

间充质干细胞治疗克罗恩病的研究进展

吴小佳¹ 陈锦阳¹ 庄盼¹ 刘军权^{2▲}

1.浙江卫未生物医药科技有限公司,浙江杭州 310053;2.杭州金域医学检验所有限公司,浙江杭州 310053

[摘要] 克罗恩病(CD)是一种易复发且发病症状多样的慢性炎症性肠病,目前尚无特效治疗手段。间充质干细胞(MSCs)具有抗感染、免疫调节、组织修复等潜能,近年来国内外有较多应用 MSCs 治疗 CD 的临床研究。本文综述了利用骨髓 MSCs 和脂肪 MSCs 等治疗 CD 的相关报道,并从 MSCs 对自然杀伤细胞、树突状细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和调节性 T 细胞的免疫调节机制及 MSCs 的组织修复能力方面,阐述了 MSCs 治疗 CD 的机制、效果和安全性,以期在未来 CD 的临床治疗提供新的思路和方法。

[关键词] 克罗恩病;间充质干细胞;治疗;治疗机制

[中图分类号] R329.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2023)05(a)-0054-04

DOI: 10.20047/j.issn1673-7210.2023.13.12

Research advances in the treatment of Crohn's disease with mesenchymal stem cells

WU Xiaojia¹ CHEN Jinyang¹ ZHUANG Pan¹ LIU Junquan^{2▲}

1.Zhejiang Weiwei Biomedical Science and Technology Co., Ltd, Zhejiang Province, Hangzhou 310053, China; 2.Hangzhou King Med Diagnostics, Co., Ltd, Zhejiang Province, Hangzhou 310053, China

[Abstract] Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory bowel disease that is prone to relapse and has various symptoms. Currently, there is no effective treatment. Mesenchymal stem cells (MSCs) have the potential of anti-inflammatory, immune regulation, tissue repair, etc. In recent years, there have been many clinical studies on the application of MSCs in the treatment of CD at home and abroad. This article reviews the related reports on the use of bone marrow-derived MSCs and adipose-derived MSCs in the treatment of CD. In terms of the immune regulation mechanism of natural killer cells, dendritic cells, macrophages, neutrophils, and regulatory T cells and the tissue repair ability of MSCs, the mechanism, efficacy and safety of MSCs in the treatment of CD are described, in order to provide new ideas and methods for the clinical treatment of CD in the future.

[Key words] Crohn's disease; Mesenchymal stem cells; Therapy; Therapeutic mechanism

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种以肠组织区跨壁和瘘管形成为特征的慢性炎症性肠病^[1],临床的主要症状有腹痛^[2]、腹泻、腹部包块、体重下降、瘘管形成和肠梗阻^[3]等,具有迁延不愈、易复发、并发症多等特点。CD 的发病机制尚不十分清楚,目前普遍认为与遗传^[4]、免疫^[5]、环境^[6]、微生物菌群^[7]和感染^[8]等相关。CD 可能是遗传易感性、环境因素和肠道微生物改变之间复杂相互作用的结果^[9],突变的易感基因造成机体对侵蚀的微生物感应不足,肠道微生物菌群失调造成大量侵袭性细菌引起环境失衡,最终导致固有免疫和适应性免疫失衡扩大炎症反应,免疫抑制机制缺陷致使免疫反应过度激活,造成辅助性 T 细胞 1 型(T helper cell type 1, Th1)^[10]、Th17^[11]和调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)比例紊乱^[12],成为 CD 的根本表现。

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82072512)。

▲通讯作者

目前 CD 的治疗方法为药物和手术,对药物治疗无效的危重患者需采用外科手术治疗,但手术存在高复发率且伴有致残的可能^[13]。干细胞疗法作为新的治疗手段越来越受重视,其中,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其抗感染、免疫调节、组织修复等生物学特性,可实现肠道免疫重建、减少免疫介导的肠道炎症的发生,成为治疗 CD 最具潜力的方法之一。

1 MSCs 治疗 CD 的机制研究

CD 致病本质是由于肠黏膜免疫反应异常导致的持续性炎症反应和肠黏膜损伤。多项研究发现, MSCs 能成功治疗系统性红斑狼疮^[14-15]、移植物抗宿主病^[16]、心肌梗死^[17]、多发性硬化^[18-19]等疾病,突出了 MSCs 的免疫平衡和免疫自稳的调节特性。MSCs 通过分泌细胞因子,如吲哚胺 2,3 双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)、前列腺素 E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)、转化生长因子 β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)、人

