DOI:10.16016/j.2097-0927.202306114

巴瑞替尼调控巨噬细胞极化减轻硬皮病小鼠肺纤维化

王郸丹[1],徐璐璐[1],张 劼[1,2] 646000 四川 泸州,西南医科大学附属医院呼吸与危重症医学科[1];400014 重庆,重庆市人民医院老年病科[2]

[摘要] **目的** 明确巴瑞替尼能否通过抑制酪氨酸蛋白激酶2(Janus kinase, JAK2)/信号传导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription, STAT3)调控巨噬细胞极化,从而减轻硬皮病小鼠肺纤维化程度。**方法** 30只8周雌性C57BL/6小鼠按随机数字表法分为3组:对照组(Ctl组,$n=6$)、硬皮病组(SSc组,$n=12$)和硬皮病+巴瑞替尼组(SSc+Ba组,$n=12$)。SSc和SSc+Ba组小鼠背部皮下注射博来霉素(7.5 mg/kg),SSc+Ba组小鼠胃内灌注巴瑞替尼(5 mg/kg)。采用ELISA检测血浆中炎症因子白介素(interleukin, IL)-1β、IL-4、IL-6、IL-10浓度,HE、Masson染色评估皮肤真皮层厚度和肺组织病变及胶原含量,RT-PCR分析肺组织中炎症因子(IL-1β、IL-4、IL-6、IL-10)mRNA水平,Western blot分析肺组织中巨噬细胞标志物CD86、CD163及JAK2/STAT3的蛋白表达水平,流式细胞术检测F4/80、CD86和CD163以明确小鼠脾脏巨噬细胞极化情况,免疫荧光检测肺组织中CD86和CD163以明确肺组织中巨噬细胞极化情况。**结果** 与Ctl组相比,SSc组小鼠注射部位皮肤真皮层增厚($P<0.001$),改良肺纤维化评分升高($P<0.001$),皮肤和肺组织胶原增多($P<0.001$)。SSc+Ba组小鼠上述表现均有不同程度的减轻($P<0.01$)。与Ctl组相比,SSc组小鼠血浆中促炎因子IL-1β($P<0.05$)和IL-6($P<0.001$)浓度以及肺组织中上述两种因子的mRNA($P<0.05$)水平明显上调。巴瑞替尼降低上述因子浓度($P<0.01$)和肺组织中mRNA($P<0.01$)水平。SSc组小鼠肺中JAK2/STAT3表达升高($P<0.01$),巴瑞替尼降低上述蛋白的表达($P<0.05$)。Western blot和免疫荧光检测结果均表明:与Ctl组相比,SSc组肺中CD86蛋白(M1巨噬细胞标志物)表达升高($P<0.01$),CD163蛋白(M2巨噬细胞标志物)表达降低($P<0.05$)。SSc+Ba组肺中CD86蛋白表达降低($P<0.05$),CD163蛋白表达升高($P<0.05$)。流式细胞术检测结果表明,SSc组脾脏巨噬细胞中$F4/80^+CD86^+CD163^-$的M1型巨噬细胞比例升高($P<0.001$),$F4/80^+CD86^-CD163^+$的M2型巨噬细胞比例降低($P<0.01$)。SSc+Ba组中,M1细胞比例降低($P<0.01$),M2细胞比例升高($P<0.001$)。**结论** 巴瑞替尼通过靶向JAK2/STAT3信号通路抑制M1巨噬细胞极化,来减轻SSc小鼠肺纤维化程度。

[关键词] 硬皮病;间质性肺病;巴瑞替尼;JAK2/STAT3;巨噬细胞
[中图法分类号] R593.25; R967; R986 [文献标志码] A

Baricitinib attenuates pulmonary fibrosis in scleroderma mice by regulating macrophage polarization

WANG Dandan[1], XU Lulu[1], ZHANG Jie[1,2] [1]Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Affiliated Hospital, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan Province, 646000; [2]Department of Geriatrics, Chongqing General Hospital, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To determine whether baricitinib regulates macrophage polarization through Janus kinase 2 (JAK2)/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway to

[基金项目] 重庆自然科学基金(cstc2021jcyj-msxmX1129);重庆市科卫联合医学科研项目(2020GDRC012c);重庆市中青年医学高端人才工作室(2021-102);重庆市老年疾病临床研究中心项目(2020-126)

[通信作者] 张 劼,E-mail: zhangjie_cq@outlook.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

reduce the severity of pulmonary fibrosis in mice with scleroderma. **Methods** Thirty 8-week-old female C57BL/6 mice were randomly divided into control group (Ctl, $n=6$), scleroderma group (SSc, $n=12$) and scleroderma+baricitinib group (SSc+Ba, $n=12$). The mice of the SSc and SSc+Ba group were inflicted with a subcutaneous injection of 7.5 mg/kg bleomycin in the back, and an intragastric gavage of 5 mg/kg baricitinib. ELISA was used to detect the plasma levels of inflammatory factors, IL-1β, IL-4, IL-6 and IL-10. HE staining and Masson staining were employed to determine the thickness of skin dermis and pathological changes and collagen content in lung tissue. The mRNA expression of IL-1β, IL-4, IL-6 and IL-10 in lung tissue was measured by RT-PCR, and the protein levels of macrophage markers CD86, CD163 and JAK2/STAT3 in lung tissue were detected by Western blotting. Afterwards, flow cytometry was applied for the expression of F4/80, CD86 and CD163 to determine the polarization of macrophages. Immunofluorescence assay was used to detect CD86 and CD163 to clarify the polarization of macrophages in lung tissue. **Results** Compared with the Ctl group, the dermis at the injection site in the back was significantly thickened ($P<0.001$), the score of pulmonary fibrosis was obviously increased ($P<0.001$), and the collagen content in skin and lung tissue was notably elevated in the SSc group ($P<0.001$). The above changes were alleviated to varying degrees in the SSc+Ba group ($P<0.01$). The SSc group had significantly higher plasma levels of IL-1β ($P<0.05$) and IL-6 ($P<0.001$) as well as elevated their mRNA levels in lung tissue ($P<0.05$) than the Ctl group. Baritinib treatment decreased the plasma concentrations of the above factors ($P<0.01$) and their mRNA levels in lung tissue ($P<0.01$). JAK2/STAT3 was highly expressed in the SSc group ($P<0.01$), and baricitinib reduced the activation of JAK2/STAT3 pathway ($P<0.05$). Western blotting and immunofluorescence assay indicated that CD86 protein (marker of M1 macrophages) was highly expressed ($P<0.01$) and CD163 protein (marker of M2 macrophages) was in low expression ($P<0.05$) in lung tissue in the SSc group than the Ctl group. In the SSc+Ba group, CD86 protein was reduced ($P<0.05$) and CD163 protein was increased ($P<0.05$) in lung tissue. Flow cytometry showed that the proportion of $F4/80^+CD86^+CD163^-$ M1 macrophages in the spleen was increased ($P<0.001$), and the proportion of $F4/80^+CD86^-CD163^+$ M2 macrophages was decreased in the SSc group when compared with Ctl group ($P<0.01$). In the SSc+Ba group, the proportion of M1 was decreased ($P<0.01$), and that of M2 was increased ($P<0.001$). **Conclusion** Baricitinib inhibits M1 macrophage polarization through JAK2/STAT3 signaling pathway, thus reducing the fibrosis of lung tissue in SSc mice.

