

· 综 述 ·

骨髓间充质干细胞的旁分泌作用

冯吉综述,陈东风审校

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042)

关键词:干细胞;移植;干细胞因子;旁分泌

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.038

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)13-1332-02

近年来,干细胞已经从实验室研究逐渐过渡到临床。目前用于临床的移植干细胞类型包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、造血干细胞(hemopoietic stem cells, HSC)、骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)、脂肪源性间充质干细胞(adipose derived stem cells, ADSCs)及内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)等。由于 BMSCs 分离简便,不需要体外培养和扩增,获取细胞数目多,可提供多种组分混合的具有多向分化潜能的原始细胞,并发挥旁分泌功能,而且,自体骨髓单个核细胞避免了免疫排斥反应和 ESCs 移植所面临的伦理学纠纷。此外,由骨髓干细胞分化来的心肌细胞能和周围宿主细胞形成有效的电-机械偶联,可弥补骨骼肌干细胞移植的缺点,因此中国目前临床上较多采用自体骨髓干细胞进行移植。

1 干细胞表达并分泌多种生物活性分子

既往认为,干细胞主要作为种子细胞通过移植后分化成靶组织细胞(如心肌和内皮细胞,即横向分化),或与靶细胞融合而发挥治疗作用。但是干细胞分化,特别是定向分化取决于周围环境,迄今在体内 BMSCs 是否可以分化为靶组织细胞仍被质疑^[1-2]。多家实验室缜密的实验研究证实, BMSCs 植入缺血组织后并未分化为相应的心肌^[1-2]、内皮^[3]、肾小管上皮^[4]等靶组织细胞,但却通过抗凋亡、抗炎和促进增殖及存活等效应明显改善缺血后心脏^[1-2]、肢体^[3]、肝脏^[5]及肾脏^[4]等器官功能。从而提出一个新的问题,即干细胞作为广泛存在于机体各种组织的具有分化潜能、并产生多种生物活性因子的细胞体系,是否通过其分泌功能发挥上述治疗作用?

BMSCs 提供的微环境由其分泌的可溶性物质、细胞表面分子以及细胞外基质组成^[6],这三者中研究较多并且更有现实意义的是 BMSCs 分泌的可溶性物质。BMSCs 除了可以分泌一些造血功能必需的细胞因子,如白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 7(IL-7)、白细胞介素 8(IL-8)、白细胞介素 11(IL-11)、白细胞介素 12(IL-12)、白细胞介素 14(IL-14)、白细胞介素 15(IL-15)、白血病抑制因子(ILF)、粒细胞集落刺激因子 G(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(GM)和干细胞因子(SCF)^[7-8]。Chen 等^[9]通过将人的 BMSCs 与受伤脑组织的提取液共同培养,并且通过酶联免疫吸附试验(ELISAs)定量发现 BMSCs 可以分泌脑源性神经生长因子(BDNF)、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维生长因子(FGF)和肝细胞生长因子(HGF),并且这一作用是呈时间依赖性的,而当 BMSCs 与正常脑组织提取液共同培养同样也有这一作用。Mahmood 等^[10]将 BMSCs 通过静脉注入脑损伤的大鼠体内,发现 BMSCs 不但可以向损伤部位迁移,还可以使脑组织的神经生长因子(NGF)和 BDNF 的水平增加。而 Kamei 等^[11]则通过 RT-PCR 的方法从 mRNA 水平证实了 BMSCs 能够分泌 BDNF 和 VEGF。Garcia 等^[12]研究表

明, BMSCs 可以分泌胶质源性神经生长因子(GDNF)和 NGF。Liu 等^[13]的研究也在 mRNA 水平证实了 BMSCs 在一定条件刺激下还能够分泌出转化生长因子 β (TGF- β)、VEGF、血小板衍生的生长因子(PDGF)、角质化细胞生长因子(KGF)和 HGF。而有实验通过蛋白质微阵列分析证明, BMSCs 可以分泌中性粒细胞趋化因子(CINC-1)、睫状神经生长因子(CNTF)、干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素 α (IL- α)、单核细胞的趋化蛋白 1(MCP-1)、金属蛋白酶组织抑制剂-2(TIMP-2)和 VEGF。

