

间充质干细胞用于慢性创面治疗的作用途径及其相关机制

谢江帆^{1,2} 杨思明¹ 尚 涛¹ 马 奎¹ 姚 斌¹ 黄 沙¹ 付小兵¹

(1. 解放军总医院第一附属医院全军创伤修复与组织再生重点实验室暨皮肤损伤修复与组织再生北京市重点实验室, 北京 100048; 2. 天津医科大学研究生院, 天津 300070)

间充质干细胞(MSCs)是一类存在于大多数成体器官中的类成纤维细胞群,在特定条件下能够向不同的谱系细胞分化。Falanga等^[1]将MSCs与造血细胞共同培养,发现MSCs可以促进造血干细胞的增殖,提示MSCs具有分泌生物活性因子并调节其他细胞功能的能力。MSCs在进入创面或是其他损伤组织时会被激活,起到促进创伤愈合和改善局部缺血的作用。目前MSCs作用于创面的机制尚未完全清楚,但MSCs在调节免疫应答和免疫排斥反应方面的功能,以及在促进创面愈合和减少瘢痕形成等方面的重要作用均已得到证实。本文就MSCs治疗皮肤慢性难愈性创面的常用方法及其在细胞及分子水平上可能涉及的作用机制综述如下。

1 MSCs 的特征

鉴定MSCs的首要标准是用培养皿培养时细胞能够贴壁,并表达细胞表面标志物CD105、CD37和CD90,但不表达CD45、CD34、CD14、CD11b、CD79a和CD19^[2],也不表达主要组织相容性标记物。目前大量的研究表明存在于创伤组织中的MSCs能够通过旁分泌作用分泌生物活性因子^[3-4],且具有与其他种类细胞相互作用的能力。

MSCs存在异质性,因此难以对其表型进行定义^[5]。这些异质性可能存在于单一解剖部位来源的细胞,也可能存在于不同解剖部位来源的细胞之间。如,目前用于研究的MSCs主要有来源于骨髓的骨髓间充质干细胞(BMSCs)和来源于脂肪组织的脂肪间充质干细胞(AMSCs),二者表型不同,但基本特征相同,比如多向分化能力以及旁分泌功能等^[6]。

2 MSCs 治疗创面的方法及作用

利用MSCs治疗创伤和局部缺血性损伤的方法目前有两种,一种是全身应用,即采用静脉输注方式,通过全身循环系统将MSCs输送到目标部位^[7];另一种是局部应用,通过直接涂布或局部注射的方法,将细胞作用于创面^[1]。这两种方式均存在如何保证移植后的细胞具有一定的活性和数量,使其能够充分发挥治疗作用的问题。细胞通过静脉循环系统到达损伤器官,如利用脐带间充质干细胞对创伤后急性肺损伤和肾脏损伤进行治疗^[3-4],可消除MSCs的其他影响,但可能会使其到达目标部位的时间延长并降低到达靶部位的细胞数量^[2]。直接涂布或局部注射的方法可使MSCs直接作用于创面,但这种方式需要伤口暴露才能完成。皮肤创面正符合这一要求,因此MSCs用于慢性难愈性创面的治疗往往采用直

接涂布或局部注射的方法,具体方式主要有以下3种。

2.1 MSCs直接注射于创面周围 Stoff等^[8]提取人类MSCs并将其立即注入家兔皮肤的创面附近,14 d后发现这些细胞融入注射部位并与创伤表皮边缘的细胞相互作用,21 d后MSCs到达创面和筋膜间的边缘,表明MSCs具有通过结缔组织并迁移的能力。且该实验中的家兔均未给予免疫活性抑制药物,都具有免疫活性,注入人类MSCs后未发生排斥反应。经过MSCs治疗的创面皮肤张力可恢复到原来的52%,未经MSCs治疗的创面皮肤张力只能达到正常皮肤张力的31%,这与MSCs可使胶原纤维沉积物有序排列的功能相吻合^[5]。

