

· 综 述 ·

成体干细胞在慢性肺疾病中应用的研究现状*

魏健平 综述, 叶小群[△] 审校

(南昌大学第二附属医院呼吸科, 南昌 330006)

关键词: 成体干细胞; 肺疾病, 慢性阻塞性; 肿瘤干细胞; 组织生物工程

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.043

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)32-3956-03

近年来,慢性肺部疾病的发病率和病死率都有明显上升。世界卫生组织的 Lopez 等^[1] 调查显示,慢性阻塞性肺疾病(COPD)于 2002 年居常见死亡原因的 11 位,预计至 2030 年该病上升成为第 4 位。目前临床上普遍采用常规治疗,但由于疾病本身特点,导致这类疾病的治疗进展缓慢。随着干细胞研究的深入,其在肺损伤修复中作用的认识也在不断加深。大量研究表明,诱导植入体内的成体干细胞可以向包括肺组织在内的多种非造血细胞类型分化^[2-3],从而给慢性肺疾病的治疗另辟蹊径。

1 干细胞生物学特性

干细胞是一种未充分分化、尚不成熟的原始细胞,其基本特性^[4]包括:(1)所占比例较低;(2)具有很强的繁衍潜能,但在机体稳态时处于 G₀ 期;(3)能够自我更新;(4)具有多向分化的能力;(5)能表达特殊标记物或生物特征以实现自我识别与富集。

1.1 肺内源性相关干细胞 肺脏呈现高度区划结构,内含有 40 余种不同分化细胞类型,使得对肺内源性相关干细胞的确认极具挑战性。尽管如此,目前已有大量的研究证实,从气管至远端气道及肺泡组织中已被假定不同的肺相关干细胞定植,其特性亦有所差异^[5-8]。

1.1.1 气道近端干细胞 气管和主支气管上皮中含有多种细胞成分,包括纤毛细胞、基底细胞、克拉拉细胞、基底神经内分泌细胞及黏膜下细胞等。多数研究者认为无论在机体稳态还是损伤应答中,基底细胞为主要干细胞源。Kotton 等^[6] 研究发现,当气道损伤时,基底部细胞能后续表达 p63 及细胞角蛋白 5/14 (Keratin5/14, Krt5/14),进而转化为肺上皮细胞。Schoch 等^[7] 通过实验证实黏膜下腺导管处高度表达 Krt5-GFP 的基底细胞相对 Krt5-GFP⁻ 具备更大的增殖及体外克隆的能力。Kim^[8] 在吸入二氧化硫损伤气道上皮的小鼠模型中,经腹腔注射 5-溴脱氧尿核苷(5-BrdU),部分位于气管上段黏膜下腺体的亚群基底上皮细胞长期表达 5-BrdU,充分证明基底细胞具有强大的重建功能。

1.1.2 气道远端干细胞 终末和呼吸性细支气管上皮主要由克拉拉细胞、纤毛细胞和神经内分泌细胞组成。其中无纤毛的克拉拉细胞备受关注,其在机体稳态时表现低增殖状态。当小鼠暴露于上皮细胞毒素“萘”时,支气管与终末细支气管内衬的克拉拉细胞几乎消耗殆尽。值得注意的是,在富含克拉拉细胞群的神经内分泌小体中及终末细支气管肺泡交接处,仍有少数耐受或称为“变异”克拉拉细胞(Clarav)残存;进一步的研究证实 Clarav 不表达 CYP2F2 酶(一种可将萘转化为毒性产物的 P450 细胞色素族),却高表达克拉拉细胞分泌蛋白(clara cell secretory protein,CCSP)和 II 型肺泡上皮表面活性物质蛋白 C

(surfactant protein C, SPC),且显示出独特的干细胞表型 Sca1⁺/CD34⁺/CD45⁻/CD31⁻^[8-10],故称为细支气管肺泡干细胞。实验说明经萘破坏的细胞为有丝分裂后细胞,必然退出细胞周期而死亡,而 Clarav 因上述特性可以反复进入细胞周期启动增殖并分化,参与肺损伤的修复。

