

慢性胰腺炎干细胞治疗研究进展

周显祝¹ 邹文斌^{1,2} 王越³ 李兆申^{1,2} 廖专^{1,2}

¹海军军医大学附属长海医院消化内科,上海 200433; ²上海市胰腺病研究所,上海 200433; ³海军军医大学基础医学院组织胚胎学教研室,上海 200433

通信作者:廖专,Email: zhuanleo@126.com

【摘要】慢性胰腺炎(CP)一种进行性慢性炎症疾病,其病理特征为胰腺腺泡萎缩、破坏和间质纤维化,临幊上缺乏有效治疗手段。干细胞治疗是目前医学研究的热点方向之一,具有促进病变损伤组织修复和功能性再生的能力,未来可能成为CP患者治疗的新方式。本文介绍了干细胞相关技术应用于CP治疗的基础研究现状和临床应用前景。

【关键词】干细胞治疗; 慢性胰腺炎; 抗炎; 纤维化

基金项目:国家自然科学基金(81700565,81770636);上海市教委创新计划重大项目(2018)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2019.05.019

慢性胰腺炎(CP)是指由于各种原因引起的胰腺组织发生进行性炎症反应,反复或持续性的损伤胰腺腺泡和小管,导致胰腺内外分泌功能不足。CP的病因很复杂,与饮酒、吸烟、高脂血症、胰腺分裂和遗传因素等相關。CP治疗主要是缓解症状,处理并发症,以及保护并改善胰腺功能。针对CP的不同治疗手段各有利弊,临幊常用的治疗方式主要是药物治疗、内镜治疗以及外科手术治疗。药物治疗方面缺少有效抗炎和抗纤维化的药物。内镜治疗主要针对胰管梗阻性患者有效。外科手术治疗创伤大,术后恢复慢,并发症较多。因此采用更有效和微创的治疗方式从根源上修复胰腺细胞与组织损伤是CP治疗研究的发展趋势。干细胞治疗是目前医学研究的热点方向之一,具有促进病变损伤组织修复和功能性再生的能力,未来可能成为CP患者治疗的新方式。本文介绍干细胞治疗CP的基础研究现状和临床应用前景。

一、干细胞的种类与特点

干细胞是一类具有自我更新和多向分化增殖能力的原始细胞,能产生表型和基因型与自己完全相同的子细胞。既具有生理性的更新能力,又对损伤与疾病导致的反应有修复功能。干细胞可分为3类,包括:(1)全能干细胞,含胚胎干细胞、胚胎生殖嵴细胞、胚胎瘤细胞;(2)多能干细胞,目前研究较多的是骨髓来源的干细胞,它可以分化成肝细胞,也可能分化成为胰腺细胞;(3)定向干细胞,胰腺的定向干细胞包括胚胎胰腺干细胞、胰腺导管细胞、胰岛来源干细胞。根据干细胞的发育阶段还可分为胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞有潜力由单个受精卵发育成为具有各种组织器官的完整个体,其分化和增殖构成动物发育的基础;成体干细胞的进一步分化则是成年动物体内组织和器官修复再生的基础。胰腺干细胞为成体干细胞,具有高度增殖及多向分化能力,具备分化成为胰腺内分泌细胞、腺泡细胞和导管细胞的潜能^[1]。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)于1976年首次从骨髓分离^[2],是一类具有多向分化潜能和高度自我更新能力的成体干细胞,可分化成多种细胞系,包括中胚层谱系,如软骨细胞、骨细胞和脂肪细胞,以及外胚层和内胚层细胞^[3]。MSCs可以从骨髓、脂肪组织和脐带中分离出来,且容易在体外扩增。MSCs有以下特点:(1)必须在标准培养条件下保持塑性贴壁;(2)表达CD₁₀₅、CD₇₃和CD₉₀,但不表达CD₄₅、CD₃₄、CD₁₄、CD_{11b}、CD_{79a}、CD₁₉或HLA-DR;(3)可以体外分化成成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞。2004年Le Blanc等^[4]报道移植MSCs成功治疗移植物抗宿主病患者,此后报道了多项MSCs临床试验。起初MSCs治疗侧重于其多向分化的能力,近期一些研究表明,大部分系统性输注的MSCs被困在肺内作为栓子^[5]。此外,在没有分化和移植到受伤组织的疾病模型中, MSCs具有抑制炎症、凋亡和纤维化的作用^[6]。因此,目前临幊相关研究的重点方向已经转向利用MSCs的旁分泌和调节功能(如抗炎作用)而非其直接分化替代组织细胞的能力。

