

基于ULK1/FUNDC1通路探讨补中益气汤调控线粒体自噬防治肌少症的机制研究

付夜平¹, 杨芳^{1*}, 胡楠^{2*}, 孙鑫¹, 杨蓝鑫¹, 方佳琪¹

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110000)

【摘要】目的 探讨补中益气汤通过调控ULK1/FUNDC1通路影响线粒体自噬在肌少症防治中的作用。**方法** 将SD大鼠依次分为空白组(KB组)、模型组(MX组)、补中益气汤组(BZYQT组),模型组、补中益气汤组采用尾部悬吊法制备肌少症模型,造模同时给药,8周后对大鼠前肢和四肢肌力进行测定,随后采集各组大鼠主动脉血清及两侧腓肠肌。腓肠肌用于质量及腓肠肌指数测定。ELISA检测血清、腓肠肌组织中MyoG蛋白含量,RT-qPCR检测腓肠肌MyoD mRNA含量;HE、Masson染色观察腓肠肌病理形态变化;免疫组化检测腓肠肌中LC3蛋白表达;ELISA法、WST-1法、TBA法、比色法分别检测腓肠肌中ROS、SOD、MDA、GSH-Px表达情况及腓肠肌ATP含量;Western blot检测腓肠肌中PGC-1 α 、Belin-1、UCP2、P62、p-ULK1(Ser555)/ULK1、p-FUNDC1(Ser17)/FUNDC1、LC3-II/LC3-I蛋白表达情况。**结果** 与KB组比较,MX组大鼠腓肠肌质量、腓肠肌指数、前肢和四肢肌力、MyoG蛋白含量、MyoD mRNA含量均降低,ROS、MDA升高,SOD、GSH-Px、ATP降低,PGC-1 α 、UCP2、p-ULK1(Ser555)/ULK1、p-FUNDC1(Ser17)/FUNDC1、LC3-II/LC3-I、P62蛋白表达均降低,且腓肠肌病理发现腓肠肌明显萎缩,横截面积变小,细胞间距增大,胶原纤维增生及沉积增加。与MX组比较,BZYQT组对以上指标均能有效改善,同时能促进ULK1/FUNDC1信号通路相关蛋白的表达。**结论** 补中益气汤可通过ULK1/FUNDC1通路介导的线粒体自噬减少氧化应激改善线粒体功能,起到防治肌少症的作用。

【关键词】 肌少症; 补中益气汤; 线粒体自噬; Unc-51样自噬激活酶1/FUN14域含蛋白1

DOI:10.70976/j.1008-0805.SZGYGY-2025-1906

CSTR:3292.14.j.1008-0805.SZGYGY-2025-1906

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-0805(2025)19-3639-07

肌少症(sarcopenia)是一种与增龄相关的骨骼肌质量和肌肉力量或躯体功能下降的疾病,多见于老年人,又称肌肉衰减综合征、肌肉减少症、少肌症^[1]。肌少症作为常见的老年综合征之一,因其发病率高、起病隐匿、对机体影响广泛等特点,对家庭医疗负担与社会公共卫生支出造成巨大影响。我国对于肌少症的认识与研究起步较晚,防控干预相关建议尚未明确与统一,且无临床有效用药^[2]。肌少症的发病受包括年龄、遗传、营养不良、慢性炎症、激素水平变化等多种因素影响^[3]。

近年来研究发现,线粒体功能障碍和自噬过程的紊乱在肌少症的发生发展中扮演着重要角色^[4]。线粒体自噬是一种清除损伤线粒体、维持细胞能量平衡和功能的重要机制。Unc-51样自噬激活酶1(Unc-51

like autophagy activating kinase 1,ULK1)和FUN14域含蛋白1(FUN14 domain containing protein 1,FUNDC1)是线粒体自噬过程中的关键蛋白,它们通过相互作用调节线粒体自噬的启动和进程^[5]。

补中益气汤源自元·李东垣《内外伤辨惑论》,是中医药中经典的补益方剂,主要由黄芪、人参、白术、甘草等药材组成,具有补气健脾、调和阴阳的功效。现代药理学研究表明,补中益气汤具有调节免疫、抗炎、抗氧化等多种生物活性,对于多种疾病具有一定的防治作用^[6,7]。本研究旨在探讨补中益气汤是否通过调节ULK1/FUNDC1通路,影响线粒体自噬过程,从而对肌少症产生防治效果,以期中医药防治肌少症提供科学依据。

收稿日期:2025-01-07; 修订日期:2025-05-27

基金项目:国家自然科学基金(82104709);辽宁省应用基础研究计划(2022JH2/101300105);辽宁省应用基础研究项目(2023JH2/101700241);