白细胞抗原 -G5 (human leukocyte antigen, HLA-G5)、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8、IL-10等,对自然杀伤(natural killer, NK)细胞^[20]、单核细胞衍生的树突状细胞(dendritic cells, DCs)^[21]、中性粒细胞(neutrophil, NEU)^[22]和巨噬细胞(macrophage, M ϕ)^[23-24]等具有调节作用。通过降低肠黏膜的炎症反应,上调 Treg 的 CD4⁺T 细胞亚群,防止炎症反复发作,避免固有免疫和适用性免疫对肠道应激反应,维持肠道免疫系统稳态。且 MSCs 具有组织修复能力,可增殖分化成表皮细胞、成纤维细胞等,对受损的细胞进行替换和修复,同时通过细胞因子的旁分泌作用激活成纤维细胞,促进血管新生,修复受损的组织。

1.1 MSCs 对免疫细胞的影响

1.1.1 NK 细胞 MSCs 对 NK 细胞的作用与剂量有关^[25]。低剂量的 MSCs 可促进 NK 细胞的增殖和杀伤作用;高剂量的 MSCs 可以通过旁分泌 IDO、PEG₂、TGF- β 1 和 HLA-G5 等免疫抑制因子和直接接触下调 NK 细胞表面活化受体抑制 NK 细胞的杀伤活性,减少 IFN- γ 的产生,抑制 CD 的 TH1 型炎症反应。

1.1.2 NEU MSCs 对 NEU 具有双向调节作用^[26]。一方面, MSCs 可以通过分泌 IL-6 抑制 NEU 的凋亡,分泌 IL-8 和 M ϕ 迁移因子将 NEU 募集到炎症部位,增强其清除病原体的能力。另一方面, MSCs 还可以通过胞外囊泡和胞吞作用抑制 NEU 进入受损组织,吞噬 NEU,防止 NEU 无限激活对 CD 受损组织造成过度伤害。

1.1.3 M ϕ CD 为 Th1 型炎症反应。M ϕ 可在 TH1 细胞产生的细胞因子刺激下发育成活化的 M1 型,促进炎症的应答。MSCs 可以通过旁分泌产生 PGE₂, 与 M ϕ 的 EP2 和 EP4 表面受体结合,以及通过细胞接触机制刺激 M ϕ 信号通路和改变下游基因的表达,使 M ϕ 转变为旁路活化的 M2 型。M2 型 M ϕ 可分泌大量 IL-10 等抑炎因子,从而发挥免疫抑制作用,促进损伤组织的修复^[23]。

1.1.4 单核细胞衍生的 DCs MSCs 对 DCs 具有抑制作用^[21]。①MSCs 可以抑制成熟的 DCs(mDCs)细胞表达 HLA-DR 分子、共刺激分子 CD80、CD86 和分泌 CD1 α 。②MSCs 通过旁分泌或激活 Notch 信号通路使 mDCs 和 DCs 的前体细胞 CD34⁺ 造血干细胞向调节性 DCs 分化。③MSCs 减少趋化因子的产生使 DCs 抗原呈递和迁移能力下降,致通过 DCs 抗原递呈激活的 T 细胞功能下降。

1.1.5 Treg 动物实验证实 MSCs 外泌体能够上调 Treg 的 CD4⁺T 细胞亚群^[25]。有研究发现,CD 患者外周血 Treg 比例低于正常组^[12], Th17 比率和 Th17/Treg 高于正常组^[11]。而 Treg 的耗竭和 Treg-T 效应细胞的

失衡在 CD 的发病机制中起关键作用。Treg 对免疫反应具有抑制作用,能防止固有免疫与适用性免疫对肠道共栖菌的不良反应,从而维持肠道稳态。

1.2 MSCs 的组织修复能力

MSCs 的归巢特性在趋化因子的作用下可选择性地将 MSCs 迁移到受损组织部位,经过自我分化为表皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞等,替代受损细胞,同时分泌的干细胞生长因子促进血管内皮细胞的增殖和分化形成新的毛细血管网,恢复血液供应,加速组织修复。

