DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.12.007

·基础研究·

阻断HMGB1减轻放疗联合PD-1抑制剂所致肺癌移植瘤模型小鼠肺损伤

蒋涵[1,2,3],刘瑶[1,2,3],吴碧波[1,2,3],王羽[1,2,3],张婧[1,2,3],胡银祥[1,2,3],欧阳伟炜[1,2,3],卢冰[1,2,3],苏胜发[1,2,3](1.贵州医科大学附属医院 肿瘤科,贵州 贵阳 550004;2.贵州医科大学附属肿瘤医院肿瘤科,贵州 贵阳 550004;3.贵州医科大学临床医学院 肿瘤学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的**:探究高迁移率族蛋白B1(HMGB1)中和抗体对肺癌LLC细胞移植瘤模型小鼠放疗联合PD-1抑制剂致放射性肺损伤的影响。**方法**:实验用25只雄性C57BL/6小鼠,随机分为对照组、PD-1抑制剂组、放疗组、放疗+PD-1抑制剂组及HMGB1中和抗体+PD-1抑制剂+放疗组,每组5只。向每只动物的右腿皮下移植肺癌LLC细胞作为原发肿瘤,间日左腿皮下移植LLC细胞作为继发肿瘤。实验第28天处死动物取肺组织和移植瘤,用H-E、Masson染色观察肺组织病理变化情况,免疫组织化学法检测肺组织和移植瘤组织中$CD4^+$和$CD8^+$ T淋巴细胞浸润情况,酶联免疫吸附实验(ELISA)检测肺组织中TNF-α、TGF-β和IL-6的表达。**结果**:与对照或PD-1抑制剂组比较,其他3组小鼠移植瘤体积明显缩小($P<0.01$或$P<0.001$),HMGB1中和抗体不能使移植瘤体积进一步缩小;与对照或PD-1抑制剂组比较,其他3组小鼠肺组织的炎症评分和胶原容积分数(CVF)均明显增加($P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.001$或$P<0.000\ 1$),HMGB1中和抗体可部分抑制放疗的不良反应($P<0.01$或$P<0.001$);与对照或PD-1抑制剂组比较,其他3组肺组织中$CD4^+$T淋巴细胞浸润明显增多(均$P<0.001$),HMGB1中和抗体可部分抑制肺组织中$CD4^+$ T淋巴细胞浸润($P<0.01$);与对照或PD-1抑制剂组比较,其他3组移植瘤组织中$CD4^+$、$CD8^+$ T淋巴细胞浸润明显增加(均$P<0.001$),HMGB1中和抗体不能抑制移植瘤组织中T细胞的浸润。与对照或PD-1抑制剂组比较,其他3组肺组织中IL-6表达升高,TGF-β表达下降(均$P<0.05$),HMGB1中和抗体对肺组织中TNF-α、IL-6和TGF-β表达无明显影响。**结论**:HMGB1中和抗体不影响对移植瘤生长抑制的前提下,可能通过减少肺部炎性细胞的浸润,进而减轻肺部炎性损伤及纤维化。

[关键词] 肺癌;HMGB1中和抗体;放射性肺损伤;PD-1抑制剂;放疗
[中图分类号] R73-35;R73-36 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385x(2025) 12-1262-09

Blocking HMGB1 mitigates lung injury in mice with lung cancer xenografts following combined radiotherapy and PD-1 inhibitor treatment

JIANG Han[1,2,3], LIU Yao[1,2,3], WU Bibo[1,2,3], WANG Yu[1,2,3], ZHANG Jing[1,2,3], HU Yinxiang[1,2,3], OUYANG Weiwei[1,2,3], LU Bing[1,2,3], SU Shengfa[1,2,3] (1. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Oncology, Affiliated Cancer Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Oncology, School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of high mobility group box-1 protein (HMGB1) neutralizing antibodies on radiation-induced lung injury in transplanted tumor-bearing mice. **Methods:** Twenty-five male C57BL/6 mice were randomly divided into five groups: control group, PD-1 inhibitor group, radiotherapy group, radiotherapy + PD-1 inhibitor group, and HMGB1 neutralizing antibody + PD-1 inhibitor + radiotherapy group, with five mice in each group. Subcutaneous transplantation of lung carcinoma LLC cells was performed on the right hind limb of each animal to establish the primary tumor, whilst subcutaneous transplantation of LLC cells on the left hind limb served as the secondary tumor. On day 28 of the experiment, animals were euthanized, and lung tissue and transplanted tumors were collected. Hematoxylin and eosin (H-E) staining and Masson's trichrome staining were performed to observe the pathological changes in the lung tissues of experimental mice. Immunohistochemistry (IHC) was used to detect the infiltration of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes in lung and transplanted tumor tissues. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to examine the expression of TNF-α, TGF-β, and IL-6 in lung tissues. **Results:** Compared with the control and PD-1 inhibitor groups, the other three groups showed significantly reduced transplanted tumor volumes ($P<0.01$ or $P<0.001$), with HMGB1 neutralizing antibodies not further decreasing tumor volume. Similarly, compared with the control and PD-1 inhibitor groups, the inflammation

[基金项目] 贵州省自然科学基金项目[No. ZK(2022)key040]
[作者简介] 蒋涵(1992—)男,硕士,住院医师,主要从事肺部肿瘤相关的基础与临床研究
[通信作者] 苏胜发(扫码获取作者通信方式)

scores and collagen volume fraction (CVF) in lung tissues were notably increased in the other three groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, or $P < 0.0001$), and HMGB1 neutralizing antibodies partially inhibited the adverse effects of radiotherapy ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). Compared to the control or PD-1 inhibitor groups, $CD4^+$ T lymphocyte infiltration was significantly increased in the lung tissues of the other three groups, and HMGB1 neutralizing antibodies partially inhibited $CD4^+$ T lymphocyte infiltration in lung tissue ($P < 0.01$). Moreover, in the transplanted tumor tissues, compared with the control or PD-1 inhibitor groups, the other three groups demonstrated significantly increased $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocyte infiltration (all $P < 0.001$); however, HMGB1 neutralizing antibodies did not inhibit T cell infiltration in the transplanted tumor tissues. Compared with the control or PD-1 inhibitor groups, IL-6 expression in lung tissue was elevated and TGF-β expression was decreased in the other three groups ($P < 0.05$), and HMGB1 neutralizing antibodies had no significant effect on the expression of TNF-α, IL-6, or TGF-β in lung tissue. **Conclusion:** HMGB1 neutralizing antibodies may reduce the infiltration of inflammatory cells in the lungs, thereby alleviating lung inflammatory injury and fibrosis, without affecting the inhibition of transplanted tumor growth effects.

