

· 综述 ·

间充质干细胞在肺纤维化治疗中的应用及机制

刘明 徐军

肺纤维化是一种以间质性肺纤维化伴有肺功能的下降及呼吸衰竭为特征的肺疾病,是许多肺部疾病的终末结局。患者病情重,病死率高,临床上尚缺乏有效的治疗药物^[1-2]。肺纤维化的典型特征为肺泡上皮细胞损伤及激活,间质性炎症、成纤维细胞增殖、细胞外基质胶原沉积,同时伴有自身免疫异常^[3-4]。因此,调节异常的自身免疫炎症,靶向异常增殖的成纤维细胞,同时诱导功能性肺上皮细胞修复,是有效控制肺间质纤维化进展的关键环节。

研究发现,间充质干细胞(MSCs)能被募集到损伤部位抑制炎症发生,并促进上皮组织修复,抑制纤维细胞的异常增殖,这些特性提示,MSCs有望为间质性肺纤维化的治疗带来新的曙光^[5]。作为一种新的治疗策略,MSCs已被用于多种疾病的治疗尝试,也被多个临床试验证明安全有效^[6-8]。尽管前期的肺纤维化动物模型及部分临床实验已证实,MSCs在治疗肺纤维化中显示了一定的效果,但其作用机制尚未阐明。现就MSCs在肺纤维化治疗中的相关进展综述如下。

一、MSCs

MSCs是一群存在于多种组织器官,能够分化成不同细胞类型,具有抗增殖、免疫调节和抗炎作用的多能干细胞^[9]。MSCs的多能性、迁移能力以及低免疫原性等特点,引起了人们对其治疗潜能的极大关注,被广泛应用于许多自身免疫相关性疾病的治疗。在呼吸系统疾病中,MSCs也显示了其特定的疗效。研究表明,MSCs可促进弹性蛋白酶诱导肺气肿的组织再生、能定位到石棉引起的肺损伤部位、可帮助肺动脉高压大鼠模型的组织重构、减轻卵清蛋白介导的小鼠哮喘模型气道慢性炎症、恢复内毒素诱导的急性肺损伤后肺泡和肺液的平衡、调节放射性肺损伤相关的纤维化反应、减轻肺纤维化小鼠的病理损伤^[10]。

二、MSCs治疗肺纤维化的动物实验研究

小鼠博来霉素模型常被用于肺纤维化疾病的研究,一些来自小鼠博来霉素模型的临床前研究数据显示,MSCs可能在肺纤维化的治疗中有效^[11-15]。Lee等^[12]发现静脉给予MSCs能够降低博来霉素诱导的肺水肿、中性粒细胞浸润、胶原沉积和总死亡率;Ortiz等^[13]发现,在小鼠经博来霉素处理

后,MSCs被募集到肺损伤部位,导致炎症减少,降低纤维化和细胞外基质的胶原沉积,促进组织修复;同样,胎盘来源的干细胞、脐带来源的MSCs,均可定位于肺组织,降低博来霉素导致的相关组织损伤^[14]。Aguilar等^[15]利用造血干细胞和MSCs作为载体,将角质细胞生长因子(KGF)带入博来霉素诱导的肺纤维化小鼠的肺脏,结果发现转导KGF基因的干细胞能减少肺部胶原沉积,而且KGF转染的造血干细胞还可导致肺泡Ⅱ型上皮细胞增殖。

虽然博来霉素诱导的肺纤维化模型常被用来模拟肺纤维化,但毫无疑问人类肺纤维化的复杂发病机制仍有待进一步阐明,博来霉素模型并不能全面模拟人类肺纤维化的病理机制^[16]。因此,一些更好的能反映人体状况的实验模型亟待建立,从而为MSCs的临床治疗提供更加可靠的依据。另外,MSCs治疗肺纤维化相关的实验设计需要考虑MSCs的给予途径、细胞数量、细胞来源、治疗时间等方面的问题,这些因素均可对MSCs的疗效产生重要影响。

