HMB 和 D-核糖缓解地塞米松诱导的 C2C12 肌管细胞萎缩

孟姣¹,张宁¹,杨光华²,朱天飞³,常崇斐⁴,王正平^{1,5}

(1.聊城大学 生物制药研究院,山东 聊城 252059;2.上海海洋大学科技部生物科学国际研究中心,上海 201306;

3.深圳市第九人民医院(龙岗中心医院),广东 深圳 518000;4.芬欧纳(深圳)健康产业科技有限公司,

广东 深圳 518000;5.聊城高新生物技术有限公司,山东 聊城 252059)

摘要 目的:探讨诱导多能干细胞来源的间充质干细胞(iPSC-MSCs)与 β -羟基- β -甲基丁酸(HMB)和 D-核糖(DR)联合使用在肌管细胞萎缩中的作用及机制。方法:以 C2C12 细胞系为研究对象,利用地塞米松(Dex)建立体外肌萎缩模型,分别设置对照组,Dex 组,iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独及联合组。采用 CCK8 法检测细胞活力,HE 染色法观察肌管形态,免疫印迹法和免疫荧光法对其机制进行研究。结果:与 Dex 组比较,iPSC-MSCs+HMB+DR+Dex 组显著增加 C2C12 肌管细胞活力($***P<0.001$)和肌管直径($***P<0.001$)。免疫印迹结果显示,iPSC-MSCs+HMB+DR+Dex 组 P-PKB($**P<0.01$)、P-mTOR($**P<0.01$)、PI3K($*P<0.05$)、PGC-1($*P<0.05$)、IGF-1($**P<0.01$)、MHC($*P<0.05$)、Pax-7($*P<0.05$)和 MyoD-1($*P<0.05$)蛋白表达显著增加,Foxo3a($**P<0.01$)、MuRF-1($*P<0.05$)、Caspase-3($*P<0.05$)和 Bax($*P<0.05$)蛋白表达以及 Bax/Bcl-2 比值($**P<0.01$)显著降低。免疫荧光结果与免疫印迹结果相一致,即 iPSC-MSCs+HMB+DR+Dex 组与 Dex 组比较,MuRF-1 蛋白表达显著降低($***P<0.001$),Pax-7 蛋白表达显著增加($***P<0.001$)。结论:iPSC-MSCs 联合 HMB 和 DR 可以改善 Dex 诱导的 C2C12 肌管细胞萎缩。这可能与 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 联合使用可以激活 PI3K/PKB 信号通路,促进蛋白质合成;降低 Bax/Bcl-2 比值以及抑制 Caspase-3 蛋白表达从而阻止细胞凋亡;增加肌蛋白 MHC、Pax-7 和 MyoD-1 的表达有关。

关键词 肌管萎缩; iPSC-MSCs; HMB; D-核糖; C2C12

中图分类号 R746.4

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



iPSC-MSCs combined with HMB and D-Ribose alleviate dexamethasone-induced C2C12 myotube cell atrophy

MENG Jiao¹, ZHANG Ning¹, YANG Guanghua², ZHU Tianfei³,
CHANG Chongfei⁴, WANG Zhengping^{1,5}

收稿日期:2024-10-15

基金项目:山东省外专双百计划(WSR2023087)资助

通信作者:王正平,女,汉族,博士,教授,国家海外特聘专家,山东省泰山产业领军人才,江苏省双创人才,研究方向:临床营养,Email: wangzhengping@lcu.edu.cn.

- (1. Institute of Biopharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng, 252059, China; 2. International Research Center for Biological Sciences, Department of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306, China; 3. Shenzhen Ninth People's Hospital (Longgang Central Hospital), Shenzhen, 518000, China; 4. Fenona (Shenzhen) Health Industry Technology Co., LTD., 518000, China; 5. Liaocheng High-tech Biotechnology Co., Ltd. Liaocheng, 252059, China)

Abstract Objective: To investigate the effects and mechanisms of the combined use of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells (iPSC-MSCs) with β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) and D-ribose (DR) on myotube atrophy. Method: In this study, the C2C12 cell line was selected as the research subject, and an in vitro muscular atrophy model was successfully constructed with the aid of dexamethasone (Dex). The experimental design encompassed a Control group, a Dex group, and groups receiving iPSC-MSCs, HMB, and DR, as well as their combined treatments. Cell viability was evaluated using the CCK8 assay, myotube morphology was observed through HE staining, and concurrently, molecular biological methods such as Western blot and immunofluorescence analysis were also applied to conduct in-depth exploration of the experimental mechanisms. Results: Compared with the Dex group, the iPSC-MSCs+HMB+DR+Dex group significantly increased C2C12 myotube cell viability ($***P<0.001$) and myotube diameter ($***P<0.001$). Western blot results showed that the iPSC-MSCs+HMB+DR+Dex group exhibited significantly increased protein expression of P-PKB ($**P<0.01$), P-mTOR ($**P<0.01$), PI3K ($*P<0.05$), PGC-1 ($*P<0.05$), IGF-1 ($**P<0.01$), MHC ($*P<0.05$), Pax-7 ($*P<0.05$), and MyoD-1 ($*P<0.05$). Meanwhile, there were significant decreases in the protein expression of Foxo3a ($**P<0.01$), MuRF-1 ($*P<0.05$), Caspase-3 ($*P<0.05$) and Bax ($*P<0.05$), as well as a significant reduction in the Bax/Bcl-2 ratio ($**P<0.01$). The immunofluorescence results were consistent with the Western blot findings, indicating that compared with the Dex group, the iPSC-MSCs+HMB+DR+Dex group had significantly decreased protein expression of MuRF-1 ($***P<0.001$) and significantly increased protein expression of Pax-7 ($***P<0.001$). Conclusion: This study has discovered that the combined application of iPSC-MSCs, HMB, and DR can significantly ameliorate the atrophy induced by Dex in C2C12 myotubes. This positive effect may be attributed to the following mechanisms: Firstly, this combined therapy can activate the PI3K/PKB signaling pathway, thereby promoting protein synthesis. Secondly, by reducing the Bax/Bcl-2 ratio and inhibiting the expression of Caspase-3 protein, it effectively halts the process of cellular apoptosis. Lastly, it also significantly increases the expression levels of MHC, Pax-7, and MyoD-1, which play crucial roles in muscle growth and differentiation.