[**Key words**] scleroderma; interstitial lung disease; baricitinib; JAK2/STAT3; macrophages

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX1129), the Joint Medical Research Project of Chongqing Science and Technology Commission and Chongqing Health Commission (2020GDRC012c), the Young and Middle-Aged Medical High-end Talent Studio of Chongqing (2021-102) and the Project of Chongqing Geriatric Disease Clinical Research Center (2020-126). Corresponding author: ZHANG Jie, E-mail: zhangjie_cq@outlook.com

系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc),又称为硬皮病,是一种免疫介导的结缔组织病,以皮肤和内脏器官纤维化以及血管病变为特征[1]。SSc 发病率不高,但其死亡率高于其他风湿性疾病。肺部受累是 SSc 的早期并发症,也是 SSc 患者的主要死亡原因[2]。约80%的 SSc 患者有肺间质异常甚至肺纤维化,最终30%的 SSc 患者会发展为间质性肺病(interstitial lung disease, ILD)[3]。尼达尼布是唯一被批准用于治疗硬皮病相关性间质性肺病(systemic sclerosis-related interstitial lung disease, SSc-ILD)的药物[4],但效果有限,亟需寻找新的治疗手段。

巴瑞替尼是一种酪氨酸蛋白激酶(Janus kinase, JAK)1/2 抑制剂,主要抑制 JAK2,用于治疗对肿瘤坏死因子抑制剂治疗无效的成人中重度类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)[5]。由于巴瑞替尼在控制炎症方面有显著的作用,该药物成为减轻炎症性疾病中过度免疫反应的候选药物。多个临床试验和病例报告证明巴瑞替尼可以缓解 RA、系统性红斑狼疮、银屑病、特应性皮炎、斑秃以及干扰素介导的自身炎性疾病等多种疾病的临床症状[5-7]。尽管巴瑞替尼在多种结

缔组织疾病中显示出较好的疗效,但在 SSc 模型中巴瑞替尼调控巨噬细胞极化的研究还较少。本研究通过建立 SSc 小鼠模型,探讨巴瑞替尼是否通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路调控巨噬细胞的极化影响 SSc 小鼠肺纤维化程度。

1 材料与方法

1.1 实验材料

主要实验试剂:博来霉素购自日本化药株式会社公司,巴瑞替尼购自 AdooQ BIOSCIENCE 公司,白介素(interleukin, IL)-1β、IL-4、IL-6 和 IL-10 酶联免疫吸附法试剂盒购自江莱生物公司,TRIzol 试剂和逆转录试剂盒购自 TaKaRa 公司,PCR Master Mix 试剂购自翌圣生物科技公司,RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度试剂盒、免疫荧光抗原修复液、DAPI 和抗荧光淬灭封片液购自碧云天生物技术公司,蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂购自 TargetMol 公司,蛋白质免疫印迹预制胶购自艾思易生物科技公司。蛋白质免疫印迹抗体:β-actin 购自杭州华安生物技术公司,胶原蛋白 4(collagen 4, Col4)、JAK2、磷酸化 JAK2(phospho-JAK2, p-JAK2)、信号传导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription, STAT3)、磷酸化 STAT3(phospho-STAT3, p-STAT3)、CD86 和 CD163 抗体购自 Affinity Biosciences 公司,辣根过氧化酶标记的二抗购自 EarthOx 公司。流式抗体:FITC F4/80 和 PE CD86 抗体购自 Elabscience 公司,APC CD163 抗体购自 Invitrogengo 公司。

1.2 动物模型

8 周 30 只 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠(体质量 18~20 g)购于重庆医科大学动物实验中心。所有动物实验经成都达硕实验动物有限公司动物伦理委员会审查批准(Dossy20210119001)。小鼠随机分笼饲养,环境温度 22~26 ℃,自由摄食水和饲料。小鼠实验前剃去背部中央区被毛,适应性饲养 1 周后按随机数字表法分为 3 组:对照组(Ctl 组,$n=6$)、硬皮病组(SSc 组,$n=12$)和硬皮病+巴瑞替尼组(SSc+Ba 组,$n=12$)。博来霉素使用磷酸缓冲盐溶液配置成 3 mg/mL 储备液,-20 ℃保存,使用时稀释成 1.5 mg/mL。巴瑞替尼使用 0.5% CMC-Na 配置成 5 mg/mL 储备液,-20 ℃保存,使用时稀释成 1 mg/mL。从第 0 天开始,Ctl 组小鼠于背部皮下注射 0.1 mL 磷酸缓冲盐溶液,胃内灌注 0.1 mL 0.5% CMC-Na;SSc 组小鼠于背部皮下注射 1.5 mg/mL 博来霉素(7.5 mg/kg),胃内灌注 0.1 mL 0.5% CMC-Na;SSc+Ba 组小鼠于背部皮下注射 1.5 mg/mL 博来霉素(7.5 mg/kg),胃内灌注 1 mg/mL 巴瑞替尼(5 mg/kg);每 2 天干预 1 次并记录小鼠体质量,共干预 4 周。于第 29 天处死小鼠,收集血浆、脾脏、皮肤和肺组织。新鲜肺组织使用磷酸缓冲盐溶液冲洗表面血液,用滤纸吸干后称取其质量。

1.3 病理学检测

小鼠左肺和皮肤组织置于 4%多聚甲醛固定 24 h,常规进行脱水、透明、包埋和切片,分别进行 HE 和 Masson 染色。在显微镜下观察组织的病理变化,每张切片随机选取 3 个视野拍照。肺组织 HE 染色使用改良 Ashcroft 评分评估肺纤维化[8]。皮肤 HE 染色使用明美软件测量真皮层厚度。皮肤和肺组织 Masson 染色使用 Image J 软件测量胶原含量。剩余肺和皮肤组织于-80 ℃保存。

1.4 ELISA 检测

小鼠血浆 600×g 离心 15 min 后取上清液进行检测。按照酶联免疫吸附法试剂盒说明书检测血浆中炎症因子(IL-1β、IL-6、IL-4、IL-10)浓度。

1.5 RT-PCR 检测

取小鼠右肺组织加入 1 mL TRIzol 后使用研磨仪匀浆,组织匀浆液 4 ℃ 12 000×g 离心 10 min。取上清液,加入 0.2 mL 氯仿充分混匀,冰上静置 5 min,4 ℃ 14 000×g 离心 20 min。吸取上层无色水相液体 400 μL,加入 400 μL 异丙醇充分混匀,-80 ℃静置 30 min,4 ℃ 14 000×g 离心 20 min。弃去上清液,加入 1 mL 75%乙醇洗涤,4 ℃ 14 000×g 离心 20 min 后弃去液体。加入无 RNA 酶水溶解。使用超微量分光光度计测量 RNA 浓度。根据逆转录试剂说明书进行逆转录,将 RNA 逆转录为 cDNA。根据 PCR Master Mix 说明书配置 PCR 反应液,根据说明书于实时荧光定量 PCR 仪进行检测。

