

# 肺移植免疫相关的研究进展及展望

## Progress and prospect of immunological research on lung transplantation

洪文娟 洪志鹏



洪志鹏,昆明医科大学第一附属医院胸外科一级主任医师、二级教授,博士研究生和硕士研究生导师,从事医疗、教学和科研工作 30 余年。现任云南省医学会胸心外科分会副主任委员、中国医师协会云南省胸外科分会副主任委员、中华医学会创伤学会云南分会副主任委员,中国研究型医院胸外科学会委员,中国抗癌协会康复会专业常委并获云岭名医称号。

主刀完成胸外科各类手术 7 000 多例,包括人工血管肺动脉重建肺癌根治术、声门下气管修复、隆凸切除与重建、上腔静脉置换术、体外循环下局部晚期肺癌根治、心房部分切除肺癌根治术、胸膜全肺切除联合心包膈肌重建和肺移植;游离空肠间置替代颈段食管、非开胸经食管裂孔食管癌手术、结肠代食管治疗腐蚀性食管灼伤、胃底翻转胃重建联合管状胃代食管根治食管癌;外伤性陈旧性支气管断离重建;全胸腔镜肺部手术、胸腹腔镜联合食管外科手术;复杂鸡胸和漏斗胸单孔矫治、自体肋软骨胸骨重建和数字化定制 3D 打印胸壁重建、胸腔镜交感神经切断术治疗手汗症等。培养硕士研究生和博士研究生 50 余人。主持和承担国家自然科学基金、国家卫生健康委员会医药科技发展研究中心、卫生部专项和云南省科技厅昆明医科大学应用基础研究联合项目等多项课题。

【关键词】 肺移植; 移植免疫; 器官移植

中图法分类号: R563

文献标识码: A

终末期肺病患者缺乏有效的内科治疗手段,其导致的肺功能衰竭致残率和致死率高,因此肺移植已成为治疗终末期肺病的有效方法。肺移植是指采用自体肺叶、同种异体肺叶、单侧肺、双侧肺、心肺联合,甚至不同物种的异种肺置换病肺,重建肺生理功能的技术,是胸外科不可或缺的重要工作之一。1983 年首例人的肺移植获得成功,目前临床肺移植多以同种异体移植为主,自体肺移植应用于根治肺癌,异种肺移植尚未从实验室走进临床。据国际心肺移植协会(The International Society for Heart and Lung Transplantation Transplant Registry, ISHLT)资料统

计,截至 2016 年 6 月 30 日,全球成人肺移植累计 60 107 例,心肺移植 3 992 例,年成人肺移植手术量 2015 年为 4 122 例<sup>[1]</sup>。虽然肺移植在该领域取得了长足的发展,手术适应症不断拓展,在外科技术操作水平层面展现出几乎没有无法逾越的难关,但是较为突出的问题依然是移植免疫排斥反应导致的移植肺功能丧失,极大的影响了肺移植患者的生活质量和生存期。我国肺移植起步于 1979 年,作为一门新兴的学科走过了近 40 年的路程<sup>[2]</sup>。迄今全国肺移植总量 939 例,移植经验和技术得到高度认可。尽管基础研究成绩斐然,但学术前沿与国际先进水平尚存差距。2016 年我国脑死亡和心脏死亡器官捐献者达 4 080 余例,而肺移植为 204 例,仅利用了不到 5% 的供肺<sup>[3]</sup>。因此供肺的利用面临着巨大的挑战,但同

肺移植的基础及临床研究取得创新性的飞跃。

### 一、肺移植免疫的作用机理和特点

肺移植免疫是受体免疫系统与供体肺抗原的特异性免疫应答。供体肺抗原除组织相容性抗原(MHC, mH, ABO)外,与其它移植器官相比肺是进行气体交换的器官,同时外界环境的微生物从鼻孔吸入到肺泡,构建了一个自己的微生物群(microbiota),作为呼吸道守护者,参与维持呼吸生理和免疫的内环境稳定。肺移植供体和受体呼吸道内的两个微生物王国可能通过调整天然免疫的级联反应,改变抗原递呈细胞(antibody presentation cells, APCs)的能力,致敏T细胞,影响移植排斥<sup>[4-5]</sup>。临床上可见严重的排斥反应通常紧随细菌或病毒感染之后。

