

补阳还五汤通过抑制 JAK2/STAT3 通路促进 BV2 小胶质细胞 M2 极化以减轻炎症反应

聂颖¹ 段嘉豪¹ 杨少锋¹ 陈龙¹ 李兆勇¹ 郭彦涛¹ 范瑜洁^{2△} 杨雷^{1△}

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤(BYHWD)调节 JAK2/STAT3 信号通路对脂多糖(LPS)中 BV2 小胶质细胞极化的影响。方法:建立 BV2 小胶质细胞脂多糖诱导神经炎症损伤模型,将细胞分为空白组、模型组、BYHWD 组、Colivelin 组(STAT3 激活剂)及 BYHWD+Colivelin 组。用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测细胞活力;酶联免疫吸附(ELISA)测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-4(IL-4)的分泌水平;免疫荧光共表达 F4/80/iNOS、F4/80/CD206 观察 BV2 细胞活化情况;免疫印迹法检测 iNOS、IL-1 β 、Arg1、Fizz1 和 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白的表达情况。结果:与空白组比较,模型组中细胞活力,IL-10、IL-4 炎症因子水平,F4/80 和 CD206 双阳性细胞比例,Fizz1、Arg1 蛋白表达水平显著下调($P < 0.05$);IL-6、TNF- α 炎症因子水平,F4/80 和 iNOS 双阳性细胞比例,iNOS、IL-1 β 、p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$)。与模型组比较,BYHWD 组细胞活力,IL-10、IL-4 炎症因子水平,F4/80 和 CD206 双阳性细胞比例,Fizz1、Arg1 蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$);IL-6、TNF- α 炎症因子水平,F4/80 和 iNOS 双阳性细胞比例,iNOS、IL-1 β 、p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平显著下调($P < 0.05$)。与 BYHWD 组比较,Colivelin 组细胞活力,IL-10、IL-4 炎症因子水平,F4/80 和 CD206 双阳性细胞比例,Fizz1、Arg1 蛋白表达水平显著下调($P < 0.05$);IL-6、TNF- α 炎症因子水平,F4/80 和 iNOS 双阳性细胞比例,iNOS、IL-1 β 、p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$)。与 Colivelin 组比较,BYHWD+Colivelin 组细胞活力,IL-10、IL-4 炎症因子水平,F4/80 和 CD206 双阳性细胞比例,Fizz1、Arg1 蛋白表达水平显著上调($P < 0.05$);IL-6、TNF- α 炎症因子水平,F4/80 和 iNOS 双阳性细胞比例,iNOS、IL-1 β 、p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达水平显著下调($P < 0.05$)。结论:补阳还五汤可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路激活,减少脂多糖诱导的 BV2 小胶质细胞 M1 型活化,促进其向 M2 型极化,为临床治疗脊髓损伤后神经炎症提供了实验依据。

[关键词] 补阳还五汤;脊髓损伤;BV2 小胶质细胞;M2 极化;神经炎症;JAK2/STAT3 信号通路

[中图分类号] R285.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2026)01-0043-08

DOI: 10. 20085/j. cnki. issn1005-0205. 260107

Buyang Huanwu Decoction Promotes M2 Polarization of BV2 Microglia by Inhibiting the JAK2/STAT3 Pathway to Alleviate Inflammatory Response

NIE Ying¹ DUAN Jiahao¹ YANG Shaofeng¹ CHEN Long¹ LI Zhaoyong¹ GUO Yantao¹
FAN Yujie^{2△} YANG Lei^{1△}

基金项目:湖南省自然科学基金(2025JJ90030)
湖南省教育厅重点项目(22A0261)
湖南省中医药管理局项目(B2023028)

¹ 湖南中医药大学第一附属医院(长沙,410007)

² 湖南省第二人民医院

△通信作者 E-mail:1169949914@qq.com(杨雷)
18593532@qq.com(范瑜洁)

¹ The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

² The Second People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410007, China.

Abstract Objective: To investigate the effect of Buyang Huanwu decoction (BYHWD) on the polarization of BV2 microglial cells induced by lipopolysaccharide (LPS) by regulating the JAK2/STAT3 signaling pathway. **Methods:** A

neuroinflammatory injury model was established in BV2 microglial cells using LPS. The cells were divided into blank group, model group, BYHWD group, Colivelin group (STAT3 activator), and BYHWD + Colivelin group. Cell viability was assessed using the Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to measure the secretion levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), and interleukin-4 (IL-4). Immunofluorescence co-expression analysis of F4/80/iNOS and F4/80/CD206 was used to observe BV2 cell activation. Western Blot was performed to detect the expression of iNOS, IL-1 β , Arg1, Fizz1, and proteins related to the JAK2/STAT3 signaling pathway. **Results:** Compared with the blank group, the model group exhibited significantly decreased cell viability, levels of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-4, the proportion of F4/80 and CD206 double-positive cells, and the protein expression levels of Fizz1 and Arg1 ($P < 0.05$). Conversely, the levels of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α , the proportion of F4/80 and iNOS double-positive cells, and the protein expression levels of iNOS, IL-1 β , p-JAK2/JAK2, and p-STAT3/STAT3 were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the BYHWD group showed significantly increased cell viability, levels of IL-10 and IL-4, the proportion of F4/80 and CD206 double-positive cells, and the protein expression levels of Fizz1 and Arg1 ($P < 0.05$), while the levels of IL-6 and TNF- α , the proportion of F4/80 and iNOS double-positive cells, and the protein expression levels of iNOS, IL-1 β , p-JAK2/JAK2, and p-STAT3/STAT3 were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the BYHWD group, the Colivelin group exhibited significantly decreased cell viability, levels of IL-10 and IL-4, the proportion of F4/80 and CD206 double-positive cells, and the protein expression levels of Fizz1 and Arg1 ($P < 0.05$), along with significantly increased levels of IL-6 and TNF- α , the proportion of F4/80 and iNOS double-positive cells, and the protein expression levels of iNOS, IL-1 β , p-JAK2/JAK2, and p-STAT3/STAT3 ($P < 0.05$). Compared with the Colivelin group, the BYHWD + Colivelin group showed significantly increased cell viability, levels of IL-10 and IL-4, the proportion of F4/80 and CD206 double-positive cells, and the protein expression levels of Fizz1 and Arg1 ($P < 0.05$), while the levels of IL-6 and TNF- α , the proportion of F4/80 and iNOS double-positive cells, and the protein expression levels of iNOS, IL-1 β , p-JAK2/JAK2, and p-STAT3/STAT3 were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** BYHWD may inhibit the activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway, thereby reducing LPS-induced M1-type activation of BV2 microglia and promoting their polarization toward the M2 phenotype. This provides experimental evidence for the clinical treatment of neuroinflammation following spinal cord injury (SCI).

