

肺动脉高压中炎症反应与免疫反应的发生机制

张 森 陈延军

摘 要 本文总结了肺动脉高压发病过程中的炎症反应和免疫反应,针对与肺动脉高压形成过程相关的趋化因子、细胞因子及其生物标志物进行了总结。综合叙述了应用动物模型来进行临床前研究的部分成果。最终发现肺动脉高压与免疫力失调、炎症和代谢异常是密不可分的。

关键词 肺动脉高压 免疫反应 炎症反应

中图分类号 R543

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.04.005

一、肺动脉高压概述

心肺疾病的不断进展最终引发肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH),其主要机制为血管内膜,中膜以及外层结构及功能发生改变,引发中小肺动脉闭塞,导致右心衰竭,最终死亡。现阶段治疗 PAH 的药物大多以扩血管和抗血管内膜增殖为主,但疗效并不理想,主要因为这两类药物并未有效延缓血管重塑过程,则病情持续恶化,预后不佳。近些年研究表明 PAH 的发生,必定存在着血管周围的炎症浸润^[1]。并且研究数据指出免疫功能的异常是首先出现的,继而发生血管炎症,最终导致血管重塑^[2]。随着 PAH 发病机制研究的不断进展,研究人员发现其病理机制主要与免疫调节异常、炎症反应及代谢功能的改变相关,正是因为这些改变从而引发一系列病理变化^[3]。

二、炎症反应与肺动脉高压

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)的动物模型和 PAH 患者(按照惯例,动物模型称为 PH,而不是 PAH)均出现肺动脉受损,并且这种损伤主要来源于血管管腔周围的炎症细胞浸润(包括 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、树突状细胞和肥大细胞),其炎症病变程度和病变血管壁厚度与平均肺动脉压存在一定关系,也让我们明确了炎症反应在肺血管重构过程中的重要作用^[4]。

趋化因子和细胞因子可诱发血管重塑导致 PAH,肺血管细胞和炎症细胞是这两类因子的主要来源,其过度表达会引发血管细胞的增殖,并且增加其

收缩性。循环中的细胞因子和趋化因子异常升高并引发管腔周围免疫细胞的浸润,包括白介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、半胱氨酸类、CCL5/RANTES 类趋化因子以及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等,例如 IL-1 β 和 TNF- α 可引发纤连蛋白的蓄积,可致肺血管受损,继而发生肺动脉高压;IL-6 可引起平滑肌细胞的异常增殖等^[5]。IL-1 可激活成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)和 IL-6 协同作用引发肺血管成纤维细胞的增殖,导致血管外膜重构。某些因子的异常激活常提示病情恶化及预后不佳^[6]。

IL-6 等部分细胞因子可调控肺血管细胞的异常增殖、迁移和分化,该过程是 PAH 的主要病理机制之一。啮齿类动物中 IL-6 的过度表达可引发肺血管重构以及加速缺氧所致的 PH 甚至闭塞性血管病变,反之 IL-6 基因敲除后,即使长期暴露在缺氧环境下,也不易发生 PH^[7]。

PAH 可引发骨形态生成蛋白 II 型受体(bone morphogenetic protein type 2 receptor, BMPR2)突变,导致正常的 BMPR2 缺乏可加剧炎症反应^[8]。BMPR2 的缺失还可引发中性粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)的增殖,GM-CSF 可加速缺氧下的 PH 形成,并且防止相应抗体的形成。BMPR2 对胸腺 T 细胞发生、发展起关键作用, BMPR2 的配体(BMP2/4)和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)协同作用下引发调节性 T 细胞(Foxp3 Treg)的发生, Treg 细胞可抑制自身免疫应答从而防止病情的恶化,则 BMPR2 的缺乏导致该过程受影响, Treg 细胞缺失^[9]。

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(D201101)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第四医院

