

间充质干细胞来源的胞外囊泡 在肺纤维化治疗中研究进展

梁秀萍 黎艳红 周 雨 胡娣萍 刘 毅

摘 要 肺纤维化是各种不同病因的间质性肺疾病的共同结局,严重影响肺功能,可导致低氧血症,呼吸困难,甚至呼吸衰竭及死亡。其高发生率和病死率加重了卫生经济负担。目前临床药物治疗存在选择少、费用高、部分患者疗效差等情况。间充质干细胞治疗在肺纤维化中具有很好的疗效,由于移植率低、易堵塞和致癌的危险等,它们面临着许多临床争议。间充质干细胞来源的胞外囊泡(MSC-EVs)是一种天然、高效的运输载体,具有促血管生成、抗凋亡、抗纤维化、免疫调节和一定的增殖再生功能。而且作为一种膜结构,MSC-EVs具有免疫原性低、半衰期长、体内稳定性好、传递效率高等优点,是一种比干细胞治疗更安全、更有效的新型非细胞生物治疗方法。本文将主要介绍 MSC-EVs 治疗肺纤维化的相关作用机制,此综述结果将为肺纤维化的治疗提供新的研究方向。

关键词 肺纤维化 间充质干细胞 胞外囊泡 外泌体 微粒 microRNA

中图分类号 R563

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.12.004

间质性肺疾病(interstitial lung disease,ILD)是一组具有共同的放射学、病理学和临床表现的异质性肺实质疾病^[1]。而肺纤维化(pulmonary fibrosis,PF)以肺泡结构进行性破坏、细胞外基质大量沉积和肺瘢痕形成为特点,临床表现为肺功能受损,肺泡气体交换受阻,从而导致低氧血症,呼吸困难,甚至呼吸衰竭及死亡,是许多ILD的共同结局^[2]。多种因素可导致肺纤维化,如自身免疫性疾病、病毒感染、二氧化硅吸入、长期吸烟、辐射、化疗、放疗、基因改变等^[3]。肺纤维化的高发生率和病死率已成为一个主要的公共问题^[4]。

目前临床上针对ILD的治疗药物以糖皮质激素、免疫抑制剂及抗纤维化药物即吡非尼酮和尼达尼布为主,但存在费用高、部分患者治疗效果不佳等情况^[1,3]。因此研究安全且性价比高的ILD治疗新方法迫在眉睫。近年来干细胞治疗方面的研究给肺纤维化等很多疾病的治疗带来了希望。研究发现,干细胞发挥治疗作用的途径除了细胞直接接触,更重要的

是其旁分泌途径^[5]。干细胞能分泌胞外囊泡(extra-cellular vesicles,EVs),特异性识别靶细胞和传递信号,继而调控靶细胞的功能,达到与干细胞相应的治疗效果^[6]。目前有多项临床前研究表明干细胞来源EVs能有效缓解PF动物模型的病理结局^[7,8]。本文将从间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)来源EVs治疗PF以及相关的作用机制进行综述。

一、MSCs 及 MSC-EVs

MSCs是一种来自中胚层且广泛存在于结缔组织和器官间质的非造血多能干细胞,具有自我更新和向中胚层组织分化的能力,如分化成软骨细胞和成骨细胞,且具有抗炎、免疫抑制、抗凋亡、抗纤维化、促血管生成等功能,亦是目前细胞治疗研究中最常用的一种细胞类型^[5]。现在MSCs作为一种自身免疫和炎症疾病的免疫抑制治疗,已广泛应用于许多疾病的临床试验,包括移植物抗宿主病、系统性硬化症、系统性红斑狼疮、慢性肾脏疾病等^[9]。同时有不少有关MSCs治疗肺纤维化的临床前研究和临床试验探索性研究,关于短期安全性和有效性的研究结果都提示干细胞治疗的可行性^[8,10]。但是,目前间充质干细胞存在移植后易死亡、移植率低、易堵塞、长期易成瘤等缺点,这让很多医生和患者望而生畏,在很大程度上限制了它的临床应用^[11]。而EVs的发现能让研究很好地规避这些缺点。

间充质干细胞来源的胞外囊泡(MSC-EVs)根

基金项目:科技部国家重点研发计划项目(2016YFC0906201);国家自然科学基金资助项目(青年项目)(82001728);中国博士后科学基金资助项目(2019M663522);四川大学华西医院学科卓越发展1·3·5工程项目(ZYGD18015)

作者单位:610041 成都,四川大学华西医院风湿免疫科(梁秀萍、黎艳红、胡娣萍、刘毅);610016 成都市第一人民医院呼吸科(周雨)

