



左为, 同济大学医学院教授、博士生导师, 国家重点研发计划“干细胞及转化研究”项目负责人, 浙江省江南干细胞研究院院长, 中组部青年“千人计划”专家, 教育部“长江学者奖励计划”青年学者, 吉美瑞生(Regen Therapeutics)创始人, 国家卫生健康委员会、国家食品药品监督管理局首批干细胞临床研究备案项目共同负责人, 上海市肺科医院特聘研究员, 中国人民解放军陆军军医大学客座教授, 呼吸疾病国家重点实验室特聘教授, 江苏省创新创业领军人才, 浙江省“千人计划”专家, 中国细胞生物学学会细胞治疗分会委员。致力于上皮组织器官再生的基础科学原理研究, 发明了肺、肾、子宫等多种人类成体组织干细胞体外稳定扩增技术、人工器官构建和人鼠嵌合器官构建技术, 发明了干细胞肺内移植方法, 完成全球首例干细胞肺内移植与肺脏再生临床试验。相关论文以第一或通讯作者身份发表在*Nature*、*Molecular Cell*、*Protein & Cell*等国际期刊上。积极探索干细胞治疗作为药品的研发路径, 其研究成果转化的REGEN001干细胞制剂已作为一类新药进入国家食品药品监督管理局注册申报阶段。

<http://med.tongji.edu.cn/Web/FacultyShow/272?tid=121>

呼吸系统干细胞临床研究进展

马煜¹ 瞿介明² 左为^{3,4*}

¹苏州吉美瑞生医学科技有限公司, 苏州 215000; ²上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海 200025;

³同济大学附属上海市肺科医院, 上海 200433; ⁴广州医科大学呼吸疾病国家重点实验室, 广州 510120

摘要 呼吸系统疾病是造成人类死亡的最重要原因之一, 针对许多持续进展的呼吸系统疾病目前尚无有效的治疗手段。基于干细胞治疗的再生医学技术为这些疾病的治疗带来了新的希望。早期的干细胞治疗主要采用自体或异体的间充质干细胞, 虽然安全性较好, 在疗效方面却未观察到对疾病的改善作用, 这可能与间充质干细胞并无分化形成成熟上皮组织和结构的能力有关。成体肺内存在二型肺泡上皮细胞和支气管基底层细胞两大类肺干细胞, 其中支气管基底层细胞具有分化形成肺泡和支气管上皮组织的潜能。通过成熟的制备工艺, 支气管基底层细胞能够在体外被分离和扩增并制备为临床级的细胞制剂, 从而被广泛应用于临床研究。已有的报道显示, 自体支气管基底层细胞肺内移植用于支气管扩张临床研究具有较好的安全性, 同时在修复受试者肺损伤, 提升肺功能方面也表现出了一定的效果。而自体支气管基底层细胞用于慢性阻塞性肺病和间质性肺病的临床研究也正在开展中。随着这些临床研究的深入进行, 干细胞移植治疗呼吸系统损伤疾病的安全性和有效性将逐步得到确认。该文对于已报道的间充质干细胞治疗呼吸系统疾病的临床研究进行了概括和分析, 同时也详细介绍了目前已经发现的成体肺内的两大类肺干细胞, 并对自体支气管基底层细胞在临床治疗呼吸系统疾病研究中的相关进展进行了具体而全面的总结。

关键词 呼吸系统疾病; 细胞治疗; 支气管基底层细胞; 肺干细胞; 肺再生

中国科技部国家重点研发计划“干细胞及转化研究”专项(批准号: 2017YFA0104600、2018YFA0108800)和国家自然科学基金(批准号: 81570091、81770073)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-65985082, E-mail: zuow@tongji.edu.cn

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2017YFA0104600, 2018YFA0108800) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81570091, 81770073)

*Corresponding author. Tel: +86-21-65985082, E-mail: zuow@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2019-01-17 16:29:13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190117.1628.002.html>

Stem Cell Clinical Trials for Respiratory Diseases

Ma Yu¹, Qu Jieming², Zuo Wei^{3,4*}

(¹Suzhou Regend Therapeutics Co., Ltd, Suzhou 215000, China; ²Ruijin Hospital, Medical School of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China; ³Shanghai Pulmonary Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200433, China; ⁴Guangzhou Institute of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China)

Abstract Respiratory system disease is one of the leading reasons for human death. Till now, there is no effective method for treatment of these continuously deteriorated diseases. Regenerative medicine based on stem cell therapy bring new hopes for such disease treatment. Alveolar epithelial type II cells and bronchial basal cells are two major types of tissue-specific stem cells in adult lung. Bronchial basal cells, sometimes also referred as distal airway stem cells, have the capacity to regenerate functional alveolar and bronchial epithelium. Moreover, bronchial basal cells can be isolated and expanded *in vitro* to make clinical-grade products, which have been widely applied in clinical trials. In this review, we discussed the major types of lung stem cells and summarized the stem cell clinical trials for multiple respiratory diseases, especially the autologous intrapulmonary transplantation of bronchial basal cells for lung regeneration purpose.

Keywords respiratory system disease; cell therapy; bronchial basal cells; lung stem cells; lung regeneration

呼吸系统对于人体的正常生命活动非常重要, 主要行使人体与外界环境间的气体交换功能。在呼吸系统中, 鼻及各级气管和支气管发挥着通气功能, 而支气管末端的肺泡则与周围的毛细血管相互作用, 发挥着气体交换的功能。从细胞组成上看, 呼吸系统是一个由上皮细胞和其他类型基质细胞共同构成的复杂组织。在执行呼吸任务的过程中, 呼吸系统中上皮细胞会发生一定程度的损耗。特别是当接触到一些外来的或内在的有害物质(例如大气污染物、细菌病毒或血液中的毒性物质)的时候, 呼吸系统中上皮细胞会大量死亡并诱发炎症反应, 从而导致肺部组织大规模损伤的发生。这种大规模的损伤往往会引发各种急性和慢性的肺部疾病, 包括急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[1]、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)^[2]、特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)^[3-4]和支气管扩张(bronchiectasis)^[5]等。根据世界卫生组织的统计, 各种呼吸系统疾病, 特别是肺部疾病(不包括肺部肿瘤)为仅次于肿瘤和心血管病的威胁人类健康的第三大杀手。在我国, 由于近年来工业化进程的发展及随之而来的大气污染加重, 呼吸系统疾病的发生率正处于急速攀升的态势。加之许多呼吸系统疾病的发生和发展是不可逆的, 医学界目前对于这些不可逆的呼吸系统病变尚无有效的治疗