2.2 将MSCs加入到纤维蛋白喷雾剂中 Falanga等^[1]将患有遗传型糖尿病小鼠尾部皮肤的创面切除,将自体MSCs加入到纤维蛋白喷雾剂中直接喷涂于创面,以提高作用于创面的细胞浓度,然后观察用自体MSCs治疗和未经MSCs治疗创面的修复情况。结果显示,大部分MSCs在进入创面后21 d脱离创面,少数孤立的细胞依然存在于创面并与周围血管相互作用;用MSCs治疗过的创面比未用MSCs治疗的创面在愈合和发展成熟组织的速度和能力方面均有所提高。

2.3 MSCs与皮肤替代物相结合作用于创面 Nambu等^[9]用胶原蛋白基质与自体AMSCs混合后作用于糖尿病小鼠的创面,发现其可以促进早期肉芽组织的形成和表皮的再生。MSCs是类成纤维细胞,它们能够独自或结合表皮细胞来构建人工皮肤。利用MSCs构建的皮肤模型移植到创面后被证明有促进血管生成的功能^[5,10]。

Hanson等^[11]总结了MSCs用于小规模临床研究中的一些作用方式,包括直接注入创面、用局部的纤维蛋白喷雾包裹或渗入胶原海绵等^[1]。这些研究均表明MSCs可以改善伤口愈合。然而,由于作用方式的不同,很难精确评估MSCs作用于创伤部位时在细胞及分子水平的作用机制。

3 MSCs 的作用机制

目前发现,MSCs促进创面愈合的基本机制主要有3种:一是通过旁分泌途径与创面细胞相互作用;二是与循环系统的相互作用;三则是通过调节免疫排斥反应来发挥其效能。

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2012CB518105);国家自然科学基金委员会创新研究群体科学基金(81121004)

通讯作者:付小兵,研究员,中国工程院院士(E-mail: fuxiaobing@vip.sina.com)

其中 MSCs 通过旁分泌途径与创面细胞相互作用占主导地位,它通过与创面细胞的相互作用,浸润组织以发挥其重要作用^[10,12]。MSCs 在创面愈合过程中存在的时间长短不一。Falanga 等^[1]发现局部应用的大多数 MSCs 在 25 d 后便脱离了创伤组织;相反,将 MSCs 注入心包部位则可存在长至 1 年^[13]。这种存在时间的多变性主要由组织类型、创面类型、细胞标记方法和 MSCs 异质性的水平共同决定^[5]。

3.1 MSCs 的旁分泌作用 MSCs 修复复合性损伤时可以通过旁分泌作用分泌多种生物活性因子来完成^[14]。但旁分泌作用需要细胞与细胞直接接触,因此需要将 MSCs 直接植入创伤部位。Smith 等^[15]发现人 MSCs 与成纤维细胞共培养时会影响其增殖效率、移行速度以及基因表达序列,表明 MSCs 可通过旁分泌作用影响成纤维细胞,改善创伤部位结构性胶原蛋白的生成、累积和组建,以促进创面愈合并减少瘢痕形成。所以,更好地了解如何调节 MSCs 与成纤维细胞共培养时胶原的形成和它们之间的新陈代谢非常重要。

3.2 MSCs 与循环系统的相互作用 在创伤修复中, MSCs 另一个重要的作用机制就是和循环系统的相互作用关系。肉芽组织的形成在早期愈合过程中非常重要, MSCs 的一个作用就是在创面早期愈合过程中诱导肉芽组织的形成,并促进新生血管网的稳定^[16]。BMSCs 和 AMSCs 均起源于各自器官的血管周围,新分离出来的 BMSCs 和 AMSCs 均显示出外周细胞的特征和功能^[17]。外膜细胞的养分供给来自于微循环系统,它们局部围绕着微血管网建立起 N-钙粘连蛋白黏附点并结合于微血管内皮细胞血管,表现出介于成纤维细胞与表皮细胞之间的表型特性。新生血管系统通过释放炎症趋化因子、血小板源性生长因子-BB(PDGF-BB)来吸引外周细胞,这种相互作用可能为 MSCs 在创伤组织中的迁移提供了动力,同时,外周细胞可以释放 angiopoietin-1 与内皮细胞上的 Tie-2 受体结合从而稳定新生的管状结构。因此, MSCs 在创面愈合的早期主要起到诱导肉芽组织生成和促进新生血管网稳定的作用。

