

索凡替尼通过抑制巨噬细胞M2型极化减轻小鼠放射性肺纤维化

商庆超^{1,2}, 冯胜强³, 张沛², 杜乐辉², 雷霄², 马娜², 张倩², 郭兴东², 曲宝林²

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心放射治疗科, 北京 100853; ³解放军联合参谋部警卫局, 北京 100000

摘要: **背景** 放射性肺损伤是胸部肿瘤最重要的剂量限制毒性, 放射性肺纤维化作为晚期的不良反应, 目前无有效治疗方法。**目的** 探讨索凡替尼对小鼠放射性肺纤维化的治疗作用及相关分子机制。**方法** 10只6~8周龄雄性C57BL/6小鼠随机分为对照组和给药组, 每组各5只, 给药组予以索凡替尼(给药剂量20 mg/kg, 给药浓度4 mg/mL)灌胃4周, 对照组予以同等体积0.9%氯化钠注射液灌胃处理。通过组织HE染色和血清生化检测肌酐、尿素氮、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、乳酸脱氢酶、肌酸激酶同工酶评估索凡替尼的毒性。30只6~8周龄雄性C57BL/6小鼠随机分为空白对照组、单纯照射组和索凡替尼+照射组, 每组各10只, 采用⁶⁰Co γ 射线对单纯照射组小鼠和索凡替尼+照射组小鼠进行单次20 Gy全胸照射构建小鼠放射性肺纤维化模型, 索凡替尼+照射组小鼠从照射后第8周开始予以索凡替尼灌胃处理(20 mg/kg, 连续4周, 给药浓度4 mg/mL)。照射后12周, 通过肺系数、HE染色、Masson染色、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)染色和I型胶原蛋白(Collagen I)染色评估3组小鼠肺组织纤维化程度。分别提取3组小鼠的肺组织总蛋白, Western blot检测精氨酸酶1(arginase-1, Arg-1)和几丁质酶3样蛋白3(chitinase 3-like protein 3, YM-1)的表达水平。体外培养小鼠巨噬细胞系RAW264.7细胞和小鼠骨髓来源的巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDMs), CCK-8法检测不同浓度索凡替尼给药后的巨噬细胞活力。使用IL-4(20 ng/mL)和IL-10(20 ng/mL)诱导巨噬细胞发生M2型极化, Western blot检测RAW264.7和BMDMs中YM-1、Arg-1的表达水平。**结果** HE染色结果显示, 与对照组比较, 索凡替尼给药组小鼠心脏、肝、脾、肺和肾没有观察到明显的组织学损伤改变。血清生化结果表明, 给药组和对照组小鼠的心、肾、肝功能等指标均在正常范围内。肺组织HE染色、Masson染色和免疫组织化学染色显示, 照射后12周单纯照射组小鼠肺组织中观察到显著的胶原纤维沉积, 肺系数、 α -SMA和Collagen I表达升高($P < 0.001$), 索凡替尼+照射组小鼠上述指标改善($P < 0.001$)。CCK-8结果显示2种巨噬细胞活力在4 μ mol/L出现细胞活力下降。Western blot结果显示, 索凡替尼能够下调照射后肺组织和体外培养巨噬细胞中YM-1和Arg-1的表达水平($P < 0.05$)。**结论** 索凡替尼通过抑制巨噬细胞向M2型极化, 对小鼠放射性肺纤维化有一定治疗作用。

关键词: 放射性肺纤维化; 索凡替尼; 巨噬细胞; 集落刺激因子1; 集落刺激因子1受体

中图分类号: R818.74

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2025)03-0239-08

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25010103

引用本文: 商庆超, 冯胜强, 张沛, 等. 索凡替尼通过抑制巨噬细胞M2型极化减轻小鼠放射性肺纤维化 [J]. 解放军医学院学报, 2025, 46 (3): 239-246.

Surufatinib attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis in mice via suppression of macrophage M2 polarization

SHANG Qingchao^{1,2}, FENG Shengqiang³, ZHANG Pei², DU Lehui², LEI Xiao², MA Na², ZHANG Qian², GUO Xingdong², QU Baolin²

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Radiation Oncology, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³Security Guard Bureau, Joint Staff of PLA, Beijing 100000, China

Corresponding author: QU Baolin. Email: qubl6212@sina.com

Abstract: Background Radiation-induced lung injury represents the most critical dose-limiting toxicity in radiotherapy for thoracic malignancies. As a late-stage adverse effect, radiation-induced lung fibrosis currently lacks effective treatment options.

Objective To investigate the therapeutic effects of surufatinib on radiation-induced lung fibrosis and the underlying mechanisms.

Methods Ten 6-8-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into control group and treatment group, with 5 mice in each group. The treatment group received surufatinib (dosage: 20 mg/kg; concentration: 4 mg/mL) via oral gavage for 4 weeks, while the control group was administered an equivalent volume of saline using the same method. The toxicity of surufatinib was evaluated through H&E staining of tissues and serum biochemical analyses, including creatinine (CRE), blood urea nitrogen (BUN), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), and creatine kinase-MB (CK-MB). Thirty 6-8 week-old male specific pathogen free-grade C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group,

