DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.01.022

# 六君子汤改善肿瘤环境下 C2C12 成肌细胞分化的分子机制

郝羚伦[1],张艳[2],彭梦薇[1],桑亚洲[3],陈玉龙[1],刘燕[1],吴耀松[1]
(1.河南中医药大学河南省中医方证信号传导重点实验室,河南省中医方证信号传导国际联合重点实验室,河南 郑州 450046;
2.天津中医药大学,天津 300193;3.华中科技大学,湖北 武汉 430064)

**摘要**:目的 研究六君子汤改善肿瘤环境下 C2C12 成肌细胞分化的分子机制,为健脾和胃法治疗肿瘤恶病质肌肉萎缩提供实验基础。方法 诱导成肌细胞 C2C12 分化,倒置显微镜观察分化后肌管长度;成肌细胞 C2C12 与肺癌细胞 Lewis 共培养,分为空白组、模型组、叉头框蛋白 O1(forkhead box protein O1,FoxO1)抑制剂组、六君子汤组、联合用药组,蛋白免疫印迹法(western blot,WB)检测 C2C12 细胞成肌分化抗原(myogenic differentiation antigen,MyoD)的表达及与过氧化物酶体增殖物受体 γ 辅助激活因子 α(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha,PGC-1α)/FoxO1 通路相关的蛋白表达;电子显微镜观察 C2C12 细胞线粒体数量及超微结构的变化;流式细胞术(flow cytometry,FCM)观测 C2C12 细胞线粒体膜电位的变化;实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,qPCR)法检测 C2C12 细胞 PGC-1α/FoxO1 通路相关分子 mRNA。结果 C2C12 细胞于分化 48h 肌管横径最长;与空白组比,模型组 C2C12 细胞 MyoD 蛋白表达明显减少($P<0.05$),线粒体数量减少($P<0.05$),线粒体双层膜皱曲不清晰甚至呈 C 形或基质肿胀,线粒体嵴数量减少、排列紊乱、断裂或溶解消失成空泡状,线粒体膜电位降低,细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A,tFAM)的 mRNA 表达明显降低($P<0.05$),FoxO1 蛋白表达明显增高,PGC-1α、脂肪和肥胖相关基因(fat mass and obesity-associated gene,FTO)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)、tFAM 蛋白表达明显减少($P<0.05$);与模型组比较,六君子汤组 C2C12 细胞 MyoD 蛋白表达明显增高,FoxO1 抑制剂组、六君子汤组、联合用药组中 C2C12 细胞线粒体数量显著增多($P<0.05$),线粒体双层膜结构正常,线粒体膜电位升高,细胞凋亡率显著降低($P<0.05$),联合用药组 C2C12 细胞 mTOR 和 tFAM mRNA 表达明显增加($P<0.05$),FoxO1 抑制剂组、六君子汤组及联合用药组中 C2C12 细胞 FoxO1 蛋白表达明显减少,PGC-1α、FTO、mTOR、tFAM 蛋白表达明显增高($P<0.05$);与六君子汤组比较,联合用药组 C2C12 细胞 PGC-1α 蛋白表达升高($P<0.05$)。结论 六君子汤通过调控 PGC-1α/FoxO1 信号通路,能维持线粒体功能,改善肿瘤环境下成肌细胞分化。

**关键词**:六君子汤;PGC-1α/FoxO1;线粒体;肿瘤恶病质;肌肉萎缩
**中图分类号**:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)01-0122-09

## Liujunzi Decoction(六君子汤) Improves Molecular Mechanism of C2C12 Myoblast Differentiation in Tumor Environment

HAO Linglun[1],ZHANG Yan[2],PENG Mengwei[1],SANG Yazhou[3],CHEN Yulong[1],LIU Yan[1],WU Yaosong[1]
(1. Henan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome and Prescription Signaling,Henan International Joint Laboratory of Traditional Chinese Medicine Syndrome and Prescription in Signaling,Henan University of Chinese Medicine,Zhengzhou 450046,Henan,China;
2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine,Tianjin 300193,China;
3. Huazhong University of Science and Technology,Wuhan 430064,Hubei,China)

**Abstract**:*Objective* To study the molecular mechanism of Liujunzi Decoction(六君子汤) to improve C2C12 myoblast differentiation in tumor environment, providing experimental basis for the treatment of tumor cachexia muscle atrophy with strengthening spleen and harmonizing stomach method. *Methods* It induced the differentiation of myoblasts C2C12 and observed the length of the differentiated myotube with an inverted microscope. Myoblasts C2C12 were co-cultured with lung cancer cell Lewis, and then were divided into blank group, model group, Forkhead box protein O1(FoxO1) inhibitor group, Liujunzi Decoction(六君子汤) group and combination group. Western Blot detected the expression of myogenic differentiation antigen(MyoD) in C2C12 cells and the expressions of proteins associated with the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha(PGC-1α)/FoxO1 pathway. Electron microscopy observed the changes in the number of mitochondria and ultrastructure of C2C12 cells. Flow cytometry observed the changes in mitochondrial membrane potential of C2C12 cells. Quantitative real-time PCR detected mRNA in the PGC-1α/FoxO1 pathway in C2C12 cells. *Results* Experiments showed that C2C12 cells had the longest transverse diameter in the muscle tube after 48 h of differentiation. Compared with those in the blank group, the MyoD

**基金项目**:国家自然科学基金项目(82074313);河南省科技攻关项目(192102310160);河南省高等学校重点科研项目(23A360024);河南省中医学"双一流"创建科学研究项目(HSRP-DFCTCM-2023-1-28)
**作者简介**:郝羚伦(1994-),女,河南南阳人,硕士在读,研究方向:分子生物学与中医肿瘤方证基础。
**通讯作者**:吴耀松(1976-),女,湖南娄底人,教授,硕士研究生导师,硕士,研究方向:分子生物学与中医肿瘤方证基础。E-mail:linawys@163.com。

protein expression and mitochondria number were significantly reduced in the model group($P<0.05$). The wrinkled boundary of the mitochondrial bilayer membrane was not clear or even more C-shaped or stromal swelling, and the number of mitochondrial cristae was reduced. The arrangement was disordered, fractured or dissolution disappeared into vacuoles. The mitochondrial membrane potential was decreased. The apoptotic rate was significantly increased($P<0.05$). The mRNA expression of mitochondrial transcription factor A(tFAM) was significantly reduced, and FoxO1 protein expression was significantly increased. The protein expressions of PGC-1α, FTO, mTOR and tFAM were significantly decreased($P<0.05$). Compared with the model group, the expression of MyoD protein increased significantly in Liujunzi Decoction group($P<0.05$). In FoxO1 inhibitor group, Liujunzi Decoction group and the combination group, the number of mitochondria was significantly increased($P<0.05$), the mitochondrial bilayer outer membrane structure was normal, the mitochondrial membrane potential was increased and the apoptosis rate was significantly reduced($P<0.05$). The mRNA expressions of mTOR and tFAM in C2C12 cells weres significantly increased in the combination group($P<0.05$), the expressions of FoxO1 protein in C2C12 cells in the FoxO1 inhibitor group, Liujunzi Decoction group and the combination group were significantly reduced, and the protein expressions of PGC-1α, FTO, mTOR and tFAM were significantly increased($P<0.05$). Compared with those in the Liujunzi Decoction group, the PGC-1α protein expression in C2C12 cells in combination group significantly increased($P<0.05$). *Conclusion* Liujunzi Decoction can improve mitochondrial function and myoblast differentiation in tumor environment by interfering with PGC-1α/FoxO1 signal pathway.

