

肺移植后闭塞性细支气管炎免疫学发病机制及治疗新策略

周琳¹综述, 高文³, 路丽明^{1,2}审校

(1. 上海交通大学附属胸科医院实验中心, 上海 200030; 2. 上海交通大学医学院免疫与微生物学系, 上海市免疫学研究所, 上海 200025; 3. 复旦大学附属华东医院胸外科, 上海 200040)

摘要: 尽管肺移植相关医学技术发展迅速, 但肺移植后慢性免疫排斥导致的移植物失功, 临床表现为闭塞性细支气管炎, 仍是制约患者长期生存率最主要因素。闭塞性细支气管炎发生的主要病因是同种异体移植免疫排斥反应。因此诱导机体免疫耐受是目前减轻同种异体移植排斥, 提高移植物长期生存率的主要方法。本文将就肺移植后慢性免疫排斥发生的机制, 及诱导肺移植免疫耐受的策略进行综述。

关键词: 肺移植, 慢性免疫排斥, 闭塞性细支气管炎, 移植耐受

中图分类号: R392.4

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2016)01-0067-05

肺移植是目前治疗慢性阻塞性肺病、特发性肺纤维化、特发性肺动脉高压等终末期肺部疾病的唯一方法^[1]。世界范围内肺移植手术例数显著增加, 虽然得益于手术及护理技术的完善, 各种免疫抑制药物的应用, 肺移植患者的 5 年生存率仍为 50% 左右, 远低于其他实体器官移植^[2]。

目前公认慢性肺移植体失功是限制肺移植患者长期生存率的最重要因素, 临床上称为闭塞性细支气管炎(obliterative bronchiolitis, OB)或闭塞性细支气管炎综合征(bronchiolitis obliterans syndrome, BOS)。OB 好发于小气道, 特别是终末细支气管, 病理学特征为结缔组织增生导致的气管部分或完全闭塞。OB 的诊断主要依据患者 1s 用力呼气量(forced expiratory volume, FEV₁)^[3], 根据 FEV₁ 的下降程度来进行判断。临床统计发现, 约 49% 的肺移植患者 5 年内患有 OB^[1]。一旦 OB 发生, 临床上尚无有效办法逆转气管闭塞进程。本文将结合近年来最新研究进展对 OB 的免疫学发病机制, 以及如何建立肺移植免疫耐受的方法等进行综述。

1 免疫学发病机制

OB 的发病机制尚未完全阐明, 包括固有免疫、细胞、体液同种异体免疫反应, 及细胞、体液自身免疫性反应在内的多种因素参与其中。

1.1 固有免疫 固有免疫在肺移植慢性排斥中的作用正日益受到研究者的关注。肺移植后发生的缺血再灌注损伤能够诱导炎症反应的发生, 其作用机制可能是通过活化 Toll 样受体及 Toll 样受体接头蛋白 MyD88 介导的信号途径^[4]。原发性移植体失功(primary graft dysfunction, PGD)的发生就与上述机制密切相关, 而 PGD 可显著增加 OB 的发病率^[5]。近来, Suzuki 等^[6]研究发现 OB 的发生发展依赖补体系统的活化, 研究者在 OB 患者及模型小鼠中发现补体调节蛋白 CD55 及 CD46 显著下调, 而支气管肺泡灌洗液中补体 C3a 的表达上升, 同时这一过程由 IL-17 介导, 可见固有免疫又与细胞免疫相互联系。

1.2 细胞免疫 针对同种异体抗原产生的细胞免疫应答依赖于抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)向次级淋巴器官(脾脏及肺部淋巴结)的迁移, 进而活化反应性 T 细胞^[7]。受者 T 细胞可直接识别供者细胞的同种异体组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC), 供者也可识别受者的同种异体 MHC 分子肽段, 受者 APC 甚至可提呈供者完整的 MHC-同种异体抗原复合物, 供受者 T 细胞识别。识别 MHC 抗原后, T 细胞获得第二共刺激信号, 继而导致 T 细

收稿日期: 2015-10-28

基金项目: 国家自然科学基金(31370904); 上海市浦江人才计划资助(15PJJD021); 上海市科委生物医药领域科技支撑项目(15401900500); 上海市卫生系统重要疾病联合攻关项目(2013ZYJB0004)

作者简介: 周琳(1989—), 男, 汉族, 常州人, 实习研究员

通讯作者: 路丽明(E-mail: lulunew2003@163.com)