收稿日期: 2025-01-01

第一作者: 商庆超, 硕士, 医师. Email: 624832019@qq.com

通信作者: 曲宝林, 博士, 主任医师. Email: qubl6212@sina.com

irradiation group, and irradiation + surufatinib group. A mouse model of radiation-induced lung fibrosis was established with thoracic γ radiation at a single dose of 20 Gy. Irradiation + surufatinib group mice received surufatinib via oral gavage (20 mg/kg/day for 4 consecutive weeks; concentration: 4 mg/mL) starting at week 8 post-irradiation. At 12 weeks after irradiation, the degree of lung fibrosis was evaluated using lung coefficient, H&E staining and Masson staining, and the expression levels of α -SMA and collagen I were detected using immunohistochemical staining. Total proteins were extracted from lung tissues, and the expression levels of Arg-1 and YM-1 were detected by Western blot. In *in vitro* experiments, RAW264.7 cells and BMDMs were treated with surufatinib after the administration of IL-4 and IL-10. The expression levels of Arg-1 and YM-1 were determined by Western blot. **Results** In *in vivo* experiments, no signs of toxicity were observed in mice treated with surufatinib according to histological analysis and biochemistry test. Histopathological analysis (H&E staining, Masson staining, and immunohistochemical staining) demonstrated that at 12 weeks post-irradiation, the irradiation group exhibited substantial collagen fiber deposition in lung tissues, accompanied by elevated lung index, α -SMA, and Collagen I expression. These pathological alterations were significantly ameliorated in the irradiation + surufatinib group ($P < 0.001$). The expression levels of Arg-1 and YM-1 were down-regulated in the irradiation + surufatinib group ($P < 0.05$). The CCK-8 assay results indicated that both types of macrophages exhibited a decrease in cell viability at a concentration of 4 μ M. Experiments *in vitro* further confirmed that surufatinib inhibited the M2 polarization of macrophages induced by IL-4 and IL-10. **Conclusion** Surufatinib has a therapeutic effect on radiation-induced lung fibrosis in mice by inhibiting the polarization of macrophages to the M2 phenotype.

Keywords: radiation-induced lung fibrosis; surufatinib; macrophage; colony stimulating factor-1; colony stimulating factor receptor-1

Cited as: Shang QCH, Feng SHQ, Zhang P, et al. Surufatinib attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis in mice via suppression of macrophage M2 polarization[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2025, 46(3): 239-246.

放射性肺损伤(radiation-induced lung injury, RILI)是胸部放疗最严重的并发症之一,包括早期放射性肺炎和晚期放射性肺纤维化(radiation-induced lung fibrosis, RILF)^[1]。RILF是RILI的终末期改变,严重影响患者的预后和生活质量。目前,RILF的分子机制未完全阐明,临床中仍缺乏特效的治疗药物^[2-3]。研究表明,M2型巨噬细胞在肺纤维化中发挥着重要的作用^[4]。M2型巨噬细胞通过分泌促纤维化细胞因子促进成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,产生大量细胞外基质,进而导致病理性纤维化^[5-7]。研究发现集落刺激因子1(colony stimulating factor-1, CSF-1)及其受体(colony stimulating factor receptor-1, CSF-1R)是调控巨噬细胞功能的重要信号通路,能够诱导巨噬细胞向M2型极化^[8-9]。抑制CSF-1/CSF-1R信号通路能够通过抑制M2型巨噬细胞极化减轻RILF^[10]。索凡替尼(surufatinib, SU)是一种新型多靶点酪氨酸酶抑制剂,其靶点包括CSF-1R^[11]。目前,索凡替尼已获批用于无法手术切除的局部晚期或转移性、进展期非功能性、分化良好的非胰腺来源的神经内分泌瘤,但索凡替尼对RILF的治疗作用尚未见相关研究报道。本研究拟探讨索凡替尼对小鼠RILF的治疗作用,并初步阐明其相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验动物:6~8周龄雄性C57BL/6小鼠[北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:

SCXK(京)2021-0006],饲养于军事科学院军事医学研究院无特定病原体级动物繁育室,每笼饲养5只小鼠,所有动物实验均经军事科学院军事医学研究院实验动物管理与使用委员会批准(批号:IACUC-DWZX-2023-555)。

1.2 实验仪器材料

实验仪器:全自动发光仪(Tanon4600SF,上海天能生命科学有限公司);实验试剂:索凡替尼[和记黄埔医药(上海)有限公司],苯甲基磺酰氟(phenyl methane sulfonyl fluoride, PMSF; Selleck公司,美国),YM-1单克隆抗体(Abcam公司,英国),Arg-1重组抗体(Proteintech公司,美国), β -tubulin多克隆抗体(Proteintech公司),化学发光液(默克密理博公司),巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)(Poptech公司,美国),胎牛血清(PAN公司,德国),DMEM(Gbico公司,美国),二甲基亚砷(北京索莱宝公司),IL-4(Poptech公司,美国),IL-10(北京义翘神州科技股份有限公司),CCK-8试剂(日本同仁化学研究所)。

1.3 药物体内毒性试验

10只雄性C57BL/6小鼠随机分为两组,即对照组(normal control group, NC组)和给药组(surufatinib treatment group, SU组),每组5只。给药组小鼠予以SU灌胃给药4周(给药剂量20 mg/kg,给药浓度4 mg/mL,1次/d),对照组小鼠予以等体积0.9%氯化钠注射液灌胃处理。4周后处死取小鼠心、肝、脾、肺和肾组织进行HE病理组织学分

析;收集小鼠外周血进行肌酐(creatinine, CRE)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(glutamic oxaloacetic transaminase, AST)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme, CK-MB)生化检测。

1.4 RILF小鼠模型的建立与干预

RILF小鼠模型的建立与干预:30只雄性C57BL/6N小鼠随机分为3组,即空白对照组(normal control group, NC组)、单纯照射组(irradiation group, IR组)以及索凡替尼+照射组(irradiation + surufatinib group, IR+SU组),每组10只。IR组和IR+SU组采用戊巴比妥钠(50 mg/kg,腹腔注射)麻醉,通过挡铅予以小鼠 γ 射线(军事科学院军事医学研究院辐射医学研究所 ^{60}Co 放射源,剂量率为184.63 cGy/min)单次20 Gy全胸照射^[12-15]。IR+SU组小鼠从照射后第8周开始予以SU灌胃治疗(20 mg/kg,1次/d,给药浓度4 mg/mL),此后每天同一时间灌胃1次,直至第12周处死。同时IR组小鼠予以等体积0.9%氯化钠注射液灌胃处理。

