DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.09.009

# 补阳还五汤水提物通过JNK/c-Jun信号通路减轻$H_2O_2$诱导的PC12细胞凋亡

温瞿华[1,2],叶妙勇[3],赵梓钦[4],王继禹[4],杨文涛[5],马利民[2],赵凡[2]
[1.广西中医药大学,广西 南宁 530200;2.南通大学附属医院泌尿外科(国家中西医协同"旗舰"建设科室),江苏 南通 226001;
3.温州医科大学附属温岭医院,浙江 温岭 317599;4.云南中医药大学,云南 昆明 650011;
5.广西中医药大学附属瑞康医院,广西 南宁 530012]

**摘要:**目的 基于c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)/c-Jun信号通路探讨补阳还五汤水提物对$H_2O_2$诱导的PC12细胞凋亡的影响及其作用机制。方法 采用最佳浓度200 μmol/L的$H_2O_2$处理PC12细胞构建氧化应激体外细胞模型。设正常组、模型组、补阳还五汤(BHD)低、中、高剂量组、SP600125组,采用SP600125和不同浓度的BHD培养基对PC12细胞进行处理。利用实时细胞分析(RTCA)系统及CCK-8法检测细胞增殖情况;免疫荧光及流式细胞仪检测细胞内活性氧水平及细胞凋亡情况;蛋白质印迹检测细胞内促凋亡蛋白Bcl-2相关X蛋白(BCL-2-associated X protein,Bax)、促凋亡蛋白半胱氨酸依赖性天冬氨酸特异性蛋白酶-3(Cysteine-dependent aspartate-specific protease-3,Caspase-3)、抗凋亡蛋白Bcl-2、c-Jun、p-c-Jun、p-JNK、JNK蛋白的表达情况。结果 与正常组比较,模型组活性氧水平、细胞凋亡率、Bax和Caspase-3蛋白表达、p-JNK/JNK和p-c-Jun/c-Jun明显升高,Bcl-2蛋白表达明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,高剂量BHD干预后活性氧水平、细胞凋亡率、Bax和Caspase-3蛋白表达、p-JNK/JNK和p-c-Jun/c-Jun显著降低($P<0.01$),Bcl-2蛋白表达明显升高($P<0.01$)。结论 补阳还五汤水提物可通过JNK/c-Jun信号通路抑制氧化应激介导的PC12细胞凋亡,揭示了补阳还五汤可通过促进神经损伤修复而改善难治性勃起功能障碍的潜在作用机制。

**关键词:**补阳还五汤;神经损伤;细胞凋亡;氧化应激;c-Jun氨基末端激酶/c-Jun信号通路;难治性勃起功能障碍
**中图分类号:**R289.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-7717(2026)09-0047-10

# Buyang Huanwu Decoction(补阳还五汤) Attenuates $H_2O_2$ Induced Apoptosis of PC12 Cells Through JNK/c-Jun Signaling Pathway

WEN Quhua[1,2],YE Miaoyong[3],ZHAO Ziqin[4],WANG Jiyu[4],YANG Wentao[5],MA Limin[2],ZHAO Fan[2]
[1.Guangxi University of Chinese Medicine,Nanning 530022,Guangxi,China;
2.Affiliated Hospital of Nantong University (National Flagship Construction Department of Collaboration between Traditional Chinese Medicine and Western Medicine),Nantong 226001,Jiangsu,China;
3.The Affiliated Wenling Hospital of Wenzhou Medical University,Wenling 317599,Zhejiang,China;
4.Yunnan University of Chinese Medicine,Kunming 650011,Yunnan,China;
5.Ruikang Hospital,Guangxi University of Chinese Medicine Affiliated Hospital,Nanning 530012,Guangxi,China]

**Abstract:***Objective* To investigate the effect and mechanism of water extract of Buyang Huanwu Decoction (补阳还五汤, BHD) on $H_2O_2$-induced apoptosis in PC12 cells based on the JNK/c-Jun signaling pathway. *Methods* An oxidative stress cell model was established by treating PC12 cells with $H_2O_2$ at an optimal concentration of 200 μmol/L. The experiment was divided into a normal group,a model group,low-,middle- and high-dose BHD groups,and an SP600125 group. PC12 cells were treated with SP600125 and different concentrations of BHD medium. The cell proliferation was detected using a real-time cell anal-

**基金项目:**国家自然科学基金项目(82004360);国家中医药管理局国家中西医协同"旗舰"科室(泌尿外科)建设项目(国中医药综结合函〔2024〕221号);中华中医药学会青年人才托举工程项目(CACM-2023-QNRC2-B21);江苏省研究型医院资助基金项目(YJXYY202204-YSA05,YJXYY202204-XKB08);南通市卫生健康委员会科研项目(MS2023020);南通大学附属医院"青蓝工程"项目
**作者简介:**温瞿华(1996-),男,江西赣州人,医师,博士在读,研究方向:泌尿男科疾病的中西医结合基础与临床。
**通讯作者:**赵凡(1989-),男,江苏南通人,主治医师,博士,研究方向:泌尿男科疾病的中西医结合基础与临床。E-mail:zhaofan@ntu.edu.cn。
马利民(1975-),男,江苏南通人,主任医师,博士,研究方向:泌尿男科疾病的中西医结合基础与临床。E-mail:ntmalimin@163.com。

ysis(RTCA) system and the CCK-8 method. Intracellular reactive oxygen species(ROS) levels and apoptosis were measured by immunofluorescence and flow cytometry. The protein expression levels of Bax, Caspase-3, Bcl-2, c-Jun, p-c-Jun, p-JNK and JNK were detected by Western blotting. *Results* Compared with the normal group, the model group showed significantly increased ROS levels, apoptosis rate, protein expressions of Bax and Caspase-3 and ratios of p-JNK/JNK and p-c-Jun/c-Jun, while the expression of Bcl-2 protein was significantly decreased($P<0.01$). Compared with the model group, high-dose BHD intervention significantly reduced ROS levels, apoptosis rate, protein expressions of Bax and Caspase-3 and ratios of p-JNK/JNK and p-c-Jun/c-Jun($P<0.01$), while significantly increasing the expression of Bcl-2 protein($P<0.01$). *Conclusion* The water extract of Buyang Huanwu Decoction can inhibit oxidative stress-mediated apoptosis in PC12 cells through the JNK/c-Jun signaling pathway, revealing a potential mechanism by which Buyang Huanwu Decoction may improve refractory erectile dysfunction by promoting nerve injury repair.