辽宁省教育厅项目(2024-JYTCB-009)

作者简介:付夜平(1996-),男(汉族),河北沧州人,辽宁中医药大学在读博士研究生,硕士学位,主要从事肌少症、骨质疏松症的中医病因病机防治研究工作。

*通讯作者简介:杨芳(1978-),女(汉族),辽宁沈阳人,辽宁中医药大学教授,博士研究生导师,博士学位,主要从事肌少症、骨质疏松症的中医病因病机防治研究工作。

*通讯作者简介:胡楠(1979-),女(汉族),辽宁鞍山人,辽宁中医药大学附属医院主任医师,博士学位,主要从事神经内科疾病的诊断及中西医结合临床防治与康复研究工作。

1 材料

1.1 动物

36 只 2~3 月龄雄性 SD 大鼠,于辽宁长生生物技术公司购买(许可证号:SCXK(辽)2019-0004),体质量 180~220g。饲养于辽宁中医药大学实验动物中心 SPF 级实验动物房,实验经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(21000042022100),严格遵循 3R 原则。

1.2 药物

补中益气汤:黄芪 15 g,党参 15 g,白术 10 g,炙甘草 15 g,当归 10 g,陈皮 6 g,升麻 6 g,柴胡 12 g,生姜 9 g,大枣 6 g 组成(批号分别为 2306024101、2203174101、2112102101、2305343101、2306101101、2306388101、2302093101、2304144101、2307149101、2202229101),上述中药颗粒购自辽宁中医药大学附属医院。

1.3 试剂

ATP 检测试剂盒(碧云天,S0026);丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成,A003-1);超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成,A001-1);谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒(南京建成,A005-1);Rat ROS ELISAKit(酶免,MM-21264R1);Rat MyoG ELISA(AMEKO,202310);ULK1、FUNDC1、GAPDH(武汉三鹰批号:11306-1-AP、29005-1-AP、28519-1-AP、60004-1-IG)、p-ULK1(Ser555)、LC3A/B(abcam批号:ab62721、ab62721);p-FUNDC1(Ser17)(Affinity批号:AF0001);p62一抗(爱博泰克,A11483)。

1.4 仪器

酶标仪(InfiniteF50,奥地利tecan);全波长酶标仪(Multiskan SkyHigh,Thermo);5200 全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);Power PacTM Basic 型电泳仪、1658001 型垂直电泳槽、170-3932 型转移电泳槽(美国Bio-Rad公司);全封闭组织脱水机(Leica ASP 6025);石蜡包埋机(Leica EG1150);石蜡切片机(Leica RM2235);M8 数字病理成像系统(M8 PreciPoint);大小鼠抓力测定仪(YLS-13A,京仪)。

2 方法

2.1 动物分组

36 只 SD 雄性大鼠适应性饲养 1 周后随机分为 3 组($n=12$),空白组(KB 组,双蒸水)、模型组(MX 组,悬尾+双蒸水)、补中益气汤组(BZYQT 组,悬尾+补中益气汤)。悬尾时间为 8 周,6:00 进行灌胃,悬尾时间为 7:00 至 17:00,悬尾同时予以药物干预,KB 组、MX 组给予中药等量双蒸水;BZYQT 组给予补中益气汤 $9.36\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,每天 1 次,连续 8 周。

2.2 标本采集与处理

末次灌胃 2h 后先进行大鼠前肢及四肢肌力检测,检测结束后给大鼠注射 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉,通过腹主动脉采血并在 4°C 下以 3000r/min 的速度离心 20min,收集上层血清后存储于 -80°C 。取大鼠左侧腓肠肌保证组织完整性,用 4% 多聚甲醛固定用于后续 Masson 染色,其余分别用于后续的 RT-qPCR 及 Western blot 蛋白分析。

2.3 指标检测

2.3.1 大鼠腓肠肌质量、大鼠体质量、腓肠肌指数检测

大鼠取材前对大鼠体质量进行检测,麻醉取血后进行两侧腓肠肌的收集,用于后续腓肠肌质量及指数的测定。

2.3.2 大鼠抓力检测

末次造模 2 h 后,采用大小鼠抓力测定仪检测大鼠前肢及四肢抓力,每只大鼠测量 3 次,取平均值。

2.3.3 ELISA 检测血清中 MyoG 及腓肠肌组织中 ROS 含量

将腓肠肌组织以 1:9 的比例与抑肽酶混合后匀浆, 3000 r/min 离心 20 min 取上清,同时将离心后的血清准备好,取出酶标板,按照试剂盒说明进行操作, 450 nm 处进行测定,根据所测 OD 值绘制标准曲线计算样本浓度。

