

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.05.026

网络首发 <http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20190121.1454.008.html>(2019-01-22)

天然免疫系统在心脏缺血再灌注损伤及其保护作用中的研究进展*

涂荣会¹综述,蒙健军^{2△}审校

(广西医科大学第一附属医院:1. 心血管病研究所;2. 老年病学科,南宁 530021)

[摘要] 天然免疫系统的激活和炎症反应是缺血再灌注损伤的重要特征,其在心肌缺血再灌注损伤中的重要作用日益受到关注。缺血预处理和缺血后处理是缺血心肌有效的内源性保护现象,具有显著的抗缺血再灌注损伤作用。现就天然免疫系统在心肌缺血再灌注及其保护作用的研究进展予以综述。

[关键词] 补体;Toll 样受体;心肌缺血再灌注;缺血预处理;缺血后处理

[中图分类号] R45

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)05-0829-04

再灌注疗法是治疗急性心肌梗死最有效的方法,但会引起心脏再灌注损伤,严重影响再灌注的疗效及患者的预后。缺血预处理和缺血后处理是缺血心肌有效的内源性保护现象,具有显著的抗缺血再灌注损伤作用。

天然免疫系统的激活和炎症反应是缺血再灌注损伤的重要特征,其在心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)中的重要作用日益受到关注^[1]。本文就天然免疫系统在 MIRI 及其保护作用的研究进展予以综述。

1 心脏缺血再灌注损伤

1960 年 JENNINGS 短暂夹闭犬冠状动脉后再开通,发现犬更易发生致命性心室颤动,显著增加缺血犬的死亡率,首次提出 MIRI 理念。随后大量的动物实验和临床研究进一步证实,再灌注在改善心肌缺血的同时其本身也会加重心肌细胞损伤,出现心肌梗死面积扩大、恶性室性心律失常、心脏收缩功能减低等再灌注损伤^[2]。近年来,随着溶栓疗法、经皮冠状动脉介入术及冠状动脉旁路搭桥术等冠状动脉血运重建技术广泛应用于冠心病治疗, MIRI 越来越引起学者的关注,已经成为心血管研究的热点。MIRI 是一种复杂的病理生理过程,其发生机制尚不完全清楚,主要涉及氧化应激、免疫炎症反应及白细胞浸润等。其中,天然免疫系统的激活和炎症反应是缺血再灌注损伤的重要特征,其在缺血再灌注损伤中的重要作用日益受到关注。

2 天然免疫系统与心脏

所有多细胞动物均拥有天然免疫系统。天然免疫系统通过特殊的模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)识别入侵的病原体,并通过一系列信号转导通路,启动宿主免疫防御反应,是机体抵抗病原微生物感染的第一道防线。适度的天然免疫反

应可促进机体组织修复,但过度的天然免疫反应则会加重机体组织损伤。天然免疫系统中能够识别病原体分子模式的受体包括 Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)、补体和天然抗体。

心脏具有完整的先天免疫系统。研究证实,心肌细胞不仅具有舒缩功能,而且类似于体内的先天性免疫细胞,也能够参与机体的天然免疫应答反应。心肌细胞表面存在 TLRs、补体等多种 PRRs,当机体遭受缺血再灌注损伤及全身炎症时,心肌细胞通过激活 TLRs 信号通路及补体,促进一些炎症因子表达,启动和介导局部的炎症反应,导致心脏损伤。

3 TLRs 与心脏缺血再灌注损伤及保护作用研究

3.1 TLRs 结构及生物学功能 TLRs 是最早被人类认识的 PRRs,属于 I 型跨膜蛋白,主要由富含亮氨酸重复序列的膜外区(识别并结合病原相关分子)、跨膜区和含有 Toll/白细胞介素 1 受体同源区(Toll/IL-1 receptor homologous region, TIR)结构域的胞质区(介导下游信号转导)组成。TLRs 广泛分布于各种免疫及非免疫细胞之中,主要在心脏、肝脏、胰腺、皮肤、肺及脑等组织中高表达。除识别、结合来源于病原体的外源性分子以外,TLRs 也能识别、结合由损伤组织和坏死细胞释放的内源性损伤相关分子,如热休克蛋白,通过信号转导启动天然免疫应答,介导炎症反应^[3]。目前在人类中发现有 11 种 TLRs(TLR1~10、TLR14),不同的 TLRs 识别不同的病原分子模式和自身组织分子。依据含 TIR 结构域接头蛋白的不同,TLRs 信号通路分为髓样分化蛋白 88(myeloid differential protein-88, MyD88)依赖性和非 MyD88 依赖性两条途径进行细胞内信号转导。不同 TLR,接头蛋白不同,其信号转导通路也有差异。除 TLR3 外,其他 TLRs 均可通过 MyD88 依赖性信号通路活化核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、胞外信号调节激酶

