

清解扶正颗粒通过抑制线粒体依赖的凋亡、激活 AMPK-PGC-1 α 通路缓解 5-氟尿嘧啶引起的骨骼肌损伤

赵锦燕^{1,2,3}, 彭娇¹, 林明和¹, 朱晓勤^{1,2,3}, 黄彬^{1,2,3}, 林久茂^{1,2,3}

福建中医药大学¹中西医结合学院,²中西医结合研究院,³福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122

摘要:目的 探讨清解扶正颗粒(QFG)缓解5-氟尿嘧啶(5-FU)导致骨骼肌萎缩的作用及其机制。方法 采用CT26细胞制备小鼠皮下移植瘤模型,10只/组,待瘤体长至100 mm³,根据瘤体大小将小鼠分为对照(CT26)组、模型(5-FU,50 mg/kg)组、干预(5-FU,50 mg/kg+QFG,1 g/kg)组,同时设置正常组。模型组和干预组小鼠给予5-FU腹腔注射,1次/3 d;干预组同时灌胃 QFG,1次/d;正常组和对照小鼠腹腔注射和灌胃等体积的生理盐水,连续干预21 d。在干预前1 d以及干预第20天进行抓力试验和悬挂试验;在第21天取材后称量瘤体质量和腓肠肌的质量;苏木素-伊红(HE)染色、透射电镜和原位末端转移酶标记(TUNEL)法观察腓肠肌组织形态改变;比色法检测腓肠肌三磷酸腺苷(ATP)含量;免疫组织化学(IHC)方法检测腓肠肌 AMPK、PGC-1 α 、细胞色素(Cyto)C、凋亡诱导因子(AIF)、凋亡蛋白酶激活因子(Apaf)-1、第二个线粒体衍生半胱天冬氨酸蛋白酶激活剂(Smac)、B细胞淋巴瘤(Bcl)-2、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和剪切的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cleaved caspase-3)和cleaved caspase-9蛋白表达。结果 与正常组比较,对照组腓肠肌质量、抓力和悬挂评分变小($P<0.05$),腓肠肌纤维结构和超微结构损伤,线粒体减少,ATP含量降低($P<0.05$),细胞凋亡率增加($P<0.05$),腓肠肌 AMPK、PGC-1 α 、Bcl-2表达降低(均 $P<0.05$),Bax、Cyto C、AIF、Apaf-1、Smac、cleaved caspase-3和cleaved caspase-9表达升高(均 $P<0.05$)。与对照组比较,模型组腓肠肌质量、抓力和悬挂评分更小($P<0.05$),腓肠肌纤维结构和超微结构损伤严重,ATP含量降低($P<0.05$),细胞凋亡进一步增加($P<0.05$),腓肠肌 AMPK、PGC-1 α 、Bcl-2表达降低(均 $P<0.05$),Bax、Cyto C、AIF、Apaf-1、Smac、cleaved caspase-3和cleaved caspase-9表达升高(均 $P<0.05$)。与模型组比较,干预组腓肠肌质量、抓力和悬挂评分增加(均 $P<0.015$),腓肠肌纤维结构和超微结构损伤减轻,细胞凋亡减少($P<0.05$),腓肠肌 AMPK、PGC-1 α 、Bcl-2表达升高(均 $P<0.05$),Bax、Cyto C、AIF、Apaf-1、Smac、cleaved caspase-3和cleaved caspase-9表达降低(均 $P<0.05$)。结论 QFG缓解5-FU所致荷瘤小鼠的骨骼肌疲劳,其机制与AMPK/PGC-1 α 通路活化,抑制腓肠肌线粒体依赖性细胞凋亡有关。

关键词:清解扶正颗粒;腺苷酸活化蛋白激酶;过氧化物酶体增殖物受体 γ 共激活因子-1 α ;线粒体生成;骨骼肌凋亡

Qingjie Fuzheng Granules alleviates 5-fluorouracil-induced skeletal muscle injury in tumor-bearing mice by inhibiting mitochondria-dependent apoptosis and activating the AMPK-PGC-1 α pathway

ZHAO Jinyan^{1,2,3}, PENG Jiao¹, LIN Minghe¹, ZHU Xiaolin^{1,2,3}, HUANG Bin^{1,2,3}, LIN Jiumao^{1,2,3}

¹College of Integrative Medicine, ²Academy of Integrative Medicine, ³Fujian Provincial Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic mechanism of Qingjie Fuzheng granules (QFG) for alleviating 5-fluorouracil (5-FU)-induced skeletal muscle atrophy. **Methods** Male BALB/c mice bearing subcutaneous colorectal cancer CT26 cell xenografts were randomized into control group, model group, and treatment group. The mice in model and treatment groups were given intraperitoneal 5-FU injections every 3 days and treated with daily gavage of saline and QFG for 21 days, respectively; the mice in the control group and normally fed mice were given only saline gavage. Gripping test and hanging test of the mice were performed before and after the treatment, and on day 21, tumor weight and gastrocnemius muscle weight were measured, and histopathology and cell apoptosis in the gastrocnemius muscle were examined with HE staining, transmission electron microscopy and TUNEL assay. ATP content in the muscle was measured, and protein expressions of AMPK, PGC-1 α , Cyt c, AIF, Apaf-1, Smac, Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 were determined with immunohistochemistry. **Results** The tumor-bearing mice in the control group showed significantly decreased gastrocnemius muscle weight and grip and suspension test scores. The gastrocnemius muscle showed ultrastructure injuries with lowered ATP content, obvious cell apoptosis, decreased expressions of AMPK, PGC-1 α , and Bcl-2, and increased expressions of Bax, Cyto C, AIF, Apaf-1, Smac, cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9. These changes were obviously worsened in 5-FU-treated mice, while QFG treatment significantly increased gastrocnemius muscle weight and strength, ameliorated its ultrastructural injuries, reduced cell

apoptosis, and reversed the abnormal protein expressions.

Conclusion QFG alleviates 5-FU-induced skeletal muscle fatigue in tumor-bearing mice by activating the AMPK/PGC-1 α pathway and inhibiting mitochondria-dependent apoptosis in the gastrocnemius muscle.

Keywords: Qingjiefuzheng granule; AMP-activated protein kinase; peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ; mitochondrial biogenesis; skeletal muscle apoptosis

收稿日期:2025-05-17

基金项目:国家自然科学基金(81303125);福建省自然科学基金(2021J01939,2022J01368)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81303125).

作者简介:赵锦燕,博士,副研究员,E-mail: zhaojinyan0928@163.com

通信作者:林久茂,博士,研究员,E-mail: linjiumao@fjtcu.edu.cn

大肠癌(CRC)是世界上第3大常见癌症,发病率和致死率逐年增加^[1]。5-氟尿嘧啶(5-FU)是治疗CRC的一线化疗药物之一,但常伴有疲劳、食欲不振、消瘦、失眠等多种不良反应^[2,3]。化疗性疲劳(CRF)是CRC患者在化疗中最容易出现也是最难以解决的并发症之一^[4],80%~90%接受化疗的患者会出现CRF,部分患者的疲劳症状甚至可以持续数年之久,严重影响患者的生活质量^[5],限制了5-FU的临床应用。因此,减轻5-FU化疗后产生的CRF症状是改善CRC患者生活质量、提高5-FU治疗效果的重要手段。

