

## 干细胞在特发性肺纤维化治疗中的研究与应用综述\*

冯小蓉<sup>1,2</sup>, 尧捷<sup>1,2</sup>, 吴涯<sup>1</sup>, 程霞<sup>1</sup>, 邹坪金<sup>1,2</sup>, 王华<sup>1,2</sup>, 杨牧<sup>1,2△</sup>

1. 电子科技大学医学院附属肿瘤医院 肿瘤基础转化研究中心(成都 610041); 2. 电子科技大学医学院(成都 610041)

**【摘要】** 特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一类呈急性或慢性进展的不可逆肺部疾病,最终会导致患者肺功能严重损害乃至死亡。目前,肺纤维化的发病机理尚不明确,无有效的治疗手段延缓病情进展。研究显示,干细胞作为机体的起源细胞,不仅参与机体各阶段的发育,在肺损伤修复方面也发挥重要作用。作为再生医学领域的明星细胞,干细胞移植为IPF的治疗提供了全新的思路。本文将结合现阶段国内外干细胞移植治疗IPF的最新动态,综述干细胞移植在IPF治疗中的机制研究与应用探索前沿。

**【关键词】** 特发性肺纤维化 干细胞移植治疗 定向分化 组织微环境

**Research and Application of Stem Cell-Based Therapy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Review** FENG Xiaorong<sup>1,2</sup>, YAO Jie<sup>1,2</sup>, WU Ya<sup>1</sup>, CHENG Xia<sup>1</sup>, ZOU Ping-jin<sup>1,2</sup>, WANG Hua<sup>1,2</sup>, YANG Mu<sup>1,2△</sup>. 1. Centre for Basic and Translational Research in Cancer, Sichuan Cancer Hospital & Institute, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, China; 2. School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: mu.yang@uestc.edu.cn

**【Abstract】** Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a type of pulmonary disease that progresses acutely or slowly into irreversible pulmonary diseases, resulting in the end severe damages to patients' lung functions, as well as deaths. At present, the pathogenesis of pulmonary fibrosis is still not clear and there is no effective therapeutic measure available to control the progression of the disease. Research findings indicate that stem cells, being the origin of all cells of organisms, participate in the development of individuals at various stages and play an important role in repairing pulmonary tissue damage. Stem cells are attracting growing attention in the field of regenerative medicine, providing new ideas for treating IPF with transplanted stem cells. Herein, in order to better explore the potential applications of stem cell transplantation in treating IPF, we attempt to summarize preliminary studies of stem cell-mediated pulmonary remodeling after IPF, as well as cutting-edge clinical trials in stem cell-based IPF therapy.

**【Key words】** Idiopathic pulmonary fibrosis Stem cell transplantation therapy Directional differentiation Tissue microenvironment

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一类病因不明,呈急性或慢性进展的纤维化间质性肺部疾病(interstitial lung diseases, ILDs)。组织学和(或)胸部高分辨率CT(high-resolution CT, HRCT)特征性表现为普通型间质性肺炎(usual interstitial pneumonia, UIP),临床表现以肺功能的进行性损伤、杵状指为主,并常常伴有心血管疾病的发生<sup>[1]</sup>。由于具有起病隐匿、进行性加重和病情不可逆等特点,IPF患者平均生存期仅为2.8年,死亡率高于大部分肿瘤疾病,被称为“类肿瘤疾病”<sup>[2]</sup>。据统计,全球约有500万IPF患者,随着近年环境污染、病原微生物暴露风险以及人口老龄化等肺部损伤因素的增加,其发病率呈逐渐上升趋势<sup>[3]</sup>。尤其我国人口老龄化与环境污染问题凸显,除已确诊的中晚期IPF患者以外,还存在大量IPF早期患者以及隐匿人群,IPF逐渐成为严重威

胁我国公共卫生健康的疾病之一。

针对IPF的诊断,目前主要依靠胸部HRCT及外科活检。HRCT呈现为典型的UIP,以胸膜下、基底部分布为主的蜂窝状改变或不伴牵拉支气管扩张。与此同时,在组织病理学上除了具有免疫细胞浸润、II型肺泡上皮细胞(alveolar epithelial type II cells, AEC II)以及细支气管上皮细胞增生等与其他间质性肺炎类似的特点,IPF还呈现特征性的成纤维细胞灶、明显纤维化或蜂窝肺<sup>[4]</sup>。最新的机制研究显示,IPF的发生与肺泡上皮细胞损伤后的异常修复密切相关<sup>[5]</sup>。当肺泡上皮细胞被反复刺激或长期处于慢性炎症环境时,其与肺间质细胞间的互作增强,肺泡区域产生间质细胞募集,导致胞外基质增生、肺泡壁增厚、肺顺应性降低,最终造成进行性的不可逆损伤<sup>[4]</sup>。尽管肺活检对于IPF的诊断意义重大,但多数患者在疾病早期往往未进行有效的病理相关检测,其发生发展的具体过程至今未明。目前针对进展性IPF的一线方案为吡非尼酮(pirfenidone)和尼达尼布(nintedanib)等药

