

间充质干细胞治疗特发性肺纤维化药理机制研究进展

高雪^{1,2}, 慈小燕^{1,2,3,4*}, 张英驰^{1,2}, 闫凤英^{1,2,3,4}

1. 天津市细胞技术创新中心, 天津 300301
2. 天津和创生物技术有限公司, 天津 300301
3. 天津药物研究院 释药技术与药代国家重点实验室, 天津 300301
4. 中国医学科学院 药物代谢新技术创新单元, 北京 100050

摘要: 间充质干细胞(MSCs)具有多种分化能力,可以直接迁移到损伤组织中并分化为肺泡上皮细胞,还可以分泌并释放多种细胞因子和外泌体,调节炎症和免疫反应。特发性肺纤维化(IPF)是与年龄相关、发病机制尚不明确的慢性进行性肺部疾病,临床上使用的吡非尼酮和尼达尼布仅能缓解症状。MSCs在治疗IPF方面具有广阔的应用前景,就目前关于MSCs治疗特发性肺纤维化的药理机制以及该疗法所存在的局限性进行综述和探讨。

关键词: 间充质干细胞(MSCs); 特发性肺纤维化(IPF); 细胞分化; 旁分泌作用; 免疫调节

中图分类号: R965.2, R967 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)08-1679-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.08.029

Research progress on pharmacological mechanism of mesenchymal stem cells in treatment of idiopathic pulmonary fibrosis

GAO Xue^{1,2}, CI Xiaoyan^{1,2,3,4}, ZHANG Yingchi^{1,2,3,4}, YAN Fengying^{1,2}

1. Center of Tianjin Cell Technology Innovation, Research and Development of Cellular Drug Quality Control Method and Quality Control System, Tianjin 300301, China
2. Tianjin He Chuang Biotechnology Co., Ltd., Tianjin 300301, China
3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Co., Ltd., State Key Laboratory of Drug Release Technology and Pharmacology, Tianjin 300301, China
4. Chinese Academy of Medical Sciences, New Technology Innovation Unit of Drug Metabolism, Beijing 100050, China

Abstract: Mesenchymal stem cells (MSCs) have a variety of differentiation abilities, which can migrate directly to injured tissues and differentiate into alveolar epithelial cells. In addition, MSCs can secrete and release a variety of cytokines and exosomes to regulate inflammation and immune responses. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an age-related chronic progressive disease with an unclear pathogenesis. The probable pathogenesis of IPF is the recurrent injury of the genetically susceptible alveolar epithelium followed by an abnormal repair response of excessive collagen deposition. The clinical use of Pirfenidone and Nintedanib can only alleviate the disease status of IPF patients. MSCs has broad application prospects in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. To discuss the pharmacological mechanism of MSCs in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis and the limitations of this therapy.

Key words: mesenchymal stem cells (MSCs); idiopathic pulmonary fibrosis (IPF); cell differentiation, paracrine; immunomodulatory

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)最早在骨髓中发现,可定义为多能间充质基质细胞,具有成纤维细胞样形态,可从胎儿脐带、胎盘以及成人脂肪、骨髓的等组织中获取,具有较高的多

收稿日期: 2022-04-11

基金项目: 中央引导地方科技发展专项(21ZYJDSY00120)

第一作者: 高雪(1995—),女,研究方向为间充质干细胞研发。Tel:13174490903 E-mail:gaoxue@tipr.com

*通信作者: 慈小燕(1987—),女,副研究员,研究方向为药动学及细胞质控。Tel:13622099172 E-mail:cixy@tjipr.com.cn

能分化潜力,在适当条件下可诱导分化为成骨、成软骨以及成脂肪细胞^[1]。MSCs的免疫原性低,不表达CD80、CD86、CD40以及主要组织相容性复合物II(major histocompatibility complex, MHC-II),因此在再生修复方面具有明显的优势^[2]。MSCs基因型稳定、不易突变,有较高的增殖能力,可承受更多的传代培养并可分化成多种的细胞表型,支持支架的血管化^[3]。MSCs具有抗增殖、免疫调节、促进上皮组织修复能力等功能^[4]。在同种异体移植的临床试验中MSCs具有不会引起严重排斥反应的优点,并且MSCs来源广泛,伦理局限小,因此其在疾病的治疗中具有广阔的应用前景。

