

## 基于 PI3K/Akt 信号通路探究葛根素改善肌少症小鼠骨骼肌细胞衰老与线粒体功能障碍的机制

夏宇阳<sup>1</sup>, 李 扬<sup>2,3,4</sup>, 何启旺<sup>1,4</sup>, 石 龙<sup>1</sup>, 雷 杰<sup>2,3,4</sup>, 文 峰<sup>1,2,3,4\*</sup>

1. 湖北中医药大学 针灸骨伤学院, 湖北 武汉 430061
2. 湖北省中医院/湖北中医药大学附属医院, 湖北 武汉 430061
3. 中医肝肾研究及应用湖北省重点实验室(湖北省中医院), 湖北 武汉 430061
4. 湖北时珍实验室, 湖北 武汉 430061

**摘 要:** **目的** 探讨葛根素通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt) 信号通路, 改善肌少症小鼠骨骼肌细胞衰老及线粒体功能障碍的作用机制。**方法** 40 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为对照组, 模型组及葛根素低、中、高剂量(50、100、200 mg·kg<sup>-1</sup>) 组。以 D-半乳糖诱导骨骼肌衰老, 建立小鼠肌少症模型。测定小鼠体重、握力; 通过苏木素-伊红(HE) 染色及天狼猩红染色观察骨骼肌病理变化及纤维化程度; 运用免疫荧光(IF) 和免疫组化(IHC) 技术检测周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1(p21)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活因子-1 $\alpha$ (PGC-1 $\alpha$ ) 蛋白质在细胞或组织中的定位和表达水平; 采用蛋白免疫印迹法(Western blotting) 及实时荧光定量聚合酶链式反应(qTR-PCR) 检测 PI3K、Akt、PGC-1 $\alpha$ 、动力蛋白相关蛋白(DRP) 1、p21、p53 蛋白与 mRNA 表达水平。**结果** 对照组相比, 模型组小鼠体重降低( $P<0.05$ 、 $0.01$ ); 握力显著下降( $P<0.01$ ); 肌纤维断裂萎缩、组织结构受损, 胶原纤维增生明显、纤维化程度升高; PI3K、Akt、PGC-1 $\alpha$  蛋白和 mRNA 表达水平显著降低( $P<0.01$ ), p21、p53、DRP1 的蛋白及 mRNA 表达水平显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较, 葛根素高剂量组小鼠体重有所回升, 中、高剂量组握力显著提高( $P<0.05$ 、 $0.01$ ); 肌纤维排列逐渐整齐、组织结构趋于完整, 胶原纤维增生被抑制、纤维化程度降低; PGC-1 $\alpha$ 、PI3K、Akt 的蛋白及 mRNA 表达水平显著升高( $P<0.01$ ), p21、p53、DRP1 的蛋白及 mRNA 表达水平显著降低( $P<0.01$ ), 且上述效应呈剂量相关性。**结论** 葛根素可能通过上调 PI3K/Akt 信号通路, 抑制 DRP1 和 p53/p21 通路激活, 改善线粒体稳态、逆转骨骼肌细胞衰老, 进而发挥骨骼肌保护作用。

**关键词:** 葛根素; 肌少症; 磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt) 通路; 细胞衰老; 线粒体功能障碍

**中图分类号:** R285; R592 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)01-0144-12

**DOI:**10.7501/j.issn.1674-6376.2026.01.013

## Mechanism of puerarin in improving skeletal muscle cell senescence and mitochondrial dysfunction in mice with sarcopenia based on PI3K/Akt signaling pathway

XIA Yuyang<sup>1</sup>, LI Yang<sup>2,3,4</sup>, HE Qiwan<sup>1,4</sup>, SHI Long<sup>1</sup>, LEI Jie<sup>2,3,4</sup>, WEN Feng<sup>1,2,3,4</sup>

1. School of Acupuncture and Orthopedics, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China
2. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine /Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061, China
3. Hubei Key Laboratory of Theory and Application Research of Liver and Kidney in Traditional Chinese Medicine (Hubei Province Hospital of Traditional Chinese Medicine), Wuhan 430061, China
4. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430061, China

**Abstract: Objective** To explore the mechanism by which puerarin improves sarcopenia in mice through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway, and to investigate its effects on skeletal muscle cell senescence and

收稿日期: 2025-10-17

**基金项目:** 湖北省重点研发计划资助项目(2024BCB035); 湖北省中医药管理局重点项目(ZY2025D007); 湖北省自然科学基金创新发展联合基金资助项目(2024AFD332, 2025AFD519); 湖北省时珍人才工程科研项目(P-20250923-1556)

**作者简介:** 夏宇阳, 硕士研究生, 主要从事中医药防治肌骨疾病研究。E-mail: 2956338071@qq.com

**\*通信作者:** 文 峰, 副主任医师, 博士, 硕士生导师, 主要从事中医药防治骨关节疾病研究。E-mail: 75189292@qq.com

mitochondrial dysfunction. **Methods** Forty male C57BL/6J mice were randomly divided into a control group, a model group, and puerarin low-, medium-, high dose (50, 100, and 200 mg·kg<sup>-1</sup>) groups. Sarcopenia was induced in mice by *D*-galactose. Body weight and grip strength were measured. Skeletal muscle pathological changes and fibrosis were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and sirius red staining. The localization and expression levels of cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21) and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) proteins in cells or tissues were detected by immunofluorescence (IF) and immunohistochemistry (IHC) techniques. The expression levels of PI3K, Akt, PGC-1 $\alpha$ , dynamin-related protein (DRP) 1, p21, and p53 proteins and mRNAs were detected by Western blotting and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Results** Compared with the control group, the model group showed decreased body weight ( $P < 0.05, 0.01$ ), significantly reduced grip strength ( $P < 0.01$ ), muscle fiber fragmentation and atrophy, damaged tissue structure, increased collagen fiber proliferation, and elevated fibrosis degree. The expression levels of PI3K, Akt, and PGC-1 $\alpha$  proteins and mRNAs were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), while the expression levels of p21, p53, and DRP1 proteins and mRNAs were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the body weight of mice in high dose puerarin groups increased, and the grip strength of the medium and high-dose groups significantly improved ( $P < 0.05, 0.01$ ). The arrangement of muscle fibers gradually became orderly, the tissue structure tended to be complete, collagen fiber proliferation was inhibited, and the degree of fibrosis decreased. The expression levels of PGC-1 $\alpha$ , PI3K, and Akt proteins and mRNAs were significantly increased ( $P < 0.01$ ), while the expression levels of p21, p53, and DRP1 proteins and mRNAs were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and these effects were dose-dependent. **Conclusion** Puerarin may protect skeletal muscle by up-regulating the PI3K/Akt signaling pathway, inhibiting the activation of the DRP1 and p53/p21 pathways, improving mitochondrial homeostasis, and reversing skeletal muscle cell senescence.

**Key words:** puerarin; sarcopenia; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway; cellular senescence; mitochondrial dysfunction

肌少症是一种以骨骼肌质量与功能进行性、广泛性减退为核心特征的增龄性疾病<sup>[1]</sup>。一项针对疗养院老年人群的荟萃分析证实,肌少症与全因死亡率高风险显著相关 [风险比 (HR) = 1.86, 95% 置信区间 (CI) 1.42~2.45,  $P < 0.001$ ,  $I^2 = 0$ ] <sup>[2]</sup>, 同时也是导致老年人跌倒风险增加、活动能力下降及慢性疾病发病率升高的关键危险因素<sup>[3]</sup>。流行病学数据显示,全球老年人群肌少症患病率为 10%~16%<sup>[4]</sup>,随着全球人口老龄化进程加剧,其患病人数呈持续攀升态势<sup>[5]</sup>;尤其在合并慢性疾病的人群中,肌少症发病率显著升高,如糖尿病患者肌少症患病率约为 18%<sup>[6]</sup>,而不可切除食管癌患者中这一比例高达 66%<sup>[7]</sup>,已成为亟待关注的重大公共卫生问题。目前该疾病缺乏临床获批的有效药物,基础干预措施以营养支持与抗阻运动为主,但疗效有限且个体差异显著<sup>[8]</sup>,因此阐明其分子机制并开发针对性治疗药物具有重要的临床意义与迫切性。

