

甘草附子汤对顺铂诱导大鼠雪旺细胞线粒体功能和凋亡的影响

姚风云¹, 姜劫琳¹, 韩瑶瑶^{2,3}, 张凯茵^{2,3}, 李雯^{2,3}, 杨红芳^{2,3}, 王琳¹, 崔言坤^{1*}

(1. 江西中医药大学中医学院, 江西 南昌 330004; 2. 江西省方-证研究重点实验室, 江西 南昌 330004; 3. 南昌市方-证对应免疫及代谢疾病防治重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 探讨甘草附子汤对顺铂诱导 RSC96 (大鼠雪旺细胞) 线粒体功能和凋亡的影响。**方法** 将 RSC96 细胞随机分为正常组、模型组、阿司匹林组、甘草附子汤组、辛味药组和甘味药组, 正常组和模型组给予 10% 空白血清, 各给药组分别给予 10% 含药血清。预给药 4 h 后, 除正常组外其余各组加入 0.5 μg/mL 顺铂造模, 24 h 后检测各组细胞存活率、细胞凋亡率、SOD 活性及 H₂O₂、ATP 水平, ELISA 法检测 GSH-Px 活性及 MDA、Cyt-C、PGC-1α 水平, Western blot 法检测 DRP1、p-DRP1、Bcl-2、Bax 蛋白表达, RT-qPCR 法检测 DRP1、Bcl-2、Bax mRNA 表达, 免疫荧光法检测 MFN1、MFN2 表达。**结果** 与正常组比较, 模型组细胞存活率降低 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$), SOD、GSH-Px 活性及 ATP、PGC-1α 水平降低 ($P < 0.01$), MDA、H₂O₂ 水平升高 ($P < 0.01$), p-DRP1/DRP1、Bax 蛋白及 DRP1、Bax mRNA 表达升高 ($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 及 MFN1、MFN2 蛋白荧光表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 甘草附子汤组 24 h 细胞存活率升高 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率降低 ($P < 0.01$), SOD、GSH-Px 活性及 ATP、PGC-1α 水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), MDA、H₂O₂ 水平降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), p-DRP1/DRP1、Bax 蛋白及 DRP1、Bax mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 及 MFN1、MFN2 蛋白荧光表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 甘味药组细胞凋亡率降低 ($P < 0.01$), GSH-Px 活性及 ATP 水平升高 ($P < 0.01$), MDA 水平降低 ($P < 0.01$), p-DRP1/DRP1、Bax 蛋白及 DRP1 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$), Bcl-2 mRNA 及 MFN1 蛋白荧光表达升高 ($P < 0.01$); 辛味药组 GSH-Px 活性及 ATP 升高 ($P < 0.01$), MDA 水平降低 ($P < 0.01$), H₂O₂ 水平升高 ($P < 0.05$), PGC-1α 水平降低 ($P < 0.01$), p-DRP1/DRP1、Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。**结论** 甘草附子汤可通过“辛”“甘”配伍来改善顺铂诱导 RSC96 细胞线粒体功能障碍和细胞凋亡, 其机制可能与抑制 DRP1 磷酸化而减少线粒体分裂, 上调 MFN1、MFN2 表达而促进线粒体融合有关。

关键词: 甘草附子汤; RSC96 细胞; 甘味; 辛味; 线粒体功能; 细胞凋亡; DRP1; MFN1/2

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)05-1486-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.05.009

Effects of Gancao Fuzi Tang on mitochondrial function and apoptosis of rat Schwann cells induced by cisplatin

YAO Feng-yun¹, JIANG Jie-lin¹, HAN Yao-yao^{2,3}, ZHANG Kai-yin^{2,3}, LI Wen^{2,3}, YANG Hong-fang^{2,3}, WANG Lin¹, CUI Yan-kun^{1*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Jiangxi Provincial Key Laboratory for Formula-Pattern Research, Nanchang 330004, China; 3. Nanchang Municipal Key Laboratory for Prevention and Treatment of Immunological and Metabolic Disease Related to Prescription and Syndrome, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT: AIM To explore the effects of Gancao Fuzi Tang on mitochondrial function and apoptosis of RSC96 (rat Schwann cells) induced by cisplatin. **METHODS** RSC96 cells were randomly divided into normal group, model group, aspirin group, Gancao Fuzi Tang group, acrid medicine group and sweet medicine group. The normal group and model group were given 10% blank serum, while each treatment group was given 10% medicine

收稿日期: 2025-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82104725); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ211245); 江西省中医药管理局科技计划项目 (2021B708)

作者简介: 姚风云 (1975—), 女, 博士, 教授, 从事方剂配伍规律现代研究。E-mail: hrbyaoyao2000@163.com

* 通信作者: 崔言坤 (1991—), 女, 博士, 副教授, 从事方剂作用机理及其药效物质基础研究。E-mail: 20201020@jxutcm.edu.cn

