

骨髓间充质干细胞改善肝纤维化的研究

——通过影响巨噬细胞极化

张琳 申欣 王若凡 张梦微

新乡医学院三全学院 河南 新乡 453003

摘要: 近些年,大量基础及临床研究均证实一定条件下利用骨髓间充质干细胞可以抑制肝星状细胞活化诱导其凋亡,从而实现肝纤维化逆转。随着干细胞技术的快速发展,基于骨髓间充质干细胞的细胞疗法在肝纤维化治疗领域的研究与应用已成为一个充满生命力的新方向。本文就间充质干细胞通过影响巨噬细胞极化在肝纤维化疾病中的研究进展做一综述。

关键词: 肝纤维化;骨髓间充质干细胞;巨噬细胞极化

Study on improvement of liver fibrosis by bone marrow mesenchymal stem cells—By affecting the polarization of macrophages

Lin Zhang, Xin Shen, Ruofan Wang, Mengwei Zhang

Sanquan College of Xinxiang Medical College Henan Xinxiang, 453003

Abstract: In recent years, a large number of basic and clinical studies have confirmed that under certain conditions, the use of bone marrow mesenchymal stem cells can inhibit the activation of hepatic stellate cells and induce their apoptosis, thereby achieving the reversal of liver fibrosis. With the rapid development of stem cell technology, the research and application of cell therapy based on bone marrow mesenchymal stem cells in the field of liver fibrosis have become a new direction full of vitality. This article reviews the research progress of mesenchymal stem cells in liver fibrosis diseases by affecting macrophage polarization.

Keywords: liver fibrosis; Bone marrow mesenchymal stem cells; Macrophage polarization

肝纤维化(Hepatic fibrosis, HF)是指各种慢性肝损伤,如病毒性肝炎、酒精药物、代谢性疾病和肝细胞自身免疫调节失调等原因导致的以肝组织中细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)过度沉积为特点的慢性病理过程,如果没有采取积极正确的处理,最终可发展为肝硬化、肝癌、肝衰竭等。肝纤维化是肝硬化发展过程中的前兆的病理变化。当肝脏受到病毒性、自身免疫、胆汁淤积、中毒性代谢性疾病等各类因素的损伤时肝星状细胞(Hepatic Stellate Cells, HSCs)胞外基质代谢失衡,蛋白大量沉积肝脏,星形细胞大量增殖,细胞骨架蛋白增多,导致肝脏纤维性变化。更重要的是慢性纤维化的无症状性往往不能引起患者的重视,导致最终发展成门脉高压,肝硬化、肝衰竭等病变而导致死亡。

一、肝纤维化发生的分子机制

肝纤维化是严重慢性肝损伤的常见结果其特征是细胞外基质的产生和降解失衡。通常由病毒、酒精、滥用药物和自身免疫力触发。肖海英等研究表明^[2],在肝纤维化的早期阶段细胞外基质的沉积可以被蛋白水解酶如基质金属蛋白酶水解。然而,持续的损伤会导致基质成分的积累,如型胶原和血型胶原

导致瘢痕组织沉积和炎症过程的开始。肝星状细胞位于肝窦内皮细胞和肝细胞之间的Disse窦周间隙,是储存维生素A的细胞。越来越多的研究表明HSCs是合成和分泌细胞外基质成分的必要细胞,在肝纤维化中起关键作用。万思哲等研究表明^[3]在物理、化学或生物因素对肝脏造成损伤时,HSCs被激活并迅速增殖:HSCs的活化是肝纤维化的重要因素。转化生长因子- β (Transforming growth factor, TGF- β)是肝纤维化的关键介质,它触发HSCs的激活,诱导细胞外基质合成增加肝细胞凋亡。活化的HSCs通过旁分泌和自分泌方式促进外周静止性HSCs的活化,在各种细胞因子的作用下转化为肌成纤维细胞,获得了收缩和纤维化的特性,分泌细胞因子,表达平滑肌肌动蛋白(Alpha-smooth muscle actin, α -SMA), α -SMA不仅是门静脉肌成纤维细胞的标志,也是HSCs活化的标志。研究发现多种细胞因子包括转化生长因子- β 、血小板衍生生长因子(Platelet-derived growth factor, PDGF)、结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)、成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)、干扰素(Interferon)和瘦素(Leptin),通过多种信号通路如TGF- β /Smad、JNK/ERK。

Notch 和 Wnt/ β -catenin 参与 HSCs 的激活。其中 TGF- β /Smad 通路是与肝纤维化相关的最重要的信号通路之一, Smad 蛋白家族参与 TGF- β 下游信号通路, 激活受体的蛋白包括 Smad3, 可以将信号从胞浆传递到细胞核, 从而促进肝纤维化的发生; 而发挥抑制功能的蛋白 Smad7, 可以阻止 Smad7 复合物的形成及由此产生的信号转导过程, 从而抑制纤维化的起始。