CRF的具体机制仍未完全阐明,目前认为其发生可能是与化疗导致的肌肉功能障碍密切相关。研究表明,化疗药物引起骨骼肌细胞凋亡,诱导骨骼肌损伤,产生肌肉疲劳、无力等并发症是CRF发生的重要原因^[6,7],值得注意的是,线粒体能量代谢稳态在调节肌肉修复和维持肌肉质量方面发挥着重要作用^[8,9],骨骼肌线粒体稳态失衡是疲劳产生的重要机制。在这一过程中,腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)作为细胞能量状态的感受器通过激活过氧化物酶体增殖物受体 γ 共激活因子-1 α (PCG-1 α)促进线粒体能量代谢,AMPK/PCG-1 α 信号通路在调节线粒体功能障碍中发挥着重要作用^[10]。基于此,靶向AMPK-PCG-1 α 信号通路调节线粒体能量代谢稳态,可能为改善5-FU化疗导致的骨骼肌细胞凋亡及CRF症状提供有效策略。

临床上用以缓解CRF的药物以中枢兴奋剂及皮质类固醇类激素为主,作用单一且部分药物长期使用后具有一定毒性作用^[11]。目前仍缺乏有效的干预措施能够及时预防及治疗CRF,而中医药在调整人体状态方面具有独特优势,本团队前期研究发现,中药复方清解扶正颗粒(QFG)联合mFOLFOX4方案治疗晚期大肠癌能提高肿瘤缓解率,改善免疫功能,提高体能状态,显著提升患者生活质量^[12],然而QFG缓解化疗疲劳的机制有待深入研究。本研究采用CRF小鼠模型,观察QFG对AMPK-PCG-1 α 信号通路的影响,探讨QFG缓解骨骼肌疲劳的机制,为临床应用提供佐证。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF级BALB/c雌性小鼠40只,6~8周龄,体质量18±2 g,购自上海斯莱克实验动物责任有限公司,动物生产许可证号:SCXK(沪)2018-0003,动物使用许可证号:SYXK(闽)2019-0007。所有小鼠饲养于福建中医药大学实验动物中心,实验室12 h:12 h交替照明,室内温度与湿度恒定,自由饮食饮水,适应性喂养1周后,进行后续试验。

1.2 伦理审查

本研究通过福建中医药大学动物实验伦理委员会

批准(伦理批号:FJTCM IACUC-2021186)。

1.3 药物

QFG由炙黄芪、白花蛇舌草、半枝莲、炒麦芽按1:1:1:1组成,由福建中医药大学附属人民医院提供,用生理盐水配成100 mg/mL浓度。5-FU(上海麦克林生化科技股份有限公司),用生理盐水配成5 mg/mL溶液。

1.4 主要试剂与仪器

RPMI 1640培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Life Technologies);细胞冻存液、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(中国凯基生物技术有限公司);苏木素染色液、伊红染色液、ATP含量检测试剂盒(索莱宝科技);电镜固定液(武汉赛维尔生物);兔多克隆抗体AMPK α 1/2、兔多克隆抗体凋亡蛋白酶激活因子-1(Apaf-1)、兔多克隆抗体第2个线粒体衍生半胱天冬氨酸蛋白酶激活剂(Smac)、兔多克隆抗体剪切的半胱天冬氨酸蛋白酶9(cleaved-caspase9)(Immunoway);鼠单克隆抗体PGC-1 α 、鼠单克隆抗体Bcl-2相关X蛋白(Bax)、兔多克隆抗体B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、兔多克隆抗体细胞色素(Cyt c)、兔多克隆抗体凋亡诱导因子(AIF)(武汉三鹰);兔单克隆抗体cleaved caspase-3(Cell Signaling Technology)。

Galaxy1型二氧化碳培养箱(Heraeus);AE100型电子天平(上海奥豪斯仪器);DW-86L578J型超低温冰箱(海尔);ZL010大小鼠拉力测试仪(安徽耀坤生物);Nikon YS100型显微镜(上海蔡康光学仪器);Finesse ME+型石蜡切片机(Thermo Fisher Scientific);YT-7FB型生物组织摊烤片机、ZT-14V1型生物组织自动脱水机、JY-BMC型生物组织石蜡包埋机(湖北孝感亚光医用电子技术)。

1.5 方法

1.5.1 细胞培养 小鼠结肠癌CT26细胞接种于含10%胎牛血清及1%青霉素及链霉素的RPMI 1640中,置37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养。

1.5.2 皮下移植瘤模型制备及分组、给药 40只BALB/c小鼠适应性喂养1周后,其中30只用对数生长期的CT26细胞接种于小鼠右前肢腋窝处皮下(1×10⁷/mL,0.1 mL/只),待瘤体长至100 mm³后,按照瘤体体积大小分为3组,10只/组,即对照(CT26)组、模型(5-FU,50 mg/kg)组和干预(5-FU,50 mg/kg+QFG,1 g/kg)组,并设置正常组。5-FU腹腔注射给药,1次/3 d,QFG灌胃给药,1次/d,正常组和对照组给等体积生理盐水,连续21 d,期间大鼠常规饲养,自由进食、饮水。

1.5.3 动物取材 取材前禁食不禁水8 h,腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后脱颈处死后,剥离完整双下肢腓肠肌并称质量,取约1 cm³放入4%多聚甲醛溶液固定,用于HE染色、TUNEL染色和IHC染色,另取约

1 mm³放入2.5%戊二醛溶液固定,用于电镜观察。

1.5.4 指标检测

1.5.4.1 行为学检测 在干预第0和第20天时分别进行疲劳相关行为学检测。

1.5.4.2 抓力试验 用右手抓住小鼠的尾巴,将小鼠前肢置于抓力测定仪的抓力板前端,当其前肢抓稳时,将小鼠身体平行于抓力板(注意后肢不能碰到抓力板),以均匀且匀速的力量向后拉小鼠至抓力板尾端,以得到过程中的最大抓力,小鼠测试15次/只,取平均值。

1.5.4.3 悬挂试验 距离地面30 cm的高度水平放置一条直径为0.8 mm的金属丝,将小鼠前肢置于金属丝上,当其前肢抓稳金属丝后松手,观察小鼠的后肢抓握情况进行评分。若小鼠双侧后肢均抓住金属丝则评分为3分,仅有一侧后肢抓住金属丝则评分为2分,双侧后肢均不能抓住金属丝则评分为1分,若小鼠掉落则评分为0分。每只小鼠重复测试3次,取平均值。

1.5.4.4 爬杆试验 自制高55 cm的简易爬杆,顶端圆球直径1 cm。将实验动物放置在圆球上,记录小鼠从圆球向下移动到爬杆底部的时间。每只小鼠重复测试3次,取平均值。

1.5.5 HE染色观察腓肠肌病理结构 腓肠肌用4%多聚甲醛固定24 h后,常规脱水,石蜡包埋,切片,脱蜡,苏木素染色5 min,自来水浸洗返蓝,伊红染色5 min,中性树胶封片,每个标本选取5个视野,使用光学显微镜观察并拍照(200倍)。

1.5.6 透射电镜观察腓肠肌超微结构 2.5%戊二醛固定后用PBS冲洗,1%锇酸固定2 h,不同浓度丙酮浸染,半薄切片和定位,超薄切片,烘干后分别经2%醋酸铀水溶液染色10~15 min、柠檬酸铅染色5~8 min,透射电子显微镜观察拍照(20 000倍)。

1.5.7 TUNEL法观察腓肠肌细胞凋亡 参照TUNEL凋亡检测试剂盒说明书进行操作,石蜡切片按常规方法进行脱蜡,烘片后,滴加蛋白酶K工作液,滴加TdT酶,37℃避光反应60 min,滴加Streptavidin-Fluorescein标记液,37℃避光反应30 min,DAPI染色液复染细胞核,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,荧光显微镜观察并拍照(400倍)。正常细胞核呈蓝色,凋亡细胞为绿色。