1.5 肺组织病理染色

照射后12周取材肺组织,称重并计算肺系数,肺系数=肺重(mg)/体重(g)。将收集的肺组织室温固定在4%多聚甲醛中,包埋在石蜡中,使用组织切片机切成4 μm 厚的切片。根据对应产品说明书操作进行HE染色、Masson染色和免疫组织化学染色(武汉赛维尔生物科技有限公司)。HE染色、Masson染色每个肺组织取材5个部分,每个部分随机选择5个区域。HE染色使用Ashcroft标准评分进行半定量分析^[16],Masson染色和免疫组织化学染色通过Image J进行阳性面积定量分析。

1.6 Western blot检测M2型巨噬细胞标志蛋白YM-1、Arg-1

取肺组织或细胞沉淀加入适量RIPA裂解液,按1:100比例加入苯甲基磺酰氟并超声匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g离心15 min后弃沉淀。将上清用BCA比色法测定浓度,加入5 \times 上样缓冲液,沸水浴10 min;每个样品在10% SDS-PAGE上样20 μL ,分离后转移到聚偏二氟乙烯膜上,用5%脱脂牛奶封闭2 h;再于几丁质酶3样蛋白3(chitinase 3-like protein 3, YM-1)单克隆抗体(1:30 000),精氨酸酶1(arginase-1, Arg-1)重组抗体(1:3 000), β -tubulin多克隆抗体(1:5 000)中4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST洗

3次,10 min/次;使用HRP标记的山羊抗兔或山羊抗鼠IgG(H+L)二抗(1:5 000)孵育1 h, TBST洗3次,10 min/次;使用化学发光液覆盖在膜上静置2 min,在全自动发光仪中拍照保存;实验重复3次,使用Image J软件对结果进行半定量分析。

1.7 细胞培养及药物处理

RAW264.7细胞购自中国科学院上海细胞库,培养于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱,传3~5代后的细胞将用于实验。冲洗6~8周龄雄性C57BL/6小鼠股骨获得骨髓细胞,再添加M-CSF(25 ng/mL)、10%胎牛血清和加入抗生素的DMEM培养基中诱导分化7 d,获得成熟的骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDMs)。SU用二甲基亚砜溶解,以2 $\mu\text{mol/L}$ 为最终浓度使用。两种巨噬细胞以 1.0×10^6 /孔接种于六孔板中,分为对照组、IL-4 + IL-10组、索凡替尼干预组,共3组。(1)索凡替尼干预组:索凡替尼干预2 h后,加入IL-4(20 ng/mL) + IL-10(20 ng/mL),诱导24 h;(2)IL-4 + IL-10组:未用索凡替尼干预,其余处理同索凡替尼干预组;(3)对照组:未进行索凡替尼干预及IL-4 + IL-10诱导。

1.8 细胞活力测定

CCK-8实验检测细胞活力,将RAW264.7和BMDMs细胞分别接种到96孔板中,每孔细胞数量为 5×10^3 ,予以2 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$ 、8 $\mu\text{mol/L}$ 、16 $\mu\text{mol/L}$ 、32 $\mu\text{mol/L}$ 、64 $\mu\text{mol/L}$ 、128 $\mu\text{mol/L}$ SU处理24 h后弃上清,每孔加入100 μL 按培养基与CCK-8试剂9:1比例配成的混合液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h后,用酶标仪在450 nm波长测定各孔吸光度值。

1.9 统计学方法

采用GraphPad Prism9.0软件进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, t 检验用于两独立样本之间的比较。One-way ANOVA分析用于方差齐性的多组样本间的比较,Tukey法用于多组中的两两比较;若方差不齐,则用校正的 F 检验进行3组及3组以上数据分析,Games-Howell检验用于多组之间的两两比较; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 索凡替尼未对小鼠重要脏器造成损伤

