

实验研究

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2025.z20241231001

毛蕊花糖苷改善线粒体功能抑制骨骼肌炎症性应激反应

汤泽玲¹, 陈莉萍¹, 马梦玲¹, 陈佳², 方培丞³, 徐志建⁴, 张勇⁴, 朱维良⁴, 龚张斌¹

1. 上海中医药大学中西医结合学院(上海 201203); 2. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心中医科(上海 200127); 3. 上海中医药大学中药学院(上海 201203); 4. 中国科学院上海药物研究所药物发现与设计中心(上海 201203)

【摘要】 目的 探讨毛蕊花糖苷(VB)通过改善线粒体功能抑制脂多糖(LPS)诱导的骨骼肌炎症性应激反应的效应,并探索其保护骨骼肌的机制。**方法** ①C57BL/6J小鼠随机分为正常组、模型组及中药组;正常组腹腔注射0.9%氯化钠溶液,连续干预7 d,1次/d;模型组腹腔注射0.9%氯化钠溶液,连续干预6 d,第7天腹腔注射5 mg/kg LPS溶液,1次/d;中药组腹腔注射150 mg/kg VB溶液,连续干预6 d,第7天腹腔注射5 mg/kg LPS溶液,1次/d。检测小鼠最大抓力和腓肠肌湿质量/体质量比值。②C2C12小鼠成肌细胞随机分为正常组、模型组及中药-低、中、高剂量组;正常组常规培养;模型组和各中药组在培养基中加终浓度为200 μ g/L的LPS;各中药组中加VB,终浓度分别为0.1 μ mol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L。细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测细胞增殖率;酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测白细胞介素-6(IL-6);Western blot法检测结蛋白(Desmin)及线粒体融合蛋白2(MFN2)表达;免疫荧光染色法检测Desmin、核因子 κ B(NF- κ B)、MFN2表达。**结果** ①与正常组比较,模型组小鼠最大抓力、腓肠肌湿质量/体质量比值减小($P<0.01$);与模型组比较,VB干预后小鼠最大抓力、腓肠肌湿质量/体质量比值增加($P<0.01$, $P<0.05$)。②在C2C12细胞中,与正常组比较,模型组6 h、12 h、24 h细胞增殖率降低($P<0.05$, $P<0.01$),IL-6水平升高($P<0.01$)。24 h后胞内MFN2及线粒体Desmin表达水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),核内NF- κ B水平升高($P<0.01$);与模型组比较,1 μ mol/L VB干预6 h、12 h、24 h后细胞增殖率升高($P<0.05$, $P<0.01$),干预12 h、24 h后IL-6水平降低($P<0.01$),干预24 h后胞内MFN2、线粒体Desmin表达水平上升($P<0.05$),核内NF- κ B水平减弱($P<0.05$)。**结论** VB通过改善线粒体功能,下调NF- κ B表达,抑制炎症因子过度合成,从而减缓骨骼肌萎缩。

【关键词】 肌少症;骨骼肌萎缩;熟地黄;毛蕊花糖苷;炎症应激;线粒体;中药研究

Verbascoside inhibits inflammatory stress response in skeletal muscles through promoting mitochondrial function

TANG Zeling¹, CHEN Liping¹, MA Mengling¹, CHEN Jia², FANG Peicheng³, XU Zhijian⁴, ZHANG Yong⁴, ZHU Weiliang⁴, GONG Zhangbin¹

1. School of Integrative Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiao Tong University Medical School, Shanghai 200127, China; 3. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 4. Drug Discovery and Design Center, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To explore whether verbascoside (VB) alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory stress in skeletal muscle by enhancing mitochondrial function, and explore its mechanism of protecting skeletal muscles. **Methods** ① C57BL/6J mice were randomly divided into normal, model, traditional Chinese medicine (TCM) groups. The normal group was intraperitoneally injected with 0.9% sodium chloride solution for 7 consecutive days, once a day. The model group was intraperitoneally injected with 0.9% sodium

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174102,81774019)

[作者简介] 汤泽玲,女,硕士研究生,主要从事中医药延缓衰老与防治老年病的研究工作

[通信作者] 龚张斌,教授,博士研究生导师;E-mail:zhangbingong@126.com。张勇,副研究员;E-mail:zhangyong109@simm.ac.cn