Keywords: Buyang Huanwu decoction; spinal cord injury; BV2 microglia; M2 polarization; neuroinflammation; JAK2/STAT3 signaling pathway

脊髓损伤 (Spinal Cord Injury, SCI) 具有高致残率、高耗费和低死亡率等特点, 往往造成损伤节段以下肢体严重的功能障碍, 已成为重大公共卫生问题^[1]。脊髓损伤发病机制复杂, 涉及多种损伤机制, 其中脊髓损伤后会引发持续炎症反应, 导致神经元受损。由于神经炎症主要由中枢神经系统介导, 且小胶质细胞是中枢神经系统的重要免疫细胞, 提示小胶质细胞介导的炎症反应是脊髓损伤继发性损伤的核心机制之一^[2]。脊髓损伤发生后, 小胶质细胞迅速活化并释放大量促炎因子, 直接损伤神经元和血管内皮细胞, 血脑屏障通透性增加, 外周免疫细胞浸润, 与小胶质细胞相互作用, 导致神经炎症的恶性循环^[3], 这些病理过程共同加重神经功能缺损, 影响患者预后^[4]。因此, 靶向调控小胶质细胞介导的神经炎症反应可能成为治疗脊髓损伤的新策略。

Janus 蛋白酪氨酸激酶 2 (Janus kinase-2, JAK2) 是细胞因子受体的细胞内信号效应因子, 通过参与多种分子机制调控各种疾病进展^[5]。JAK2/STAT3 通路可参与活化小胶质细胞, 促进神经元凋亡, 进而损伤血脑屏障, 加重神经系统损伤, 而抑制 STAT3 磷酸化

可减少细胞凋亡, 改善血脑屏障损伤和神经炎症, 进而保护神经元, 减轻脊髓损伤后组织损伤^[6]。脊髓损伤可归属中医“气虚血瘀”证范畴。清代著名医家王清任以“益气活血”之法, 创立补阳还五汤 (Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)。该方疗效显著, 逐渐成为临床治疗中枢神经系统损伤的经典方, 广泛应用于中风后遗症、截瘫等神经系统损伤疾病^[7]。有研究发现, 补阳还五汤可以有效促进大鼠颈髓损伤后小胶质细胞表型从 M1 型转换为 M2 型, 减轻神经炎症反应, 抑制继发性损伤, 从而改善颈髓损伤后运动功能障碍^[8], 但补阳还五汤能否通过调节 JAK2/STAT3 信号通路影响脂多糖诱导小胶质细胞产生的炎症损伤尚不清楚。因此, 本文以 BV2 小胶质细胞为研究对象, 基于 JAK2/STAT3 信号通路探讨补阳还五汤治疗脊髓损伤后神经炎症的作用及具体机制, 以期为临床应用补阳还五汤治疗脊髓损伤提供理论依据。

1 材料

1.1 动物及细胞系

无特定病原体 (SPF) 级 SD 大鼠 20 只, 8~12 周龄, 雄性, 体重为 (250 \pm 20) g, 均购自湖南斯莱克景达

实验动物有限公司(SYXK(湘)2021-0074),饲养于湖南中医药大学第一附属医院动物实验中心。本研究符合湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会规定,伦理审查编号为SLBH-202307180003,实验过程遵循“3R”原则(替代、减少、优化),大鼠处死采用戊巴比妥钠过量麻醉法,符合动物伦理要求。大鼠小胶质细胞BV2株购于武汉普诺赛生物有限公司(货号为CL-0493),已传至第5代。

1.2 药物与试剂

脂多糖(LPS,货号L6143)与STAT3激活剂Colivelin(货号SML0609)购自美国Sigma-Aldrich公司;CCK-8试剂盒(货号E-CK-A362)购自Elabscience公司;NO检测试剂盒(货号S0021S)购自碧云天公司;TNF- α 、IL-6、IL-4及IL-10的ELISA试剂盒(货号依次为AF02132-A、AF2163-A、AF02165-A、AF02176A)购自艾方生物科技有限公司。所用抗体包括:兔抗iNOS(货号bs-0162R,奥伯森)、兔抗Arg1(货号APR24398N,安诺伦)、兔抗Iba-1(货号db2881,戴格生物),以及F4/80(货号ab6640)、CD206(货号ab64693)、p-JAK2(货号ab32101)与p-STAT3(货号ab76315)抗体(均购自Abcam公司,稀释比分别为1:500,1:500,1:1000和1:1000)。

1.3 仪器

XE-100型超高速离心机(美国Beckman公司),Nanosight LM10型系统(美国Nanosight Ltd公司),H7650型透射电镜(日本日立公司),OlympusFV3000型共聚焦显微镜(日本奥林巴斯公司),FLX800型多功能荧光成像仪(美国BioTek公司),1681130B型酶标仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 药物制备

