王思捷,廖淑珍,招春飞,等. 间充质干细胞源外泌体治疗类风湿性关节炎动物模型和临床研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 109-112.
Wang SJ, Liao SZ, Zhao CF, et al. Current progress in the application of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of clinical rheumatoid arthritis and related animal models [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 109-112.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.03.019

间充质干细胞源外泌体治疗类风湿性关节炎动物模型和临床研究进展

王思捷[1],廖淑珍[2],招春飞[2],吴 平[1*],潘庆军[2*]

(1. 广东医科大学附属医院临床医学研究中心,广东 湛江 524001;
2. 湛江市慢性肾脏病防控重点实验室,广东 湛江 524001)

【摘要】 目前,临床治疗类风湿性关节炎(RA)可选的药物有限,治疗效果仍不容乐观。间充质干细胞(MSCs)治疗 RA 具有较好的应用前景,但也存在一定的潜在治疗风险。MSCs 可排泌多种功能性外泌体(MSCs-Exos),MSCs-Exos 不但具备 MSCs 的疗效,且可显著降低 MSCs 的治疗风险。随着 Exos 研究技术的成熟,以及更多的动物模型和大规模的临床研究,MSCs-Exos 有望为 RA 的治疗提供新的策略。

【关键词】 自身免疫性疾病;类风湿性关节炎;间充质干细胞;外泌体;治疗
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1671-7856(2019) 03-0109-04

Current progress in the application of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of clinical rheumatoid arthritis and related animal models

WANG Sijie[1], LIAO Shuzhen[2], ZHAO Chunfei[2], WU Ping[1*], PAN Qingjun[2*]
(1. Clinical Research Center of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China.
2. Key Laboratory of Prevention and Management of Chronic Kidney Disease of Zhanjiang City, Zhanjiang 524001)

【Abstract】 Drugs for the effective treatment of rheumatoid arthritis (RA) are currently lacking. While there is growing interest in the potential application of mesenchymal stem cells (MSCs) in the treatment of RA, there are potential risks associated with cell-based therapies. MSCs secrete functional exosomes (MSC-Exos) that can mediate many of the functions of MSCs and, consequently, these extracellular vesicles provide an attractrive alternative that may circumvent many of the risks associated with cell-based strategies. With current advances in exosomal technology, including on-going studies in animal models and findings from large-scale clinical trials, there is great expectation that MSC-Exos will provide a new and exciting strategy for the treatment of RA.

【Keywords】 autoimmune diseases; rheumatoid arthritis; mesenchymal stem cells; exosomes; treatment

自身免疫性疾病(autoimmune diseases, AD)是指机体对自身抗原产生免疫反应,进而导致自身组织损害所引起的疾病。其中,类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)较常见。RA 的常见病理

[**基金项目**]国家自然科学基金(81471530)。
[**作者简介**]王思捷(1986—),男,硕士研究生,研究方向:医学检验。E-mail:uno09@ 126.com
[**通信作者**]吴平(1962—),男,主任技师,硕士生导师。E-mail:wping62@ 126.com
潘庆军(1978—),男,教授,博士生导师。E-mail:stilwapan@ gmail.com * 共同通信作者

改变为关节的肿胀、滑膜关节的破坏和慢性炎症[1-2],并高表达多种炎症因子,如白细胞介素 27(interleukin 27,IL-27)、白细胞介素 35(IL-35)、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor α,TNF-α)等促炎因子已被证实与 RA 的发病有关[3-4]。目前,其临床治疗可选的药物有限,治疗效果仍不容乐观。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)指具有多谱系分化能力潜能的细胞,近年来,其在自身免疫性疾病发病中的免疫调节功能备受关注[5]。外泌体(exosomes,Exos)是一类直径约 30 至 150 纳米的细胞外囊泡,由细胞内部的胞内体与细胞膜融合释放到细胞外形成[6],其内富含蛋白质、核酸、脂质等物质,作为细胞间传递信息的载体,可发挥多种生物学功能。研究发现,间充质干细胞可排泌多中外泌体[7],其对 RA 可能具有潜在的治疗作用,本文对此作一综述。