二、干细胞治疗胰腺炎的研究现状

目前干细胞治疗主要用于胰腺炎动物模型,其治疗更常用于急性胰腺炎(AP)而非CP。研究中最常用的MSCs类型是骨髓和脐带来源干细胞。鼠MSCs是最常用的治疗胰腺炎的干细胞,其次为人类MSCs,极少数研究使用犬MSCs。

关于干细胞治疗CP的研究^[7-9],目前尚没有在人体上进行。这些研究均将不同来源的干细胞通过静脉注射于CP模型鼠,并在一段时间后观察鼠胰腺情况。研究的主要差异是干细胞来源和注射剂量以及检测疗效的时间等方面^[7-8]。Sun等^[9]对小鼠施用低剂量的脂肪来源的MSCs(adipose-derived mesenchymal stem cells, ASCs)进行治疗。

三、干细胞治疗CP的作用与机制

目前研究均观察到干细胞治疗对实验动物的胰腺炎有

明显改善作用。发挥治疗作用的途径为两种:旁分泌途径和干细胞归巢及定向分化后的细胞替代途径。越来越多的研究表明旁分泌机制起主导作用,其分泌出特定细胞因子或抑制某些细胞因子的表达,从而发挥抗炎以及抗纤维化的作用^[10]。有研究表明,人 MSCs 输入可有效降低糖尿病小鼠的血糖水平,这种变化是通过增加小鼠中产生胰岛素的胰岛 β 细胞来介导的,表明高血糖的逆转是通过诱导内源性胰岛的再生而不是将注射的 MSCs 直接分化为产生胰岛素的细胞^[11]。旁分泌机制是目前更能被普遍认可的发挥治疗作用的方式,提示可将干细胞的分泌因子分离后直接输送给患者。另一种途径是干细胞归巢至受损胰腺后,分化为受损器官的细胞进行补充与修复。这种途径的可能原因是胰腺的生理更新和损伤修复主要依靠胰腺干细胞和骨髓来源的干细胞。但在正常生理情况下,胰腺干细胞的数量并不能满足胰腺损伤修复的需要,在胰腺损伤的自身修复过程中的作用相对较小。病理损伤时,自体骨髓 MSCs 可随血液循环到达损伤的胰腺,转化为胰腺干细胞,参与病理修复,从而恢复胰腺功能。从目前的结果来看,干细胞治疗胰腺炎主要有以下几方面效应。

1. 抗炎作用与旁分泌效应:炎症是 CP 病情进展的基础,目前的研究证明,ACCs 能抑制乙醇和蛙皮素诱导炎症的作用。将腺泡细胞与干细胞共培养时,干细胞能显著抑制腺泡细胞和胰腺星状细胞 TNF- α 、IL-6 等炎症因子和纤连蛋白的表达。不仅如此,在 ASCs 条件培养基中培养腺泡细胞也能达到类似的效果。这种效应可能是通过干细胞的旁分泌效应所介导的,即干细胞分泌一些特殊递质到培养基中,递质作用于腺泡细胞,延缓甚至阻断其炎症因子的表达,从而达到抗炎的作用。

2. 延缓纤维化:胰腺纤维化的核心环节是激活态的胰腺星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSCs) 分泌大量的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)。在正常胰腺中,PSCs 呈圆形和静止状态,静息态 PSCs 仅产生少量 ECM。而在胰腺损伤的早期阶段,静息态 PSCs 在氧化应激、乙醇等刺激下被激活,转化为肌成纤维样细胞,并分泌大量 ECM。同时炎症细胞与血小板以及活化的 PSCs 自身也产生炎症递质,如单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)、细胞间黏附分子-1、IL-8,这些炎症因子通过自分泌 (作用于 PSCs 自身) 与旁分泌作用 (作用于炎症细胞及血小板) 形成环路,引发正反馈,加速炎症的过程^[12]。

3. 抑制炎症因子的产生:MCP-1 在单核细胞和淋巴细胞向炎症部位的趋化中起着核心作用^[13-14]。在多种纤维化疾病 (包括特发性肺纤维化、系统性硬化症和 CP) 中均观察到 MCP-1 的过度表达^[15-17],因此 MCP-1 水平可能是胰腺纤维化和炎症的重要治疗靶点。有研究表明,干细胞条件培养基中培养的 PSCs,其 MCP-1 和 IL-8 的表达水平显著下降^[7,8]。目前文献中普遍得出的结论是腺泡细胞和星状细胞在干细胞条件培养基中培养时,能减少乙醇及雨蛙素所诱导的炎症因子产生,一方面能抑制激活态 PSCs 的自分泌效应,一方面

