

• XXXX •

大补脾汤通过JAK1/STAT6信号通路调控炎症改善放射性肺损伤

张朝宁, 兰瑜, 武正娟, 余臣祖*
(甘肃中医药大学, 兰州 730000)

[摘要] 目的:探讨大补脾汤(DBPT)对放射性肺损伤(RILI)的肺保护作用,并阐明其是否通过调控酪氨酸激酶1/信号转导与转录激活子6(JAK1/STAT6)信号通路介导的炎症反应发挥作用。方法:48只SPF级雄性SD大鼠随机分为6组($n=8$):空白组,模型组,DBPT高、中、低剂量组($24.28, 12.14, 6.07 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)及高剂量+AG490组(JAK1/STAT6抑制剂, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。连续灌胃给药2周后,除空白组外均接受右肺8 Gy X线单次照射。照射后24 h取材,采用苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-6(IL-6)、转化生长因子- β (TGF- β)水平,免疫组化(IHC)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测JAK1、STAT6、磷酸化(p)-JAK1、p-STAT6表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)分析相关基因转录水平。结果:与空白组比较,模型组呈现典型RILI病理特征(肺泡结构破坏、间质充血、淋巴细胞浸润)。与模型组比较,DBPT各给药组(尤其是高、中剂量组)肺组织损伤程度明显减轻。与空白组比较,模型组血清TNF- α 、IL-8、IL-6、TGF- β 水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,DBPT各剂量组(特别是高剂量组)能剂量依赖性地明显降低这些促炎因子水平($P<0.05, P<0.01$)。与空白组比较,模型组肺组织p-JAK1/JAK1和p-STAT6/STAT6的比值显著降低($P<0.01$);与模型组比较,DBPT干预(尤其高剂量组)能明显提升p-JAK1/JAK1和p-STAT6/STAT6的比值($P<0.05, P<0.01$)。与DBPT高剂量组比较,联用AG490(JAK1/STAT6抑制剂)明显逆转了DBPT的保护效应,导致肺损伤加重、炎症因子水平回升($P<0.05$),证实了该信号通路的关键作用。结论:DBPT对RILI具有显著的肺保护作用,其机制可能与激活JAK1/STAT6信号通路,进而降低促炎因子释放,减轻辐射诱导的肺组织炎症损伤有关。该研究提示JAK1/STAT6信号通路是DBPT防治RILI的潜在作用靶点。

[关键词] 大补脾汤;放射性肺损伤;酪氨酸激酶1/信号转导与转录激活子6(JAK1/STAT6)信号通路;炎症反应

[中图分类号] R289;R256;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(XXXX)XX-0001-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260204

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX



Dabupi Tang Ameliorates Radiation-induced Lung Injury by Regulating Inflammation via JAK1/STAT6 Signaling Pathway

ZHANG Chaoning, LAN Yu, WU Zhengjuan, YU Chenzu*
(Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of Dabupi Tang (DBPT) against radiation-induced lung injury (RILI) and to elucidate whether its mechanism involves modulating the inflammatory response mediated by the Janus kinase 1 (JAK1)/signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) signaling pathway. **Methods:** Forty-eight SPF-grade male SD rats were randomized into 6 groups ($n=8$): blank control, model, high-dose ($24.28 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) DBPT, medium-dose ($12.14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) DBPT, low-dose ($6.07 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) DBPT, and high-dose DBPT + AG490 (a JAK1/STAT6 inhibitor, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). After two consecutive weeks of gavage, other groups except the blank control group received single-dose irradiation with 8 Gy X-ray to the right lung for the modeling of RILI. Samples were collected 24 h post-irradiation. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to

[收稿日期] 2025-10-09

[基金项目] 2025年度甘肃省自然科学基金项目(25JRRA929);甘肃省高校青年博士支持项目(2024QB-087);敦煌医学与转化教育部重点实验室开放基金项目(DHYX23-08, DHYX24-19);2024年度中医学一级学科“岐黄英才”导师专项基金项目(ZYXKSD-202405)

[第一作者] 张朝宁,博士,副教授,从事中医药防护辐射损伤研究,E-mail:1754648867@qq.com

[通信作者] *余臣祖,博士,副教授,从事中医药防治西北地区常见病研究,E-mail:442940743@qq.com

observe lung histopathology. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6), and transforming growth factor- β (TGF- β) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of JAK1, STAT6, phosphorylated JAK1 (p-JAK1), and phosphorylated STAT6 (p-STAT6) in the right lung tissue were determined by immunohistochemistry and Western blot. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was employed to analyze the transcription levels of related genes. **Results:** Compared with the blank control group, the model group showed typical pathological features (alveolar structure destruction, interstitial hyperemia, and lymphocyte infiltration) of RILI. Compared with the model group, the DBPT groups (especially the high- and medium-dose groups) exhibited significantly alleviated lung tissue damage. Compared with the blank control group, the model group exhibited elevated serum levels of TNF- α , IL-8, IL-6, and TGF- β ($P<0.01$), which were reduced by DBPT in a dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the blank control group, the model group showed decreased p-JAK1/JAK1 and p-STAT6/STAT6 ratios in the lung tissue ($P<0.01$). Compared with the model group, DBPT intervention (especially the high dose) increased the p-JAK1/JAK1 and p-STAT6/STAT6 ratios ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the high-dose DBPT group, high-dose DBPT + AG490 reversed the protective effect of DBPT, leading to aggravated lung injury and increased pro-inflammatory cytokine levels ($P<0.05$), confirming the critical role of this pathway. **Conclusion:** DBPT exerts a significant protective effect against RILI. It may activate the JAK1/STAT6 signaling pathway to reduce the release of pro-inflammatory cytokines, thus alleviating RILI. This study suggests that the JAK1/STAT6 pathway is a potential therapeutic target for DBPT in the prevention and treatment of RILI.