1.1.3 肺泡上皮干细胞 肺泡表面主要由 I 和 II 型肺泡上皮细胞(alveolar epithelium cell, AEC)构成。Kim^[8] 经研究已确认 AEC I 为终分化细胞,失去增生分裂特征,在机体中承担气体交换功能。Swain 等^[11] 发现无论正常肺泡上皮更新还是肺损伤组织的修复,均通过 AEC II 增殖并转分化为 AEC I;同时 AEC II 细胞表型 SPC 也转变为 AEC I 特异性表型-水通道蛋白 5。Griffiths 等^[12] 利用荧光激活细胞分选仪从 AEC 群中分离出端粒酶逆转录酶阳性的亚群细胞相对更具有增殖繁衍活性,其在体外培养应用氘标记的胸腺嘧啶核苷脉冲追踪发现 AEC I 亦由 AEC II 分化而来。故认为 AEC II 在远端肺上皮细胞损伤后修复中起关键作用,很可能是肺实质中的肺泡上皮干细胞。

1.2 肺外源性相关干细胞

1.2.1 成体骨髓干细胞 一般分为 3 种细胞成分,即间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)、造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSC)和内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)。MSC 属多能性干细胞,因其具有多向分化潜质、支持造血、调节免疫和自我复制等特点而成为研究的重点。大量的文献证实,移植外源性骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cell, BMDMSC)在病变肺组织释放可溶性因子或趋化因子作用下^[13],经血液循环定植于受损部位(称为归巢);并受特定的“小生境”(niche)影响而决定所需分化,如血管内皮生长因子、肝细胞生长因子、干细胞派生因子-1、转化生长因子-β 等,显示其在损伤修复中具有极强的可塑性。Weiss 等^[14] 通过性别错配移植术,即将雄性小鼠 BM-DMSC 植入雌性鼠体内,应用荧光原位杂交技术发现在雌性鼠肺活检样本中,存有一定比例的含 Y 染色体阳性的肺上皮细胞,充分印证以上观点。HSC 最早应用于血液系统疾病中,后却在受体肺泡表面发现嵌合现象,针对 HSC 移植于肺内是否只是原位融合还是转分化结果还存有异议^[2]。此外, EPC 在慢性肺部疾病及本文后叙的肺动脉高压中^[15-16],可以分化为内皮细胞,恢复肺泡毛细血管完整性,降低通透性减轻肺水肿,改善肺通气。

1.2.2 侧群细胞(side population cells, SP cells) SP 细胞是一类能够主动外排染料 Hoechst 33342 的细胞,在流式细胞图上呈现 Hoechst 33342 低染的细胞。Zhou 等^[13] 研究发现,不同组织来源的 SP 细胞均表达 ABC 转运蛋白家族的多耐药基

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(33002901-3939-41)。
[△] 通讯作者, E-mail: yxq-li@tom.com。

作者简介:魏健平(1981~),住院医师,硕士,主要从事肺癌干细胞的研究。

因 ABCG2/BCRP1, 该基因的表达量与 SP 细胞表型呈正相关, 是 SP 细胞特征性决定因素。大量文献证实^[4,16], 众多的组织/器官(脐带血、骨骼肌、心脏、乳腺、肺脏、肝脏、肾脏等)的干细胞/肿瘤细胞中均含有少量的 SP 细胞, 且同源性高, 具有自我更新和多向分化潜能, 故认为 SP 细胞是浓聚的干细胞群体。但由于 Hoechst 33342 的细胞毒性能够减弱侧群细胞的活力, 针对侧群细胞能否真正代表肺外源性相关干细胞还存有分歧, 尚需严密实验进一步的阐述。