通讯作者:刘毅,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱:yi2006liu@163.com

据其被干细胞泌出方式及大小不同,主要分为3种类型:①外泌体(exosomes, EXOs):直径30~150nm,通过干细胞内多泡体与细胞膜融合分泌到细胞外环境而产生;②微囊泡/微粒(microvesicles, MVs):直径50~1000nm,通过质膜向外出芽、分裂以及随后向细胞外空间释放小泡而产生;③凋亡小体:直径1000~5000nm,是干细胞凋亡时释放的异质性囊泡^[12]。MSC-EVs是一种天然、高效的运输载体,可以保持与母体细胞相似的功能特征,具有促血管生成、抗凋亡、抗纤维化、免疫调节和一定的增殖再生功能^[12,13]。而且作为一种膜结构, MSC-EVs具有免疫原性低、半衰期长、体内稳定性好、传递效率高等优点,是一种比干细胞治疗更安全、更有效的新型非细胞生物治疗方法^[9]。

二、MSC-EVs治疗肺纤维化的机制

肺纤维化的发病机制复杂,很多机制尚不明确。目前研究发现,肺纤维化的发生主要是因为外源性或内源性因素引起内皮细胞和(或)肺泡上皮反复损伤,激活凝血级联反应,释放各种细胞因子和生长因子,募集免疫细胞并浸润组织,最终激活成纤维细胞转化为肌成纤维细胞并分泌过多的胶原纤维,从而导致细胞外基质的大量沉积^[14]。查阅文献发现,目前暂无关于MSC-EVs治疗纤维化的临床研究发表,但是有部分国内外文献报道了这方面的基础研究。目前研究发现, MSC-EVs在肺纤维化模型中具有保护肺泡上皮细胞,抑制上皮间质转化,抑制单核-吞噬细胞募集分化和炎症细胞因子释放,抑制成纤维细胞增殖分化,减少胶原的生成等作用,继而改善纤维化模型的纤维化程度,从而达到治疗效果^[7,8,15]。

1. 保护肺泡上皮细胞,抑制上皮间质转化:越来越多的研究表明,肺泡上皮细胞在肺纤维化过程中起着重要作用,其异常的生理病理过程包括增殖、凋亡、细胞衰老及上皮间质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT),都会引起或加重肺纤维化^[16]。MSC-EVs在这方面的研究也最丰富。Yang等^[15]将人脐带间充质干细胞来源外泌体(human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes, HUCMSC-EXOs)经尾静脉单次注射给博来霉素诱导的C57/6小鼠肺纤维化模型,第21天处死小鼠发现HUCMSC-EXOs可显著降低肺纤维化小鼠的肺系数(肺湿重/体重×100%),改善肺组织切片胶原沉积和肺组织病理变化,同时降低小鼠TGF- β 1、p-smad2/3和波形蛋白(vimentin)的表达,增加E-钙

黏蛋白(E-cadherin)的表达。而vimentin和E-cadherin正是上皮间质转化的标志性蛋白。该研究还发现,与造模后第11天给予HUCMSC-EXOs比,第2天给药治疗效果更加明显。进一步的体外研究中,他们将HUCMSC-EXOs与TGF- β 1刺激的A549细胞(肺部上皮样细胞)共培养,发现TGF- β 1促进下游smad2/3蛋白磷酸化,使vimentin下调,E-cadherin上调,而这一作用可被HUCMSC-EXOs反转。该研究认为,HUCMSC-EXOs可以通过抑制TGF- β 1/sm2/3信号通路激活的上皮-间质转化而缓解小鼠肺纤维化程度,且早期给药效果更加明显。此外,Xiao等^[17]将骨髓间充质干细胞来源的EXOs(bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes, BMSC-EXOs)经尾静脉给予LPS诱导的小鼠肺损伤模型和LPS刺激的小鼠肺上皮细胞MLE-1,发现BMSC-EXOs可通过沉默Ikbkb和破坏IKK β 的稳定性,抑制NF- κ B和hedgehog通路,进而下调vimentin,上调E-cadherin,从而反转LPS诱导的EMT过程。而Chen等^[18]研究表明,人脐带间充质干细胞来源微粒(HUCMSC-MVs)传递的miR-100通过靶向mTOR增强自噬,抑制博来霉素诱导的急性肺损伤大鼠模型的肺细胞凋亡、炎症反应和纤维化,同时在体外研究中减轻博来霉素诱导的大鼠II型肺泡上皮细胞凋亡和炎症反应。以上研究表明MSC-EVs可通过调节多种信号通路调控肺泡上皮细胞,进而改善肺纤维化。