**Keywords**: Liujunzi Decoction(六君子汤); PGC-1α/FoxO1; mitochondrion; tumor cachexia; muscle atrophy

肌肉萎缩是导致骨骼肌丢失、体质量下降的重要因素，亦是肿瘤患者恶病质晚期的常见症状[1]，具有加重肿瘤病人机体功能损伤、降低抗肿瘤治疗耐受性、促肿瘤转移、增高病死率等危害，是现代医学抗肿瘤方向仍须重视的关键问题。

六君子汤由人参、茯苓、白术、甘草、半夏、陈皮 6 味中药组成，具有健脾益气，化痰燥湿之功，是临床上治疗肿瘤恶病质的常用方剂。中医理论认为“脾主肌肉”，肌肉的质量及功能有赖于脾胃正常生理功能的支持，而六君子汤能补气健脾，有效改善肿瘤患者食欲，为肌肉维持正常生理状态提供能量，改善肿瘤恶病质。前期研究发现，六君子汤可以改善肺癌恶病质小鼠肌肉萎缩[2]。

线粒体是细胞内产能的关键细胞器，肿瘤环境中，炎症因子的分泌增多使骨骼肌线粒体功能失调，线粒体中腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine-triphosphate, ATP)合成酶的活性降低，抑制氧化磷酸化过程，使机体产能减少，加速肿瘤患者的能量丢失，引起骨骼肌能量代谢障碍，终致肌肉萎缩[3]。能量失衡是肿瘤进展的重要因素，过氧化物酶体增殖物受体γ辅助激活因子α(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, PGC-1α)通过参与线粒体发生调控机体适应性产热，是骨骼肌细胞的“能量感受器”，能正向调节能量代谢和肌肉组织生长，缓解多种形式的肌肉萎缩，PGC-1α 的水平与肌肉形态大小相关，并能抑制叉头框蛋白 O1(forkhead box protein O1, FoxO1)的表达[4]。

前期文献并未发现有通过 PGC-1α/FoxO1 通路改善线粒体功能防治肿瘤恶病质肌肉萎缩的研究，基于此，本研究以小鼠成肌细胞 C2C12 与小鼠肺腺癌细胞 Lewis 共培养建立的体外肌管萎缩细胞模型为基础，基于 PGC-1α/FoxO1 通路探究六君子汤改善肿瘤环境下肌细胞分化、防治肿瘤恶病质肌肉萎缩的分子机制，以期为该方防治肿瘤恶病质肌肉萎缩提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞

小鼠成肌细胞 C2C12(武汉普诺赛生命科技有限公司，CL-0044)、小鼠肺腺癌细胞 Lewis(中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库)。

### 1.2 主要试剂

DMEM 高糖培养基(北京 Solarbio 公司，货号 12100)；FoxO1 抑制剂(美国 MCE 公司，货号 AS1842856)；胎牛血清(南美 LONSERA 公司，批号 SF0007001)；马血清(武汉 Procell 公司，批号 164215-100)；BCA 蛋白浓度测定试剂盒(博士德生物，货号 AR0146)，线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(北京索莱宝科技有限公司，批号 M8650)；成肌分化抗原(myogenic differentiation antigen, MyoD)1 兔多克隆抗体(武汉三鹰，批号 00025860)、小鼠单克隆 PGC-1α 抗体、小鼠单克隆哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抗体、兔多克隆脂肪和肥胖相关基因(fat mass and obesity-associated gene, FTO)抗体、HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(武汉三鹰，批号分别为 66369-1、66888-1、27226-1、SA00001-2)，兔单克隆 FoxO1 抗体(英国 Abcam，批号为 Ab52857)，HRP Affinipure Goat Anti-Mouse Ig-G(H+L)(美国 Earthox 公司，E030110-01)，兔多克隆线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A, tFAM)抗体(美国 Immunoway，批号 YT2916)。

### 1.3 实验器材

SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)；Primovert 型倒置显微镜(德国 Zeiss 公司)；CHEMIDOCXRS+型高灵敏度化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)；Power Pac1000 型电泳仪和转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)；流式细胞仪(美国 BD 公司，FACSCalibur)。

### 1.4 实验药品的制备

六君子汤，药物组成比例参照《医学正传》中人参：茯苓：白术：甘草：半夏：陈皮=2∶2∶3∶2∶3∶2。所有中药饮片均购于北京同仁堂，经河南中医药大学中药实验室鉴定均为正品。中药饮片按以上比例研磨、萃取、干燥后密封储存，出膏率为 1.819%。六君子汤用 DMEM 培养基(不含血清)配置成所需药物浓度，并过滤除菌，用于后续实验。

## 2 实验方法

### 2.1 模型构建及评价标准

#### 2.1.1 倒置显微镜观测 C2C12 细胞肌管形态和横径长度

C2C12 细胞常规培养，待细胞传代长至 60%～80%时，加入 2%马血清分化培养基诱导分化。在分化的第 0、24、48、72、96 h 用倒置显微镜拍照观察，用 Image J 软件测量细胞肌管横径。

#### 2.1.2 蛋白免疫印迹法检测各组 C2C12 细胞 MyoD 的表达

C2C12 细胞接种至 6 孔 Transwell 共培养板的下室，以马血清

诱导分化,同时设置空白组、模型组、六君子汤组。除空白组外,上室各组接种同等数量的 Lewis 细胞,六君子汤组加入六君子汤药液,继续培养 48 h 后提取各组 C2C12 细胞总蛋白,采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,进行电泳、转膜、封闭、孵一抗(MyoD 1∶4000;GAPDH 1∶10 000)、二抗(山羊抗兔 GAPDH 1∶10 000;山羊抗鼠 GAPDH 1∶7000),显影,分析目标条带灰度值。

2.2 分组与给药

C2C12 细胞接种于 Transwell 共培养板的下室,待细胞长至 60% ~80% 加入 2% 马血清进行诱导分化,同时 Lewis 细胞按照与 C2C12 细胞 1∶1 的细胞数量接种于共培养板的上室,并进行分组,具体分组及加药见表 1。本研究实验药品浓度的选择参照本团队前期筛选出的浓度,即六君子汤为 100 μg/mL、FoxO1 抑制剂为 1 μmol/L。培养 48 h 后,进行指标检测。