供体移植肺抗原与受体间的差异是导致排斥反应的物质基础,通过直接通路、部分或不完全直接通路(semi-direct pathway)和间接通路激活T细胞。直接通路指受体T细胞直接识别供体APCs表面的MHC抗原,活化CD8<sup>+</sup>T细胞和CD4<sup>+</sup>T细胞。间接通路则是受体MHC II类分子将供体MHC多态区域的多肽即脱落的抗原提呈给T细胞,活化CD4<sup>+</sup>T细胞,以及激活天然免疫系统,导致移植肺功能紊乱。通过间接识别非主要组织相容性复合物分子(non-major histocompatibility complex molecules, non-MHC)基因编码的异己抗原决定簇,激活受体单核吞噬细胞与分化,增强异体反应T细胞的致敏。不完全直接通路是供体完整的MHC分子转移给受体的APCs,产生免疫应答,间接识别的CD4<sup>+</sup>T细胞交叉调控直接识别的CD8<sup>+</sup>T或CD8<sup>+</sup>T细胞的功能<sup>[6-8]</sup>。

移植肺所携带的异体MHC抗原细胞如过路白细胞(主要是APCs)、淋巴细胞和碎片组织进入受体,激活CD8<sup>+</sup>T和CD4<sup>+</sup>T细胞,CD8<sup>+</sup>T细胞直接攻击移植肺的靶细胞,CD4<sup>+</sup>T释放IL2等细胞因子;B细胞在辅助细胞2(type2 T helper, Th2)细胞释放IL3、IL4、IL5的帮助下,转化为浆细胞并产生供体特异性抗体(donor specific antibodies, DSA),激活补体,引起补体C4裂解为小分子片段的C4a和大分子片段的C4b,再转换为补体经典活化途径裂解成份C4d,与毛细血管基底膜、内皮细胞IV型胶原结合,DSA作用于移植体内皮细胞

反应损伤均在内的抗体介导排斥反应(antibody-mediated rejection, AMR),导致移植肺失败。AMR是以移植肺功能障碍、组织病理学改变和DSA为特征的临床综合征,其诊断依据有赖于组织病理学改变,治疗通常以综合管理为主,包括静脉内免疫球蛋白(intravenous immune globulin, IVIG)、血浆置换、单抗和C1酯酶抑制剂等处理<sup>[9-12]</sup>。

### 二、外泌体、DMAPs、mi RNA 和长链非编码RNA

外泌体(exosomes)直径均30~100 nm,从许多细胞释放,在生理、病理和移植免疫系统都发挥着重要的作用。经过外泌体转导的细胞与细胞间远程通讯,将完整的供体MHC分子信息从供体树突状细胞传递至受体树突状细胞表面,参与肺移植急性排斥反应和慢性排斥如闭塞性细支气管炎(bronchiolitis obliterans syndrome, BOS)的免疫发病过程<sup>[13]</sup>。

移植免疫应答不但能够识别异体抗原,还能够识别“危险信号”(danger/damage associated molecular patterns, DMAPs),DMAPs源于机体自身的内源性分子。它们是细胞外热休克蛋白(extracellular heat shock protein, eHsp72)、尿酸晶体(uric acid crystals)、线粒体DNA、高迁移率族蛋白(high mobility group box1, HMGB1)和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),可激活天然免疫和机体的无菌性炎症反应<sup>[14]</sup>。

mi RNA是小的内源性非编码RNA分子,长约22个核苷酸,转录后调控基因表达和免疫过程,调节免疫细胞的增殖与分化(miR-185-5p, miR-200a-3p),抑制NF- $\kappa$ B的表达(miR-26a-5p, miR-140-3p, miR-339-5p)<sup>[15]</sup>。