BYHWD组方为生黄芪120g、当归尾6g、赤芍4.5g、地龙3g、川芎3g、红花3g、桃仁3g,中药饮片由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供。按原方比例一次性购回并经鉴定,加水回流提取2次,第一次加10倍水提取2h,第二次加8倍水提取1.5h,药液过滤浓缩致含生药浓度2g/mL,4℃下保存,用蒸馏水稀释备用。

2.2 含药血清的制备

20只大鼠随机分为含药血清组(10只)和空白组(10只),含药血清组大鼠连续7d灌胃补阳还五汤水煎剂,给药方案依据体表面积等效剂量换算原理^[9],参照临床成人日剂量142.5g/d,计算获得大鼠日给药剂量为12.825g/kg。按照既往经验^[10],使用临床等效剂量5倍换算出大鼠每日等效剂量为64.13g/kg。空白组连续7d灌胃等量生理盐水,每天分早、晚2次

给药,间隔10h。于末次给药2h后,大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,4℃下3000r/min离心15min,分别得含药血清和空白血清,置于56℃下水浴灭活30min,过滤,-80℃冰箱保存备用。

2.3 含药血清的浓度筛选

取对数生长期的BV2小胶质细胞,以5000个/孔密度接种于96孔板内,每孔100 μ L,各组均设3个复孔。设置对照组和5%,10%,15%,20%补阳还五汤含药血清组,对照组加入相应浓度空白血清,分别作用于BV2小胶质细胞24,48,72h。所有孔中加入10 μ L/孔的CCK-8,用完全培养基配制CCK-8溶液,去除含药培养基,每孔加入100 μ L含有CCK-8的培养基,继续孵育4h后于酶标仪上450nm处测定吸光度(A),计算各组细胞增殖率,细胞增殖率=(A_{实验}-A_{空白})/(A_{对照}-A_{空白})。

2.4 分组及给药

脂多糖可以诱导BV2细胞活化,用脂多糖处理构建BV2细胞炎症模型^[11]。将部分生长至对数期的细胞重悬并随机分为:1)空白组,常规培养72h;2)模型组,1mg/L脂多糖刺激24h后,加入10%空白血清培养72h;3)BYHWD组,脂多糖刺激24h后,加入20%补阳还五汤含药血清培养72h;4)Colivelin组,脂多糖刺激24h后,加入100nmol/L Colivelin+10%空白血清培养72h;5)BYHWD+Colivelin组,脂多糖刺激24h后,加入20%补阳还五汤含药血清+100nmol/L Colivelin培养72h。

2.5 CCK-8实验检测BV2细胞活力

按照2.4节中细胞分组,干预48h后,按照1 \times 10⁵个/孔接种于96孔板上,培养24h后,每孔加入10 μ L CCK-8溶液,置于37℃、5%CO₂培养箱内30min,在酶标仪上测量450nm处的吸光度,对细胞存活率进行检测,计算实验组/对照组的吸光度比值,制作细胞生长曲线,实验重复3次。

2.6 ELISA检测炎症因子的表达

收集2.4节中各组细胞上清液,按照ELISA试剂盒说明书进行操作,检测IL-1 β 、TNF- α 、IL-10和IL-4等炎症因子表达情况。

2.7 免疫荧光法检测M1型标志物、M2型标志物双阳性表达率

按照2.4节细胞分组收集细胞,细胞接种于爬片后,按分组干预结束,4%多聚甲醛固定30min,0.3% Triton X-100透化15min,5%BSA封闭1h;一抗(F4/80 1:500,iNOS 1:300,CD206 1:300)4℃下孵育过夜;荧光二抗(Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG 1:1000,Alexa Fluor 594标记山羊抗鼠IgG 1:1000)室温孵育1h;DAPI染核5min,抗荧光淬灭剂封片,

在激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。图片定量分析方法:每个爬片随机选取5个视野($\times 200$),ImageJ软件计数 F4/80 + iNOS 双阳性细胞数、F4/80 + CD206 双阳性细胞数,计算占总 F4/80 阳性细胞的百分比。

2.8 免疫印迹法检测 iNOS、IL-1 β 、Arg1、Fizz1 和 JAK2/STAT3 信号通路相关蛋白的表达

按照 2.4 节细胞分组收集细胞,加入含 1%PMSF 和 1%磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 15 min。取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度并调整至 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。取 10 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜,5% BSA 室温封闭 1 h。加入一抗 IL-1 β 、Arg-1、iNOS、p-JAK2、JAK2、p-STAT 3、STAT 3(均为 1:1 000)及 GAPDH(1:14 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。洗膜后加相应二抗(山羊抗兔/小鼠,1:25 000)室温孵育 1 h,ECL 显影。用 ImageJ 分析条带灰度,以目的蛋白与 GAPDH 灰度比值表示结果。

2.9 统计学方法

所有实验独立重复 3 次,每次设置 3 个复孔,数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,并用 Graph Pad Prism 8.0 进行统计学分析,组间均数比较采用单因素方差分析(ANOVA),符合正态分布和方差齐后,采用 Tukey 法进行多重比较;若方差不齐,则采用 Welch ANOVA + Dunnett's T_3 法; $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度的补阳还五汤含药血清对 BV2 细胞增殖的影响

补阳还五汤含药血清各浓度组 BV2 细胞增殖率均高于同时段相应浓度的空白血清,提示补阳还五汤含药血清促进细胞活性;在 24, 48, 72 h 各时间点中,20% 含药血清组最高;进一步比较细胞增殖率,各血清干预组在处理 72 h 时细胞增殖率最高,提示 20% 补阳还五汤含药血清干预 72 h 时,BV2 细胞增殖率达 1.13 ± 0.09 ,显著高于同浓度空白血清组 (0.81 ± 0.05),差异有统计学意义($P < 0.001$),且无细胞毒性(增殖率 < 1.2 符合安全范围),故确定 20% 为最佳血清浓度,72 h 为最佳干预时间,可作为后续细胞实验最佳干预浓度及时间点,见表 1。