containing serum. After 4 hours of pre-administration, except the normal group, all other groups were interfered with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ cisplatin to create a model. After 24 hours, the cell survival rate, apoptosis rate, SOD activity, H_2O_2 and ATP levels in each group were detected. ELISA was used to detect GSH-Px activity and MDA, Cyt-C, PGC-1 α levels. Western blot was used to detect the protein expressions of p-DRP1, DRP1, Bcl-2 and Bax. RT-qPCR was used to detect the mRNA expressions of *DRP1*, *Bcl-2* and *Bax*. Immunofluorescence was used to detect the MFN1 and MFN2 expressions. **RESULTS** Compared with the normal group, the survival rate of cells in the model group decreased ($P < 0.01$), the apoptosis rate increased ($P < 0.01$), the activities of SOD and GSH-Px, the levels of ATP and PGC-1 α decreased ($P < 0.01$), the levels of MDA and H_2O_2 increased ($P < 0.01$), the expressions of p-DRP1/DRP1 and Bax proteins, and *DRP1* and *Bax* mRNA all increased ($P < 0.01$), and the expressions of *Bcl-2* mRNA, and MFN1 and MFN2 proteins fluorescence decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the 24-hour cell survival rate in Gancao Fuzi Tang group increased ($P < 0.05$), the apoptosis rate decreased ($P < 0.01$), the activities of SOD and GSH-Px, the levels of ATP and PGC-1 α increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the levels of MDA and H_2O_2 decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expressions of p-DRP1/DRP1, Bax proteins, and *DRP1* and *Bax* mRNA decreased ($P < 0.01$), while the expressions of *Bcl-2* mRNA, and MFN1 and MFN2 proteins fluorescence increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the sweet medicine group, the apoptosis rate decreased ($P < 0.01$), GSH-Px activity and ATP level increased ($P < 0.01$), MDA level decreased ($P < 0.01$), the expressions of p-DRP1/DRP1, Bax proteins and *DRP1* mRNA decreased ($P < 0.01$), and the expressions of *Bcl-2* mRNA and MFN1 protein fluorescence increased ($P < 0.01$). In the acrid medicine group, GSH-Px activity, ATP level increased ($P < 0.01$), MDA level decreased ($P < 0.01$), H_2O_2 level increased ($P < 0.05$), PGC-1 α level decreased ($P < 0.01$), and p-DRP1/DRP1 and Bax protein expressions decreased ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Gancao Fuzi Tang can improve the mitochondrial function and apoptosis of RSC96 cells induced by cisplatin through the compatibility of “Xin” and “Gan”, and its mechanism may be related to inhibiting DRP1 phosphorylation to reduce mitochondrial division, and increase the expressions of MFN1 and MFN2 to promote mitochondrial fusion.

KEY WORDS: Gancao Fuzi Tang; RSC96 cells; sweet flavor; acrid flavor; mitochondrial functions; apoptosis; DRP1; MFN1/2

目前,我国癌症的发生率和死亡率均高于全球平均水平^[1]。化疗可特异性杀伤癌细胞并阻断增殖,但其诸多不良反应成为棘手问题。化疗所致周围神经病(chemotherapy-induced peripheral neuropathy, CIPN)是由神经毒性化疗药所致的严重不良反应^[2],发病率高达68.1%^[3],其典型症状包括对称分布的肢端麻木、刺痛、触感异常和感觉障碍^[4],通常随化疗进程而发展,具有明显的剂量依赖性^[5]。CIPN发病机制尚未明确,主要涉及线粒体功能障碍、氧化应激、背根神经节感觉神经元损伤、神经炎症等^[4-5]。目前,有证据支持可治疗CIPN的药物数量单一,作用有限,并存在不良反应^[3,6]。近年来,中医药在促进周围神经损伤修复方面有切实可靠的作用^[7],因此,充分利用其独特优势进一步挖掘有效防治CIPN的方法切实可行。

甘草附子汤出自《伤寒杂病论》,是“辛甘化

阳”配伍的代表方之一,用于治疗风湿相搏所致“骨节烦疼,掣痛,不得屈伸”,对寒湿证疼痛模型的止痛作用显著^[8]。课题组前期研究表明,甘草附子汤能有效缓解CIPN模型小鼠疼痛症状,其机制与抗炎、抗氧化应激有关^[9]。为了进一步明确甘草附子汤防治CIPN的作用机制,本实验将从该方及其拆方调控动力蛋白相关蛋白1(dynamine-related protein 1, DRP1)、改善线粒体功能、抑制细胞凋亡的角度进行探讨,以期为扩大其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 细胞株 大鼠雪旺细胞RSC96,购自武汉普诺赛生命科技有限公司,序列号2J1Z8BCOVT。

1.2 动物 50只SPF级SD雄性大鼠,体质量(220 \pm 20)g,购买并饲养于江西中医药大学实验动物中心[实验动物生产许可证号SCXK(赣)2023-0001,实验动物使用许可证号SYXK(赣)

2022-0002], 饲养环境温度 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (55 ± 5)%, 自由摄食饮水。实验方案符合江西中医药大学实验动物伦理委员会标准 (伦理审批号 JZLLSC20210051)。

1.3 药物 甘草附子汤(炙甘草 10 g、制附子 15 g、桂枝 20 g、白术 10 g)及其辛味药(制附子 15 g、桂枝 20 g)、甘味药(炙甘草 10 g、白术 10 g)组方饮片均购自江西中医药大学附属医院。制附子(黑顺片)由亳州市沛谯药业有限责任公司生产,批号 240902;炙甘草、桂枝、白术均由江西江中中药饮片有限公司生产,批号 241025、2412059、240708。取甘草附子汤及其辛味药、甘味药组方饮片适量,分别加入 8 倍量蒸馏水浸泡 30 min,先煎制附子 1 h,再加入其他药物煎煮 2 次,每次 50 min,合并 2 次滤液,浓缩至生药量 1 g/mL。阿司匹林肠溶片(100 mg/片,石药集团欧意药业有限公司,批号 2862209326),制成 0.009 g/mL 药液,现用现配。顺铂(美国 Sigma 公司,批号 102478462)。

