

间充质干细胞治疗急性肺损伤的研究进展

郑丽坤¹, 张磊², 陈乃耀³, 吴寿岭⁴, 赵辉^{3,5*}

(1. 华北煤炭医学院; 2. 附属开滦医院 骨科; 3. 血液科; 4. 心内科, 河北 唐山 063000;
5. 天津大学化工学院 生物制药实验室, 天津 300000)

摘要: 间充质干细胞是一种多能造血干细胞。在急性肺损伤中, 它可以分化为 I 和 II 型上皮细胞, 修复受损的局部组织。此外, 间充质干细胞还通过减少促炎症细胞因子 IL-1、MIP-2、INF- γ 和 TNF- α 的释放, 上调抗炎症细胞因子 IL-10、IL-1ra 和 IL-13 的分泌, 减轻炎症细胞反应, 从而发挥治疗作用。

关键词: 急性肺损伤; 间充质干细胞

中图分类号: R 563.9 文献标志码: A

Progress in the treatment of acute lung injury with mesenchymal stem cells

ZHENG Li-kun¹, ZHANG Lei², CHEN Nai-yao³, WU Shou-ling⁴, ZHAO Hui^{3,5*}

(1. North China Coal Medical College; 2. Dept. of Orthopedics, Kailuan Hospital Affiliated; 3. Dept. of Hematology;
4. Dept. of Cardiology, Kailuan Hospital Affiliated, Tangshan 063000; 5. Biopharmaceutical Laboratory, School of Chemical
Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300000, China)

Abstract: Mesenchymal stem cell is a kind of multipotent hematopoietic stem cell. In the case of acute lung injury, it can differentiate into Type I and Type II epithelial cell, and to repair impaired tissues. In addition, mesenchymal stem cells have benefit effects in the treatment of lung injury by reducing proinflammatory factors IL-1, MIP-2, INF- γ , TNF- α , increasing antiinflammatory factors IL-10, IL-1ra, IL-13 and alleviating inflammatory response to the acute lung injury.

Key words: acute lung injury; mesenchymal stem cells

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是重症患者发生急性呼吸衰竭的主要原因。由于缺乏有效的治疗措施, 迄今其死亡率仍高于 40%^[1]。随着人们对骨髓来源的干/祖细胞认识的不断加深, 证实这种细胞有望成为一种治疗手段, 并用于那些没有治疗措施或是治疗措施有限的疾病上^[2-3]。过去的研究证实了骨髓来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)^[4]能够植入损伤肺部, 进一步分化为肺上皮细胞^[5]。最近在肺损伤模型中发现 MSCs 能够

通过减少促炎症细胞因子、升高抗炎症细胞因子、减轻肺水肿等介导炎症反应, 从而对 ALI 起到了一定的治疗作用^[6-9]。本文拟就 MSCs 介导 ALI 的炎症反应做一综述。

1 间充质干细胞(MSC)

1.1 间充质干细胞的鉴定

MSCs 是一类多能干细胞, 可以分化成多种细胞类型, 植入肺脏后能分化为 I 和 II 型上皮细胞、内皮

细胞和成纤维细胞^[7,10]。临床上限制 MSCs 使用的一个原因就是目前尚缺乏特异性的细胞表面标志对这些细胞进行分离和鉴定。既往有人采用了骨髓培养分离贴壁细胞和免疫去除法纯化 MSCs,最近更多的采用了从小鼠脂肪组织中分离 MSCs,对获得的贴壁细胞进行扩增。研究证实,20~25 代的 MSCs 仍然保持着分化为成骨细胞、脂肪细胞和肌纤维母细胞的能力^[8]。要想得到更纯化的 MSCs 用于临床研究,还需要更多特异性的 MSCs 表面标志的发现。

1.2 间充质干细胞的功能

研究证实, MSCs 有免疫调节特性^[11-12],能抑制树突状细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和自然杀伤细胞的活性^[13-14],减少炎症细胞因子的分泌。另一方面因为它们缺乏 MHC II 抗原的表达,所以在同种移植术中能诱导出耐受表型^[15]。另有研究发现, MSCs 能使 Th1 细胞反应转变成 Th2 细胞反应^[15-16],来下调 T 细胞的反应。

