

间充质干细胞及其在临床中的应用

张星星 邓常文 屈玉兰 白 冲

摘 要 间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是一类中胚层来源的干细胞,具有强大的免疫调节能力的同时无明显的不良反应而日益成为研究的热点。全身或局部器官的免疫失调是临床上众多疾病的发病机制, MSC 的出现为对激素抵抗或无法耐受免疫抑制剂的患者带来了新的希望。

关键词 间充质干细胞 免疫调节能力 临床应用

中图分类号 R593

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.10.003

由于大多数免疫性疾病的发病机制仍不清楚,临床治疗仍常以激素和免疫抑制剂为主,而对激素耐药或免疫抑制剂无法耐受很常见,如何更好地治疗这些疾病,已成为临床亟需解决的问题。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是骨髓中一类非造血干细胞,可以自我更新或分化为骨、软骨或脂肪组织等多种细胞。MSC 在骨髓中生成基质层,是造血微环境的组成部分,起着支持造血祖细胞造血的功能。除了最常用的骨髓来源, MSC 还可以从胎盘、脂肪组织、脐带血及肝中获得。自从发现它可以抑制 T 细胞的免疫反应之后,再加上容易分离、体外易扩增且不丢失干细胞潜能等特性, MSC 在临床上的应用逐渐引起关注,有望成为治愈临床免疫性疾病的新方法。本文主要讨论 MSC 的免疫学特性及在各种疾病治疗中的研究进展。

一、MSC 的治疗机制

1. MSC 的迁移:在未受干预的动物体内,骨髓是 MSC 优先归巢的器官,但在有炎症的动物体内,通过血管注射的 MSC 会优先归巢至炎症存在的部位^[1-3]。MSC 表面虽然缺乏人 P-选择素糖蛋白配体 1,但是仍然可以通过与 P-选择素的互动实现在内皮上的滚动而 MSC 表面表达的 CD44 和极迟反应抗原 4 通过血管细胞黏附分子-1 黏附在血管内皮上;一旦 MSC 成功黏附在血管内皮上,则通过包括结合黏附分子、钙黏素和血小板-内皮细胞黏附分子等一系列复杂的相互作用,使细胞渗出血管进入骨髓间质的细胞外基质,然后经 $\alpha 1$ 整合素和 CD44,黏附在

透明质酸、层粘连蛋白、胶原蛋白和纤连蛋白等细胞外基质的组成部分上。迁移的方向主要是由趋化分子的浓度梯度决定的。

2. MSC 的免疫抑制作用:由于 MSC 具有免疫抑制的特点,注射 MSC 已经被用在多种临床试验中,来治疗移植物抗宿主病及多种自身免疫性疾病。

(1) MSC 对固有免疫的影响: MSC 表面表达的因子 H 和其他多种补体调节蛋白,使 MSC 能免受机体介导的急性和超急性排斥反应的攻击,但是 MSC 仍可以被补体小片段如补体 C3a 和 C5a 等招募到组织受损区域发挥作用^[4]。1) MSC 与中性粒细胞: MSC 可以削弱中性粒细胞的呼吸爆发,还可以通过 IL-6 依赖方式延迟静息、激活中性粒细胞的凋亡,以达到延长中性粒细胞寿命的目的, MSC 对中性粒细胞的保护功能对于含有大量具有功能的成熟中性粒细胞器官,比如骨髓、肺来说可能具有重要的保护作用^[5]。2) MSC 与树突状细胞:树突状细胞(DC)是最重要的抗原递呈细胞,是唯一可以激活初始 T 细胞抗原递呈细胞。人类 MSC 与 DC 共培养后, DC 分泌 TNF- α 下降。此外, MSC 可抑制 DC 的表面 MHC II 类分子和共刺激分子的上调, MSC 还可阻止单核细胞、脐带血细胞和 CD34⁺造血干细胞向 DC 的分化成熟,这表明 MSC 对于不同来源的 DC 的成熟过程有抑制作用^[6-8]。3) MSC 与自然杀伤细胞: MSC 通过下调自然杀伤(NK)细胞表面 NKp30、和 NKG2D 的表达,从而抑制静息期 NK 细胞的细胞毒性^[9]。人类 MSC 和 NK 细胞共培养时, NK 细胞增殖受到抑制, IFN- γ 的分泌显著减少^[9,10]。关于 MSC 在与 NK 细胞共培养时是否易于被 NK 细胞吞噬仍存在争议。