\* 中国科技部重点研发计划(No. 2018YFA0108604)和四川省国际科技创新/港澳台科技创新合作重点项目(No. 2020YFH0167)资助

△ 通信作者, E-mail: mu.yang@uestc.edu.cn

物的联合治疗<sup>[6-7]</sup>。研究显示,52周的治疗能显著降低纤维化的进展以及局部炎症的发生,改善肺功能并延长无进展生存期,降低死亡风险<sup>[6-7]</sup>。尽管如此,由于肺部纤维化不可逆的病理特性,该治疗方案在改善终末期IPF患者肺部功能以及生活质量等方面的效果十分有限,尤其对抑制病情持续性进展上无明显作用<sup>[6-7]</sup>。

干细胞作为再生医学领域的明星细胞,在参与心脑血管的损伤修复和对呼吸系统内环境稳态的维持与再生方面具有重要作用<sup>[8]</sup>。近年来,干细胞治疗IPF的相关研究受到极大关注。本文将围绕该领域的研究前沿,从作用机制、临床策略以及最新应用3个方面,深入阐述干细胞治疗IPF的最新成果和发展趋势。

## 1 干细胞与干细胞治疗

干细胞是存在于机体中具有自我更新能力以及多向分化潜能的细胞。在正常发育、生理或病理损伤情况下,干细胞可以被激活和动员,通过定向分化以及旁分泌作用重建组织结构、恢复器官功能。作为个体发育的“起源细胞”与组织再生的“万能细胞”,干细胞以其独特的生物学活性和兼容性,在细胞修复和治疗领域发挥不可替代的优势。自上世纪90年代开始,以干细胞为基础的疾病治疗相关研究就已在全世界范围内广泛开展。例如髓心减压术联合局部移植单个核细胞或骨髓细胞加速骨组织重建、修复骨缺损,介导大面积骨伤的愈合<sup>[9]</sup>。同时,干细胞回输对核酸氧化分解与内源性嘌呤生成具有显著抑制作用,从而极大地降低尿酸指数,缓解痛风相关临床症状<sup>[10]</sup>。另外,在干细胞治疗心肌梗塞的临床试验中,急性心肌梗死患者在治疗后,左心射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)较治疗前升高35%<sup>[11]</sup>。同样,干细胞在肿瘤、IPF和糖尿病等重大慢病的症状改善和预后方面也有积极的效果<sup>[12]</sup>。截止目前,基于干细胞的疾病治疗已逐渐从实验室探索走向临床应用,虽然相关试验还处于早期阶段,但是毫无疑问,与大部分传统治疗方式相比,干细胞治疗在特异性、有效性和副作用等方面具有先天优势。

## 2 IPF的干细胞治疗

### 2.1 用于IPF治疗的干细胞

目前,用于IPF治疗的干细胞类别较为广泛,包括肺源性干细胞,骨髓、脂肪、胎盘等来源的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),循环内皮祖细胞(circulating endothelial progenitor cells, EPCs),胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)以及诱导性多能干细胞

(induced pluripotent stem cells, iPSCs)等。其中,肺源性干细胞和骨髓来源的MSCs最为常见<sup>[13]</sup>。

肺源性干细胞是指存在于气管、支气管、肺泡或肺间质中具有自我更新能力以及分化潜能的细胞,例如可以向AEC I分化的AEC II。SERRANO-MOLLAR等<sup>[14]</sup>发现,在对博来霉素诱导的肺纤维化大鼠模型进行AEC II移植治疗后,大鼠肺部纤维化减少、肺疤痕面积减少、体质量回升速率加快、羟脯氨酸含量降低。同时AEC II移植还能有效减轻肺水肿、胶原沉积以及抑制免疫细胞浸润等促进肺纤维化进程的因素。除了天然存在的AEC II外,经iPSCs与骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived stem cells, BMSCs)等体外诱导的AEC II也具有降低肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素6(interleukin 6, IL-6)等炎症因子水平、延缓IPF的作用<sup>[15-16]</sup>。以上系列研究表明,AEC II移植对肺部纤维化进程的控制与其细胞来源无显著相关性。但相较天然的AEC II,诱导型AEC II在体外培养过程中可能发生干性丢失、突变以及瘤化等现象,增加AEC II移植治疗后肺部恶性肿瘤发生的风险<sup>[17-18]</sup>。综上所述,从安全性角度出发,相较于诱导型AEC II,天然AEC II的移植在IPF治疗中更具优势。