Keywords myotube atrophy; iPSC-MSCs; HMB; D-Ribose; C2C12

0 引言

骨骼肌具有控制运动和储存能量的功能,在骨骼肌发生萎缩时,身体运动系统将遭受明显的损害,进而导致跌倒、身体残疾、住院以及早逝等不良后果的风险增加,对社会经济带来了严重的影响^[1]。骨骼肌萎缩是一个复杂的现象,由多种因素共同影响,其背后的分子机制至今尚未完全明确。在临床上,针对骨骼肌萎缩的治疗手段也没有形成统一的标准。当前,骨骼肌萎缩治疗仍面临挑战,亟需新的有效疗法。

诱导多能干细胞来源的间充质干细胞(induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells, iPSC-MSCs)是指通过导入特定的转录因子将终末分化的体细胞重编程为多能干细胞,然后在间充质干细胞培养基中进行扩增并诱导分化为间充质干细胞^[2]。iPSC-MSCs与传统间充质干细胞相比,在细胞增殖、免疫调节、产生能够控制微环境的外泌体、生物活性旁分泌因子分泌等方面具有优势,同时在理论上消除了免疫抑制,减少了变异来源^[3]。JOHANNA等人的研究证实间充质干细胞可以改善肌肉萎缩小鼠模型中肌肉质量和质量的丧失^[4]。此外,PIAO等人的研究表明间充质干细胞对骨骼肌有保护作用,可以延缓衰老相关

骨骼肌萎缩^[5]。但目前针对间充质干细胞联合运动营养补充剂治疗骨骼肌萎缩的研究较少。

D-核糖(D-ribose, DR)和 β -羟基- β -甲基丁酸(Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, HMB)均是常用的运动营养补充剂。DR 天然存在于所有生命细胞中,参与腺苷酸的合成和 ATP 的再生^[6]。大量的研究和临床数据表明,DR 具有保护心脏功能、缓解肌肉酸痛和抗疲劳等作用^[7-10]。HMB 是亮氨酸的中间代谢物,研究发现 HMB 能够通过上调磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路促进蛋白质合成,同时通过蛋白酶体途径抑制蛋白质降解^[11-12]。因此,iPSC-MSCs、DR 和 HMB 对于改善肌肉萎缩均有积极作用。本研究将三者相结合,采用地塞米松(Dexamethasone, Dex)诱导 C2C12 细胞建立体外肌萎缩模型^[13],旨在探讨 iPSC-MSCs 联合 HMB 和 DR 在骨骼肌萎缩中的作用及潜在机制,为骨骼肌萎缩疾病的治疗提供实验基础与科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

间充质干细胞无血清培养基购自友康生物科技(北京)股份有限公司;HMB 购自上海源叶生物科技有限公司;DR 购自海门尚品医药科技有限公司;Dex、CCK8 检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂购自上海碧云天有限公司;胎牛血清购自武汉普诺赛生命科技有限公司;马血清购自 Hyclone;高糖 DMEM 培养基、青霉素-链霉素溶液、0.25% EDTA-胰蛋白酶、苏木精染液、伊红染液、SDS、甘氨酸、脱脂奶粉购自北京索莱宝有限公司;PVDF 膜购自 Millipore;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、 β -actin 购自沈阳万类生物科技有限公司;肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, MHC)、肌肉特异性环指蛋白 1(Muscle-specific ring finger protein 1, MuRF-1)抗体购自爱博泰克生物科技有限公司;mTOR、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Phospho-mammalian target of rapamycin, P-mTOR)、PI3K、过氧化物酶体增生激活受体 γ 协同刺激因子 1(Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α , PGC-1)、胰岛素样生长因子 1(Insulin-like growth factor-1, IGF-1)、PKB、磷酸化蛋白激酶 B(Phospho-protein kinase B, P-PKB)、成对框基因 7(Paired box-7, PAX-7)、肌源性分化 1(Myogenic differentiation-1, MyoD-1)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、叉头框蛋白 o3a(Forkhead box o3a, Foxo3a)和 Caspase-3 一抗以及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔和辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠二抗购自 Proteintech。

多功能酶标仪:瑞士 TECAN 公司;高速台式离心机:德国 Eppendorf 公司;倒置荧光显微镜:日本 OLYMPUS 公司;化学发光图像分析系统:上海天能科技有限公司。

1.2 iPSC-MSCs 细胞的培养以及培养液的收集

iPSC-MSCs 细胞由深圳乐土精准医疗科技有限公司提供。细胞在使用前于 37℃ 的水浴中迅速解冻,用间充质干细胞无血清培养基于 CO₂ 培养箱中培养。细胞生长至 80% 更换新的培养基,继续培养 48 h 后,收集培养基进行离心(2 000 r/min, 10 min)并用 0.22 μ m 过滤器过滤,收集上清液储存于 -80℃ 直至使用。本研究所使用 iPSC-MSCs 均在 10 代以内。

1.3 C2C12 细胞培养、分化及分组

小鼠 C2C12 成肌细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。C2C12 细胞使用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的高糖 DMEM 培养基(生长培养基),置于 CO₂ 培养箱中培养。细胞融合至 70% 时,更换 2% 马血清和 1% 青霉素-链霉素的高糖 DMEM 培养基(分化培养基)诱导分化,每 48 h 更换分化培养基,分化的第 5 d 进行药物处理。实验设置对照(Control)组(无处理)、Dex 组(100 μ m/mL Dex 处理)、iPSC-MSCs + Dex 组(50% ipsc-MSCs 培养液 + 100 μ m/mL Dex 处理)、DR + Dex 组(3 mg/mL DR + 100 μ m/mL Dex 处理)、HMB + Dex 组(75 μ g/mL HMB + 100 μ m/mL Dex 处理)、iPSC-MSCs + DR + Dex 组(50% iPSC-MSCs 培养液 + 3 mg/mL DR + 100 μ m/mL Dex 处理)、iPSC-MSCs + HMB + Dex 组(50% iPSC-MSCs 培养液 + 75 μ g/mL HMB + 100 μ m/mL Dex 处理)、DR + HMB + Dex 组(3 mg/mL DR + 75 μ g/mL HMB + 100 μ m/

mL Dex 处理)和 iPSC-MSCs+DR+HMB+Dex 组(50% iPSC-MSCs 培养液+3 mg/mL DR+75 μ g/mL HMB+100 μ m/mL Dex 处理)。

1.4 细胞活力测定

利用 CCK8 法检测 C2C12 肌管细胞活力,具体操作如下:取对数生长期 C2C12 细胞,按每孔 1×10^3 个细胞接种于 96 孔板中。按 1.3 中的分化及分组方法进行处理,每组设置 6 个复孔。药物处理 24 h 后,每孔中加入 10 μ L CCK8 溶液,置于培养箱中孵育 1 h,于 450 nm 波长处测定 OD 值,计算细胞活力。相对细胞活力 β_x 的计算公式如

$$\beta_x(\%) = (A_s - A_0) / (A_c - A_0) \times 100\%,$$

式中 A_s 、 A_0 和 A_c 分别为实验组、背景和空白对照品的吸光度。

1.5 苏木精-伊红(HE)染色

取对数生长期 C2C12 细胞,按每孔 4×10^4 个细胞接种于 24 孔板中。按 1.3 中的分化及分组方法进行处理,药物处理 24 h 后进行 HE 染色,具体方法如:将细胞用 PBS 洗 3 遍,随即用 95% 乙醇固定 15 min,固定结束后用 PBS 洗 3 遍;接着向每孔加入 200 μ L 苏木精染液染色 5~10 min,再用水清洗 3 遍;每孔加入 200 μ L 伊红染液染色 35 min,再次用水清洗 3 遍后加入适量 PBS;最后使用显微镜观察并随机选择 3 个区域拍照,使用 Image J 软件量化肌管细胞直径。