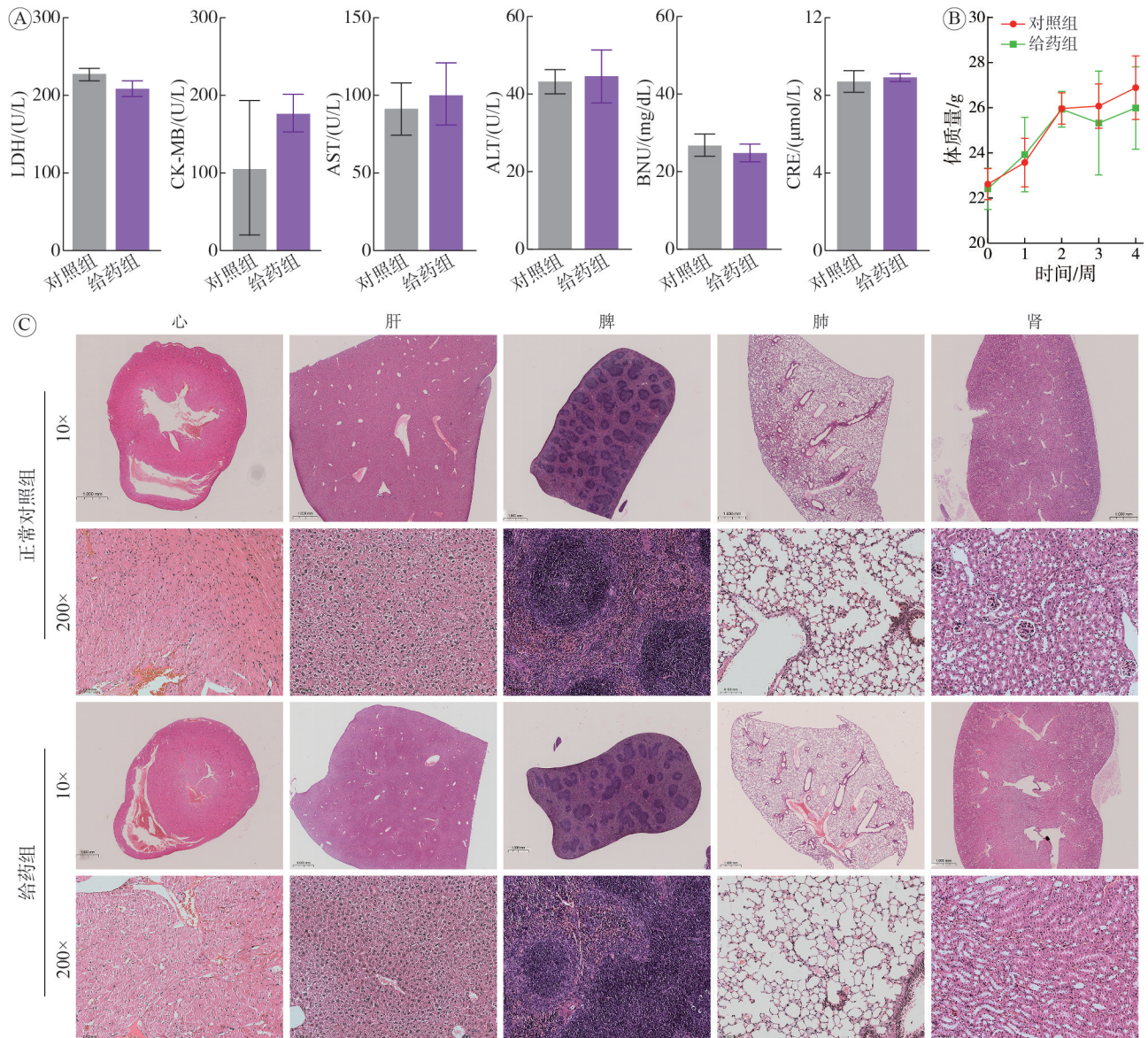
小鼠予以SU连续灌胃4周处理后收集外周血清进行生化检测、取材关键脏器进行病理学分析。生化检测结果显示,SU组与NC组小鼠血清中CRE($t=0.632$, $P=0.544$)、BUN($t=1.862$, $P=0.099$)、

ALT($t=0.395$, $P=0.702$)、AST($t=1.377$, $P=0.205$)、LDH($t=1.370$, $P=0.208$)、CK-MB($t=1.757$, $P=0.116$)差异无统计学意义(图1A)。体质量记录结果显示,两组小鼠体质量随饲养时间增加,在第4周时SU组体质量虽有下降,但与NC组比较差异无统计学意义($t=0.867$, $P=0.411$;图1B)。HE染色结果显示, SU组和NC组小鼠心脏、肝、脾、肺和肾等器官组织结构正常,未见损伤(图1C)。上述结果表明, SU 20 mg/kg连续灌胃给药4周末对重要脏器造成损伤。

2.2 索凡替尼改善照射后小鼠一般状况

通过 γ 射线单次20 Gy全胸照射构建小鼠RILF

模型,照后8周予以SU灌胃处理,连续给药4周后取材肺组织进行进一步分析。大体观察可见,IR组和IR+SU组小鼠的照射区域皮肤出现颜色毛色由黑变白,IR组较IR+SU组颜色变白更严重(图2A)。体质量记录结果显示,照射后小鼠体质量下降, SU治疗后小鼠体质量有一定程度回升,IR+SU组小鼠回升较快,且在12周时体质量与IR组比较差异有统计学意义($F=18.76$, $P=0.027$;图2B)。照射后小鼠肺系数升高,提示肺部炎症及水肿,而在12周时IR+SU组小鼠肺系数低于IR组且差异有统计学意义,提示SU具有较好的治疗效果($F=15.05$, $P<0.001$;图2C)。上述结果提示SU



A: SU(20 mg/kg)给药4周后小鼠生化指标分析; B: SU(20 mg/kg)给药小鼠4周体质量变化; C: SU(20 mg/kg)给药4周后小鼠内脏器官的HE染色(10 \times , 标尺1 mm; 200 \times , 标尺0.1 mm)。

图1 SU给药对小鼠重要脏器的影响

Fig. 1 Effects of surufatinib administration on the vital organs of mice

能够改善照射后小鼠一般状况。

2.3 索凡替尼减轻小鼠放射性肺纤维化

进一步评估照射后小鼠肺组织的病理学改变,对照射后12周小鼠肺组织进行HE染色、Masson染色及免疫组织化学染色,并对其组织损伤程度进行评分。HE染色结果显示,NC组小鼠肺组织结构清晰,肺泡壁及毛细血管壁完整,未见损伤改变;IR组小鼠肺组织炎性细胞浸润增多,肺泡间隔增厚,肺泡腔缩小及结构破坏;IR+SU组相比IR组肺组织炎症浸润及损伤减轻(图3A)。Masson染色结果显示,NC组小鼠的肺组织结构正常,胶原纤维染色细而淡。IR组小鼠肺组织肺泡壁结构破坏,可见大片胶原纤维沉积,局部纤维化改变,而IR+SU组较IR组局部纤维化程度减轻(图3B)。进一步对肺纤维化情况进行评分,与IR组比较,IR+SU组的评分和面积降低且有统计学差异($F=331.8, P<0.001$; $F=109.1, P<0.001$;图3C、图3D)。免疫组织化学显示,与IR组比较,IR+SU组成纤维细胞活化标志 α -SMA和胶原产物Collagen I阳性面积比降低且有统计学差异($F=48.8, P<0.01$; $F=17.8, P<0.001$;图3E)。上述结果表明SU能够改善RILF严重程度。