2.3.4 RT-qPCR 检测腓肠肌中 MyoD mRNA 表达情况

将组织液氮冷冻后用研钵进行研磨,Trizol 法进行 RNA 的提取,Nanodrop 测定 O. D. 260/O. D. 280 比值,计算 RNA 浓度。PrimeScript®RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行反转录操作,使用 Stratagene Mx3000p 荧光定量 PCR 仪进行检测,按 SYBR®Premix-ExTaq™II(TliRNaseH Plus),ROXplus 试剂盒进行 RT-qPCR 的检测,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因的相对表达量。PCR 引物由“Primer Premier v6.0”软件设计,由成普生物科技(上海)公司合成。见表 1。

表 1 引物信息

基因名称	碱基序列(5'→3')	碱基数	扩增物长度/bp
MyoD	F:TTTTTCATGCGACTCACA	18	123
	R:GTGGGAAAGACTGGGTGTCA	22	
GAPDH	F:TGGCAAAGTGGAGATTGTTG	21	150
	R:CGTTGAATTTGCCGTGACTG	20	

2.3.5 各组大鼠 SOD、MDA、GSH-Px、ATP 检测

严格按照试剂盒操作说明进行操作。

2.3.6 各组大鼠腓肠肌HE、Masson 染色

将腓肠肌置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h后, 然后进行石蜡包埋、切片, 常规HE及Masson染色。

2.3.7 各组大鼠腓肠肌LC3免疫组化

将4%多聚甲醛固定的腓肠肌组织依次脱蜡与水化、细胞通透与封闭抗原修复、血清封闭、孵育一抗、孵育二抗、切片显色、复染及封片拍照, 计算各组腓肠肌LC3表达情况。

2.3.8 Western blot 检测PGC-1α、Beclin-1、UCP2、p-ULK1 (Ser555)/ULK1、p-FUNDC1 (Ser17)/FUNDC1、LC3-II/LC3-I、P62蛋白表达

准备腓肠肌组织样本, 经液氮冷冻后匀浆, 用BCA法测定蛋白含量。制备SDS-PAGE凝胶并进行电泳、上样、转膜和封闭。随后, 加入稀释的一抗PGC-1α(1: 800), Beclin-1 (1: 5000), UCP2 (1: 800), p-ULK1 (Ser555) (1: 1500), ULK1 (1: 700), FUNDC1 (1: 12000), p-FUNDC1 (Ser17) (1: 1500), LC3A/B (1: 1000), GAPDH 1:30000), 在4℃下孵育过夜, 用TBST洗涤5次, 5min/次。之后, 孵育二抗(1:10000), 并通过ECL发光和成像系统进行检测, 最后用Image J软件分析条带灰度值。

2.4 统计学分析

采用SPSS 27.0 软件进行数据处理。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间差异比较采用单因素方差分析, 方差齐以Bonferroni 检验进行统计学差异的分析, 方差不齐以Tamhane's 检验进行统计学差异的分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠腓肠肌质量、体质量、腓肠肌指数对比

与KB组相比, MX组大鼠腓肠肌总质量、体质量、腓肠肌指数均降低。与MX组相比, BZYQT组大鼠腓肠肌总质量、体质量、腓肠肌指数均升高。见表2。

3.2 各组大鼠前肢及四肢肌力比较

与KB组相比, MX组大鼠前肢、四肢肌力均降低($P<0.01$)。与MX组相比, BZYQT组前肢及四肢肌力

改善较为明显, 组间差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表3。

表2 各组大鼠腓肠肌质量、体质量、腓肠肌指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	腓肠肌总质量/g	体质量/g	腓肠肌指数/%
KB组	4.32±0.47**	430.8±28.72	1.41±0.05 [#]
MX组	2.38±0.64	222.8±42.29	1.00±0.04**
BZYQT组	3.20±0.17	246.8±17.51	1.06±0.04**

与KB组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, [#] $P<0.01$; $n=5$

表3 各组大鼠前肢和四肢肌力比较($\bar{x}\pm s$) g

组别	前肢肌力	四肢肌力
KB组	993.46±33.02 [#]	1482.21±161.56 [#]
MX组	536.87±51.68**	745.11±31.76**
BZYQT组	737.79±30.56***	976.76±80.58***

与KB组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, [#] $P<0.01$; $n=8$

3.3 各组大鼠腓肠肌MyoG蛋白、MyoD mRNA 检测结果

与KB组相比, MX组大鼠MyoG蛋白、MyoD mRNA表达降低; 与MX组相比, BZYQT组大鼠MyoG蛋白、MyoD mRNA表达均升高。见表4。

表4 各组大鼠MyoG蛋白、MyoD mRNA 表达量($\bar{x}\pm s$)