[Keywords] Dabupi Tang; radiation-induced lung injury; Janus kinase 1 (JAK1)/signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) signaling pathway; inflammatory response

放射治疗是肺癌、乳腺癌及食管癌等胸部恶性肿瘤的主要治疗手段,尽管现代放疗技术如调强放疗和立体定向放射治疗可以显著降低放射性肺损伤(RILI)的发生率,但肺泡上皮细胞对电离辐射高度敏感,仍有相当比例患者出现放射性肺炎甚至肺纤维化,严重影响患者生存质量并常迫使放疗中断^[1-2]。

RILI的病理本质是辐射触发的持续性损伤与修复失衡。其核心环节包括辐射直接/间接所致的DNA损伤与氧化应激、失控的炎症级联反应[以肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)等促炎因子风暴为特征],以及最终由转化生长因子- β (TGF- β)等驱动的纤维化重塑^[3-5]。其中,炎症是连接早期损伤与晚期纤维化的关键枢纽,因而调控炎症反应成为干预的重要靶点^[6]。

酪氨酸激酶1/信号转导与转录激活子6(JAK1/STAT6)信号通路在免疫调节与组织修复中扮演着复杂而关键的角色。既往研究认为,该通路可通过介导白细胞介素-14/白细胞介素-13(IL-4/IL-13)信号,促进M2型巨噬细胞极化及TGF- β 表达,从而加剧纤维化^[7-8]。然而,越来越多的证据表明,JAK1/STAT6信号通路的生物学效应具有高度的背景依赖性,其在炎症消退与组织保护方面的潜在功能尚未被充分阐明。因此,重新审视并明确JAK1/STAT6信号轴在RILI中的动态角色,特别是其是否存在抑制炎症、延缓纤维化的保护性效应,对于开发新的干预策略至关重要。

当前RILI临床治疗主要依赖糖皮质激素,但其

长期应用易导致免疫抑制、代谢紊乱及感染风险增加^[9-10],亟需开发兼具多靶点调控优势且安全性高的替代药物。大补脾汤(DBPT)源自敦煌遗书《辅行决脏腑用药法要》,由人参、炙甘草、干姜、白术、麦冬、五味子、旋覆花组成,契合放疗后“脾气大疲、肺津亏耗”之病机,融益气生津、健脾养肺于一体,是培土生金法的代表方。前期研究表明,大补脾汤能显著降低RILI模型大鼠肺组织活性氧(ROS)水平、减轻炎性浸润及胶原沉积^[11-14],减轻肺损伤。

基于上述理论与前期证据,提出科学假说,大补脾汤可能通过调控JAK1/STAT6信号通路,抑制辐射诱导的过度炎症反应,从而发挥肺保护作用。本研究旨在通过体内实验验证这一假说,为阐明大补脾汤的作用机制及发现RILI防治新靶点提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠48只,鼠龄2~3月,体质量200~300 g,购自甘肃中医药大学SPF级实验动物中心,动物生产合格证号SCXK(甘)2021-0001。所有大鼠在甘肃中医药大学SPF级实验动物中心饲养(温度20~25℃、相对湿度40%~70%),SPF级实验动物设施使用许可证号SYXK(甘)2021-0004。

1.2 伦理 本研究经甘肃中医药大学动物伦理委员会批准(伦理批号2023-589)。

1.3 药物 大补脾汤由以下中药饮片组成:人参15 g、五味子5 g(亳州市悠善堂生物科技有限公司,批号分别为250801、240401),炙甘草15 g、干姜

15 g、旋覆花 5 g(陇西保和堂药业有限责任公司,批号分别为 2025040、20250639、20250614),白术 5 g(甘肃康乐药业有限责任公司,批号 251116),麦冬 5 g(四川新荷花中药饮片股份有限公司,批号 2508162JX)。由甘肃中医药大学中药制药实验室魏舒畅教授完成鉴定并制药:。将煎煮 2 次的药液合并,用 100 目滤布过滤,旋转、蒸发、浓缩滤液后,按人与大鼠体表面积折算,配制成含原药材 $1.214\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液。按上述药液浓度的 0.5 和 2 倍,再分别配制成 $0.607\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $2.428\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 药液,4℃冷藏备用。

1.4 试剂 IL-6、IL-8、TNF- α 、TGF- β_1 酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(江苏酶免实业有限公司,批号分别为 2312R25、2312R28、2310R42、2312R38);苏木素-伊红(HE)染色试剂脱蜡液(无锡市江原实业技贸有限公司,批号 240729);苏木素染液[伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司,批号 110824];伊红染液(天津市天新精细化工开发中心,批号 20240102);中性树胶、封闭山羊血清(北京索莱宝生物科技有限公司,批号分别为 96949-21-2、54240222003);JAK1、STAT6、磷酸化(p)-JAK1、p-STAT6 抗体(美国 ImmunoWay 公司,批号分别为 432427、RK641B、B7301、RS4119);内参 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 GeneTex 公司,批号为 42898);二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)与山羊抗小鼠 IgG(美国 ImmunoWay 公司,批号分别为 B0203、B0111);反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(Real-time PCR)试剂盒[上海翊圣生物科技有限公司,货号分别为 11141ES60 (H9305270)、11202ES08 (WH1313011)];免疫组化(IHC)一抗 p-STAT6、STAT6、p-JAK1、JAK1(美国 Immunoway 公司,批号分别为 YP0256、YT4454、YP1373、YT2424);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 240010323);AG490(北京百奥莱博科技有限公司,货号 Y16446)。

1.5 仪器 RX650 X 型射线辐射仪(美国 Faxitron 公司);D-315 型病理切片机、YD-AB3 型组织摊片机、YD-6L 生物组织冷冻包埋机(金华市益迪医疗设备有限公司);SN100680221 型显微拍照系统(山东志盈医学科技有限公司);K5800 型微量核酸测定仪(北京凯奥科技发展有限公司产品);A300 型 PCR 型扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司);201901003 型 Real-time PCR 仪[鲲鹏基因(北京)科