2.4 索凡替尼下调肺组织中M2型巨噬细胞相关标记物的表达

为进一步探究SU减轻RILF的具体调控机制,我们检测肺组织中M2型巨噬细胞相关标志物蛋白表达。肺组织Western blot检测结果显示,与NC组相比,IR组小鼠肺组织内M2型巨噬细胞表型标记物Arg-1和YM-1的表达显著上调且有统计学差异($F=8.958, P=0.012$; $F=6.800, P=0.029$),而IR+SU组小鼠肺组织Arg-1和YM-1蛋白表达较IR组下调且有统计学差异($F=8.958, P=0.040$; $F=6.800, P=0.038$;图4)。上述结果提示,SU抑制

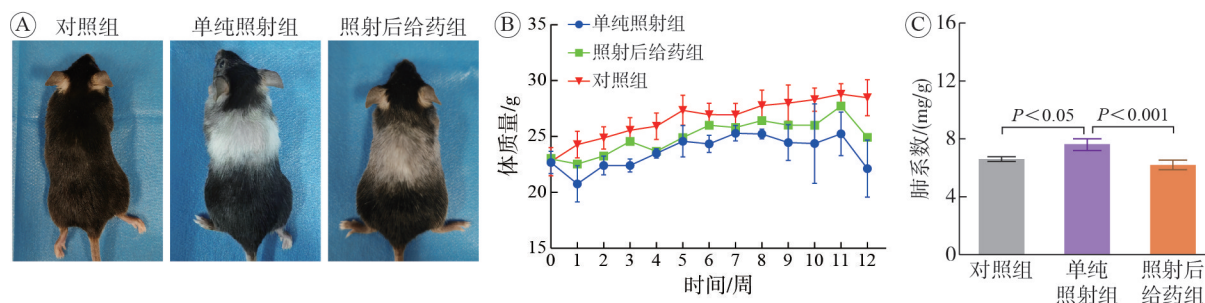
了照射后小鼠肺组织中M2型巨噬细胞的浸润。

2.5 索凡替尼下调巨噬细胞中M2型巨噬细胞相关标记物的表达

CCK-8法测定不同SU浓度对RAW264.7细胞和BMDMs细胞活力的影响,结果显示给药浓度为 $4 \mu\text{mol/L}$ 时细胞活力开始出现显著降低且有统计学差异($t=3.093, P=0.037$; $t=5.99, P=0.004$),因此后续实验选择 $2 \mu\text{mol/L}$ 作为体外给药浓度(图5A)。体外实验采用IL-4+IL-10诱导RAW264.7细胞和BMDMs向M2型极化。Western blot结果显示,RAW264.7细胞和BMDMs处理后细胞内Arg-1、YM-1蛋白表达上调,而SU处理能够下调RAW264.7细胞和BMDMs内Arg-1、YM-1的蛋白表达水平(图5B,图5C)。体外实验显示,SU能抑制巨噬细胞M2型极化。

3 讨论

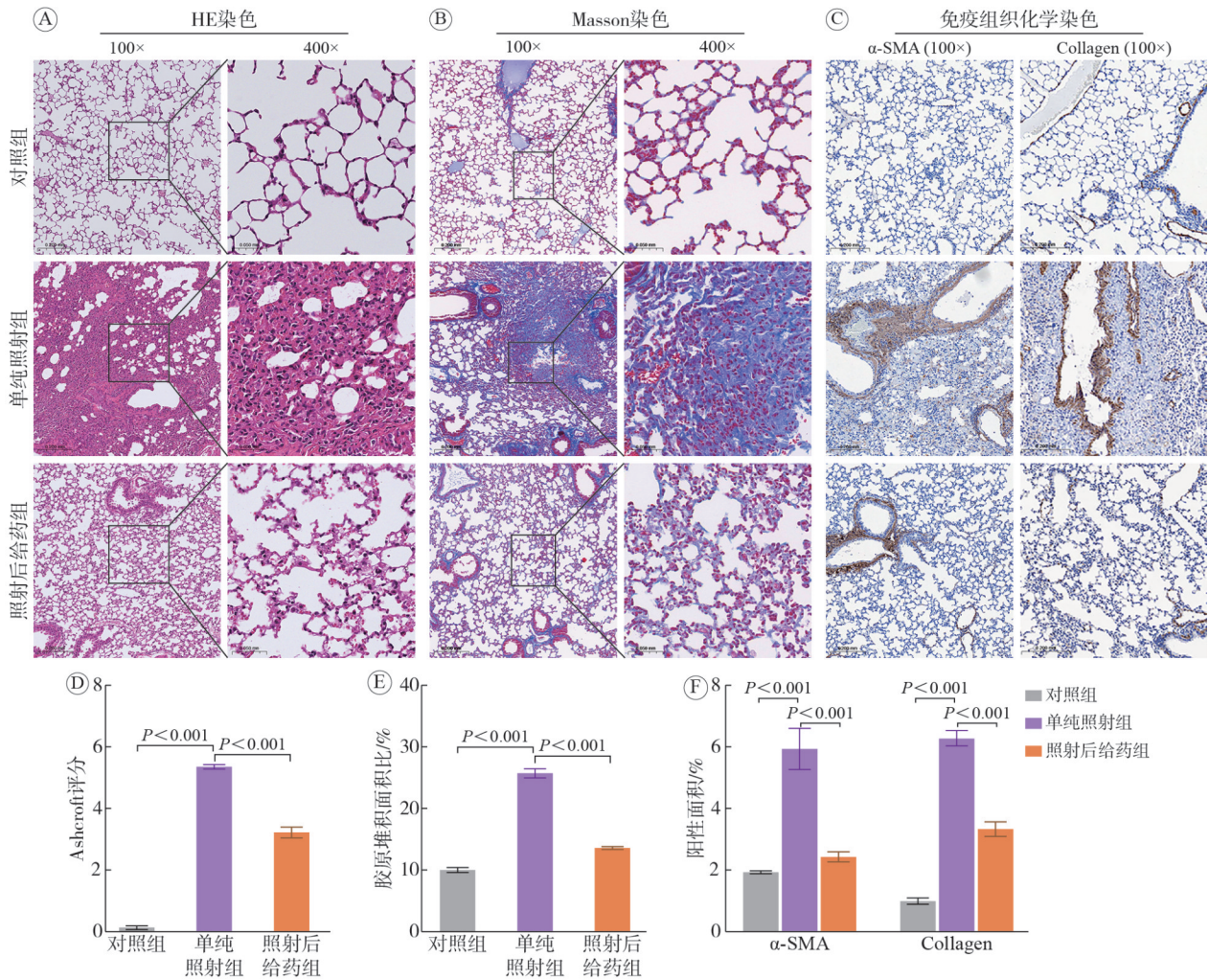
放射治疗在胸部肿瘤的综合治疗中具有非常重要的作用,约有50%的胸部肿瘤患者需进行放射治疗,而RILI是胸部放疗患者主要的不良反应,严重影响患者预后和生活质量。肺纤维化的发展过程是渐进和不可逆的,主要表现为胶原蛋白沉积和瘢痕形成,破坏肺泡结构,最终导致呼吸衰竭和死亡^[17],目前无有效的治疗方法,并且可用于管理疾病和缓解症状的治疗选择有限。在本研究中,我们成功构建了小鼠RILF模型,并评估了SU的治疗作用。结果表明,照射后12周小鼠肺组织出现了显著的纤维化改变;与单纯照射组相比,SU治疗能够显著降低小鼠肺系数及纤维化病理量化评分,证明了SU可以有效减轻照射引起的肺组织损伤。免疫组化和Masson染色结果进一步证实,与单纯照射组比较,SU治疗后肺组织Masson染色阳性面积比、 α -SMA和胶原产物Collagen I阳性面