手段, 同时, 这也给社会带来了巨大的经济负担。仅COPD一种疾病, 其发病率在我国40岁以上人群中超过13.7%, 整体经济负担已居我国疾病治疗经济负担第二位^[6]。因此, 对于急性和慢性肺部损伤及修复的研究和临床防控研究非常必要, 呼吸系统疾病的防治形势也变得相当严峻。

对于以上各种类型的急性和慢性肺部疾病, 传统的治疗方法并没有取得特别良好的效果。而以干细胞治疗为代表的新技术, 则为这些疾病的治疗提供了新的思路 and 方案。细胞治疗是指利用某些具有特定功能的细胞的特性, 采用生物工程方法获取和/或通过体外扩增、特殊培养等技术处理后, 使这些细胞获得增强免疫、杀死病原体 and 肿瘤细胞、促进组织器官再生和机体康复等治疗功效, 从而达到治疗疾病的目的。早在上个世纪70年代, 细胞治疗就已经在血液相关疾病治疗(输血和骨髓移植)中得到应用。细胞治疗能够明显弥补器官移植领域中的不足, 如器官或组织来源严重不足、免疫排斥明显、手术时间长、技术要求高等。近年来, 细胞治疗逐渐兴起, 并得以拓展和推广, 同时为治疗部分肿瘤和组织器官损伤性疾病带来了新的方法和曙光^[7]。目前细胞治疗根据治疗目的和机理不同主要分为两类: 一类为抗肿瘤的细胞治疗, 如CAR-T细胞治疗等^[8-11]; 另一类为组织损伤的细胞治疗, 如皮肤细胞移植治

疗烧伤或皮肤损伤^[12]、肝实质细胞移植治疗肝衰竭和其他肝代谢疾病^[13]、角膜缘细胞移植治疗角膜损伤^[14]等。各类细胞治疗方法正被运用到包括血液系统疾病、肿瘤、糖尿病、心血管病、神经系统疾病等多种疾病的治疗中^[15]。随着技术的逐步成熟,也陆续有细胞治疗的产品被欧盟或美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市,也有少量在韩国、日本、澳大利亚批准上市,用于相关疾病的治疗,其中也包含部分干细胞治疗产品^[15]。

相比于异体干细胞治疗来说,自体干细胞治疗的细胞来源于自体,更具有安全性^[16-17]。相比于传统药物治疗及器官移植治疗,自体细胞治疗存在以下优点。(1)细胞来源于自身,不存在免疫排斥问题。(2)移植细胞来源于成体组织器官,本身即是身体的一部分,故在理论上不存在成瘤的风险。(3)细胞具有一定程度的可塑性,其分裂和迁移能力活跃,在适当的环境中可以补充凋亡或坏死的同组织或同类型细胞。(4)操作简单。移植细胞不具备器官的正常外形及解剖结构,不再是一个完整的器官,而是一个细胞群,移植时常制成细胞悬液,无须吻合血管,因此,移植是通过各种输注途径来实现的。(5)多种治疗机制,可通过迁移到组织受损部位并分化为正常组织细胞发挥修复作用,同时也通过旁分泌机制,分泌各种抗炎因子,抑制促炎因子分泌发挥作用。

1 早期间充质干细胞在呼吸系统疾病治疗中的探索

早期用于细胞治疗的细胞多为间充质干细胞。间充质干细胞为目前临床应用最多的一类干细胞,其分布广泛,可来源于脐带、胎盘、骨髓、血液、脂肪组织等全身性的组织^[18-20],易于体外分离并大量扩增。在呼吸系统疾病的治疗方面,间充质干细胞已经被用于多种慢性和急性呼吸系统损伤的临床研究,其中部分研究已经完成并报道了研究结果。

目前已有关于间充质干细胞治疗COPD(包含肺气肿)的临床研究的结果报道。第一个结果报道的关于COPD的细胞治疗研究(NCT01110252)在巴西完成,采用非随机自身对照的研究设计,整个研究共招募了4名重度(4级呼吸困难)的COPD患者进行自体骨髓来源的间充质干细胞的移植^[21]。在细胞移植后对患者进行了12个月的跟踪随访,结果显示,间充质干细胞移植治疗在这4名COPD患者身上表现

出了较好的安全性,未出现明显的不良反应。但是4名患者的肺功能检查指标第1秒用力呼出的气量容积(the first second of forced expiratory volume, FEV₁)、用力肺活量(forced vital capacity, FVC)和肺活量(vital capacity, VC)均未表现出明显的上升^[21],说明间充质干细胞移植并未表现出治疗的有效性。之后一项关于COPD的细胞治疗研究(NCT00683722)在美国完成,该研究采用了随机、双盲、安慰剂平行对照的研究设计,共招募62名中度和重度的COPD患者(2级呼吸困难和3级呼吸困难)参与研究,其中30名COPD患者进行异体骨髓间充质干细胞(prochymal)的移植,另外32名COPD患者进行安慰剂(细胞回输溶剂)的治疗^[22]。在移植后对两组患者均进行了为期2年的随访跟踪,期间并未出现与间充质干细胞相关的死亡或严重不良事件,但是也并未观察到间充质干细胞移植给COPD患者的肺功能检查指标(包含FEV₁、FVC、FEV₁/FVC等)和生活质量评估(包含6分钟步行测试和博格呼吸困难评分等)方面带来明显的改善^[22]。

另一项临床研究(NCT01306513)中,研究者将单向支气管内活瓣植入和间充质干细胞移植结合起来,目的是通过减少发炎来降低单向支气管内活瓣植入治疗重度COPD患者的并发症^[23]。该研究为患者单盲、随机、安慰剂对照设计的I期临床研究。5名试验组患者在进行单向支气管内活瓣植入前进行异体骨髓来源间充质干细胞的移植,5名对照组患者在进行单向支气管内活瓣植入前进行安慰剂(生理盐水)的注射。之后对两组患者均进行了90天的跟踪随访,未有细胞相关的不良事件发生。但间充质干细胞的移植也未能给患者的肺功能带来改善^[23]。另外,考虑到该研究的实验设计,间充质干细胞的移植只是单向支气管内活瓣植入治疗COPD的辅助,并不能直接反映间充质干细胞对于COPD治疗的效果。

