

# 基于 IGF-1/PI3K/AKT/mTOR 信号通路的 归脾汤对化疗肌少症的调节作用探讨

宋子馨<sup>1</sup>, 王 艺<sup>2</sup>, 马贤德<sup>3</sup>, 许欣竹<sup>2</sup>, 王建光<sup>2</sup>, 张月宇<sup>2</sup>, 雷 萍<sup>2\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学研究生学院, 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学中西医结合学院, 辽宁 沈阳 110847;

3. 辽宁中医药大学教学实验中心, 辽宁 沈阳 110847)

**【摘要】目的** 探讨 5-氟尿嘧啶(5-FU)诱导的肌少症的发生机制是否与胰岛素样生长因子-1(IGF-1)/磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路有关,并用归脾汤进行调节。**方法** 选取 40 只 SPF 级雌性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组(28mg/kg 5-FU)、归脾汤低剂量组(28mg/kg 5-FU+0.5g/ml 归脾汤)、中剂量组(28mg/kg 5-FU+1g/ml 归脾汤)、高剂量组(28mg/kg 5-FU+2g/ml 归脾汤),每组 8 只,造模的同时归脾汤组灌胃不同剂量归脾汤,连续干预 14 天。末次给药后,大鼠禁水禁食,次日处死大鼠,取腓肠肌等以待检测,期间记录各组大鼠体重、抓力等生理状况。苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠腓肠肌组织病理改变;免疫组织化学法(IHC)检测腓肠肌组织中肌萎缩相关蛋白 Fbxo32 及 Trim63 蛋白表达;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测腓肠肌组织内胰岛素样生长因子-1(IGF-1)及胰岛素样生长因子-1受体(IGF-1R)的含量;实时荧光定量 PCR(RT-PCR)测定腓肠肌组织中 IGF-1、IGF-1R 的 mRNA 表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测腓肠肌组织中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 的蛋白表达水平。**结果** 与空白组相比,模型组大鼠体质量、抓力均明显下降( $P<0.01$ );肌细胞间隙增大、细胞核紊乱出现核内移,并可见炎性细胞浸润;IGF-1、IGF-1R 蛋白及 mRNA 表达水平升高( $P<0.01$ );Fbxo32、Trim63 蛋白表达明显升高( $P<0.01$ );p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平的比值显著降低( $P<0.01$ )。与模型组相比,归脾汤低、中、高剂量大鼠体质量、抓力上升( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );腓肠肌内 IGF-1、IGF-1R 蛋白及 mRNA 表达水平升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );Fbxo32、Trim63 蛋白表达显著下降( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平的比值显著升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论** 归脾汤对 5-FU 诱导的肌少症模型大鼠具有明显改善作用,可能与激活 IGF-1/PI3K/AKT/mTOR 信号通路,上调 IGF-1、IGF-1R、p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白表达有关。

**【关键词】** 化疗; 肌少症; 骨骼肌; 归脾汤; IGF-1/PI3K/AKT/mTOR 信号通路

DOI 标识:doi:10.3969/j.issn.1008-0805.2024.10.06

**【中图分类号】**R285.5 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1008-0805(2024)10-2337-07

肌少症(Sarcopenia)是一种进行性、全身性骨骼肌质量和功能丧失的疾病,主要表现为肌肉质量下降以及肌肉力量减弱<sup>[1]</sup>,当肌肉减少与衰老相关时,可将其归类为原发性肌少症;而当肌肉减少与肿瘤、活动减少(废用性萎缩)、营养不良、器官衰竭、侵袭等疾病相关时,可将其归类为继发性肌少症<sup>[2]</sup>。近来有研究表明,化疗可导致继发性肌少症,降低癌症患者的生活质量<sup>[3,4]</sup>。化疗后肌肉代谢和功能受损引起骨骼肌减少,同时骨骼肌减少导致化疗毒性增强,并降低化疗耐受力,形成恶性循环,严重威胁患者预后及术后生存状况<sup>[5]</sup>。研究表明骨骼肌质量较高的患者,在化疗中血液毒性发生率明显较低<sup>[6]</sup>。5-氟尿嘧啶(5-FU)作为化疗常用药物之一,被广泛应用于多种癌症治疗中,但多项研究表明,5-FU 通过破坏骨骼肌免疫细胞,可

影响骨骼肌的修复与重塑,引起骨骼肌减少<sup>[7,8]</sup>。体外研究发现,经 5-FU 治疗后肌管直径减少 43%,肌纤维蛋白含量减少 50%,mTORC1 底物 S6K1thr389 的磷酸化减少 80%,加重了癌症恶病质的发展<sup>[9]</sup>。

“归脾汤”出自严和用的《济生方》,经薛己在《内科摘要》中改良后,使其同时具有健脾益血的功效。课题组前期研究表明归脾汤可显著提高化疗小鼠的体质量及抓力,降低炎症水平,但是其具体作用机制尚未阐明,而 IGF-1/PI3K/AKT/mTOR 信号通路是调控肌肉生长活动的重要信号通路<sup>[10,11]</sup>,因此本研究以腹腔注射 5-FU 构建肌少症模型,探讨归脾汤对化疗肌少症大鼠的调节作用,并从 IGF-1/PI3K/AKT/mTOR 信号通路阐述其可能的作用机制,为归脾汤改善化疗肌少症提供实验依据。