1.4 试剂 CCK-8 试剂盒(深圳百凯美生物技术有限公司,批号 231211); Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 240008004); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢(H_2O_2)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20240802、20241122、202301221); 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C)、过氧化物酶体增殖激活受体- γ 辅激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α) ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号 070921008536320710、121309008210161218、121309008114341218、121309008210321218); DRP1、磷酸化 DRP1 (p-DRP1) 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号 8570S、6319S); B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax) 抗体(英国 Abcam 公司,货号 AB194583、AB32503); 线粒体融合素 1 (mitofusin 1, MFN1)、MFN2 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 00122853、00140833)。

1.5 仪器 Attune NxT 流式细胞仪(美国赛默飞世尔科技公司); XRS+型化学发光成像系统、CFX 96 Touch 实时荧光定量 PCR 系统(美国 Bio-Rad

公司); SpectraMax 190 光吸收型全波长酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); Spark 10M 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); uLite 超微量分光光度计(英国 BioChrom 公司); DM3000 LED 显微镜(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 RSC96 细胞选用含 10% 胎牛血清及 1% 青-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基,置于 37°C 、5% CO_2 无菌培养箱中培养。当细胞增长至 80%~90% 时进行传代,取对数生长期者进行后续实验。

2.2 顺铂诱导 RSC96 细胞 CIPN 模型制备 取对数生长期 RSC96 细胞,调整密度至 $3\times 10^4/\text{mL}$,接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,细胞贴壁后分别用 0.5、1.0、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 顺铂干预^[10], 24、48 h 后检测细胞存活率,确定顺铂造模浓度。

2.3 含药血清制备 大鼠适应性喂养 3 d 后,随机分为空白血清组、阿司匹林含药血清组(0.009 g/kg)、甘草附子汤含药血清组(4.95 g/kg)、辛味药含药血清组(3.15 g/kg)和甘味药含药血清组(1.8 g/kg),每组 10 只,每天按相应给药剂量灌胃,空白血清组给予等体积生理盐水,连续给药 7 d。末次给药 1 h 后麻醉大鼠,腹主动脉采血,静置,离心后取上清, 56°C 水浴灭活 30 min, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,得到相应含药血清,置于 -80°C 冰箱中保存。

2.4 含药血清浓度筛选 取对数生长期 RSC96 细胞,调整密度至 $3\times 10^4/\text{mL}$,接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,待细胞贴壁后弃去原培养基,分别加入用 DMEM 高糖培养基梯度稀释的阿司匹林含药血清、甘草附子汤含药血清、辛味药含药血清、甘味药含药血清(梯度依次为 5%、10%、15%、20%)进行干预,同时设置相应浓度的空白血清组作为对照。24、48 h 后,检测各组细胞存活率,选择最佳含药血清浓度。

2.5 分组及给药 RSC96 细胞分为正常组、模型组、阿司匹林组、甘草附子汤组、辛味药组和甘味药组,正常组和模型组加入空白血清,其余 4 组加入含药血清。预给药 4 h 后,除正常组外其余各组加入顺铂进行造模,正常组给予等体积 PBS。

2.6 CCK-8 法检测细胞存活率 RSC96 细胞按“2.5”项下方法分组、给药后按照试剂盒说明书,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,置于培养箱中继续孵育 2 h,测定 450 nm 波长处光密度(OD)值,计

算细胞存活率。

2.7 流式细胞术检测细胞凋亡情况 收集 RSC96 细胞,按照 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书,将流式细胞仪调整至合适电压进行检测,通过 Flowjo 软件分析细胞凋亡情况。

2.8 生化试剂盒检测细胞 H₂O₂、ATP 水平和 SOD 活性 取对数生长期 RSC96 细胞,调整其密度至 5×10⁴/mL,接种于 10 cm 培养皿中,每皿 8 mL,按“2.5”项下方法分组、给药后收集,按照试剂盒说明书检测 H₂O₂、ATP 水平和 SOD 活性。

2.9 ELISA 法检测细胞 MDA、Cyt-C、PGC-1α 水平和 GSH-Px 活性 RSC96 细胞按“2.8”项下方法分组、给药后收集,按照试剂盒说明书检测 MDA、Cyt-C、PGC-1α 水平和 GSH-Px 活性。

2.10 Western blot 法检测细胞 p-DRP1、DRP1、Bcl-2、Bax 蛋白表达 提取各组 RSC96 细胞总蛋

白,变性后采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜、封闭后加入稀释后的一抗 p-DRP1 (1:1 000)、DRP1 (1:1 000)、Bcl-2 (1:500)、Bax (1:1 000) 及 GAPDH (1:5 000),4 ℃ 孵育过夜,次日加入稀释后的二抗 (1:10 000),室温孵育 1 h,化学发光法曝光成像,条带采用 Image Lab 软件进行定量分析。

2.11 RT-qPCR 法检测细胞 DRP1、Bcl-2、Bax mRNA 表达 按照试剂盒说明书提取 RSC96 细胞总 RNA,采用超微量分光光度计测定纯度和浓度,按照试剂盒说明书逆转录为 cDNA。采用实时荧光 PCR 定量系统设定扩增循环程序,以 GAPDH 为内参,测定 DRP1、Bcl-2、Bax mRNA 相对表达。引物由深圳华大基因股份有限公司合成,序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

基因	正向引物	反向引物	产物长度/bp
GAPDH	5'-CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT-3'	5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	94
DRP1	5'-AGGTTGCCCGTGACAAATGA-3'	5'-CACAGGCATCAGCAAAGTCG-3'	94
Bcl-2	5'-GGTGAAGTGGGGAGGATTG-3'	5'-AGAGCGATGTTGTCACCAG-3'	102
Bax	5'-TGCTACAGGGTTCATCCAGG-3'	5'-TGAGACACTCGCTCAGCTTCTTG-3'	114