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81560068);广西自然科学基金资助项目(2015GXNSFAA139198)。 作者简介:涂荣会(1974—),博士,副主任医师,主要从事冠心病、高血压基础与临床研究工作。 △ 通信作者, E-mail: gxmjj@163.com。

(extracellular regulated protein kinases, ERK)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)及 p38 等信号通路,促进炎症因子生成和释放;TLR3 和 TLR4 则介导 Toll 样受体转接蛋白通过非 MyD88 依赖性信号通路,激活干扰素 β 调节因子 3 和 NF- κ B,诱导 I 型干扰素、各种炎症因子和共刺激分子的产生、释放^[4]。

3.2 TLRs 与心脏缺血再灌注损伤 心肌缺血缺氧可引起大量损伤相关分子释放,诱导细胞和组织损伤;尽管再灌注维持了心脏的代谢、结构和功能,同时也引起了心脏急性炎症反应,进一步加重心肌损伤,在此过程中 TLRs 作为许多损伤相关分子的靶点,发挥了重要作用。其中,TLR4 和 TLR2 介导的信号通路在 MIRI 中起着关键性调节作用。LU 等^[5]研究发现,在心脏缺血再灌注早期,心肌缺血区及危险区的 TLR4 及 NF- κ B 表达显著升高,心肌细胞凋亡明显增加;而缺血再灌注 TLR4 基因缺陷小鼠,其心脏炎症反应及心肌梗死面积均显著减少。此外,研究还发现抑制 TLR4 及下游信号通路 MyD88 及 NF- κ B 也能减轻 MIRI,进一步证实 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路参与了 MIRI 的发生、发展^[6-7]。BAGCHI 等^[8]则发现,除 TLR4 外,TLR2 在大鼠 MIRI 过程中也明显升高,通过促进左室重构引起心脏结构及功能异常。ARSLAN 等^[9]在小鼠心脏再灌注前 5 min 应用特异性 TLR2 抗体,小鼠心肌梗死面积显著减小,心脏功能显著改善,则进一步揭示 TLR2 信号通路介导了 MIRI。近年来,TLR9 介导的 p38 MAPK 信号通路在 MIRI 中的作用已引起学者的关注。XIE 等^[10]发现再灌注大鼠心肌 TLR9 及 p38 MAPK 蛋白表达显著上调,心肌细胞凋亡及心肌梗死面积显著增加,而应用 TLR9 抑制剂氯喹则取消了上述作用,显示 TLR9 介导了 MIRI。总之,TLRs 是 MIRI 的重要受体,其信号通路激活所介导的炎症反应及心肌细胞凋亡是 MIRI 的重要机制,积极干预 TLRs 信号通路可能是减轻 MIRI 新靶点。

3.3 TLRs 与心脏缺血预处理 心脏缺血预处理即心脏经过数次短暂的缺血再灌注处理可改善其后长时间冠状动脉闭塞引起的心肌损伤,是机体组织自身对抗缺血再灌注损伤的一种强而有效内源性保护措施,在冠心病防治、心脏保存及心脏移植等方面具有重要意义。TLRs 信号通路在缺血预处理心脏保护中的重要作用已得到广泛研究。ZHOU 等^[11]研究发现,TLR-9 配体(CpG-ODN)预处理通过抑制心肌细胞能量代谢、促进心肌血管生成,进而改善急性心肌梗死小鼠的心功能。DONG 等^[12]研究显示缺血预处理显著改善再灌注野生型小鼠的心功能,减少损伤性肌酸激酶的释放,这种保护作用在 LR2 及 TIR 适配蛋白(TIRAP)基因缺陷小鼠消失,提示 TLR2-TIRAP 信号通路介导心脏缺血预处理。同样,应用

