

基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路研究巴戟天环烯醚萜类部位治疗衰老性肌少症的作用及机制

王馨莹¹, 何晶晶¹, 连晓笛¹, 李 慧^{1,2}, 蔡雪婷^{1,2}, 李 瑶^{1,2}, 范永春^{1,2}, 赵呈雷^{1,2*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028

摘要:目的 探讨巴戟天 *Morinda officinalis* 中环烯醚萜类部位对衰老性肌少症的治疗作用及机制。方法 以水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸为指标, 考察不同体积分数乙醇对巴戟天中环烯醚萜类部位加热回流提取效率的影响, 提取液经减压浓缩后, 采用大孔吸附树脂富集纯化, 获得总环烯醚萜类部位。通过比较不同极性洗脱溶剂的洗脱效果, 优化纯化工艺参数, 建立并验证高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析方法后, 对有效部位中主要环烯醚萜类成分进行含量测定, 所得纯化部位用于后续药效学评价。利用 C2C12 细胞分化模型及 D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) 诱导的 C2C12 肌管细胞萎缩模型, 以肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MYHC) 蛋白表达为指标, 评价环烯醚萜类部位促进肌管分化及改善 C2C12 细胞肌管萎缩的作用。采用 D-gal 诱导的小鼠加速衰老模型, 测量小鼠拉力及后肢肌肉质量, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察胫骨前肌及腓肠肌病理变化, 研究环烯醚萜类部位的治疗效果。利用转录组测序对各组小鼠腓肠肌进行差异基因分析, 并综合网络药理学分析提示, 进一步通过 Western blotting 及 qRT-PCR 验证转录组测序结果中相关差异基因表达变化。**结果** 60%乙醇加热回流提取巴戟天, 环烯醚萜类部位含量最高。纯化工艺中, H103 大孔吸附树脂吸附性能最佳, 且以水为洗脱溶剂时目标成分洗脱率最高。巴戟天环烯醚萜类部位能显著改善 D-gal 诱导的 C2C12 细胞萎缩 ($P < 0.001$), 并促进肌管细胞分化 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。环烯醚萜类部位可显著提高加速衰老小鼠的四肢拉力和后肢肌肉质量与体质量比值 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 显著增加衰老小鼠胫骨前肌和腓肠肌肌肉横截面积 ($P < 0.01$ 、 0.001), 进而改善衰老相关的肌少症表型。进一步机制研究发现, 环烯醚萜类部位可上调磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路关键蛋白的表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 并显著上调磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit α , PIK3CA)、丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine kinase 1, AKT1)、mTOR 基因表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且 PI3K 抑制剂 LY294002 显著抑制环烯醚萜类部位对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达的上调作用 ($P < 0.05$)。**结论** 巴戟天中环烯醚萜类部位可显著改善衰老引起的肌少症, 其作用机制与调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。

关键词: 肌少症; 巴戟天; 环烯醚萜类; 衰老; PI3K/Akt/mTOR 信号通路; 水晶兰苷; 去乙酰基车叶草苷酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)16-6385-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.16.014

Effect and mechanism of *Morinda officinalis* iridoid fraction in treatment of aging-related sarcopenia based on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

WANG Xinying¹, HE Jingjing¹, LIAN Xiaodi¹, LI Hui^{1,2}, CAI Xueting^{1,2}, LI Yao^{1,2}, FAN Yongchun^{1,2}, ZHAO Chenglei^{1,2}

1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

收稿日期: 2026-02-14

基金项目: 江苏省医院中药制剂融合创新中心项目 (2024YYZYJRCZX); 江苏省老年健康项目 (LKM2025007); 南京中医药大学自然科学基金重点项目 (2025039)

作者简介: 王馨莹, 硕士研究生, 研究方向为中药效应与安全评价方法。E-mail: 972074103@qq.com

*通信作者: 赵呈雷, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药药理与新产品开发研究。E-mail: zhaocl292@163.com

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of iridoid fraction from *Morinda officinalis* on aging-related sarcopenia. **Methods** Using monotropein and deacetylasperulosidic acid as analytical markers, effects of different ethanol concentrations on extraction efficiency of active iridoids fraction from *M. officinalis* via heated reflux extraction was investigated. The extract was concentrated under reduced pressure and subsequently enriched and purified using macroporous adsorption resin to obtain the total active iridoid fraction. By comparing the elution efficiencies of solvents with varying polarities, purification parameters were optimized. Following the establishment and validation of a high performance liquid chromatography (HPLC) analytical method, the content of major iridoid components in active fraction was quantified. The purified fraction was then used for subsequent pharmacodynamic evaluations. The C2C12 cell differentiation model and a *D*-galactose (*D*-gal)-induced C2C12 myotube atrophy model were employed to assess the effects of iridoid fraction on promoting myotube differentiation and ameliorating myotube atrophy, with MYHC protein expression serving as the indicator. A *D*-gal-induced accelerated aging mouse model was utilized to evaluate the therapeutic effects of iridoid fraction through grip strength tests, hindlimb muscle mass measurements, and hematoxylin-eosin (HE) staining of tibialis anterior and gastrocnemius muscles. Differentially expressed genes in gastrocnemius muscle of mice in each group was analyzed by transcriptome sequencing, and the results were further verified by Western blotting and qRT-PCR for the expression changes of related differentially expressed genes indicated by transcriptome sequencing, in combination with network pharmacology analysis. **Results** The extraction of iridoid components from *M. officinalis* was optimized using a 60% ethanol solution under heated reflux conditions, resulting in the highest iridoid content. In the purification process, H103 macroporous adsorption resin demonstrated superior adsorption performance, with water as the eluent resulting in the highest elution rate of target constituents. The iridoid fraction from *M. officinalis* significantly ameliorated *D*-gal-induced atrophy in C2C12 myotubes ($P < 0.001$), and promoted myotube differentiation ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The iridoid fraction could significantly enhance the limb pulling force and ratio of hind limb muscle mass to body mass of accelerated aging mice ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), significantly increase the cross-sectional area of the tibialis anterior muscle and gastrocnemius muscle in aging mice ($P < 0.01, 0.001$), thereby improving the phenotype of age-related sarcopenia. Further mechanism studies revealed that iridoid fraction could up-regulate the expression levels of key proteins in phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and significantly up-regulate the expression levels of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*), serine/threonine kinase 1 (*AKT1*) and *mTOR* genes ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). And PI3K inhibitor LY294002 significantly inhibited the upregulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway related protein expressions by iridoid fraction ($P < 0.05$). **Conclusion** The iridoid fraction of *M. officinalis* can significantly improve sarcopenia caused by aging, and its mechanism is related to the regulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

Key words: sarcopenia; *Morinda officinalis* How; iridoids; aging; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; monotropein; deacetylasperulosidic acid

肌少症是一种与年龄相关的肌肉量减少以及肌肉力量和功能下降的疾病^[1]。有研究表明 30 岁后人体肌肉会因为老化而逐渐流失,目前,男性肌少症的患病率高于女性,且随着年龄增加肌少症的患病率显著增加^[2]。肌少症是导致老年人失能的重要诱因,肌少症导致跌倒风险增加 3 倍、髋部骨折后 1 年内死亡率达到 20%、重度患者失能风险升高 40%、全因死亡率提高 50%,已成为老龄化社会的重大健康挑战^[3]。磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)是一组参与细胞生长、增殖、分化等功能的酶^[4],PI3K/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路参与若干重要细胞过程的调控包括骨肌中的凋亡、增殖和代谢。研究表明,激活 PI3K/Akt/mTOR

通路可以诱导肌肉肥大并阻止骨骼肌萎缩^[5]。PI3K 及其主要下游效应因子 Akt 和 mTOR 的激活,是驱动骨骼肌增殖、分化以及蛋白质合成等合成代谢过程的必要条件。其中,通过启动 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,可以促进肌肉蛋白质合成^[6],并抑制肌肉的蛋白质降解。

中医并无“肌少症”这一病名记载,根据其四肢痿软乏力、疲乏萎靡、不耐活动、困倦纳差等临床表现,可将其归属为“痿证”“肉痿”“虚劳”等范畴^[7],其病位在于肌肉,病性以脾肾两虚为主^[8]。巴戟天 *Morindae Officinalis Radix* 是我国传统四大南药之一,具有补肾阳、强筋骨的功效。《本草新编》中记载,巴戟天温而不热,健脾开胃,这与肌少症属脾肾衰败相吻合。巴戟天中环烯醚萜苷类成分的含量较高^[9],并且巴戟天具有抗炎、抗疲劳、抗衰

老、抗氧化、调节免疫和抗病毒等药用活性^[10-13]。目前关于巴戟天的研究报道主要集中在化学成分、药理作用和成分提取等方面,而巴戟天环烯醚萜类有效部位在肌少症治疗中的作用尚不清楚。本研究旨在分离巴戟天环烯醚萜类有效部位,研究其对衰老相关性肌少症的治疗作用,并探讨其通过 PI3K/Akt 信号通路治疗肌少症的作用机制,以期为巴戟天治疗肌少症的临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

小鼠成肌细胞株 C2C12 (货号 SCSP-505) 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,8 周龄 10 只,12 周龄 40 只,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,生产许可证号 SCXK (苏) 2023-0009。动物饲养于室温 20~25 °C、室内照明以自然采光为主的环境中,通风良好,环境较安静。动物实验经江苏省中医药研究院动物伦理委员会批准 (伦理批准号 AEW-20250219-488)。

1.3 药材

巴戟天饮片购自江苏紫石中药饮片有限公司,经江苏省中医药研究院李振麟副研究员鉴定为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥根。

1.4 药品与试剂

CCK-8 试剂盒 (批号 20241028) 购自苏州新赛美生物科技有限公司;苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒 (批号 Z885241022)、DEPC 水 (批号 031124240527) 购自上海碧云天生物有限公司;D-半乳糖 (D-galactose, D-gal, 批号 D161S235152)、AB-8 大孔树脂 (批号 JS237793)、D101 大孔树脂 (批号 JS239566)、H103 大孔树脂 (批号 KS356115) 购自上海源叶生物科技有限公司;PI3K 抑制剂 LY294002 (批号 258335)、PI3K 激活剂 740Y-P (批号 229608) 购自上海陶术生物科技股份有限公司;HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (批号 7E760L3)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (批号 7E1290H4) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;肌球蛋白重链 (myosin heavy chain, MYHC) 抗体 (批号 9/26/24) 购自美国 DSHB 公司; β -tubulin 抗体 (批号 AA0119J1909N0064) 购自南京巴傲得生物科技股份有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 29)、

HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (批号 36)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 16)、Akt 抗体 (批号 28)、p-Akt 抗体 (批号 25)、PI3K p85 抗体 (批号 7)、p-PI3K 抗体 (批号 7)、mTOR 抗体 (批号 21)、p-mTOR 抗体 (批号 12) 购自美国 CST 公司;FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号 WF9404030)、曲拉通 X-100 (批号 C16220419) 购自上海翌圣生物有限公司;对照品水晶兰苷 (质量分数 $\geq 98\%$,批号 WP25051909)、去乙酰基车叶草苷酸 (质量分数 $\geq 98\%$,批号 WP24072610) 购自四川省维克奇生物科技有限公司。

1.5 仪器

Varioskan flash 型酶标仪、QuantStudio™ 5 型 qRT-PCR 仪 (美国 Thermo 公司);5417R 型低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司);JIMBioFIL 型全自动细胞计数仪 (江苏卓微生物科技有限公司);Nikon AX/AX R with NSPARC 型激光共聚焦超分辨率显微镜 (日本 Nikon 公司);Waters XBridge® Peptide BEH 型 C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 10 μ m)、Waters Alliance® 2695 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司);M7 型双光束紫外-可见分光光度计 (上海美谱达仪器有限公司)。

2 方法

2.1 巴戟天环烯醚萜类部位的制备

2.1.1 巴戟天醇提物的制备 取巴戟天药材粉碎,分别用 60%、70%、80%乙醇进行加热回流提取,每次 1 h,共提取 2 次。合并 2 次滤液,减压浓缩至 1 g/mL。采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 对不同体积分数的巴戟天醇提物中环烯醚萜类成分的含量进行测定。

2.1.2 大孔树脂富集环烯醚萜类部位 树脂经标准预处理后,进行湿法装柱。将巴戟天醇提物上样 (液面高于树脂床层 2 cm),静置吸附 2 h。依次采用 3 倍柱体积 (bed volume, BV) 的双蒸水及 10%、30%、50%、70%乙醇进行梯度洗脱,收集各洗脱液,减压浓缩至终体积为 1 BV 后,采用 HPLC 对不同洗脱液中环烯醚萜类成分的含量进行测定,并采用紫外分光光度法 (ultraviolet spectrophotometry, UV) 测定水洗脱液中总环烯醚萜类成分的含量。

2.1.3 不同大孔树脂 (AB-8、D101、H103 大孔树脂) 对巴戟天环烯醚萜类成分吸附能力的比较 称取干燥大孔树脂,加入 95% 无水乙醇浸泡 24 h,液

面没过树脂。湿法装柱后用蒸馏水洗脱至洗脱液无醇味后待用。称取预处理的树脂湿质量 5 g, 置于 50 mL 离心管中, 精密加入巴戟天醇提物 15 mL, 置于 25 °C 恒温振荡器上振荡 24 h, 取上清液进行 HPLC 测定, 并计算饱和吸附量 (Q_e)。

$$Q_e = [(C_0 - C_e) \times V] / m$$

C_0 为吸附前溶液中目标物的初始浓度, C_e 为吸附达到平衡时溶液中目标物的剩余浓度, V 为加入溶液体积, m 为树脂质量

2.2 HPLC 测定巴戟天醇提物及洗脱液中环烯醚萜类成分的含量

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸对照品 13.5、18.9 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 用色谱纯甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 制成水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸质量浓度分别为 1.35、1.89 mg/mL 的混合对照品储备液。取混合对照品储备液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 弃去初滤液, 取续滤液作为进样溶液。

2.2.2 色谱条件 Waters XBridge® Peptide BEH 型 C_{18} 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 10 μm), 流动相为 0.05% 甲酸水溶液 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱: 0~15 min, 97%~80% A; 15~45 min, 80% A; 45~50 min, 80%~60% A; 50~55 min, 60%~20% A; 55~60 min, 20%~10% A; 60~61 min, 10% A; 61 min, 10%~97% A。体积流量 1 mL/min; 进样量 2 μL。

2.2.3 专属性考察 分别取阴性对照溶液 (双蒸水)、混合对照品溶液及水洗脱液, 按“2.2.2”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 如图 1 所示, 阴性对

照溶液在目标峰位置处无干扰峰, 混合对照品溶液中各组峰与水洗脱液中待测成分峰的保留时间一致, 无杂峰重叠, 表明该方法具有良好的专属性。

2.2.4 线性关系考察 取混合对照品储备液, 分别进样 2、4、6、8、10、12 μL, 按“2.2.2”项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标 (y), 质量为横坐标 (x), 用最小二乘法进行线性回归, 得到水晶兰苷回归方程为 $y = 1681684.9571x - 806111.8667$, $r = 0.9998$; 去乙酰基车叶草苷酸回归方程为 $y = 3207295.3000x - 647034.6000$, $r = 0.9995$ 。表明该方法在线性范围内定量准确可靠。

2.2.5 精密度试验 取巴戟天 60% 乙醇提取物, 按“2.2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积并计算峰面积的 RSD 值。结果显示, 巴戟天 60% 乙醇提取物中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸峰面积的 RSD 分别为 1.11%、1.38%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取巴戟天 60% 乙醇提取物, 按“2.2.2”项下色谱条件分别在 0、1、2、4、6、8 h 进样, 记录峰面积并计算 RSD 值。结果显示, 巴戟天 60% 乙醇提取物中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸峰面积的 RSD 分别为 3.2%、3.3%。表明巴戟天 60% 乙醇提取物在 8 h 内稳定性良好, 能够满足整个分析测试过程的需要。

2.2.7 重复性试验 取巴戟天 60% 乙醇提取物 6 份, 按“2.2.2”项下色谱条件进样, 记录峰面积并计算 RSD 值。结果显示, 巴戟天 60% 乙醇提取物中水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸峰面积的 RSD 值分别为 3.02%、3.08%。表明该方法重复性良好, 分析结果可靠。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量 (水晶兰苷质量浓度为 4.77 mg/mL、去乙酰基车叶草苷酸质量浓度为 1.80 mg/mL) 的巴戟天 60% 乙醇提取物 6 份, 稀释 4 倍。每份准确量取 1 mL, 6 份溶液中分别加入 2.14 mg/mL 水晶兰苷对照品溶液 0.5 mL、0.675 mg/mL 去乙酰基车叶草苷酸对照品溶液 0.5 mL, 制成加样供试品溶液。取加样供试品溶液 2 μL, 按“2.2.2”项下色谱条件进样, 结果显示, 水晶兰苷的加样回收率为 95%~98%, 其峰面积的 RSD 值为 2.3%; 去乙酰基车叶草苷酸的加样回收率为 96%~101%, 其峰面积的 RSD 值为 1.8%, 表明该方法准确度良好。

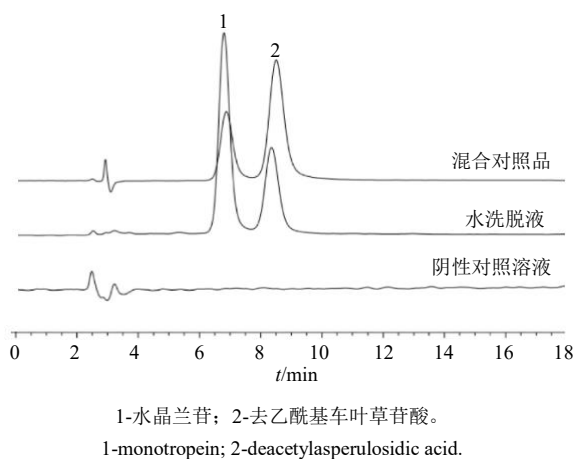


图 1 混合对照品、水洗脱液及阴性对照溶液的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference standard, water elution solution and negative control solution

2.3 UV 法测定巴戟天水洗脱液中总环烯醚萜类成分含量

精密量取适量巴戟天水洗脱液, 置蒸发皿中, 于 100 °C 水浴蒸干, 再移入 105 °C 烘箱中干燥 3 h, 直至残留固体达到恒定质量。取出后置于干燥器中冷却至室温, 称定固形物质量。采用 UV 法, 以对二甲氨基苯甲醛-冰醋酸为显色体系^[14], 以水晶兰苷为对照品, 在 620 nm 处测定吸光度 (A) 值, 计算巴戟天水洗脱液中总环烯醚萜类成分含量。

2.4 体外实验

2.4.1 巴戟天环烯醚萜类部位和 D -gal 对 C2C12 细胞活力的影响 C2C12 细胞以 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 分别加入不同质量浓度 (0.5、16.0、32.0、64.0、128.0、256.0、512.0、1 024.0、2 048.0 $\mu\text{g/mL}$) 的环烯醚萜类部位或不同质量浓度 (10、20、30、40、50、60、70、80、90 mg/mL) 的 D -gal, 对照组加入不含药物的培养基。孵育 24 h 后, 避光加入 CCK-8 试剂, 在 37 °C、5% CO_2 条件下孵育 30 min, 采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值。

2.4.2 C2C12 细胞分化 C2C12 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 24 孔板, 细胞密度为 80%~90% 时, 弃去含胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的完全培养基, 更换为含 2% 马血清 (horse serum, HS) 的 DMEM 完全培养基。每 24 小时换液 1 次, 诱导分化 8 d。分化后的肌管细胞, 细胞核为多核呈串珠样排列。在诱导细胞分化的同时加入 20 mg/mL 的 D -gal 培养 48 h, 以促进肌管萎缩。

