

基因工程化间充质干细胞移植治疗炎症性肠病的研究进展

李 宁 金世柱 杨宁宁

【摘要】 炎症性肠病(IBD)是一类反复发作、难以治愈的肠道疾病。目前,医学上尚无治愈 IBD 的方法。间充质干细胞(MSC)移植可以改善 IBD 患者的症状,但由于其归巢效率较低,未达到预期的治疗效果。近年来,构建基因工程化 MSC 受到越来越多研究者的关注。MSC 经外源基因修饰后可稳定表达这些基因,并使 MSC 迁移至损伤部位,发挥抗炎作用。该文就基因工程化 MSC 治疗 IBD 的研究进展作一综述。

【关键词】 间充质干细胞;基因工程;炎症性肠病

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2021.03.002

炎症性肠病(IBD)是一类慢性肠道非特异性炎症性疾病,包括克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)。IBD 的病因尚未明确,可能与遗传易感性、环境因素及自身免疫等有关^[1]。近年来,IBD 的发病率逐年升高,青年患者所占比例也呈上升趋势。IBD 可反复发作,难以治愈。目前主要的治疗方法是控制炎症反应,并调节机体的免疫功能,对于药物治疗无效且病情较重的患者可能会选择手术治疗^[2]。应用氨基水杨酸盐、糖皮质激素和免疫抑制剂等药物治疗后,大部分 IBD 患者可获得暂时性缓解,但长期应用上述药物会引发不良反应。药物不能根治及应用时引起的不良反应不仅给患者带来了经济负担,也严重影响了患者的生活质量。手术治疗会对患者造成较大的创伤,并可引起多种近期和远期的并发症^[3]。近年来,细胞疗法在 IBD 的治疗中受到越来越多的关注。间充质干细胞(MSC)可以迁移至肠道炎症反应部位,修复受损组织。但由于 MSC 的归巢效率较低,导致其在损伤部位发挥的修复作用未能达到预期,从而影响了 IBD 的治疗效果。基因工程是指将外源基因通过某种方式导入目的细胞中,使其过表达或沉默某种基因的技术。鉴于 MSC 应用的局限性,构建基因工程化 MSC 至关重要。

1 MSC

干细胞可用于治疗多种疾病,MSC 来源丰富,易于培养,具有自我更新和多向分化的能力,是机体内重要的免疫调节细胞。MSC 在体外扩增后可以产生大量细胞,并且在适当条件下分化为多种细胞表型,如成骨细胞、神经元细胞、肠上皮细胞和肝细胞等^[4]。MSC 移植作为一种新型的细胞疗法,在很多领域表现出了治疗潜力,由于 MSC 在体外环境中易于扩增和培养,并且具有一定的免疫抑制作用,故已被应用于心血管疾病、自身免疫性疾病、胃肠道疾病等的临床试验中^[5]。研究表明,MSC 可以迁移至肠道损伤部位,通过炎症反应促进受损组织修复,从而在局部抑制病情进展^[6]。然而,在应用过程中,发现外源注射的 MSC 只有少量到达靶组织,并且其在靶组织中的存留时间短暂,导致移植 MSC 未能达到预期的治疗效果。为解决这一问题,研究者构建了基因工程化 MSC,以期进一步提高对 IBD 的治疗效果。

2 基因工程技术

基因工程技术包括物理、化学、生物 3 种方法,在应用这些方法修饰 MSC 时,可以简单描述为非病毒方法和病毒方法。使用各种物理、化学方法对 MSC 进行修饰为非病毒方法;使用生物方法对 MSC 进行修饰为病毒方法,主要是指病毒载体的应用,包括慢病毒载体、腺病毒载体等^[7]。非病毒方法的优势在于其可以传递更大的基因,但主要缺点是转染效率低,基因表达时间短暂;应用病毒载体可

以实现较高的转染效率,且不影响 MSC 的干细胞特性,还可根据所用病毒的类型,实现长期稳定的转基因表达^[8]。尽管目前非病毒方法的应用越来越广泛,但 MSC 的基因修饰通常还是通过病毒载体实现的。MSC 在体内定位、存活、保留等方面存在局限性,使其临床应用受到限制,基因工程是改善 MSC 性能的一种常用方法。

3 修饰 MSC 的基因

MSC 可以被多种外源基因修饰,并稳定表达这些基因,经过改造的 MSC 可以分泌抑制细胞凋亡的因子,增强促进血管再生、抗炎、修复等功能,更有利于对 IBD 的治疗^[9]。以下主要对部分与 IBD 损伤和修复相关的基因作一概述。

