

# 丹参酮 II<sub>A</sub> 通过调控 Rac1/JNK 通路改善臂丛神经根性撕脱伤后运动功能障碍

张 琴<sup>1</sup>, 程晓民<sup>1</sup>, 陈曼妮<sup>1</sup>, 胡向航<sup>1</sup>, 潘启暘<sup>1</sup>, 加彩菊<sup>1</sup>, 刘煜洪<sup>3</sup>, 张 颢<sup>1,2\*</sup>

1. 广州中医药大学基础医学院 中西医结合基础研究中心, 广东 广州 510000

2. 广州中医药大学基础医学院 医学生物技术系, 广东 广州 510000

3. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510000

**摘要:** **目的** 采用臂丛神经根性撕脱伤 (brachial plexus root avulsion, BPA) 再植大鼠模型和过氧化氢 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 诱导的小鼠运动神经元细胞系 NSC-34 神经元损伤模型, 探讨丹参酮 II<sub>A</sub> 对 BPA 的治疗作用及其作用机制。 **方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和丹参酮 II<sub>A</sub> 低、高剂量 (10、30 mg/kg) 组, 每组 15 只。造模后连续给药 8 周, 每周通过 Terzis 梳洗试验 (Terzis grooming test, TGT) 评估运动功能恢复情况; 取肱二头肌称定质量, 并进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察肌肉组织形态; 采用中性红染色检测脊髓前角运动神经元存活情况; 采用荧光金逆行标记及肌皮神经胆碱乙酰转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 与神经丝蛋白 200 (neurofilament 200, NF200) 免疫荧光染色评估轴突再生; 免疫荧光法检测脊髓前角离子钙结合衔接分子 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1)、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 及神经元型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 的表达; 检测损伤侧脊髓中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; Western blotting 检测损伤侧脊髓中 Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)、细胞分裂周期蛋白 42 (cell division control protein 42, Cdc42)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 及 c-Jun 蛋白表达。体外实验设置对照组、模型组、丹参酮 II<sub>A</sub> 组和 Rac1 抑制剂组, 以 400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 NSC-34 细胞氧化损伤, 给予丹参酮 II<sub>A</sub> 组或 NSC 23766 干预后, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, 测定 MDA、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及 SOD 活性, Western blotting 检测 Rac1/JNK 通路相关蛋白表达。 **结果** 术后 1 周模型组大鼠 TGT 评分均为 0, 提示模型建立成功。与模型组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> 组可显著提高 TGT 评分 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 促进轴突再生水平 ( $P<0.01$ ), 提升运动神经元存活数量 ( $P<0.01$ ), 改善肌肉萎缩 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 并降低 Iba1 及 GFAP 表达 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。同时, 丹参酮 II<sub>A</sub> 组能减轻氧化应激损伤, 表现为 nNOS 阳性运动神经元数量显著减少 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), MDA 水平明显下降 ( $P<0.001$ ), SOD 活性明显升高 ( $P<0.01$ ), 并显著上调 Rac1、Cdc42、JNK 及 c-Jun 蛋白表达 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ )。细胞实验中, 丹参酮 II<sub>A</sub> 可显著提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的细胞活力 ( $P<0.01$ ), 增加 SOD 活性 ( $P<0.01$ ), 降低 MDA 和 ROS 水平 ( $P<0.01$ ), 并上调 Rac1、Cdc42、JNK 及 c-Jun 蛋白表达 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ); 而联合使用 Rac1 抑制剂 NSC 23766 则可部分逆转丹参酮 II<sub>A</sub> 的保护效应 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ )。 **结论** 丹参酮 II<sub>A</sub> 可能通过激活 Rac1/JNK 信号通路, 抑制氧化应激及神经炎症反应, 促进运动神经元存活与轴突再生, 从而改善 BPA 大鼠运动功能恢复。

**关键词:** 臂丛神经根性撕脱伤; 丹参酮 II<sub>A</sub>; Rac1/JNK 通路; 运动神经元; 轴突再生; 氧化应激; 神经炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)03-0935-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.03.013

## Tanshinone II<sub>A</sub> facilitates motor function recovery following brachial plexus root avulsion by modulating Rac1/JNK pathway

ZHANG Qin<sup>1</sup>, CHENG Xiaomin<sup>1</sup>, CHEN Manni<sup>1</sup>, HU Xianghang<sup>1</sup>, PAN Qiyang<sup>1</sup>, JIA Caiju<sup>1</sup>, LIU Yuhong<sup>3</sup>, ZHANG Xie<sup>1,2</sup>

1. Basic Research Center for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, School of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

收稿时间: 2025-09-25

基金项目: 广东省中医药局科研项目 (20241084); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2021A1515110800)

作者简介: 张 琴, 女, 硕士研究生, 研究方向为神经损伤与修复。E-mail: 20231110023@stu.gzucm.edu.cn

\*通信作者: 张 颢, 女, 博士, 硕士生导师, 从事神经损伤与修复研究。E-mail: zhangxie@gzucm.edu.cn

2. Department of Medical Biotechnology, School of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

3. School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China

**Abstract: Objective** To investigate the therapeutic effect and mechanism of tanshinone II<sub>A</sub> on motor function recovery after brachial plexus root avulsion (BPA) using a rat brachial plexus root avulsion (BPA)-replantation model and an hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced oxidative damage model in NSC-34 cells. **Methods** A total of 60 SD rats were randomly divided into sham group, model group, tanshinone II<sub>A</sub> low- and high-dose (10, 30 mg/kg) groups, with 15 rats in each group. After modeling, continuous administration was performed for eight weeks. Motor function recovery was evaluated using Terzis grooming test (TGT). The biceps brachii muscle was weighed and processed for hematoxylin-eosin (HE) staining to assess morphological changes. Motor neuron survival in the spinal cord was determined by neutral red staining. Axonal regeneration was assessed by Fluoro-Gold retrograde labeling and immunofluorescence staining for choline acetyltransferase (ChAT) and neurofilament 200 (NF200) in the musculocutaneous nerve. Immunofluorescence was performed to detect ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expressions. Level of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase in the injured spinal cord were measured. The protein expressions of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), cell division control protein 42 (Cdc42), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and c-Jun in the injured spinal cord were detected by Western blotting. *In vitro*, control group, model group, tanshinone II<sub>A</sub> group and Rac1 inhibitor group were established. NSC-34 cells were induced with 400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to cause oxidative damage. After intervention with tanshinone II<sub>A</sub> or NSC 23766, cell viability was assessed using CCK-8 assay. Levels of MDA, reactive oxygen species (ROS) and activity of SOD were measured, and the expressions of Rac1/JNK pathway-related proteins was analyzed by Western blotting. **Results** The BPA model was successfully established as evidenced by consistently 0 TGT scores in model group at 1 week post-surgery. Compared with model group, tanshinone II<sub>A</sub> significantly improved the TGT scores ( $P < 0.05, 0.01$ ), enhanced axonal regeneration ( $P < 0.01$ ), increased motor neuron count ( $P < 0.01$ ), mitigated muscle atrophy ( $P < 0.05, 0.01$ ), and reduced the expressions of Iba1 and GFAP ( $P < 0.05, 0.01$ ). Meanwhile, tanshinone II<sub>A</sub> improved oxidative stress damage, including decreased nNOS positive motor neurons ( $P < 0.05, 0.01$ ), reduced MDA level ( $P < 0.001$ ), elevated SOD activity ( $P < 0.01$ ), while up-regulating Rac1, Cdc42, JNK and c-Jun expressions in spinal cord tissue ( $P < 0.01, 0.001$ ). *In vitro*, tanshinone II<sub>A</sub> significantly increased viability of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-injured NSC-34 cells ( $P < 0.01$ ), elevated SOD activity ( $P < 0.01$ ), decreased MDA and ROS levels ( $P < 0.01$ ), up-regulated Rac1, Cdc42, JNK and c-Jun protein expressions ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ). Notably, these protective effects of tanshinone II<sub>A</sub> were partially attenuated by co-administration of Rac1 inhibitor NSC 23766 ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** Tanshinone II<sub>A</sub> promotes motor function recovery following brachial plexus root avulsion by activating Rac1/JNK signaling pathway, which attenuates oxidative stress and neuroinflammation, thereby enhancing motor neuron survival and axonal regeneration.