骨骼肌稳态的维持依赖于肌纤维内精密的分子调控网络,其中线粒体能量代谢紊乱与细胞衰老进程已被证实是驱动肌少症发生发展的两大核心环节。骨骼肌线粒体生物合成功能异常会直接导致能量供给不足与氧化应激产物蓄积,进而削弱肌纤维收缩功能及存活能力<sup>[9]</sup>;与此同时,肌源性细胞的不可逆衰老可通过分泌衰老相关分泌表型

(SASP) 构建促分解代谢的局部微环境,进一步加剧肌肉再生障碍与萎缩进程<sup>[10]</sup>。因此,筛选可协同改善线粒体功能并延缓细胞衰老的关键干预靶点,已成为当前肌少症领域的研究焦点。磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路作为调控细胞生长、代谢及存活的核心信号轴,在上述病理过程中扮演着关键的“整合者”角色<sup>[11]</sup>,其活化状态对维持线粒体功能稳态与延缓细胞衰老至关重要<sup>[12]</sup>。

作为通路起始核心激酶的 PI3K,其激活可有效抑制线粒体依赖性凋亡通路<sup>[13]</sup>,Li 等<sup>[14]</sup>在脓毒性肺损伤大鼠模型中的研究证实,线粒体辅酶 Q (MitoQ) 可通过激活 PI3K 信号减轻脂多糖 (LPS) 诱导的肺泡上皮细胞线粒体损伤;反之,该通路活性减弱则会加剧氧化应激反应,加速细胞衰老进程<sup>[15]</sup>。Akt 作为通路下游的关键效应分子,可通过磷酸化调控多种底物蛋白,直接参与线粒体功能调节与细胞衰老进程的调控<sup>[16]</sup>。已有研究证实,Akt 信号激活可缓解 *D*-半乳糖诱导的肾脏线粒体功能障碍与纤维化,而其活性受抑则会破坏线粒体自噬稳态,诱发内皮细胞衰老<sup>[17]</sup>。

葛根素是传统中药葛根的主要活性成分,属异黄酮类化合物。葛根作为中医阳明经引经药,性味甘辛凉,核心功效为“解肌退热,生津通脉”,其“解

肌”以舒缓筋肉、“生津”以濡养肌络的作用特点，与肌少症“肌肉拘挛、失养萎缩”的核心病机高度契合，为葛根素干预肌少症提供了坚实的传统理论依据。现代药理研究已证实葛根素具有抗氧化、神经保护及改善代谢性疾病等多重药理活性<sup>[18-20]</sup>，近年研究进一步发现其可通过调控多条信号通路发挥抗衰与线粒体保护作用，其中 PI3K/Akt 通路是其核心作用靶点之一。Zeng 等<sup>[21]</sup>在脑损伤大鼠模型中的研究表明，葛根素可通过激活 PI3K/Akt 通路抑制核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 通路活性，从而拮抗细胞衰老、减轻脑损伤程度；针对糖尿病大鼠骨骼肌萎缩的动物实验证实，葛根素可上调 Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路及过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活因子-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 的表达水平，增强线粒体生物合成能力，进而抑制骨骼肌萎缩<sup>[22]</sup>；而在缺氧微环境下，葛根素又可通过下调 PI3K/Akt 通路诱导缺氧抑制的肺动脉平滑肌细胞 (PASMCs) 凋亡<sup>[23]</sup>。尽管现有研究已证实葛根素对 PI3K/Akt 通路具有调控作用，但其作用的细胞环境依赖性仍存争议<sup>[24]</sup>，且葛根素是否通过该通路改善肌少症相关的骨骼肌衰老及线粒体功能障碍，尚未得到系统阐明。

基于上述研究背景与理论依据，本研究提出核心假说：葛根“解肌生津”的传统功效，从现代医学视角分析，其科学内涵可能在于通过精准调控骨骼肌中 PI3K/Akt “枢纽”通路，协同改善线粒体功能障碍与肌源性细胞衰老，最终实现对肌少症的干预作用。因此，本研究通过构建肌少症小鼠模型，系统探讨葛根素通过调控 PI3K/Akt 通路改善骨骼肌细胞衰老及线粒体功能障碍的具体作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性小鼠 40 只，体质量 24~28 g，由河南斯克贝斯生物科技股份有限公司提供。生产许可证号 SCXK (豫) 20200005。实验前适应性饲养 1 周，自由摄食和饮水，环境条件为室温 (22±2) °C，相对湿度 50%~60%，光照周期为 12 h/12 h。所有实验均按照伦理准则进行，方案均经湖北中医药大学实验动物管理委员会和实验动物伦理委员会批准，批准文件编号 2024010。

### 1.2 药物及试剂

葛根素 (质量分数 99.72%，批号 SM2211)、D-半乳糖 (批号 ST1219)、DAPI (货号 C1002)，上海

碧云天生物科技有限公司；苏木素 (货号 H9627)、天狼猩红 (货号 365548)，德国 Sigma 公司；二甲苯 (批号 10023418)、包埋石蜡 (批号 69019361)、无水乙醇 (批号 10009218)、苦味酸 (批号 10015714)，中国医药集团有限公司；中性多聚甲醛固定液 (批号 G1101)、p53 抗体 (货号 GB11641)、动力蛋白相关蛋白 1 抗体 (DRP1，货号 GB115659)、Akt 抗体 (货号 GB150002)，武汉赛维尔生物科技有限公司；免疫组化试剂盒 (批号 PV-9000)，北京中杉金桥生物技术有限公司；RNAiso Plus (货号 9109)、PrimeScript™ RT reagent Kit (货号 RR037A)，日本 TAKARA 公司；Hieff™ qPCR SYBR Green Master Mix (货号 11201ES08)，翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司；PGC-1 $\alpha$  抗体 (货号 66369-1-Ig)、周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1 抗体 (p21，货号 28248-1-AP)、PI3K 抗体 (货号 60225-1-Ig)，武汉三鹰生物技术有限公司；Goat Anti-Rabbit IgG H&L HRP (货号 ab205718)、Goat pAb to Rb IgG Alexa Fluor 594 (货号 ab150080)、Goat pAb to Ms IgG Alexa Fluor 594 (货号 ab150116)，武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.3 仪器

ZSZL 型小鼠握力测定仪，北京众实迪创科技有限公司；Olympus BX53 型荧光显微镜，日本 Olympus 公司；Tanon5200 型凝胶成像系统，上海天能科技有限公司；RM2016 型病理切片机，德国 Leica 公司；JK-6 型生物组织摊烤片机，武汉俊杰电子有限公司；T-24 型组织研磨仪，上海净信实业发展有限公司；TGL-16 型台式高速冷冻离心机，湘仪离心机仪器有限公司；Micro Drop 型超微量分光光度计，上海宝予德科学仪器有限公司；MyCycler 型基因扩增仪，美国 Bio-rad 公司；ViiA7 型实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪，美国 ABI 公司；Cellometer mini 型细胞计数仪，美国 Nexcelom 公司；5702R 型低速离心机，德国 Eppendorf 公司。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模、给药与取材

40 只 SPF 级雄性小鼠经 1 周适应性饲养后，采用随机数字表法依据体质量分为 5 组，即对照组、模型组及葛根素低、中、高剂量 (50、100、200 mg·kg<sup>-1</sup>) 组<sup>[25]</sup>，每组 8 只。除对照组外，其余各组均通过 ip 400 mg·kg<sup>-1</sup> D-半乳糖<sup>[26]</sup>建立小鼠肌少症模型；对照组每日 ip 等体积 0.9%氯化钠溶液，上述处理持续 4 周。造模期间每周观察小鼠一般状

态,若小鼠出现活动能力下降、食欲减退、毛色晦暗无光泽、体质量增长减缓等衰老相关表现,即判定造模成功<sup>[27-28]</sup>。造模成功后,葛根素各剂量组每日 ig 相应剂量葛根素;模型组与对照组每日 ig 等体积 0.9%氯化钠溶液。所有组均每日干预 1 次,持续干预 7 周。末次给药后禁食不禁水 12 h,采用 2%戊巴比妥钠溶液(200 mg·kg<sup>-1</sup>)安乐死处死小鼠后剥取双侧腓肠肌组织,左侧固定于 4%多聚甲醛(4 ℃,24 h)用于组织学分析,右侧液氮速冻后保存于-80 ℃冰箱中用于分子生物学检测。