2.4.3 HE 染色观察 C2C12 细胞肌管形成 设置对照组、水洗脱组、10% 乙醇洗脱组和 30% 乙醇洗脱组, 对照组加入不含洗脱液的培养基, 水洗脱组、10% 乙醇洗脱组和 30% 乙醇洗脱组分别加入 10 μL 洗脱液, 连续处理 8 d。设置对照组和环烯醚萜类部位组, 对照组加入不含药物的培养基, 环烯醚萜类部位组加入不同质量浓度 (0.012 5、0.025 0、0.050 0、0.100 0、0.200 0 $\mu\text{g/mL}$) 的环烯醚萜类部位, 连续处理 8 d。设置对照组、模型组和环烯醚萜类部位组, 对照组加入不含药物的培养基, 模型组和环烯醚萜类部位组按“2.4.2”项下方法促进细胞分化, 环烯醚萜类部位组加入不同质量浓度 (0.012 5、0.025 0、0.050 0、0.100 0、0.200 0 $\mu\text{g/mL}$) 的环烯醚萜类部位连续处理 8 d。经 4% 多聚甲醛固定, 双蒸水清洗细胞, 0.1% 曲拉通-100 破膜, 避光加入苏木素染色液染色, 充分洗去多余染液, 以免假阳性

影响染色效果。伊红染色液染色 1 min, 70% 乙醇清洗 2 次, 最后保存在双蒸水中, 于显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件测量细胞直径。

2.4.4 免疫荧光染色检测 MYHC 表达 C2C12 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 24 孔板中细胞爬片, 设置对照组、模型组和环烯醚萜类部位组, 对照组加入不含药物的培养基, 模型组和环烯醚萜类部位组按“2.4.2”项下方法促进细胞分化, 环烯醚萜类部位组加入不同质量浓度 (0.025、0.050、0.100、0.200 $\mu\text{g/mL}$) 的环烯醚萜类部位连续处理 8 d。弃去培养基, 加入 PBS 清洗细胞, 经 4% 多聚甲醛溶液固定、0.1% 曲拉通-100 破膜、5% 牛血清白蛋白封闭后, 加入 MYHC 抗体, 4 °C 孵育过夜; 加入 FITC 标记的荧光二抗, 室温摇床上避光孵育 2 h, 加入 DAPI 于室温避光孵育, 固定爬片, 室温避光晾干, 使用共聚焦荧光显微镜观察并拍照。

2.4.5 Western blotting 检测 MYHC 蛋白表达 C2C12 细胞以 8×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 设置对照组、模型组和环烯醚萜类部位组, 对照组加入不含药物的培养基, 模型组和环烯醚萜类部位组按“2.4.2”项下方法促进细胞分化, 环烯醚萜类部位组加入不同质量浓度 (0.05、0.10、0.20 $\mu\text{g/mL}$) 的环烯醚萜类部位孵育 24 h。弃去培养基, 收集细胞, 加入裂解液提取蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后, 加入 MYHC 抗体, 4 °C 孵育过夜; TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 加入二抗, 室温孵育 1.5 h; TBST 清洗 3 次, 加入显影液, 使用超灵敏多功能成像仪进行曝光, 存储图片, 用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.5 体内实验

2.5.1 动物分组、造模与给药 取 8 周龄 C57BL/6J 小鼠 10 只作为对照组, 12 周龄 C57BL/6J 小鼠随机分为模型组和环烯醚萜类部位高、中、低剂量 (80、60、40 mg/kg) ^[15] 组, 每组 10 只。 D -gal 用生理盐水配制成 20 mg/mL 的溶液, 对照组 ip 0.1 mL 生理盐水, 其余小鼠 ip 0.1 mL D -gal 溶液 (200 mg/kg), 1 次/d, 连续造模 70 d。造模同时, 各给药组 ig 质量浓度分别为 10.0、7.5、5.0 mg/mL 的环烯醚萜类部位溶液, 1 次/d, 连续给药 70 d。

2.5.2 小鼠四肢拉力测量 造模前和造模给药后每 7 天使用小鼠拉力仪测量 1 次小鼠四肢拉力, 记录抓力仪上显示最大瞬时抓力值。每只小鼠重复测

量 3 次, 每次测量间隔 3 min。记录 3 次测量结果, 并计算其平均值作为该次测量的最终抓力值。

2.5.3 腓肠肌和胫骨前肌 HE 染色 给药结束后, 颈椎脱臼法处死小鼠, 分离双侧腓肠肌和胫骨前肌, 称定质量后, 于 4% 多聚甲醛溶液中固定 72 h, 脱水后包埋在石蜡中, 切成 5 μm 薄片, 脱蜡进行 HE 染色。装片后, 于显微镜下观察并拍照。

2.5.4 转录组测序 取对照组、模型组和环烯醚萜类部位高剂量组小鼠腓肠肌, 迅速置于液氮中冷冻, 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。提取总 RNA, 经琼脂糖凝胶电泳、超微量分光光度计及 Agilent 2100 型生物分析仪检测。使用 Illumina NEBNext[®] Ultra[™] 试剂盒构建文库。文库经 Qubit[™] 荧光定量仪、Agilent 2100 型生物分析仪检测插入片段大小及 qRT-PCR 准确定量 (有效浓度 $>2\text{ nmol/L}$) 合格后, 利用 Illumina 平台上机测序, 采用边合成边测序技术, 生成 150 bp 双端测序数据。

2.6 网络药理学靶点预测

2.6.1 巴戟天活性成分的筛选 采用 TCMSP 数据库 (<https://tcmspw.com>) 输入关键词“巴戟天”, 进行检索, 设置口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 进行筛选, 并通过文献检索收集巴戟天活性成分信息, 整理数据, 删除重复和结构不明的成分。检索 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行蛋白质功能查询, 整理人源成分, 将活性成分转化成蛋白质靶点名称, 这些靶点可被认为是巴戟天活性成分的潜在作用靶点。

2.6.2 肌少症基因靶点的收集 检索 DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)、TTD 数据库 (<https://db.idrblab.net/ttd/>), 以“sarcopenia”为关键词检索疾病相关潜在作用靶点。

2.6.3 巴戟天活性成分-肌少症潜在基因靶点网络构建 将药物潜在作用靶点和肌少症疾病靶点输入韦恩图网站 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 获得药物与疾病交集的靶点, 导入 Cytoscape 3.10.1 软件构建药物-活性成分-疾病靶点网络模型, 再将交集靶点导入 String 数据库 (<https://www.string-db.org/>), 设定物种为人, 筛选出结合评分 ≥ 0.7 的靶点, 将其导入 Cytoscape 软件中得到蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein

interaction, PPI) 可视化网络; 将度值排名前 10 的靶点筛选出来, 绘制关键靶点的可视化网络图。

2.6.4 实验验证

(1) Western blotting 检测 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达: C2C12 细胞以 8×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 设置对照组、模型组和环烯醚萜类部位组, 对照组加入不含药物的培养基, 模型组和环烯醚萜类部位组按“2.4.2”项下方法促进细胞分化, 环烯醚萜类部位组加入不同质量浓度 (0.05、0.10、0.20 $\mu\text{g/mL}$) 的环烯醚萜类部位连续处理 8 d。弃去培养基, 收集细胞, 按“2.4.5”项下方法检测 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达。

为进一步探究环烯醚萜类部位对 PI3K/Akt 通路的影响, 设置对照组、模型组、PI3K 抑制剂 LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$) 组、PI3K 激动剂 740Y-P (10 $\mu\text{mol/L}$) 组、环烯醚萜类部位 (0.2 $\mu\text{g/mL}$) 组和 LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$) + 环烯醚萜类部位 (0.2 $\mu\text{g/mL}$) 组, 对照组加入不含药物的培养基, 其余各组按“2.4.2”项下方法促进细胞分化, 环烯醚萜类部位组连续给药处理 8 d; 抑制剂组和激动剂组于第 8 天分别加入相应药物处理 24 h。弃去培养基, 收集细胞, 按“2.4.5”项下方法检测 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达。

(2) qRT-PCR 检测 PI3K/Akt/mTOR 通路相关基因表达: C2C12 细胞以 8×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 设置对照组、模型组和环烯醚萜类部位组, 对照组加入不含药物的培养基, 模型组和环烯醚萜类部位组按“2.4.2”项下方法促进细胞分化, 环烯醚萜类部位组加入不同质量浓度 (0.05、0.10、0.20 $\mu\text{g/mL}$) 的环烯醚萜类部位连续处理 8 d。弃去培养基, 收集细胞, 采用 Trizol 试剂提取总 RNA, 经逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 使用针对磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3 激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, *PIK3CA*)、丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine kinase 1, *AKT1*)、*mTOR* 及内参基因 β -actin 特异性引物与 SYBR Green 预混液, 在 qRT-PCR 分析仪上进行扩增, 循环结束后通过熔解曲线验证产物特异性。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目标基因的相对表达量。引物序列见表 1。

2.7 统计学分析

使用 GraphPad Prism 10.5.0 软件对数据进行统计分析, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行组间比较。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>PIK3CA</i>	F: CACCTGAACAGACAAGTAGAGGC R: GCAAAGCATCCATGAAGTCTGGC
<i>AKT1</i>	F: GGACTACTTGCACTCCGAGAAG R: CATAGTGGCACCCTCCTTGATC
<i>mTOR</i>	F: AGAAGGGTCTCCAAGGACGACT R: GCAGGACACAAAGGCAGCATTG
<i>β-actin</i>	F: CACCATTGGCAATGAGCGGTTT R: AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT

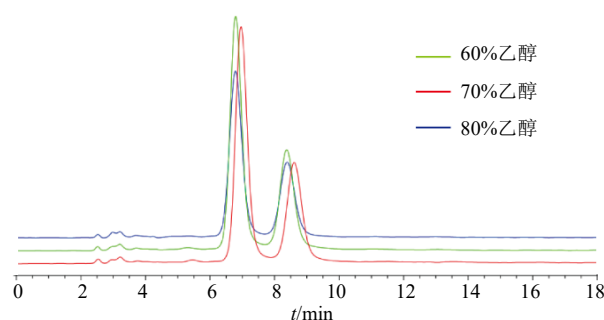
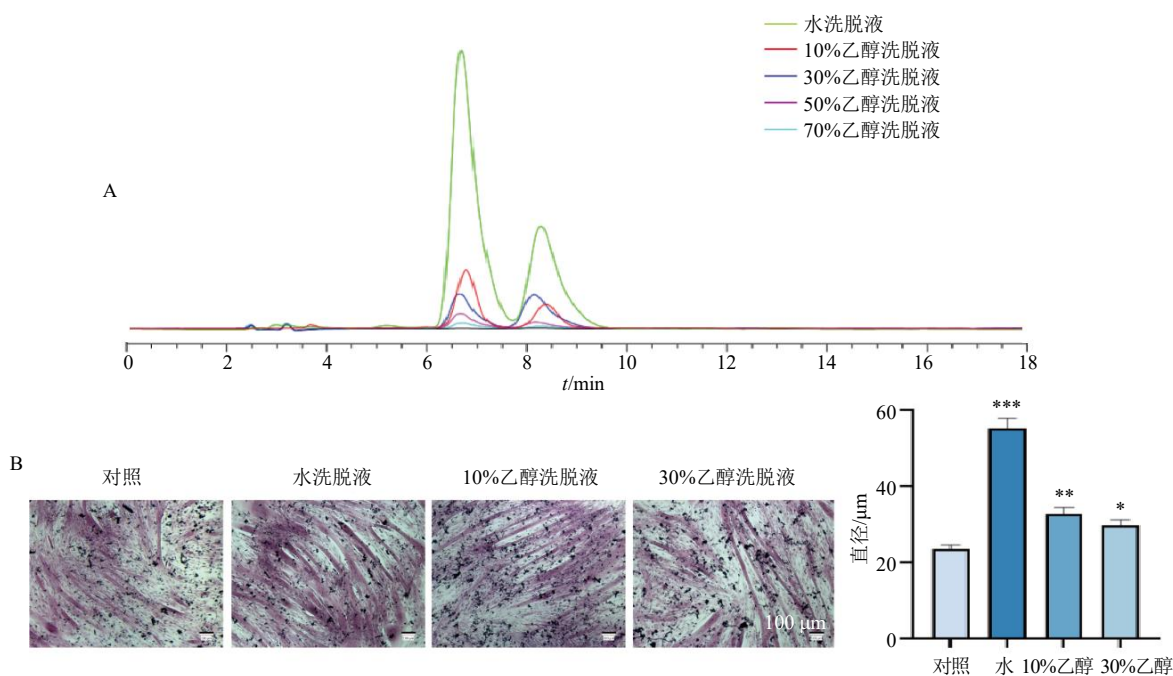
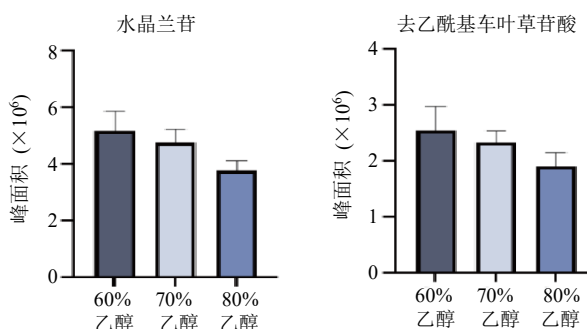


图 2 不同体积分数的巴戟天醇提物中环烯醚萜类成分的含量比较

Fig. 2 Comparison of iridoids content in ethanolic extracts of *M. officinalis* with different volume fractions



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 3 不同洗脱液中环烯醚萜类成分的含量比较 (A) 及对 C2C12 细胞肌管形成的影响 (B, ×100) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 3 Comparison of content of iridoid compounds in different eluents (A) and their effects on myotube formation in C2C12 cells (B, ×100) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

基车叶草苷酸的含量高于 10%乙醇、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇洗脱液。HPLC 测定巴戟天水洗脱液中水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸质量浓度分别为 3.03、1.42 mg/mL, UV 法测定巴戟天水洗脱液中总环烯醚萜类成分质量分数为 78.5%。如图 3-B 所示, 与对照组比较, 水洗脱液、10%乙醇洗脱液和 30%乙醇洗脱液均显著促进 C2C12 细胞肌管形成 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 其中水洗脱液促进 C2C12 细胞肌管形成作用最佳。

3.3 不同大孔树脂对巴戟天环烯醚萜类成分吸附能力的比较

不同大孔树脂对巴戟天环烯醚萜类成分吸附能力见表 2。结果显示, H103 大孔树脂对水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸具有较好的吸附能力, 且吸附能力为 3 种树脂中最优, 对水晶兰苷和去乙酰基车叶草苷酸的饱和吸附量分别为 29.7、13.4 mg/g, 表明 H103 大孔树脂对环烯醚萜类成分具有高效的富集与分离能力, 适用于从巴戟天中提取纯化环烯

表 2 不同大孔树脂对巴戟天环烯醚萜类成分吸附能力的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Comparison of adsorption capacities of different macroporous resins for iridoid components in *M. officinalis* ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

大孔树脂	饱和吸附量/(mg·g ⁻¹)	
	水晶兰苷	去乙酰基车叶草苷酸
AB-8	13.3±0.3	5.4±0.2
D101	17.2±0.3	6.1±0.2
H103	29.7±0.9	13.4±0.5

醚萜类成分。

3.4 环烯醚萜类部位及 D-gal 对 C2C12 细胞活力的影响

如图 4 所示, 64.0~2 048.0 μg/mL 环烯醚萜类部位显著抑制 C2C12 细胞增殖 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 0.5~32.0 μg/mL 环烯醚萜类部位对 C2C12 细胞活力无明显影响。30~90 mg/mL D-gal 显著抑制 C2C12 细胞增殖 ($P<0.001$), 10~20 mg/mL D-gal 对 C2C12 细胞活力无明显影响。

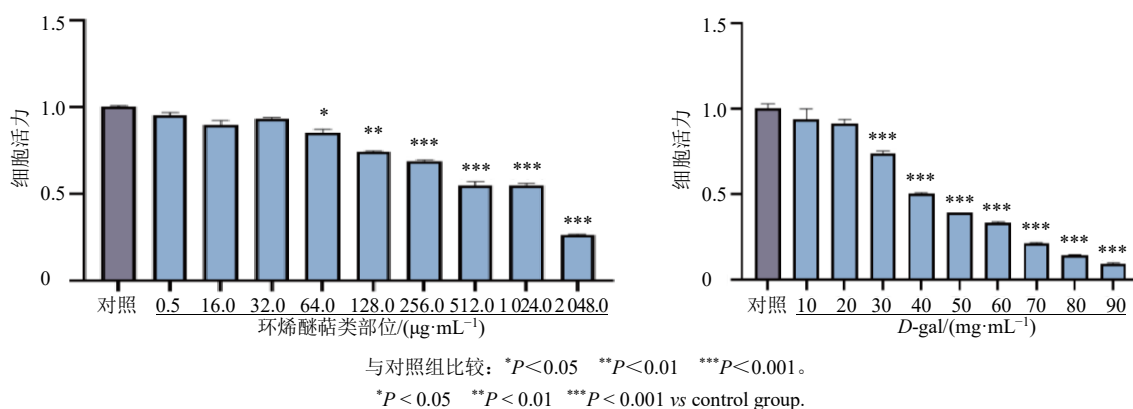


图 4 环烯醚萜类部位及 D-gal 对 C2C12 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effect of iridoid fraction and D-gal on viability of C2C12 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