[Key words] lung carcinoma; HMGB1 neutralizing antibody; radiation-induced lung injury; PD-1 inhibitor; radiotherapy

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(12): 1262-1270. DOI：10.3872/j.issn.1007-385x.2025.12.007]

肺癌是在男性癌症中发病率最高，同时也是死亡的主要原因，在女性中，肺癌的发病率排名第三[1-3]。放射治疗是癌症治疗的主要手段之一，在胸部肿瘤放射治疗过程中往往会引起放射相关性肺损伤（radiation-induced lung injury, RILI）[4]。最常见的包括放射性肺炎和放射性肺纤维化[5]。此外，随着免疫疗法作为各种癌症的一线和二线治疗的广泛应用，免疫治疗相关肺损伤的发生率迅速增加[6]。放免联合治疗在提高胸部肿瘤疗效的同时，可能会产生不良反应的叠加，其相关作用机制不明。有研究[6-9]表明，阻断高迁移率族蛋白B1（high mobility group box-1 protein, HMGB1）/TLR4通路具有减轻RILI的作用。HMGB1在释放后，细胞外HMGB1通常充当损伤相关分子模式（damage-associated molecular pattern，DAMP）分子，通过不同的受体或直接摄取来调节炎症和免疫反应[10]。随着免疫细胞的迁移，许多细胞因子和HMGB1积聚在受损的肺组织中[11]。在炎症和损伤的过程中，可通过不同的信号通路导致急性肺炎和慢性肺纤维化[12]，同时在一些炎症及炎症相关性疾病当中，HMGB1及相关通路展现出治疗潜力[13-14]。但在荷瘤小鼠以及放射性肺损伤领域的相关研究较少。本研究的前期工作发现，正常小鼠模型用PD-1抑制剂联合放射处理可加重放射性肺损伤[15]，在小鼠模型上发现PD-1抑制剂联合放射治疗会加重心肌损伤，同时出现HMGB1明显升高[16]。因此，本课题拟通过构建放免联合治疗致荷瘤小鼠的肺损伤模型，观察HMGB1中和抗体对RILI的影响，通过H-E、Masson染色，免疫组织化学染色，ELISA测定肺组织中细胞因子变化，观察HMGB1中和抗体能否在不影响抗肿瘤疗效的同时，对放免联合所致肺损伤起到一定的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞与主要试剂

雄性C57BL/6小鼠，6~8周龄，体重20~25 g，25只，购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号：SCXK(京)2021-0006]。在SPF级标准条件下喂养。小鼠在实验前适应环境1周。动物实验经贵州医科大学动物实验伦理委员会批准（No. 2101188）。Lewis肺癌LLC细胞购自陕西富恒生物科技有限公司。LLC细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养基于37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养传代。本实验所用主要试剂见表1。

表1 主要试剂及其生产商

主要试剂	产地
PD-1抑制剂	Bio X cell公司，美国
HMGB1中和抗体	Arigo公司，日本
1.25%三溴乙醇	南京爱贝生物科技有限公司，中国
H-E染色试剂盒	索莱宝科技有限公司，中国
Masson染色试剂盒	索莱宝科技有限公司，中国
DMEM	索莱宝科技有限公司，中国
无水乙醇	国药集团化学试剂公司，中国
二甲苯	国药集团化学试剂公司，中国
柠檬酸抗原修复液	索莱宝科技有限公司，中国
苏木精染液	索莱宝科技有限公司，中国
PMSF	索莱宝科技有限公司，中国
Anti-CD4 Rabbit pAb一抗	Servicebio，中国
Anti-CD8 Rabbit pAb一抗	Servicebio，中国
HRP标记山羊抗兔二抗	Servicebio，中国
BCA蛋白浓度测定试剂盒	索莱宝科技有限公司，中国
（TNF-α）ELISA试剂盒	江苏酶免实业有限公司，中国
（IL-6）ELISA试剂盒	江苏酶免实业有限公司，中国
（TGF-β）ELISA试剂盒	江苏酶免实业有限公司，中国

1.2 LLC细胞移植瘤模型的建立、分组和干预流程

取对数生长期的LLC细胞，用PBS将其配制成1×10^7个/mL细胞悬液，每只小鼠右腿皮下注射LLC

细胞 1 × 10^6个（共0.1 mL）模拟原发肿瘤，2 d后每只小鼠左腿皮下注射LLC细胞0.5 × 10^6个（共0.05 mL）模拟继发肿瘤。移植后第5天开始测量移植瘤体积，第9天时所有注射部分均观察到肉眼可见的移植瘤（约200 mm^3），表明移植瘤模型成功建立。用随机数字表法将小鼠分为5组：对照组，PD-1抑制剂组，放疗组，放疗＋PD-1抑制剂组，HMGB1中和抗体＋PD-1抑制剂＋放疗组，分别简称为A、B、C、D和E组。

移植瘤模型建立和治疗流程见图1。照射前用1.25%三溴乙醇麻醉小鼠（0.2 mL/10 g）。右腿注射LLC细胞10 d后进行全胸腔照射（模拟放射性肺损伤），胸前垫1 cm厚补偿胶，胸前0°单野照射，照射野13 cm × 2 cm（3只小鼠并排照射），源皮距100 cm，6 MV X射线，20 Gy单次全胸腔照射，剂量率600 cGy/min，照射结束后待小鼠自然苏醒，正常喂养。

C组、D组、E组在第10、12、14天进行模拟原发肿瘤放射治疗，腿部0°单野照射，照射野2 cm × 2 cm，源皮距100 cm，6 MV X线，8 Gy单次腿部肿瘤照射，剂量率600 cGy/min。D组和E组在末次照射后同时给予PD-1抑制剂腹腔注射，剂量200 μg。E组，在第17天予以HMGB1中和抗体腹腔注射（20 μg/100 μL PBS）。

观察至28 d或肿瘤体积超过2 000 mm^3，对小鼠执行安乐死并取肺及移植瘤。数据收集及肿瘤体积图的处理使用GraphPad Prism version 7.0软件。