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是慢性、诱发原因不明的进行性肺部疾病^[5]。临床病理观察以及动物模型观察发现,IPF可以理解成“伤口”无法愈合的疾病^[6-7]。目前临床上针对IPF的治疗药物主要有吡非尼酮和尼达尼布^[8]两种,尼达尼布可通过抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、成纤维细胞生长因子(platelet-derived growth factor, FGF)以及转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)等,对成纤维细胞活性发挥抑制作用^[9]。吡非尼酮主要作用为抑制胶原合成、下调TGF- β 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)以及减少成纤维细胞增殖。吡非尼酮和尼达尼布虽然已经被认为是临床上治疗IPF指南用药,但只能延缓肺功能的继续恶化,不能逆转肺纤维化过程,且会产生毒性^[10]。因此,开发能精准治疗IPF,而不产生严重副作用的治疗药物成为目前的研究重点。

MSCs因其具有安全无毒、来源丰富、直接应用于损伤组织以及治疗范围广等优点,成为治疗肺纤维化疾病的研究热点^[11]。因此本文就MSCs治疗IPF可能的药理机制进行汇总,以期为后续的临床研究及新药研发提供依据。

1 MSCs的分化能力

MSCs具有分化为不同细胞系的祖细胞的能力,在不同培养条件下,MSCs具有向中胚层来源细胞、内胚层以及外胚层来源的细胞分化的能力^[12]。在多种动物的肺损伤模型中,MSCs和MSCs条件培养基的存在下,在减缓模型小鼠的肺损伤同时还可增加肺上皮细胞的数量。

MSCs分化为肺细胞样细胞的能力使其成为治

疗肺纤维化的理想替代方法^[12-14]。1项动物体内实验表明,经致死辐射后的雌性小鼠接受等周龄的雄性小鼠的全骨髓移植后,在第1、3、5、7天以及第2、4、6月和6个月对接受移植的雌性小鼠的肺组织进行Y染色体和表面活性剂蛋白B的mRNA荧光原位杂交染色,结果表明雌性小鼠的肺泡发现从雄性供体中移植的Y染色体阳性MSCs,并且这些雄性的MSCs转变为肺上皮细胞的形态^[15]。MSCs可通过与驻留的上皮细胞融合或直接向上皮细胞的转变而促进组织再生,减轻由博来霉素(Bleomycin)诱导的IPF小鼠肺损伤^[16]。

对放射性标记细胞的跟踪显示,iv骨髓MSCs时,MSCs主要定位于肺部,通过右心脏和肺血管的血液循环,将MSCs依次传输到肺部、肝脏以及其他器官^[17]。在肺部损伤的状态下,MSCs聚集在损伤部位并可激活肺部局部驻留的干细胞,改善肺顺应性和气体交换,减轻IPF症状。

2 MSCs的抗炎和免疫调节作用

MSCs本身具有低免疫原性,自体或跨种属的异体移植均难以引起免疫排斥反应。巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞以及T淋巴细胞等在IPF发病机制中有重要作用^[18]。

2.1 提高M2型巨噬细胞水平

巨噬细胞可分为M1型和M2型,分别在IPF的疾病发生中发挥促炎或促纤维化作用。MSCs可通过分泌外泌体调节巨噬细胞极化,抑制慢性炎症,促进损伤后组织愈合。

动物在体实验研究表明,在由 $5\text{ U}\cdot\text{kg}^{-1}$ 博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中,模型成熟的21 d开始由给予大鼠iv 2.5×10^7 个人来源脐带MSCs,以大鼠ig $1.6\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 吡非尼酮做阳性对照药,肺组织染色发现人脐带间充质干细胞(HUMSCs)组肺泡间隙与健康小鼠一致,炎性细胞浸润和胶原沉积减少,M2型巨噬细胞水平明显提高^[19]。

2.2 减少中性粒细胞浸润

中性粒细胞在骨髓中成熟后随血液运输到外周,可分泌促炎细胞因子并且释放活性氧自由基和促纤维化因子。研究发现IPF患者肺中有大量中性粒细胞聚集,中性粒细胞与IPF死亡率有关。MSCs对中性粒细胞的抑制效果主要通过MSCs的外泌体和条件培养基发挥作用。MSCs和MSCs外泌体中的mRNA、microRNA以及蛋白质水平的表达差异较大,因此二者具有不同的生物学功能^[20]。

