十全大补汤含药血清对*D*-半乳糖诱导C2C12细胞萎缩的保护作用

董炳垚[1#], 李蔚瑶[1#], 何 盼[2], 李震宇[1*], 秦雪梅[1*]

(1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西 太原 030006; 2. 山西中医药大学, 山西 晋中 030619)

摘要: 肌少症是与年龄相关的进行性肌肉量和功能丧失疾病, 严重威胁老年人生活质量和生存率。十全大补汤为经典补益方, 具益气补血之效, 现代研究显示十全大补汤对肌少症具有潜在干预作用。为探讨十全大补汤对肌少症的保护作用及机制, 本研究通过制备十全大补汤水煎液, 灌胃大鼠后采集其含药血清, 利用UHPLC-Q-TOF-MS鉴定入血成分。本研究动物实验遵循山西中医药大学科学研究伦理委员会的规定并通过动物实验伦理审查 (批准编号: AWE202403229)。以含药血清干预*D*-半乳糖 (*D*-gal) 诱导的C2C12肌管细胞衰老模型, 采用CCK-8检测细胞活性, DCFH-DA探针检测活性氧水平, JC-1染色检测线粒体膜电位, 流式细胞术分析细胞周期, RT-qPCR检测肌分化相关因子 (*MyoD*、*MyoG*、*Mstn*) 及衰老基因 (*p53*) 表达。LC-MS拟靶向代谢组学筛选差异代谢物并分析相关通路。结果表明, 15%含药血清能够显著提高细胞存活率, 降低活性氧水平, 恢复线粒体膜电位, 减少G0/G1期细胞阻滞, 促进细胞周期进程, 且能够上调*MyoD*、*MyoG*表达, 下调*Mstn*、*p53*表达。进一步拟靶向代谢组学分析表明, 含药血清干预后, 可回调119个差异代谢物 (42个上调, 77个下调), 主要涉及氨基酸、核苷酸、能量和糖代谢等通路。本研究表明, 十全大补汤含药血清通过多靶点、多通路协同作用, 改善线粒体功能、调控细胞周期并促进肌分化, 从而对*D*-gal诱导的肌管细胞萎缩发挥保护作用。

关键词: 肌少症; C2C12成肌细胞; 细胞萎缩; 十全大补汤含药血清; 细胞代谢组学

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)03-0835-10

Protective effect of drug-containing serum from Shiquandabu Decoction on *D*-galactose-induced atrophy of C2C12 cells

DONG Bing-yao[1#], LI Wei-yao[1#], HE Pan[2], LI Zhen-yu[1*], QIN Xue-mei[1*]

(*1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine of Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China*)

Abstract: Sarcopenia is an age-related progressive disease characterized by the loss of skeletal muscle mass and function, which seriously threatens the quality of life and survival of elderly individuals. Shiquandabu Decoction is a classical traditional Chinese herbal formula known for its effects in benefiting Qi and nourishing blood, and modern studies have demonstrated its potential therapeutic effects on sarcopenia. To investigate the protective effects and underlying mechanisms of Shiquandabu Decoction against sarcopenia, this study prepared its water decoction, administered it to rats by gavage, collected the drug-containing serum, and identified the components absorbed into the blood using UHPLC-Q-TOF-MS. The animal experiments in this study were conducted in compliance with the regulations of the Scientific Research Ethics Committee of Shanxi University of Chinese Medicine and approved by the Animal Experimentation Ethics Review (approval No.: AWE202403229).

收稿日期: 2025-06-22; 修回日期: 2025-10-27.

基金项目: 山西省卫健委中医药科研课题 (2024ZYYA026); 山西省中医药科技创新工程项目 (2024kjzy002); 国家自然科学基金资助项目 (82405058); 山西中医药大学博士科研启动基金 (2024BK05).

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn; lizhenyu@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0705

The drug-containing serum was used to treat a *D*-galactose (*D*-gal)-induced senescent C2C12 myotube model. CCK-8 was used to detect cell activity, DCFH-DA probe was used to detect reactive oxygen species (ROS) levels, JC-1 staining was used to detect mitochondrial membrane potential, flow cytometry was used to analyze the cell cycle, and RT-qPCR was used to detect the expression of myogenic differentiation-related factors (*MyoD*, *MyoG*, and *Mstn*) and senescence gene (*p53*). LC-MS proposed targeted metabolomics to screen for differential metabolites and analyze related pathways. The results showed that 15% drug-containing serum was able to significantly increase the cell survival rate, reduce the ROS levels, restore the mitochondrial membrane potential, reduce the G0/G1 phase cellular block, and promote the cell cycle process, and it was able to up-regulate the expression of *MyoD* and *MyoG*, and down-regulate the expression of *Mstn* and *p53*. Metabolomics studies of the proposed target cells showed that intervention with drug-containing serum resulted in the callback of 119 differential metabolites (42 up-regulated and 77 down-regulated), mainly related to amino acids, carbohydrates, lipids, nucleotides and energy metabolic pathways. These results suggest that the drug-containing serum of Shiquandabu Decoction exerts a protective effect against *D*-gal-induced myocyte attenuation through multi-target and multi-pathway synergistic effects, improving mitochondrial function, regulating the cell cycle and promoting myo-differentiation.

Key words: sarcopenia; C2C12 myoblast; cellular atrophy; Shiquandabu Decoction containing drug serum; cellular metabolomics

随着我国老龄化进程加速, 肌少症 (又称“骨骼肌减少症”) 作为典型的增龄性疾病日益凸显。该病以肌肉质量减少、力量下降及功能减退为特征[1], 随着年龄增长, 蛋白质代谢失衡与肌生成能力衰退显著增加老年人死亡风险。中医理论将肌少症归为“痿证”“虚劳”等范畴。《黄帝内经》记载的“筋脉弛缓、肌肉萎缩”等症状与现代肌少症高度吻合[2]。中医强调“脾主肌肉”理论,《四圣心源》指出: “脾气盛则肌肉丰满而充实”[3],《太平圣惠方》亦载: “脾胃化生气血, 荣养肌肉”[4], 为治疗奠定了理论基础。

十全大补汤出自宋代《太平惠民和剂局方》, 由黄芪、肉桂、当归、熟地黄、白芍、川芎、党参、茯苓、白术和炙甘草共十味药材组成, 还需加生姜和大枣共同煎制。该方剂融合四君子汤 (党参、白术、茯苓、甘草) 益气健脾与四物汤 (当归、川芎、芍药、熟地黄) 补血活血之效, 佐以黄芪、肉桂, 形成气血双补的协同治疗体系。课题组前期研究发现, 十全大补汤可显著改善*D*-半乳糖 (*D*-gal) 诱导的肌少症模型大鼠的骨骼肌质量和功能, 表明其对肌少症具有潜在干预作用[5]。为进一步探究其作用机制, 本研究采用C2C12成肌细胞模型, 通过体外实验进一步验证十全大补汤对肌细胞增殖与分化的调控作用并探索其作用机制, 为阐明其改善肌少症的作用靶点提供实验依据。