长链非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNA)是非蛋白编码转录长度大于200的核苷酸。lncRNA在移植免疫中的作用与激活免疫相关,研究表明发生免疫移植排斥反应时,lncRNA表达升高,有效的抗排斥治疗后恢复正常。小鼠心脏移植后lncRNA表达上调,说明lncRNA可以用于早期诊断或预测急性排斥反应<sup>[16]</sup>。

三、移植肺的保护和保存、缺血再灌注损伤激发的炎症事件与免疫损伤

粘附分子 ICAM 的升高<sup>[17]</sup>。我们课题组长期聚焦于供体移植肺的保护研究,在离体肺损伤的保护及其机制方面取得了系列原创性成果,通过动物实验提出了更加符合生理的保存方法,更好的保护了离体肺的器官活性、组织结构及正常功能,降低了免疫损伤,有望为肺移植患者提供优质肺源。

缺血再灌注损伤对移植免疫排斥的发生与发展具有重要的影响,天然免疫细胞表面的 Toll 样受体能够识别缺血再灌注损伤产生的 DMAPs,产生天然免疫反应以及 T 细胞活化所需的信号(粘附分子、细胞因子等),增强 T 细胞介导的排斥反应。减轻缺血再灌注损伤的天然免疫损伤,则有助于调控抗原特异性排斥反应<sup>[18]</sup>。

#### 四、表观遗传与移植免疫

表观遗传是 DNA 序列以外的化学标记编辑的遗传密码,通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑、遗传印记、随机染色体失活和非编码 RNA 从多个层面调控基因表达,可实现对移植免疫的精准调控<sup>[19]</sup>。以 miRNA 作为移植免疫耐受的生物标记物,通过 miRNA 芯片能够发现具有调控移植排斥反应的 miRNA。

#### 五、免疫抑制和免疫耐受诱导

肺移植的适应证不断向儿童、高龄、HIV 和 HCV 感染性疾病患者或以前不能移植的危重症病人扩大。肺移植排斥反应的大小取决于宿主识别异体抗原 T 细胞的数量、攻击频率、细胞分化阶段和先天免疫的激活程度。肺移植急性排斥反应典型临床表现为呼吸困难、低热、肺门周围间质性浸润、缺氧和白细胞升高。急性排斥反应的次数和严重程度和慢性排斥反应的发生明显相关,慢性排斥的病理特征为 BOS,但是并非所有的移植后 BOS 都是免疫介导,误吸或慢性感染亦可导致。慢性移植肺功能不全(chronic lung allograft dysfunction, CLAD)是目前远期生存的一大障碍,其危险因素有感染(巨细胞病毒、曲霉菌、假单胞菌)、胃食管返流、AMR 等。免疫抑制药物是肺移植取得成功的关键,所有临床移植均依赖于免疫抑制药物治疗移植排斥。

联合用药显著增强了抗移植排斥的效果:

①钙调磷酸酶抑制剂(calcineurin inhibitor, CNI)

针对 AMR 的临床用药有单克隆抗体(利妥昔单抗、依库丽单抗、贝利木单抗、托珠单抗)、普罗沙福、硼替佐米、卡非佐米和 IVIG、血浆置换;针对 CLAD 的有阿奇霉素、环孢素雾化吸入、孟鲁司特;抗纤维化的尼达尼布、吡非尼酮和甲氨蝶呤;治疗顽固性排斥反应的有抗胸腺细胞球蛋白、阿仑单抗、体外光分离置换(extracorporeal photopheresis, ECP)和全身淋巴组织照射(total lymphoid irradiation, TLI)。他克莫司长效释放剂、舌下含服剂和静脉给药的新型制剂,可维持免疫治疗。通过药代动力学的监控,达到免疫抑制剂用药最小化、疗效最大化,并最大限度降低毒副作用(肾毒性、神经毒性、高氨血症和恶性肿瘤),提高无病生存期(CLAD-free survival)。免疫治疗在保护移植肺的同时还需要避免长期用药的毒性作用。

