

本文引用: 瞿海龙, 周英莲, 张新欣, 等. 间充质干细胞介导的肺损伤修复多重效应[J]. 医学研究与教育, 2017, 34(4): 46-51. DOI: 10.3969/j.issn.1674-490X.2017.04.010.

# 间充质干细胞介导的肺损伤修复多重效应

瞿海龙, 周英莲, 张新欣, 刘鹏, 彭广军

(河北大学附属医院急诊科, 河北 保定 071000)

**摘要:** 间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 是成体干细胞内的一类不均质细胞, 对多种疾患具有显著的临床疗效, 包括对肺损伤的修复。尽管 MSCs 具有自我增殖和多向分化的潜能, 但目前认为 MSCs 主要是通过旁分泌效应实现组织更新和修复。在肺损伤修复时, MSCs 通过调节机体免疫系统和促进内皮细胞及上皮细胞的再生实现。最近研究显示, MSCs 在组织修复过程中参与了线粒体的转移和囊泡脱落, 而且 MSCs 是肺上皮干细胞池的组成成分, 在环境改变与干细胞反应的信息整合中起到重要作用。阐述 MSCs 治疗肺损伤的机制, 展望其治疗潜能。

**关键词:** 间充质干细胞; 肺损伤; 旁分泌; 再生

DOI: 10.3969/j.issn.1674-490X.2017.04.010

中图分类号: R3

文献标志码: A

文章编号: 1674-490X(2017)04-0046-06

## The multiple- effect: mesenchymal stem cell-mediated lung repair

JU Hailong, ZHOU Yinglian, ZHANG Xinxin, LIU Peng, PENG Guangjun

(Emergency Department, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China)

**Abstract:** Mesenchymal stem cells (MSCs), a heterogeneous subset of adult stem cells, have surfaced as potential therapeutic units with significant clinical benefit for a wide spectrum of disease conditions, including those affecting the lung. Although MSCs carry both self-renewal and multilineage differentiation abilities, current dogma holds that MSCs mainly contribute to tissue regeneration and repair by modulating the host tissue via secreted cues. Thus, the therapeutic benefit of MSCs is thought to derive from so called paracrine effect. The regenerative mechanisms are employed by MSCs in the lung including modulation of the immune system as well as promotion of epithelial and endothelial repair. Apart from secreted factors, a number of recent findings suggest that MSCs engage in mitochondrial transfer and shedding of membrane vesicles as a means to enhance tissue repair following injury. Furthermore, it is becoming increasingly clear that MSCs are an integral component of epithelial lung stem cell niches. As such, MSCs play an important role in coupling information from the environment to stem and progenitor populations. The aim of this review is to outline the major mechanisms by which MSCs contribute to lung regeneration, and potential for future therapy.

**Key words:** mesenchymal stem cells; lung injury; paracrine; regeneration

收稿日期: 2017-03-09

第一作者: 瞿海龙 (1976—), 男, 河北涞水人, 副主任医师, 硕士, 主要从事急救医学研究。

通信作者: 彭广军 (1965—), 男, 河北枣强人, 主任医师, 硕士, 主要从事急救医学临床和科研。

E-mail: pgj650652@sina.com

成体肺组织在机体内环境稳态状态下，可进行缓慢持续的自我更新。与表皮及造血组织不同，肺组织是具有多种自我再生潜能的细胞。有大鼠实验表明沿着呼吸系统近端轴分布着不同类型上皮细胞干细胞或祖细胞，维持着肺组织的更新和修复<sup>[1]</sup>。尽管肺组织具有内在再生能力，但呼吸系统疾患仍是导致死亡的第三位原因。近年来许多学者将目光聚焦于间充质干细胞（mesenchymal stem cells, MSCs）。与其他类型细胞相比，MSCs 具有独特的交互作用，能够促进受损细胞存活。呼吸系统结构复杂，细胞种类多，利用 MSCs 的特性能够促进肺组织的修复。本文就 MSCs 的肺修复机制作一综述。

## 1 MSCs 肺修复可行性与生物学特征

成熟的肺组织起源于两个胚层：内胚层和中胚层。肺部的各种上皮细胞起源于内胚层，气道和血管平滑肌细胞、软骨细胞、肌成纤维细胞和周细胞起源于中胚层。在肺组织早期发育过程中，内胚层和中胚层的相互作用形成了气管树结构。在分支发生过程中，中胚层能够分泌成纤维细胞生长因子 10 (fibroblast growth factor 10, FGF10) 等信号物质，内胚层细胞接受信号后分支、发育，这个过程直到终末细支气管发育成熟为止<sup>[2]</sup>。内胚层和中胚层的这种相互作用，类似于 MSCs 与上皮细胞相互接触过程，使 MSCs 治疗成体肺损伤成为可能<sup>[3]</sup>。