关于间充质干细胞治疗IPF的临床研究(NCT01385644)也已经有报道^[24]。据报道,该临床研究采用开放、单中心、非随机、前后自身对照的设计,共招募8名中度的IPF患者接受了异体胎盘来源的间充质干细胞的移植,之后对患者进行了6个月的随访跟踪。结果显示,治疗的安全性较好,未出现严重不良事件,但肺功能检测的指标包含[FVC、肺一氧化碳弥散量(diffusing capacity of the lung for carbon monoxide, DLCO)等]和生活质量评估(包含6分钟步

行距离等)显示患者各项指标在6个月内未发生明显的下降,但也未发生明显的提升^[24],这说明间充质干细胞的移植可能减缓了疾病的进程,但仍然未能起到逆转疾病发展的作用。

已报道的间充质干细胞移植治疗急性呼吸窘迫综合征的临床研究(NCT01775774)采用多中心、开放的研究设计,共招募9名中度到重度的ARDS患者进行异体骨髓来源间充质干细胞的移植^[25]。虽然在随后的观察中发现有受试者发生严重不良事件,但均排除与细胞的移植有关^[25]。而在疗效方面,间充质干细胞移植后ARDS患者的肺损伤评分和序贯器官衰竭评分(sequential organ failure assessment, SOFA)均发生下降,未检测到改善^[25]。

综上所述,间充质干细胞的移植对于呼吸系统损伤疾病的治疗具有较好的安全性,但在功能方面并未表现出较好的疗效。从理论上讲,间充质干细胞并无分化形成成熟上皮组织和结构的能力,无法对呼吸系统中损伤的组织进行修复,从而也无法逆转疾病的发生和发展。此外,由于间充质干细胞本身属于成纤维细胞类型,其肺内移植具有促进肺组织纤维化加重的风险,需要严格谨慎地对其风险进行把控。由此来看,在间充质干细胞之外寻找到真正具有肺组织分化潜能的干细胞并将其用于移植治疗,将成为今后呼吸系统疾病细胞治疗的关键所在。

2 肺干细胞的分类及再生修复机制

肺脏是呼吸系统的核心部分,是一个由气管、支气管和肺泡组成的复杂器官,其主要功能是行使机体与外界环境的气体交换过程。气管及各级支气管是通气的结构,而肺泡是换气的主要结构。气管及支气管上皮主要由基底层细胞、分泌细胞(club cell)和纤毛细胞构成。肺泡主要由一型肺泡上皮细胞、二型肺泡上皮细胞及其周围的毛细血管构成。其中一型肺泡上皮是血-气交换的位置,而二型肺泡上皮主要行使分泌表面活性因子的功能。就不同的生物物种而言,其肺脏的细胞组成、结构和功能都存在一定程度的差异,以便与其特定的生活环境及发育周期相适应。

成年动物和人体的肺内存在若干种不同类型的肺干细胞(lung stem cell)或肺前体细胞(lung progenitor cell),它们具有不同程度的肺上皮组织分化的潜能,在不同的生理及病理状态下发挥组织自稳态

维持及损伤修复的功能。与间充质干细胞不同,这些成体肺干细胞是真正意义上具有肺再生功能的种子细胞。值得注意的是,由于成体组织中“干细胞”和“前体细胞(又有人称其为祖细胞)”这两个概念常常交替被使用,在本文中我们也不对其进行严格界定区分。总体上来看,可以将肺干细胞或肺前体细胞分为二型肺泡上皮细胞(alveolar epithelial type 2 cell, AEC2)和支气管基底层细胞(basal cell)两大类。

AEC2是肺内远端气道组织中主要行使分泌功能的细胞。近来的研究表明,在AEC2中有一类*Axin2*基因高表达的细胞类群,对Wnt信号具有较好的响应性,被认为具有肺前体细胞的特性^[26-28]。这类细胞还表达TM4SF1细胞表面分子标记,因此可以被流式细胞仪分选研究。在体外三维培养条件下,这类AEC2来源的肺前体细胞可以分化成为一型肺泡上皮及二型肺泡上皮细胞。在小鼠体内的谱系追踪试验也证实这些细胞可以在动物体内分化成为成熟的肺泡上皮细胞^[26-28]。然而,由于缺乏体内移植数据,目前尚不明确人体内的这类AEC2是否具有再生肺泡的能力^[26-28]。由于AEC2分布位置在远端肺实质区域,它主要在肺部日常自稳态维持和轻微损伤修复中发挥作用。当肺实质出现大规模损伤之后,AEC2本身的死亡导致它难以发挥出再生修复的功能。

当肺部出现大规模损伤之后,位于近段气道的支气管基底层细胞担负起修复再生肺组织的任务。支气管基底层细胞包含远端气道干细胞(distal airway stem cell, DASC),它是在动物和人体支气管上皮底层位置天然存在的一类特殊的细胞,特异表达*Krt5*和*P63*标记基因。这类细胞具有多种分化潜能。一方面,它可以在支气管内分化成为分泌细胞和纤毛细胞,修复再生支气管上皮;另一方面,这类细胞可以感知远端肺实质的损伤,进而被激活从近段沿支气管迁移进入肺实质,完成肺实质的损伤修复^[29-31]。

哈佛大学Frank McKeon研究组^[29]于2011年率先从小鼠远端支气管中鉴定到这一细胞类群。2015年,通过在小鼠体内利用遗传谱系追踪的方法进行研究,McKeon研究组^[29]证实,表达*Krt5*基因的支气管基底层细胞在流感病毒感染后发生一系列增殖、迁移和分化的活动。发表在*Nature*期刊的进一步的动物试验还证实,如果在小鼠体内用遗传学方法特异剔除掉支气管基底层细胞,则小鼠的肺功能不仅