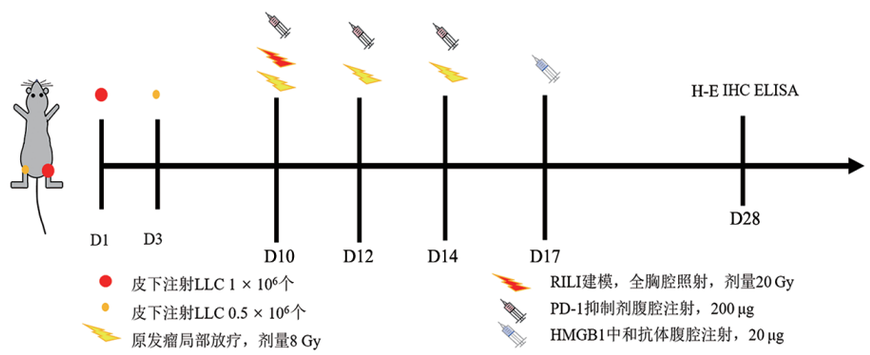


图1　移植瘤模型的建立和治疗流程图

1.3　肺组织病理学H-E染色及炎症分级

H-E染色：各组小鼠肺组织经甲醛固定、乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、制备病理切片（4 μm），常规H-E染色后，再经脱水、透明、中性树胶封固，每张标本随机选取3个不重复视野，观察小鼠肺组织病理变化。评分由两名高年资病理科医师进行阅片评估。为评估炎症程度，使用以下标准[17]进行评分：0分表示没有或偶尔有炎症细胞；1分表示有一些散在排列的炎症细胞；2分表示有较多炎性细胞在肺间质及肺泡腔内；3分表示有大量的炎症细胞在血管周围。两位医生给出的评分均值作为同一样本炎性浸润评分。

1.4　免疫组织化学法分析肺组织中淋巴细胞浸润

将肺组织和移植瘤组织石蜡标本连续切片，片厚4 μm，脱蜡至水后用3% H_2O_2处理10 min，高温高压热修复抗原，2%山羊血清封闭20 min，抗CD4（1∶100）、CD8（1∶100）抗体4 ℃冰箱处理过夜，生物素标记羊抗兔二抗（1∶150）室温下处理20 min，辣根过氧化物酶标记链霉亲和素室温下处理10 min，DAB显色液反应5 min，最后经苏木精复染、梯度乙醇脱水、二甲苯透明和中性树胶封片。在显微镜高倍镜（× 400）下观察拍照，固定拍摄条件，每个标本随机抽取5张切片，拍照并存储，用ImageJ软件进行图像分析，测量CD4、CD8阳性染色区域的积分光密度（integrated optical density, IOD）值和视野内细胞所占面积（area, A），用“平均光密度（average optical density, AOD）= IOD / A”公式计算视野免疫组织化学AOD，取3个视野的AOD的平均值作为每张切片的AOD值。以AOD来表示抗原的相对表达量。

1.5　Masson染色步骤及胶原纤维容积分数（collagen volume fraction, CVF）的计算

肺组织经固定、脱水、包埋、切片，将切片进行Masson染色后脱水并封片。数字切片扫描仪对切片进行图像采集，每张标本随机选取3个不重复视野。用ImageJ软件选定并计算每张切片蓝色胶原部分面积和除空白外的总组织面积，计算CVF，CVF = 蓝色胶原面积 / 总组织面积 × 100%。

1.6　ELISA检测各组肺组织中TNF-α、TGF-β和IL-6

取30 mg小鼠肺冻存组织加入蛋白裂解液，冰浴下超声匀浆，离心后取上清液。分别上清液及不同浓度的标准品加入已包被好捕获抗体（TNF-α、TGF-β和IL-6）的酶标板，参照说明书进行抗体孵育、洗涤、二抗孵育和显色反应。用酶标仪测定光密度（*D*）值，$D = D_{450} - D_{570}$。用标准品浓度及对应*D*绘制标准曲线，代入样本D计算出样本浓度（pg/mL）。

1.7　统计学处理

所有实验均独立进行3次。采用SPSS软件进行统

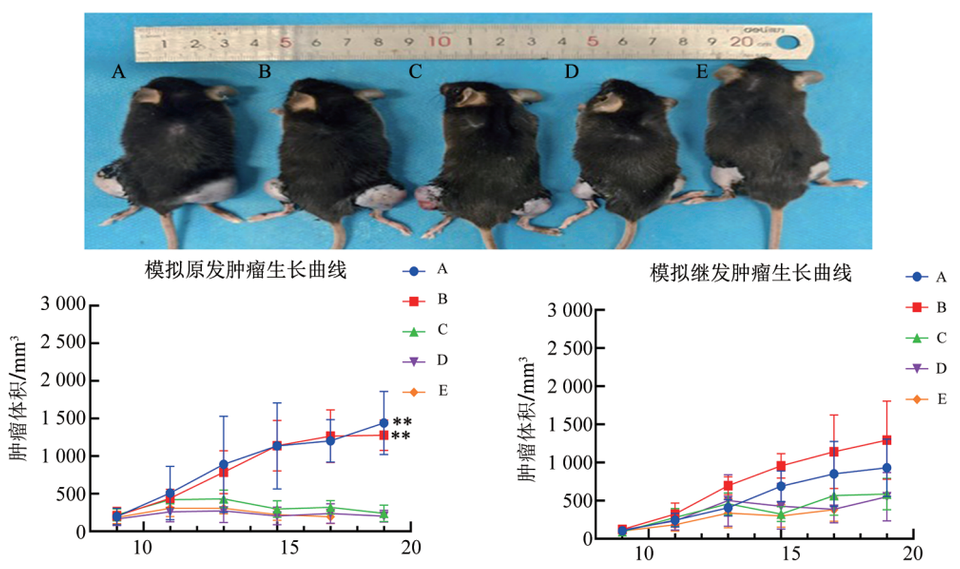
计分析，用GraphPad 7.0软件绘制图片。符合正态分布的计量数据以$\bar{x} \pm s$表示，组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），进一步两两比较采用LSD法，方差不齐时采用Dunnett's T3方法。数据不符合正态分布采用非参数检验，进一步比较采用Bonferroni法。以$P < 0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 成功构建肺癌LLC细胞小鼠移植瘤模型

测量各组移植瘤大小的结果（图2）显示，在模拟原发肿瘤中，与A组或B组比较，C组、D组和E组移植瘤体积明显缩小（$P < 0.01$或$P < 0.001$）。与D组比较，E组移植瘤体积无明显变化。实验结果说明，在模拟原发肿瘤中，照射治疗是移植瘤缩小的主要因素，PD-1抑制剂、HMGB1中和抗体对移植瘤体积无明显影响。