动物在体实验表明,气管内注射脂多糖诱导的

野生型雄性 C57/B6 小鼠的急性肺损伤模型中,尾 iv 间充质干细胞条件培养基(MSC-CM),以注射等量生理盐水为对照,结果显示给药组肺部的炎症细胞因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和重组小鼠巨噬细胞增殖蛋白-2(murine recombinant-2, MIP-2)水平显著低于对照组,给药组的肺部中性粒细胞标记物 GPI 锚定蛋白 Ly-6G 和核因子激活 B 细胞的 κ -轻链增强 p65(nuclear factor kappa-B p65, NF- κ B p65)染色减少, MIP-2 和 Ly-6G 是中性粒细胞招募和累积的标志, NF- κ B p65 与中性粒细胞的凋亡有关^[21]。目前 MSCs 对 IPF 中性粒细胞的作用机制研究有限,但是中性粒细胞仍是 IPF 发病机制中发挥重要作用的免疫细胞。

2.3 诱导树突状细胞向耐受表型分化

树突状细胞(dendritic cell, DC)作为一种抗原提呈细胞,几乎存在于所有的组织中,是先天免疫反应和适应性免疫反应之间的桥梁。肺部中的 DC 主要分布在肺泡间隔,以未成熟状态存在于肺部外周,主要起摄取抗原的作用。MSCs 可干扰 DC 的抗原提呈功能、分化,成熟和迁移,减少 DC 的活化和炎症因子的分泌^[22]。

体外实验表明,质量浓度 $20 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MSCs 外囊泡(mesenchymal stem cell extracellular vesicles, MSC-EV)与 DC 共培养可干扰未成熟 DC 的抗原摄取能力,减少 DC 表面成熟标志物 CD80、CD83 和 CD86 的表达,降低促炎细胞因子 IL-6 和白细胞介素-12 p70(Interleukin-12 p70, IL-12 p70)的分泌。

2.4 抑制 T 细胞增殖和活化

MSCs 通过可溶性细胞因子和细胞接触依赖介质广泛抑制 T 细胞的活化和增殖。这些介质可以直接作用于 T 细胞,或通过调节抗原提呈细胞和其他辅助细胞间接作用。MSCs 可减少 T 细胞的干扰素- γ (interferon gamma, IFN- γ)和 TNF- α 分泌,上调白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4),使 T 细胞从促炎状态转化为抗炎状态,减轻肺部的炎症情况^[23]。此外, MSCs 可以恢复 Th1/Th2 动态平衡,抑制 T 细胞的过度增殖。

3 MSCs 的旁分泌作用

细胞的旁分泌效应即指细胞分泌可溶性细胞因子的能力,可调节不同疾病的免疫反应。研究发现静脉给予 MSCs 可以抑制 IPF 模型中促炎因子和促纤维化细胞因子的表达^[15, 24-25]。随后,收集培养 MSCs 48 h 培养基检测后发现,其中富含大量的细胞因子,如 IL-6、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-

1 β)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等以及在缺氧条件下可在培养基中获得 TGF- β , 这些细胞因子调节炎症过程,刺激内皮细胞的迁移,有助于缺血模型中损伤血管组织的修复。

IL-6 是一种抗纤维化活性的细胞因子。动物在体实验表明,经 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中, IL-6 通过在早期炎症阶段上调 II 型非细胞从而减缓小鼠肺损伤^[26]。

TGF- β 是一种主要的纤维性细胞因子,可诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,导致大量胶原沉淀,从而导致肺弹性和功能同时丧失或增强伤口的异常愈合反应^[25]。在 $4 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 博来霉素诱导的小鼠 IPF 模型中,人脐带来源的 MSCs 经致死浓度 ($15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的过氧化氢处理 24 h 后,将 MSCs (2×10^5 个)以未经过氧化氢处理的 MSCs 作为对照,可以减少 IPF 模型小鼠肺部的胶原沉积,肺组织肺泡间隙增大,相关炎症因子 TGF- β 和平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)减少^[27]。

MSCs 的旁分泌细胞因子不仅直接作用于肺部损伤细胞,且影响其他免疫细胞的成熟和分化。1 项体外实验表明,将 MSCs 与 DC 以 10:1 进行共培养 72 h,以 HGF 作为阳性对照。对 DC 相关的成熟标志物进行检测后发现 MSCs 组 DC 表面 CD86、CD40 以及 MHC-II 表达量明显下降,且下降水平与 MSCs 分泌的 HGF 水平呈现正相关。而未成熟的 DC 具有较低的吞噬抗原能力且抑制 T 细胞的增殖^[28]。