收稿日期:2024-02-22; 修订日期:2024-07-29

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82374375);辽宁省科技厅自然科学基金指导计划项目(2019-ZD-0444);辽宁中医药大学“远志工程”

作者简介:宋子馨(1997-),女(汉族),内蒙古通辽人,辽宁中医药大学在读硕士研究生,主要从事虚证免疫机制研究及中医药调控工作。

\*通讯作者简介:雷 萍(1978-),女(汉族),山西太原人,辽宁中医药大学副教授,博士学位,主要从事虚证免疫机制研究及中医药调控工作。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 6 ~ 8 周龄, 体质量 (200 ± 20)g, 购于辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(辽)2020-0001, 本实验通过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(21000042022079)。

### 1.2 药物及试剂

归脾汤内白术 9g(批号: 220801CP0154), 人参 6g(批号: CP259220201), 黄芪 12g(批号: 22061701), 当归 9g(批号: 22073001), 炙甘草 3g(批号: 221001CP057), 茯神 9g(批号: A220106), 远志 6g(批号: 220701CP137), 酸枣仁 12g(批号: 22072101), 木香 6g(批号: 220801CP0082), 龙眼肉 12g(批号: 22061801); 购于国大药房, 常规煎煮, 浓缩为终浓度 2g/ml, 再分别稀释为 1g/ml 和 0.5g/ml。5-氟尿嘧啶注射液(购于天津金耀氨基酸有限责任公司, 批号 20151003); 苏木素伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术公司, 批号: C0105S); Fbxo32、Trim63 抗体(爱必信生物科技有限公司, 批号为 abs136707、abs136595); PI3K、AKT、mTOR 抗体(Affinity 公司, 批号为 AF6241、AF6261、AF6308); p-PI3K 抗体(Abcam 公司, 批号为 ab182651); p-AKT、p-mTOR 抗体、Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody(CST 公司, 批号为 4060S、5536S、7074s); GAPDH(Immunoway 公司, 批号: YN5585); ELISA Kit for Insulin Like Growth Factor 1(IGF1)、ELISA Kit for Insulin Like Growth Factor 1 Receptor(IGF1R)、(武汉优尔生商贸有限公司, 批号为: SEA050Ra、SEB659Ra); RNAiso Plus、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser、TB Green Premix Ex Taq II(Takara 公司, 批号为 9109、RR047A、RR820A)。

### 1.3 仪器

电子天平(沈阳天平仪器有限公司, EST1000-2); 大鼠抓力测定仪(济南益延科技发展有限公司, YLS-13A); Multiskan FC 型酶标仪(美国 THERMO 公司); 1658001 型垂直电泳槽; 170-3932 型转移电泳槽(美国 Bio-Rad 公司); Tanon5200 型化学发光成像系统(上海天能科技有限公司); CFX96 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); ST16R 型冷冻高速离心机(美国 Thermo 公司); Arcadia 型组织包埋机; Biocut 型切片机; M8 数字切片扫描成像系统(Precipoint FM34F056)。

## 2 方法

### 2.1 实验动物及分组

SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, 适应性喂养 1 周后开

始实验。将大鼠随机分成 5 组, 即 A 组(空白组)、B 组(模型组)、C 组(归脾汤低剂量组)、D 组(归脾汤中剂量组)、E 组(归脾汤高剂量组), 每组 8 只。参考文献方法<sup>[12]</sup>, 并根据以往实验改良, 将除 A 组以外的大鼠腹腔注射 5-氟尿嘧啶(5-FU), 剂量为 28mg/kg, 每天给药一次, 连续 5d, A 组给予生理盐水腹腔注射; 归脾汤组在造模的同时灌胃不同剂量归脾汤, 其中 C 组为 0.5g/ml、D 组为 1g/ml、E 组为 2g/ml。同时, 其余组给予等量生理盐水灌胃, 连续灌胃 14d, 期间测量体质量与抓力。

### 2.2 样品制备与动物处理

末次给药后禁食禁水, 次日麻醉后处死大鼠, 取腓肠肌组织, 剪取部分组织于 4% 多聚甲醛中固定, 其余组织装于冻存管中置于 -80℃ 冰箱保存, 以待后续检测。

### 2.3 大鼠一般状况

实验期间观察各组大鼠生长状况、饮食进水、毛色光泽、精神状态等一般状况并记录体质量及抓力。

### 2.4 HE 染色观察腓肠肌形态学改变

将固定于 4% 多聚甲醛中的大鼠腓肠肌组织经乙醇、二甲苯脱水透明后进行石蜡包埋、切片, 二甲苯脱蜡后, 进行苏木精伊红染色, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察各组大鼠腓肠肌组织形态学变化。