在模拟继发肿瘤实验中，观察到各组小鼠移植瘤体积变化幅度差异较小，但趋势与模拟原发肿瘤相似。各组间数据差异没有统计学意义。



与A组或B组比较，$^{**}P < 0.01$。

图2 小鼠移植瘤大体图及肿瘤体积变化

2.2 放射治疗可明显增加肺组织的炎症评分HMGB1中和抗体可部分抑制放射治疗的这种不良反应

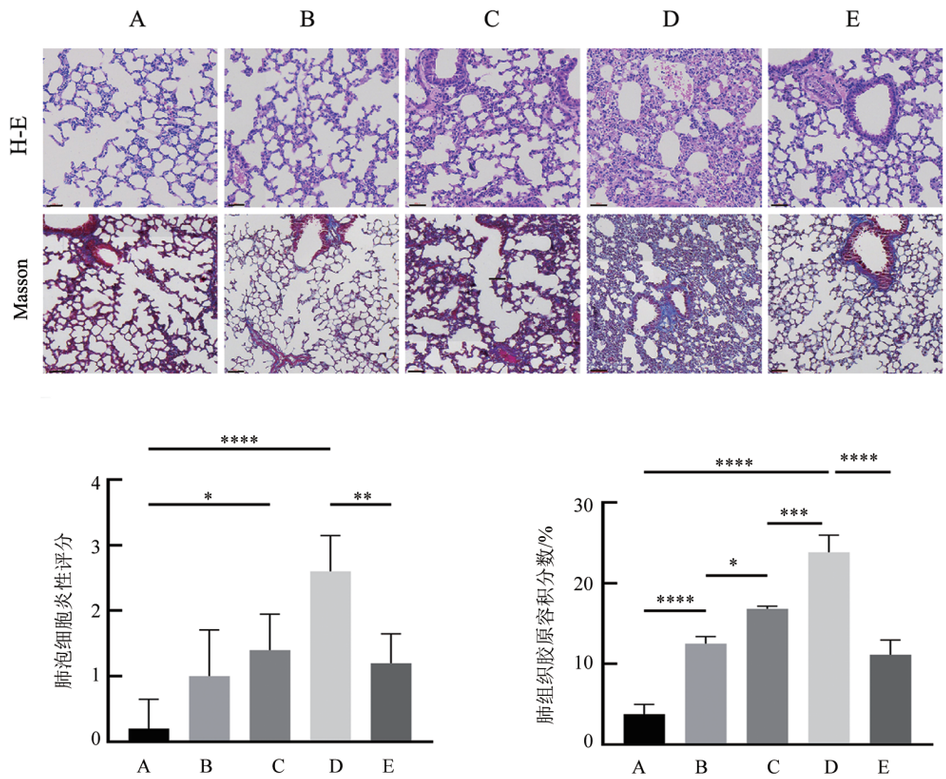
H-E染色结果（图3）显示，A组小鼠肺组织切片可见肺泡壁正常，组织结构清晰，有少许炎症细胞浸润；B组小鼠肺组织结构相对完整，炎症细胞浸润加重；C组肺泡间隔增厚，肺泡腔体变小，组织结构紊乱，肺间质充血、水肿明显，可见较多的炎症细胞浸润；D组肺泡间隔弥漫增厚、水肿，肺泡互相融合，部分甚至消失，正常结构明显破坏，可见大量炎症细胞浸润。E组肺泡结构总体较完整，部分肺泡间隔断裂，可见少许炎症细胞浸润。与A、B、C、E组相比，D组的炎性细胞浸润评分是最高的。

2.3 放射治疗可明显增加肺组织的CVF，HMGB1中和抗体可部分抑制放射治疗的此不良反应

Masson染色结果（图3）显示，胶原纤维被染成蓝色，肺泡上皮细胞染成红色。A组肺组织结构完整，肺间质未见明显的胶原纤维沉积；B组肺泡细胞壁稍增厚，部分血管旁可见少量胶原纤维分布；C组肺间质明显增厚，血管旁可见明显蓝染胶原纤维沉积；D组肺组织中肺泡结构大量破坏，肺泡间隔及血管旁可见明显蓝染的胶原纤维沉积；E组肺泡结构少量破坏，肺泡间隔有增厚，血管旁见少量蓝染的胶原纤维沉积。肺组织胶原半定量分析结果（图3）显示：A、B、C、D各组CVF逐渐增加，E组CVF较D组明显下降，组间比较发现，各组间CVF的差异均有统计学意义（$P < 0.05$或$P < 0.01$或$P < 0.001$或$P < 0.001$或$P < 0.000\ 1$）。实验结果说明，放射治疗可明显增加肺组织的炎症评分和CVF，HMGB1中和抗体可部分抑制放射治疗的这种不良反应。

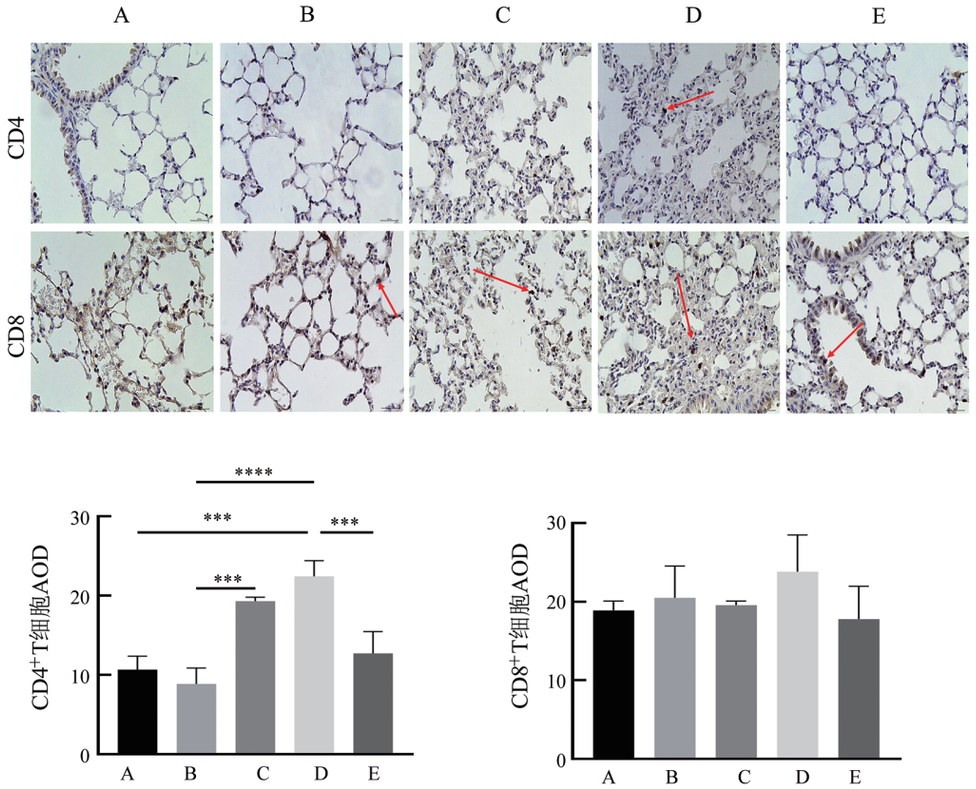
2.4 放射损伤后肺组织中$CD4^+$ T淋巴细胞浸润明显增多HMGB1中和抗体可部分阻断此细胞的浸润