早在 1968 年，Friedenstein 等将 MSCs 定义为一类起源于骨髓且具有成骨特性的干细胞亚群，最初研究显示 MSCs 具有克隆特性、可贴壁生长、非造血功能<sup>[4]</sup>。为了便于研究和应用，国际细胞治疗协会间充质和组织干细胞分会先后多次细化 MSCs 的定义，将其具有集落形成单位的特性纳入其中。目前 MSCs 被划分为具有自我增殖和多项分化潜能的干细胞<sup>[5]</sup>。体外培养时，人和小鼠的 MSCs 具有三系分化潜能，可分化为脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞。随着研究的深入，从更多的组织中提取出了 MSCs，包括脂肪组织、脐带血、胎盘和羊水。越来越多的证据表明在许多器官具有内在 MSCs，但这些细胞表型特征和分化潜能差异很大。由于缺乏特定的标志物，使 MSCs 的认定成为困难，到目前尚未发现一类特属于 MSCs 标志物。对 MSCs 鉴定多采取联合应用表面标记物的方法，其阳性表达 CD105、CD73 和 CD90，而缺乏造血细胞标志物<sup>[6]</sup>。

肺组织的 MSCs 主要位于周血管区域，富含 CD90、CD105 标志物，缺乏造血干细胞表面标志物和 CD45。目前用于肺修复的 MSCs 主要来源于骨髓，然而肺组织来源的 MSCs 与外源性 MSCs 在治疗效果和作用机制方面存在差异。肺组织来源 MSCs 在体外具有三系分化潜能，而在体内不能向成骨细胞分化<sup>[7]</sup>。同样，Reinisch 等研究显示尽管不同组织来源的 MSCs 表型特征相似，但在体内分化潜能却千差万别<sup>[8]</sup>。这些结果表明不同组织来源的 MSCs 其基因表达方式和 DNA 甲基化不同。与骨髓来源的 MSCs 相比，肺组织来源的 MSCs 在大鼠肺内停留时间更长<sup>[9]</sup>。

## 2 MSCs 治疗肺损伤的机制

### 2.1 MSCs 的免疫功能

MSCs 可通过干预机体固有免疫系统和获得性免疫系统，起到免疫抑制功能。体外共培养实验表明 MSCs 可调节多种类型免疫细胞，包括 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞、树突细胞，尤其是可抑制 T 细胞的活化与增殖、抑制单核细胞的分化、阻断 B 细胞的增殖<sup>[10]</sup>。与骨髓源性

MSCs 相似, 肺源性 MSCs 通过可溶性因子抑制 T 细胞的增殖, 减弱气道过敏性炎症反应和急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)。MSCs 分泌的可溶性因子包括细胞因子、吲哚 2, 3-脱氢酶、一氧化氮 (nitric oxide, NO)、前列腺素 E2 (prostaglandin-E2, PGE2)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导蛋白 6 等。有研究显示骨髓来源的 MSCs 能够减轻脓毒症的炎症反应, 其机制是通过提高白介素 10 (interleukin-10, IL-10) 的分泌, 活化机体的巨噬细胞<sup>[11]</sup>。大鼠肺气肿模型中, MSCs 能够抑制肺泡巨噬细胞的 COX-2/PGE2 信号途径, 减轻气道炎症反应<sup>[12]</sup>。多项研究显示 PGE2 在 MSCs 免疫调节方面发挥了重要作用。在体内, MSCs 与免疫系统的相互作用是非常复杂的,  $\gamma$ -干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) 在任何促炎因子存在的情况下, 如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\alpha$  或 IL-1 $\beta$ , 可诱导炎性因子和一氧化氮合酶高表达, 促进 T 淋巴细胞向 MSCs 周边募集。此外, 骨髓源性 MSCs 分泌的转化生长因子  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 可减轻哮喘小鼠的过敏反应。由 MSCs 分泌的因子可影响多个过程。在 ALI 时, IL-1 受体拮抗剂可起到抗炎症反应和抗纤维化的作用。尽管 MSCs 体外免疫调节机制已非常明确, 但对于肺组织内固有 MSCs 是否具有生理免疫调节作用尚不清楚。多项研究显示 MSCs 通过分泌 TGF- $\beta$  和 PGE2 可适应机体的免疫环境, 并可作出相应的反应。关于 MSCs 的免疫调节功能与组织再生的相关性是未来研究的重点。为了临床应用的 MSCs 具有统一标准, ISCT 发布了一项工作建议用于评估 MSCs 的免疫特性。实际上, 由于目前获取 MSCs 的方法众多, 致使不同研究无法实施有效的比较。

