

• 综述 •

间充质干细胞治疗原发性干燥综合征的研究进展

李欣 李芳 李小峰

【摘要】 干燥综合征是一种侵犯外分泌腺,累及多脏器、多系统,以高度淋巴细胞浸润为特征的慢性炎症性自身免疫性疾病。目前发病机制尚未明确,治疗仍停留在改善症状,提高患者生存质量,阻止疾病进展阶段,尚无根治性方法。近年来间充质干细胞作为治疗自身免疫性疾病的一种新方法已成为研究热点,本文就间充质干细胞与自身免疫性疾病及治疗原发性干燥综合征的相关研究进展进行综述。

【关键词】 干燥综合征; 间质干细胞; 自身免疫疾病

Research advancement of mesenchymal stem cells in the treatment of primary Sjögren syndrome Li Xin, Li Fang, Li Xiaofeng. Department of Rheumatism, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: Li Fang, Email: sunshine5670@hotmail.com

【Abstract】 Sjögren syndrome is a kind of chronic inflammatory autoimmune disease, characterized by a large number of lymphocytic infiltration of exocrine glands, which can effect multiple organs and systems. The pathogenesis of Sjögren syndrome is not clear. At present the disease just can be treated by improving the symptom and the quality of survival and preventing the progress of disease instead of being cured radically. In recent years, it has been a hot spot of research that mesenchymal stem cells as a new way to treat autoimmune disease. The paper made a review to state research advancement of the link between mesenchymal stem cells and autoimmune disease, especially primary Sjögren syndrome.

【Key words】 Sjogren's syndrome; Mesenchymal stem cells; Autoimmune diseases

干燥综合征(Sjögren syndrome, SS)是一种以口干、眼干为典型临床表现,可累及多脏器造成多系统损害的自身免疫性疾病。此病若单独存在,则称为原发性干燥综合征(primary Sjögren syndrome, pSS),若合并有一种或几种诊断明确的自身免疫性疾病,则称为继发性干燥综合征(secondary Sjögren syndrome, sSS)。随着对疾病认识的深入及诊断技术的不断发展,该疾病的漏诊、误诊率正逐步降低。目前流行病学数据显示,全球pSS发生率约0.06%~0.07%,患病率约0.61%^[1],其中以女性多发。近年来间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其具有较强的免疫调节作用,为治疗自身免疫性疾病提供了新的思路。本文就MSCs与免疫系统、自身免疫性疾病及治疗pSS的相关研究进展进行综述。

一、MSCs的来源及基本特征

MSCs是一类来源于早期中胚层和外胚层,可

刺激造血、影响固有免疫及适应性免疫,具体多向分化潜能、支持造血及强大增殖能力的多能干细胞。研究发现MSCs可从骨髓、脐带血、脂肪组织、羊水、皮肤、肝脏、骨骼肌、外周血,甚至是牙龈等多种组织器官中分离出来^[2]。MSCs具有强大的分化潜能,其可在体内外分化为骨、软骨、肌肉、上皮、脂肪、神经等间充质组织^[3-4],且鉴于其具有取材方便、低免疫原性、较强免疫调节功能等基本特征^[5],已被作为细胞治疗的理想种子细胞。

二、MSCs与免疫系统

大量实验研究表明MSCs具有调节B细胞、T细胞免疫功能,抑制致炎细胞因子分泌、自然杀伤(NK)细胞增殖等特点,可起到抗炎、减弱移植排斥反应及抑制自身免疫疾病等作用,其可通过以下途径调控固有免疫及适应性免疫。

1. 对固有免疫的调节: MSCs可抑制NK细胞及树突状细胞(dendritic cell, DC)的活化、分化和效应发挥,其产生的IL-6可促进中性粒细胞凋亡及抑制DC的成熟,同时发现IL-6和粒细胞集落刺激生物因子(GM-CSF)存在可影响巨噬细胞的功能^[6]。

2. 对适应性免疫的调节: (1) MSCs通过上调细胞周期负性调节蛋白p27的表达,从而抑制T淋巴细胞的增殖; MSCs产生可溶性因子NO、转化生长因子 β (TGF- β)、肝细胞生长因子(HGF)、前列腺素E2 (PGE2)、截断CCL-2和IL-10及膜结合分子PD-1、PD-L1抑制CD4⁺T淋巴细胞增殖,从而分别抑制Th1细胞、Th17细胞产生 γ 干扰素(IFN- γ)、IL-17A,同时分别促进Th2细胞、Treg细胞释IL-4、TGF- β ,继而起到抗炎作用^[7]。(2) MSCs可上调一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS),进而抑制CD8⁺T淋巴细胞的增殖、细胞因子的产生及细胞毒作用^[8]。(3) MSCs可抑制活化B细胞的增殖、分化、趋化因子受体的表达和免疫球蛋白的产生^[9]。