三、MSCs治疗特发性肺纤维化(IPF)患者的临床试验

由于MSCs具有强大的免疫调节和多向分化功能,而且来源容易,分离培养简单等优势,目前已有许多用于临床疾病患者治疗的报道。截至2015年2月23日,临床试验信息网站(clinicaltrials.gov)已有4项MSCs治疗IPF的注册临床试验,分别评价自体或异体骨髓、胎盘及脂肪来源的MSCs对IPF的治疗效果及安全性,给药方式包括静脉及气管内直接给予。最初的临床试验将主要评估安全性,并以肺功能、生活质量为次要终点,检测重要的生物标志物的改变。其中一项已完成的试验募集了8例中至重度的IPF患者,静脉给予胎盘来源的MSCs,6个月后接受肺功能,6min步行距离及CT评估,结果发现静脉给予MSCs对于中重度IPF是一种可行且有较好安全性的治疗方式^[17]。既往动物实验曾发现,在博来霉素损伤后立即给予小鼠骨髓MSCs,可减轻博来霉素诱导的肺组织炎症和胶原沉积,但第7天给予则病变不会发生明显改善^[12],提示MSCs对于早期炎症阶段的肺纤维化可能更有益。但实际被确诊的大部分肺纤维化患者为中晚期患者,MSCs能否也具有抗纤维化和组织重塑的作用尚待进一步研究。

MSCs治疗肺纤维化的临床试验设计,涉及确定安全剂量、治疗时间间隔、评估疗效和安全性终点。主要包括肺血流动力学、肺功能、住院治疗、感染和死亡以及是否单一输液或重复注射。最近关于波尼松、硫唑嘌呤和N-乙酰半胱氨酸治疗肺纤维化失败的临床试验表明,选择合适的治疗群体是试验成败的关键^[18]。因此,如果最初试验证明了其安全

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2015.48.018

基金项目:国家自然科学基金(81200050)

作者单位:510120 广州,呼吸疾病国家重点实验室 广州呼吸疾病研究所 广州医科大学附属第一医院呼吸内科

通信作者:徐军,Email:xufeili@vip.163

性,随后的 II 期临床试验测试则可进一步评估 MSCs 对肺纤维化的临床治疗效果。

虽然以前的 MSCs 研究并没有报告严重不良事件,但对于肺纤维化患者,需要考虑给予 MSCs 是否会导致异常的成纤维细胞增殖或发生 MSCs 恶性转化。尽管没有临床前研究报道该现象,但仍需要高度关注这一问题。据我们所知,目前没有临床试验报告,给予 MSCs 会导致肿瘤形成相关的不良事件增加。此外,研究者对接受人类白细胞抗原不相容骨髓 MSCs 移植的患者尸检组织的检查表明,虽然在肺部可检测到供体 MSCs 的 DNA,但未发现异位组织的形成或 MSCs 供体来源的恶性肿瘤发生。尽管如此,仍需对 MSCs 治疗的患者进行长期监测以确认不存在此类安全性问题。

四、MSCs 的可能作用机制

目前认为, MSCs 到达损伤部位后,可进行细胞替代,或者直接/间接作用于靶细胞,抑制炎症,改善局部或全身免疫微环境,促进损伤细胞的修复和固有干细胞再生。Y 染色体荧光原位杂交实验表明,在受体雌性小鼠肺损伤部位可发现移植供体为雄性小鼠的骨髓 MSCs 的 Y 染色体,这些雄性小鼠的 MSCs 具有上皮细胞形态,提示它们可能通过与固有上皮细胞融合,或通过间质向上皮转化机制,帮助组织再生与修复^[19]。当然,考虑到实验条件的限制及仪器分辨率等因素,该过程的真实性尚需进一步深入研究。虽然报道不多,但的确有研究显示 MSCs 不仅能够分化为中胚层起源的细胞,而且还能分化为内胚层和外胚层细胞(包括上皮)起源的细胞。MSCs 在专用的气道培养基中培养可不同程度的表达肺特异性上皮标记,包括 Clara 细胞分泌蛋白、表面活性蛋白 C、和甲状腺转录因子 1 等^[20]。此外,原位杂交、绿色荧光蛋白和上皮标记共染色研究表明,绿色荧光蛋白标记的 MSCs 有可能在肺损伤部位呈现上皮表型并促进组织修复^[21]。另外也有实验证据表明,限于免疫荧光显微镜相关的技术问题,可能会导致产生“骨髓 MSCs 有助于肺泡上皮细胞再生”的虚假结论^[22],因此对这些研究的认识还需谨慎对待。