chloride solution for 6 consecutive days, and on the 7th day, LPS solution 5 mg/kg was intraperitoneally injected, once a day. In the TCM group, 150 mg/kg VB solution was intraperitoneally injected for 6 consecutive days, and on the 7th day, 5 mg/kg LPS solution was intraperitoneally injected, once a day. Grip strength and the ratio of wet weight to body weight of the gastrocnemius muscle (GW/BW ratio) were measured. ② C2C12 mouse myoblast cells were divided into normal, model, as well as low-, medium- and high-dose TCM groups. The normal group was cultured routinely; The model and TCM groups were cultured in medium supplemented with LPS (200 $\mu\text{g/L}$); VB was added to the TCM groups at final concentrations of 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) was used to detect cell proliferation; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure IL-6 levels; Western blot was used to analyze Desmin and mitochondrial fusion protein 2 (MFN2) expressions; Immunofluorescence staining was used to detect Desmin, NF- κB , MFN2 expressions. **Results** ① Compared with the normal group, mice in the model group had significantly lower grip strength and GW/BW ratio ($P<0.01$); After VB intervention, the maximum grip strength and GW/BW ratio of mice increased compared with the model group ($P<0.01$, $P<0.05$). ② In C2C12 cells, compared with the normal group, the model group showed decreased proliferation at 6 h, 12 h, 24 h ($P<0.05$, $P<0.01$), increased IL-6 level ($P<0.01$). After 24 h, mitochondrial MFN2 and intracellular Desmin expression levels decreased ($P<0.05$), intranuclear NF- κB level increased ($P<0.01$). Compared with the model group, 1 $\mu\text{mol/L}$ VB intervention increased cell proliferation at 6 h, 12 h, 24 h ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$), decreased IL-6 level at 12 h, 24 h ($P<0.01$); After intervention for 24 h, mitochondrial MFN2 and intracellular Desmin expression levels increased ($P<0.05$), intranuclear NF- κB level decreased ($P<0.01$). **Conclusion** VB improves mitochondrial function, reduces NF- κB expression, inhibits excessive synthesis of inflammatory factors, thereby slowing down skeletal muscle atrophy.

Keywords: sarcopenia; skeletal muscle atrophy; Rehmanniae Radix Praeparata; verbascoside; inflammatory stress; mitochondria; Chinese materia medica research

肌少症是一种以骨骼肌质量及肌肉功能逐渐下降为主要特征的老年性疾病,严重影响人们的生活质量^[1]。炎症应激反应是诱导或加剧骨骼肌萎缩的独立危险因素,炎症因子水平的异常升高通过多种机制直接影响骨骼肌功能,引发肌无力、麻痹、肌萎缩等症状^[2],增加相关疾病的发病率及病死率^[3]。炎症应激反应与线粒体功能障碍密切相关,线粒体功能障碍引发炎症反应,抑制炎症因子的表达可以有效改善骨骼肌萎缩及线粒体功能^[4]。前期研究^[5]发现,补肾健脾方能降低骨骼肌萎缩模型动物的炎症因子水平,改善骨骼肌功能,其君药熟地黄为传统的益精填髓中药。高效液相色谱法检测发现毛蕊花糖苷(verbascoside, VB)是补肾健脾方中熟地黄的主要有效成分之一。VB属于苯乙醇糖苷类化合物,在列当科、玄参科中药等传统补肾中药中含量丰富^[6],具有良好的抗氧化、抗炎、改善记忆等活性。国内外研究^[7]报道VB具有延缓衰老、免疫调节等药理作用,但鲜见其防治肌少症的效应及机制研究报道。本研究拟通过建立脂多糖(LPS)诱导炎症模型,考察VB对线粒体功能相关指标及炎症因子表达的影响,探究VB通过改善线粒体功能,抑制炎症应激反应的药理作用,初步探索其改善肌少症的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级雄性C57BL/6J小鼠,6~8周龄,体质量18~22 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0011;实验动物使用许可证号:SCXK(京)2021-0006。动物饲养

于上海中医药大学实验动物中心SPF级屏障内,12 h明/12 h暗交替循环,恒温24℃左右,相对湿度(47%±2%),适应环境饲养3 d后用于实验。动物实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会审批(伦理审批号:PZSHUTCM2307240002)。

1.1.2 细胞 C2C12小鼠成肌细胞株,购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

1.1.3 药物与试剂 VB(批号:61276-17-3),成都瑞芬思生物科技有限公司;LPS(规格:5 g/L;批号:L2654),美国Sigma-Aldrich公司; β -肌动蛋白(β -actin)、结蛋白(Desmin)、核因子 κB (NF- κB)抗体(批号分别为62346、52941、51518),上海帛龙生物科技有限公司;电压依赖性阴离子通道蛋白1(VDAC1)抗体(批号:16056),英国Abcam公司;线粒体融合蛋白2(MFN2)抗体(批号:9843S),美国Cell Signaling Technology公司;马血清(批号:E510006-0100),上海生工生物工程有限公司;胎牛血清(批号:2045512CP),美国Gibco公司;0.25%胰酶(批号:2186960),美国Thermo Fisher Scientific公司;花菁染料3(Cy3)标记山羊抗小鼠IgG(H+L)(批号:A0516),中国Arigo公司;线粒体绿色荧光探针(Mito-Tracker Green)、细胞计数试剂盒-8(CCK-8)、线粒体蛋白抽提试剂盒(批号分别为C1048、C0038、R4459),上海碧云天生物技术股份有限公司;白细胞介素-6(IL-6,批号:EK0410),上海亿崛生物科技有限公司。

1.1.4 主要仪器 全自动胶成像仪(型号:Tanon-4200SF),上海天能科技有限公司;Western blot电泳-转膜装置(型号:PowerPacTMHC),美国Bio-Rad公司;细胞培养箱、多功能酶标仪(型号分别为BB150、130-096-

334), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 大小鼠抓力测定仪(型号: YLS-13A), 山东省医学科学院设备站。