2.12 免疫荧光法检测细胞 MFN1、MFN2 表达 在 12 孔板中放入 RSC96 细胞爬片,每孔接种 4×10⁴ 个,按“2.5”项下方法分组、给药后 4% 多聚甲醛固定,0.2% Triton 通透,5% 牛血清白蛋白封闭,加入稀释后的一抗 MFN1 (1:400) 和 MFN2 (1:200),4 ℃ 孵育过夜,次日复温后,加入稀释后的荧光二抗 (1:400),避光孵育 1 h,再加入 DAPI 染色液,避光孵育 5 min,滴加适量抗荧光淬灭封片剂,取出细胞爬片,倒扣在封片剂上,在荧光显微镜下观察并拍摄,采用 ImageJ 软件进行平均荧光强度定量分析。

2.13 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度顺铂对 RSC96 细胞存活率的影响 与对照组比较,不同浓度顺铂均导致 RSC96 细胞存活率降低 ($P < 0.01$),并且随其质量浓度增加及作用时间延长而进一步降低 ($P < 0.01$),见表 2。最终,选择 0.5 μg/mL 进行造模。

3.2 不同浓度含药血清对 RSC96 细胞存活率的影响 各组含药血清作用于 RSC96 细胞 24 h 后,

表 2 不同质量浓度顺铂对 RSC96 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 2 Effects of different concentrations of cisplatin on the viability of RSC96 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	24 h 细胞存活率/%	48 h 细胞存活率/%
对照组	100.00±8.38	100.00±7.21
0.5 μg/mL 顺铂组	83.55±6.36 ^{###}	54.93±5.75 ^{###}
1.0 μg/mL 顺铂组	73.00±2.65 ^{###}	31.36±2.99 ^{###}
1.5 μg/mL 顺铂组	71.06±8.57 ^{###}	23.80±1.83 ^{###}

注:与对照组比较,^{###} $P < 0.01$ 。

细胞存活率基本随其浓度增加呈现不同程度的下降趋势,在 15%、20% 下更明显;与空白血清组比较,5% 各含药血清组细胞存活率无明显变化 ($P > 0.05$),10% 辛味药含药血清组细胞存活率降低 ($P < 0.01$),15% 甘味药含药血清组和 20% 辛味药含药血清组细胞存活率升高 ($P < 0.05$),见表 3。培养 48 h 后,与空白血清组比较,15%、20% 各含药血清组细胞存活率无明显变化 ($P > 0.05$),5% 阿司匹林含药血清组、5% 辛味药含药血清组细胞存活率降低 ($P < 0.05$),10% 甘草附子汤含药血清组细胞存活率升高 ($P < 0.01$),见表 4。最终,选择 5%、10% 进行后续实验。

表3 不同浓度含药血清培养24 h对RSC96细胞存活率的影响 (OD, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab. 3 Effects of different concentrations of drug-containing serum cultured for 24 h on the viability of RSC96 cells (OD, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	5% 血清浓度	10% 血清浓度	15% 血清浓度	20% 血清浓度
空白血清组	0.82±0.07	0.74±0.03	0.55±0.05**	0.40±0.03**
阿司匹林含药血清组	0.73±0.04	0.65±0.04	0.60±0.05**	0.45±0.07**
甘草附子汤含药血清组	0.78±0.07	0.75±0.07	0.51±0.07**	0.41±0.04**
辛味药含药血清组	0.78±0.05	0.60±0.04***#	0.66±0.07*	0.52±0.08**#
甘味药含药血清组	0.73±0.06	0.69±0.07	0.68±0.07#	0.47±0.08**

注: 与5%血清浓度比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与空白血清组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

表4 不同浓度含药血清培养48 h对RSC96细胞存活率的影响 (OD, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab. 4 Effects of different concentrations of drug-containing serum cultured for 48 h on the viability of RSC96 cells (OD, $\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	5% 血清浓度	10% 血清浓度	15% 血清浓度	20% 血清浓度
空白血清组	1.75±0.03	1.75±0.09	1.76±0.07	1.86±0.05
阿司匹林含药血清组	1.64±0.04#	1.84±0.06*	1.76±0.10	1.81±0.18
甘草附子汤含药血清组	1.69±0.07	1.95±0.06***#	1.77±0.12	1.83±0.06*
辛味药含药血清组	1.63±0.05#	1.84±0.09*	1.71±0.12	1.82±0.13*
甘味药含药血清组	1.70±0.07	1.82±0.07	1.76±0.10	1.80±0.07

注: 与5%血清浓度比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与空白血清组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.3 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导RSC96细胞存活率的影响 培养24 h后,与正常组比较,模型组细胞存活率降低($P<0.01$);与模型组比较,5%甘草附子汤组细胞存活率有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$),10%甘草附子汤组细胞

存活率升高($P<0.01$),10%甘味药组细胞存活率降低($P<0.01$),而培养48 h后,与模型组比较,各给药组细胞存活率无明显变化($P>0.05$),见表5。最终,后续实验以10%血清浓度给药,造模24 h为时间截点进行指标检测。

表5 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导RSC96细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab. 5 Effects of Gancao Fuzi Tang and its decomposed recipes on the viability of RSC96 cells induced by cisplatin ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	24 h 细胞存活率/%		48 h 细胞存活率/%	
	5% 血清浓度	10% 血清浓度	5% 血清浓度	10% 血清浓度
正常组	100.00±9.13	100.00±4.77	100.00±3.86	100.00±4.00
模型组	69.34±6.35##	78.95±8.46##	48.04±3.86##	44.52±1.84##
阿司匹林组	69.39±7.52	78.47±7.78	49.85±4.40	39.31±2.90
甘草附子汤组	77.03±7.71	92.41±7.98*	47.49±5.31	44.15±1.28
辛味药组	67.57±5.14	71.17±6.12	47.24±3.58	40.38±3.46
甘味药组	76.86±9.44	61.73±1.80**	44.77±6.01	39.40±3.36

