

干细胞移植治疗炎症性肠病的研究进展

赵琳琳^{1,2} 梁锐³ 王志强⁴ 孙贻^{2*}

(¹昆明理工大学医学院, 昆明 650500; ²云南省第一人民医院检验科, 昆明 650032;
³天津医科大学第二医院病理科, 天津 300211; ⁴天津医科大学第二医院普外科, 天津 300211)

摘要 炎症性肠病包括克罗恩病和溃疡性结肠炎, 其病程迁延、并发症严重, 可引起严重的消化吸收障碍, 甚至危及患者生命, 是当今临床治疗上的一个重大医学难题。传统药物治疗方法不能有效治疗炎症性肠病, 且会导致药物依赖及不良反应。研究发现, 干细胞移植可修复肠道损伤, 并恢复肠道的免疫系统, 给炎症性肠病的治愈带来了新的希望。该文就造血干细胞、间充质干细胞、肠道干细胞、诱导性多能干细胞、孤雌胚胎干细胞等多种干细胞移植治疗炎症性肠病的研究进展作一综述。

关键词 炎症性肠病; 干细胞移植; 治疗

Advances in Stem Cell Transplantation for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease

ZHAO Linlin^{1,2}, LIANG Rui³, WANG Zhiqiang⁴, SUN Yi^{2*}

(¹Medical Faculty, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;
²Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China;
³Department of Pathology, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China;
⁴Department of General Surgery, the Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract Inflammatory bowel disease, including Crohn's disease and ulcerative colitis, has a prolonged course of disease, serious complications, can cause serious digestive dysfunction, and even endangers the life of patients. It is a major medical problem in clinical treatment today. Traditional medicines and treatments are not effective in treating inflammatory bowel disease and can lead to drug dependence and adverse reactions. The study found that stem cell transplantation can repair intestinal damage and restore the intestinal immune system, bringing new hope to the cure of inflammatory bowel disease. In this paper, the research progress of various stem cell transplantation such as hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells, intestinal stem cells, induced pluripotent stem cells and parthenogenetic embryonic stem cells for the treatment of inflammatory bowel disease is reviewed.

Keywords inflammatory bowel disease; stem cell transplantation; treatment

1 炎症性肠病的研究现状

1.1 炎症性肠病概述

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD)

是一组病因不明确的慢性非特异性肠道炎症性疾病, 它包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)。UC是一种影响结直肠的

收稿日期: 2018-11-13 接受日期: 2019-05-27

国家自然科学基金(批准号: 81660302)和云南省应用基础研究计划(批准号: 2013FZ179、2014FB040)资助的课题

*通讯作者: Tel: 13987160360, E-mail: huludeng@126.com

Received: November 13, 2018 Accepted: May 27, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81660302) and Yunnan Basic Applied Research Project (Grant No.2013FZ179, 2014FB040)

*Corresponding author: Tel: +86-13987160360, E-mail: huludeng@126.com

网络出版时间: 2019-12-11 11:29:40 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1129.032.html>

表面溃疡性疾病,而CD是涉及从口腔到肛门的透壁性疾病。IBD一直是全球医疗保健问题,在成人和儿童中,发病率不断增加^[1]。IBD在西方国家更为普遍,发病率为0.5%,在亚洲国家的发病率也正在迅速增加^[2]。IBD的临床表现主要以腹痛、腹泻、黏液血便、贫血和消瘦为主,甚至出现各种全身并发症,如视物模糊、关节疼痛、皮疹等。严重影响患者的生活质量,而不断增多的IBD患者无疑将对全球医疗保健形成严峻挑战。

1.2 IBD的病因和发病机制

IBD的病因和发病机制尚不清楚,多数研究人员认为,肠道感染、肠黏膜屏障损伤、肠黏膜免疫调节异常以及遗传和环境因素都参与发病过程^[3]。IBD是一种多基因相关的疾病,其自身易感位点分布于第1、3、4、5、6、7、10、12、14、16、19号和X染色体上。2001年,Hugot等^[4]证实,IBD的第一个易感基因是*NOD2/CARD15*,随后又逐渐发现了很多其他的易感基因(如*ATG16L1*、*IL-23R*、*OCTN*、*DLG15*)。易感基因*NOD2/CARD15*的位点突变使IBD患者体内合成大量的NOD蛋白,蛋白受体(TOIL和CD14)识别NOD蛋白以后,会将信号传递给TNF受体蛋白,使之激活核转录因子NF- κ B,引起炎症细胞因子的增多,从而诱发IBD^[5]。