在早期的临床实验中均已证实同种异体 MSCs 表现出了很好的耐受性,在移植到无关受者体内后,没有诱导出免疫反应^[17]。后来有人将 MSCs 注射到肺损伤的小鼠体内,观察到在损伤后的主气道和小气道中有供者来源的细胞灶^[7],这说明了 MSCs 能够植入损伤肺部并参与受损气道上皮的修复。

最近的研究证实, MSCs 的这种作用是一种拟药理学的效应,表现暂时性的释放抗炎因子,刺激了内源性的修复,而不是移植植入物的再生修复损伤组织。

2 急性肺损伤(ALI)病理

ALI 以肺泡毛细血管壁的破裂为其病理特征,随着肺泡中蛋白质渗出,引发肺水肿,最终气体交换障碍,发生呼吸衰竭^[18]。这种疾病的组织学特征是肺部严重的急性炎症反应和中性粒细胞肺泡炎,这是中性粒细胞通过 TLR4 诱导炎症细胞因子和趋化因子的表达、上调白细胞黏附分子来激活内皮细胞完成的^[19-20]。

3 间充质干细胞和急性肺损伤

3.1 间充质干细胞用于治疗急性肺损伤的给药途径

通过静脉、气管或是直接注射外源性的干/祖细

胞进入人体的肺组织。肺泡毛细血管床完全是通过右心搏出量来供血的,它可以滤除大的或是失去弹性、不能变形的细胞,对于正常的红细胞和白细胞没有这种作用。因此从静脉途径注入 MSCs 后,大部分可以富集在肺脏。气管内直接给药的方式^[8],可使 MSCs 更好的在受损肺脏发挥作用。受损局部直接给药的优越性在实验室和临床心肌梗死的治疗实践也得到了证实^[21]。

3.2 间充质干细胞在急性肺损伤组织中的植入

没有肺损伤时,只有很少数量的 MSCs 渗出到肺实质,并最终整合到肺细胞系。肺损伤时,这种整合也低于肺细胞总数的 10%。有人对天然小鼠和脂多糖(LPS)诱发小鼠进行了比较^[6],在 LPS 诱发后的 15 min,小鼠肺脏切片中有 MSCs。第 3 天仍能探测到这些细胞,但数量减少了。另外对 MSCs 在肺脏的定植进行了定量分析,结果大约 47% 的 MSCs 定植在 LPS 诱发小鼠的肺脏,而天然小鼠中约 38%。无论有无肺损伤,在 MSCs 注入后的 3 d 内,大多数的 MSCs 从肺中消失,只有 <8% 的 MSCs 保留在肺脏。另有报道用 MSCs 和 PBS 治疗内毒素诱导的小鼠^[10],观察到 MSCs 分散在 MSCs 治疗的小鼠肺组织中,然而在 24 和 48 h 后移植植入物均小于植入时的 5%,用 PBS 治疗的小鼠没有 MSCs。综合以上的数据,支持 MSCs 对肺损伤的保护并不依赖于它植入肺脏的能力^[6],这样的结果和骨髓来源的 MSCs 治疗心肌梗死的报告一致^[22-23]。然而,也有研究报道了有大量的 MSCs 滞留在损伤肺中^[24],或者说是炎症提高了 MSCs 的定植数量^[25]。

3.3 间充质干细胞调节急性肺损伤的炎症反应

3.3.1 调节细胞因子:由于 MSCs 具有免疫调节活性,能下调促炎症反应^[5,13,14,26],因此有人对 MSCs 能否调节 ALI 的炎症进行了研究。用 MSCs 治疗内毒素诱导的 ALI, MSCs 治疗组支气管肺泡灌洗液和血浆中 MIP-2 的水平显著降低,支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 也显示出了减少的趋势。用成纤维细胞和无活性的 MSCs 代替 MSCs 并没有减轻内毒素诱导的促炎症反应,支气管肺泡灌洗液和血浆中的 MIP-2 和 TNF- α 的水平没有变化。IL-10 是主要的抗炎细胞因子, MSCs 治疗后 8 h 的支气管肺泡灌洗液和血浆中 IL-10 的水平显著升高,并且血浆中的高水平能够持续到治疗后的 24 h,这点和最近报