**Key words:** brachial plexus root avulsion; tanshinone II<sub>A</sub>; Rac1/JNK pathway; motor neuron; axonal regeneration; oxidative stress; neuroinflammation

臂丛神经根性撕脱伤 (brachial plexus root avulsion, BPA) 是臂丛神经根自脊髓表面撕脱的周围神经损伤, 可导致患肢的感觉和运动功能障碍<sup>[1]</sup>, 多发生于交通事故、重物压伤、运动伤 (如滑雪) 及分娩产伤等, 预后极差<sup>[2-3]</sup>。据统计, 全球臂丛神经损伤患者约占创伤总数的 1.2%, 其中 65% 成人损伤和 75% 产伤麻痹属于根性撕脱伤, 且发病率呈逐年上升趋势<sup>[4]</sup>。目前, 临床上主要应用显微外科手术 (如神经移位术、功能性肌肉移植重建术及原位回植术) 联合神经营养药物修复治疗, 该策略可在一定程度上促进患者运动功能恢复<sup>[5-6]</sup>, 但仍面临诸多挑战。术后神经再生速度缓慢, 难以在运动神经元及手内肌萎缩前重建有效运动单位, 导致功能恢

复困难<sup>[7]</sup>。同时, 现有神经营养因子因半衰期短, 局限于局部应用, 而神经干细胞移植存在安全性和分化方面不确定性等问题<sup>[8-9]</sup>。因此, 在显微外科神经再植的基础上, 亟需寻找一种安全有效且能促进神经元存活及轴突再生的药物。

丹参作为活血化瘀的常用中药, 可通过改善微循环、抑制炎症反应及抗氧化等途径, 为神经再生过程提供必要的营养支持与微循环保障<sup>[10-11]</sup>。其活性成分丹参酮 II<sub>A</sub> 已被证实具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等多种药理作用, 在脊髓损伤、缺血性脑卒中及阿尔茨海默病等多种神经系统疾病中均展现良好疗效。已有研究证实丹参酮 II<sub>A</sub> 可通过调控核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 通路调节小胶质细胞活

化与极化,从而减轻脑缺血再灌注损伤<sup>[12]</sup>。此外,研究表明丹参酮 II<sub>A</sub> 通过靶向谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)/酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long chain family, ACSL4) 通路抑制铁死亡,进一步促进脊髓损伤后的功能恢复<sup>[13]</sup>。尽管丹参酮 II<sub>A</sub> 在神经系统疾病中的保护作用已被广泛证实,然而其是否对 BPA 具有保护作用及其具体机制目前尚未见系统报道。

Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1)/c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 通路在神经再生方面具有至关重要的作用。研究表明, Rac1 信号通路通过激活 WASP 家族维罗素蛋白 (WASP-family verprolin-homologous protein, WAVE) 及肌动蛋白相关蛋白复合物,直接催化形成分支状肌动蛋白,从而调控肌动蛋白细胞骨架的动态重组<sup>[14]</sup>。该通路同时可激活 p21 激活激酶 (p21-activated kinase, PAK),引发 LIM 域激酶 (LIM domain kinase, LIMK) 对切丝蛋白的磷酸化抑制,进一步稳定肌动蛋白丝结构,最终促使轴突再生并实现神经功能恢复<sup>[15-16]</sup>。JNK/c-Jun 信号通路是介导神经细胞响应损伤与再生过程的关键分子途径之一。活化的 JNK 进入细胞核,可磷酸化转录因子 c-Jun,促进其形成转录活性复合物激活蛋白-1 (activating protein-1, AP-1)。该复合物一方面诱导促凋亡基因表达,参与神经元凋亡过程;另一方面也可上调神经营养因子及细胞骨架蛋白等再生相关基因的表达,进而发挥促进轴突再生的作用<sup>[17-18]</sup>。研究显示, Rac1 可通过激活 JNK/c-Jun 信号通路,调控细胞骨架重构及轴突生长,从而促进神经再生过程<sup>[19]</sup>。这一协同机制为开发多靶点神经修复策略提供了重要理论基础。

本研究拟建立体内 BPA-再植大鼠模型及体外过氧化氢 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 诱导小鼠运动神经元细胞系 NSC-34 神经元损伤模型,旨在探讨丹参酮 II<sub>A</sub> 对 BPA 的治疗作用及其潜在机制,以期为临床治疗 BPA 提供新的思路及理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

60 只 SPF 级雌性 SD 大鼠,体质量 180~220 g, 6~8 周龄,购自广州锐格生物科技有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK (粤) 2023-0059。动物饲养于广州中医药大学动物实验中心,实验动物使用许可证号 SYXK (粤) 2023-0342,屏障环境每 12 h

交替进行明/暗光照,温度 21~23 ℃,相对湿度 60%~70%,动物自由进食饮水,定期更换垫料。动物实验经广州中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 20220315003)。

### 1.2 细胞

NSC-34 细胞 (批号 ZKCC-X1846) 购自北京中科质检生物技术有限公司。

### 1.3 药品与试剂

丹参酮 II<sub>A</sub> (质量分数≥95%,批号 S31459-10g) 购自上海源叶生物科技有限公司; 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (批号 20241202-09) 购自广州化学试剂厂; Rac1 抑制剂 NSC 23766 (质量分数≥99%,批号 HY-15723A) 购自美国 MedChemExpress 公司; 荧光金染料 (批号 Fluoro-Gold) 购自美国 Fluorochrome 公司; 离子钙结合适配分子 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1) 抗体 (批号 019-19741) 购自日本和光生物公司; 神经元型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 抗体 (批号 61-7000) 购自美国 Thermo 公司; 胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (批号 G6171)、神经丝蛋白 200 (neurofilament 200, NF200) 抗体 (批号 N4142)、胆碱乙酰转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 抗体 (批号 AB144P) 购自美国 Sigma 公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒 (批号 DH0020) 购自北京雷根生物公司; Rac1 抗体 (批号 WL02851)、细胞分裂周期蛋白 42 (cell division control protein 42, Cdc42) 抗体 (批号 WL01165)、JNK 抗体 (批号 WL01295)、c-Jun 抗体 (批号 WL02863) 购自沈阳万类生物科技有限公司; β-tubulin 抗体 (批号 GB15200-100) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 胎牛血清 (批号 164210-50) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 培养基 (批号 6125216) 购自美国 Gibco 公司; 中性红粉末 (批号 MB4613-1)、CCK-8 试剂盒 (批号 MA0218-3) 购自大连美仑生物技术有限公司; BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (批号 P0010S)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒 (批号 S0131S)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒 (批号 S0101S)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号 S0033S) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.4 仪器

CM1860 型冰冻切片机、RM2245 型石蜡包埋

机、DMI8 型倒置荧光显微镜（德国 Leica 公司）；BX53 型病理图像采集系统（日本 Olympus 公司）；ECLIPSE 型倒置荧光显微镜（日本 Nikon 公司）；Powerpac Universal 通用型电泳仪蛋白电泳系统（美国 Bio-Rad 公司）；5200 型化学发光成像仪（上海天能公司）；3131 型细胞培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；BCM 型超净工作台（苏州苏净安泰公司）；Synergy NEO2 型多模式微孔板检测仪（美国 Bio Tek 公司）。

## 2 方法

### 2.1 体内实验

**2.1.1 动物分组与给药** 将 60 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和丹参酮 II<sub>A</sub> 低、高剂量（10、30 mg/kg）组，每组 15 只。于 BPA 手术后且大鼠清醒后开始给药，各给药组 ig 相应药物，假手术组和模型组 ig 等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠（carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na）溶液，1 次/d，连续给药 8 周。

**2.1.2 BPA-再植大鼠模型的建立** 大鼠适应性饲养 1 周后，ip 3% 戊巴比妥钠（60 mg/kg）麻醉，俯卧位固定于在手术台，术区备皮消毒。以大鼠右侧作为手术损伤侧，自枕部到肩胛骨上角行约 3 cm 正中切口，以第二胸椎棘突（T2）作为骨标记，逐层分离右侧颈长肌和颈半棘肌，以金属钩牵引固定肌肉，充分暴露术野。手术刀沿椎板向外剥离椎板附着肌肉，显露右侧 C4-T2 椎板，用骨钳避开脊髓小心咬除 C4-C8 椎板，暴露 C5-C7 神经根。以自制细玻璃钩牵引撕脱右侧 C5-C7 背侧和腹侧根，撕脱后立即将撕脱的 C6 腹侧根贴回原位，同时彻底切除 C5 近端和 C7 远端残根以防止再生。假手术组仅剥离椎板暴露脊髓，不进行撕脱。术后逐层缝合大鼠肌肉和皮肤并消毒，待大鼠清醒后送回饲养环境。

**2.1.3 Terzis 梳洗试验检测大鼠运动功能** 术前及术后每周同一时间对各组大鼠进行 Terzis 梳洗试验并评分，连续 8 周进行评分检测大鼠患侧前肢运动功能的恢复情况。使用喷壶在大鼠头面部均匀喷洒 3~5 mL 纯净水，诱导大鼠使用前肢梳理沾湿的毛发。进行实验时用相机记录 5 min 内大鼠患侧前肢屈肘去除头部水珠时前爪到达头部的最高位置。梳洗试验的评分标准：0 分，动物无屈肘功能；1 分，屈肘功能部分恢复但前爪未达鼻部；2 分，屈肘功能部分恢复前爪可达鼻部；3 分，屈肘功能部分恢复但前爪未达眼部；4 分，屈肘功能部分恢复前爪

可达眼部；5 分，屈肘功能恢复前爪可达耳部或其上部。

**2.1.4 HE 染色观察肱二头肌的病理变化** 肱二头肌经 4% 多聚甲醛固定、脱水机脱水后，肱二头肌长轴垂直于桌面放置进行石蜡包埋，-20 ℃ 冰箱过夜后置于轮转式切片机切片，厚度 4 μm，玻片置于 60 ℃ 烘箱烤片 1 h 后，二甲苯、梯度乙醇脱蜡，苏木素染液染色 10 min，纯水洗涤，再进入 1% 盐酸乙醇中分化 10 s，水洗后伊红染液染色 5 min，切片在梯度乙醇中脱水，最后放置于二甲苯中透明，随后用中性树胶封片，于显微镜下观察并拍照。

**2.1.5 荧光金逆行标记脊髓组织中的运动神经元** 在大鼠造模后第 8 周前 3 d，各组随机选择 3 只大鼠对右侧肌皮神经注射荧光金染料以标记运动神经元。大鼠 ip 3% 戊巴比妥钠（60 mg/kg）麻醉后，局部备皮消毒，暴露并鉴定右侧肌皮神经，使用微型玻璃移液管将 10 μL 荧光金染液缓慢注射入肌皮神经内，并用显微手术钳夹闭注射部位 10 s 以防染液外漏，术后逐层缝合大鼠肌肉和皮肤并消毒，于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