A: 照射后12周后各组小鼠的照片(NC: 空白对照组; IR: 单纯照射组; IR+SU: 照射后给药组); B: 各组小鼠体质量比较; C: 各组小鼠肺系数比较。

图2 不同处理组小鼠皮肤、体质量和肺系数变化

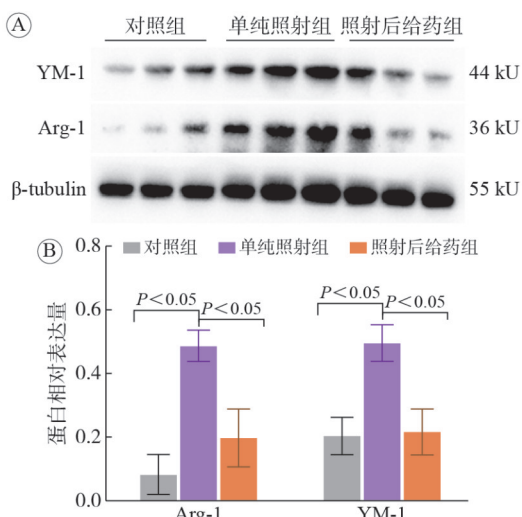
Fig. 2 Changes in skin, body weight, and lung coefficient of mice in different treatment groups



A: HE 染色(100×和400×); B: Masson 染色(100×和400×); C: 免疫组织化学染色检测 α -SMA 和 Collagen I(100×, 标尺 0.2 mm; 400×, 标尺 0.05 mm); D: 肺纤维化 Ashcroft 评分结果; E: Masson 染色量化分析结果; F: α -SMA 和 Collagen I 阳性面积。

图 3 不同处理组小鼠病理染色结果及评分

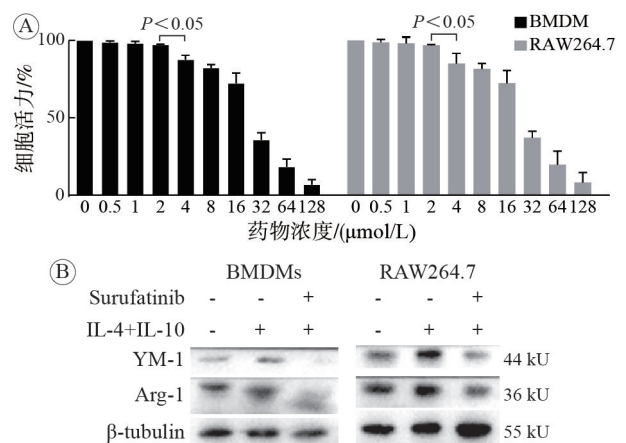
Fig. 3 Pathological staining results and scoring of mice in different treatment groups



A: Western blot 结果; B: ARG-1、YM-1 表达水平量化分析结果。

图 4 不同处理组小鼠肺组织 Arg-1 和 YM-1 的表达

Fig. 4 Protein expression levels of Arg-1 and YM-1 in the lung tissue of mice in different treatment groups



A: 不同浓度 SU 对 BMDMs 细胞和 RAW264.7 细胞活力的影响; B: 不同处理的 BMDMs、RAW264.7 细胞中 ARG-1 和 YM-1 的蛋白表达水平。

图 5 SU 下调巨噬细胞中 ARG-1 和 YM-1 的蛋白表达水平

Fig. 5 Surufatinib downregulates the protein expression levels of Arg-1 and YM-1 in macrophages

积比降低, 这表明SU能够减少细胞外基质沉积, 具有一定的抗纤维化作用。SU的安全性及有效性也在小鼠模型中得到进一步验证, 我们的结果表明SU可以作为治疗RILF的潜在药物。

