

# 炎症介质与肺移植缺血再灌注损伤

王发龙,李 蕾,陈国千\*

(南京医科大学附属无锡人民医院 医学检验科,江苏 无锡 214023)

肺移植为目前治疗终末期肺病的主要手段。随着肺保护技术、手术方法的进步和免疫抑制剂的应用等,肺移植成功率逐年提高,但肺移植术后 1 年和 5 年的生存率分别还只有 80% 和 50% 左右<sup>[1]</sup>。原发性移植肺失功为肺移植后早期死亡的首要原因,而缺血再灌注损伤(IRI)是原发性移植肺失功的主要因素。因此,肺移植 IRI 的分子机制研究对于提高肺移植成功率具有重要意义,受到广泛重视,本文就炎症介质在肺移植 IRI 中的作用作一综述。

## 1 肺移植 IRI 的发生

随着肺保护技术的发展,在过去的二十年间肺 IRI 的发生明显减少或减轻,但缺血再灌注导致的肺损伤仍是致患者早期死亡及晚期并发症的主要原因,且严重的肺 IRI 还与移植后发生急慢性排斥反应、阻塞性细支气管炎等有关<sup>[2-3]</sup>。

动物实验和临床研究显示肺移植 IRI 表现为双相模式,IRI 的发生早期(灌注后 24 h 内)与供体有关,晚期则主要取决于受体情况,其病理生理贯穿于供肺的切取、保存及再灌注的整个过程。调查研究表明活体器官移植预后明显好于脑死亡供体,但除肾移植外大多数器官移植供体来源于脑死亡个体,肺移植也不例外。供体肺不能长时间耐受缺血,随着时间的延长冷缺血导致供体肺细胞的死亡比例升高,冷缺血 6 h、12 h 后供体肺仅有不到 2% 的细胞死亡,但在冷缺血 18 h 和 24 h 后细胞死亡率分别达到 11% 和 27%,且细胞坏死比率与移植肺的功能呈高度负相关<sup>[4]</sup>。

## 2 肺移植的炎症反应

肺 IRI 的发生机制包括活性氧自由基的释放,补体和血小板碎片的活化、白细胞的活化、促凝因子的活化及血管张力的变化等。炎症反应是 IRI 的特征性表现,与趋化因子、炎症介质或促炎细胞因子的释放、粘附因子的上调等关系密切。

肺移植炎症反应的发生与诸多因素有关。Ha-

nusch 等<sup>[5]</sup>研究发现肺移植供体在原位热缺血后 3 h 清晰地显示有中性粒细胞趋化因子-1 存在,同时血管细胞粘附因子-1、细胞间粘附因子-1 mRNA 表达上调,用多巴胺预处理兔供体肺和冷缺血保存两项措施可以显著降低这些变化,因为多巴胺延缓了肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )对这些粘附分子的上调,但不会影响 TNF- $\alpha$ 、白细胞介素-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 的表达。脑死亡供体也会引起移植肺的炎症反应,Barklin<sup>[6]</sup>等报道脑死亡引发全身炎症反应,脑死亡后支气管肺泡灌洗液内 IL-8、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、人生长调节致癌基因  $\alpha$  和中性粒细胞明显高于对照组,肺组织切片中 IL-8 mRNA 表达增高,其中支气管肺泡灌洗液中 IL-8 的水平与早期移植肺失功有密切关系。