**2.1.6 中性红染色检测脊髓组织中运动神经元存活情况** 脊髓冰冻切片用 PBS 洗涤 3 次，洗去多余的 OCT。再置于 1% 中性红染液中染色 10 min，用纯水洗涤 3 次。梯度乙醇脱水后，放置于二甲苯中 3~5 min 进行透明，随后用中性树胶封片，于显微镜下观察并拍照。

**2.1.7 免疫荧光染色检测脊髓 Iba1、GFAP、nNOS 和肌皮神经 NF200、ChAT 表达** 组织经 OCT 包埋后，置于冰冻切片机切片，肌皮神经切片厚度 6 μm、脊髓组织切片厚度 20 μm，PBS 溶液洗涤 3 次后分别滴加 Iba1（1：1 000）、GFAP（1：1 000）、nNOS（1：1 000）、ChAT（1：800）、NF200（1：1 000）一抗，于 16 ℃ 摇床过夜孵育；次日，PBS 洗涤 3 次后，加入对应种属 488（1：1 000）或 555（1：1 000）荧光二抗，于室温摇床避光孵育 2 h；PBS 洗涤 3 次后，裱片并使用抗荧光淬灭剂封片，在倒置荧光显微镜下观察和拍照。

**2.1.8 脊髓组织内 MDA 水平与 SOD 活性的检测** 术后 1 周取 C5-C7 节段脊髓组织，加入适量组织裂解液进行冰上匀浆，随后在 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min 后，收集上清液，按照试剂盒说明书检测脊髓组织内 MDA 水平与 SOD 活性。

**2.1.9 Western blotting 检测脊髓组织中 Rac1、**

Cdc42、JNK 及 c-Jun 的蛋白表达 脊髓组织中加入适量含 1% 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的 RIPA 裂解液, 进行匀浆、超声、离心后吸取上清, 通过 BCA 蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 调齐样品蛋白浓度, 金属浴 100 °C 加热 10 min 使蛋白变性, 置于 -20 °C 储存。蛋白样品经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, TBST 洗涤后, 加入 5% 脱脂牛奶于室温封闭 1 h 后, TBST 洗涤 3 次, 10 min/次; 分别加入 Rac1、Cdc42、JNK 及 c-Jun 一抗, 4 °C 摇床孵育过夜; 次日, TBST 洗涤 3 次, 10 min/次, 加入对应二抗, 室温摇床孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后, 加入 ECL 发光液, 使用天能化学发光成像仪进行显影。

## 2.2 体外实验

**2.2.1 细胞培养** NSC-34 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养, 细胞生长密度达到 80% 左右时, 进行传代处理, 取对数生长期的 NSC-34 细胞用于后续实验。

**2.2.2 CCK-8 法检测细胞活力** 取对数生长期的 NSC-34 细胞, 以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L, 细胞贴壁后分别加入不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100、200、300、400、500、600、700、800  $\mu$ mol/L) 或丹参酮 II<sub>A</sub> (0.1、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0  $\mu$ mol/L) 处理 24 h, 另设置对照组加入不含药物的培养基。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 继续培养 1 h, 用多模式微孔板在 450 nm 处测定吸光度 (*A*) 值。

设置对照组、模型组和丹参酮 II<sub>A</sub> (0.1、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0  $\mu$ mol/L) 组, 模型组和给药组加入 400  $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 24 h, 给药组提前 3 h 加入不同浓度的丹参酮 II<sub>A</sub> 处理, 对照组加入不含药物的培养基。每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 溶液, 继续培养 1 h, 测定 *A* 值。

**2.2.3 细胞分组与给药** 设置对照组、模型组、丹参酮 II<sub>A</sub> 组和 Rac1 抑制剂组。对照组加入基础培养基, 模型组加入 400  $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培养 24 h, 丹参酮 II<sub>A</sub> 组加入 20  $\mu$ mol/L 丹参酮 II<sub>A</sub> 及 400  $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培养 24 h, Rac1 抑制剂组加入 20  $\mu$ mol/L 丹参酮 II<sub>A</sub>、50  $\mu$ mol/L NSC 23766 及 400  $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培养 24 h。

**2.2.4 细胞内 MDA 水平及 SOD 活性的检测** 取

对数生长期的 NSC-34 细胞, 以  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板, 细胞贴壁后按“2.2.3”项下方法进行给药。培养 24 h 后, 按照试剂盒说明书测定细胞内 MDA 水平及 SOD 活性。

**2.2.5 细胞内 ROS 水平的检测** 取对数生长期的 NSC-34 细胞, 以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板, 细胞贴壁后按“2.2.3”项下方法进行给药。培养 24 h 后, 按照说明书步骤, 给予 DCFH-DA 探针孵育完成后, 用倒置荧光显微镜观察染色情况并进行拍照, 每孔随机选取 3 个视野, 用 Image J 软件进行荧光强度分析。

**2.2.6 Western blotting 检测细胞中 Rac1、Cdc42、JNK 及 c-Jun 的蛋白表达** 取对数生长期的 NSC-34 细胞, 以  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板, 细胞贴壁后按“2.2.3”项下方法进行给药。培养 24 h 后, 弃去培养基, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 200  $\mu$ L RIPA 裂解液, 冰上裂解 15 min, 用刮刀收集细胞, 加入裂解液提取蛋白, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清后用 BCA 试剂盒进行蛋白定量, 按照“2.1.9”项方法检测相关蛋白表达。

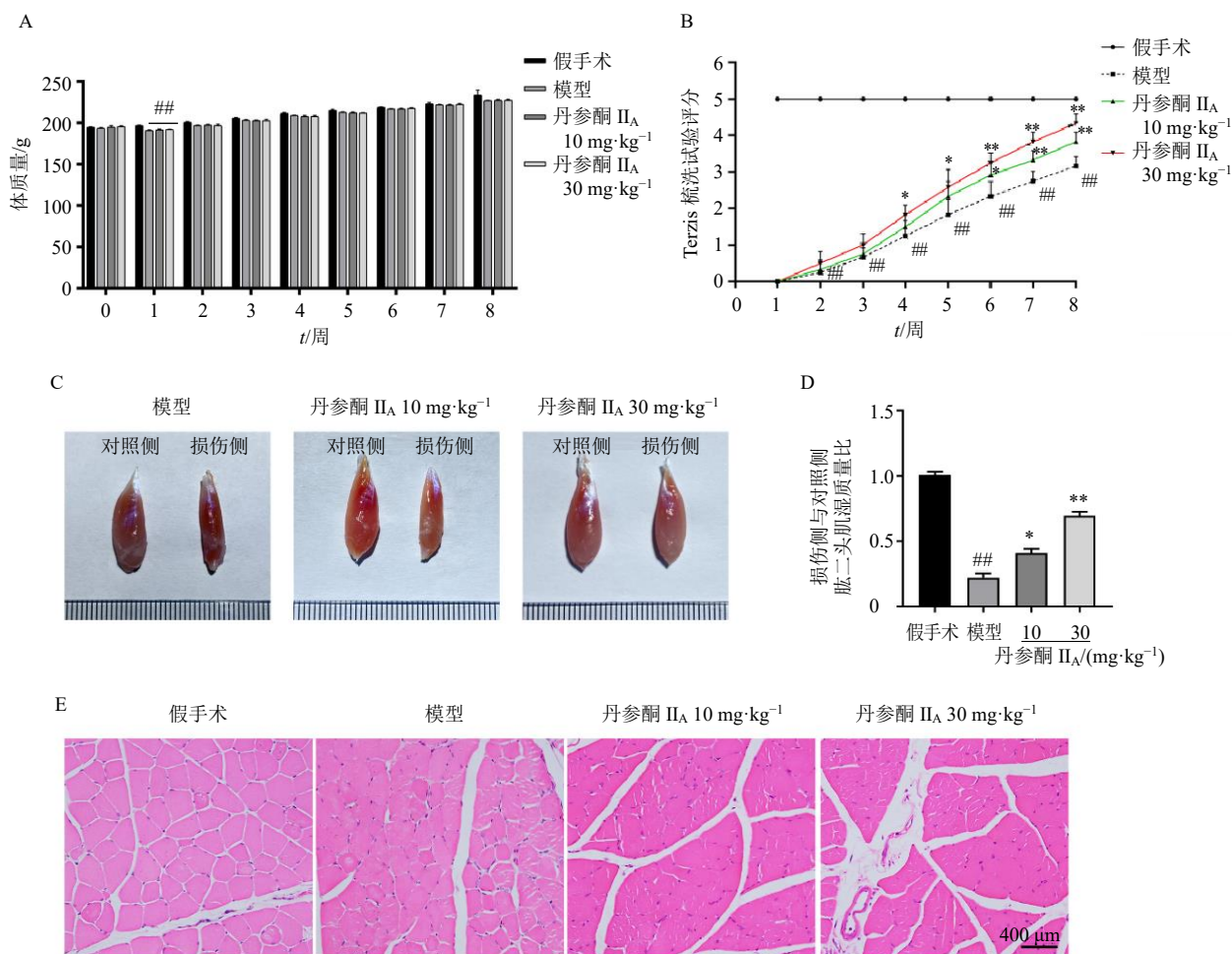
## 2.3 统计学分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 26.0 软件进行分析, 统计分析采用单因素方差分析 (ANOVA), 多重比较采用 Bonferroni 检验。使用 GraphPad Prism 8.3 软件进行绘图。