TLR2 配体(Pam3CSK4)预处理能够显著减轻小鼠缺血区中性粒细胞浸润、炎症因子产生及心肌细胞凋亡,同时降低血清肌钙蛋白 T 水平,减小心肌梗死面积、改善心脏功能。进一步研究显示,磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B, PI3K/Akt)生存通路介导了缺血预处理心脏保护^[13]。最近 LEE 等^[14]发现 TLR4 信号通路同样在缺血预处理心脏保护中发挥重要调控作用。应用 TLR-4 拮抗剂 eritoran 预处理,小鼠 NF- κ B 的活化、促炎因子的表达明显减少,小鼠心肌梗死面积显著减小。信号转导机制研究显示缺血预处理及远端缺血预处理通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路改善 MIRI^[15]。此外,研究还发现地塞米松预处理,紫檀芪预处理也是通过下调 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路发挥心脏保护作用的^[16-17]。因此,针对 TLRs 及下游信号通路积极干预对缺血预处理心脏保护具有重要临床意义。

3.4 TLRs 与心脏缺血后处理 由于心肌缺血事件的不可预料性,缺血预处理的临床应用有一定的局限性。2003 年有研究首次提出了一种新的内源性心肌保护方法——缺血后处理,即心肌发生缺血后在长时间的再灌注前对缺血心肌反复实施短暂的缺血再灌注处理,可以显著减轻 MIRI。大量的基础研究及临床试验均证实缺血后处理可显著减少再灌注心肌梗死面积及恶性心律失常的发生,减少心肌坏死与凋亡,显著改善心脏功能^[18]。由于可在缺血后再灌注期间进行,缺血后处理具有广阔的临床应用前景。TLR 信号通路是否参与心脏缺血后处理目前少有研究报道。近期, KIM 等^[19]研究显示 TLR9 配体后处理通过激活 TLR9 发挥心脏保护作用,而应用 PI3K 特异性抑制剂渥曼青霉素,小鼠心肌梗死面积显著增加,提示这种心脏保护作用是由 TLR9-PI3K 信号通路介导的。ZHANG 等^[15]报道七氟烷后处理通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路改善 MIRI。而 TLR2、TLR3 等其他 TLRs 信号通路在心脏缺血后处理中的重要作用有待进一步研究。

4 补体系统激活与 MIRI 及保护作用研究

4.1 补体系统激活与 MIRI 补体是存在于人和动物血清、组织液和细胞膜表面的一组不耐热、经活化后具有酶活性、可介导免疫应答和炎症反应的蛋白质。补体系统由固有成分(C1~C9、B 因子、D 因子、甘露聚糖结合凝集素)、调控蛋白(血浆可溶性因子及细胞膜结合蛋白)和受体等 30 余种蛋白质组成。作为天然免疫系统的一部分,补体系统不仅通过病原相关分子模式激活,也可通过缺血再灌注期间释放的内源性损伤相关分子所激活,通过经典途径、甘露糖结合凝集素途径和旁路途径,最终导致 C3 的降解和 C5 的激活,形成攻膜复合体^[1]。攻膜复合体插入细胞膜形成贯通胞膜的圆形亲水离子通道,引起钠、钙离子

和水分子内流,导致细胞钙超载,最终引起细胞肿胀、裂解死亡;同时攻膜复合体可刺激内皮细胞表达 IL、血小板活化因子、P 选择素及单核细胞趋化蛋白-1,引起中性粒细胞、单核巨噬细胞募集到损伤心肌介导炎症损伤;此外,攻膜复合体和 C5a 也可通过诱导 p21 蛋白(ras 基因家族编码的蛋白质)的表达引起细胞凋亡;更为重要的是在补体激活过程中产生的补体活性成分及其一系列 C3a、C5a 等裂解片段,通过促进中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞募集到损伤心肌,产生氧自由基、各种蛋白水解酶,促进炎症介质肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1、IL-6、NF- κ B 等释放,引起心肌细胞的坏死和凋亡,导致心肌损伤。

早在 1971 年 HILL 等提出,补体系统在 MIRI 中发挥重要的调控作用,其中 C5、C3 是引起心肌细胞凋亡及组织损伤的关键介质^[20]。研究表明,MIRI 后 C5aR mRNA 和蛋白表达明显上调。再灌注 C5aR 基因敲除的小鼠其心肌组织 C3 沉积和白细胞浸润明显减少,同时心肌细胞凋亡及心肌梗死面积显著减少,心功能显著改善^[21]。同样,抑制心肌组织 C3 沉积及蛋白表达,亦可改善小鼠 MIRI^[22]。除 C5、C3 外,补体 B 因子在 MIRI 中的作用日益受到关注。研究显示,心肌缺血再灌注过程中可激活补体 B 因子,进而促进心肌 C3 活化,引起肌钙蛋白 I 释放,心肌梗死面积扩大;而缺血再灌注补体 B 因子基因缺陷的小鼠,其心肌 C3 活化和肌钙蛋白 I 释放显著减少,心肌梗死面积显著缩小^[23]。总之,补体与 MIRI 密不可分,MIRI 能够上调一些补体成分的表达并导致补体的激活,而激活的补体成分通过直接和间接效应介导 MIRI。