表 1 Transwell 共培养上下室加液

| 组别 | 下室加液 | 上室加液 |
|---|---|---|
| 空白组 | 2% 马血清培养基 | DMEM |
| 模型组 | 2% 马血清培养基 | DMEM + Lewis |
| 抑制剂组 | 2% 马血清培养基 | DMEM + Lewis + FoxO1 抑制剂 |
| 六君子汤组 | 2% 马血清培养基 | DMEM + Lewis + 六君子汤 |
| 联合用药组 | 2% 马血清培养基 | DMEM + Lewis + 六君子汤 + FoxO1 抑制剂 |

2.3 指标检测

2.3.1 透射电子显微镜观察各组 C2C12 细胞线粒体数量及结构 取 24 孔 Transwell 板,C2C12 细胞按 $2\times10^4$ 个/孔种至下室的细胞爬片上,用 2% 马血清诱导细胞分化,上室每孔接种 Lewis 细胞 $2\times10^4$ 个,按表 1 加药并培养 48 h 后取出爬片,固定、收集、再固定过夜,电子显微镜观察各组 C2C12 细胞线粒体数量及超微结构的变化。

2.3.2 流式细胞术观测各组 C2C12 细胞线粒体膜电位 前期细胞处理同 2.2,按线粒体膜电位检测试剂盒 JC-1 说明书处理细胞,FACSCalibur 流式细胞仪检测,设置波长为 488 nm,每组样本获取 $1\times10^4$ 个细胞。JC-1 单体及聚合物的荧光信号在 FL1、FL2 探测器上分别获得。因 JC-1 发射双波长,故利用电子补偿来纠正红色荧光和绿色荧光的重叠部分。FL1-H 值代表绿色荧光强度,FL2-H 值代表红色荧光强度。CELLQuest 软件获取并分析数据。

2.3.3 实时荧光定量 PCR 法检测各组 C2C12 细胞 PGC-α/FoxO1 通路 mRNA 应用 TRIzol 法提取细胞 RNA,逆转录后进行 PCR 扩增。以 GAPDH 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算,引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。见表 2。

表 2 引物序列及长度

| 基因 | | 引物序列 | 长度/(bp) |
|---|---|---|---|
| PGC-1α | F | TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT | 134 |
| | R | CCACTTCAATCCACCCAGAAAG | |
| FoxO1 | F | ATGCTCAATCCAGAGGGAGG | 183 |
| | R | ACTCGCAGGCCACTTAGAAAA | |
| FTO | F | TTCATGCTGGATGACCTCAATG | 137 |
| | R | GCCAACTGACAGCGTTCTAAG | |
| mTOR | F | ACCGGCACACATTTGAAGAAG | 110 |
| | R | CTCGTTGAGGATCAGCAAGG | |
| tFAM | F | ATTCCGAAGTGTTTTTCCAGCA | 122 |
| | R | TCTGAAAGTTTTGCATCTGGGT | |
| GAPDH | F | TGGTCGTATTGGGCGCCTGGT | 150 |
| | R | TCGCTCCTGGAACAGGTGA | |

2.3.4 蛋白免疫印迹法检测各组 C2C12 细胞 PGC-1α/FoxO1 通路相关蛋白表达 前期细胞处理同 2.2,提取各组 C2C12 细胞总蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,电泳(SDS-PAGE)、转膜、封闭,加一抗(稀释比列:PGC-1α 1∶25 000;FoxO1 1∶5000;mTOR 1∶8000;FTO 1∶1500,tFAM 1∶300;GAPDH 1∶10 000)、二抗(稀释比例:山羊抗鼠 GAPDH 1∶7000;山羊抗兔 GAPDH 1∶10 000)孵育,ECL 化学发光法显影,收集图像,分析目标条带灰度值。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 数据统计软件进行正态性和方差齐性检验,若符合正态分布且满足方差齐性,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间比较选用 LSD 检验;若符合正态分布但不满足方差齐性,用 Dunnett T3 检验;若不符合正态分布,用非参数检验。结果采用的方式,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

3.1 倒置显微镜观测 C2C12 细胞肌管形态和横径长度

实验发现,2% 马血清培养基诱导 C2C12 分化 24 h 时,细胞出现多核;诱导分化 48 h 时,细胞呈现肌管形状;诱导分化 72 h、96 h,肌管回缩。与分化 72 h、96 h 比,分化 48 h 的肌管横径长度差异有统计学意义($P<0.05$);与分化 96 h 比,分化 72 h 的肌管横径长度差异有统计学意义($P<0.05$);0 h、24 h 时未见肌管形态,故未做统计测量。见表 3、插页 XVI 图 1。

表 3 倒置显微镜观测 C2C12 细胞肌管横径($\bar{x}\pm s$)

| 分化时间段/(h) | $n$ | 肌管横径/(μm) |
|---|---|---|
| 48 | 10 | $1.727\pm0.299^{*}$ |
| 72 | 10 | $1.224\pm0.276^{\#}$ |
| 96 | 10 | $0.811\pm0.139$ |

注:* 与 72 h、96 h 组比较,$P<0.05$;# 与 96 h 组比较,$P<0.05$。

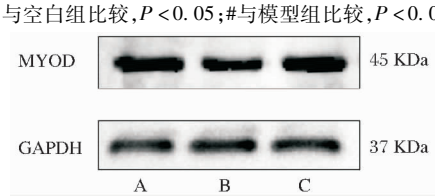
3.2 蛋白免疫印迹法检测 C2C12 细胞 MyoD 的表达

与空白组比较,模型组 C2C12 细胞 MyoD 蛋白表达量明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,六君子汤组 C2C12 细胞 MyoD 蛋白表达量明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4、图 2。

表 4 蛋白免疫印迹法检测各组 C2C12 细胞 MyoD 的蛋白表达量($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | $n$ | MyoD/GAPDH |
|---|---|---|
| 空白组 | 4 | $1.579\pm0.084$ |
| 模型组 | 4 | $1.107\pm0.205^{*}$ |
| 六君子汤组 | 4 | $1.671\pm0.344^{\#}$ |

注:* 与空白组比较,$P<0.05$;# 与模型组比较,$P<0.05$。




注:A. 空白组;B. 模型组;C. 六君子汤组。

图 2 蛋白免疫印迹法检测各组 C2C12 细胞 MyoD 的蛋白表达量

3.3 透射电子显微镜观察各组 C2C12 细胞线粒体的数量及结构

结果表明,与空白组相比,模型组 C2C12 细胞线粒体数量明显减少,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组相比,抑制剂组、六君子汤组、联合用药组 C2C12 细胞线粒体数量显著增多,差异具有统计学意义($P<0.05$);其他用药组之间比较

差异无统计学意义。形态结构上可以看出，与空白组相比，模型组 C2C12 细胞线粒体双层膜边界皱曲模糊甚至多呈 C 形或基质肿胀，线粒体嵴数量减少、排列紊乱、断裂或溶解消失成空泡状；与模型组相比，抑制剂组、六君子汤组、联合用药组 C2C12 细胞线粒体双层膜结构正常。见表 5、插页 Ⅻ 图 3。

表 5 透射电镜观察共培养条件下各组 C2C12 细胞线粒体数量($\bar{x} \pm s$)

