

角质细胞生长因子-2 在高原性肺水肿的预防作用

余君, 宋元林, 李华茵, 张新, 洪群英, 朱蕾

(复旦大学附属中山医院, 呼吸科)

摘要: 高原性肺水肿 (high altitude pulmonary edema, HAPE) 是一种威胁生命的疾病, 通常发生在快速进入海拔超过 3000 米地区的健康人群。迄今国际上尚缺乏对 HAPE 的有效预防药物, 一些已用于临床的药物, 它们不仅副作用大, 且效用单一。角质细胞生长因子 (Keratinocyte growth factor, KGF)-2 在 HAPE 发生发展过程中不仅可降低或避免肺泡-毛细血管膜应激衰竭, 还可避免细胞骨架塌陷, 促进肺水转运, 对抗氧化应激和肺泡表面物质失衡, 所以应用 KGF-2 为治疗 HAPE 带来新的希望。

关键词: 高原性肺水肿; 角质细胞生长因子-2; 肺泡-毛细血管膜应激衰竭

中图分类号: R563

The potential role of keratinocyte growth factor-2 on high altitude pulmonary edema

She Jun, Song yuanlin, Li Huayin, Zhang Xin, Hong qunying, Zhu Lei

(Department of Pulmonary Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University)

Abstract: High altitude pulmonary edema (HAPE) is potentially fatal altitude illness affecting non-acclimatized individuals develops in rapidly ascending above 3000m. So far there is no effective prophylactic treatment against HAPE. The therapeutics of HAPE in clinic are not work well and some of them have large side effects. Keratinocyte growth factor (KGF) -2 has been shown to reduce alveolar epithelium and capillary endothelium stress failure, avoid the collapse of the cytoskeleton, promote the lung water transport, against the oxidative stress and maintenance the alveolar surfactant homeostasis. The pretreatment with KGF-2 might be a new promising to HAPE.

Key words: high altitude pulmonary edema; Keratinocyte growth factor-2; alveolar epithelium and capillary endothelium stress failure

0 引言

高原性肺水肿 (high altitude pulmonary edema, HAPE) 通常发生在快速进入海拔超过 3000 米地区的健康人群, 表现为缺氧和肺内出现高蛋白性漏出液的一种威胁生命的疾病[1, 2]。HAPE 发病率为 1%-2%, 但有文献报道约 75% 的正常人群进入高原后可出现亚临床表现, 患者有干咳, 胸痛和呼吸困难等现象, 提示可能已经存在血管外肺水增加[2]。我国青藏高原地区尤其是西藏平均海拔 4000 米以上, 占全国面积的 1/6, 是 HAPE 的高发区。近年来西部开发, 赴西藏旅游人数急剧增加, HAPE 发病率较前有明显升高趋势。而迄今国际上尚缺乏对 HAPE 的有效预防药物, 所以研发新型药物很有必要, 现将近年来 KGF-2 在 HAPE 的研究进展做一综述。

1. HAPE 的发病机制

基金项目: 教育部博士点基金新教师类 (编号: 20110071120060)

作者简介: 余君, 主要研究方面: 肺损伤, 气道疾病, 肺部肿瘤

通信联系人: 朱蕾教授, 主要研究方向: 肺损伤/急性呼吸窘迫综合症. E-mail: zhu.lei@zs-hospital.sh.cn

HAPE 的发生与高原低氧合并运动密切相关,其发病机制尚未完全阐明,目前认为低氧可使肺血管收缩产生肺动脉高压,而运动可加重肺动脉高压的形成。肺部血管血流动力学异常,部分微血管压力增加,导致血浆向血管外漏出,然而血管收缩使血液逆流至毛细血管并不能完全解释 HAPE 的发病[3]。

1995 年,West 等[4]通过超微结构检测发现肺毛细血管内皮层或整个气血屏障的断裂,红细胞和水肿液进入肺泡间质和肺泡腔,为毛细血管应激衰竭在 HAPE 发病中的作用提供了证据。我们最近发表在欧洲呼吸病杂志上的研究表明[5, 6],在模拟海拔 4700 米,给予动物持续运动,病理表现为肺间质增宽(间质性肺水肿),及红细胞漏出伴肺泡性肺水肿。电镜下不仅毛细血管内皮细胞出现损伤,而且肺泡上皮细胞的肿胀和断裂更显著,推测肺泡-毛细血管膜应激衰竭(alveolocapillary barrier stress failure)在 HAPE 的发病中有重要作用。涉及的机制可能包括细胞骨架塌陷,肺内液体清除障碍[7],氧自由基破坏和表面活性物质失衡等。