1.6 Western blot 检测

取小鼠右肺组织加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂后,使用研磨仪匀浆,组织裂解液 4 ℃ 14 000×g 离心 10 min,留取上清液。使用 BCA 蛋白浓度试剂盒检测组织蛋白浓度,加入蛋白上样缓冲液,100 ℃加热 10 min,-20 ℃保存。预制胶每孔加入 50 μg 蛋白样本行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电转模后封闭,一抗(Col4、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、CD86 和 CD163)4 ℃孵育过夜,洗膜 3 次,每次 10 min。二抗室温孵育 1 h,以 β-actin 作为内参,使用化学发光成像系统显像,化学分析软件系统分析对比条带强弱程度。

1.7 流式细胞术检测

将 200 目细胞筛用磷酸缓冲盐溶液润湿,剪碎脾脏,用注射器活塞研磨。脾脏单细胞悬液经 400 目细胞筛过滤后 4 ℃ 300×*g* 离心 5 min。弃去上清液,加入红细胞裂解液,吹打混匀,4 ℃静置 15 min 后,4 ℃ 300×*g* 离心 5 min,弃上清。无菌磷酸缓冲盐溶液重悬细胞,4 ℃ 300×*g* 离心 5 min,离心后弃上清。无菌磷酸缓冲盐溶液重悬细胞,4 ℃保存。50 μL 脾脏单细胞悬液加入 5 μL FITC F4/80、5 μL PE CD86 和 0.25 μg APC CD163 抗体,4 ℃避光孵育 30 min。染色结束后,加入 1.5 mL 无菌磷酸缓冲盐溶液重悬吹打细胞,离心后弃上清。磷酸缓冲盐溶液重悬细胞后,使用流式细胞仪进行检测。

1.8 免疫荧光检测

左肺组织切片常规脱蜡、抗原修复,封闭后一抗(CD86、CD163)4 ℃孵育过夜,洗涤 3 次,每次 10 min。二抗避光室温孵育 1 h,洗涤 3 次,每次 10 min。DAPI 避光室温孵育 5 min,洗涤 3 次,每次 10 min。滴加封片液,盖玻片封片。荧光显微镜下观察 CD86 和 CD163 表达并拍照,Image J 软件测量荧光强度。

1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2 统计软件分析数据,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析,2 组间比较采用独立样本 t 检验,检测水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 巴瑞替尼减轻博来霉素引起的皮肤和肺组织的纤维化

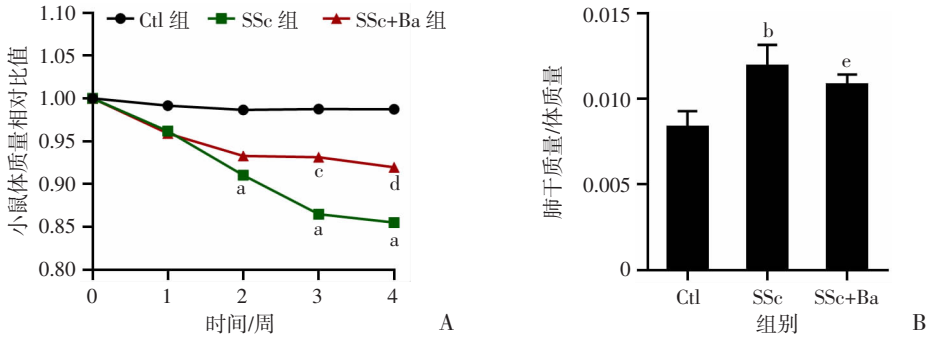
2.1.1 小鼠一般情况及肺比重 在实验 2 周内,与 Ctl 组相比,SSc 组和 SSc+Ba 组小鼠逐渐出现饮水、饮食及活动量减少,体质量明显降低($P<0.05$)。在实验 3、4 周,与 SSc 组相比,SSc+Ba 组小鼠体质量降低情况逐渐缓解。在第 4 周,SSc+Ba 组小鼠体质量明显高于 SSc 组($P<0.01$,图 1A)。肺比重是评估肺纤维化的重要指标,数值越高,表明肺纤维程度越严重。SSc 组小鼠肺比重明显高于 Ctl 组($P<0.001$),SSc+Ba 组肺比重明显低于 SSc 组($P<0.05$),见图 1B。

2.1.2 皮肤和肺组织病理 皮肤 HE 和 Masson 染色显示,SSc 组小鼠真皮层厚度及胶原含量较 Ctl 组明显增多($P<0.001$),SSc+Ba 组与 SSc 组相比,真皮层厚度及胶原明显减少($P<0.001$;图 2A、B,3A、B)。肺 HE 和 Masson 染色显示,SSc 组小鼠肺组织结构破坏、炎症细胞浸润较多、肺泡间隔明显增厚、胶原含量较多,巴瑞替尼的干预减轻了上述表现,2 组间肺纤维化评分及胶原含量差异均有统计学意义($P<0.01$;图 2C、D,3C、D)。

2.1.3 肺组织细胞外基质表达 Western blot 检测结果发现,与 Ctl 组相比,SSc 组小鼠肺组织中细胞外基质 Col4 累积明显增多($P<0.05$),SSc+Ba 组细胞外基质较 SSc 组明显减少($P<0.05$, 图 4A、B)。