## 2.2 MSCs 的旁分泌功能

MSCs 与周边细胞的旁分泌信号是其调节组织修复的主要机制, MSCs 的有益效应也主要是来源于其旁分泌信号。体外研究显示 MSCs 分泌物成分复杂, 既包括一系列细胞间信号传递分子, 又包括胞外基质组分, 如骨膜蛋白和纤维黏连蛋白。尽管目前由 MSCs 分泌的全部信号分子了解不多, 但在 ALI 时 MSCs 分泌的几种分子已被阐明。ALI 是由于肺毛细血管内皮屏障功能障碍, 通透性增加导致肺水肿。体内及体外实验证明血管生成素 1 (angiopoietin1, ANGPT1) 可减轻 ALI 的症状、促进内皮细胞的存活、抑制肺毛细血管炎性反应及通透性<sup>[13]</sup>。有趣的是将 MSCs 进行基因修饰后, 可过量表达 ANGPT1, 提高 MSCs 的治疗效应。角质细胞生长因子 (keratinocyte growth factor, KGF) 和肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是 MSCs 分泌的另两种信号分子。KGF 能够清除肺泡上皮液体, HGF 能够作用于毛细血管内皮细胞, 恢复内皮的完整和减轻通透性<sup>[14]</sup>。体外实验表明, HGF 能够减轻肺气肿和肺纤维化模型的肺损伤。

除了可分泌经典的生长因子以外, 人 MSCs 还可分泌脂氧素 A4 和抗菌肽 LL-37。需要指出的是用于实验的损伤模型并不能真实反映机体疾病的病理过程, 而且外源性的 MSCs 移植后可能触发了内源性 MSCs 修复反应。

## 2.3 MSCs 的胞外囊泡

最近研究发现细胞脱落囊泡到胞外, 可实现细胞之间信息交流。胞外囊泡能够携带多种物质, 如蛋白、脂类、mRNA 和其他生物活性物质。囊泡可根据其起源和大小分为外泌体、微泡。外泌体源于内泌体, 直径 40~100 nm; 微泡源于质膜, 直径可达 1 000 nm。有研究显示 MSCs 可通过释放胞外囊泡实现受损细胞修复。将 MSCs 来源的微泡通过气道注射到 ALI 大鼠, 可减轻肺水肿和肺部炎症反应, 抑制白细胞局部聚集<sup>[15]</sup>。进一步研究显示, 在这些注入的微泡中, 有 KGF 的 mRNA 表达, 提示其修复功能可能源于某些生长因子的分泌。此外, 小鼠源性 MSCs 外泌体具有内皮细胞保护作用。在缺氧诱导的肺

动脉高压模型中, 将外泌体通过静脉注入小鼠体内, 可抑制炎症反应, 其机制可能与抑制 STAT3 信号传导途径有关。

骨髓源性 MSCs 可将线粒体转移到其他类型细胞, 修复由于线粒体缺陷所导致的呼吸功能障碍, 如脓毒症诱导的 ALI、过敏性气管炎和哮喘。在一小鼠 ALI 模型中, 将 MSCs 通过气管注入体内, 通过缝隙连接蛋白 43 作用将线粒体转移到肺泡上皮细胞<sup>[16]</sup>。线粒体能够实现细胞间的转移, 主要与 Miro1 蛋白相关。有研究显示, MSCs 的 Miro1 表达越多, 其组织修复能力越强。MSCs 可将线粒体装配到微泡内。当这些微泡进入到受损肺组织, 可抑制单核细胞的聚集, 减少炎性介质和促纤维化因子的释放, 如 TNF- $\alpha$ 、IL-6、TGF- $\beta$  和 IL-10。