C2C12细胞作为经典成肌细胞系[6], 是研究肌肉分化和衰老的理想模型[7]。其作为一种未完全分化的肌源性细胞, 与成熟肌细胞存在一定差异。但在特定诱导条件下能够分化为多核肌管, 形成具有收缩功能的肌纤维。这一特性使其成为研究骨骼肌发育、再生及相关疾病的重要体外模型[8,9]。该细胞在马血清分化培养基中可快速形成肌管[10], 其分化过程依赖*MyoD*和*MyoG*的表达调控[11]。*D*-gal可激活*p53*, 抑制*MyoD*和*MyoG*表达[12], 并上调*Mstn*表达, 进而损伤肌管分化能力, 因此, 本研究采用马血清联合*D*-gal诱导的C2C12肌管萎缩模型[13,14]分析十全大补汤含药血清对该模型调控作用, 为肌少症的中医药治疗提供实验依据。

材料与方法

细胞与动物 小鼠C2C12成肌细胞购自海星生物科技有限公司 (批号: 20220524M1); SPF级雄性SD大鼠由北京华阜康生物科技股份有限公司提供 [合格证号: 110322241101955154, 许可证号: SCXK (京) 2024-0003]。动物实验遵循山西中医药大学动物伦理委员会的规定并通过动物实验伦理审查 (批准编号: AWE202403229)。

药物与试剂 黄芪 (产地: 山西, 批号23070230)、当归 (产地: 甘肃, 批号23060122)、炙甘草 (产地: 内蒙古, 批号23060122)、茯苓 (产地: 安徽, 批号23040121)、党参片 (产地: 山西, 批号23070121)、肉桂 (产地: 广西, 批号23050121)、白芍 (产地: 安徽, 批号23060121)、川芎 (产地: 四川, 批号23060121)、熟地黄 (产地: 山西, 批号23070321)、白术 (产地: 安徽, 批号23080121) 均购自山西和仁堂中药饮片有限公司; 甲醇 (LC-MS级)、乙腈 (LC-MS级) 购自Thermo Fisher公司, 甲酸 (LC-MS级)、*D*-半乳糖 (*D*-gal) 购自Sigma-Aldrich; DMEM高糖培养基购自赛默飞世尔科技; 马血清、青

霉素−链霉素混合液、胰蛋白酶-EDTA消化液购自北京索莱宝公司; 胎牛血清 (FBS) 购自上海农笙生物科技有限公司; 无血清快速细胞冻存液购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)、CCK-8试剂盒、细胞周期检测试剂盒 (BA00205) 购自北京博奥森生物技术有限公司; ROS试剂盒 (10A065) 和MyoD抗体 (WL04662) 购自沈阳万类生物科技有限公司; JC-1线粒体膜电位染色试剂盒 (M8650) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; p53抗体 (KC-2397) 购自爱博生 (北京) 科学技术有限公司; BCA试剂盒 (P1511) 和5× SDS-PAGE蛋白上样缓冲液购自北京普利莱基因技术有限公司。

仪器 Agilent 1290超高效液相色谱 (安捷伦公司); Triple TOF™ 5600+高分辨质谱仪 (AB SCIEX公司); 超高效液相色谱−三重四级杆质谱联用仪 (AB SCIEX Triple Quad 5500$^+$ LC-MS/MS); HF safe1800生物安全柜 (力康生物医疗科技控股有限公司); 超纯水系统 (英国ELGA公司); ACQUITY UPLC HSS T3 (美国Waters公司); KDC-140HR高速冷冻离心机、低速离心机 (安徽中科中佳有限公司); SB-5200DT超声波清洗机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 二氧化碳细胞培养箱 (太仓艺斯高医疗器械科技有限公司); TE2000-U荧光倒置显微镜 (Nikon公司); SynergyHTX多功能酶标仪 (美国MD.iD5公司); 电泳仪 (1645050)、半干转印槽 (美国Bio-Rad公司); 4619195B超灵敏多功能成像仪 (美国Cytiva公司); 多功能酶标仪 (Molecular Device公司)。

药物提取 将十全大补汤处方各饮片 (党参、白术、茯苓、炙甘草、当归、川芎、白芍、熟地黄、黄芪、肉桂) 按等量混合, 同时根据传统煎煮方法加入适量生姜和大枣 (每100 g饮片加100 g生姜片及100 g大枣) 分别加水煎煮3次, 100目筛网过滤, 合并滤液并减压浓缩至浓度为1 g·mL^{-1}, −20 ℃保存备用。

动物分组及含药血清制备 SPF级雄性SD大鼠20只, 体质量 (200 ± 20) g, 适应性喂养7天后, 随机分为2组, 分别灌胃生理盐水和十全大补汤水煎液, 每组10只。十全大补汤给药组给予10 g·kg^{-1}[15], 连续给药4天, 每天上下午各1次。末次给药前禁食不禁水12 h, 第5天上午给药1.5 h后麻醉, 腹主动脉采血, 室温静置30 min, 3 500 r·min^{-1}离心15 min, 取上层血清, 经56 ℃、30 min水浴灭活, 在超净台内经0.22 μm过滤器过滤除菌, 混合同组大鼠不同血清后用1.5 mL EP管分装, 置于−80 ℃超低温冰箱储藏待用。

细胞分组及干预 C2C12细胞在含10%胎牛血清和1%青霉素−链霉素双抗的DMEM培养基中, 于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养至密度约70%, 更换为含2%马血清的DMEM分化培养基, 继续培养5天, 通过显微镜下观察, 待肌管形成率大于80%, 将细胞分为空白组、模型组 (40 mg·mL^{-1} *D*-gal)、空白血清组及十全大补汤含药血清组 (40 mg·mL^{-1} *D*-gal + 15%血清浓度)。

CCK-8细胞增殖实验 以每毫升1×10^{5}个细胞接种于96孔板中, 待细胞贴壁并完成分化后, 每组设置6个复孔, 孵育48 h后, 于避光条件下每孔加入10 μL CCK-8检测溶液并置于37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育30 min, 使用酶标仪在450 nm波长下测定各孔吸光度值 (*A*)。根据测定结果计算细胞存活率, 用于筛选最佳造模浓度和含药血清干预浓度。

活性氧 (ROS) 检测和JC-1线粒体膜电位染色 以每毫升1×10^{5}个细胞接种于6孔板中并完成分化后, 每组设置3个复孔, 孵育48 h后, PBS缓冲液洗涤细胞, 按照检测试剂盒说明书进行预处理, 于荧光显微镜下观察并拍照记录。

流式检测细胞周期 收集6孔板中细胞至15 mL离心管中, PBS洗涤1次。按照细胞周期检测试剂盒说明书进行预处理, 用流式细胞仪检测各组细胞周期, 采用Flowjo软件进行数据分析。

qRT-PCR检测 采用Trizol法提取细胞总RNA, 使用核酸分光光度计测定其浓度及纯度。按照5× All-In-One RT Master反转录试剂盒说明书将RNA进行逆转录, 得到cDNA。按照BlasTaq™ 2× qPCR Master-Mix说明书配制qPCR反应体系, 使用实时荧光定量PCR仪检测*MyoD*、*MyoG*、*Mstn*、*p53*的mRNA表达水平。qPCR引物委托生工生物工程股份有限公司合成, 引物序列见表1。