二、肝脏巨噬细胞发挥双重作用

2.1 巨噬细胞的极化

巨噬细胞极化的概念是在 1992 年发现 IL-4 可以显著提高小鼠巨噬细胞甘露糖受体 (CD206) 的活性时首次被提出的。巨噬细胞受到不同因素的刺激会发生极化, 表现出极大地异质性, 表现为细胞因子分泌、细胞表面标志物以及转录调节的多样性。为了区分这种表型和功能的多样性, 巨噬细胞被分为经典激活的巨噬细胞 (M1 型巨噬细胞) 和替代激活的巨噬细胞 (M2 型巨噬细胞)。M1 型巨噬细胞是促炎型巨噬细胞, 由 LPS 或/和 IFN- γ 刺激产生, 高表达 CD86、CD80、PD-L1 等, 分泌促炎细胞因子 (如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-23a、iNOS、IL-12 等), 促进 CD4+T 细胞向 Th1 细胞分化, 参与细菌清除、抗病毒活动, 组成抗病原体的第一道防线。M2 型巨噬细胞是免疫调节型巨噬细胞, 由 IL-4 和/或 IL-13 刺激产生, 高表达 CD206、CD163、arg1、FIZZ1 等, 分泌免疫调节因子 (如 IL-10、IL-4、TGF- β 、IL-1Ra 等), 抑制 Th1 免疫应答, 促进 Th2 免疫应答, 参与免疫抑制、抗寄生虫感染、组织重构等。虽然巨噬细胞 M1/M2 型的分类来自于 T 细胞的 Th1 和 Th2 分类, M1 型极化和 M2 型极化的结果分别是 Th1 样和 Th2 样应答, 但是 M1/M2 型极化并不依赖于 T 细胞。

肝脏内 M1 型巨噬细胞主要分泌促炎因子, 参与杀菌抑菌和免疫刺激, 在肝纤维化进展期发挥促炎和促纤维化作用; 而 M2 型巨噬细胞主要参与炎症消退、血管生成、细胞外基质降解等, 可以在肝纤维化恢复期发挥抗炎和抗纤维化作用。Wan 等人发现与重度肝脏损害的病人相比, 肝脏损害轻的病人 M2 型巨噬细胞更多, 还在酒精性和非酒精性脂肪肝小鼠模型中发现激活 M2 型巨噬细胞可以通过分泌 IL-10 促进 M1 型巨噬细胞凋亡, 从而减轻酒精或高脂诱导的炎症和肝细胞损伤。Weng 等人研究发现 M2 型巨噬细胞虽然会促进纤维化, 但是也会加速纤维化的降解。研究者证实纤维化进展期靶向清除浸润的巨噬细胞可以改善纤维化, 而在恢复期清除巨噬细胞会加剧纤维化。这都表明巨噬细胞的极化直接影响慢性肝损伤的预后, M2 型极化有助于保护肝脏免受损害。

2.2 巨噬细胞的促炎作用

侯宇等人研究表明^[1]肝脏巨噬细胞在肝脏中的作用是动态的, 巨噬细胞对来自组织的不同微环境信号产生不同的应答, 导致不同的极化状态。在肝脏损伤的起始应答阶段, 定居的

Kupffer 细胞起重要的作用, Kupffer 细胞激活后快速分泌大量细胞因子和趋化因子, 如 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、CCL2 和 CCL5 等, 这些促炎因子一方面会参与 HSCs 的激活, 另一方面还会导致单核细胞以及其他免疫细胞大量向肝脏募集。CCL2-CCR2 信号通路在后者中起关键作用, CCR2-/- 小鼠和 CCL2 抑制剂都可以减轻肝脏纤维化。急性和慢性肝脏损伤都以肝脏巨噬细胞大量增多为特征, 其原因就是大量的单核细胞流入肝脏。在 CCl4 诱导肝纤维化小鼠中, 浸润的单核细胞引起肝脏巨噬细胞增加了 3 到 5 倍。酒精性肝炎和肝硬化的病人的肝脏巨噬细胞的数量在早期脂肪肝阶段和晚期肝炎和肝硬化阶段也都明显增加。浸润的单核细胞亚型主要是 Ly6Chi 单核细胞, 当他们移居至肝脏后, 分化为 Ly6C+ 巨噬细胞, 占据巨噬细胞池。这些单核细胞来源的巨噬细胞可以在特定的损伤区域形成环样结构, 当肝损伤广泛时它们累积在门静脉周围。它们表现出促炎促纤维化的特性, 是纤维化激活和进展的关键一环。它们通过与 HSCs 相互作用, 生成 TGF- β 促进纤维化。