无法修复,反而会发生组织纤维化^[30]。由此推断,支气管基底层细胞对于肺脏的修复是必需的。同时,在H1N1流感病毒损伤的小鼠肺损伤模型中,将小鼠来源的支气管基底层细胞经过标记之后,经气管移植到小鼠肺脏中,可观察到供体细胞在受体肺脏中大面积整合,并分化形成成熟的肺泡和支气管结构^[30]。同期上,加州大学的Harold Chapman研究组^[31]也发表论文阐释了Krt5⁺/P63⁺支气管基底层细胞被Notch信号激活的机理。他们的研究还指出,正常状态下支气管基底层细胞在肺内主要分化成为一型肺泡样细胞,而几乎不能分化成为AEC2。然而,如果用药物抑制Notch信号通路,则可以改变其分化偏好,产生大量的AEC2^[31]。类似地,2017年,Michael O' Reilly研究组^[32]也通过谱系追踪实验也证实小鼠支气管基底层细胞更倾向于分化成为一型肺泡上皮细胞。特别是当肺泡出现严重损伤以及原来的AEC2大量缺失的时候,支气管基底层细胞对肺脏再生的贡献尤为显著。因此从某种意义上来说,支气管基底层细胞相对于AEC2而言是一类更高层级的成体干细胞。同年,Cardoso研究组^[33]证实,小鼠胚胎期气道内的P63⁺细胞在成年后表现为P63⁺/Krt5⁺细胞,是支气管基底层细胞的最原始形式,可进一步转变成为P63⁺/Krt5⁺细胞。这一研究对成体肺干细胞的胚胎起源过程作出了阐释。

在成年人体内,支气管基底层细胞在人的支气管上皮组织底层广泛分布,其中在支气管上皮凹陷处的个别细胞同时还表达SOX9^[34]。在胚胎期,具有成体肺泡发育潜能的肺前体细胞表达SOX9,而SOX9表达异常将影响成体肺泡的形成^[35-36],提示表达SOX9的成体支气管基底层细胞与胚胎期的肺前体细胞具有相似性,可能也具有肺泡形成的能力。通过支气管镜刷检,可以从人的3~4级支气管中获取含有这群细胞的支气管刷检组织^[37]。将这群细胞铺到胚胎来源的滋养层细胞上进行培养,3~5天后可以观察到支气管基底层细胞克隆的长出,同时在体外特定培养环境中,这些细胞能够在短期内大量扩增,同时维持其分化潜能^[34]。蛋白水平上的检测发现,这些支气管基底层细胞克隆能够表达肺前体细胞的标记物NKX2.1和Ki67,同时还为KRT5和P63双阳性。将支气管基底层细胞进行RNA-Seq检测,也确认了这群细胞高表达干细胞的标记物KRT5、P63、NGFR、S100A、integrin 6、integrin 4等,低表达支

气管和肺泡成熟上皮的标记物^[38]。已有的报道显示,呼吸系统损伤疾病患者的受损肺泡区域出现了表达P63和KRT5的细胞^[34,39-41],提示P63和KRT5阳性的支气管基底层细胞参与到了肺泡损伤区域的修复中。

德国马普所的Meyer研究组^[42]证实,在体外培养分化条件下,人支气管基底层细胞可以分化成为成熟的支气管上皮和肺泡上皮细胞。通过控制培养基中诱导因子的水平,特别是Notch信号通路的水平,可以有效地控制分化的偏向性。我们的研究团队^[34]发现,若将人来源的支气管基底层细胞进行GFP标记后移植到免疫缺陷的肺损伤小鼠中,3周后通过跟踪发现,它们可以大面积地整合到免疫缺陷小鼠的肺损伤部位,形成人鼠细胞嵌合的肺组织。对整合的人支气管基底层细胞进行深入分析,其中一部分整合细胞不再表达SOX9,分化形成肺泡组织,表达成熟上皮细胞的标记物如AQP5和HOPX,也有部分细胞形成了位于支气管区域的表达CC10的分泌细胞以及表达FOXP1和acetylated-tubulin的纤毛细胞。进一步对移植小鼠的功能进行检测发现,支气管基底层细胞在移植到肺损伤小鼠后,能够募集周围的毛细血管,形成血气交换单元,同时研究中还发现,这些损伤小鼠的肺局部纤维化程度在移植人的支气管基底层细胞后明显降低。支气管基底层细胞在小鼠中再生的肺泡也使小鼠动脉血中的二氧化碳分压降低、氧分压和氧饱和度增加,说明支气管基底层细胞的移植通过新生肺泡使肺损伤小鼠的肺功能得到了改善^[34]。

值得一提的是,除了再生出一型肺泡上皮细胞直接提升呼吸功能外,支气管基底层细胞在肺内还被认为具有屏障作用(barrier)^[27,43]。肺实质出现损伤之后,常导致肺内组织液的生成和回流平衡失调,使大量组织液在很短时间内不能被肺淋巴和肺静脉系统吸收,从肺毛细血管内外渗,积聚在肺泡、肺间质和细小支气管内,从而造成肺通气与换气功能严重障碍。而无论是内源的还是移植的支气管基底层细胞,均可以在肺损伤部位形成紧密的上皮屏障,阻止血管渗漏,抑制肺水肿的发生。此外,这一屏障还可以对外来微生物、理化因子和过敏源的侵入起到防御作用。

综上所述,二型肺泡上皮和支气管基底层上皮来源的两类肺干细胞均在肺部损伤修复过程中起着重要的作用。二者在功能上存在相互补充的关系。

就目前来看, 支气管基底层细胞在培养和移植方面的优势使其在临床应用上有更高的潜力, 有望通过新生肺部结构, 修复肺的损伤, 重建肺部的生理功能, 从而达到疾病治疗的目的。同时为目前尚无有效治疗手段的肺损伤疾病(如IPF、COPD、支气管扩张等)治疗提供新的思路和新的希望。

3 支气管基底层细胞临床应用研究现状

综合来看, 支气管基底层细胞在科学性和技术实用性等各方面是最适用于呼吸系统疾病临床治疗的干细胞。目前在美国国立卫生研究院(National Institute of Health, NIH)临床研究官方数据库ClinicalTrials上可以查询到已经登记的相关临床研究, 其中包含支气管扩张、COPD和间质性肺病(interstitial lung disease)的临床研究(表1)。