1.6 免疫印迹法

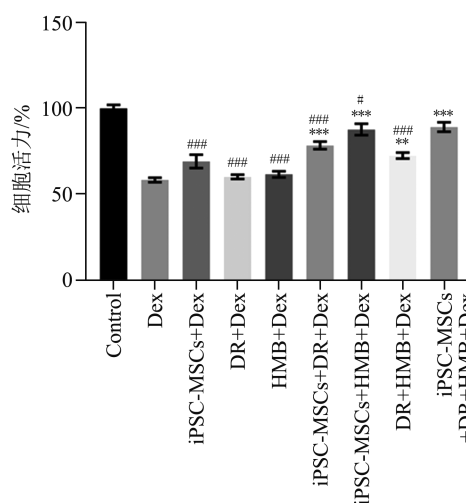
取对数生长期 C2C12 细胞,按每孔 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板中。按 1.3 中的分化及分组方法进行处理,药物处理 24 h 后用 PBS 漂洗 2 遍,随即加入含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶磷酸抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度。蛋白经 SDS-PAGE 凝胶分离(20 μ g/泳道)后转移至 PVDF 膜上;5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,随后加入一抗(按说明书进行稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日加入二抗室温孵育 2 h,洗膜后用 ECL 化学发光试剂显影,化学发光图像分析系统进行成像,并用 Image J 软件进行量化分析。以 β -actin 作为内参,并进行归一化处理。

1.7 免疫荧光法

取对数生长期 C2C12 细胞,按每孔 1×10^5 个细胞接种于 24 孔板中。按 1.3 中的分化及分组方法进行处理,药物处理 24 h 后弃去培养基,用 PBS 漂洗 2 遍,加入 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min,用 PBS 洗 3 遍;加入 0.2% triton X-100(PBS 配制)对细胞透化处理 10 min,用 PBS 洗 3 遍;加入 10% 山羊血清室温封闭 30 min;加入 1 抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;加入二抗室温避光孵育 2 h,用 PBS 洗 4 遍;加入 0.5 μ g/mL DAPI 室温避光染色 10 min,用 PBS 洗 3 遍后加入适量 PBS。使用倒置荧光显微镜观察拍照,Image J 软件进行量化分析。

1.8 统计学分析

所有数据均采用 SPSS26.0 软件进行分析。数据表示为平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm SEM$)。采用单因素方差分析(ANOVA)和 Tukey 事后检验(用于多重比较)进行组间比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。



注:与 Control 组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$;

与 Dex 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图1 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独或联合应用对 C2C12 肌管细胞活力的影响($\bar{x} \pm SEM$)

Fig. 1 Effects of iPSC MSCs, HMB, and DR alone or in combination on the viability of C2C12 myotubes ($\bar{x} \pm SEM$)

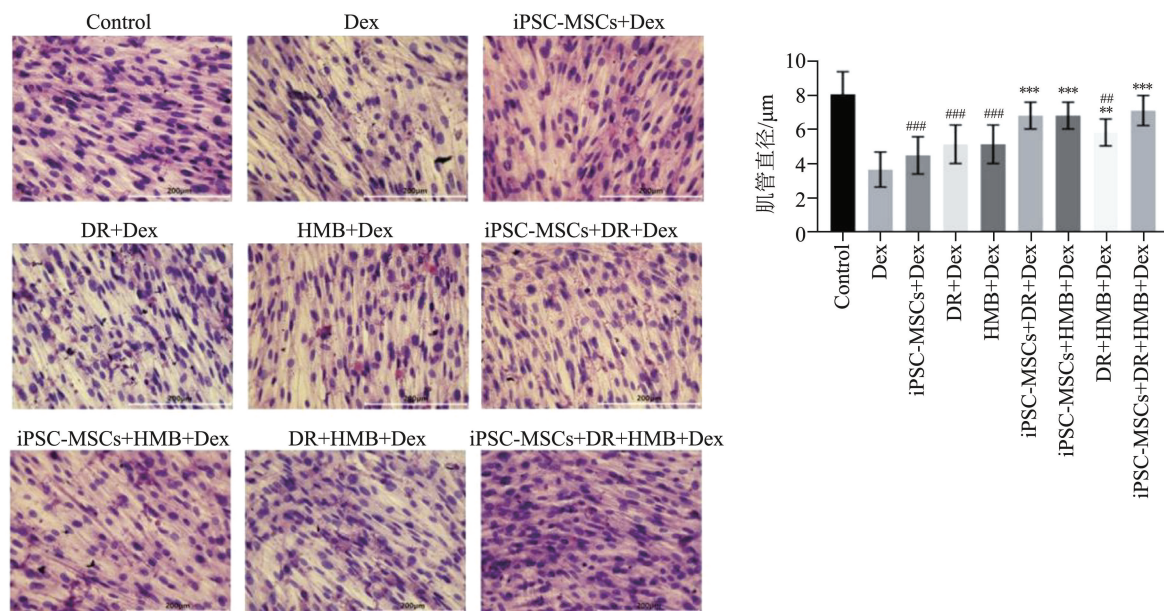
2 结果

2.1 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独或联合应用对 C2C12 肌管细胞活力的影响

如图 1 所示, Dex 处理后, C2C12 肌管细胞活力降低, 而 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独或联合处理均能提高 C2C12 肌管细胞活力, 其中 DR+HMB+Dex 组 (** $P < 0.01$)、iPSC-MSCs+DR+Dex 组 (** $P < 0.01$)、iPSC-MSCs+HMB+Dex 组 (** $P < 0.01$) 和 iPSC-MSCs+DR+HMB+Dex 组 (** $P < 0.01$) 与 Dex 组比较差异具有统计学意义; 提示 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 两两联合以及三者联合对 Dex 诱导的 C2C12 肌管细胞损伤具有保护作用。

2.2 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独或联合应用对 C2C12 肌管细胞直径的影响

如图 2 所示, Dex 处理后肌管发生萎缩、断裂, 肌管直径减小。而 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独或联合处理组均能增加 Dex 诱导的 C2C12 肌管直径, 其中 DR+HMB+Dex 组 (** $P < 0.01$)、iPSC-MSCs+DR+Dex 组 (** $P < 0.01$)、iPSC-MSCs+HMB+Dex 组 (** $P < 0.01$) 和 iPSC-MSCs+DR+HMB+Dex 组 (** $P < 0.01$) 肌管直径显著增加。提示 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 两两联合以及三者联合可以缓解 Dex 诱导的 C2C12 肌管细胞萎缩。