肠道免疫系统会对自身抗原以及外来抗原产生异常反应而造成IBD,其特点是在易感宿主中免疫反应过度^[6]。此外,由于缺乏具有免疫调节功能的细胞,如FoxP3⁺ Treg,肠黏膜的免疫耐受不能维持,进一步增加肠黏膜局部免疫反应,使肠黏膜免疫系统受损,从而诱发IBD。

肠黏膜屏障功能是指,防止肠内致病性抗原(如细菌、毒性物质、食物抗原、致癌物)侵入,以保持相对稳定的内环境,维持正常身体活动。肠上皮细胞源自肠隐窝中的干细胞分化,具有有效的自我更新能力。肠黏膜屏障的重要组成部分是肠上皮细胞之间的紧密连接,当IBD发生时,肠上皮细胞之间紧密连接的功能受损,紧密连接蛋白(如claudin、occludin和交界黏附分子)的表达减少,肠道通透性增加,促使大量微生物和食物抗原被吸收,从而产生大量的促炎细胞因子(如IFN- γ 、IL-6、IL-1 β 和TNF- α)^[7],加剧了肠黏膜免疫损伤。

1.3 IBD的治疗现状

IBD的现有治疗包括控制活动性炎症和调节免

疫紊乱,常用药物包括氨基水杨酸制剂、糖皮质激素和免疫抑制剂等,短期缓解率介于70%~80%^[8],并且只能减轻其症状或抑制恶化,患者需要终身服药,这可能会导致药物依赖,患者后期会出现不良反应,对危重患者的疗效有限且不能彻底治愈^[9]。在过去的30年中,再生医学和干细胞生物学领域取得了巨大的进展。干细胞的再生和免疫调节潜力的最新发现和进展,为IBD治疗开辟了新的方向,并且干细胞移植治疗IBD在基础研究和临床试验方面均取得了一定成果。

2 干细胞移植在IBD治疗中的应用

干细胞(stem cells, SCs)是一组独特的未分化细胞,具有自我更新的能力,在某些生理或实验条件下分化为组织特异性细胞,形成具有功能的器官或组织。SCs根据来源分为胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和成体干细胞。近年来,干细胞移植在治疗自身免疫性疾病方面得到了进一步发展,为治疗IBD开辟了新道路。在IBD中,受损的肠组织和免疫系统都需要修复。只有SCs可以同时修复受损肠道组织并纠正免疫异常,以保持相对稳定的内部环境和正常的生理功能^[10]。肠道环境包括隐窝和壁龛,支持传入的SCs,使其能够植入并分化^[11],可以有效地治疗IBD。

2.1 造血干细胞移植

造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)是从骨髓、脐带或外周血中分离出来的干细胞,具有自我更新能力,可分化为血液中各种类型细胞。用HSCs移植治疗IBD时,HSCs能定植于肠黏膜损伤处,并分化为肠上皮细胞,同时修复肠损伤^[12]。HSCs还具有免疫调节的作用,可以产生免疫原性较低的细胞以减轻肠道免疫反应。

HSCs治疗IBD的机制可能有以下几个方面。(1)HSCs加速肠黏膜修复再生。(2)HSCs参与调节T淋巴细胞,重置免疫系统。T淋巴细胞功能异常会导致IBD的发生,CD呈现Th1/Th17样反应,会释放IL-2、INF- γ 和TNF等引发炎症反应;而UC呈现Th2样反应的特征,会释放IL-4、IL-5、IL-6、IL-10和IL-13等增强免疫应答。HSCs移植可摧毁异常T淋巴细胞的免疫系统,并产生新的具有免疫耐受的T淋巴细胞种群,从而修复免疫损伤。(3)HSCs修复异常基因。彭凯玥等^[13]用脐血干细胞(一种特殊的HSCs)移植治疗

*IL-10RA*基因突变导致的早发型IBD, 通过Sanger测序和蛋白功能验证, 发现*IL-10RA*基因突变位点被修复, *IL-10*信号通路恢复正常, 患者移植11个月以后, 病情得到缓解, 且无相关并发症发生。