(2) MSC 对适应性免疫的影响: 1) MSC 与 T 细

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81270073)

作者单位:200433 上海 第二军医大学附属长海医院呼吸内科

通讯作者:白冲,电子信箱:bc7878@sohu.com

胞:T 淋巴细胞在受到细胞来源或非特异性的有丝分裂原刺激时细胞产生增殖反应, MSC 可以抑制该增殖过程, 且此过程为可逆的, TGF- β 1 和肝细胞生长因子可能起到重要作用。MSC 可促进 Th1 免疫反应向 Th2 免疫反应转化, 其中绝大部分的体外共培养实验结果均认为 MSC 可以直接抑制 CD3⁺CD4⁺T 细胞增殖以及 Th1 细胞因子(如 IL-2 和 IFN- γ)的分泌。还有学者认为 T 细胞在 MSC 存在的情况下因为 MSC 表面不表达共刺激分子作为第 2 信号而变为免疫无能, 当然这还有待于进一步确定^[11]。有些研究显示 MSC 对具有细胞毒性的 T 细胞有直接抑制作用。在细胞毒性 T 细胞的启动阶段, MSC 可以阻止外来抗原特异性 CD8⁺T 细胞对靶细胞的细胞毒性作用^[12]。2) MSC 抑制 B 细胞: MSC 抑制体外 B 细胞的增殖, 并可以刺激 B 细胞分泌抗体, 诱导 B 细胞多克隆分化和增殖, 且与其间质细胞的支持作用相符^[13]。

3. 组织修复和再生: MSC 有相当的可塑性, 不仅可以分化成中胚层细胞, 还可以分化为外胚层组织(神经细胞)和内胚层组织(肝细胞)。MSC 已经被证实可以提高心肌功能、脑缺血后的脑功能修复肝脏和关节损伤等^[14-16]。因为使用胚胎干细胞会引起很多伦理问题, 所以现在许多临床研究更倾向于使用成体干细胞比如 MSC。

二、影响 MSC 增殖及治疗效果的因素

但因 MSC 在成人组织中数量较少, 需在体外培养达到一定的细胞数量才能起到治疗的作用, 所以首先找到最优的 MSC 体外增殖的方法是非常必要的。目前发现 MSC 捐献者的年龄、性别、接种密度都可能影响细胞的数量、治疗效果。但是不同的文献报道各不相同。

(1) 捐献者年龄和 MSC 增殖: 关于捐献者年龄和 MSC 增殖的关系, 相悖的研究结果和文献都有出现。多数文献报道捐献者年龄和 MSC 增殖速率呈反比关系。其余则认为两者无相关。Khan 在研究两组不同年龄(平均年龄分别为 57 岁和 86 岁)被试的滑膜脂肪垫来源的 MSC 时发现在 MSC 培养的多个时间点, MSC 的增殖差异无统计学意义。这种趋势也在其他许多文献研究中被证实。但是 Baxter 等报道了相对于 0~18 岁的患者, 59~75 岁患者的 MSC 生长能力严重受损, 表现为明显缓慢的生长速度。

(2) 捐献者性别和 MSC 增殖: 关于捐献者性别和 MSC 增殖关系的文献较少, 因为大部分文献的分组同时包括男性和女性来源的 MSC。Faustini 等在研究

脂肪来源的干细胞时发现对于男性来源的干细胞来说, 最有效的消化是用 0.2% 胶原酶孵育 1h, 而对女性来源的干细胞则是过夜消化法更有效。女性捐献者的干细胞增殖数量显著高于男性。而且考虑到干细胞还有雌激素和雄激素受体, 推测 MSC 的增殖很可能存在性别差异。