2 成体干细胞在肺部慢性疾病中的应用

在肺部各种急、慢性损伤病理发展过程中, 普遍有共同的早期改变, 即内皮损伤导致血管舒张/收缩功能紊乱, 而 EPC 作为内皮细胞的前体, 能够在病变初期起到促进愈合作用。Yamada 等^[17]在肺损伤患者的 CT 影像资料中发现, 肺组织中瘢痕样纤维化改变与外周血中 EPC 水平成负相关, 推测 EPC 可能作为成纤维细胞参与修复。HSC 主要用于血液系统疾病, 但在肺疾病中的研究缺乏可查文献。外源性 BMDMSC 具有强大的可塑性, 通过该细胞在肺部的转分化而替代常规药物在肺疾病中的应用具有可行性。

2.1 COPD 针对 COPD 的肺气肿及气道重塑病理过程, “炎症假说”受普遍青睐, 认为肺损伤机制一旦启动, 导致机体产生过度的炎症免疫反应^[18], 其中辅助性 T 淋巴细胞 Th1/Th2 免疫反应的失衡尤为重要, 即消除诱发因素, 仍进行性加重。研究证实^[19], MSC 低表达 MHC I、但不表达 MHC II 和其他协同刺激分子(CD40/CD80/CD86), 具有低免疫原性。基于以上两方面因素互补, 植入的外源性 BMDMSC 可以逃避宿主的免疫监控, 通过调节免疫作用, 抑制炎症反应为肺损伤的修复提供便利。张超凤等^[20]通过烟雾暴露方法建立小鼠 COPD 模型后, 运用胞膜荧光染料 PKH26 标记的 BMDMSC 经尾静脉输入, 病变肺组织可见散在红色荧光细胞; 治疗组与模型组相比, 血清中超氧化物歧化酶活性明显增强, 且脂质过氧化产物——活性丙二醛含量亦显著降低。充分证明外源性 BMDMSC 能够提高自由基清除酶活性, 降低脂质过氧化导致的损伤, 有利于肺损伤的修复。Gupta 等^[21]证实定植肺损伤组织的 BMDMSC 能够经旁分泌作用, 下调大肠杆菌内毒素致敏小鼠支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)及血浆中促炎因子(TNF- α 和 MIP-2)的表达, 同时上调抗炎细胞因子 IL-10 表达, 抑制 Th1/Th2 免疫反应的失衡, 提高小鼠生存率。

2.2 支气管哮喘 黄芸等^[22]在运用鸡卵清蛋白(OVA)诱导小鼠哮喘模型中, 经尾静脉注射 BMDMSC 后, ELISA 检测发现 BALF 中 β -氨基己糖苷酶活性明显降低, 证实外源性 BMDMSC 能够减轻肥大细胞脱颗粒现象; 并抑制哮喘小鼠亢进的 Th2 变态反应, BALF 中 IL-5 及 IL-9 水平与 OVA 诱导组相比显著下降, 炎症细胞活化受限, 从而减轻哮喘小鼠模型肺部组织局部炎症。Lee 等^[23]在应用甲苯二异氰酸酯诱导哮喘的小鼠模型中, 静脉输注 BMDMSC 发现, BMDMSC 能显著降低气道内炎症指数、BALF 中嗜酸性粒细胞和中性粒细胞数量; 减少杯状细胞数及胶原蛋白沉积; 同时经免疫组化染色分析病变组织中 SMA 蛋白及 PCNA 蛋白的表达也随之趋于正常。该实验较全面的诠释 BMDMSC 在哮喘治疗中的多效性。

2.3 肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH) Umar 等^[16]在野百合碱诱导的 PAH 小鼠模型中, 静脉或气管内植入 BMDMSC 均能产生新的 EPCs, 后者又引发下游多种血管生成因子及内皮型一氧化氮合酶的释放, 修复受损内皮细胞促进肺微血管再生, 增加肺血管床数量并减轻肺动脉压力, 逆转肺小动脉重构, 减轻右心室肥大。