1.5.8 免疫组织化学(IHC)染色检测 AMPK、PGC-1 α 、Cyto C、AIF、Apaf-1、Smac、Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3和cleaved caspase-9蛋白表达 石蜡切片按常规方法进行脱蜡,置于沸腾的枸橼酸钠缓冲液中进行抗原热修复,滴加内源性过氧化物酶阻断剂,加一抗工作液孵育,抗体浓度分别为AMPK α (1:200)、PGC-1 α (1:200)、Bax(1:200)、Bcl-2(1:200)、Cyt c(1:200)、AIF(1:200)、Smac(1:100)、Apaf-1(1:100)、cleaved caspase-9(1:100)、cleaved caspase-3(1:200),阴性对照片孵育

PBS,4℃孵育过夜,滴加二抗,DAB染色,苏木素复染,中性树胶封片。在光学显微镜下($\times 400$)随机采集6个视野的图像,阳性表达的判断标准为图像出现棕黄色颗粒。采用Motic 6.0图像分析系统对阳性率进行半定量分析,观察腓肠肌组织AMPK α 、PGC-1 α 、Bax、Bcl-2、Cyto c、AIF、Smac、Apaf-1、cleaved caspase-9、cleaved caspase-3蛋白表达情况。

1.5.9 腓肠肌ATP含量测定 按照试剂盒说明书进行操作,提取腓肠肌组织ATP,分别加入标准液和工作液,酶标仪340 nm处检测吸光度值A1,37℃反应3 min,340 nm处检测吸光度值A2,按公式计算ATP含量($\mu\text{mol/g}$ 质量)。

1.6 统计学分析

本研究采用SPSS 27.0软件进行数据处理。数据以均数 \pm 标准差表示,符合正态分布的计量资料,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐,组间两两比较采用LSD法。若不符合方差齐性则选用Tamhane's T_2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠瘤体质量、去瘤体质量、腓肠肌质量、抓力、悬挂评分和爬杆时间比较

与正常组比较,对照组小鼠腓肠肌质量减小($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组瘤体质量和腓肠肌质量显著减小(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,治疗组腓肠肌质量增加(均 $P < 0.05$),瘤体质量无变化($P > 0.05$,表1)。与正常组比较,对照组小鼠出现骨骼肌疲劳指征——抓力和悬挂评分变小($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组抓力和悬挂评分更小($P < 0.05$)。与模型组比较,QFG治疗组抓力和悬挂评分增大($P < 0.05$,表2)。

表1 各组小鼠瘤体质量和腓肠肌质量比较

Tab. 1 Comparison of tumor weight and gastrocnemius muscle weight in each group (g, Mean \pm SD, n=4)

| Group | Tumor weight | Gastrocnemius weight |
|-----------|------------------------------|------------------------------|
| Normal | - | 0.31 \pm 0.02 |
| Control | 10.93 \pm 1.92 | 0.25 \pm 0.01** |
| Model | 2.83 \pm 0.40 [#] | 0.21 \pm 0.01 [#] |
| Treatment | 2.74 \pm 0.57 | 0.25 \pm 0.01 Δ |
| F | 63.88 | 25.57 |
| P | <0.001 | <0.001 |

** $P < 0.05$ vs normal group; [#] $P < 0.05$ vs control group; Δ $P < 0.05$ vs model group.

2.2 各组腓肠肌组织纤维结构和超微结构比较

HE染色结果显示,正常组腓肠肌纤维呈长条形排列整齐,纤维致密,形态正常,结构完整,可见蓝色细胞核

表2 各组小鼠抓力和悬挂评分比较

Tab.2 Comparison of grip and suspension test scores in each group (Mean±SD, n=4)

| Group | Grip | Suspension score |
|-----------|--------------------------|-------------------------|
| Normal | 76.37±1.48 | 3 |
| Control | 63.45±1.66** | 2.33±0.47* |
| Model | 54.75±1.93 [#] | 1.85±0.33 [#] |
| Treatment | 69.12±2.96 ^{△△} | 2.67±0.27 ^{△△} |
| <i>F</i> | 76.63 | 9.74 |
| <i>P</i> | <0.001 | <0.01 |

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs normal group; [#] $P<0.05$, [#] $P<0.01$ vs control group; ^{△△} $P<0.01$ vs model group.

和粉红色细胞质;对照组腓肠肌纤维排列稍紊乱,肌间隙稍增大。模型组腓肠肌纤维排列紊乱,肌纤维扭曲、断裂,肌间隙明显增大;治疗组腓肠肌损伤情况明显改善,可见肌纤维排列整齐,纤维致密性变好,肌间隙减小(图1)。

透射电镜结果显示,正常组形态完整,肌浆网、Z线、M线排列整齐,有较多线粒体分布于肌浆网中;与正常组比较,对照组超微结构未见明显改变;模型组超微结构损伤严重,肌浆网紊乱,线粒体数量减少,线粒体嵴变少;与模型组比较,治疗组超微结构明显改善,线粒体数量增加(图2)。

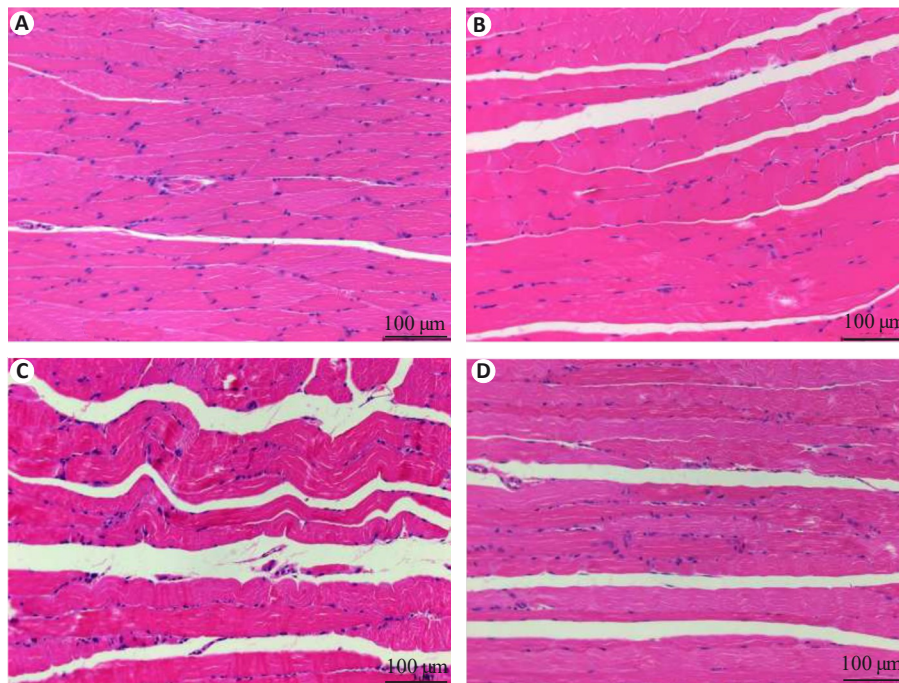


图1 各组小鼠腓肠肌HE染色结果

Fig.1 HE staining of the gastrocnemius muscle of the mice in each group. A: Normal group. B: Control group. C: Model group. D: Treatment group.