以上注册应用临床研究的支气管基底层细胞的移植均为自体细胞移植, 即利用稳定的工艺从患者自体分离出支气管基底层细胞之后, 在体外大量扩增, 制备成临床级的人支气管基底层细胞自体回输制剂(图1)。

2018年, 我们的研究组^[34]率先报道了首个支气管基底层细胞移植的临床研究, 适应症为支气管扩张。支气管扩张是由慢性炎症反应引起, 慢性炎症引起支气管结构发生进行性的损伤, 支气管的弹性组织被破坏, 支气管发生持久扩张, 目前利用传统方法并无有效的治疗手段, 结构上的损伤无法得到恢复^[44-45]。在这个小样本探索性研究中, 2名约50岁的

男性非囊性纤维化支气管扩张患者在2016年4月被招募参与自体支气管基底层细胞移植。其中1名患者已经被诊断为支气管扩张长达8年, 具有咳痰和呼吸困难的症状, 且在常规药物治疗后持续加重。肺部CT扫描的结果也显示出多处柱状支气管扩张和斑片状浸润影。另1名患者被诊断为支气管扩张伴随COPD达10年以上, 也具有咳痰和呼吸困难的症状, 在常规药物治疗后症状持续加重。肺部CT扫描显示多处囊状支气管扩张, 支气管壁加厚及斑片状浸润影。研究者通过支气管镜刷检获取2名患者的刷检组织, 之后在GMP规范的环境中, 从这2名支气管扩张患者的刷检组织中成功分离和扩增支气管基底层细胞, 再通过支气管镜将临床级的自体支气管基底层细胞按 1×10^6 个细胞/kg体重的剂量分别回输到两名患者的远端肺叶。在细胞回输前1天, 细胞回输后1月、3月和12月分别对患者的临床状态进行评估, 同时对患者进行持续跟踪到细胞回输后20个月, 结果显示, 2名患者未发生不良反应。细胞移植后患者的肺功能检测中FEV₁、FVC和DLCO/VA指标明显恢复。CT的结果也显示, 其中1名患者的支气管囊性扩张发生区域性的修复(图2), 同时患者自述呼吸困难的症状改善, 运动能力增强, 咳嗽减少, 急性加重的次数也减少; 另1名患者也明显感受到咳嗽减少和急性加重次数减少^[34]。因此, 自体支气管基底层细胞在支气管扩张的治疗中显示出有效的迹象, 为临床研究的进一步探索提供了坚实的基础。

COPD是一组以气流受限为特征的肺部疾病,

表1 已在ClinicalTrials系统上登记的支气管基底层细胞临床研究汇总*

Table 1 Summary of the clinical researches of bronchial basal cells registered on ClinicalTrials*

序号 No.	注册号 Register No.	适应症 Disease	主要终点指标 Primary outcome measures
1	NCT02722642	Bronchiectasis	HRCT
2	NCT03021681	COPD	FEV ₁ , HRCT, ABG, 6MWT
3	NCT03092648	COPD	FEV ₁ , FVC
4	NCT03153800	Chronic respiratory diseases	FEV ₁ , DLCO
5	NCT03188627	COPD	FEV ₁ , FVC
6	NCT03156673	COPD	FEV ₁ , FVC
7	NCT02745184	IPF	FVC
8	NCT02796781	ILD [#]	DLCO
9	NCT03655808	Bronchiectasis	DLCO
10	NCT03655795	COPD	DLCO

*以上数据截至2018年9月20日。*国家卫生健康委员会、国家食品药品监督管理局药监局干细胞临床研究备案项目。

*Above are data before September 20th, 2018. *This project was put on record by National Health Commission of China and National Medical Products Administration of China as clinical research of stem cells.

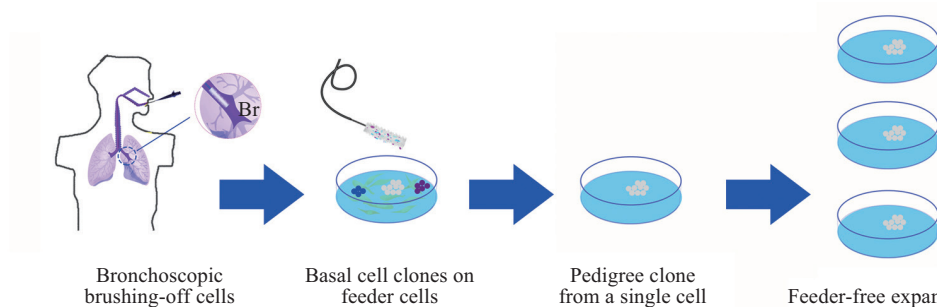
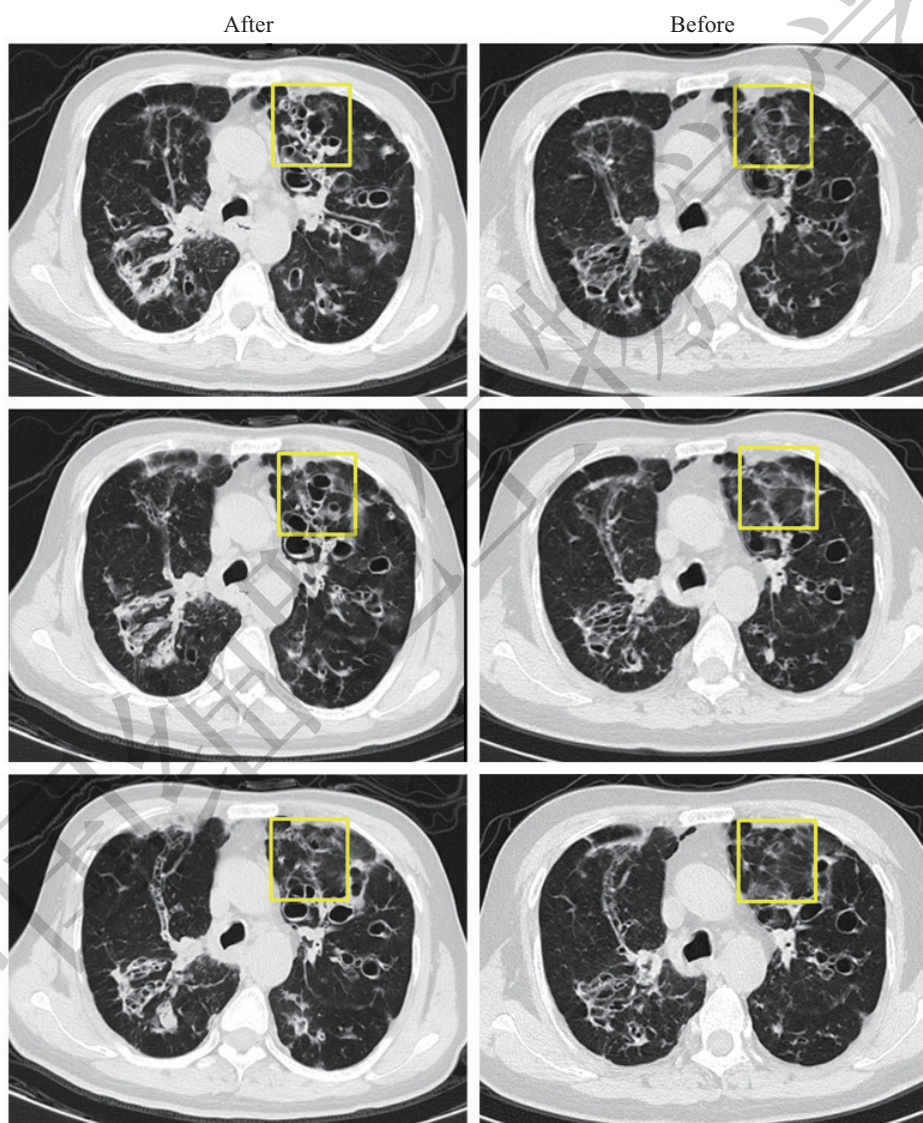