Table 1 qRT-PCR primer sequences

Gene name	Primer sequence
MyoD forward	5'-AACCAGCGGCTACCCAAAGG-3'
MyoD reverse	5'-CGGTCCAGGTGCGTAGAAGG-3'
MyoG forward	5'-ACCCTACAGACGCCCACAATC-3'
MyoG reverse	5'-GAAGGCAACAGACATATCCTCCAC-3'
Mstn forward	5'-AGACCCGTCAAGACTCCTACAAC-3'
Mstn reverse	5'-CTTCACATCAATACTCTGCCAAATACC-3'
p53 forward	5'-TGAACCGCCGACCTATCCTTAC-3'
p53 reverse	5'-GCACAAACACGAACCTCAAAGC-3'

蛋白质印迹 (Western blot) 以每毫升1×10^{5}个细胞接种于6孔板中并完成分化后, 每组设置3个复孔, 孵育48 h后, PBS缓冲液洗涤细胞。每孔加入100 μL细胞裂解液 (RIPA∶PMSF = 99∶1) 于冰上裂解15 min, 4 ℃、13 000 r·min^{-1}离心15 min, 取上清。BCA试剂盒测定蛋白质浓度, 根据蛋白浓度加入5× SDS-PAGE蛋

白上样缓冲液, 使得蛋白终浓度为2 μg·μL^{-1}, 涡旋混匀, 95 ℃金属浴5 min后得到待测样本。蛋白上样量为20 μg, 采用8% SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白, 将蛋白转印至PVDF膜上。5%脱脂奶粉室温摇床封闭2.5 h, 目的蛋白MyoD (1∶800)、p53 (1∶1 000) 和GAPDH (1∶20 000) 于4 ℃摇床孵育过夜, 室温摇床孵育二抗 (1∶20 000) 1.5 h, TBST缓冲液洗涤3次。增强化学发光试剂显色曝光, 使用化学发光成像系统检测蛋白条带, 采用Imagej1.8.0.112软件对各条带进行灰度扫描, GAPDH作为检测表达水平的内参。

含药血清化学成分分析

含药血清前处理　参考课题组前期实验方法, 取100 μL含药血清加入甲醇−乙腈混合液 (1∶1) 400 μL沉淀蛋白, 涡旋1 min后, 于4 ℃、13 000 r·min^{-1}离心20 min, 吸取上清液于EP管, 经冷冻离心浓缩至干后, 用100 μL 20%甲醇溶解, 涡旋3 min, 于4 ℃、13 000 r·min^{-1}离心10 min后取上清, 即得待测溶液, 进行LC-MS测试。空白血清组样本处理方法同上。

色谱条件　Waters Acquity UHPLC HSS T3液相色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1%甲酸水 (A)-乙腈 (B); 柱温: 40 ℃; 流速: 0.3 mL·min^{-1}; 进样量: 2 μL, 梯度洗脱条件: 0～0.5 min, 5% B; 0.5～8.0 min, 5%～45% B; 8.0～9.0 min, 45%～48% B; 9.0～16.0 min, 48%～50% B; 16.0～18.5 min, 50%～60% B; 18.5～19.0 min, 60%～75% B; 19.0～20.0 min, 75%～80% B; 20.0～22.0 min, 80%～85% B; 22.0～23.5 min, 85%～95% B; 23.5～24.5 min, 95%～5% B; 24.5～26.0 min, 5% B。

质谱条件　采用电喷雾 (ESI) 离子源, 正、负离子模式均进行数据采集, 正离子模式的离子化电压: +5 500 V, 负离子模式为: −4 500 V; 离子源温度为550 ℃, Gas 1为55 psi, Gas 2为55 psi, 气帘气为30 psi, 去簇电压 (declustering potential, DP) 60 V。采用数据依赖性扫描 (information dependent acquisition, IDA) 模式。一级质谱 (TOF MS) 的*m*/*z*扫描范围为50～1 500, 子离子 (product ion) 的*m*/*z*扫描范围为50～1 250, MS2碰撞能量 (collision energy, CE) 为40 ± 20 eV。

数据处理　对文献中已报道的十全大补汤相关化合物信息进行整理, 并结合课题组自建数据库, 构建包含化学名称、分子式、精确相对分子质量及二级质谱碎片的化合物列表。基于SCIEX OS 3.0分析平台, 在Analytics模块中导入目标化合物的化学名称及分子式, 设定匹配参数: 质量误差 < 10 ppm、同位素丰度比 < 20 ppm。通过自动峰提取算法对原始质谱数据进行特征峰识别, 结合化合物保留时间分布规律及二级质谱裂解特征 (特征碎片离子、中性丢失等), 对血清中的化合物进行成分解析。

细胞代谢组学分析

样品制备　细胞样品于预冷的生理盐水洗涤3次, 用细胞刮刀刮下细胞转移至1.5 mL EP管中, 生理盐水重悬并吹匀, 于4 ℃、12 000 r·min^{-1}条件下离心10 min弃上清并收集细胞沉淀, 于液氮内速冻后, 加入75%甲醇溶液, 置于冰上超声15 min后, 4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心10 min, 收集上清液。管中沉淀则重复上述步骤, 合并两次上清液并冻干。采用80%甲醇水溶液复溶 (含0.1%甲酸), 加入氘代内标溶液, 涡旋1 min, 4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心15 min, 收集上清液于液相小瓶内, 所有待测样品等分混合作为QC样本。

色谱条件　Waters Acquity UHPLC HSS T3液相色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1%甲酸水 (A)-乙腈 (B); 柱温为40 ℃; 流速0.3 mL·min^{-1}; 进样量1 μL; 梯度洗脱条件: 0～2 min, 2% B; 2～3 min, 2%～35% B, 3～17 min, 35%～70% B, 17～18 min, 70% B; 18～20 min, 70%～98% B, 20～23 min, 98% B; 23～23.5 min, 98%～2% B, 23.5～25 min, 2% B。

质谱条件　分别在正、负离子扫描模式下进行采集, 正离子喷雾电压+5 500 V, 负离子喷雾电压−4 500 V, 采用选择性多反应监测模式 (sMRM) 的模式进行数据采集, 离子源温度: 550 ℃, 气帘气压力: 30 psi, Gas 1为55 psi, Gas 2为55 psi。

数据处理　在SCIEX OS中导入原始数据, 对代谢物峰面积进行校正。使用SIMCA-P软件, 采用主成分分析 (PCA) 进行组间比较, 进行正交偏最小二乘法 (OPLS-DA) 判别分析方法和Permutation Testing模型验证。使用SPSS 16.0和GraphPad Prism 5软件对数据进行统计检验和差异分析, 以*t*检验 ($P < 0.05$)、FC值 (FC > 1.2或FC < 0.8) 筛选得到差异代谢物。

结果

1　含药血清成分分析

基于文献和本地数据库的二级碎片比对分析, 从十全大补汤含药血清中鉴定到24个入血成分 (表2), 其中, 在黄芪中鉴定到8个化合物, 主要为黄酮类化合物; 甘草中鉴定到5个, 为黄酮类和萜类化合物; 熟地黄中鉴定到2个, 为黄酮类和萜类化合物; 当归中鉴定到4个, 主要为苯酞类化合物; 川芎鉴定到6个, 主要为苯酞类化合物; 肉桂中鉴定到3个, 为苯丙素类和酚类化合物; 芍药中鉴定到4个, 为有机酸和萜类化合物。