组别	MyoG/mg·mL ⁻¹ ($n=8$)	MyoD mRNA($n=3$)
KB组	298.81±19.46	1.00±0.01 [#]
MX组	288.77±18.68	0.76±0.07**
BZYQT组	307.00±21.28	1.17±0.03***

与KB组比较, ** $P<0.01$; 与MX组比较, [#] $P<0.01$

3.4 各组大鼠腓肠肌ROS、SOD、MDA、GSH-Px、ATP 检测结果

与KB组相比, MX组SOD、GSH-Px、ATP表达均降低, MDA表达升高, 组间差异均具有统计学意义($P<0.01$)。与MX组相比, BZYQT组SOD、GSH-Px、ATP表达升高, MDA表达降低, 组间差异均具有统计学意义($P<0.01$)。见表5。

表5 各组大鼠ROS、SOD、MDA、GSH-Px、ATP表达情况($\bar{x}\pm s$)

组别	ROS/ ng·mL ⁻¹	SOD/ U·mg ⁻¹	MDA/ μmol·g ⁻¹	GSH-Px/ U·mg ⁻¹	ATP/ nmol·mg ⁻¹
KB组	5.35±0.96 [#]	361.32±14.83 [#]	2.27±0.26 [#]	170.36±2.44 [#]	12.99±0.35 [#]
MX组	6.21±0.57**	176.29±5.83**	3.90±0.39**	120.29±4.51**	8.01±0.19**
BZYQT组	5.50±0.30 [#]	285.91±7.15***	2.43±0.17 [#]	149.39±4.44***	12.60±0.31 [#]

与KB组比较, ** $P<0.01$; 与MX组比较, [#] $P<0.01$, [#] $P<0.05$; $n=8$

3.5 各组大鼠 HE、Masson 染色结果

与KB组相比,MX组发生明显萎缩,横截面积变小,细胞间距增大稀疏,胶原纤维增生及沉积增加。与MX组相比,BZYQT组以上病理改变均有改善。见图1、图2。

3.6 各组大鼠腓肠肌 LC3 免疫组化检测

与KB组相比,MX组 LC3 蛋白表达降低,组间差异不具有统计学意义($P>0.05$)。与MX组相比,BZYQT组 LC3 蛋白表达升高,组间差异均具有统计学意义($P<0.01$)。见图3、见表6。

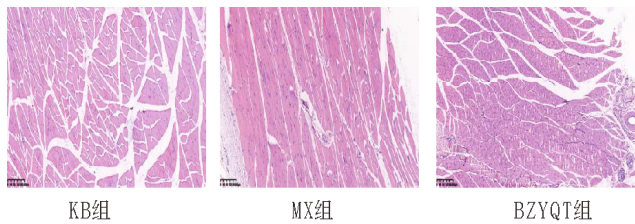


图1 各组大鼠腓肠肌病理观察
(HE 染色,bar=200μm)

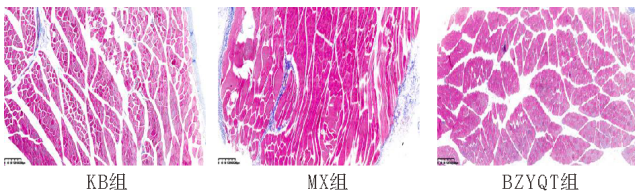


图2 各组大鼠腓肠肌病理观察
(Masson 染色,bar=200μm)

3.7 各组大鼠 PGC-1α、Beclin-1、UCP2、P62、p-ULK1 (Ser555)/ULK1、p-FUNDC1 (Ser17)/FUNDCl、LC3- II / LC3- I 蛋白检测结果

与KB组相比,MX组 PGC-1α、Beclin-1、UCP2、P62、p-FUNDC1 (Ser17)/FUNDCl、LC3- II /LC3- I 蛋白表达降低;p-ULK1 (Ser555)/ULK1 蛋白表达升高。与MX组相比,BZYQT组 PGC-1α、Beclin-1、UCP2、P62、p-ULK1 (Ser555)/ULK1、p-FUNDC1 (Ser17)/FUNDCl、LC3- II /LC3- I 蛋白均有不同程度表达的升高。见图4。