除了AEC II之外,来源于中胚层的BMSCs因分化能力强、免疫原性低且无伦理学冲突等特点,也逐渐成为IPF干细胞治疗研究中的“种子细胞”。最新研究表明,IPF患者BMSCs出现线粒体结构紊乱、DNA受损、迁移能力下降以及增殖和分化水平降低等特征<sup>[19]</sup>,即患者BMSCs为典型的衰老状态。当采用亚致死辐照剂量(5 Gy)对BMSCs功能进行抑制之后,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)介导的急性肺损伤小鼠由于BMSCs自我修复能力降低,导致严重的肺泡扩张以及肺水肿<sup>[20]</sup>。以上表现说明BMSCs功能的丧失可能与IPF进展呈正相关。与之相反,具有正常生理功能的BMSCs对于维持和稳定IPF患者无进展生存有良好的促进作用<sup>[19]</sup>。在LPS介导的急性肺损伤小鼠模型中观察到,大量BMSCs在第7天从骨髓迁移至肺部炎症区域,分化形成Cytokeratin(Krt)<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>型肺泡上皮细胞以及CD34<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>型肺毛细血管内皮细胞,重建肺部炎症区域组织结构<sup>[20]</sup>。

当肺部损伤程度过大或出现骨髓抑制等并发症时,自体的BMSCs不足以完成组织修复,干细胞移植则成为IPF治疗的最佳选择。在博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型中,粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)与粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,

GM-CSF)等干细胞归巢相关蛋白水平上调,募集供体来源的BMSCs归巢至损伤的肺实质区域并重建纤维化区域的肺部功能。除此之外,募集的供体来源BMSCs还能降低博来霉素引起的骨髓抑制效应<sup>[21]</sup>。基于以上作用,肺纤维化小鼠的14 d生存率由35%大幅提升至100%<sup>[21]</sup>。

综上所述,AEC II 移植治疗在减缓和修复肺部纤维化、减轻肺水肿、胶原沉积以及抑制非特异性免疫反应上有非常显著的效果。异体BMSCs移植治疗不仅可以有效地修复肺部急性损伤和改善肺部慢性纤维化,还能提高干细胞在患处的募集能力以及提高骨髓活性。AEC II 以及BMSCs等干细胞在治疗IPF上有广阔的应用前景。

## 2.2 干细胞治疗IPF的分子机制

**2.2.1 干细胞的定向分化** 定向分化作为干细胞进行损伤修复的经典途径之一,在IPF治疗过程中意义重大。有研究指出,当肺部遭受急性损伤后,支气管远端干细胞(distal airway stem cells, DASCs)可以迁移分化形成AEC II 以及支气管分泌细胞。同时AEC II 也具有向AEC I 定向分化的能力,干细胞的定向分化及时补充了损伤区域的细胞丢失,促进损伤组织结构与功能的重建<sup>[22]</sup>。进一步,该团队在转录因子Trp63与Krt5双阳性的DASCs(DASCs<sup>P63/Krt5</sup>)回输治疗肺损伤小鼠过程中发现,DASCs<sup>P63/Krt5</sup> 不仅能在供体小鼠内长期存活,并在3个月内分化形成新的微支气管以及肺泡细胞,DASCs<sup>P63/Krt5</sup>的移植加速了肺组织再生和肺功能恢复<sup>[22]</sup>。另一方面,基于BMSCs移植治疗肺损伤的研究也证实,在移植BMSCs<sup>GFP</sup>后的14 d,损伤灶新生肺上皮细胞表达GFP,进而明确了BMSCs定向迁移和分化的时间与路径<sup>[21]</sup>。

干细胞向肺部募集以及定向分化的过程主要受到Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、Hedgehog以及缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1 $\alpha$ )/Notch等多种信号通路的调控<sup>[23-25]</sup>。在生理条件下,处于静息状态的AEC II 表达Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路的关键调节蛋白Axin2,而微环境中的成纤维细胞则大量分泌其配体Wnt5。当AEC II 胞内Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路被激活后,干细胞维持静息状态<sup>[26]</sup>。而在病理状态下,AEC II 的大量增殖与子代细胞的归巢引起微环境中Wnt5相对浓度降低,Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路关闭,AEC II 则分化为AEC I <sup>[26]</sup>。基于类器官三维培养的相关研究进一步发现,AEC II 定向分化还依赖于pdz结合基序转录共激活蛋白(transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif, TAZ)。当AEC II 中的TAZ活性受到抑制或被条件性敲除后,小鼠对博来霉素的敏感性增加,病灶处AEC I 的数量减少,小鼠肺部纤

维化进展加重<sup>[27]</sup>。作为Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路中的关键负反馈调节蛋白,TAZ可以通过与 $\beta$ -catenin或蓬乱蛋白(disheveled, Dsh)结合,阻断信号通路的激活,从而介导AEC II 定向分化<sup>[28]</sup>。然而,最新研究证实异常激活状态下的Wnt/ $\beta$ -Catenin信号通路不但不能维持AEC II 的干性,反而促进肺源性间充质干细胞向肌成纤维细胞分化,加速IPF发展<sup>[29]</sup>。因此,在后续的机制研究当中,除了阐明如何调动干细胞的定向分化以外,其定向分化的相关机理也值得进一步探索。