2.3 各组腓肠肌ATP含量比较

与正常组比较,对照组小鼠腓肠肌组织中ATP含量下降($P<0.01$);与对照组比较,模型组小鼠腓肠肌ATP含量明显降低($P<0.01$);与模型组比较,治疗组小鼠腓肠肌ATP含量明显增加($P<0.01$,表3)。

2.4 各组腓肠肌细胞凋亡比较

荧光显微镜观察腓肠肌细胞核,正常的细胞核呈蓝色,而凋亡的细胞核呈绿色(图3)。与正常组比较,对照组腓肠肌细胞凋亡率增加($P<0.01$);与对照组比较,模型组腓肠肌细胞凋亡率增加($P<0.01$);与模型组比较,治疗组腓肠肌细胞凋亡率降低($P<0.01$,图3、表4)。

2.5 各组腓肠肌组织AMPK、PGC-1 α 、Cyt c、AIF、Apaf-1、Smac、Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3和cleaved caspase-9蛋白表达比较

与正常组比较,对照组AMPK、PGC-1 α 、Bcl-2表达降低($P<0.01$),Bax、Cyt c、AIF、Apaf-1、Smac、cleaved caspase-3和cleaved caspase-9表达升高(均 $P<0.01$);与对照组比较,模型组AMPK、PGC-1 α 、Bcl-2表达降低(均 $P<0.01$),Bax、Cyt c、AIF、Apaf-1、Smac、cleaved caspase-3和cleaved caspase-9表达升高(均 $P<0.01$);与模型组比较,AMPK、PGC-1 α (图4、表5)、Bcl-2(图5、表6)表达升高(均 $P<0.01$),Bax、Cyt c(图5、表6)、AIF、Apaf-1、Smac(图6、表7)、cleaved caspase-3和cleaved caspase-9(图7、表8)表达降低(均 $P<0.01$)。

3 讨论

化疗引起的癌因性疲劳属于中医学“虚劳”“虚损”的范畴,是以脏腑功能衰退,气血阴阳不足为主要病机

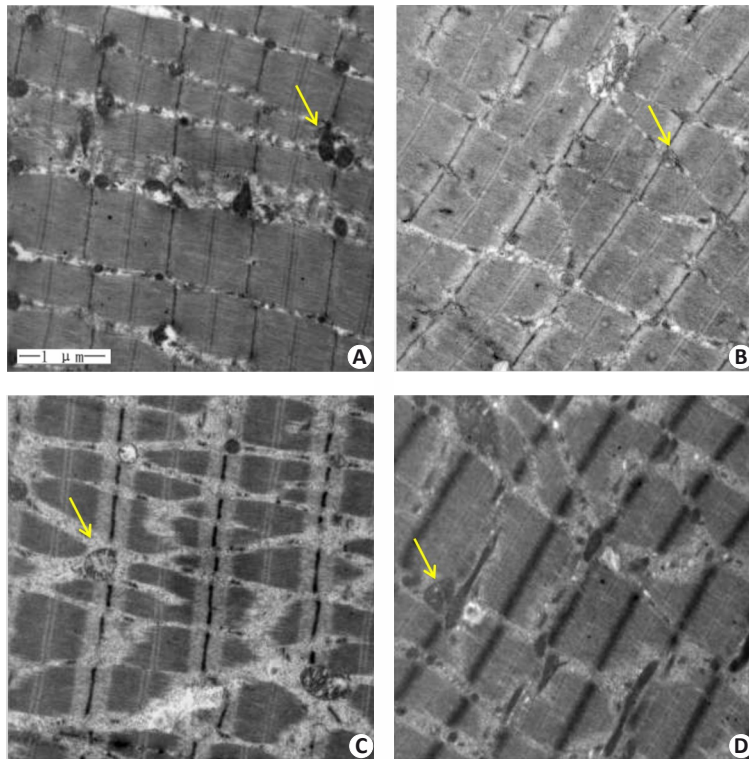


图2 各组小鼠腓肠肌透射电镜结果

Fig. 2 Transmission electron microscopy of the gastrocnemius muscle in each group (Original magnification: ×20 000). A: Normal group. B: Control group. C: Model group. D: Treatment group. Yellow arrows indicate the mitochondria.

表3 各组小鼠ATP含量比较

Tab.3 Comparison of ATP content in the gastrocnemius muscle in each group (μmol/g, Mean±SD, n=4)

| Group | Content of ATP |
|-----------|-------------------------|
| Normal | 3.31±0.25 |
| Control | 2.06±0.11** |
| Model | 0.89±0.12 [#] |
| Treatment | 1.44±0.17 ^{△△} |
| F | 113.85 |
| P | <0.001 |

**P<0.01 vs normal group; [#]P<0.01 vs control group; ^{△△}P<0.01 vs model group.

的多种慢性虚弱证候的总称^[13],古代医家多认为本病的发生与先天禀赋不足、饮食失节、劳逸失常、情志内伤、药物攻伐太过等因素有关。化疗性疲劳是癌症患者体内“癌毒”结聚,复感外邪(化疗),导致脏腑气血阴阳虚衰,久虚不复而成劳。“癌毒”刚性猛烈,长期伏结于体内,耗损正气,所谓“邪之所凑,其气必虚”,化疗药物相当于外邪,“两虚相得,乃客其形”,导致人体正气日益衰微,精微物质不断耗损,即“频感外邪,消耗气血”,终至五脏虚衰,气血亏乏,真元耗损,元神失养而发为疲乏^[14]。

化疗性疲劳证属本虚标实,故以扶正祛邪、调整阴阳为主要治则。QFG由炙黄芪、白花蛇舌草、半枝莲、炒

麦芽组成,其中白花蛇舌草和半枝莲作为君药,具有清热解毒、消肿止痛之效;炙黄芪为臣药,具有益气、健脾、扶正之功,辅助君药使其清解癌毒而不伤正气;炒麦芽为佐药,助黄芪健脾益气。四药合用,标本兼顾,攻补兼施,研究证实炙黄芪和炒麦芽均具有健脾益气,抗疲劳的功效^[15-18],且已有研究证实黄芪中含有抗疲劳的化学成分,黄芪多糖、黄芪甲苷、黄芪总黄酮均有抗疲劳增加免疫力的作用^[19-21]。白花蛇舌草和半枝莲抑制大肠癌生长^[22-24],因此,由炙黄芪、白花蛇舌草、半枝莲、炒麦芽组成的QFG抗疲劳的同时也可以抑制肿瘤生长。课题组前期研究显示QFG可以减轻化疗引起的相关不良反应(疲乏无力、食少纳呆、便溏等),改善患者生活质量,延长生存期^[12]。在前期研究的基础上,本研究通过荷瘤小鼠腹腔注射5-FU制备大肠癌化疗性疲劳模型,探讨QFG对CRF的改善作用及其分子机制。实验结果显示:与未荷瘤的正常小鼠比较,对照组小鼠出现抓力及悬挂评分减少,爬杆时间延长等明显的疲劳指征,而5-FU模型组小鼠的疲劳指征则更显著,表明荷瘤小鼠化疗性疲劳模型构建成功,在化疗的基础上同时灌服QFG则可以显著增加小鼠抓力和悬挂评分,缩短爬杆时间,显著改善小鼠的疲劳体征。此外,QFG可增加小鼠去瘤体质量及腓肠肌质量,说明QFG可以减轻5-FU对小鼠的机体损害。以上实验结果证实QFG能缓解化

