

• 综述 •

内皮微粒在急性移植物抗宿主病内皮损伤发生中的作用及机制研究进展*

安博文^{1△} 洪梅^{1△△}

[关键词] 异基因造血干细胞移植;急性移植物抗宿主病;内皮微粒;内皮损伤
[中图分类号] R457.7 [文献标志码] A [文章编号] 1004-2806(2013)07-0502-03

Research progress on the role and mechanism of endothelial microparticles in acute graft-versus-host disease

Summary Many studies have proved that endothelial cell injury plays an important role in the initiation and development of acute graft-versus-host disease (aGVHD) and is an early event of tissue injury caused by aGVHD. Endothelial microparticles (EMPs) are cell-membrane vesicles that shed from peripheral—blood endothelial cells when subjected to stress conditions, such as activation, apoptosis and so on. Several studies have indicated that the rise of EMPs suggests severe endothelial damage in patients with aGVHD. EMPs may participate in the immune injury of aGVHD through the apoptosis induced by Fas/FasL. We will review the research progress of aGVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and endothelial cell injury, and discuss EMPs and its possible mechanisms in endothelial cell injury during aGVHD.

Key words allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; acute graft-versus-host disease; endothelial microparticles; endothelial injury

异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)是彻底根治恶性血液病和遗传性疾病的主要手段,但其临床应用仍存在许多问题,其中急性移植物抗宿主病(aGVHD)是移植失败和患者死亡的主要原因之一。据欧洲骨髓移植登记中心统计资料,非亲缘 allo-HSCT 患者的 aGVHD 发生率为 40%~60%,病死率为 30%~50%。因此,深入研究 aGVHD 发病机制并探讨其防治新策略,对提高临床移植成功率和拓展 allo-HSCT 的临床应用具有重要意义。目前,aGVHD 与内皮细胞损伤的相关性成为研究的热点。本文就 aGVHD 与内皮细胞损伤的相关性进展做一综述。

1 内皮损伤在 aGVHD 中的作用

血管内皮细胞是血液和组织间的重要屏障,是机体重要的代谢及内分泌器官之一,具有选择性通透、产生细胞因子、表达各种膜分子、参与血管修复和重塑等功能。内皮细胞损伤是众多疾病的共同病理过程,如动脉粥样硬化、高血压、血栓性疾病和移植排异反应等。

aGVHD 的本质是供者 T 淋巴细胞对宿主靶细胞表面 MHC 抗原产生免疫应答所致的炎症反

应,而内皮细胞是供者 T 细胞最先接触到的宿主细胞及重要的靶组织。研究证实,内皮细胞损伤在 aGVHD 的启动和发展中发挥重要作用,是 aGVHD 所致受者组织损伤的早期事件^[1-2]:①供者 T 细胞接触到内皮细胞后直接损伤内皮细胞,并导致内皮微粒(EMPs)的释放;②内皮细胞表面抗原能激活 T 细胞,促进炎症因子的分泌和淋巴细胞在组织器官的募集,细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)则通过穿孔素/颗粒酶和 Fas/Fas 配体(Fas/FasL)途径清除抗原表达的内皮细胞;③越来越多的临床、病理及实验室证据表明,aGVHD 中存在内皮细胞的免疫损伤^[3-4]。对急性皮肤 GVHD 患者的皮肤中内皮损伤的半定量研究发现,其皮肤中血管性血友病因子(vWF)的外渗、外周血管的核尘、内膜淋巴细胞浸润以及血管增生等内皮损伤的征象显著多于未发生 aGVHD 的患者^[3]。在 aGVHD 患者小肠血管内皮细胞损伤的区域观察到毛细血管出血,其严重程度与临床出血性小肠结肠炎的严重程度相关。

移植后的早期内皮损伤综合征可代表内皮形式的 GVHD,它们可能是移植相关毒性、超急性排斥反应和供者反应性 T 淋巴细胞对受者血管内皮细胞损伤综合作用的结果,包括移植相关的微血管病、肝静脉闭塞病、弥漫性肺泡出血、植入综合征和毛细血管渗漏综合征。内皮细胞是 aGVHD 免疫介导损伤的靶组织,内皮损伤综合征与 aGVHD 有