将人脐带血内皮细胞和 MSCs 混合注入无胸腺小鼠皮下组织或颅内可以形成血管结构,并表达外周细胞特异性蛋白,说明 MSCs 具有促血管生成及稳定血管网络的作用^[9]。体内研究显示, MSCs 在 PDGF-BB 的趋化作用下促血管生成及稳定的作用更强。体外共培养实验研究时也发现 MSCs 可以通过与人脐带血内皮细胞的相互作用来促进血管的形成,并在内皮细胞血管上起到与外周细胞相同的作用^[18]。以上研究结果均表明 MSCs 主要通过是在创伤部位诱导早期肉芽组织的形成和稳定新生血管系统来发挥其治疗功能。

3.3 MSCs 调节免疫排斥反应 MSCs 通过免疫调节等多方面复杂的步骤促进创面修复。MSCs 的免疫调控作用需要由其他因子如 TNF- α 、IL-1 和干扰素- γ 共同作用使其活化,促进其释放可溶性正调节因子比如吡啶胺 2-3 双加氧酶、IL-10 和前列腺素 E₂, 通过一定的相互作用刺激 MSCs 释放生物活性因子来抑制 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的分裂增殖,从而降低免疫排斥反应的发生。上述作用可使 MSCs 具有一定的治疗潜能,相关研究已经开始^[2]。

研究 MSCs 的免疫调控功能对临床应用 MSCs 治疗慢性难愈性创面十分重要。MSCs 既可以增强同种异体细胞应用于创面组织修复时的免疫耐受,又可以通过调节免疫排斥反应减缓或抑制创伤修复时的多种炎症反应。

4 MSCs 注入创伤部位后的转归

目前,对于治疗创伤的 MSCs 的最后转归并没有确切的结论。Falanga 等^[1]发现几乎所有局部作用于小鼠皮肤创面的 MSCs 在创面完全愈合之前或更早就已经脱离创面部位。然而, Yamaguchi 等^[19]发现局部作用于兔子创面皮肤或筋膜上的 MSCs 最后将分化为成纤维细胞。MSCs 最后分化为成纤维细胞很难得到验证,因为这两种形态的细胞具有同一种细胞表面标志物。近期研究显示,运用结缔组织生长因子处理 MSCs, 克隆 MSCs 的亚型虽然具有成纤维细胞的特性,但只有被 TNF- β 1 处理后才能表达平滑肌肌动蛋白- α (SMA- α)。大部分研究中,对 MSCs 的长远命运评估如果不依赖非侵袭性细胞技术是很困难的。将人类 MSCs 注入心肌梗死模型小鼠体内后 MSCs 可滞留于创伤部位至第 52 周,注射的细胞用荧光免疫标记并结合生物发光素,可以用正电子发射断层和磁共振来追踪细胞的位置,但这些细胞最终并不能分化成心肌细胞^[13]。评估 MSCs 作为治疗细胞的转归和效能在未来的研究中非常重要,可使我们更好地了解这些细胞在创伤修复过程中的功能,掌握其发挥效能的最佳方式。

5 结 语

目前已有充分的证据支持 MSCs 能够促进创面的修复或改善局部慢性缺血。但大部分研究都属于现象学研究,仍有许多未知问题有待进一步探索。比如:将 MSCs 作用于靶部位的最有效方式是什么? 这些细胞在促进创面的修复时的主要作用机制是什么? 创伤愈合后这些细胞的转归如何? 这些基础问题的阐明将为细胞治疗的临床运用产生巨大的推动作用。同时,找出 MSCs 作用于创面的最佳时间和最佳途径也是相关研究亟待解决的问题,可以在最大程度上使其发挥治疗潜能。另外,细胞治疗的长期安全性以及是否会有不良反应的产生等问题也有待进一步探索,这些问题的答案对于 MSCs 的未来临床之路都至关重要。