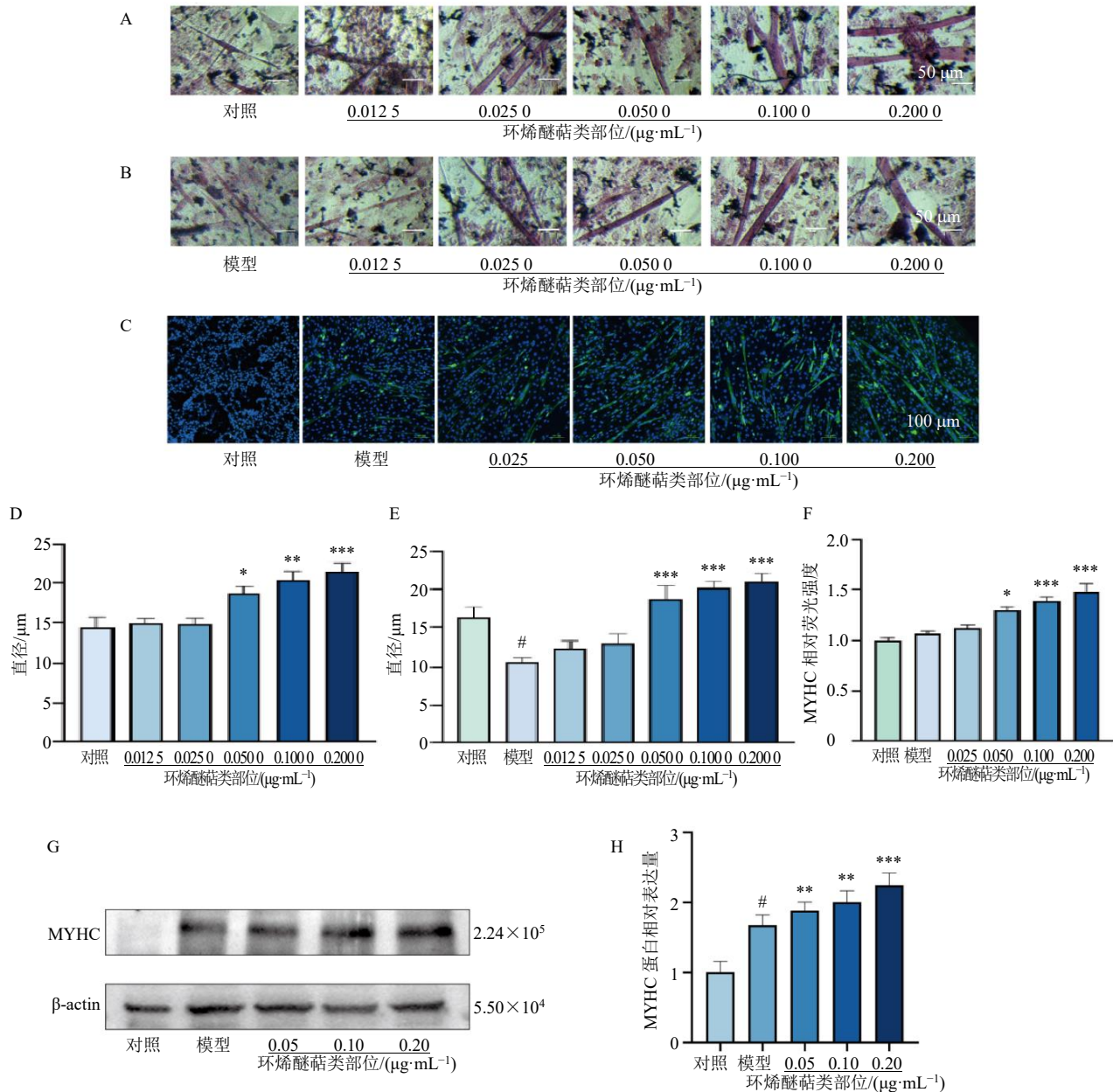
3.5 环烯醚萜类部位促进 C2C12 细胞分化

如图 5-A、B、D、E 所示, 0.05~0.20 μg/mL 环烯醚萜类部位显著促进 C2C12 细胞分化 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 并且可以有效改善 D-gal 引起的肌管萎缩 ($P<0.001$), 表明环烯醚萜类部位具有促进 C2C12 成肌细胞分化为肌管细胞的能力, 且呈剂量相关性。如图 5-C、F 所示, 0.05~0.20 μg/mL 环烯醚萜类部位显著升高 MYHC 的荧光强度 ($P<0.05$ 、 0.001), 且细胞由单核细胞分化为多核肌管细胞, 表明环烯醚萜类部位能促进 C2C12 细胞分化为肌管细胞。如图 5-G、H 所示, 与模型组比较, 0.05~0.20 μg/mL 环烯醚萜类部位显著上调 MYHC 蛋白

表达 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 表明环烯醚萜类部位可显著促进 C2C12 细胞分化。

3.6 环烯醚萜类部位对衰老小鼠四肢拉力、肌肉质量及肌纤维横截面积的影响

如图 6-A 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠四肢拉力显著降低 ($P<0.001$); 与模型组比较, 各给药组小鼠四肢拉力均显著增加 ($P<0.05$ 、 0.001), 表明环烯醚萜类部位可有效改善 D-gal 引起的小鼠四肢拉力下降。如图 6-B 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠后肢肌肉质量与体质量比值显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 环烯醚萜类部位中、高剂量组小鼠后肢肌肉质量与体质量比值显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001)。HE



A、D-HE 染色考察环烯醚萜类部位对 C2C12 细胞分化的影响 (×200); B、E-HE 染色考察环烯醚萜类部位对 *D*-gal 诱导的 C2C12 细胞分化的影响 (×200); C、F-免疫荧光染色考察环烯醚萜类部位对 *D*-gal 诱导的 C2C12 细胞 MYHC 表达的影响 (×100); G、H-Western blotting 考察环烯醚萜类部位对 *D*-gal 诱导的 C2C12 细胞 MYHC 蛋白表达的影响; 与对照组比较: # $P < 0.05$ *** $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。

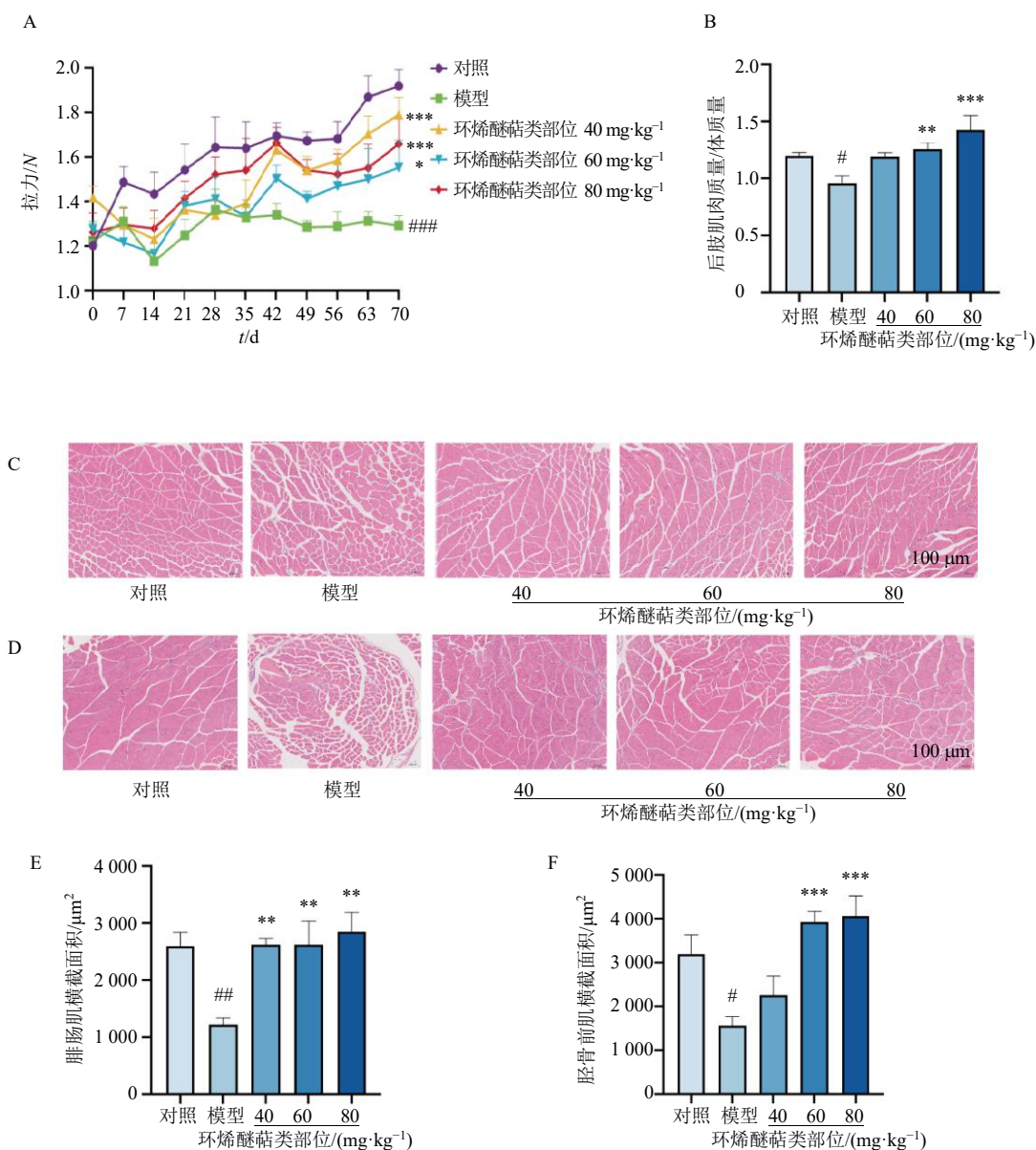
A, D-effect of iridoid fraction on C2C12 cell differentiation observed by HE staining (×200); B, E-effect of iridoid fraction on *D*-gal induced C2C12 cell differentiation observed by HE staining (×200); C, F-effect of iridoid fraction on expression of MYHC in C2C12 cells induced by *D*-gal observed by immunofluorescence staining (×100); G, H-effect of iridoid fraction on expression of MYHC protein in C2C12 cells induced by *D*-gal observed by Western blotting; # $P < 0.05$ *** $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 5 环烯醚萜类部位促进 C2C12 细胞分化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Iridoid fraction promotes C2C12 cell differentiation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

染色结果 (图 6-C~F) 显示, 与模型组比较, 环烯醚萜类部位各剂量组小鼠腓肠肌肌纤维横截面积显著增加 ($P < 0.01$), 环烯醚萜类部位中、高剂量组小鼠

胫骨前肌肌纤维横截面积显著增加 ($P < 0.001$)。以上结果表明, 环烯醚萜类部位可以增加肌纤维横截面积并且能够减少衰老所致的肌肉质量损失。



A-各组小鼠四肢拉力 ($n=10$); B-各组小鼠后肢肌肉质量与体质量比值 ($n=10$); C、D-各组小鼠腓肠肌和胫骨前肌 HE 染色 ($\times 200$); E、F-各组小鼠腓肠肌和胫骨前肌肌肉横截面积 ($n=6$)。

A-limb tension of mice in each group ($n=10$); B-ratio of hind limb muscle mass to body mass of mice in each group ($n=10$); C、D-HE staining of gastrocnemius and tibialis anterior muscles of mice in each group ($\times 200$); E、F-cross sectional area of gastrocnemius and tibialis anterior muscles of mice in each group ($n=6$).