### 2.5 免疫组化法检测肌萎缩相关蛋白 Fbxo32、Trim63 的表达情况

取腓肠肌石蜡切片脱蜡、脱水, PBS 洗涤后于高压锅内进行抗原修复, 冷却至室温, 3% 过氧化氢室温孵育 15min, 取 5% 山羊血清封闭 30min, 加入一抗(Fbxo32、Trim63), 4℃ 孵育过夜, 滴加二抗室温孵育 1h, PBS 洗涤后加入 DAB 显色液, 苏木素复染, 封片, 镜下观察 Fbxo32 和 Trim63 蛋白的表达情况。采用 Image J 软件进行分析。

### 2.6 ELISA 法检测各组大鼠腓肠肌内 IGF-1、IGF-1R 的蛋白表达情况

取 100mg 腓肠肌组织加入 1ml PBS 溶液制成组织匀浆, 离心后取上清, 按 ELISA 试剂盒说明书要求检测 IGF-1、IGF-1R 表达情况, 测定每个孔的 OD 值, 绘制标准曲线, 横坐标表示标准品浓度, 纵坐标表示相应的光密度(OD)值, 通过标准品的线性回归曲线, 计算各个样本的浓度值。

### 2.7 实时荧光定量 PCR 法检测各组大鼠腓肠肌内 IGF-1、IGF-1r 的 mRNA 表达情况

取 50mg 腓肠肌组织加入 1ml RNAiso Plus, 经匀浆、离心提取总 RNA, 逆转录为 cDNA 后, 按照试剂盒说明书, 于冰上配制 25μl 反应体系。扩增反应条件为:(第 1 步: 95℃, 30s, 1 次循环; 第 2 步: 95℃, 5s; 60℃, 30s, 39 次循环; 第 3 步: Melt Curve) 以 β-actin 为内参, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析目的基因的相对表达量。

引物由 Takara 公司合成,引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

引物名称	序列(5'-3')	长度/bp
IGF-1	上游 GCACTCTGCTTGCTCACCTTA	188
	下游 TCGGAATGCTGGAGCCATA	
IGF-1R	上游 GTCTTCACCACTGATTCCGATGTC	192
	下游 GCAGTTATCCGGCTTGTCCA	
$\beta$ -actin	上游 AGGCCAACCGTGA AAAAGATG	208
	下游 ATGCCAGTGGTACGACCAGA	

### 2.8 Western blot 法检测大鼠腓肠肌内 IGF-1/PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达情况

将腓肠肌组织于冰上剪碎,加入裂解液、蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂研磨,进行裂解;分离上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳、转膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 70min;加入稀释后的一抗(p-PI3K 稀释比例 1:300;Fbxo32、Trim63、p-mTOR 稀释比例 1:500;PI3K、AKT、p-AKT、mTOR 稀释比例 1:1000;GAPDH 稀释比例 1:5000),4℃ 孵育过夜;加入 HRP 标记的二抗,室温下孵育 1h 后,应用 ECL 发光试剂盒和凝胶成像系统对蛋白进行显色,用 Image J 软件分析蛋白条带。

表 2 归脾汤对化疗肌少症大鼠体质量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot ml^{-1}$	体质量/g		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
空白组	-	228.6 $\pm$ 7.0	262.0 $\pm$ 7.1	286.8 $\pm$ 13.8
模型组	-	232.5 $\pm$ 3.5	228.8 $\pm$ 6.4 <sup>1)</sup>	228.0 $\pm$ 10.8 <sup>1)</sup>
归脾汤低剂量组	0.5	230.0 $\pm$ 5.6	242.4 $\pm$ 7.22 <sup>2)</sup>	251.9 $\pm$ 9.8 <sup>2)</sup>
归脾汤中剂量组	1	230.8 $\pm$ 9.5	247.3 $\pm$ 12.5 <sup>2)</sup>	262.4 $\pm$ 16.3 <sup>2)</sup>
归脾汤高剂量组	2	228.8 $\pm$ 4.3	232.2 $\pm$ 8.7	241.5 $\pm$ 13.5 <sup>2)</sup>

与正常组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ,与模型组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;  $n = 8$

表 3 归脾汤对化疗肌少症大鼠抓力的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot ml^{-1}$	抓力/g		
		第 1 天	第 7 天	第 14 天
空白组	-	1204.8 $\pm$ 110.4	1499.4 $\pm$ 140.3	1626.9 $\pm$ 110.7
模型组	-	1139.4 $\pm$ 70.9	1104.8 $\pm$ 45.5 <sup>1)</sup>	1214.8 $\pm$ 30.0 <sup>1)</sup>
归脾汤低剂量组	0.5	1130.1 $\pm$ 60.9	1315.9 $\pm$ 40.8 <sup>2)</sup>	1334.5 $\pm$ 27.3 <sup>2)</sup>
归脾汤中剂量组	1	1164.5 $\pm$ 71.6	1274.8 $\pm$ 59.6 <sup>2)</sup>	1506.1 $\pm$ 69.5 <sup>2)</sup>
归脾汤高剂量组	2	1195.9 $\pm$ 75.6	1235.6 $\pm$ 94.6 <sup>2)</sup>	1283.0 $\pm$ 113.9

与正常组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ,与模型组比较,<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;  $n = 8$