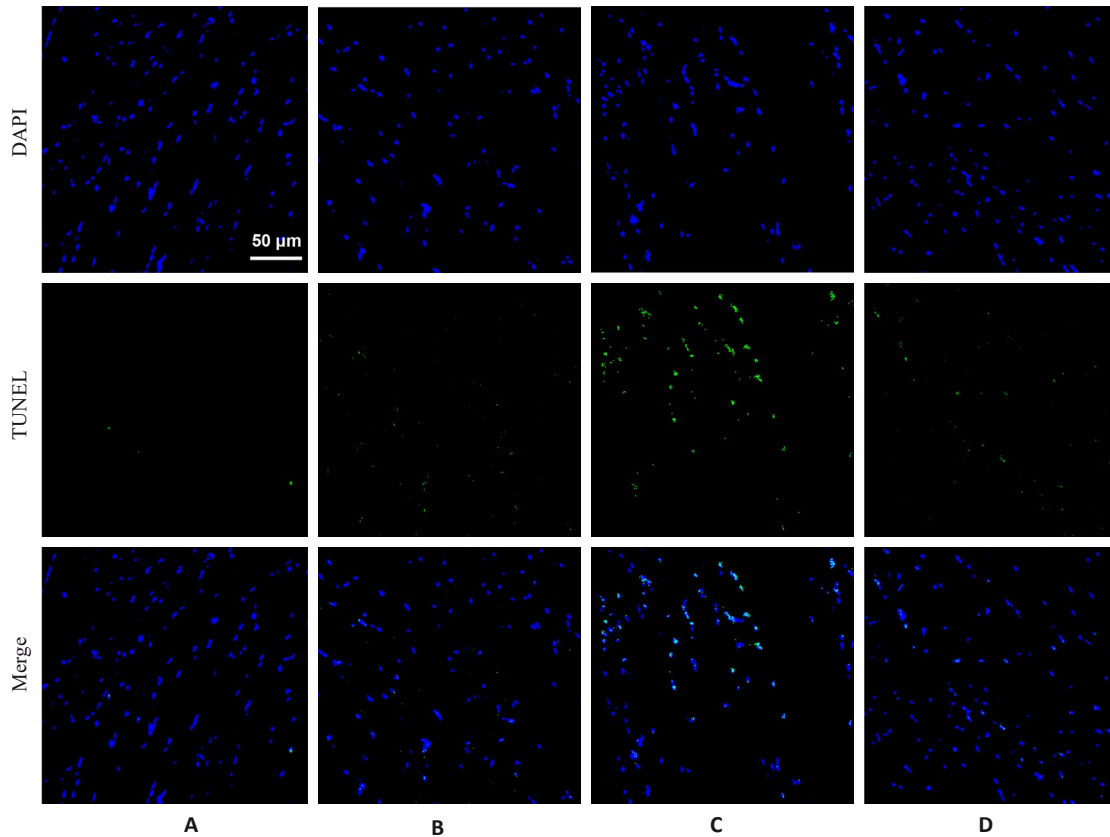


图3 各组小鼠腓肠肌TUNEL染色结果

Fig.3 TUNEL staining of the gastrocnemius muscle in each group (×400). A: Normal group. B: Control group. C: Model group. D: Treatment group.

表4 各组小鼠凋亡率比较

Tab.4 Comparison of cell apoptosis rate in the gastrocnemius muscle in each group (% , Mean±SD, n=3)

| Group | Apoptosis rate |
|-----------|--------------------------|
| Normal | 3.66±0.37 |
| Control | 14.13±0.60** |
| Model | 36.39±0.53 ^{##} |
| Treatment | 13.61±1.06 ^{△△} |
| F | 1214.94 |
| P | <0.001 |

**P<0.01 vs normal group; ^{##}P<0.01 vs control group; ^{△△}P<0.01 vs model group.

疗性疲劳,这与临床研究的结果一致,但QFG改善CRF的药效机制仍需进一步探讨。

现代医学认为,骨骼肌能量耗竭是疲劳产生的重要机制,线粒体在细胞能量代谢中发挥至关重要的作用,骨骼肌线粒体数量减少和功能障碍均是骨骼肌疲劳发生的潜在因素^[25],因此维持线粒体数量和骨骼肌能量代谢具有重要意义。研究发现AMPK/PGC-1α是调控能量代谢的重要信号通路之一^[26]。AMPK作为重要的能量感受器,当细胞内能量失衡时,AMPK被激活后促进脂肪酸氧化及糖酵解以恢复体内能量平衡,同时AMPK

也是PGC-1α的上游调控因子,而PGC-1α是线粒体生物发生和功能的关键调节因子,参与维持线粒体动态平衡,AMPK在能量匮乏时通过磷酸化PGC-1α促进线粒体的生物合成,为组织细胞提供能量^[27,28]。已有研究表明通过调控AMPK/AIRT1/PGC-1α轴,可以增加线粒体代谢效率,维持骨骼肌功能,改善5-FU导致的骨骼肌损伤^[29]。在本实验研究中,荷瘤小鼠接受5-FU化疗后镜下观察发现腓肠肌肌纤维排列紊乱,肌间隙明显增大,组织中AMPK、PGC-1α的表达及线粒体数量与ATP含量显著降低,表明5-FU会导致线粒体能量代谢紊乱,导致骨骼肌萎缩。而QFG能显著改善腓肠肌肌纤维组织结构紊乱的情况,上调腓肠肌AMPK和PGC-1α表达,增加线粒体数量和ATP含量,缓解5-FU化疗引起的骨骼肌萎缩。

骨骼肌萎缩也是骨骼肌疲劳的重要因素,线粒体损伤诱导骨骼肌细胞凋亡增加使骨骼肌纤维数量减少,从而导致骨骼肌萎缩^[30-32],因而抑制骨骼肌细胞凋亡被认为是缓解骨骼肌萎缩的重要方式。细胞凋亡涉及多种机制,包括线粒体凋亡、caspase介导的蛋白切割等^[1]。其中Bcl-2/Bax/caspase通路是线粒体凋亡的关键信号通路,研究表明Cyto c释放引起Caspase级联反应是线粒体损伤引起凋亡的重要机制^[33,34],当细胞接收到凋亡

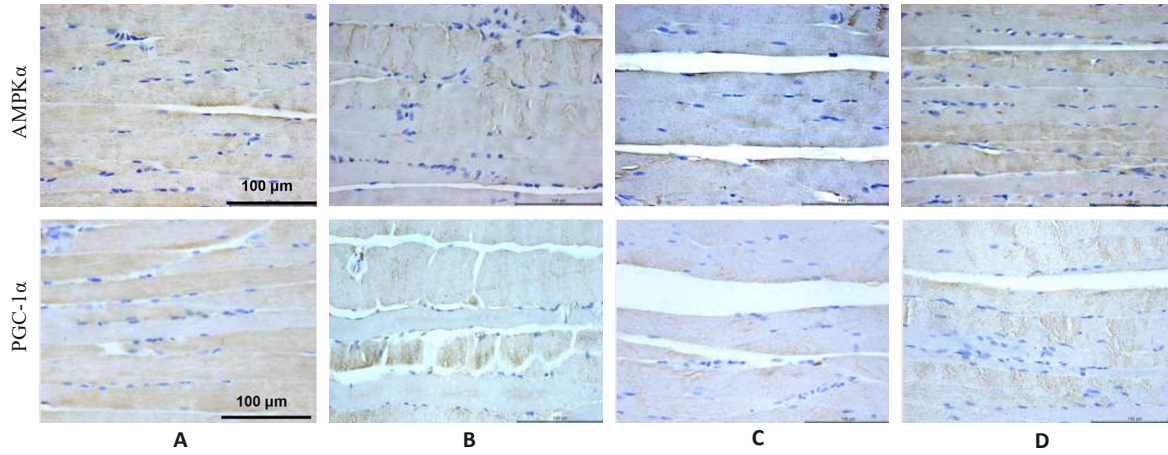


图4 各组小鼠腓肠肌AMPKα和PGC-1α蛋白表达

Fig.4 Immunohistochemistry for detecting AMPK and PGC-1α protein expressions in the gastrocnemius muscle in each group (×400). A: Normal group. B: Control group. C: Model group. D: Treatment group.