也可以通过旁分泌抑制炎症细胞和血小板释放炎症递质,阻断正反馈进程,进而抑制胰腺纤维化。

4. 防止胰腺细胞死亡:最近 Sun 等^[9]探讨了干细胞静脉输注对 CP 模型小鼠胰腺细胞死亡的影响。通过特定的染色方法对凋亡细胞进行染色,发现在接受干细胞治疗的 CP 模型小鼠中染色的凋亡细胞显著减少,表明干细胞能保护胰腺细胞免受乙醇和蛙皮素所诱导的细胞死亡,即腺泡细胞受损减少,其释放的细胞因子也相应减少,进而减弱了 PSCs 细胞的活化,减缓了胰腺纤维化的进程。

5. 归巢:干细胞有自主趋化至机体受损部位的特性。较新的研究结果表明,干细胞治疗 2 周后,实验动物的胰腺中有干细胞荧光蛋白表达,而在肝脏或肺组织中无表达,表明干细胞经过静脉注射特异性地迁移到受损的胰腺处。Zhou 等^[7]的研究证实了该现象,在实验的第 14 天和第 28 天从大鼠的胰腺组织中检测出了干细胞。由于胆管梗阻,肝功能受到一定程度的损害,因而在肝脏中也检测到干细胞,表明静脉输注的干细胞可以有效地到达受损组织的静脉内。有研究报道,输注干细胞的健康老鼠在第 14 天后于肺组织中鉴定出少量的干细胞,这是由于培养的 MSCs 直径大于了微毛细血管 (20 μm) 的宽度,因此 MSCs 被阻塞在肺部毛细血管而无法通过^[18]。但 Eggenhofer 等^[19]研究发现不一样的现象,通过尾静脉对肝脏受损的小鼠注射绿色荧光蛋白标记的 MSCs 后 24 h,肝脏和脾脏中均发现荧光,但未能从这些器官中分离出活体 MSCs,表明活体 MSCs 静脉输注后不能通过肺的毛细血管床,因此作者认为先前在其他组织的一些研究检测到的可能是来自 MSCs 碎片或被吞噬的 MSCs,而不是活体 MSCs 标记 (例如放射性、荧光素标记)。该研究表明,如果 MSCs 需要递送到除肺以外的组织,则必须探讨其他使用途径,例如通过门静脉给药可将 MSCs 递送至肝脏,而动脉给药可将 MSCs 递送至特定器官。

6. 分化:当干细胞迁移到胰腺,通过干细胞绿色荧光蛋白与淀粉酶的共染色可以知道干细胞分化成了淀粉酶阳性的细胞,且表达了大量的腺泡细胞特异性产物^[9],说明体内归巢至受损胰腺的干细胞分化成了腺泡样细胞。同时体外细胞培养的研究提供了进一步的证据,即由腺泡细胞分泌的生长因子和信号分子可以导致干细胞向腺泡细胞方向分化。当与腺泡细胞共培养时,大鼠骨髓 MSCs、人羊膜上皮细胞和人 ASCs 在体外已显示出分化为唾液腺泡细胞的能力^[20-21]。目前认为,细胞间接接触和微环境释放营养因子 (即旁分泌作用) 似乎是驱动干细胞分化的原因。然而并非所有 MSCs 都具有相同的分化能力。据报道,在唾液腺模型中 13% ~ 18% 的 ASC 分化为淀粉酶阳性细胞^[22-23]。目前需要确认是否只有其中一部分亚群的 MSCs 具有分化为特定细胞的潜力,或者目前分离出的 ASCs 是各种不同干细胞的混合,每个干细胞已经有自己特定的分化方向,需要在各自特定环境中被触发,例如这部分淀粉酶阳性分化潜能的细胞在唾液腺模型中被触发。