如何才能不以牺牲全身免疫防御能力为代价,接受外来的器官,使移植肺被作为受体自身器官的一部分,不会被排异,建立免疫耐受,或许是解决该问题的选项之一:①功能性免疫耐受,不用免疫抑制药,受体免疫系统不排斥供体器官;②部分免疫耐受,低剂量免疫抑制药即可维持治疗,防止急、慢性排斥;③自发性免疫耐受,移植手术后未经任何特殊的诱导手段,而自发形成的免疫耐受。免疫耐受是异体器官与宿主共存无免疫损伤的一种状态,形成机制与嵌合体(微嵌合、全嵌合、混合嵌合)等有关。通过阻断特异性移植免疫应答、主动免疫、诱导免疫偏离、干细胞、胸腺移植和复合组织移植建立嵌合体(chimerism)等手段产生移植耐受,(如应用 IL-2 受体拮抗药巴利昔单抗(basiliximab)或胸腺细胞球蛋白),使肺移植患者生存获益<sup>[20-23]</sup>。

研究并阐明肺移植的免疫应答和免疫耐受机制,降低肺移植后的排异反应,尤其是慢性排异的发生,延长移植肺的使用寿命,仍有许多基础研究尚待深入。

#### 六、肺的再移植

肺的再移植手术适应证可概括为气道并发症、原发性移植植物功能障碍(primary graft dysfunction, PGD)导致急性移植肺衰竭、难治性排斥反应和 CLAD。有的病人再移植术后获得了

96.5%、88.9%、74.5%和63.8%;首次移植组为99.2%、98.2%、89.3%、68.1%和53.1%,可见再移植5年生存率高出首次移植10.7个百分点。通常65%的患者再移植术后5年内发生慢性排斥,28.5%的患者1年内发生过1次急性排斥反应。对已经发生初次移植排斥的受体进行第二方供体肺的再移植,依然遵循初次移植排斥的基本规律。初次与再次移植的排斥反应交叉,DSA负荷增大,再移植的免疫状态可能更为复杂<sup>[24-25]</sup>。

## 七、异种移植

异种移植的免疫障碍包括:①受体内天然抗体介导的超级排斥反应;②急性体液异种移植排斥反应和细胞介导的排斥反应;③血栓微血管病和慢性排斥反应。基因工程从源头上很大程度的克服了超急排斥反应和保护移植器官功能。2003年第一个 $\alpha$ -1,3-半乳糖基转移酶基因敲除( $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase gene-knockout, GTKO)的基因修饰猪产出后,将基因修饰猪的心脏移植给狒狒,存活了945 d,肾移植存活了136 d,肺移植却只存活了1 d多。除了形态学改变外,与肺内丰富的巨噬细胞聚集相关,并涉及区域免疫即组织滞留免疫细胞(tissue-resident lymphocytes)机制。单基因修饰只能消除单一因素的影响如人类补体或血栓调节蛋白基因、CD39、人类组织因子途径抑制剂基因等的转入。人工核酸内切酶介导的基因编辑技术的发展,例如:锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFNs)技术、转录激活因子样效应物核酸酶技术(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)、规律成簇的间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)技术,现今已能构建多基因修饰,随着基因编辑技术的进步,将有力的促进异种移植从实验室向临床转化,但能否实现异种肺移植,临床应用还面临着巨大的挑战<sup>[26-27]</sup>。

## 八、组织工程学

肺移植现今与基础医学有着广泛的学科联系,通过多学科交叉和肺移植团队建设,使知识结构向基础医学纵向延伸,将把新的研究成果及时整合,积极参与到国际竞争与协作中,并利用转化医学(translational medicine)将基础研究和临床紧