1 间充质干细胞与类风湿性关节炎

MSCs 可对参与先天性和适应性免疫应答的多种细胞发挥免疫调节作用。自体 MSCs 可通过 IFN-γ、TNF-α、IL-1α 或 β 等促炎性细胞因子显著抑制活化的淋巴细胞的增殖[8]。已报道从健康受试者中提取的滑膜间充质干细胞(synovial MSCs,S- MSCs)能够在体外抑制混合淋巴细胞反应中的 T 细胞的增殖[9]。机制方面,MSCs 对 T 细胞的作用包括抑制 $CD4^+$ T 细胞在对有丝分裂原或抗体(抗 CD2 / CD3/ CD28)活化反应中的增殖[10-12]。此外,MSCs 还能抑制 T 细胞分泌 IL-2、TNF-α 等炎症因子[13]。

MSCs 治疗 RA 具有潜在的疗效,但也存在一定的问题。基于患者自体 MSCs 的数量和功能的缺陷,同种异体的 MSCs 治疗方案表现出来更大的优势。RA 的动物模型研究发现,同种异体的 MSCs 在体外表现出较差的免疫原性[14]。在胶原诱导的关节炎动物模型(collagen induced arthritis,CIA)中发现,腹腔注射同种异体 MSCs 反应良好[15]。临床研究发现,给 RA 患者静脉输注同种异体的 MSCs 或脐带来源的 MSCs,抗 TNF 的耐药患者会出现短暂的临床改善[16],同种异体的 MSCs 在 RA 治疗中具有安全性和潜在的有效性[17]。除单独输注 MSCs 外,同种异体的 MSCs 与常规药物相结合的治疗方法,可使 RA 的患者在临床指标和血清学上得到显著的改善[18]。另对 15 例难治性系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus,SLE)患者的治疗发现,同种异体的 MSCs 治疗后,患者的肾功能得到稳定的改善[18]。另一方面,同种异体的 MSCs 治疗 RA 也存在一定的面问题。有报道发现,CIA 动物模型在注射使用 MSCs 后,所有动物的跖趾关节和趾间关节都出现了明显的关节炎症状[19]。此外,由于 MSCs 可以抑制抗肿瘤免疫反应,存在的隐性或低活性的肿瘤可能被激活的风险[20]。进一步研究发现,局部的 MSCs 输注治疗,如关节内注射 MSCs,一定程度上可能降低风险并获益。一项 SCID 小鼠关节炎模型的研究发现关节内注射脂肪组织来源的 MSCs 治疗风湿性疾病,具有实用性和安全性[21]。但在 RA 的临床病例研究中,关节内注射 MSCs 作为治疗手段,仍需要更多实验与评估。

2 外泌体与类风湿性关节炎

当前,外泌体参与 RA 发病已被认知。在 RA 患者的成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLSs)中可分离到含 TNF-α 的外泌体,TNF-α 可激活 NF-κB,进一步可诱导滑膜组织中 T 细胞的抗凋亡机制,进而加重炎症反应[22]。FLSs 来源的携带 CD13 的外泌体可诱导 T 细胞的趋化作用,进一步激活 RA 中的 FLS 增生,并释放多种致炎因子,进而加速 RA 炎症进程[23]。研究显示,Wnt 信号通路在 RA 造成的骨侵袭、骨质疏松等改变中发挥着重要作用[24]。而外泌体也参与了 Wnt 信号通路的调控,CD9 和 CD82 可通过外泌体分泌形式,将 Wnt 通路下游分子 β-catenin 外排到胞外,从而降低自身 Wnt 信号通路活性[24]。同时,肿瘤细胞也可通过外泌体介导的方式,将 14-3-3 蛋白和 β-catenin 转移至下游靶细胞,激活其 Wnt 信号通路[25]。FLS 来源的外泌体中的 miR-221-3p 可影响成骨细胞分化,而在 RA 模型中,TNF 可促进 miR-221-3p 的表达,上调的 miR-221-3p 通过抑制 Wnt 信号通路中的 Dkk,最终可阻滞成骨细胞的分化,影响磨损骨质的修复进程[26]。RA 病人的关节液和滑膜组织中可分离到含 miR-let-7b 的外泌体,而 miR-let-7b 可激活 Toll 样受体(Toll-like receptor,TLR),进而促进 M1 巨噬细胞的增值分化,加重 RA 的炎症反应[27]。RA 的动物模型研究发现,免疫抑制基因修饰的骨髓来源树突状细胞(dendritic cells,DC)的外泌体,可抑制 CIA 动物模型中关节炎的严重程度和发生率[28]。而经白细胞介素 10(IL-10)处理的 DC 来源的外泌体则可抑制 CIA 动物模型的关节炎的发病,并减轻