3.2 补阳还五汤对 BV2 细胞活性的影响

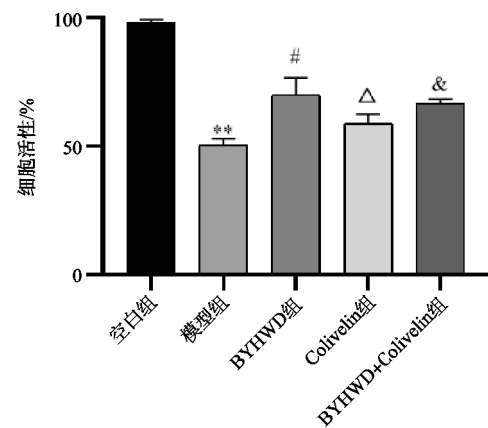
CCK-8 检测各组细胞活力结果显示,与空白组比较,模型组细胞活力显著下调,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,BYHWD 组细胞活力显著上调,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 BYHWD 组比较,Colivelin 组细胞活力下调,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 Colivelin 组比较,BYHWD + Colivelin

表 1 不同浓度含药血清对 BV2 细胞增殖率的影响($n=3$)

组别	浓度/%	增殖率		
		24 h	48 h	72 h
空白血清组	5	0.55	0.61	0.69
	10	0.63	0.69	0.72
	15	0.69	0.73	0.75
	20	0.72	0.77	0.81
含药血清组	5	0.91 ¹⁾	0.94 ²⁾	0.98 ²⁾
	10	0.92 ²⁾	1.01 ²⁾	1.06 ²⁾
	15	0.97 ²⁾	1.06 ²⁾	1.10 ²⁾
	20	1.11 ¹⁾	1.10 ²⁾	1.13 ¹⁾

注:与空白血清组相比,1) $P < 0.01$,2) $P < 0.05$ 。

组细胞显著上调,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



注:与空白组比较,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与BYHWD组比较,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$;与Colivelin组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;下同。

图 1 CCK-8 检测细胞活性

3.3 补阳还五汤对炎症因子表达的影响

与空白组比较,模型组 IL-6 和 TNF- α 炎症因子显著上调,差异有统计学意义($P < 0.05$);IL-10 和 IL-4 炎症因子显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,BYHWD 组 IL-6 和 TNF- α 炎症因子显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);IL-10 和 IL-4 炎症因子显著上调,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 BYHWD 组比较,Colivelin 组 IL-6 和 TNF- α 炎症因子显著上调,差异有统计学意义($P < 0.05$);IL-10 和 IL-4 炎症因子显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 Colivelin 组比较,BYHWD + Colivelin 组 IL-6 和 TNF- α 炎症因子显著下调,差异有统计学意义($P < 0.05$);IL-10 和 IL-4 炎症因子显著上调,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各组细胞培养上清中 IL-6、TNF- α 、IL-10 和 IL-4 表达情况见表 2。

3.4 补阳还五汤对 BV2 小胶质细胞极化的影响

免疫荧光检测小胶质细胞活化情况,F4/80 和 iNOS 双阳性表示 BV2 细胞 M1 极化,F4/80 和 CD 206 双阳性表示 BV2 细胞 M2 极化,结果显示:与

表 2 各组细胞培养上清中 IL-6、TNF- α 、IL-10 和 IL-4 表达情况 ($n=3, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	IL-6	TNF- α	IL-10	IL-4
空白组	134.14 \pm 19.19	165.22 \pm 13.65	298.12 \pm 23.46	279.13 \pm 19.22
模型组	174.89 \pm 9.23 ¹⁾	312.26 \pm 19.22 ¹⁾	120.19 \pm 9.34 ²⁾	98.11 \pm 7.32 ¹⁾
BYHWD 组	138.17 \pm 8.72 ³⁾	180.11 \pm 22.23 ⁴⁾	259.22 \pm 19.14 ⁴⁾	230.34 \pm 21.11 ³⁾
Colivelin 组	183.28 \pm 10.37 ⁵⁾	345.99 \pm 28.56 ⁵⁾	108.27 \pm 9.17 ⁵⁾	78.12 \pm 5.27 ⁵⁾
BYHWD+Colivelin 组	155.22 \pm 11.24 ⁶⁾	209.17 \pm 20.38 ⁶⁾	170.14 \pm 14.35 ⁶⁾	205.12 \pm 14.23 ⁶⁾

注:与空白组相比,1) $P<0.05$,2) $P<0.01$;3)与模型组相比, $P<0.05$,4) $P<0.01$;5)与 BYHWD 组相比, $P<0.05$;6)与 Colivelin 组相比,6) $P<0.05$;下同。

空白组比较,模型组细胞 F4/80 和 iNOS 双阳性比例上调,差异有统计学意义($P<0.05$),F4/80 和 CD206 双阳性比例下调,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,BYHWD 组细胞 F4/80 和 iNOS 双阳性比例下调,差异有统计学意义($P<0.05$),F4/80 和 CD206 双阳性比例上调,差异有统计学意义($P<0.05$);与 BYHWD 组比较,Colivelin 组 F4/80 和 iNOS 双阳性比例上调,差异有统计学意义($P<0.05$),F4/80 和 CD206 双阳性比例显著下调,差异有统计学意义($P<0.05$);与 Colivelin 组比较,BYHWD+Colivelin 组 F4/80 和 iNOS 双阳性比例下调,差异有统计学意义($P<0.05$),F4/80 和 CD206 双阳性比例显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