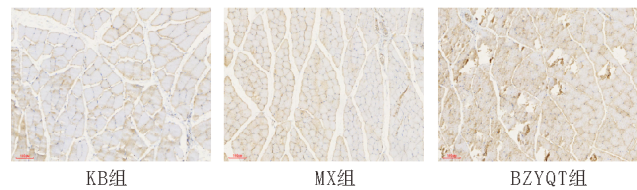
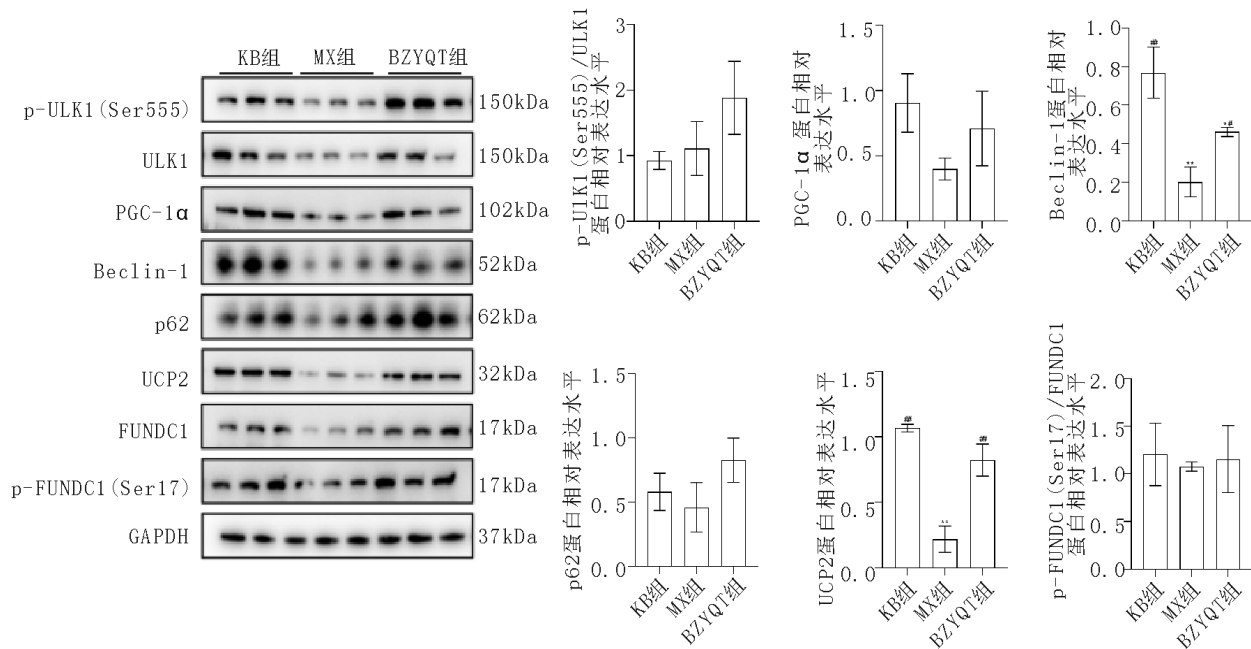


图3 各组大鼠腓肠肌 LC3 免疫组化 (bar=100 μm)

表6 各组大鼠腓肠肌 LC3 蛋白 AOD($\bar{x}\pm s$)

组别	AOD(LC3)
KB 组	222.45±5.36
MX 组	203.86±7.68
BZYQT 组	247.36±4.43***

与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;n=5



与正常组比较,** $P<0.01$,* $P<0.05$;与模型组比较,## $P<0.01$,# $P<0.05$;n=3

图4 各组大鼠蛋白表达情况

4 讨论

中医学将肌少症归属于“痿证”范畴,认为其病机主要在于脾肾虚损、气血不足。中医理论强调“脾主四

肢肌肉”,脾失健运会导致肌肉失去濡养,表现为肌肉瘦削、无力。在现代医学领域中,肌少症被明确定义为一种随着年龄增长而出现的骨骼肌质量、力量以及功能逐渐且持续性衰退的病症。其发生发展背后涵盖了

一系列复杂的因素相互交织,诸如神经肌肉系统的退行性病变、激素分泌水平的紊乱波动、炎症反应的异常激活以及蛋白质代谢过程的失衡失调等,现代医学主要通过运动疗法和营养支持来改善肌少症患者的症状^[8]。阻抗运动被认为是提高肌肉质量和功能的有效手段,而营养支持则通过补充蛋白质和维生素 D 等来促进肌肉合成^[9],而肌少症并未有明确的临床治疗用药,从中医学角度进行肌少症的防治具有一定优势。

补中益气汤是中医经典方剂之一,其主要功效为补中益气、升阳举陷。在中医理论中,脾为后天之本,主运化,是气血生化之源。脾虚则运化失职,导致气血生化不足,进而出现肌肉失养、肌肉萎缩等症状,这与现代医学中肌少症的病理机制有一定的相似性。补中益气汤通过补益脾气,促进气血的生成和运行,从而改善肌肉的营养状态,增强肌肉力量,对于肌少症具有一定的防治作用。经文献调研发现,探究补中益气汤防治肌少症的相关基础研究较少,故本研究具有一定意义。