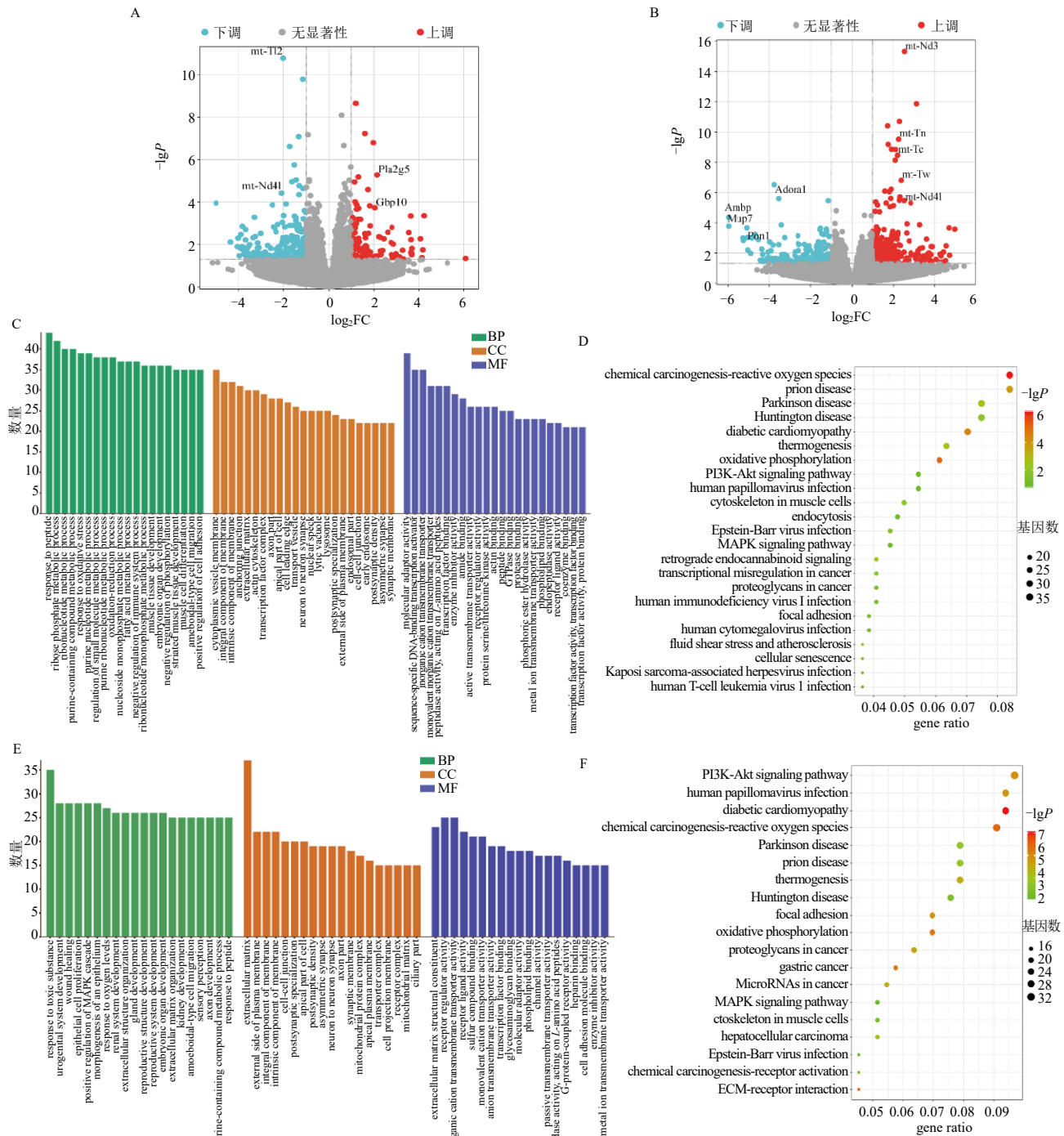
图 6 环烯醚萜类部位对衰老小鼠四肢拉力、肌肉质量及肌纤维横截面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 6 Effect of iridoid fraction on limb tension, muscle mass and muscle fiber cross-sectional area in aging mice ($\bar{x} \pm s$)

3.7 各组小鼠腓肠肌差异表达基因分析

如图 7-A 所示,相较于对照组,模型组共鉴定出 338 个差异表达基因,其中上调与下调基因分别为 109 和 229 个。如图 7-B 所示,与模型组相比,给予环烯醚萜类部位干预后,共鉴定出 452 个差异表达基因,其中上调 284 个,下调 168 个。表明对

照组与模型组之间、模型组与给药组之间均存在显著的基因表达差异,且各组在整体转录组水平上能够被明确区分。如图 7-C、D 所示,模型组与对照组的差异表达基因主要涉及氧化磷酸化等相关信号通路,模型组与给药组的差异表达基因主要与 PI3K/Akt 信号通路有关。



A-对照组 vs 模型组差异表达基因分析; B-模型组 vs 环烯醚萜类部位高剂量组差异表达基因分析; C-对照组 vs 模型组交集靶基因 GO 富集分析柱状图; D-对照组 vs 模型组交集靶基因 KEGG 富集分析气泡图; E-模型组 vs 环烯醚萜类部位高剂量组交集靶基因 GO 富集分析柱状图; F-模型组 vs 环烯醚萜类部位高剂量组交集靶基因 KEGG 富集分析气泡图。

A-differentially expressed genes analysis between control group and model group; B-differentially expressed genes analysis between model group and iridoid fraction high-dose group; C-bar chart for GO enrichment analysis of intersecting target genes between control group and model group; D-bubble plot for KEGG enrichment analysis of intersecting target genes between control group and model group; E-bar chart for GO enrichment analysis of intersecting target genes between model group and iridoid fraction high-dose group; F-bubble plot for KEGG enrichment analysis of intersecting target genes between model group and iridoid fraction high-dose group.

图 7 各组小鼠腓肠肌差异表达基因分析及差异表达基因的富集分析 ($n = 4$)

Fig. 7 Analysis of differentially expressed genes in gastrocnemius muscles of mice in each group and enrichment analysis of differentially expressed genes ($n = 4$)

3.8 网络药理学分析与实验验证

3.8.1 巴戟天活性成分的筛选 通过 TCMSP 和文献检索巴戟天活性成分, 根据 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 筛选得到 20 个巴戟天活性成分 (表 3)。

表 3 巴戟天活性成分

Table 3 Active ingredients of *M. officinalis*

MOLID	成分	OB%	DL
MOL002883	油酸乙酯	32.40	0.19
MOL009503	1-羟基-3-甲氧基蒽醌	104.33	0.21
MOL006147	2-甲氧基茜素	32.81	0.21
MOL009504	1-羟基-6-羟甲基蒽醌	81.77	0.21
MOL009558	5-羟基-2-(2-羟基苯甲酰基)-4-(羟甲基)苯甲酸-2-羟乙酯	62.32	0.26
MOL009519	(2R,3S)-(+)-3',5'-二羟基-4,7'-二甲氧基二氢黄酮醇	77.24	0.33
MOL009500	1,6-二羟基-5-甲氧基-2-(甲氧基甲基)-9,10-蒽醌	104.54	0.34
MOL009537	美洲商陆素 A	46.71	0.35
MOL009513	2-羟基-1,8-二甲氧基-7-甲氧基甲基蒽醌	112.30	0.37
MOL009495	2-羟基-1,5-二甲氧基-6-(甲氧基甲基)-9,10-蒽醌	95.85	0.37
MOL009496	1,5,7-三羟基-6-甲氧基-2-(甲氧基甲基)-9,10-蒽醌	80.42	0.38
MOL002879	1,5,7-三羟基-6-甲氧基-2-甲氧基甲基蒽醌	43.59	0.39
MOL001506	角鲨烯	33.55	0.42
MOL009524	3 β -羟基-5-豆甾烯-20(R)-醇	36.91	0.75
MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75
MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75
MOL009562	俄亥俄素 A	38.13	0.76
MOL009551	异去甲氧基镰叶芹醇	49.12	0.77
MOL009541	四乙酰基车叶草苷	45.47	0.82
MOL009525	24-丁基-5-胆甾烯-3 β -醇	35.35	0.82

3.8.2 巴戟天活性成分与肌少症疾病靶点 将 TCMSP 及 Uniprot 数据库的结果进行整理, 得到 68 个巴戟天活性成分的潜在靶点。在 OMIM、GeneCards、DisGeNET、TTD 数据库及相关文献进行肌少症疾病相关靶点的预测, 整理结果得到 2 202 个潜在疾病靶点。使用在线绘图工具将药物预测所得靶点与疾病对应靶点进行映射, 得到交集靶点 24 个。

3.8.3 PPI 网络分析 将疾病与活性成分的交集靶点导入 STRING 数据库, 采用 Cytoscape 软件构建 PPI 网络图。在该网络中, 度值越大、颜色越深, 表示蛋白之间的关联越密切。进一步分析发现, PPI 网络中存在 3 个核心节点, 分别为 AKT1、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1), 它们与转录组富集分析中显著富集的 PI3K/Akt 通路密切相关, 且共同指向以 AKT1 为中心的调控机制。AKT1 作为 PI3K 信号通路的关键枢纽, 在 PPI 网络里具有最高连接度, 该结果既明确了 AKT1 是多重上游信号汇聚的关键节点, 也从网络层面解释了转录组数据中该通路显著富集的原因。综上, 网络药理学和转录组数据相互支持, 共同提示 AKT1 以及其介导的 PI3K/Akt 通路可能是巴戟天治疗肌少症的核心靶点和关键信号途径。

3.8.4 环烯醚萜类部位对 D-gal 诱导的 C2C12 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达的影响 如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组 C2C12 细胞 p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白表达水平呈降低趋势;