进一步研究发现, MSCs 的器官定植率较低,而且这种定植存在的时间通常是短暂的,提示一定存在其他的治疗机制。同时,在 MSCs 治疗肝硬化、心肌梗死、肾衰等动物模型中,观察到其疗效与定植细胞比例并无绝对相关性;甚至一些炎症性疾病仅使用 MSCs 培养上清就能取得良好的治疗效果;除了同源 MSCs,异源甚至异种 MSCs 治疗针对免疫健全的患者同样有治疗作用。种种研究均提示, MSCs 的治疗效应可能主要是通过大量分泌的免疫抑制因子、细胞因子、生长因子等调节炎症和维持组织稳态而发挥作用^[23-24]。这些因子包括:转化生长因子、白细胞介素 6、前列腺素 E2、成纤维细胞生长因子、肝细胞生长因子、血小板源性生长因子、血管内皮生长因子、吡啶胺 2,3 二氧化酶、一氧化氮等,这些分泌的因子能够抑制炎症反应,促进内皮、上皮的激活,介导内源性前体细胞/干细胞的增殖和分化。

肺纤维化的典型特点是间质炎症和上皮细胞损伤后导

致的成纤维细胞增殖和胶原沉积。已有研究证明 MSCs 会优先向炎症部位迁移,能够抑制持续的损伤,促进组织的修复^[25]。旁分泌因子的分泌被认为是其发挥治疗作用的一个重要机制。MSCs 释放的多种分泌因子可改变 IPF 患者肺部微环境,促进修复^[26]。此外, MSCs 可通过细胞融合产生影响,包括线粒体转位、细胞分化和促进新生血管形成等。MSCs 的抗炎作用可能也是由可溶性介质的分泌介导。肺纤维化患者患肺炎的风险较高,在最近的针对肺炎和败血症的实验研究表明, MSCs 可分泌抗微生物因子、上调细菌的吞噬作用^[27]。

同时,骨髓 MSCs 和基质细胞产生的细胞间的相互作用,可影响到固有的组织干细胞,促进其增殖、存活和提高分化能力^[28]。利用支气管肺发育不良小鼠高氧模型的研究表明,外源性干细胞可以诱导肺内固有的前体细胞的增殖从而促进组织修复。定位于细支气管肺泡交界处的细支气管肺泡干细胞,能耐受细支气管和肺泡损伤,并增殖更新为新的上皮细胞^[29]。肺内固有的前体细胞可表现出与骨髓来源的 MSCs 类似的抗炎和免疫调节特性。Kajstura 等^[30]的研究提示,人类肺干细胞具有向细支气管、肺泡和肺血管分化的能力,这群 c-kit 阳性的肺干细胞和前体细胞相关研究表明,肺可以像其他器官一样,通过干细胞诱导进行组织修复。MSCs 能否通过促进肺内干细胞的正常增殖分化,从而参与肺损伤的修复尚需进一步的验证。

五、问题及展望

尽管 MSCs 在肺纤维化动物模型研究中显示了一定的效果,但仍有许多关键问题亟待解决,如:(1)何种来源的 MSCs 最适合肺纤维化的治疗? 适合肺纤维化治疗的细胞具有什么样的生物学特性?(2) MSCs 除了对免疫细胞进行调节外,是否对肺的结构细胞(肺泡上皮细胞、成纤维细胞等)的增殖分化产生直接影响? 这些影响会导致怎样的治疗结果?(3)肺纤维化患者异常的免疫微环境会对 MSCs 生物学功能产生何种影响? 如何有效提高 MSCs 的治疗效果?(4)组织固有的 MSCs 在正常发育及疾病发生发展过程中的作用? 对上述问题的深入研究和解析,将对更好地理解 MSCs 在肺纤维化治疗中的作用,更加有效地利用 MSCs 提供指导。

参 考 文 献

- [1] Fernandez IE, Eickelberg O. New cellular and molecular mechanisms of lung injury and fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Lancet, 2012, 380(9842): 680-688.
- [2] Steele MP, Schwartz DA. Molecular mechanisms in progressive idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Annu Rev Med, 2013, 64: 265-276.
- [3] Wolters PJ, Collard HR, Jones KD. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Annu Rev Pathol, 2014, 9: 157-179.
- [4] Loomis-King H, Flaherty KR, Moore BB. Pathogenesis, current treatments and future directions for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Curr Opin Pharmacol, 2013, 13(3): 377-385.
- [5] Toonkel RL, Hare JM, Matthay MA, et al. Mesenchymal stem cells and idiopathic pulmonary fibrosis. Potential for clinical testing[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 188(2): 133-