注: 与 Control 组比较: $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$; 与 Dex 组比较: $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

图 2 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独或联合应用对 C2C12 肌管细胞直径的影响 ($\bar{x} \pm SEM$)

Fig. 2 Effects of iPSC MSCs, HMB, and DR alone or in combination on the diameter of C2C12 myotubes ($\bar{x} \pm SEM$)

2.3 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独或联合应用对 C2C12 肌管细胞 PI3K/PKB 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 3 所示, 免疫印迹结果显示, 与 Dex 组相比, iPSC-MSCs、DR 和 HMB 三者联合处理后 PGC-1 (图 3E, $^{*}P < 0.05$)、P-mTOR (图 3H, $^{**}P < 0.01$)、P-PKB (图 3I, $^{**}P < 0.01$)、IGF-1 (图 3J, $^{**}P < 0.01$) 和 PI3K (图 3K, $^{*}P < 0.05$) 蛋白表达显著增加, Foxo3a (图 3F, $^{**}P < 0.01$) 和 MuRF-1 (图 3G, $^{*}P < 0.05$) 蛋白表达显著下降。免疫荧光结果与免疫印迹结果一致, 即 iPSC-MSCs 与 DR 和 HMB 的联合处理使 MuRF-1 蛋白表达显著降低 (图 3B, $^{***}P < 0.001$)。显示 iPSC-MSCs 与 HMB 及 DR 的联合应用, 能够上调 PI3K/PKB 信号通路。

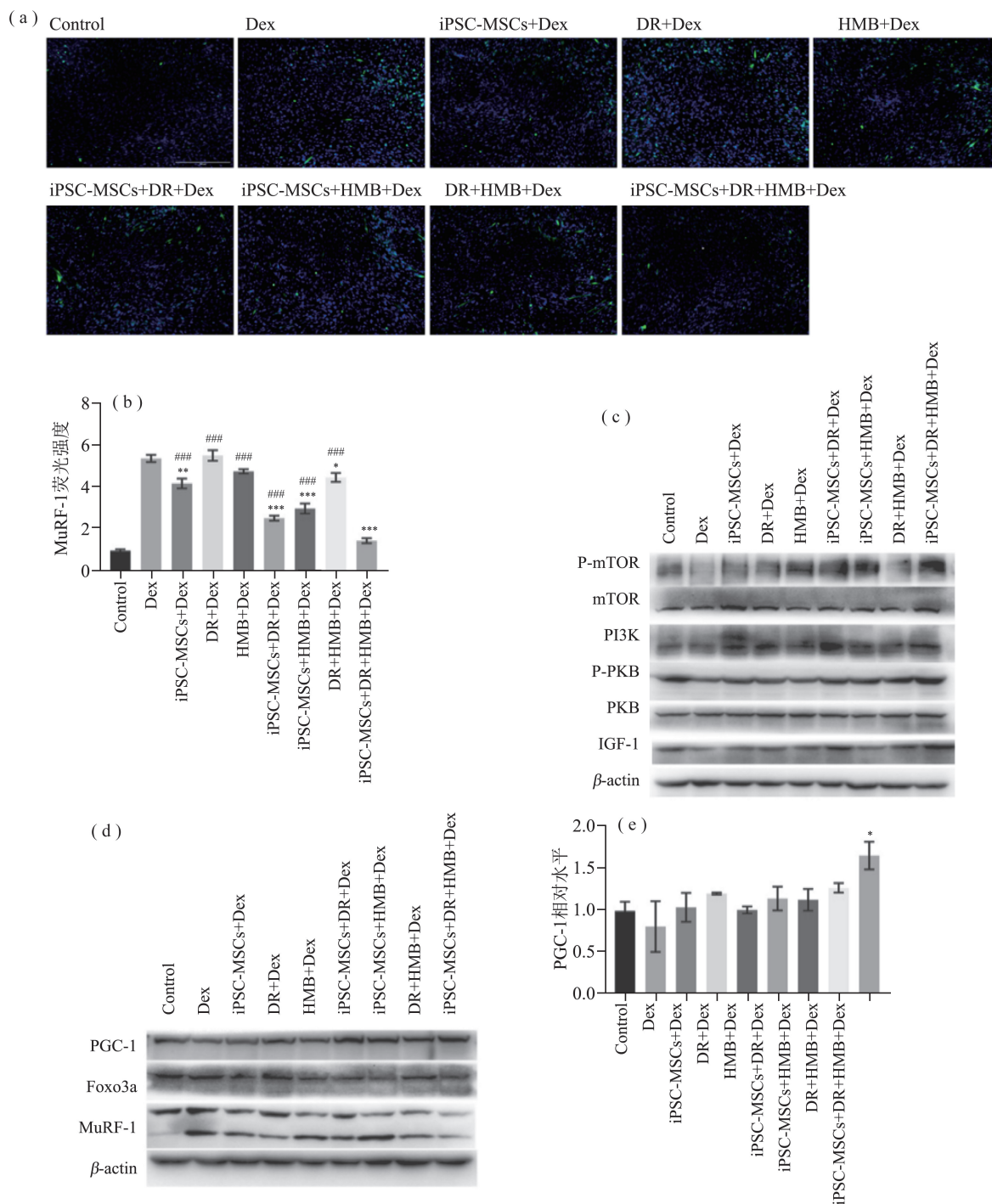
2.4 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独或联合应用对 C2C12 肌管细胞凋亡相关蛋白表达的影响