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目资助(No: 81172826)
¹华中科技大学同济医学院附属协和医院血液科(武汉, 430022)
[△]现在地址为信阳市中心医院血液内科(河南信阳,464000)
^{△△} 审校者
通信作者:洪梅,E-mail:meihongcn@yahoo.com.cn

共同的特点,通过 CTL 细胞的浸润导致内皮细胞凋亡从而使微血管变得稀疏,在 CTL 细胞诱导内皮细胞凋亡的过程中,蛋白酶活化受体-1(PAR-1)亦参与内皮细胞的凋亡过程^[5]。Biedermann 等(2002)研究显示,移植相关微血管病患者的血浆能诱导正常微血管内皮细胞的凋亡,并且患者血浆中内皮损伤的标志物(如 vWF 等)与内皮损伤一致升高。Spitzer(2001)研究发现,allo-HSCT 死亡患者中有 40%尸解发现广泛的肺出血,并且 aGVHD 与肺泡出血的发生密切相关。异基因干细胞移植后小鼠 aGVHD 模型发现,小鼠发生急性肺损伤的肺毛细血管高度扩张充血、淋巴细胞浸润,导致血管内皮细胞脱落、凋亡,进而导致血管周围的炎症^[6]。

2 内皮损伤的信息载体 EMPs

EMPs 是内皮细胞遭受应激(激活或凋亡)时脱落于血循环中的直径为 0.1~1.0 μm 的小囊泡,其具备内皮细胞特有的细胞膜、细胞质和细胞核结构(少量的核碎片),微粒表面含有磷脂酰丝氨酸和内皮细胞来源的蛋白,其蛋白质成分与内皮细胞产生 EMPs 时的状态有关。血液中 EMPs 的水平与性质可反映其来源内皮细胞的功能,检测血浆中 EMPs 水平是新近发展的一种评估内皮功能损伤的方法^[7]。EMPs 并非是简单的细胞脱落物,而是携带多种生物学信息与生物活性分子的“载体”,其可作为细胞介质和黏附素的扩散载体,促进细胞信号的传导和效能,从而影响细胞的生物学功能,并具有促凝、促炎、加重内皮功能障碍等多种病理作用^[8-9]。

健康人体内存在基础水平的 EMPs,心血管疾病患者可检测到 EMPs 水平的升高,如急性冠状动脉综合征、糖尿病、动脉性高血压和高 TG 血症等。其他一些内皮细胞受损的疾病,如狼疮抗凝物、血小板减少性紫癜、先兆子痫、夜间阵发性血红蛋白尿、多发性硬化症等患者亦均存在 EMPs 水平的升高,而这些疾病都存在内皮激活或凋亡状态,EMPs 水平的升高提示内皮损伤的发生。Werner 等^[10]对 50 例冠心病患者进行研究发现,循环血液中 EMPs 的数量与冠状动脉的损伤有显著相关性,而增多的 EMP 能独立预测内皮依赖性血管舒张功能的受损情况,且不受高血压、血脂异常、吸烟、糖尿病、年龄、性别等传统危险因素的影响。Vanwijk 等(2002)研究发现,严重高血压患者体内循环 EMPs 大量增加。因此,EMPs 不仅是内皮细胞功能障碍的标志,还能导致血管的损伤。此外,EMPs 还表达黏附分子,如细胞间黏附分子-1、E 选择素或 vWF 等,检测这些分子可作为内皮细胞损伤的标志。由于 EMPs 也表达这些细胞损伤的标记,因而 EMPs 也能反映内皮功能障碍的程度。