1.2.1 MSCs 迁移归巢特性 MSCs 能选择性地迁移到组织损伤和炎症的部位, MSCs 表面趋化因子 4 与基质细胞衍生因子 1 结合可使细胞迁移到达受损组织附近。在 MSCs 表达的细胞黏附分子和胞外表达的黏附分子配体结合后向毛细血管壁内皮细胞黏附。MSCs 在趋化因子金属球蛋白和纤维连接蛋白的作用下,可以迁出血管内皮,离开血液循环,进入受损组织。

1.2.2 MSCs 诱导分化促进血管新生作用 MSCs 有较强的增殖能力和诱导分化作用是创面愈合进程中组织细胞增长迅速的主要原因。MSCs 促进血管新生并激活成纤维细胞,血管新生是创面愈合的主要步骤。MSCs 是一种多能干细胞,在不同诱导条件下可以分化为脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、肌细胞、神经胶质细胞及神经细胞等。有报道^[26],将 MSCs 移植于创面局部,取愈合组织进行免疫荧光染色后发现, MSCs 可表达血管内皮细胞标志 CD31,提示 MSCs 在体内可分化为血管内皮细胞和平滑肌细胞,参与创面的上皮重建。MSCs 通过自分泌或旁分泌方式分泌多种细胞因子,促进血管内皮细胞的增殖和分化,在先前的毛细血管处形成新的毛细血管网^[27],建立和恢复局部血液供应,加速肉芽组织增生,促进难愈性创面愈合。

2 MSCs 治疗 CD 的临床应用

MSCs 可从多种组织中提取,体外分离、培养、扩增技术已臻成熟。目前应用脂肪 MSCs(adipose mesenchymal stem cells, AMSCs) 和骨髓 MSCs (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 治疗 CD 的临床报道较多,这些研究均肯定了 MSCs 治疗 CD 的有效性和安全性^[28-36]。

2.1 MSCs 临床治疗 CD 的有效性

有报道显示^[28],在 7 个欧洲国家和以色列的 49 家医院进行了随机、双盲、平行、安慰剂对 CD 肛瘘患者应用 AMSCs 进行 III 期临床研究。结果提示, AMSCs 治疗 CD 愈后好。有报道^[29]对 43 例 CD 患者经手术瘘管彻底切开术且完全缝合后用 AMSCs 细胞与纤维蛋白混合注入内开口周围的黏膜下层和瘘管管壁。于 12 个月

和 24 个月时分别观察到有 79.3% 和 80.8% 瘘管完全愈合。有研究显示^[30], 分阶段分别用自身 AMSCs 和自身富血小板血浆对 11 例 18 岁以上临床缓解期或疾病稳定期患者进行治疗, 中期随访 31 个月(21~37 个月), 发现 91%(10/11) 瘘管完全愈合, 9%(1/11) 部分愈合。回顾性研究发现^[31], 用 AMSCs 治疗 23 例肛瘘妇女后, 其中有 6 例妇女在 AMSCs 治疗缓解期时成功怀孕, 并且 5 例妇女足月妊娠, 提示 CD 肛瘘患者 AMSCs 治疗后能跨越妊娠的心理障碍, 减轻肠道炎症反应, 增加怀孕成功率。有报道显示^[32], 用中医“挂线”疗法与自体 AMSCs 移植结合治疗 CD 肛瘘, 取得了良好的临床效果。有研究发现^[33], 用 BMSCs 连续局部注射 10 例 CD 患者, 治疗 12 个月后全部患者病情缓解, 1 年治愈率为 88%, 2 年为 50%, 4 年为 37%。

2.2 MSCs 临床治疗 CD 的安全性

MSCs 不表达或极低水平表达 HLA-II 类分子、组织相容性复合体 I 类分子和共刺激分子等。因此, 异体 MSCs 在宿主体内可获得移植宿主的免疫耐受或者免疫豁免性^[34]。有研究显示^[34], 近几年应用 MSCs 动物实验和临床研究发现: 应用 MSCs 后实验小鼠体质无明显改变, 未出现死亡, 无急性毒性症状^[35], 精神状态、粪便等排泄物均正常, 也无致瘤性、成瘤性和促瘤性^[36]。在上述的研究中也证明 MSCs 的临床不良反应少见, 是安全有效的治疗方法。