1.2 细胞培养 C2C12 细胞于含体积分数 10% 的胎牛血清的高糖培养基中进行培养, 置于体积分数 5% 的 CO₂、37 °C 的恒温培养箱, 待细胞生长至约 80%, 将培养液换为含体积分数 2% 的马血清, 待细胞分化为肌管细胞后用于后续实验。

1.3 分组、造模与干预

1.3.1 细胞实验 C2C12 小鼠成肌细胞随机分为 5 组: 正常组、模型组以及模型+VB 低、中、高剂量组(分别简称“中药-低剂量组”“中药-中剂量组”“中药-高剂量组”)。正常组在含体积分数 2% 的马血清的杜氏改良 Eagle 高糖培养基(DMEM)中培养; 模型组在上述培养基中加入终浓度为 200 μg/L 的 LPS; 中药-低、中、高剂量组在含 200 μg/L LPS 的培养基中加入 VB, 终浓度分别为 0.1 μmol/L、1 μmol/L、10 μmol/L。在不同时间节点收集样本进行实验。

1.3.2 动物实验 C57BL/6J 小鼠进行称量后, 以随机数字分组法分为正常组、模型组、中药组, 每组 6 只。以 LPS 诱导炎症模型。正常组腹腔注射 0.9% 氯化钠溶液, 连续干预 7 d, 1 次/d; 模型组腹腔注射 0.9% 氯化钠溶液, 连续干预 6 d, 1 次/d, 第 7 天腹腔注射新鲜配制的 LPS 溶液 1 次, 剂量为 5 mg/kg; 中药组腹腔注射新鲜配制的 VB 溶液, 150 mg/kg^[8], 连续干预 6 d, 1 次/d, 第 7 天腹腔注射 LPS 溶液 1 次, 剂量为 5 mg/kg。造模结束 24 h 后进行后续实验。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 小鼠抓力检测 按“1.3.2”项方法进行干预后, 让小鼠预适应抓力测试仪, 置于抓力板的中央区域, 待小鼠抓紧抓力板上的栅栏并向前探身时, 操作者抓住小鼠尾巴根部均匀用力向后牵拉, 至小鼠疲劳松爪, 仪器随即记录小鼠的最大抓力值。每只小鼠进行 2 次测试, 取其平均值。

1.4.2 小鼠腓肠肌湿质量/体质量比值检测 按“1.3.2”项方法进行干预后, 取出小鼠并安乐死, 仔细分离腓肠肌, 电子天平上称取湿质量, 计算腓肠肌湿质量与体质量的比值。

1.4.3 细胞增殖率检测 C2C12 细胞培养于 96 板, 待生长至密度为 80% 时, 将培养基更换为无血清的高糖培养基, 继续培养 12 h 后, 按“1.3.1”项干预方法加入含药物的分化培养基, 继续培养 6 h、12 h、24 h。每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂, 孵育 60 min。应用酶标仪在 450 nm 处读取每孔光密度(OD)值。细胞增殖率的计算公式: 细胞增殖率(%) = $(OD_{\text{药物组}} - OD_{\text{Blank组}}) / (OD_{\text{正常组}} - OD_{\text{Blank组}}) \times 100\%$, 其中 Blank 组仅加入培养基, 用于调零。

1.4.4 酶联免疫吸附分析(ELISA)法检测 C2C12 细胞

上清液 IL-6 水平 按“1.3.1”项干预方法加入含药物的分化培养基培养后, 吸取上清液, 4 °C、12 000 r/min 离心 1 min, 取上清 100 μL 加入包被板中(每个样本 2 个复孔), 加入按 1:100 稀释的 IL-6 一抗, 室温孵育 90 min, 加入二抗孵育 30 min, 加底物显色, 终止反应。酶标仪读取 450 nm 处 OD 值, 计算 IL-6 水平。

1.4.5 Western blot 法检测 C2C12 细胞 Desmin、MFN2 蛋白表达 按“1.3.1”项干预方法处理后, C2C12 细胞中加入放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液进行裂解以抽提总蛋白, 或应用线粒体蛋白抽提试剂盒抽提线粒体蛋白质。冰上裂解 15 min 后, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后收集上清液, 以二辛可酸(BCA)法测定蛋白质浓度。各孔取 10 μL 的蛋白质上样, 应用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质(浓缩胶, 90 V, 30 min; 分离胶, 100 V, 70 min)。将分离后的蛋白质电转移(0.25 A 电流 110 min)至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 5% 脱脂牛奶封闭 60 min, 加入 Desmin、MFN2、β-actin、VDAC1 一抗(稀释比例为 1:1 000)4 °C 孵育过夜, 加入二抗室温孵育 60 min。按照增强化学发光(ECL)试剂盒说明进行显影。总蛋白的内参为 β-actin, 线粒体蛋白的内参为 VDAC1。应用 ImageJ 软件进行分析。