图1 支气管基底层细胞的分离和扩增流程图(根据参考文献[34]修改)

Fig.1 Diagram of isolation and expansion of bronchial basal cells (modified from reference [34])



支气管扩张患者接受自体支气管基底层细胞移植前和移植一年后的肺部高分辨率CT图片。同一层面连续三张CT图像展示了支气管扩张结构在移植之后局部的改善修复(黄色框部分)。

Images from high-resolution CT scan of a bronchiectasis patient before and 1 year after autologous transplantation of bronchial basal cells. Three consecutive CT images at the same layer show regional recovery of bronchiectasis after transplantation (Yellow square).

图2 支气管基底层细胞移植治疗支气管扩张临床试验CT图片(根据参考文献[34]修改)

Fig.2 CT images from the clinical research of bronchiectasis patient transplanted with bronchial basal cells (modified from reference [34])

发病率和死亡率都较高^[46]。在我国有超过4 000万COPD患者, 每年有超过60万人因此而死亡, 造成了巨大的社会和经济负担^[6]。吸烟或其他有害气体或颗粒刺激引起小气道的炎症, 从而造成COPD患者支气管或肺泡结构的损伤。目前传统的治疗方法仅为对症处理, 未能从根本上解决肺部结构损毁的问题, 支气管基底层细胞治疗或许为其治疗提供了新的思路。目前, 在美国NIH临床研究官方数据库Clinicaltrials中, 可以查询到6项关于支气管基底层细胞移植治疗COPD的早期临床研究, 目的是探索自体支气管基底层细胞移植治疗COPD的安全性和有效性。从查询到的内容看, 临床研究的对象多为40~75岁的COPD患病人群, 无性别偏向, 既有单中心、非随机、前后对照的试验设计, 也有单中心、非随机、同期对照的试验设计, 试验组的干预均为自体支气管基底层细胞的移植。而评估的主要疗效指标也是肺功能的指标, 其他次要疗效指标也包含肺功能、HRCT评分、6分钟步行距离和一些量表分析。目前美国NIH临床研究官方数据库ClinicalTrials的数据显示5项已注册的关于支气管基底层细胞治疗COPD的临床研究处于受试者招募的状态, 另1项研究虽已注册但尚未开始招募受试者。虽然支气管基底层细胞治疗COPD在理论上具有很好的前景, 但研究的具体结果还有待研究者的后续报道。

间质性肺病(interstitial lung disease, ILD)是肺间质相关的一组肺部疾病总称, 包含弥漫性肺实质、肺泡炎症和间质纤维化等病理病变。其中, IPF是一种严重的ILD类型, 患者存活时间较短, 仅3~5年; 患者的肺泡结构发生损伤, 肺间质纤维化; 临床上通常表现出活动性呼吸困难、限制性通气障碍、弥散功能降低和低氧血症等症状; 同时随着时间推移发生持续加重或肺功能下降^[47]。对于IPF的治疗, 虽然已有的吡啡尼酮和尼达尼布两种药物对患者的肺功能下降有一定的延缓作用, 但也难以逆转病程, 肺部损伤结构难以获得修复^[48-49]。在我国干细胞备案系统中, 已有1项名为“人自体支气管基底层细胞治疗间质性肺病临床研究”的项目成功备案(注册号为CMR-20161212-002)。该项临床研究采用单中心、非随机、前后自身对照的设计, 其目的主要用于评价自体支气管基底层细胞移植治疗ILD的安全性和有效性。根据目前项目的进展情况, 未发生与自体支气管基底层细胞相关的不良事件, 包括成瘤事件。

同时, 已有的初步结果显示, 人支气管基底层细胞自体回输制剂的移植治疗能够有效地改善或稳定ILD患者的肺弥散功能DLCO, 而已有的药物如吡啡尼酮和尼达尼布等均不能对患者的肺弥散功能有改善作用^[48-49]。肺弥散功能主要指氧和二氧化碳通过肺泡及肺毛细血管壁在肺内进行气体交换的过程, 也是呼吸系统最重要的作用之一。而肺弥散功能的改善也间接说明移植的自体支气管基底层细胞新生了肺泡结构, 重建了血气交换单元, 这与人支气管基底层细胞移植到免疫缺陷的肺损伤小鼠中能够形成具有换气功能的血气交换单元的观察结果一致。由此可见, 自体支气管基底层细胞对于ILD的治疗提供了新的希望。