肺移植 IRI 的炎症反应的发生是多种免疫细胞和促炎因子相互作用的过程。已有许多研究表明肺泡巨噬细胞是启动肺 IRI 的重要细胞,供体肺内的巨噬细胞在再灌注时迅速活化并释放促炎因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、单核细胞化学趋化蛋白-1 等,而中性粒细胞是参与肺移植后 IRI 后期的主要细胞。IRI 中的关键步骤可能是循环中的中性粒细胞在再灌注时粘附在血管内皮细胞表面,通过在细胞表面表达选择性蛋白,释放有害的蛋白酶、氧自由基、细胞因子而加剧肺组织的损伤。T 淋巴细胞在肺 IRI 中的作用还不是很清楚,最近的研究显示 T 细胞通过协同巨噬细胞、内皮细胞、中性粒细胞、血小板等作用加剧 IRI 炎症反应。在早期炎症反应中专职抗原提呈细胞(树突状细胞、肥大细胞、巨噬细胞)也可以分泌促炎因子促进 T 细胞活化,通过它们之间的相互作用延长 T 细胞在肺组织的存在时间<sup>[7]</sup>。

## 3 肺移植 IRI 中的免疫细胞活化

对于肺移植再灌注损伤中免疫细胞的活化,Fiser<sup>[8]</sup>等在 2001 年提出的“两阶段假说”受到普遍接受,即再灌注损伤早期由供者巨噬细胞介导,2 h 后主要由受者白细胞介导。

### 3.1 巨噬细胞的活化

巨噬细胞在肺移植再灌注损伤引起的炎症反应

中起始动作用。早在 2003 年 Naidu 等<sup>[9]</sup> 实验研究发现巨噬细胞在肺 IRI 早期起着重要的作用, 最近研究显示缺氧 1 h 后肺灌洗液中巨噬细胞数量增多。巨噬细胞是一种重要的炎性细胞, 活化后可以释放  $\text{TNF-}\alpha$ 、巨噬细胞炎性蛋白-1、单核细胞化学趋化蛋白-1、巨噬细胞炎性蛋白-2 等。Zhao 等<sup>[10]</sup> 用雄性 C57BL/6 大鼠建立的肺缺血模型研究巨噬细胞在肺 IRI 的作用, 发现用氯膦酸盐预处理消耗巨噬细胞的供体小鼠在 IRI 后, 肺泡灌洗液中炎症介质  $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1、IL-2、干扰素- $\beta$  等的释放明显减少, 聚合酶链式反应也显示基因表达比对照组降低。 $\text{TNF-}\alpha$  是启动炎症反应的重要细胞因子, 在炎症反应中可由巨噬细胞和肺泡内皮细胞释放,  $\text{TNF-}\alpha$  基因敲除的小鼠肺 IRI 的炎症反应明显减弱。Ashish 等<sup>[11]</sup> 分别使用 RAW 264.7 巨噬细胞和 MLE-12 肺泡上皮细胞, 通过缺氧/复氧培养模拟肺缺血再灌注过程, 发现缺氧 3 h 和复氧 1 h 培养后肺泡上皮细胞释放巨噬细胞炎性蛋白-2、IL-6、单核细胞化学趋化蛋白-1、角质细胞起源趋化因子等, 但没有释放  $\text{TNF-}\alpha$ , 巨噬细胞释放  $\text{TNF-}\alpha$ 、巨噬细胞炎性蛋白-1 $\alpha$ 、巨噬细胞炎性蛋白-2、单核细胞化学趋化蛋白-1 等但不释放角质细胞起源趋化因子; 如果两种细胞株一起联合培养, 则缺氧/复氧诱导巨噬细胞产生的  $\text{TNF-}\alpha$  显著引起肺泡上皮细胞的角质细胞起源趋化因子、单核细胞化学趋化蛋白-1、巨噬细胞炎性蛋白-2、IL-6 等的释放。但 Nakamura 等<sup>[12]</sup> 通过研究表明相反观点, 在体外大鼠肺缺血再灌注模型中, 气管内使用脂质体包被的氯膦酸盐处理后加重肺泡内中性粒细胞聚集和气道功能失调, 不仅无益于而且恶化肺 IRI。