学仪器有限公司];TGL-1850 型高速冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司产品);WD-9423C 型全自动化学发光成像系统(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 所有大鼠适应性喂养 1 周,后采用随机数字表法分为 6 组,空白组,模型组,大补脾汤(DBPT)高、中、低剂量组和高剂量+AG490 组,每组 8 只。各组均按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的灌胃体积每日给药 1 次,连续 2 周。DBPT 高、中、低剂量组每日给药剂量分别为 24.28 、 12.14 、 $6.07\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (分别由质量浓度为 2.428 、 1.214 、 $0.607\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液换算得出)。高剂量+AG490 组在给予 $24.28\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 大补脾汤基础上,联用 JAK1/STAT6 抑制剂 AG490($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[14]。空白组与模型组灌胃等体积生理盐水。剂量设定依据如下:大补脾汤高剂量参考临床等效剂量(按体表面积折算)及前期预实验确定,中、低剂量按等比例递减设置以观察量效关系;AG490 剂量根据文献[14]报道的有效抑制浓度确定。

2.2 RILI 动物模型制备

2.2.1 模型构建 本研究采用成熟的单纯肺局部照射法构建 RILI 大鼠模型^[11-14]。该模型旨在模拟临床放疗中射线对正常肺组织的间接损伤,其核心病理基础是射线直接损伤肺泡上皮与血管内皮细胞,引发持续的炎症与氧化应激反应。选择此模型可排除肿瘤或手术等混杂因素,专注于放射性损伤的内在机制与药物干预研究。照射剂量参考文献,采用单次 8 Gy X 线右肺照射,该剂量可稳定引发显著的急性损伤效应^[15]。造模成功的判定标准主要依据照射后 24 h 的表现:(1)肺组织呈现典型的急性放射性损伤病理特征(如肺泡结构破坏、炎性细胞浸润);(2)血清中关键促炎因子(如 TNF- α 、IL-6)水平较空白组显著升高。

2.2.2 照射流程 给药 2 周后所有大鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠溶液(无菌生理盐水配制, $5\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$)麻醉。麻醉成功后,将大鼠以仰卧位固定于操作台。采用定制铅皮屏蔽装置保护大鼠身体非靶区,仅暴露右肺区域(照射野设定为 $2\text{ cm}\times 3\text{ cm}$)。使用 X 射线放射治疗仪,在源皮距 200 cm、剂量率 $1\text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ 的条件下,对模型组大鼠右肺进行单次 8 Gy 的照射,空白组大鼠接受 0 Gy 的假照射。整个麻醉与照射过程中,所有大鼠生命体征平稳,无死亡发生。

2.3 取材及处理 照射后所有大鼠正常饲养,24 h 后过量麻醉处死大鼠,腹主动脉取血,室温静置 1 h,

后 4℃、3 000 r·min⁻¹离心 15 min(离心半径 8.58 cm),收集血清,将血清样品储存在-20℃冰箱。取出右肺,冰生理盐水冲洗,剪成 2 份:1 份肺组织放入相应冻存管,-80℃冰箱冻存,用于蛋白免疫印迹法(Western blot)和 Real-time PCR 检测;1 份肺组织用 4%多聚甲醛固定,用于 HE 染色和 IHC 检测。

2.4 指标检测

2.4.1 苏木素-伊红(HE)染色观察右肺组织病理形态学变化 将 4%多聚甲醛固定的右肺组织经梯度乙醇脱水、石蜡包埋后切片,HE 染色,脱水后封片,显微镜下读片并采集图像。

2.4.2 Western blot 检测右肺组织 JAK1、STAT6、p-JAK1、p-STAT6 蛋白表达 从每组 8 只大鼠的右肺组织中随机选取 3 份(每份约 10 mg)进行检测。组织经剪碎后,用预冷生理盐水冲洗两次,加入放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解液于低温匀浆仪中充分匀浆。匀浆液于 4℃、12 000 r·min⁻¹离心 15 min,收集上清。采用聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法测定蛋白浓度。蛋白样品经变性后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳分离并转至 PVDF 膜。用 5%脱脂牛奶封闭后,与相应一抗(β -actin、JAK1、STAT6、p-JAK1、p-STAT6,稀释比例均为 1:2 000)于 4℃孵育过夜。随后,用封闭液稀释的 HRP 标记二抗(1:5 000)室温孵育 2 h。使用化学发光成像系统显影,Image J 软件分析目标条带灰度值。以 β -actin 为内参计算目标蛋白的相对表达量(目标蛋白灰度值/ β -actin 灰度值)。蛋白活化水平以磷酸化蛋白与对应总蛋白的灰度值比值(p-JAK1/JAK1,p-STAT6/STAT6)表示。

2.4.3 IHC 检测右肺组织 JAK1、p-JAK1、STAT6、p-STAT6 蛋白相对表达量 石蜡包埋右肺组织,切片厚度 4 μ m,经脱蜡、水化、修复后,封闭加 p-STAT6(1:200)、STAT6(1:100)、p-JAK1(1:100)、JAK1(1:150)抗体,4℃孵育过夜,二抗(1:1 500)37℃孵育,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色、脱水、封片。显微镜读片拍照,使用 Image proplus 6.0 免疫组化分析软件计算图片平均光密度值,用以表示蛋白相对表达量。

2.4.4 Real-time PCR 检测右肺组织 JAK1、STAT6 mRNA 水平 称质量冷冻的右肺组织约 0.1 g 后加裂解液快速匀浆,用 RNA 试剂盒提取总 RNA,逆转录成 cDNA;然后以 cDNA 为模板,进行 Real-time PCR 扩增,反应体系:HiEffqPCR SYBR