4 结语

MSCs 在临床上治疗 IPF 已经取得了一定的研究进展^[29]。截至 2022 年 5 月,在 Clinical Trials 检索到全球范围内的 MSCs 临床试验项目已经超过 4 000 个,药物临床试验登记与信息公示平台显示 2022 年上半年国内新增 5 个干细胞新药项目,其中包括 MSCs 治疗 IPF 新药项目。

MSCs 在治疗 IPF 方面具有明显的优势,目前的药理机制研究包括 MSCs 向受损肺组织迁移,分泌 IL-6、TGF- β 等细胞因子,从而调节肺部内皮和上皮细胞的通透性,减少炎症反应,促进组织修复,抑制细菌生长。在细胞分化方面, MSCs 不仅可迁移至损伤部位发挥“归巢”效应,直接分化成肺部祖细胞,并且动员肺局部驻留的干细胞分化,改善 IPF 症状。同时, MSCs 还能通过分泌细胞因子,直接或间接地影响巨噬细胞、中性粒细胞以及 DC 等免疫细胞的聚集、成熟和凋亡,减轻肺部炎性细胞浸润,调

节免疫系统和局部炎症微环境,增强对IPF的治疗作用。

尽管目前的研究可以初步阐述MSCs治疗IPF的药理机制,但仍存在以下3点不足:(1)绝大多数由博来霉素诱导的动物模型均在早期给与MSCs治疗,但临床上IPF与普通间质肺炎因存在相似的病理表现而在初期难以区分,IPF一经发现绝大多数为终末期,因此MSCs在IPF终末期是否具有良好的治疗作用仍需进一步的实验证明。(2)当前临床上用MSCs治疗IPF主要围绕MSCs安全性评价,如注射低剂量(2×10^3 个细胞)^[30]或高剂量(2×10^8 个细胞)^[31]的MSCs对IPF患者有负面影响跟踪评价,但对于是否能够真正改善IPF肺部损伤仍然存在探索空间。(3)不论是动物模型还是临床试验,均是由静脉给予MSCs(IPF小鼠模型存在由气管注入的情况),研究证明iv的MSCs在不同器官中可长期存活。但若患者患有多种疾病,体内免疫环境复杂,还需进一步探究静脉MSCs治疗IPF是否会对其他器官造成影响。

IPF一经发现,就宣布患者的生命进入倒计时,目前医学上能做的只是减轻患者的痛苦,且需要长期服药。MSCs的出现对IPF患者来说是一道希望的曙光,因此在MSCs治疗IPF的研发及临床试验阶段,建议考虑疾病与MSCs的特点,深入开展相关研究,以期开发出药理学机制明确、副作用小、具有良好治疗效果的MSCs制剂。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Han Y, Li X, Zhang Y, et al. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine [J]. *Cells*, 2019, doi: 10.3390/cells8080886.
- [2] Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, et al. Stem cells: Their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells — a review [J]. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(4): 1111-1126.
- [3] Li Z, Niu S, Guo B, et al. Stem cell therapy for COVID-19, ARDS and pulmonary fibrosis [J]. *Cell Prolifer*, 2020, 53(12): e12939.
- [4] Shi Y, Wang Y, Li Q, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(8): 493-507.
- [5] Maher T M, Bendstrup E, Dron L, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 197.
- [6] Renzoni E A, Poletti V, Mackintosh J A. Disease pathology in fibrotic interstitial lung disease: Is it all about usual interstitial pneumonia? [J]. *Lancet*, 2021, 398(10309): 1437-1449.
- [7] Richeldi L, Collard H R, Jones M G. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10082): 1941-1952.
- [8] Raghu G. Idiopathic pulmonary fibrosis: Lessons from clinical trials over the past 25 years [J]. *Eur Respir J*, 2017, doi: 10.1183/13993003.01209-2017.
- [9] Lamb Y N. Nintedanib: A review in fibrotic interstitial lung diseases [J]. *Drugs*, 2021, 81(5): 575-586.
- [10] Behr J, Nathan S D, Wuyts W A, et al. Efficacy and safety of sildenafil added to pirfenidone in patients with advanced idiopathic pulmonary fibrosis and risk of pulmonary hypertension: A double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial [J]. *Lancet Respir Med*, 2021, 9(1): 85-95.
- [11] Shi Y, Hu G, Su J, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair [J]. *Cell Res*, 2010, 20(5): 510-518.
- [12] Raman N, Imran S a M, Ahmad Amin Noordin K B, et al. Mechanotransduction in mesenchymal stem cells (MSCs) differentiation: A review [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, doi: 10.3390/ijms23094580.
- [13] Yang S, Liu P, Jiang Y, et al. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Cell Develop Biol*, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.639657.
- [14] Cruz F F, Rocco P R M. The potential of mesenchymal stem cell therapy for chronic lung disease [J]. *Exp Rev Respir Med*, 2020, 14(1): 31-39.
- [15] Ortiz L A, 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]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8407-8411.
- [16] Filidou E, Kandilogiannakis L, Tarapatzi G, et al. Anti-inflammatory and anti-fibrotic effect of immortalized mesenchymal-stem-cell-derived conditioned medium on human lung myofibroblasts and epithelial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, doi: 10.3390/ijms23094570.
- [17] Zangi L, Margalit R, Reich-Zeliger S, et al. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cell*, 2009, 27(11): 2865-2874.
- [18] 陈 乾, 熊旭东. 免疫细胞在特发性肺纤维化中的研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(10): 1586-1590. Chen Q, Xiong X D. Progress of immunocyte in

- idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2018, 35(10): 1586-1590.
- [19] Chu K A, Yeh C C, Kuo F H, et al. Comparison of reversal of rat pulmonary fibrosis of nintedanib, pirfenidone, and human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, doi: 10.1186/s13287-020-02012-y.
- [20] Liu A, Zhang X, He H, et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem/stromal cell-derived secretome and vesicles for lung injury and disease [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2020, 20(2): 125-140.
- [21] Su V Y, Lin C S, Hung S C, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium Induces neutrophil apoptosis associated with inhibition of the NF- κ B pathway in endotoxin-induced acute lung injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, doi: 10.3390/ijms20092208.
- [22] Reis M, Mavin E, Nicholson L, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate dendritic cell maturation and function [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2538.
- [23] Keyhanmanesh R, Rahbarghazi R, Aslani M R, et al. Systemic delivery of mesenchymal stem cells condition media in repeated doses acts as magic bullets in restoring IFN- γ /IL-4 balance in asthmatic rats [J]. *Life Sci*, 2018, 212: 30-36.
- [24] Theise N D, Henegariu O, Grove J, et al. Radiation pneumonitis in mice: A severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow [J]. *Exper Hematol*, 2002, 30(11): 1333-1338.
- [25] Wei P, Xie Y, Abel P W, et al. Transforming growth factor (TGF) - β 1-induced miR-133a inhibits myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, doi: 10.1038/s41419-019-1873-x.
- [26] Kobayashi T, Tanaka K, Fujita T, et al. Bidirectional role of IL-6 signal in pathogenesis of lung fibrosis [J]. *Respir Res*, 2015, doi: 10.1186/s12931-015-0261-z.
- [27] Mahmoudi T, Abdolmohammadi K, Bashiri H, et al. Hydrogen peroxide preconditioning promotes protective effects of umbilical cord vein mesenchymal stem cells in experimental pulmonary fibrosis [J]. *Adv Pharm Bull*, 2020, 10(1): 72-80.
- [28] Lu Z, Chang W, Meng S, et al. Mesenchymal stem cells induce dendritic cell immune tolerance via paracrine hepatocyte growth factor to alleviate acute lung injury [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, doi: 10.1186/s13287-019-1488-2.
- [29] Chambers D C, Enever D, Ilic N, et al. A phase 1b study of placenta-derived mesenchymal stromal cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respirology*, 2014, 19(7): 1013-1018.
- [30] Glassberg M K, Minkiewicz J, Toonkel R L, et al. Allogeneic human mesenchymal stem cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis via intravenous delivery (AETHER): A phase I safety clinical trial [J]. *Chest*, 2017, 151(5): 971-981.
- [31] 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 Transl Med*, 2020, 9(1): 6-16.

[责任编辑 李红珠]