目前,EMPs 的测量方法没有统一标准,主要

有酶联免疫吸附法和流式细胞术,其中后者快速准确,易操作,是目前检测 EMPs 的主要方法。目前提取 EMPs 的方法主要有 2 种,第 1 种得到乏血小板血浆后高速离心 10 000 $\times g$ 约 1 h,使 EMPs 沉淀至血浆最下层;另 1 种是得到乏血小板血浆后低速离心将细胞碎片等大颗粒沉淀至下层,EMPs 则悬浮于血浆上清中。由于 EMPs 比正常细胞小得多,其携带的蛋白数量很少,导致荧光强度较弱,目前常使用 0.8 μm 和 3 μm 或 1 μm 和 10 μm 的标准微球作为参照来检测。0.8 μm 和 1 μm 的标准微球用于定位,3 μm 和 10 μm 的标准微球不仅用于区别 EMPs,而且可以对其进行定量分析。

EMPs 具有细胞间信息传递的功能,可提高其预测疾病的特异性。今后对 EMPs 的研究重心将会从单纯检测其数量转向对携带某些特定抗原的 EMPs 的信号传递机制的分析。

3 EMPs 与 aGVHD

内皮细胞受到刺激后可以释放 EMPs 到外周中。在干细胞移植术后的患者,大剂量化疗及照射都可导致内皮细胞的损伤,化疗药物的毒性作用及活化单核细胞释放的细胞因子等对内皮细胞有直接的杀伤作用,故移植后严重的并发症与内皮细胞及 EMPs 关系密切。

近年来,不少研究均证实了 EMPs 与 aGVHD 密切相关。Pilusich 等^[11]检测了 allo-HSCT 患者血浆中 EMPs 的变化,发现 aGVHD 患者血浆中 EMPs 水平(18.5/ μl)比无 aGVHD 患者(14.6/ μl)明显升高,且与病情的严重程度密切相关,但与预处理强度、感染并发症等无关。Nomura 等^[12]发现,患者移植早期血浆中 EMPs 水平较移植前明显升高,同时伴有 aGVHD 相关指标如白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、可溶性 IL-2 受体水平的相应升高。我们的研究也得出一致的结论,EMPs 在移植后 1 周即出现升高,且在 aGVHD 发生时骤然升高,激光共聚焦显微镜观察到 aGVHD 发生时 EMPs 的分布比例明显增多,在移植后 EMPs 升高的同时可检测到 TNF- α 、血管内皮生长因子的升高,且 aGVHD 组移植后 3 周 EMPs 水平显著高于非 aGVHD 组^[13]。同时,我们也在 TNF- α 的诱导下,观察到内皮细胞 EMPs 的释放。以上研究表明,EMPs 水平升高提示 aGVHD 患者发生了严重的内皮损伤,可作为预示 aGVHD 的敏感标志物,其与 aGVHD 密切相关,并作为一种细胞信息载体参与了 aGVHD 的发生。

4 EMPs 参与 aGVHD 的发生机制

业已证实,Fas/FasL 及穿孔素/颗粒酶途径诱导的凋亡是 aGVHD 中 CTL 和 NK 细胞杀伤靶细胞的经典效应机制。Fas 是 TNF 受体超家族成员,Fas 与其配体 FasL 结合后传导死亡信号进入

细胞内,诱导细胞凋亡。Fas/FasL 途径是 aGVHD 中至关重要的一个环节。aGVHD 动物模型中,血管内皮细胞的凋亡几乎完全依赖于 Fas 与 FasL 之间的相互作用^[6]。

进一步的研究探讨了 EMPs 参与内皮损伤的机制。Mezentsev 等(2005)通过观察不同浓度 EMPs 对内皮细胞的影响,发现随着 EMPs 作用时间和浓度的增加,其对内皮细胞凋亡率增加的影响也加大,并加重内皮功能损害。韦祎等^[14]报道显示,缺血性股骨头坏死患者的细胞膜微粒在体外能够增加内皮细胞凋亡基因 Fas/beta-actin 的表达。Nomura 等^[12]发现,HSCT 早期 EMPs 升高的同时,凋亡标志物 sFasL 也明显升高;用 TNF- α 和 sFasL 诱导脐静脉内皮细胞,同样观察到 EMPs 释放增加。我们的研究发现,aGVHD 发生时血浆 sFasL 和 EMPs 水平均显著升高,而在无 aGVHD 患者和 aGVHD 发生前保持较低的水平^[13]。由于靶细胞杀伤作用的启动伴随 sFasL 的释放,sFasL 的升高提示 aGVHD 中存在 Fas/FasL 途径凋亡效应的增强^[12]。我们进一步在培养的 Eahy926 细胞中证实了 EMPs 与 Fas 系统的关系,在 0、50、100 ng/ml TNF- α 的诱导下,随着 TNF- α 浓度的增大,Fas+EMPs 占总 EMPs 的百分比逐渐升高,并伴有凋亡标志的 CD31⁺ EMPs 的显著增高。