表5 各组小鼠腓肠肌AMPK和PGC-1α蛋白表达

Tab.5 Protein expression levels of AMPK and PGC-1α in the gastrocnemius muscle in each group (% , Mean±SD, n=3)

| Group | AMPK | PGC-1α |
|-----------|--------------------------|--------------------------|
| Normal | 56.46±0.62 | 57.90±1.40 |
| Control | 42.48±1.88** | 25.67±1.01** |
| Model | 16.27±1.07 ^{##} | 14.29±0.65 ^{##} |
| Treatment | 21.8±1.17 ^{△△} | 20.67±2.00 ^{△△} |
| F | 648.10 | 406.17 |
| P | <0.001 | <0.01 |

**P<0.01 vs normal group; ^{##}P<0.01 vs control group; ^{△△}P<0.01 vs model group.

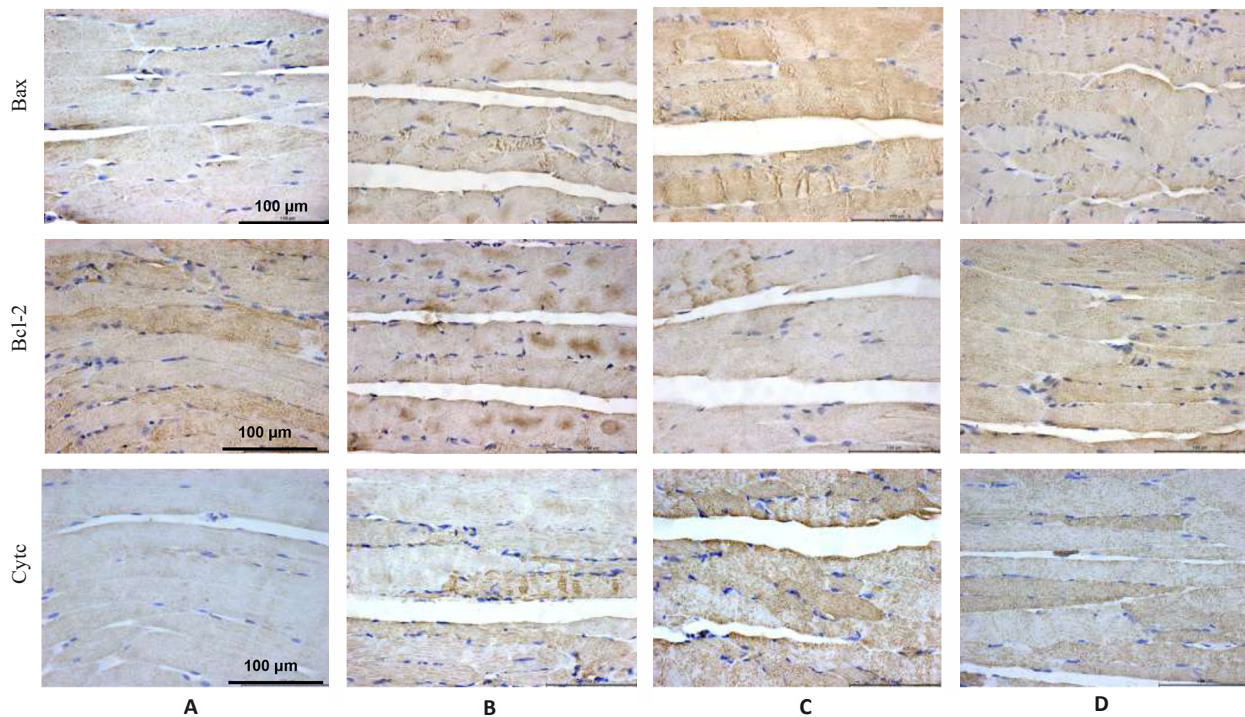


图5 各组小鼠腓肠肌Bax、Bcl-2和Cyt c蛋白表达

Fig.5 Immunohistochemistry for detecting Bax, Bcl-2 and Cyt c protein expressions in the gastrocnemius muscle in each group (×400). A: Normal group. B: Control group. C: Model group. D: Treatment group.

表6 各组小鼠腓肠肌Bax、Bcl-2和Cyt c蛋白表达

Tab.6 Protein expression levels of Bax, Bcl-2 and Cyt c in the gastrocnemius muscle in each group (% , Mean±SD, n=3)

| Group | Bax | Bcl-2 | Cyt c |
|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Normal | 29.42±0.79 | 71.08±1.53 | 20.41±0.53 |
| Control | 51.03±1.74** | 55.40±0.92** | 43.32±1.55** |
| Model | 80.67±1.36 ^{##} | 37.53±1.41 ^{##} | 69.45±1.13 ^{##} |
| Treatment | 33.38±1.0 ^{△△} | 57.27±1.07 ^{△△} | 38.02±0.96 ^{△△} |
| <i>F</i> | 661.12 | 293.84 | 674.29 |
| <i>P</i> | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

***P*<0.01 vs normal group; ^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{△△}*P*<0.01 vs model group.

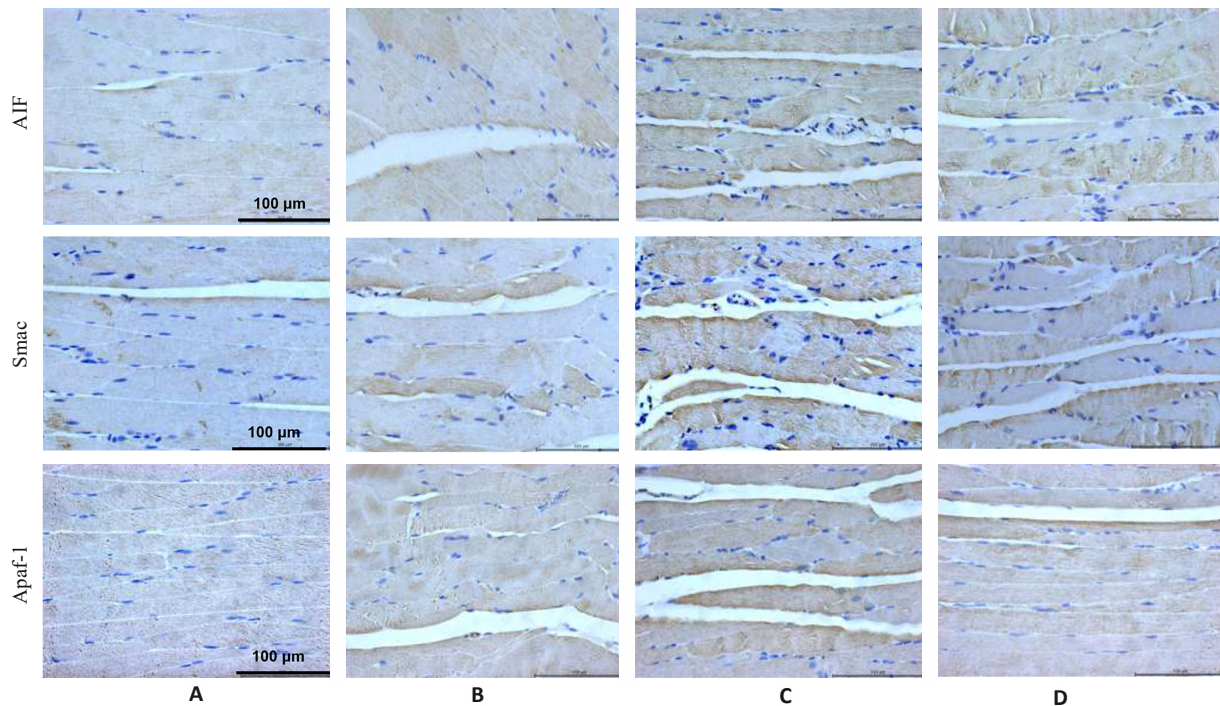


图6 各组小鼠腓肠肌AIF、Smac及Apaf1蛋白表达

Fig.6 Immunohistochemistry for detecting AIF, Smac and Apaf1 protein expressions in the gastrocnemius muscle in each group (×400). A: Normal group. B: Control group. C: Model group. D: Treatment group.