**Keywords**: Buyang Huanwu Decoction(补阳还五汤); nerve injury; apoptosis; oxidative stress; JNK/c-Jun signaling pathway; refractory erectile function

周围神经损伤(Peripheral nerve injuries, PNI)是一种以感觉和运动功能障碍为主要表现的神经系统疾病,可由创伤、医源性损伤等多种因素造成,亦可由内科疾病(如糖尿病等)引起,并可能进一步导致靶器官的结构和/或功能受损[1-2]。中医学无PNI的记载,但可将PNI归属于"痿证""痹证""筋伤"等范畴,PNI后"气血失和(气机虚滞和血瘀络阻)"是导致病情进展及靶器官结构和功能损伤的关键病机[3]。研究表明清·王清任《医林改错》中所载的经典益气活血通络复方补阳还五汤(Buyang huanwu decoction, BHD)用于治疗PNI疗效肯定,且不良反应少[4]。有学者提出PNI损伤后失神经肌萎缩的中医病理机制为气虚血瘀,这与笔者团队前期提出神经损伤后阴茎海绵体平滑肌萎缩(阴茎海绵体平滑肌细胞凋亡)伴功能损害的基本病机为气虚血瘀有"异曲同工之妙"[5]。目前,笔者团队已针对PNI(如阴茎海绵体神经损伤)与难治性勃起功能障碍(refractory erectile dysfunction, RED)的关系及益气活血通络方药的干预作用机制方面展开了一些研究[6-9],认为神经损害参与了包括前列腺癌根治术(Radical prostatectomy, RP)后勃起功能障碍(Erectile dysfunction, ED)(医源性阴茎海绵体神经受损)、糖尿病性ED(糖尿病周围神经病变)等多种RED的病理生理过程并在其中起关键作用,提出益气活血通络法是防治RED的基本中医治则学术观点[10-13]。同时,课题组前期也已通过动物实验证实BHD可有效改善双侧海绵体神经损伤及糖尿病大鼠模型勃起功能[8,14],但作用机制仍需进一步探讨。

神经损伤后可导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过度积累并介导氧化应激反应,继而进一步加重损伤[15],其中,氧化应激所致的神经细胞凋亡在神经损伤性ED、糖尿病性ED等RED病理机制中扮演重要角色[16]。c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)又被称为应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK),1996年,Kolesnick等报道了神经酰胺(ceramide)通过JNK信号介导了应激诱导的细胞凋亡[17],目前认为JNK/c-Jun信号通路在ROS介导的细胞凋亡中起到重要调控作用[18]。PC12细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤的分化细胞,其在结构和功能上与神经元有许多相似之处,故被广泛用于神经生理学和神经药理学研究,常在体外细胞实验中替代神经元以进行神经损伤机制及干预的研究[19]。

本研究利用PC12细胞株,通过$H_2O_2$体外刺激构建了氧化应激模型,并基于JNK/c-Jun信号通路探讨了BHD水提物对氧化应激诱导的PC12细胞凋亡的抑制作用及机制,以期从"减少细胞凋亡不能提示促进修复可提示减轻神经损伤"的角度探讨和揭示BHD用于改善前列腺癌根治术后ED、糖尿病性ED等RED的潜在可行性及部分科学内涵。

## 1 材料和方法

1.1 化学试剂 Dulbecco改良的Eagle培养基/营养混合物F12(DMEM/F12)(11320033, Gibco公司);胎牛血清(FBS)(S9030, Solarbio公司);胰蛋白酶(X1020, Solarbio公司);活性氧检测试剂盒(S0033,碧云天生物技术公司);Hoechst 33258染色液(C1017,碧云天生物技术公司);JNK抑制剂SP600125(S1876,碧云天生物技术公司);细胞计数试剂盒-8(CCK-8)(C0037,碧云天生物技术公司);大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞(SCSP-517,中国医学科学院细胞库);半胱氨酸依赖性天冬氨酸特异性蛋白酶-3(Cysteine-dependent aspartate-specific protease-3, Caspase-3)抗体(ab2302, Abcam公司);Bcl-2相关X蛋白(BCL-2-associated X protein, Bax)抗体(ab32503, Abcam公司);Bcl-2抗体(ab32124, Abcam公司);JNK抗体(#9252, Cell Signaling Technology公司);p-JNK抗体(#4668, Cell Signaling Technology公司);c-Jun抗体(#9165, Cell Signaling Technology公司);p-c-Jun抗体(#2994, Cell Signaling Technology公司);β-肌动蛋白(YM8010, Immunoway公司);二抗(YM2195, Immunoway公司);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(556547, BD Biosciences公司)。

1.2 补阳还五汤的制备及质量控制 黄芪、赤芍、桃仁、当归、川芎、地龙、红花购自浙江中医药大学医疗器械有限公司(中国浙江)。将所有草药以120∶15∶15∶15∶15∶15∶6(干重)的比例混合(表1)[6]。将混合物在质量为其10倍的蒸馏水中煮沸两次,每次60 min。收集两次煮沸的液体,浓缩至1 g/mL,并以6000 g/min的转速离心15 min。将上清液通过0.22 mm的微膜(Sartorius, Goettingen, GER)过滤,并在-80 ℃下储存以备后用。

采用UPLC-Q-TOF-MS技术对BHD标准汤剂的化学成分进行了分析。色谱分析在35 ℃下使用ACQUITY HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)进行。流速为0.2 mL/

min,二元梯度洗脱系统由水(含0.1%甲酸)(A)和乙腈(B)组成。UPLC线性梯度洗脱程序如下:0~2 min,5%~20% B;2~9 min,20%~40% B;9~14 min,40% B;14~24 min,40%~65% B;24~27 min,65%~90% B;27~29 min,90% B;29~33 min,5% B,2 L。

表1 补阳还五汤组成剂量

| 成分 | 剂量/(g) |
|---|---|
| 黄芪 | 120 |
| 赤芍 | 15 |
| 桃仁 | 15 |
| 当归 | 15 |
| 川芎 | 15 |
| 地龙 | 15 |
| 红花 | 6 |

本研究采用AB SCIEX Triple TOF TM 5600+系统(AB SCIEX Technologies,波士顿,马萨诸塞州,美国)进行质谱(MS)分析。质量扫描范围为m/z 100-2000,离子喷雾电压为4.5 kV,离子源温度为500 ℃,去簇电压为-100 V,碰撞能量为-45 eV,碰撞能量叠加为(-45±15) eV,帘气(CUR)为40 kPa,雾化气GS1和辅助气GS2的压力均为50 kPa,数据采集时间为40 min。数据分析采用Peak View软件(AB SCIEX Technologies,波士顿,马萨诸塞州,美国)进行。

1.3 细胞培养 PC12细胞购自中国医学科学院细胞库(中国上海)。细胞在含10%磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS)、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM/F12培养基中,于37 ℃、含5% $CO_2$的加湿培养箱中培养。

1.4 氧化应激体外模型 为建立PC12细胞的氧化应激模型,根据团队前期实验基础及预实验结果[20],本研究采用最佳浓度200 μmol/L的$H_2O_2$处理细胞。简言之,将PC12细胞以4000个细胞/孔的密度接种于含10%胎牛血清(FBS)的DMEM/F12培养基的96孔板中,培养24 h。随后,用PBS(Solarbio,北京,中国)或浓度200 μmol/L的$H_2O_2$处理细胞。24 h后,更换为无血清培养基,并加入CCK-8溶液(10 μL/孔)。继续培养1 h后,使用酶标仪(Sunnyvale,CA,USA)测定450 nm处的吸光度。细胞活力计算公式如下:细胞活力=(实验组吸光度/对照组吸光度)×100。

1.5 细胞增殖测定 本研究采用实时细胞分析(RTCA)系统(ACEA Biosciences,Inc.,CA,USA)检测BHD对正常PC12细胞的增殖作用,并使用CCK-8法检测BHD对$H_2O_2$诱导损伤的PC12细胞的保护作用。RTCA系统通过检测细胞指数(CI)来评估细胞增殖效果,该指数与细胞数量和活力呈正相关。在细胞接种前,向E-plate的每个微孔中加入50 μL培养基,并将E-plate放入RTCA中进行10 min的自检。自检完成后,启动基线测试,以确认所有选定孔均正常接触。随后,将指数生长的PC12细胞以8000个细胞/孔的密度接种于E-plate中,每孔加入100 μL含不同浓度BHD(0~40 mg/mL)的培养基。将E-plate安装于RTCA上,并置于37 ℃、5% $CO_2$的培养箱中。系统自动校正扫描后,记录不同浓度BHD对PC12细胞活性的影响曲线。