2. KGF-2 的预防潜力

迄今国际上尚缺乏对 HAPE 的有效预防药物,一些已用于临床的药物,如:硝苯地平通过扩张外周血管降低肺动脉压;糖皮质激素减少炎症因子的浸润; β -受体激动剂上调 ENaC 来促进肺水吸收,它们不仅副作用大,且效用单一[1]。目前尚没有一种药物做到多环节干预 HAPE 疾病,新近发现的上皮特异性丝裂原---角化生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)-2 是纤维生长因子(FGF)家族中的一员,又名 FGF10,与纤维生长因子受体(FGFR)2-IIIb 和 FGFR1-IIIb 有高亲和力,多数学者认为, KGF-2 和 KGF (FGF7)的功能和作用机制存在重叠和互补[8, 9]。它通过促进上皮增生,修复损伤,调节细胞间质和保护内皮屏障,有效的预防内毒素,机械通气和肺移植等引起的损伤[10, 11, 12, 13]。我们的研究显示, KGF-2 在 HAPE 发生发展过程中会起类似的保护作用,降低或避免肺泡-毛细血管膜应激衰竭[14],所以应用 KGF-2 治疗 HAPE 的疗效和机制值得深入探讨。

2.1 细胞骨架和肺水转运

有研究显示,低氧可使上皮和内皮细胞骨架塌陷和细胞间连接松弛。细胞骨架塌陷,主要表现为骨架蛋白 F-肌动蛋白丝(actin filament)和 α -膜收缩蛋白(spectrin)的瓦解,但随着低氧的恢复, F-actin filament 和 α -spectrin 的断裂(disruption)和丛聚(clumping)会消失[15]。同时,肺泡-毛细血管屏障主要由肺泡上皮和血管内皮细胞通过粘附连接(adherens junction, AJ)和紧密连接(tight junction, TJ)等结构蛋白构成。它们一方面与 actin 连接,保持细胞极性,另一方面传递细胞与细胞间的信息。低氧下若这些蛋白出现表达量或功能异常,则可出现细胞骨架紊乱,且表现为细胞间的粘附连接和紧密连接,如: VE-cadherin/p120-catenin complex 的解体,通透性增高,损害屏障功能。 KGF 可维持上皮和内皮细胞的完整(integrity)和稳态(homeostasis)[16]。它通过与 FGFR1 和 FGFR2 结合,调节细胞迁移。我们推测 KGF-2 可能也有类似作用。

缺氧可影响细胞间通透性和离子通道钠通道(epithelial sodium channel, ENaC)和 K 泵(Na/K-ATPase)的表达[15]。这些离子通道在氯离子通道(CFTR)的参与下,通过主动转运使上皮与间质之间渗透压差,于是水经跨细胞和细胞间粘附连接和紧密连接途径进入间质,最后回流至毛细血管和淋巴管[17]。已有研究证实, AQP-5 可对跨细胞和细胞间连接的水转运起调节作用[18]。当 AQP-5 基因剔除后,不仅水转运能力降低,且细胞间的连接蛋白,如: occludin 和 claudins 表达发生下调。我们已有研究证实, AQP5-/-基因剔除小鼠与野生型

80 比较易导致肺水肿发生[19]。我们推测 HAPE 肺泡-毛细血管膜应激衰竭的发生可能与细胞骨架, 细胞间连接和离子通道表达的改变, 及肺泡上皮水通道(aquaporin, AQP)-5 和毛细血管内皮 AQP-1 对水转运的调控密切相关。

2.2 氧化应激和表面活性物质失衡

85 低氧可激活线立体氧敏感机制(O_2 sensing mechanism), 一些超氧阴离子(O_2^-)和 H_2O_2 等随着细胞呼吸而出现毒性产物, 而且低氧通过抑制线立体内电子的传输, 使剩余的电子载体进行氧化还原反应增加活性氧簇(reactive oxygen species, ROS), 进入胞质溶胶参与信号传导[20]。HAPE 是一种低压低氧下的肺损伤, 所以推测 ROS 参与 HAPE 的发病。ROS 可调控离子通道, 如: 在肺水清除中有重要作用的 Na/K-ATPase, 通过与 ROS 和激活的 PKC- ζ 作用, 在细胞浆膜和细胞间隙来实现内吞和胞吐[20]。

90 高原低氧还能影响 AEC 的正常代谢, 使表面活性物质分泌减少, 毛细血管和肺组织通透性增加。研究显示, 预防性运用 KGF 可刺激 AEC 增生, 加强表面活性物质分泌, 提高磷脂水平, 改善肺水清除, 降低呼吸膜通透性[21], 但有学者持不同观点, 似乎 KGF 并没有显著的促进细胞增生和表面活性物质分泌, 而是调节表面活性物质动态平衡(surfactant homeostasis)来减少细胞凋亡, 机制可能与 p53, Bax 和 Bcl-X 有关[22]。