4 结论与展望

结合科学理论和现有实验数据来看, 相比间充质干细胞移植, 以支气管基底层细胞为代表的成体肺干细胞移植在呼吸系统疾病治疗方面整体上具有较明显的优势。支气管基底层细胞一方面可以在体外大量增殖, 同时具有成熟的工艺被制备成临床可用的细胞制剂; 另一方面也能在肺损伤的动物模型中分化形成成熟的支气管上皮和肺泡上皮结构, 从而修复损伤的呼吸系统, 恢复其功能。这说明, 支气管基底层细胞移植在修复呼吸系统损伤中具有很高的可能性。支气管基底层细胞移植为呼吸系统疾病的临床治疗提供了新的潜在方法。

在已有的早期临床研究中, 均为自体支气管基底层细胞的移植, 一方面其在损伤性的呼吸系统疾病中表现出了很高的安全性, 另一方面从已经报道的少量临床病例来看, 自体支气管基底层细胞的移植也在呼吸系统损伤疾病患者身上表现出了有效性的趋势^[34], 为这些疾病的治疗提供了新的思路。随着临床研究的逐渐深入, 自体支气管基底层细胞移植治疗呼吸系统损伤疾病的有效性将会得以真正的验证。随着基础和临床研究的深入进展, 支气管基底层细胞的应用领域也将会进一步拓展到更多类型的呼吸系统损伤疾病中, 如急性呼吸窘迫综合征、气管损伤等。

目前对于支气管基底层细胞的临床研究, 大多用于自体支气管基底层细胞的移植, 其最大的好处是可以有效避免异体间的排斥反应, 而随着基因改造技术的进步和我们对于免疫排斥反应的越来越深

入的了解, 支气管基底层细胞的改造技术将会越来越成熟, 异体支气管基底层细胞的应用也将成为现实。除成体干细胞之外, 多能干细胞(包括胚胎干细胞和iPS细胞)也可以被诱导成为支气管基底层细胞或成熟的支气管和肺泡细胞^[50-51]。若能很好地解决多能干细胞应用中的安全性问题, 相信这一技术也会有较高的临床应用潜力。在具体实践中, 如何解决好细胞的制备工艺、药理毒理研究、质量管理等问题, 为干细胞治疗产品的规范化规模化应用提出了新的挑战。此外, 在临床试验设计和管理层面, 如何把控好临床安全性、临床有效性、受试者权益保护、风险管理方案等几个关键问题, 从而严格高效地推进干细胞在呼吸系统疾病治疗中的试验, 也是未来将面临的一大挑战。

参考文献 (References)

- Beitler JR, Schoenfeld DA, Thompson BT. Preventing ARDS: progress, promise, and pitfalls. *Chest* 2014; 146(4): 1102-13.
- Mannino DM. COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest* 2002; 121(5 Suppl): 121S-6S.
- King TE Jr, Pardo A, Selman M. *Lancet* 2011; 378(9807): 1949-61.
- Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, Zisman DA, Martinez FJ, Lynch JP, 3rd. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs* 2004; 64(3 Suppl): 405-30.
- Moulton BC, Barker AF. Pathogenesis of bronchiectasis. *Clin Chest Med* 2012; 33: 211-7.
- Wang C, Xu J, Yang L, Xu Y, Zhang X, Bai C, *et al.* Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study. *Lancet* 2018; 391(10131): 1706-17.
- Campbell A, Brieva T, Raviv L, Rowley J, Niss K, Brandwein H, *et al.* Concise review: process development considerations for cell therapy. *Stem Cells Transl Med* 2015; 4(10): 1155-63.
- Johnson JK, Miller JS. Current strategies exploiting NK-cell therapy to treat hematologic malignancies. *Int J Immunogenet* 2018; doi: 10.1111/iji.12387.
- Wang Y, Bo J, Dai HR, Lu XC, Lü HY, Yang B, *et al.* CIK cells from recurrent or refractory AML patients can be efficiently expanded *in vitro* and used for reduction of leukemic blasts *in vivo*. *Exp Hematol* 2013; 41(56): 241-52. e243.
- Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, *et al.* Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2018; 378(5): 439-48.
- Leahy AB, Elgarten CW, Grupp SA, Maude SL, Teachey DT. Tisagenlecleucel for the treatment of B cell acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2018; 18(10): 959-71.
- Hirsch T, Rothoef T, Teig N, Bauer JW, Pellegrini G, De Rosa L, *et al.* Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature* 2017; 551(7680): 327-32.
- Wang F, Zhou L, Ma X, Ma W, Wang C, Lu Y, *et al.* Monitoring of intrasplenic hepatocyte transplantation for acute-on-chronic liver failure: a prospective five-year follow-up study. *Transplant Proc* 2014; 46: 192-8.
- Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* 2010; 363(2): 147-55.
- Trounson A, McDonald C. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. *Cell Stem Cell* 2015; 17(1): 11-22.
- Benoit E, O'Donnell TF, Patel AN. Safety and efficacy of autologous cell therapy in critical limb ischemia: a systematic review. *Cell Transplant* 2013; 22(3): 545-62.
- Sharma A, Sane H, Badhe P, Gokulchandran N, Kulkarni P, Lohiya M, *et al.* A clinical study shows safety and efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy to improve quality of life in muscular dystrophy patients. *Cell Transplant* 2013; 22 Suppl 1: S127-38.
- Ding Y, Yang H, Feng JB, Qiu Y, Li DS, Zeng Y. Human umbilical cord-derived MSC culture: the replacement of animal sera with human cord blood plasma. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2013; 49(10): 771-7.
- Patel J, Shafiee A, Wang W, Fisk NM, Khosrotehrani K. Novel isolation strategy to deliver pure fetal-origin and maternal-origin mesenchymal stem cell (MSC) populations from human term placenta. *Placenta* 2014; 35: 969-71.
- Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2011; 112: 1206-18.
- Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Marcelino MY, Stessuk T, *et al.* Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2011; 6: 63-71.
- Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest* 2013; 143: 1590-8.
- Stolk J, Broekman W, Mauad T, Zwaginga JJ, Roelofs H, Fibbe WE, *et al.* A phase I study for intravenous autologous mesenchymal stromal cell administration to patients with severe emphysema. *QJM* 2016; 109(5): 331-6.
- Chambers DC, Enever D, Ilic N, Sparks L, Whitelaw K, Ayres J, *et al.* A phase 1b study of placenta-derived mesenchymal stromal cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2014; 19(7): 1013-8.
- Wilson JG, Liu KD, Zhuo H, Caballero L, McMillan M, Fang X, *et al.* Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial. *Lancet Respir Med* 2015; 3(1): 24-32.
- Barkauskas CE, Crouse MJ, Rackley CR, Bowie EJ, Keene DR, Stripp BR, *et al.* Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest* 2013; 123(7): 3025-36.
- Zacharias WJ, Frank DB, Zepp JA, Morley MP, Alkhaleel FA, Kong J, *et al.* Regeneration of the lung alveolus by an evolutionarily conserved epithelial progenitor. *Nature* 2018; 555(7695): 327-32.