1993年, Drakos等^[14]报道了第一例伴有CD的淋巴瘤患者, 在接受异基因HSCs移植后病情有所改善。Ditschkowski等^[15]使用同种异体HSCs移植治疗7例CD患者和4例特发性UC患者, 移植后34个月的随访结果显示, 10例患者存活, 除1例患者在移植后早期出现轻度CD症状外, 所有患者均未在移植后发生IBD。相关的治疗报道有很多, 其治疗效果也得到了肯定。但也有部分病例在异基因HSCs移植后出现结肠炎和溃疡症状^[16], 这可能与移植抗宿主反应有关。因此, 我们需要在临床研究中进一步证明其安全性。

2.2 间充质干细胞移植

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一种多能干细胞, 主要有骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)和脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ASCs), 在体内可分化成多种特殊的组织谱系, 如成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和心肌细胞, 且具有组织迁移、免疫调节和调控炎症反应等功能。MSCs的免疫原性很低, 非常适于临床移植治疗, 并且很容易提取和培养, 又适用于自体移植, 具有很好的应用前景。

MSCs治疗IBD的机制可能有以下几个方面。(1) MSCs能特异性迁移并种植到受损伤组织部位, 在那里可成功分化为功能性细胞以替换受损或患病的细胞。研究发现, CCR2、CXCR4、VCAM1和MMP2等贩运分子可促进MSCs归巢^[17]。(2) MSCs治疗能够抑制Th1/Th17细胞活性并增强肠系膜淋巴结中的Treg细胞, 并伴有促炎细胞因子(如IFN- γ 、IL-17、IL-6、和TNF- α)和抗炎细胞因子IL-10的升高, 促进组织愈合, 下调黏膜免疫反应性^[18]。(3) MSCs通过调节降低巨噬细胞中15-LOX-1、IL-6和p-STAT3的表达, 使*IL-10*基因的表达增加从而减轻IBD的症状^[19]。

Cho等^[20]向10名CD患者体内注射剂量不同的ASCs, 3名患者显示瘘管完全愈合, 另外7名患者显示瘘管部分愈合。Ciccocioppo等^[21]招募10名患者接受自体BMMSCs局部注射, 结果7例完全治愈, 3例部分治愈。MSCs的分化潜能也增加了肿瘤发生的几率, Wu等^[22]建立的Balb/C小鼠体内模型研究证实, MSCs

条件培养基通过AMPK/mTOR介导的NF- κ B激活, 提高结肠直肠癌细胞侵袭和增殖的能力, 促进结肠直肠癌的进展。关于MSCs移植安全性, 目前尚无定论, 需要深入研究MSCs组织重塑的精确机制。此外, 还需要针对MSCs的分离扩增、给药剂量和安全控制的优化标准来建立研究内或国家内比较。

2.3 肠道干细胞移植

肠上皮组织是成年哺乳动物中最活跃的组织之一, 肠上皮细胞每4~5天更新一次^[23], 其过程依赖于肠道干细胞(intestinal stem cells, ISCs)不断分裂和补充。ISCs属于成体干细胞, 位于肠道的隐窝基底部, 在肠黏膜修复损伤中发挥重要作用, 是修复治疗IBD的最佳干细胞来源。Fukuda等^[24]已经将ISCs移植到肠黏膜受损的实验小鼠中, 成功改善了黏膜愈合。但是ISCs数量有限, 无法进行长期的体外培养和增殖, 在治疗IBD时, 存在许多困难。近年来, 已经建立了人类和啮齿类动物胃肠干细胞培养体系^[25], 应开发更多二维和三维培养方案、共培养技术和生长培养基组合物, 来寻求富集干细胞群的技术。为IBD等难治性胃肠疾病做进一步的研究。