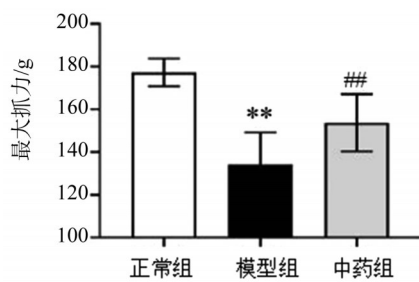
1.4.6 免疫荧光染色法检测 C2C12 细胞 Desmin、NF-κB、MFN2 蛋白胞内定位 按“1.3.1”项干预方法处理后, C2C12 细胞以 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 体积分数 0.5% 曲拉通 X-100(Triton X-100)通透破膜, 体积分数 5% 山羊血清于 37 °C 封闭 1 h。加入一抗[Desmin (1:100), NF-κB、MFN2 (1:200)], 于 37 °C 孵育 1 h。加入 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG (H+L) 二抗(1:200)避光孵育 2 h。4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)标记细胞核, Mito-Tracker Green 标记线粒体, 于倒置荧光显微镜下拍照记录, 应用 ImageJ 软件分析, 平均荧光强度(Mean) = 该区域荧光强度总和(IntDen)/该区域面积(Area)。

1.5 统计学方法 所有数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较在满足正态性分布与方差齐性基础上应用 One-way ANOVA 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

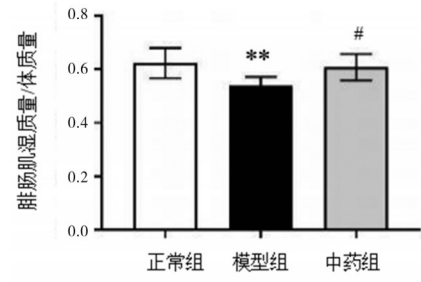
2.1 VB 对小鼠最大抓力值的影响 检测各组小鼠的最大抓力值作为评估小鼠肌力的指标之一。与正常组比较, 模型组小鼠最大抓力减弱($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组小鼠的最大抓力增强($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 VB 对小鼠腓肠肌湿质量/体质量比值的影响 与正常组比较, 模型组小鼠腓肠肌湿质量/体质量比值减小($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组小鼠的腓肠肌湿质量/体质量比值增大($P < 0.05$)。见图 2。



注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$; $n=6, \bar{x} \pm s$ 。

图1 各组小鼠最大抓力值比较

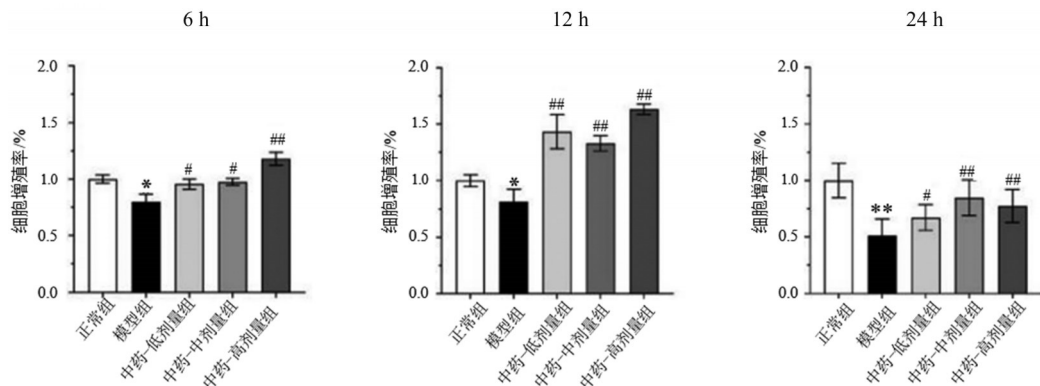


注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$; $n=6, \bar{x} \pm s$ 。

图2 各组小鼠腓肠肌湿质量与体质量比值比较

2.3 VB对C2C12细胞增殖活性的影响 不同终浓度VB(0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$)干预不同时间(6 h、12 h、24 h)后检测C2C12细胞增殖活性。与正常组比较,模型组C2C12细胞增殖活性显著降低($P<$

0.05, $P<0.01$);与模型组比较,各浓度VB干预后,C2C12细胞增殖活性均显著升高($P<0.05, P<0.01$),中浓度VB(1 $\mu\text{mol/L}$)干预6 h、12 h、24 h后,细胞增殖活性显著升高($P<0.05, P<0.01$)。见图3。



注:与正常组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$; $n=6, \bar{x} \pm s$ 。

图3 各组C2C12细胞增殖率比较

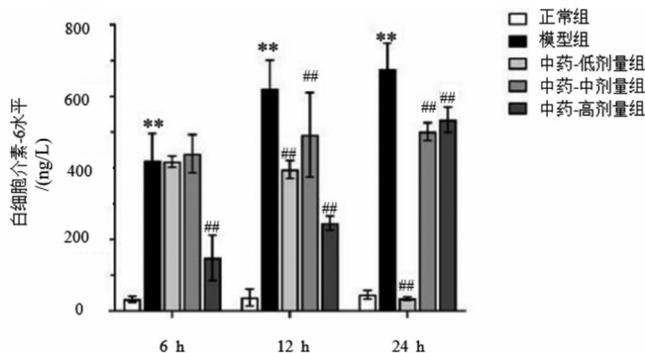
2.4 VB对C2C12细胞上清液中IL-6水平的影响 与正常组比较,LPS干预不同时间(6 h、12 h、24 h)后,C2C12细胞上清液中IL-6水平均显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,1 $\mu\text{mol/L}$ VB(中药-中剂量组)干预12 h、24 h后,C2C12细胞IL-6水平降低($P<0.01$)。见图4。综合以上结果,选择1 $\mu\text{mol/L}$ VB干预24 h进行后续实验。

