

肺移植缺血再灌注损伤肺保护的研究进展

宫素岗 刘锦铭 (上海肺科医院呼吸科 200433)

作者简介

刘锦铭 (1959 -), 男, 医学硕士。呼吸内科主任、教授、硕士研究生导师。上海市肺科医院呼吸内科副主任、肺功能室主任。《中华结核和呼吸杂志》、《中华医学杂志》特邀审稿专家。

目前, 肺移植手术已成为治疗终末期肺病的唯一有效手段。尽管已有许多改进措施, 肺移植术后缺血再灌注损伤 (Ischemia Reperfusion Injury, IR I) 仍是导致手术失败的主要原因之一 (致死率达 16% ~ 25%), 也是移植后发生慢性排斥反应的重要危险因素, 影响长期生存率。因此, 研究其发生机制及保护措施显得尤为重要。

1 缺血再灌注肺损伤的发生机制

1.1 自由基在 IR I 中的作用

肺毛细血管内皮细胞内含丰富的黄嘌呤脱氢酶, 缺血时黄嘌呤脱氢酶被转化为黄嘌呤氧化酶, 再灌注时黄嘌呤氧化酶降解腺苷产生大量的自由基, 尤其是氧自由基。氧自由基可介导脂质过氧化, 抑制蛋白质功能, 诱发血管内皮细胞膜损伤导致内皮细胞水肿, 毛细血管阻塞, 还可促进炎症因子产生, 中性粒细胞聚集和活化, 从而引发肺组织损伤, 导致肺功能下降。

1.2 钙超载在 IR I 中的作用机制

当缺血发生时, 细胞内 ATP 含量减少, 钠泵活性降低, 造成细胞内 Na^+ 含量增多, 细胞水肿; 再灌注时, 细胞内高 Na^+ 迅速激活 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白, Na^+ 得以向细胞外转运, 同时, 大量 Ca^{2+} 进入细胞, 这是缺血再灌注钙超载形成的主要途径。钙超载可以使细胞膜、线粒体和肌浆网膜损伤, 进一步增加膜的通透性, 使内皮细胞水肿; 干扰线粒体氧化磷酸化, 使 ATP 生成减少; 还可以增强 Ca^{2+} 依赖性蛋白酶活性, 加速黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶, 促进自由基生成, 损伤肺组织。

1.3 血管内皮细胞和中性粒细胞介导的 IR I

在 IR I 发生早期, 血管内皮细胞内原先存在的一些蛋白质前体被活化, 释放多种细胞黏附分子, 促

进中性粒细胞黏附和聚集、血小板沉积、造成微血管堵塞。随着再灌注时间的延长, 中性粒细胞、血管内皮细胞表面的细胞黏附分子表达进一步增加, 中性粒细胞和内皮细胞发生黏附。黏附的中性粒细胞可释放化学趋化物质, 如白三烯、血小板激活因子 (Platelet Activating Factor, PAF)、血栓素 A_2 (Thromboxane A_2 , TXA_2)、肿瘤坏死因子 - (Tumor Necrosis Factor, TNF-) 等, 加重细胞间黏附和微血管堵塞。同时损伤的血管内皮细胞肿胀, 导致管腔狭窄, 血液灌流受阻。激活的血管内皮细胞和中性粒细胞可释放大量的缩血管物质, 如内皮素, 血管紧张素 - 、 TXA_2 等。而扩血管物质如一氧化氮 (Nitrous Oxide, NO), 前列环素类物质 (PGI_1 , PGI_2) 等合成和释放减少, 造成微血管舒缩功能的改变, 加重细胞的损伤和坏死。

2 肺移植缺血再灌注肺损伤的保护性措施

2.1 自由基清除剂 (Free Radical Scavenger, FRS) 的应用

FRS 在 IR I 中起主要作用。有害自由基的产生可引起一系列细胞内毒素链式反应, 使质膜过氧化, 引起细胞器损伤及细胞死亡, 还可引起核酸损害, 导致细胞内酶的失活。FRS 可清除 IR I 过程中形成的自由基, 起到对机体的保护作用。FRS 主要有两大类: 低分子 FRS 和酶性 FRS, 它们可单独应用, 也可以联合应用以对抗自由基对机体的损伤作用。

胡尔滨等在还原性谷胱甘肽 (低分子 FRS) 预处理对肺 IR I 的保护作用的研究中发现, 预处理组中多指标 (丙二醛、凝血因子、游离血红蛋白浓度) 含量均低于对照组。说明还原性谷胱甘肽预处理可减轻早期 IR I。其机制可能是还原性谷胱甘肽