通讯作者:陈延军,电子邮箱:chenyanjunhyd@163.com

感染可诱导巨噬细胞激活,继而出现血管周围的巨噬细胞浸润、血管重塑与肺纤维化最终导致 PAH,但是治疗原发病并不能逆转肺动脉高压^[10]。巨噬细胞浸润于血管周围,发挥吞噬和修复作用。CD68⁺巨噬细胞可加速 PAH 的血管闭塞过程,而巨噬细胞的消耗或失活可以防止缺氧性 PH 和门脉性 PAH 的发生^[11]。林岛综合征是一种罕见的常染色体显性遗传性疾病,基本病变是成血管细胞瘤,这些罕见的基因突变,突变诱导巨噬细胞激活继而刺激血管成纤维细胞增殖,进而发展为 PAH^[10]。GM-CSF 和白细胞三烯 B4 (leukotrienes B4, LTB4) 可在炎症反应时协同作用于巨噬细胞的基因表达,该过程近期证实在 PAH 的病理机制中亦存在^[12]。

巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 的增多可致肺动脉高压。MIF 是一种能抑制巨噬细胞随机移动的细胞因子,具有酶活性、参与淋巴免疫、内分泌调控及促炎作用等多种生物学功能,参与机体免疫及炎症反应,在正常人体血清内呈低水平表达。它是一类重要的上游炎性介质,与 CD74 结合后可发挥其多效性。血管内皮细胞中, MIF 与 CD74 结合后可激活 Src 家族激酶 (Src family kinase, SFK)、丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶 (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase, MAPK/ERK)、磷酸肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI₃K/Akt) 和 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 通路,这些通路的激活也可导致 PAH 的发生^[13]。MIF 也可以与趋化因子受体 2 (CXCR2) 和趋化因子受体 4 (CXCR4) 结合,诱导血管细胞增殖,进而加速缺氧下的肺动脉高压形成^[14]。

中性粒细胞在 PAH 病理过程中作用受到的关注较少,但是实验室及临床研究中均发现中性粒细胞弹性蛋白酶对该过程存在影响。研究发现,在特发性肺动脉高压患者及实验室 PH 中,平滑肌细胞的中性粒细胞弹性蛋白酶过度表达,当抑制该过程则可防止 PH 的恶化^[15]。在慢性缺氧实验鼠的肺动脉平滑肌细胞中亦发现了高表达弹性蛋白酶;对于野百合碱注射所引发的实验室 PH,抑制弹性蛋白酶表达甚至可以逆转病变。其次弹性蛋白酶还可激活补体系统,从而增强免疫炎症反应^[16],实验数据提示特发性肺动脉高压存在着补体 C3 的沉积,实验室 PH 模型中存在补体消耗的保护作用,这些数据也提示 PAH 的病

理机制中存在补体相关的血管损伤。

三、免疫反应与肺动脉高压

PAH 发生时出现免疫应答适应不良,进而产生血管周围炎性细胞浸润和各类因子的异常增多的;事实上,免疫功能和机体耐受性存在一个微妙的平衡,任何一方的异常均可能引发慢性炎症或自身免疫病^[17]。

Treg 细胞可调控自身耐受性,肺动脉高压患者的 Treg 细胞功能已改变,不仅调节 T 细胞,也对 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞及 NK 细胞有影响,动物实验中 Treg 细胞功能下调可致 PH,在人体中亦是如此。实验室无胸腺鼠因缺乏 T 细胞,则会发生肺血管受损,继而 B 细胞、巨噬细胞和肥大细胞浸润肺脏,类似人 PAH,当补充 Treg 细胞则可避免此情况的发生。多数可引发 CD4⁺T 细胞计数和功能异常的疾病均可出现继发性肺动脉高压,例如 HIV 病毒感染、系统性硬化、系统性红斑狼疮、慢性淋巴细胞性甲状腺炎、干燥综合征和抗磷脂综合征等^[18]。

CD4⁺T 细胞的效应器大致可分为辅助 T 细胞 (T helper, TH) 1、TH2 和 TH17,均在自身免疫疾病的病理过程中起关键作用^[19]。TH17 和 TH1 协同起效,生成 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNFs) 和 IL-2 等,因此 TH1 和极化的 TH17 均可引自身免疫疾病和炎症反应。TH17 可诱导产生 IL-6、TNF- α 、GM-CSF、IL-21 和 IL-22。TH2 可诱导产生 IL-4、IL-5 和 IL-13,他们主要参与超敏反应和细胞外病原体的清除工作 (蠕虫)。当免疫失调时,TH1/TH17 免疫反应激活,其中 TNF- α 和 IL-6 可加剧血管重塑过程,TH2 通过自身通路引发血管重塑^[20]。系统性硬化患者血浆中的 IL-13 可促进 PAH 形成,过表达的 IL-13 可致实验室 PH。当 Treg 细胞和 NK 细胞的单一缺乏或共同缺失导致免疫功能失调时,则 TH1/TH17 的免疫功能占主导,从而出现 LTB4 分泌增加,GM-CSF 受体巨噬细胞的活化,继而出现内皮细胞凋亡、平滑肌细胞增生肥大等血管损伤^[16]。