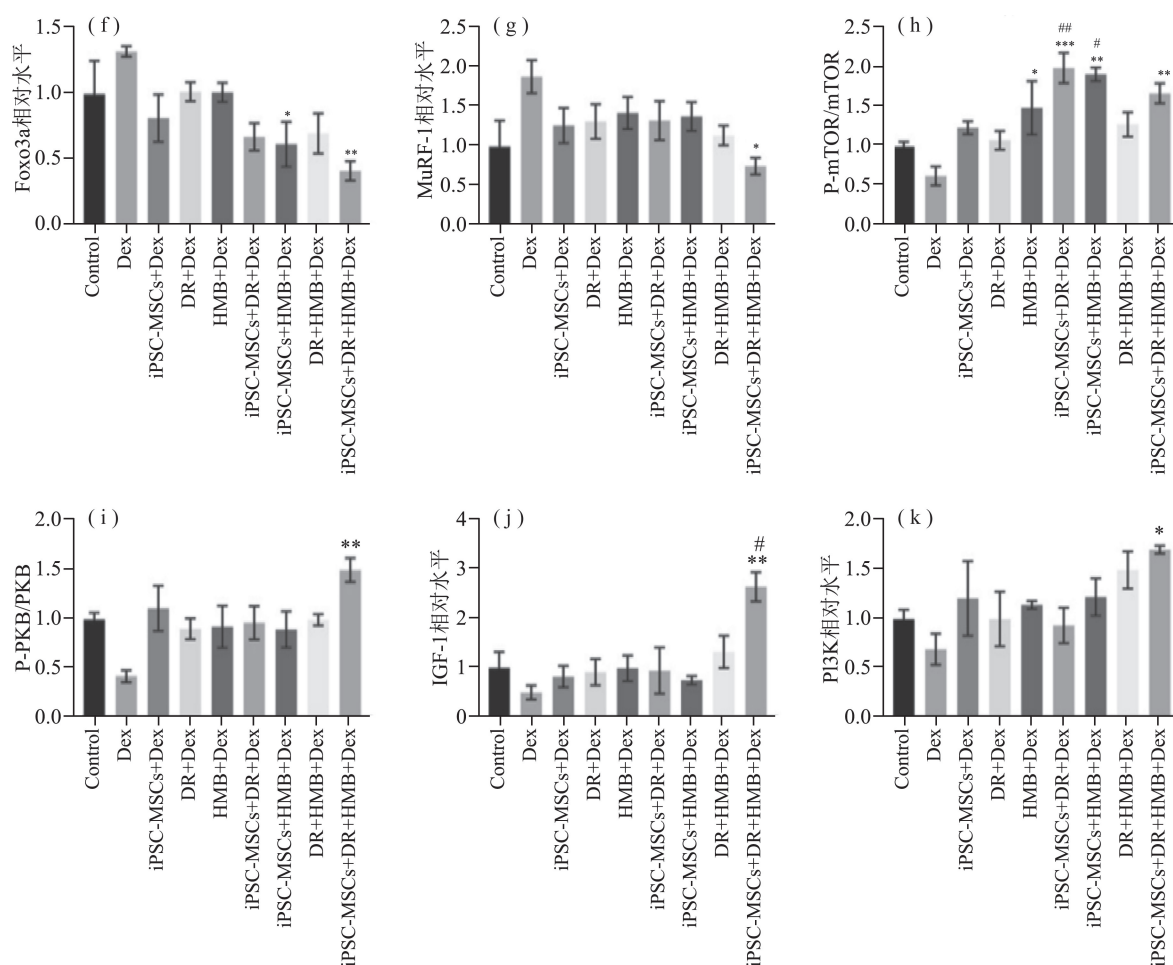
如图 4 所示, 经 Dex 处理的 C2C12 肌管细胞, Bax 和 Caspase-3 的表达增加, Bcl-2 的表达降低。经过 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独或联合干预后, Bax 和 Caspase-3 的表达均有不同程度降低, 其中 iPSC-MSCs+DR+HMB+Dex 组与 Dex 组比较, Bax (图 4B, $^{*}P < 0.05$) 和 Caspase-3 (图 4E, $^{*}P < 0.05$) 表达显著降

低;Bcl-2(图4C)表达虽有所增加,但与Dex组相比无统计学差异;此外,与Dex组比较,iPSC-MSCs+HMB+Dex组(图4D, * $P < 0.05$)、iPSC-MSCs+DR+Dex组(图4D, * $P < 0.05$)和iPSC-MSCs+DR+HMB+Dex组(图4D, ** $P < 0.01$)的Bax/Bcl-2值显著降低。表明iPSC-MSCs联合HMB、iPSC-MSCs联合DR和iPSC-MSCs联合DR及HMB可以抑制Dex诱导的C2C12肌管细胞凋亡。

2.5 iPSC-MSCs、HMB和DR单独或联合应用对C2C12肌管细胞MHC、Pax-7和MyoD-1蛋白表达的影响

如图5所示,Western blot结果显示,iPSC-MSCs+DR+HMB+Dex组与Dex组比较,MHC(图5D, * $P < 0.05$)、Pax-7(图5E, * $P < 0.05$)和MyoD-1(图5F, * $P < 0.05$)蛋白表达显著增加。免疫荧光结果显示,与Dex组比较,iPSC-MSCs+DR+HMB+Dex组Pax-7(图5B, *** $P < 0.001$)荧光强度显著增加,这与免疫印迹结果一致。提示iPSC-MSCs与DR及HMB的联合应用,能够显著提升与肌管萎缩密切相关的MHC、Pax-7和MyoD-1蛋白的表达水平。





注:与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 Dex 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$,
(a,b) 免疫荧光标记法结果 (Bar=200 μm);(c~k) Western blot 结果。