注: 与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.4 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导RSC96细胞凋亡的影响 与正常组比较,模型组凋亡细胞百分比升高($P<0.01$);与模型组比较,阿司匹林组、甘草附子汤组和甘味药组凋亡细胞百分比降低($P<0.01$),见表6、图1。

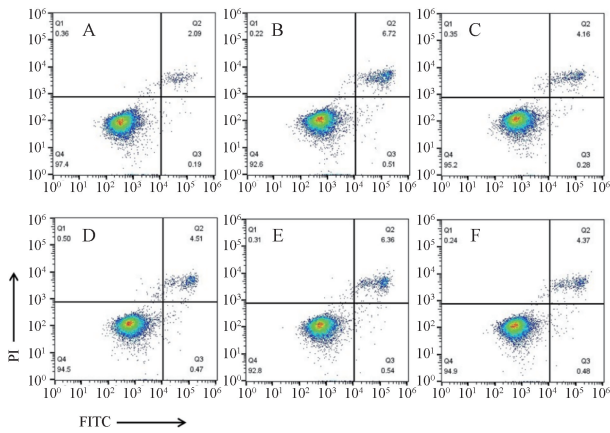
表6 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导RSC96细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 6 Effects of Gancao Fuzi Tang and its decomposed recipes on apoptosis of RSC96 cells induced by cisplatin ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	凋亡细胞百分比/%	数量/个
正常组	2.26±0.14	231.67±27.54
模型组	6.60±0.16##	644.00±14.93##
阿司匹林组	4.22±0.15**	406.00±14.93**
甘草附子汤组	4.75±0.21**	453.00±18.03**
辛味药组	6.28±0.16	601.67±16.17
甘味药组	4.45±0.09**	429.67±7.64**

注: 与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

3.5 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导RSC96细胞SOD、GSH-Px活性及MDA、H₂O₂水平的影响 与正常组比较,模型组细胞SOD、GSH-Px活性降低($P<0.01$),MDA、H₂O₂水平升高($P<0.01$);与模型组比较,甘草附子汤组细胞SOD、GSH-Px活性升高($P<0.05$, $P<0.01$),MDA、H₂O₂水平降低($P<0.05$, $P<0.01$),辛味药组和甘味药组细



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为阿司匹林组，D 为甘草附子汤组，E 为辛味药组，F 为甘味药组。

图 1 各组 RSC96 细胞凋亡流式图

Fig. 1 Flow chart of apoptosis of RSC96 cells in each group

胞 GSH-Px 活性升高 ($P < 0.01$)，MDA 水平降低 ($P < 0.01$)，阿司匹林组 MDA 水平降低 ($P < 0.01$)，而辛味药组 H_2O_2 水平升高 ($P < 0.05$)，见表 7。

3.6 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导 RSC96 细胞 ATP、Cyt-C、PGC-1 α 水平的影响 与正常组比较，模型组细胞 ATP、PGC-1 α 水平降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，甘草附子汤组 ATP、PGC-1 α 水平升高 ($P < 0.01$)，辛味药组和甘味药组 ATP 水平升高 ($P < 0.01$)，辛味药组 PGC-1 α 水平降低 ($P < 0.01$)，而各组 Cyt-C 水平无明显差异 ($P > 0.05$)，见表 8。

3.7 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导 RSC96 细胞 p-DRP1、DRP1、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组细胞 p-DRP1/DRP1、Bax 蛋白

表 7 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导 RSC96 细胞 SOD、GSH-Px 活性及 MDA、 H_2O_2 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 7 Effects of Gancao Fuzi Tang and its decomposed recipes on activities of SOD, GSH-Px and levels of MDA and H_2O_2 in RSC96 cells induced by cisplatin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	SOD/(U·mg prot ⁻¹)	GSH-Px/(mIU·mg prot ⁻¹)	MDA/(ng·mg prot ⁻¹)	H_2O_2 /(mmol·g prot ⁻¹)
正常组	13.46±1.01	190.18±3.66	1.98±0.01	8.18±0.46
模型组	11.01±0.28 ^{##}	165.21±3.77 ^{##}	2.48±0.19 ^{##}	13.82±0.32 ^{##}
阿司匹林组	11.64±0.33	176.61±2.19	1.97±0.20 ^{**}	15.36±0.65
甘草附子汤组	12.19±0.35 [*]	187.16±9.04 ^{**}	1.67±0.02 ^{**}	10.11±0.18 [*]
辛味药组	11.25±0.24	198.99±10.82 ^{**}	1.83±0.07 ^{**}	17.38±0.47 [*]
甘味药组	11.73±0.95	187.04±10.09 ^{**}	1.73±0.06 ^{**}	16.36±2.82

注：与正常组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

表 8 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导 RSC96 细胞 ATP、Cyt-C、PGC-1 α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 8 Effects of Gancao Fuzi Tang and its decomposed recipes on ATP, Cyt-C and PGC-1 α levels in RSC96 cells induced by cisplatin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ATP/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{g prot}^{-1}$)	Cyt-C/ (ng·mg prot ⁻¹)	PGC-1 α / (ng·g prot ⁻¹)
正常组	31.80±2.40	51.55±4.92	31.73±1.55
模型组	23.16±1.24 ^{##}	55.75±2.80	16.67±0.78 ^{##}
阿司匹林组	22.88±0.85	61.10±3.02	15.29±0.86
甘草附子汤组	32.81±0.46 ^{**}	50.32±1.12	19.15±1.31 ^{**}
辛味药组	28.42±0.57 ^{**}	63.45±2.49	13.69±0.51 ^{**}
甘味药组	30.89±0.72 ^{**}	54.62±2.51	14.90±0.32