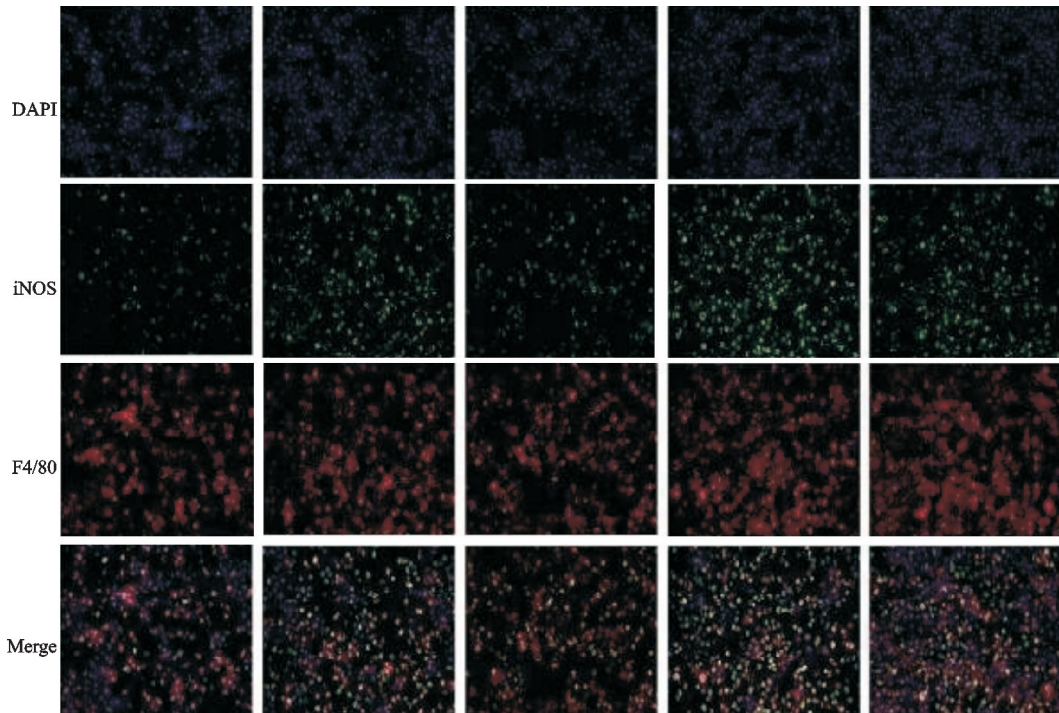
3.5 补阳还五汤对 BV2 小胶质细胞 M1 和 M2 型标志物表达的影响

M1 标志物为 iNOS 和 IL-1 β ,M2 标志物为 Fizz1 及 Arg1,Western Blot 结果显示:与空白组比较,模型组细胞 iNOS 和 IL-1 β 蛋白表达显著上调,Fizz1 及 Arg1 蛋白表达显著下调,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,BYHWD 组细胞 iNOS 和 IL-1 β

蛋白表达显著下调,Fizz1 及 Arg1 蛋白表达显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$);与 BYHWD 组比较,Colivelin 组细胞 iNOS 和 IL-1 β 蛋白表达显著上调,Fizz1 及 Arg1 蛋白表达显著下调,差异有统计学意义($P<0.05$);与 Colivelin 组比较,BYHWD+Colivelin 组细胞 iNOS 和 IL-1 β 蛋白表达显著下调,Fizz1 及 Arg1 蛋白表达显著上调,见图 3。

3.6 补阳还五汤对 BV2 小胶质细胞 JAK2/STAT3 信号通路表达的影响

与空白组比较,模型组细胞 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达显著上调,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,BYHWD 组细胞 JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达显著下调,差异有统计学意义($P<0.05$);与 BYHWD 组比较,Colivelin 组细胞 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白表达上调,差异有统计学意义($P<0.05$);与 Colivelin 组比较,BYHWD+Colivelin 组细胞 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 蛋白显著下调,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 4。