2 干细胞分泌生物活性分子对不同器官的修复作用

2.1 血管生成 干细胞分泌的活性物质影响血管细胞增殖、迁移、黏附和细胞外基质形成等血管生成的多个环节^[14]。缺氧培养上调 BMSCs 分泌 VEGF 和基质金属蛋白酶(MMP-2)的细胞表面激活物,而有学者认为,缺氧培养也可下调 MMP-2 分泌。大鼠 BMSCs 培养基以剂量依赖方式促进体外内皮细胞的增殖和迁移, VEGF 和 FGF-2 抗体仅能部分消除上述作用,表明还有其他分泌因子参与了这一过程。小鼠缺血后肢肌肉注射 BMSCs 可以改善肢体血流灌注、增加股部血管数量、改善肢体功能、减轻肌肉萎缩及纤维化。进一步研究发现,注射后间充质干细胞(MSCs)分布于肌纤维之间,引起注射局部骨骼肌组织成 FGF-2 和 VEGF 蛋白上调,但未见 MSCs 位于新生血管中^[3],这些都提示, BMSCs 并没有直接修复损伤组织,可能是通过其旁分泌的众多因子来调节受损组织的修复过程。

2.2 肾脏保护作用 大鼠肾脏缺血-再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)致急性肾衰竭 3 d 后,给予右旋糖酐铁标记的 MSCs 明显改善肾脏功能,核磁共振成像显示 MSCs 位于肾脏皮质,组织学检查证实 MSCs 主要位于肾小管周围,但肾小管细胞未见铁标记,提示 BMSCs 不是通过分化为小管细胞,而是通过旁分泌参与肾脏保护。有研究还发现,肾脏 I/R 后注入的 MSCs 附着在肾脏微血管上,明显抑制相邻细胞的凋亡,提示 MSCs 可以通过旁分泌作用减轻肾脏急性 I/R 损伤。大鼠急性 I/R 后即刻或 24 h 经颈静脉注射 BMSCs 明显改善肾功能、增加肾小管细胞增殖、抑制凋亡,激光共聚焦显微镜检测荧光标记的 BMSCs 出现于损伤早期的肾小球,少量附着于肾微血管床,但在给予 MSCs 后 3 d 内未见其分化为肾小管上皮或内皮细胞。给予 MSCs 后 24 h 促炎细胞因子 IL-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、重组人 IFN- γ 和一氧化氮合酶(NOS)明显下降,抗炎细胞因子 IL-10、FGF-2、TNF- α 和 Bcl-2 蛋白明显上调,提示 MSCs 诱导的这种早期肾脏保护可能主要是通过旁分泌的抗炎功能实现的^[5]。

2.3 抗心脏损伤作用 常氧和缺氧培养的大鼠骨髓单核细胞培养基中富含 VEGF、IL-1 β 、FGF-2、PDGF、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)和 TGF- β ,这种培养基可以抑制体外成年心肌细胞凋

亡并改善其收缩性。大鼠心肌梗死后心肌内或腹腔注射骨髓单核细胞培养基,均明显增加心肌微血管密度,减轻梗死区纤维化,改善心脏功能。提示骨髓单核细胞分泌的活性因子通过抑制细胞凋亡和诱导血管生成而改善梗死心肌的功能^[8]。大鼠急性心肌梗死后 1 d 经尾静脉注射 MSCs 后早期(24~48 h),心脏功能明显改善,而注射过表达骨髓基质细胞衍生因子-1(SDF-1)的 MSCs 后心脏功能改善的程度还进一步提高,并增加梗死区心肌细胞存活率和血管密度,提示 MSCs 这种心脏保护作用与其分泌 SDF-1 有关。