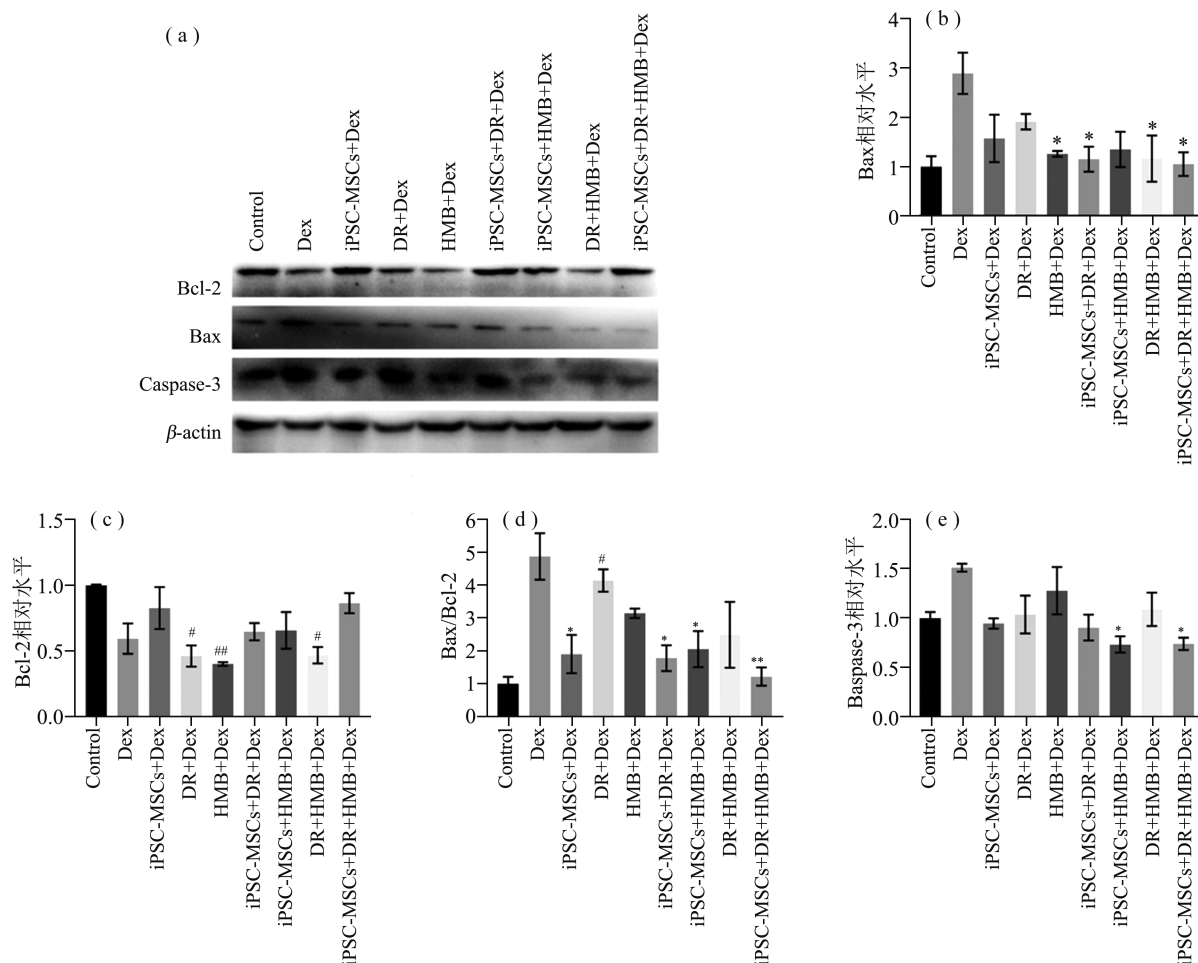
图3 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独或联合应用对 C2C12 肌管细胞 IGF/PI3K/AKT/Foxo3a 信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Fig. 3 Effects of iPSC MSCs, HMB, and DR alone or in combination on the expression of IGF/PI3K/AKT/Foxo3a signaling pathway related proteins in C2C12 myotubes ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

3 结论

肌肉萎缩是一种复杂的生理现象,超过三分之一的严重运动能力障碍相关疾病患者会出现肌肉萎缩症状^[1]。肌肉萎缩的发生与蛋白质含量下降密切相关,而蛋白质含量的变化与蛋白质合成速率以及蛋白质降解速率有关^[14-15]。IGF-1 是肌肉生长的正向调节信号及有利刺激因子,在骨骼肌蛋白质合成、肌细胞增殖以及分化方面发挥积极作用^[16]。PI3K/PKB 信号通路是 IGF-1 介导肌蛋白合成的关键途径之一。IGF-1 与受体结合后激活 PI3K,进而激活 PKB,PKB 作为生长调节剂促进肌肉肥大^[17]。mTOR 作为 PKB 下游的 Ser/Thr 激酶,调控骨骼肌细胞增殖、生长及肌蛋白合成,对肌肉发育至关重要。同时,IGF-1/PI3K/PKB 通路也调控泛素-蛋白酶体系统,这种作用是由 Foxo 转录因子介导的^[18]。Foxo 蛋白家族成员的转移和转录会促进泛素蛋白连接酶 MuRF-1 的表达,MuRF-1 主要作用是促进泛素化和降解一些与肌肉结构和功能相关的蛋白质^[19-20]。有研究表明 MuRF-1 蛋白的表达量增加,会促进骨骼肌萎缩发生^[21]。此外,PGC-1 是线粒体生物合成过程的关键调节因子,同时在机体内也扮演着促进氧化代谢的重要角色^[22]。PI3K/PKB 通过抑制 Foxo 的活性,间接影响 PGC-1 的表达和功能。有研究表明 Foxo 与 PGC1 的相互作用可以减少蛋白质降解^[17]。本研究结果显示 iPSC-MSCs 与 HMB 及 DR 的联合应用可以增加 IGF-1、PI3K、P-PKB、P-mTOR

和PGC-1蛋白的表达,同时减少Foxo3a和MuRF-1蛋白的表达,表明iPSC-MSCs联合HMB和DR能够缓解C2C12肌管萎缩,这可能归因于三者联合使用上调了PI3K/PKB信号通路从而增加蛋白质合成,同时通过下调Foxo3a/MuRF-1信号通路抑制了蛋白质降解。



注:与Control组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与Dex组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

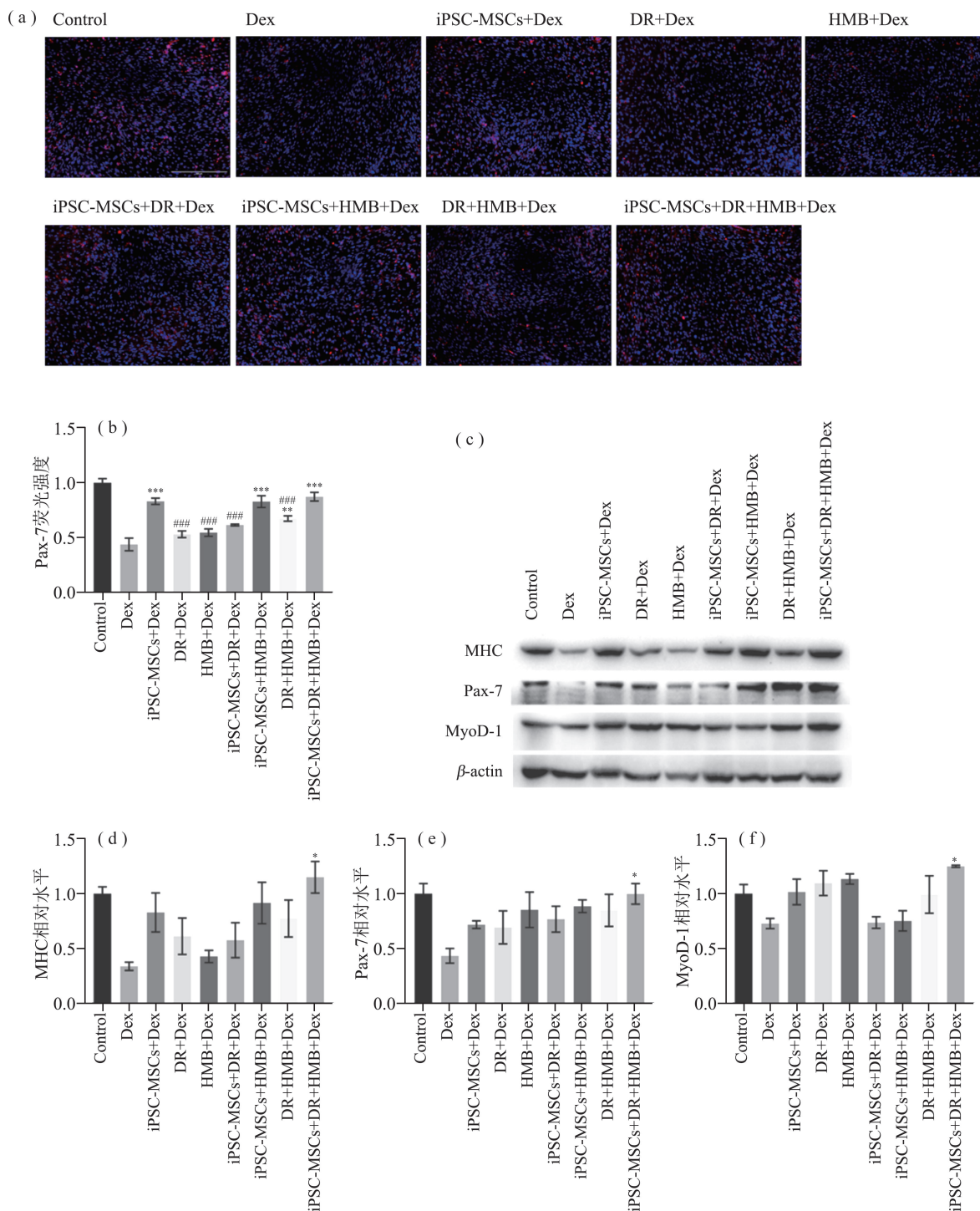
图4 iPSC-MSCs、HMB和DR单独或联合应用对C2C12肌管细胞凋亡相关Bax、Bcl-2和Caspase-3蛋白表达的影响($\bar{x} \pm SEM$)