道的 APCs 提高了 MSCs 治疗后 IL-10 的水平是一致的^[27]。此外用凋亡的 MSCs^[10] 治疗后,支气管肺泡灌洗液及血浆中 IL-10 的水平没有显著升高。这项发现提示, MSCs 治疗作用的机制可能是 IL-10 在肺脏炎症反应中的预防作用^[28]。除了 IL-10 外, MSCs 也上调了其他抗炎症细胞因子,包括 IL-1ra、IL-13。在 MSCs 治疗后,支气管肺泡灌洗液中 IL-1ra 水平和血浆 IL-13 的水平是升高的。MSCs 分泌的脂质调节剂 PGE2 有抗炎的特性,然而其含量在 MSC 治疗组和 PBS 治疗组中没有区别^[10]。

除了 MSCs 调节外周炎症细胞因子外,最近有人提出了鼠和人的 MSCs 亚群都能分泌高水平的白细胞介素 1 受体拮抗成分 (IL1RN),从而调节了炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-1^[9]。IL1RN 功能是作为 IL1- α 和 IL1- β 竞争抑制物。IL-1 能促发肺部的急性肺泡渗出和中性粒细胞炎症。体内外的实验数据表明,通过人 MSCs 产生的 IL1RN 减轻了博来霉素诱导的小鼠肺损伤,这个过程是通过阻断 IL-1 和 TNF- α 的产生和/或阻断 IL-1 和 TNF- α 的活性实现的。为了确定是否 MSCs 的 IL1RN 表达具有生物活性,还分析了它抑制依赖 IL-1 α 增殖的辅助性 T 淋巴细胞系 D10. G4. 1 的能力。最初说明了重组 IL1RN 蛋白以剂量依赖的方式抑制 IL-1 α 诱导的 D10. G4. 1 细胞的增殖,并且 IL1RN 的这种活性能够用抗 IL1RN 抗体阻断,随后揭示 MSCs 的条件培养基能够显著的抑制 IL-1 α 刺激 D10. G4. 1 细胞增殖的作用,这种抑制作用和它含的 IL1RN 的剂量是相关的,并且这个剂量和上述实验中加入的重组 IL1RN 的量是相符的。此外,在 MSCs 的条件培养基中加入中和性的抗 IL1RN 抗体,能够阻断它抑制 IL-1 α 诱导细胞增殖的作用。结合这些数据说明, IL1RN 是 IL-1 α 主要的拮抗剂,是由 MSCs 分泌的。在另一组实验中发现, MSCs 的条件培养基也可以抑制 RAW-264. 7 巨噬细胞分泌 TNF- α ,得出 MSCs 作用于巨噬细胞并不依赖于细胞间的直接接触,这一点也支持了 MSCs 可能是通过分泌某种物质而影响巨噬细胞的功能。因为巨噬细胞的激活能够促进炎症反应的发生,因此提出 MSCs 抑制损伤肺脏局部炎症反应的另一个可能机制。综合多个研究结果可以看出, MSCs 能够在急性肺损伤时下调促炎症细胞因子例如 IL-1、MIP-2、INF- γ 和 TNF- α ,同时上调抗

炎症细胞因子例如 IL-10、IL-1ra 和 IL-13^[6,8-9]。

3.3.2 调节炎症细胞:中性粒细胞通过产生毒素活性氧和细胞因子介导肺实质的损伤,并通过分泌蛋白水解酶改变了肺的结构。ALI 的组织学肯定了中性粒细胞炎症反应的存在。为了研究是否 MSCs 能减少 ALI 肺组织中的中性粒细胞数,对 MSCs 和 PBS 治疗组进行了比较,结果中性粒细胞总数、中性粒细胞绝对值和 MPO 的活性在两组中没有区别。这说明了 MSCs 的保护功能并不依赖于减少受损肺中的中性粒细胞数。