注：与正常组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

表达升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)；与模型组比较，甘草附子汤组、辛味药组、甘味药组细胞 p-DRP1/DRP1、Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)，阿司匹林组细胞 p-DRP1/DRP1 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)，而各组 Bcl-2 蛋白表达无明显差异 ($P > 0.05$)，见表 9、图 2。

3.8 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导 RSC96 细胞 DRP1、Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响 与正常组

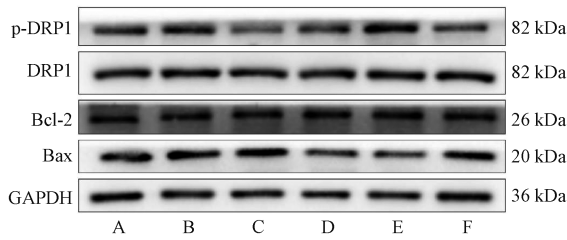
表 9 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导 RSC96 细胞 p-DRP1/DRP1、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 9 Effects of Gancao Fuzi Tang and its decomposed recipes on the protein expressions of p-DRP1/DRP1, Bcl-2 and Bax in RSC96 cells induced by cisplatin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	p-DRP1/DRP1	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH
正常组	0.75±0.07	0.64±0.10	0.74±0.06
模型组	1.01±0.05 ^{##}	0.58±0.02	1.65±0.28 ^{##}
阿司匹林组	0.53±0.06 ^{**}	0.74±0.08	1.38±0.17
甘草附子汤组	0.50±0.10 ^{**}	0.77±0.11	0.88±0.02 ^{**}
辛味药组	0.67±0.05 ^{**}	0.56±0.03	0.86±0.17 ^{**}
甘味药组	0.49±0.06 ^{**}	0.45±0.04	0.86±0.12 ^{**}

注：与正常组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

比较，模型组细胞 DRP1、Bax mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)，Bcl-2 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，各给药组 Bcl-2 mRNA 表达均升高 ($P < 0.01$)，阿司匹林组、甘草附子汤组、甘味药组细胞 DRP1 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)，甘草附子汤组细胞 Bax mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)，而辛味药组 Bax mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)，见表 10。



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为阿司匹林组，D 为甘草附子汤组，E 为辛味药组，F 为甘味药组。

图 2 各组细胞 p-DRP1、DRP1、Bcl-2、Bax 蛋白条带

Fig. 2 Protein bands of p-DRP1, DRP1, Bcl-2 and Bax in cells of each group

表 10 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导 RSC96 细胞 DRP1、Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 10 Effects of Gancao Fuzi Tang and its decomposed recipes on the mRNA expressions of DRP1, Bcl-2 and Bax in RSC96 cells induced by cisplatin ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	DRP1 mRNA	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA
正常组	1.00±0.02	1.00±0.05	1.00±0.08
模型组	1.32±0.10 ^{##}	0.78±0.09 [#]	1.51±0.25 ^{##}
阿司匹林组	0.85±0.04 ^{**}	1.15±0.07 ^{**}	1.45±0.06
甘草附子汤组	0.68±0.01 ^{**}	1.35±0.07 ^{**}	1.11±0.07 ^{**}
辛味药组	1.15±0.19	1.58±0.14 ^{**}	1.85±0.18 [*]
甘味药组	0.90±0.07 ^{**}	1.11±0.02 ^{**}	1.33±0.05

注：与正常组比较，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。

3.9 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导 RSC96 细胞 MFN1、MFN2 表达的影响 与正常组比较，模型组细胞 MFN1、MFN2 表达降低 ($P<0.01$)；与模

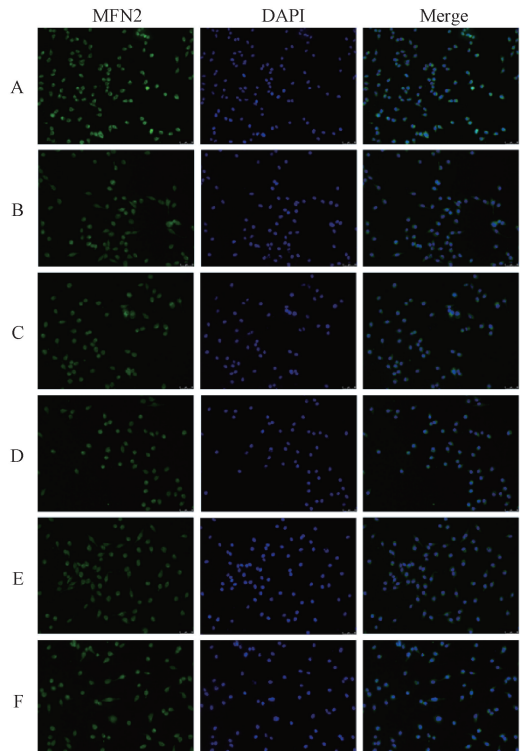
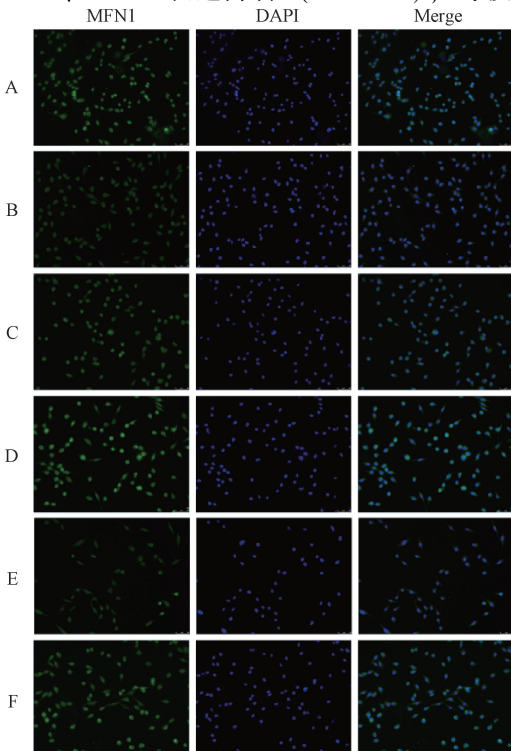
型组比较，甘草附子汤组 MFN1、MFN2 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，而阿司匹林组和甘味药组细胞 MFN1 表达升高 ($P<0.01$)，见表 11、图 3。