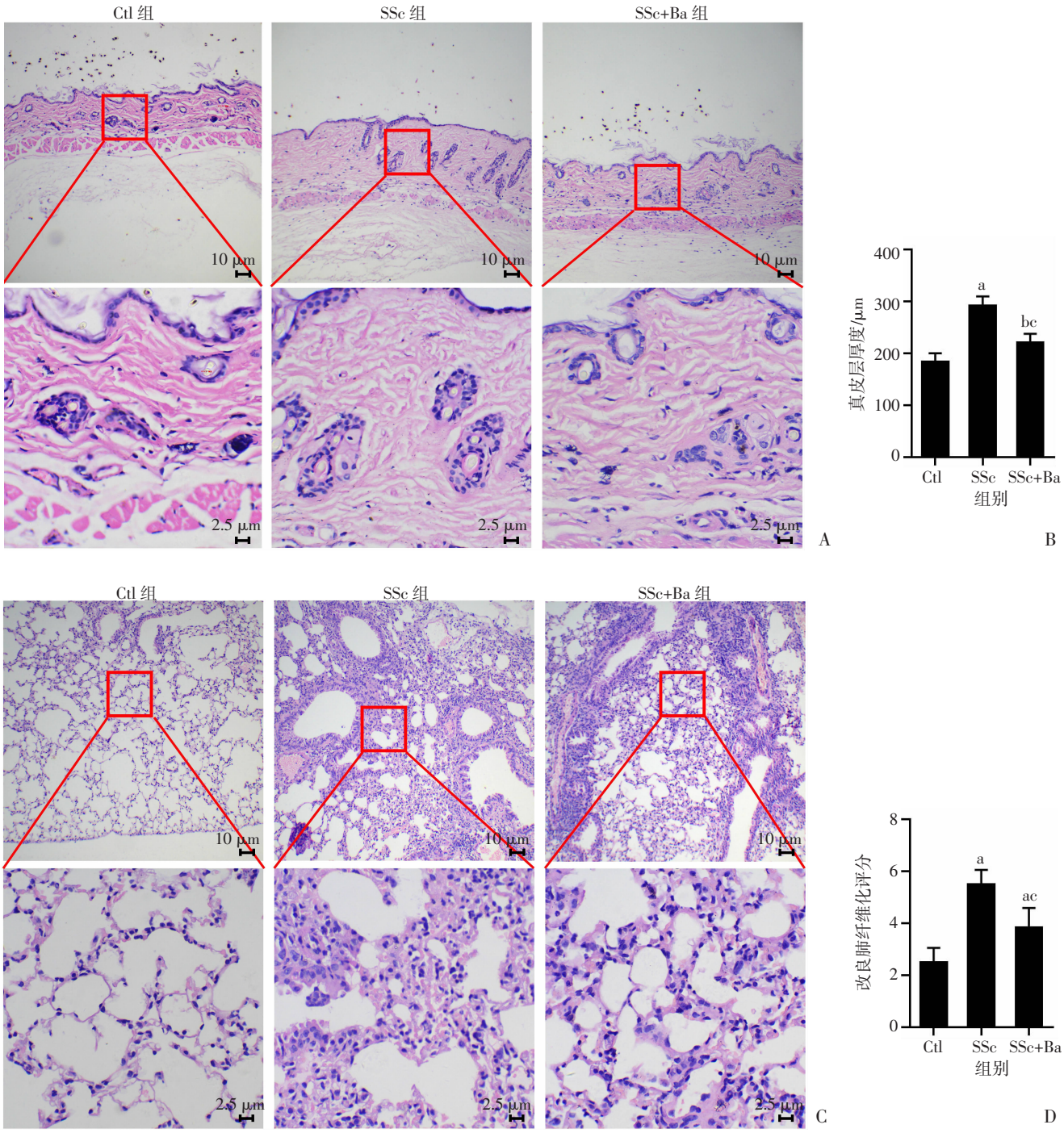
2.2 巴瑞替尼影响小鼠血浆和肺组织中炎症因子的水平

ELISA 检测结果显示,与 Ctl 组相比,SSc 组小鼠血浆中促炎因子 IL-1β 和 IL-6 浓度明显升高($P<0.05$,$P<0.001$),抗炎因子 IL-4 和 IL-10 浓度差异无统计学意义。与 SSc 组相比,SSc+Ba 组促炎因子 IL-1β 和 IL-6 浓度明显降低、抗炎因子 IL-4 和 IL-10 浓度明显升高($P<0.01$,图 5A~D)。肺组织中炎症因子的 mRNA 水平具有同样的变化趋势(图 5E~H)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.001$,与 Ctl 组比较;c:$P<0.01$,d:$P<0.001$,e:$P<0.05$,与 SSc 组比较

图 1 各组小鼠体质量(A)与肺比重(B)变化



a: $P<0.001$, b: $P<0.01$, 与 Ctl 组比较; c: $P<0.001$, 与 SSc 组比较

A:皮肤 HE 染色;B:真皮层厚度比较;C:肺组织 HE 染色;D:改良肺纤维化评分

图 2 各组小鼠皮肤和肺组织 HE 染色

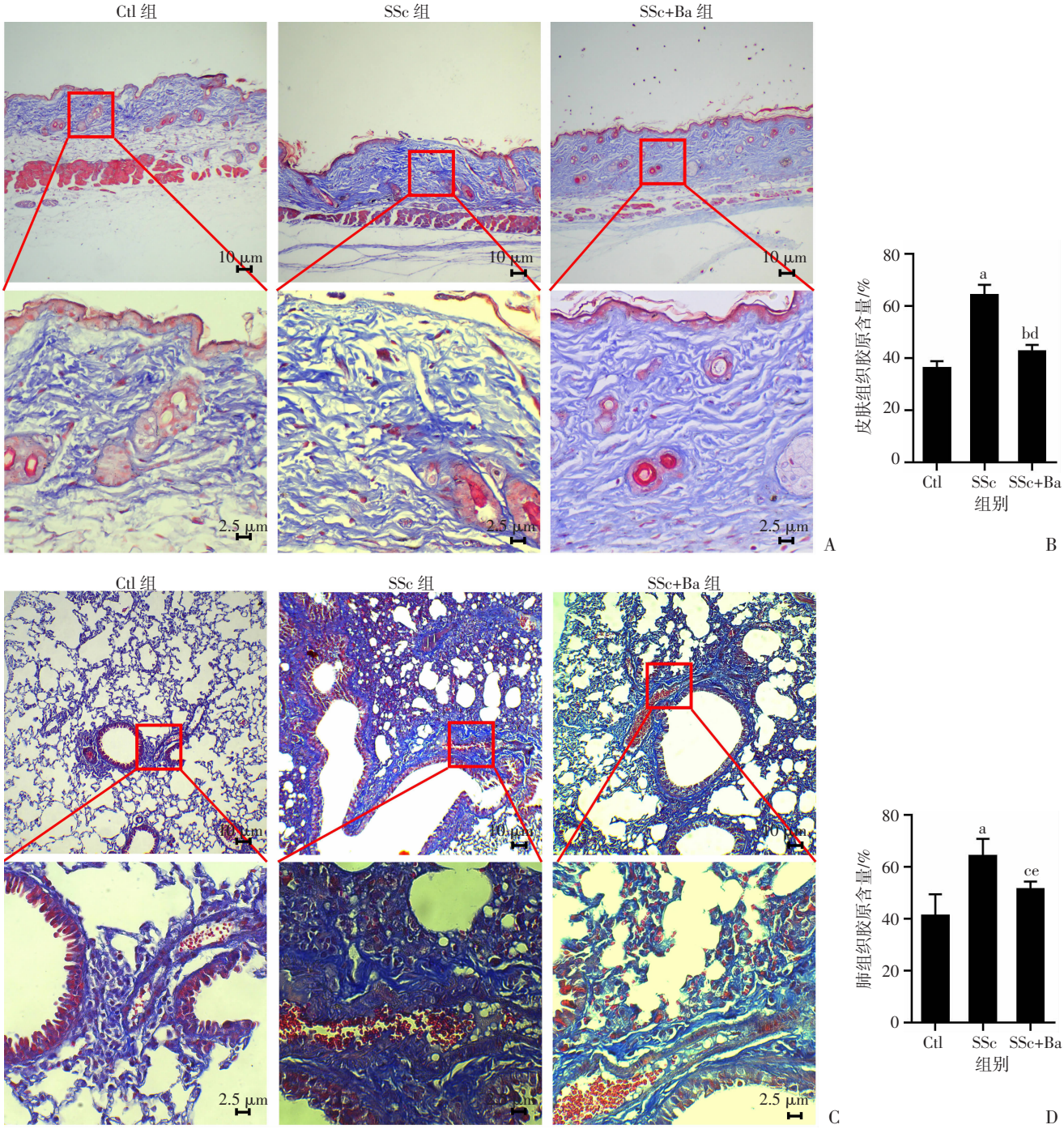
2.3 巴瑞替尼影响 SSc 小鼠肺组织中 JAK2/STAT3 信号通路表达

Western blot 检测结果显示,与 Ctl 组相比,SSc 组小鼠肺组织中 JAK2 和 STAT3 蛋白激活明显增多,与 SSc 组相比,SSc+Ba 组 2 种蛋白激活明显减少($P<0.001$,$P<0.05$,图 4A、C~E)。