## 3 结果

### 3.1 丹参酮 II<sub>A</sub> 促进 BPA 大鼠前肢运动功能恢复

如图 1-A 所示, 在 BPA 术后检测大鼠体质量, 与假手术组比较, 在术后 1 周时模型组及丹参酮 II<sub>A</sub> 给药组大鼠体质量均显著降低 ( $P < 0.01$ )。在术后 2~8 周, 各组大鼠体质量无统计学差异。结果显示, 丹参酮 II<sub>A</sub> 在实验期间对大鼠体质量无明显影响。各组大鼠 Terzis 梳洗试验评分如图 1-B 所示, 术后 1 周, 模型组及丹参酮 II<sub>A</sub> 给药组 Terzis 梳洗试验评分均为 0 分, 提示各造模大鼠前肢运动功能完全丧失, 模型成功复制。术后 2 周后, 与假手术组比较, 模型组大鼠 Terzis 梳洗试验评分明显下降 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> 低、高剂量组 Terzis 梳洗试验评分在第 4~8 周显著提高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。表明丹参酮 II<sub>A</sub> 能有效促进 BPA 大鼠前肢运动功能恢复。如图 1-C~E 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠肱二头肌湿质量比显著降低 ( $P < 0.01$ ), HE 病理染色结果显示肌纤维直径更小, 成纤维细



A-大鼠术后体重变化 (n=6); B-大鼠术后 Terzis 梳洗试验评分 (n=6); C、D-损伤侧与对照侧肱二头肌湿质量比 (n=3); E-肱二头肌 HE 染色 (×400); 与假手术组比较: ###*P*<0.01 ####*P*<0.001; 与模型组比较: \**P*<0.05 \*\**P*<0.01 \*\*\**P*<0.001, 图 2~6 同。

A-postoperative weight changes in rats (n=6); B-postoperative Terzis grooming test score of rats (n=6); C、D-weight ratio of fresh biceps brachii on injured side to that on control side (n=3); E-biceps brachii observed by HE staining (×400); ###*P*<0.01 ####*P*<0.001 vs sham group; \**P*<0.05 \*\**P*<0.01 \*\*\**P*<0.001 vs model group, same as Figs. 2—6.

图 1 丹参酮 II<sub>A</sub> 促进 BPA 大鼠前肢运动功能恢复 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 1 Tanshinone II<sub>A</sub> promotes motor functional recovery of forelimb in BPA rats ( $\bar{x} \pm s$ )

胞数量较多; 与模型组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> 给药组肱二头肌湿质量比明显提高 (*P*<0.05、0.01), 肌纤维直径变大, 成纤维细胞数量减少。表明丹参酮 II<sub>A</sub> 能有效改善 BPA 大鼠的肌肉萎缩。

### 3.2 丹参酮 II<sub>A</sub> 促进 BPA 大鼠运动神经元的轴突再生

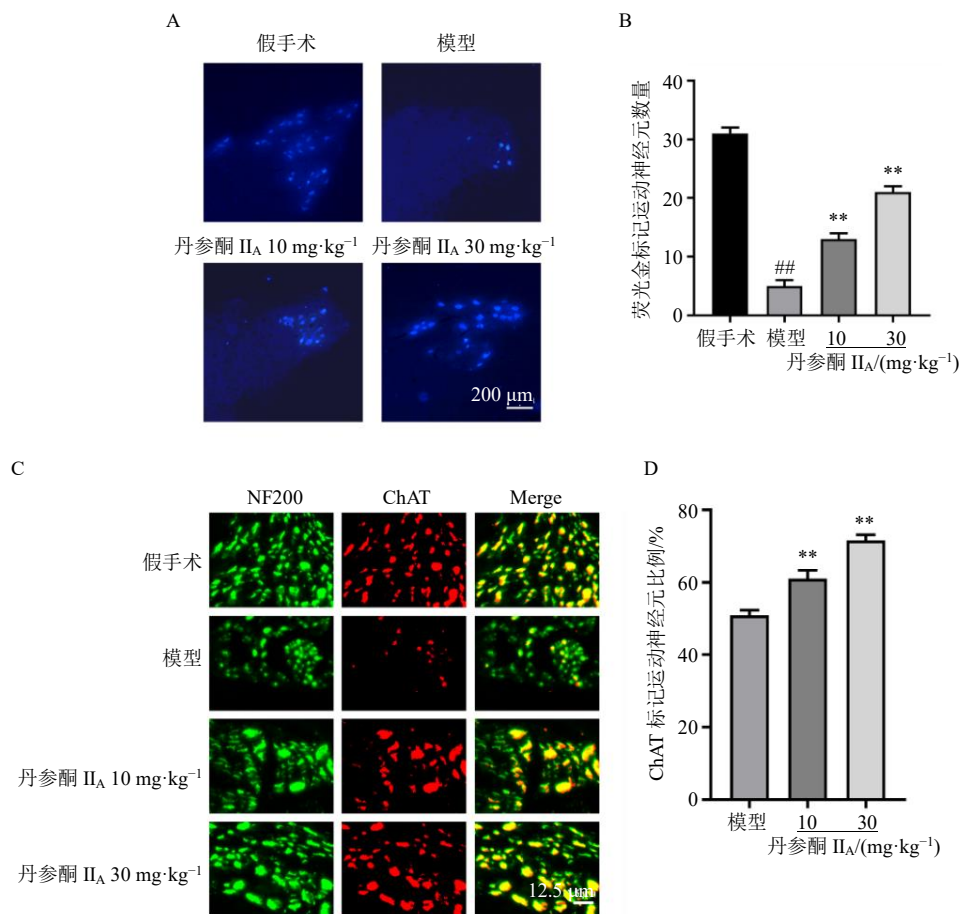
术后 8 周各组大鼠注射荧光金逆行标记脊髓内运动神经元, 结果如图 2-A、B 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脊髓前角运动神经元数量显著减少 (*P*<0.01); 与模型组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> 低、高剂量组大鼠脊髓前角运动神经元数量明显增加 (*P*<0.01)。从标记神经元的形态发现, 模型组荧光金标记的神经元数量少、细胞体积小, 丹参酮 II<sub>A</sub> 给药组

荧光金标记的神经元胞体体积增大、结构清晰, 表明丹参酮 II<sub>A</sub> 有效促进撕脱运动神经元的轴突再生, 增强了运动神经元轴突与周围神经的联系。术后 8 周采用免疫荧光观察各组大鼠损伤侧肌皮神经 NF200 和 ChAT 表达, 结果见图 2-C、D, 其中 NF200 标记的是包含感觉轴突和运动轴突在内的全部轴突, ChAT 标记的是运动轴突。与模型组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> 低、高剂量组可明显增加 ChAT 标记运动神经元的比例 (*P*<0.01), 表明丹参酮 II<sub>A</sub> 能有效促进 BPA 大鼠运动神经元的轴突再生。

### 3.3 丹参酮 II<sub>A</sub> 促进 BPA 大鼠脊髓神经元存活

在术后第 8 周对大鼠脊髓前角进行中性红染色, 结果如图 3 所示, 与假手术组比较, 模型组大





A、B-荧光金逆行标记脊髓前角运动神经元数量 ( $\times 100$ ,  $n=6$ ); C、D-损伤侧肌皮神经运动神经元轴突比例 ( $\times 400$ ,  $n=3$ )。A, B-number of motoneurons in anterior horn of spinal cord labeled by fluorogold ( $\times 100$ ,  $n=6$ ); C, D-ratio of motor neuron axons on musculocutaneous nerve of injured side ( $\times 400$ ,  $n=3$ ).

图 2 丹参酮 II<sub>A</sub> 促进 BPA 大鼠脊髓运动神经元轴突再生 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 2 Tanshinone II<sub>A</sub> promotes neuronal axonal regeneration in spinal cord of BPA rats ( $\bar{x} \pm s$ )

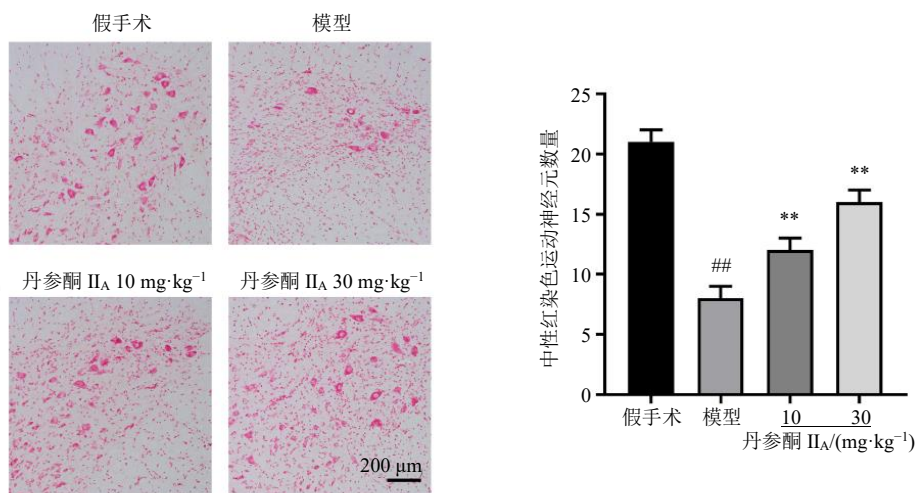


图 3 丹参酮 II<sub>A</sub> 促进 BPA 大鼠脊髓运动神经元存活 ( $\times 100$ ;  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 3 Tanshinone II<sub>A</sub> promotes neuronal survival in spinal cord of BPA rats ( $\times 100$ ;  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