2.3 相关的信号途径

PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)和它的下游效应元件 AKT (serine-threonine protein kinase)构成的信号途径在细胞存活和修复损伤中有重 3 要作用。最近的研究显示[23, 24], 低氧中生长因子(GF)通过酪氨酸激酶连接受体(tyrosine kinase receptors, TKR)和 G 蛋白连接受体传递信号, 激活 PI3K/AKT, 阻止细胞凋亡。一般认为, PI3K 的活性是受许多机制严格控制的。无活性的 P85—P110 复合物普遍存在于胞质中, 等待适当的信号激活。PI3K 通过两种方式激活: 一种是与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体或连接蛋白相互作用, 引起二聚体构象改变而被激活。另一种是通过 Ras 和 P110 直接结合, 导致 PI3K 的活化。PI3K 被激活后, 在细胞膜上生成第二信使 PIPa, PIPa 与细胞内含有 PH 结构域的信号蛋白 Akt 和磷酸肌醇依赖性蛋白激酶(phosphoinositide dependent kinase-I, PDK1)结合, 促使 PDK1 磷酸化 Akt 蛋白的 Ser308 导致 Akt 的活化。AKT 是一种相对分子质量为 60 000 的丝氨酸 / 苏氨酸激酶, 能直接磷酸化多种转录因子, 抑制凋亡基因的表达和增强抗凋亡基因的表达, 促进细胞的存活。研究显示[18]: AKT 能调节转录因子 NF- κ B 和 Bcl-2。NF- κ B 与许多细胞因子和生长因子引起的细胞分化、凋亡和生存有关。正常状态下, NF- κ B 在胞质中与它的抑制因子 I- κ B 结合无转录活性。AKT 能通过磷酸化激活 IKK(I- κ B 激酶), 使 I- κ B 降解, 于是 NF- κ B 转位到细胞核内诱导目的基因表达。AKT 对介导的 I- κ B 降解和 NF- κ B 活化是必需的。同时, AKT 还能通过直接磷酸化促凋亡蛋白 Bad 促进细胞生存。Bad 是 Bcl-2 家族中的一个致凋亡蛋白, 通过结合和拮抗 Bcl-2 和 Bcl-X 等使细胞凋亡。AKT 通过 Raf-1 和 P65PAK 来磷酸化 Bad 的 Ser136 位残基, 使 Bad 与胞质中的 14-3-3 蛋白螯合, 使 Bcl-2 或 Bcl-XI 恢复抗细胞凋亡的功能。因此 PI3K-AKT 可能参与 HAPE 病理生理过程的调控。

115 此外, 研究表明, FGF10 可通过 FGF10-FGFR2b-Sprouty 信号通路, 调节肺干/祖细胞端粒末端转移酶和促进细胞迁移修复肺损伤, 并且 Sprouty 基因家族还能负反馈调节 FGF 信号, 避免恶性增生和瘢痕形成[25]。尽管有报道低氧会启动干细胞的活化, 肺内募集。但 HAPE 引起的肺泡-毛细血管屏障应激衰竭使内源性干细胞失去再生和修复的能力(内源性干细胞失活), 而 FGF10 可恢复干/祖细胞的功能[26], 修复因 DNA 损害和谷胱甘肽缺失致细胞损伤, 减少凋亡和促进细胞迁移。细胞迁移是一系列生理程序的集合, 其中细胞骨架是物质基

础, Rho-Rho 激酶通过调节细胞内骨架蛋白的聚合状态而扮演“分子开关”的角色。最近研究发现, 骨架蛋白的聚合, 解聚和跨膜离子流动, 随着渗透压不同而发生改变。而 AQP_s 可利用渗透压变化促进细胞迁移时突出的形成, 来修复损伤[27]。

综上所述, HAPE 的发病机制, 包括毛细血管内皮和肺泡上皮应激衰竭, 细胞骨架塌陷, 肺水清除障碍, 氧自由基的破坏和表面活性物质失衡等方面, 所以研究 KGF-2 可能的预防作用, 及相关转录因子的调控, 为 HAPE 的治疗带来新希望。

[参考文献] (References)