### 3.3 归脾汤对大鼠腓肠肌组织病理学结构变化的影响

HE 结果显示,空白组大鼠腓肠肌组织结构完整,肌纤维排列紧密整齐,细胞核位于边缘,界限清晰,模型组大鼠腓肠肌纤维排列疏松、断裂,细胞核紊乱并出现核内移,可见炎性细胞浸润。归脾汤低、中、高剂量组肌纤维排列疏松,有少量炎性细胞浸润。见图 1。

### 2.9 统计学分析

采用 SPSS22.0 统计学软件进行统计,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,数据进行正态性和方差齐性检验,组间数据比较采用 One-way ANOVA 分析,方差不齐采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 归脾汤对大鼠体质量的影响

如表 2 所示,造模前各组大鼠体质量无明显差异,实验第 7 天时,模型组大鼠体质量显著低于空白组( $P < 0.01$ ),而归脾汤低、中剂量组体质量明显高于模型组( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );实验第 14 天时,模型组大鼠体质量继续下降,仍显著低于空白组,与模型组相比,归脾汤低、中、高剂量组均显著上升( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。

### 3.2 归脾汤对大鼠抓力的影响

实验初始时,各组大鼠抓力无显著性差异,实验第 7 天时,模型组大鼠抓力显著低于空白组( $P < 0.01$ ),而归脾汤低、中、高剂量组抓力明显高于模型组( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );实验第 14 天时,模型组大鼠抓力仍显著低于空白组( $P < 0.01$ ),与模型组相比,归脾汤低、中、高剂量组均显著上升( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。见表 3。

### 3.4 归脾汤对大鼠腓肠肌组织中 Fbxo32、Trim63 蛋白表达水平的影响

免疫组化结果显示,与空白组比较,模型组 Fbxo32、Trim63 蛋白吸光度值均显著高于空白组高( $P < 0.01$ ),与模型组比较,归脾汤低、中、高剂量组蛋白吸光度值均显著下降( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。见图 2,表 4。

### 3.5 归脾汤对各组大鼠腓肠肌组织内 IGF-1、IGF-1R 含量的影响

根据 Elisa 实验结果显示,与空白组相比,模型组大鼠腓肠肌组织中 IGF-1 和 IGF-1R 的表达水平显著增加( $P < 0.01$ );与模型组相比,归脾汤低剂量组

IGF-1 和 IGF-1R 的表达水平上升,但差异无统计学意义;归脾汤中剂量组 IGF-1 和 IGF-1R 的表达水平升高( $P < 0.05, P < 0.01$ );归脾汤高剂量组 IGF-1 含量增加( $P < 0.05$ )。见表 5。

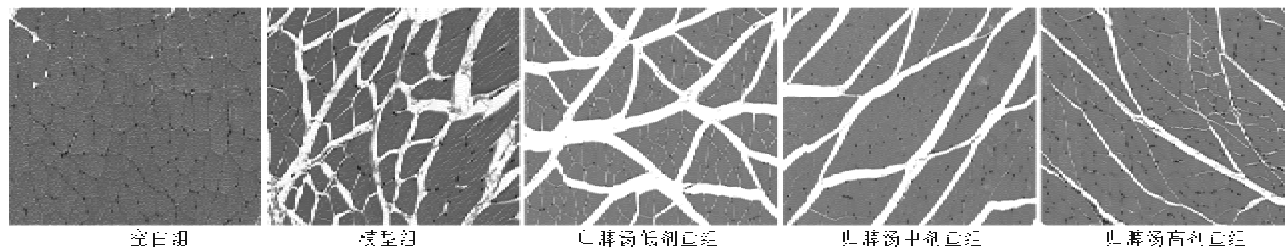


图 1 归脾汤对化疗肌少症大鼠腓肠肌组织的影响(400×)

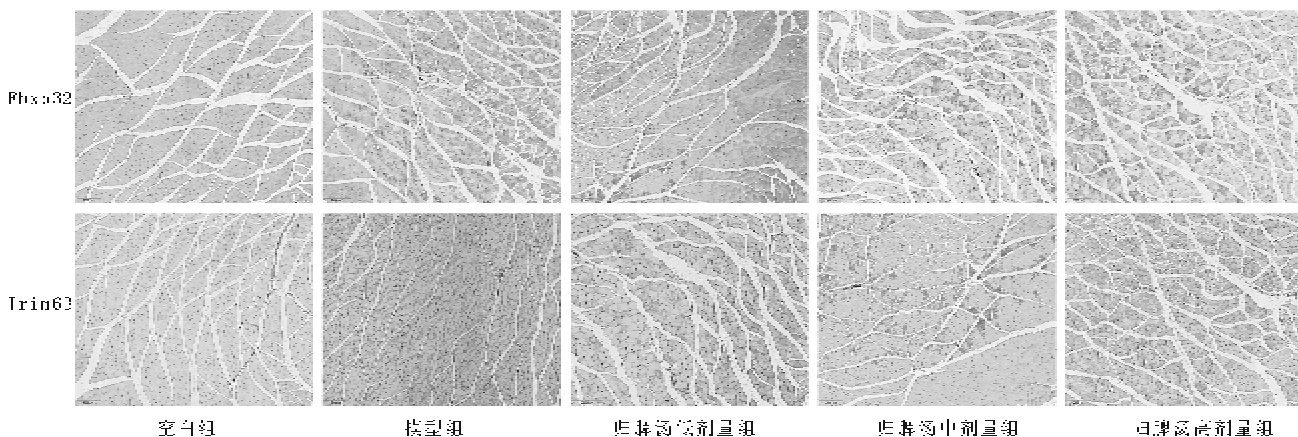


图 2 归脾汤对化疗肌少症大鼠腓肠肌 Fbxo32 和 Trim63 蛋白表达的影响(免疫组化,200×)