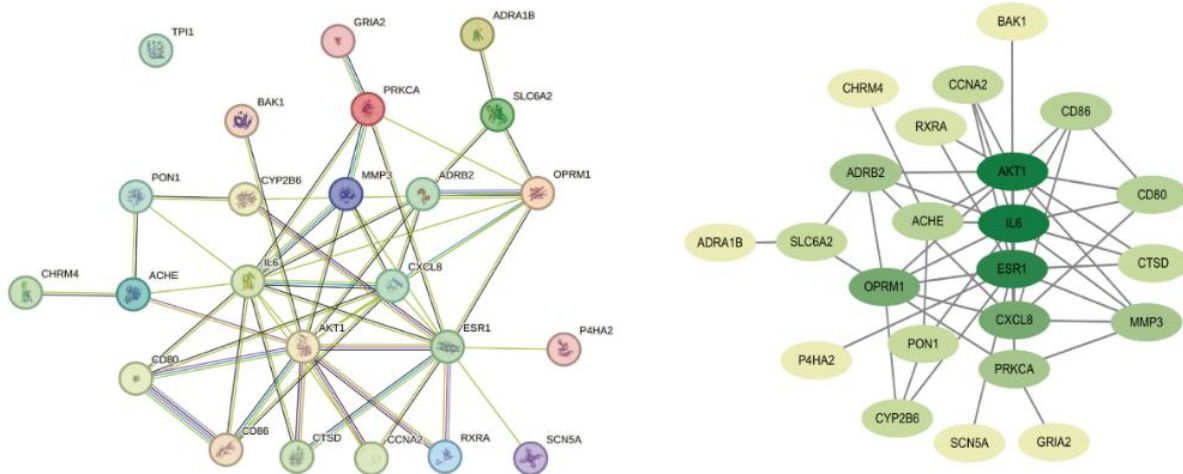


图 8 PPI 网络图

Fig. 8 PPI network

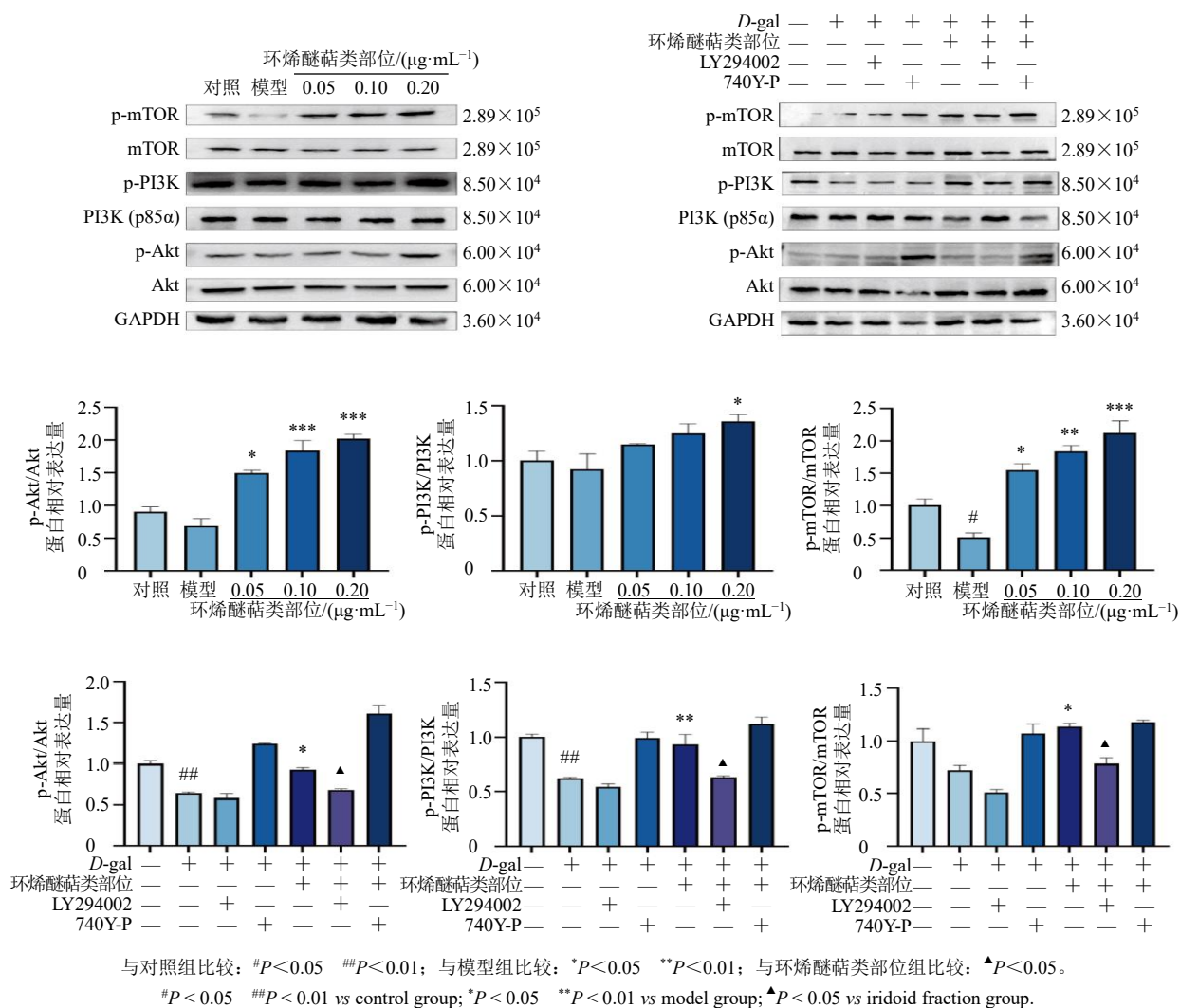


图9 环烯醚萜类部位对 D-gal 诱导的 C2C12 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of iridoid fraction on expressions of PI3K/Akt/mTOR pathway related proteins in D-gal induced C2C12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

与模型组比较, 0.05~0.20 $\mu\text{g/mL}$ 环烯醚萜类部位显著上调 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 0.20 $\mu\text{g/mL}$ 环烯醚萜类部位显著上调 p-PI3K/PI3K 蛋白表达 ($P < 0.05$)。进一步给予 PI3K 抑制剂 LY294002、PI3K 激动剂 740Y-P 探究环烯醚萜类部位对 D-gal 诱导的 C2C12 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达的影响, 结果显示, PI3K 抑制剂 LY294002 显著抑制环烯醚萜类部位对 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K、p-mTOR/mTOR 蛋白表达的上调作用 ($P < 0.05$)。此外, 环烯醚萜类部位联用 PI3K 激动剂后, p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平均进一步上调, 提示环烯醚萜类部位与 PI3K 激动剂之间可能存在协同增效作用。以上结果与转录组及网络药理学的结果

相一致, 表明巴戟天环烯醚萜类部位可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路, 改善衰老引起的肌少症。

3.8.5 环烯醚萜类部位对 D-gal 诱导的 C2C12 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路相关基因表达的影响 基于转录组 KEGG 通路富集结果, 环烯醚萜类有效部位干预后 PI3K/Akt 通路被显著富集。利用 qRT-PCR 技术对 PI3K/Akt 通路核心基因 (*PIK3CA*、*AKT1*、*mTOR*) 的表达进行定量检测。如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组 C2C12 细胞 *PIK3CA*、*mTOR* 基因表达水平显著降低 ($P < 0.05$), *AKT1* 基因表达水平呈降低趋势; 与模型组比较, 0.10、0.20 $\mu\text{g/mL}$ 环烯醚萜类部位显著上调 *AKT1*、*PIK3CA* 基因表达 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 0.20 $\mu\text{g/mL}$ 环烯醚萜类部位显著上调 *mTOR* 基因表达 ($P < 0.001$)。

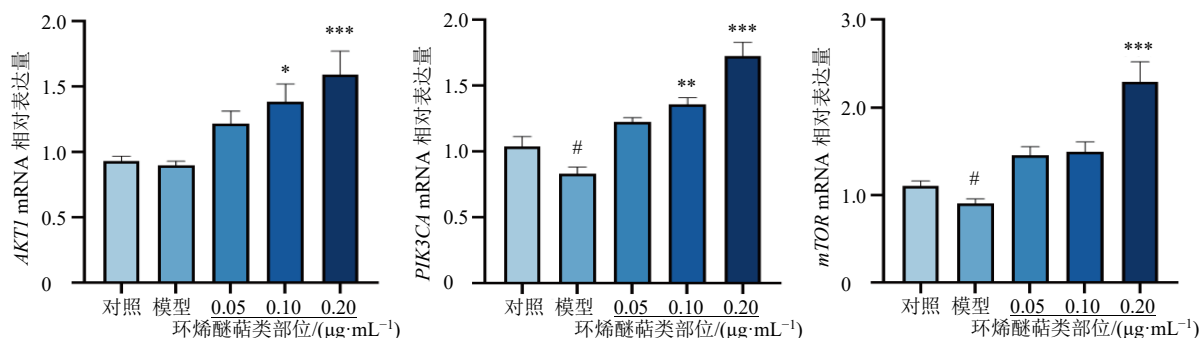


图 10 环烯醚萜类部位对 *D*-gal 诱导的 C2C12 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of iridoid fraction on expressions of PI3K/Akt/mTOR pathway related genes in *D*-gal induced C2C12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

肌少症是一种全身性的肌肉疾病，涉及肌肉质量减少、肌肉功能急速降低^[16]。临床数据证明肌少症长期以来一直与衰老和老年人有关^[17]，有研究表明，人类的骨骼肌质量在 20~90 岁减少 50%，肌肉力量在 30 岁达到峰值，50 岁以后每 10 年下降 15%，70 岁以后每 10 年下降 30%^[18]，全球目前约有 5 000 万人患有肌少症，预计在 2050 年患病人数可高达 5 亿^[19]。肌少症不仅降低了老年人的活动能力和生活质量，增加了跌倒及骨折的风险，也给社会带来了沉重负担。随着人口老龄化加剧，对于肌少症的关注逐渐增加，因此能有效治疗衰老引起的肌少症对提高老年人生活质量具有重要的意义。

肌少症目前缺乏获批的针对性药物，中医药干预而受到广泛关注。在中医治疗方面，中医学者认为肌肉的生长发育与脾胃的运化功能有密切的关系。汪涛等^[20]认为年老肾衰，脏腑渐败；饮食失宜，脾胃虚损；久病体衰，气血失调是老年肌少症的病因病机，治疗上应以调脾补肾为本。巴戟天被《中国药典》收录为补肾阳、强筋骨要药，主治“筋骨痿软”，与肌少症“痿证”范畴高度契合。巴戟天的传统应用核心在于“补肾阳”，其药效逻辑遵循中医“肾主骨”的理论框架。本研究系统考察了巴戟天中环烯醚萜类部位对衰老性肌少症的改善作用，为从肌肉层面阐释“肾主骨生髓，髓充则筋健”理论提供了实验依据。近年来，巴戟天活性成分与药理机制研究不断深入，已明确其多个有效部位可针对不同疾病发挥独立的作用，体现多成分、多靶点的药效特点。其中，已成功上市的巴戟天寡糖部位，临床证实可有效治疗抑郁症^[21]。巴戟天中的环烯醚萜部位则能通过激活腺苷酸活化蛋白激酶