表7 各组小鼠腓肠肌AIF、Smac和Apaf1蛋白表达

Tab.7 Protein expression levels of AIF, Smac and Apaf1 in the gastrocnemius muscle in each group (% , Mean±SD, n=3)

| Group | AIF | Smac | Apaf1 |
|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Normal | 17.09±0.58 | 18.21±0.66 | 19.54±0.51 |
| Control | 36.43±0.50** | 36.41±0.69** | 39.32±0.69** |
| Model | 51.70±0.55 ^{##} | 51.23±1.72 ^{##} | 49.32±1.27 ^{##} |
| Treatment | 27.24±0.32 ^{△△} | 23.59±1.59 ^{△△} | 29.63±1.68 ^{△△} |
| <i>F</i> | 1719.99 | 270.47 | 252.82 |
| <i>P</i> | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

***P*<0.01 vs normal group; ^{##}*P*<0.01 vs control group; ^{△△}*P*<0.01 vs model group.

信号刺激时,Bcl-2家族抗凋亡蛋白Bcl-2表达减少,促凋亡蛋白Bax表达增加,Bax转位到线粒体外膜,导致线粒体外膜通透性增加^[35-37],线粒体膜电位下降,Cyt c、

AIF和Smac释放入胞质^[38,39],其中Cyt c、Apaf-1和pro-caspase-9结合^[40],形成凋亡复合体,继而剪切caspase-9,激活下游caspase-3级联反应,使细胞骨架发

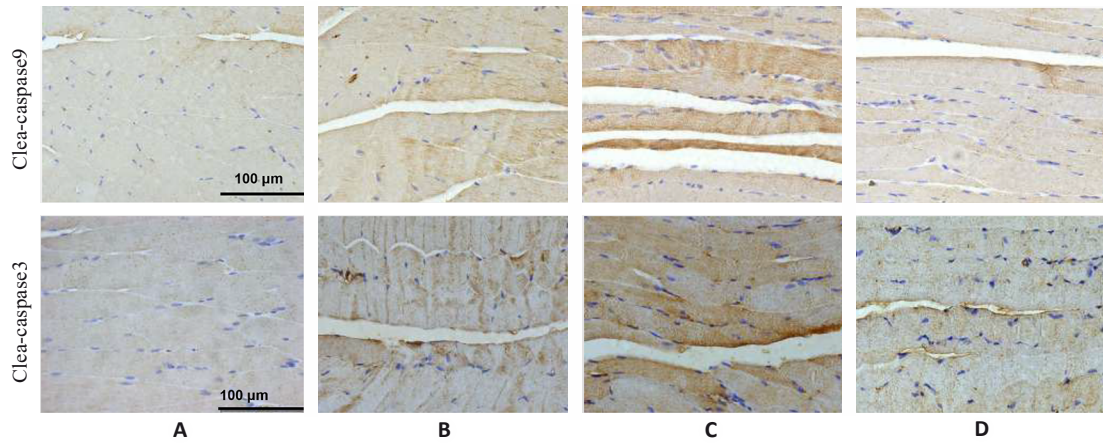


图7 各组小鼠腓肠肌cleaved caspase-9和cleaved caspase-3蛋白表达
Fig.7 Immunohistochemistry for detecting cleaved caspase-9 and cleaved caspase-3 expressions in the gastrocnemius muscle in each group (×400). A: Normal group. B: Control group. C: Model group. D: Treatment group.

表8 各组小鼠腓肠肌cleaved caspase-9和cleaved caspase-3蛋白表达

Tab.8 Protein expression levels of cleaved caspase-9 and cleaved caspase-3 in the gastrocnemius muscle in each group (% , Mean±SD, n=3)

| Group | Cleaved-caspase9 | Cleaved-caspase3 |
|-----------|---------------------------|---------------------------|
| Normal | 16.35±0.34 | 19.61±0.50 |
| Control | 44.50±0.84** | 29.94±1.60** |
| Model | 90.65±0.80 ^{###} | 58.86±1.33 ^{###} |
| Treatment | 20.08±0.43 ^{△△} | 20.67±2.00 ^{△△} |
| F | 2244.19 | 569.43 |
| P | <0.001 | <0.01 |

**P<0.01 vs normal group; ^{###}P<0.01 vs control group; ^{△△}P<0.01 vs model group.

生最终裂解,引起细胞凋亡;AIF进入到细胞核里与染色体结合,使其变成紧密凝集状态并发生断裂,引起细胞凋亡;而Smac抑制凋亡抑制蛋白(IAP)表达,促进细胞凋亡^[41]。在本实验研究中,与对照组比较,模型组小鼠腓肠肌中Bcl-2表达显著下调,而Bax、Cyto C、AIF、Apaf-1、Smac、cleaved caspase-3和cleaved caspase-9的表达均显著上调,说明5-FU导致Bax/Bcl-2比值失衡使线粒体膜通透性增加,同时促进Cyto c释放使细胞凋亡增加,引起骨骼肌细胞损伤。而QFG则能使腓肠肌中的Bcl-2显著上调,同时抑制Bax、Cyto C、AIF、Apaf-1、Smac、cleaved caspase-3和cleaved caspase-9表达,提示QFG能够抑制5-FU引起的线粒体凋亡,从而改善骨骼肌萎缩。

综上所述,QFG能够有效减轻5-FU对荷瘤小鼠的机体损害,能改善5-FU引起的化疗性疲劳,其作用机制可能是与QFG通过调控AMPK/PGC-1α信号通路改善线粒体能量代谢,抑制线粒体依赖途径的凋亡,从而缓解骨骼肌萎缩有关。本研究通过体内实验探讨QFG对

化疗性疲劳的作用及其分子机制,为其运用于临床提升5-FU治疗大肠癌的疗效及患者的耐受性应用上提供了实验依据,该研究只初步研究了清解扶正颗粒缓解荷瘤小鼠化疗性疲劳的机制,深入的机制以及清解扶正颗粒的有效成分尚需进一步研究和探讨。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Cao WY, Li JH, Yang KP, et al. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress[J]. Bull Cancer, 2021, 108(3): 304-22.
- [2] Beesley VL, Ross TL, King MT, et al. Evaluating patient-reported symptoms and late adverse effects following completion of first-line chemotherapy for ovarian cancer using the MOST (Measure of Ovarian Symptoms and Treatment concerns) [J]. Gynecol Oncol, 2022, 164(2): 437-45.
- [3] Fox RS, Ancoli-Israel S, Roesch SC, et al. Sleep disturbance and cancer-related fatigue symptom cluster in breast cancer patients undergoing chemotherapy[J]. Support Care Cancer, 2020, 28(2): 845-55.
- [4] Liu WM, Liu J, Ma L, et al. Effect of mindfulness *Yoga* on anxiety and depression in early breast cancer patients received adjuvant chemotherapy: a randomized clinical trial[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2022, 148(9): 2549-60.
- [5] Zhang H, Meng YT, Jiang RX, et al. Effect of multimodal exercise on cancer-related fatigue in patients undergoing simultaneous radiotherapy and chemotherapy: a randomized trial in patients with breast cancer[J]. Altern Ther Health Med, 2023, 29(5): 233-7.
- [6] Mallard J, Hucteau E, Charles AL, et al. Chemotherapy impairs skeletal muscle mitochondrial homeostasis in early breast cancer patients[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2022, 13(3): 1896-907.
- [7] Mallard J, Hucteau E, Bender L, et al. A single chemotherapy administration induces muscle atrophy, mitochondrial alterations and apoptosis in breast cancer patients[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2024, 15(1): 292-305.