4.2 补体系统与心脏缺血预处理 2000 年,TAN-HEHCO 等发现缺血预处理通过减少兔心脏缺血区 C1、C3、C8、C9 及攻膜复合体的 mRNA 及蛋白质表达减轻 MIRI,初步证实心脏缺血预处理通过抑制补体系统激活发挥再灌注心脏保护作用。在小鼠缺血前 30 min 分别应用 C5 的单克隆抗体(BB5.1)和 C3a 受体拮抗剂(C3aRA),再灌注心肌的炎症反应及组织损伤明显减轻。最近,TANG 等^[24]应用 C5 shRNA 预处理大鼠,发现大鼠损伤性血肌钙蛋白 T 显著减少,心肌组织 TNF- α 等炎症因子水平显著下降,同时心肌梗死面积明显减少 40%,进一步研究发现该保护作用是由 PI3K/Akt 生存通路介导的。

4.3 补体系统与心脏缺血后处理 心脏缺血后处理对补体系统调控鲜见研究报道。近期临床试验显示,对行冠脉旁路搭桥术的急性 ST 段抬高型心肌梗死患者应用 C1、C5 抑制剂,即 C1、C5 抑制剂后处理,不仅安全,而且有效减轻 MIRI,改善心功能。本课题组近期发现心脏缺血后处理显著减少缺血再灌注大鼠全身炎症反应及心脏 C3、C5 的 mRNA 和蛋白表达,通过调控心脏天然免疫系统,减轻 MIRI,具体机制有待

深入研究。

5 结 语

TLRs 一直是免疫学研究的热点,尽管动物实验和体外研究已经证实,抑制不同 TLRs 信号通路可有效保护 MIRI,然而针对心肌梗死患者抑制 TLRs 是否能够挽救心肌进一步损伤目前尚无研究报道。在临床试验进行前,进一步阐明不同 TLRs 介导的 MIRI 机制是未来的一个重要研究方向。补体系统包括一系列蛋白质,针对不同环节的补体靶向药物能在不同水平抑制补体级联反应,这也提供了许多急性心肌梗死药物介入靶点。一份纳入了 4 个临床研究包含 5 916 份病例的系统回顾显示,采用新型的 C5 抑制剂 pexelizumab 治疗,能够降低急性心肌梗死患者行冠脉搭桥术的病死率。然而受补体抑制剂发挥疗效的治疗窗较窄、组织穿透性差、患者个体差异等多重因素的影响,补体靶向药物保护性结果在临床中可能出现复杂不一致的现象。针对心肌梗死患者,如何开发安全有效的补体靶向药物值得深入研究。总之,TLRs 信号通路及补体激活所介导的天然免疫应答是导致 MIRI 的重要机制。通过对缺血预处理及缺血后处理抗 MIRI 的免疫机制深入研究,探讨针对 TLRs 信号通路及补体系统可能的作用靶点,对于缺血预处理及后处理的临床应用,减轻、预防 MIRI,改善急性心肌梗死患者的心肌存活及长期预后,具有十分重要的意义。

参考文献

- [1] BONAVENTURA A, MONTECUCCO F, DALLEGRI F. Cellular recruitment in myocardial ischaemia/reperfusion injury[J]. Eur J Clin Invest, 2016, 46(6):590-601.
- [2] JIAN J, XUAN F, QIN F, et al. The antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities of the baubinia championii flavone are connected with protection against myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(4):1365-1375.
- [3] RAI V, AGRAWAL D K. The Role of DAMPs and PAMPs in inflammation-mediated vulnerability of atherosclerotic plaques[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 95(10):1245-1253.
- [4] TOLDO S, QUADER M, SALLOUM F N, et al. Targeting the innate immune response to improve cardiac graft recovery after heart transplantation: implications for the donation after cardiac death[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6):958.
- [5] LU M, TANG F, ZHANG J, et al. Astragaloside IV attenuates injury caused by myocardial ischemia/reperfusion in rats via regulation of toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B signaling pathway[J]. Phytother Res, 2015, 29(4):599-606.
- [6] LI X, YANG J, YANG J, et al. RP105 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via suppressing