### 3.2 中性粒细胞和淋巴细胞的活化

中性粒细胞积聚一直被认为是 IRI 后引起器官损害的主要因素。中性粒细胞主要于 IRI 后期发挥作用, Deng 等<sup>[13]</sup> 研究结果显示, 肺缺血再灌注组中性粒细胞数量升高且明显高于单纯缺血组, 表明中性粒细胞主要在再灌注期发挥作用。研究表明中性粒细胞在肺移植 IRI 早期影响很小, 再灌注 4 h 后中性粒细胞明显增多<sup>[14,15]</sup>。CD4+T 细胞在 IRI 中也发挥重要作用, 许多研究结果显示在再灌注前抑制 CD4+T 细胞可以降低肺 IRI 中的炎症反应进而减弱移植肺的损伤, 并且 CD4+T 细胞在 IRI 中先于中性粒细胞的活化。CD4+ 和 CD8+ 细胞均可表达 CD3 分子, 检测肺泡灌洗液中的 CD3 水平可以反映两者细胞的数量, Yang 等<sup>[16]</sup> 在研究 CD4

+T 细胞在肺 IRI 中的作用时发现, CD4+ 细胞抑制组肺泡灌洗液 CD3 水平明显低于 CD8+T 细胞抑制组, 表明肺 IRI 中活化的主要是 CD4+T 细胞; 反映中性粒细胞浸润程度的肺泡灌洗液中髓过氧化物酶含量, 在 CD4+T 细胞抑制组与中性粒细胞抑制组间没有显著性差异, 另外, 抑制 CD4+T 细胞后巨噬细胞炎性蛋白-1、 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-17、角质细胞起源趋化因子等均明显低于对照缺血再灌注组, 提示中性粒细胞活化依赖于 CD4+T 细胞。Geudens 等<sup>[17]</sup> 采用 T 细胞缺乏的小鼠进行肺缺血再灌注实验研究, 发现缺血再灌注后肺泡灌洗液中中性粒细胞数量和 IL-1 $\beta$  水平明显降低, 提示 T 细胞参与肺缺血再灌注的炎症反应, 因此, IRI 的抗淋巴细胞治疗方法值得重视和研究。

## 4 肺移植 IRI 中的炎症介质释放

### 4.1 $\text{TNF-}\alpha$

$\text{TNF-}\alpha$  是一种分子量 17 kDa 的促炎细胞因子, 主要由巨噬细胞、肥大细胞、淋巴细胞、内皮细胞通过内毒素等因素诱导激活后释放, 诸多研究表明  $\text{TNF-}\alpha$  为肺 IRI 的重要启动因子。研究显示肺缺血再灌注后  $\text{TNF-}\alpha$  表达明显增加<sup>[18]</sup>。肺 IRI 中  $\text{TNF-}\alpha$  主要由早期激活的肺泡巨噬细胞释放,  $\text{TNF-}\alpha$  可刺激肺泡内皮细胞释放单核细胞化学趋化蛋白、角质细胞起源趋化因子等而诱导中性粒细胞聚集, 并可改变肺泡血管渗出率导致肺水肿。 $\text{TNF-}\alpha$  有膜结合型和可溶型两种存在形式, 可溶型  $\text{TNF-}\alpha$  具有生物活性, 在炎症反应中起作用的是可溶型  $\text{TNF-}\alpha$ 。 $\text{TNF-}\alpha$  转换酶可将膜结合型  $\text{TNF-}\alpha$  解离形成可溶型  $\text{TNF-}\alpha$ , Goto 等<sup>[19]</sup> 在大鼠肺移植实验中, 将供肺放入含有  $\text{TNF-}\alpha$  转换酶抑制剂的 Euro-Collins 保存液中 6 h, 然后进行移植并再灌注 4 h, 结果显示肺损伤明显减轻, 肺泡中性粒细胞浸润、肺组织细胞间粘附因子-1 表达及支气管肺泡灌洗液中的单核细胞化学趋化蛋白-1、高迁移率族蛋白 B1、可溶性上皮钙黏蛋白和中性粒细胞酯酶等炎症介质明显减少。Krishnadasan 等<sup>[20]</sup> 研究结果显示, 小鼠经  $\text{TNF-}\alpha$  抗体处理后缺血再灌注肺的血管渗透率降低、多种早期促炎因子 mRNA 表达下降及支气管肺泡灌洗液中白细胞数减少等。Maxey<sup>[21]</sup> 等报道, 缺乏  $\text{TNF-}\alpha$  的基因突变小鼠经过肺缺血再灌注后, 肺动脉压力、气道阻力、组织损伤评分及肺湿干重比等与野生鼠比较明显降低。