提供电子，使自由基还原，降低自由基反应。

Y amash ita等研究了一种酶性清除剂超氧化物歧化酶(Superoxide Dism utase, SOD)在移植肺IR I中的作用。结果显示对照组肺血管阻力显著增高，而再灌注前给予SOD组无明显变化。给予SOD的瘪肺组、膨肺组和不给SOD的膨肺组，肺血管含水量及血气要明显好于不给SOD的瘪肺组。说明SOD无论在瘪肺还是膨肺，对肺IR I的保护作用是有效的。Sh im izu等在用SOD和过氧化氢酶与去除白血球两种手段对兔肺IR I作用的研究中发现，SOD和过氧化氢酶连用可以降低自由基对肺组织的损害，而不能缓解白细胞的损伤作用。

2.2 钙拮抗剂的运用

再灌注后钙向细胞内流动是由于缺血所诱发的细胞毒性反应之一。细胞内钙离子的增加可激活磷脂酶，促进膜磷脂降解，增加膜通透性，而且通过增强钙离子依赖性蛋白酶活性，促进自由基生成，加重肺水肿，进一步使肺组织和肺功能受到损害，故阻断钙内流对防止再灌注后肺损伤有良好的作用。

Karck等对钙拮抗剂尼群地平，地尔硫卓在IR I中的作用做了研究。尼群地平组和地尔硫卓组湿干比明显小于对照组。这可能与钙离子拮抗剂阻断了钙离子内流，减轻了钙超载对肺的损伤有关。动物实验表明：钙通道阻滞剂异博定可保护缺血肺免受再灌注损伤，而且异博定与胍苯哒嗪相比，前者缺血引起的损伤少于胍苯哒嗪，这说明具有阻滞钙通道作用的血管扩张药物具有更好的效果。基于这一经验，出现了一种含异博定的新的灌洗液。目前，钙拮抗剂减轻IR I的研究报道很多，但在肺移植保护方面非常少，值得关注。

2.3 与炎症介质、细胞因子等血管活性物质有关药物的应用

2.3.1 与NO有关的物质

NO主要通过cGMP途径发挥作用，其可以舒张血管，抑制血小板聚集和黏附，抑制白细胞趋化运动，减少超氧阴离子产生，降低毛细血管通透性，减少渗出。在肺脏，NO可以调节肺血管张力，改善通气/血流比值。鉴于这些特性，NO在肺IR I保护方面的研究也逐渐开展起来，为临床肺移植的应

用提供了实验依据。

Bach a等在猪非心跳供体肺移植实验中研究了NO的保护效应。结果显示，NO处理组表现出更低的肺血管阻力，更好的氧化效应，更高的生存率。故认为NO可以减轻肺移植的IR I，主要是因为NO可以预防IR I引起的肺血管收缩，抑制外周血液循环中的多形核白细胞与内皮细胞黏附，从而减轻炎症反应，保护肺组织。Fukahara等在犬肺IR I实验中发现NO可以减轻肺IR I后的肺动脉高压，而不影响全身动脉压；可以抑制IR I后SOD的降低而提高清除OFR的能力，减轻肺IR I。

如今有许多学者通过补充外源性NO来保护肺损伤，改善肺功能。外源性NO包括NO供体(如硝酸甘油)和NO气体。W ittw er等发现，在Perfadex液中加入硝酸甘油能明显改善供肺的氧合，降低肺血管阻力及吸气峰压。进一步研究发现在肺灌洗及冷保存时加入硝酸甘油，对延长供肺保存时间的作用最明显，而在再灌注时加入硝酸甘油效果不明显。Aitch ison等在猪肺移植中发现，肺灌注时吸入20 ppm NO后，肺血管阻力和供肺氧合明显改善，供肺的热缺血损伤明显减轻。吸入NO不但能扩张血管，还能抑制炎症反应。Sch utte等在兔肺移植中发现，缺血前吸入10 ppm NO能明显降低供肺的血管通透性，减轻肺水肿。这可能与吸入NO促进粒细胞凋亡，抑制氧化爆发及炎症因子(TNF- α 、IL-6等)的表达有关。基因工程具有强大的生命力，目前有许多学者用此进行了肺移植IR I的保护性研究。Suda等在大鼠肺移植模型中，对供体动物注射 5×10^9 pfu腺病毒编码的内皮结构型一氧化氮合酶(cNOS)基因作为实验组，发现实验组的动脉氧分压(PaO₂)显著高于对照组，而髓过氧化物酶活性显著低于对照组。其原因就是通过腺病毒介导的cNOS基因转移提高体内的NO浓度，使NO发挥作用，减轻肺IR I，改善移植后的肺功能。

2.3.2 内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)受体拮抗剂的应用

ET-1参与IR I许多病理生理过程。有研究表明，IR I可引起肺动脉内皮受损导致ET-1升高，并以自分泌-旁分泌的形式作用于肺阻力血管平滑

肌上的ET-A受体,导致肺血管尤其是微小动脉收缩。另外,ET-1可直接抑制血管内皮细胞NOS导致NO产生减少,增加肺血管阻力,引起肺间质水肿,影响肺换气功能。因此,有望通过ET-1受体拮抗剂阻断ET-1,减轻肺IRI。