(3) 接种密度对 MSC 增殖的影响: 尽管有限, 这部分文献仍然认为接种密度影响 MSC 增殖速率。Both 等发现以低密度接种的 MSC 增殖速度更快, 当 MSC 以 100/cm² 密度接种达到目标细胞数的时间比以 5000/cm² 密度接种快 4.1 天。Lode 等也得到了同样的结果, 接种密度最高的细胞生长速率最小, 而接种密度最小的细胞生长速率最高。高接种密度时细胞生长速率降低可能是因为细胞接触抑制。而低接种密度时细胞高速的生长可能是因为小颗粒细胞, 即停滞期的循环干细胞, 该细胞可在指数生长期的对数阶段大量增殖。

三、MSC 的临床应用

1. MSC 在心血管系统的应用: 根据 WHO 研究结果, 心血管疾病是全球首位死亡原因。临床前期的证实 MSC 可以提高啮齿动物和猪心肌梗死后的心脏功能。MSC 优先归巢至梗死的心肌处非常重要。由于心肌梗死, 增加了局部血管通透性, 提高了趋化因子的释放, 上调黏附蛋白的表达, 这些都有助于 MSC 的迁移。因此, MSC 可以通过静脉注射的途径使用, 从而避免了风险更高的输注方式。设有安慰剂对照组的 I 期临床试验研究(Osiris Therapeutics Inc. 网址: www.osiristx.com)结果显示, 来源于与患者人白细胞抗原不匹配的健康人的 MSC, 经静脉注入患有心肌梗死的患者体内, 与对照组相比, MSC 能明显提高心肌梗死患者的心脏射血分数和肺功能, 而且发生心率失常的概率更小。

2. MSC 在移植物抗宿主病中的应用: 移植物抗宿主病(GVHD)是造血干细胞移植和供者淋巴细胞输注后的常见并发症, 近年来对其发病机制的探索已取得很大的进步。GVHD 第 1 线的治疗是肾上腺糖皮质激素, 其对 50%~80% 的患者有效, 疗效取决于起始发病时患者的严重程度。GVHD 二线治疗主要是免疫抑制剂, 使用免疫抑制剂的 1 年生存率约为 30%。而近期的研究发现 MSC 移植可改善 GVHD 患者的生存, 如 MSC 移植可以延长异基因皮肤移植物的存活时间。Weng 进行了 1 项对 19 名因患有血液系统恶性疾病行造血干细胞移植的患者进行了为期

3 年零 5 个月的随访,结果发现 MSC 的治疗可以减少慢性难治性 GVHD 的免疫抑制剂,部分患者甚至可以停用免疫抑制剂。LeBlanc 观察到 MSC 对 1 个骨髓移植后 4 期 GVHD 有治疗作用。MSC 支持移植物的机制尚不清楚,可能和它们在造血微环境中的支持作用相关。MSC 可以改变 DC 作为 GVHD 的中介物的作用。MSC 可以阻止单核细胞和骨髓前体细胞分化为 DC,在 DC 成熟过程中抑制 CD1a、CD40、CD80、CD86 和 HLA - DR 的上调,而 Sbano 等则认为 MSC 仍存在一定免疫原性,其治疗 GVHD 的安全性有待于更多研究的进一步证实^[17,18]。

3. MSC 在系统性红斑狼疮中的应用:MSC 可以逆转系统性红斑狼疮(SLE)小鼠和患者的多器官衰竭或狼疮肾炎,这可能与 MSC 提高了 Treg 细胞的比例有关^[19,20]。也有报道称,在两个有活动性但炎症表现不明显的狼疮患者身上,输注自身 MSC 可以明显提高 Treg 细胞比例却无狼疮症状的缓解^[21]。还有研究者认为 MSC 治疗 SLE 的机制与恢复 Th1/Th2 平衡有关,实验数据表明 MSC 可能通过调节效应 T 细胞分泌 IL - 4 和 IFN - γ 的水平促进 SLE 小鼠中优势的 Th2 体液免疫反应向 Th1 细胞免疫反应方向转变。如 Zhou 等发现向狼疮小鼠腹腔注射骨髓来源的间充质干细胞可以抑制外周血 T 细胞 IL - 4 的分泌、增加 IFN - γ 的分泌。这个理论在 SLE 患者身上也得到了证实,研究证实 MSC 促使免疫反应向 Th1 方向的极化伴随着患者临床症状的缓解^[22]。但是也有实验得到了相反的结果^[23]。这些各有分歧的实验结果表明 MSC 中介的效应和 SLE 免疫发病机制的复杂性,还需要我们进一步研究。