### 4.2 白细胞介素

白细胞介素为一类由多种类型细胞所分泌的调

节细胞生长、分化和免疫活性的细胞因子,在炎症反应中起重要作用。IL-1 $\beta$ 是一种可溶性的细胞因子,在肺 IRI 中发挥重要作用,Rega<sup>[22]</sup>等通过猪肺移植的研究发现,移植肺支气管肺泡灌洗液中 IL-1 $\beta$ 浓度与肺血管阻力、平均气道压、组织湿干重比等成正相关。IL-8 主要由单核-巨噬细胞产生,成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、肝细胞等在适宜的刺激条件下亦可产生 IL-8,为一种强作用的中性粒细胞激活因子,可以趋化中性粒细胞在炎症爆发部位聚集。Matilla 等<sup>[23]</sup>研究结果显示,兔肺缺血 1 h 时 IL-8 mRNA 表达明显增强,并一直持续到再灌注期,而 TNF- $\alpha$ 、干扰素等在缺血阶段增加但再灌注时减少,且血液和支气管肺泡灌洗液中 IL-8 的变化与中性粒细胞聚集有密切关系。有学者认为支气管肺泡灌洗液中的 IL-8 含量可以作为评估心脏死亡供体移植肺损伤的实验指标<sup>[24]</sup>。Moreno 等<sup>[25,26]</sup>报道,肺移植患者早期血液和支气管肺泡灌洗液中 IL-6、IL-8 浓度显著升高,且与移植炎症反应尤其是原发性移植肺失功的发生有关。

#### 4.3 氧自由基

巨噬细胞、淋巴细胞等活化后可生成释放氧自由基,胞内 NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶等参与氧自由基的生成,氧自由基在介导肺 IRI 和原发性移植肺失功中发挥重要作用。Yang<sup>[27]</sup>等报道,NADPH 氧化酶基因缺失小鼠或正常 C57BL/6 小鼠经 NADPH 氧化酶抑制剂处理后进行肺缺血再灌注实验,结果显示诸多促炎因子释放明显减少、肺功能失调和损伤减轻。

炎症介质介导的炎症反应在肺移植 IRI 的发展中发挥着重要作用,其作用机制还有待进一步研究。开展炎症介质靶向治疗对于肺移植 IRI 的防治、提高肺移植成功率将具有重要意义。

作者简介:王发龙(1987—),男,南京医科大学在读硕士研究生,研究方向:炎症介质的基础和临床研究;陈国干,博士生导师,教授。

#### 参考文献:

- [1] Okada Y, Kondo T. Preservation solution for lung transplantation[J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 57(12): 635.
- [2] Bittner HB, Binner C, Dahlberg P, et al. Reducing ischemia-reperfusion injury in clinical lung transplantation[J]. Transplant Proc, 2007, 39(2): 489.
- [3] Ahmad S, Shlobin OA, Nathan SD. Pulmonary complications of lung transplantation[J]. Chest, 2011, 139(2): 402.
- [4] 丁嘉安, 姜格宁. 肺移植[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008, 197.
- [5] Hanusch C, Nowak K, Trlitz P, et al. Donor dopamine treatment limits pulmonary oedema and inflammation in lung allografts sub-