鼠脊髓前角中性红染色的阳性运动神经元数量显著减少 ( $P<0.01$ )；与模型组比较，丹参酮 II<sub>A</sub> 低、高剂量组的阳性运动神经元数量明显增加 ( $P<0.01$ )。表明丹参酮 II<sub>A</sub> 能有效增加撕脱伤损伤后脊髓前角运动神经元的存活数量。

### 3.4 丹参酮 II<sub>A</sub> 改善 BPA 大鼠脊髓前角胶质反应

在术后 2 周检测损伤侧脊髓前角小胶质细胞标志物 Iba1 和星形胶质细胞标志物 GFAP 的表达。如图 4 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脊髓前角 Iba1、GFAP 表达水平显著升高 ( $P<0.01$ ), 且均密集分布于病变区; 与模型组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> 显著抑制损伤区域小胶质细胞与星形胶质细胞的激活 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。表明丹参酮 II<sub>A</sub> 能有效抑制撕脱伤引起的神经炎症反应。

### 3.5 丹参酮 II<sub>A</sub> 改善 BPA 大鼠脊髓损伤后的氧化应激水平

进一步评估丹参酮 II<sub>A</sub> 对 BPA 诱导的脊髓氧化

应激的影响。在术后 2 周对损伤侧脊髓前角进行 nNOS 免疫荧光染色, 术后 1 周对损伤侧脊髓进行氧化应激水平检测。免疫荧光染色结果如图 5-A、B 所示, 假手术组中鲜少检测到 nNOS 标记的运动神经元, 与模型组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> 低、高剂量组 nNOS 阳性运动神经元数量明显减少 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。如图 5-C、D 所示, 与假手术组比较, 模型组脊髓组织中 MDA 水平显著升高 ( $P<0.001$ ), SOD 活性显著降低 ( $P<0.001$ ); 与模型组比较, 丹参酮 II<sub>A</sub> 低、高剂量组 MDA 水平显著降低 ( $P<0.001$ ), 丹参酮 II<sub>A</sub> 高剂量组 SOD 活性明显升高 ( $P<0.01$ )。表明丹参酮 II<sub>A</sub> 能有效减轻 BPA 诱导脊髓损伤后的氧化应激水平。

### 3.6 丹参酮 II<sub>A</sub> 激活 BPA 大鼠脊髓 Rac1/JNK 通路

术后 2 周采用 Western blotting 检测各组大鼠脊髓 Rac1/JNK 信号通路相关蛋白表达, 结果如图 6 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脊髓组织中

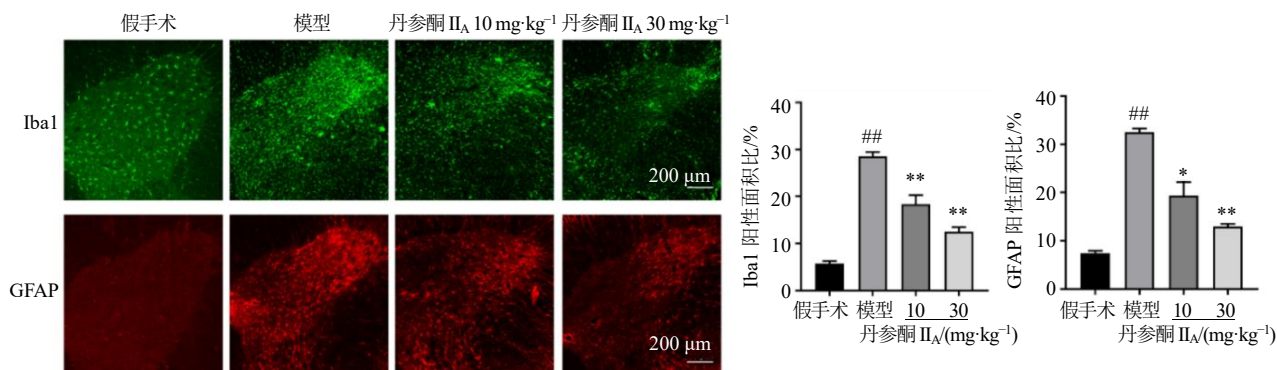
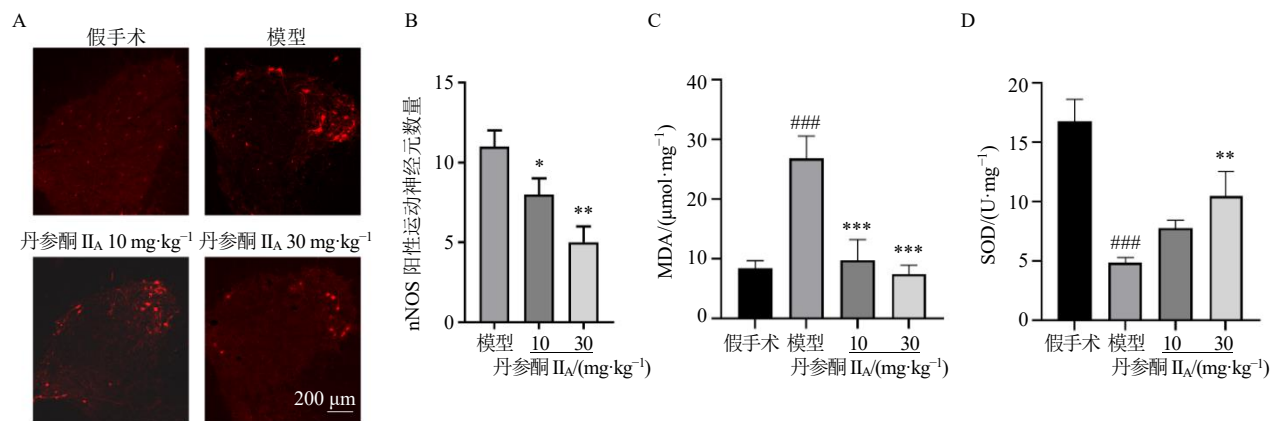


图 4 丹参酮 II<sub>A</sub> 改善 BPA 大鼠脊髓前角胶质水平 ( $\times 100$ ;  $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**Fig. 4** Tanshinone II<sub>A</sub> improves glial cell level in spinal anterior horn of BPA rats ( $\times 100$ ;  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



A、B-脊髓前角 nNOS 阳性神经元数量 ( $\times 100$ ,  $n=3$ ); C、D-MDA 水平及 SOD 活性 ( $n=3$ )。

A, B-number of nNOS-positive neurons in anterior horn of spinal cord ( $\times 100$ ,  $n = 3$ ); C, D-MDA level and SOD activity ( $n = 3$ ).

图5 丹参酮 II<sub>A</sub>降低BPA大鼠脊髓损伤氧化应激水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Fig. 5** Tanshinone II<sub>A</sub> reduces oxidative stress levels in spinal cord injury of BPA rats ( $\bar{x} \pm s$ )



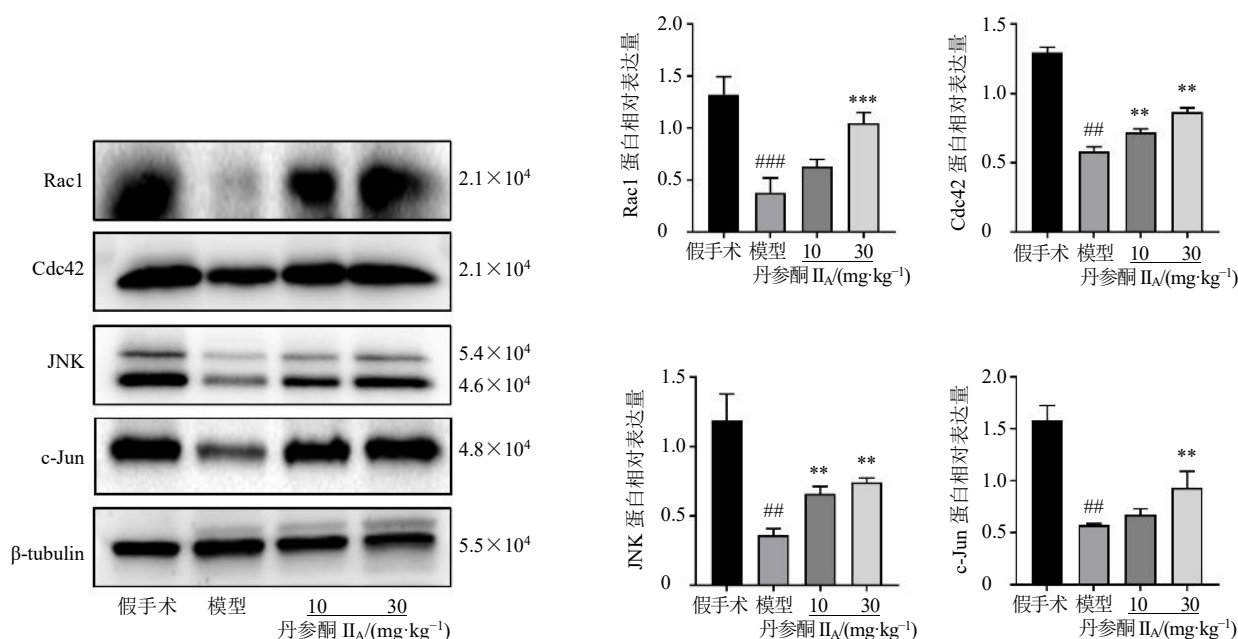


图 6 丹参酮 II<sub>A</sub> 激活 BPA 大鼠脊髓 Rac1/JNK 通路 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 6 Tanshinone II<sub>A</sub> activates spinal cord Rac1/JNK pathway in BPA rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Rac1、Cdc42、JNK 和 c-Jun 的蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )；与模型组比较，丹参酮 II<sub>A</sub> 给药能显著拮抗损伤引起的上述蛋白表达下降，其中高剂量组 Rac1、Cdc42、JNK 及 c-Jun 蛋白表达水平明显增加 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )，低剂量组 JNK 和 Cdc42 蛋白表达水平显著增加 ( $P < 0.01$ )。表明丹参酮 II<sub>A</sub> 可能通过调控 Rac1/JNK 信号通路表达进而促进轴突再生及运动功能恢复。