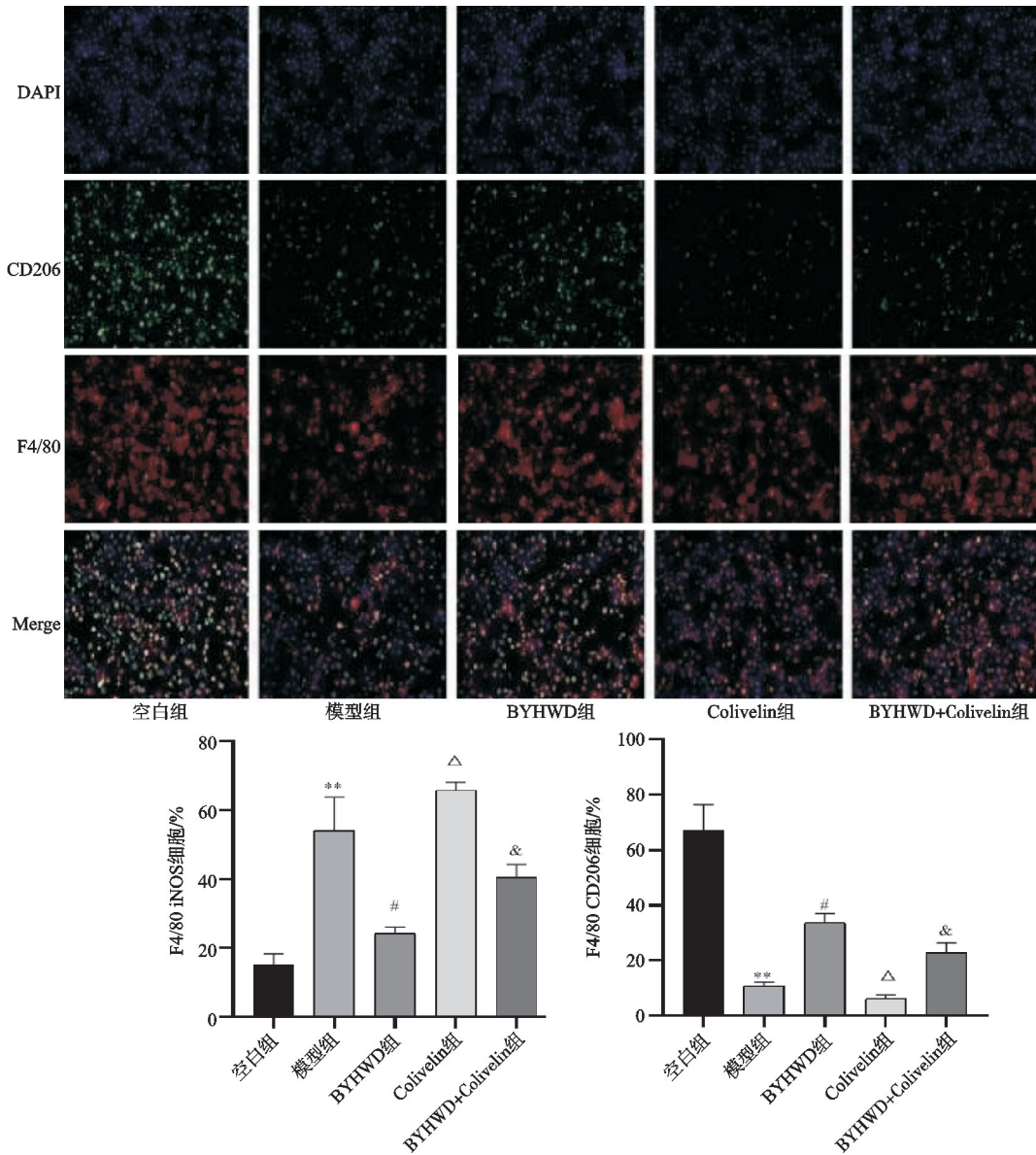


图2 补阳还五汤对BV2小胶质细胞极化的影响(×200)