## 2.2 体质量及前肢握力测定

葛根素干预期间,每周定时测定小鼠体质量及前肢握力 1 次:将小鼠置于电子秤,静止后记录体质量;握力计平放于水平台面,悬提小鼠尾部使其前肢接触感应横杆,待小鼠抓握横杆并静止后,沿仪器长轴匀速水平向后拖拽尾部,前肢松开时仪器自动记录最大握力,每只小鼠重复测定 3 次、间隔 5 min,取平均值作为最终握力数据。

## 2.3 苏木素-伊红(HE)及天狼猩红染色

取 4%多聚甲醛固定的小鼠肌肉组织,经脱水、包埋、冷冻后,用切片机制备 4 μm 厚切片。切片脱蜡水化后,分别进行 HE 染色和天狼猩红染色。染色后组织经乙醇脱水、二甲苯透明,以中性树胶封片,于显微镜下观察并采集图像。

## 2.4 免疫荧光检测小鼠腓肠肌组织中 PGC-1α 与 p21 蛋白的定位及表达水平

组织切片经抗原修复(如为石蜡切片)后,使用 4%多聚甲醛固定,并用 0.1% Triton X-100 进行透化处理。之后石蜡切片用二甲苯脱蜡,并通过不同浓度的乙醇再水合,然后再进行高温抗原修复。随后,在 37 ℃下以 5%牛血清白蛋白(BSA)孵育以封闭非特异性结合位点。滴加不同一抗 PGC-1α(1:200)及 p21(1:200)于 4 ℃孵育过夜,磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤后与相应荧光标记山羊来源的 IgG 多克隆抗体(1:200),在避光条件下 37 ℃孵育 1 h。细胞核采用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色,以清晰区分细胞结构,染色完成后使用抗荧光淬灭封片剂进行封片,延长荧光信号的保存时间。所有操作均在生物安全柜中进行。样本于荧光显微镜下观察并采集图像。使用 Image J 软件对获取的荧光图像进行定量分析,通过计算目标蛋白的平均荧光强度,实现对其表达水平的客观评估。

## 2.5 免疫组化检测小鼠腓肠肌组织中 PGC-1α 与 p21 蛋白表达水平

石蜡包埋组织经切片后,依次使用二甲苯和梯度乙醇进行脱蜡和水化处理。抗原修复采用 0.01 mol·L<sup>-1</sup>枸橼酸缓冲液(pH 6.0)于电热恒温水浴锅中加热进行。随后使用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液阻断内源性过氧化物酶活性 10 min,并在 37 ℃下以正常山羊血清封闭非特异性结合位点。切片滴加适当浓度的不同靶标一抗 PGC-1α(1:200)及 p21(1:200)4 ℃孵育过夜,PBS 洗涤后,将切片与山羊抗兔二抗(1:3 000)进行孵育(37 ℃孵育 20~30 min)。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色反应完成后,苏木素复染细胞核,盐酸分化后返蓝,经乙醇脱水、二甲苯透明,最后封片。所有切片均在倒置显微镜下观察并采集图像,通过 Image J 软件评估阳性区域面积占比及平均吸光度(A)值。

## 2.6 Western blotting 检测小鼠腓肠肌组织中 p21、p53、DRP1、PI3K、Akt 与 PGC-1α 蛋白的表达水平

采用 RIPA 裂解液提取骨骼肌组织总蛋白,BCA 法测定浓度并变性后,使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上进行 Western blotting 检测。膜用 5%脱脂奶粉(磷酸化蛋白用 1% BSA)封闭后,采用稀释比例 1:1 000 的 p21、p53、DRP1 抗体,稀释比例(1:2 000)的 PI3K、Akt、PGC-1α 抗体以及稀释比例(1:20 000)的 β-actin(内参蛋白)抗体 4 ℃孵育过夜,再与辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(1:5 000)室温孵育 2 h。通过 ECL 化学发光试剂显影,使用 Image J 软件分析目标蛋白与内参 β-actin 条带的光密度值,以目的蛋白条带光密度值与内参蛋白条带光密度值的比值表示目标蛋白的相对表达水平。

## 2.7 qRT-PCR 检测小鼠腓肠肌组织中 p21、p53、DRP1、PI3K、Akt、PGC-1α 基因 mRNA 表达水平

Trizol 法提取腓肠肌总 RNA 后,按照说明书将其逆转录为 cDNA。合成后,依次添加试剂,再以 cDNA 为模板,采用 qPCR 对应试剂盒,在 ABI ViiA7 仪器上进行扩增。反应程序为:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 10 s,60 ℃退火 30 s(采集荧光),共 40 个循环。以 β-actin 作为内参基因,所有引物由北京擎科生物合成,采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算基因的相对表达量,实验独立重复 3 次。相关引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

| 引物             | 序列 (5'→3')                |                           |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>p21</i>     | 上游 GGTGGAGACCTGATGATACCC  | 下游 TCTGCTGGCAAAGTGGGAC    |
| <i>p53</i>     | 上游 TGGAAGACTCCAGTGGAAC    | 下游 TCTTCTGTACGGCGGTCTCT   |
| <i>DRP1</i>    | 上游 AGCAAGAGAGCTGCCTTCAG   | 下游 GTTGCCTGTTGTTGGTTCCT   |
| <i>PI3K</i>    | 上游 TTAAATGGTGAGCACGGAGATG | 下游 AAATGTCACCAGACCACTCCT  |
| <i>Akt</i>     | 上游 TCCTCAAGAAGGAGGTCATCGT | 下游 CATACTCCATGACAAAGCAGAG |
| <i>PGC-1α</i>  | 上游 CTCTCAGTAAGGGGCTGGTT   | 下游 GACGCCAGTCAAGCTTTTTC   |
| <i>β-actin</i> | 上游 GGCTGTATCCCTCCATCG     | 下游 CCAGTTGGTAACAATGCCATGT |

## 2.8 统计学方法

使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析和图形绘制。数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 实验至少独立重复 3 次。首先以 Shapiro-Wilk 和 Brown-Forsythe 法分别检验数据的正态性与方差齐性。如果数据符合正态分布且满足方差齐性, 采用单因素方差分析 (ANOVA), 并使用 Tukey HSD 法进行事后检验; 如果数据不符合正态分布, 则采用 Kruskal-Wallis 非参数检验, 并应用 Steel-Dwass 法进行事后检验。

## 3 结果

### 3.1 各组小鼠体质量测定

结果见表 2, 对照组小鼠体质量呈稳定增长趋

势; 与对照组相比, 造模第 3 周起, 模型组小鼠体质量增长速率显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 提示 *D*-半乳糖诱导的衰老模型可显著影响小鼠正常生长发育及代谢功能。葛根素干预对 *D*-半乳糖所致的体质量增长抑制具有一定改善效应, 其中高剂量组效果最为显著, 自造模第 3 周起, 其平均体质量持续高于模型组, 表明该剂量对衰老相关的体质量增长异常具有较好的恢复作用。

### 3.2 各组小鼠握力变化

结果见表 3, 与对照组比较, 3 周后模型组小鼠的最大前肢握力值显著降低 ( $P < 0.01$ )。葛根素干预 3 周内葛根素各组握力提升缓慢, 5 周后中、高剂量

表 2 葛根素对肌少症小鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of puerarin on body mass in sarcopenic mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 体质量/g        |                            |                           |                            |
|-----|---------------------------|--------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|     |                           | 第 1 周        | 第 3 周                      | 第 5 周                     | 第 7 周                      |
| 对照  | —                         | 25.51 ± 1.60 | 27.46 ± 1.33               | 28.88 ± 1.20              | 30.18 ± 1.10               |
| 模型  | —                         | 24.12 ± 1.75 | 25.04 ± 1.04 <sup>##</sup> | 26.97 ± 1.26 <sup>#</sup> | 27.20 ± 1.25 <sup>##</sup> |
| 葛根素 | 50                        | 23.82 ± 1.45 | 24.90 ± 1.40               | 26.20 ± 1.57              | 26.90 ± 1.30               |
|     | 100                       | 24.75 ± 1.19 | 24.60 ± 0.81               | 25.84 ± 0.98              | 27.56 ± 0.95               |
|     | 200                       | 24.02 ± 1.62 | 26.07 ± 1.17               | 27.83 ± 1.19              | 28.70 ± 2.18               |

与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group.