3.1 细胞间黏附分子-1

细胞间黏附分子-1(ICAM-1)可参与细胞间的信号传递,对调节机体免疫应答有重要作用^[10]。研究表明,ICAM-1 与 MSC 密切相关,生理状态下,MSC 几乎不表达 ICAM-1,而当发生炎症反应时,MSC 可显著上调 ICAM-1 的表达。ICAM-1 表达上调有助于增强 MSC 的免疫抑制作用,当 ICAM-1 基因被阻断或者被敲除后,MSC 的免疫抑制作用被逆转^[11]。研究表明,过表达 ICAM-1 的 MSC 可减轻结肠组织的病理损伤,改善 IBD 小鼠的一般状况,促进体质量恢复,降低小鼠的病死率;与其他治疗组比较,过表达 ICAM-1 的 MSC 可显著减少 Th1 细胞和 Th17 细胞的数量,同时升高 Treg 细胞所占比例^[12]。该研究结果提示,ICAM-1 的过表达可增强 MSC 调节 Th 细胞亚群的能力,并可促使 MSC 向受损组织迁移,在局部减轻炎症反应,从而对 IBD 起到较好的治疗作用。

3.2 IL-25

IL-25 可通过减少 Th1/Th17 相关细胞因子的合成,抑制 Th1/Th17 细胞的免疫应答,从而减轻多种由自身免疫性疾病诱导的炎症损伤^[13]。研究表明,IL-25 可抑制 IBD CD4⁺ T 细胞向 Th1/Th17 细胞分化,在 IBD 的受损黏膜中 IL-25 的表达明显降低^[14]。IL-25 诱导的 MSC 抗炎活性明显增强,在 IBD 大鼠肠道炎症反应的减轻及组织学修复过程中具有重要意义。IL-25 诱导的 MSC 在结肠炎大鼠中抑制 Th17 细胞分化的能力增强,同时使 T 细胞的数量显著增加^[15]。此外,IL-25 诱导的 MSC 还可以促进肠上皮细胞的增殖和迁移^[16]。以上结果提示,IL-25 主要通过抑制 Th17 细胞分化、上调 Treg

细胞表达帮助 MSC 缓解 IBD 症状,同时增强了 MSC 诱导肠上皮再生的能力。因此,IL-25 可能成为辅助 MSC 治疗 IBD 的新疗法。

3.3 IL-35

IL-35 是一种免疫抑制性细胞因子,已被应用于多种慢性炎症反应和免疫相关性疾病的潜在治疗^[17]。IL-35 主要由 Treg 细胞产生,其免疫抑制功能不仅表现为抑制 Th17 细胞分化,还包括促进 Treg 细胞扩增,扩增的 Treg 细胞又可以分泌 IL-35,从而增强了它的免疫抑制作用^[18]。IL-35 在 IBD 中具有抗炎活性,有研究表明,IL-35 主要通过抑制 T 细胞增殖和 Th17 细胞分化等多种机制发挥抗炎作用^[19]。IL-35 可使 Th1/Th17 相关转录因子的基因表达降低,发挥抗炎活性,减轻 IBD 患者的结肠损伤^[18]。为了探讨 IL-35 在治疗 IBD 中的潜在作用,MSC 是 IL-35 的理想载体,IL-35-MSC 可通过下调促炎性细胞因子的表达来改善 IBD 症状。研究表明,IL-35-MSC 可增加 Treg 细胞数量,Treg 细胞可阻止病理性免疫反应进展,并可以产生抗炎性细胞因子,传递抗炎信号^[20]。因此,IL-35 的过表达可能成为 IBD 治疗的新靶点。

3.4 IL-37b

IL-37 与炎症反应密切相关。与健康受试者比较,IL-37 在 IBD 患者血清中的表达水平较低,而在病变组织中的表达水平明显升高,且与病变组织的严重程度呈正比^[21]。该结果表明 IL-37 可能对炎症反应起负反馈调节作用,并参与了疾病的整个进展过程;而 IBD 患者血清中 IL-37 的表达水平降低可能是由于其在肠道损伤组织中消耗过多所致。IL-37b 是 IL-37 的主要活性形式,具有较强的免疫抑制作用,IL-37b 基因修饰的 MSC 可以明显减轻 IBD 的病情严重程度^[22]。这可能是 IL-37b 通过促进 Treg 细胞增殖来实现的,并且 IL-37b 可上调抗炎因子 IL-2 的表达,还可下调促炎因子干扰素- γ (IFN- γ) 的表达^[23-24]。因此,IL-37b 基因的过表达有望成为促进 MSC 治疗作用的新途径。