树突细胞参与免疫病理过程,无论是实验室 PH 还是 PAH 患者,均在病变肺动脉中发现了树突细胞的聚集。研究发现特发性肺动脉高压患者肺部存在新生淋巴组织,并且实验确证了 3 级肺淋巴组织的存在,从少量的淋巴细胞聚集到类淋巴滤泡样组织形成,这种 3 级肺淋巴组织为 PAH 的发病结构基础。一项实验证实,将 PH 模型鼠血液中的免疫球蛋白 G

(immunoglobulin G, IgG) 注入健康幼鼠体内, 亦可引发幼鼠的血管病变和 PH 形成^[18]。

四、肺动脉高压与代谢异常

实验证实, 代谢异常是可信且独立的 PAH 发病机制。参与 PAH 发病过程的免疫细胞的获能方式不同, 例如淋巴细胞主要是通过氧化磷酸化获能, 骨髓细胞则为糖酵解获能, 中性粒细胞的线粒体通过甘油三磷酸的穿梭来维持跨膜电位, 这样便可增强有氧糖酵解过程, 这主要为恶性肿瘤细胞的代谢方式, 但是在 PAH 患者的肺血管及右心室中亦发现了这类特殊的线粒体; 骨髓前体分化为中性粒细胞的过程中, 获得了这种有氧糖酵解的代谢模式。因适应不同环境所造成的代谢差异和固有免疫细胞均可帮助我们了解特殊微环境下炎症反应的特点。

五、免疫反应炎症因子与肺动脉高压

随着 PAH 发病机制研究的不断深入, 医生们认为需要提出一个主要观点来阐述其发病过程, 最终认定免疫损伤为罪魁祸首。那为什么是炎症导致 PAH 呢? 并且为什么非炎症过程以及遗传因素所造成的 PAH 也会出现炎症反应呢? 这其中包含很多方面, 从 BMPR2 变异的角度来说, 内皮细胞和平滑肌细胞中都有 BMPR2 信号的效应器, 这样便激活了过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator - activated receptor, PPAR) γ 所介导的基因调节。该受体的目标为 Apelin 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 (peroxisome proliferator - activated receptor gamma coactivator, PGC) 1α 等多肽类物质, 它们会极大的影响炎症反应和代谢过程。自身免疫性复合内分泌疾病这类遗传性疾病、HIV 病毒感染、结缔组织病或者 Treg 细胞功能受损时均可导致免疫功能异常, 继而攻击肺血管, 将自限性炎症转变为广泛的损伤^[21]。

六、展望

总之, 在未来的研究中, 需要明确炎症反应受何种基因影响, 何种基因引发免疫功能异常, 而引发广泛的血管损伤, 及其对代谢的影响, 以及免疫异常和代谢紊乱是如何加重病情的。炎症组织的代谢异常主要表现为单核细胞和中性粒细胞的聚集, 以及淋巴细胞的局部增殖。PAH 所造成的免疫功能异常也就代表着线粒体代谢的改变, 反过来, 若心肺组织中线粒体获能方式改变也可以影响免疫细胞。多数生物的获能方式主要为糖的代谢, 炎症反应可以引发胰岛素抵抗, 巨噬细胞在脂肪组织中的浸润也可导致胰岛素抵抗, 从而导致糖利用障碍继而细胞代谢紊乱。糖

酵解、脂肪酸氧化及活性氧的产生等供能方式的改变, 导致了成纤维细胞和巨噬细胞间的异常作用; 若代谢过程恢复正常, 则可避免巨噬细胞的活化与趋化, 继而防止 PH 发病。综上所述, 免疫、炎症和代谢为 PAH 病理机制过程中是相互关联相互作用的, 它们应为一个整体理论, 而不是像过去那样独立作用。随着动物研究和临床实验的不断深入, 能否通过抑制具体炎症和免疫过程的方法, 逆转血管重塑, 提供 PAH 治疗新思路。