表 3 葛根素对肌少症小鼠握力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of puerarin on grip strength in sarcopenic mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 握力/N        |                           |                           |                           |
|-----|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|     |                           | 第 1 周       | 第 3 周                     | 第 5 周                     | 第 7 周                     |
| 对照  | —                         | 2.37 ± 0.29 | 2.60 ± 0.12               | 2.80 ± 0.24               | 2.94 ± 0.28               |
| 模型  | —                         | 2.15 ± 0.28 | 2.13 ± 0.13 <sup>##</sup> | 2.13 ± 0.21 <sup>##</sup> | 2.19 ± 0.26 <sup>##</sup> |
| 葛根素 | 50                        | 2.31 ± 0.26 | 2.21 ± 0.31               | 2.41 ± 0.33               | 2.41 ± 0.31               |
|     | 100                       | 2.31 ± 0.24 | 2.27 ± 0.34               | 2.56 ± 0.14 <sup>*</sup>  | 2.59 ± 0.38 <sup>*</sup>  |
|     | 200                       | 2.14 ± 0.19 | 2.40 ± 0.34               | 2.85 ± 0.45 <sup>**</sup> | 2.78 ± 0.27 <sup>**</sup> |

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group.

组小鼠握力较模型组显著提升 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。

### 3.3 小鼠腓肠肌组织 HE 染色

结果如图 1 所示, 与对照组相比, 模型组肌间隙显著增宽, 细胞排列紊乱, 同时出现肌纤维肿胀、断裂、横截面积减小等情况。与模型组比较, 葛根素各剂量组中纤维结构完整性逐渐得到恢复, 横纹清晰, 肌纤维横截面积增大, 呈现出一定的剂量相关性。

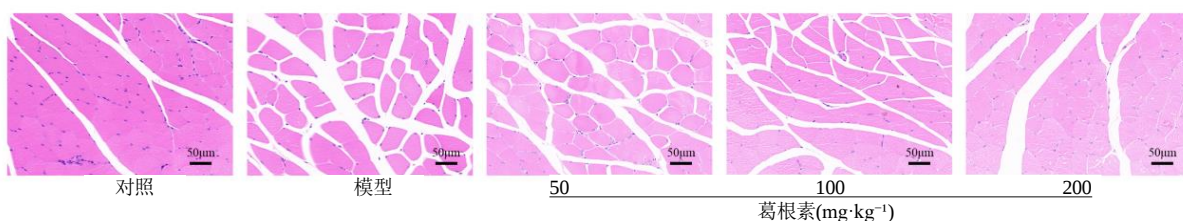


图 1 葛根素对肌少症小鼠模型骨骼肌细胞组织病理学的影响 ( $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of puerarin on histopathology of skeletal muscle cells in sarcopenia model mice ( $\times 400$ )

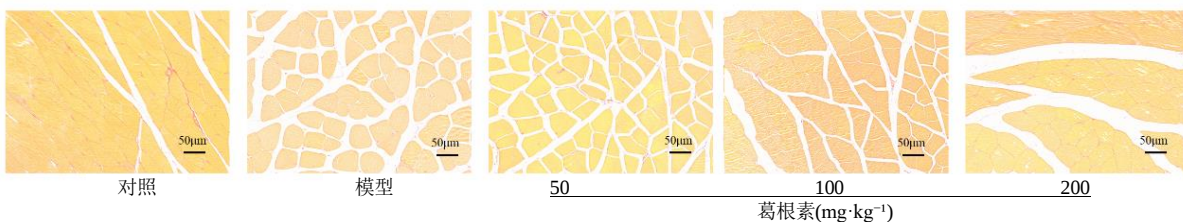


图 2 葛根素对肌少症小鼠模型骨骼肌细胞组织胶原沉积的影响 ( $\times 400$ )

Fig. 2 Impact of puerarin on collagen deposition in skeletal muscle cell tissues of sarcopenia model mice ( $\times 400$ )

### 3.5 葛根素对小鼠腓肠肌组织中 PGC-1 $\alpha$ 、p21 蛋白表达的影响

为多维度验证 PGC-1 $\alpha$  与 p21 在小鼠腓肠肌组织中的表达特征及分布模式, 本研究同步采用免疫荧光与免疫组化技术检测。免疫组化染色基于酶促反应显色原理, 可在明场显微镜下清晰呈现目标蛋白的表达强度, 及其与肌纤维、细胞核等组织形态结构的关联, 为半定量分析提供可靠依据; 免疫荧光染色基于荧光信号成像, 灵敏度与分辨率更高, 更适用于特定蛋白的精确定位研究。需要说明的是, 本研究中对 PGC-1 $\alpha$  与 p21 的免疫荧光检测, 系采用相邻组织切片分别进行独立标记的策略。此方法能有效呈现二者在组织中的总体分布与表达趋势, 但由于未在同一张切片上进行多色共标记, 因此其结果不能用于直接判定两种蛋白在单一细胞内的共定位关系。

PGC-1 $\alpha$  与 p21 的免疫荧光 (图 3、表 4) 与免疫组化 (图 4、表 5) 检测结果趋势一致: 与对照组比较, 模型组小鼠腓肠肌组织中 PGC-1 $\alpha$  表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), p21 表达水平显著升高 ( $P <$

### 3.4 小鼠腓肠肌组织天狼猩红染色

结果见图 2, 与对照组相比, 模型组小鼠腓肠肌组织胶原纤维沉积水平显著升高, 肌细胞大小不均一, 形态趋向卵圆形改变。与模型组比较, 葛根素各剂量组肌肉组织纤维化程度均明显降低, 胶原纤维排列由紊乱网状结构转变为平行束状, 且该改善效应也呈现出一定的剂量相关性。

0.01), 且模型组可见大量强阳性细胞核信号; 与模型组比较, 葛根素中、高剂量组 PGC-1 $\alpha$  表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), p21 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 低剂量组亦呈现 PGC-1 $\alpha$  升高、p21 降低的趋势, 且效应随葛根素浓度升高呈剂量相关性增强。2 种检测方法相互验证、互为补充, 进一步保障了实验结果的可靠性。

### 3.6 葛根素对小鼠腓肠肌组织中 p21、p53、DRP1、PI3K、Akt、PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 与对照组相比, 模型组小鼠肌肉组织中 PI3K、Akt、PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而 p21、p53 及 DRP1 的蛋白水平明显升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 葛根素中、高剂量组中 PI3K、Akt、PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), DRP1、p21、p53 蛋白表达水平则显著降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 5 及表 6。