4. MSC 在哮喘中的应用:哮喘是一类多种免疫细胞(嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞等)参与的气道疾病,因此 MSC 作为一种免疫调节性的细胞被多次研究用于治疗哮喘。Nemeth 等^[24]用 MSC 治疗豚鼠草致敏的小鼠哮喘模型发现,在激发阶段在小鼠体内注入 MSC 可以避免小鼠出现哮喘特征性的病理改变包括嗜酸性粒细胞的浸润、肺内过量的黏液分泌、肺泡灌洗液 IL - 4、IL - 5 和 IL - 13 和血清 IgG1、IgE 的升高,究其机制,可能是 IL - 4 和或 IL - 13 激活了 MSC 的 STAT6 通路,导致 TGF - β 的分泌增高,同时还有可能联合 Treg 细胞导致免疫的抑制。在一项对职业性哮喘的研究中,Martínez - González 等^[25]发现,人脂肪来源的 MSC 可以减轻哮喘职业哮喘模型早期的中性粒细胞介导的

炎症反应、IgE 分泌、抑制淋巴细胞浸润而保护肺泡结构、明显抑制肺泡平滑肌细胞的肥大和增生和气道高反应性。

近年来多项研究均表明 MSC 的免疫调节能力在多种疾病中起到治疗作用,是新型的临床治疗手段。但相悖的研究结果也时有出现,而这些不同的研究结果可能跟各不相同的研究对象、试剂和实验条件有关。所以明确 MSC 在人群各种免疫失调性疾病中是否有治愈作用有重要意义。未来的研究重点应是在确保患者安全的前提下尽可能开展多中心临床试验,在确定 MSC 治疗作用的基础上研究其治疗机制。

参考文献

- 1 Bensidhoum M, Chapel A, Francois S, *et al.* Homing of in vitro expanded Stro - 1 - or Stro - 1 + human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment[J]. *Blood*, 2004, 103(9): 3313 - 3319
- 2 Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, *et al.* Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co - infused with hematopoietic cells to treat a radiation - induced multi - organ failure syndrome[J]. *J Gene Med*, 2003, 5(12): 1028 - 1038
- 3 Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, *et al.* Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8407 - 8411
- 4 Schraufstatter IU, DiScipio RG, Zhao M, *et al.* C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation[J]. *J Immunology*, 2009, 182(6): 3827 - 3836
- 5 Raffaghelli L, Bianchi G, Bertolotto M, *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche[J]. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 151 - 162
- 6 Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺ - derived and monocyte - derived dendritic cells[J]. *J Immunology*, 2006, 177(4): 2080 - 2087
- 7 Jiang XX, Zhang YI, Liu B, *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte - derived dendritic cells[J]. *Blood*, 2005, 105(10): 4120 - 4126
- 8 Zhang W, Ge W, Li C, *et al.* Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte - derived dendritic cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13(3): 263 - 271
- 9 Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, *et al.* Mesenchymal stem cell - natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL - 2 - induced NK - cell proliferation[J]. *Blood*, 2006, 107(4): 1484 - 1490
- 10 Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit natural killer - cell proliferation, cytotoxicity, and

cytokine production; role of indoleamine 2, 3 - dioxygenase and prostaglandin E2[J]. Blood, 2008, 111(3): 1327 - 1333

- 11 Di Nicola M, Carlo - Stella C, Magni M, *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T - lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli[J]. Blood, 2002, 99(10): 3838 - 3843
- 12 Rasmusson I, Uhlin M, Le Blanc K, *et al.* Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes[J]. J Leukocyte Biol, 2007, 82(4): 887 - 893
- 13 Traggiai E, Volpi S, Schena F, *et al.* Bone marrow - derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients[J]. Stem Cells, 2008, 26(2): 562 - 569
- 14 Fang B, Shi M, Liao L, *et al.* Systemic infusion of FLK1 + mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride - induced liver fibrosis in mice[J]. Transplantation, 2004, 78(1): 83 - 88
- 15 Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, *et al.* Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis[J]. Arthritis Rheumatol, 2003, 48(12): 3464 - 3474
- 16 Zhao LR, Duan WM, Reyes M, *et al.* Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats[J]. Exp Neurol, 2002, 174(1): 11 - 20
- 17 Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin - 6 - dependent mechanism[J]. Stem Cells, 2007, 25(8): 2025 - 2032
- 18 Jiang XX, Zhang YI, Liu B, *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte - derived dendritic