3.5 CXCR4 趋化因子受体 4

基质细胞衍生因子-1(SDF-1)是促进干细胞归巢至受损组织的重要因素之一,它可以与 CXCR4 趋化因子受体 4(CXCR4)相互作用,与干细胞的迁移和组织定位的过程相关。CXCR4 是 SDF-1 的受体,位于 MSC 的表面^[25]。MSC 经 CXCR4 基因修饰后不影响其生物学活性及细胞活力,而可以增强其迁

移能力,使更多的 MSC 聚集于受损部位,即可增强其归巢性^[26]。研究表明,过表达 CXCR4 的 MSC 可下调 IBD 小鼠的促炎因子表达,降低肿瘤负荷^[27]。该结果提示,过表达 CXCR4 的 MSC 具有有效的抗肿瘤作用,这可能是因为 CXCR4 增强了 MSC 向肠道受损部位聚集的能力。此外,CXCR4 的过表达既不会影响 MSC 的分化能力,也不会增强其增殖能力,而是会增强 MSC 对 SDF-1 的趋化性^[27]。综上所述,SDF-1/CXCR4 通路可能对 MSC 的归巢和存活起关键性作用,CXCR4 的过表达在促进 MSC 归巢至损伤部位方面具有一定的应用前景。

4 总结

近年来,随着中国经济水平的提高,IBD 的患病率也呈升高趋势,因其具有难以治愈的特点,给患者带来了身体和精神上的痛苦。为了解决这一难题,研究人员提出应用基因工程化 MSC 治疗 IBD。将外源基因通过病毒转染等方式导入 MSC 中,可以在提高其治疗效果的同时不改变 MSC 的生物学表型。基因工程化 MSC 主要通过增强 MSC 的迁移能力,增加其归巢至损伤部位的数量,促进肠上皮细胞的增殖和迁移,抑制 Th1 细胞和 Th17 细胞分化并促进 Treg 细胞扩增,下调促炎性细胞因子的表达,上调抗炎性细胞因子的表达等机制治疗 IBD。基因工程化 MSC 治疗方案的提出为今后临床治疗 IBD 提供了新的希望,但其应用于人体的安全性仍有待于进一步研究。

参 考 文 献

- Ramos GP, Papadakis KA. Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases[J]. *Mayo Clin Proc*, 2019, 94(1): 155-165.
- Forte D, Ciciarello M, Valerii MC, et al. Human cord blood-derived platelet lysate enhances the therapeutic activity of adipose-derived mesenchymal stromal cells isolated from Crohn's disease patients in a mouse model of colitis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6(1): 170.
- Keane TJ, Dziki J, Sobieski E, et al. Restoring mucosal barrier function and modifying macrophage phenotype with an extracellular matrix hydrogel: potential therapy for ulcerative colitis[J]. *J Crohns Colitis*, 2017, 11(3): 360-368.
- Zhang Y, Li R, Rong W, et al. Therapeutic effect of hepatocyte growth factor-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells on CCl₄-induced hepatocirrhosis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1186.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- Soontararak S, Chow L, Johnson V, 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[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7(6): 456-467.
- 王曼, 李树仁. 基因工程在骨髓间充质干细胞治疗心肌梗死中的应用[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(1): 269-271.
- Devetzi M, Goulielmaki M, Khoury N, et al. Genetically-modified stem cells in treatment of human diseases: Tissue kallikrein (KLK1)-based targeted therapy (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3): 1177-1186.
- Li H, Shen S, Fu H, et al. Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells in tissue engineering[J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 9671206.
- Rubtsov Y, Goryunov K, Romanov A, et al. Molecular mechanisms of immunomodulation properties of mesenchymal stromal cells: a new insight into the role of ICAM-1[J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 6516854.
- Ren G, Zhao X, Zhang L, et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression[J]. *J Immunol*, 2010, 184(5): 2321-2328.
- Li X, Wang Q, Ding L, et al. Intercellular adhesion molecule-1 enhances the therapeutic effects of MSCs in a dextran sulfate sodium-induced colitis models by promoting MSCs homing to murine colons and spleens[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 267.
- Su X, Huang Q, Chen J, et al. Calycosin suppresses expression of pro-inflammatory cytokines via the activation of p62/Nrf2-linked heme oxygenase 1 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 113(Pt A): 695-704.
- Shi T, Xie Y, Fu Y, et al. The signaling axis of microRNA-31/interleukin-25 regulates Th1/Th17-mediated inflammation response in colitis [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(4): 983-995.
- Cheng W, Su J, Hu Y, et al. Interleukin-25 primed mesenchymal stem cells achieve better therapeutic effects on dextran sulfate sodium-induced colitis via inhibiting Th17 immune response and inducing T regulatory cell phenotype[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(9): 4149-4160.
- Su J, Xie C, Fan Y, et al. Interleukin-25 enhances the capacity of mesenchymal stem cells to induce intestinal epithelial cell regeneration[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12): 5320-5331.
- Fonseca-Camarillo G, Furuzawa-Carballeda J, Yamamoto-Furusho JK. Interleukin 35 (IL-35) and IL-37: Intestinal and peripheral expression by T and B regulatory cells in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Cytokine*, 2015, 75(2): 389-402.
- Nan Z, Fan H, Tang Q, et al. Dual expression of CXCR4 and IL-35 enhances the therapeutic effects of BMSCs on TNBS-