采用CCK-8法检测BHD的保护作用。简言之,将PC12细胞以4000个细胞/孔的密度接种于96孔板中,使用含10% FBS的DMEM/F12培养基,并先用$H_2O_2$(200 μmol/L)预处理12 h,然后更换为含不同浓度BHD(10、15、20 mg/mL)的新鲜培养基继续孵育12 h。12 h后,将原培养基更换为无血清培养基,并加入CCK-8溶液(10 μL/孔)。继续培养1 h后,使用酶标仪(Sunnyvale,CA,USA)测定450 nm处的吸光度。细胞存活率计算公式如下:细胞存活率=(实验组吸光度/对照组吸光度)×100%。

1.6 细胞内活性氧的检测 使用2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)探针(购自中国上海碧云天生物技术有限公司)检测细胞内ROS水平。DCFH-DA进入细胞后,会被水解为DCFH,进而被ROS氧化为高强度的绿色DCF。简言之,将PC12细胞以$5\times10^4$个细胞/孔的密度接种到6孔板中培养24 h。每组细胞先用含有SP600125和不同浓度BHD(0、10、15、20 mg/mL)的培养基预处理12 h。用PBS洗涤细胞3次后,暴露于用培养基稀释的$H_2O_2$(200 μmol/L)中。12 h后,再次洗涤细胞,并在含有10 μM DCFH-DA的无血清培养基中孵育30 min。随后洗去剩余的DCFH-DA,在485 nm处激发DCFH荧光,并使用荧光显微镜(日本东京奥林巴斯公司)在520 nm处测量发射光。

1.7 Hoechst 33258染色 每组细胞按上述方法处理后,在避光条件下,使用浓度为10 μg/mL的Hoechst 33258染色液(碧云天生物技术有限公司,中国上海)染色30 min;随后弃去染色液,用PBS洗涤细胞3次,在荧光显微镜(Olympus)下观察细胞形态并拍照记录。

1.8 流式细胞仪分析 本研究使用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒检测PC12细胞的凋亡情况。根据制造商的说明,先用BHD预处理细胞,然后用$H_2O_2$处理,之后用冰冷的PBS洗涤两次,并用胰蛋白酶消化。随后收集细胞,再次用冰冷的PBS洗涤,在4 ℃下以1000 r/min离心5 min。收集到的细胞重悬于PBS中,然后加入5 μL的Annexin V-FITC和10 μL的碘化丙啶(PI)。在37 ℃的暗处孵育10 min后,使用流式细胞仪(FACS,购自美国加利福尼亚州圣何塞的BD Biosciences公司)检测细胞凋亡情况。

1.9 蛋白质印迹 使用RIPA裂解液(Beyotime)提取总蛋白。按照上述步骤将种于6孔板中的细胞进行处理。之后,根据说明书,在冰上使用含有1% PMSF的RIPA裂解液裂解细胞30 min,并在4 ℃下以12 000 g/min离心15 min。使用BCA检测试剂盒的参考手册测量蛋白浓度。然后,在8%~10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)上电泳分离15 μg蛋白,并将其转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上(Bio-Rad Laboratories,Hercules,CA,USA)。每张PVDF膜随后在含有5%脱脂牛奶(Solarbio,北京,中国)的Tris缓冲液(Absin,上海,中国)中于25 ℃封闭1 h。接下来,每张膜在4 ℃下与一抗孵育过夜,包括抗c-Jun、p-c-Jun、p-JNK、JNK、Bcl-2、Bax、裂解的Caspase-3和β-肌动蛋白抗体,最后一种用作加载对照。第2天,用TBST(Absin,上海,中国)洗涤膜3次,然后在25 ℃下与相应的HRP标记的二抗孵育1 h。之后,用Be-

yoECL Moon(Biosharp,合肥,中国)处理膜,并使用 Odyssey 红外成像系统(Li-Cor Bioscience,Lincoln,NE,USA)检测红外荧光。使用 ImagePro Plus 6.0 软件(Media Cybernetics,Bethesda,MD,USA)分析获得的结果。

1.10 统计分析 所有数据均以均数±标准差(SD)表示,并使用 GraphPad Prism 6.0 软件(GraphPad Software,美国加利福尼亚州圣地亚哥)进行分析。组间比较采用单因素方差分析,随后进行适当的事后检验以分析差异。$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 UPLC-QTOF-MS/MS 分析 项目组采用 UPLC-QTOF-MS/MS 对受试者进行了全阴离子扫描。阴离子模式下的总离子数如插页Ⅺ图 1 所示。据此,研究发现 BHD 水提物中含有邻苯二甲酸酐、氢化肉桂酸、羟基红花黄色素 A、芍药苷、刺芒柄花素、黄芪皂苷Ⅱ和黄芪皂苷Ⅰ。

2.2 BHD 水提物对 PC12 细胞增殖的影响 RTCA 的结果表明,随着 BHD 水提物浓度从 0 增加到 40 mg/mL,其对正常 PC12 细胞增殖的影响显著增加。然而,当浓度高于 20 mg/mL 时,观察到正常 PC12 细胞的增殖率随着 BHD 水提物浓度的增加而降低(插页Ⅺ图 2A)。此外,我们使用相同浓度的 BHD 水提物处理 $H_2O_2$ 诱导损伤的 PC12 细胞 12 h,并使用 CCK-8 检测法测定其细胞活力(插页Ⅺ图 2B)。两项检测结果均显示,20 mg/mL 是促进 PC12 细胞增殖的最佳 BHD 水提物浓度。此外,10 mg/mL、15 mg/mL 和 25 mg/mL 的 BHD 水提物也显示出对 PC12 细胞增殖的促进作用。

2.3 BHD 水提物对 PC12 细胞活性氧水平的影响 如插页Ⅻ图 3A 所示,经 $H_2O_2$ 处理后,PC12 细胞中 ROS 荧光强度显著增强,细胞发出强烈的绿色荧光。用不同浓度的 BHD 水提物处理细胞后,发现 ROS 水平有不同程度的下降(插页Ⅻ图 3B)。结果显示,中剂量 BHD 水提物组和高剂量 BHD 水提物组之间的 ROS 水平差异无显著统计学意义($P>0.05$)。我们还注意到,中剂量 BHD 水提物组和高剂量 BHD 水提物组的 ROS 水平明显低于模型组($P<0.01$)。SP600125 组的 ROS 水平下降最为显著($P<0.01$)。

2.4 BHD 水提物对 PC12 细胞凋亡的影响 如插页ⅩⅢ图 4A 所示,正常组细胞的细胞核染色较浅且均匀。相比之下,我们在模型组中观察到大量凋亡细胞,其细胞核染色质增多,展现出高强度的蓝光染色,不同程度的细胞核固缩,以及偶尔的核分裂。然而,BHD 水提物处理减少了这些凋亡细胞的变化及凋亡细胞的数量。项目组以正常组作为免疫荧光强度统计的参照(插页ⅩⅢ图 4B)。据此,我们观察到模型组和正常组之间的荧光强度差异具有显著统计学意义($P<0.01$)。中剂量 BHD 水提物组和高剂量 BHD 水提物组的荧光强度明显低于模型组($P<0.01$),与模型组相比,SP600125 组的荧光强度下降最为显著($P<0.01$)。