### 3.7 丹参酮 II<sub>A</sub> 降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 NSC-34 细胞中氧化应激水平

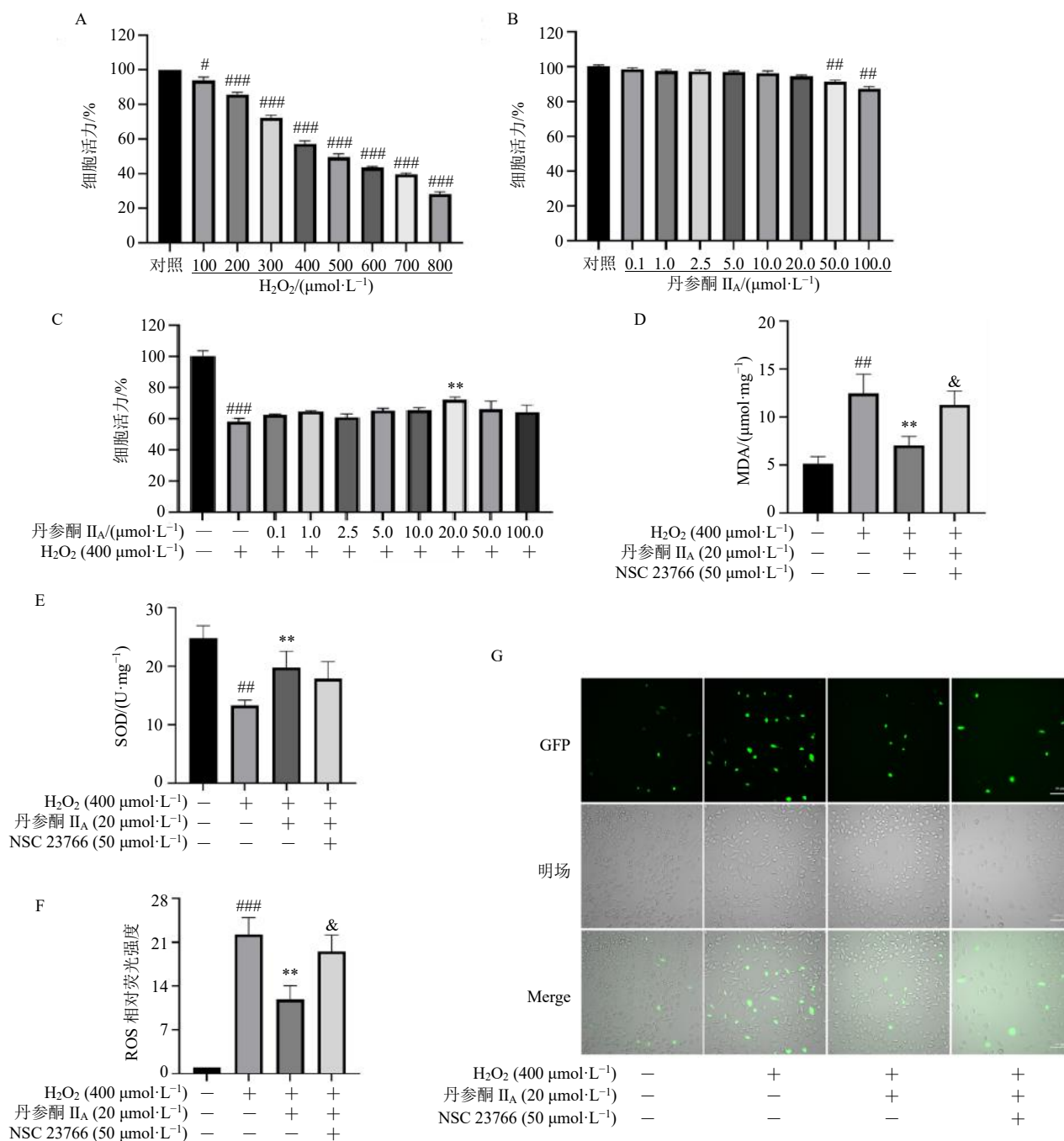
如图 7-A 所示，与对照组比较，给予 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后 NSC-34 细胞活力明显下降 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。在给予 400  $\mu\text{mol/L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 时，细胞存活率为 57.38%，说明此浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可有效诱导细胞损伤，且避免浓度过高导致细胞不可逆的损伤。因此，本研究选取 400  $\mu\text{mol/L}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以诱导神经元损伤，进一步探讨丹参酮 II<sub>A</sub> 的神经保护作用机制。如图 7-B 所示，50、100  $\mu\text{mol/L}$  丹参酮 II<sub>A</sub> 处理 NSC-34 细胞 24 h 后，细胞活力显著降低 ( $P < 0.01$ )，表现出细胞毒副作用。0.1~20.0  $\mu\text{mol/L}$  丹参酮 II<sub>A</sub> 处理后细胞活力无明显变化，表明在此浓度范围内丹参酮 II<sub>A</sub> 无明显细胞毒副作用。如图 7-C 所示，与对照组比较，模型组细胞活力显著降低 ( $P < 0.001$ )；与模型组比较，丹

参酮 II<sub>A</sub> (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 组细胞活力显著升高 ( $P < 0.01$ )。因此，选择 20  $\mu\text{mol/L}$  丹参酮 II<sub>A</sub> 进行后续实验，验证其神经保护作用机制。

如图 7-D~G 所示，与对照组比较，模型组 MDA 水平及 ROS 相对荧光强度显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )，SOD 活性显著降低 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，丹参酮 II<sub>A</sub> 组 MDA 水平及 ROS 相对荧光强度明显下降 ( $P < 0.01$ )，SOD 活性明显升高 ( $P < 0.01$ )；与丹参酮 II<sub>A</sub> 组比较，Rac1 抑制剂组 MDA 水平及 ROS 相对荧光强度显著升高 ( $P < 0.05$ )，SOD 活性呈现下降趋势。结果表明，丹参酮 II<sub>A</sub> 能降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的氧化应激水平，同时 Rac1 抑制剂 NSC 23766 能抑制丹参酮 II<sub>A</sub> 发挥抗氧化的作用。

### 3.8 丹参酮 II<sub>A</sub> 通过激活 Rac1/JNK 通路发挥神经保护作用

如图 8 所示，与对照组比较，模型组 Rac1、Cdc42 和 JNK 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，c-Jun 蛋白表达水平呈降低趋势；与模型组比较，丹参酮 II<sub>A</sub> 组 Rac1、Cdc42、JNK 和 c-Jun 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )；联合使用 Rac1 抑制剂后，上述蛋白表达水平明显下降 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。表明丹参酮 II<sub>A</sub> 可能通过调控 Rac1/JNK 信号通路从而发挥其神经保护作用。



A~C-CCK-8 法检测细胞活力; D-MDA 水平; E-SOD 活性; F、G-ROS 水平 ( $\times 200$ ); 与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ; 与丹参酮 II<sub>A</sub> 组比较: <sup>&</sup> $P < 0.05$  <sup>&&</sup> $P < 0.01$ , 图 8 同。

A—C-cell viability detected by CCK-8 method; D-MDA level; E-SOD activity; F, G-ROS level ( $\times 200$ ); <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  <sup>&&</sup> $P < 0.01$  vs tanshinone II<sub>A</sub> group, same as Fig. 8.

图 7 丹参酮 II<sub>A</sub>降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的 NSC-34 细胞中氧化应激水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Tanshinone II<sub>A</sub> reduces level of oxidative stress in NSC-34 cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

BPA 是一种治疗难度大、预后差的严重上肢周围神经损伤,多发生于道路交通、运动事故及难产等<sup>[2]</sup>。其主要原因是脊髓神经根被强大外力牵拉撕

脱,引起轴突断裂及逆行性轴突损伤,大量运动神经元发生退化及死亡,进而引发肌肉萎缩,严重者可导致上肢运动功能丧失,极大地增加患者的生活负担<sup>[4,8]</sup>。BPA 的临床修复效果主要受限于轴突再生

