



新一代间充质干细胞及其外泌体治疗急性心肌梗死的研究进展

中国医学科学院阜外医院 杨跃进

一、自体骨髓干细胞治疗AMI的优势和缺陷

急性心肌梗死(AMI)再灌注治疗包括急诊冠状动脉介入(PCI)和溶栓治疗,能够挽救缺血和损伤的心肌,缩小梗死(MI)面积,明显改善患者的心功能和近远期预后;但对于坏死的心肌仍无法挽救且不能再生,大面积MI可出现心室重塑,心功能进行性降低,最终导致慢性心力衰竭,5年生存率通常低于50%。

自2002年,Strauer报道首个国际干细胞临床研究以来,临床用于治疗AMI的干细胞,仍然是自体骨髓干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs),包括单个核细胞(mononuclear cells, MNCs)、内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。其中,自体骨髓MSCs因其取材方便、培养技术成熟、体外扩增能力强、可自体移植、异体移植无免疫排斥反应、无伦理争议,以及具有免疫调节功能等众多优势成为心肌再生治疗的优选种子。大量临床研究显示BMSCs治疗AMI均有效,但疗效甚微,仅能提高左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)3%~5%,主要通过旁分泌机制,并无心肌再生作用。国际研究发现干细胞的旁分泌机制通过其外泌体(exosome)介导,后者为直径30~150nm的细胞外囊泡结构,包含多种功能调节蛋白因子、mRNA和非编码RNA等,其通过传递功能分子,在细胞间信号传导和功能调节方面发挥重要作用。外泌体移植治疗AMI具有与干细胞移植相似效果,还有无致瘤风

险、无免疫原性、性质稳定、方便运输及输注等突出优点。特别是无免疫原性,也使异体MSCs的外泌体成为最具潜力的治疗AMI的新一代生物药物,可免去等待自体MSCs所需3~4周的培养扩增时间,但遗憾的是对MI后心功能改善效果与MSCs一样很微弱。

二、新一代MSCs及其外泌体治疗AMI的进展与突破

国际研究已经公认,干细胞移植治疗AMI疗效不佳的原因主要是移植干细胞由于恶劣的炎症环境而存活率较低,另一方面,移植干细胞不能靶向迁移,归巢到MI区的数量很有限。因此,如何使更多移植的干细胞靶向归巢到MI区并存活下来是解决问题的关键。笔者研究团队针对这一国际难题,提出了“土壤-种子”假说,一方面改善“土壤”(炎症微环境),减少移植干细胞死亡;另一方面是优化“种子”,即改良干细胞,使其具有抗凋亡和靶向归巢作用,大幅增加其移植后归巢至MI区的数量和生存率,增强修复能力,提高心功能。

早期研究依据他汀类降脂药具有抗炎、抗凋亡、抗氧化应激和保护内皮功能的多效性(pleiotropic effects),用于改善“土壤”,通过猪AMI模型表明口服大剂量阿托伐他汀(ATV)60~80mg/d可减少移植的MSCs凋亡,提高其存活率,使LVEF提高7.2%,机制与其抗炎和抗氧化应激有关,也与激活RhoA/ROCK/ERK通路相关。临床研究也显示服用大剂量ATV一周,能使大面积前壁AMI恢复期冠脉内移植

自体骨髓MSCs后1年的LVEF中位数提高12.6%(从31.6%~47.5%),显著高于常规剂量他汀的5%(从32.5%~38%, $P=0.001$),并伴有NT-ProBNP显著降低(215.8pg/ml vs 906.6pg/ml, $P=0.005$)和同位素正电子发射断层显像即PET的瘢痕面积缩小(-3.13% vs +3.06%, $P=0.026$),显示了AMI干细胞治疗中改善“土壤”的有效性和必要性。