三、MSCs与自身免疫性疾病

目前自身免疫性疾病尚无法根治,激素、免疫抑制剂、非甾体抗炎药及部分生物制剂虽可阻断大部分的炎症过程,但对于部分难治性疾病疗效较差,严重影响疾病的缓解率及生存率。研究表明MSCs具有较强的免疫调节功能,其为自身免疫性疾病的治疗提供了新的思路,且大量体外与动物实验均证实其具有较好的治疗前景,尤其对于病史较长的难治性自身免疫性疾病^[10]。

当前有关MSCs治疗类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的研究主要集中于动物实验,大多数研究显示MSCs改善DBA小鼠RA症状的主要机制为抑制炎症因子的产生及激活Treg细胞^[11-12]。然而Papadopoulou等^[13]的研究则表明MSCs分别在治疗胶原诱导的RA模型和自然发病的RA模型后得出完全相反的结论,并且MSCs只有在RA发病之前输注是有效的,可能与MSCs被输注到炎症微环境中失去免疫调节作用有关。Wang等^[14]在研究MSCs对实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠模型的治疗作用中发现:人类胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hES-MSCs)可显著减轻EAE小鼠的临床症状并预防神经脱髓鞘病变的发生,且发现hES-MSCs疾病修饰效果明确强于人类骨髓来源间充质干细胞(human bone-marrow-derived MSCs, BMMSCs),其认为BMMSCs治疗中高表达的IL-6可能有降低其疗效的作用。除此以外,近年来还有许多MSCs在治疗克罗恩病、1型糖尿病、系统性红斑狼疮、多发性硬化症等自身免疫性疾病相

关的临床试验被报道。目前pSS合并多处内脏损害者,应用糖皮质激素、生物制剂及免疫抑制剂往往疗效欠佳,而MSCs因其具有抗炎及较强免疫调节作用,近年来被作为治疗严重的难治性pSS的新方法正日益受到关注。下面将详细阐述MSCs治疗pSS的相关研究进展。

四、MSCs与pSS

1. MSCs在pSS发病机制中的作用: SS是一种以外分泌腺体炎症浸润及腺体功能障碍为主要特点的慢性、全身性自身免疫性疾病,其发生可能与B细胞的活化、免疫球蛋白及抗体的产生、外分泌腺体T细胞的浸润等机制有关。研究显示,SS患者外分泌腺体中以T细胞浸润为主,尤其是Th1细胞^[15],Treg数量显著减少且外周血中CD4⁺CD25⁺T细胞亦处于下降趋势^[16],同时发现B细胞数量的减少与疾病缓解有着必然联系^[17]。当前治疗SS比其他自身免疫性疾病更难且更具有挑战性^[18],而随着MSCs的深入研究,发现其可通过多种途径改善涎腺和泪腺的外分泌功能,其为治疗SS,特别是难治性、重型SS带来了新的希望。

路臻豪等^[19]将MSCs在pSS发病机制中的作用总结如下: (1)重建涎腺: BMMSCs在体内可能会通过细胞转化和融合的方式成为涎腺上皮细胞、血管内皮细胞等细胞,参与重建涎腺,同时MSCs移植后能产生IL-10,其可起到改善涎腺分泌的作用。

(2)参与泪腺的组织修复: 目前存在两种假说: 其一、MSCs移植后可能通过分化的方式进行泪腺组织修复; 其二、泪腺周围可能存在干细胞,可利用其自我增殖功能进行修复。Park等^[20]通过RT-PCR和Western blot实验技术从58种相关蛋白中最后确定出ANKRD56、TCF3和HMG20B 3种蛋白与MSCs分化为涎腺上皮细胞有关。在此之前,研究者分别用MSCs治疗SS样NOD/Ltj小鼠模型及SS患者时发现: 其可诱导T细胞转化为Treg和Th2细胞,同时可抑制Th17和滤泡性辅助性T(T follicular helper, Tfh)细胞的反应,起到恢复唾液腺分泌功能的作用。同时数据显示: 基质细胞衍生因子-1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1)的产生将促使MSCs移植后朝着炎症区域迁移,而SDF-1的配体CXC趋化因子受体4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)的中和作用则会影响MSCs的治疗效果^[21]。Khalili等^[22]研究证实: 完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA)只能短时间内改善唾液分泌功能。

用MSCs联合CFA治疗SS样NOD/Ltj小鼠模型时,唾液腺的修复作用较单用MSCs时明显,其主要机制为:增加了腺体组织修复速度及成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的再生能力^[23]。目前MSCs在pSS发病机制中的具体作用尚不清楚,仍需要通过大量动物实验与人体试验进一步探索。