2　*D*-gal诱导肌管衰老

显微镜下观察发现, 马血清分化第一天, C2C12成

Table 2 Characterization of serum chemical constituents of drugs contained in the Shiquandabu Decoction based on UHPLC-Q-TOF-MS. HQ: Astragali Radix; GC: Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; DG: Angelicae Sinensis Radix; CX: Chuanxiong Rhizoma; RG: Cinnamomi Cortex; DH: Rhei Radix et Rhizoma; SY: *Paeonia lactiflora* Pall.; SJ: Zingiberis Rhizoma Recens; BZ: Atractylodis Macrocephalae Rhizoma; DS: Codonopsis Radix

No.	Compound name	Ion mode	Molecular formula	RT/min	Found at mass	Mass error	Fragment	Source[5]
1	Glycyrrhetinic acid	$[M-H]^-$	$C_{30}H_{46}O_4$	21.30	469.331 9	−0.8	469.333 5, 470.336 2	GC
2	Vanillic acid	$[M-H]^-$	$C_8H_8O_4$	4.76	167.034 9	−0.3	167.033 9, 123.050 2, 79.056 3	CX, SY, HQ, SJ
3	Salicylic acid	$[M-H]^-$	$C_7H_6O_3$	7.25	137.024 9	1.5	137.024 8, 93.035 0, 65.041 6	SY
4	Calycosin	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{12}O_5$	6.27	285.076 0	0.9	285.073 3, 270.060 5, 225.066 8	HQ
5	Formononetin	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{12}O_4$	9.89	269.079 0	−6.7	213.090 5, 197.051 5	HQ
6	Ligustilide	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{14}O_2$	10.02	191.107 0	−2.1	191.106 8, 145.100 9	DG, CX
7	Geniposidic acid	$[M-H]^-$	$C_{16}H_{22}O_{10}$	3.10	373.111 4	0.2	211.066 3, 149.062 0, 123.048 1	DH
8	Ferulic acid	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{10}O_4$	6.12	193.049 6	−5.6	178.029 1, 134.036 5	DG, CX
9	Senkyunolide F	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{14}O_3$	7.13	207.100 8	−3.5	161.097 5, 147.048 6, 133.064 4	CX
10	*n*-Butylphthalide	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{14}O_2$	10.01	191.106 2	−2.1	173.105 6, 145.100 9, 135.041 2	DG, CX
11	Butylidenephthalide	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{12}O_2$	9.91	189.090 9	−0.4	143.090 0, 128.064 0, 105.055 8	DG, CX
12	Liquiritigenin	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{12}O_4$	7.84	255.066 0	−1	135.008 1, 119.048 3, 91.019 4	HQ, GC
13	Liquiritin	$[M-H]^-$	$C_{21}H_{22}O_9$	6.53	417.120 4	1.1	417.119 5, 119.051 1	HQ, GC
14	Neoisoliquritin	$[M-H]^-$	$C_{21}H_{22}O_9$	7.04	417.118 8	−0.3	417.117 5, 255.056 7, 135.006 4	HQ, GC
15	Liquiritin apioside	$[M-H]^-$	$C_{26}H_{30}O_{13}$	5.67	549.162 5	2	549.162 3, 255.065 1, 135.006 9	HQ, GC
16	Kaempferol-3-*O*-*D*-glucopyranoside	$[M-H]^-$	$C_{21}H_{20}O_{11}$	6.60	447.092 6	−1.5	271.059 9, 165.016 4	HQ, DH
17	Atractylenolide-III	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{20}O_3$	10.02	249.150 3	0.2	249.147 5, 231.133 6, 203.138 7	BZ, DS
18	8-Acetoxy-atractylenolide III	$[M+H]^+$	$C_{17}H_{24}O_3$	11.78	277.181 3	−4.1	277.167 1, 105.070 8	BZ
19	Atractylenolide-II	$[M+H]^+$	$C_{15}H_{20}O_2$	10.17	233.154 9	−2.7	215.141 8, 187.147 9, 159.083 5	BZ, DS
20	Cinnamate	$[M+H]^+$	$C_9H_8O_2$	2.73	149.059 7	−0.1	103.053 6, 77.041 2	RG
21	Cinnamylalcohol	$[M+H]^+$	$C_9H_{10}O$	14.07	135.080 5	1.2	105.071 8	RG
22	Paeonol	$[M+H]^+$	$C_9H_{10}O_3$	14.72	167.070 2	−0.3	149.063 9	RG
23	Penoy ketone-1-*O*-*β*-*D*-glucoside	$[M+HCOO]^-$	$C_{16}H_{24}O_9$	2.25	405.140 9	1.7	359.134 3, 179.073 1	SY
24	Paeoniflorin	$[M+HCOO]^-$	$C_{23}H_{28}O_{11}$	5.26	525.160 9	−0.9	479.157 6, 449.144 1, 327.107 3	SY

肌细胞呈梭形单层贴壁生长; 2～4天时, 细胞开始融合形成多核肌管; 分化5天时, 呈现出典型的厚管状结构, 说明肌管分化成功 (图1A)。结合文献报道的造模浓度范围[15]及细胞活性实验结果 (图1B), 当*D*-gal浓度达到40 mg·mL^{-1}时, 与对照组相比, C2C12肌管细胞存活率显著下降至约50%, 故最终选择该浓度进行后续实验。

3 十全大补汤含药血清对*D*-gal诱导肌管衰减的保护作用

实验结果显示, *D*-gal损伤48 h后细胞存活率显著降低 (图2A), 浓度为10%、15%和20%的十全大补汤含药血清显著提高细胞存活率 (图2B), 且在15%时为最佳干预浓度, 故选用该浓度进行后续实验。ROS实验结果表明 (图2C), 模型组中ROS水平显著升高, 而十全大补汤含药血清处理后ROS水平显著降低, 提示其具有抗氧化作用。线粒体膜电位检测 (图2D) 显示, 模型组红色荧光减弱、绿色荧光增强 ($P < 0.01$), 表示线粒体膜电位降低; 十全大补汤含药血清则能显著恢复红色荧光强度 ($P < 0.01$), 表明线粒体膜电位增加。细胞周期分析 (图3A) 发现模型组出现G0/G1期阻滞, 十全大补汤含药血清可降低G0/G1期比例, 促进S期和G2期进程, 恢复细胞增殖能力。此外, *D*-gal诱导的模型组中 (图3B), 肌分化因子*MyoD*、*MyoG*的mRNA

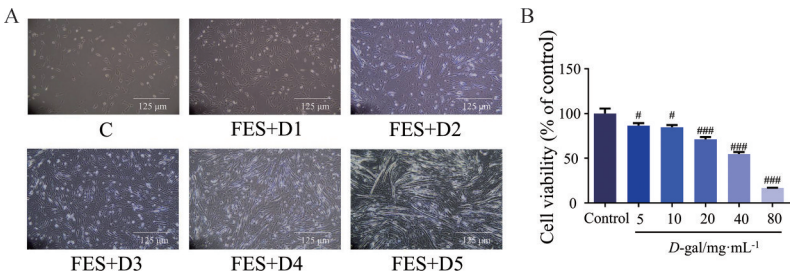


Figure 1 Cell viability effects of different concentrations of *D*-gal induced senescence in differentiated cells. A: Fetal equine serum (FES) induces C2C12 myotube formation, 20× magnification, scale bar: 125 μm; B: Effect of different concentrations of *D*-gal on the activity of C2C12 myotubular cells. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* the control group. *D*-gal: *D*-Galactose