**2.2.2 干细胞相关旁分泌作用** 干细胞的旁分泌功能具有稳定微环境、维持干性以及促进定向分化等积极作用,而微泡(外泌体)、免疫相关因子以及生长因子等旁分泌产物则是参与上述干细胞功能的主要载体。TAN等<sup>[30]</sup>发现人羊膜来源干细胞在分化形成肺泡上皮细胞过程中,能分泌大量外泌体(human amnion epithelial cell-derived exosomes, hAEC Exo),其中包含多种细胞因子,参与调控包括丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、凋亡与发育、磷脂酰肌醇-3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt)、Ras蛋白(rat sarcoma, RAS)、Hippo、转录生长因子 $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ )以及细胞黏附等多类信号通路。基于干细胞旁分泌功能与机理的研究逐渐成为继定向分化后该领域的主要研究方向。

有证据表明,干细胞通过旁分泌作用改变免疫细胞的状态,进而影响宿主免疫系统以及移植部位的免疫微环境<sup>[31-32]</sup>。在体外研究中,局部炎症显著活化BMSCs并使其分泌前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)、吲哚胺-吡咯2,3-双加氧酶(indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase, IDO)、TGF $\beta$ 1、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、IL-10等细胞因子,以及CXCR3、CCR5等趋化因子。以上因子除了募集巨噬细胞、NK细胞、T细胞和B细胞等免疫细胞向干细胞定向迁移外,还能阻止非特异性炎症的产生,进而形成免疫抑制屏障<sup>[33-37]</sup>。深入研究发现,PGE2的大量分泌通过阻断树突状细胞介导的抗原呈递来降低移植部位T细胞的增殖活性与细胞毒性<sup>[36]</sup>。另外,PGE2还对NK细胞的活化以及细胞毒性有良好的抑制作用<sup>[38]</sup>。而IDO不仅可以抑制T细胞与NK细胞的免疫功能,还能显著下调B细胞的增殖与分化,避免抗体分泌型浆细胞的大量形成<sup>[36, 39-40]</sup>。体内实验的最新数据表明,脂肪来源间充质干细胞移植治疗小鼠急性肝炎可以减少CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>巨噬细胞和TNF<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T细胞的数量,从而减轻肝脏炎症的程

度<sup>[41]</sup>。除此之外,在胎盘间充质干细胞移植治疗博来霉素引起的小鼠IPF模型中同样发现,病灶处TNF和IL-1 $\beta$ 等促炎细胞因子水平降低,局部炎症得到缓解<sup>[42]</sup>。基于以上研究成果,干细胞移植所带来的旁分泌效应被认为是治疗多种免疫性疾病与慢性炎症疾病的潜在手段。

值得一提的是,干细胞的旁分泌作用还能通过阻止上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)来有效缓解IPF<sup>[43]</sup>。有证据显示,BMSCs的旁分泌作用促进了肺泡上皮细胞表达闭锁连接蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)、上皮细胞钙粘蛋白(E-cadherin, E-cad)、细胞角蛋白19(cytokeratin19, Krt19)和甲状腺转录因子1(thyroid transcription factor-1, TTF-1)等上皮细胞标记物,同时抑制间质细胞标记物波形蛋白(vimentin)、 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -Smooth actin,  $\alpha$ -SMA)的表达<sup>[44]</sup>。而在兔宫腔黏连模型中更是直观地观察到,BMSCs所分泌的外泌体能显著延缓EMT<sup>[44]</sup>。已知TGF- $\beta$ 是个体发育的关键蛋白,能通过Smad或非Smad两种途径促进纤维化的发生<sup>[45]</sup>,其相关信号通路网络,如受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)、Notch、Wnt以及Integrin等信号通路等在EMT中发挥重要作用<sup>[46-48]</sup>。上述模型的纤维化病变组织中,BMSCs产生的外泌体不仅降低TGF- $\beta$ 1及其受体,以及下游信号蛋白的mRNA表达水平,还显著抑制了相关信号蛋白的磷酸化水平<sup>[43]</sup>。

除此之外,干细胞定植还能增加Nrf2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)局部浓度,促进血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)和 $\gamma$ -谷氨酸半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase,  $\gamma$ -GCS)的活性,并清除氧自由基(ROS),以此抑制氧化应激的水平,进而改善胞外基质的沉积以及成纤维细胞增生所导致的微环境障碍<sup>[49]</sup>。

综上所述,无论是干细胞定向分化对肺部功能的恢复,还是定植后旁分泌带来的炎症抑制、抗EMT或抑制氧化应激,都对IPF转归有非常积极的意义。但是,由于参与的细胞种类繁多,功能复杂,并涉及多个信号通路(网络)的转导,因此其分子机制的探索工作亟待开展。

### 3 干细胞治疗IPF的策略

无论从理论基础还是大部分临床试验结果来看,干细胞在IPF治疗中展现了巨大的临床应用前景。然而,目前在干细胞来源、回输途径、回输剂量,乃至移植窗口的选择上还存在较大争议,仍值得探讨。