### 3.7 葛根素对小鼠腓肠肌组织中 p21、p53、DRP1、PI3K、Akt、PGC-1 $\alpha$ 的 mRNA 表达的影响

qRT-PCR 结果显示 (表 7), 与对照组相比, 模型组中 PI3K、Akt 与 PGC-1 $\alpha$  的 mRNA 表达水平

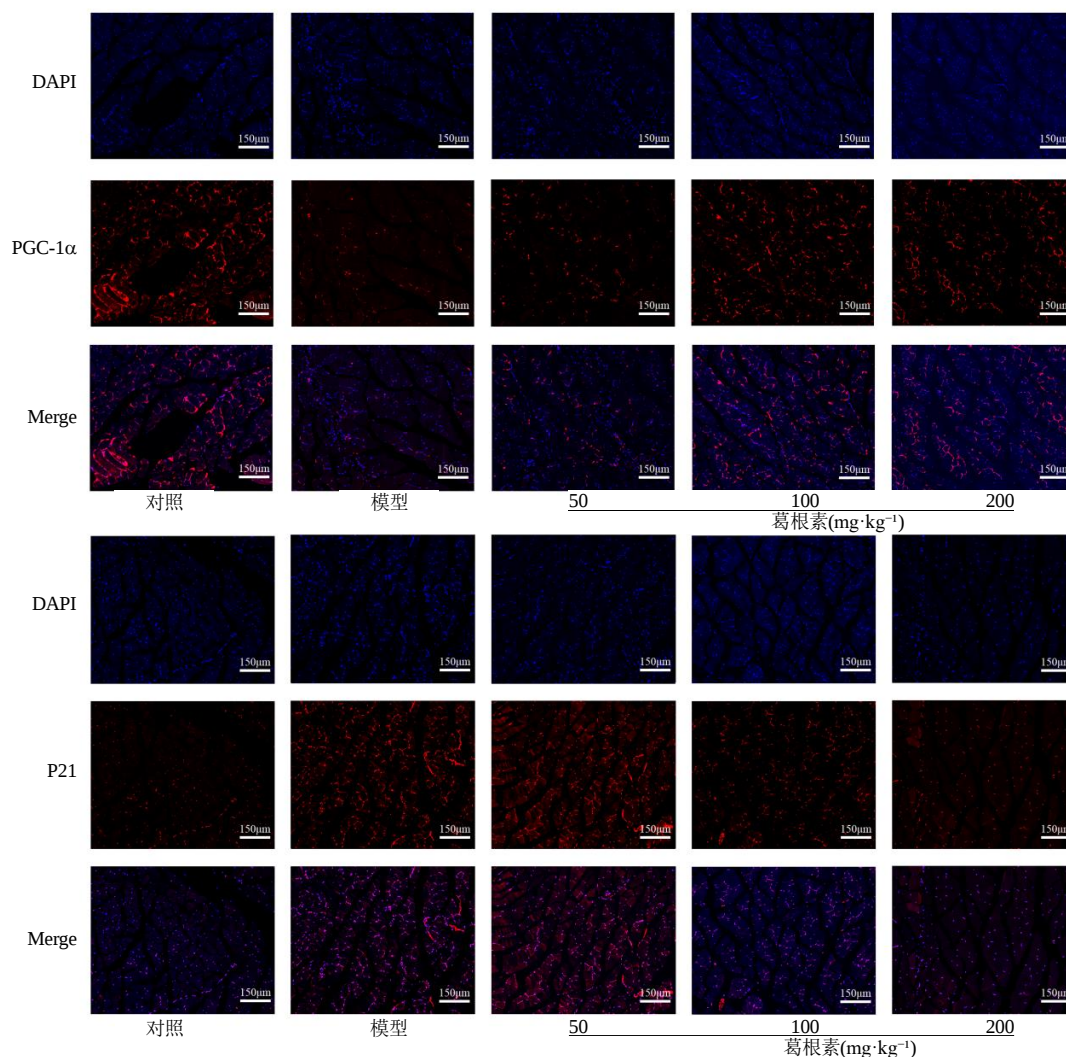


图 3 免疫荧光检测 PGC-1α、p21 蛋白表达 (×200)

Fig. 3 Immunofluorescence detection of PGC-1α, p21 expression (×200)

表 4 平均荧光强度 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Average fluorescence intensity ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 平均荧光强度                    |                           |
|-----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|     |                           | PGC-1α                    | p21                       |
| 对照  | —                         | 1.22 ± 0.27               | 0.09 ± 0.02               |
| 模型  | —                         | 0.06 ± 0.01 <sup>##</sup> | 0.49 ± 0.09 <sup>##</sup> |
| 葛根素 | 50                        | 0.13 ± 0.03               | 0.33 ± 0.08               |
|     | 100                       | 0.63 ± 0.11 <sup>**</sup> | 0.22 ± 0.07 <sup>**</sup> |
|     | 200                       | 0.77 ± 0.13 <sup>**</sup> | 0.19 ± 0.03 <sup>**</sup> |

与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group.

显著下调 ( $P < 0.01$ ); 而 *DRP1* 以及细胞衰老相关基因 *p21* 与 *p53* 的 mRNA 表达均显著上调 ( $P < 0.01$ )。与模型组相比, 葛根素各剂量组均呈现出良好的剂量相关性, *PI3K*、*Akt* 及 *PGC-1α* 的 mRNA 表达显著上升 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 而 *p21*、*p53* 及 *DRP1*

的表达水平则明显下降 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

#### 4 讨论

肌少症是一种年龄相关性骨骼肌退行性疾病, 以骨骼肌质量进行性减少、肌力下降及生理功能减退为主要临床特征<sup>[27]</sup>。其病理进程与细胞衰老、线粒体功能障碍密切相关<sup>[29]</sup>, 衰老微环境可诱导肌细胞周期停滞甚至凋亡<sup>[30]</sup>; 而线粒体生物合成减少、动力学失衡会引发能量代谢紊乱, 二者共同加速肌萎缩发展<sup>[31]</sup>。

现代中医基于肌少症肌肉萎缩、消瘦无力、肢体懈怠、运动迟缓等临床表现, 将其归属于“痿证”“虚劳”等范畴<sup>[32]</sup>。结合中医古籍对痿证的认知,《素问·痿论》有云“脾主身之肌肉, 脾气热, 则胃热而渴, 肌肉不仁, 发为肉痿”“治痿独取阳明”<sup>[33]</sup>, 为该病基于“脾主肌肉”的中医核心逻辑确立了治

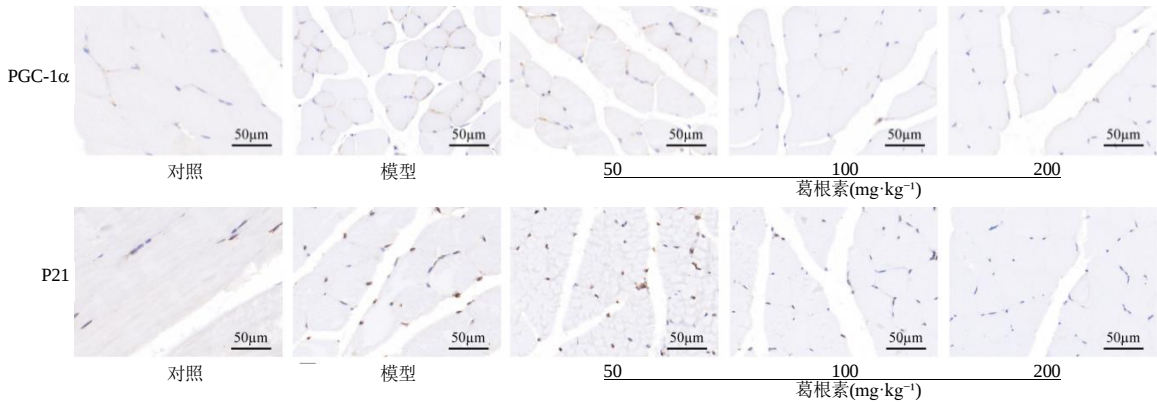


图 4 免疫组化检测葛根素对小鼠骨骼肌组织中 PGC-1α、p21 表达 (×400)

Fig. 4 Immunohistochemical detection of puerarin on expression of PGC-1α and p21 in skeletal muscle tissue of mice (×400)

表 5 葛根素对小鼠骨骼肌组织中 PGC-1α、p21 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of puerarin on expression levels of PGC-1α, p21 proteins in skeletal muscle tissue of mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | A                        |                          |
|-----|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
|     |                           | PGC-1α                   | p21                      |
| 对照  | —                         | 0.78±0.17                | 0.87±0.04                |
| 模型  | —                         | 0.33±0.03 <sup>###</sup> | 1.73±0.11 <sup>###</sup> |
| 葛根素 | 50                        | 0.39±0.11                | 1.61±0.13                |
|     | 100                       | 0.47±0.09 <sup>**</sup>  | 1.32±0.17 <sup>**</sup>  |
|     | 200                       | 0.69±0.19 <sup>**</sup>  | 1.04±0.15 <sup>**</sup>  |

与对照组比较: <sup>###</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

<sup>###</sup> $P<0.01$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs model group.