RILF的特征主要是胶原纤维的过度沉积, 致使细胞外基质重塑, 进而导致肺组织结构改变和功能障碍。照射后肺组织间质内的成纤维细胞可分化为肌成纤维细胞, 肌成纤维细胞可分泌细胞外基质, 活化的肌成纤维细胞有助于肺纤维化的形成^[18]。成纤维细胞活化的标志就是 α -SMA表达升高和胶原产物Collagen I过度沉积^[19]。在本研究中, 照射后小鼠肺组织中 α -SMA表达含量和胶原产物Collagen I含量显著升高, 经过SU治疗后下降。这提示SU能抑制辐射引起的成纤维细胞活化, 降低 α -SMA和胶原产物Collagen I表达, 从而减少肺组织中胶原纤维沉积, 减轻肺纤维化的程度。

巨噬细胞在肺纤维化过程中扮演着重要角色^[20], 因此针对巨噬细胞的相关调控通路探索肺损伤防治新策略也是近年来的研究热点。巨噬细胞是介导先天免疫反应的主要细胞, 在组织发育、维持组织稳态和组织再生中起着重要作用^[21]。在RILI的发生发展过程中, 不同极化类型的巨噬细胞具有不同的生物学效应。经典激活的M1型巨噬细胞促进炎症反应, 在早期炎症损伤中占主导地位。而M2型巨噬细胞主要起修复作用, 在RILI晚期被激活, 分泌促纤维化细胞因子促进纤维化的发展。有研究表明肺纤维化患者肺泡灌洗液中的CSF-1升高, 并刺激巨噬细胞和成纤维细胞参与纤维化的形成^[22]。研究发现, CSF-1在肺纤维化患者中的表达升高, 对肺纤维化有促进作用。在博来霉素诱导的肺纤维化模型中, CSF1^{-/-}小鼠相较对照组小鼠纤维化程度减轻^[23]。Zhao等^[24]研究发现在博来霉素小鼠模型中, M2型巨噬细胞参与肺纤维形成, 并且使用CSF-1R抑制剂耗竭肺泡巨噬细胞能够抑制肺纤维化发展。Zhou等^[25]研究了IL-34通过CSF-1R调节人肺成纤维细胞促进炎症介质IL-6和IL-8的分泌, 使用CSF-1R单克隆抗体后可降低成纤维细胞的促炎作用, 进一步机制阐明通过MAPK、PI3K-Akt、JAK、NK- κ B进行调节。Joshi等^[26]研究了肺纤维化微环境中单核细胞衍生的肺泡巨噬细胞受到CSF-1/CSF-1R信号通路调节, 在石棉诱导的肺纤维化小鼠模型中, 使用CSF-1单克隆抗体或抑制剂PLX3397阻断CSF-1/CSF-1R信号通路以减少单核细胞分化的肺泡巨噬细胞, 进而

减轻肺纤维化。Zhang等^[27]研究表明, 在RILI中晚期, 多种促纤维化细胞因子如IL-4、IL-13促进巨噬细胞极化成M2型巨噬细胞, 导致细胞外基质过度分泌和沉积, 最终导致纤维化和间质改变。M2型巨噬细胞在RILI中晚期可以调节肌成纤维细胞活性, 通过TGF- β /Smad途径诱导转磷酸化和胶原蛋白形成, 促进RILF的进程。同时, 抑制CSF-1/CSF-1R能够减少M2型巨噬细胞的浸润, 而肺组织中具有促炎表型的巨噬细胞没有明显变化, 提示CSF-1/CSF-1R通路对M1型巨噬细胞没有明显调控作用^[10]。由此可见, 消耗巨噬细胞, 尤其是M2型巨噬细胞, 可减轻肺纤维化^[28-30]。研究发现治疗特发性肺纤维化的药物尼达尼布同样能够通过靶向CSF-1R发挥作用, 提示CSF-1/CSF-1R是治疗肺纤维化的潜在靶点^[31-32]。总之, CSF-1是调控巨噬细胞分化和增殖的重要因子, 而抑制CSF-1/CSF-1R通路通过影响巨噬细胞极化, 减轻肺纤维化, 是RILF的潜在治疗靶点。在本研究体内实验中, SU作为一种CSF-1/CSF-1R通路抑制剂, 下调了照射后小鼠肺组织中M2巨噬细胞相关标志物。在体外细胞实验中, 我们用IL-4 + IL-10成功诱导巨噬细胞的M2型极化, 通过分析M2型巨噬细胞相关标志物Arg-1、YM-1的表达水平, 明确了SU能够抑制M2型巨噬细胞极化。这些发现表明SU可以通过抑制巨噬细胞M2极化, 来缓解RILF的严重程度。

本研究将研究终点设定为照射后12周, 虽然在该阶段已经观察到肺组织内胶原纤维的沉积及肺纤维化的病理改变特点, 但如能在更晚期时间点评估SU的作用可能会更具有临床意义。本研究结果虽然提示SU通过抑制巨噬细胞M2极化进而发挥对放射性肺纤维具有治疗作用, 但SU调控巨噬细胞极化的具体下游分子机制仍未阐明, 有待进一步深入研究。研究表明, 巨噬细胞极化调控受到PI3K/Akt信号通路^[33]、Notch信号通路^[34]、JAK-STAT信号通路^[35]等多种信号通路调节。CSF-1/CSF-1R下游通过何种信号通路调控巨噬细胞向M2型极化, 仍有待进一步研究。

综上所述, 本研究结果表明, SU可以减轻辐射诱导肺纤维化程度, 延缓RILF的发展。其机制与抑制巨噬细胞M2极化、抑制成纤维细胞活化有关。本研究创新性地发现SU可治疗小鼠的RILF, 为临床治疗RILF提供了新的参考。