2. 抑制单核-吞噬细胞募集分化和炎症细胞因子释放:肺组织中的巨噬细胞有两种来源,一种为组织定居巨噬细胞,分布在肺泡和肺间质中,另一种是在炎症等刺激下的被募集到受损肺组织的骨髓来源单核细胞^[19]。骨髓单核细胞迁移到组织内后成为组织巨噬细胞,其处于休眠的状态称为M0,M0在不同炎症细胞因子刺激下分化为:①经典活化巨噬细胞M1,可促炎杀菌,终止损伤修复过程,防止过度修复;②选择性活化巨噬细胞M2,可抗炎和促进组织修复^[20]。目前,大部分研究提示M1和M2可促进肺纤维化进程,但是个别研究出现相反的结果,所以M1和M2与肺纤维化的关系尚不确定^[21]。近年来,在MSC-EVs治疗心血管、消化、泌尿和中枢神经系统相关疾病时关于巨噬细胞极化的研究中,均发现MSC-EVs通过抑制M1型细胞,提高M2型细胞的表达来达到治疗作用^[22]。在肺纤维化中, MSC-EVs如何使调节巨噬细胞极化,又能否通过调控巨噬细胞

极化达到治疗效果呢? Willis 等^[23]将新生小鼠暴露于高氧 (75% O₂), 诱导支气管肺发育不良模型, 且在出生后第 4 天使用 HUCMSC - EXOs 治疗, 在出生后第 7 天返回室内空气。分别在出生后第 7、14、42 天处理动物进行分析。研究发现, 高氧暴露的小鼠表现出明显的肺泡简化、纤维化和肺血管重构, 而这些表现在 HUCMSC - EXOs 治疗后得到有效改善。进一步研究发现, 在体内外, HUCMSC - EXOs 可调节巨噬细胞表型, 抑制促炎 M1 状态 (CCL2、CCL7、IL - 6) 和增强抗炎 M2 状态 (arginase - 1、CD206、CCL17), 进而得出 HUCMSC - EXOs 可通过调节肺巨噬细胞表型缓解高氧诱导的支气管肺发育不良模型, 改善肺功能, 减少纤维化和肺血管重塑, 以及改善肺动脉高压的结论。同样的, Mansouri 等^[8]研究发现, 给博来霉素诱导肺纤维化小鼠模型注射 BMSC - EXOs 可以减少经典促炎单核细胞 (CD45⁺ CD11b⁺ MHC II⁻ CD64^{lo/int} CCR2⁺ Ly6^{chi}) 的数量, 增加非经典单核细胞 (CD45⁺ CD11b⁺ MHC II⁻ CD64^{lo/int} CCR2⁻ Ly6^{clo}) 和肺泡巨噬细胞 (CD45⁺ CD11b⁻ CD11c⁺ CD64⁺) 的水平从而减少肺泡变形, 降低胶原水平, 以及改善 Ashcroft 评分。然而这种巨噬细胞极化的调节和肺纤维化的缓解是否同样能在其他肺纤维化模型中达到, 还有待于进一步研究。

3. 制成纤维细胞增殖分化, 减少胶原的生成: 肺成纤维细胞在 TGF - β 等促纤维化因子的刺激下活化并分化为肌成纤维细胞, 分泌大量胶原并沉积在肺组织, 直接导致了肺纤维化, 是肺纤维化的最终阶段^[24]。目前, Shentu 等^[25]将 MSC - EVs 分别作用于 TGF - β 1 刺激的正常肺成纤维细胞和特发性肺纤维化患者的肺成纤维细胞。研究发现, 与未使用 MSC - EVs 的对照组比较, MSC - EVs 组的 α - 平滑肌肌动蛋白 (α - smooth muscle actin, α - SMA)、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN)、I 型胶原和 III 型胶原的表达均显著下调。进一步研究发现, MSC - EVs 中的 miR - 630 可以阻断正常肺成纤维细胞和 IPF 成纤维细胞中 TGF - β 1 对 N - 钙黏蛋白 2 (N - cadherin, CDH2) 的诱导。Wan 等^[7]在特发性肺纤维化的研究中发现, MSC - EVs 可通过 miR - 29b - 3p 下调肺成纤维细胞中卷曲蛋白 6 (frizzled 6, FZD6) 的表达, 从而抑制肺成纤维细胞的增殖、迁移、侵袭和分化, 同时降低 α - SMA 和 I 型胶原的表达。同时, 在皮肤纤维化的研究中, Hu 等^[26]通过体外研究发现, HUMSC - EXOs 能够通过抑制成纤维细胞的经典信号通路以及