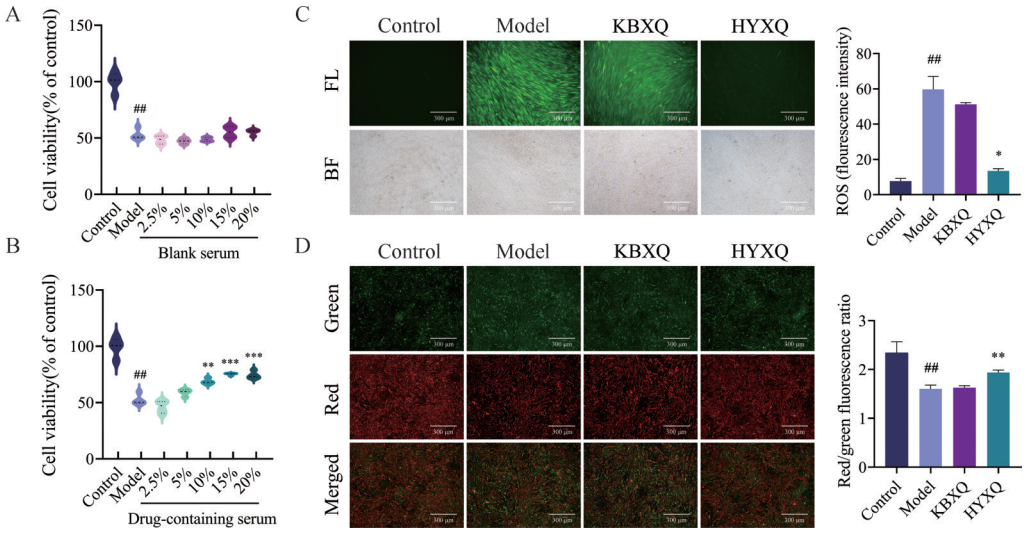


Figure 2 Protective effects of drug-containing serum against *D*-gal-induced C2C12 myotube injury. A: Effect of blank serum on *D*-gal-induced activity of C2C12 myotubular cells; B: Effect of Shiquandabu Decoction broth on *D*-gal-induced activity of C2C12 myotubular cells; C: Effect of drug-containing serum on the ROS levels in *D*-gal-induced C2C12 myotubular cells, 10× magnification, scale bar: 300 μm; D: Effect of drug-containing serum on the mitochondrial membrane potential of JC-1 in *D*-gal-induced C2C12 myotubular cells, 10× magnification, scale bar: 300 μm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* model group. FL: Fluorescence field; BF: Bright field; KBXQ: 15% blank serum group; HYXQ: 15% drug-containing serum group

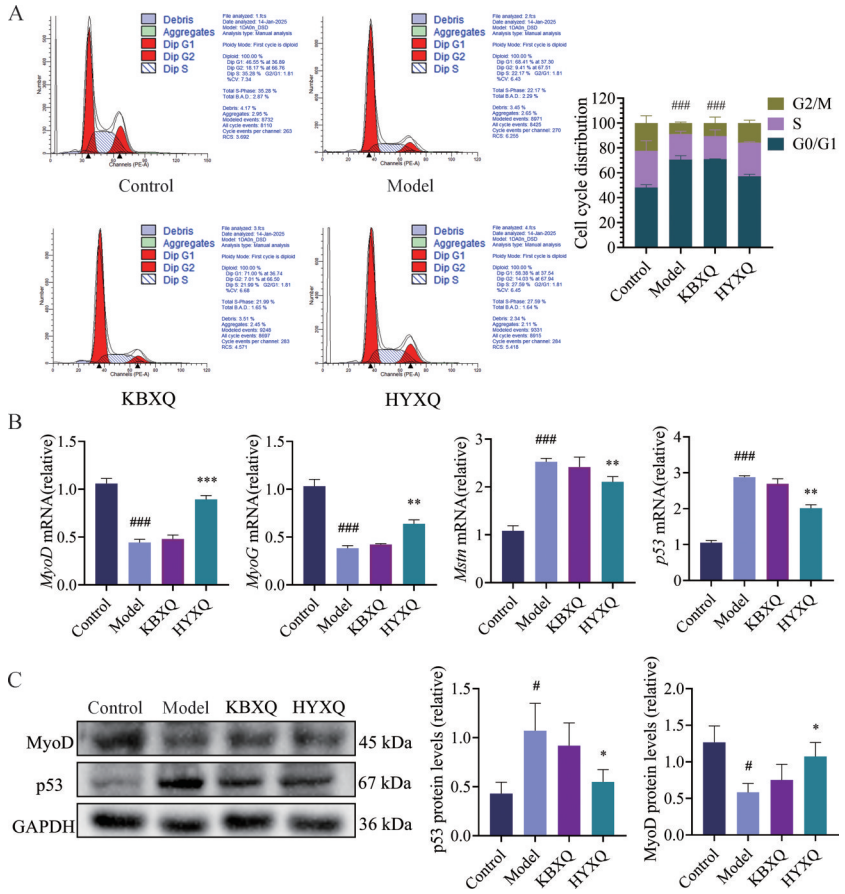


Figure 3 Effects of drug-containing serum on cell cycle and senescence-associated gene/protein expression in *D*-gal-induced C2C12 myotubes. A: Effect of drug-containing serum on the cycle of *D*-gal-induced C2C12 myotubular cells; B: Effect of drug-containing serum on the mRNA expression of *MyoD*, *MyoG*, *Mstn*, and *p53* in *D*-gal-induced C2C12 myotubular cells; C: Western blot analysis of protein bands of MyoD and p53. $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* blank group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* model group

含量显著下调, 衰老相关基因*Mstn*、*p53*的mRNA含量显著上调, Western blot (图3C) 实验进一步验证了这一趋势, 显示MyoD蛋白表达显著下调, 而p53蛋白表达显著上调, 十全大补汤含药血清可回调这一趋势, 促进肌分化并缓解衰老。空白血清组在上述指标中与模型组相比均无显著作用。

4 十全大补汤含药血清对*D*-gal损伤的C2C12肌管细胞代谢的影响

在正、负离子模式下, 6个QC样本均位于± 2 SD范围内, 分布集中, 表明仪器稳定性良好, 符合分析要求 (图4A)。PCA结果如图4B显示, 空白组、模型组和含药血清组明显分离。模型组代谢谱显著偏离空白组, 表明*D*-gal诱导细胞代谢发生紊乱; 而含药血清组代谢谱介于两者之间, 且更接近空白组, 表明十全大补汤能部分回调*D*-gal引起的代谢异常。图4C所示, 经PLS-DA置换检验 (200次) 证实, 模型稳定可靠, 无过度拟合。基于S-plot分析 (图4D), 筛选出对组间差异贡献显著的代谢物, 并对差异代谢物进行聚类分析。经代谢组学分析发现, 空白组与模型组间共筛选到244个显著差异代谢物; 模型组与含药血清组比较则筛选到196个差异代谢物, 其中119个代谢物的变化趋势在含药血清干预后出现回调, 呈现与模型组相反的变化趋势 (图5A), 其中42种显著上调, 77种显著下调 (补充材料表1)。