#### 3.1 干细胞治疗IPF的回输途径

在IPF治疗中,干细胞的回输方式往往决定了其在进入体内后的微环境,这无疑对于干细胞的存活、迁移、增

殖和分化意义重大,也是影响IPF预后的关键因素<sup>[50]</sup>。从目前的动物实验以及预临床试验来看,最常用的移植方式包括静脉回输、腹腔注射以及气管雾化<sup>[51-52]</sup>。而针对干细胞特异性、肺组织定植效率以及干细胞分化效率等多方面而言,静脉回输和气管雾化最为理想<sup>[13]</sup>。

干细胞治疗IPF的静脉回输指供体干细胞通过血液循环到达肺组织并形成定植,以定向分化或形成微环境的方式对受损病灶进行修复<sup>[51]</sup>。与常规治疗药物相似,干细胞进入体内后也存在首过效应,得益于肺组织强大的脉管系统,经静脉回输的干细胞在进入血液后会被肺组织捕获,随后逐渐在肺组织中富集和定植<sup>[51]</sup>。基于此,干细胞的静脉注射是治疗IPF较为理想的移植路径。

气管雾化则是指将干细胞悬液处理形成雾化颗粒,以气道吸入的方式进入到支气管,随后自由迁移到肺部<sup>[52]</sup>。就IPF的特点而言,气管雾化的优势在于干细胞能更加直接地到达靶器官,减少其与其他脏器滞留带来的副作用以及其他不可控因素<sup>[52]</sup>。因此,气管雾化也是一种干细胞治疗IPF的常用回输路径。

尽管如此,无论是静脉回输还是气管雾化,都存在一定局限性。例如在静脉回输过程中,干细胞不可避免的会浸润到肺部微血管,而微血管内皮细胞屏障会大幅降低干细胞向病灶组织的迁移与定植<sup>[53]</sup>。此外,在气管雾化过程中,为了保证干细胞的活性和浓度等因素,其对于缓冲液的选取、雾化液滴的大小和液滴的喷射距离等参数都需要基于疾病的进展周期和患者的临床特征进行优化,由此带来时间与经济成本也需要慎重考量<sup>[54]</sup>。

#### 3.2 干细胞回输治疗IPF的剂量选择

有别于传统药物的剂量爬坡试验,干细胞回输剂量对治疗所带来的副作用更小。在干细胞治疗急性心肌梗塞患者的临床试验中,以静脉回输的方式分别给予患者 $0.5 \times 10^6$ 、 $1.6 \times 10^6$ 以及 $5 \times 10^6$ 细胞/kg剂量的BMSCs后发现,与安慰剂组相比,除了部分心室早搏的患者对不同细胞剂量的耐受程度具有依赖性以外,低剂量组与高剂量组患者之间的副作用和不良反应率并无显著差异<sup>[55]</sup>。同样,在多个IPF的干细胞治疗临床试验中,干细胞回输的剂量选择也相对较宽,从 $5 \times 10^5$ 至 $2 \times 10^8$ 细胞/kg不等<sup>[21, 55]</sup>。从已公布的结果来看,IPF患者对以上剂量范围的骨髓来源、脂肪来源或胎盘来源的间充质干细胞都有较好的耐受性<sup>[55-56]</sup>。

除上述单次高剂量回输剂量外,针对干细胞多频次回输的临床试验也于最近开展<sup>[57]</sup>。在纳入中度快速进展期IPF患者的基础上,进行单次剂量为 $2 \times 10^8$ 细胞/kg,每6周1次的多频次MSCs静脉回输治疗。在为期96周的治

疗过程中,除了4例病情相对严重的患者由于IPF突进展导致呼吸衰竭去世外,未出现MSCs静脉回输治疗相关的超进展以及不良事件,说明多频次长周期回输治疗与单次高剂量回输治疗同样安全<sup>[57]</sup>。尽管如此,对不同进展周期以及存在其他基础疾病的IPF患者的干细胞静脉回输临床试验尚未开展,因此单次高剂量或(和)多频次长周期干细胞移植是否引起超进展,严重不良反应,乃至其他副作用还需要进一步探索。

### 3.3 干细胞治疗IPF的时间窗口

截止目前,对于IPF的干细胞治疗,并无确切、统一的时间窗口。不过对不同进展期的IPF动物模型进行干细胞治疗后发现,治疗时间窗口的选择对于预后尤为重要。比如在肺部损伤出现的24 h内进行干细胞移植,病灶处肺部组织修复和重建效果较好。而在损伤发生3 d后再进行治疗,干细胞不仅不会抑制胶原形成,甚至促进损伤病灶的纤维化<sup>[58]</sup>。然而,对于已经形成肺纤维化(损伤后15 d)的小鼠,AEC II的移植仍然具有减少纤维化水平的效果<sup>[14]</sup>。以上结果表明,时间窗口的不同,干细胞对肺部组织的修复与重建机制也存在差异。除了定向分化外,其对微环境和免疫的调节作用也至关重要。虽然目前对于干细胞移植的时间窗口与IPF患者预后的相关性研究仍处于起步阶段,但毫无疑问,不同的移植时间以及治疗窗口可能导致干细胞参与损伤肺组织修复与重建的机制截然不同,最终使治疗效果迥异。