2.3 巨噬细胞的抑炎作用

某些组织微环境因素可以诱导 Ly6C+ 巨噬细胞转变为 Ly6Clo 巨噬细胞, Ly6Clo 巨噬细胞可分泌大量的溶解纤维蛋白的 MMP-9 和 MMP-13, 以及抗炎细胞因子 IL-10, 这些都与促进组织修复和损伤恢复, 终止肝损伤有关。研究表明^[2]吞噬细胞碎片可以促使 Ly6Chi 巨噬细胞转变为 Ly6Clo 巨噬细胞。另外, 趋化因子受体 CX3CR1 也可能是介导这一转变的关键分子, 其在 Ly6Clo 巨噬细胞上高表达。研究发现清除 Ly6Clo 巨噬细胞会导致纤维化消退失败, 移植这类巨噬细胞可以减轻 CCl4 诱导小鼠肝纤维化。给小鼠以 CCL2 抑制剂 (mNOX-E36) 治疗, 会导致 Ly6Clo 巨噬细胞显著增加, 加速 CCl4 或蛋氨酸胆素缺乏饮食造成的肝纤维化的恢复。这些都说明 Ly6Clo 巨噬细胞在协调纤维化恢复中起重要作用。Kupffer 细胞可以通过产生促纤维化因子 TGF- β 和血小板来源生长因子 (PDGF) 激活 HSCs, 还通过 IL-1 和 TNF- α 诱导的 NF- κ B 的激活促进 HSCs 的存活, 从而加重纤维化。但另一方面, Kupffer 细胞也可以表达 MMP-9/-12/-13 降解细胞外基质, 起到促进纤维化恢复的作用。正因为巨噬细胞在肝脏中有许多不同的功能, 而且由功能相反的细胞类型构成, 使得他们成为治疗肝脏疾病的新靶点, 然而也正是由于这种极大的异质性导致靶向巨噬细胞的治疗相当具有挑战性。

三、BM-MSCs 对肝纤维化的调控作用

3.1 BM-MSCs 分泌的细胞因子通过影响巨噬细胞极化治疗小鼠肝纤维化

BM-MSCs 抑制巨噬细胞由 LPS+IFN- γ 诱导的 M1 型极化, BM-MSCs 促进巨噬细胞向 M2 型极化。研究证实了 MSC 通过旁分泌可溶性细胞因子影响了巨噬细胞的极化类型, 即抑制 LPS+IFN- γ 诱导的巨噬细胞的 M1 型极化, 促进巨噬细胞向

M2 型极化。但 BM-MSCs 具体通过哪一类或者哪几类细胞因子影响巨噬细胞极化, 还需进一步研究。通过查阅文献, IL-1Ra 这一 BM-MSCs 分泌的细胞因子引起我们的注意。一方面, IL-1 信号通路在激活 HSCs 和促进肝纤维化中发挥作用, IL-1Ra 是 IL-1 的内源性抑制剂, 可以阻断 IL-1 信号通路, 研究表明, 在肝衰竭或肝脏部分切除术后模型鼠中, IL-1Ra 注射可以改善组织学损伤, 加速肝脏再生和修复。Petrasek 等人还报道了给予酒精性脂肪肝小鼠重组 IL-1Ra 可以明显改善小鼠肝脏组织损伤。另一方面, 近来也有一些关于 BM-MSCs 分泌的 IL-1Ra 的报道。Patricia 等人研究发现, BM-MSCs 通过分泌 IL-1Ra 促进脾脏巨噬细胞向 M2 型极化同时抑制 B 细胞的分化。Luis 等人发现 MSCs 通过分泌 IL-1Ra 抑制肺内巨噬细胞 M1 型极化。从而在 BLM 诱导的小鼠肺脏损伤中发挥抗炎抗纤维化的作用。

四、总结与展望

目前, 根据我们所搜集到的数据, 在各个领域已经注册了 900 多项临床试验, 其中与肝纤维化相关的临床试验在进行的就有 49 项。MSCs 以其独特的优势在临床应用方面展现出广阔

的应用前景, 然而其在治疗肝纤维化疾病的机制还未完全阐明, 甚至有完全相反的结果呈现, 未来需要更多基础机制研究来确定治疗特定肝病的最有效的细胞来源培养条件、细胞数量、给药频率和给药途径, 以期在人类肝脏疾病治疗方面发挥巨大的作用。

参考文献:

- [1] 侯宇, 韩英. 骨髓间充质干细胞调控巨噬细胞改善肝纤维化的机制研究[R]. 第四军医大学.
 - [2] 肖海英, 吴剑平, 汪安江, 郑雪莲. 巨噬细胞在肝纤维化中的作用[J]. 中国细胞生物学学报 Chinese Journal of Cell Biology 2020, 42(4):705-711
 - [3] 万思哲, 朱萱. 间充质干细胞对纤维化进展的调控机制[R]. 生命科学 Chinese Bulletin of Life Sciences 10004-0374 (2019)10-1054-06
 - [4] 张凤, 熊思东. 巨噬细胞极化及其意义[J]. 细胞生物学杂志 Chinese Journal of Cell Biology 2007, 29:27-30
- 作者简介: 张琳, 2001 年, 女, 河南省安阳市, 汉族, 新乡医学院三全学院, 临床医学专业。