5 通路分析

如图5B所示, 代谢通路分析结果显示, 空白组与

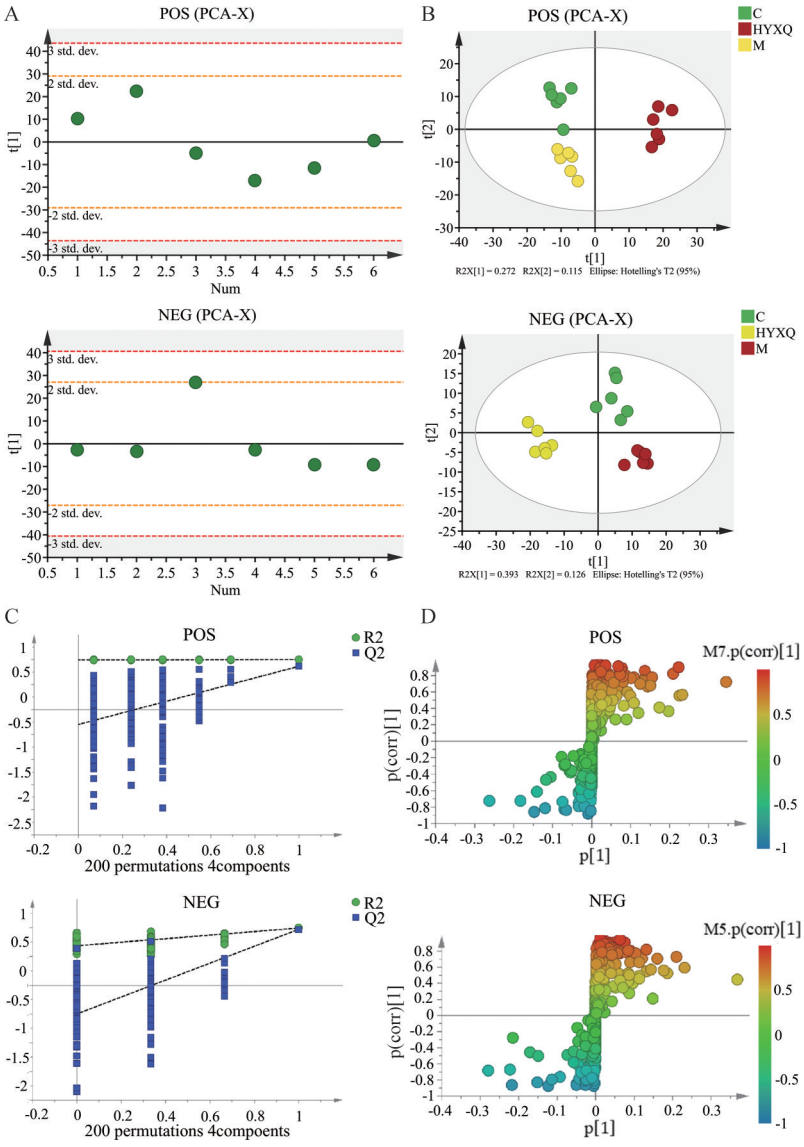


Figure 4 Multivariate statistical analysis. A: Distribution of QC samples in positive (POS) and negative (NEG) ion modes; B: Dispersion point diagram of PCA between groups in positive and negative ion mode; C: Permutation plots of blank and model groups in positive and negative ion mode; D: S-plot of blank and model groups in positive and negative ion mode. C: Blank group, M: Model group

模型组之间存在20条显著性差异代谢通路, 模型组与含药血清组间则发现19条差异代谢通路。经过富集发现, 含药血清可能通过调控16条关键代谢通路发挥作用 (图5C), 包括精氨酸生物合成、丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢、果糖/甘露糖代谢、磷酸戊糖途径、半乳糖代谢和嘧啶代谢等。其中, 精氨酸代谢通路的变化最为显著, 在模型组中, arginine、aspartate、glutamate、glutamine、*N*-acetylornithine和oxoglutaric acid等6个差异代谢物水平显著上调, 而经含药血清干预后这些代谢物均呈现显著下调趋势 (图5D)。

讨论

D-gal诱导的细胞衰老模型已被广泛应用于衰老相关研究, 其可通过多种途径影响细胞功能。在衰老过程中, *D*-gal能上调关键衰老相关因子 (如*p53*) 的表达, 促进细胞周期停滞, 尤其是G0/G1期阻滞, 从而抑制细胞增殖能力[16]。此外, *D*-gal诱导的氧化应激和线粒体功能障碍可激活凋亡信号通路, 导致细胞凋亡率增加[17]。在肌肉相关研究中, *D*-gal对C2C12成肌细胞的肌管形成具有显著抑制作用。该机制涉及肌源性分化关键调控因子*MyoD*和*MyoG*的表达下调, 同时肌肉生长抑制素*Mstn*的表达上调, 最终导致肌管分化受阻