### 3.4 影响干细胞回输治疗IPF的其他因素

除了对干细胞回输的途径、剂量的选择,以及时间窗口的关注外,移植辅助药物,包括免疫抑制剂、干性维持药物,乃至干细胞移植前基因修饰与改造也是当前本领域的研究热点之一<sup>[59-60]</sup>。但是,目前该方面的基础与临床研究多集中于改善神经系统和免疫系统疾病症状和功能<sup>[60]</sup>,而针对IPF相关症状,如肺部功能恢复、EMT的抑制,甚至肺部微环境重建等方面的多药联用和移植前细胞工程改造未见明确报道。因此,作为干细胞回输治疗领域不可或缺的一个方向,在保证安全的前提下,以临床应用和机制探索为目的相关工作应尽快开展。

## 4 干细胞治疗IPF的临床应用

目前,已有多项注册开展的干细胞治疗IPF的临床研究。CHAMBERS等<sup>[61]</sup>使用非血缘配对供者来源的胎盘来源间充质干细胞,以静脉输注的方式移植至中晚期IPF患者体内。纳入的8例患者标准为一氧化碳扩散能力( $DL_{CO}$ ) $\geq 25\%$ ,用力肺活量(FVC) $\geq 50\%$ ,输入剂量为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  细胞/kg。随访6个月的结果显示,除了轻微

急性炎症等不良事件发生外,所有患者对干细胞移植均耐受良好。而与治疗相关指标如血氧饱和度( $SaO_2$ ),虽然在移植后15 min有轻微下调,同时心率有短暂性下降,但血流动力学并无明显改变。此外,与治疗前相比, $DL_{CO}$ 、FVC以及6 min步行量(6MWB)无变化。另一项基于非血缘配对供者BSCs静脉回输治疗早中期IPF的临床研究中,随访60周显示,所有9例患者对移植的干细胞耐受良好,除2例患者分别在治疗后10周和29周分别由于与干细胞治疗无关的纤维化突发性进展发生死亡外。其余7例患者与治疗前相比,FVC预计值百分比(FVC%pred)均值下降3%,而 $DL_{CO}$ 预计值百分比( $DL_{CO}\% \text{ pred}$ )均值下降5.4%<sup>[12]</sup>。

以上结果表明,作为一种新兴的临床治疗手段,干细胞移植对IPF症状改善、转归和患者的生存周期以及生活质量均有积极的效果。基于干细胞移植治疗IPF的机制与临床应用的探索迫在眉睫。

## 5 展望

综上所述,干细胞移植后的定向分化以及对微环境和免疫的调节作用,在肺部损伤病灶的修复与组织功能重建过程中扮演重要角色,干细胞移植治疗为IPF患者的治愈与疾病转归带来了希望。但目前干细胞移植治疗IPF仍面临诸多挑战。首先是临床应用的安全性问题,尽管干细胞移植在预临床实验以及已开展的临床试验中都表现出较低的副作用和不良事件发生率,但局限于观察周期短和纳入样本量小等因素,因此长时间、大规模,乃至多中心的临床研究亟待开展。其次,如何基于干细胞培养、种类选择、回输方式、回输剂量以及移植时间建立完整统一的质控标准与标准操作流程,是保证干细胞移植治疗IPF安全性、稳定性和有效性的前提条件,也是大规模开展干细胞移植治疗IPF的基础。最后,我们还需要明确IPF的发生机制,探索疾病发展转归的原因,并利用干细胞在定向分化、微环境调节与炎症控制等功能,针对性的改善肺部损伤病灶处的病理性改变。干细胞作为再生医学领域的种子细胞,我们有理由相信干细胞移植必将在不久的将来成为治疗IPF一线方案。

\* \* \*

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参 考 文 献

- [1] VAN CLEEMPUT J, SONAGLIONI A, WUYTS W A, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis for cardiologists: differential diagnosis, cardiovascular comorbidities, and patient management. *Adv Ther*, 2019, 36(2): 298-317.