免疫组织化学法检测结果（图4）显示，$CD4^+$ T淋巴细胞和$CD8^+$ T淋巴细胞染成棕黄色或棕褐色。A、B、C、D各组浸润的$CD4^+$ T淋巴细胞浸润逐渐增加，其中$CD8^+$ T淋巴细胞的占比较高。在E组中$CD4^+$ T淋巴细胞明显减少。实验结果说明，放射损伤后肺组织中淋巴细胞浸润明显增多，主要是$CD4^+$ T淋巴细胞，HMGB1中和抗体可明显降低肺组织中$CD4^+$ T淋巴细胞的浸润。



$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$,$^{***}P < 0.001$,$^{****}P < 0.000\ 1$。在H-E染色图中，标尺 = 40 μm，在Masson染色图片中，标尺 = 60 μm。

图3　各组肺组织H-E及Masson染色

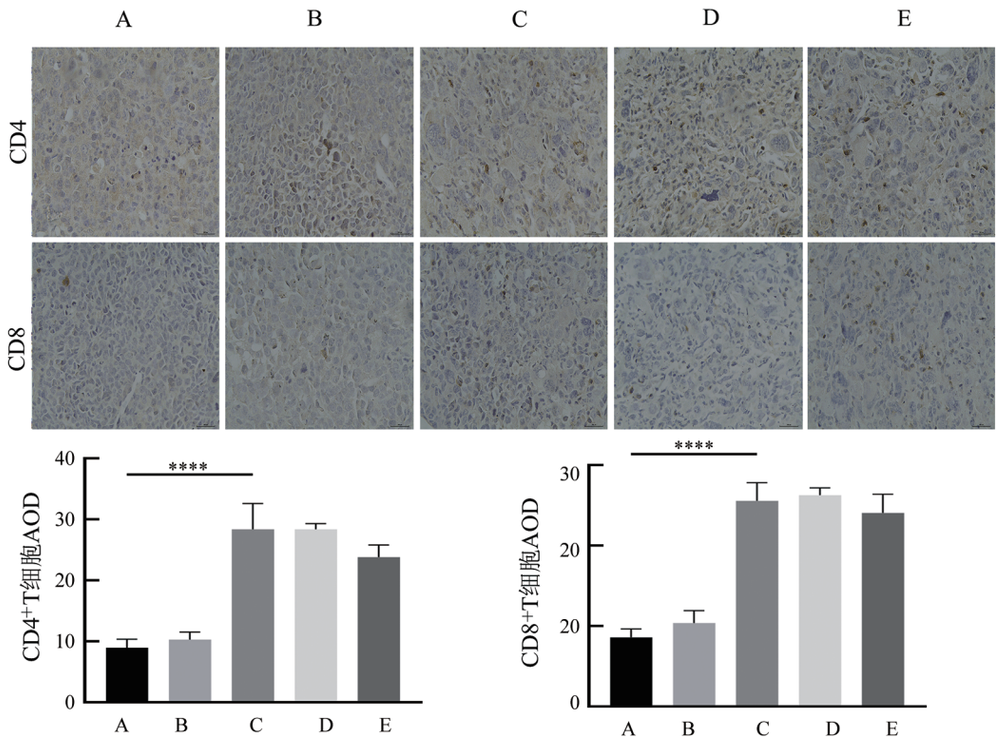


箭头所指为染成棕黄色或棕褐色的$CD4^{+}$ T淋巴细胞和$CD8^{+}$ T淋巴细胞。$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$,$^{***}P < 0.001$,$^{****}P < 0.000\ 1$。

图4　各组肺CD4/CD8阳性T淋巴细胞染色情况（× 400）

2.5 放射损伤后移植瘤组织中T淋巴细胞浸润明显增加

免疫组织化学染色结果（图5）显示，原发（右腿皮下）肿瘤中，$CD4^+$ T淋巴细胞和$CD8^+$ T淋巴细胞染成棕黄色或棕褐色。A组未见明确的$CD4^+$和$CD8^+$ T淋巴细胞浸润，B组可见少许的$CD4^+$和$CD8^+$ T淋巴细胞浸润，C、D、E组的$CD4^+$和$CD8^+$ T淋巴细胞浸润相似；E组CD4标记和CD8标记的细胞的AOD值都与D组接近，差异无统计学意义。实验结果说明，放射损伤后出现T淋巴细胞浸润明显增加。

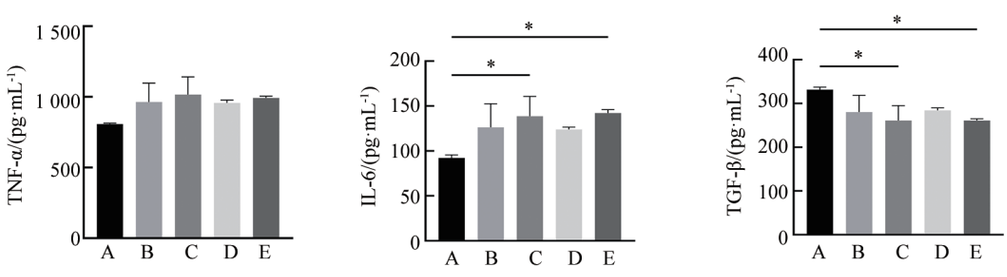


$^{****}P < 0.000\ 1$。

图5 D28各组肿瘤组织中CD4/CD8阳性T淋巴细胞染色情况（× 200）

2.6 各组移植瘤小鼠肺组织中TNF-α、IL-6和TGF-β的表达

ELISA检测结果（图6）显示，与A组比较，TNF-α在治疗各组中无明显变化，IL-6在C组和E组中表达均明显升高（均$P < 0.05$）较高，TGF-β在C组和E组中表达均明显下降（均$P < 0.05$）较高。实验结果说明，放射损伤后肺组织中IL-6表达升高，TGF-β表达下降，HMGB1中和抗体对肺组织中TNF-α、IL-6和TGF-β表达无明显影响。