总之,目前研究表明,MSCs 可分化为淀粉酶阳性细胞,

这种情况可以在细胞输注体内后发生,也可以在 ASCs 与腺泡细胞共培养或在腺泡细胞条件培养基中培养时(即体外)发生。

四、总结与展望

目前的研究已经从治疗效果角度阐明了干细胞能够发挥抗炎,抑制纤维化进展等作用,但缺少针对这些效应的具体机制的研究。此外,缺少关于干细胞输注后是否能缓解疼痛方面的研究。对于干细胞治疗 CP 的另一个思路是体外诱导其分化为内分泌或外分泌细胞后再植入手内。内分泌细胞植入的主要问题是数量问题,对于糖尿病患者,基于细胞疗法旨在替代胰腺产生胰岛素的细胞。目前该方法已接近临幊上可行,但尚未达到取代外源胰岛素注射治疗糖尿病的程度。外分泌植入的问题是位置问题,必须实现移植的外分泌细胞产生的消化酶能通过导管递送至肠腔。此外,与胰腺内分泌细胞替代疗法不同,没有证据证明外分泌细胞替代疗法具有比目前的口服胰酶替代疗法更安全、更有潜力。总之,对以上问题的机制研究将可能有助于该领域的进一步发展及加速临床转化的进程。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, et al. Pancreatic stellate cells: Molecular mechanism of pancreatic brosis [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(9): 1115-1124.
- [2] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs [J]. *Exp Hematol*, 1976, 4(5): 267-274.
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284 (5411): 143-147. DOI: 10.1126/science.284.5411.143.
- [4] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells[J]. *Lancet*, 2004, 363 (9419): 1439-1441. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16104-7.
- [5] Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution [J]. *Circulation*, 2003, 108(7): 863-868. DOI: 10.1161/01.CIR.0000084828.50310.6A.
- [6] Lee R, Pulin A, Seo M, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6[J]. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(1): 54-63.
- [7] Zhou C, Li M, Qin A, et al. Reduction of fibrosis in dibutyltin dichloride-induced chronic pancreatitis using rat umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly [J]. *Pancreas*, 2013, 42(8): 1291-1302.
- [8] Kawakubo K, Ohnishi S, Fujita H, et al. Effect of fetal membrane-derived mesenchymal stem cell transplantation in rats with acute and chronic pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2016, 45(5): 707-713. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000541.
- [9] Sun Z, Gou W, Kim DS, et al. Adipose stem cell therapy mitigates chronic pancreatitis via differentiation into acinar-like cells in mice[J]. *Mol Ther*, 2017, 25 (11): 2490-2501. DOI: 10.1016/j.molther.2017.06.016.
- [10] Yin G, Hu G, Wan R, et al. Role of bone marrow mesenchymal stem cells in L-arg-induced acute pancreatitis: effects and possible mechanisms[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (5): 4457-4468.
- [11] Lee RH, Seo MJ, Reger RL, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (46): 17438-17443. DOI: 10.1073/pnas.0608249103.
- [12] Andoh A, Takaya H, Saotome T, et al. Cytokine regulation of chemokine (IL-8, MCP-1, and RANTES) gene expression in human pancreatic periacinar myofibroblasts [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(1): 211-219. DOI: 10.1053/gast.2000.8538.
- [13] Taub DD, Proost P, Murphy WJ, et al. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes[J]. *J Clin Invest*, 1995, 95 (3): 1370-1376. DOI: 10.1172/JCI117788.
- [14] Valente AJ, Rozek MM, Schwartz CJ, et al. Characterization of monocyte chemotactic protein-1 binding to human monocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 176(1): 309-314. DOI: 10.1016/0006-291X(91)90925-w.
- [15] Distler O, Pap T, Kowal-Bielecka O, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis[J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44 (11): 2665-2678. DOI: 10.1002/1529-0131 (200111)44:11<2665::aid-art446>3.0.co;2-s.
- [16] Antoniades HN, Neville-Golden J, Galanopoulos T, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89 (12): 5371-5375. DOI: 10.1073/pnas.89.12.5371.
- [17] Saurer L, Reber P, Schaffner T, et al. Differential expression of chemokines in normal pancreas and in chronic pancreatitis[J]. *Gastroenterology*, 2000, 118 (2): 356-367. DOI: 10.1016/s0016-5085(00)70218-6.
- [18] Crop MJ, Baan CC, Korevaar SS, et al. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 162 (3): 474-486. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04256.x.
- [19] Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion[J]. *Front Immunol*, 2012, 3: 297. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00297.
- [20] Huang GL, Zhang NN, Wang JS, et al. Transdifferentiation of

human amniotic epithelial cells into acinar cells using a double-chamber system [J]. *Cell Reprogram*, 2012, 14 (4): 377-383. DOI:10.1089/cell.2011.0096.

[21] Lee J, Park S, Roh S. Transdifferentiation of mouse adipose-derived stromal cells into acinar cells of the submandibular gland using a co-culture system [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 334 (1): 160-172. DOI:10.1016/j.yexcr.2015.03.006.

[22] Lim JY, Ra JC, Shin IS, et al. Systemic transplantation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the

regeneration of irradiation-induced salivary gland damage [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (8): e71167. DOI: 10.1371/journal.pone.0071167.

[23] Suşman S, Rus-Ciucă D, Sorişău O, et al. Pancreatic exocrine adult cells and placental stem cells co-culture. Working together is always the best way to go [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2011, 52 (3 Suppl): 999-1004.

(收稿日期:2018-09-30)

(本文编辑:冀凯宏)