## 2.4 MSCs 与上皮干细胞池

干细胞池由细胞和胞外基质组成, 两者共同构成干细胞的生存环境。干细胞池能够调控干细胞的自我增殖与分化, 维持内环境的稳态。原位 MSCs 是上皮干细胞池的重要组分, 能够维持上皮的完整性、再生受损上皮细胞。目前了解到的 MSCs 在体内的生物学特性, 主要是基于对骨髓源性 MSCs 的研究。骨髓源性 MSCs 经体外培养后仍能保持其生物学特性, 移植到体内可形成造血支持池, 成为造血干细胞池的重要组分。尽管目前有许多研究聚焦于肺组织干细胞群, 但关于上皮干细胞池的相关知识了解甚少。有资料显示沿气道树分布着一些原位 MSCs, 而这些 MSCs 存在于相应部位的上皮干细胞池内。MSCs 在体内对成体肺干细胞的作用尚未阐明, 部分原因是由于实验无法标记原位肺组织 MSCs。近期的一项应用基因小鼠模型进行的实验表明, 上皮干细胞池的调控远比想象的复杂。在上皮细胞与间质细胞相互作用过程中, FGF10 起到重要的作用, 可调节上皮干细胞与干细胞池之间的信息交流<sup>[17]</sup>。在体外, 肺泡干细胞要实现克隆扩增, 须与肺间质细胞共培养, 然而间质细胞的作用可部分被 FGF10 和 HGF 所替代。同样, 在体外, 上皮干细胞要实现增殖与分化, 须与间质细胞共培养。有研究显示 MSCs 可通过 FGF10 的表达水平调节上皮干细胞的生长, 而 TGF- $\beta$  可减弱间质细胞对上皮干细胞的作用, 其机制可能与减少 FGF10 有关<sup>[18]</sup>。总之, 体内和体外实验表明, MSCs 是肺干细胞池的重要组成部分, 其功能因其在气道轴的位置而存在差异。

## 2.5 MSCs 的成血管作用

将 MSCs 与内皮细胞在体外进行共培养, 可促进内皮细胞的增殖、抽芽和迁移, 形成血管样结构。在培养基中加入基质金属蛋白酶可促进胞外基质降解, 促进血管形成。在三维培养体系中, MSCs 是内皮样血管结构形成的必须条件, 加入蛋白酶抑制剂后, 可减少内皮细胞的抽芽, 表明 MSCs 是通过金属蛋白酶调节血管形成的<sup>[19]</sup>。在小鼠心肌梗死模型中, 将人的脐带血来源的 MSCs 注射到心肌组织中, 可提高受损心肌的血管密度, 该研究显示 MSCs 成血管作用是通过旁分泌机制实现的<sup>[20]</sup>。然而肺组织的 MSCs 是如何实现血管再生的目前尚不清楚, 需进一步研究阐明。

## 3 MSCs 治疗肺部疾患的临床应用

到目前大约有 40 余项临床研究用于评估 MSCs 治疗肺部疾患的安全性, 这些疾病包括特发肺间质纤维化、ALI、慢性阻塞性肺疾病、肺气肿、先天性支气管发育不良等。这些研究显示 MSCs 人体移植是安全的, 并无毒副效应和严重的并发症<sup>[21]</sup>。然而 MSCs 治疗肺部疾患的长期效应尚不清楚。MSCs 在 ALI 动物模型中的疗效无疑是确切的, 而在人体对肺损伤的修复却不十分明显, 纠其原因可能与植人体

内的MSCs数量少有关<sup>[22]</sup>。在今后的实验研究中,增加移植细胞的数量,其临床疗效有可能改善。同时规范MSCs的来源、统一移植途径及时机,也是以后需关注之处。例如在移植途径方面,有的研究采用气管滴注,有的采取静脉注射。何种途径更适合患者,取决于疾病种类及患者自身状况。在MSCs临床应用中存在一些亟待解决的问题:MSCs在体内存留时间短,如何提高MSCs在体内滞留时间,发挥最大修复肺组织效应;MSCs的均质性,统一MSCs提取标准,规范体外培养流程,使不同实验间应用的MSCs具有可比性。