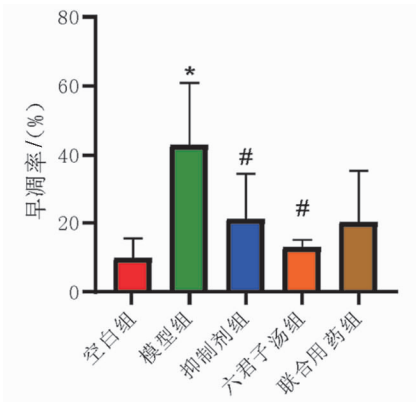
单位：个

| 组别 | $n$ | 线粒体数 |
|---|---|---|
| 空白组 | 4 | 8.000 ± 0.816 |
| 模型组 | 4 | 3.250 ± 0.500 * |
| 抑制剂组 | 4 | 7.750 ± 0.500# |
| 六君子汤组 | 4 | 6.250 ± 0.957# |
| 联合用药组 | 4 | 6.500 ± 1.291# |

注：* 与空白组比较，$P < 0.05$；# 与模型组比较，$P < 0.05$。

3.4 流式细胞术观测各组 C2C12 细胞线粒体膜电位

分析与线粒体膜电位对应的绿色和红色荧光强度的变化。与空白组比较，模型组 C2C12 细胞线粒体膜电位降低，细胞凋亡率显著升高，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）；与模型组比较，抑制剂组、六君子汤组 C2C12 细胞线粒体膜电位升高，细胞凋亡率显著降低，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）；其余各用药组比较差异无统计学意义。见插页 Ⅻ 图 4、图 5。




注：* 与空白组比较，$P < 0.05$；# 与模型组比较，$P < 0.05$。

图 5 流式细胞术观测药物对各组 C2C12 细胞早凋率的影响

3.5 qPCR 法检测各组 C2C12 细胞 PGC－1α/FoxO1 通路相关 mRNA 表达量

结果表明，与空白组比较，模型组 C2C12 细胞 tFAM 的 mRNA 表达量明显降低，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）；与模型组比较，联合用药组 C2C12 细胞 tFAM mRNA 表达量明显增加，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）；其余各组比较均无统计学意义（$P > 0.05$）。见表 6。

3.6 蛋白免疫印迹法检测各组 C2C12 细胞中 PGC－1α/FoxO1 通路相关蛋白表达

结果表明，与空白组比较，模型组 C2C12 细胞中 FoxO1 蛋白表达量明显增高，PGC－1α、FTO、mTOR、tFAM 蛋白表达量明显减少，差异均具有统计学意义（$P < 0.05$）；与模型组比较，FoxO1 抑制剂组、六君子汤组及联合用药组 C2C12 细胞 FoxO1 蛋白表达量明显减少，PGC－1α、FTO、mTOR、tFAM 蛋白表达量明显增高，差异具有统计学意义（$P < 0.05$）；与六君子汤组比较，联合用药组 C2C12 细胞 PGC－1α 的蛋白表达量具有统计学意义（$P < 0.05$），其余各用药组的蛋白表达量比较无统计学意义（$P > 0.05$）。见表 7、图 6。

## 4 讨论

肿瘤恶病质归属中医“虚劳”的范畴，其发病机制与脾胃功能正常密切相关，脾胃虚则气血化生无源，使机体失于濡养，致肌肉萎缩、消瘦乏力[5]。中医认为脾气虚贯穿着肿瘤发生发展过程的始终，尤其在肿瘤患者恶病质晚期中体现更为明显[6]。健脾和胃治法在临床上治疗肿瘤恶病质具有良好的疗效，能减少恶病质所致的炎症反应，增强机体免疫力、改善食欲，提高患者的生活质量，使患者生存期得以延长[7]。

六君子汤出自《医学正传》，是经典的健脾和胃代表方剂。临床研究表明，六君子汤能有效增强肿瘤患者食欲，为肌肉生长供能，改善肿瘤患者恶病质状态[6]；其白术、人参的有效成分可纠正血清细胞因子白细胞介素－6（interleukin 6，IL－6）、肿瘤坏死因子－α（tumour necrosis factor－α，TNF－α）含量的异常升高而抑制肿瘤恶病质的进展[8]。本团队前期研究亦表明，EC9706 细胞可以被六君子汤乙酸乙酯部位抑制增殖，并降低内皮细胞和肿瘤细胞中 IL－6 生成[9]，有效缓解人移植瘤裸鼠饮食减少、大便异常、免疫低下、体质量下降等病理状态[10]；

表 6 qPCR 法检测各组 C2C12 细胞 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)

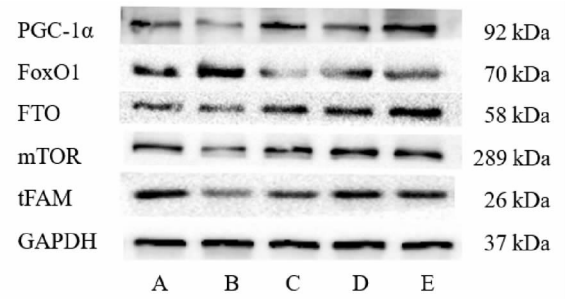
| 组别 | $n$ | 目的基因/GAPDH | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PGC－1α | FoxO1 | FTO | mTOR | tFAM |
| 空白组 | 6 | 1.000 ± 0 | 1.000 ± 0 | 1.000 ± 0 | 1.000 ± 0 | 1.000 ± 0 |
| 模型组 | 6 | 0.583 ± 0.076 | 1.080 ± 0.398 | 0.748 ± 0.105 | 0.493 ± 0.231 | 0.406 ± 0.265 * |
| 抑制剂组 | 6 | 1.582 ± 1.320 | 1.148 ± 0.456 | 1.038 ± 0.143 | 0.812 ± 0.357 | 0.825 ± 0.390 |
| 六君子汤组 | 6 | 3.514 ± 2.932 | 1.472 ± 0.766 | 1.241 ± 0.327 | 0.864 ± 0.292 | 0.756 ± 0.351 |
| 联合用药组 | 6 | 3.596 ± 2.269 | 1.444 ± 0.837 | 1.164 ± 0.641 | 1.091 ± 0.466# | 0.994 ± 0.365# |

注：* 与空白组比较，$P < 0.05$；# 与模型组比较，$P < 0.05$。

表 7 免疫印迹法检测各组 C2C12 细胞 PGC－1α/FoxO1 通路相关蛋白表达量($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $n$ | 目的蛋白/GAPDH | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | PGC－1α | FoxO1 | FTO | mTOR | tFAM |
| 空白组 | 5 | 2.794 ± 0.594 | 0.658 ± 0.124 | 1.554 ± 0.442 | 3.279 ± 0.551 | 1.948 ± 0.729 |
| 模型组 | 5 | 1.179 ± 0.226 * | 1.577 ± 0.679 * | 0.622 ± 0.080 * | 0.825 ± 0.780 * | 0.759 ± 0.221 * |
| 抑制剂组 | 5 | 3.863 ± 0.678# | 0.500 ± 0.075# | 1.567 ± 0.359# | 2.671 ± 0.893# | 2.442 ± 0.312# |
| 六君子汤组 | 5 | 3.420 ± 0.702# | 0.687 ± 0.327# | 1.504 ± 0.268# | 3.147 ± 0.647# | 1.975 ± 0.351# |
| 联合用药组 | 5 | 4.680 ± 0.860#▲ | 0.794 ± 0.271# | 2.130 ± 0.717# | 2.609 ± 1.142# | 2.324 ± 0.153# |