源制造脱细胞支架成为了现实。脱细胞支架由细胞外基质构成,宏观和微观更接近解剖结构。通过复合因子诱导,可调节细胞的生长、繁殖、分化。理想的细胞外基质应具备良好的生物相容性,在体内不引起炎症反应和毒性反应;能被自身组织所取代;在体内可保持特定形状;表面化学特性和表面微结构利于细胞的粘附和生长;降解速率可根据不同细胞的再生速率而进行调整。脱细胞后支架的质量评估:可通过分析基质超微结构、毛细血管基底膜和肺泡小叶间隔是否保留完整,其中上皮细胞和血管内皮细胞是否容易黏附和分化将是脱细胞是否成功的重要指标。肺组织工程为解决移植免疫排斥带来了新希望,目前仍有许多研究障碍,需要更多的努力和探索<sup>[28]</sup>。

## 九、免疫功能调控

肺移植的免疫调控贯穿于免疫应答的全过程。移植免疫可以通过多层面、多种机制包括表观遗传调控机体的免疫细胞功能。移植损伤可能改变染色质的结构和功能,影响基因的转录与表达,通过mRNA修饰如RNAm6A的修饰从而实现基因转录后调控。m6A修饰经IL-7/STAT5/SCOS信号通路控制T细胞免疫稳态。蛋白质翻译后修饰(post-translational modification, PTM)参与了关键免疫信号通路的调控,实现对免疫细胞发生、分化、活化、功能和终止,以及体液免疫的精准调控。通过能量代谢途径亦可影响免疫系统对DMAPs的感知和应答<sup>[29]</sup>。

## 十、结语

随着肺移植手术适应证的不断拓展,呼吸道微生态免疫、AMR、外泌体、DMAPs、miRNA和lncRNA,以及免疫细胞功能的表观调控、PTM调控和细胞代谢调控,为我们深入研究肺移植免疫机制的全貌提供了契机。移植排斥反应涉及多种免疫细胞,T细胞和B细胞是机体的二大卫士,在移植排斥过程中发挥着重要作用。在移植的实体器官中,肺的获取、保护和保存有其特殊性。临床免疫抑制剂以联合应用、局部给药和诱导免疫耐受为主要措施。再移植是治疗肺移植术后移植肺衰竭的重要手段。异种移植的免疫学障碍通过基因工程、嵌合体诱导耐受等技术逐渐得到克服。组织工程肺为扩大供肺来源提供了新的途径。