作者贡献 曲宝林、张沛、杜乐辉: 设计研

究方案, 论文修改与定稿; 商庆超: 研究实施, 论文撰写; 冯胜强: 论文修改; 雷霄: 技术指导, 论文修改; 马娜、张倩: 文献查找, 数据分析; 郭兴东: 协助研究实施。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取, Email: 624832019@qq.com。

参考文献

- Chang ST, Lv JC, Wang XZ, et al. Pathogenic mechanisms and latest therapeutic approaches for radiation-induced lung injury: a narrative review [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2024, 202: 104461.
- Yan YJ, Fu JM, Kowalchuk RO, et al. Exploration of radiation-induced lung injury, from mechanism to treatment: a narrative review [J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2022, 11 (2): 307-322.
- Wang P, Yan ZY, Zhou PK, et al. The promising therapeutic approaches for radiation-induced pulmonary fibrosis: targeting radiation-induced mesenchymal transition of alveolar type II epithelial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (23): 15014.
- Jiang YY, Cai R, Huang Y, et al. Macrophages in organ fibrosis: from pathogenesis to therapeutic targets [J]. *Cell Death Discov*, 2024, 10 (1): 487.
- Wang Z, Du KL, Jin NK, et al. Macrophage in liver fibrosis: identities and mechanisms [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 120: 110357.
- Cheng PY, Li SY, Chen HY. Macrophages in lung injury, repair, and fibrosis [J]. *Cells*, 2021, 10 (2): 436.
- Zhang L, Wang Y, Wu GR, et al. Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? [J]. *Respir Res*, 2018, 19 (1): 170.
- Lei FY, Cui NW, Zhou CX, et al. CSF1R inhibition by a small-molecule inhibitor is not microglia specific; affecting hematopoiesis and the function of macrophages [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117 (38): 23336-23338.
- Fu CL, Odegaard JI, Hsieh MH. Macrophages are required for host survival in experimental urogenital schistosomiasis [J]. *FASEB J*, 2015, 29 (1): 193-207.
- Meziani L, Mondini M, Petit B, et al. CSF1R inhibition prevents radiation pulmonary fibrosis by depletion of interstitial macrophages [J]. *Eur Respir J*, 2018, 51 (3): 1702120.
- Koumariou A, Kaltsas G. Surufatinib: a novel oral agent for neuroendocrine tumours [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 17 (1): 9-10.
- Liu DM, Kong FX, Yuan Y, et al. Decorin-modified umbilical cord mesenchymal stem cells (MSCs) attenuate radiation-induced lung injuries via regulating inflammation, fibrotic factors, and immune responses [J]. *Int J Radiat Oncol*, 2018, 101 (4): 945-956.
- Bickelhaupt S, Erbel C, Timke C, et al. Effects of CTGF blockade on attenuation and reversal of radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109 (8): djw339.
- Guo XD, Du LH, Ma N, et al. Monophosphoryl lipid A ameliorates radiation-induced lung injury by promoting the polarization of macrophages to the M1 phenotype [J]. *J Transl Med*, 2022, 20 (1): 597.
- Bronova I, Smith B, Aydogan B, et al. Protection from radiation-induced pulmonary fibrosis by peripheral targeting of cannabinoid receptor-1 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2015, 53 (4): 555-562.
- Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale [J]. *J Clin Pathol*, 1988, 41 (4): 467-470.
- Jarzebska N, Karetnikova ES, Markov AG, et al. Scarred lung: an update on radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 7: 585756.
- Jin HE, Yoo Y, Kim Y, et al. Radiation-induced lung fibrosis: preclinical animal models and therapeutic strategies [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12 (6): 1561.
- Yarnold J, Brotons MV. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis [J]. *Radiother Oncol*, 2010, 97 (1): 149-161.
- Deng LL, Ouyang BS, Shi HL, et al. Icariside II attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by modulating macrophage polarization [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116810.
- Chen SZ, Saeed AFUH, Liu Q, et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8 (1): 207.
- Baran CP, Opalek JM, McMaken S, et al. Important roles for macrophage colony-stimulating factor, CC chemokine ligand 2, and mononuclear phagocytes in the pathogenesis of pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176 (1): 78-89.
- Dakhlallah D, Wang YJ, Bobo TA, et al. Constitutive AKT activity predisposes lung fibrosis by regulating macrophage, myofibroblast and fibrocyte recruitment and changes in autophagy [J]. *Adv Biosci Biotechnol*, 2019, 10 (10): 346-373.
- Zhao JJ, Okamoto Y, Asano Y, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 facilitates pulmonary fibrosis through potentiating IL-13 pathway in macrophages [J]. *PLoS One*, 2018, 13 (5): e0197604.
- Zhou J, Sun XY, Zhang J, et al. IL-34 regulates IL-6 and IL-8 production in human lung fibroblasts via MAPK, PI3K-Akt, JAK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 61: 119-125.
- Joshi N, Watanabe S, Verma R, et al. A spatially restricted fibrotic niche in pulmonary fibrosis is sustained by M-CSF/M-CSFR signalling in monocyte-derived alveolar macrophages [J]. *Eur Respir J*, 2020, 55 (1): 1900646.
- Zhang H, Han G, Liu H, et al. The development of classically and alternatively activated macrophages has different effects on the varied stages of radiation-induced pulmonary injury in mice [J]. *J Radiat Res*, 2011, 52 (6): 717-726.
- Huang YJ, Zhang WQ, Yu FR, et al. The cellular and molecular mechanism of radiation-induced lung injury [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 3446-3450.
- Gibbons MA, MacKinnon AC, Ramachandran P, et al. Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184 (5): 569-581.
- Hou JW, Shi JY, Chen L, et al. M2 macrophages promote myofibroblast differentiation of LR-MSCs and are associated with pulmonary fibrogenesis [J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16 (1): 89.
- Wollin L, Wex E, Pautsch A, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Eur Respir J*, 2015, 45 (5): 1434-1445.