胞增殖、活化^[5]。肺移植后主要的效应性 T 细胞亚群为 Th1 及 Th17 细胞亚群,其分泌的 IFN- γ 和 IL-17 进一步促进免疫反应,增加了 OB 发生的风险^[8]。

1.3 体液免疫 临床研究发现,肺移植后 B 细胞产生的同种异体抗体增加了 OB 的发病风险,降低了患者生存期。这类同种异体抗体主要针对 MHC 分子及次要组织相容性抗原,产生的抗体与供体抗原及补体因子 C1q 相结合,激活了补体^[9]。同种异体抗体的产生一般先于 OB 的发生,并与其发生发展密切相关。Jaramillo 等^[10]研究证实 anti-HLA 抗体可以诱导纤维化生长因子的分泌,并使气管上皮细胞发生凋亡,导致气道纤维增生。

肺移植后反复的组织损伤与修复过程是 OB 发生的重要病理学特征。缺血再灌注损伤,同种异体及固有免疫应答均可导致肺部组织损伤,从而释放出基质金属蛋白酶,炎症因子及其他介质开始组织修复过程。这一组织修复过程会使本来隐藏的自身抗原暴露于免疫系统,导致自身免疫反应的发生。V 型胶原(Col(V))就是组织修复过程中释放出的重要自身抗原。在肺组织中,V 型胶原主要表达于血管、支气管周边组织及上皮细胞,这些组织是发生慢性排斥的主要部位。Col(V)能有效将自身的分子表位隐蔽,免于免疫系统识别。而一旦肺组织损伤发生,这些抗原蛋白表位就会暴露于免疫系统,发生自身免疫反应^[11]。Burlingham 等^[12]在一项临床研究中证实,对 Col(V)有严重 T 细胞免疫应答的患者罹患 OB 的机率最高。产生针对 Col(V)及 K- α 1 微管蛋白的自身抗体,也是发生 OB 的重要机制。临床研究表明,肺移植后 anti-Col(V)与 anti-K α 1 抗体的出现与 OB 的发展有明显相关性,同时移植前就存在 anti-Col(V)与 anti-K α 1 抗体的患者患 OB 的风险显著降低^[11]。

肺移植患者生存率远低于其他实体器官移植,且罹患 OB 的概率极高。这很可能与肺作为人体最重要的呼吸器官有关。近年来,由于空气污染的日趋严重,研究发现其已成为 OB 发生的新的危险因素,超过 25% 的 OB 发生与空气污染有关^[12]。肺部与污染空气直接接触,可能导致肺部免疫微环境的改变,引起系统性炎症等,发生慢性排斥。这可能也是肺移植与其他实体器官移植最大的不同,因此,需引起我们的重视并进一步研究。

2 诱导移植耐受的策略

2.1 TCR/CD3 复合物 TCR 能够识别 APC 提呈的抗原肽,但如果没有 CD3,TCR 将不能向胞内传递信号。CD3 链的胞内域包含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM),一旦与 TCR 结合就能向胞内传递信号^[13]。起初认为针对 TCR/CD3 复合物的抗体只能诱导非特异性的免疫抑制,随后研究发现特异性的免疫抑制也可被诱导产生。这一过程可能是由于免疫反应向 Th2 型偏移,同时诱导产生了调节性 T 细胞。Nicolls 等^[14]在大鼠心脏移植模型中首次证明 anti-CD3 抗体具有诱导免疫耐受的能力。随后,在皮肤移植模型和胰岛移植模型中均证明 anti-CD3 抗体可以有效诱导抑制免疫耐受^[15]。Wain 等^[16]对 52 名肺移植患者使用 5 mg/day 的 anti-CD3 抗体,并合并口服咪唑硫嘌呤及环孢霉素 A,结果发现,使用 anti-CD3 抗体的患者均未见急性排斥,36 个月时,有 69% 的患者没有发生 OB 病变。因此,anti-CD3 抗体可能是一种针对肺移植患者安全有效的免疫抑制疗法,可以很好地抑制急性慢性移植排斥的发生。