- 251-5.
- 28 Nabhan AN, Brownfield DG, Harbury PB, Krasnow MA, Desai TJ. Single-cell Wnt signaling niches maintain stemness of alveolar type 2 cells. *Science* 2018; 359: 1118-23.
- 29 Kumar PA, Hu Y, Yamamoto Y, Hoe NB, Wei TS, Mu D, *et al.* Distal airway stem cells yield alveoli *in vitro* and during lung regeneration following H1N1 influenza infection. *Cell* 2011; 147(3): 525-38.
- 30 Zuo W, Zhang T, Wu DZ, Guan SP, Liew AA, Yamamoto Y, *et al.* p63(+)Krt5(+) distal airway stem cells are essential for lung regeneration. *Nature* 2015; 517(7536): 616-20.
- 31 Vaughan AE, Brumwell AN, Xi Y, Gotts JE, Brownfield DG, Treutlein B, *et al.* Lineage-negative progenitors mobilize to regenerate lung epithelium after major injury. *Nature* 2015; 517(7536): 621-5.
- 32 Yee M, Domm W, Gelein R, Bentley KL, Kottmann RM, Sime PJ, *et al.* Alternative progenitor lineages regenerate the adult lung depleted of alveolar epithelial type 2 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017; 56(4): 453-64.
- 33 Yang Y, Riccio P, Schotsaert M, Mori M, Lu J, Lee DK, *et al.* Spatial-temporal lineage restrictions of embryonic p63(+) progenitors establish distinct stem cell pools in adult airways. *Dev Cell* 2018; 44(6): 752-61.e4.
- 34 Ma Q, Ma Y, Dai X, Ren T, Fu Y, Liu W, *et al.* Regeneration of functional alveoli by adult human SOX9(+) airway basal cell transplantation. *Protein Cell* 2018; 9(3): 267-82.
- 35 Perl AK, Kist R, Shan Z, Scherer G, Whitsett JA. Normal lung development and function after Sox9 inactivation in the respiratory epithelium. *Genesis* 2005; 41(1): 23-32.
- 36 Rockich BE, Hrycaj SM, Shih HP, Nagy MS, Ferguson MA, Kopp JL, *et al.* Sox9 plays multiple roles in the lung epithelium during branching morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(47): E4456-64.
- 37 Wimberley NW, Bass JB, Jr., Boyd BW, Kirkpatrick MB, Serio RA, Pollock HM. Use of a bronchoscopic protected catheter brush for the diagnosis of pulmonary infections. *Chest* 1982; 81(5): 556-62.
- 38 Chapman HA, Li X, Alexander JP, Brumwell A, Lorzio W, Tan K, *et al.* Integrin alpha6beta4 identifies an adult distal lung epithelial population with regenerative potential in mice. *J Clin Invest* 2011; 121(7): 2855-62.
- 39 Chilosi M, Poletti V, Murer B, Lestani M, Cancellieri A, Montagna L, *et al.* Abnormal re-epithelialization and lung remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis: the role of deltaN-p63. *Lab Invest* 2002; 82(10): 1335-45.
- 40 Asano S, Takemura T, Katoh K, Taneda M, Kitagawa M. Epithelial regeneration after diffuse alveolar damage in relation to underlying disease and DAD stage: an autopsy study. *J Med Dent Sci* 2011; 58(4): 113-21.
- 41 Smirnova NF, Schamberger AC, Nayakanti S, Hatz R, Behr J, Eickelberg O. Detection and quantification of epithelial progenitor cell populations in human healthy and IPF lungs. *Respir Res* 2016; 17(1): 83.
- 42 Imai-Matsushima A, Martin-Sancho L, Karlas A, Imai S, Zoranovic T, Hocke AC, *et al.* Long-term culture of distal airway epithelial cells allows differentiation towards alveolar epithelial cells suited for influenza virus studies. *EBio Medicine* 2018; 33(5): 230-241.
- 43 Xi Y, Kim T, Brumwell AN, Driver IH, Wei Y, Tan V, *et al.* Local lung hypoxia determines epithelial fate decisions during alveolar regeneration. *Nat Cell Biol* 2017; 19(8): 904-14.
- 44 Wang Z. Bronchiectasis: still a problem. *Chin Med J (Engl)* 2014; 127(1): 157-72.
- 45 Chalmers JD, Aliberti S, Blasi F. Management of bronchiectasis in adults. *Eur Respir J* 2015; 45(5): 1446-62.
- 46 Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000; 343: 269-80.
- 47 Antoniou KM, Margaritopoulos GA, Tomassetti S, Bonella F, Costabel U, Poletti V. Interstitial lung disease. *Eur Respir Rev* 2014; 23(131): 40-54.
- 48 King TE Jr, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, Fagan EA, Glasspole I, Glassberg MK, *et al.* A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 370: 2083-92.
- 49 Richeldi L, du Bois RM, Raghu G, Azuma A, Brown KK, Costabel U, *et al.* Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2014; 370(22): 2071-82.
- 50 McCauley KB, Hawkins F, Kotton DN. Derivation of epithelial-only airway organoids from human pluripotent stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2018; 45(1): e51.
- 51 Hawkins F, Kramer P, Jacob A, Driver I, Thomas DC, McCauley KB, *et al.* Prospective isolation of NKX2-1-expressing human lung progenitors derived from pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2017; 127(6): 2277-94.