- jected to prolonged hypothermia[J]. Transplantation, 2008, 85(10): 1449.
- [6] Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2009, 53(4): 425.
- [7] Laubach VE, Kron IL. Pulmonary inflammation after lung transplantation[J]. Surgery, 2009, 146(1): 1.
- [8] Fiser SM, Tribble CG, Long SM, et al. Lung transplant refusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 121(6): 1069.
- [9] Naidu BV, Krishnadasan B, Farivar AS, et al. Early activation of the alveolar macrophage is critical to the development of lung ischemia-reperfusion injury[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 126(1): 200.
- [10] Zhao M, Fernandez LG, Doctor A, et al. Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 291(5): 1018.
- [11] Sharma AK, Fernandez LG, Awad AS, et al. Proinflammatory response of alveolar epithelial cells is enhanced by alveolar macrophage-produced TNF- $\alpha$  during pulmonary ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(1): 105.
- [12] Nakamura T, Abu-Dahab R, Menger M D, et al. Depletion of alveolar macrophages by clodronate-liposomes aggravates ischemia-reperfusion injury of the lung[J]. J Heart Lung Transplant, 2005, 24: 38.
- [13] Deng CS, Wang C, Pang BS, et al. The role of polymorphonuclear cells in lung ischemia-reperfusion injury in a canine model of pulmonary thromboembolism[J]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2006, 29(9): 603.
- [14] 王兴安, 姜格宁, 徐志飞. 炎症细胞对犬肺移植早期再灌注损伤的影响[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(6): 643.
- [15] Draenert A, Marquardt K, Inci I, et al. Ischaemia-reperfusion injury in orthotopic mouse lung transplants—a scanning electron microscopy study[J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92(1): 18.
- [16] Yang Z, Sharma AK, Linden J, et al. CD4+ T Lymphocytes Mediate Acute Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 137(3): 695.
- [17] Geudens N, Vanaudenaerde BM, Neyrinck AP, et al. The Importance of lymphocytes in lung ischemia-reperfusion injury[J]. Transplant Proc, 2007, 39(8): 2659.
- [18] Khimenko PL, Bagby GJ, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in ischemia and reperfusion injury in rat lungs[J]. J Appl Physiol, 1998, 85(6): 2005.
- [19] Goto T, Ishizaka A, Kobayashi F, et al. Importance of Tumor Necrosis Factor-Cleavage Process in Post-Transplantation Lung Injury in Rats[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170(11): 1239.
- [20] Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, et al. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 125(2): 261.
- [21] Maxey TS, Enelow RI, Gaston B, et al. Tumor necrosis factor-

- alpha from resident lung cells is a key initiating factor in pulmonary ischemia-reperfusion injury[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004,127(2):541.
- [22] Rega FR, Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, et al. IL-1beta in bronchial lavage fluid is a non-invasive marker that predicts the viability of the pulmonary graft from the non-heart-beating donor[J]. J Heart Lung Transplant, 2005, 24(1):20.
- [23] Matilla JM, García YM, Sánchez CM, et al. Interleukin-8 expression in lung tissue during ischemia-reperfusion[J]. Arch Bronconeumol, 2007, 43(10):542.
- [24] Lascano EC, Bertolotti A, Gómez CB, et al. Failure of IL-8 to assess early reperfusion injury following lung transplantation of cardiac death donor pigs[J]. Transpl Int, 2009, 22(5):574.
- [25] Moreno I, Vicente R, Ramos F, et al. Determination of Interleukin-6 in Lung Transplantation; Association With Primary Graft Dysfunction[J]. Transplant Proc, 2007, 39(7):2425.
- [26] Moreno I, Mir A, Vicente R, et al. Analysis of interleukin-6 and interleukin-8 in lung transplantation; correlation with nitric oxide administration[J]. Transplant Proc, 2008, 40(9):3082.
- [27] Yang Z, Sharma AK, Marshall, et al. MNADPH Oxidase in Bone Marrow-Derived Cells Mediates Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 40(3):375.