表 4 归脾汤对化疗肌少症大鼠腓肠肌 Fbxo32 和 Trim63 蛋白表达的影响

组别	剂量 /g · ml <sup>-1</sup>	Fbxo32	TRIM63
空白组	-	0.0838 ± 0.0047	0.0768 ± 0.0120
模型组	-	0.1262 ± 0.0019 <sup>1)</sup>	0.1400 ± 0.0091 <sup>1)</sup>
归脾汤低剂量组	0.5	0.1200 ± 0.0028	0.1198 ± 0.0165 <sup>2)</sup>
归脾汤中剂量组	1	0.0984 ± 0.0066 <sup>3)</sup>	0.0924 ± 0.0018 <sup>3)</sup>
归脾汤高剂量组	2	0.1129 ± 0.0051 <sup>3)</sup>	0.1013 ± 0.0070 <sup>3)</sup>

与正常组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ,与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$

### 3.6 归脾汤对各组大鼠腓肠肌组织内 IGF-1、IGF-1R mRNA 表达水平的影响

与空白组比较,模型组大鼠腓肠肌组织中 IGF-1、IGF-1R mRNA 的表达水平显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,归脾汤低剂量组 IGF-1、IGF-1R mRNA 的表达水平升高,但差异无统计学意义,归脾汤中剂量组 IGF-1 和 IGF-1R mRNA 的表达水平升高( $P < 0.01$ );归脾汤高剂量组 IGF-1 mRNA 表达增加( $P < 0.01$ )。见表 6。

表 5 归脾汤对化疗肌少症大鼠腓肠肌内 IGF-1 和 IGF-1R 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g · ml <sup>-1</sup>	IGF-1	IGF-1R
空白组	-	18.00 ± 0.92	14.11 ± 0.59
模型组	-	11.06 ± 0.70 <sup>1)</sup>	8.98 ± 0.61 <sup>1)</sup>
归脾汤低剂量组	0.5	12.85 ± 0.62 <sup>2)</sup>	9.10 ± 1.62
归脾汤中剂量组	1	15.40 ± 0.77 <sup>2)</sup>	12.02 ± 0.63 <sup>3)</sup>
归脾汤高剂量组	2	13.65 ± 0.58 <sup>2)</sup>	10.54 ± 0.38 <sup>2)</sup>

与正常组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ,与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$

表 6 归脾汤对化疗肌少症大鼠腓肠肌 IGF-1 和 IGF-1R mRNA 相对表达水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g · ml <sup>-1</sup>	IGF-1	IGF-1R
空白组	-	1.01 ± 0.18	1.01 ± 0.18
模型组	-	1.31 ± 0.06 <sup>1)</sup>	1.39 ± 0.05 <sup>1)</sup>
归脾汤低剂量组	0.5	1.43 ± 0.09	1.44 ± 0.06
归脾汤中剂量组	1	1.88 ± 0.02 <sup>4)</sup>	2.21 ± 0.02 <sup>4)</sup>
归脾汤高剂量组	2	2.03 ± 0.22 <sup>4)</sup>	1.67 ± 0.35

与正常组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ,与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$ ;n=8

### 3.7 归脾汤对各组大鼠 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠腓肠肌组织中 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平比值明显下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,归脾汤低、中、高剂量组大鼠腓肠肌组织内 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平的比值明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 3,表 7。

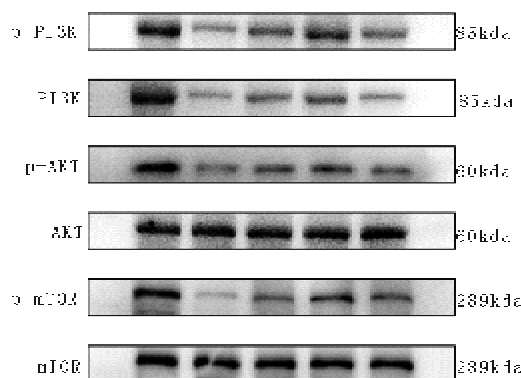


图 3 各组大鼠腓肠肌组织中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路蛋白表达电泳

表 7 归脾汤对化疗肌少症大鼠腓肠肌 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR 和 p-mTOR 蛋白相对表达量影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot ml^{-1}$	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT	p-mTOR/mTOR
空白组	-	1.03 ± 0.06	1.01 ± 0.03	1.06 ± 0.06
模型组	-	0.54 ± 0.08 <sup>1)</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.45 ± 0.03 <sup>1)</sup>
归脾汤低剂量组	0.5	0.63 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.63 ± 0.06 <sup>2)</sup>	0.59 ± 0.02 <sup>2)</sup>
归脾汤中剂量组	1	0.75 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.83 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.80 ± 0.03 <sup>2)</sup>
归脾汤高剂量组	2	0.86 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.70 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.65 ± 0.04 <sup>2)</sup>