为了定量分析 BHD 水提物对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响,我们进行了 Annexin V-FITC/PI 染色,并使用流式细胞术进行了分析评估。如插页ⅩⅣ图 5 所示,项目组发现与正常组相比,在使用 $H_2O_2$ 诱导凋亡后,模型组中 PC12 细胞的凋亡率显著增加($P<0.01$)。低浓度的 BHD 水提物并未显著改善 PC12 细胞的凋亡率($P>0.05$)。然而,中浓度和高浓度的 BHD 水提物均被证实可有效降低 PC12 细胞的凋亡率($P<0.05$),其高浓度的 BHD 水提物展现出更为显著的效果($P<0.01$)。值得注意的是,SP600125 可显著降低 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞凋亡($P<0.01$)。

2.5 BHD 水提物对 PC12 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 为了进一步探讨 BHD 水提物对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞凋亡保护作用的分子机制,项目组检测了 PC12 细胞中促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达情况。项目组的研究结果(见图 6)表明,在 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞中,促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达显著增加($P<0.01$),而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达则显著降低($P<0.01$)。然而,项目组观察到,在高浓度 BHD 水提物处理后,这一趋势得到了逆转,促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达显著降低($P<0.01$ 和 $P<0.05$),而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达则显著增加($P<0.01$)。同时,SP600125 也被证实能显著($P<0.01$)逆转 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞凋亡趋势。

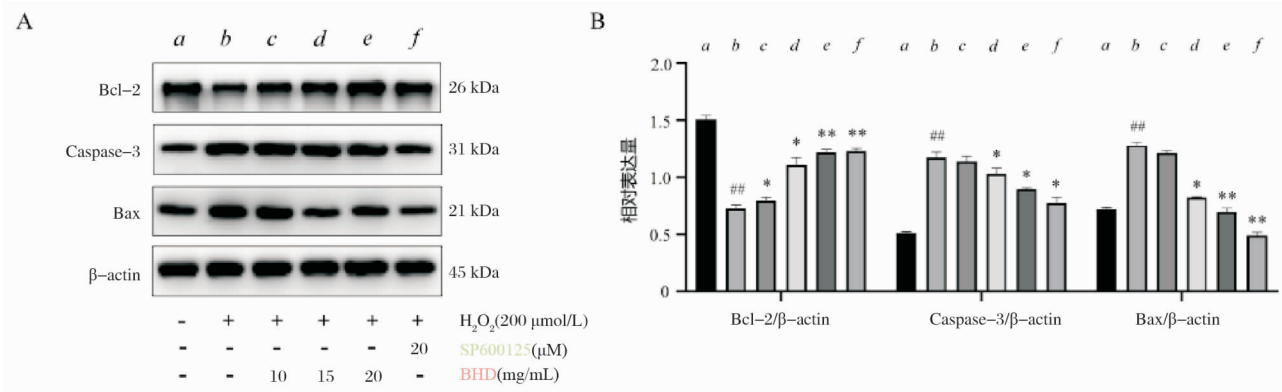
2.6 BHD 水提物对 JNK/c-Jun 信号通路的影响 已知 JNK/c-Jun 信号通路与细胞凋亡密切相关。为了探究 BHD 水提物是否能够通过 JNK/c-Jun 信号通路减少细胞凋亡,项目组通过蛋白质印迹法在过氧化氢诱导并处理的 PC12 细胞中检测了该通路的蛋白。结果(图 7)表明,高浓度 BHD 水提物显著抑制了 JNK 和 c-Jun 的磷酸化;即 p-JNK/JNK 和 p-c-Jun/c-Jun 均显著降低($P<0.01$)。中浓度 BHD 水提物的抑制作用不如高浓度显著($P<0.05$),而低浓度 BHD 水提物对 JNK/c-Jun 信号通路无显著影响($P>0.05$)。作为 JNK 特异性抑制剂,SP600125 对 JNK/c-Jun 信号通路显示出最显著地抑制作用($P<0.001$)。

## 3 讨论

中医学认为,PNI 的病因病机可分内外,外因为跌仆闪挫、金刃所伤,内因为脏腑虚损[3,21]。PNI 后病情进展及靶器官结构和功能受损的关键病机是“气血失和(气机虚滞和血瘀络阻)”,治疗当以益气活血通络为主。

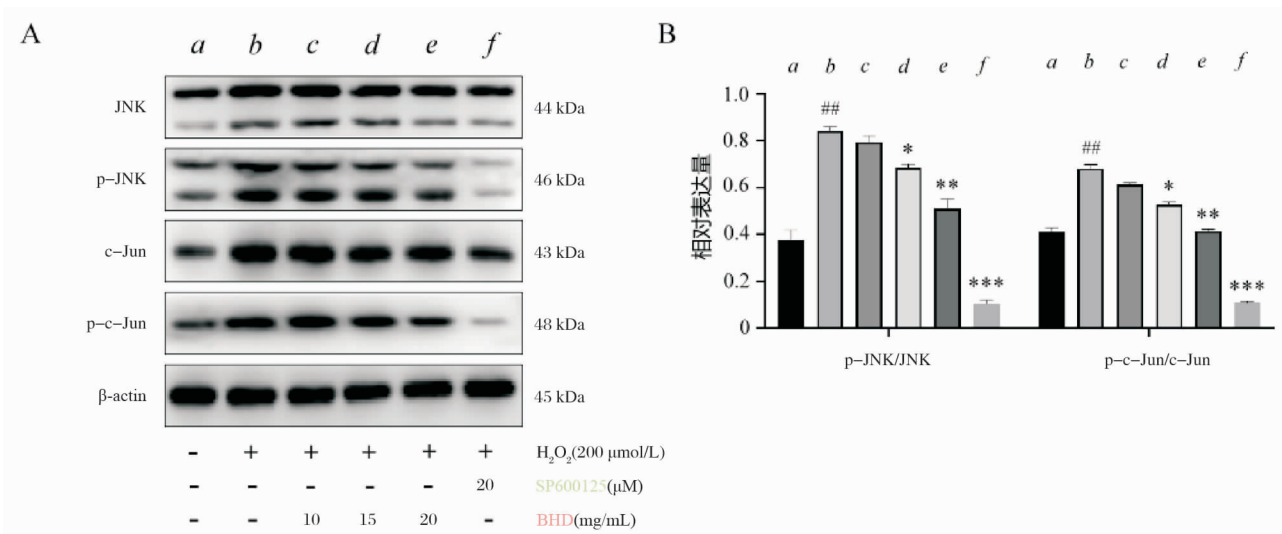
RED 是指患者经规范服用 5 型磷酸二酯酶抑制剂(包括剂量、疗程、起效时间),排除性刺激不充分、影响药物吸收因素(如酒精摄入)、产品质量问题等情况后,主诉勃起改善不显著甚至未改善的一类 ED[10]。笔者课题组研究发现,PNI 与多种 RED 关系密切,如前列腺癌根治术后 ED、糖尿病性 ED 等。前列腺癌根治手术技术虽然已经较为成熟,但仍然可能产生不可避免的神经损伤,从而导致 ED[12];另外,糖尿病周围神经病变是糖尿病性 ED 的关键病理机制之一,使得临床治疗效果不佳、颇为棘手[22]。因此,笔者课题组认为以“促神经损伤修复”探索 RED 的治疗或康复具有重要的研究价值,同时,提出益气活血通络法是防治 RED 的基本治则治法[10,12]。

神经损伤后的病理生理机制较为复杂,涉及到氧化应激、缺血/缺氧、纤维化、细胞凋亡等,其中氧化应激扮演着极其重要的角色。氧化应激是生物系统中抗氧化剂水平与 ROS 产生之间的不平衡状态,以 ROS 过量为特征,过量的 ROS 可触发细