3 结语

综上, CD 是病因不明确且复发率高的严重肠道性疾病, 而目前常规治疗方法不能有效控制疾病进展, MSCs 可以作为其重要治疗手段之一。由于 MSCs 来源广, 移植后受体对其的免疫豁免性, 以及 MSCs 直接或结合其他材料能有效治愈 CD 患者肠腔瘘管、提高患者生活质量、减轻 CD 引起的疼痛、促进损伤组织修复、缩短患者住院时间等特点而被广泛地应用于临床实践。虽然 MSCs 对 CD 的治疗具有确切效果, 但是 MSCs 在 CD 受损组织的存活时间和疗效时长及回输高密度细胞数量和提高回输频次是否提高 CD 的治疗效果和疗效时长有待动物实验和临床试验进一步验证。

[参考文献]

- [1] Sevana K, Eva R, Nassim H, *et al.* Mitochondrial impairment drives intestinal stem cell transition into dysfunctional Paneth cells predicting Crohn's disease recurrence [J]. *BMJ*, 2020, 69(11): 1939-1951.
- [2] Vassiliki S, Morris G, Anthony KA, *et al.* Interventions for the management of abdominal pain in Crohn's disease and inflammatory bowel disease [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 11(11): 1-11.
- [3] Ronald K, Nazar M, Laura F, *et al.* Quality of life in inflammatory bowel diseases: it is not all about the bowel [J]. *Intest Res*, 2021, 19(1): 45-52.
- [4] Caruso R, Mathes T, Martens EC, *et al.* A specific gene-microbe interaction drives the development of Crohn's disease-like colitis in mice [J]. *Sci Immunol*, 2019, 4(eaaw 4341): 1-14.
- [5] Bamias G, Cominelli F. Exploring the Early Phase of Crohn's Disease [J]. *Clin Gastroenterol Hepato*, 2021, 19(12): 2469-2480.
- [6] Iris S, Valentina KV, Barbara R, *et al.* Environmental Microbial Factors Determine the Pattern of Inflammatory Lesions in a Murine Model of Crohn's Disease-Like Inflammation [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2020, 26(1): 66-79.
- [7] Esther C, Reiner W, Michael S, *et al.* Dysbiotic microbiota interactions in Crohn's disease [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): e1949096(1-20).
- [8] Laila AG, Mar AC, Javier PG. Systematic Review: The Gut Microbiome and Its Potential Clinical Application in Inflammatory Bowel Disease [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(997): 1-43.
- [9] Mohammad T, Gregory CAA, Andrew RJM, *et al.* Microbial imbalance in inflammatory bowel disease patients at different taxonomic levels [J]. *Gut Pathog*, 2020, 12(1): 1-8.
- [10] Huang LJ, Mao XT, Li YY, *et al.* Multiomics analyses reveal a critical role of selenium in controlling T cell differentiation in Crohn's disease [J]. *Immunity*, 2021, 54(8): 1728-1744.
- [11] Huang J, Yang ZY, Li YY, *et al.* *Lactobacillus paracasei* R3 protects against dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice *via* regulating Th17/Treg cell balance [J]. *J Transl Med*, 2021, 19(356): 1-13.
- [12] Clough JN, Omer OS, Tasker S, *et al.* Regulatory T-cell therapy in Crohn's disease: challenges and advances [J]. *Gut*, 2020, 69(5): 942-952.
- [13] Colombo F, Frontali A, BaldC, *et al.* Repeated surgery for recurrent Crohn's disease: does the outcome keep worsening operation after operation? A comparative study of 1224 consecutive procedures [J]. *Updates Surg*, 2022, 74(1): 73-80.
- [14] Tang WY, Liu JH, Peng CJ, *et al.* Functional Characteristics and Application of Mesenchymal Stem Cells in Systemic Lupus Erythematosus [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2021, 69(1): 7-17.
- [15] Fang L, Hui C, Tao C, *et al.* Immunotherapeutic effects of allogeneic mesenchymal stem cells on systemic lupus erythematosus [J]. *Lupus*, 2020, 29(8): 872-883.