2.4 巴瑞替尼影响 SSc 小鼠巨噬细胞极化

与 Ctl 组相比,SSc 组小鼠脾脏巨噬细胞中 $F4/80^+CD86^+CD163^-$ 的 M1 型巨噬细胞比例明显升高($P<0.001$),$F4/80^+CD86^-CD163^+$ 的 M2 型巨噬细胞比例明显降低($P<0.01$)。巴瑞替尼降低了小鼠脾脏中 M1 细胞比例,升高了 M2 细胞比例($P<0.001$,图 6)。

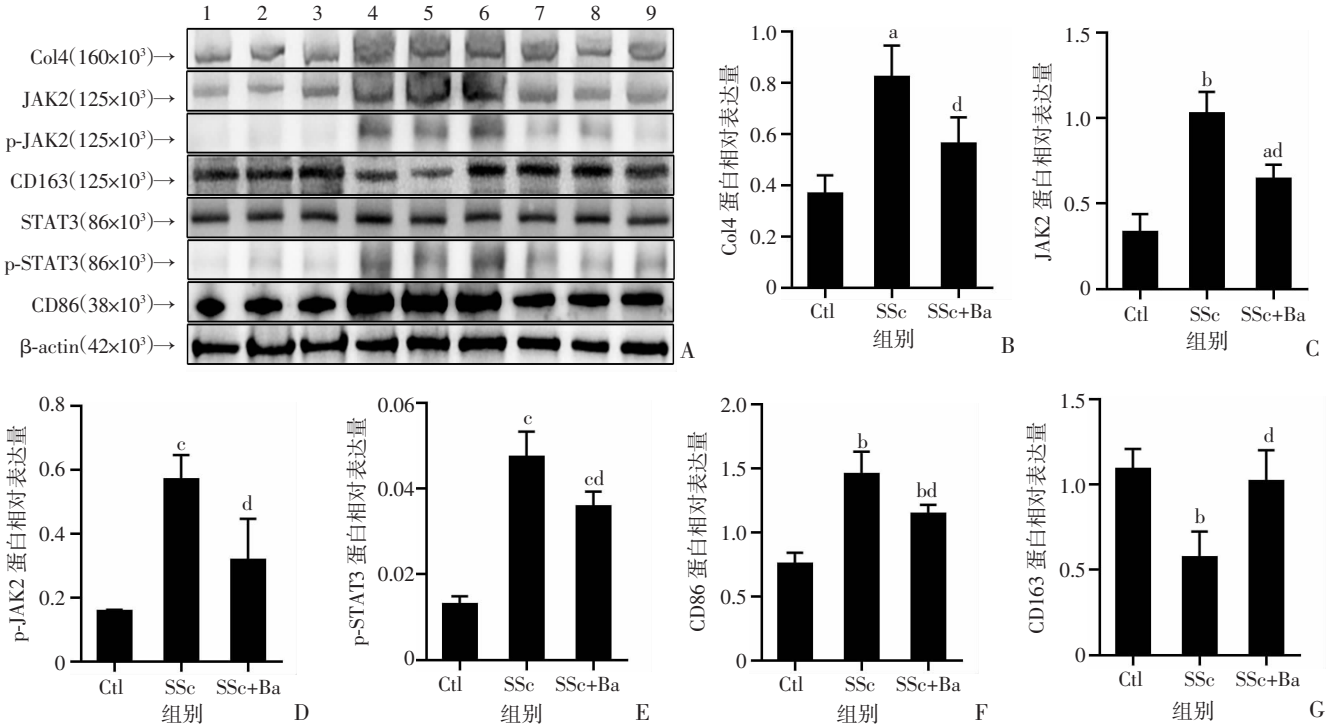
Westen blot 和免疫荧光检测结果显示,与 Ctl 组相比,SSc 组小鼠肺组织中 CD86 蛋白表达升高,CD163 蛋白表达降低,差异具有统计学意义($P<0.01$);SSc+Ba 组与 SSc 组相比,肺组织中 CD86 表达降低,CD163 表达升高,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 4A、F、G,图 7)。



a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 Ctl 组比较;d:$P<0.001$,e:$P<0.01$,与 SSc 组比较

A:皮肤 Masson 染色;B:皮肤组织胶原含量比较;C:肺组织 Masson 染色;D:肺组织胶原含量

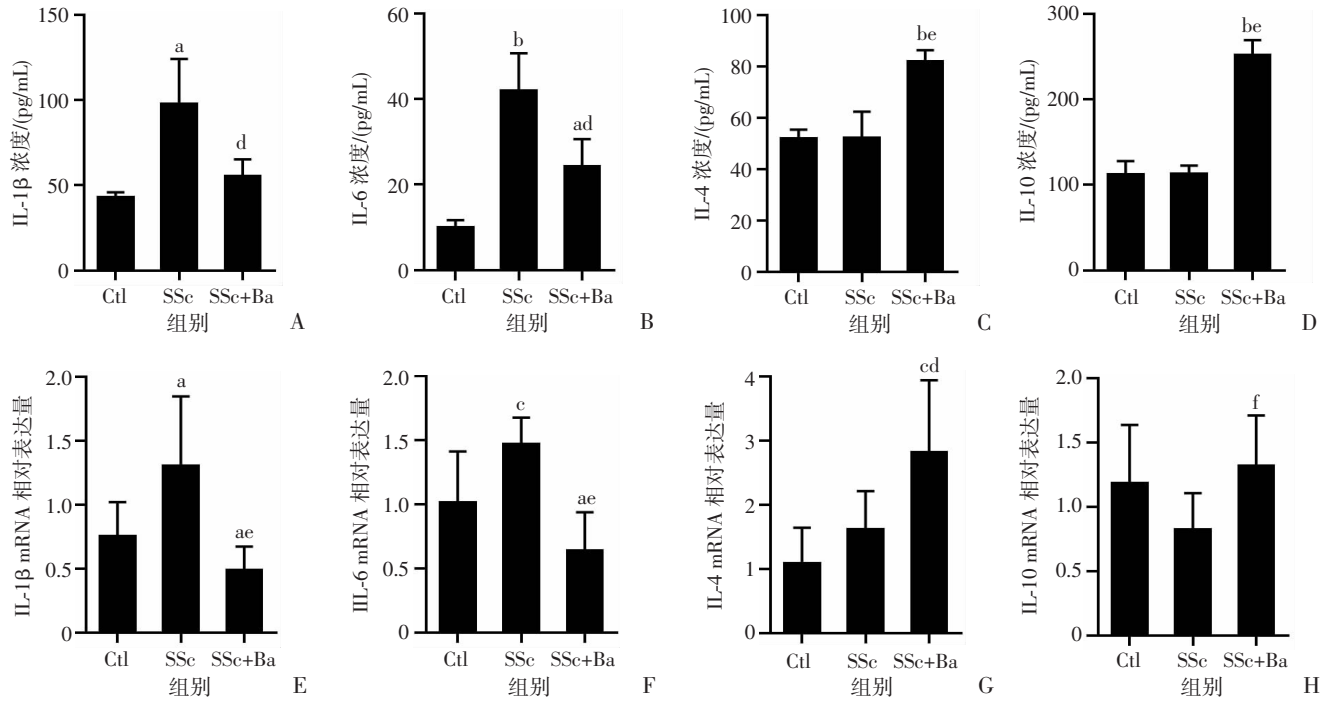
图 3　各组小鼠皮肤和肺组织 Masson 染色



a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.001$, 与 Ctl 组比较; d: $P<0.05$, 与 SSc 组比较