- international society for heart and lung transplantation: thirty-fourth adult lung and heart-lung transplant report-2017; Focus theme: Allograft ischemic time [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2017, 36 ( 10 ): 1047-1057.
- 2 张涛,洪文娟,洪志鹏. 肺移植的近况及进展[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2012, 5( 5 ): 457-461.
- 3 陈静瑜. 努力打造与国际接轨的肺移植团队[J]. 实用器官移植电子杂志, 2017, 5( 5 ): 329-330.
- 4 Bellinghausen C, Rohde GGU, Savelkoul PHM, et al. Viral-bacterial interactions in the respiratory tract [J]. *J Gen Virol*, 2016, 97 ( 12 ): 3089-3102.
- 5 Lei YM, Chen L, Wang Y, et al. The composition of the microbiota modulates allograft rejection [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126( 7 ): 2736-2744.
- 6 Sivaganesh S, Harperl SJ, Conlon TM, et al. Copresentation of intact and processed MHC alloantigen by recipient dendritic cells enables delivery of linked help to alloreactive CD8 T cells by indirect-pathway CD4 T cells [J]. *J Immunol*, 2013, 190( 11 ): 5829-5838.
- 7 Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, et al. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells [J]. *J Immunol*, 2004, 173( 8 ): 4828-4837.
- 8 Jordan SC, Lorant T, Choi J, et al. IgG endopeptidase in highly sensitized patients undergoing transplantation [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377( 5 ): 442-453.
- 9 Agbor-Enoh S, Jackson AM, Tunc I, et al. Late manifestation of alloantibody-associated injury and clinical pulmonary antibody-mediated rejection: Evidence from cell-free DNA analysis [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2018, 37( 7 ): 925-932.
- 10 Witt CA, Gaut JP, Yusen RD, et al. Acute antibody-mediated rejection after lung transplantation [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2013, 32 ( 10 ): 1034-1040.
- 11 Hachem RR. Acute rejection and antibody-mediated rejection in lung transplantation [J]. *Clin Chest Med*, 2017, 38( 4 ): 667-675.
- 12 Valenzuela NM, Reed EF. Antibody-mediated rejection across solid organ transplants: manifestations, mechanisms, and therapies [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127( 7 ): 2492-2504.
- 13 Gunasekaran M, Xu Z, Nayak DK, et al. Donor-derived exosomes with lung self-antigens in human lung allograft rejection [J]. *Am J Transplant*, 2017, 17( 2 ): 474-484.
- 14 Oberbanscheidt MH, Zeng Q, Li Q, et al. Non-self recognition by monocytes initiates allograft rejection [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124 ( 8 ): 3579-3589.
- 15 Gharib SA, Edelman JD, Ge L, et al. Acute cellular rejection elicits distinct microRNA signatures in airway epithelium of lung transplant patients [J]. *Transplant Direct*, 2015, 1( 10 ): e44.
- 16 Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40( 14 ): 6391-6400.
- 17 孙相华,洪志鹏. 肺移植供肺保存的现状与进展[J/CD]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2012, 5( 2 ): 170-173.
- 18 Ioannou A, Dalle Lucca J, Tsokos GC. Immunopathogenesis of ischemia/reperfusion-associated tissue damage [J]. *Clin Immunol*, 2011, 141 ( 1 ): 3-14.
- 19 Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: definition, mechanism and clinical perspective [J]. *Semin Reprod Med*, 2009, 27( 5 ): 351-357.
- 20 Djamali A, Kauffman DB, Ellis TM, et al. Diagnosis and management of antibody-mediated rejection: current status and novel approaches [J]. *Am J Transpl*, 2014, 14( 2 ): 255-271.
- 21 Caim J, Yek T, Banner NR, et al. Time-related changes in pulmonary function after conversion to tacrolimus in bronchiolitis obliterans syndrome [J]. *J Heart Lung Transpl*, 2003, 22( 1 ): 50-57.
- 22 Furuya Y, Jayarajan SN, Taghavi S, et al. The impact of alemtuzumab and basiliximab induction on patient survival and time to bronchiolitis obliterans syndrome in double lung transplantation recipients [J]. *Am J Transplant*, 2016, 16( 8 ): 2334-2341.
- 23 2017 American Transplant Congress Abstracts [J]. *Am J Transplant*, 2017, 17( Suppl 3 ): 5-815.
- 24 Aigner C. Retransplantation [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2015, 20( 5 ): 521-526.
- 25 Kawut SM. Lung retransplantation [J]. *Clin Chest Med*, 2011, 32 ( 2 ): 367-377.
- 26 Cooper DK, Ekser B, Ramsoondar J, et al. The role of genetically engineered pigs in xenotransplantation research [J]. *J Pathol*, 2016, 238( 2 ): 288-299.
- 27 Ezzelarab M, Garcia B, Azimzadeh A, et al. The innate immune response and activation of coagulation in  $\alpha 1$   $\beta$ -galactosyltransferase gene-knockout xenograft recipients [J]. *Transplantation*, 2009, 87 ( 6 ): 805-812.
- 28 Nichols JE, Niles J, Riddle M, et al. Production and assessment of decellularized pig and human lung scaffolds [J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19( 17-18 ): 2045-2062.
- 29 Pearce EJ, Pearce EL. Immunometabolism in 2017: Driving immunity: all roads lead to metabolism [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18( 2 ): 81-82.

( 收稿日期: 2018-05-13)