线粒体自噬是细胞通过自噬体和溶酶体降解功能调控受损线粒体的过程。在肌少症中,线粒体自噬功能的下降会导致损伤线粒体的积累,这些损伤的线粒体不仅自身功能受损,还会通过释放有害物质(如活性氧等)影响其他细胞器和细胞的正常功能^[10]。骨骼肌细胞具有高代谢需求和有限的再生能力,因此线粒体自噬对于维持细胞内稳态至关重要^[11]。当线粒体自噬功能下降时,细胞内无法有效清除功能失调或多余的细胞器和蛋白质聚集体,导致细胞结构和功能的破坏,进一步加剧肌肉的萎缩^[12]。此外,线粒体自噬的失调与氧化应激之间存在相互作用:一方面,氧化应激会损伤线粒体,促使线粒体自噬的激活;另一方面,线粒体自噬的不足又会导致损伤线粒体的积累,进一步加剧氧化应激^[13]。这种恶性循环会加速肌少症的发展。

ULK1 是自噬启动的关键激酶,其活性受腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)的调控。在应激条件下,如低氧或能量不足时,AMPK 激活并磷酸化 ULK1,进而促进 ULK1 复合物的形成,启动自噬过程。FUNDC1 是线粒体外膜上的受体蛋白,其 LIR(LC3 interacting region)序列可以与微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)结合^[14]。ULK1 可以通过磷酸化 FUNDC1 的 Ser17 位点,增强 FUNDC1 与 LC3 的相互作用,从而促进线粒体自噬的发生^[15]。这一过程有助于清除损伤的线粒体,防止其对细胞的进一步损害。

在肌少症中,线粒体功能的下降和损伤线粒体的积累是其主要特征之一^[12]。ULK1/FUNDC1 介导的线粒体自噬能够有效清除这些损伤的线粒体,减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,从而减轻氧化

应激对肌肉细胞的损伤。此外,通过维持线粒体的质量和数量,ULK1/FUNDC1 介导的线粒体自噬有助于改善肌肉细胞的能量代谢,增强肌肉力量和功能。因此,调节 ULK1/FUNDC1 信号通路可能为肌少症的治疗提供新的策略。

研究采用尾部悬吊的方式进行肌少症大鼠模型的构建^[16],模型构建同时予以补中益气汤干预进行防治研究。目前在动物中目前没有统一的肌少症诊断标准,既往研究多以动物腓肠肌作为靶肌肉,使用靶肌肉与动物体质量的比值来判断肌肉减少症动物模型成功与否,在啮齿动物中,抓力作为评估大鼠骨骼肌力量的指标也是肌少症的评价标准之一^[17]。因此,本研究对肌少症大鼠腓肠肌质量、腓肠肌指数(%)及其前肢、四肢肌力进行了检测,同时通过分子生物学检测肌生成关键蛋白 MyoG、关键转录因子 MyoD 以及腓肠肌 HE、Masson 染色等形态学检测,明确了肌少症模型的成立。在补中益气汤干预下,能有效提高大鼠腓肠肌质量、腓肠肌指数(%)及其前肢、四肢肌力,同时明显提升 MyoG、MyoD 表达,从病理检测中更是直观看到了补中益气汤对肌少症大鼠腓肠形态、纤维化状况的明显改善。

解偶联蛋白 2(uncoupling protein 2, UCP2)是一种位于线粒体内膜的质子载体蛋白,属于解偶联蛋白家族。它通过允许质子通过线粒体内膜,导致氧化磷酸化解偶联,从而减少 ATP 的合成,能量以热的形式散失。UCP2 的这种特性使其在调节线粒体功能和能量代谢方面发挥重要作用^[18]。ROS、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)在线粒体自噬中扮演着重要角色,ROS 是线粒体自噬的重要诱导因素,MDA 是脂质过氧化的产物,其水平的升高通常反映氧化应激的加剧,SOD 活性的提高可以促进线粒体自噬的发生,而 GSH-Px 有助于减轻氧化应激对线粒体的损伤,促进线粒体自噬的发生也具有重要作用^[19]。本研究结果发现,补中益气汤能有效提高肌少症大鼠腓肠肌 UCP2 蛋白表达,降低 ROS、MDA 表达,提高 SOD、GSH-Px 表达,进一步提高 ATP 含量。

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α , PGC-1 α)是线粒体生物合成的主要调节因子,PGC-1 α 的高表达能激活其下游 TFEB、NRF1 等因子表达,影响线粒体自噬进程^[20]。Beclin-1、p62、LC3 蛋白是线粒体自噬中的关键蛋白,在线粒体自噬的启动、选择性降解和自噬体形成等过程中发挥关键作用,同时也是反应线粒体自噬速率的关键蛋白^[21],在补中益气汤干预下 PGC-1 α 、Beclin-1、p62、