Green MasterMix(lowRox) 10 μ L,cDNA 1 μ L,引物 0.8 μ L,加无菌超纯水至 20 μ L;反应条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 10 s,60℃退火 20 s、72℃延伸 20 s,循环 40 次。以 β -actin 为内参,用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法进行 mRNA 相对定量分析。引物由博迈德生物科技公司合成。见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 ACCCGCGAGTACAACCTTCT	260
	下游 GTCAGGATGCCTCTCTTGCT	
STAT6	上游 ACTGCGCAAGTGTCTCTGAA	228
	下游 CACCAGGCTTTCACACCTCT	
JAK1	上游 ATGGAGTTTCTGCCTTCGG	151
	下游 CTGCTAAGTCCCGGTGAACA	

2.4.5 ELISA 检测血清中 TNF- α 、TGF- β 、IL-6、IL-8 水平 每组取 8 只大鼠的血清样本(独立生物学重复, $n=8$),每个样本等量分装 3 份,加入同一块 96 孔酶标板的相邻孔位进行技术重复检测;每板同步检测系列浓度标准品,建立标准曲线;板内变异系数(CV)<10%,确保数据稳定性;取同一样本 3 个技术复孔的吸光度 A 均值,根据标准曲线计算该样本的炎症因子浓度;最终数据基于 8 个生物学重复样本的浓度均值进行组间比较。

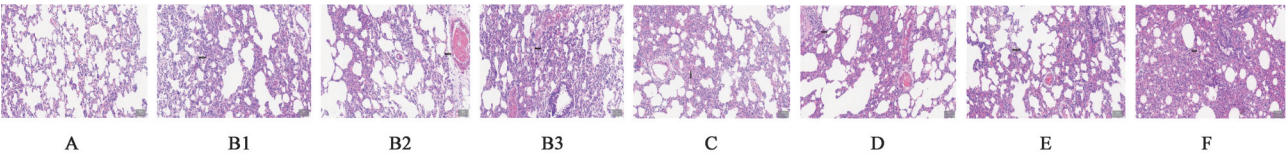
2.5 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件和 Graphpad 软件对实验结果进行统计学分析和作图,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间多重比较,采用最小显著性差异法(LSD)检验作为多重比较的事后分析,方差不齐时进行 Dunnett 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 DBPT 对 RILI 大鼠肺组织病理形态学的影响 HE 染色结果显示,空白组右肺组织结构完整,肺泡壁薄且均匀分布,未见充血、出血、纤维化及炎性细胞浸润;辐射引发显著的肺部组织学重构:模型组呈现典型放射性肺炎特征:(1)肺泡结构紊乱:肺泡上皮增生伴大小不均,局部融合形成肺大泡;(2)间质血管异常:小血管增生充血伴局灶性出血;(3)炎性反应活跃:间质中等量以淋巴细胞为主的浸润。

DBPT 干预显著改善辐射诱导的肺部病理损伤,且呈剂量依赖性:DBPT 高、中剂量组间质充血

和淋巴细胞浸润较模型组明显减少,肺泡结构破坏程度部分恢复,未见出血灶。DBPT低剂量组间质充血与炎症浸润部分缓解。JAK1/STAT6信号通路抑制剂 AG490 可部分逆转 DBPT 的保护效应: DBPT 高剂量+AG490 组出现支气管周围炎性细胞浸润及间质广泛充血。见图 1。



注: A. 空白组; B1. 模型组间质出血; B2. 模型组小血管扩张充血; B3. 模型组炎症细胞浸润; C. 高剂量+AG490 组; D. DBPT 高剂量组; E. DBPT 中剂量组; F. DBPT 低剂量组

图1 DBPT对RILI大鼠肺组织病理形态学的影响(HE,×50)
Fig. 1 Effect of DBPT on histopathological morphology of lung tissue in RILI rats (HE,×50)

3.2 DBPT对RILI大鼠炎症因子及纤维化指标的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中IL-8、IL-6、TNF-α及TGF-β水平均呈现显著上调趋势($P<0.01$)。与模型组比较,经DBPT干预后,各单独给药剂量组上述指标均较模型组明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),且呈现剂量依赖性改善特征,其中高剂量DBPT对IL-8、IL-6、TNF-α和TGF-β的抑制作用最为显著($P<0.01$)。在联合应用JAK1/STAT6信号通路抑制剂AG490后,高剂量DBPT对炎症因子及TGF-β的调控作用被部分逆转,高剂量+AG490组各指标水平较单纯高剂量组明显回升($P<0.05$)。见表2。

表2 DBPT对RILI大鼠血清炎症因子及纤维化指标的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 2 Effect of DBPT on serum inflammatory factors and fibrosis indicators in RILI rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-8	IL-6	TNF-α	TGF-β
空白组		70.07±10.23	64.34±8.83	76.97±18.47	99.65±17.95
模型组		291.13±20.50 ¹⁾	114.89±6.64 ¹⁾	305.18±16.96 ¹⁾	209.92±13.23 ¹⁾
DBPT高剂量+AG490组	24.28±0.005	202.32±13.43 ⁴⁾	104.86±8.17 ⁴⁾	252.16±20.82 ⁴⁾	180.54±11.04 ⁴⁾
DBPT高剂量组	24.28	96.56±16.20 ³⁾	77.02±10.09 ³⁾	122.13±19.74 ³⁾	123.22±12.72 ³⁾
DBPT中剂量组	12.14	124.21±12.71 ²⁾	86.18±5.30 ²⁾	154.46±14.64 ²⁾	148.22±13.15 ²⁾
DBPT低剂量组	6.07	156.32±18.21 ²⁾	96.43±4.15 ²⁾	213.05±19.55 ²⁾	165.19±15.52 ²⁾