2.4 诱导性多能干细胞移植

日本研究人员Takahashi和Yamanaka^[26]利用逆转录病毒介导的4种转录因子基因(*Oct4*、*Sox*、*Myc*和*Klf4*)转导至小鼠皮肤成纤维细胞中, 将其重编程为一类新的干细胞, 称之为诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs), 具有与ESCs相似的形态、功能和基因表达。以iPSCs作为研究对象避免了ESCs研究面临的伦理和法律问题, 同时自体移植也避免了免疫排斥的问题。Spence等^[27]利用iPSCs获得与人类肠道组织非常相似的三维肠道有机体, 经一系列的诱导培养最终分化出肠上皮细胞。iPSCs可产生组织特异性细胞^[28-29]。研究发现, 由iPSCs衍生的MSCs(iMSCs)在IBD小鼠模型中与ASCs一样有效, iMSCs的施用还刺激肠道上皮细胞增殖, Lgr5⁺肠干细胞数量增加, 肠血管生成增加^[30]。尽管iPSCs被认为与ESCs具有非常相似的特征有关, 但与ESCs相比, iPSCs在基因表达、表型特征、增殖、分化、凋亡和衰老方面并不完全相同。因此, 移植iPSCs是否与人ESCs一样有效尚不清楚, 需要在临床应用之前进一步确认。

2.5 孤雌胚胎干细胞移植

孤雌胚胎干细胞(parthenogenetic embryonic stem

cells, pESCs)来源于未经受精的卵母细胞人工孤雌激活的胚胎, pESCs细胞系在增殖、活性和定向分化潜能方面与ESCs细胞相似, 在适当的条件下, 可诱导分化为三个胚层的组织细胞。王志强^[31]利用人孤雌胚胎干细胞已成功诱导出肠上皮干细胞, 为治疗IBD提供了新思路。pESCs细胞还具有降低畸胎瘤形成的潜力^[32], 并且其体外培养和诱导分化没有伦理问题, 是治疗IBD的一个理想细胞来源。

3 结论

IBD的治疗面临巨大的挑战, 干细胞疗法被认为是修复炎症性损伤和重建免疫系统的一种有价值的方法, 其不损伤器官, 感染的风险也大大降低。在基础研究和临床试验中, 不同类型的干细胞均被用于IBD, 现有的HSCs移植和MSCs移植的研究是令人兴奋的, 临床试验证实干细胞移植对难治性IBD有一定效果, 并能够使部分患者长期维持缓解, 改善患者的生活质量, 这将对IBD的治疗提供很大的帮助。但是, 目前干细胞移植仍面临巨大的挑战, 临床试验研究缺乏说服力, 存在一定的复发率, 并且增加了肿瘤发生的几率。在以后的研究中应该确定最佳的干细胞类型、给药途径和剂量以提高干细胞归巢的效率, 降低其免疫排斥, 促使干细胞在受损肠道中的生存并发挥其作用, 以进一步了解干细胞疗法的效用与其治疗医学和外科手术难治性IBD的风险之间的关系。

参考文献 (References)