与正常组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ,与模型组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.01$

课题组前期研究表明化疗可影响大鼠肠道菌群的组成和短链脂肪酸(SCFAs)的产生量,而 SCFAs 通过与游离脂肪酸受体 2 和 3(Ffar2/3)结合,促进葡萄糖的吸收和代谢,诱导 IGF-1 的释放<sup>[21]</sup>。胰岛素样生长因子-1(IGF-1)是调节蛋白质合成和降解途径的典型生长因子之一,参与了骨骼肌生长、分化和再生,在增强肌肉功能,缓解骨骼肌萎缩方面具有重要作用,有实验表明,IGF-1 与肌肉质量和力量发育有关,可减缓肌肉退化,并能增加肌肉卫星细胞的增殖能力<sup>[22]</sup>。IGF-1 与细胞内接头蛋白胰岛素受体底物-1(IGF-1R)结合后,磷酸化肌醇磷酸 3 激酶(PI3K)和蛋白激酶 B(AKT),桑叶和当归叶混合提取物通过上调肌肉萎缩大鼠 PI3K 和 AKT 的磷酸化水平,改善大鼠握力,促进肌肉合成和代谢<sup>[23]</sup>。黄芩素通过激活 AKT 在体内和体外的磷酸化,增加肌纤维厚度,抑制肌肉特异性泛素-蛋白酶系统,改善肌肉萎缩状况<sup>[24]</sup>。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是 AKT 下游的一个

## 4 讨论

肌少症在中医中应属“痿证”范畴中的“肉痿”。《素问·痿论》云:“脾主身之肌肉。”《灵枢·本脏》:“脾应肉。”脾在体合肉,主四肢。脾的运化功能一旦发生障碍,即会引起四肢消瘦、痿废等症。因此,可以从脾论治肌少症。大量文献证实,中医药可从多层次、多靶点、多途径对骨骼肌减少发挥作用<sup>[13-15]</sup>。归脾汤中人参、龙眼肉共为君药,益气健脾,养血补心,有改善神疲乏力之功;黄芪、白术健脾和中,固表敛汗,当归滋阴养血,以增龙眼肉补血养心之效,为臣药;茯神、远志、酸枣仁益智宁心、定志安神;木香芳香醒脾,辛散理气,共为佐药;炙甘草调和诸药,为佐使药,全方补脾益气、养血安神。大量研究证明归脾汤内药物对肌肉萎缩具有较好疗效,白术主要成分白术内脂Ⅲ(ATL-Ⅲ)可预防慢性肾脏病大鼠肌肉萎缩,降低肌肉和血清中炎症因子<sup>[16]</sup>。人参肉桂膏具有缓解疲劳和避免肌肉流失的作用,给药后斑马鱼的肌损伤情况得到改善<sup>[17]</sup>。黄芪果糖制剂可增加 D-半乳糖诱导衰老模型雄性大鼠的肌肉质量<sup>[18]</sup>。归脾汤已被证实对多种癌症化疗引起的不良反应具有较好改善作用<sup>[19,21]</sup>,但对于肌少症的相关研究尚未见报道。

靶点,有研究表明 IGF-1 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路介导 C2C12 成肌细胞,引起肌管肥大,可通过应用 mTOR 抑制剂阻断<sup>[25]</sup>。IGF-1/PI3K/AKT/mTOR 信号通路在调控肌肉生长活动中有重要作用,在非分裂肌纤维中,促进蛋白质的合成,抑制蛋白质的降解<sup>[26]</sup>。

本实验通过腹腔注射 5-FU 构建模型,实验初各组大鼠体质量、抓力均无显著性差异,实验第 7 天时,模型组大鼠体质量、抓力较空白组相比显著下降,HE 病理结果显示模型组大鼠腓肠肌纤维排列疏松、断裂,细胞核紊乱,并可观察到炎性细胞浸润。泛素-蛋白酶系统(UPS)是真核生物中一种重要的蛋白质降解系统,研究表明其在肌肉萎缩的发展过程中具有重要作用<sup>[27,28]</sup>。肌肉萎缩盒蛋白 32(Fbxo32/atrogen-1)和肌环指蛋白-1(Trim63/MuRF-1)是骨骼肌中最具特征的 E3 泛素连接酶。多项研究表明,Fbxo32 和 Trim63 是肌肉特异性泛素连接酶,在肌肉萎缩中表达上调<sup>[29,30]</sup>。免疫组化结果显示模型组大鼠腓肠肌

Fbxo32 和 Trim63 蛋白表达升高,提示造模成功。

在 5-FU 作用下,大鼠骨骼肌萎缩、肌肉功能下降,运用归脾汤对 5-FU 诱导的肌少症大鼠进行干预,结果显示,归脾汤低、中、高剂量组发挥显著的改善作用。体质量及抓力显著提高,Fbxo32 及 Trim63 蛋白表达下降,骨骼肌萎缩情况缓解。表明归脾汤对化疗肌少症具有较好改善作用。给予归脾汤后,大鼠腓肠肌组织内 IGF-1 和 IGF-1R 的蛋白及 mRNA 表达水平上升,并显著上调了 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达。