参考文献

- 1 Perros F, Dorfmueller P, Montani D, *et al.* Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185(3): 311 - 321
- 2 Tamosiuniene R, Tian W, Dhillon G, *et al.* Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension [J]. Circ Res, 2011, 109(8): 867 - 879
- 3 Sutendra G, Dromparis P, Bonnet S, *et al.* Pyruvate dehydrogenase inhibition by the inflammatory cytokine TNF α contributes to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. J Mol Med (Berl), 2011, 89(8): 771 - 783
- 4 Stacher E, Graham BB, Hunt JM, *et al.* Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(3): 261 - 272
- 5 Huertas A, Perros F, Tu L, *et al.* Immune dysregulation and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: a complex interplay [J]. Circulation, 2014, 129(12): 1332 - 1340
- 6 Ricard N, Tu L, Le Hir M, *et al.* Increased pericyte coverage mediated by endothelial - derived fibroblast growth factor - 2 and interleukin - 6 is a source of smooth muscle - like cells in pulmonary hypertension [J]. Circulation, 2014, 129(15): 1586 - 1597
- 7 Condliffe R, Pickworth JA, Hopkinson K, *et al.* Serum osteoprotegerin is increased and predicts survival in idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. Pulm Circ, 2012, 2(1): 21 - 27
- 8 Davies RJ, Holmes AM, Deighton J, *et al.* BMP type II receptor deficiency confers resistance to growth inhibition by TGF - β in pulmonary artery smooth muscle cells: role of proinflammatory cytokines [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(6): L604 - L615
- 9 Sawada H, Saito T, Nickel NP, *et al.* Reduced BMPR2 expression induces GM - CSF translation and macrophage recruitment in humans and mice to exacerbate pulmonary hypertension [J]. J Exp Med, 2014, 211(2): 263 - 280
- 10 Li M, Riddle SR, Frid MG, *et al.* Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension [J]. J Immunol, 2011, 187(5): 2711 - 2722
- 11 Tian W, Jiang X, Tamosiuniene R, *et al.* Blocking macrophage leukotriene b4 prevents endothelial injury and reverses pulmonary hypertension [J]. Sci Transl Med, 2013, 5(200): 200ra117

(下转第 51 页)

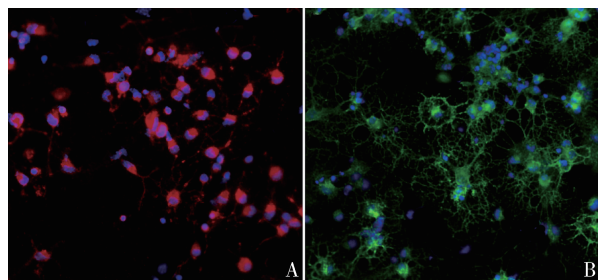


图 3 少突胶质细胞系细胞(免疫荧光, ×200)

A. 混合细胞培养吹打纯化后, 细胞免疫荧光; B. 加入促分化培养基第 4 天, OLs 分化发育晚期细胞免疫荧光

能, 更重要的是大大加快神经信号在轴突上的传导^[5]。CNS 脱髓鞘疾病在临床上很常见, 例如多发性硬化、新生儿缺血缺氧性脑病和交通事故中的脊髓损伤等。目前世界范围内神经科学家对髓鞘发育/再生过程中的分子机制还没有完全了解, 这类疾病迄今还没有有效治疗方法。寻找相对简单, 经济且高效的体外 OL 培养方法, 有助于更深入地研究 OL 分化发育, 髓鞘形成和再生。对 CNS 脱髓鞘疾病的研究具有极大的临床意义。

混合细胞吹打纯化后, 细胞存活率约为 96.4%; OPCs 纯度较高, 约占细胞总数的 93.3%。与传统通过摇床将 OPCs 洗脱的方法不同^[6], 本研究运用消化液 mOIM 消化, 然后通过巴氏管吹打分离纯化的方法具有以下优点: ①吹打分离纯化耗时大大缩短, 提高分离纯化后 OPCs 的存活率; ②mOIM 可更轻易地将 OPCs 与其他细胞如星形胶质细胞分离, 更大限度地减少细胞损伤; ③同时操作步骤更加简单, 更加经济。此外, 在原代细胞培养至第 4 天左右, 当混合培养的细胞长满至 T25 培养皿约 70% 时, 适时更换培养基 mOGM 更有利于促进细胞增殖。