A: Westen blot 检测肺组织蛋白表达 1~3: Ctl 组; 4~6: SSc 组; 7~9: SSc+Ba 组; B: Col4 蛋白相对表达量; C: JAK2 蛋白相对表达量; D: p-JAK2 蛋白相对表达量; E: p-STAT3 蛋白相对表达量; F: CD86 蛋白相对表达量; G: CD163 蛋白相对表达量

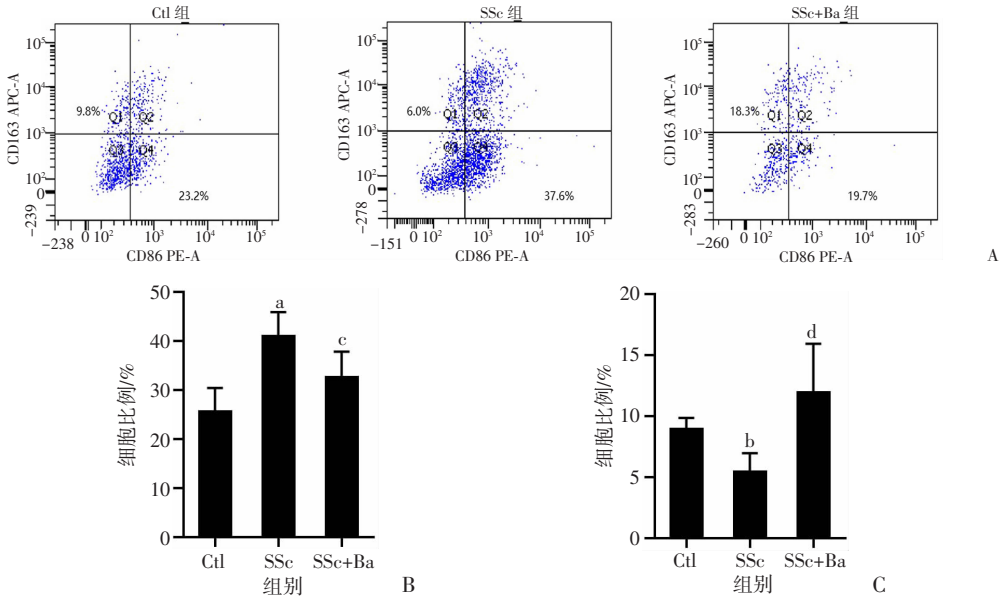
图 4 各组小鼠肺组织中细胞外基质 Col4、JAK2/STAT3 和巨噬细胞标志物表达



a: $P<0.05$, b: $P<0.001$, c: $P<0.01$, 与 Ctl 组比较; d: $P<0.01$, e: $P<0.001$, f: $P<0.05$, 与 SSc 组比较

A: 血浆 IL-1β 浓度; B: 血浆 IL-6 浓度; C: 血浆 IL-4 浓度; D: 血浆 IL-10 浓度; E: 肺组织 IL-1β mRNA 相对表达量; F: 肺组织 IL-6 mRNA 相对表达量; G: 肺组织 IL-4 mRNA 相对表达量; H: 肺组织 IL-10 mRNA 相对表达量