但是有人却得出了相反的结果^[6],对 LPS/生理盐水组和 LPS/MSC 组的支气管肺泡灌洗液中炎症细胞的总数进行了比较,在 LPS 诱导后的第 3 天,前一组中的炎症细胞总数升高了将近 20 倍,主要是中性粒细胞的升高(占细胞总数的 80%),而 MSCs 治疗组,支气管肺泡灌洗液中的中性粒细胞数和细胞总数明显减少^[6]。

3.3.3 减少渗出:ALI 病理中的另一个特点就是肺泡腔内蛋白质的渗出以及肺水肿,体外 LPS 诱导肺损伤的切片组织学鉴定也显示出了渗出性水肿的特点,然而 MSCs 治疗后肺渗出和肺水肿的范围显著减少了。有人对比了天然小鼠和 LPS 诱导小鼠,在 LPS 诱导后第 3 天,支气管肺泡灌洗液中血管渗漏的蛋白参数显著升高, MSCs 治疗后能减少这些蛋白的水平^[6]。血管形成蛋白 1 转染 MSCs 后可以完全逆转肺水肿,这种以细胞为载体的基因转染治疗方法有待进一步研究。

4 展望

ALI 以其高发病率、高死亡率和治疗方法的匮乏一直备受人们关注。近年来随着对间充质干细胞认识的不断深入,认识到 MSCs 能定向分化为肺泡上皮细胞,从而实现对急性肺损伤的治疗。最近的研究证实了它还能调节炎症反应,具体表现在能够提高抗炎症反应细胞因子,下调促炎症反应细胞因子。

但是目前的研究还有很大的局限性。首先,急性肺损伤模型不能充分再现急性肺损伤的复杂临床过程,而且 MSCs 的治疗基本是在肺损伤后的 0.5 h ~ 4 h,在更晚时间点进行介入治疗还没有进一步的研究。其次,需要进一步研究在同样的或是其他的

急性肺损伤模型中,是否高水平的 MSCs 能够提供更好的治疗效果。第三, MSCs 也可以潜在的利于成纤维细胞的发育,虽然这种作用不显著,但是仍然需要对此功能做进一步的研究,以确保它们能起到有益的治疗作用。

另一方面,表达 IL1RN 的 MSCs 提供给我们一个崭新的细胞载体,但是这种细胞的确切分离方法

还不是很清楚。除了对 MSCs 自身的研究,现在也有人进行了以细胞为基础的基因转染^[9],虽然这种方法能够克服直接基因治疗的一些缺陷,并且可以有选择性和持久性的表达基因^[29-30],但是这些基因转染的研究均是在肺损伤之前完成的,对于损伤这种治疗是否能起到相同的效果仍不明确。

参考文献:

- [1] Mutlu GM, Budinger GR. Incidence and outcomes of acute lung injury [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(4):416 - 417.
- [2] Stripp BR, Shapiro SD. Stem cells in lung disease, repair, and the potential for therapeutic interventions: State-of-the-art and future challenges [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34(5):517 - 518
- [3] Minguell JJ, Erices A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2006, 231(1):39 - 49.
- [4] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4):315 - 317
- [5] 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.
- [6] Mei SH, McCarter SD, 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.
- [7] Serikov VB, Popov B, Mikhailov VM, *et al.* Evidence of temporary airway epithelial repopulation and rare clonal formation by BM-derived cells following naphthalene injury in mice[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2007, 290(9):1033 - 1045.
- [8] Gupta N, Su X, Popov B, *et al.* Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice [J]. *J Immunol*, 2007, 179(3):1855 - 1863.
- [9] Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and anti-fibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(26):11002 - 11007.
- [10] Krause DS, Theise ND, Collector MI, *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell [J]. *Cell*, 2001, 105(3):369 - 377.
- [11] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, *et al.* Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions [J]. *Blood*, 2006, 107(1):367 - 372.
- [12] Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, *et al.* Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 6(4):435 - 441.
- [13] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease [J]. *Nat Rev Immuno*, 2008, 8:726 - 736
- [14] Ren Guang-wen, Zhang Liying, Zhao Xin, *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.
- [15] Batten P, Sarathchandra P, Antoniwi JW, *et al.* Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(8):2263 - 2273.
- [16] Maccario R, Podestà M, Moretta A, *et al.* Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype [J]. *Haematologica*, 2005, 90(4):516 - 525.
- [17] Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, *et al.* Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2005, 2:8.