优化“种子”方面,使用 $1\mu\text{mol/L}$ 阿托伐他汀溶液对MSCs进行预处理24小时,不仅能抗凋亡,还能使MSCs膜受体G蛋白耦联受体4(CXCR4)从膜内外翻,由MI区基质细胞衍生因子1(SDF-1)趋化,促进移植干细胞靶向归巢至MI区(SDF-1/CXCR4轴),形成了新一代MSCs,从大鼠尾静脉输入显著提高干细胞归巢率和存活率,使LVEF提高17.5%,梗死面积缩小50%。口服强化他汀联合他汀预处理的MSCs移植治疗急性心肌梗死可使LVEF增加15.8%(从51.2%~67.0%),梗死面积缩小 $>50%$,还发现口服强化阿托伐他汀能够使梗死区SDF-1表达峰值从AMI后1天延迟至第7天,促进干细胞的持续归巢和存活率来改善心功能。

干细胞移植的最佳时间窗及移植次数是临床的必答题。前者与MI区炎症环境的恶劣程度及其心肌SDF-1分泌水平之间的动态平衡相关。过早移植,即在心肌梗死后3天内给予干细胞移植,由于MI区心肌SDF-1表达高峰,干细胞归巢的增加而被广泛应用。然而,同期MI区恶劣的炎症微环境并不利于归巢的干细胞

生存,这也是临床疗效有限的原因之一。相反,晚期移植,即在心肌梗死之后3~4周给予干细胞移植,对危重患者虽更安全,MI区炎症也已基本消退;但MI心肌分泌的SDF-1水平已很低;而且此时心室重塑已不可逆,瘢痕形成阻碍干细胞的定植,已基本被国际临床研究结果否定。移植次数与治疗效果的关系也是干细胞治疗领域一个备受关注的方面。多数研究均证实对于不同移植途径(静脉移植、心肌内注射等),多次移植较单次移植治疗效果更好。

因此,在他汀改善“土壤”基础上,本团队进一步评价了新一代他汀预处理MSCs在AMI不同时期(早期、中期、晚期)单次、2次、3次移植对提高心功能的影响。早期为MI后第1周,中期为第2周,晚期为第4周。口服强化ATV在AMI后4周过程中均使MI周边区SDF-1分泌显著升高,表达高峰从AMI后1天推迟至1周,第2周仍处于较高水平,甚至到第3周和第4周时,SDF-1的表达量仍然是AMI对照组的3.3倍。最佳移植时间窗是AMI后第2周(中期),三次移植在归巢定植、抗炎抗凋亡、血管新生、血流动力学改善、心功能提高和MI面积缩小等方面均显示较单次产生明显的累积效应,移植疗效较好。中期三次移植归巢率最高,达到23.96%,LVEF值较AMI对照组升高16.2%,MI面积则从AMI组的49.8%降至16.1%,效果突出。机制主要与新一代MSCs更高的归巢和存活率、更强的抗炎抗凋亡

下转第6版

专家介绍



杨跃进 主任医师

主任医师,博士研究生导师,国家心血管病中心原副主任,中国医学科学院阜外医院原副院长,心内科和冠心病中心原主任,现任北京协和医学院长聘教授。长期从事提高骨髓间充质干细胞(MSCs)及其外泌体治疗急性心肌梗死(AMI)效果及机制探索研究。针对骨髓干细胞移植治疗AMI临床疗效低下的国际瓶颈难题,原创提出“土壤”与“种子”假说基础上,通过他汀改善炎症微环境,以利于MSCs的存活(*Eur Heart J* 2008),同时用他汀预处理干细胞增加其存活与归巢(*Am J Transl Res* 2015),不断提出移植方案的优化(*Stem Cells Transl Med* 2019),并对MSCs来源的外泌体移植治疗的机制(*Cardiovasc Res* 2020)及移植方案(*Stem Cell Res Ther* 2019)展开深入研究,取得重要进展并有所突破。