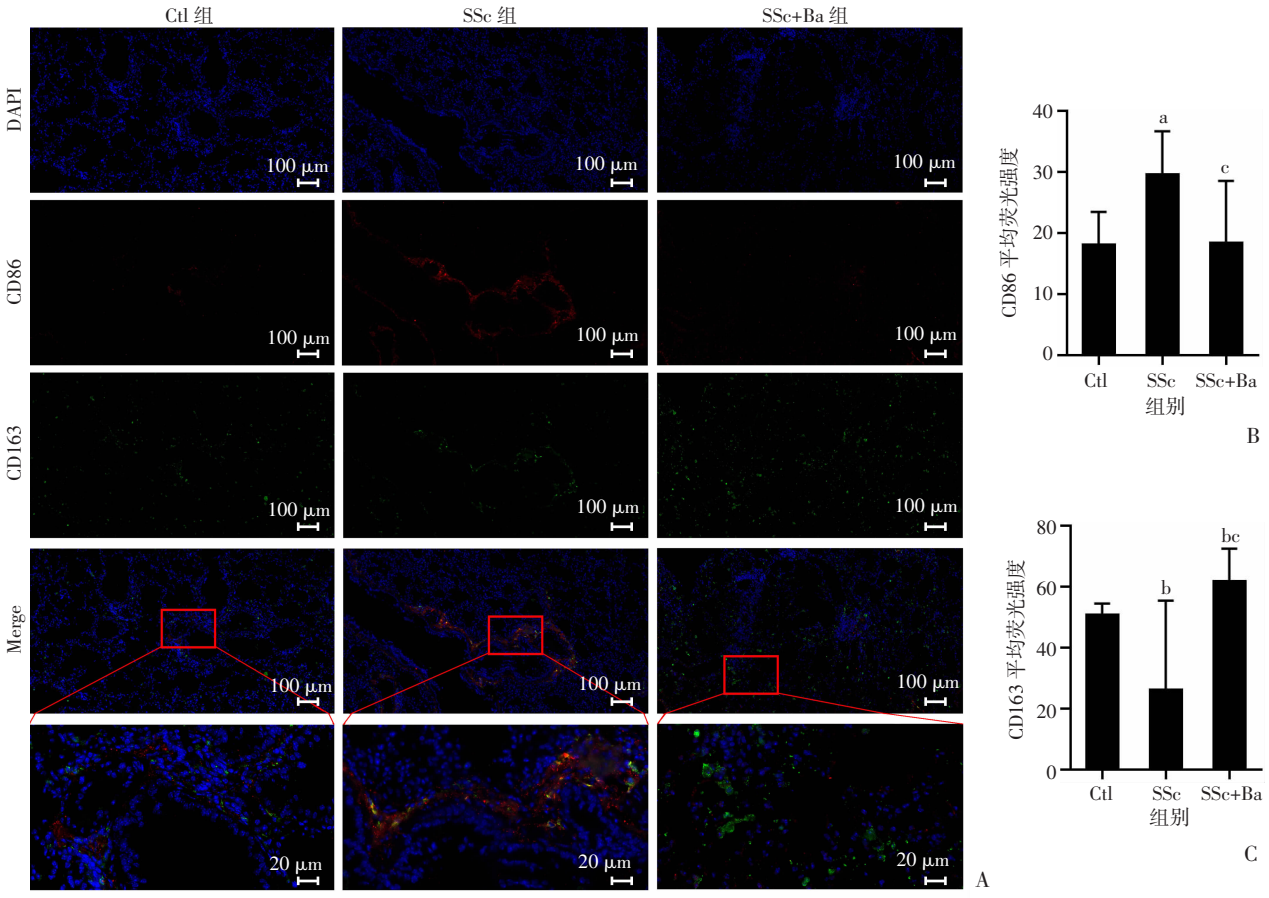
图 5 各组小鼠血浆炎症因子浓度和肺组织炎症因子 mRNA 水平



a: $P<0.001$, b: $P<0.01$, 与 Ctl 组比较; c: $P<0.01$, d: $P<0.001$, 与 SSc 组比较

A: 流式细胞术检测小鼠脾脏巨噬细胞极化; B: 小鼠脾脏 $F4/80^+CD86^+CD163^-$ 的 M1 型巨噬细胞比例; C: 小鼠脾脏 $F4/80^+CD86^-CD163^+$ 的 M2 型巨噬细胞比例

图 6 各组小鼠脾脏巨噬细胞极化情况



a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与 Ctl 组比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$, 与 SSc 组比较

A: 小鼠肺组织中 CD86 和 CD163 免疫荧光表达; B: 小鼠肺组织中 CD86 平均免疫荧光强度; C: 小鼠肺组织 CD163 平均免疫荧光强度

图 7 各组小鼠肺组织 CD86 和 CD163 荧光表达

3 讨论

JAK 是一种受体相关的酪氨酸激酶家族,配体和受体结合后诱导 JAK 活化。活化的 JAK 募集并磷酸化 STAT 蛋白,磷酸化的 STAT 蛋白形成二聚体进入细胞核调控目的基因转录。JAK2 在多种细胞因子信号通路中起重要作用,并参与增殖、分化、凋亡以及免疫调节等多种生物学过程[9]。研究发现 JAK2 在心脏纤维化[10]、特发性肺纤维化[11-12]和类风湿关节炎伴间质性肺病[11]等炎症和纤维化疾病中高表达,表明 JAK2 可能在调节组织炎症和纤维化进程中起重要作用。

巨噬细胞是一种固有免疫细胞,在机体的防御、炎症反应、内环境稳定以及抗原呈递等生理过程中发挥重要作用,并具有调控固有免疫和适应性免疫等重要生物学过程的功能[13]。巨噬细胞具有高度可塑性,根据不同刺激物转化为不同表型,包括经典活化巨噬细胞(M1 型)和替代活化巨噬细胞(M2 型)。脂多糖单独或联合干扰素-γ 可诱导巨噬细胞极化为 M1 型,释放如 IL-1β、IL-6、IL-12、IL-23、肿瘤坏死因子-α 和环氧合酶 2 等因子促进炎症反应[14]。IL-4、IL-10、IL-13、糖皮质激素和免疫复合物等可诱导巨噬细胞极化为 M2 型,M2 型巨噬细胞又分为 4 个亚型,包括 M2a、b、c 和 d,其中 M2a 主要由 IL-4 和 IL-13 诱导,表达Ⅰ型精氨酸酶编码基因、甘露糖受体和 CD163 等,促进组织的损伤修复[15]。

肺组织纤维化分为早期炎症阶段和中晚期纤维化阶段[16]。在肺纤维化的早期,肺组织中巨噬细胞极化为 M1 型,诱导持续的炎症反应和组织损伤。在肺纤维化的中晚期,肺组织中巨噬细胞极化为 M2 型,促进损伤修复和重塑[16]。WANG 等[17]在急性肺损伤动物模型中发现 M1 型巨噬细胞显著增加,分泌大量炎症因子和趋化因子,加剧肺泡上皮细胞和血管内皮细胞损伤。另一项研究表明在急性肺损伤早期,肺组织中存在大量 M1 型巨噬细胞浸润,而在急性肺损伤晚期,肺组织中聚集大量 M2 型巨噬细胞[18]。DONG 等[19]在碳纳米管诱导的小鼠肺纤维化模型中发现 M1 型巨噬细胞在模型诱导的第 1 天明显上升,第 3 天达到峰值。以上研究表明,在肺组织纤维化的早期阶段,巨噬细胞极化为 M1 表型,诱导持续的炎症反应和组织损伤。

巨噬细胞极化机制目前尚不明确,但有研究表明 JAK/STAT 信号通路与巨噬细胞极化有关[20-21]。一项关于炎症性肠病的研究发现托法替尼通过靶向抑制 JAK3 和 JAK2 进而抑制炎症因子 IL-6 和 IL-22 分泌,同时抑制 STAT3 信号过度表达来改善肠道屏障功能受损和降低疾病易感性[22]。在另一项研究中,RUNTSCH 等[23]发现衣康酸及其衍生物在巨噬细胞中通过修饰 JAK1 的残基减少巨噬细胞极化为 M2 表型,其机制是靶向 JAK1/STAT6 信号通路。激活 JAK/STAT1 通路可促进干扰素-γ 诱导 M1 极化,而抑制 JAK/STAT6 通路可抑制 IL-4 诱导 M2 极化[24]。此外,在缺血性脑损伤和心肌再灌注损伤的研究中发现鲁索利替尼和黄芩苷通过抑制 JAK2/STAT3 磷酸化调控巨噬细胞极化来减轻炎症反应和组织损伤[25-26]。

本研究发现 JAK2/STAT3 在 SSc 小鼠肺组织中激活,证明 JAK2/STAT3 信号通路很可能促进 SSc 肺纤维化的发生和发展。在干预 4 周 SSc 小鼠肺纤维化模型中,SSc 组小鼠肺组织巨噬细胞主要极化为 M1 型,分泌更多促炎因子(IL-1β 和 IL-6)。巴瑞替尼通过减少促炎因子分泌和抑制 M1 极化发挥抗炎和减轻组织炎症损伤的作用,其机制与靶向抑制 JAK2/STAT3 信号通路有关。

本研究在构建 SSc-ILD 模型的同时予以巴瑞替尼干预,因此巴瑞替尼减轻 SSc 肺纤维化的作用是预防性的,而非治疗性。但由于发现巴瑞替尼具有缓解皮肤增厚和改善组织炎症损伤的作用,因此巴瑞替尼可能对 SSc 患者的病情有一定的改善作用。成纤维细胞在纤维化疾病的发病机制中具有重要作用,在纤维化过程中,成纤维细胞和巨噬细胞存在相互作用[27]。本研究仅探讨了巨噬细胞在 SSc 小鼠模型中的极化情况,而成纤维细胞和巨噬细胞的相互作用及其机制尚不明确,仍需更深入的研究。

参考文献:

[1] DENTON C P, KHANNA D. Systemic sclerosis[J]. Lancet, 2017, 390(10103): 1685-1699. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)30933-9.

[2] PERELAS A, SILVER R M, ARROSSI A V, *et al*. Systemic sclerosis-associated interstitial lung disease[J]. Lancet Respir Med, 2020, 8(3): 304-320. DOI: 10.1016/S2213-2600(19)30480-1.