白。与正常组比较,模型组C2C12细胞胞内Desmin蛋白以及线粒体MFN2蛋白表达水平平均下调($P<0.05$);与模型组比较,1 $\mu\text{mol/L}$ VB干预后,胞内Desmin蛋白和线粒体MFN2蛋白表达水平平均上调($P<0.05$)。见图5。

2.6 VB对C2C12细胞胞内Desmin、核内NF- κ B及线粒体内MFN2蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组C2C12细胞肌管形状细长,平均肌管直径减小,胞内Desmin及线粒体内MFN2水平(平均荧光强度)降低($P<0.01$),核内NF- κ B水平升高($P<0.01$)。与模型组比较,1 $\mu\text{mol/L}$ VB干预后C2C12细胞肌管形状粗壮,平均肌管直径增大,胞内Desmin及线粒体内MFN2水平升高($P<0.05, P<0.01$),核内NF- κ B水平降低($P<0.01$)。见图6~9。

3 讨论

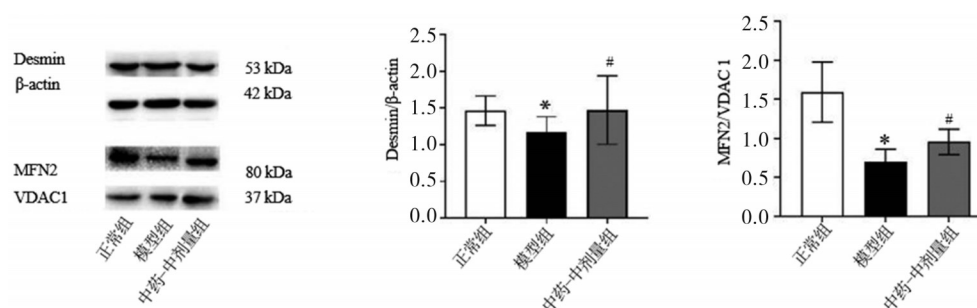
骨骼肌是人体中质量占比最大的组织,随着年龄增长,骨骼肌呈进行性萎缩,称为肌少症。亚洲老年人肌少症的患病率为5.5%~25.7%^[9],仅美国每年耗费于肌少症的医疗费用高达180亿美元,而目前尚无获批的治疗方法和公认的治疗药物,亟需探明其治疗靶点,为开发安全有效的药物奠定基础^[10]。炎症反应是推动骨