导读

- 干细胞技术产品转化现状与展望 2版
- 肠道菌群对造血干细胞命运及功能的调控机制 3版
- 血红蛋白病离体干细胞基因治疗与同种异体造血干细胞移植比较 4版
- 基于人类多能干细胞体外造血发生体系研究及本课题组最新进展 5版
- 定量谱系分析确定肝-胰-胆系祖细胞生态位 6版
- 探秘Barrett食管来源——食管癌早筛新突破 7版
- 用人胎肝类器官模拟肝母细胞瘤的发展揭示YAP1的激活足以导致肿瘤的发生 8版

干细胞技术产品转化现状与展望

中国医学科学院血液病医院（中国医学科学院血液学研究所）/ 细胞产品国家工程技术研究中心 韩之波

干细胞技术可用于组织损伤修复，是再生医学研究的热点，国内外大量机构在这个领域投入巨资，希望能有所突破。干细胞技术衍生的细胞产品是干细胞技术产业转化的关键，这些产品的出现给患者带来了希望，研发机构、医生、患者都想快速推进干细胞技术产品转化，但配套的政策和管理相对滞后，导致在国内、外均存在研究和应用不规范的现象，甚至是乱象。规范的干细胞技术产品转化将有利于行业的发展，并造福患者。本文就国内外干细胞技术产品转化现状做一简介。

一、国外干细胞技术产品转化现状

国外多个国家已有干细胞技术产品上市，美国将人类组织和细胞类产品分为 PHS 351 和 PHS 361 两大类管理，干细胞技术产品属于 PHS 351 产品，由 FDA 生物制品评估研究中心负责审评。欧盟将干细胞技术产品纳入先进技术治疗医学产品（ATMP）管理，由欧盟药品管理局负责审批。韩国干细胞技术产品由韩国 FDA（KFDA）监管，为促进产业发展，其立法简化了相关审批过程。日本对干细胞技术产品的管理则相对宽松，属于按药品和技术的“双轨”制管理模式，其《再生医学安全法案》（ASRM）规定，只要医院、诊所通过卫生部的认证，就可以进行干细胞技术疗法。

截至 2022 年 3 月，国外已有 14 款干细胞药物获批上市，主要为骨髓、脐带血及脂肪来源的间充质干细胞（MSC）技术产品。虽然已经有多个产品上市销售，但目前国外已上市产品单价较高、销售额不大，其中在日本和欧盟获批上市的 Alofisel 用于治疗克罗恩病患者复杂肛周瘘，其售价约 7 万美元/疗程，在日本批准上市销

售的 Temcell 用于治疗移植抗宿主病（GVHD），其售价约 12 万美元/疗程。在这些上市产品中，Temcell 在 2020 年销售 24 亿日元（约 2 100 万美元），2021 年预测销售额 32 亿日元（约 2 700 万美元），这也是目前已知年销售额能超过 2 000 万美元的通用型干细胞技术产品。除了因 GVHD 这个适应证患者较少以外，高昂的售价也是影响干细胞技术产品销售额不大的主要原因之一。昂贵的单价与 MSC 组织来源有关，这类骨髓源 MSC 体外扩增周期长，导致制备成本高。

国外寄予厚望的胚胎干细胞（ESC）或诱导多能干细胞（iPSC）产品的转化一直不太乐观，研究者希望在脊髓损伤、帕金森病和视网膜黄斑变性等疾病中实现细胞替代治疗，但这方面进展缓慢。目前，部分企业转而将其诱导分化为 MSC 样细胞来实现产业转化。2021 年 10 月美国 Vertex 制药公司宣布 VX-880 在 1/2 期临床试验的首例 1 型糖尿病患者（T1D）中获得积极数据，患者每日胰岛素用量从 VX-880 治疗前的 34 U/d，在第 90 天减少至 2.9 U/d。VX-880 是一种来源于同种异体干细胞的全分化胰岛细胞疗法，如果能证实其实现了细胞替代治疗，这将是干细胞技术产品的一个突破。由于目前案例太少，还需谨慎乐观，毕竟之前也有报道 MSC 在某些糖尿病患者也能减少胰岛素用量，甚至停用胰岛素，但这并不是通过细胞替代途径实现的。