表 6 葛根素对肌少症小鼠模型骨骼肌细胞中 p21、p53、DRP1、PI3K、Akt、PGC-1α 蛋白相对表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effects of puerarin on expression levels of p21, p53, DRP1, PI3K, Akt and PGC-1α proteins in skeletal muscle cells of sarcopenia model mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | p21/β-actin              | p53/β-actin              | DRP1/β-actin             | PI3K/β-actin             | Akt/β-actin              | PGC-1α/β-actin           |
|-----|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照  | —                         | 0.29±0.13                | 0.16±0.08                | 0.31±0.10                | 0.32±0.13                | 0.16±0.13                | 0.38±0.05                |
| 模型  | —                         | 0.68±0.12 <sup>###</sup> | 0.38±0.03 <sup>###</sup> | 0.72±0.16 <sup>###</sup> | 0.15±0.03 <sup>###</sup> | 0.08±0.05 <sup>###</sup> | 0.08±0.07 <sup>###</sup> |
| 葛根素 | 50                        | 0.55±0.02                | 0.32±0.11                | 0.59±0.10                | 0.24±0.17                | 0.09±0.05                | 0.13±0.06                |
|     | 100                       | 0.37±0.02 <sup>**</sup>  | 0.20±0.06 <sup>**</sup>  | 0.46±0.09 <sup>**</sup>  | 0.26±0.16 <sup>**</sup>  | 0.10±0.06 <sup>**</sup>  | 0.19±0.04 <sup>**</sup>  |
|     | 200                       | 0.32±0.19 <sup>**</sup>  | 0.19±0.12 <sup>**</sup>  | 0.38±0.17 <sup>**</sup>  | 0.30±0.09 <sup>**</sup>  | 0.12±0.08 <sup>**</sup>  | 0.29±0.14 <sup>**</sup>  |

与对照组比较: <sup>###</sup> $P<0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*\*</sup> $P<0.01$ 。

<sup>###</sup> $P<0.01$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs model group.

疗方向。葛根既归脾胃经, 又为阳明经引经药, 可引药直达病所, 调节肌肉运动、升发脾胃阳气, 历代医家常以其治疗痿证<sup>[34]</sup>。且其性偏寒凉, 故在湿热伤津、筋脉失养所致的痿证中应用广泛<sup>[35-36]</sup>, 为现代从中药有效成分切入, 深入研究葛根治疗肌少症的作用机制, 提供了经典中医理论支撑与临床研

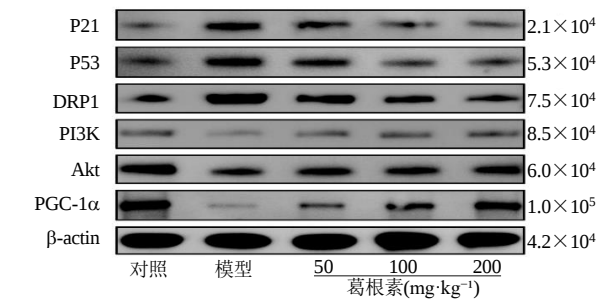


图 5 Western blotting 检测各组小鼠骨骼肌细胞中 p21、p53、DRP1、PI3K、Akt、PGC-1α 表达

Fig. 5 Western blotting detect expression of p21, p53, DRP1, PI3K, Akt and PGC-1α in skeletal muscle cells of mice in each group

究思路。

葛根的主要活性成分葛根素是一种异黄酮类天然化合物, 已在多种肌肉萎缩模型中证实, 可通过抗氧化、抗炎及代谢调节等机制发挥肌肉保护作用<sup>[22,37]</sup>。本研究聚焦葛根素在肌少症模型中的治疗潜力, 从调控线粒体功能、抑制细胞衰老等角度丰

表 7 葛根素对肌少症小鼠模型骨骼肌细胞中 *p21*、*p53*、*DRP1*、*PI3K*、*Akt*、*PGC-1α* mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Table 7 Effects of puerarin on expression levels of *p21*, *p53*, *DRP1*, *PI3K*, *Akt* and *PGC-1α* mRNA in skeletal muscle cells of sarcopenia model mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | <i>p21</i> /β-actin     | <i>p53</i> /β-actin     | <i>DRP1</i> /β-actin    | <i>PI3K</i> /β-actin    | <i>Akt</i> /β-actin     | <i>PGC-1α</i> /β-actin  |
|-----|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 对照  | —                         | 1.00±0.15               | 1.00±0.09               | 1.00±0.15               | 1.00±0.03               | 1.00±0.03               | 1.00±0.04               |
| 模型  | —                         | 4.46±0.13 <sup>##</sup> | 5.26±0.03 <sup>##</sup> | 5.29±0.10 <sup>##</sup> | 0.17±0.10 <sup>##</sup> | 0.02±0.08 <sup>##</sup> | 0.21±0.03 <sup>##</sup> |
| 葛根素 | 50                        | 3.16±0.06 <sup>*</sup>  | 4.57±0.14 <sup>*</sup>  | 5.21±0.07 <sup>*</sup>  | 0.35±0.03 <sup>*</sup>  | 0.21±0.14 <sup>*</sup>  | 0.33±0.14 <sup>*</sup>  |
|     | 100                       | 2.29±0.10 <sup>**</sup> | 2.58±0.05 <sup>**</sup> | 2.20±0.07 <sup>**</sup> | 0.50±0.06 <sup>**</sup> | 0.34±0.02 <sup>**</sup> | 0.50±0.10 <sup>**</sup> |
|     | 200                       | 1.52±0.09 <sup>**</sup> | 1.97±0.15 <sup>**</sup> | 1.65±0.03 <sup>**</sup> | 0.75±0.13 <sup>**</sup> | 0.74±0.09 <sup>**</sup> | 0.81±0.14 <sup>**</sup> |

与对照组比较: <sup>##</sup>*P*<0.01; 与模型组比较: <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01。

<sup>##</sup>*P*<0.01 vs control group; <sup>\*</sup>*P*<0.05 <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs model group.

富其作用机制, 旨在为其临床应用提供实验依据。

本研究采用经典刺激物 *D*-半乳糖构建骨骼肌细胞衰老与线粒体功能障碍相关的肌少症小鼠模型<sup>[38]</sup>, 结果表明葛根素干预可显著改善 *D*-半乳糖诱导的小鼠肌肉组织病理损伤。行为学层面, 相较于模型组, 高剂量葛根素干预组小鼠体质量有所上升, 中、高剂量组前肢握力显著增强 (*P*<0.05、0.01), 2019 年肌肉减少症定义和结果联盟 (SDOC) 工作组已将握力明确列为行动能力残疾的重要指标及健康相关结局的预测因子<sup>[39]</sup>, 该指标的显著改善提示小鼠肌肉功能得到有效维持。进一步的组织学分析显示, 葛根素干预可显著减轻肌纤维萎缩与间质纤维化, 表现为肌纤维横截面积明显增加、胶原沉积减少, 且该效应呈剂量相关性; 鉴于肌纤维增殖能力有限, 其横截面积变化取决于蛋白质合成与降解的协调平衡<sup>[40]</sup>, 而 *PI3K/Akt* 通路是调控蛋白合成的核心通路之一, 主要通过激活下游哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1 (mTORC1) 精确调控蛋白质合成速率<sup>[41]</sup>, 本实验中肌纤维横截面积的增加与 *PI3K/Akt* 通路的显著上调相符。从分子机制来看, 葛根素可显著上调 *PI3K/Akt* 分子及线粒体生物合成关键调控因子 *PGC-1α* 的表达 (*P*<0.01), 同时显著下调线粒体分裂调控蛋白 *DRP1* 及细胞衰老相关分子 *p21*、*p53* 的表达 (*P*<0.01), 上述结果提示, 葛根素改善肌少症的作用机制可能与调控细胞衰老进程、改善线粒体功能相关。

细胞衰老是指细胞在应对各类应激压力时, 进入不可逆的生长停滞状态, 并分泌包括炎症因子、趋化因子、蛋白酶在内的 SASP, 进而破坏组织微环境<sup>[10]</sup>, 最终引发生理储备耗竭、器官功能衰退<sup>[42]</sup>。线粒体功能障碍是指 ATP 合成效率降低、线粒体膜电位下降、线粒体自噬受阻等一系列异常表现, 导

致细胞能量代谢严重受损<sup>[9]</sup>。在 *D*-半乳糖诱导的肌少症模型中, *D*-半乳糖蓄积引发活性氧 (ROS) 爆发<sup>[43]</sup>, 激活 *p53/p21* 细胞衰老信号通路, 同时抑制 *PI3K/Akt/mTOR* 生存通路; 这些变化进一步诱导线粒体膜电位降低、ATP 合成减少及线粒体自噬失调, 进而激活线粒体依赖性凋亡通路<sup>[44]</sup>, 最终导致肌纤维萎缩、细胞凋亡增加及再生能力丧失的肌少症典型表型<sup>[45]</sup>。本研究进一步证实, 细胞衰老与线粒体功能障碍在肌少症的发生发展中扮演关键角色。