注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$; $n=6, \bar{x} \pm s$ 。

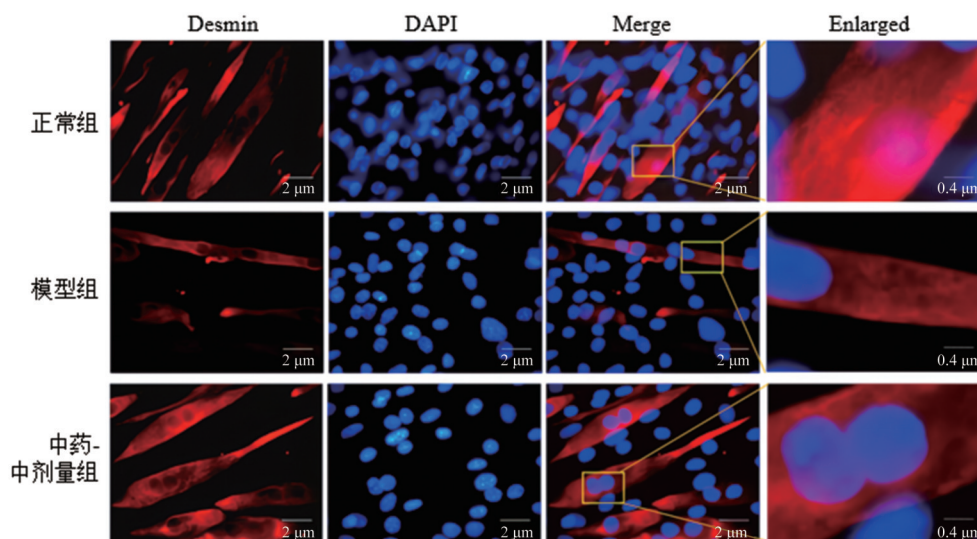
图4 各组C2C12细胞上清液白细胞介素-6水平比较

2.5 VB对C2C12细胞Desmin、MFN2蛋白表达的影响 Desmin、MFN2是评价线粒体功能的重要指标蛋



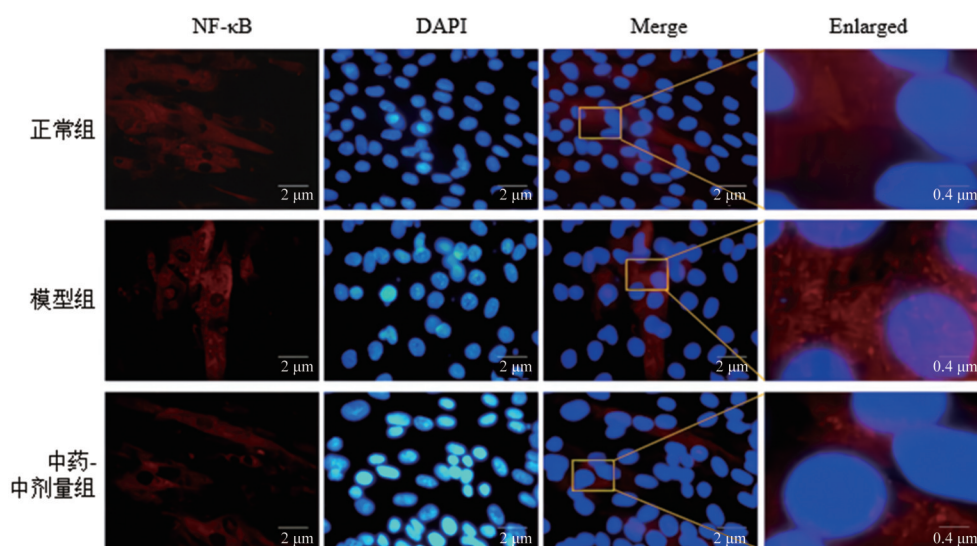
注:Desmin 为结蛋白,β-actin 为 β-肌动蛋白,MFN2 为线粒体融合蛋白 2,VDAC1 为电压依赖性阴离子选择性通道蛋白 1。与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$; $n=6, \bar{x} \pm s$ 。

图 5 各组 C2C12 细胞 Desmin、MFN2 蛋白的表达 (Western blot 法)



注:Desmin 为结蛋白,DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶,Merge 为合并,Enlarged 为放大 5 倍的图像。

图 6 各组 C2C12 细胞胞内 Desmin 蛋白免疫荧光染色结果

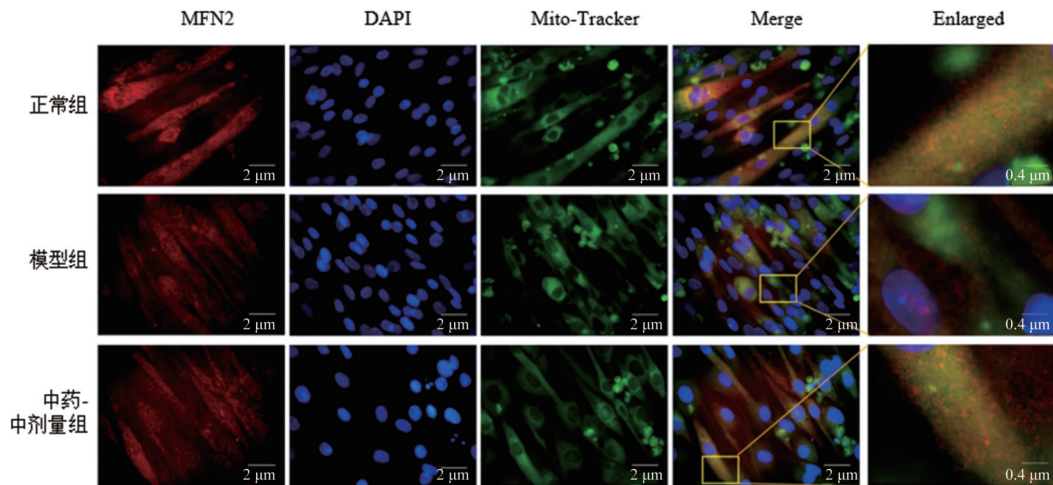


注:NF-κB 为核因子 κB,DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶,Merge 为合并,Enlarged 为放大 5 倍的图像。

图 7 各组 C2C12 细胞核内 NF-κB 蛋白免疫荧光染色结果

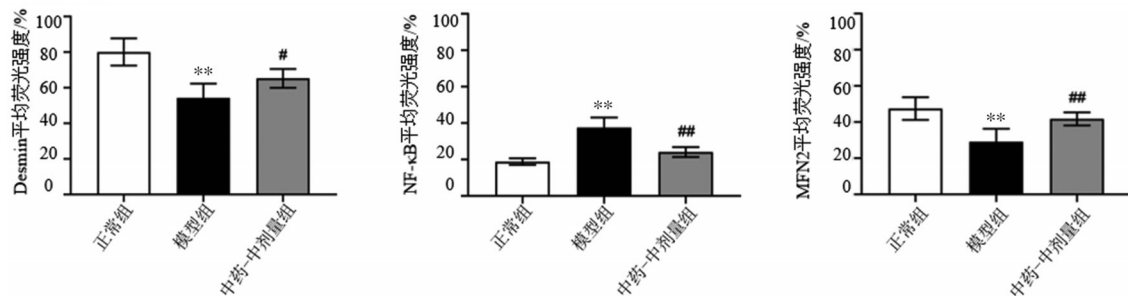
骨骼肌萎缩的核心原因之一。全身性炎症、局部(如肾脏、肺脏)炎症,均会影响骨骼肌细胞内的炎症信号传导,导致骨骼肌萎缩。线粒体作为炎症的核心调节细胞器^[11],其功能障碍会引发炎症反应,游离线粒体脱氧