- Loddo I, Romano C. Inflammatory bowel disease: genetics, epigenetics, and pathogenesis. *Front Immunol* 2015; 6: 551.
- Fei M, Qiang T, Li W, Chu F, Xia L, Li HS, *et al.* Mesenchymal stem cells and their therapeutic applications in inflammatory bowel disease. *Oncotarget* 2017; 8(23): 38008-21.
- Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 2011; 474(7351): 298-306.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411(6837): 599-603.
- Nicolas B, Aguirre JE, Hans-Christian R, Ramnik X, Podolsky DK. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* 2005; 170(1): 21.
- Salem GA, Selby GB. Stem cell transplant in inflammatory bowel disease: a promising modality of treatment for a complicated disease course. *Stem Cell Investig* 2017; 4: 95.
- Henderson P, Van Limbergen JE, Schwarze J, Wilson DC. Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 17(1): 382-95.
- Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012; 380(9853): 1590-605.
- Saniabadi AR, Tanaka T, Ohmori T, Sawada K, Yamamoto T, Hanai H. Treating inflammatory bowel disease by adsorptive leucocytapheresis: a desire to treat without drugs. *World J Gastroenterol* 2014; 20(29): 9699-715.
- Singh UP, Singh NP, Singh B, Mishra MK, Nagarkatti M, Nagarkatti PS, *et al.* Stem cells as potential therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *Front Biosci* 2010; 2(2): 993.
- Lanzoni G, Roda G, Belluzzi A, Roda E, Bagnara GP. Inflammatory bowel disease: moving toward a stem cell-based therapy. *World J Gastroenterol* 2008; 14(29): 4616-26.
- Gazouli M, Roubelakis MG, Theodoropoulos GE. Stem cells as potential targeted therapy for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014; 20(5): 952-5.
- 彭凯玥, 钱晓文, 吴冰冰, 黄志恒, 芦军萍, 翟晓文, 等. 脐血干细胞移植治疗白介素10受体A基因突变导致的极早发型炎症性肠病1例病例报告并文献复习. *中国循证儿科杂志(Peng Kaiyue, Qian Xiaowen, Wu Bingbing, Huang Zhiheng, Lu Junping, Zhai Xiaowen, et al. A case report and literature review of umbilical cord blood stem cell transplantation for the treatment of very early-type inflammatory bowel disease caused by interleukin 10 receptor A gene mutation Chinese Journal of Evidence-based Pediatrics)* 2016; 11(3): 171-6.
- Drakos PE, Nagler A, Or R. Case of Crohn's disease in bone marrow transplantation. *Am J Hematol* 1993; 43(2): 157-8.
- Ditschkowski M, Einsele H, Schwerdtfeger R, Bunjes D, Trensche R, Beelen DW, *et al.* Improvement of inflammatory bowel disease after allogeneic stem-cell transplantation. *Transplantation* 2003; 75(10): 1745-7.
- Eivindson M, Nielsen JN, Grønbaek H, Flyvbjerg A, Hey H. The insulin-like growth factor system and markers of inflammation in adult patients with inflammatory bowel disease. *Horm Res* 2005; 64(1): 9-15.
- Ko IK, Kim BG, Awadallah A, Mikulan J, Lin P, Letterio JJ, *et al.* Targeting improves MSC treatment of inflammatory bowel disease. *Mol Ther* 2010; 18(7): 1365-72.
- Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, *et al.* Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell* 2012; 10(5): 544-55.
- Mao F, Wu Y, Tang X, Wang J, Pan Z, Zhang P, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate inflammatory bowel disease through the regulation of 15-LOX-1 in macro-phages. *Bio-technol Lett* 2017; 39(6): 929-38.
- Cho YB, Lee WY, Park KJ, Kim M, Yoo HW, Yu CS. Autologous adipose tissue-derived stem cells for the treatment of Crohn's fistula: a phase I clinical study. *Cell Transplant* 2013; 22(2): 279-85.
- Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, *et al.* Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut* 2011; 60(6): 788-98.
- Wu XB, Liu Y, Wang GH, Xu X, Cai Y, Wang HY, *et al.* Mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through AMPK/mTOR-mediated NF- κ B activation. *Sci Rep* 2016; 6: 21420.

- 23 Quyn AJ, Appleton PL, Carey FA, Steele RJ, Barker N, Clevers H, *et al.* Spindle orientation bias in gut epithelial stem cell compartments is lost in precancerous tissue. *Cell Stem Cell* 2010; 6(2): 175-81.
- 24 Fukuda M, Mizutani T, Mochizuki W, Matsumoto T, Nozaki K, Sakamaki Y, *et al.* Small intestinal stem cell identity is maintained with functional paneth cells in heterotopically grafted epithelium onto the colon. *Genes Dev* 2014; 28(16): 1752-7.
- 25 PhD MWM. Retraction: adult tissue stem cell therapy for gastrointestinal diseases by mamoru watanabe. *J Gastroenterol Hepatol* 2018; 33(1): 175-81.
- 26 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 27 Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, *et al.* Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature* 2011; 470(7332): 105-9.
- 28 Ferreira AF, Calin GA, Picançoastro V, Kashima S, Covas DT, De FC. Hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells: considering the role of microRNA as a cell differentiation regulator. *J Cell Sci* 2018; 131(4): jcs203018.
- 29 Luzzani CD, Miriuka SG. Pluripotent stem cells as a robust source of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2017; 13(1): 68-78.
- 30 Soontarak S, Chow L, Johnson V, Coy J, Wheat W, Regan D, *et al.* Mesenchymal stem cells(MSC) derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) equivalent to adipose-derived MSC in promoting intestinal healing and microbiome normalization in mouse inflammatory bowel disease model. *Stem Cells Transl Med* 2018; 7(6): 456-67.
- 31 王志强. 人孤雌胚胎干细胞诱导分化为肠上皮干细胞的研究. 昆明医科大学(博士论文), 2013.
- 32 Tao H, Chen X, Wei A, Song X, Wang W, Liang L, *et al.* Comparison of teratoma formation between embryonic stem cells and parthenogenetic embryonic stem cells by molecular imaging. *Stem cells Int* 2018; 2018: 7906531.