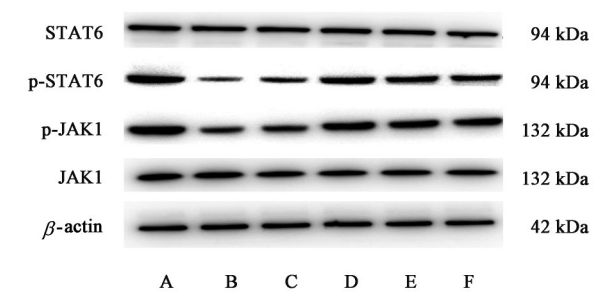
注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$;与DBPT高剂量组比较⁴⁾ $P<0.05$ (表3-表5同)

3.3 DBPT对JAK1/STAT6信号通路活性及相关蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组JAK1与STAT6的磷酸化水平均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,DBPT各剂量组,尤其是高剂量组,能明显提升p-JAK1/JAK1与p-STAT6/STAT6值($P<0.05$, $P<0.01$),见图2、表3。与DBPT高剂量组比较,联合使用AG490可显著拮抗DBPT的效应,使p-JAK1/JAK1与p-STAT6/STAT6值明显下降($P<0.05$),见表3。

3.4 DBPT对RILI大鼠肺组织JAK1/STAT6信号通路关键蛋白表达的影响 IHC染色结果显示,与空白组比较,模型组大鼠肺组织中JAK1、STAT6及其磷酸化蛋白(p-JAK1、p-STAT)的阳性表达水平显著下降($P<0.01$),细胞核周围棕黄色颗粒阳性信号强

表3 DBPT对RILI大鼠JAK1/STAT6通路活性及相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 3 Effect of DBPT on activity of JAK1/STAT6 pathway and expression of related proteins in RILI rats ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	p-JAK1/JAK1	p-STAT6/STAT6	JAK1/β-actin	STAT6/β-actin	p-JAK1/β-actin	p-STAT6/β-actin
空白组		1.67±0.040	1.71±0.06	0.93±0.05	0.98±0.03	1.55±0.037	1.68±0.06
模型组		0.67±0.09 ¹⁾	0.37±0.03 ¹⁾	0.95±0.10	1.00±0.06	0.64±0.09 ¹⁾	0.37±0.03 ¹⁾
高剂量+AG490组	24.28±0.005	0.83±0.08 ⁴⁾	0.81±0.04 ⁴⁾	0.99±0.04	1.02±0.12	0.81±0.07 ⁴⁾	0.83±0.05 ⁴⁾
DBPT高剂量组	24.28	1.52±0.09 ³⁾	1.44±0.10 ³⁾	0.85±0.08	0.99±0.06	1.29±0.07 ³⁾	1.43±0.10 ³⁾
DBPT中剂量组	12.14	1.24±0.09 ²⁾	1.20±0.05 ²⁾	0.89±0.05	0.96±0.08	1.10±0.08 ²⁾	1.16±0.05 ²⁾
DBPT低剂量组	6.07	1.02±0.06 ²⁾	1.01±0.08 ²⁾	0.88±0.05	0.97±0.04	0.90±0.05 ²⁾	0.98±0.08 ²⁾



注:A.空白组;B.模型组;C.高剂量+AG490组;D.DBPT高剂量组;E.DBPT中剂量组;F.DBPT低剂量组(图3同)

图2 各组大鼠肺组织JAK1/STAT6信号通路及相关蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of activity of JAK1/STAT6 signaling pathway and expression of related proteins in lung tissues of each group of rats

度减弱。与模型组比较,经DBPT干预后,高、中、低剂量组 JAK1、STAT6、p-JAK1 及 p-STAT 蛋白表达均明显上调($P<0.05$),阳性颗粒在肺泡上皮细胞及间质细胞核周呈现剂量依赖性富集。当联合 JAK1/

STAT6 信号通路特异性抑制剂 AG490 干预后,高剂量 DBPT 对 JAK1、STAT6 及其磷酸化蛋白的激活作用被显著削弱,高剂量+AG490 组各指标表达水平较单纯高剂量组明显回落($P<0.05$)。见图3、表4。

3.5 DBPT 对 RILI 大鼠肺组织 JAK1/STAT6 信号通路基因表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠肺组织中 JAK1、STAT6 的 mRNA 表达水平均显著下调($P<0.01$)。给予 DBPT 干预后,与模型组比较,各剂量组能剂量依赖性地明显上调 JAK1 与 STAT6 的 mRNA 表达($P<0.05, P<0.01$),其中高剂量组的作用最为显著($P<0.01$)。然而,在 DBPT 高剂量基础上联合 JAK1/STAT6 抑制剂 AG490 后,与 DBPT 高剂量组比较,其对 JAK1、STAT6 mRNA 的上调作用被明显削弱($P<0.05$)。见表5。