安君等用家犬左肺移植模型研究了ET-1与其拮抗剂在肺移植早期的表现,发现正常肺动脉对ET-1表现出先舒张后收缩(一过性舒张后持续收缩反应)的双向反应。用ET-B受体阻断剂前处理可使其舒张反应消失而收缩反应明显增强;ET-A受体阻断剂前处理可使其收缩反应部分消失而舒张反应明显增强。原因是ET-1所致的舒张反应是通过作用于内皮细胞的ET-B受体后释放内皮源性NO来实现的。Shennib等在犬左肺移植实验中证实,非选择性TA/ETB受体拮抗剂可以减少诱导型NOS的表达,可以降低细胞凋亡的程度,从而减轻肺的IRI,改善肺功能,与之前的实验结论相同。

2.3.3 前列环素类物质的应用

前列环素类物质包括 PGI_1 、 PGI_2 、 PGF_2 等一系列血管活性物质,其中 PGI_1 、 PGI_2 可以扩张血管,增加局部组织血流,进而提高组织功效。在肺IRI时,这类物质的减少是促发再灌注损伤,加重再灌注损伤的重要因素,可以激活白细胞,促进血小板聚集,参与无灌流现象的发生;产生氧自由基,从而导致肺内多形核白细胞积聚,炎症反应,脂质过氧化等一系列病理现象的发生,引起IRI。因此通过外源性 PGI_1 等前列环素类物质阻断上述现象的发生日益得到重视,也取得了一定的效果。

周永安等在对 PGI_1 的研究中发现 PGI_1 组的肺湿干比,肺通透指数,支气管肺泡灌洗液中白细胞和中性粒细胞数百分比,血清中TNF- α 含量,丙二醛含量均明显低于单纯移植组,SOD活性明显高于单纯移植组。说明 PGI_1 对肺损伤的保护作用与其抑制TNF- α 的产生和释放以及中性粒细胞的浸润和激活有关。同时 PGI_1 降低肺组织丙二醛含量,并提高SOD活性,也参与了肺组织损伤的保护作用。另外,在再灌注损伤过程中,中性粒细胞激活是氧自由基产生的一个重要来源,可以推测 PGI_1 可能是通过抑制中性粒细胞活性减轻氧自由

基损伤,保护肺功能的。Lockinger等在兔IRI模型实验中发现雾化吸入 PGI_1 、伊洛前列素(长效前列环素类似物)和硝普钠(提供NO)三种物质后,可明显改善毛细血管前肺动脉压和毛细血管通透性,提高肺功能,故认为此法可被应用于肺移植中,作为肺IRI的保护手段。de Perro等为了探讨 PGI_1 对肺移植IRI保护机制进行了大鼠单肺移植模型实验,在再灌注时加入 PGI_1 的处理组,TNF- α 、IFN- γ 、IL-12明显低于其它组,而作为保护因子的IL-10明显高于其它组,但凋亡细胞数目和bcl-2(抑制细胞凋亡的原癌基因)表达各组之间并无显著差别。可见 PGI_1 减轻IRI及提高肺功能的机制是通过前炎症和抗炎症细胞因子的转换来介导的,而不是通过调控细胞凋亡水平实现的。

2.3.4 PAF拮抗剂的应用

已经证实,PAF在肺IRI的白细胞黏附中起重要作用,其可以激活白细胞,刺激白细胞黏附,趋化和颗粒释放,造成肺组织损伤;能增加白细胞表面黏附的糖蛋白表达和激活,促进白细胞与内皮细胞黏附;还能激活内皮细胞,引起细胞形态学变化及血管壁通透性增加,导致肺水肿等一系列变化。因此,通过阻断PAF以减轻肺IRI也不失为一种很好的保护方法,并且在这方面的研究也证实了这一点。

Iwazaki等做了对FR 128998(一种PAF抑制剂)与肺IRI在犬肺移植中的关系的研究。FR 128998组的气道峰压、Pao₂、心输出量显著好于对照组,而肺间质水肿,透明膜局限化很轻微,多形核白细胞浸润也很少,其原因可能是FR 128998抑制了PAF释放,减轻了白细胞对组织的损伤。Qayumi等研究了PAF在IRI发生机制中的作用以及PAF拮抗剂TCV-309单独或与 PGI_1 联合对体外肺保存期延长到20h的保护效应。实验发现,肺移植24h后PAF和TXB₂水平只在对照组有显著提高,TCV-309组和联合 PGI_1 组的血流动力学、气体交换指标和肺顺应性都明显优于对照组。用PAF拮抗剂TCV-309可对肺体外缺血保存期延长到20h,减轻移植后肺IRI,而 PGI_1 可能只起一个附加保护效应。除动物实验的研究外,有学者还在临床实践中