注：* 与空白组比较，$P < 0.05$；# 与模型组比较，$P < 0.05$；▲ 与六君子汤组比较，$P < 0.05$。




注：A. 空白组；B. 模型组；C. 六君子汤组；D. 抑制剂组；E. 联合用药组。

图 6 免疫印迹法检测各组 C2C12 细胞 PGC－1α/FoxO1 通路相关蛋白表达量

并有体内和体外研究发现，六君子汤可能调控信号传导和转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）信号通路，或关闭泛素蛋白酶体系统，减缓肿瘤环境下的肌肉蛋白降解[2,11]。

小鼠成肌细胞 C2C12 呈梭形、贴壁生长，该细胞生长速度快，一旦出现密集分布时，可导致自体分化，因此，使用 2% 的马血清诱导分化时需把握好关键节点。本研究采用 2% 马血清诱导 C2C12 细胞分化，通过观察不同时间段的肌管形态并进行肌管横径测量，结果显示，于分化 0 h、24 h 未见肌管形态；于诱导分化 48 h，C2C12 细胞退出细胞增殖周期，大部分细胞呈现出肌管形态，出现多核或串珠样双核结构，肌管增厚变长、横径亦明显增大，分化明显，并出现肌纤维的融合；于诱导分化 72 h、96 h，肌管明显回缩、横径变小，可见大量漂浮的成团凋亡细胞。因此，诱导 C2C12 细胞分化 48 h 为最佳分化时期，宜于诱导建立肿瘤恶病质肌管萎缩细胞模型。MyoD 作为生肌因子家族的成员之一，是肌生成的驱动转录因子和骨骼肌早期分化的标志性蛋白，在骨骼肌肥大和生长过程中起重要作用，能诱导肌细胞增殖和分化，且增殖时 MyoD 的水平升高最为明显[12]。本研究中，当 C2C12 细胞与肺腺癌 Lewis 细胞按照 1∶1 的数量比例共培养时，模型组 C2C12 细胞 MyoD 的蛋白水平显著降低，表明模型构建成功。六君子汤药物干预后，六君子汤组 C2C12 细胞 MyoD 的蛋白表达出现明显升高，进一步提示六君子汤能有效改善肿瘤恶病质的肌肉萎缩状态。

肿瘤恶病质引起的肌肉萎缩不仅与蛋白质合成减少、蛋白质降解增多相关，一定程度上也是能量代谢异常的表现，主要是因线粒体的功能障碍致氧化功能受损[13]。线粒体功能紊乱能激活多种细胞内的信号通路如腺苷酸活化蛋白激酶[adenosine 5′－monophosphate（AMP）－activated protein kinase，AMPK]通路，它通过磷酸化自噬或磷酸化 PGC－1α 致线粒体生物发生[14]。有文献显示，Lewis 肺癌细胞外小泡能促进 C2C12 成肌细胞肌管中脂肪和蛋白质降解[15]。线粒体结构及功能变化是决定细胞凋亡的关键环节，动物实验相关的蛋白质组学分析显示，恶病质小鼠骨骼肌中线粒体超微结构及功能均发生改变，如线粒体的数量减少、线粒体氧化损伤、炎症因子大量分泌，骨骼肌中与线粒体功能和能量稳态相关的蛋白表达亦出现异常[16]；此外，在肿瘤恶病质患者的体内发现了线粒体吞噬、线粒体动力学标志物的病理性改变[17]。本研究采用透射电镜观察了细胞形态学的改变，与空白组比较，模型组 C2C12 细胞的线粒体数量明显减少，甚至呈 C 形或基质肿胀，线粒体双层膜边界出现皱曲模糊，线粒体嵴数量减少、排列紊乱、断裂或溶解消失成空泡状；药物干预后，各用药组 C2C12 细胞线粒体数量明显增多，内、外膜结构恢复完整，可见，六君子汤确能恢复线粒体功能及形态，改善肌管萎缩。

线粒体为细胞的增殖和分化供能，其双层膜的交界处有一蛋白性孔道（permeability transition pore，PTP），当细胞受损或死亡时激发信号使 PTP 开启，出现线粒体的膜电位崩解，并见呼吸链断裂，细胞色素 C（cytochrome C，Cyt C）释放进入胞质，激活 Caspase 途径，致细胞凋亡[18]。线粒体膜电位下降是细胞处于凋亡早期阶段的标志性信号，线粒体膜电位检测试剂盒JC－1 是用于检测细胞线粒体膜电位的一种理想的荧光探针。正常的细胞线粒体膜电位较高，JC－1 在线粒体基质中聚集，形成聚合物，产生红色荧光；细胞受损后，线粒体膜电位降低，表现为绿色荧光。流式细胞仪检测细胞膜电位变化结果可靠，本研究通过分析与线粒体膜电位对应的荧光强度，结果显示，模型组 C2C12 细胞的线粒体膜电位降低，早期凋亡率显著升高，这进一步证明了模型构建的成功；各用药组 C2C12 细胞线粒体膜电位升高，而早期凋亡率均有明显下降，表明六君子汤对线粒体结构和功能有较好地修复作用，明显改善细胞线粒体膜电位，限制细胞凋亡进程。

PGC－1α 参与脂肪组织和骨骼肌的生物活性[19]，通过激活转录因子促进线粒体生物发生，还能维持线粒体功能，增强线粒体的活性和质量，改善肌肉功能、抑制肌肉萎缩，提高肌肉耐力[20]。FoxO1 是叉头框转录因子家族中的一员，其影响骨骼肌线粒体发挥正常功能主要体现在两个方面：首先，抗氧化功能异常会激活 FoxO 的表达，促进氧自由基清除；其次，FoxO1 表达增加能够激活泛素蛋白酶体系统，加速蛋白质降解[21]。PGC－1α 是肌肉萎缩生物标志分子的上游调节因子，同时也在上游调节 FoxO1 信号转导。PGC－1α 通过抑制 FoxO 阻滞 E3 泛素连接酶肌肉特异性环指蛋白 1（muscle RING finger 1，MuRF1）和肌肉萎缩基因 Fbox－1（muscle atrophy f－box，MAFbx/Atrogin－1）的转录，抵抗肌肉萎缩[22]。体内实验研究结果显示，六君子汤可以介导泛素－蛋白酶体途径（ubiquitin－proteasome pathway，UPP），增加腓肠肌肌纤维横截面积，缓解恶病质小鼠腓肠肌质量及体质量的丢失，延缓肌肉萎缩进程[11]。CHEN J M 等[23]的研究发现，四君子汤能缓解 Lewis 细胞诱导的恶病质小鼠食欲减少、体质量减轻及肠黏膜损伤，恢复线粒体功能，有效抑制恶病质状态小鼠的肌肉损失。本研究显示，Lewis 细胞与 C2C12 细胞共培养后，模型组 C2C12 细胞 PGC－1αmRNA 及蛋白表达水平均降低，FoxO1 mRNA 及蛋白表达水平均升高，而六君子汤组和 FoxO1 抑制剂组 C2C12 细胞的 PGC－1αmRNA 及蛋白表达升高，FoxO1 mRNA 水平较高、但蛋白表达下降，这可能与不同的翻译后修饰类型有关。这些结果表明 FoxO1 抑制剂有效地阻断了 PGC－1α/FoxO1 通路，六君子汤有效影响 PGC－1α 和 FoxO1 这两个关键蛋白的表达，维持线粒体功能，改善肌管萎缩，进一步证实六君子汤能纠正肿瘤恶病质的肌肉萎缩。