因此,EMPs 可通过 Fas/FasL 途径诱导细胞凋亡,参与 aGVHD 的免疫损伤。EMPs 通过 Fas/FasL 途径诱导凋亡而参与 aGVHD 的内在机制尚未清楚。鉴于 EMPs 具有携带生物学信息的作用,其可能的分子信号传导系统尚待进一步研究。

综上,血管内皮细胞是 aGVHD 时 CTL 损伤机制的关键靶点,血管内皮细胞的凋亡几乎完全依赖于 Fas/FasL 途径,而 EMPs 能通过 Fas/FasL 途径诱导内皮细胞凋亡,在 aGVHD 的发生发展中起重要作用。阻断 EMPs 的作用可能减轻 aGVHD 的免疫损伤,更重要的是,阻断 EMPs 的病理作用并不影响肿瘤特异性 CTL 的激活及功能,可有效阻止 aGVHD 的发生,并保留对受者有利的移植物抗肿瘤效应。

参考文献

[1] SOCIÉ G,BLAZAR B R. Acute graft-versus-host disease:from the bench to the bedside[J]. Blood,2009,114:4327-4336.
 [2] TICHELLI A,GRATWOHL A. Vascular endothelium as “novel” target of graft-versus-host disease[J]. Best Pract Res Clin Haematol,2008,21:139-148.
 [3] SUNTHARALINGAM G,PERRY M R,WARD S,et

al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412[J]. New Engl J Med,2006,355:1018-1028.
 [4] BIEDERMANN B C. Vascular endothelium and graft-versus-host disease[J]. Best Pract Res Clin Haematol,2008,21:129-138.
 [5] QUAN L,JIAN Z,PING Z,et al. Proteinase-activated receptor-1 mediates allogeneic CD8(+) T cell-induced apoptosis of vascular endothelial cells[J]. Med Oncol,2009,26:379-385.
 [6] DESCHAUMES C, VERNEUIL L, ERTAULT-DANESHPOUY M,et al. CD95 ligand-dependant endothelial cell death initiates oral mucosa damage in a murine model of acute graft versus host disease[J]. Lab Invest,2007,87:417-429.
 [7] ROOS M A,GENNERO L,DENYSENKO T,et al. Microparticles in physiological and in pathological conditions[J]. Cell Biochem Funct,2010,28:539-548.
 [8] PUDDU P,PUDDU G M,CRAVERO E,et al. The involvement of circulating microparticles in inflammation,coagulation and cardiovascular diseases[J]. Can J Cardiol,2010,26:140-145.
 [9] RABELINK T J,DE BOER H C,VAN ZONN-EVELD A J. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease[J]. Nat Rev Nephrol,2010,6:404-414.
 [10] WERNER N,WASSMANN S,AHLERS P,et al. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2006,26:112-116.
 [11] PILUSCH V,RANK A,STEBER R,et al. Endothelial cell-derived Microparticles in allogeneic hematopoietic stem cell recipients [J]. Transplantation,2006,81:1405-1409.
 [12] NOMURA S,ISHII K,INAMI N,et al. Evaluation of angiopoietins and cell-derived microparticles after stem cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant,2008,14:766-774.
 [13] WU Q,CHEN H,FANG J,et al. Elevated Fas/FasL system and endothelial cell microparticles are involved in endothelial damage in acute graft-versus-host disease:a clinical analysis[J]. Leuk Res,2012,36:275-280.
 [14] 韦祎,吴志宏,邱贵兴,等. 细胞膜微粒对血管内皮细胞功能的影响[J]. 中华医学杂志,2008,88(11):754-759.

(收稿日期:2012-09-11)