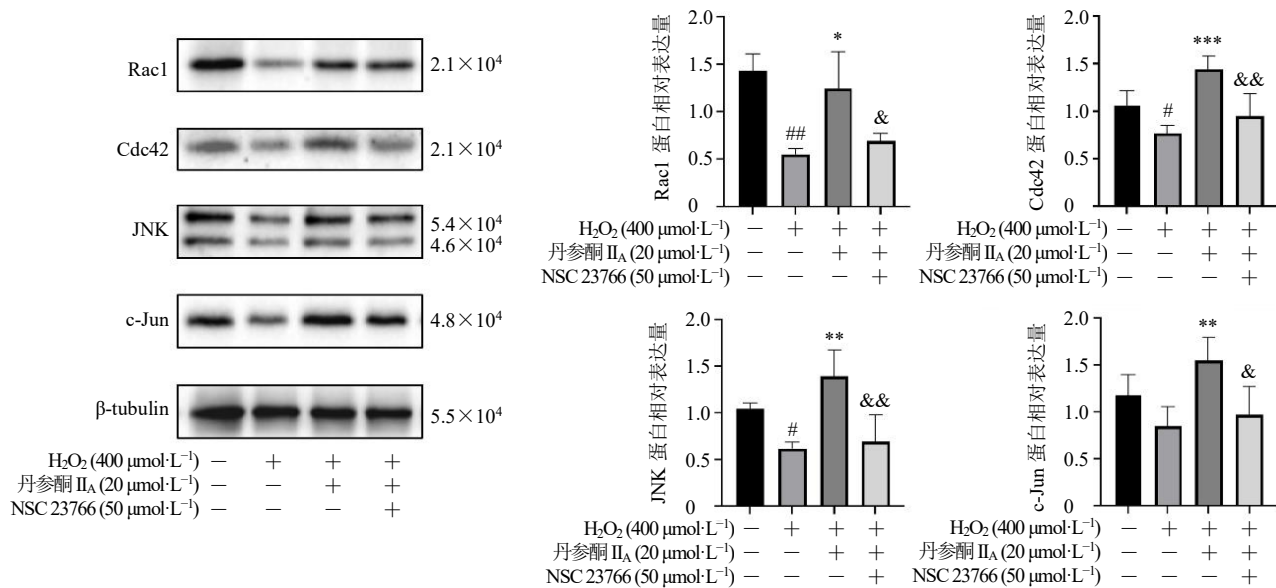


图 8 丹参酮 IIA 通过激活 Rac1/JNK 通路抑制氧化应激水平发挥神经保护作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Tanshinone IIA exerts neuroprotective effect by activating Rac1/JNK pathway to inhibit oxidative stress levels ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

缓慢及复杂的病理机制，导致手术再植后功能恢复受限。因此，在手术干预基础上辅以有效的药物治疗对于改善术后神经再生与功能恢复至关重要。本研究通过建立撕脱再植大鼠模型，模拟临床 BPA 后典型病理改变。结果显示，BPA 大鼠损伤侧肱二头肌出现明显萎缩、肌纤维排列紊乱，且 Terzis 梳洗试验评分显示大鼠前肢运动功能严重受损，提示 BPA 模型复制成功。

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎，具有活血化瘀、通经止痛之功效<sup>[20-21]</sup>。丹参酮 IIA 作为丹参中的重要活性成分，其磺酸钠盐制剂（丹参酮 IIA 磺酸钠注射液）因其安全性高，并具备抗炎、抗氧化及保护血管内皮等药理作用，已广泛应用于心脑血管疾病的临床治疗<sup>[22]</sup>。临床试验表明，丹参酮 IIA 磺酸钠能有效降低急性冠脉综合征患者经皮冠状动脉介入治疗后超敏 C 反应蛋白（high sensitivity C-reactive protein, hs-CRP）、肿瘤坏死因子- $\alpha$ （tumor necrosis- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ）及基质金属蛋白酶-9（matrix metalloproteinase-9, MMP-9）水平，提高 SOD 活性<sup>[23]</sup>。此外，在缺血性卒中患者中，丹参酮 IIA 磺酸钠注射液可显著改善患者血黏度、血脂、脑血流及炎症凝血相关指标<sup>[24]</sup>，发挥神经保护作用。同时，研究表明丹参酮 IIA 磺酸钠可通过调控内源性神经干细胞向神经元分化，有效改善大鼠脊髓损伤后的病理形态，促进脊髓损伤后运动

功能的恢复<sup>[25]</sup>，为其应用于神经损伤修复提供了实验依据。在神经保护方面，研究证实丹参酮 IIA 能够抑制神经炎症、减轻氧化应激损伤，并促进神经元轴突再生<sup>[26]</sup>。其机制涉及促进热休克蛋白 70（heat shock protein 70, HSP70）表达，抑制神经元凋亡，从而减轻脊髓缺血再灌注损伤<sup>[27]</sup>。在外周坐骨神经横断损伤中，丹参酮 IIA 亦可缓解神经病理性疼痛，促进神经再生<sup>[28]</sup>。近期研究表明丹参酮 IIA 磺酸钠可通过调节 miR-125b-5p/信号转导与转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）轴，抑制小胶质细胞极化和神经炎症，进而改善神经病理性疼痛<sup>[29]</sup>。Dai 等<sup>[30]</sup>研究发现，丹参酮 IIA 磺酸钠通过抑制 p38/丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号通路，减轻氧化应激，从而延缓大鼠椎间盘退变。本研究结果显示，丹参酮 IIA 能有效促进脊髓中运动神经元的轴突再生，显著提高运动神经元的存活数量，减轻 BPA 诱导的脊髓病理损伤。同时，丹参酮 IIA 显著缓解 BPA 后大鼠脊髓的神经炎症和胶质细胞反应，并有效改善氧化应激水平，进而改善肱二头肌的肌肉萎缩，并在一定程度上恢复 BPA 大鼠的前肢运动功能。

Rac1 作为关键的 Rho 鸟苷三磷酸（guanosine triphosphate, GTP）酶，在接收到脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor, BDNF）等

上游信号后,与GTP结合的Rac1迅速启动,通过激活PAK磷酸化并抑制切丝蛋白,稳定肌动蛋白纤维,直接驱动生长锥形成与轴突延伸,为轴突再生提供结构基础<sup>[15-16]</sup>。Tahirovic等<sup>[31]</sup>发现,在神经元中条件性敲除Rac1会严重损害轴突再生。Heasman等<sup>[32]</sup>研究证实,在海马神经元中抑制Rac1活性会导致树突棘数量显著减少,而过度激活Rac1则导致树突棘异常增多及形态改变。这些结果表明Rac1的激活在体内轴突再生过程中发挥重要作用。在转录调控层面,JNK信号通路是轴突再生另一关键环节<sup>[33]</sup>。神经损伤后,JNK通过磷酸化转录因子c-Jun,启动包括生长相关蛋白-43(growth associated protein-43, GAP-43)、神经营养因子及细胞骨架蛋白在内的多种再生相关基因的表达,为神经元的结构修复提供分子基础<sup>[34-36]</sup>。Huang等<sup>[37]</sup>发现c-Jun基因修饰干细胞可显著上调胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、BDNF、神经鞘胚素(artemin, ARTN)等多种因子的表达,从而促进背根神经节外植体的轴突生长。此外,研究显示丹参酮II<sub>A</sub>通过诱导内质网应激激活JNK/c-Jun通路,抑制非小细胞肺癌的细胞生长并增强程序性细胞死亡蛋白-1(programmed death-1, PD-1)免疫治疗效果<sup>[38]</sup>。

根据文献及课题组前期研究结果<sup>[39]</sup>,BPA损伤后,脊髓内小胶质细胞与星形胶质细胞的活化具有明确的时间相关性。小胶质细胞活化在术后14d达到高峰,并维持约2周,之后逐渐消退。星形胶质细胞活化标志物GFAP的表达在损伤后1d即上调,同样在术后14d达到峰值<sup>[43]</sup>。因此,术后第2周正处于胶质反应的高峰期,此时检测能最大程度反映药物对胶质细胞活化的干预效果。NOS介导的氧化应激是BPA后运动神经元凋亡的重要机制。本研究在术后第1周已检测氧化应激指标,而术后第2周正是nNOS表达与氧化损伤的高发期,此时评估nNOS表达变化,可更直接地反映药物对早期损伤通路的调控作用<sup>[45]</sup>。Rac1作为调控细胞骨架重组的关键小G蛋白,在神经损伤后早期即被激活<sup>[47]</sup>。在术后认知障碍等模型中,Rac1信号通路的改变也出现于损伤早期<sup>[49]</sup>。因此,在病理反应高峰期(术后第2周)检测Rac1等相关蛋白表达,有助于揭示药物在关键时间窗内对信号通路的干预效果。本研究体内实验结果显示,丹参酮II<sub>A</sub>组大鼠脊髓组织中Rac1、Cdc42、JNK及c-Jun蛋白表达水平较

模型组均显著升高,提示Rac1/JNK信号通路可能参与其对BPA的治疗过程。为了进一步验证该机制,在体外H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导NSC-34细胞神经元损伤中发现,丹参酮II<sub>A</sub>可显著上调Rac1/JNK信号通路相关蛋白表达,而该效应可被Rac1抑制剂NSC23766部分逆转。上述结果表明,丹参酮II<sub>A</sub>可能通过激活Rac1,进而调控其下游Cdc42、JNK及c-Jun信号级联反应,发挥促进轴突再生与神经保护作用。

综上,丹参酮II<sub>A</sub>联合再植术能有效改善BPA大鼠的肌肉萎缩,促进运动神经元轴突再生与神经元存活,并显著恢复前肢运动功能,其作用可能通过激活Rac1/JNK信号通路介导。丹参酮II<sub>A</sub>联合手术再植可能是一种具有潜力的治疗策略,为BPA的临床药物治疗提供新的实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 王雨,王文晟. 臂丛神经根性撕脱损伤后微环境变化的研究进展 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2018, 36(5): 596-599.
- [2] Chalil A, Wang Q, Abbass M, *et al.* Dorsal root entry zone lesioning for brachial plexus avulsion injuries: Case series and literature review [J]. *Front Pain Res*, 2021, 2: 749801.
- [3] 冯亚平,丁有权,覃扬,等. 成年臂丛神经根性撕脱伤后脊髓前角运动神经元的死亡表型及其机制 [J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(4): 537-541.
- [4] Koliatsos V E, Price W L, Pardo C A, *et al.* Ventral root avulsion: An experimental model of death of adult motor neurons [J]. *J Comp Neurol*, 1994, 342(1): 35-44.
- [5] 朱晋,史良,阎涛,等. 臂丛神经撕脱伤后神经病理性疼痛及治疗方案解读 [J]. 科技视界, 2023, 13(14): 53-55.
- [6] Shen J L, Chen Y S, Lin J Y, *et al.* Neuron regeneration and proliferation effects of Danshen and tanshinone II<sub>A</sub> [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 2011: 378907.
- [7] 张显峰,周涛,任强. 不同来源神经供体进行臂丛神经根性撕脱伤移位修复的疗效比较 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2020, 23(3): 268-273.
- [8] 张宇策,张军. 神经干细胞治疗臂丛神经根损伤的研究进展 [J]. 医学综述, 2015, 21(17): 3073-3076.
- [9] Sharp K G, Yee K M, Steward O. A re-assessment of long distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2014, 257: 186-204.
- [10] Xu J, Liu X F, Yu H, *et al.* Tanshinone II<sub>A</sub> inhibits the apoptosis process of nerve cells by upshifting SIRT1 and