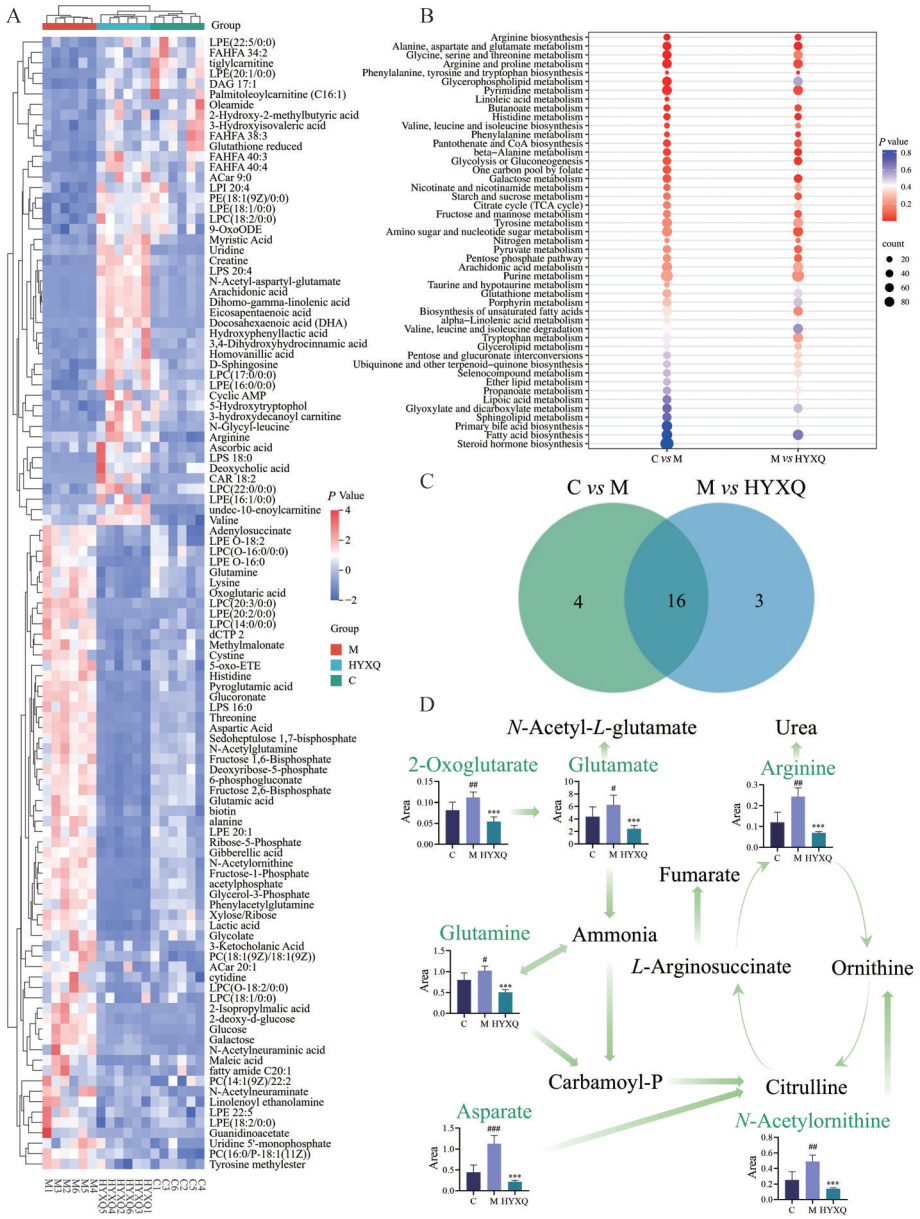


Figure 5 Differential metabolites and pathway analysis in blank, model and drug-containing serum groups. A: Cluster analysis plot of differential metabolites between blank, model and drug-containing serum groups; B: Metabolic pathway analysis between blank, model and drug-containing serum groups; C: Venn diagram of different metabolic pathways between the blank group and the model group, and between the model group and the treatment group; D: Changes in differential metabolites in the arginine metabolic pathway

和肌管萎缩[18]。这些变化与衰老相关的肌肉萎缩 (肌少症) 的病理特征高度吻合, 使*D*-gal诱导的C2C12细胞模型成为研究肌肉衰老及药物干预的重要工具。

本研究采用UHPLC-Q-TOF-MS技术对十全大补汤含药血清的化学成分进行系统分析, 鉴定出黄酮类、苯酞类及萜类等多种成分。通过含药血清干预*D*-gal诱导的C2C12肌管衰减模型, 发现15%的十全大补汤含药血清显著提高细胞存活率。此外, 含药血清能改善ROS水平, 维持线粒体膜电位, 减少G0/G1期细胞阻滞, 并调控衰老及肌生成相关基因和蛋白表达 (上调MyoD和MyoG, 下调Mstn和p53)。而空白血清无干预效果, 含药血清的保护作用依赖于入血吸收的十全大补汤化学成分。基于LC-MS拟靶向代谢组学分析, 十全大补汤含药血清可显著回调119个差异代谢物, 并调控16条关键代谢通路, 形成多靶点协同作用的调控网络。

文献报道丙氨酸上调可促进支链氨基酸代谢[19]; 精氨酸和缬氨酸作为支链氨基酸促进肌肉蛋白合成[20], 且精氨酸通过激活mTOR信号通路促进蛋白质合成[21]; 抗坏血酸[22]和半胱氨酸[23]通过抗氧化作用维持肌肉功能; 天冬氨酸参与氮代谢和能量供应[24-26]; 果糖2,6-二磷酸通过激活糖酵解提供能量[27,28]; 尿苷及其衍生物5'-UMP上调可促进线粒体生物发生改善能量代谢[29,30]; 核糖通过改善肌肉病理促进功能恢复[31]。十全大补汤含药血清可显著上调这些代谢物, 其中黄芪黄酮类成分毛蕊异黄酮和芒柄花素可通过激活mTOR通路增强支链氨基酸的利用[32,33]。党参、白术中的白术内酯III等萜类成分能够通过调控谷氨酰胺代谢为肌肉提供能量底物[34]; 此外, 花生四烯酸降低可抑制炎症介质生成[35]; 二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸降低能缓解其对成肌细胞分化的抑制[36]。而十全大补汤含药血清可显著下调这些代谢物, 其中甘草次酸能够通过上调抗氧化物质减少氧化应激损伤[37], 肉桂中的肉桂酸类成分可以抑制炎症因子释放[38]。

以上发现表明, 十全大补汤中黄芪、党参、白术等健脾成分协同作用, 通过入血成分调控多靶点、多通路的作用机制, 调节细胞代谢紊乱, 从而延缓肌细胞萎缩。这些作用共同促进了细胞功能恢复和稳态的维持, 体现了十全大补汤含药血清的多重生物学效应。

本研究发现十全大补汤含药血清能显著改善*D*-gal诱导的C2C12肌管萎缩模型细胞活力, 增强抗氧化能力, 维持线粒体功能并调控细胞周期及肌生成相关基因表达。代谢组学分析表明, 含药血清通过回调部分差异代谢物和调控16条通路发挥多靶点保护作用。

本研究虽初步解析了十全大补汤含药血清的入血成分并分析了其对*D*-gal诱导肌管萎缩细胞模型的代谢通路, 但仍需深入研究。后续需结合代谢动力学方法, 精准定性和定量分析血清中的代谢成分, 并通过与药效学指标的相关性研究筛选潜在药效物质。此外, 可结合多组学整合分析, 明确十全大补汤调控代谢网络的关键靶点和核心机制, 为阐明其治疗肌少症的物质基础和作用机制提供更全面的科学依据。

作者贡献: 董炳垚参与了实验操作、数据处理和文章撰写; 李蔚瑶参与了实验操作、数据处理和文章撰写; 何盼指导实验及文章修改; 李震宇提出整体设计并指导文章修改; 秦雪梅提出整体设计并指导文章修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Liu J, Ding QQ, Zhou BY, et al. Chinese expert consensus on diagnosis and treatment for elderly with sarcopenia (2021) [J]. Chin J Geriatr (中华老年医学杂志), 2021, 40: 943-952.

[2] He P, Liu YT, Du GH, et al. Research advances in sarcopenia [J]. Acta Neuropharmacol (神经药理学报), 2020, 10: 47-53.

[3] Wei J, Wei KS, Luo M, et al. Treating sarcopenia on the basis of spleen [J]. Clin J Tradit Chin Med (中医药临床杂志), 2019, 31: 1282-1284.

[4] Mao ZH, Liu XT, Zhang H, et al. Mechanism of reinforcing spleen and stomach method intervening aging sarcopenia [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2017, 44: 1631-1634.

[5] He P. Study on The Effect and Mechanism of Shiquandabu Decoctionon Sarcopenia Model Rats Induced by *D*-Galactose Combining with Constrained (十全大补汤干预*D*-半乳糖复合限制运动诱导肌少症模型大鼠的药理作用及机制研究) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2023.