4 讨论

RILI是胸部肿瘤放疗常见且严重的并发症,其病理本质是辐射引发的持续性过度炎症反应与组

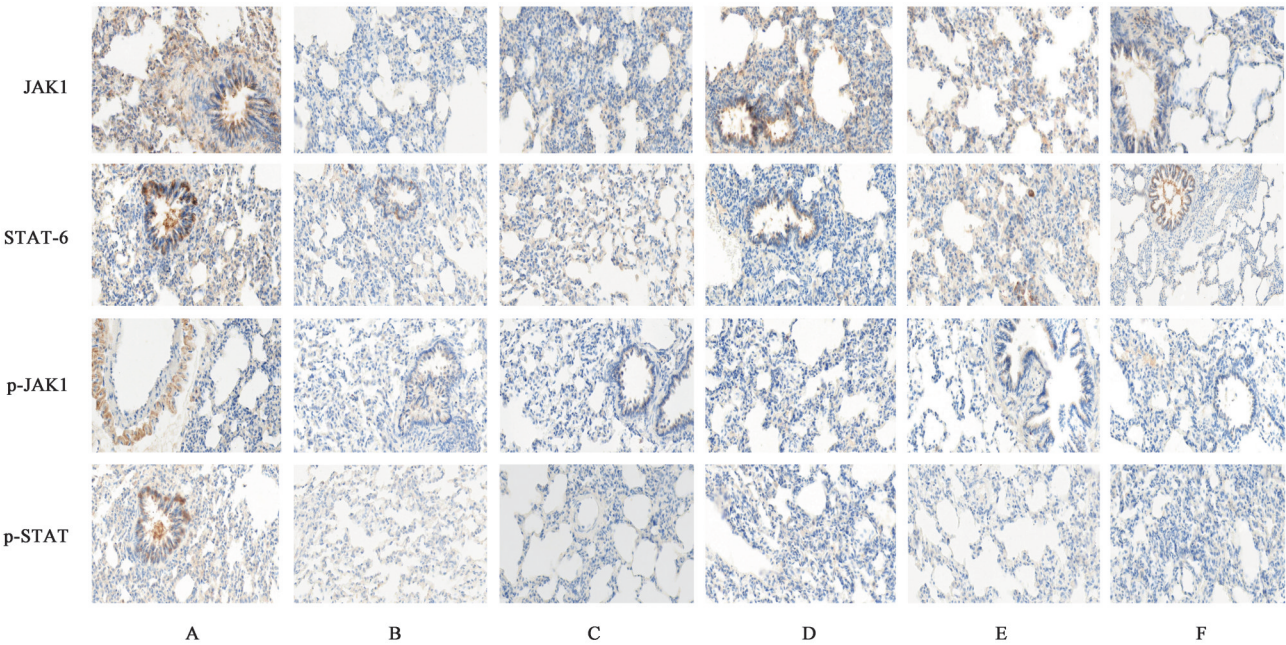


图3 DBPT对RILI大鼠JAK1/STAT6通路关键蛋白表达的影响(免疫组化,×50)

Fig. 3 Effect of DBPT on expression of key proteins of JAK1/STAT6 pathway in RILI rats (IHC, ×50)

表4 DBPT对RILI大鼠JAK1/STAT6信号通路关键蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of DBPT on expression of key proteins of JAK1/STAT6 signaling pathway in RILI rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	JAK1	STAT6	p-JAK1	p-STAT
空白组		2.88±0.13	2.25±0.10	1.67±0.08	3.38±0.18
模型组		1.15±0.12 ¹⁾	0.40±0.07 ¹⁾	0.50±0.11 ¹⁾	0.70±0.17 ¹⁾
高剂量+AG490组	24.28±0.005	1.39±0.09 ^{1,4)}	0.73±0.03 ^{1,4)}	0.76±0.06 ^{1,4)}	1.44±0.07 ^{1,4)}
DBPT高剂量组	24.28	2.40±0.18 ³⁾	1.87±0.08 ³⁾	1.17±0.10 ³⁾	2.37±0.22 ³⁾
DBPT中剂量组	12.14	1.96±0.06 ²⁾	1.17±0.10 ²⁾	0.98±0.07 ²⁾	1.83±0.15 ²⁾
DBPT低剂量组	6.07	1.63±0.06 ²⁾	0.90±0.03 ²⁾	0.80±0.04 ²⁾	1.60±0.07 ²⁾

表5 DBPT对RILI大鼠JAK1/STAT6信号通路mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of DBPT on mRNA expression of JAK1/STAT6 signaling pathway of RILI rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	JAK1	STAT6
空白组		1.00±0.05	1.00±0.06
模型组		0.32±0.04 ¹⁾	0.22±0.02 ¹⁾
高剂量+AG490组	24.28±0.005	0.41±0.04 ^{1,4)}	0.35±0.08 ^{1,4)}
DBPT高剂量组	24.28	0.86±0.07 ³⁾	0.87±0.04 ³⁾
DBPT中剂量组	12.14	0.66±0.05 ²⁾	0.67±0.05 ²⁾
DBPT低剂量组	6.07	0.56±0.04 ²⁾	0.51±0.05 ²⁾

织修复失衡,其中急性炎症期是推动后续肺纤维化发展的关键环节^[16-18]。在中医理论中,放射线属“火热毒邪”,放疗作为“攻伐之法”,易耗伤人体正气,导致气阴两虚、脏腑失调,临床多见肺脾两虚之证。肺脾两脏关系密切,脾土为肺金之母,脾虚则肺失充养,此即“土不生金”的核心病机。因此,运用“培土生金”法,通过健脾益气以资生肺气,成为中医药防治RILI的重要思路,相关临床与基础研究亦证实了该治法的有效性^[19-20]。本研究基于这一理论,选用经典方剂大补脾汤,旨在从调控炎症反应的角度,深入探讨其防治RILI的分子机制。研究首次揭示,大补脾汤的保护作用与其特异性激活JAK1/STAT6信号通路、从而有效抑制过度炎症反应密切相关。

JAK1/STAT6信号轴在免疫与炎症调节中扮演着核心角色。STAT6是介导IL-4/IL-13下游信号的关键转录因子,其活化能驱动巨噬细胞向具有抗炎、促修复功能的M2型极化,并抑制促炎因子的产生^[21]。本研究结果显示,在RILI模型大鼠中,肺组织内p-JAK1与p-STAT6的磷酸化水平显著降低,而血清中TNF- α 、IL-6、IL-8、TGF- β 等促炎因子浓度却急剧升高。这一发现提示,在RILI状态下,JAK1/STAT6信号通路的活性受到抑制,导致其下游的抗炎与组织修复程序无法有效启动,从而难以遏制辐射触发的炎症级联反应,这可能是形成“炎症-损伤-炎症”恶性循环的重要机制。

大补脾汤干预后,大鼠肺组织病理损伤显著减轻,促炎因子水平呈剂量依赖性下降。机制研究表明,这一保护效应与JAK1/STAT6信号通路的特异性激活密切相关。Western blot结果显示,大补脾汤能显著提升p-JAK1/JAK1与p-STAT6/STAT6的磷酸化比值,而不改变其总蛋白表达量。这提示其作用核心在于“功能调节”,即增强既有信号蛋白的活