(上接第 16 页)

- 12 Serezani CH, Kane S, Collins L, *et al.* Macrophage dectin-1 expression is controlled by leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 axis[J]. *J Immunol*, 2012, 189(2): 906-915
- 13 Guignabert C, Montani D. Key roles of Src family tyrosine kinases in the integrity of the pulmonary vascular bed[J]. *Eur Respir J*, 2013, 41(1): 3-4
- 14 Perros F, Cohen-Kaminsky S, Gambaryan N. Cytotoxic cells and granulysin in pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-occlusive disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(2): 189-196
- 15 Kim YM, Haghighat L, Spiekeroetter E, *et al.* Neutrophil elastase is produced by pulmonary artery smooth muscle cells and is linked to neointimal lesions[J]. *American Journal of Pathology*, 2011, 179(3): 1560-1572
- 16 Spiekeroetter E, Tian X, Cai J, *et al.* FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension

B104 条件性培养基(B104-conditioned medium, B104-CM), 由大鼠神经母细胞瘤细胞系在含 N2 培养基培养下产生的生长因子, 既往研究显示, B104-CM 可有效促进 NIH3T3 有丝分裂^[7]。此外, B104-CM 可诱导多能干细胞向少突胶质细胞系细胞分化。本研究中笔者运用 B104-CM 作为 mOGM 培养基的重要组成部分, 尽管加入 B104-CM 后细胞的增殖情况尚可, 但它的作用机制目前并不清楚。因此, 科学家在使用 B104-CM 作药理学等研究时应该慎重, 因为它含有不确定的化学成分或生长因子。此外, B104-CM 的收集工作应该严格按照以上实验步骤进行, 以确保大鼠神经母细胞瘤细胞系在适宜的环境下生长。

通过吹打纯化 OPCs 培养的方法, 细胞纯度高, 实验操作更简单可行且经济, 为 OL 分化发育和髓鞘形成和再生奠定更坚实的理论基础, 对 CNS 脱髓鞘疾病的研究具有很大的临床意义。

参考文献

- 1 Nicolay DJ, Doucette JR, Nazari AJ. Transcriptional control of oligodendrogenesis[J]. *Glia*, 2007, 55(13): 1287-1299
- 2 Lin SC, Bergles DE. Synaptic signaling between neurons and glia[J]. *Glia*, 2004, 47(3): 290-298
- 3 Artemiadis AK, Anagnostouli MC. Apoptosis of oligodendrocytes and post-translational modifications of myelin basic protein in multiple sclerosis: possible role for the early stages of multiple sclerosis[J]. *Eur Neurol*, 2010, 63(2): 65-72
- 4 Wu B, Ren X. Promoting axonal myelination for improving neurological recovery in spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(10): 1847-1856
- 5 Zalc B, Colman DR. Origins of vertebrate success[J]. *Science*, 2000, 288(5464): 271-272
- 6 Chen Y, Balasubramanian V, Peng J, *et al.* Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1044-1051
- 7 Niu J, Wang L, Liu S, *et al.* An efficient and economical culture approach for the enrichment of purified oligodendrocyte progenitor cells[J]. *J Neurosci Methods*, 2012, 209(1): 241-249
- (收稿日期: 2016-08-18)
- (修回日期: 2016-09-07)
- [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(8): 3600-3613
- 17 Arends SJ, Damoiseaux JG, Duijvestijn AM, *et al.* Immunoglobulin G anti-endothelial cell antibodies: inducers of endothelial cell apoptosis in pulmonary arterial hypertension? [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 174(3): 433-440
- 18 Perros F, Dorfmueller P, Souza R. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension[J]. *Eur Respir J*, 2007, 29(3): 462-468
- 19 Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1183: 211-221
- 20 Graham BB, Chabon J, Kumar R, *et al.* Protective role of IL-6 in vascular remodeling in Schistosoma pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(6): 951-959
- 21 Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, *et al.* Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension[J]. *Circ Res*, 2014, 115(1): 165-175
- (收稿日期: 2016-08-03)
- (修回日期: 2016-09-04)