TGF - β 1/smad 2/3 信号通路来抑制真皮成纤维细胞 - 肌成纤维细胞的转化, 这为肺纤维化的研究提供了思路。

三、microRNAs 的作用

MSC - EVs 通过携带的多种物质, 包括蛋白质、脂质、核酸 (包括 microRNAs, mRNA 和 DNA 等) 等来实现其生物效应^[12]。其中, microRNAs 是一类系统发育上保守的非编码 RNA, 其长度为 19 ~ 22 个碱基的单链核糖核酸, 参与细胞增殖、分化、凋亡等^[27]。MSC - EVs 可以使靶细胞通过内吞或融合将 microRNAs 和其他生物活性分子转移到靶细胞, 从而与邻近或远处的细胞通信。MSC - EVs 能通过转移不同或相同的 microRNAs 治疗疾病, 这在肾脏、肝脏、心脏、脑等疾病的研究中均已被证明^[28]。在肺纤维化的研究中也发现 EVs 中 microRNAs 的作用。Xiao 等^[17]研究发现, BMSC - EXOs 通过 miR - 23a - 3p 和 miR - 182 - 5p 协作来调控 NF - κ B 和 hedgehog 通路, 进而反转 LPS 诱导的 EMT 过程, 缓解肺纤维化的发展。同样的, Chen 等^[18]研究表明, HUCMSC - MVs 是通过传递 miR - 100 部分改善 ALI 模型大鼠的肺细胞凋亡、炎症反应和纤维化。Shentu 等^[25]研究发现, MSC - EVs 通过传递 miR - 630 来阻止成纤维细胞向肌纤维细胞的分化。Sun 等^[29]将经血中子宫内膜干细胞来源的 EXOs 分别作用于博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型和 TGF - β 1 处理的肺泡上皮细胞 MLE - 12 细胞, 发现 EXOs 通过将 miRNA - Let - 7 转运到肺泡上皮细胞中, 进而下调 ROS 的水平和 LOX1 的表达、改善线粒体 DNA 的损伤以及抑制炎症体 NLRP3 的激活, 从而缓解肺纤维化。

四、展 望

MSC - EVs 具有促血管生成、抗凋亡、抗纤维化、免疫调节和一定的增殖再生功能, 可以通过转移 microRNA 保护肺泡上皮细胞从而抑制上皮间质转化, 抑制单核 - 吞噬细胞募集分化和炎症细胞因子释放, 以及抑制成纤维细胞增殖分化, 减少胶原的生成等, 改善各种肺疾病模型的纤维化程度, 具有很好的应用前景。然而还有问题需要进一步解决, MSC - EVs 制备和保存等技术并不成熟, 这在很大程度上限制了 MSC - EVs 的应用。同时, MSC - EVs 的给药方式、频次、剂量等在各研究中均有不同, 还需要大量的临床前研究和大规模的临床研究来统一确定。MSC - EVs 在肺纤维化中的作用机制仍处于探索阶段, 尤其是 MSC - EVs 可能会促进 M2 型巨噬细胞极化, 这是否

会促进肺纤维化的进展,需要笔者更加深入的研究。笔者研究距使用 MSC - EVs 进行安全、有效、规范的肺纤维化治疗还有很大一段的距离,需要开展进一步的研究予以证实。