- TLR4 signaling pathways in rat model[J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 100(2): 281-286.
- [7] YANG J, YANG C, YANG J, et al. RP105 alleviates myocardial ischemia reperfusion injury via inhibiting TLR4/TRIF signaling pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(6): 3287-3295.
 - [8] BAGCHI A K, AKOLKAR G, MANDAL S, et al. Toll-like receptor 2 dominance over Toll-like receptor 4 in stressful conditions for its detrimental role in the heart[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 312(6): H1238-H1247.
 - [9] ARSLAN F, SMEETS MB, O'NEILL LA, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocyte toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-TLR-2 antibody[J]. *Circulation*, 2010, 121(1): 80-90.
 - [10] XIE L, LIU S, CHENG J, WANG L, et al. Exogenous administration of mitochondrial DNA promotes ischemia reperfusion injury via TLR9-p38 MAPK pathway[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2017, 89(1): 148-154.
 - [11] ZHOU D C, SU Y H, JIANG F Q, et al. CpG oligodeoxynucleotide preconditioning improves cardiac function after myocardial infarction via modulation of energy metabolism and angiogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(5): 4245-4257.
 - [12] DONG J W, VALLEJO J G, TZENG H P, et al. Innate immunity mediates myocardial preconditioning through Toll-like receptor 2 and TIRAP-dependent signaling pathways[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(3): H1079-H1087.
 - [13] POURRAJAB F, YAZDI M B, ZARCH M B, et al. Cross talk of the first-line defense TLRs with PI3K/Akt pathway, in preconditioning therapeutic approach[J]. *Mol Cell Ther*, 2015, 3(1): 4.
 - [14] LEE S M, HUTCHINSON M, SAINT D A. The role of Toll-like receptor 4 (TLR4) in cardiac ischaemic-reperfusion injury, cardioprotection and preconditioning[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2016, 43(9): 864-871.
 - [15] ZHANG J, ZHANG J, YU P, et al. Remote ischaemic preconditioning and sevoflurane postconditioning synergistically protect rats from myocardial injury induced by ischemia and reperfusion partly via inhibition TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(1): 22-32.
 - [16] YANG Y F, PENG K, LIU H, et al. Dexmedetomidine preconditioning for myocardial protection in ischaemia-reperfusion injury in rats by downregulation of the high mobility group box 1-toll-like receptor 4-nuclear factor κ B signalling pathway[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 44(3): 353-361.
 - [17] WANG C, SUN H, SONG Y, et al. Pterostilbene attenuates inflammation in rat heart subjected to ischemia-reperfusion: role of TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(2): 1737-1746.
 - [18] VANEZIS A P, RODRIGO G C, SQUIRE I B, et al. Remote ischaemic conditioning and remodelling following myocardial infarction: current evidence and future perspectives[J]. *Heart Fail Rev*, 2016, 21(5): 635-643.
 - [19] KIM S C, WU S, FANG X, et al. Postconditioning with a CpG containing oligodeoxynucleotide ameliorates myocardial infarction in a murine closed-chest model[J]. *Life Sci*, 2014, 119(1/2): 1-8.
 - [20] SHARIF-PAGHALEH E, YAP M L, PUHL S L, et al. Non-Invasive whole-body detection of complement activation using radionuclide imaging in a mouse model of myocardial ischaemia-reperfusion injury[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16090.
 - [21] DE HOOG V C, TIMMERS L, VAN DUIJVENVOORDE A, et al. Leucocyte expression of complement C5a receptors exacerbates infarct size after myocardial reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103(4): 52152-52159.
 - [22] YAMAMOTO T, TAMAKI K, SHIRAKAWA K, et al. Cardiac Sirt1 mediates the cardioprotective effect of caloric restriction by suppressing local complement system activation after ischemia-reperfusion[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(8): H1003-H1014.
 - [23] CHUN N, HADDADIN A S, LIU J, et al. Activation of complement factor B contributes to murine and human myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179450.
 - [24] TANG K, CHENG Y, WU S, et al. Protective effect of C5 shRNA on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(10): 1394-1402.

(收稿日期: 2018-08-13 修回日期: 2018-11-27)