化效率,而非促进蛋白合成。这一作用模式得到了关键的药理学反向验证,JAK激酶抑制剂AG490的干预,完全阻断了高剂量大补脾汤的抗炎与肺保护效应。尽管AG490对JAK亚型的选择性存在局限^[22-23],但此结果强烈支持JAK/STAT信号通路是大补脾汤发挥作用的必要条件。

基于以上结果,提出大补脾汤基于“培土生金”理论,通过JAK1/STAT6轴发挥作用的可能机制,大补脾汤全方益气生津、健脾养肺,旨在纠正放疗后“脾气大疲、肺津亏耗”的核心病机;从现代生物学视角看,这种整体调节改善了机体的免疫内环境,从而直接或间接促进了JAK1的磷酸化激活,活化的JAK1进而磷酸化STAT6,使其形成二聚体转入核内。一方面,活化的STAT6可抑制TNF- α 、IL-6等促炎基因的转录;另一方面,作为M2型巨噬细胞极化的关键驱动因子^[24],STAT6的激活有助于推动肺内巨噬细胞表型向抗炎、促修复方向转化,从而重塑肺部免疫微环境。上述过程协同作用,最终实现减轻炎症浸润、保护肺泡结构、阻断纤维化早期进程的效果,并为中医“培土生金”理论(健脾土以生养肺金)提供了现代医学解释:即通过健脾调节全身免疫,进而减轻肺部特异性炎症损伤。

值得注意的是,研究中IHC与Western blot在检测JAK1和STAT6总蛋白时显示的差异(IHC信号变化而Western blot总蛋白量无统计学差异),进一步佐证了“功能调节”为主的机制。IHC信号强弱受蛋白定位与聚集状态影响,其变化提示药物可能影响了蛋白在细胞内的功能状态与空间分布,这与磷酸化激活的发现相一致,共同说明大补脾汤的作用焦点在于恢复通路的功能活性。

综上所述,本研究不仅首次揭示了JAK1/STAT6信号轴在RILI中可能扮演的保护性角色,更重要的是,从“培土生金”的理论出发,阐明了大补脾汤通过精准激活该通路、重塑抗炎微环境、减轻肺组织损伤的分子机制。本研究为理解RILI的病理生理提供了新的视角,也为开发靶向JAK1/STAT6信号通路的放射防护策略提供了实验依据。

当然,本研究亦存在局限。首先,AG490抑制剂对JAK1/STAT6的特异性有限,未来需采用选择性JAK1抑制剂或STAT6基因敲减/敲除技术进行靶点确证。其次,本研究聚焦于JAK1-STAT6轴,尚未系统检测其他JAK/STAT亚型(如p-JAK2、p-STAT3)的活性变化,也未对巨噬细胞M1/M2表型转化等下游关键事件进行直接观测,因此未能全

面阐明大补脾汤对复杂信号网络的整体调控模式,而这恰是中药复方多靶点作用的特点所在。基于此,后续研究可沿以下方向深入:第一,在确证通路靶点的基础上,解析大补脾汤中调控该通路的具体药效成分,并利用细胞模型探讨其对巨噬细胞极化等关键下游功能的影响;第二,在疾病全程视角下,探索在RILI纤维化阶段长期给药,能否通过维持JAK1/STAT6信号通路活性来改善肺功能结局,从而为临床转化提供更关键的疗效证据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] WANG S, XU D, XIAO L, et al. Radiation-induced lung injury: From mechanism to prognosis and drug therapy[J]. *Radiat Oncol*, 2025, 20(1): 39.
- [2] WANG Y, ZHANG J, SHAO C. Cytological changes in radiation-induced lung injury [J]. *Life Sci*, 2024, 358: 123188.
- [3] CHEN Y Y, WANG M, ZUO C Y, et al. Nrf-2 as a novel target in radiation induced lung injury [J]. *Heliyon*, 2024, 10(8): e29492.
- [4] RAEISPOUR M, TALEBPOUR AMIRI F, FARZIPOUR S, et al. Febuxostat, an inhibitor of xanthine oxidase, ameliorates ionizing radiation-induced lung injury by suppressing caspase-3, oxidative stress and NF- κ B [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022, 45(6): 2586-2593.
- [5] LI E, HUANG J, HUANG J, et al. ALDH2 attenuates radiation-induced lung injury by inhibiting ROS and epithelial-mesenchymal transition mediated by the TGF- β_1 /Smad pathway [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2024, 87: 102334.
- [6] 胡建华, 万龙, 肖宝荣. 放射性肺损伤的发生及预防进展 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2022, 27(2): 185-191.
HU J H, WAN L, XIAO B R. Advances in the occurrence and prevention of radiation-induced lung injury [J]. *Chin Clin Oncol*, 2022, 27(2): 185-191.
- [7] ZHANG X, WANG X, SUN L, et al. Tofacitinib reduces acute lung injury and improves survival in a rat model of sepsis by inhibiting the JAK-STAT/NF- κ B pathway [J]. *J Inflamm*, 2023, 20(1): 5.
- [8] ZHAO A, GUO C, WANG L, et al. Xiebai San alleviates acute lung injury by inhibiting the phosphorylation of the ERK/Stat3 pathway and regulating multiple metabolisms [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155397.
- [9] CHANG S, LV J, WANG X, et al. Pathogenic mechanisms and latest therapeutic approaches for radiation-induced lung injury: A narrative review [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2024, 202: 104461.
- [10] LI Y, HE Y. Therapeutic applications of stem cell-derived exosomes in radiation-induced lung injury [J]. *Cancer Cell Int*, 2024, 24(1): 403.
- [11] 张朝宁, 余臣祖. 敦煌医学古方大补脾汤对放射性肺损伤大鼠的防护作用研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(10): 4900-4903.
ZHANG C N, YU C Z. Study on the protective effect of Dunhuang medical ancient formula Dabu Pi decoction on rats with radiation-induced lung injury [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 34(10): 4900-4903.
- [12] 张朝宁, 余臣祖. 敦煌医学古方大补脾汤对放射性肺损伤大鼠 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(11): 51-56.
ZHANG C N, YU C Z. Effect of Dunhuang medical ancient formula Dabu Pi decoction on the PI3K/Akt signaling pathway in rats with radiation-induced lung injury [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2021, 28(11): 51-56.
- [13] 张朝宁, 余臣祖, 张燕. 敦煌医学古方大补脾汤对放射性肺损伤大鼠 AMPK/mTOR 信号通路及自噬的影响 [J]. *中医研究*, 2022, 35(9): 78-83.
ZHANG C N, YU C Z, ZHANG Y. Effect of Dunhuang medical ancient formula Dabu Pi decoction on the AMPK/mTOR signaling pathway and autophagy in rats with radiation-induced lung injury [J]. *Tradit Chin Med Res*, 2022, 35(9): 78-83.
- [14] 张朝宁, 张志明, 余臣祖. 大补脾汤通过 NCOA4 介导的铁自噬调控铁死亡减轻放射性肺损伤大鼠氧化应激研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2023, 8(30): 100-106.
ZHANG C N, ZHANG Z M, YU C Z. Dabu Pi decoction alleviates oxidative stress in rats with radiation-induced lung injury by regulating ferroptosis via NCOA4-mediated ferritinophagy [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2023, 8(30): 100-106.
- [15] 刘光盛, 刘敏, 赖宏豪, 等. 辐射合并减压暴露致大鼠急性肺损伤的效应观察 [J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2023, 47(3): 155-162.
LIU G S, LIU M, LAI H H, et al. Observation on the effect of radiation combined with decompression exposure on acute lung injury in rats [J]. *Int J Radiat Med Nucl Med*, 2023, 47(3): 155-162.
- [16] GUO H, CHEN J, YU H, et al. Activation of Nrf2/ARE pathway by Anisodamine (654-2) for inhibition of cellular aging and alleviation of radiation-induced lung injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt A): 110864.
- [17] 顾永清, 敖兴坤, 朱娇娇. 电离辐射调控细胞命运在放射性肺损伤中的作用及治疗进展 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2023, 44(2): 2153-2164.
GU Y Q, AO X K, ZHU J J. The role of ionizing radiation in regulating cell fate in radiation-induced lung injury and therapeutic advances [J]. *J Xi'an Jiaotong Univ: Med Sci*, 2023, 44(2): 2153-2164.
- [18] 莫慧敏, 常晶, 周海, 等. 预防性使用维生素 C 可通过调节巨噬细胞极化和肺泡上皮细胞凋亡缓解放射性肺损伤 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2023, 39(6): 848-856.
MO H M, CHANG J, ZHOU H, et al. Preventive use of