- 140.
- [6] Ringden O. Mesenchymal stromal cells as first-line treatment of graft failure after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(9): 1243-1246.
- [7] Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, et al. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(11): 2818-2823.
- [8] Woodworth TG, Furst DE. Safety and feasibility of umbilical cord mesenchymal stem cells in treatment-refractory systemic lupus erythematosus nephritis: time for a double-blind placebo-controlled trial to determine efficacy[J]. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16(4): 113.
- [9] Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(11): 1009-1016.
- [10] Spees JL, Pociask DA, Sullivan DE, et al. Engraftment of bone marrow progenitor cells in a rat model of asbestos-induced pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(4): 385-394.
- [11] Cargnoni A, Gibelli L, Tosini A, et al. Transplantation of allogeneic and xenogeneic placenta-derived cells reduces bleomycin-induced lung fibrosis[J]. *Cell Transplant*, 2009, 18(4): 405-422.
- [12] Lee SH, Jang AS, Kim YE, et al. Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis[J]. *Respir Res*, 2010, 11: 16.
- [13] Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(14): 8407-8411.
- [14] Moodley Y, Atienza D, Manuelpillai U, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(1): 303-313.
- [15] Aguilar S, Scotton CJ, McNulty K, et al. Bone marrow stem cells expressing keratinocyte growth factor via an inducible lentivirus protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e8013.
- [16] Chapman HA. Disorders of lung matrix remodeling[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(2): 148-157.
- [17] Chambers DC, Enever D, Ilic N, et al. A phase 1b study of placenta-derived mesenchymal stromal cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Respirology*, 2014, 19(7): 1013-1018.
- [18] Raghu G, Collard HR, Anstrom KJ, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinically meaningful primary endpoints in phase 3 clinical trials[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(10): 1044-1048.
- [19] Sueblinvong V, Loi R, Eisenhauer PL, et al. Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(7): 701-711.
- [20] Wang C, Zhu H, Sun Z, et al. Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling promotes epithelial differentiation of mesenchymal stem cells and repairs bleomycin-induced lung injury[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014, 307(3): C234-C244.
- [21] Chang JC, Summer R, Sun X, et al. Evidence that bone marrow cells do not contribute to the alveolar epithelium[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(4): 335-342.
- [22] Kotton DN, Fabian AJ, Mulligan RC. Failure of bone marrow to reconstitute lung epithelium[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(4): 328-334.
- [23] Ma S, Xie N, Li W, et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells[J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(2): 216-225.
- [24] 刘明, 汪劲松, 刘沐芸, 等. 人脐带间充质干细胞外泌体免疫调节功能的研究[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(32): 2630-2633.
- [25] Inamdar AC, Inamdar AA. Mesenchymal stem cell therapy in lung disorders: pathogenesis of lung diseases and mechanism of action of mesenchymal stem cell[J]. *Exp Lung Res*, 2013, 39(8): 315-327.
- [26] Shen Q, Chen B, Xiao Z, et al. Paracrine factors from mesenchymal stem cells attenuate epithelial injury and lung fibrosis[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4): 2831-2837.
- [27] Krasnodembskaya A, Samarani G, Song Y, et al. Human mesenchymal stem cells reduce mortality and bacteremia in gram-negative sepsis in mice in part by enhancing the phagocytic activity of blood monocytes[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(10): L1003-L1013.
- [28] Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation[J]. *Circ Res*, 2010, 107(7): 913-922.
- [29] Tropea KA, Leder E, Aslam M, et al. Bronchioalveolar stem cells increase after mesenchymal stromal cell treatment in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(9): L829-L837.
- [30] Kajstura J, Rota M, Hall SR, et al. Evidence for human lung stem cells[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(19): 1795-1806.

(收稿日期:2015-04-03)

(本文编辑:宋国营)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于关键词的标引

本刊要求论著类文章需标引 2~5 个关键词。请使用中国医学科学院医学信息研究所的《中文医学主题词表》(CmeSH) 所列的词,或登录万方医学网: <http://med.wanfangdata.com.cn/Mesh/Mesh.aspx> 查找。如果查不到相

应的关键词,处理办法有:(1)可选用直接相关的几个主题词进行组配。(2)可根据树状结构表选用最直接的上位主题词。(3)必要时,可采用习用的自由词并列于最后。每个英文关键词第一个字母大写,各词汇之间空 2 个字。