- induced colitis in rats through expansion of Tregs and suppression of Th17 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 499(4): 727-734.
- 19 McLean MH, Neurath MF, Durum SK. Targeting interleukins for the treatment of inflammatory bowel disease-what lies beyond anti-TNF therapy?[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(2): 389-397.
- 20 Yan Y, Zhao N, He X, et al. Mesenchymal stem cell expression of interleukin-35 protects against ulcerative colitis by suppressing mucosal immune responses[J]. *Cytotherapy*, 2018, 20(7): 911-918.
- 21 Kusaka S, Nishida A, Takahashi K, et al. Expression of human cathelicidin peptide LL-37 in inflammatory bowel disease[J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 191(1): 96-106.
- 22 Wang WQ, Dong K, Zhou L, et al. IL-37b gene transfer enhances the therapeutic efficacy of mesenchymal stromal cells in DSS-induced colitis mice[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(11): 1377-1387.
- 23 Liu T, Liu J, Lin Y, et al. IL-37 inhibits the maturation of dendritic cells through the IL-1R8-TLR4-NF- κ B pathway[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864(10): 1338-1349.
- 24 Fukaura K, Iboshi Y, Ogino H, et al. Mucosal profiles of immune molecules related to T helper and regulatory T cells predict future relapse in patients with quiescent ulcerative colitis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2019, 25(6): 1019-1027.
- 25 Wang Z, Lin Y, Ye H, et al. Over-expression of CXCR4 promotes homing and proliferation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2019, 35(5): 393-398.
- 26 Chen Z, Chen Q, Du H, et al. Mesenchymal stem cells and CXC chemokine receptor 4 overexpression improved the therapeutic effect on colitis via mucosa repair[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(2): 821-829.
- 27 Zheng XB, He XW, Zhang LJ, et al. Bone marrow-derived CXCR4-overexpressing MSCs display increased homing to intestine and ameliorate colitis-associated tumorigenesis in mice[J]. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2019, 7(2): 127-138.

(收稿日期:2020-05-14)

(本文编辑:周骏)

2021 年本刊可直接用缩写的常用词汇

2021 年本刊对一些消化科医师比较熟悉的常用词汇允许直接用缩写,即第 1 次出现时,可以不标注中文,如下所列(按英文缩写的首字母顺序排列):

ALT(丙氨酸氨基转移酶)	GGT(γ -谷氨酰转肽酶)	PPI(质子泵抑制剂)
AST(天冬氨酸氨基转移酶)	HBV(乙型肝炎病毒)	PVDF 膜(聚偏氟乙烯膜)
ATP(三磷酸腺苷)	H-E 染色(苏木精-伊红染色)	ROC 曲线(受试者操作特征曲线)
BMI(体质量指数)	HR(风险比)	RR(相对危险度)
CA125(糖类抗原 125)	IL(白细胞介素)	RT-PCR(反转录-聚合酶链反应)
CA19-9(糖类抗原 19-9)	MALT 淋巴瘤(黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤)	SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)
CFU(菌落形成单位)	MAPK(丝裂原激活蛋白激酶)	SP 法(链霉素抗生素蛋白-过氧化物酶连接法)
CT(计算机断层扫描)	miRNA(微 RNA)	TBS(Tris 盐酸缓冲液)
DAB 显色(二氨基联苯胺显色)	MRI(磁共振成像)	Th(辅助性 T 细胞)
DEPC(焦碳酸二乙酯)	MTT(四甲基偶氮唑盐)	TNBS(三硝基苯磺酸)
DMSO(二甲基亚砷)	NF- κ B(核因子- κ B)	TNF(肿瘤坏死因子)
dNTP(脱氧核糖核苷三磷酸)	NK 细胞(自然杀伤细胞)	Treg(调节性 T 细胞)
ELISA(酶联免疫吸附测定)	OR(比值比)	WHO(世界卫生组织)
FDA(食品和药品管理局)	PBS(磷酸盐缓冲液)	95%CI(95%可信区间)
GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)	PCR(聚合酶链反应)	