综上所述,归脾汤能够改善 5-FU 诱导的肌少症大鼠生理状况、降低骨骼肌病理损伤程度,抑制骨骼肌萎缩,其机制可能与激活 IGF-1/PI3K/AKT/mTOR 信号通路,促进蛋白质合成,从而抑制骨骼肌减少有关。

参考文献:

[1] Cho MR, Lee S, Song SK. A Review of Sarcopenia Pathophysiology, Diagnosis, Treatment and Future Direction[J]. J Korean Med Sci, 2022, 37(18):e146.

[2] Matsumoto C, Sekine H, Zhang N, et al. Role of p53 in Cisplatin-Induced Myotube Atrophy[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(11):9176.

[3] Bozzetti F. Chemotherapy-Induced Sarcopenia[J]. Curr Treat Options Oncol, 2020, 21(1):7.

[4] Xu XY, Jiang XM, Xu Q, et al. Skeletal Muscle Change During Neoadjuvant Therapy and Its Impact on Prognosis in Patients With Gastrointestinal Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Front Oncol, 2022, 12:892935.

[5] Bozzetti F. Forcing the vicious circle: sarcopenia increases toxicity, decreases response to chemotherapy and worsens with chemotherapy[J]. Ann Oncol, 2017, 28(9):2107.

[6] Sato Y, Tanaka Y, Inai T, et al. Effect of Biweekly-DCF Neoadjuvant Chemotherapy on Skeletal Muscle Mass of Esophageal Cancer Patients[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2022, 49(1):47.

[7] VanderVeen BN, Cardaci TD, Madero SS, et al. 5-Fluorouracil disrupts skeletal muscle immune cells and impairs skeletal muscle repair and remodeling[J]. J Appl Physiol (1985), 2022, 133(4):834.

[8] VanderVeen BN, Cardaci TD, Bullard BM, et al. The complex heterogeneity of the immune cell signatures across wasting tissues with C26 and 5 fluorouracil induced cachexia[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2024, 326(2):C606.

[9] Mora S, Adagoke OAJ. Maintenance of the Branched-Chain Amino Acid transporter LAT1 Counteracts Myotube Atrophy following Chemotherapy[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2024, 326(3):C866.

[10] Gellhaus B, Biker KO, Schilling AF, Saul D. Therapeutic Consequences of Targeting the IGF-1/PI3K/AKT/FOXO3 Axis in Sarcopenia: A Narrative Review[J]. Cells, 2023, 12(24):2787.

[11] Gui C, Bao Z, Chow SK, et al. Coapplication of Magnesium Supplementation and Vibration Modulate Macrophage Polarization to Attenuate Sarcopenic Muscle Atrophy through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(21):12944.

[12] Chen H, Xu C, Zaang F, et al. The gut microbiota attenuates muscle wasting by regulating energy metabolism in chemotherapy-induced

malnutrition rats[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2020, 85:1049.

[13] Tang G, Du Y, Guan H, et al. Butyrate ameliorates skeletal muscle atrophy in diabetic nephropathy by enhancing gut barrier function and FFA2-mediated PI3K/Akt/mTOR signals[J]. Br J Pharmacol, 2022, 179(1):159.

[14] 任柏魁,姚 辉,卢秉久. 泽泻红山颗粒通过 PI3K/AKT 通路抑制 NASH 小鼠骨骼肌损伤[J]. 解剖科学进展, 2021, 27(4):417.

[15] 张安宁,罗雪林,黄思琴,等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在大鼠急性骨骼肌挫伤修复中的作用[J]. 中国运动医学杂志, 2018, 37(7):S94.

[16] Wang M, Hu R, Wang Y, et al. Atacetylenolide III Attenuates Muscle Wasting in Chronic Kidney Disease via the Oxidative Stress-Mediated PI3K/AKT/mTOR Pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019;1875471.

[17] 董恩颖,陈 亮,张 璐,等. 人参肉桂膏对斑马鱼实验模型增强免疫力、缓解疲劳和肌肉流失的作用研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(7):1631.

[18] 梁美婷,王可欣,吕思敏,等. 黄芪果糖制剂对 D-半乳糖衰老模型大鼠肌肉与骨骼的影响[J]. 中成药, 2021, 43(9):2485.

[19] 袁 敏,杨云珍,钟 雷,等. 归脾汤加减内服联合中药热敷对乳腺癌术后气血两虚证患者康复的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(21):150.

[20] 沈淑琴. 甘麦大枣汤及归脾汤联合 TC/TP 对气血两虚证卵巢癌患者临床疗效、内分泌功能及骨髓抑制情况分析[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(3):627.

[21] Pakmez CT, Dragsted LO, Brahe LK. Gut microbiota alterations and dietary modulation in childhood malnutrition - The role of short chain fatty acids[J]. Clin Nutr, 2019, 38(2):615.