注：(A)通过蛋白质印迹法检测 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞中的凋亡相关蛋白；(B)对(A)的定量分析。数据以均数 ± 标准差表示($n$ = 3)。a. 正常组，b. 模型组，c. 补阳还五汤低剂量组，d. 补阳还五汤中剂量组，e. 补阳还五汤高剂量组，f. SP600125 组。##与 a 组比较，$P$ < 0.01；* 与 b 组比较，$P$ < 0.05；* * 与 b 组比较，$P$ < 0.01。

图 6 BHD 水提物和 SP600125 对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞凋亡相关蛋白表达的影响




注：(A)通过蛋白质印迹法检测 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞中的 JNK/c - Jun 信号通路；(B)对(A)中的数据进行量化，以均数 ± 标准差表示($n$ = 3)。a. 正常组，b. 模型组，c. 补阳还五汤低剂量组，d. 补阳还五汤中剂量组，e. 补阳还五汤高剂量组，f. SP600125 组。##与 a 组比较，$P$ < 0.01；* 与 b 组比较，$P$ < 0.05；* * 与 b 组比较，$P$ < 0.01；* * * 与 b 组比较，$P$ < 0.001。

图 7 BHD 水提物和 SP600125 对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞中 JNK/c - Jun 信号通路的影响

胞凋亡[15]，从而进一步加重神经损伤。作为经典的益气活血通络复方，BHD 广泛应用于 PNI 的治疗。有学者研究 BHD 对糖尿病大鼠坐骨神经细胞凋亡的影响发现，BHD 能够显著抑制糖尿病大鼠坐骨神经氧化应激损伤及炎症因子水平，修复坐骨神经病理性损伤，改善大鼠坐骨神经功能，抑制坐骨神经细胞凋亡，进而促进糖尿病大鼠坐骨神经损伤的恢复[23]。另外，亦有学者证实了 BHD 可抑制脑缺血后神经细胞凋亡，从而对脑组织起到保护作用[24]。本研究采用 $H_2O_2$ 构建氧化应激体外细胞模型，结果显示经 $H_2O_2$ 处理后，PC12 细胞中的 ROS 水平显著提高，细胞凋亡率显著增加。在使用不同浓度的 BHD 水提物处理后，ROS 水平得到不同程度的下降，PC12 细胞凋亡率显著下降。JNK 抑制剂 SP600125 组 ROS 水平及 PC12 细胞凋亡率下降最显著。ROS 过量可触发细胞凋亡，而细胞凋亡亦会引起线粒体功能和结构产生变化，加剧 ROS 的产生，形成恶性循环[25]。因此，BHD 水提物可能通过下调细胞内的 ROS 水平，抑制氧化应激，从而抑制 PC12 细胞凋亡，同时，细胞凋亡被抑制后 ROS 的产生亦会减少，进一步抑制 PC12 细胞凋亡。另外，研究表明，促凋亡蛋白 Caspase - 3、Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl - 2 是线粒体诱导的细胞凋亡途径中的 3 种必需蛋白[26]。本研究发现，PC12 细胞凋亡的同时，细胞中 Bax 和 Caspase - 3 表达显著增加，Bcl - 2 的表达则显著降低，经高浓度 BHD 水提物处理后，Bax 和 Caspase - 3 的表达显著降低，而 Bcl - 2 的表达则显著增加，表明 BHD 水提物可能通过调控细胞凋亡相关蛋白抑制 PC12 细胞凋亡。

JNK/c - Jun 信号通路与 ROS 介导的细胞凋亡密切相关[18]。JNK 可通过不同的信号通路被 ROS 激活，激活后的 JNK 可通过磷酸化并抑制 Bcl - 2 表达发挥促凋亡活性[18]。因此，JNK 信号通路在细胞凋亡的过程中具有重要地位。有研究表明，益气活血通络的复方可能通过抑制 JNK 信号通路改善大鼠糖尿病神经病理性疼痛[27]。另外，有学者研究发现，益

气活血通络复方能抑制 JNK 信号通路的异常激活，从而保护糖尿病周围神经病变模型小鼠周围神经的功能[28]。本研究采用益气活血通络的 BHD 水提物处理 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞，在实验中发现 $H_2O_2$ 处理导致了 PC12 细胞内 JNK 和 c－Jun 的磷酸化，经 BHD 处理后，JNK 和 c－Jun 的磷酸化得到了抑制，而 JNK 特异性抑制剂 SP600125 处理后亦表现出对 JNK/c－Jun 信号通路的显著抑制作用。表明 BHD 水提物对 JNK/c－Jun 信号通路具有抑制作用。

综上，本研究利用 $H_2O_2$ 构建了 PC12 细胞氧化应激体外模型，BHD 水提物体外干预显示了抗氧化应激性能，且可以抑制氧化应激造成的 PC12 细胞凋亡；同时，本研究表明 BHD 水提物可通过 JNK/c－Jun 信号通路抑制氧化应激介导的 PC12 细胞凋亡。总之，本研究以“促进神经损伤修复”为研究切入点，初步揭示了 BHD 的部分作用机制，为临床上应用益气活血通络法（补阳还五汤及类方）治疗前列腺癌根治术后 ED、糖尿病性 ED 等难治性 ED 提供了一定理论依据。当然，本研究仍然存在一定局限性，需要通过进一步的体内外实验研究或结合多学科交叉手段去深入探讨。

**参考文献**

[1] LOPES B, SOUSA P, ALVITES R, et al. Peripheral nerve injury treatments and advances: one health perspective[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(2): 918.

[2] GALIERO R, CATURANO A, VETRANO E, et al. Peripheral neuropathy in diabetes mellitus: pathogenetic mechanisms and diagnostic options[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3554.

[3] 韩易言，马铁明. 针刺在周围神经损伤修复中的作用及机制探讨[J]. 中华中医药学刊，2022，40(6)：154－157.

[4] LIU H W, LI J, XU W H, et al. Chinese herbal medicine Buyang Huanwu Decoction in treatment of peripheral nerve injury: a systematic review and meta－analysis of randomized controlled trials[J]. Medicine, 2023, 102(29): e34256.

[5] 周岚，梅晓云. 益气活血法防治失神经肌萎缩的理论探讨[J]. 南京中医药大学学报，2012，28(4)：306－308.

[6] 周康，叶妙勇，赵凡，等. 两种黄芪剂量补阳还五汤对海绵体神经损伤性大鼠勃起功能障碍的治疗效果[J]. 中国实验动物学报，2020，28(6)：788－795.

[7] 赵凡，叶妙勇，马轲，等. 红景Ⅰ号方对双侧海绵体神经损伤SD大鼠阴茎组织中缝隙连接蛋白43表达的影响[J]. 中华男科学杂志，2021，27(1)：56－62.

[8] 叶妙勇，赵凡，王军卫，等. 补阳还五汤对糖尿病性勃起功能障碍大鼠阴茎海绵体纤维化及RhoA、ROCK2蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志，2022，42(11)：1369－1375.

[9] YE M Y, ZHAO F, MA K, et al. Effect of HongJing I in treating erectile function and regulating RhoA pathway in a rat model of bilateral cavernous nerve injury[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 1083737.

[10] 赵凡，李海松，张春和，等. 难治性勃起功能障碍中西医结合防治策略述评[J]. 中华中医药杂志，2023，38(9)：4013－4021.

[11] 温瞿华，赵凡，杨荣超，等. 勃起功能障碍（阳痿）中医治法研究现况[J]. 现代中西医结合杂志，2022，31(12)：1738－1743.