- [8] Jahnke VE, Peterson JM, Van Der Meulen JH, et al. Mitochondrial dysfunction and consequences in calpain-3-deficient muscle[J]. *Skelet Muscle*, 2020, 10(1): 37.
- [9] 黄燕峰, 朱达坚, 鲁路. 黄芪多糖对慢性疲劳小鼠骨骼肌线粒体功能的影响及作用机制[J]. *广东医学*, 2017, 38(12): 1789-94.
- [10] 张璐, 丁焕章, 许浩燃, 等. 参芪补中方通过激活 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 改善 COPD 肺脾气虚证大鼠线粒体功能障碍[J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(5): 969-976.
- [11] 关海燕, 张洪亮. 恶性肿瘤患者化疗引起癌因性疲乏的中西医研究进展[J]. *新疆中医药*, 2018, 36(5): 119-21.
- [12] 华杭菊, 林久茂, 任丽萍, 等. 清解扶正方联合 mFOLFOX4 方案治疗晚期大肠癌的疗效观察[J]. *福建中医药*, 2019, 50(1): 20-1, 24.
- [13] 王泽坤, 陈晓琦, 陈召起, 等. 癌因性疲乏的中西医研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(3): 1185-9.
- [14] 周婷, 吴泳蓉, 熊家青, 等. 癌因性疲乏的中医病因探析[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(2): 982-5.
- [15] Wei XT, Xin JY, Chen W, et al. *Astragalus* polysaccharide ameliorated complex factor-induced chronic fatigue syndrome by modulating the gut microbiota and metabolites in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114862.
- [16] Dong J, Wang S, Gui YR, et al. *Astragalus membranaceus* (Huang Qi) for cancer-related fatigue: a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101(3): e28633.
- [17] 余意, 胡明华, 张丹丹, 等. 黄芪多糖对气虚大鼠的补气作用及其机制探讨[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(4): 505-10.
- [18] 徐振秋, 李雪峰, 张海波, 等. 麦芽油软胶囊缓解体力疲劳作用的研究[J]. *食品与发酵科技*, 2015, 51(5): 17-9, 26.
- [19] 郝浩帆, 姚佳霖, 王宝亮, 等. 黄芪及其有效成分治疗重症肌无力的作用机制研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2025, 43(10): 171-5.
- [20] 柴梦音, 寇卜心, 豆双双, 等. 黄芪超微粉抗急性肝损伤、抗疲劳作用及黄芪甲苷含量的变化[J]. *现代中医药*, 2022, 42(5): 26-32.
- [21] 吴娇, 全芳超. 黄芪的化学成分、药理作用及临床应用[J]. *滨州医学院学报*, 2024, 47(1): 68-75.
- [22] Wu ZH, Yin B, You FM. Molecular mechanism of anti-colorectal cancer effect of *Hedyotis diffusa* Willd and its extracts[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 820474.
- [23] Zhu DY, Yuan SM, Chen C. *Hedyotis diffusa*-*Scutellaria barbata* (HD-SB) suppresses the progression of colorectal cancer cells via the hsa_circ_0039933/hsa-miR-204-5p/wnt11 axis[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 13331.
- [24] Yang ZP, Lu S, Tang HZ, et al. Molecular targets and mechanisms of *Hedyotis diffusa*-*Scutellaria barbata* herb pair for the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and molecular docking[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 6186662.
- [25] Yang SW, Chu SF, Gao Y, et al. A narrative review of cancer-related fatigue (CRF) and its possible pathogenesis[J]. *Cells*, 2019, 8(7): 738.
- [26] Deng XH, Zhang SW, Wu JZ, et al. Promotion of mitochondrial biogenesis via activation of AMPK-PGC1 α signaling pathway by ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extract, and its major active component 6-gingerol[J]. *J Food Sci*, 2019, 84(8): 2101-11.
- [27] Sun SN, Yang SR, Cheng Y, et al. Jinlida granules alleviate podocyte apoptosis and mitochondrial dysfunction via the AMPK/PGC-1 α pathway in diabetic nephropathy[J]. *Int J Mol Med*, 2025, 55(2): 26.
- [28] Fontana F, Macchi C, Anselmi M, et al. PGC1- α -driven mitochondrial biogenesis contributes to a cancer stem cell phenotype in melanoma[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(1): 166897.
- [29] 苏东东, 靳庆瑞, 赵梦, 等. 参兰颗粒通过 AMPK/PGC-1 α /NRF1 介导的线粒体保护改善阿霉素性心脏毒性[J]. *中药药理与临床*, 2025, 41(9): 2-9.
- [30] Yang XF, Xue PP, Chen HR, et al. Denervation drives skeletal muscle atrophy and induces mitochondrial dysfunction, mitophagy and apoptosis via miR-142a-5p/MFN1 axis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(3): 1415-32.
- [31] Piao LM, Huang Z, Inoue A, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells ameliorate aging-associated skeletal muscle atrophy and dysfunction by modulating apoptosis and mitochondrial damage in SAMP10 mice[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 226.
- [32] Cao YY, Wang Z, Yu T, et al. Sepsis induces muscle atrophy by inhibiting proliferation and promoting apoptosis via PLK1-AKT signalling[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(20): 9724-39.
- [33] Nguyen TT, Wei SB, Nguyen TH, et al. Mitochondria-associated programmed cell death as a therapeutic target for age-related disease[J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(8): 1595-619.
- [34] Gu J, Rauniyar S, Wang Y, et al. Chrysophanol induced glioma cells apoptosis via activation of mitochondrial apoptosis pathway[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 6855-68.
- [35] Cosentino K, Hertlein V, Jenner A, et al. The interplay between BAX and BAK tunes apoptotic pore growth to control mitochondrial-DNA-mediated inflammation[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(5): 933-49.e9.
- [36] Zhang S, Rao SJ, Yang MW, et al. Role of mitochondrial pathways in cell apoptosis during He-patic ischemia/reperfusion injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 2357.
- [37] Wang HJ, Zhang CW, Li MN, et al. Antimicrobial peptides mediate apoptosis by changing mitochondrial membrane permeability[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12732.
- [38] Flores-Romero H, Dadsena S, García-Sáez AJ. Mitochondrial pores at the crossroad between cell death and inflammatory signaling[J]. *Mol Cell*, 2023, 83(6): 843-56.
- [39] Cetraro P, Plaza-Diaz J, MacKenzie A, et al. A review of the current impact of inhibitors of apoptosis proteins and their repression in cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(7): 1671.
- [40] Picca A, Calvani R, Coelho-Junior HJ, et al. Cell death and inflammation: the role of mitochondria in health and disease[J]. *Cells*, 2021, 10(3): 537.
- [41] Barroso T, Melo-Alvim C, Ribeiro LA, et al. Targeting inhibitor of apoptosis proteins to overcome chemotherapy resistance—a marriage between targeted therapy and cytotoxic chemotherapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17): 13385.

(编辑: 经媛)