核糖核酸(mtDNA)活化环鸟苷酸-腺苷酸合成酶/干扰素基因刺激蛋白(cGAS/STING1)信号通路,通过激活经典 NF-κB 通路^[12],促进 IL-6 等炎症因子表达,从而诱导骨骼肌萎缩^[13]。



注:MFN2为线粒体融合蛋白2,Mito-Tracker为线粒体荧光探针,DAPI为4',6-二脒基-2-苯基吡啶,Merge为合并,Enlarged为放大5倍的图像。

图8 各组C2C12细胞线粒体内MFN2蛋白与线粒体免疫荧光双染色结果



注:Desmin为结蛋白,NF-κB为核因子-κB,MFN2为线粒体融合蛋白2。与正常组相比,** $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;n=6, $\bar{x} \pm s$ 。

图9 各组C2C12细胞Desmin、NF-κB、MFN2平均荧光强度变化

根据其症状,肌少症在中医学中称为“肌痿”^[14]。《难经·二十四难》云“足少阴气绝,则骨枯……故骨髓不濡,即肉不着骨;骨肉不相亲,即肉濡而却”,肾主骨生髓,肾精、肾气亏虚,骨髓失于濡养,后发展为四肢肌肉痿弱无力的肌少症表现。课题组前期研究^[15]发现补肾健脾方能改善线粒体功能,其有效成分VB被证实能改善帕金森病细胞和果蝇模型中的线粒体损伤,抑制线粒体的去极化,维持线粒体的正常结构,改善线粒体功能,是一种安全有效的线粒体自噬诱导剂,具有延缓衰老、调节免疫等药理作用^[16]。

本课题组前期预实验通过配体相似性方法获得VB潜在作用靶标结果,发现VB可抑制环氧合酶(COX)活性。COX是连接炎症和慢性疾病的重要分子^[17],选择性抑制COX可改善线粒体功能损伤^[18],提示VB能通过抗炎保护骨骼肌萎缩。COX的表达和活性受NF-κB等转录因子和IL-6等炎症因子的调控。C2C12细胞膜上存在Toll样受体4,能被LPS特异性识别,引起急性炎症应激反应,激活NF-κB信号通路^[19],调控下游炎症因子IL-6合成,诱导骨骼肌内蛋白质降解,导致骨骼肌萎缩^[20]。C2C12细胞表达特有骨架蛋白Desmin,其需与线粒体相互作用才能发挥正常功能,可连接肌膜下细胞骨架、线粒体和收缩性肌原纤维,维

持肌肉细胞结构和功能的完整性^[21]。跨膜GTP酶MFN2与NF-κB通路密切相关,通过减少氧化应激、内质网应激和自噬改善线粒体形态/功能异常,在线粒体融合、运输、周转等活动中起关键作用^[22]。MFN2突变导致腓骨肌萎缩^[23],线粒体过度分裂^[24],功能紊乱。代谢性疾病患者如2型糖尿病患者、衰老个体、肥胖人群的骨骼肌中MFN2表达明显下降,伴随炎症反应^[25]。

本研究应用经典的LPS方法制作炎症应激反应模型,探讨VB保护骨骼肌萎缩的可能机制。LPS作用后,小鼠腓肠肌湿质量/体质量比值明显下降,最大抓力减弱,体外实验结果显示LPS显著抑制C2C12细胞增殖活性,诱导骨骼肌萎缩。LPS作用后,线粒体内MFN2蛋白表达水平均显著降低。

过表达MFN2可抑制NF-κB信号通路^[26];敲除MFN2后,NF-κB磷酸化,可激活相关信号通路^[27]。本研究结果提示,LPS诱导的MFN2水平降低,减弱了对NF-κB通路的抑制作用,体现于细胞核内NF-κB水平升高,NF-κB发生核转位并活化,作为转录因子调控下游炎症因子IL-6的表达,诱导炎症反应。VB干预后,上调了MFN2蛋白表达水平,改善了线粒体功能,抑制了NF-κB活化,阻遏了IL-6合成,减轻了炎症反应,进而上调了Desmin的表达水平,缓解了骨骼肌萎缩。

综上,本研究结果提示 VB 可通过改善线粒体功能,抑制炎症应激反应,防治骨骼肌萎缩,为开发有效的抑炎生肌药物提供了实验依据。

参考文献:

- [1] ZHANG H, WANG J, XI J, et al. Functional fitness and risk factors of older patients with diabetes combined with sarcopenia and/or frailty: a cross-sectional study[J]. *Nurs Open*, 2024, 11(1): e2042.
- [2] 湛妮, 邓彭博, 李园园, 等. 重症肺炎并脓毒性肌病 1 例及文献回顾[J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(3): 243-248.
- [3] WEBSTER J M, KEMPEN L, HARDY R S, et al. Inflammation and skeletal muscle wasting during cachexia[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 597675.
- [4] DHILLON R J, HASNI S. Pathogenesis and management of Sarcopenia[J]. *Clin Geriatr Med*, 2017, 33(1): 17-26.
- [5] 常岑. 基于脂质代谢组学研究补肾健脾方改善骨骼肌萎缩大鼠脂质异常沉积的机制[D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [6] 黄文静, 谢兴亮, 盛艳梅. 毛蕊花糖苷药理作用及其制剂研发进展[J]. *中草药*, 2024, 55(23): 8256-8268.
- [7] PONGKITWITOON B, PUTALUN W, TRIWITAYAKORN K, et al. Anti-inflammatory activity of verbascoside- and isoverbascoside-rich Lamiales medicinal plants[J]. *Heliyon*, 2024, 10(1): e23644.
- [8] 阿热孜古丽·阿不拉, 冯顺钱, 马慧丽, 等. 毛蕊花糖苷对溃疡性结肠炎小鼠肠道菌和炎症因子的影响[J]. *中国药理学通报*, 2025, 41(4): 646-654.
- [9] CHEN L K, WOO J, ASSANTACHAI P, et al. Asian working group for Sarcopenia: 2019 consensus update on Sarcopenia diagnosis and treatment[J]. *J Am Med Dir Assoc*, 2020, 21(3): 300-307.
- [10] PALLA A R, RAVICHANDRAN M, WANG Y X, et al. Inhibition of prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH rejuvenates aged muscle mass and strength[J]. *Science*, 2021, 371(6528): eabc8059.
- [11] YEO D, KANG C, JI L L. Aging alters acetylation status in skeletal and cardiac muscles[J]. *Geroscience*, 2020, 42(3): 963-976.
- [12] QIAN Y, CHEN C, MA L, et al. CD38 Deficiency Promotes inflammatory response through activating Sirt1/NF- κ B-mediated inhibition of TLR2 expression in macrophages[J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 8736949.
- [13] 张禹杰, 方淑蓓, 岑俊, 等. 中医药治疗肌少症的临床应用及治疗机制初探[J]. *上海中医药杂志*, 2022, 56(12): 16-22.
- [14] MARCHI S, GUILBAUD E, TAIT S W G, et al. Mitochondrial control of inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(3): 159-173.
- [15] 徐划萍, 金国琴, 龚张斌, 等. 补肾益气方药延缓骨骼肌衰老的实验研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(1): 63-66.
- [16] AIMAITI M, WUMAIER A, AISA Y, et al. Acteoside exerts neuroprotection effects in the model of Parkinson's disease via inducing autophagy: network pharmacology and experimental study[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 903: 174136.
- [17] WILEY C D, CAMPISI J. The metabolic roots of senescence: mechanisms and opportunities for intervention[J]. *Nat Metab*, 2021, 3(10): 1290-1301.
- [18] RASHID M A, TANG J J, YOO K H, et al. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 ameliorates cisplatin-induced impairments in mitochondrial and cognitive function[J]. *Front Mol Neurosci*, 2023, 16: 1295991.
- [19] MATSUKAWA S, KAI S, SEO H, et al. Activation of the β -adrenergic receptor exacerbates lipopolysaccharide-induced wasting of skeletal muscle cells by increasing interleukin-6 production[J]. *PLoS One*, 2021, 16(5): e0251921.
- [20] HAMOUDI D, BOUREDJI Z, MARCADET L, et al. Muscle weakness and selective muscle atrophy in osteoprotegerin-deficient mice[J]. *Hum Mol Genet*, 2020, 29(3): 483-494.
- [21] SUKHAREVA K S, SMOLINA N A, CHURKINA A I, et al. Desmin mutations impact the autophagy flux in C2C12 cell in mutation-specific manner[J]. *Cell Tissue Res*, 2023, 393(2): 357-375.
- [22] 徐郎海. 线粒体融合蛋白 MFN2 在软骨衰老及骨关节炎发生中的代谢紊乱和促炎作用[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
- [23] SCHREPFER E, SCORRANO L. Mitofusins, from mitochondria to metabolism[J]. *Mol Cell*, 2016, 61(5): 683-694.
- [24] NISR R B, SHAH D S, GANLEY I G, et al. Proinflammatory NF- κ B signalling promotes mitochondrial dysfunction in skeletal muscle in response to cellular fuel overloading[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(24): 4887-4904.
- [25] ABAD-JIMENEZ Z, VEZZA T, LOPEZ-DOMENECH S, et al. Impact of Roux-en-Y Gastric Bypass on mitochondrial biogenesis and dynamics in leukocytes of obese women[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(7): 1302.
- [26] LI J, WANG Y, WU T, et al. Baicalein suppresses high glucose-induced inflammation and apoptosis in trophoblasts by targeting the miRNA-17-5p-Mfn1/2-NF- κ B pathway[J]. *Placenta*, 2022, 121: 126-136.
- [27] LIU X, SUN J, YUAN P, et al. Mfn2 inhibits proliferation and cell-cycle in Hela cells via Ras-NF- κ B signal pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 197.

编辑: 杨轶舜

收稿日期: 2024-12-31