$^{*}P < 0.05$。

图6 各组肺组织细胞因子检测数据

3 讨 论

本研究中发现无论是模拟原发肿瘤还是模拟继发肿瘤的治疗，PD-1抑制剂联合放射治疗对肿瘤的控制效果较好。但放免联合治疗在增强抗肿瘤的同时也会加重肺损伤，主要表现为肺部炎症及纤维化。

而阻断HMGB1在不减轻抗肿瘤疗效的同时，可以减轻放射性肺损伤及纤维化。PACIFIC研究[18]在2022年公布真实世界研究中的数据显示，PFS和OS均优于安慰剂组，但30.5%和26.1%的患者分别发生3/4级不良反应，15.4%患者停用度伐单抗，不良反应主要是肺炎和放射性肺炎。在此前的研究中，GENG等[15]、WANG等[19]发现，在正常小鼠模型上用PD-1抑制剂可加重放射性肺损伤。而在荷瘤小鼠模型上，WANG等也观察到放免联合治疗会加重放射性肺损伤[20]。因此，减轻肺组织炎症反应或许能够减少放射性肺损伤的相关不良反应的发生。而在此前的研究中，HMGB1中和抗体在多种炎症相关疾病中，例如中性粒细胞气道炎症、牙周炎等，都展现出了一定的减轻炎症的作用[14,21-22]。

本研究在此基础之上，建立了移植瘤小鼠的放射性肺损伤模型，并在模拟治疗结束后予以HMGB1中和抗体以期减轻放射性肺损伤。在使用HMGB1中和抗体后并未对抗肿瘤治疗造成负面影响，但能部分减轻肺部炎症反应。本研究在H-E和Masson染色结果中观察到，与其他各组相比，放疗＋PD-1抑制剂组的肺泡变形程度最高，肺间质充血严重，肺间质及血管周围可见更为明显的蓝染胶原纤维。单纯用PD-1抑制剂或单纯放疗组的炎性分数，均不如放疗＋PD-1抑制剂组。H-E染色的炎性评分以及Masson染色的CVF评分均高于其他组。用HMGB1中和抗体后，小鼠肺泡结构相对完整，肺间质炎性细胞浸润减轻，蓝染的胶原纤维沉积减少。同时，不论是炎性评分还是CVF评分均出现明显的下降（相较于放疗＋PD-1抑制剂组）。由此可见，HMGB1中和抗体能够对肺部炎症起到缓解作用。本研究建立的移植瘤小鼠的肺损伤模型，旨在尽量模拟真实世界的肺癌患者接受放疗后的肺损伤情况，目前HMGB1中和抗体在小鼠模型上起到的积极作用，提示该药物在预防肺损伤方面可能具有重要作用。

本研究发现，与对照组相比，PD-1抑制剂＋放疗组，无论是$CD4^+$ T细胞还是$CD8^+$ T细胞的数量都要明显高于其他组，而在用HMGB1中和抗体后两种T细胞数量均出现的明显降低，这提示HMGB1中和抗体在T细胞介导的免疫过程中起到相应作用。研究[20]表明，$CD8^+$ T淋巴细胞浸润，而不是$CD4^+$ T淋巴细胞在放疗联合PD-1抑制剂所致肺损伤中起着重要作用，而在放射性心脏损伤的相关研究当中也发现，$CD8^+$ T淋巴细胞比$CD4^+$ T淋巴细胞更容易在心肌细胞中浸润[16]。MARTIN等[23]研究表明，乳腺癌患者单侧胸部放疗后的支气管肺泡灌洗液中的淋巴细胞水平显著升高，他们将这种以T淋巴细胞浸润为主的肺炎称为淋巴细胞性肺泡炎。随后，CLAUDIA等[24]也得出了类似的结论，淋巴细胞性肺泡炎是所有患者放射性肺炎的标志物。肺部炎症反应的程度与症状的存在相关。淋巴细胞性肺泡炎主要由T淋巴细胞组成，并且以CD4亚群为主。

$CD8^+$ T淋巴细胞作为直接杀伤细胞在肿瘤免疫微环境中起到重要作用，此前的研究[25-26]表明，$CD8^+$ T淋巴细胞在放射线联合PD-1抑制剂所致正常组织损伤中起着重要作用。同时，$CD8^+$ T淋巴细胞在放疗联合PD-1抑制剂的抗肿瘤作用中也是关键的一环。本研究中发现，在肺组织中HMGB1中和抗体更加侧重于抑制$CD4^+$ T淋巴细胞而不是$CD8^+$T淋巴细胞。而在肿瘤组织中，虽然$CD4^+$T淋巴细胞以及$CD8^+$ T淋巴细胞都出现轻微降低，但是差异无统计学意义。并且，$CD8^+$淋巴细胞作为对肿瘤组织的直接杀伤细胞并未因使用HMGB1中和抗体而出现明显减少。这提示HMGB1中和抗体之所以能够在使用后缓解小鼠肺部炎症浸润，而并未影响抗肿瘤治疗的原因。