Fig. 4 Effects of iPSC-MSCs, HMB, and DR alone or in combination on the expression of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 proteins related to apoptosis in C2C12 myotubes ($\bar{x} \pm SEM$)

细胞凋亡是肌肉萎缩的一个重要病理过程。尽管正常的细胞凋亡在组织稳态中起着重要作用,但过度的细胞凋亡会导致肌肉质量的损失^[23]。在肌肉萎缩发生时,肌肉细胞会经历凋亡程序,导致细胞数量减少和肌肉质量下降^[24]。Bax/Bcl-2通路与Caspase通路在细胞凋亡中发挥重要作用。Bcl-2家族蛋白,特别是Bax与Bcl-2的相互作用,是调控细胞凋亡的关键机制,Bax的激活促使线粒体膜通透性改变,释放促凋亡因子,进而激活Caspase通路^[25]。Caspase家族蛋白作为凋亡执行者,利用其半胱氨酸蛋白酶活性切割底物蛋白,推动细胞凋亡进程^[26]。同时,Caspase通路的激活能反馈调节Bax/Bcl-2通路,形成相互依存的调控网络^[23]。本研究发现iPSC-MSCs、HMB和DR三者联合应用可以减少Bax和Caspase-3蛋白表达,同时降低Bax/Bcl-2比值,表明iPSC-MSCs联合HMB和DR可能通过抑制细胞凋亡而缓解肌管萎缩。

肌球蛋白是肌肉组织的结构蛋白和收缩蛋白,由肌球蛋白轻链和MHC两条肽链组成,其中MHC能与肌动蛋白结合,并具有ATP酶活性,这两种特性使其在肌肉收缩中起主导作用^[27]。本研究结果显示,iPSC-MSCs与HMB和DR联合应用可以增加MHC的表达。此外,Pax-7作为骨骼肌卫星细胞的特异性标志物,在所有的卫星细胞中均能表达,并且起着维持和调节卫星细胞功能的重要作用^[28]。Pax7的缺乏可能会

导致细胞周期发生阻滞^[29]。MyoD-1 是成肌分化过程中的关键转录因子,能够促进卫星细胞向成肌细胞的分化^[30]。Pax-7 与 MyoD-1 之间的相互作用可以加速受损肌肉的修复和再生。本研究发现,iPSC-MSCs、HMB 和 DR 联合应用可同时增加 Pax-7 和 MyoD-1 的表达。提示 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 联合应用改善肌肉萎缩可能与肌蛋白 MHC、Pax-7 和 MyoD-1 的表达增加密切相关。



注:与 Control 组比较:### $P < 0.001$;与 Dex 组比较:* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$, (a, b) 免疫荧光标记法结果 (Bar = 200 μm); (c~f) Western blot 结果。

图 5 iPSC-MSCs、HMB 和 DR 单独或联合应用对 C2C12 肌管细胞 MHC、Pax-7 和 MyoD-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Fig. 5 Effects of iPSC MSCs, HMB, and DR alone or in combination on the expression of MHC, Pax-7, and MyoD-1 proteins in C2C12 myotubes cells ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

综上所述(图6),iPSC-MSCs与HMB和DR联合能改善Dex诱导的C2C12肌管萎缩,这可能与上调PI3K/PKB通路以促进蛋白质合成、下调Foxo3a/MuRF-1信号通路抑制蛋白质降解;通过降低Bax/Bcl-2值和减少Caspase-3蛋白表达进而抑制细胞凋亡;增加肌蛋白MHC、Pax-7和MyoD-1的表达有关。

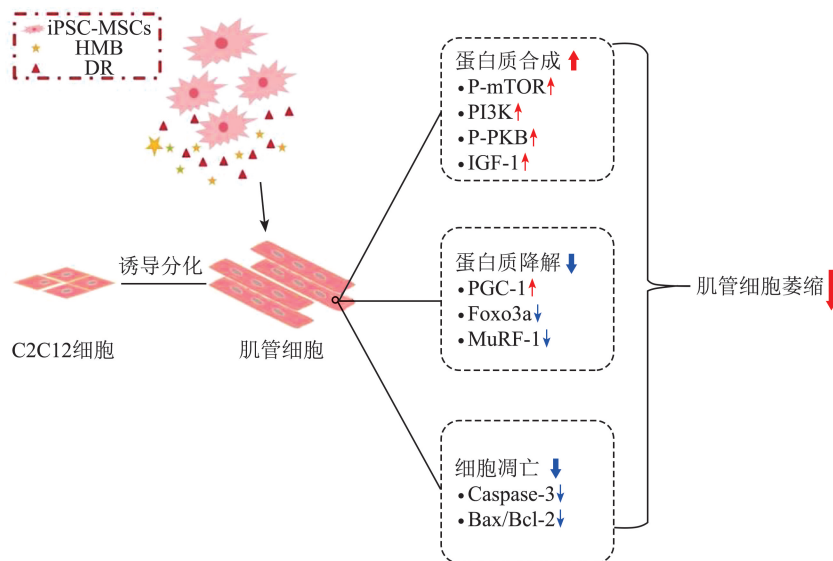


图6 iPSC-MSCs联合HMB和DR改善Dex诱导的C2C12肌管细胞萎缩机制图

Fig. 6 Mechanism diagram of iPSC-MSCs combined with HMB and DR improving Dex-induced C2C12 myotube cell atrophy