2. MSCs治疗pSS相关动物实验:我国研究者们首次揭示了SS样NOD/Ltj小鼠模型体内及人体内的BMMSCs存在免疫调节功能缺陷,并认为其可能与NOD/Ltj小鼠及人体内的BMMSCs向Treg分化减少有关^[21]。目前对于大部分腺体严重破坏的pSS,糖皮质激素、免疫抑制剂,甚至是生物制剂对于促进唾液分泌均达不到满意疗效,鉴于MSCs具有促进涎腺分泌及修复组织的作用,故同种异体MSCs移植可能成为治疗pSS的一种崭新、有效的治疗方法。

在SS动物模型的实验研究中,研究者们发现:在SS大鼠下颌下腺植入BMMSCs后,大鼠唾液腺分泌功能较前有所改善,且通过绿色荧光标记技术,可见BMMSCs在体内可长时间存活,并随着植入时间的延长,其分布由注入针道附近逐渐向腺泡间质及下颌下腺其余区域分布,但其具体机制尚未明确^[24]。随着对MSCs认识的逐渐深入,研究者们将焦点集中于其治疗效果上。目前发现骨髓来源细胞(bone marrow-derived cells, BMDCs)可改善pSS唾液腺分泌功能,其包括造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)和BMMSCs两种干细胞。Khalili等^[25]分别用BMDCs和脾脏来源细胞作用于SS样NOD小鼠模型上,经过长达1年的观察发现:小鼠患病初期,其两种治疗方式均可使小鼠唾液流率维持在正常值的80%~100%,且脾脏来源细胞较BMDCs治疗NOD小鼠疗效更好。然而,对于处于疾病晚期的小鼠而言,两种治疗虽均可改善唾液流率,但最多可恢复为正常值的50%。两种方法的数据均显示:TNF- α 、T细胞、B细胞可随EGF、Treg的升高而降低。但对于pSS早期及晚期患者是否也可得出相似的结论,有待进一步证实。同时对于出现症状但尚未发展为pSS的患者来说,积极有效的治疗显得尤为重要。研究者们将CFA联合BMDCs注入7周大的NOD小鼠(尚未发展为SS),52周后观察发现所有小鼠的唾液流率均恢复正常,更有趣的是,通过治疗NOD小鼠最终未发展为SS^[22]。然而此种联合治疗方案对于人类预防pSS的发生是否适

用,尚需大量临床试验加以验证。

3. MSCs治疗pSS相关临床试验:目前发现脐带来源间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)治疗pSS可增加唾液流率、改善疾病症状及抑制免疫反应。研究证实pSS患者体内循环滤泡性辅助性T(circulating T follicular helper, cTfh)细胞的增多与抗SSB抗体及SS疾病活动性指数评分有着密切的联系。Xu等^[21]选取应用糖皮质激素及免疫抑制剂后疗效不佳的24例pSS患者(11例患者唾液腺受损,13例患者存在多器官受累),按 $1 \times 10^6/\text{kg}$ 标准静脉输注同种异体UC-MSCs后,所有患者病情在不同程度上均有所好转,同时发现UC-MSCs输注后血浆抗SSA、抗SSB抗体数目大幅度减少,起到抑制Tfh的分化及功能发挥的作用。关于UC-MSCs抑制Tfh分化的相关机制,Liu等^[26]通过用pSS患者外周血与UC-MSCs在体外共同培养后发现:UC-MSCs可通过分泌吲哚氨2,3-二氧化酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)抑制cTfh细胞的分化,而IDO的分泌可能与被激活的CD4⁺T细胞释放可溶性因子有关。

当前MSCs治疗pSS仍处于实验阶段,尚未应用于临床,而要寻找到一种合理的给药方式显得尤为重要。近来研究者们研制出了一种新的给药方式,其脐带沃顿胶间充质干细胞(human umbilical cord Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells, hUCMS)用IFN- γ 处理后装入微型胶囊内与外周血共同培养,结果显示此给药方式其可抑制pSS患者T细胞的增殖并恢复Treg与Th17比值的平衡^[27]。然而此种治疗方式是否适用于临床,还有待大量临床试验证实。

五、总结与展望

MSCs因其强增殖能力、低免疫原性及特有的免疫调节作用,为治疗pSS带来了新的治疗思路。近期有研究者已对满足要求的6项预实验研究进行了系统评价,结果表明MSCs治疗SS唾液腺功能紊乱方面是有效的,但仍需大量的临床试验证明其有效性^[28]。同时对于不同来源的MSCs对机体的免疫调节作用是否相同、MSCs移植后是否会诱发肿瘤、MSCs是否能根治pSS等问题尚需长期、大样本的动物实验及临床试验才能得到解决。

参考文献

- [1] Qin B, Wang J, Yang Z, et al. Epidemiology of primary Sjögren's syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. Ann Rheum Dis, 2014: annrheumdis-2014-205375.