2.4 肺部肿瘤 目前, 普遍研究认为肿瘤的发生、发展、转移以及耐药与肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)密切相关。Dittmar 等^[24]发现, 再发肿瘤干细胞(rCSCs)异质性启动并引发高度恶性且耐药的新发肿瘤, 其中非整倍体肿瘤细胞与正常干细胞融合杂交起到至关重要的作用。值得注意的是, 融合后的杂交细胞均高表达 ABCG2/BCRP 基因, 导致肿瘤细胞产生多重耐药而逃逸豁免。同时本课题^[25]也证实, ABCG2/BCRP 基因在包括肺部肿瘤在内的多种实体肿瘤当中广泛表达。Akunuru 等^[26]通过实验证明, 不同细胞表型的 CSCs 的致癌性均与细胞上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关, 其形态改变主要有 E-cadherin 表达的下降, Foxc2、N-cadherin、Twist、Snail 及 fibronectin 的表达上升; 由于 Rac1 是调节细胞骨架和转录调控的关键, 研究表明经 shRNA 沉默 Rac1, 阻止 EMT 过程中肌动蛋白细胞骨架的重组, 能够有效抑制肿瘤扩散。

2.5 肺组织生物工程 据相关报道^[27], 国外已有一种新的治疗手段, 利用非自体来源的细胞外基质(异体或异种)构建的生物三维支架作为诱导模板, 再植入患者自体干细胞或由干细胞体外分化的多细胞系, 培育重建出相同功能的器官和组织, 并成功用于临床。Macchiarini 等^[28]从患有支气管软化症的患者体内分离出上皮细胞和 MSC 衍生的软骨细胞, 与预先去除细胞及 MHC 抗原的气管支架置于生物反应器中共培养; 将共培养的生成物取代患侧主支气管, 能够实现通气功能; 移植后随访 4 个月内, 患者未出现排异反应, 且无需服用免疫抑制剂。

3 展 望

虽成体干细胞来源广泛、低免疫原性、多向分化潜能且不涉及伦理道德的约束, 可以广泛运用于临床, 但同时也面临一些问题: (1) 干细胞在转分化过程中积累的遗传突变是否能在植入部位引起新发肿瘤; (2) 干细胞的多向分化在临床上是否能够精准调控达到预期目的; (3) 干细胞植入的时期、方式与剂量等因素是否影响临床疗效; (4) 干细胞植入后仍需长期的跟踪观察排外暂时尚不可预知的不良反应, 这些都需大量严谨的体外实验和长期的临床前观察来验证。只有随着研究的一步深入和技术手段的提高, 所涉及的问题都能有效解决后, 这一令人鼓舞的新技术才能真正地走向临床。

参考文献:

- [1] Lopez AD, Mathers CD. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030 [J]. *Ann Trop Med Parasitol*, 2006, 100(5/6): 481-499.
- [2] Navarro M, Pu F, Hunt JA. The significance of the host inflammatory response on the therapeutic efficacy of cell therapies utilising human adult stem cells [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(4): 361-370.
- [3] Kassmer SH, Bruscia EM, Zhang PX, et al. Nonhematopoietic cells are the primary source of bone marrow-derived lung epithelial cells [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(3): 491-499.
- [4] Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, et al. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6207-6219.
- [5] Rawlins EL. Lung epithelial progenitor cells: lessons from development [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, 5(6): 675-681.