3 干细胞分泌的生物活性物质在损伤肝脏中的作用

越来越多的证据表明干细胞对组织器官修复及其保护作用至少部分源于其分泌功能:大鼠 D-氨基半乳糖致暴发性肝衰竭后 24 h 静脉注射 BMSCs 无明显疗效,而注射 MSCs 溶解物明显改善存活率,静脉注射 MSCs 培养基明显减轻 D-氨基半乳糖所致肝细胞空泡变性、坏死和凋亡以及白细胞浸润和组织结构变形等,提高暴发性肝衰竭大鼠存活率,提示干细胞旁分泌功能是治疗暴发性肝衰竭的重要机制^[15]。

多个研究发现,种植于肝脏的 BMSCs 通过旁分泌形式分泌多种细胞因子和生长因子,如 IL-10^[16]、TNF- α ^[17]、GM-CSF^[18]、HGF^[19]和 NGF^[20]等,使其肝内甚至血清水平增加,在促进肝脏再生和修复的同时,抑制肝脏炎症反应、促进细胞外基质(ECM)降解、改善凋亡诱导的肝损伤、提高血清清蛋白水平等^[21,11-12]。IGF-1、VEGF、HGF 等具有抗血管内皮和肝细胞凋亡的作用;而 HGF 除抗凋亡外,还能促有丝分裂并通过抑制 TGF- β 表达抗纤维化。

Oyagi 等^[19]将大鼠 BMSCs 与损伤肝细胞体外共培养,培养液中的 HGF 含量较与正常肝细胞共培养者高,认为损伤肝细胞可能产生某种信号作用于 BMSC,使其分泌 HGF 至胞外,而 HGF 可以促进 BMSCs 分化^[21],且具有抗细胞凋亡活性,在促进肝脏再生和修复中起重要作用^[22-23]。

Tashiro 等^[24]在 1993 年用信号序列追踪技术发现了骨髓基质细胞分泌 SDF-1,随后在 PA6 系小鼠 BMSCs 分泌的细胞因子中也发现了 SDF-1,在肝损伤时,SDF-1 和 MMP 能促进肝细胞动员;HGF 通过增加人祖细胞的活力并协同 SCF 促进 SDF-1 诱导的定向迁移。

MSCs 广泛存在于机体各种组织且具多分化潜能。移植的 BMSCs 进入损伤肝脏后,可以分泌多种细胞因子、调节肽以及干细胞特异性归巢和营养因子等生物活性因子的细胞体系作用于周围细胞发挥旁分泌作用,参与移植治疗后的免疫调节^[25],调节炎症反应,可以促进细胞增殖,抑制功能细胞的凋亡,促进前体细胞的分化和增殖,并参与新生血管形成改善损伤组织的微循环还可以通过移植的 BMSCs 发挥抗凋亡、抗炎等作用来改善损伤肝细胞的病理状态。认识 MSCs 旁分泌在细胞治疗中的作用后,可以应用基因工程技术干预干细胞分泌的细胞因子的表达,过量表达有利于组织修复的细胞因子,可以使 MSCs 在移植治疗中发挥更重要的作用。

移植 BMSCs 的旁分泌作用,以及对受损肝细胞及肝内各种间质细胞的功能的调整,可以很好解释在临床上。行 BMSCs 移植的终末期肝病患者,2~6 h 即出现精神体力恢复,腹胀减轻、利尿效果显著等改变。这些变化不可能用移植的 MSCs 在数小时内分化发育或融合成肝细胞而发挥功能来解释。因此研究 BMSCs 的旁分泌功能及如何调节肝脏实质及间质细胞,对阐明 BMSCs 移植治疗终末期肝病机制存在重要价值。

参考文献:

- [1] Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts[J]. *Nature*, 2004, 428(6983): 664-668.
- [2] Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium[J]. *Nature*, 2004, 428(6983): 668-673.
- [3] Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms[J]. *Circ Res*, 2004, 94(5): 678-685.
- [4] Togel F, Hu Z, Weiss K, et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms[J]. *Am Physiol Renal Physiol*, 2005, 289(1): F31-42.
- [5] Di Campli C, Zocco MA, Saulnier N, et al. Safety and efficacy profile of G-CSF therapy in patients with acute on chronic liver failure[J]. *Dig Liver Dis*, 2007, 39(12): 1071-1076.
- [6] 娄淑杰, 顾平, 王铭维, 等. 软脑膜细胞诱导神经干细胞高比例分化为神经元的效应[J]. *中国临床康复*, 2005, 38(9): 4-6.
- [7] Rafii S, Meeus S, Dias S, et al. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2002, 13(1): 61-67.
- [8] Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro; effects of dexamethasone and IL-1 alpha[J]. *Cell Physiol*, 1996, 166(3): 585-592.
- [9] Chen X, Katakowskim M, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts growth factor production[J]. *Neurosci Res*, 2002, 69(6): 687-691.
- [10] Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells(MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury[J]. *Neurotrauma*, 2004, 21(1): 33-39.
- [11] Kamei N, Tanaka N, Oishi Y, et al. Bone marrow stromal cells promoting corticospinal axon growth through the release of humoral factors in organotypic cocultures in neonatal rats[J]. *Neurosurg Spine*, 2007, 6(5): 412-419.
- [12] Garcia R, Aguiar J, Alberti E, et al. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(3): 753-754.
- [13] Liu Y, Dulchavsky DS, Gao X, et al. Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production[J]. *J Surg Res*, 2006, 136(2): 336-341.
- [14] 洪小杨, 王斌, 封志纯. BMSCs 鼠脑移植对 HIBD 新生鼠脑血管再生的影响[J]. *广东医学*, 2010, 31(2): 142-145.
- [15] Parekkadan B, Van Poll D, Suganuma K, (下转第 1348 页)

胞膜上,发生肿瘤时分泌亢进,并经肿瘤血管释放入血^[3]。本研究中胆道恶性肿瘤各组患者的血清 CA19-9 水平明显升高,以 CA19-9 34 U/mL 为 cut-off 值,阳性率达到 91% (188/207),且明显高于良性疾病组及对照组($P < 0.01$)与国内外报道相符。而根治性手术(切除恶性肿瘤及转移灶)后血清 CA19-9 水平明显下降,术后第 3 周已接近正常水平。姑息性手术(未能切除肿瘤及转移灶)后血清 CA19-9 术后第 1 周略有下降,第 3 周又有上升,个别病例因病情恶化甚至高于术前,显示血清 CA19-9 对胆道系统恶性肿瘤的诊断、良恶性鉴别、疗效观察具有重要价值。

梗阻性黄疸患者血清 CA19-9 含量升高可导致恶性胆管系统肿瘤诊断的假阳性结果。由于健康人胰液及胆汁中有较高含量的 CA19-9,而血清中含量较低^[4-6]。因此胆总管结石等梗阻因素的存在,可能影响胰液及胆汁的排泄,同时可能由于结石对胆管壁的刺激,使胆管壁通透性增加,从而促进 CA19-9 向血液逆流,导致血清 CA19-9 升高。本研究中肝胆良性疾病黄疸组血清 CA19-9 明显高于无黄疸组及对照组。提示良性胆管系统疾病引起梗阻性黄疸可引起血清 CA19-9 升高,良性病变引起梗阻性黄疸,其血清 CA19-9 升高程度较恶性病变引起者低。在应用 CA19-9 鉴别胆管系统良恶性病变时,特别是有黄疸存在时应高度重视,应进行动态观察。本研究中良性黄疸梗阻因素解除后第 1 周末 CA19-9 即基本恢复正常。

本研究结果还显示,随着黄疸因素的解除,良性疾病组血清 CA19-9 水平下降,恶性疾病中行根治性手术切除原发肿瘤及转移灶的患者(有黄疸/根治性手术组、无黄疸/根治性手术组)术后 CA19-9 明显下降,而姑息性手术组(有黄疸/姑息性手术组、无黄疸/姑息性手术组)因只解除黄疸而未切除肿瘤灶,血清 CA19-9 不下降,个别病例因病情恶化而有上升趋势。良性疾病有黄疸组因治疗解除黄疸和炎症等因素,治疗后第 1 周血清 CA19-9 即下降接近正常水平,证实,CA19-9 在胆道恶性肿瘤的辅助诊断、预后判断、疗效观察等方面的作用是确定的,正确分析黄疸因素、动态检测 CA19-9、联合检测其他肿瘤