参 考 文 献

- [1] Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, Shrayder D, Carson P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds[J]. Tissue Eng, 2007, 13: 1299-1312.
- [2] Karp JM, Teo GSL. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the Details[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4: 206-216.
- [3] 鲁刚, 马奎, 付小兵. 脐带间充质干细胞对创伤后早期急性肺损伤作用的研究[J]. 感染、炎症、修复, 2013, 14(1): 3-6.
- [4] 鲁刚, 马奎, 黄沙, 孙同柱, 付小兵. 脐带间充质干细胞对重度烧伤大鼠肾脏保护作用的研究[J]. 感染、炎症、修复, 2012,

- 13(1):10-12.
- [5] Lee CH, Shah B, Moiola EK, Mao JJ. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model [J]. J Clin Invest, 2010, 120: 3340-3349.
- [6] Hong SJ, Traktuev D, March KL. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2010, 15: 86-91.
- [7] Hamou C, Callaghan MJ, Thangarajah H, Chang E, Chang EI, Grogan RH, Paterno J, Vial IN, Jazayeri L, Gurtner GC. Mesenchymal stem cells can participate in ischemic neovascularization[J]. Plast Reconstr Surg, 2009, 123: 45S-55S.
- [8] Stoff NS, Moore ST, Numnum M, Espinosa-de-los-Monteros A, Richter DF, Siegal GP, Chow LT, Feldman D, Vasconez LO, Mathis JM, Stoff A, Rivera A, Banerjee A, Stoff-Khalili MA, Curiel DT. Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation [J]. Exp Dermatol, 2009, 18: 362-369.
- [9] Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, Mizuno H, Yanagibayashi S, Yamamoto N, Azuma R, Nakamura S-I, Kiyosawa T, Ishihara M, Kanatani Y. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix [J]. Ann Plast Surg, 2009, 62: 317-321.
- [10] 雷永红, 付小兵, 袁方, 蔡斌, 孙同柱. 骨髓 MSCs 促进“创面”愈合的实验研究 [J]. 感染、炎症、修复, 2008, 9(2): 72-76.
- [11] Hanson SE, Bentz ML, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds [J]. Plast Reconstr Surg, 2010, 125: 510-516.
- [12] 周锐华, 鄢文海. MSCs 及创面修复的研究进展 [J]. 感染、炎症、修复, 2005, 6(3): 183-185.
- [13] Wang J, Zhang S, Rabinovich B, Bidant L, Soghomonyan S, Alauddin MM, Bankson JA, Shpall E, Willerson JT, Gelovani JG, Yeh TH. Human CD34⁺ cells in experimental myocardial infarction: long-term survival, sustained functional improvement, and mechanism of action [J]. Circ Res, 2010, 106: 1904-1911.
- [14] Da Silva Meirelles L, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20: 419-427.
- [15] Smith AN, Willis E, Chan VT, Muffley LA, Isik FF, Gibran NS, Mocking AM. Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury [J]. Exp Cell Res, 2010, 316: 48-54.
- [16] Egaña JT, Fierro FA, Krüger S, Bornhäuser M, Huss R, Lavandero S, Machens HG. Use of human mesenchymal cells to improve vascularization in a mouse model for scaffold-based dermal regeneration [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15: 1191-1200.
- [17] Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanevaiah AR, Saadatzaheh MR, Murphy M, Johnstone BH, Ingram DA, March KL. Robust functional vascular network formation *in vivo* by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells [J]. Circ Res, 2009, 104: 1410-1420.
- [18] Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Influence of adult mesenchymal stem cells on *in vitro* vascular formation [J]. Tissue Eng Part A, 2009, 15: 1751-1761.
- [19] Yamaguchi Y, Kubo T, Murakami T, Takahashi M, Hakamata Y, Kobayashi E, Yoshida S, Hosokawa K, Yoshikawa K, Itami S. Bone marrow cells differentiate into wound myofibroblasts and accelerate the healing of wounds with exposed bones when combined with an occlusive dressing [J]. Br J Dermatol, 2005, 152: 616-622.

(收稿日期: 2014-09-14)