- vitamin C can alleviate radiation-induced lung injury by regulating macrophage polarization and alveolar epithelial cell apoptosis [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2023, 39 (6) : 848-856.
- [19] 张海明,丁浩,罗丹,等. 人参饮子基于“培土生金”理论防治放射性肺损伤机制探讨[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(6): 1430-1431.
- ZHANG H M, DING H, LUO D, et al. Exploration of the mechanism of Ginseng decoction in preventing and treating radiation-induced lung injury based on the theory of "Cultivating Earth to Generate Metal" [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2020, 31(6): 1430-1431.
- [20] 黄如敬,鲁洪岭,吴超,等. 沙参麦冬汤抗小细胞肺癌放射性肺损伤后肺的纤维化[J]. *解剖科学进展*, 2024, 30(5): 544-547.
- HUANG R J, LU H L, WU C, et al. Shashen Maidong decoction against pulmonary fibrosis after radiation-induced lung injury in small cell lung cancer[J]. *Prog Anat Sci*, 2024, 30(5): 544-547.
- [21] 李瑞萍,王世宇,魏秀楠,等. 基于 miR-21/SOCS1/JAK1/STAT6 信号通路探讨黄芪败酱薏仁汤对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜屏障的修复作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 16(31): 96-105.
- LI R P, WANG S Y, WEI X N, et al. Exploring the repairing effect of Huangqi Baijiang Yiren decoction on the intestinal mucosal barrier in rats with ulcerative colitis via the miR-21/SOCS1/JAK1/STAT6 signaling pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 16(31): 96-105.
- [22] 魏双燕,李霞,陈莉,等. 酪氨酸蛋白激酶 2 特异性抑制剂 AG490 对妊娠期高血压综合征大鼠血管内皮细胞分泌功能的作用机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, (21): 3457-3460.
- WEI S Y, LI X, CHEN L, et al. Study on the mechanism of the specific tyrosine kinase 2 inhibitor AG490 on the secretory function of vascular endothelial cells in rats with pregnancy-induced hypertension syndrome [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2020, (21): 3457-3460.
- [23] 段兆,彭应琪,徐冬垚,等. 灯盏乙素通过 JAK2/STAT3 信号通路减轻缺血性脑卒中大鼠神经元凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2025, 41(6): 1098-1108.
- DUAN Z, PENG Y Q, XU D Y, et al. Scutellarin alleviates neuronal apoptosis in rats with ischemic stroke via the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2025, 41(6): 1098-1108.
- [24] 王珏,刘琪,张潇予,等. 基于 IL-4/JAK1/STAT6 信号通路影响巨噬细胞 M2 极化探讨培元定喘汤治疗哮喘气道炎症的作用机制[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(8): 4312-4317.
- WANG J, LIU Q, ZHANG X Y, et al. Exploring the mechanism of Peiyuan Dingchuan decoction in treating airway inflammation in asthma by affecting macrophage M2 polarization based on the IL-4/JAK1/STAT6 signaling pathway [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2024, 39(8): 4312-4317.

[责任编辑 周冰冰]