已发病的动物模型的关节炎严重程度[29]。综上,外泌体参与了 RA 发生发展的多个环节。

3 间充质干细胞源的外泌体与类风湿性关节炎

MSCs-Exos 除携带结构蛋白(细胞膜骨架蛋白、微管蛋白、肌动蛋白和肌球蛋白等)外,还携带多种功能性蛋白(CD9、CD63、CD81、CD82、Hspa8、Hsp60、Hsp70 和 Hsp90、ALG-2 相互作用蛋白 X 与肿瘤易感基因 101 蛋白,代谢相关蛋白 GAPDH、LDHA、PGK1 和 PKM,以及特异性的 MHC-Ⅰ和 MHC-Ⅱ等)[30]。除蛋白质外,MSCs-Exos 还能转运多种 RNA(mRNA、miRNA 和 siRNA 等),其中 mRNA 可直接在靶细胞中翻译出相应的功能蛋白质,发挥再生修复等作用;miRNA 则通过沉默或抑制目标 mRNA 翻译,从而下调蛋白质在靶细胞中的表达;siRNA 则可敲除受体细胞中的目标基因达到基因沉默的作用[31]。

体外实验发现,MSCs-Exos 可通过减少 T、B 淋巴细胞的增殖,在炎症性关节炎诱导 Treg 细胞群来发挥免疫抑制作用[32]。动物体内实验发现,MSCs-Exos 可以减轻骨性关节炎动物的骨关节炎症状[33]。已报道,软骨细胞可在密闭的、处于低氧环境的关节腔内,正常新陈代谢,但极低氧环境可促进促炎因子(IL-1、IL-6 和 MCP-1 等)及趋化因子(CXCL-12、COX-2、血管内皮生长因子和前列腺素 E2)等生成,诱发微环境中慢性炎症反应、软骨下骨硬化与骨赘形成[34]。已报道,这些骨性关节病理微环境的改变与局部外泌体所携带的多种蛋白和 RNA 转运密切相关[35]。另外,基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases,MMP)可介导细胞外基质的降解,炎症因子穿透软骨表面可导致 RA 炎症滑膜局部浸润[36]。携带 miRNA-150-5p 的 MSCs-Exos 可显著下调了 MMP14 和血管内皮生长因子的表达,减轻了关节炎的严重程度[37]。

综上,在 RA 中,MSCs-Exos 不但具备 MSCs 的治疗效果,且降低了 MSCs 的潜在治疗风险,有望为 RA 的治疗提供新的策略,但仍需更多的动物模型和临床研究。

4 展望

近年来,MSC 治疗 RA 的研究取得一定的进展,但在动物及临床病例研究中显示其存在一定的治疗风险。但 MSCs 排泌的功能性 Exos 不但具备 MSCs 的疗效,且降低了 MSCs 的潜在治疗风险。然而,这一新疗法仍有一些问题急需解决:(1)如何获取大量的可用于治疗的外泌体;(2)需开发高效的外泌体的分离及纯化的技术方法;(3)外泌体组成成分复杂,需进一步研究各效应成分的作用机制。随着 Exos 研究技术的成熟,以及更多的动物模型和大规模的临床研究,MSCs-Exos 有望为 RA 的治疗提供新的策略。

参考文献:

[1] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(9): 2569-2581.

[2] Koenders MI, van den Berg WB. Novel therapeutic targets in rheumatoid arthritis [J]. Trends Pharmacol Sci, 2015, 36(4): 189-195.

[3] Abdi E, Najafipour H, Joukar S, et al. Expression of IGF-1, IL-27 and IL-35 receptors in adjuvant induced rheumatoid arthritis model [J]. Iran J Immunol, 2018, 15(1): 14-27.

[4] Lai NS, Yu HC, Tung CH, et al. The role of aberrant expression of T cell miRNAs affected by TNF-α in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 261.

[5] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells [J]. Exp Hematol, 2003, 31(10): 890-896.

[6] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(8): 581-593.

[7] Cosenza S, Ruiz M, Toupet K, et al. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 16214.

[8] Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process [J]. Leukemia, 2011, 25(9): 1408-1414.

[9] Djouad F, Bony C, Häupl T, et al. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells [J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(6): R1304-R1315.

[10] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli [J]. Blood, 2002, 99(10): 3838-3843.