- [2] RAGHU G, REMY-JARDIN M, MYERS J L, *et al.* Diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198 (5): e44–e68[2021-03-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30168753/>. doi: 10.1164/rccm.201807-1255ST.
- [3] WYNN T A, RAMALINGAM T R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*, 2012, 18(7): 1028–1040.
- [4] WYNN T A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*, 2008, 214(2): 199–210.
- [5] BLOKLAND KEC, WATERS D W, SCHULIGA M, *et al.* Senescence of IPF lung fibroblasts disrupt alveolar epithelial cell proliferation and promote migration in wound healing. *Pharmaceutics*, 2020, 12(4): 389.
- [6] MYLLARNIEMI M, KAARTEENAHO R. Pharmacological treatment of idiopathic pulmonary fibrosis - preclinical and clinical studies of pirfenidone, nintedanib, and N-acetylcysteine. *Eur Clin Respir J*, 2015, 2[2021-03-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26557253/>. doi: 10.3402/ecrj.v2.26385.
- [7] RAGHU G, SELMAN M. Nintedanib and pirfenidone. New antifibrotic treatments indicated for idiopathic pulmonary fibrosis offer hopes and raises questions. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191(3): 252–254.
- [8] 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 Immunol*, 2007, 179(3): 1855–1863.
- [9] KANG J S, SUH Y J, MOON K H, *et al.* Clinical efficiency of bone marrow mesenchymal stem cell implantation for osteonecrosis of the femoral head: A matched pair control study with simple core decompression. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 274.
- [10] URBIETA-CACERES V H, ZHU X Y, JORDAN K L, *et al.* Selective improvement in renal function preserved remote myocardial microvascular integrity and architecture in experimental renovascular disease. *Atherosclerosis*, 2012, 221(2): 350–358.
- [11] CHUGH A R, BEACHE G M, LOUGHRAN J H, *et al.* Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation*, 2012, 126(11 Suppl 1): S54–S64.
- [12] 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. *Chest*, 2017, 151(5): 971–981.
- [13] GHADIRI M, YOUNG P M, TRAINI D. Cell-based therapies for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) disease. *Expert Opin Biol Ther*, 2016, 16(3): 375–387.
- [14] SERRANO-MOLLAR A, NACHER M, GAY-JORDI G, *et al.* Intratracheal transplantation of alveolar type II cells reverses bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(12): 1261–1268.
- [15] ZHOU Q, YE X, SUN R, *et al.* Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into alveolar epithelial cells *in vitro* for use *in vivo*. *Stem Cells Transl Med*, 2014, 3(6): 675–685.
- [16] MA N, GAI H, MEI J, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells can differentiate into type II alveolar epithelial cells *in vitro*. *Cell Biol Int*, 2011, 35(12): 1261–1266.
- [17] UZUNHAN Y, NUNES H, GILLE T, *et al.* Innovative therapeutics for idiopathic pulmonary fibrosis. *Presse Med*, 2011, 40(12 Pt 1): 1100–1112.
- [18] JEONG J O, HAN J W, KIM J M, *et al.* Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy. *Circ Res*, 2011, 108(11): 1340–1347.
- [19] CARDENES N, ALVAREZ D, SELLARES J, *et al.* Senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 257.
- [20] YAMADA M, KUBO H, KOBAYASHI S, *et al.* Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol*, 2004, 172(2): 1266–1272.
- [21] 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(14): 8407–8411.
- [22] ZUO W, ZHANG T, WU D Z, *et al.* p63<sup>+</sup>Krt5<sup>+</sup> distal airway stem cells are essential for lung regeneration. *Nature*, 2015, 517(7536): 616–620.
- [23] CHEN X, SHI C, CAO H, *et al.* The hedgehog and Wnt/beta-catenin system machinery mediate myofibroblast differentiation of LR-MSCs in pulmonary fibrogenesis. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 639.
- [24] XI Y, KIM T, BRUMWELL A N, *et al.* Local lung hypoxia determines epithelial fate decisions during alveolar regeneration. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(8): 904–914.
- [25] CHEN X, ZHAO C, ZHANG C, *et al.* Vagal-alpha7nAChR signaling promotes lung stem cells regeneration via fibroblast growth factor 10 during lung injury repair. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 230.
- [26] NABHAN A N, BROWNFIELD D G, HARBURY P B, *et al.* Single-cell Wnt signaling niches maintain stemness of alveolar type 2 cells. *Science*, 2018, 359(6380): 1118–1123.
- [27] SUN T, HUANG Z, ZHANG H, *et al.* TAZ is required for lung alveolar epithelial cell differentiation after injury. *JCI Insight*, 2019, 5 [2021-03-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31211697/>. doi: 10.1172/jci.insight.128674.
- [28] IMAJO M, MIYATAKE K, HIMURA A, *et al.* A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J*, 2012, 31(5): 1109–1122.
- [29] CAO H, WANG C, CHEN X, *et al.* Inhibition of Wnt/beta-catenin signaling suppresses myofibroblast differentiation of lung resident mesenchymal stem cells and pulmonary fibrosis. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 13644.
- [30] TAN J L, LAU S N, LEAW B, *et al.* Amnion epithelial cell-derived exosomes restrict lung injury and enhance endogenous lung repair. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(2): 180–196.
- [31] CHEN Y B, SHAH N N, RENTERIA A S, *et al.* Vedolizumab for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Adv*, 2019, 3(23): 4136–4146.
- [32] LE GOUILL S, THIEBLEMONT C, OBERIC L, *et al.* Rituximab after autologous stem-cell transplantation in mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 2017, 377(13): 1250–1260.
- [33] KRAMPERA M, COSMI L, ANGELI R, *et al.* Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24(2): 386–398.
- [34] TSE W T, PENDLETON J D, BEYER W M, *et al.* Suppression of

- allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 2003, 75(3): 389–397.
- [35] REN G, ZHANG L, ZHAO X, *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(2): 141–150.
- [36] JARVINEN L, BADRI L, WETTLAUFER S, *et al.* Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. *J Immunol*, 2008, 181(6): 4389–4396.
- [37] ISSARANGGUN NA AYUTHAYA B, SATRAVAHA P, PAVASANT P. Interleukin-12 modulates the immunomodulatory properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*, 2017, 52(3): 546–555.
- [38] PAPASAVVAS E, AZZONI L, KOSENKOV A V, *et al.* NK response correlates with HIV decrease in pegylated IFN- $\alpha$ 2a-treated antiretroviral therapy-suppressed subjects. *J Immunol*, 2019, 203(3): 705–717.
- [39] GE W, JIANG J, ARP J, *et al.* Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation*, 2010, 90(12): 1312–1320.
- [40] TERNESS P, BAUER T M, ROSE L, *et al.* Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: Mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*, 2002, 196(4): 447–457.
- [41] HIGASHIMOTO M, SAKAI Y, TAKAMURA M, *et al.* Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4<sup>+</sup> T-cell suppression. *Eur J Immunol*, 2013, 43(11): 2956–2968.
- [42] LI F, HAN F, LI H, *et al.* Human placental mesenchymal stem cells of fetal origins-alleviated inflammation and fibrosis by attenuating MyD88 signaling in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice. *Mol Immunol*, 2017, 90: 11–21.
- [43] YAO Y, CHEN R, WANG G, *et al.* Exosomes derived from mesenchymal stem cells reverse EMT via TGF- $\beta$ 1/Smad pathway and promote repair of damaged endometrium. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 225.
- [44] UZUNHAN Y, BERNARD O, MARCHANT D, *et al.* Mesenchymal stem cells protect from hypoxia-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310(5): L439–451.
- [45] JUNG B, STAUDACHER J J, BEAUCHAMP D. Transforming growth factor beta superfamily signaling in development of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 2017, 152(1): 36–52.
- [46] HAYASHI H, ABDOLLAH S, QIU Y, *et al.* The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF $\beta$  receptor and functions as an antagonist of TGF $\beta$  signaling. *Cell*, 1997, 89(7): 1165–1173.
- [47] ZHAO G, WOJCIECHOWSKI M C, JEE S, *et al.* Negative regulation of TGF $\beta$ -induced lens epithelial to mesenchymal transition (EMT) by RTK antagonists. *Exp Eye Res*, 2015, 132: 9–16.
- [48] LENZ A, TOREN-HARITAN G, EFRAT S. Redifferentiation of adult human beta cells expanded *in vitro* by inhibition of the WNT pathway. *PLoS One*, 2014, 9 (11): e112914[2021-03-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25393025/>. doi: 10.1371/journal.pone.0112914.
- [49] WEN C, HUANG C, YANG M, *et al.* The Secretion from bone marrow mesenchymal stem cells pretreated with berberine rescues neurons with oxidative damage through activation of the Keap1-Nrf2-HO-1 signaling pathway. *Neurotox Res*, 2020, 38(1): 59–73.
- [50] KEAN T J, LIN P, CAPLAN A I, *et al.* MSCs: Delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation. *Stem Cells Int*, 2013, 2013: 732742 [2021-03-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24000286/>. doi: 10.1155/2013/732742.
- [51] YOUSEFI F, EBTEKAR M, SOLEIMANI M, *et al.* Comparison of *in vivo* immunomodulatory effects of intravenous and intraperitoneal administration of adipose-tissue mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(3): 608–616.
- [52] YUNT Z X, MOHNING M P, BARTHEL L, *et al.* Kinetics of the angiogenic response in lung endothelium following acute inflammatory injury with bleomycin. *Exp Lung Res*, 2014, 40(8): 415–425.
- [53] FISCHER U M, HARTING M T, JIMENEZ F, *et al.* Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: The pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(5): 683–692.
- [54] OCHOWIAK M, KASPERKOWIAK A, DOLIGALSKI M, *et al.* The thermostated medical jet nebulizer: Aerosol characteristics. *Int J Pharm*, 2019, 567: 118475 [2021-03-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31276762/>. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118475.
- [55] KUMAMOTO M, NISHIWAKI T, MATSUO N, *et al.* Minimally cultured bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate fibrotic lung injury. *Eur Respir J*, 2009, 34(3): 740–748.
- [56] ROJAS M, XU J, WOODS C R, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(2): 145–152.
- [57] 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. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(1): 6–16.
- [58] YAN X, LIU Y, HAN Q, *et al.* Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted Flk-1(+) mesenchymal stem cell in lung. *Exp Hematol*, 2007, 35(9): 1466–1475.
- [59] ZHANG C, MA Y Y, LIU J, *et al.* Preventive infusion of donor-derived CAR-T cells after haploidentical transplantation: two cases report. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98 (29): e16498[2021-03-24]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31335716/>. doi: 10.1097/MD.00000000000016498.
- [60] PERNET O, YADAV S S, AN D S. Stem cell-based therapies for HIV/AIDS. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 103: 187–201.
- [61] 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. *Respirology*, 2014, 19(7): 1013–1018.

(2021-01-08收稿, 2021-03-19修回)

编辑 姜恬