细胞因子同样是参与RILI发生的重要影响因素之一，探索其中的关键细胞因子，对于进一步了解HMGB1中和抗体的作用机制具有重要作用。IL-6是一种重要促炎因子，无论是在PD-1抑制剂相关性炎症、自身免疫性炎症，还是放射线导致的损伤，都起着重要作用[27-28]。CHEN等[29]研究中发现，放射性肺炎患者血液中的IL-6水平与RILI的发生呈正相关。TGF-β1一直以来被认为是介导肺纤维化的重要信号通路，SAVITA等[30]研究发现，可通过槲皮素-3-芸香糖苷来抑制NF-κB/TGF-β1信号通路来减轻放射性肺炎。TNF-α是重要的生物活性细胞因子，也是肿瘤坏死因子的一种，参与体内多种炎症反应，同时在免疫调节、炎症介导、抗肿瘤中也有着重要作用[31-32]。ZHANG等[33]研究发现，抑制TNF-α通路对肺具有放射保护作用。HMGB1虽然广泛参与了人体内的炎症反应，拥有大量受体，但目前只有RAGE和TLR4被完全证实为确定的受体系统[34-35]。HMGB1释放到胞外后可以与TLR4结合并启动下游信号通路，释放活性NF-κB p65，进而诱导部分细胞因子IL-1β、IL-6和TNF-α的活化和释放，进一步促进炎症反应[36]。NF-κB p65本身在多条炎症相关的信号通路中都占据着重要作用，有研究[37]表明，可通过抑制NF-κB/NLRP3通路来改善肺纤维化。另一项研究[38]表明，通过抑制NF-κB/MAPK可以减轻脓毒性急性肾损伤小鼠的肾脏炎症。而HMGB1可以通过影响NF-κB p65的活性，进而参与到许多炎症反应中。

但在真实世界的研究中，因为肿瘤本身会分泌

部分细胞因子，因此很难通过一种细胞因子的变化水平来预测损伤的情况，甚至会出现与此前研究相悖的结果。此前一项关于IL-6和放射性肺炎的研究[39]表明，血清IL-6水平升高与欧洲裔肺癌患者发生放射性肺炎的风险相关，但在亚洲人中未检测到。BAE等[40]研究发现，患者接受放射治疗后1个月，IL-17水平相对变化显著，而TNF-α、IL-10、IL-13和TGF-β水平变化不明显。

YING等[41]发现，吡非尼酮可通过抑制TGF-β1/Smad3通路调节巨噬细胞极化和减轻放射性肺纤维化。本研究中，细胞因子的测定是使用肺组织研磨后经ELISA检测，同时动物模型是荷瘤小鼠的肺损伤模型，虽然本研究中细胞因子的水平并无统计学差异，但这仅仅代表肺组织中的细胞因子水平。肺泡灌洗液和血清中细胞因子的表达水平仍然值得探索，而HMGB1中和抗体对于TGF-β1/Smad3通路的调节作用也仍然值得深入研究。

在荷瘤小鼠模型中，单纯用PD-1抑制剂或单纯接受肿瘤放射治疗造成的肺损伤程度较轻，PD-1联合放射治疗导致放射性肺损伤较重。HMGB1中和抗体与放免联合抗肿瘤治疗同时使用，并未对肿瘤治疗造成负面作用。使用HMGB1中和抗体可减轻肺部炎性细胞的浸润，同时减轻$CD4^+$ T淋巴细胞在肺部的浸润。对于HMGB1中和抗体是否通过影响TGF-β1/Smad3或其他信号通路来减轻放射性肺损伤的相关机制仍需进一步探索。

[参 考 文 献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] 郑荣寿, 陈茹, 韩冰峰, 等 . 2022年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46(03): 221-231. DOI:10.3760/cma.j.cn112152-20240119-00035.

[3] CAO W, CHEN H D, YU Y W, *et al*. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7): 783-791. DOI: 10.1097/CM9.0000000000001474.

[4] HANANIA A N, MAINWARING W, GHEBRE Y T, *et al*. Radiation-induced lung injury: assessment and management[J]. Chest, 2019, 156(1): 150-162. DOI: 10.1016/j.chest.2019.03.033.

[5] ARROYO-HERNÁNDEZ M, MALDONADO F, LOZANO-RUIZ F, *et al*. Radiation-induced lung injury: current evidence[J/OL]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1): 9[2025-09-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33407290/. DOI: 10.1186/s12890-020-01376-4.

[6] CHEN B Q, NA F F, YANG H, *et al*. Ethyl pyruvate alleviates radiation-induced lung injury in mice[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 92: 468-478. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.05.111.

[7] ZHENG L, ZHU Q, XU C, *et al*. Glycyrrhizin mitigates radiation-induced acute lung injury by inhibiting the HMGB1/TLR4 signalling pathway[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 214-226. DOI: 10.1111/jcmm.14703.

[8] ZHANG Z F, ZHOU J L, VERMA V, *et al*. Crossed pathways for radiation-induced and immunotherapy-related lung injury[J/OL]. Front Immunol, 2021, 12: 774807[2025-09-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34925345/. DOI: 10.3389/fimmu.2021.774807.

[9] MEI Z J, TIAN X L, CHEN J, *et al*. α7-nAchR agonist GTS-21 reduces radiation-induced lung injury[J]. Oncol Rep, 2018, 40(4): 2287-2297. DOI: 10.3892/or.2018.6616.

[10] LOTZE M T, TRACEY K J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4): 331-342. DOI: 10.1038/nri1594.

[11] MURPHY K M, REINER S L. The lineage decisions of helper T cells[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(12): 933-944. DOI: 10.1038/nri954.

[12] HUANG Y J, ZHANG W Q, YU F R, *et al*. The cellular and molecular mechanism of radiation-induced lung injury[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 3446-3450. DOI: 10.12659/msm.902353.

[13] NISHIBORI M, MORI S J, TAKAHASHI H K. Anti-HMGB1 monoclonal antibody therapy for a wide range of CNS and PNS diseases[J]. J Pharmacol Sci, 2019, 140(1): 94-101. DOI: 10.1016/j.jphs.2019.04.006.

[14] ZHANG F, HUANG G, HU B, *et al*. Anti-HMGB1 neutralizing antibody ameliorates neutrophilic airway inflammation by suppressing dendritic cell-mediated Th17 polarization[J/OL]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 257930[2025-09-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24959003/. DOI: 10.1155/2014/257930.

[15] GENG Y C, SU S F, CAO L, *et al*. Effect of PD-1 inhibitor combined with X-ray irradiation on the inflammatory microenvironment and lung tissue injury in mice[J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 545-556. DOI: 10.2147/JIR.S350112.

[16] BAI J, WU B, ZHAO S, *et al*. The effect of PD-1 inhibitor combined with irradiation on HMGB1-associated inflammatory cytokines and myocardial injury[J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 6357-6371. DOI: 10.2147/jir.s384279.

[17] DOWNING L, SAWARYNSKI K E, LI J, *et al*. A simple quantitative method for assessing pulmonary damage after x irradiation[J]. Radiat Res, 2010, 173(4): 536-544. DOI: 10.1667/RR1712.1.