2.2 T 细胞共刺激分子阻断剂 如前所述 T 细胞的活化依赖于 TCR 与抗原提呈细胞表面 MHC-抗原复合物的结合及第二信号的激活。已有众多针对共刺激信号诱导免疫耐受的研究,其中 CD28:CD80/CD86 途径是目前研究最广的通路,T 细胞表面的 CD28 可与抗原提呈细胞表面的 CD80/CD86 特异结合,CD28 的结合活化为 T 细胞激活所必需。CD80/CD86 同时也可以与已活化 T 细胞表面的 CTLA-4 相结合,激活抑制信号途径从而抑制 T 细胞活化^[17]。CTLA-4 与 CD28 结构相似,但与 CD80/CD86 亲和性更高。因此,阻断 CD28 共刺激信号可以导致 T 细胞发生不完全活化、无能甚至凋亡^[18]。目前已开发出商业化的 anti-CD80/CD86, anti-CD28 单克隆抗体以及 CTLA-4-Ig 融合蛋白。在灵长类肾移植模型中,阻断 CD80/CD86 信号通路可显著延长同种异体移植物的生存期,但即使联合使用其他免疫抑制剂,也不能诱导完全的免疫耐受^[19]。在大鼠肾移植模型中使用 anti-CD28 单克隆抗体可诱导同种异体免疫耐受^[20]。Pearson 等^[21]研究发现 CTLA-4-Ig 融合蛋白可诱导心脏移植小鼠免疫耐受,受者小鼠在移植后连续注射 12 d CTLA-4-Ig,大部分小鼠生存期

显著延长。尽管在啮齿类动物模型中取得了良好的效果,但在人和灵长类动物中 CTLA-4-Ig 的效果仍然不明。另外针对 CD40:CD154(CD40L)信号通路的阻断抗体也取得了部分成功, Dodd-O 等^[22]研究发现 anti-CD154 抗体可以延长同种异体肺移植模型小鼠移植物的生存期,这种作用可能是通过消除效应性 CD4⁺ 和 CD8⁺ 细胞功能并提高 Treg 细胞比例完成。同样通过抑制共刺激分子 CD137 也可以缓解 OB 发病进程^[23]。在临床前研究中,针对阻断共刺激信号通路诱导同种异体免疫耐受的研究取得了令人欣喜的结果,目前包括 ICOS, PD-1, OX40, 4-1BB, CD27 及其相应配体等分子在内的研究正在进行中。

2.3 免疫调节细胞

2.3.1 调节性 T 细胞 调节性 T 细胞是一群具有免疫抑制作用的 T 细胞。调节性 T 细胞主要分为 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T(nTreg) 细胞和适应性调节性 T 细胞(aTreg 或 iTreg)。目前在肺移植领域研究较深入的是 nTreg, nTreg 在免疫耐受方面起着中心作用。过去数十年,在基础与临床移植研究中, nTreg 已被确定在诱导及维持移植免疫耐受方面起着重要作用^[24]。早期仅仅将 CD4 和 CD25 作为其表型标志, Treg 细胞的特征性转录因子 Foxp3 在其增殖、分化及功能维持中发挥重要作用^[25]。Treg 细胞通过细胞间接触及分泌 IL-10、IL-2、TGF- β 等细胞因子发挥其免疫调节功能^[26]。大量实验已证明 Foxp3⁺ Tregs 以及效应性 T 细胞均出现于移植中,敲除 Foxp3⁺ Tregs 会导致移植排斥,向个体过继输入 Treg 细胞能显著延长移植植物生存率,表明 Treg 细胞不仅能够诱导移植免疫耐受,也是维持免疫耐受不可或缺的^[27]。在临床肺移植中,测定 Treg 比例已经用来预测患者罹患 OB 的风险。Meloni 等^[28]首次报道了 OB 患者及未发病患者外周血 Treg 比例的差别。他们分析发现 OB 患者外周血 CD4⁺ CD25⁺ 细胞绝对比例较肺功能稳定的患者低(20 cells/ μ l vs 10 cells/ μ l),且正常人外周血 Treg 细胞的比例较肺移植患者高,无论患者是否患有 OB。Sommer 等^[29]利用富集 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞的外周血单个核细胞注射人源化小鼠异位气管移植模拟的 OB 模型,发现其可以显著延缓 OB 的进展,保护气管的组织结构。因此通过调控 nTreg 来诱导移植免疫耐受,是降低急慢性肺移植排斥反应的重要研究策略及方

向。将 Treg 细胞运用于临床治疗的关键在于如何制备大量高纯度及高稳定性的 Treg 细胞以及证明其安全性。已有部分早期的临床研究评价 Treg 细胞在治疗 GVHD, 器官移植方面的疗效及安全性。这些将为 Treg 细胞疗法运用于治疗肺移植同种异体免疫排斥提供数据支持。