[6] Yaffe A, Schwarz Y, Hacohen D, et al. Inhibition of 2-5A synthetase expression by antisense RNA interferes with interferon-mediated antiviral and antiproliferative effects and induces anchorage-independent cell growth [J]. Cell Growth Differ, 1996, 7: 969-978.

[7] Wong CY, Al-Salami H, Dass CR. C2C12 cell model: its role in understanding of insulin resistance at the molecular level and pharmaceutical development at the preclinical stage [J]. J Pharm Pharmacol, 2020, 72: 1667-1693.

[8] He YQ, Feng Y. A study of promotion of myogenic differentiation of C2C12 cells by salidroside combined with curcumin and prevention of palmitic acid-induced myotube atrophy [J]. Geriatr Health Care (老年医学与保健), 2024, 30: 1250-1257.

[9] Matsubara T, Urata M, Nakajima T, et al. Geranylgeraniol-induced myogenic differentiation of C2C12 cells [J]. In Vivo, 2018, 32: 1427-1431.

[10] Huang B, Jiao Y, Zhu Y, et al. Mdfi promotes C2C12 cell differentiation and positively modulates fast-to-slow-twitch muscle

fiber transformation [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 605875.

[11] Liu N, Deng XJ, Wang JP, et al. Research progress on regulation factors of myogenic regulatory factors and myogenesis [J]. China Anim Husb Vet Med (中国畜牧兽医), 2015, 42: 2644-2649.

[12] Yang ZJ, Broz DK, Noderer WL, et al. p53 suppresses muscle differentiation at the myogenin step in response to genotoxic stress [J]. Cell Death Differ, 2015, 22: 560-573.

[13] Wang J. Study on the Inductive Effect of *D*-Galactose on Sarcopenia and Anti-sarcopenia Factors (*D*-半乳糖对肌肉衰减综合征的诱导效应和抗肌肉衰减因子研究) [D]. Beijing: National Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Diseases Control and Prevention, 2019.

[14] Yang YF, Yang W, Liao ZY, et al. MICU3 regulates mitochondrial Ca^{2+}-dependent antioxidant response in skeletal muscle aging [J]. Cell Death Dis, 2021, 12: 1115.

[15] Tian S, Zhao H, Guo H, et al. Propolis ethanolic extract attenuates *D*-gal-induced C2C12 cell injury by modulating Nrf2/HO-1 and p38/p53 signaling pathways [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 6408.

[16] Zhang Y, Wu W, Huang C, et al. Fisetin alleviates *D*-galactose-induced senescence in C2C12 myoblasts: metabolic and gene regulatory mechanisms [J]. J Proteome Res, 2025, 24: 834-849.

[17] Abdel Khalek W, Cortade F, Ollendorff V, et al. SIRT3, a mitochondrial NAD^+-dependent deacetylase, is involved in the regulation of myoblast differentiation [J]. PLoS One, 2014, 9: e114388.

[18] Zhang SB, Yang J, Chang SJ, et al. Effect of Prussian blue nanoparticleson delaying aging muscle atrophy [J]. Chin J Osteoporos Bone Miner Res (中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志), 2025, 18: 73-82.

[19] Oh JY, Moon JW, Kang MJ, et al. Effects of *D*-alanine analog on muscle atrophy through regulation of myostatin expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2025, 761: 151670.

[20] Le Couteur DG, Solon-Biet SM, Cogger VC, et al. Branched chain amino acids, aging and age-related health [J]. Ageing Res Rev, 2020, 64: 101198.

[21] Zhou M, Wei Y, Feng Y, et al. Arginine regulates skeletal muscle fiber type formation *via* mTOR signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25: 6184.

[22] Zanella BTT, Magiore IC, Duran BOS, et al. Ascorbic acid supplementation improves skeletal muscle growth in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles: *in vivo* and *in vitro* studies [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 2995.

[23] Yosef B, Zhou Y, Mouschouris K, et al. *N*-Acetyl-*L*-cysteine reduces fibrosis and improves muscle function after acute compartment syndrome injury [J]. Mil Med, 2020, 185: 25-34.

[24] Holeček M. Aspartic acid in health and disease [J]. Nutrients, 2023, 15: 4023.

[25] de Haan A, van Doorn JE, Westra HG. Effects of potassium + magnesium aspartate on muscle metabolism and force development during short intensive static exercise [J]. Int J Sports Med, 1985, 6: 44-49.

[26] Castelli S, Desideri E, Laureti L, et al. *N*-Acetylaspartate promotes glycolytic-to-oxidative fiber-type switch and resistance to atrophic stimuli in myotubes [J]. Cell Death Dis, 2024, 15: 686.

[27] Pyko M, Rider MH, Hue L, et al. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase from frog skeletal muscle: purification, kinetics and immunological properties [J]. J Comp Physiol B, 1993, 163: 89-98.

[28] Bosca L, Challiss RA, Newsholme EA. The effect of fructose 2, 6-bisphosphate on muscle fructose-1, 6-bisphosphatase activity [J]. Biochim Biophys Acta, 1985, 828: 151-154.

[29] Nakagawara K, Takeuchi C, Ishige K. 5'-CMP and 5'-UMP alleviate dexamethasone-induced muscular atrophy in C2C12 myotubes [J]. Biochem Biophys Rep, 2023, 34: 101460.

[30] Dubinin MV, Starinets VS, Belosludtseva NV, et al. The effect of uridine on the state of skeletal muscles and the functioning of mitochondria in duchenne dystrophy [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 10660.

[31] Cataldi MP, Lu QL. Ribitol and ribose treatments differentially affect metabolism of muscle tissue in FKRP mutant mice [J]. Sci Rep, 2025, 15: 1329.

[32] Xiang S, Luo Y, Liu W, et al. Calycosin alleviates ovariectomy-induced osteoporosis by promoting BMSCs autophagy *via* the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2025, 398: 11963-11974.

[33] Yang M, Yang Z, Huang X, et al. Formononetin alleviates thermal injury-induced skin fibroblast apoptosis and promotes cell proliferation and migration [J]. Burns, 2025, 51: 107256.

[34] Wang FX. Atractylenolide II Regulated Glutaminolysis Contributes Tohepatie Stellate Cell Senescence for Inhibition of Liver Fibrosis (白术内酯III调控谷氨酰胺代谢诱导肝星状细胞衰老的抗肝纤维化机制研究) [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2022.

[35] Roberts BM, Kolb AL, Geddis AV, et al. The dose-response effects of arachidonic acid on primary human skeletal myoblasts and myotubes [J]. J Int Soc Sports Nutr, 2023, 20: 2164209.

[36] Zhang L. Effects of EPA and DHA on Proliferation, Differentiation and Apoptosis in C2C12 Myoblasts (EPA和DHA对C2C12成肌细胞增殖、分化和凋亡的影响) [D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2018.

[37] Wen Y, Chen H, Zhang L, et al. Glycyrrhetinic acid induces oxidative/nitrative stress and drives ferroptosis through activating NADPH oxidases and iNOS, and depriving glutathione in triple-negative breast cancer cells [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 173: 41-51.

[38] Shen MT, Bai DN, Wang QW, et al. Research progress on anti-inflammatory mechanism of *Cinnamomum cassia* and its active components [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 3218-3225.