- [1] West JB. The physiologic basis of high-altitude diseases [J]. *Ann Intern Med* 2004, 141: 789-800.
- [2] Cremona G, Asnaqhi R, Baderna P, et al. Pulmonary extravascular fluid accumulation in recreational climber: a prospective study [J]. *Lancet* 2002, 359: 303-309.
- [3] Sartori C, Allemann Y, Scherrer U. Pathogenesis of pulmonary edema: learning from high-altitude pulmonary edema [J]. *Respir Physiol Neurobiol* 2007, 159: 338-349.
- [4] West JB, Colice GL, Lee YJ, et al. Pathogenesis of high-altitude pulmonary oedema: direct evidence of stress failure of pulmonary capillaries [J]. *Eur Respir J* 1995, 8: 523-529.
- [5] Bai CX, She J, Goolaerts A, Song YL et al. Stress failure plays a major role in development of High Altitude Pulmonary Edema in rats [J]. *Eur Respir J* 2010, 35: 584-591.
- [6] Hopkins SR. Stress failure and high altitude pulmonary oedema: mechanistic insights from physiology. *Eur Respir J* 2010; 35: 470-472.
- [7] Sartori C, Allemann Y, Duplain H, et al. Salmeterol for the prevention of high-altitude pulmonary edema [J]. *N Engl J Med* 2002, 346: 1631-1636.
- [8] Ware LB and Matthay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, 282: L924-940.
- [9] Simonet WS, DeRose ML, Bucay N, et al. Pulmonary malformation in transgenic mice expressing human keratinocyte growth factor in the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(26): 12461-12465.
- [10] Alderson R, Gohari-Fritsch S, Olsen H, et al. In vitro and in vivo effects of repifermin (keratinocyte growth factor-2, KGF-2) on human carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 50: 202-212.
- [11] Gills P, Savla U, Volpert OV, et al. Keratinocyte growth factor induces angiogenesis and protects endothelial barrier function [J]. *Journal of Cell Science* 1999, 112: 2049-2057.
- [12] Chandel NS, Budinger RS, Mutlu GM, et al. Keratinocyte growth factor expression is suppressed in early acute lung injury/acute respirator distress syndrome by smad and c-Abl pathways [J]. *Crit Care Med* 2009, 37: 1678-1684.
- [13] Frevtes CO, Ratanatharathorn V, Taylor C, et al. Phase I/II randomized trial evaluating the safety and clinical effects of repifermin administered to reduce mucositis in patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 8318-8324.
- [14] She Jun, Goolaerts Arnaud, Shen Jun, et al. KGF-2 targets alveolar epithelia and capillary endothelia to reduce high altitude pulmonary oedema in rats. *J Cell Mol Med*. 2012; 16: 3074-3084.
- [15] Bouvry D, Planes C, Malbert-Colas L, et al. Hypoxia-induced cytoskeleton disruption in alveolar epithelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, 35: 519- 527.
- [16] Murakami M, Nguyen LT, Zhang ZW, et al. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity [J]. *J Clin Invest* 2008, 118: 3355-3366.
- [17] Bai C, Fukuda N, Song Y, et al. lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice [J]. *J Clin Invest* 1999, 103: 555-561.
- [18] Kawedia JD, Nieman ML, Boivin GP, et al. Interaction between transcellular and paracellular water transport pathways through Aquaporin 5 and the tight junction complex [J]. *PNAS* 2007, 104: 3621-3626.
- [19] She Jun, Bi Jing, Tong L, Song Yuanlin, Bai Chunxue. New insights of aquaporin 5 in the pathogenesis of high altitude pulmonary edema. *Diagn Pathol*. 2013; 8: 193.
- [20] Data LA, Chandel NS, Ridge KM, et al. Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cell is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC- ζ [J]. *J Clin Invest* 2003, 111: 1057-1064.
- [21] Bi Jing, Tong Lin, Zhu Xiadan, Yang Dong, Bai Chunxue, Song Yuanlin, She Jun. Keratinocyte growth factor-2 intratracheal instillation significantly attenuates ventilator-induced lung injury in rats [J]. *J Cell Mol Med*. 2014, 18: 1226-1235
- [22] Barazzzone C, Donati YR, Rochat AF, et al. Keratinocyte growth factor protects alveolar epithelium and endothelium from oxygen-induced injury in mice [J]. *American Journal of Pathology* 1999, 154: 1479-1487.
- [23] Humar R, Kiefer FN, Berns H, et al. Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin-dependent signaling [J]. *FASEB* 2002, 16, 771-780.
- [24] Gerasimovskaya EV, Tucker DA, and Stenmark KR. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and mammalian target of rapamycin is necessary for hypoxia-induced pulmonary artery adventitial fibroblast proliferation [J]. *J Appl Physiol* 2004, 98: 722-731.
- [25] Warburton D, Tefft D, Mailleux A, et al. Do lung remodeling, Repair, and Regeneration Recapitulate Respiratory ontogeny? *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: s59- s62.
- [26] Li Jing, Zhou Jian, Zhang Dan, Song Yuanlin, She Jun, Bai Chunxue. Bone marrow-derived mesenchymal

stem cells enhance autophagy via PI3K/AKT signaling to reduce the severity of ischaemia/reperfusion-induced lung injury. J Cell Mol Med. 2015; 19: 2341-2351.

185 [27] Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS, et al. Aquaporins and cell migration. Eur J Physiol 2008; 456: 693-700.