表 11 甘草附子汤及其拆方对顺铂诱导 RSC96 细胞 MFN1、MFN2 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 11 Effects of Gancao Fuzi Tang and its decomposed recipes on the expressions of MFN1 and MFN2 in RSC96 cells induced by cisplatin ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	MFN1 平均荧光强度	MFN2 平均荧光强度
正常组	53.98±1.02	67.52±4.83
模型组	28.13±1.84 ^{##}	32.33±2.72 ^{##}
阿司匹林组	45.17±3.13 ^{**}	43.19±4.71
甘草附子汤组	66.83±1.22 ^{**}	44.26±1.54 [*]
辛味药组	27.98±1.43	41.92±0.49
甘味药组	61.07±3.07 ^{**}	43.35±5.58

注：与正常组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$ 。



注：A 为正常组，B 为模型组，C 为阿司匹林组，D 为甘草附子汤组，E 为辛味药组，F 为甘味药组。

图 3 各组 RSC96 细胞 MFN1、MFN2 免疫荧光染色 ($\times 200$)

Fig. 3 Immunofluorescence staining of MFN1 and MFN2 in RSC96 cells in each group ($\times 200$)

4 讨论

CIPN属于中医“痹证”范畴，与风、寒、湿关系密切，即“风寒湿三气杂至，合而为痹也”。铂类药物是致CIPN的主要原因之一，其药性寒凉^[11]，易损阳气，常遇冷诱发或遇寒加重^[12]，故以阳虚寒凝、风湿痹阻、经脉不通为基本病机^[13]，治则温阳散寒、宣痹止痛。甘草附子汤由甘草、附子、桂枝、白术组成，方中附子、桂枝辛热，温阳散寒止痛；白术、甘草甘温，益气健脾，使阳气化生有源，合附子、桂枝温补并用，寓“辛甘化阳”之意。课题组前期研究证实，甘草附子汤可通过抗炎、抗氧化应激来改善CIPN^[9]；本实验以顺铂诱导RSC96细胞损伤建立CIPN模型，以抗炎镇痛药阿司匹林为阳性对照药，进一步研究甘草附子汤改善CIPN的作用机制。

线粒体功能障碍、氧化应激引起的神经损伤是CIPN关键发病机制^[14]，铂类药物易在周围神经系统中累积，改变线粒体形态及功能，造成神经元损伤，表现为ATP生成减少和活性氧类增加^[15]。SOD、GSH-Px可清除异常增多的活性氧类，有抗氧化作用，而MDA是反映脂质过氧化程度的重要指标。本研究结果显示，甘草附子汤可促进顺铂诱导RSC96细胞ATP生成，提高SOD、GSH-Px活性，降低MDA、H₂O₂水平，可能通过抗氧化应激、保护线粒体功能来改善CIPN。

线粒体裂变和融合过程对线粒体功能至关重要^[16]，DRP1是促进线粒体分裂的关键蛋白之一，抑制p-DRP1表达可减轻神经元损伤^[17]；线粒体融合主要由MFN1和MFN2介导，缺乏其一会显著降低线粒体融合效率^[18]；PGC-1 α 作为线粒体生成的关键调节因子，可调节MFN1、MFN2、DRP1蛋白表达及磷酸化，影响线粒体的融合和分裂^[19-21]。本研究结果显示，甘草附子汤能提高顺铂诱导RSC96细胞PGC-1 α 水平，降低p-DRP1/DRP1蛋白表达，升高MFN1、MFN2表达，可能通过抑制线粒体分裂、促进线粒体融合来改善线粒体功能。

线粒体是介导细胞凋亡的重要因素。研究表明，顺铂通过Bax/Cyt-C途径来启动线粒体应激反应，诱导细胞凋亡^[22]；Bax激活可促使Cyt-C释放^[23]，Cyt-C与凋亡肽酶激活因子1结合后启动凋亡级联反应^[24]；抗凋亡蛋白Bcl-2表达升高可抑制细胞凋亡，保护细胞活性。本研究结果显示，甘草附子汤可提高顺铂诱导RSC96细胞存活率，降低