2.3.2 间充质干细胞 间充质干细胞已经作为一种体内治疗多种急性肺损伤模型的疗法^[30]。研究发现,间充质干细胞具有的功能使其成为治疗包括自身免疫性疾病,移植排斥反应及急性肺损伤在内的细胞治疗药物。间充质干细胞能够分泌大量旁分泌因子:角质细胞生长因子, G-CSF, GM-CSF 等^[31],这些因子有利于内源性干细胞进入血液循环。同时,间充质干细胞可以阻断 IFN- γ , IL-2, IL-1 β , IL-4, MIP-2 和 TNF- α 等炎症细胞因子^[32-33]。最后,通过抑制固有及适应性免疫细胞活性发挥免疫调节作用^[34],并保护肺部内皮及上皮细胞层^[35]。Zhao 等^[36]发现人胎盘来源的间充质干细胞可以有效缓解异位气管移植模型小鼠 OB 的发病进程。通过在移植周围皮下注射胎盘来源间充质干细胞,治疗组移植气管较对照组闭塞情况显著减轻,同时调节性 T 细胞比例上升。说明利用间充质干细胞治疗或缓解 OB 发病具有可行性。同时间充质干细胞来源广泛,易于大规模制备,同时又具有较低的免疫原性,可能是一种理想的诱导肺移植免疫耐受的细胞性药物。

2.4 3D 打印技术 3D 打印是指一种基于三维数字模型的采用逐层连续打印技术将材料结合起来的工艺。生物活性打印是目前组织工程技术的研究热点。通过 3D 打印技术将细胞与生物材料同步打印,形成与人体结构功能相似的组织或器官。2006 年, Fugax 首次提出了 3D 生物打印概念。Boland 等^[37]利用血管内皮细胞和藻酸盐水凝胶成功打印微脉管结构。其他诸如心脏,肝脏,肺,肾脏等实体组织器官的 3D 打印技术正广泛研究中。Li 等^[38]利用聚乙烯等材料使用 3D 打印技术制造出肺,可用于防止肺切除术后并发症的发生。3D 打印技术在器官移植中的运用可能是有效解决同种异体免疫排斥等器官移植障碍的有效方法。

3 结论

在诱导移植免疫耐受研究方面已经取得了重大进展,但上述的每种策略可能都存在一些不足之

处, 无法完全逆转 OB 的发展进程。此外, 研究表明器官移植的成功率与移植的器官本身密切相关。而肺移植患者的平均生存率在实体器官移植中是最低的, 这可能也意味着诱导肺移植免疫耐受的难度也相对较大。因此, 在利用一般的诱导免疫耐受策略的同时, 我们更应该关注肺部与其他器官的区别, 开发出特异性的诱导免疫耐受药物。