[12] 赵凡，张翔，石兵，等. 结合根治性前列腺切除术后勃起功能障碍的发病机制初探其中医药防治思路[J]. 中国男科学杂志，2017，31(6)：66－69.

[13] 赵凡，赵剑锋，张春和，等. 基于“气血理论”刍议阳痿病机及治法[J]. 中国性科学，2017，26(8)：90－92.

[14] YE M Y, ZHAO F, MA K, et al. Buyang Huanwu decoction ameliorates damage of erectile tissue and function following bilateral cavernous nerve injury[J]. Chin J Integr Med, 2023, 29(9): 791－800.

[15] ZHU H Y, ZHOU L, TANG J C, et al. Reactive oxygen species－responsive composite fibers regulate oxidative metabolism through internal and external factors to promote the recovery of nerve function[J]. Small, 2024, 20(37): e2401241.

[16] SONG G D, WANG J X, LIU J H, et al. Dimethyl fumarate ameliorates erectile dysfunction in bilateral cavernous nerve injury rats by inhibiting oxidative stress and NLRP3 inflammasome－mediated pyroptosis of nerve *via* activation of Nrf2/HO－1 signaling pathway[J]. Redox Biol, 2023, 68: 102938.

[17] VERHEIJ M, BOSE R, LIN X H, et al. Requirement for ceramide－initiated SAPK/JNK signalling in stress－induced apoptosis[J]. Nature, 1996, 380(6569): 75－79.

[18] SHEN H M, LIU Z G. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 40(6): 928－939.

[19] ZHOU T E, MO J R, XU W G, et al. Mild hypothermia alleviates oxygen－glucose deprivation/reperfusion－induced apoptosis by inhibiting ROS generation, improving mitochondrial dysfunction and regulating DNA damage repair pathway in PC12 cells[J]. Apoptosis, 2023, 28(3－4): 447－457.

[20] 叶妙勇，赵凡，马轲，等. $H_2O_2$ 对大鼠阴茎海绵体平滑肌细胞connexin43蛋白表达的影响及红景天苷的干预作用[J]. 中华男科学杂志，2019，25(8)：690－695.

[21] 谢翠梅，许林杰，钱长晖. 中医药对周围神经损伤修复的研究进展[J]. 中国民族民间医药，2022，31(17)：73－78.

[22] 《糖尿病合并男性性功能障碍多学科中国专家共识》编写专家委员会. 糖尿病合并男性性功能障碍多学科中国专家共识[J]. 中国男科学杂志，2022，36(1)：3－33.

[23] 张建，赵静. 补阳还五汤调节MEK/ERK通路对糖尿病大鼠坐骨神经细胞凋亡及机械性痛觉超敏的影响研究[J]. 检验医学与临床，2024，21(19)：2876－2882.

[24] 欧阳银，曾繁佐，刘镇奎，等. 补阳还五汤介导Cav1调控Wnt通路对脑缺血小鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 中国中医药信息杂志，2024，31(11)：104－109.

[25] CIRCU M L, AW T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(6): 749－762.

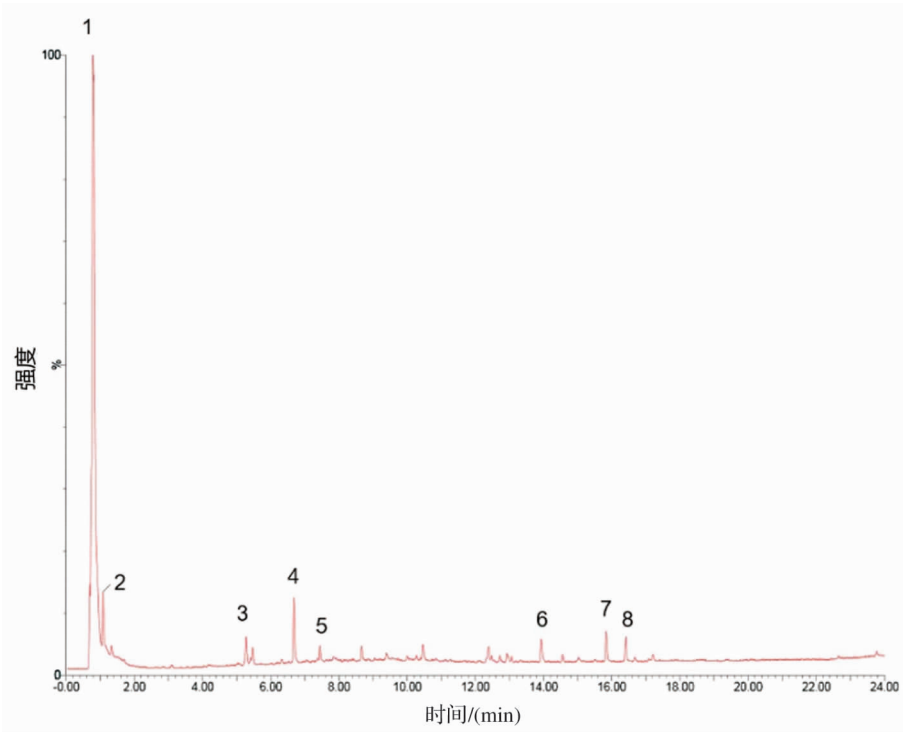
[26] LIANG Z W, CHEN Y, GU R F, et al. Asiaticoside prevents oxidative stress and apoptosis in endothelial cells by activating ROS－dependent p53/bcl－2/Caspase－3 signaling pathway[J]. Curr Mol Med, 2023, 23(10): 1116－1129.

[27] 马俊龙，唐何勇，王帆竞，等. 益气活血通络方对糖尿病神经病理性疼痛大鼠脊髓星形胶质细胞活性及JNK信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志，2021，36(3)：1397－1401.

[28] 姚永传，申国明，江爱娟，等. 益气活血通络方对糖尿病周围神经病变小鼠JNK信号通路蛋白及炎性因子的影响[J]. 北京中医药大学学报，2017，40(11)：923－927.

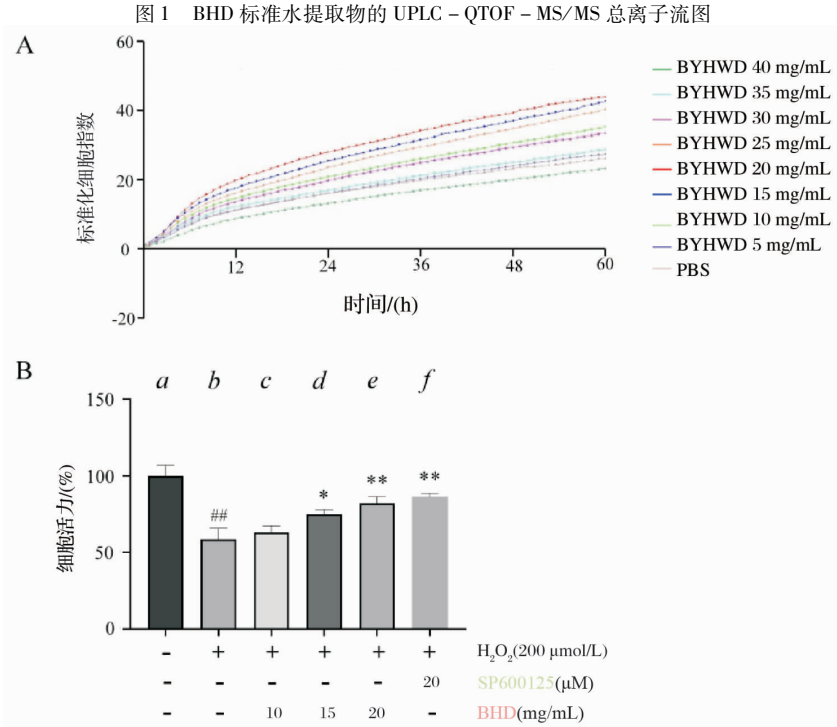
# 补阳还五汤水提物通过 JNK/c－Jun 信号通路减轻 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞凋亡