总之,与其他类型干细胞相比, MSCs的免疫原性特点、多向分化潜能,更适于肺组织的再生修复,其临床应用的有效性、安全性仍需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] KOTTON D N, MORRISEY E E. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations [J]. *Nat Med*, 2014, 20(8): 822-832. DOI: 10.1038/nm.3642.
- [2] HOGAN B L, BARKAUSKAS C E, CHAPMAN H A, et al. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(2): 123-138. DOI: 10.1016/j.stem.2014.07.012.
- [3] VOLCKAERT T, DILL E, CAMPBELL A, et al. Parabronchial smooth muscle constitutes an airway epithelial stem cell niche in the mouse lung after injury [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(11): 4409-4419. DOI: 10.1172/JCI58097.
- [4] FRIEDENSTEIN A J, PETRAKOVA K V, KUROLESOVA A I, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues [J]. *Transplantation*, 1968, 6(2): 230-247.
- [5] 瞿海龙, 陈晓春, 边剑飞, 等. 骨髓间充质干细胞体外培养表达平滑肌肌动蛋白的实验研究 [J]. 医学研究与教育, 2012, 29(4): 10-12.
- [6] KEATING A. Mesenchymal stromal cells: new directions [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(6): 709-716. DOI: 10.1016/j.stem.2012.05.015.
- [7] ROLANDSSON S, ANDERSSON S A, BRUNE J C, et al. Primary mesenchymal stem cells in human transplanted lungs are CD90/CD105 perivascularly located tissue-resident cells [J]. *BMJ Open Respir Res*, 2014, 1(1): e000027. DOI: 10.1136/bmjjresp-2014-000027.
- [8] REINISCH A, ETCHART N, THOMAS D, et al. Epigenetic and in vivo comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation [J]. *Blood*, 2015, 125(2): 249-260. DOI: 10.1182/blood-2014-04-572255.
- [9] HOFFMAN A M, PAXSON J A, MAZAN M R, et al. Lung-derived mesenchymal stromal cell post-transplantation survival, persistence, paracrine expression, and repair of elastase-injured lung [J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(10): 1779-1792. DOI: 10.1089/scd.2011.0105.
- [10] NAUTA A J, FIBBE W E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells [J]. *Blood*, 2007, 110(10): 3499-3506.
- [11] NÉMETH K, LEELAHAVANICHKUL A, YUEN P S, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production [J]. *Nat Med*, 2009, 15(1): 42-49. DOI: 10.1038/nm.1905.
- [12] TADOKORO T, WANG Y, BARAK L S, et al. IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(35): E3641-3649. DOI: 10.1073/pnas.1409781111.

- [13] MEI S H, MCCARTER S D, DENG Y, et al. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(9): e269.
- [14] LAN Y W, CHOO K B, CHEN C M, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 97. DOI: 10.1186/s13287-015-0081-6.
- [15] LEE C, MITSIALIS S A, ASLAM M, et al. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Circulation*, 2012, 126(22): 2601-2611. DOI: 10.1161/CIRCULATION-AHA.112.114173.
- [16] ISLAM M N, DAS S R, EMIN M T, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury[J]. *Nat Med*, 2012, 18(5): 759-765. DOI: 10.1038/nm.2736.
- [17] KUMAR M E, BOGARD P E, ESPINOZA F H, et al. Mesenchymal cells. Defining a mesenchymal progenitor niche at single-cell resolution[J]. *science*, 2014, 346(6211): 1258810. DOI: 10.1126/science.1258810.
- [18] MCQUALTER J L, MCCARTY R C, VAN DER VELDEN J, et al. TGF- $\beta$  signaling in stromal cells acts upstream of FGF-10 to regulate epithelial stem cell growth in the adult lung[J]. *Stem Cell Res*, 2013, 11(3): 1222-1233. DOI: 10.1016/j.scr.2013.08.007.
- [19] KACHGAL S, CARRION B, JANSON I A, et al. Bone marrow stromal cells stimulate an angiogenic program that requires endothelial MT1-MMP[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(11): 3546-3555. DOI: 10.1002/jcp.24056.
- [20] NASCIMENTO D S, MOSQUEIRA D, SOUSA L M, et al. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(1): 5. DOI: 10.1186/sert394.
- [21] LIU K D, WILSON J G, ZHUO H, et al. Design and implementation of the START (STem cells for ARDS Treatment) trial, a phase 1/2 trial of human mesenchymal stem/stromal cells for the treatment of moderate-severe acute respiratory distress syndrome[J]. *Ann Intensive Care*, 2014, 4: 22. DOI: 10.1186/s13613-014-0022-z.
- [22] CHAMBERS D C, 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. DOI: 10.1111/resp.12343.

(责任编辑: 裴永强)