细胞凋亡率，下调Bax蛋白表达；Cyt-C水平下降趋势、Bcl-2蛋白表达升高趋势在基因表达上得到进一步验证，可能通过改善线粒体功能而抑制细胞凋亡。

值得注意的是，在甘草附子汤拆方中辛味药组对SOD、p-DRP1/DRP1、MFN1、MFN2及细胞凋亡率的影响与模型组相比无明显差异，而甘味药组对p-DRP1/DRP1、MFN1及细胞凋亡率的影响基本与甘草附子汤组一致，可见单用辛味药不能有效改善线粒体功能而防治CIPN，尤其在失去甘味药佐制后，甚至可能由于附子毒性呈现出对细胞的进一步损伤；甘味药组对线粒体的融合作用有限，主要通过抑制线粒体分裂来改善功能，可能与其主要有效成分抑制线粒体分裂而改善神经炎症^[25]，保护神经功能^[26]有关；甘草附子汤组整体效果优于拆方组，充分说明方剂配伍减毒增效的优势。

综上所述，甘草附子汤能有效改善顺铂诱导CIPN细胞模型，其机制可能是抑制DRP1磷酸化而阻止线粒体分裂，上调MFN1、MFN2而促进线粒体融合，从而改善线粒体功能，抑制细胞凋亡，并且是通过辛味药与甘味药共同配伍实现的，为扩大该方临床应用范围提供了一定实验依据。

参考文献：

- [1] Cao W, Chen H D, Yu Y W, *et al.* Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783-791.
- [2] Loprinzi C L, Lacchetti C, Bleeker J, *et al.* Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: ASCO Guideline Update[J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38(28): 3325-3348.
- [3] Seretny M, Currie G L, Sena E S, *et al.* Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a systematic review and meta-analysis[J]. *Pain*, 2014, 155(12): 2461-2470.
- [4] Zajaczkowska R, Kocot-Kepska M, Leppert W, *et al.* Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1451.
- [5] Staff N P, Grisold A, Grisold W, *et al.* Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a current review[J]. *Ann Neurol*, 2017, 81(6): 772-781.
- [6] Smith E M, Pang H, Cirrincione C, *et al.* Effect of duloxetine on pain, function, and quality of life among patients with chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy: a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2013, 309(13): 1359-1367.
- [7] 陈传奇, 陈龙菊. 中医药促进周围神经损伤修复的研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(9): 2251-2253.

- [8] 靳 荃, 青千裕, 郜宪明, 等. 甘草附子汤对小鼠疼痛模型及寒湿证疼痛模型止痛作用比较研究[J]. 山西中医药大学学报, 2020, 21(5): 338-341.
- [9] 姚风云, 刘 蕊, 黄艳美, 等. 甘草附子汤抗化疗诱导的小鼠周围神经病的机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(11): 1-5; 259.
- [10] Yin Y, Zhou Y, Zhou J, *et al.* Cisplatin causes erectile dysfunction by decreasing endothelial and smooth muscle content and inducing cavernosal nerve senescence in rats[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1096723.
- [11] 李 娜, 王圆圆, 张 青. 基于“性味归经”理论的顺铂临床性能初探[J]. 中医杂志, 2015, 56(21): 1822-1825.
- [12] Kang L, Tian Y, Xu S, *et al.* Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy: clinical features, mechanisms, prevention and treatment[J]. *J Neurol*, 2021, 268(9): 3269-3282.
- [13] 姚风云, 张凯茵, 崔言坤, 等. 从“辛甘化阳”法论治化学治疗致周围神经病变[J]. 中医研究, 2024, 37(8): 1-5.
- [14] Areti A, Yerra V G, Naidu V, *et al.* Oxidative stress and nerve damage: role in chemotherapy induced peripheral neuropathy[J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 289-295.
- [15] Jheng H F, Tsai P J, Guo S M, *et al.* Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(2): 309-319.
- [16] Zong Y, Li H, Liao P, *et al.* Mitochondrial dysfunction: mechanisms and advances in therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 124.
- [17] Chuang Y C, Lin T K, Yang D I, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma dependent pathway reduces the phosphorylation of dynamin-related protein 1 and ameliorates hippocampal injury induced by global ischemia in rats[J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23(1): 44.
- [18] Sloat S R, Whitley B N, Engelhart E A, *et al.* Identification of a mitofusin specificity region that confers unique activities to Mfn1 and Mfn2[J]. *Mol Biol Cell*, 2019, 30(17): 2309-2319.
- [19] Martin O J, Lai L, Soundarapandian M M, *et al.* A role for peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth[J]. *Circ Res*, 2014, 114(4): 626-636.
- [20] Peng K, Yang L, Wang J, *et al.* The interaction of mitochondrial biogenesis and fission/fusion mediated by PGC-1 α regulates rotenone-induced dopaminergic neurotoxicity[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(5): 3783-3797.
- [21] Dabrowska A, Venero J L, Iwasawa R, *et al.* PGC-1 α controls mitochondrial biogenesis and dynamics in lead-induced neurotoxicity[J]. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(9): 629-647.
- [22] McDonald E S, Windebank A J. Cisplatin-induced apoptosis of DRG neurons involves bax redistribution and cytochrome c release but not fas receptor signaling[J]. *Neurobiol Dis*, 2002, 9(2): 220-233.
- [23] McArthur K, Whitehead L W, Heddleston J M, *et al.* BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis[J]. *Science*, 2018, 359(6378): eaao6047.
- [24] Bock F J, Tait S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(2): 85-100.
- [25] Zhou K, Chen J, Wu J, *et al.* Atractylenolide III ameliorates cerebral ischemic injury and neuroinflammation associated with inhibiting JAK2/STAT3/Drp1-dependent mitochondrial fission in microglia[J]. *Phytomedicine*, 2019, 59: 152922.
- [26] Li H, Yu W, Yang Y, *et al.* Combination of atractylenolide I, atractylenolide III, and paeoniflorin promotes angiogenesis and improves neurological recovery in a mouse model of ischemic stroke[J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 3.