*PI3K/Akt* 通路的核心作用已得到广泛认可, 其在细胞增殖、凋亡、代谢等多种生命过程中发挥重要调控作用, 通路功能异常与肌少症的病理进展密切相关<sup>[46]</sup>。为明确葛根素对骨骼肌细胞的保护作用是否与 *PI3K/Akt* 信号通路相关, 本研究发现, 葛根素干预可显著上调 *PI3K/Akt* 及线粒体生物合成关键调控因子 *PGC-1α* 的蛋白与 mRNA 表达水平 (*P*<0.01), 同时显著下调线粒体分裂调控蛋白 *DRP1* 及细胞衰老相关分子 *p21*、*p53* 的表达水平 (*P*<0.01)。结合既往研究可见, 葛根素的分子调控规律具有一致性: 在脑损伤模型中, 葛根素通过激活 *PI3K/Akt*/核因子红系相关因子 2 (Nrf2) 信号通路, 抑制氧化应激并减轻灌注损伤<sup>[47]</sup>, 其对 *PI3K/Akt* 通路的激活效应与本实验一致; 在牙周炎模型中, 葛根素可激活 Nrf2 以增强线粒体自噬, 同时下调 *DRP1* 表达缓解炎症损伤<sup>[48]</sup>, 与本研究葛根素下调 *DRP1*、改善线粒体功能的趋势相符; 在小鼠乳腺老化模型中, 葛根素通过显著下调 SASP 及 *p53/p21* 表达、抑制相关信号通路修复线粒体损伤<sup>[49]</sup>, 这与本实验中葛根素抑制细胞衰老通路的调控逻辑一致。上述既往研究结果与本实验数据相互印证, 进一步提升了本研究结论的可靠性。综上, 葛根素可能通过激活 *PI3K/Akt* 核心信号通路, 一方面抑制 *DRP1* 介导

的线粒体过度分裂<sup>[50]</sup>, 另一方面促进 PGC-1 $\alpha$  表达以增强线粒体生物发生<sup>[13]</sup>, 同时下调 p53/p21 细胞衰老及周期阻滞相关通路, 从调控细胞衰老、改善线粒体功能等多维度发挥抗肌少症作用。

本研究尚存在许多局限性。首先, 尽管实验证实了葛根素与 PI3K/Akt 通路及相关分子的表达关联性, 但缺乏功能获得性与缺失性实验 (如基因过表达、RNA 干扰等), 难以明确各分子间的层级调控关系及核心作用靶点。其次, 细胞内信号通路并非孤立存在, 后续需进一步系统解析 PI3K/Akt 通路与 Nrf2、p38 MAPK 等其他通路的交互调控网络, 阐明其在肌少症病理进程中的协同或拮抗作用。再者, 目前临床上尚无正式获批的肌少症治疗特效药<sup>[51-52]</sup>, 本研究核心目标为验证葛根素对 D-半乳糖诱导肌少症模型的初步疗效及量效关系, 故未设置阳性对照组<sup>[53]</sup>, 该局限性将在后续研究中补充完善。此外, 动物模型的病理特征与人类肌少症存在物种差异, 葛根素的临床转化价值仍需通过严格的临床研究进一步验证。最后, 本研究仅聚焦 PI3K/Akt 通路核心分子, 后续将深入挖掘该通路的上下游结合位点, 为完善葛根素的调控机制网络提供更全面的实验依据。

综上所述, 本研究明确证实葛根素可显著改善肌少症模型小鼠的肌肉萎缩症状及运动功能减退, 其作用机制与激活 PI3K/Akt 核心信号通路密切相关, 具体表现为上调线粒体生物合成关键因子 PGC-1 $\alpha$  的表达, 同时下调线粒体分裂调控蛋白 DRP1 及细胞衰老相关分子 p53、p21 的表达水平。本研究从天然药物活性成分干预视角, 系统探讨了葛根素通过 PI3K/Akt 通路调控骨骼肌细胞凋亡、线粒体功能及细胞衰老的核心机制, 不仅为葛根素作为肌少症潜在治疗药物的研发提供了坚实的科学依据与实验基础, 也为肌少症的中医靶向治疗提供了新思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Coelho-Júnior H J, Marzetti E. Capturing what counts in muscle failure: A critical appraisal of the current operational models of sarcopenia [J]. *Lancet Healthy Longev*, 2025, 6(8): 100756.
- [2] Zhang X M, Wang C H, Dou Q L, et al. Sarcopenia as a predictor of all-cause mortality among older nursing home residents: A systematic review and Meta-analysis [J]. *BMJ Open*, 2018, 8(11): e021252.
- [3] Wang Y C, Xu Q, Lu S Q, et al. The effect of muscle quality index on risk of adverse health outcomes: A prospective cohort study of 355, 209 adults [J]. *Am J Clin Nutr*, 2025, 122(5): 1452-1460.
- [4] Yuan S, Larsson S C. Epidemiology of sarcopenia: Prevalence, risk factors, and consequences [J]. *Metabolism*, 2023, 144: 155533.
- [5] Senior H E, Henwood T R, Beller E M, et al. Prevalence and risk factors of sarcopenia among adults living in nursing homes [J]. *Maturitas*, 2015, 82(4): 418-423.
- [6] Feng L Y, Gao Q Q, Hu K Y, et al. Prevalence and risk factors of sarcopenia in patients with diabetes: A Meta-analysis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2022, 107(5): 1470-1483.
- [7] Jogiat U M, Bédard E L R, Sasewich H, et al. Sarcopenia reduces overall survival in unresectable oesophageal cancer: A systematic review and Meta-analysis [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2022, 13(6): 2630-2636.
- [8] Kittiprachakul S, Maung S T, Poorirerngpoom N, et al. Exercise and nutrition interventions for sarcopenia in cirrhosis: A systematic review and network Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Eur J Clin Nutr*, 2025, 79(11): 1087-1098.
- [9] Zong Y, Li H, Liao P, et al. Mitochondrial dysfunction: Mechanisms and advances in therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 124.
- [10] Herranz N, Gil J. Mechanisms and functions of cellular senescence [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(4): 1238-1246.
- [11] Wei P, Zhang X Y, Yan C, et al. Mitochondrial dysfunction and aging: Multidimensional mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Biogerontology*, 2025, 26(4): 142.
- [12] Gellhaus B, Böker K O, Schilling A F, et al. Therapeutic consequences of targeting the IGF-1/PI3K/Akt/FOXO3 axis in sarcopenia: A narrative review [J]. *Cells*, 2023, 12(24): 2787.
- [13] Chen X, Ji Y N, Liu R Q, et al. Mitochondrial dysfunction: Roles in skeletal muscle atrophy [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 503.
- [14] Li R R, Ren T, Zeng J Q. Mitochondrial coenzyme Q protects sepsis-induced acute lung injury by activating PI3K/Akt/GSK-3  $\beta$ /mTOR pathway in rats [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5240898.
- [15] Ji Z J, Liu G H, Qu J. Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging [J]. *J Genet Genomics*, 2022, 49(4): 287-298.
- [16] Takenaka Y, Inoue I, Nakano T, et al. Prolonged disturbance of proteostasis induces cellular senescence via temporal mitochondrial dysfunction and subsequent mitochondrial accumulation in human fibroblasts [J].