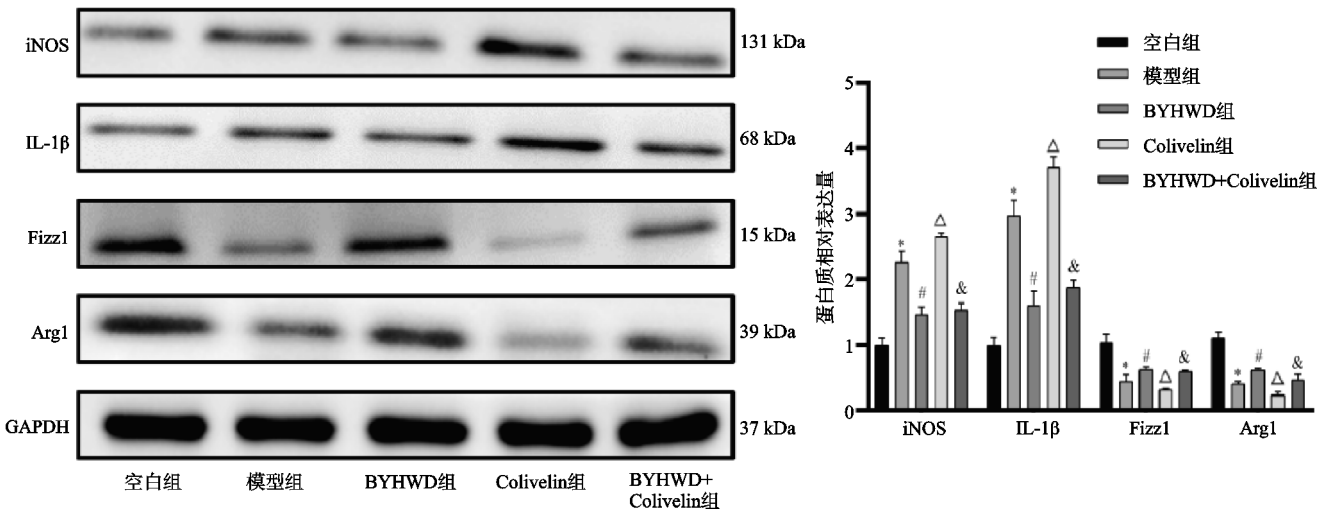


图3 补阳还五汤对BV2小胶质细胞iNOS、IL-1β、Fizz1及Arg1蛋白表达的影响

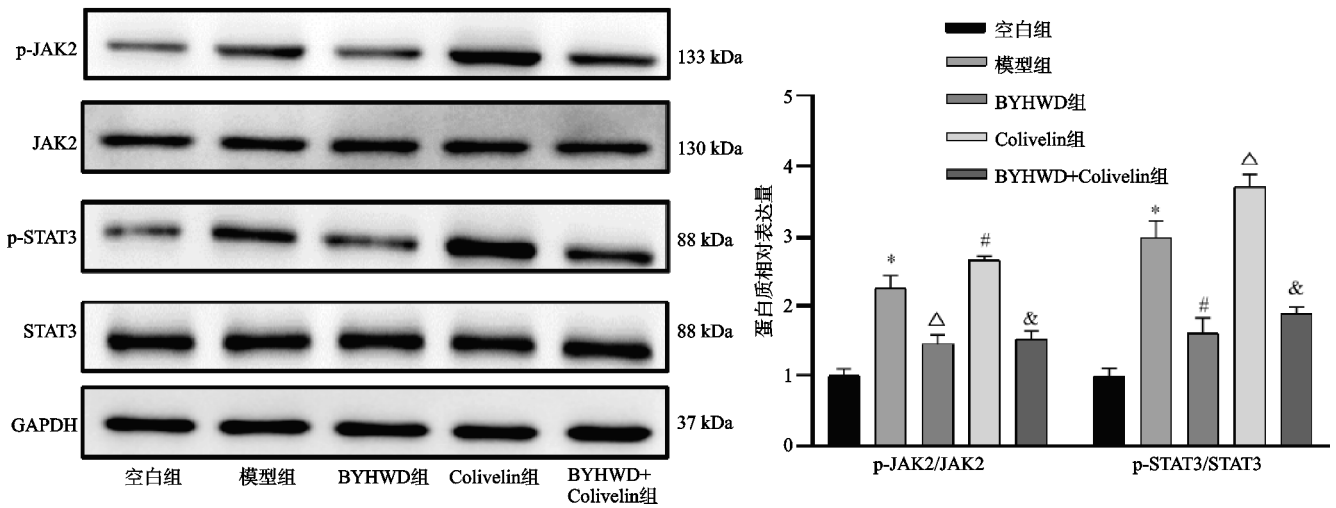


图 4 补阳还五汤对 BV2 小胶质细胞 JAK2/STAT3 信号通路的影响

4 讨论

脊髓损伤是严重的神经系统损伤疾病,通常引起患者运动、感觉和自主神经功能障碍。脊髓损伤引发多种分子调控机制,如神经保护因子、炎症介质和神经干细胞,影响细胞凋亡、炎症反应和神经元再生^[12]。脊髓损伤后作为中枢神经常驻免疫细胞小胶质细胞,也是中枢神经系统的先天免疫防御反应的主要效应细胞,活化并释放大炎症因子和趋化因子引发免疫细胞的浸润,导致炎症反应加剧,然后通过引起胶质屏障形成和胶质瘢痕转化,导致神经元结构与功能的不可逆损伤,其在脊髓损伤的神经恢复中起阻碍作用^[13-14]。脊髓损伤后小胶质细胞被激活,其特异性标志物 Iba-1 表达增多并呈现出阿米巴样改变。活化的小胶质细胞分为 M1 型和 M2 型,其中 M1 型小胶质细胞高表达 iNOS,释放促炎因子如 IL-1 β 、TNF- α 、IL-18、IL-6 等,从而加剧神经炎症反应。而 M2 型小胶质细胞高表达 Arg-1,释放抗炎因子如 IL-10、转化生长因子- β (TGF- β)等,能够促进炎症消退和神经的修复。因此,抑制小胶质细胞的激活并促进其由 M1 型向 M2 型转化,可能是改善神经炎症、治疗脑脊髓损伤后功能恢复的重要策略。

脊髓损伤归属于中医“痿证”范畴,其核心症状“肢体懈惰不收”与“体惰”描述相符,病机以气虚血瘀、筋脉失养为关键。《灵枢·寒热病》云“身有所伤,血出多……若有所堕坠,四支懈惰不收,名曰体惰”;《难经·二十八难》载“督脉者……起于下极之腧,并于脊里,上至风府,入属于脑”。有研究认为脊髓与督脉走行一致。清代医家王清任在《医林改错》中阐释其病机为:“若元气一亏,经络自然空虚,有空虚之隙,难免其气向一边归并。”基于此理论,王清任创制了以黄芪为君药的补阳还五汤,通过黄芪重补元气、行气活血、通达经络之功,改善气虚血瘀所致的肢体功能障碍。JAK2/STAT3 信号通路是小胶质细胞极化的核心调

控机制,其双向作用深刻影响神经炎症进程^[15],在病理刺激下,该通路过度激活可驱动小胶质细胞向促炎的 M1 型极化,释放 TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子,通过正反馈循环放大炎症反应并加剧神经元损伤^[16];而适度激活或靶向干预则能诱导抗炎的 M2 型极化,促进 Arg-1、IL-10 等抗炎因子表达,增强组织修复能力^[17]。这一通路在脑卒中、神经退行性疾病及肿瘤微环境等病理场景中均发挥关键作用,其精准调控为开发神经炎症相关疾病的治疗策略提供了重要靶点。

本研究结果表明,补阳还五汤干预能够降低脂多糖诱导的小胶质细胞中 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 的蛋白表达水平。这提示补阳还五汤可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路的活化,减轻脂多糖诱导的小胶质细胞炎症损伤。为进一步验证补阳还五汤对该通路的靶向调控作用,本研究采用脂多糖诱导小胶质细胞构建神经炎症模型,Colivelin 作为 JAK2/STAT3 通路激活剂进行反向验证,构建神经炎症模型,实验结果显示脂多糖刺激显著激活了 BV2 小胶质细胞,促使其向促炎性 M1 表型极化,同时伴随炎症因子释放增加及 JAK2/STAT3 信号通路关键蛋白(p-JAK2、p-STAT3)表达上调,表明 JAK2/STAT3 信号通路的激活加剧了脊髓损伤后的神经炎症损伤。值得注意的是,补阳还五汤干预有效抑制了 JAK2/STAT3 信号通路的激活,逆转了脂多糖诱导的小胶质细胞活化,促进其向抗炎性 M2 表型转化,并显著提升了抗炎因子(如 IL-10)的表达水平。研究表明补阳还五汤能显著下调 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平(p-JAK2、p-STAT3)。在脊髓损伤模型中,补阳还五汤治疗组大鼠损伤脊髓组织中的 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平显著降低^[18]。类似地,在高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤模型中,补阳还五汤含药血清也能够下调 p-JAK2 和 p-STAT3 的蛋白表达^[19]。推测补阳还五汤对 JAK2/STAT3 通路的抑制,部分是通过调控其上游激