(收稿日期:2011-08-17)

文章编号:1007-4287(2012)04-0746-04

# 树突状细胞与肺癌免疫的相关研究进展

张春雨<sup>1</sup>综述,李立<sup>2</sup>审校

(1. 四平市中心医院 呼吸内科,吉林 四平 136000;2. 吉林大学中日联谊医院 呼吸内科)

树突状细胞(Dendritic Cell, DC)是目前发现的功能最强的专职性抗原递呈细胞(APC),能摄取和加工递呈抗原,具有强大的激活 CD8<sup>+</sup>、CTL 及 CD4<sup>+</sup> T 辅助细胞的能力,控制着体内免疫反应的过程,在免疫应答中处于中心地位,因而成为肿瘤免疫反应的中心环节。DC 可以在体外培养后用于体内免疫治疗,也可辅以细胞因子或其它因子如 Flt-3 等在体内扩增<sup>[1]</sup>。DC 包括:朗罕氏细胞、间质树突细胞、并指状树突细胞等。人 DC 缺乏 B 细胞、T 细胞、NK 细胞及单核巨噬细胞系的特异标志,表达其相对特异性抗原:CD83 等及大量表达 MHC I 和 II 类分子、共刺激分子 CD40 等及粘附分子:CD11a、ICAM-3、LFA-3 等<sup>[2]</sup>。DC 最大的特点是能激活初始型 T 细胞,而巨噬细胞、B 细胞仅能刺激已活化的或记忆性 T 细胞,因此 DC 是机体免疫反应的始动者,在免疫应答的诱导中具有独特地位<sup>[3]</sup>。近年来,在 DC 的基础和临床应用研究方面都取得了一些突破性的进展。应用肿瘤的各种抗原,诸如肿瘤特异性抗原、肿瘤相关抗原及完全性细胞抗原,以各种手段修饰 DC 制成瘤苗,以此免疫荷瘤宿主和参加临床试验的肿瘤患者,可产生抗肿瘤免疫,树突状细胞与肺癌免疫的相关研究为肺部肿瘤病人的治疗及康复带来了新的希望。现就其研究进展作一综述。

## 1 树突状细胞的生物学特征

树突状细胞(Dendritic Cells, DC)最先由 Steinman 在 1973 年描述,是体内最活跃、功能最大的专职抗原提呈细胞。成熟 DC 形态特殊,其细胞膜有较强的伸缩能力,甚至可扩展到数百微米,扩展的形式有:树突、伪足等。DC 另一个特点就是其表面存在大量 MHC II 类抗原,同时缺乏子系标志<sup>[4]</sup>,如 CD56(NK 细胞)等。DC 还表达多种黏附分子<sup>[5]</sup>,如:CD11a(LFA21)等等。DC 在成熟和激活的不同阶段,其表型也发生着变化。人体血循环中 DC 的前体表达 CD2,CD13 和 CD33 等,当其成熟时,这些分子的表达就会逐渐降低。而另一方面,黏附分子、共刺激分子和 MHC 抗原表达则明显上调。DC 的前体由骨髓迁移至血液系统,并随血液循环迁移至体内特殊部位,在这些部位内成熟并发挥免疫监视功能。这种向组织内的迁移依靠 DC 表达趋化因子受体 CCR1,CCR5 和 CCR6 等来完成。组织定居的 DC,包括皮肤内的朗罕氏细胞以及肝脏、黏膜及肺中的 DC,对抗原进行加工并将其与 MHC I 类和 II 类分子形成复合物共同呈递。DC 还需要抗原非依赖性信号激活并俘获抗原。这些信号包括 LPS 等和来自病毒及细菌的直接刺激。被激活后,DC 下调抗原摄取和加工的能力,上调 MHC、共刺激分子、黏附分子表达和呈递抗原的能力。激活的 DC 将离开