二、国内干细胞技术产品转化现状

由于现有监管部门不同，我国干细胞技术产品大体可以分为两类：非体外培养类干细胞制剂和体外培养类干细胞制剂。非体外培养类干细胞制剂主要为造血干细胞类制剂，这

类制剂属于满足体外最小操作的干细胞技术产品，不需要体外扩增，并可以在封闭系统中制备。我国造血干细胞主要按技术管理，国家卫生健康委 2017 年印发造血干细胞移植技术管理规范（2017 年版）和造血干细胞移植技术临床应用质量控制指标（2017 版）供行业遵照执行。按技术管理的造血干细胞移植需要在核发《医疗机构执业许可证》的卫生行政部门办理造血干细胞移植、采集相应专业诊疗科目登记，并要满足《非血缘造血干细胞移植技术管理规范》和《非血缘造血干细胞采集技术管理规范》等文件中的相关要求。

体外培养类干细胞范围就比较广，包含 ESC、iPSC、MSC 和神经干细胞等干细胞技术产品，这类产品涉及体外培养、诱导分化、基因修饰等工艺，且属于非最终灭菌生物制品，因此按照药物管理能最大化保证产品和患者的安全。如果造血干细胞在体外进行了培养或基因修饰，也应纳入按药物管理的技术产品。迄今为止，我国除了造血干细胞制剂外尚没有其他干细胞技术产品上市销售，在转化方面还有较长的路要走。

关于干细胞制剂的转化有两条路径，一是按药物研发并上市销售，另一个是项目备案进行临床探索研究。第二条路径是临床研究性质，并不能真正实现转化，仅作为第一条途径很好的补充，这属于类双轨制管理，因此，实质的转化还是要走药物研发路径。2015 年国家卫生计生委、国家食品药品监管总局以国卫科教发〔2015〕48 号印发《干细胞临床研究管理办法（试行）》，通过临床备案研究可提前探索干细胞技术产品针对某个适应证的安全性和有效性，节约药物

开发时间。国内已有西比曼、铂生卓越和天津昂赛等多家机构利用备案研究的数据在申请新药临床试验（IND）时减免了部分阶段的临床试验，加快了药物临床试验的进度，有利于新药早日上市。截至 2022 年 3 月，我国已经有 129 个项目完成了干细胞临床研究备案。由于目的和要求不完全相同，按药物申报并已获得 IND 批件的产品应该可以满足干细胞临床研究项目备案的要求，而通过项目备案的产品并不完全能满足新药 IND 的要求，还有许多工作需要补充。研发机构充分利用好临床备案研究，可以在新药研发过程中节约研发周期和资金，提高新药上市成功率。

经过多年摸索发展，从 2018 年始，国内干细胞技术产品转化逐渐步入正轨。2018 年至 2022 年 3 月，已有 40 个干/祖细胞相关产品 IND（含 3 个补充申请）获国家药品监督管理局药品审评中心（CDE）受理，其中 27 个获得默示许可进入临床试验。CDE 默示许可进入临床试验干细胞产品数量的增加，让国内人员初步见到干细胞技术产业转化的曙光。但同时，产品和适应证同质化情况也会越加严重，竞争会加剧，同类产品将进入比拼临床试验速度和降低产品生产成本阶段，早日实现产品 NDA 上市，将最大程度保证企业拥有继续发展的机会。当然也有可喜的现象，在这些默示许可的干细胞技术产品中除了单纯 MSC 产品以外，也出现了与材料结合的外用 MSC 和基因编辑的造血干细胞等新产品，这说明国内科学家也在进行干细胞技术产品的转化创新。