PGC－1α 还可以激活 tFAM，tFAM 通过易位到线粒体，参与线粒体 DNA 的复制和转录，保护其免受活性氧（reactive oxygen species，ROS）和降解的影响，维持线粒体的正常生理功能[24]。本研究中，模型组 C2C12 细胞 tFAM mRNA 水平及蛋白表达出现了明显的降低，六君子汤组中则表现出升高的趋势，说明六君子汤能恢复萎缩肌管的线粒体功能，与我们前面观测到的六君子汤组 C2C12 细胞线粒体膜电位升高、线粒体数量增多及结构相对完整的现象一致。

FTO 是一种 N6－甲基腺苷（N6－methyladenosine，$m^6A$）去

甲基化酶,在许多恶性肿瘤中参与肿瘤进展和转移,调节脂肪代谢,但其在肿瘤恶病质中的作用仍不清楚。mTOR 是一种保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,参与调节线粒体代谢功能,调控细胞骨架和蛋白质合成[25],在萎缩肌肉中,mTOR 通路被抑制[26-27]。有研究发现,在 C2C12 细胞中,FTO 通过 mTOR - PGC1(途径调控线粒体生物发生,促进肌管分化,并以其去甲基化功能减少内质网应激、氧化应激和细胞凋亡,控制脂肪分解,改善肌肉萎缩[28]。本实验中,与空白组比,模型组 C2C12 细胞 FTO、mTOR mRNA 水平及蛋白表达量降低,而六君子汤组 C2C12 细胞 FTO 和 mTOR mRNA 水平及蛋白表达比模型组明显升高,其机理可能是六君子汤抑制了肌管萎缩的 C2C12 细胞线粒体损伤,降低了细胞早期凋亡及脂肪流失,与报道中的观点一致[29]。

综上所述,六君子汤能促进线粒体生成、减少线粒体损伤并改善其功能,影响成肌细胞分化;通过调控 PGC - 1α/FoxO1 信号通路上影响线粒体功能和肌生成的蛋白调控成肌细胞增殖和分化,可能是六君子汤改善肿瘤恶病质肌肉萎缩的分子机制之一。后续,我们将拟结合 PGC - 1α/FoxO1 这一信号通路进行体内实验或通过其他相关通路研究六君子汤改善线粒体功能防治肿瘤恶病质肌肉萎缩的分子机制,为中医药运用于临床提供更全面的参考依据。

**参考文献**

[1] SANTOS JMO, PEIXOTO DA SILVA S, GIL DA COSTA RM, et al. The emerging role of microRNAs and other non - coding RNAs in cancer *Cachexia*[J]. Cancers, 2020, 12(4): 1004.

[2] 张艳,桑亚洲,彭梦薇,等. 六君子汤调控 STAT3/泛素蛋白酶体途径防治肺癌恶病质小鼠肌肉萎缩的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(5):8 - 15.

[3] ANTUNES D, PADRÃO A I, MACIEL E, et al. Molecular insights into mitochondrial dysfunction in cancer - related muscle wasting [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1841(6): 896 - 905.

[4] QIN W, PAN J, WU Y, et al. Protection against dexamethasone - induced muscle atrophy is related to modulation by testosterone of FOXO1 and PGC - 1α[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 403(3 - 4): 473 - 478.

[5] 桑亚洲, 张艳, 刘燕, 等. 肿瘤恶病质发病机制及中医药防治研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(1): 203 - 213.

[6] 苏雅, 祝永福, 夏黎明. 中医辨证治疗癌症恶病质临床疗效观察[J]. 中医药临床杂志, 2015, 27(9): 1251 - 1254.

[7] 孟丹华, 李晨旭, 尚艺婉, 等. 六君子汤治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 172 - 174.

[8] SUN B, LUO H, DENG L, et al. The study on mechanism of the modified Chinese herbal compound, jianpijiedu, on a mouse model of hepatic carcinoma cachexia[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3113 - 3121.

[9] 尹素改, 王慧慧, 吴耀松, 等. 六君子汤提取物对食管癌 Eca109 细胞的增殖抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 163 - 166.

[10] 金华彬. 健脾和胃法通过 STAT3 信号通路对食管癌细胞株 EC9706 生长的干预作用[D]. 郑州: 河南中医药大学, 2017.

[11] 贺倩文, 刘冬静, 刘燕, 等. 六君子汤干预 IL - 6/STAT3 信号影响肿瘤环境下 C2C12 细胞分化机制的研究[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2021, 23(10): 3630 - 3637.

[12] 沈震宇. MyoD 在慢阻肺动物模型膈肌萎缩中的作用及其与 IGF - 1 的关系[D]. 长沙: 中南大学, 2014.

[13] SCHMIDT S F, ROHM M, HERZIG S, et al. Cancer *Cachexia*: more than skeletal muscle wasting[J]. Trends Cancer, 2018, 4(12): 849 - 860.

[14] HONG Y A, LIM J H, KIM M Y, et al. Fenofibrate improves renal lipotoxicity through activation of AMPK - PGC - 1α in db/db mice [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96147.

[15] HU W J, RU Z Y, ZHOU Y L, et al. Lung cancer - derived extracellular vesicles induced myotube atrophy and adipocyte lipolysis via the extracellular IL - 6 - mediated STAT3 pathway[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2019, 1864(8): 1091 - 1102.

[16] SHUM AMY, POLJAK A, BENTLEY N L, et al. Proteomic profiling of skeletal and cardiac muscle in cancer cachexia: alterations in sarcomeric and mitochondrial protein expression[J]. Oncotarget, 2018, 9(31): 22001 - 22022.

[17] BALLARÒ R, BELTRÀ M, LUCIA S D, et al. Moderate exercise in mice improves cancer plus chemotherapy - induced muscle wasting and mitochondrial alterations[J]. FASEB J, 2019, 33(4): 5482 - 5494.