LC3-II/I 蛋白表达均升高,表明补中益气汤能显著提升肌少症大鼠腓肠肌线粒体自噬效率。进一步对 ULK1/FUNDC1 信号通路蛋白进行检测,结果发现补中益气汤能干预下,p-ULK1(Ser55)/ULK1、p-FUNDC1(Ser17)/FUNDC1 蛋白表达均升高,表明补中益气汤可通过 ULK1/FUNDC1 信号通路调控线粒体自噬,进而改善肌少症大鼠腓肠肌功能,起到防治肌少症的作用。

尽管本实验取得了一定的研究成果,但仍存在一些局限性。首先,实验样本量相对较小,可能会影响结果的统计学意义和外推性。其次,对于补中益气汤中具体活性成分调控 ULK1/FUNDC1 通路的具体机制尚需进一步深入研究。此外,本实验主要以动物模型为研究对象,其在人体中的应用效果和安全性仍需通过临床试验进行验证。

未来的研究可以从以下几个方面进行拓展:一是扩大样本量,开展更大规模的动物实验和临床试验,以进一步验证补中益气汤对肌少症的防治效果及其调控 ULK1/FUNDC1 通路的作用;二是深入探讨补中益气汤中各活性成分的具体作用机制,明确其在调控 ULK1/FUNDC1 通路中的具体靶点和作用途径;三是结合现代分子生物学技术,如基因编辑、蛋白质组学等,进一步揭示补中益气汤调控 ULK1/FUNDC1 通路的分子机制。通过这些研究,将有助于更好地理解补中益气汤的作用机制,为其在肌少症防治中的应用提供更为科学的依据。

参考文献:

- [1] NUNES-PINTO M, BANDEIRADEMELLO R G, PINTO M N, et al. Sarcopenia and the biological determinants of aging: A narrative review from a geroscience perspective [J]. Ageing Res Rev, 2025, 102587.
- [2] 崔华,王朝晖,吴剑卿,等. 老年人肌少症防控干预中国专家共识(2023)[J]. 中华老年医学杂志,2023,42(2):144-153.
- [3] 代婷,陈言,郭长胜,等. 线粒体质量控制调控肌少症发病机制及其中医药干预的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2025,31(8):279-286.
- [4] 张鑫,刘静,张迪,等. 自噬相关信号通路在肌骨衰减疾病中的作用[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2024,17(5):506-512.
- [5] 付夜平,杨芳,孙鑫,等. 补肾健脾法对 OP 大鼠肌骨中 ULK1/FUNDC1 介导的线粒体自噬的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2024,30(7):953-958.
- [6] 楚爱景,陆钰原,乔佳君,等. 补中益气汤通过 TGF- β /Smad 信号通路对自身免疫性甲状腺炎大鼠 Treg 细胞的影响[J]. 中国中药杂志,2024,49(19):5288-5296.
- [7] 葛文静,单朋涛,李兵杰,等. 补中益气汤加減升麻、柴胡对脾虚泄泻大鼠胃肠、免疫功能及肠黏膜屏障的影响差异[J]. 中药新药与临床药理,2023,34(6):722-729.
- [8] SAYER A A, COOPER R, ARAI H, et al. Sarcopenia [J]. Nat Rev Dis Primers, 2024, 10(1):68-73.
- [9] 李代萍,沈妍交,郝秋奎,等. 老年肌少症综合干预循证临床实践指南(患者版)[J]. 中国循证医学杂志,2024,24(8):876-878.
- [10] 李伟,尹洪涛,孙永晨,等. 线粒体移植治疗肌少症的潜力[J]. 中国组织工程研究,2025,29(13):2842-2848.
- [11] 侯国珍,郭琪,韩佩佩. 肌少症自噬激活和线粒体质量控制信号途径的研究进展[J]. 中国医学科学院学报,2022,44(4):709-716.
- [12] 周凤珠,张曾,何燕铭. 线粒体在老年肌少症中的作用机制研究[J]. 老年医学与保健,2024,30(2):547-550.
- [13] 周艳雯,李秀芬,张长明. 线粒体功能障碍相关分子机制在肌少症发病过程中的作用研究进展[J]. 实用老年医学,2024,38(1):72-76.
- [14] 朱钰,李永华. 线粒体自噬受体 FUNDC1 研究进展[J]. 济宁医学院学报,2021,44(6):442-446.
- [15] YANG K, WU J, LI S, et al. NTRK1 knockdown induces mouse cognitive impairment and hippocampal neuronal damage through mitophagy suppression via inactivating the AMPK/ULK1/FUNDC1 pathway [J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1):404-414.
- [16] NEMOTO A, GOYAGI T. Tail suspension is useful as a sarcopenia model in rats [J]. Lab Anim Res, 2021, 37(1):7-13.
- [17] 朱师宇,吕安康,赵宇星,等. 基质金属蛋白酶-1、金属蛋白酶组织抑制因子-1 在老年肌少症大鼠中的表达及意义[J]. 南方医科大学学报,2020,40(1):104-109.
- [18] 曾垂义,王振涛,黑炫鼎,等. 抗纤益心方对扩张型心肌病大鼠心肌细胞 PKA/CaMK II 信号通路及线粒体膜电位的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2024,26(6):1601-1607.
- [19] 王亮,邓银栓,屈涛,等. 线粒体质量控制在骨关节炎中的作用机制及应用前景[J]. 中国临床药理学与治疗学,2025,30(2):282-288.
- [20] 张雪,漆正堂,丁树哲. PGC-1 α 在运动调节线粒体自噬中的作用机制研究[J]. 生命的化学,2018,38(1):119-127.
- [21] 袁宇晴,龙丹,谢超群,等. 三物白散对胃癌细胞自噬相关蛋白 Beclin1、LC3、p62 表达的影响[J]. 中医药导报,2024,30(3):30-36.