（正文见 47－52 页）



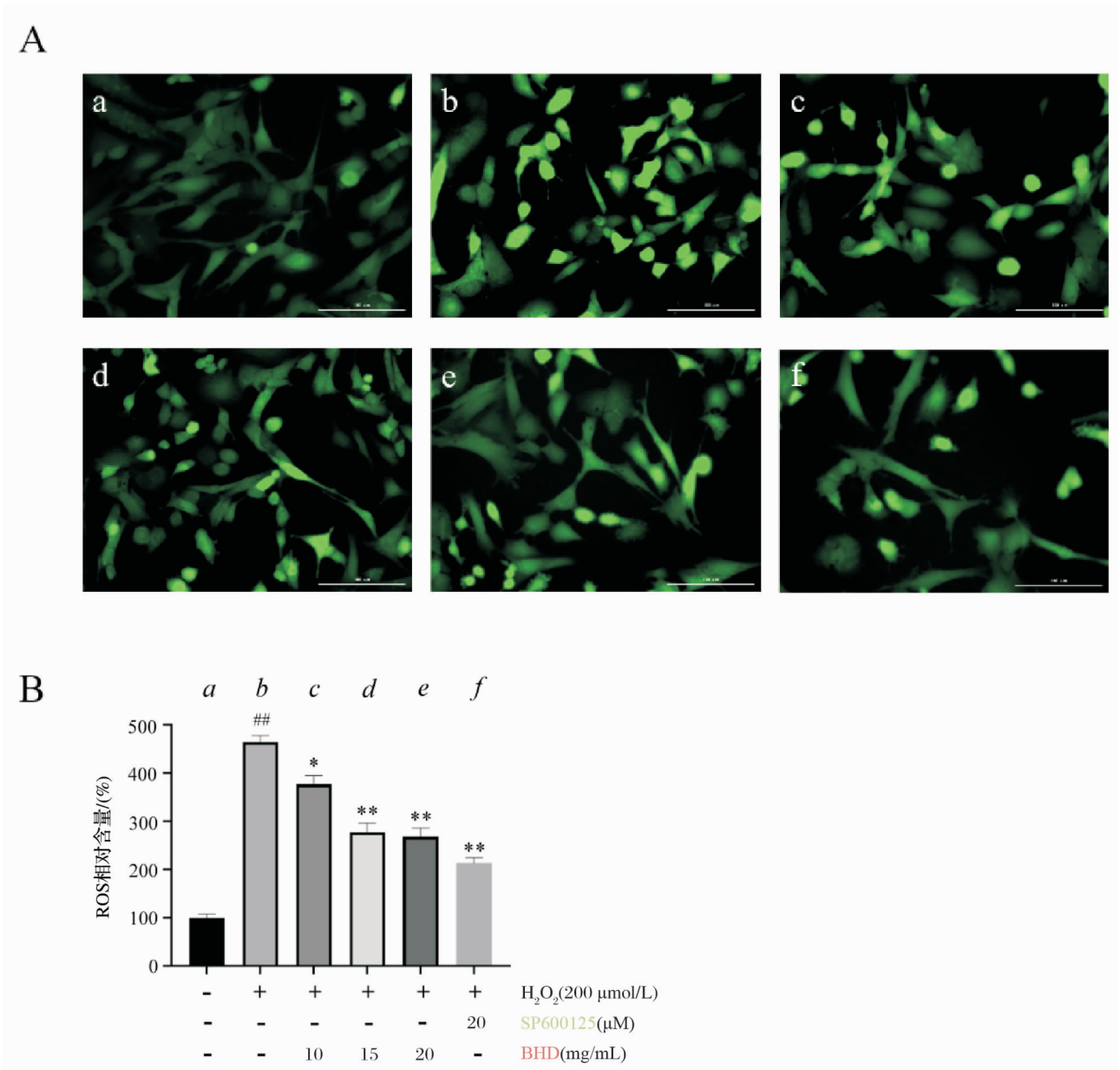

注：1：邻苯二甲酸酐；2：氢化肉桂酸；3：羟基红花黄色素 A；4：芍药苷；5：刺芒柄花素；6：黄芪皂苷Ⅱ；7：黄芪皂苷Ⅰ；8：黄芪皂苷Ⅰ。

图 1　BHD 标准水提取物的 UPLC－QTOF－MS/MS 总离子流图



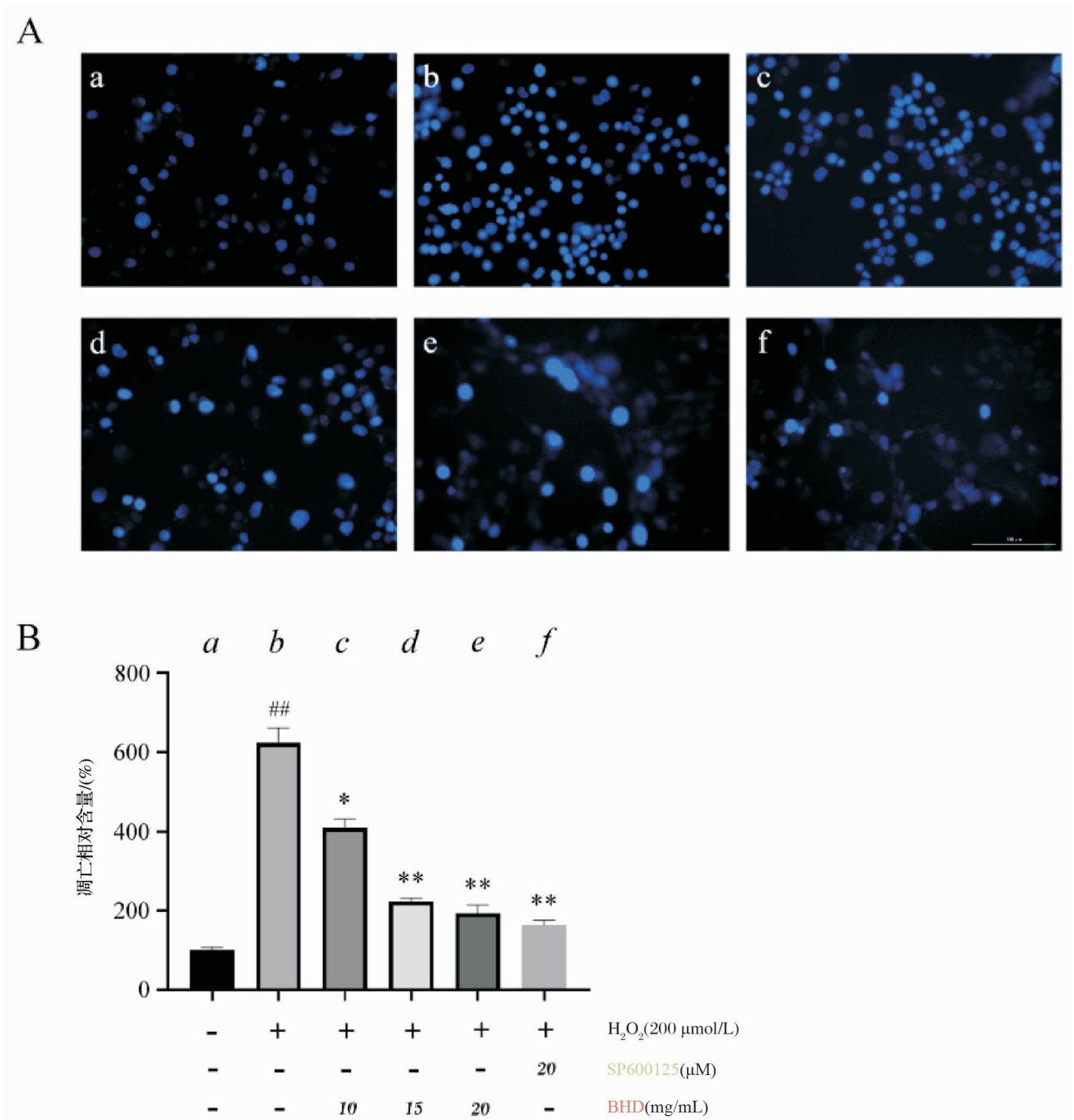

注：（A）不同浓度 BHD 水提物（0、5、10、15、20、25、30、35 和 40 mg/mL）对正常 PC12 细胞增殖的影响；（B）BHD（10、15、20 mg/mL）对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞增殖的影响。a. 正常组，b. 模型组，c. 补阳还五汤低剂量组，d. 补阳还五汤中剂量组，e. 补阳还五汤高剂量组，f. SP600125 组。##与 a 组比较，$P<0.01$；＊与 b 组比较，$P<0.05$；＊＊与 b 组比较，$P<0.01$。

图 2　BHD 水提物促进 PC12 细胞增殖



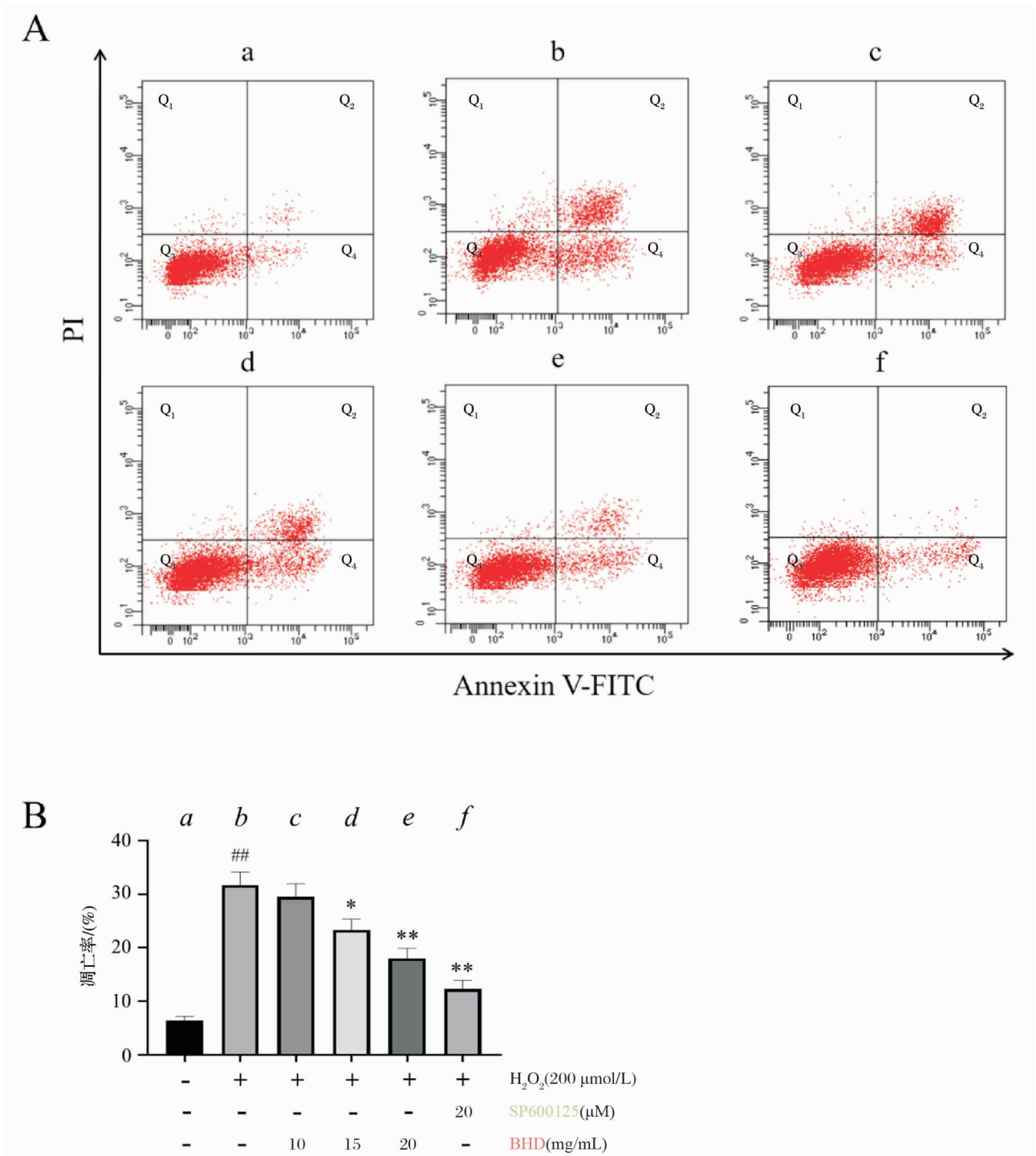

注：(A) SP600125 和不同浓度 BHD 水提物对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞中 ROS 水平影响的荧光图像；(B) 对(A)的量化分析。数据以平均数值 ± 标准差表示($n=3$)。a. 正常组，b. 模型组，c. 补阳还五汤低剂量组，d. 补阳还五汤中剂量组，e. 补阳还五汤高剂量组，f. SP600125 组。##与 a 组比较，$P<0.01$；* 与 b 组比较，$P<0.05$；* * 与 b 组比较，$P<0.01$。