- FEBS J, 2022, 289(6): 1650-1667.
- [17] Yang M, Liu Y, Luo S L, et al. DsbA-L ameliorates renal aging and renal fibrosis by maintaining mitochondrial homeostasis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2024, 45(4): 777-789.
- [18] Wen S Q, Wang L, Wang T, et al. Puerarin alleviates cadmium-induced mitochondrial mass decrease by inhibiting PINK1-Parkin and Nix-mediated mitophagy in rat cortical neurons [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2022, 230: 113127.
- [19] 陈焱, 封俨宸, 廖紫云, 等. 葛根素调节肥胖机制的研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(11): 4103-4114.  
Chen Y, Feng Y C, Liao Z Y, et al. Research progress in pharmacological effects of puerarin [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(11): 4103-4114.
- [20] 陈凯, 魏平慧, 史琳. 葛根异黄酮类成分的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(12): 2602-2610.  
Chen K, Wei P H, Shi L. Research progress on pharmacological effects of isoflavones from *Pueraria lobata* [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(12): 2602-2610.
- [21] Zeng J, Zheng S Z, Chen Y Z, et al. Puerarin attenuates intracerebral hemorrhage-induced early brain injury possibly by PI3K/Akt signal activation-mediated suppression of NF- $\kappa$ B pathway [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(16): 7809-7824.
- [22] Yin L, Chen X, Li N, et al. Puerarin ameliorates skeletal muscle wasting and fiber type transformation in STZ-induced type 1 diabetic rats [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 110977.
- [23] 张晓丹, 杨艳南, 王淑静, 等. 葛根素对 PI3K/Akt 通路介导 PASMCS 凋亡的影响 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(15): 3041-3046.  
Zhang X D, Yang Y N, Wang S J, et al. Effect of puerarin on PI3K/Akt pathway-mediated apoptosis of PASMCS [J]. China J Chin Mater Med, 2015, 40(15): 3041-3046.
- [24] Yoon Y E, Ju S H, Kim Y, et al. Natural flavonoids for the prevention of sarcopenia: Therapeutic potential and mechanisms [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(15): 7458.
- [25] 李蕾, 金妍伶, 吕碧君, 等. 葛根素通过 AMPK/mTOR 通路激活自噬治疗小鼠高脂血症 [J]. 陕西科技大学学报, 2024, 42(5): 60-66, 76.  
Li L, Jin Y L, Lyu B J, et al. Puerarin activates autophagy through AMPK/mTOR pathway to treat hyperlipidemia in mice [J]. J Shaanxi Univ Sci Technol, 2024, 42(5): 60-66, 76.
- [26] 房珈慧, 刘颖, 薛美兰, 等. 干酪乳杆菌对 D-半乳糖所致衰老小鼠抗氧化系统及肠黏膜屏障功能的作用 [J]. 营养学报, 2016, 38(6): 580-585.  
Fang J H, Liu Y, Xue M L, et al. Effects of Lactobacillus casei on antioxidant system and intestinal mucosal barrier in D-galactose induced aging mice [J]. Acta Nutr Sin, 2016, 38(6): 580-585.
- [27] Xie W Q, He M, Yu D J, et al. Mouse models of sarcopenia: Classification and evaluation [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2021, 12(3): 538-554.
- [28] Cruz-Jentoft A J, Sayer A A. Sarcopenia [J]. Lancet, 2019, 393(10191): 2636-2646.
- [29] He Y, Xie W, Li H, et al. Cellular senescence in sarcopenia: Possible mechanisms and therapeutic potential [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 793088.
- [30] Sacco A, Belloni L, Latella L. From development to aging: The path to cellular senescence [J]. Antioxid Redox Signal, 2021, 34(4): 294-307.
- [31] Covarrubias A J, Perrone R, Grozio A, et al. NAD<sup>+</sup> metabolism and its roles in cellular processes during ageing [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(2): 119-141.
- [32] 王碧萱, 骆天炯. 基于“治痿独取阳明”理论探究老年肌少症的病机与治疗策略 [J]. 当代医药论丛, 2025, 23(16): 5-8.  
Wang B X, Luo T J. Based on the theory of “treating flaccidity and taking Yangming alone”, this paper explores the pathogenesis and treatment strategy of sarcopenia in the elderly [J]. Contemp Med Symp, 2025, 23(16): 5-8.
- [33] 赵浩斌, 翟双庆. 从《黄帝内经》崇阳思想浅谈“治痿独取阳明” [J]. 中医学报, 2022, 37(7): 1373-1377.  
Zhao H B, Zhai S Q. On “treating flaccidity syndrome with Yangming alone” based on thought of Yang being superior in *Huang di Nei Jing* [J]. Acta Chin Med, 2022, 37(7): 1373-1377.
- [34] 杨波, 周扬, 王振国. 葛根四性考辨 [J]. 上海中医药杂志, 2009, 43(10): 82-83.  
Yang B, Zhou Y, Wang Z G. Textual research on four properties of *Radix Puerariae* [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2009, 43(10): 82-83.
- [35] 王颖, 矫健鹏, 岳小强. 李氏清暑益气汤治疗杂病验案 5 则 [J]. 江苏中医药, 2024, 56(1): 66-68.  
Wang Y, Jiao J P, Yue X Q. Five cases of miscellaneous diseases treated by Lishi Qingshu Yiqi Decoction [J]. Jiangsu J Tradit Chin Med, 2024, 56(1): 66-68.
- [36] 蒋旭宏, 黄小民, 章正祥, 等. 裘昌林教授治疗重症肌无力的用药规律探究 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(3): 428-432.  
Jiang X H, Huang X M, Zhang Z X, et al. Exploration of professor Qiu Changlin’s medication rule in treating myasthenia gravis [J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2016,

- 25(3): 428-432.
- [37] Lin S J, Cheng Y, Chen X X, et al. Puerarin delays the progression of muscle atrophy in mice with dexamethasone-induced sarcopenia through inhibiting the TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway [J]. Food Sci Nutr, 2025, 13(4): e70166.
- [38] 贾新傲, 唐玉娇. 肌少症小鼠模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 404-410.  
Jia X A, Tang Y J. Research progress in mouse models of sarcopenia [J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2024, 32(3): 404-410.
- [39] Cawthon P M, Trivison T G, Manini T M, et al. Establishing the link between lean mass and grip strength cut points with mobility disability and other health outcomes: Proceedings of the sarcopenia definition and outcomes consortium conference [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2020, 75(7): 1317-1323.
- [40] Romanello V, Sandri M. Mitochondrial quality control and muscle mass maintenance [J]. Front Physiol, 2015, 6: 422.
- [41] Wang Y L, Meng J Y, Zhang J C, et al. Cell biomechanics on muscle atrophy: From intricate mechanisms to therapeutic frontiers [J]. Ann Med, 2025, 57(1): 2540598.
- [42] Aunan J R, Watson M M, Hagland H R, et al. Molecular and biological hallmarks of ageing [J]. Br J Surg, 2016, 103(2): e29-46.
- [43] Wang H H, Sun Y N, Qu T Q, et al. Nobiletin prevents *D*-galactose-induced C2C12 cell aging by improving mitochondrial function [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11963.
- [44] Chung C Y, Singh K, Sheshadri P, et al. Inhibition of the PI3K-Akt-MTORC1 axis reduces the burden of the m.3243A>G mtDNA mutation by promoting mitophagy and improving mitochondrial function [J]. Autophagy, 2025, 21(4): 881-896.
- [45] Sha J Y, Li J H, Zhou Y D, et al. The p53/p21/p16 and PI3K/Akt signaling pathways are involved in the ameliorative effects of maltol on *D*-galactose-induced liver and kidney aging and injury [J]. Phytother Res, 2021, 35(8): 4411-4424.
- [46] Hsu W H, Wang S Y, Chao Y M, et al. Novel metabolic and lipidomic biomarkers of sarcopenia [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2024, 15(5): 2175-2186.
- [47] Zhang Q Q, Yao M, Qi J J, et al. Puerarin inhibited oxidative stress and alleviated cerebral ischemia-reperfusion injury through PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1134380.
- [48] Xiang Y L, Li Z L, He X, et al. Puerarin relives inflammation, bone destruction and facilitates osteogenic differentiation in periodontitis by enhancing mitochondrial autophagy via activating mitochondrial Mitofusin 2 [J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16(1): 218.
- [49] Liu S, Hu H J, Zhang M, et al. Puerarin delays mammary gland aging by regulating gut microbiota and inhibiting the p38MAPK signaling pathway [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(19): 10879-10896.
- [50] Chang X, He Y H, Wang L, et al. Puerarin alleviates LPS-induced H9C2 cell injury by inducing mitochondrial autophagy [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2022, 80(4): 600-608.
- [51] Metodieva K, Dimitrov I, Bivolarska A. Combating sarcopenia through nutrition: Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Aronia melanocarpa* [J]. Nutrients, 2025, 17(21): 3333.
- [52] Cruz-Jentoft A J, Bahat G, Bauer J, et al. Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis [J]. Age Ageing, 2019, 48(1): 16-31.
- [53] Li Y, Liu Z Y, Yan H Y, et al. *Polygonatum sibiricum* polysaccharide ameliorates skeletal muscle aging and mitochondrial dysfunction via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Phytomedicine, 2025, 136: 156316.

[责任编辑 孙英杰]