对P AF拮抗剂的应用进行了评价,Wittwer等将P AF拮抗剂BN 52021用于双肺移植患者,在32 h的观察时间内,肺泡动脉氧分压差在低剂量组和高剂量组中有明显改善趋势,其中P AF浓度在高剂量组中最低,故认为高浓度的P AF拮抗剂BN 52021易和临床肺保存方法相结合,在肺移植中有更高的应用前景。

2.3.5 核因子 κ B(Nuclear Factor κ B,NF- κ B)抑制剂的应用

肺IR I期间,随着再灌注时间的延长逐渐出现肺功能降低。再灌注后NF- κ B蛋白和mRNA表达明显增加,表明存在NF- κ B的激活。它的激活在各种细胞外刺激信号转导调控中起核心作用。活化的NF- κ B能与DNA链的特定B序列结合,启动和调节众多与免疫和炎症反应有关的基因转录,包括前炎因子TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8以及使白细胞聚集的炎症介质和黏附分子。NF- κ B激活导致上述介质的生成增加,加重了IR I。NF- κ B抑制剂可以阻断NF- κ B的生成和激活,保护肺功能。

王东等在离体肺再灌注期间运用NF- κ B抑制剂N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)对大鼠肺的保护作用做了研究。结果发现,再灌注60 min后,实验组PaO₂降低和肺血管阻力升高明显低于对照组;再灌注后,与对照组比较实验组肺组织湿干比,髓过氧化物酶活性明显降低,NF- κ B蛋白和mRNA表达明显减少。表明再灌注期间运用NAC能有效抑制NF- κ B表达,明显改善呼吸功能。

Ishiyama等应用IkappaB Superrepressor基因转导的NF- κ B抑制剂对肺移植后IR I的保护作用进行了研究。结果显示,移植24 h后,实验组的氧合作用较对照组明显提高;再灌注24 h后,实验组肺水肿和中性粒细胞浸润很轻;移植术后2 h后,NF- κ B细胞的激活和凋亡细胞的死亡显著减少。说明这种基因转导的抑制剂是通过抑制NF- κ B细胞的激活和细胞凋亡保护肺组织,改善肺功能的。NF- κ B

抑制剂是一种很有潜力的减轻IR I,提高肺功能的药物。

2.3.6 IL-10的应用

IL-10是人体内自然产生的抗炎介质,具有多种抑制性效应,可广泛抑制炎症介质,抑制肺内中性粒细胞聚集及脱颗粒,重建体内炎症介质及抗炎介质的平衡。因此可以应用IL-10抑制炎症反应,主要是抑制TNF- α ,达到干扰IR I,保护肺组织及肺功能的目的。

周勇安等在大鼠移植肺IR I的实验中,研究了IL-10的保护作用及机制。经气管内给予受体大鼠IL-10可明显降低肺湿干重比、肺通透指数,BALF中中性粒细胞百分比和血清TNF- α 含量。说明IL-10对肺损伤的保护作用与其抑制TNF- α 的产生或释放以及中性粒细胞的浸润和激活有关。Itano等研究了腺病毒介导的基因转导IL-10在鼠移植肺IR I中的作用。结果,实验组PaO₂显著高于对照组,而PaCO₂、髓过氧化物酶、诱导型NOS(iNOS)mRNA表达均低于对照组。原因是IL-10抑制了炎症反应,使中性粒细胞浸润减少,下调了NOS mRNA表达,改善了移植肺的气体交换,从而改善了移植肺功能。

2.4 其它物质的应用

抑肽酶是从牛肺中提取的一种丝氨酸蛋白酶抑制剂。有研究证实抑肽酶可以减轻肺IR I。另外如TNF- α 抑制剂、己酮可可碱等也在实验中证实对肺IR I有一定的保护作用。最近基因治疗也在肺IR I方面得以深入开展,对携带IL-10、可溶性TNFR I-Fc融合蛋白等基因在该领域进行的研究取得了可喜的应用前景。

3 结语

迄今为止,对于肺IR I的研究,绝大部分是在实验动物身上进行的,然而这些实验资料却已经为缺血再灌注损伤的临床防治提供了重要的启示和借鉴,为临床研究奠定了重要的基础。综上所述,在肺IR I方面的研究已取得一定的成果,为临床肺移植提供了理论依据,但真正应用于临床尚需进一步的努力,相信随着医学科学的发展肺移植相关技术会逐渐完善并广泛开展,为全人类带来福音。

学习提纲

1. 掌握IR I保护措施。
2. 熟悉IR I发生机制。