活因子实现的。相关研究证实补阳还五汤在降低 p-JAK2 和 p-STAT 3 的同时,也显著下调了通路关键激活因子 IL-6 及其受体 gp130 的蛋白水平^[20]。补阳还五汤的抗氧化和抗炎作用也被认为是其抑制 JAK2/STAT 3 通路的重要环节^[17]。这些结果证实,补阳还五汤通过特异性调控 JAK2/STAT 3 信号通路,进而调节 BV2 小胶质细胞介导的神经炎症反应。

综上所述,补阳还五汤能够通过调控 JAK2/STAT3 信号通路,抑制脂多糖后诱导的 BV2 小胶质细胞活化,并促进 BV2 小胶质细胞向 M2 型极化。本研究明确了补阳还五汤对脊髓损伤后产生的神经炎症的抑制作用与作用机制,为补阳还五汤治疗脊髓损伤提供了科学依据。然而,本研究目前仅进行了体外实验,尚未在体内模型中验证上述结论,后续研究拟通过体内实验对此进行更深入的探讨,并探索脊髓损伤后的神经炎症网络调控机制。

本研究的局限性如下:1)体外实验仅采用脂多糖单一诱导,未能模拟体内复杂的损伤微环境;2)含药血清的具体有效成分不明;3)未深入探究 JAK2/STAT3 通路下游靶点与小胶质细胞极化的关系;4)缺乏体内实验验证。未来计划如下:1)构建脊髓损伤大鼠模型,在体内验证药物对神经功能恢复、小胶质细胞极化及 JAK2/STAT3 通路的影响;2)采用 LC-MS 等技术鉴定含药血清有效成分,并预测其与靶点的结合;3)进一步探索该通路下游的靶基因,以明确其调控极化的分子网络。

参考文献

- [1] CHO N. Targeting the brain after spinal cord injury: targeted deep brain stimulation improves walking after injury[J]. *Science*, 2025, 389(6759): 468-469.
- [2] HAO J, YANG Y B, XIE L, et al. Actl6a regulates autophagy via Sox2-dependent Atg5 and Atg7 expression to inhibit apoptosis in spinal cord injury[J]. *Journal of Advanced Research*, 2025, 77: 281-296.
- [3] FEHLBERG C, JOHN D, KANG B, et al. Molecular pathology of acute spinal cord injury in middle-aged mice[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2025, 22(1): 181.
- [4] HE W B, ZHANG L, ZHENG D T, et al. Nanodrug-loaded microneedles promote scar-reduced repair after spinal cord injury by re-establishing microglial homeostasis[J]. *Acta Biomaterialia*, 2025, 198: 440-451.
- [5] TEFFERI A, LASHO T L, GILLILAND G. JAK2 mutations in myeloproliferative disorders[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2005, 353(13): 1416-1417.
- [6] ZHAO C X, ZHOU T G, LI M, et al. Argatroban promotes recovery of spinal cord injury by inhibiting the PAR1/JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Neural Regeneration Research*, 2024, 19(2): 434-439.
- [7] 刘如歌, 刘韩彬, 王家慧, 等. 补阳还五汤治疗神经系统疾病的研究进展[J]. *卒中与神经疾病*, 2025, 32(3): 327-332.
- [8] 范婷婷, 万彩云, 卢青青, 等. 补阳还五汤改善脊髓损伤的抗氧化功能及作用机制[J]. *世界中医药*, 2021, 16(12): 1818-1823.
- [9] 魏伟, 吴希美, 李元建. *药理实验方法学*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [10] 李兆勇, 李玲慧, 杨雷, 等. 补肾活血方调节 ADSCs-Exos 对椎间盘退变髓核细胞凋亡及 ERK 信号通路的影响[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(21): 5704-5712.
- [11] 徐鑫梓, 王睿, 杜雅明, 等. 敲减 NLRP3 抑制 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞的炎症反应[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2024, 53(1): 1-5.
- [12] DISABATO D J, MARION C M, MIFFLIN K A, et al. System failure: systemic inflammation following spinal cord injury[J]. *European Journal of Immunology*, 2024, 54(1): 2250274.
- [13] BAROUDI M, REZK A, DAHER M, et al. Management of traumatic spinal cord injury: a current concepts review of contemporary and future treatment[J]. *Injury*, 2024, 55(6): 111472.
- [14] WU Z W, FENG K M, HUANG J Q, et al. Brain region changes following a spinal cord injury[J]. *Neurochemistry International*, 2024, 174: 105696.
- [15] SHEN J, GAO F, ZHAO L, et al. MicroRNA-34c promotes neuronal recovery in rats with spinal cord injury through the C-X-C motif ligand 14/Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription-3 axis[J]. *Chinese Medical Journal*, 2020, 133(18): 2177-2185.
- [16] JI R, HAO Z Z, WANG H, et al. Fisetin promotes functional recovery after spinal cord injury by inhibiting microglia/macrophage M1 polarization and JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(32): 17964-17976.
- [17] YIN S Y, XIA F Y, ZOU W J, et al. Ginsenoside Rg1 regulates astrocytes to promote angiogenesis in spinal cord injury via the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2024, 334: 118531.
- [18] 郭德华, 刘小舟, 吴成林, 等. 补阳还五汤对脊髓外伤性截瘫的治疗作用及 JAK2/JAK3 通路的影响[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(12): 2905-2908.
- [19] 姜菲菲, 杨帆, 陈志强. 补阳还五汤调控 JAK2/STAT3 信号通路改善肾小管上皮细胞线粒体稳态的机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2025, 41(10): 2-10.
- [20] 郭德华, 吴成林, 许洋, 等. 补阳还五汤治疗脊髓外伤性截瘫的作用机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(8): 1487-1492.

(收稿日期: 2025-11-15)