cells[J]. Blood, 2005, 105(10): 4120 - 4126

- 19 Sun L, Akiyama K, Zhang H, *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans[J]. Stem Cells, 2009, 27(6): 1421 - 1432
- 20 Gu Z, Akiyama K, Ma X, *et al.* Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates lupus nephritis in MRL/lpr mice[J]. Lupus, 2010, 19(13): 1502 - 1514
- 21 Carrion F, Nova E, Ruiz C, *et al.* Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients[J]. Lupus, 2010, 19(3): 317 - 322
- 22 Sun L, Wang D, Liang J, *et al.* Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheumatol, 2010, 62(8): 2467 - 2475
- 23 Chang JW, Hung SP, Wu HH, *et al.* Therapeutic effects of umbilical cord blood - derived mesenchymal stem cell transplantation in experimental lupus nephritis[J]. Cell Transplant, 2011, 20(2): 245 - 257
- 24 Nemeth K, Keane - Myers A, Brown J M, *et al.* Bone marrow stromal cells use TGF - β to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed - induced asthma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(12): 5652 - 5657
- 25 Martínez - González I, Cruz M J, Moreno R, *et al.* Human mesenchymal stem cells resolve airway inflammation, hyperreactivity and histopathology in a mouse model of occupational asthma[J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(19): 2352 - 2363

(收稿日期: 2014 - 12 - 04)

(修回日期: 2014 - 12 - 17)

(上接第 7 页)

- 16 Matsumoto M, Oshiumi H, Seya T. Antiviral responses induced by the TLR3 pathway[J]. Rev Med Virol, 2011, 21(1): 67 - 77
- 17 Sainathan SK, Bishnupuri KS, Aden K, *et al.* Toll - like receptor - 7 ligand Imiquimod induces type I interferon and antimicrobial peptides to ameliorate dextran sodium sulfate - induced acute colitis[J]. Inflamm Bowel Dis, 2012, 18(5): 955 - 967
- 18 Schiller J, Lowy D. Virus infection and human cancer: an overview [M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2014: 1 - 10
- 19 Ko YB, Kim BR, Nam SL, *et al.* High - mobility group box 1 (HMGB1) protein regulates tumor - associated cell migration through the interaction with BTB domain[J]. Cell Signal, 2014, 26(4): 777 - 783
- 20 Sato Y, Goto Y, Narita N, *et al.* Cancer cells expressing toll - like receptors and the tumor microenvironment[J]. Cancer Microenviron, 2009, 2(1): 205 - 214
- 21 Koido S, Homma S, Okamoto M, *et al.* Combined TLR2/4 - activated dendritic/tumor cell fusions induce augmented cytotoxic T lymphocytes[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59280

- 22 Eiró N, González L, González LO, *et al.* Study of the expression of Toll - like receptors in different histological types of colorectal polyps and their relationship with colorectal cancer[J]. J Clin Immunol, 2012, 32(4): 848 - 854
- 23 Zent C, Smith B, Ballas Z, *et al.* A phase I clinical trial of CpG oligonucleotide 7909 (PF - 03512676) in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2012, 53(2): 211 - 217
- 24 Schmoll HJ, Wittig B, Arnold D, *et al.* Maintenance treatment with the immunomodulator MGN1703, a Toll - like receptor 9 (TLR9) agonist, in patients with advanced colorectal carcinoma and disease control after induction therapy: a randomised, double - blind, placebo - controlled trial[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(9): 1615 - 1624
- 25 Chiron D, Jegou G, Pellat - Deuceunynck C. Toll - like receptors: expression and involvement in multiple myeloma[J]. Leukemia Research, 2010, 34(12): 1545 - 1550

(收稿日期: 2015 - 02 - 27)

(修回日期: 2015 - 03 - 09)