[18] SPIGEL D R, FAIVRE-FINN C, GRAY J E, *et al*. Five-year survival outcomes from the PACIFIC trial: durvalumab after chemoradiotherapy in stage III non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2022, 40(12): 1301-1311. DOI: 10.1200/JCO.21.01308.

[19] WANG L L, ZHAO W D, NING X, *et al*. Effect of X-ray irradiation combined with PD-1 inhibitor treatment on lung tissue injury in mice[J/OL]. Int Immunopharmacol, 2023, 123: 110775[2025-09-11]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/37562291/. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110775.

[20] WANG F, LUO Y, TIAN X L, *et al*. Impact of radiotherapy concurrent with anti-PD-1 therapy on the lung tissue of tumor-bearing mice[J]. Radiat Res, 2019, 191(3): 271-277. DOI: 10.1667/RR15182.1.

[21] YOSHIHARA-HIRATA C, YAMASHIRO K, YAMAMOTO T, *et al*.

Anti-HMGB1 neutralizing antibody attenuates periodontal inflammation and bone resorption in a murine periodontitis model [J/OL]. Infect Immun, 2018, 86(5): e00111-18[2025-09-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29531138/. DOI: 10.1128/IAI.00111-18.

[22] WANG Y P, SHI J, TAN C P, *et al*. The role of anti-HMGB1 antibody and anti-moesin antibody in ANCA-associated vasculitis [J]. Med Clin (Barc), 2023, 161(3): 101-106. DOI: 10.1016/j.medcli.2023.03.026.

[23] MARTÍN C, ROMERO S, SÁNCHEZ-PAYÁ J, *et al*. Bilateral lymphocytic alveolitis: a common reaction after unilateral thoracic irradiation[J]. Eur Respir J, 1999, 13(4): 727-732. DOI: 10.1034/j.1399-3003.1999.13d05.x.

[24] TOMA C L, SERBESCU A, ALEXE M, *et al*. The bronchoalveolar lavage pattern in radiation pneumonitis secondary to radiotherapy for breast cancer[J]. Maedica (Bucur), 2010, 5(4): 250-257.

[25] AERTS J G, HEGMANS J P. Tumor-specific cytotoxic T cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer[J]. Cancer Res, 2013, 73(8): 2381-2388. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3932.

[26] LAI J Z, ZHU Y Y, RUAN M, *et al.* Local irradiation sensitized tumors to adoptive T cell therapy *via* enhancing the cross-priming, homing, and cytotoxicity of antigen-specific CD8 T cells[J/OL]. Front Immunol, 2019, 10: 2857[2025-09-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31921127/. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02857.

[27] KISHIMOTO T, KANG S, TANAKA T. IL-6: A new era for the treatment of autoimmune inflammatory diseases[J/OL]//NAKAO K, MINATO N, UEMOTO S. Innovative Medicine: Basic Research and Development. Tokyo: Springer, 2015[2025-11-11]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500320/.

[28] WU S, CAO Z, LU R, *et al*. Interleukin-6 (IL-6)-associated tumor microenvironment remodelling and cancer immunotherapy[J/OL]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2025, 85: 93-102. DOI:10.1016/j.cytogfr.2025.01.001.

[29] WANG X, YANG C, KÖRNER H, *et al.* Tumor Necrosis Factor: What Is in a Name? [J/OL]. Cancers, 2022, 14(21): 5270. DOI: 10.3390/cancers14215270.

[30] JOSEPHS S F, ICHIM T E, PRINCE S M, *et al*. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic[J/OL]. Journal of Translational Medicine, 2018, 16(1): 242. DOI:10.1186/s12967-018-1611-7.

[31] CHEN Y, HYRIEN O, WILLIAMS J, *et al*. Interleukin (IL)-1A and IL-6: applications to the predictive diagnostic testing of radiation pneumonitis[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 62(1): 260-266. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2005.01.041.

[32] VERMA S, DUTTA A, DAHIYA A, *et al*. Quercetin-3-Rutinoside alleviates radiation-induced lung inflammation and fibrosis via regulation of NF- κB/TGF- β1 signaling[J/OL]. Phytomedicine, 2022, 99: 154004[2025-09-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35219007/. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154004.

[33] ZHANG M, QIAN J, XING X Y, *et al*. Inhibition of the tumor necrosis factor-α pathway is radioprotective for the lung[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(6): 1868-1876. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-07-1894.

[34] YANG H, WANG H C, JU Z L, *et al*. MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling[J]. J Exp Med, 2015, 212(1): 5-14. DOI: 10.1084/jem.20141318.

[35] YANG H, WANG H C, ANDERSSON U. Targeting inflammation driven by HMGB1[J/OL]. Front Immunol, 2020, 11: 484[2025-09-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32265930/. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00484.

[36] LIU S Q, CHEN Z J. Expanding role of ubiquitination in NF-κB signaling[J]. Cell Res, 2011, 21(1): 6-21. DOI: 10.1038/cr.2010.170.

[37] PENG L, WEN L, SHI Q F, *et al*. Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF- κB/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation[J/OL]. Cell Death Dis, 2020, 11(11): 978[2025-09-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33188176/. DOI: 10.1038/s41419-020-03178-2.

[38] REN Q, GUO F, TAO S B, *et al*. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF-κB p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice[J/OL]. Biomed Pharmacother, 2020, 122: 109772[2025-09-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31918290/. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109772.

[39] FU Z Z, PENG Y, CAO L Y, *et al*. Correlations between serum IL-6 levels and radiation pneumonitis in lung cancer patients: a meta-analysis[J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30(2): 145-154. DOI: 10.1002/jcla.21828.

[40] JEONG B K, KIM J H, JUNG M H, *et al.* Cytokine profiles of non-small cell lung cancer patients treated with concurrent chemoradiotherapy with regards to radiation pneumonitis severity [J/OL]. J Clin Med, 2021, 10(4): 699[2025-09-11]. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33670117/. DOI: 10.3390/jcm10040699.

[41] YING H J, FANG M, HANG Q Q, *et al*. Pirfenidone modulates macrophage polarization and ameliorates radiation-induced lung fibrosis by inhibiting the TGF-β1/Smad3 pathway[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(18): 8662-8675. DOI: 10.1111/jcmm.16821.

［收稿日期］ 2025-07-27　　［修回日期］ 2025-11-11
［本文编辑］ 向正华