- FOXO3 $\alpha$  protein and regulating anti-oxidative stress molecules and inflammatory factors in cerebral infarction model [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2025, 47(1): 23-33.
- [11] Li C W, Xu R, Zhang M L, *et al.* *Salvia miltiorrhiza* water extract ameliorated cGAS-STING-mediated acute liver injury by blocking interaction between STING and TBK1 [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(4): 768-778.
- [12] Song Z B, Feng J J, Zhang Q, *et al.* Tanshinone II<sub>A</sub> protects against cerebral ischemia reperfusion injury by regulating microglial activation and polarization via NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 641848.
- [13] Xu L C, Jiang G Z, Tan S Y, *et al.* Tanshinone II<sub>A</sub> promotes functional recovery after spinal cord injury by inhibiting neuron and oligodendrocyte ferroptosis through the GPX4/ACSL4 axis [J]. *Neurochem Res*, 2025, 50(3): 167.
- [14] Bailly C, Degand C, Laine W, *et al.* Implication of Rac1 GTPase in molecular and cellular mitochondrial functions [J]. *Life Sci*, 2024, 342: 122510.
- [15] Bonifácio de Assis E D, Martins W K N, de Carvalho C D, *et al.* Effects of rTMS and tDCS on neuropathic pain after brachial plexus injury: A randomized placebo-controlled pilot study [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 1440.
- [16] Hall A. Rho GTPases and the control of cell behaviour [J]. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(Pt 5): 891-895.
- [17] Zheng M X, Qiu Y Q, Xu W D, *et al.* Long-term observation of respiratory function after unilateral phrenic nerve and multiple intercostal nerve transfer for avulsed brachial plexus injury [J]. *Neurosurgery*, 2012, 70(4): 796-801;discussion801.
- [18] Nadel G, Maik-Rachline G, Seger R. JNK cascade-induced apoptosis-a unique role in GqPCR signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17): 13527.
- [19] Htut M, Misra V P, Anand P, *et al.* Motor recovery and the breathing arm after brachial plexus surgical repairs, including re-implantation of avulsed spinal roots into the spinal cord [J]. *J Hand Surg Eur Vol*, 2007, 32(2): 170-178.
- [20] 冯科冉, 李伟霞, 王晓艳, 等. 丹参化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(2): 609-618.
- [21] 李自波, 郑亚秋. 丹参及其有效成分调控血管内皮细胞功能的药理作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(14): 5324-5332.
- [22] Shao H K, Fang C Y, Huang Y, *et al.* Sodium tanshinone II<sub>A</sub> sulfonate injection as adjunctive therapy for the treatment of heart failure: A systematic review and meta-analysis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 95: 153879.
- [23] Kan Z Q, Yan W L, Yang M Q, *et al.* Effects of sodium tanshinone II<sub>A</sub> sulfonate injection on inflammatory factors and vascular endothelial function in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1144419.
- [24] Liu F Z, Zhao Q, Sun L Q, *et al.* A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on the efficacy and safety of tanshinone II<sub>A</sub> sodium sulfonate injection as adjunctive therapy for stroke [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 353(Pt B): 120413.
- [25] Zhong W Q, Xu L C, Jiang G Z, *et al.* Sodium tanshinone II<sub>A</sub> sulfonate promotes proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells to repair rat spinal cord injury via the Notch pathway [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 367.
- [26] Eggers R, Tannemaat M R, Ehlert E M, *et al.* A spatio-temporal analysis of motoneuron survival, axonal regeneration and neurotrophic factor expression after lumbar ventral root avulsion and implantation [J]. *Exp Neurol*, 2010, 223(1): 207-220.
- [27] Zhang L, Gan W D, An G Y. Influence of Tanshinone II<sub>A</sub> on heat shock protein 70, Bcl-2 and Bax expression in rats with spinal ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(36): 2882-2888.
- [28] Li M, Wang J Y, Ding L X, *et al.* Tanshinone II<sub>A</sub> attenuates nerve transection injury associated with nerve regeneration promotion in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 659: 18-25.
- [29] Zeng J, Gao W W, Yang H, *et al.* Sodium tanshinone II<sub>A</sub> sulfonate suppresses microglia polarization and neuroinflammation possibly via regulating miR-125b-5p/STAT3 axis to ameliorate neuropathic pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 972: 176523.
- [30] Dai S Q, Shi X, Qin R Q, *et al.* Sodium tanshinone II<sub>A</sub> sulfonate ameliorates injury-induced oxidative stress and intervertebral disc degeneration in rats by inhibiting p38 MAPK signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5556122.
- [31] Tahirovic S, Hellal F, Neukirchen D, *et al.* Rac1 regulates neuronal polarization through the WAVE complex [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(20): 6930-6943.
- [32] Heasman S J, Ridley A J. Mammalian Rho GTPases: New insights into their functions from *in vivo* studies [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(9): 690-701.
- [33] Coffey E T, Smiciene G, Hongisto V, *et al.* C-Jun N-terminal protein kinase (JNK) 2/3 is specifically activated by stress, mediating c-Jun activation, in the presence of constitutive JNK1 activity in cerebellar neurons [J]. *J*



- Neurosci*, 2002, 22(11): 4335-4345.
- [34] Waetzig V, Herdegen T. A single c-Jun N-terminal kinase isoform (JNK3-p54) is an effector in both neuronal differentiation and cell death [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(1): 567-572.
- [35] Zhao Y Y, Kuca K, Wu W D, *et al.* Hypothesis: JNK signaling is a therapeutic target of neurodegenerative diseases [J]. *Alzheimers Dement*, 2022, 18(1): 152-158.
- [36] 宋昕, 王彩霞. JNK 信号转导通路 with 病理性疼痛关系的研究进展 [J]. *内蒙古医学杂志*, 2022, 54(12): 1470-1473.
- [37] Huang L L, Quan X, Liu Z Y, *et al.* C-Jun gene-modified Schwann cells: Upregulating multiple neurotrophic factors and promoting neurite outgrowth [J]. *Tissue Eng Part A*, 2015, 21(7/8): 1409-1421.
- [38] Zhang Y Z, Lai H L, Huang C, *et al.* Tanshinone IIA induces ER stress and JNK activation to inhibit tumor growth and enhance anti-PD-1 immunotherapy in non-small cell lung cancer [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155431.
- [39] Su H, Yuan Q, Zhou L, *et al.* Brachial plexus avulsion: A model for axonal regeneration study [A] // *Neural Regeneration* [M]. Oxford: Academic Press, 2015: 101-115.
- [40] Graeber M B, López-Redondo F, Ikoma E, *et al.* The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy [J]. *Brain Res*, 1998, 813(2): 241-253.
- [41] 加彩菊, 黄豆豆, 陈曼妮, 等. 基于 SIRT1/AMPK 通路探讨虎杖苷对臂丛神经根性撕脱伤大鼠神经再生与功能恢复的作用及机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2025, 36(5): 674-682.
- [42] Jia C J, Chen M N, Huang D D, *et al.* Edaravone promotes motoneuron survival and functional recovery after brachial plexus root avulsion and reimplantation in rats: Involvement of SIRT1/TFEB pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 145: 113686.
- [43] Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease [J]. *Neuroscience*, 1993, 54(1): 15-36.
- [44] Grabber M B, Kreutzberg G W. Astrocytes increase in glial fibrillary acidic protein during retrograde changes of facial motor neurons [J]. *J Neurocytol*, 1986, 15(3): 363-373.
- [45] Zhou L H, Wu W. Survival of injured spinal motoneurons in adult rat upon treatment with glial cell line-derived neurotrophic factor at 2 weeks but not at 4 weeks after root avulsion [J]. *J Neurotraum*, 2006, 23(6): 920-927.
- [46] Zhou L H, Han S, Xie Y Y, *et al.* Differences in c-jun and nNOS expression levels in motoneurons following different kinds of axonal injury in adult rats [J]. *Brain Cell Biol*, 2008, 36(5): 213-227.
- [47] Magalhães J, Dias V P, Eira J, *et al.* Rac1 inhibition prevents axonal cytoskeleton dysfunction in transthyretin amyloid polyneuropathy [J]. *Cell Rep*, 2025, 44(10): 116111.
- [48] Schellino R, Boido M, Vercelli A. JNK signaling pathway involvement in spinal cord neuron development and death [J]. *Cells*, 2019, 8(12): 1576.
- [49] Chen B, Qin G, Xiao J, *et al.* Transient neuroinflammation following surgery contributes to long-lasting cognitive decline in elderly rats via dysfunction of synaptic NMDA receptor [J]. *J Neuroinflamm*, 2022, 19(1): 181.

[责任编辑 李亚楠]