图 3 BHD 水提物对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞中 ROS 水平的影响(原始放大倍数：×100。标尺 = 100 μm)




注：(A)SP600125 和不同浓度 BHD 水提物对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞凋亡影响的荧光图像；(B)(A)的量化数据。数据以平均数值 ± 标准差表示($n=3$)。a. 正常组，b. 模型组，c. 补阳还五汤低剂量组，d. 补阳还五汤中剂量组，e. 补阳还五汤高剂量组，f. SP600125 组。##与 a 组比较，$P<0.01$；* 与 b 组比较，$P<0.05$；* * 与 b 组比较，$P<0.01$。

图 4 BHD 水提物对 $H_2O_2$ 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响(原始放大倍数：×100。标尺 = 100 μm)




注：(A)凋亡的PC12细胞用Annexin V－FITC/PI染色并通过流式细胞仪进行分析，四个象限分别代表坏死细胞(Q1)、晚期凋亡细胞(Q2)、早期凋亡细胞(Q3)和活细胞(Q4)；(B)对(A)的定量分析。凋亡率＝晚期凋亡率＋早期凋亡率。数据以平均数值±标准差表示($n=3$)。a. 正常组，b. 模型组，c. 补阳还五汤低剂量组，d. 补阳还五汤中剂量组，e. 补阳还五汤高剂量组，f. SP600125组。##与a组比较，$P<0.01$；＊与b组比较，$P<0.05$；＊＊与b组比较，$P<0.01$。

图5 BHD水提物和SP600125对$H_2O_2$诱导的PC12细胞凋亡的影响