参 考 文 献

- [1] 邱玮,唐成林,廖偲,等. 基于 p38 MAPK 信号通路探讨电针对大鼠失神经骨骼肌萎缩的影响[J]. 中国针灸,2025,45(1):61-70.
- [2] 赵文,毕玉琳,付旭阳,等. 干细胞治疗肌萎缩侧索硬化症:细胞来源、数量、修饰手段及给药途径[J]. 中国组织工程研究,2025,29(19):4083-4090.
- [3] ZHOU A K, JOU E, LU V, et al. Using pre-clinical studies to explore the potential clinical uses of exosomes secreted from induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells[J]. Tissue Engineering and Regenerative Medicine,2023,20(6):793-809.
- [4] ABRIGO J, RIVERA J C, ARAVENA J, et al. High fat diet-induced skeletal muscle wasting is decreased by mesenchymal stem cells administration: implications on oxidative stress, ubiquitin proteasome pathway activation, and myonuclear apoptosis[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity,2016(2016):9047821.
- [5] PIAO L M, HUANG Z, INOUE A, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells ameliorate aging-associated skeletal muscle atrophy and dysfunction by modulating apoptosis and mitochondrial damage in samp10 mice[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2022,13(1):226.
- [6] 肖爱爱,汤惠茹,姜雯,等. D-核糖复方制剂辅助治疗新型冠状病毒肺炎的临床研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2023,36(1):93-98.
- [7] 袁保辉,丁琪,刘桂芹,等. D-核糖的生理功能及其应用[J]. 中国生化药物杂志,2016,36(5):210-212.
- [8] CAO W, QIU J Q, CAI T W, et al. Effect of D-ribose supplementation on delayed onset muscle soreness induced by plyometric exercise in college students[J]. Journal of the International Society of Sports Nutrition,2020,17(1):42.
- [9] 肖爱爱,王雪艳,温敏,等. D-核糖对阿霉素诱导心脏毒性的保护作用及机制研究[J]. 食品工业科技,2022,43(13):359-366.
- [10] 张振刚,王峰. 有氧运动联合补充 D-核糖对小鼠抗疲劳和抗氧化的作用[J]. 食品工业科技,2022,43(2):368-375.
- [11] OKTAVIANA J, ZANKER J, VOGGIN S, et al. The effect of β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) on sarcopenia and functional frailty in older persons: a systematic review. [J]. The Journal of Nutrition, Health & Aging,2019,23(2):145-150.
- [12] KIMURA K, CHENG X W, INOUE A, et al. β -Hydroxy- β -methylbutyrate facilitates PI3K/Akt-dependent mammalian target of rapamycin and FoxO1/3a phosphorylations and alleviates tumor necrosis factor α /interferon γ -induced MuRF-1 expression in C2C12 cells[J]. Nutrition Research,2014,34(4):368-374.
- [13] KIM N H, LEE J Y, KIM C Y. Protective role of ethanol extract of *Cibotium barometz* (*Cibotium Rhizome*) against dexamethasone-induced muscle atrophy in C2C12 myotubes[J]. International Journal of Molecular Sciences,2023,24(19):14798.
- [14] SHEN S N, YU H, GAN L S, et al. Natural constituents from food sources: potential therapeutic agents against muscle wasting[J].

Food & Function, 2019, 10(11): 6967-6986.

- [15] YOO A, KIM J I, LEE H, et al. Gromwell ameliorates glucocorticoid-induced muscle atrophy through the regulation of Akt/mTOR pathway[J]. Chinese Medicine, 2024, 19(1): 20.
- [16] FU S T, LIN X J, YIN L J, et al. Androgen receptor regulates the proliferation of myoblasts under appropriate or excessive stretch through IGF-1 receptor mediated p38 and ERK1/2 pathways[J]. Nutrition & Metabolism, 2021, 18(1): 85.
- [17] 耿洪伟. 地塞米松通过 miR-322 增强对肌肉萎缩的诱导作用[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [18] 张桂仙, 袁娅金, 熊薇, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路预防治疗 2 型糖尿病肌少症研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(5): 1110-1115.
- [19] 洪伟皓, 田航, 栾一胜, 等. 中等强度持续运动和高强度间歇运动对小鼠肥胖性肌萎缩的干预作用[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(35): 5618-5623.
- [20] RAHMAN M M, ULLA A, MORIWAKI H, et al. Muscle-protective effect of carnosine against dexamethasone-induced muscle atrophy in C2C12 myotube[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2024, 70(3): 219-227.
- [21] KIM R, KIM J W, CHOI H, et al. Ginsenoside Rg5 promotes muscle regeneration via p38 mapk and Akt/mTOR signaling[J]. Journal of Ginseng Research, 2023, 47(6): 726-734.
- [22] 周永战, 陈佩杰, 肖卫华. 老年人肌少症发生机制[J]. 生理学报, 2018, 70(4): 445-454.
- [23] GUAN K F, QI X F, CHEN H R, et al. The cytoprotection of milk-derived MFG-E8 on mitochondria-injured L6 cell via mediation of Akt/bcl-2/bax-caspase-3 signaling pathway[J]. Food Bioscience, 2023, 51(1): 102289.
- [24] PARK J, LEE J Y, KIM Y, et al. Limosilactobacillus fermentum MG5091 and lactococcus lactis MG4668 and MG5474 suppress muscle atrophy by regulating apoptosis in C2C12 cells[J]. Fermentation, 2023, 9(7): 659.
- [25] PARK C, JI S Y, LEE H, et al. Mori ramulus suppresses hydrogen peroxide-induced oxidative damage in murine myoblast C2C12 cells through activation of AMPK[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(21): 11729.
- [26] 田鹏, 岳慧英, 宋洁, 等. 抗阻与有氧干预对小鼠胫骨前肌凋亡基因表达的影响[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2024, 47(4): 865-873.
- [27] 尹丽琴, 李范玲, 汤长发, 等. 不同强度运动对骨骼肌纤维 MHC 亚型转化及 CaN/NFATc1 信号通路的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2017, 33(4): 360-364.
- [28] VON MALTZAHN J, JONES A E, PARKS R J, et al. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(41): 16474-16479.
- [29] OLGUIN H C, OLWIN B B. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal[J]. Developmental Biology, 2004, 275(2): 375-388.
- [30] 何雅琦, 冯颖. 红景天苷联合姜黄素促进 C2C12 细胞成肌分化并防止棕榈酸诱导的肌管萎缩研究[J]. 老年医学与保健, 2024, 30(5): 1250-1257.

(责任编辑: 刘庆松)