- [2] Gao Y, Zhao G, Li D, et al. Isolation and multiple differentiation potential assessment of human gingival mesenchymal stem cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(11): 20982-20996.
- [3] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(9): 726-736.
- [4] Baghaban Eslaminejad M, Malakooty Poor E. Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration[J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(3): 344-354.
- [5] 范传波, 艾辉胜. 骨髓间充质干细胞免疫抑制作用及其机理[J]. *生物技术通讯*, 2005, 16(4): 445-447.
- [6] Spaggiari GM, Moretta L. Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity[J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91(1): 27-31.
- [7] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells[J]. *Blood*, 2005, 105(7): 2821-2827.
- [8] Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 141-150.
- [9] Franquesa M, Hoogduijn MJ, Bestard O, et al. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells[J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 212.
- [10] Cipriani P, Ruscitti P, Di Benedetto P, et al. Mesenchymal stromal cells and rheumatic diseases: new tools from pathogenesis to regenerative therapies[J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(7): 832-849.
- [11] Zhou B, Yuan J, Zhou Y, et al. Administering human adipose-derived mesenchymal stem cells to prevent and treat experimental arthritis[J]. *Clin Immunol*, 2011, 141(3): 328-337.
- [12] Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, et al. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells reduce inflammatory and T-cell response and induce regulatory T cells *in vitro* in rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2010, 69(1): 241-248.
- [13] Papadopoulou A, Yiangou M, Athanasiou E, et al. Mesenchymal stem cells are conditionally therapeutic in preclinical models of rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(10): 1733-1740.
- [14] Wang X, Kimbrel EA, Ijichi K, et al. Human ESC-derived MSCs outperform bone marrow MSCs in the treatment of an EAE model of multiple sclerosis[J]. *Stem Cell Reports*, 2014, 3(1): 115-130.
- [15] Kallenberg CG, Vissink A, Kroese FG, et al. What have we learned from clinical trials in primary Sjogren's syndrome about pathogenesis?[J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(1): 205.
- [16] Li X, Qian L, Wang G, et al. T regulatory cells are markedly diminished in diseased salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome[J]. *J Rheumatol*, 2007, 34(12): 2438-2445.
- [17] Meijer JM, Meiners PM, Vissink A, et al. Effectiveness of rituximab treatment in primary Sjogren's syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(4): 960-968.
- [18] Ramos-Casals M, Tzioufas AG, Stone JH, et al. Treatment of primary Sjogren syndrome: a systematic review[J]. *JAMA*, 2010, 304(4): 452-460.
- [19] 路臻豪, 汤建平. 间充质干细胞在干燥综合征发病机制中的作用与治疗前景[J]. *中华风湿病学杂志*, 2013, 17(7): 492-494.
- [20] Park YJ, Koh J, Gauna AE, et al. Identification of regulatory factors for mesenchymal stem cell-derived salivary epithelial cells in a co-culture system[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112158.
- [21] Xu J, Wang D, Liu D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjögren syndrome[J]. *Blood*, 2012, 120(15): 3142-3151.
- [22] Khalili S, Liu Y, Sumita Y, et al. Bone marrow cells are a source of undifferentiated cells to prevent Sjögren's syndrome and to preserve salivary glands function in the non-obese diabetic mice[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(11): 1893-1899.
- [23] Khalili S, Liu Y, Kornete M, et al. Mesenchymal Stromal Cells Improve Salivary Function and Reduce Lymphocytic Infiltrates in Mice with Sjögren's-Like Disease[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38615.
- [24] 杨兆安, 夏碧清, 吕汉孝, 等. 骨髓间充质干细胞移植对舍格伦综合征大鼠模型的治疗作用[J]. *上海口腔医学*, 2011, 20(2): 152-158.
- [25] Khalili S, Faustman DL, Liu Y, et al. Treatment for salivary gland hypofunction at both initial and advanced stages of Sjögren-like disease: a comparative study of bone marrow therapy versus spleen cell therapy with a 1-year monitoring period[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(3): 412-423.
- [26] Liu R, Su D, Zhou M, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of circulating T follicular helper cells in patients with primary Sjögren's syndrome through the secretion of indoleamine 2, 3-dioxygenase[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2015, 54(2): 332-342.
- [27] Alunno A, Montanucci P, Bistoni O, et al. In vitro immunomodulatory effects of microencapsulated umbilical cord Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells in primary Sjögren's syndrome[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2015, 54(1): 163-168.
- [28] Jensen DH, Oliveri RS, Trojahn Kølle SF, et al. Mesenchymal stem cell therapy for salivary gland dysfunction and xerostomia: a systematic review of preclinical studies[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2014, 117(3): 335-342.

(收稿日期: 2015-04-02)

(本文编辑: 张志巍)

李欣, 李芳, 李高峰. 间充质干细胞治疗原发性干燥综合征的研究进展 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2015, 9 (17): 3269-3272.