To explore the mechanism of *Buzhong Yiqi Decoction* (补中益气汤) in regulating mitochondrial autophagy in the prevention and treatment of sarcopenia based on the ULK1/FUNDC1 pathway

FU Yeping¹, YANG Fang^{1*}, HU Nan^{2*}, SUN Xin¹, YANG Lanxin¹, FANG Jiaqi¹

(1. *Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 110847, China*; 2. *Affiliated Hospital of Liaoning University of Chinese Medicine, Shenyang 110000, China*)

Abstract: Objective To investigate the role of *Buzhong Yiqi Decoction* (补中益气汤, BZYQD) in preventing and treating sarcopenia by regulating the ULK1/FUNDC1 pathway and influencing mitochondrial autophagy. **Methods** SD rats were randomly divided into the blank control group (KB group), the model group (MX group), and the BZYQD group. Sarcopenia models were established in the MX and BZYQD groups using the tail suspension method. Drugs were administered during modeling. After 8 weeks, the muscle strength of the forelimbs and hindlimbs was measured. Subsequently, aortic serum and bilateral gastrocnemius muscles of rats in each group were collected. The gastrocnemius muscle is used for the determination of mass and gastrocnemius muscle index. The MyoG protein content in serum and GAS muscle tissue was measured by ELISA, and MyoD mRNA expression in the GAS muscle was quantified by RT-qPCR. Pathological changes in the GAS muscle were observed using HE and Masson staining. LC3 protein expression in the GAS muscle was detected by immunohistochemistry (IHC). The levels of ROS, MDA, SOD, and GSH-Px, as well as the ATP content, in the GAS muscle were measured using ELISA, WST-1, TBA, and colorimetric assays, respectively. The protein expression levels of PGC-1 α , Beclin-1, UCP2, p62, p-ULK1 (Ser555)/ULK1, p-FUNDC1 (Ser17)/FUNDC1, and LC3-II/LC3-I in the GAS muscle were determined by Western blot (WB). **Results** Compared with the KB group, rats in the MX group showed decreased GAS muscle mass and index, reduced muscle strength of the forelimbs and hindlimbs, lower MyoG protein content, and diminished MyoD mRNA expression. Additionally, levels of ROS and MDA were elevated, while levels of SOD and GSH-Px, as well as ATP content, were reduced. The expression levels of PGC-1 α , UCP2, p62, the p-ULK1 (Ser555)/ULK1 ratio, the p-FUNDC1 (Ser17)/FUNDC1 ratio, and the LC3-II/LC3-I ratio were all decreased. Moreover, pathological examination of the GAS muscle revealed significant atrophy, reduced myofiber cross-sectional area, and increased interstitial space with sparse cellularity. Collagen fiber proliferation and deposition were increased. Compared with the MX group, the BZYQD group showed significant improvements in all the aforementioned parameters and also promoted the expression of proteins associated with the ULK1/FUNDC1 signaling pathway. **Conclusion** BZYQD reduces oxidative stress and alleviates mitochondrial function through ULK1/FUNDC1 pathway-mediated mitochondrial autophagy, thereby playing a role in the prevention and treatment of sarcopenia.

Key words: Sarcopenia; *Buzhong Yiqi Decoction* (补中益气汤); Mitochondrial autophagy; ULK1/FUNDC1

(责任编辑:程文锋)