[11] Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide [J]. Blood, 2003, 101(9): 3722-3729.

[12] Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, et al. IFN-γ activation of

mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease [J]. Eur J Immunol, 2008, 38(6): 1745-1755.

[13] Eljaafari A, Tartelin ML, Aissaoui H, et al. Bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal cells promote Th17 cell expansion and activation through caspase 1 activation: contribution to the chronicity of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(7): 2147-2157.

[14] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation [J]. Transplantation, 2003, 75(3): 389-397.

[15] Augello A, Tasso R, Negrini SM, et al. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(4): 1175-1186.

[16] Liang J, Li X, Zhang H, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in patients with refractory RA [J]. Clin Rheumatol, 2012, 31(1): 157-161.

[17] Wang L, Wang L, Cong X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy [J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(24): 3192-3202.

[18] Liang J, Zhang H, Hua B, et al. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(8): 1423-1429.

[19] Sullivan C, Murphy JM, Griffin MD, et al. Genetic mismatch affects the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells in vitro and their ability to influence the course of collagen-induced arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(4): R167.

[20] Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals [J]. Blood, 2003, 102(10): 3837-3844.

[21] Toupet K, Maumus M, Peyrafitte JA, et al. Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice [J]. Arthritis Rheum, 2013, 65(7): 1786-1794.

[22] Zhang HG, Liu C, Su K, et al. A membrane form of TNF-α presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death [J]. J Immunol, 2006, 176(12): 7385-7393.

[23] Morgan RL, Behbahani-Nejad N, Endres J, et al. Localization, shedding, regulation and function of aminopeptidase N/CD13 on fibroblast like synoviocytes [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162008.

[24] Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions [J]. Blood, 1989, 74(5): 1844-1851.

[25] Dovrat S, Caspi M, Zilberberg A, et al. 14-3-3 and β-catenin are secreted on extracellular vesicles to activate the oncogenic Wnt pathway [J]. Mol Oncol, 2014, 8(5): 894-911.

[26] Maeda Y, Farina NH, Matzelle MM, et al. Synovium-derived microRNAs regulate bone pathways in rheumatoid arthritis [J]. J Bone Miner Res, 2017, 32(3): 461-472.

[27] Kim SJ, Chen Z, Essani AB, et al. Identification of a novel Toll-like receptor 7 endogenous ligand in rheumatoid arthritis synovial fluid that can provoke arthritic joint inflammation [J]. Arthritis Rheumatol, 2016, 68(5): 1099-1110.

[28] Cai Z, Zhang W, Yang F, et al. Immunosuppressive exosomes from TGF-β1 gene-modified dendritic cells attenuate Th17-mediated inflammatory autoimmune disease by inducing regulatory T cells [J]. Cell Res, 2012, 22(3): 607-610.

[29] Kim SH, Lechman ER, Bianco N, et al. Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis [J]. J Immunol, 2005, 174(10): 6440-6448.

[30] Pashoutan Sarvar D, Shamsasenjan K, Akbarzadehlaleh P. Mesenchymal stem cell-derived exosomes: new opportunity in cell-free therapy [J]. Adv Pharm Bull, 2016, 6(3): 293-299.

[31] Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes [J]. J Vis Exp, 2012(59): e3037.

[32] Cosenza S, Toupet K, Maumus M, et al. Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis [J]. Theranostics, 2018, 8(5): 1399-1410.

[33] Withrow J, Murphy C, Liu Y, et al. Extracellular vesicles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2016, 18(1): 286.

[34] Chenevier-Gobeaux C, Simonneau C, Lemarechal H, et al. Effect of hypoxia/reoxygenation on the cytokine-induced production of nitric oxide and superoxide anion in cultured osteoarthritic synoviocytes [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(6): 874-881.

[35] Toh WS, Lai RC, Hui JHP, et al. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: Implications for osteoarthritis treatment [J]. Semin Cell Dev Biol, 2017, 67: 56-64.

[36] Karsdal MA, Madsen SH, Christiansen C, et al. Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(3): R63.

[37] Chen Z, Wang H, Xia Y, et al. Therapeutic potential of mesenchymal cell-derived miRNA-150-5p-expressing exosomes in rheumatoid arthritis mediated by the modulation of MMP14 and VEGF [J]. J Immunol, 2018, 201(8): 2472-2482.

〔收稿日期〕2018-11-15