参考文献

- [1] Yusen RD, Christie JD, Edwards LB, *et al.* The registry of the international society for heart and lung transplantation; thirtieth adult lung and heart-lung transplant report—2013; focus theme: age [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2013, 32: 965-978.
- [2] Lodhi SA, Lamb KE, Meier-Kriesche HU. Solid organ allograft survival improvement in the United States: the long-term does not mirror the dramatic short-term success [J]. *Am J Transplant*, 2011, 11: 1226-1235.
- [3] Barker AF, Bergeron A, Rom WN, *et al.* Obliterative bronchiolitis [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370: 1820-1828.
- [4] Kreisel D, Goldstein DR. Innate immunity and organ transplantation; focus on lung transplantation [J]. *Transpl Int*, 2013, 26: 2-10.
- [5] Gracon AS, Wilkes DS. Lung transplantation: chronic allograft dysfunction and establishing immune tolerance [J]. *Hum Immunol*, 2014, 75: 887-894.
- [6] Suzuki H, Lasbury ME, Fan L, *et al.* Role of complement activation in obliterative bronchiolitis post-lung transplantation [J]. *J Immunol*, 2013, 191: 4431-4439.
- [7] Larsen CP, Morris PJ, Austyn JM. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection [J]. *J Exp Med*, 1990, 171: 307-314.
- [8] Lemaitre PH, Vokaer B, Charbonnier LM, *et al.* IL-17A mediates early post-transplant lesions after heterotopic trachea allotransplantation in Mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e70236.
- [9] Mcmanigle W, Pavlisko EN, Martinu T. Acute cellular and antibody-mediated allograft rejection [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2013, 34: 320-335.
- [10] Jaramillo A, Smith CR, Maruyama T, *et al.* Anti-HLA class I antibody binding to airway epithelial cells induces production of fibrogenic growth factors and apoptotic cell death: a possible mechanism for bronchiolitis obliterans syndrome [J]. *Hum Immunol*, 2003, 64: 521-529.
- [11] Weber DJ, Wilkes DS. The role of autoimmunity in obliterative bronchiolitis after lung transplantation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 304: L307-311.
- [12] Verleden GM, Vos R, Vanaudenaerde B, *et al.* Current views on chronic rejection after lung transplantation [J]. *Transplant International*, 2015, 28: 1131-1139.
- [13] Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex [J]. *Immunity*, 2006, 24: 133-139.
- [14] Nicolls MR, Aversa GG, Pearce NW, *et al.* Induction of long-term specific tolerance to allografts in rats by therapy with an anti-CD3-like monoclonal antibody [J]. *Transplantation*, 1993, 55: 459-468.
- [15] You S, Zuber J, Kuhn C, *et al.* Induction of allograft tolerance by monoclonal CD3 antibodies; a matter of timing [J]. *Am J Transplant*, 2012, 12: 2909-2919.
- [16] Wain JC, Wright CD, Ryan DP, *et al.* Induction immunosuppression for lung transplantation with OKT3 [J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 67: 187-193.
- [17] Ippoliti G, Darmini AM, Lucioni M, *et al.* Introduction to the use of belatacept: a fusion protein for the prevention of posttransplant kidney rejection [J]. *Biologics*, 2012, 6: 355-362.
- [18] Riella LV, Sayegh MH. T-cell co-stimulatory blockade in kidney transplantation: back to the bench [J]. *Kidney Int Suppl* (2011), 2011, 1: 25-30.
- [19] Birsan T, Hausen B, Higgins JP, *et al.* Treatment with humanized monoclonal antibodies against CD80 and CD86 combined with sirolimus prolongs renal allograft survival in cynomolgus monkeys [J]. *Transplantation*, 2003, 75: 2106-2113.
- [20] Haspot F, Seveno C, Dugast AS, *et al.* Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells [J]. *Am J Transplant*, 2005, 5: 2339-2348.
- [21] Pearson TC, Alexander DZ, Winn KJ, *et al.* Transplantation tolerance induced by CTLA4-Ig [J]. *Transplantation*, 1994, 57: 1701-1706.
- [22] Dodd-O JM, Lendermon EA, Miller HL, *et al.* CD154 blockade abrogates allospecific responses and enhances CD4 (+) regulatory T-cells in mouse orthotopic lung transplant [J]. *Am J Transplant*, 2011, 11: 1815-1824.
- [23] Hodge G, Hodge S, Reynolds PN, *et al.* Targeting peripheral blood pro-inflammatory CD28null T cells and natural killer T-like cells by inhibiting CD137 expression; possible relevance to treatment of bronchiolitis obliterans syndrome [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2013, 32: 1081-1089.
- [24] Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 7-13.
- [25] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3 [J]. *Nat Genet*, 2001, 27: 20-21.
- [26] Von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6: 338-344.
- [27] Burrell BE, Nakayama Y, Xu J, *et al.* Regulatory T cell in-

- duction, migration, and function in transplantation [J]. *J Immunol*, 2012, 189: 4705-4711.
- [28] Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, *et al.* Regulatory CD4+ CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome [J]. *Transplantation*, 2004, 77: 762-766.
- [29] Sommer W, Knofel AK, Madrahimov N, *et al.* Allogeneic CD4+ CD25^{high} T cells regulate obliterative bronchiolitis of heterotopic bronchus allografts in both porcized and humanized mouse models [J]. *Transplantation*, 2015, 99: 482-491.
- [30] Xu J, Woods CR, Mora AL, *et al.* Prevention of endotoxin-induced systemic response by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293: 131-141.
- [31] Rojas M, Xu J, Woods CR, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33: 145-152.
- [32] Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, *et al.* Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8407-8411.
- [33] Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A, *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble factors [J]. *Stem Cell*, 2011, 29: 913-919.
- [34] Guo K, Ikehara S, Meng X. Mesenchymal stem cells for inducing tolerance in organ transplantation [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2014, 2: 8.
- [35] Gupta N, Su X, Popov B, *et al.* Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice [J]. *J Immunol*, 2007, 179: 1855-1863.
- [36] Zhao Y, Gillen JR, Harris DA, *et al.* Treatment with placenta-derived mesenchymal stem cells mitigates development of bronchiolitis obliterans in a murine model [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2014, 147: 1668-1677.
- [37] Boland T, Xu T, Damon B, *et al.* Application of inkjet printing to tissue engineering [J]. *Biotechnol J*, 2006, 1: 910-917.
- [38] Li X, Cai H, Cui X, *et al.* Prevention of late postpneumectomy complications using a 3D printed lung in dog models [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2014, 46: 67-73.