参考文献

- Castelino FV, Varga J. Interstitial lung disease in connective tissue diseases; evolving concepts of pathogenesis and management[J]. Arthrit Res Ther, 2010, 12(4): 213
- Fang L, Chen H, Kong R, *et al.* Endogenous tryptophan metabolite 5 - Methoxytryptophan inhibits pulmonary fibrosis by downregulating the TGF - beta/SMAD3 and PI₃K/AKT signaling pathway[J]. Life Sciences, 2020, 260: 118399
- Wallis A, Spinks K. The diagnosis and management of interstitial lung diseases[J]. BMJ, 2015, 350: h2072
- Lee TH, Yeh CF, Lee YT, *et al.* Fibroblast - enriched endoplasmic reticulum protein TXNDC5 promotes pulmon MF ary fibrosis by augmenting TGFbeta signaling through TGFBR1 stabilization[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4254
- Phinney DG, Pittenger. Concise review: MSC - Derived exosomes for cell - free therapy[J]. Stem Cells, 2017, 35(4): 851 - 858
- Murray LMA, Krasnodembskaya AD. Concise review: intercellular communication via organelle transfer in the biology and therapeutic applications of stem cells[J]. Stem Cells, 2019, 37(1): 14 - 25
- Wan X, Chen S, Fang Y, *et al.* Mesenchymal stem cell - derived extracellular vesicles suppress the fibroblast proliferation by downregulating FZD6 expression in fibroblasts via micrRNA - 29b - 3p in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J Cell Physiol, 2020, 235 (11): 8613 - 8625
- Mansouri N, Willis GR, Fernandez - Gonzalez A, *et al.* Mesenchymal stromal cell exosomes prevent and revert experimental pulmonary fibrosis through modulation of monocyte phenotypes[J]. JCI Insight, 2019, 4(21): e128060
- Lai P, Weng J, Guo L, *et al.* Novel insights into MSC - EVs therapy for immune diseases[J]. Biomark Res, 2019, 7: 6
- Averyanov A, Koroleva I, Konoplyannikov M, *et al.* First - in - human high - cumulative - dose stem cell therapy in idiopathic pulmonary fibrosis with rapid lung function decline[J]. Stem Cells Translat Med, 2020, 9(1): 6 - 16
- Mei SH, Haitsma JJ, Dos Santos CC, *et al.* Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis[J]. Am J Respirat Critical care Medicine, 2010, 182(8): 1047 - 1057
- van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2018, 19(4): 213 - 228
- Thery C, Witwer KW, Aikawa E, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines [J]. J Extracell Vesicles, 2018, 7(1): 1535750
- Wang F, Xia H, Yao S. Regulatory T cells are a double - edged sword in pulmonary fibrosis[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 84: 106443

- Yang J, Hu H, Zhang S, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell - derived exosomes alleviate pulmonary fibrosis in mice by inhibiting epithelial - mesenchymal transition[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2020, 40(7): 988 - 994
- Martinez FJ, Collard HR, Pardo A, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17074
- Xiao K, He W, Guan W, *et al.* Mesenchymal stem cells reverse EMT process through blocking the activation of NF - κ B and Hedgehog pathways in LPS - induced acute lung injury[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(10): 863
- Chen WX, Zhou J, Zhou SS, *et al.* Microvesicles derived from human Wharton's jelly mesenchymal stem cells enhance autophagy and ameliorate acute lung injury via delivery of miR - 100[J]. Stem Cell Rese Ther, 2020, 11(1): 113
- 张妮, 梁世倩, 高春辰, 等. 组织定居巨噬细胞起源, 分化, 功能与器官纤维化关系研究进展[J]. 现代免疫学, 2021, 41(1): 66 - 69, 87
- Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1 - m2 polarization balance[J]. Front Immunol, 2014, 5: 614
- 李杰, 刘刚. 巨噬细胞在肺纤维化中的作用及研究进展[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2020, 19(6): 626 - 629
- Wang J, Xia J, Huang R, *et al.* Mesenchymal stem cell - derived extracellular vesicles alter disease outcomes via endorsement of macrophage polarization[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2020, 11(1): 424
- Willis GR, Fernandez - Gonzalez A, Anastas J, *et al.* Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation[J]. Am Jo Respirat Crit Care Med, 2018, 197(1): 104 - 116
- Distler JHW, Gyorfi AH, Ramanujam M, *et al.* Shared and distinct mechanisms of fibrosis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2019, 15(12): 705 - 730
- Shentu TP, Huang TS, Cernec - Kohan M, *et al.* Thy - 1 dependent uptake of mesenchymal stem cell - derived extracellular vesicles blocks myofibroblastic differentiation[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 18052
- Hu J, Chen Y, Huang Y, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cell - derived exosomes suppress dermal fibroblasts - myofibroblasts transition via inhibiting the TGF - β 1/Smad 2/3 signaling pathway[J]. Exp Mol Pathol, 2020, 115: 104468
- Li H, Zhao X, Shan H, *et al.* MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis: involvement in pathogenesis and potential use in diagnosis and therapeutics[J]. Acta Pharmaceut Sin B, 2016, 6(6): 531 - 539
- Qiu G, Zheng G, Ge M, *et al.* Mesenchymal stem cell - derived extracellular vesicles affect disease outcomes via transfer of microRNAs[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 320
- Sun L, Zhu M, Feng W, *et al.* Exosomal miRNA let - 7 from menstrual blood - derived endometrial stem cells alleviates pulmonary fibrosis through regulating mitochondrial DNA damage[J]. Oxidat Medi Cell Longev, 2019: 4506303

(收稿日期: 2021 - 06 - 17)

(修回日期: 2021 - 06 - 25)