标志物可以提高胆道恶性肿瘤诊断的准确性,降低误诊。

此外,CA19-9 为人类血型物质 Lewis 的相关抗原,现已清楚约 5%~10%健康人不能合成 CA19-9,Le(a-,b-)血型的健康人或肿瘤患者血清中 CA19-9 始终为阴性,同时,CA19-9 水平的高低还与其在癌组织中的表达程度有关。本研究资料中有 5 例恶性肿瘤患者血清 CA19-9 始终在正常范围内,可能与此因素有关。对这类患者检测 CA19-9 的临床价值不大。

(志谢:淮安市第一人民医院肝胆胰科、病案室为本文提供资料和学术指导,表示感谢。)

参考文献:

- [1] Maestrazi S,Przemioslo R,Mitchell H,et al. The effect of benign and malignant liver disease on the turnout markers CA19-9 and CEA[J]. *Ann Clin Biochem*, 1998, 35: 99-103.
- [2] Ni XG,Bai XF,Mao YL,et al. The clinical value of serum CEA,CA19 9,and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2005, 31(2): 164.
- [3] 张盛,刘爱民,潘永林,等.胆道支架植入联合灌注化疗方法治疗恶性梗阻性黄疸 17 例分析[J]. *重庆医学*, 2009, 38(10):1209-1212.
- [4] 曹晓静,李增鹏,仲召阳.多肿瘤标志物蛋白芯片联合诊断胰腺癌判别函数的建立和应用[J]. *重庆医学*, 2007, 36(19):1948-1950.
- [5] 陈锦隆,易石坚,贺德,等.胆管癌患者血清 CEA、CA19-9、CA242 联合检测的临床意义[J]. *广东医学*, 2008, 29(8):1380-1381.
- [6] 陈建明,何 穗,龙国文,等.良性胆道疾病 CA19-9 检测的临床意义[J]. *中国医疗前沿*, 2008, 3(13):91-93.

(收稿日期:2010-05-19 修回日期:2010-10-17)

(上接第 1333 页)

et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure [J]. *PLoS One*, 2007, 2(9): e941.

- [16] 冯帅南,黄宏.基质细胞衍生因子-1/CXCR4 轴的特性及其在损伤修复中的作用[J]. *创伤外科杂志*, 2008, 10(5): 471-473.
- [17] Tilg H,Jalan R,Kaser A,et al. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis[J]. *Hepatology*, 2003, 38(4): 419-425.
- [18] Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(1):108-119.
- [19] Oyagi S,Hirose M,Kojima M,et al. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4-injured rats[J]. *Hepatology*, 2006, 44(4): 742-748.
- [20] Li Y,Chen J,Chen XG,et al. Human marrow stromal cell

therapy for stroke in rat;neurotrophins and functional recovery[J]. *Neurology*, 2002, 59(4): 514-523.

- [21] Luk JM, Wang PP, Lee CK, et al. Hepatic potential of bone marrow stromal cells; development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models [J]. *Immunol Methods*, 2005, 305(1): 39-47.
- [22] Matsuda Y, Matsumoto K, Ichida T, et al. Hepatocyte growth factor suppresses the onset of liver cirrhosis and abrogates lethal hepatic dysfunction in rats [J]. *Biochemistry*, 1995, 118(3): 643-649.
- [23] Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats [J]. *Nature Med*, 1999, 5(2): 226-230.
- [24] Tashiro K, Tada H, Heilker R, et al. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins [J]. *Science*, 1993, 261(5): 600-603.
- [25] 杨媛媛,周诺.骨髓间充质干细胞作为组织工程种子细胞的研究进展[J]. *广西医学*, 2010, 32(5): 586-589.

(收稿日期:2011-01-08)