[3] KHANNA D, NAGARAJA V, TSENG C H, *et al*. Predictors

of lung function decline in scleroderma-related interstitial lung disease based on high-resolution computed tomography: implications for cohort enrichment in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease trials[J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17: 372. DOI: 10.1186/s13075-015-0872-2.

[4] DISTLER O, HIGHLAND K B, GAHLEMANN M, *et al*. Nintedanib for systemic sclerosis-associated interstitial lung disease[J]. N Engl J Med, 2019, 380(26): 2518-2528. DOI: 10.1056/NEJMoa1903076.

[5] JORGENSEN S C J, TSE C L Y, BURRY L, *et al*. Baricitinib: a review of pharmacology, safety, and emerging clinical experience in COVID-19[J]. Pharmacotherapy, 2020, 40(8): 843-856. DOI: 10.1002/phar.2438.

[6] ASSADIASL S, FATAHI Y, MOSHARMOVAHED B, *et al*. Baricitinib: from rheumatoid arthritis to COVID-19[J]. J Clin Pharmacol, 2021, 61(10): 1274-1285. DOI: 10.1002/jcph.1874.

[7] KALIL A C, PATTERSON T F, MEHTA A K, *et al*. Baricitinib plus remdesivir for hospitalized adults with covid-19[J]. N Engl J Med, 2021, 384(9): 795-807. DOI: 10.1056/NEJMoa2031994.

[8] HÜBNER R H, GITTER W, EL MOKHTARI N E, *et al*. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples[J]. Biotechniques, 2008, 44(4): 507-511, 514-517. DOI: 10.2144/000112729.

[9] RUAN H, LUAN J Y, GAO S Y, *et al*. Fedratinib attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis *via* the JAK2/STAT3 and TGF-β1 signaling pathway[J]. Molecules, 2021, 26(15): 4491. DOI: 10.3390/molecules26154491.

[10] EID R A, ALKHATEEB M A, EL-KOTT A F, *et al*. A high-fat diet rich in corn oil induces cardiac fibrosis in rats by activating JAK2/STAT3 and subsequent activation of ANG II/TGF-1β/Smad3 pathway: the role of ROS and IL-6 trans-signaling[J]. J Food Biochem, 2019, 43(8): e12952. DOI: 10.1111/jfbc.12952.

[11] WANG S H, LIU M F, LI X J, *et al*. Canonical and noncanonical regulatory roles for JAK2 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. FASEB J, 2022, 36(6): e22336. DOI: 10.1096/fj.202101436R.

[12] MILARA J, HERNANDEZ G, BALLESTER B, *et al*. The JAK2 pathway is activated in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Respir Res, 2018, 19(1): 24. DOI: 10.1186/s12931-018-0728-9.

[13] 周宪宾. 巨噬细胞 M1/M2 极化分型的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(10): 957-960.. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2012.10.022.
ZHOU X B. Research progress on M1/M2 polarization typing of macrophages[J]. Chin J Immunol, 2012, 28(10): 957-960.. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2012.10.022.

[14] RUSSELL D G, HUANG L, VANDERVEN B C. Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens[J]. Nat Rev Immunol, 2019, 19(5): 291-304. DOI: 10.1038/s41577-019-0124-9.

[15] WANG L X, ZHANG S X, WU H J, *et al*. M2b macrophage polarization and its roles in diseases[J]. J Leukoc Biol, 2019, 106(2): 345-358. DOI: 10.1002/JLB.3RU1018-378RR.

[16] 蔡泽慧, 赵鹏, 张蓝熙, 等. 巨噬细胞活化参与肺纤维化机制研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(15): 3853-3857. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2022.15.061.
CAI Z H, ZHAO P, ZHANG L X, *et al*. Research progress on the mechanism of macrophage activation participating in pulmonary fibrosis[J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(15): 3853-3857. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2022.15.061.

[17] WANG L, ZHANG H S, SUN L Y, *et al*. Manipulation of macrophage polarization by peptide-coated gold nanoparticles and its protective effects on acute lung injury[J]. J Nanobiotechnology, 2020, 18(1): 38. DOI: 10.1186/s12951-020-00593-7.

[18] 石小云. M2 巨噬细胞在脂多糖诱导肺纤维化中的作用及机制[D]. 南昌:南昌大学, 2021.
SHI X Y. Effects and mechanism of M2 macrophages on pulmonary fibrosis induced by lipopolysaccharide[D]. Nanchang: Nanchang University, 2021.

[19] DONG J, MA Q. Macrophage polarization and activation at the interface of multi-walled carbon nanotube-induced pulmonary inflammation and fibrosis[J]. Nanotoxicology, 2018, 12(2): 153-168. DOI: 10.1080/17435390.2018.1425501.

[20] LIANG Y B, TANG H, CHEN Z B, *et al*. Downregulated $SOCS_1$ expression activates the JAK1/STAT1 pathway and promotes polarization of macrophages into M1 type[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5): 6405-6411. DOI: 10.3892/mmr.2017.7384.

[21] 周琦, 孙慧娟, 于栋华, 等. 巨噬细胞 M1/M2 型极化在不同疾病中的作用机制[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(11): 1502-1506. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2020.11.005.
ZHOU Q, SUN H J, YU D H, *et al*. Mechanisms of M1/M2 macrophage polarization in different diseases[J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(11): 1502-1506. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2020.11.005.

[22] SPALINGER M R, SAYOC-BECERRA A, ORDOOKHANIAN C, *et al*. The JAK inhibitor tofacitinib rescues intestinal barrier defects caused by disrupted epithelial-macrophage interactions[J]. J Crohns Colitis, 2021, 15(3): 471-484. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjaa182.

[23] RUNTSCH M C, ANGIARI S, HOOFTMAN A, *et al*. Itaconate and itaconate derivatives target JAK1 to suppress alternative activation of macrophages[J]. Cell Metab, 2022, 34(3): 487-501.e8. DOI: 10.1016/j.cmet.2022.02.002.

[24] SHAN X, HU P, NI L, *et al*. Serine metabolism orchestrates macrophage polarization by regulating the IGF1-p38 axis[J]. Cell Mol Immunol, 2022, 19(11): 1263-1278. DOI: 10.1038/s41423-022-00925-7.

[25] ZHU H, JIAN Z H, ZHONG Y, *et al*. Janus kinase inhibition ameliorates ischemic stroke injury and neuroinflammation through reducing NLRP3 inflammasome activation *via* JAK2/STAT3 pathway inhibition[J]. Front Immunol, 2021, 12: 714943. DOI: 10.3389/fimmu.2021.714943.

[26] XU M, LI X Y, SONG L C. Baicalin regulates macrophages polarization and alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury via inhibiting JAK/STAT pathway[J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 655-663. DOI: 10.1080/13880209.2020.1779318.

[27] BUECHLER M B, FU W X, TURLEY S J. Fibroblast-macrophage reciprocal interactions in health, fibrosis, and cancer[J]. Immunity, 2021, 54(5): 903-915. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.04.021.

(收稿:2023-06-29;修回:2023-08-19)
(编辑 刘秋池)