[22] Song YH, Song JL, Delafontaine P, Godard MP. The therapeutic potential of IGF-1 in skeletal muscle repair[J]. Trends Endocrinol Metab, 2013, 24(6):310.

[23] Hwangbo H, Kim MY, Ji SY, et al. A Mixture of Morus alba and Angelica keiskei Leaf Extracts Improves Muscle Atrophy by Activating the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Inhibiting FoxO3a In Vitro and In Vivo[J]. J Microbiol Biotechnol, 2023, 33(12):1635.

[24] Song G, Park WY, Jiao W, et al. Moderating AKT signaling with baicalein protects against weight loss by preventing muscle atrophy in a cachexia model caused by CT26 colon cancer[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2024, 1871(3):119670.

[25] Moreira-Pais A, Ferreira R, Gil da Costa R. Platinum-induced muscle wasting in cancer chemotherapy: Mechanisms and potential targets for therapeutic intervention[J]. Life Sci, 2018, 208:1.

[26] Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways[J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(11):1009.

[27] Bilodeau PA, Coyne ES, Wing SS. The ubiquitin proteasome system in atrophying skeletal muscle: roles and regulation[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2016, 311(3):C392.

[28] Peris-Moreno D, Taillandier D, Polge C. MuRF1/TRIM63, Master Regulator of Muscle Mass[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18):6663.

[29] Munkhong S, Kim S, Moon S, et al. Experimental Models of Sarcopenia: Bridging Molecular Mechanism and Therapeutic Strategy[J]. Cells, 2020, 9(6):1385.

[30] 许欣竹,段志同,董涵宇,等. 益气健脾汤联合二甲双胍激活 PI3K/Akt/mTOR 通路调控自噬对抗糖尿病肌萎缩[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(2):547.

## To explore the regulatory effect of Guipi Decoction on chemotherapy - related sarcopenia based on IGF - 1/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

SONG Yu-xin<sup>1</sup>, WANG Yi<sup>2</sup>, MA Xian-de<sup>3</sup>, XU Xin-zhu<sup>2</sup>, WANG Jian-guang<sup>2</sup>, ZHANG Yue-yu<sup>2</sup>, LEI Ping<sup>2\*</sup>

(1. Graduate School of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 2. College of Integrative Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 3. Teaching Experiment Center, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

**Abstract; Objective** To investigate whether the pathogenesis of 5 - fluorouracil (5 - FU) - induced sarcopenia is related to the insulin - like growth factor - 1 (IGF - 1)/phosphatidylinositol - 3 - kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway, which is regulated by Guipi Decoction. **Methods** Forty SPF male SD rats were randomly divided into blank group, model group (28mg/kg 5 - FU), Guipi Decoction low - dose group (28mg/kg 5 - FU + 0.5g/ml Guipi decoction), medium - dose group (28mg/kg 5 - FU + 1g/ml Guipi decoction) and high - dose group (28mg/kg 5 - FU + 2g/ml Guipi Decoction), 8 animals in each group. At the same time, Guipi decoction group was given different doses of Guipi decoction, and the intervention lasted for 14 days. After the last administration, the rats were deprived of water and fasted, and the rats were killed the next day, and the gastrocnemius muscles were taken for detection, during which the physiological status of the rats such as body weight and grasping power were recorded. The pathological changes of gastrocnemius were observed by hematoxylin - eosin (HE) staining. The expression of muscular atrophy related proteins Fbxo32 and Trim63 in gastrocnemius was detected by immunohistochemistry (IHC). The contents of insulin - like growth factor - 1 (IGF - 1) and insulin - like growth factor - 1 receptor (IGF - 1R) in gastrocnemius were detected by enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA). Real - time fluorescence quantitative PCR (RT - PCR) was used to determine the mRNA expression levels of IGF - 1 and IGF - 1R in gastrocnemius. Protein expression levels of p - PI3K, PI3K, p - Akt, Akt, p - mTOR and mTOR in gastrocnemius were detected by Western blot. **Results** Compared with blank group, the body weight and grip strength of rats in model group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The myocyte space was enlarged, the nuclei were disordered and the inflammatory cells were infiltrated. The expression levels of IGF - 1 and IGF - 1R protein and mRNA were increased ( $P < 0.01$ ); The expressions of Fbxo32 and Trim63 were significantly increased ( $P < 0.01$ ). The ratios of p - PI3K / PI3K, p - Akt / Akt, p - mtor / mTOR protein expression levels were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the body weight and grip strength of rats with low, medium and high doses of Guipi decoction were increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The protein and mRNA expression levels of IGF - 1 and IGF - 1R in gastrocnemius were increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); The expressions of Fbxo32 and Trim63 were significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The ratios of p - PI3K / PI3K, p - Akt / Akt, p - mtor / mTOR protein expression levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Guipi Decoction has obvious improvement effect on 5 - FU - induced sarcopenia model rats, which may be related to activation of IGF - 1/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and up - regulation of IGF - 1, IGF - 1R, p - PI3K/PI3K, p - Akt/Akt, p - mTOR/mTOR protein expression.

**Key words:** Chemotherapy; Sarcopenia; Skeletal muscle; Guipi Decoction; IGF - 1/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

(责任编辑: 张秀兰)