(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 信号通路促进线粒体生物合成，改善骨代谢失衡，为骨质疏松的防治提供新依据^[22]，萜类部位可通过抑制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor pyrin domain-containing protein 3, NLRP3) 炎症小体的活化减轻慢性炎症反应，用于治疗类风湿性关节炎^[23]。值得注意的是，抑郁症、骨质疏松、类风湿性关节炎与肌少症虽分属不同系统的疾病，但在老年人群中常共存并相互影响，共同构成老年综合征的重要表现。本研究证实，巴戟天可通过激活 PI3K/Akt 信号通路来改善衰老相关肌少症的肌肉质量和功能，并显示出良好的临床转化潜力。巴戟天作为传统补益类中药，安全性高，口服使用方便，适合老年人长期服用。PI3K/Akt 通路是调控肌肉合成代谢的核心通路，巴戟天作为这条通路的天然激活剂，可为目前缺乏特效药的肌少症治疗提供理论依据。此外，通路里 Akt 的磷酸化水平可作为药效生物标志物，为后续临床试验提供可以量化的中间指标。巴戟天可与营养支持或抗阻运动联用，形成协同干预的方案，尤其适用活动受限或长期卧床的患者。综上，巴戟天在药物开发、功能食品及联合康复等领域均展现出良好的转化前景。肌少症的发生与发展涉及多条经典信号通路的失调。其中，胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)/PI3K/Akt 通路活性降低可导致肌肉蛋白合成减少^[24]，而转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)/Smad 与核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路过度激活则会促进肌肉蛋白降解与炎症反应^[25-26]，

此外,叉头框蛋白 O (forkhead box protein O, FOXO)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 及线粒体相关通路的异常也参与了肌肉萎缩与能量代谢障碍^[27-28],这些通路相互作用,共同加剧了衰老过程中的肌肉流失与功能下降。环烯醚萜类成分在调控肌肉代谢中显示出潜力,相关研究发现水晶兰苷可通过调节 Akt/mTOR/FOXO3a 信号通路,改善地塞米松诱导的小鼠肌肉萎缩和 C2C12 细胞肌管萎缩,并能提升肌肉质量与力量^[15]。然而,目前关于巴戟天总环烯醚萜类部位在衰老相关肌少症中的作用及其机制尚缺乏系统研究。因此,本研究围绕巴戟天总环烯醚萜类部位对衰老性肌少症的改善作用展开。首先通过比较不同浓度乙醇提取物的 HPLC 分析,确定 60%乙醇为提取总环烯醚萜类成分的最佳溶剂。进一步采用大孔吸附树脂富集该部位,吸附性能评价表明,H103 大孔树脂对环烯醚萜类成分具有最优的吸附与富集效果,从而为后续提取分离巴戟天中环烯醚萜类部位提供了依据。

骨骼肌主要由收缩慢、耐疲劳的慢肌纤维 (I 型),以及收缩快、较耐疲劳的快肌纤维 (IIA 型) 和收缩最快、易疲劳的快肌纤维 (IIX 型) 组成^[29]。腓肠肌以快肌纤维为主,占 50%~70%;而胫骨前肌则以慢肌纤维为主,占 75%~80%^[30]。在衰老过程中,II 型快肌纤维对失神经和合成代谢抵抗更为敏感,其萎缩与流失速度显著快于 I 型慢肌纤维。此外,肌肉流失在空间上亦不均衡,通常表现为远端肌肉早于近端,其中胫骨前肌作为以慢肌为主的远端踝背屈肌,在衰老早期即可出现明显流失^[31]。本研究中,HE 染色结果显示巴戟天环烯醚萜类部位可显著增加衰老模型小鼠胫骨前肌与腓肠肌的肌纤维横截面积,同时提高四肢拉力及后肢肌肉质量与体质量比值,提示巴戟天环烯醚萜类部位可同时改善快肌与慢肌的肌肉减少表现。结合肌肉组织转录组学与网络药理学分析,本研究初步提示 PI3K/Akt 信号通路可能是该部位促进肌管分化、改善肌肉功能的关键通路之一。

综上,巴戟天环烯醚萜类部位在改善衰老性肌少症方面表现出良好潜力,其口服给药方式与成本优势,为社区老年人群的长期管理提供了新选择。本研究通过系统分离制备了巴戟天环烯醚萜类部位,综合运用体内外模型,验证环烯醚萜类部位可显著改善衰老引起的肌少症,进一步通过转录组学

与网络药理学整合分析,初步阐明其可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路发挥作用,为肌少症的防治提供了新的候选策略与理论依据,亦为相关中药新药研发奠定基础。然而,本研究仍存在一定局限:①尽管转录组学分析揭示了环烯醚萜类部位治疗肌少症的潜在作用机制,但其具体调控机制及其他潜在信号通路(如与线粒体生物合成、炎症调节等相关的通路)是否参与,仍需通过相关实验进一步确认。②本研究聚焦于环烯醚萜类部位,尚未考察巴戟天中其他活性部位是否具有协同或独立抗肌少症作用,后续可开展多组分配伍研究,以全面阐释巴戟天的整体药效物质基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 夏宇阳,李扬,何启旺,等.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[J].药物评价研究,2026,49(1):144-155.
- [2] Vanni S, Colini Baldeschi A, Zattoni M, et al. Brain aging: A Janus-faced player between health and neurodegeneration [J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(2): 299-311.
- [3] Kedlian V R, Wang Y N, Liu T L, et al. Human skeletal muscle aging atlas [J]. *Nat Aging*, 2024, 4(5): 727-744.
- [4] Xekouki P, Azevedo M, Stratakis C A. Anterior pituitary adenomas: Inherited syndromes, novel genes and molecular pathways [J]. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2010, 5(5): 697-709.
- [5] Glass D J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy [J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(2): 87-90.
- [6] Han M J, Choung S Y. *Codonopsis lanceolata* ameliorates sarcopenic obesity via recovering PI3K/Akt pathway and lipid metabolism in skeletal muscle [J]. *Phytomedicine*, 2022, 96: 153877.
- [7] 邓斌,刘温华,宋银枝,等.从脾肾论治慢性心力衰竭肌少症之机理探讨[J].中国中医基础医学杂志,2021,27(8):1313-1315.
- [8] 陈嘉敏.老年肌肉减少症中医证型与相关影响因素研究[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [9] 沈赓,何玉琼,张奇,等.巴戟天环烯醚萜苷类成分的制备及其对破骨细胞骨吸收的抑制作用[J].第二军医大学学报,2019,40(2):149-156.
- [10] Zhang J H, Xin H L, Xu Y M, et al. *Morinda officinalis* How-A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*,

- 2018, 213: 230-255.
- [11] Kim I T, Park H J, Nam J H, *et al.* In-vitro and in-vivo anti-inflammatory and antinociceptive effects of the methanol extract of the roots of *Morinda officinalis* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(5): 607-615.
- [12] Zhang H L, Li J, Xia J M, *et al.* Antioxidant activity and physicochemical properties of an acidic polysaccharide from *Morinda officinalis* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 58: 7-12.
- [13] 刘梦云, 闫小景, 王宸, 等. 基于多指标-响应面法优选甘草制巴戟天工艺及其总寡糖体外抗氧化活性研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(23): 7989-7998.
- [14] 李茂星, 贾正平, 沈涛, 等. 分光光度法测定藏药独一味及其制剂中总环烯醚萜苷的含量 [J]. *中药新药与临床药理*, 2006, 17(1): 45-47.
- [15] Wang P, Kang S Y, Kim S J, *et al.* Monotropein improves dexamethasone-induced muscle atrophy via the Akt/mTOR/FOXO3a signaling pathways [J]. *Nutrients*, 2022, 14(9): 1859.
- [16] 何盼, 陈磊, 连让平, 等. 中医药防治肌少症的研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(10): 3729-3738.
- [17] Sayer A A, Syddall H, Martin H, *et al.* The developmental origins of sarcopenia [J]. *J Nutr Health Aging*, 2008, 12(7): 427-432.
- [18] Buford T W, Anton S D, Judge A R, *et al.* Models of accelerated sarcopenia: Critical pieces for solving the puzzle of age-related muscle atrophy [J]. *Ageing Res Rev*, 2010, 9(4): 369-383.
- [19] Wilkinson D J, Piasecki M, Atherton P J. The age-related loss of skeletal muscle mass and function: Measurement and physiology of muscle fibre atrophy and muscle fibre loss in humans [J]. *Ageing Res Rev*, 2018, 47: 123-132.
- [20] 汪涛, 杨敏春, 任璇璇. 老年骨骼肌减少症中医理法探究 [J]. *新中医*, 2017, 49(11): 149-151.
- [21] Zhang Z W, Gao C S, Zhang H, *et al.* *Morinda officinalis* oligosaccharides increase serotonin in the brain and ameliorate depression via promoting 5-hydroxytryptophan production in the gut microbiota [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(8): 3298-3312.
- [22] Zhang Q, Zhang J H, He Y Q, *et al.* Iridoid glycosides from *Morinda officinalis* How. exert anti-inflammatory and anti-arthritic effects through inactivating MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *BMC Complementary Med Ther*, 2020, 20(1): 172.
- [23] Cordiano R, Caserta S, Minciullo P L, *et al.* Anthraquinones and *Aloe vera* extracts as potential modulators of inflammaging mechanisms: A translational approach from autoimmune to onco-hematological diseases [J]. *Molecules*, 2025, 30(6): 1251.
- [24] Glass D J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(10): 1974-1984.
- [25] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387(6628): 83-90.
- [26] Li H, Malhotra S, Kumar A. Nuclear factor- κ B signaling in skeletal muscle atrophy [J]. *J Mol Med*, 2008, 86(10): 1113-1126.
- [27] Sandri M, Sandri C, Gilbert A, *et al.* Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy [J]. *Cell*, 2004, 117(3): 399-412.
- [28] Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy [J]. *Physiology*, 2008, 23(3): 160-170.
- [29] Burke R E, Levine D N, Zajac F E III, *et al.* Mammalian motor units: Physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius [J]. *Science*, 1971, 174(4010): 709-712.
- [30] Johnson M A, Polgar J, Weightman D, *et al.* Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles An autopsy study [J]. *J Neurol Sci*, 1973, 18(1): 111-129.
- [31] Lexell J, Taylor C C, Sjöström M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15-to 83-year-old men [J]. *J Neurol Sci*, 1988, 84(2/3): 275-294.

[责任编辑 李亚楠]