[18] 谭迎春, 陈子江, 卢少明, 等. 用荧光探针 JC - 1 检测氧化应激对精子线粒体膜电位的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2006, 44(5): 447 - 450.

[19] DAS D K, GRAHAM Z A, CARDOZO C P. Myokines in skeletal muscle physiology and metabolism: recent advances and future perspectives[J]. Acta Physiol, 2020, 228(2): e13367.

[20] DA CRUZ S, PARONE P A, LOPES V S, et al. Elevated PGC - 1α activity sustains mitochondrial biogenesis and muscle function without extending survival in a mouse model of inherited ALS[J]. Cell Metab, 2012, 15(5): 778 - 786.

[21] GOMES M D, LECKER S H, JAGOE R T, et al. Atrogin - 1, a muscle - specific F - box protein highly expressed during muscle atrophy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(25): 14440 - 14445.

[22] LIU J, PENG Y H, FENG Z H, et al. Reloading functionally ameliorates disuse - induced muscle atrophy by reversing mitochondrial dysfunction, and similar benefits are gained by administering a combination of mitochondrial nutrients[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 69: 116 - 128.

[23] CHEN J M, YANG T T, CHENG T S, et al. Modified Sijunzi Decoction can alleviate cisplatin - induced toxicity and prolong the survival time of cachectic mice by recovering muscle atrophy[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 233: 47 - 55.

[24] THEILEN N T, KUNKEL G H, TYAGI S C. The role of exercise and TFAM in preventing skeletal muscle atrophy[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(9): 2348 - 2358.

[25] KILLIAN M L, THOMOPOULOS S. Scleraxis is required for the development of a functional tendon enthesis[J]. FASEB J, 2016, 30(1): 301 - 311.

[26] MCFARLANE C, PLUMMER E, THOMAS M, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF - kappaB - independent, FoxO1 - dependent mechanism [J]. J Cell Physiol, 2006, 209(2): 501 - 514.

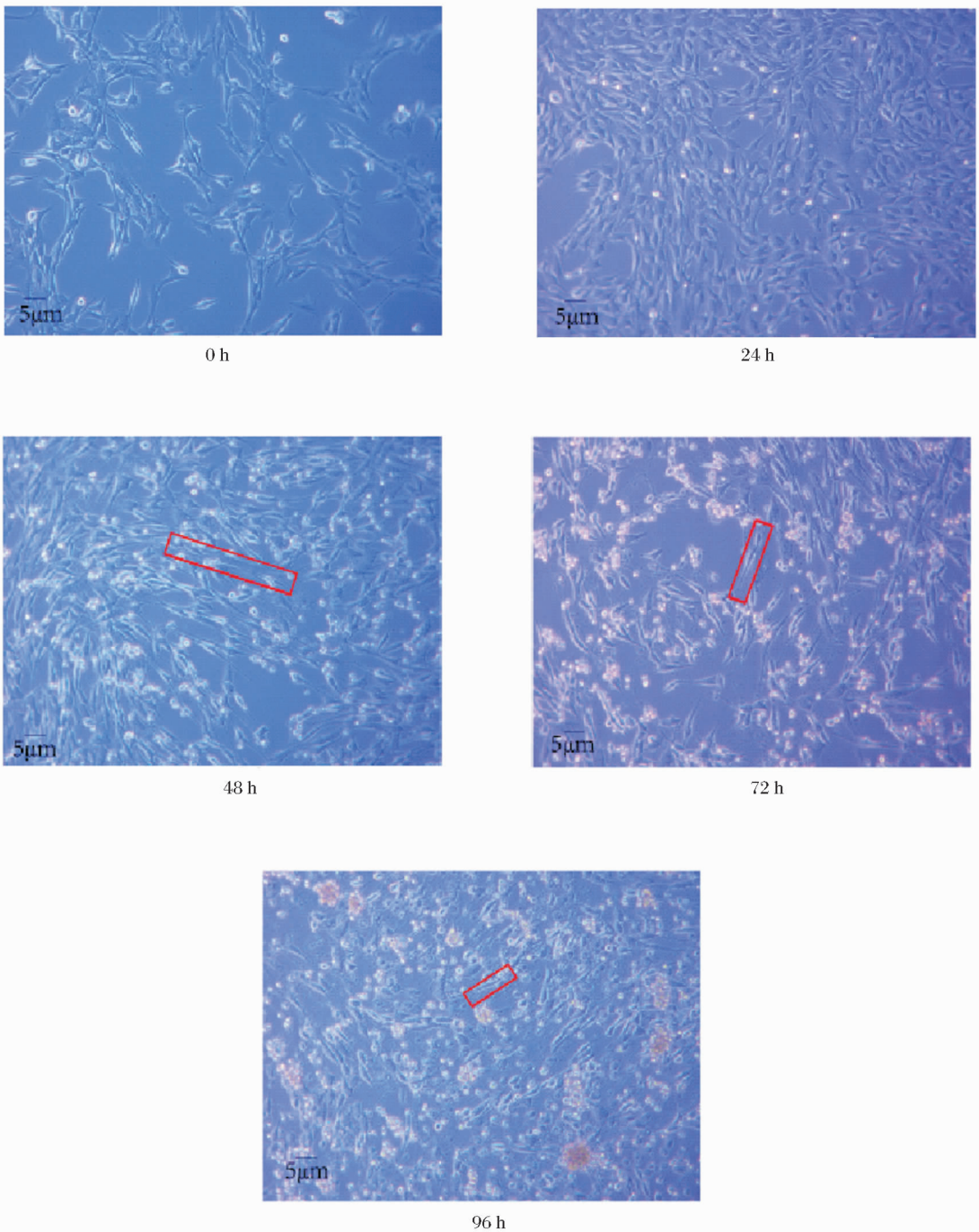
[27] LOKIREDDY S, MCFARLANE C, GE X J, et al. Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting[J]. Mol Endocrinol, 2011, 25(11): 1936 - 1949.

[28] WANG X B, HUANG N, YANG M, et al. FTO is required for myogenesis by positively regulating mTOR - PGC - 1α pathway - mediated mitochondria biogenesis[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(3): e2702.

[29] SHEN Z T, LIU P, SUN Q, et al. FTO inhibits $UPR^{mt}$ - induced apoptosis by activating JAK2/STAT3 pathway and reducing m6A level in adipocytes[J]. Apoptosis, 2021, 26(7 - 8): 474 - 487.