- [16] Yu Q, Wang H, Zhang L, *et al.* Advances in the treatment of graft-versus-host disease with immunomodulatory cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92: 1–10.
- [17] Sun YY, Liu J, Xu ZR, *et al.* Matrix stiffness regulates myocardial differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(2): 2231–2250.
- [18] Barati S, Tahmasebi F, Faghihi F. Effects of mesenchymal stem cells transplantation on multiple sclerosis patients [J]. *Neuropeptides*, 2020, 84(102095): 1–9.
- [19] Panayioti P, Ibrahim K, Netta L, *et al.* Beneficial effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation in active progressive multiple sclerosis [J]. *Brain*, 2021, 143(12): 3574–3588.
- [20] Fatemeh RK, Shahab S, Seyed MM. Mesenchymal stem cells alter the frequency and cytokine profile of natural killer cells in abortion-prone mice [J]. *J Cell Physiol*, 2022, 235(10): 7214–7223.
- [21] Zhao YL, Su GH, Wang Q, *et al.* The CD200/CD200R mechanism in mesenchymal stem cells' regulation of dendritic cells [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(8): 9607–9613.
- [22] Zhang ZY, Tian HZ, Yang C, *et al.* Mesenchymal Stem Cells Promote the Resolution of Cardiac Inflammation After Ischemia Reperfusion *Via* Enhancing Efferocytosis of Neutrophils [J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(5): 1–13.
- [23] Zhao L, Tang Y, Lei N, *et al.* Clinical features and monocyte/macrophage subsets characterization in granulomatous *vs* non-granulomatous Crohn's disease [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2020, 55(4): 442–448.
- [24] Zhao F, Zheng T, Gong W, *et al.* Extracellular vesicles package dsDNA to aggravate Crohn's disease by activating the STING pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(9): 815–820.
- [25] Neda H, Hajar AK, Saeed NMK, *et al.* Adipose-derived mesenchymal stem cell-secreted exosome alleviates dextran sulfate sodium-induced acute colitis by Treg cell induction and inflammatory cytokine reduction [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(8): 5906–5920.
- [26] 李智伟, 邢立行, 张中洲, 等. MSCs 联合 EPCs 在组织工程血管化中的作用研究 [J]. *农垦医学*, 2018, 40(3): 193–197.
- [27] Santoro M, Awosika TO, Snodderly KL, *et al.* Endothelial/Mesenchymal Stem Cell Crosstalk Within Bioprinted Co-cultures [J]. *Tissue Eng Part A*, 2020, 26(5–6): 339–349.
- [28] Julián P, Damián GO, Gert VA, *et al.* Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial [J]. *Lancet*, 2016, 388(10051): 1281–1290.
- [29] Panés J, García-Olmo D, Van AG, *et al.* Long-Term Results of Adipose-Derived Stem Cell Therapy for the Treatment of Crohn's Fistula [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(5): 532–537.
- [30] Wainstein C, Quera R, Fluxa D, *et al.* Stem cell therapy in refractory perineal Crohn's disease: long-term follow-up [J]. *Colorectal Dis*, 2018, 20(3): 68–75.
- [31] Raquel SB, Mariano GA, Hector G, *et al.* First-in-Human Case Study: Pregnancy in Women With Crohn's Perianal Fistula Treated With Adipose-Derived Stem Cells: A Safety Study [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(6): 598–602.
- [32] 李猛, 刘艳, 张雨婷, 等. 张苏闽治疗克罗恩病肛瘘临床经验 [J]. *东中医药大学学报*, 2019, 43(3): 279–283.
- [33] Ciccocioppo R, Gallia A, Sgarella A. Long-term follow-up of Crohn disease fistulas after local injections of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Mayo Clin Proc*, 2015, 90(6): 747–755.
- [34] 冯波, 黎啸峰, 彭海宁, 等. 人脐带间充质干细胞的安全性评价 [J]. *激光生物学报*, 2022, 31(1): 43–49.
- [35] 吴姚钰, 沈熙, 宋伟, 等. 人脐带间充质干细胞生物急性毒性评测 [J]. *南通大学学报*, 2021, 41(4): 324–327.
- [36] Gang W, Wu HL, Liu UP, *et al.* Pre-clinical study of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of traumatic brain injury: safety evaluation from immunogenic and oncogenic perspectives [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(2): 354–361.

(收稿日期: 2021–12–28)