- [6] Kotton DN, Summer R, Fine A. Lung stem cell; new paradigms[J]. *Exp Hematol*, 2004, 32(4):340-343.
- [7] Schoch KG, Lori A, Burns KA, et al. A subset of mouse tracheal epithelial basal cells generates large colonies in vitro[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(40):631-642.
- [8] Kim CF. Paving the road for lung stem cell biology: bronchioalveolar stem cells and other putative distal lung stem cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(5):1092-1098.
- [9] Reynolds SD, Malkinson AM. Clara cell: progenitor for the bronchiolar epithelium[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(1):1-4.
- [10] Chen H, Matsumoto K, Stripp BR. Bronchiolar progenitor cells[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2009, 6(7):602-606.
- [11] Swain RJ, Kemp SJ, Goldstraw P, et al. Spectral monitoring of surfactant clearance during alveolar epithelial type II cell differentiation[J]. *Biophys J*, 2008, 95(12):5978-5987.
- [12] Griffiths MJ, Bonnet D, Janes SM. Stem cells of the alveolar epithelium[J]. *Lancet*, 2005, 366(9481):249-260.
- [13] Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. The ABC transporter *Bcrp1/ABCG2* is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype[J]. *Nat Med*, 2001, 7(9):1028-1034.
- [14] Weiss DJ, Kolls JK, Ortiz LA, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, 5(5):637-667.
- [15] Loebinger MR, Aguilar S, Janes SM. Therapeutic potential of stem cells in lung disease: progress and pitfalls[J]. *Clin Sci(Lond)*, 2008, 114(2):99-108.
- [16] Umar S, de Visser YP, Steendijk P, et al. Allogenic stem cell therapy improves right ventricular function by improving lung pathology in rats with pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(5):1606-1616.
- [17] Yamada M, Kubo H, Ishizawa K, et al. Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair[J]. *Thorax*, 2005, 60(5):410-413.
- [18] Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2007, 4(7):512-521.
- [19] 包新杰, 王任直. 间充质干细胞的免疫学特性[J/CD]. *中华细胞与干细胞杂志: 电子版*, 2011, 1(1):93-97.
- [20] 张超凤, 区庆坚, 王志红, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠慢性阻塞性肺疾病[J]. *心肺血管病杂志*, 2011, 30(1):62-66.
- [21] 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.
- [22] 黄芸, 欧阳海峰, 吴朔, 等. 外源性间充质干细胞减轻支气管哮喘小鼠气道炎症的研究[J/CD]. *中华哮喘杂志: 电子版*, 2010, 4(2):102-106.
- [23] Lee SH, Jang AS, Kwon JH, et al. Mesenchymal stem cell transfer suppresses airway remodeling in a toluene diisocyanate-induced murine asthma model[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2011, 3(3):205-211.
- [24] Dittmar T, Nagler C, Schwitalla S, et al. Recurrence cancer stem cells—made by cell fusion[J]. *Med Hypotheses*, 2009, 73(4):542-547.
- [25] 孙芬芬, 叶小群. 肿瘤干细胞耐药机制及对策[J]. *重庆医学*, 2010, 39(5):540-544.
- [26] Akunuru S, James ZQ, Zheng Y. Non-small cell lung cancer stem/progenitor cells are enriched in multiple distinct phenotypic subpopulations and exhibit plasticity[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3(2):352-361.
- [27] Badylak SF, Weiss DJ, Caplan A, et al. Engineered whole organs and complex tissues[J]. *Lancet*, 2012, 379(9819):943-952.
- [28] Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway[J]. *Lancet*, 2008, 372(9655):2023-2030.

(收稿日期:2013-06-04 修回日期:2013-07-12)

· 综 述 ·

4 项动脉粥样硬化的相关因子研究进展*

方海洋 综述, 吴延庆[△] 审校

(南昌大学第二附属医院心内科, 南昌 330006)

关键词: Endoglin; Toll 样受体; MicroRNA; Humanin; 动脉粥样硬化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.32.044

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)32-3958-04

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是众多心脑血管疾病共同的病理基础, 严重危害人类的健康。随着对 AS 的不断研

究, 认为 AS 是一种炎症性自身免疫性疾病, 慢性炎症和免疫功能失调在 AS 的形成中起着重要作用^[1]。近年来, 各种炎症

* 基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金资助项目(81260025)。 作者简介: 方海洋(1985~), 硕士, 主要从事冠心病临床与基础研究。 [△] 通讯作者, E-mail: wuyanqing01@sina.com。