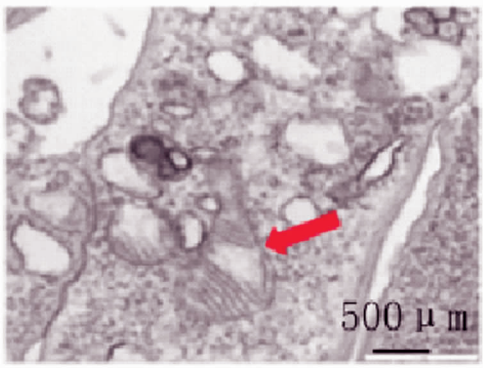
# 六君子汤改善肿瘤环境下 C2C12 成肌细胞分化的分子机制

（正文见 122－127 页）

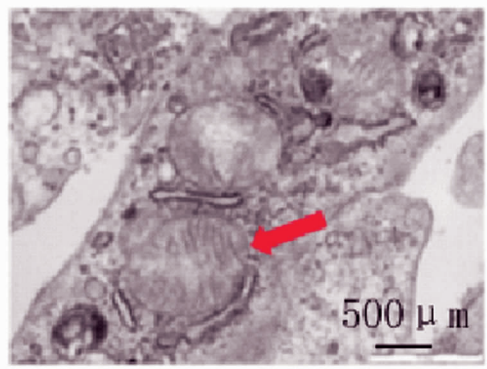



注：红框标注即为肌管形态。

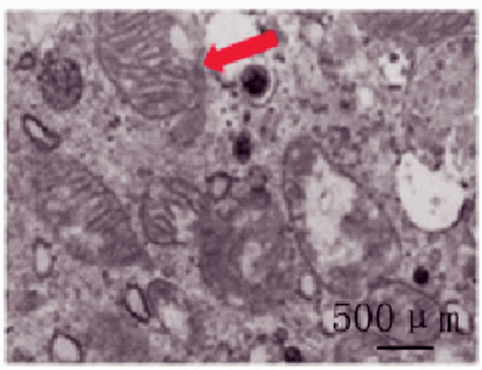
图 1　倒置显微镜下观察 C2C12 细胞肌管分化情况（100 ×）



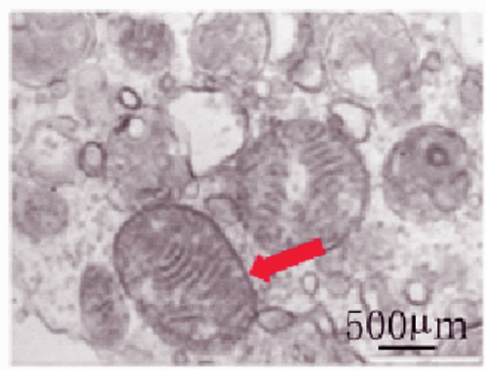

空白组



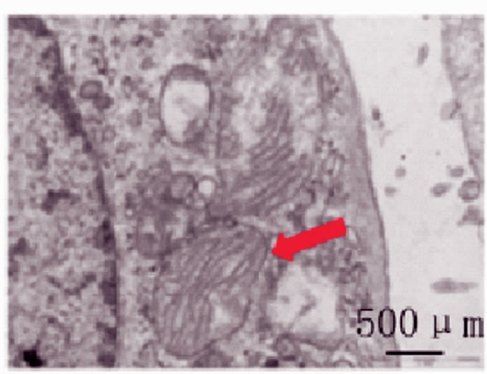

模型组




抑制剂组




六君子汤组




联合用药组

注:红色箭头:线粒体。

图 3　透射电镜观察各组 C2C12 细胞线粒体超微结构( ×30 000)

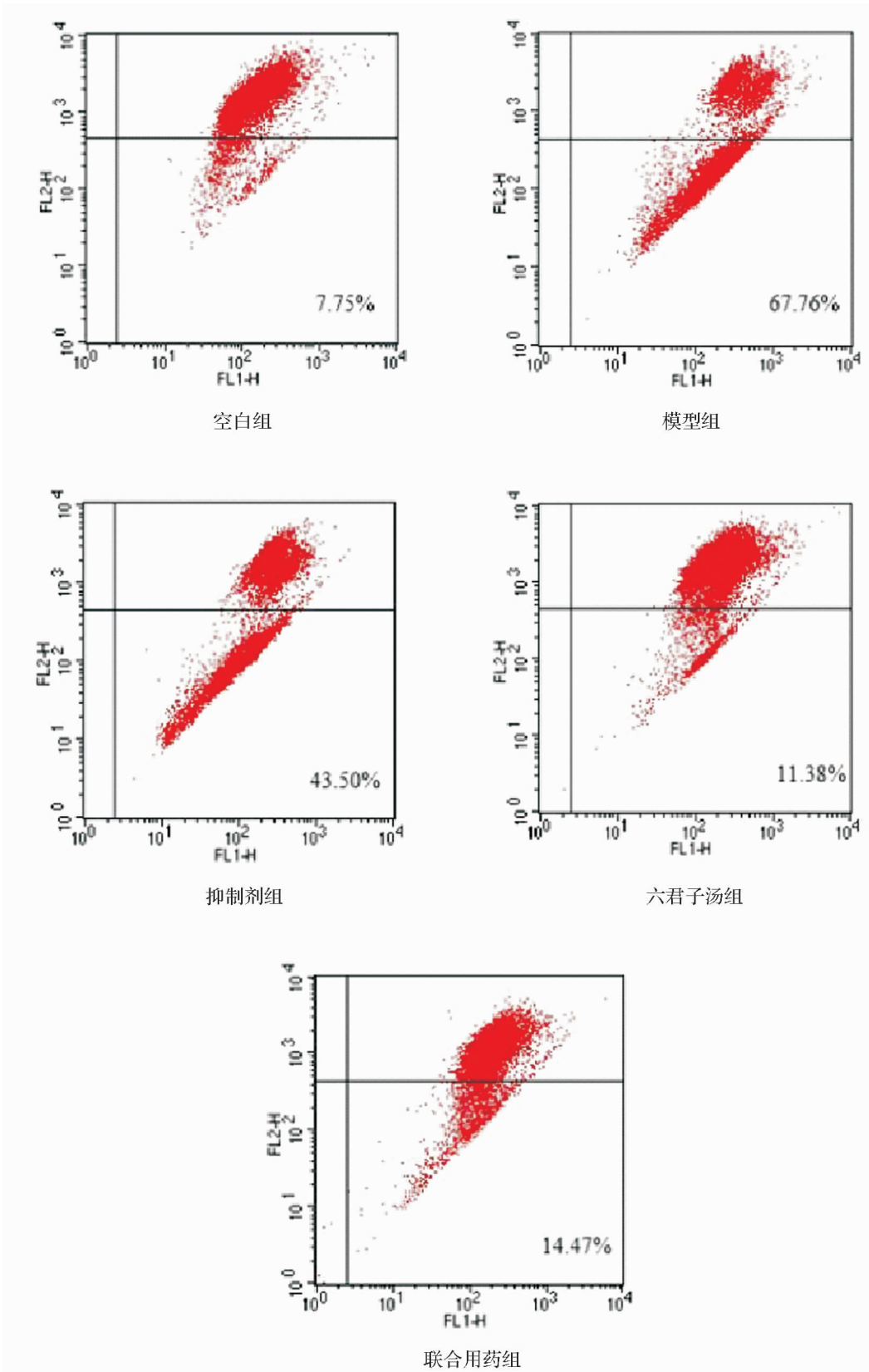



图 4 流式细胞术观测药物对各组 C2C12 细胞线粒体膜电位的影响