- [18] Guidot DM, Folkesson HG, Jain L, *et al.* Integrating acute lung injury and regulation of alveolar fluid clearance [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 291(3):L301–306.
- [19] Altemeier WA, Matute-Bello G, Gharib SA, *et al.* Modulation of lipopolysaccharide-induced gene transcription and promotion of lung injury by mechanical ventilation [J]. *J Immunol*, 2005, 175(5):3369–3376.
- [20] Gharib SA, Liles WC, Matute-Bello G, *et al.* Computational identification of key biological modules and transcription factors in acute lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(6):653–658.
- [21] Li TS, Hayashi M, Ito H, *et al.* Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor-beta-preprogrammed bone marrow stem cells [J]. *Circulation*, 2005, 111(19):2438–2445.
- [22] van Laake LW, Hassink R, Doevendans PA, *et al.* Heart repair and stem cells[J]. *J Physiol*, 2006, 577(Pt 2):467–478.
- [23] Fukuda K, Yuasa S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2006, 98(8):1002–1013
- [24] Herzog EL, Van Arnam J, Hu B, *et al.* Threshold of lung injury required for the appearance of marrow-derived lung epithelia [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(8):1986–1992.
- [25] 田兆方,杜江,王斌,等. 大鼠骨髓来源 MSCs 对新生大鼠高氧肺损伤的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(11):1692–1695.
- [26] Williams TJ, Wilson JW. Challenges in pulmonary fibrosis: 7-Novel therapies and lung transplantation [J]. *Thorax*, 2008, 63(3):277–284.
- [27] Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, *et al.* Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness [J]. *Blood*, 2005, 105(5):2214–2219.
- [28] Spight D, Zhao B, Haas M, *et al.* Immunoregulatory effects of regulated, lung-targeted expression of IL-10 *in vivo* [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(2):L251–265.
- [29] Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, *et al.* Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease[J]. *Circ Res*, 2005, 96(4):442–450.
- [30] Kugathasan L, Dutly AE, Zhao YD, *et al.* Role of angiotensin-II in experimental and human pulmonary arterial hypertension [J]. *Chest*, 2005, 128(6 Suppl):633S–642S.

子宫颈癌疫苗接种的疑虑

据美国 BIOCOMPARE 科技新闻网(2009/2/6)报道,最近几个月来,在女性子宫颈癌的防治工作上,最受瞩目的就是防治子宫颈癌的人类乳头瘤状病毒(HPV)疫苗问世,而且该疫苗的公司进行了广泛推广接种的商业行为。不过美国耶鲁大学的科学家提出了一些不同看法,认为该疫苗的问世虽然是一件好事,但就家长的角度来说,并不会觉得这一个疫苗一定要接种,因为年纪轻的少女很可能会因为接种疫苗后更不在乎性行为的发生,从而导致青少年男女之间更多滥交事件的发生。

美国食品及药物管理局建议,11~12岁的年轻女性必须接受 HPV 疫苗的接种,而 13~26 岁的女性也可以考虑接种疫苗。据相关的数据了解,妇女因为感染 HPV 而最后发展为子宫颈癌的机会非常大,仅美国地区 2007 年就有超过 11 000 位被确诊为恶性子宫颈癌的患者,而其中很大比例患者的发病原因与 HPV 病毒的感染有关。

这项由耶鲁大学 Sanjay Basu 博士所主持的研究计划,为进一步了解 HPV 疫苗上市后的影响而特别设计了一个数学模型,在这个模型中,将受访者的教育程度、疫苗的费用以及其他可能产生影响的很多因素列入防治子宫颈癌的成效因素,结果发现,除了 3 剂疫苗注射的费用可能影响疫苗接种的意愿外,接受疫苗接种者的心态也会影响最后防止癌症发生的成果。

因此,参与此次研究的学者认为,为了公众健康的考虑,疫苗开发生产的公司除了推广疫苗的接种外,还要加强相关的卫生教育,以达到防治疾病的目的。