三、展望

干细胞技术产品新产品管线的开发是企业发展的基础。

专家介绍



韩之波 研究员

实验血液学国家重点实验室研究员，现任天津市细胞药物工程技术重点实验室主任，中国生物医学工程学会干细胞工程技术分会秘书长。主要从事成体干细胞基础与应用相关研究，主持一类新药“注射用间充质干细胞（脐带）”的研发和申报工作，已有 3 个适应证获 CDE 默示许可进入临床试验。作为主要完成人获得国家科技进步奖 2 项、省部级奖励 8 项。主编出版专著 *perinatal stem cells*、《间充质干细胞基础与临床（第二版）》。作为主要发明人获 6 项发明专利授权。

现在已陆续有新型的干细胞技术产品被报道，比如细胞与生物材料结合产品、微囊化的胰腺细胞、与医疗器械组合的治疗产品、基因编辑的干细胞产品和干细胞衍生的外泌体产品等。这些新产品的出现将造福广大患者，并推动干细胞产业的蓬勃发展。现有药物评价体系不能完全适用于评价干细胞技术产品，如何在评价体系和评价方法上有所创新，这需要行业和监管部门共同努力，大家都有共同目标：推进安全、有效的创新型干细胞技术产品上市，并造福患者。

干细胞技术产品的发展需
下转第 3 版

医学参考报

理事长兼总编辑：巴德年 社长：魏海明
副理事长兼副总编辑：曹雪涛等 副社长：吕春雷
理事会秘书长：周赞 副社长：周赞

社址：北京市西城区红莲南路30号红莲大厦B0403
邮编：100055
总机：010-63265066
网址：www.yxckb.com

干细胞与再生医学专刊

名誉主编：裴钢 陈义汉
主编：刘中民
副主编：高绍荣 高维强 沈洪 时玉舫 孙凌云

常务编委（按姓氏笔画排序）：
刘厚奇 刘德伍 孙毅 李保界 杨黄恬 何志颖
张军 昌晓红 郑加麟 钱海燕 康九红 路晓光

编委（按姓氏笔画排序）：

丁妍 丁劲 万光明 乐卫东 成昱 刘光慧 汤红明
李雪玲 汪泱 张平 张怡 陈俊霞 岳锐 周瑾
赵小阳 顾志峰 钱恒文 徐秀琴 郭维华 唐志辉 舒莉萍
编辑部主任：汤红明
编辑：毕紫娟 郑天慧 何斌 陈莉 李锋 冯丽杰
投稿邮箱：yxckb_sc@163.com

肠道菌群对造血干细胞命运及功能的调控机制

厦门承葛生物科技有限公司 夏荣木

健康成人胃肠道在胃部高酸性环境中大约存在 10^2 个细菌，这部分细菌可进入十二指肠及空肠。远端回肠有 $10^7\sim 10^8$ 个细菌，结肠中有 $10^{11}\sim 10^{12}$ 个细菌，所有这些细菌统称为肠道微生物群或肠道菌群。对高度厌氧环境中生长的细菌进行培养非常困难，只有 10%~50% 的细菌可在实验室成功培养。随着独立于培养测序技术的出现，大量相关数据产生，研究人员对健康和疾病状态下个体细菌的组成有了深入了解，对肠道菌群的作用也已初步了解。

最近研究证实，无菌动物肠道菌群可显著影响宿主的多种生物学行为，包括新陈代谢、器官发育、炎症及免疫反应等。现在，研究者已充分认识到，宿主—肠道菌群相互作用可形成健康有益的“智能通讯系统”，肠道菌群的生物活性代谢物，如短链脂肪酸、共轭脂肪酸、胞外多糖和神经活性代谢物— γ -氨基丁酸 (GABA) 及血清素可为宿主带来益处。因此，宿主与肠道菌群的相互作用对维持宿主健康状态至关重要。

个体肠道菌群特征的独特性犹如体内另一套“基因组”，这套“基因组”可能是疾病风险的预先决定因素。目前研究证实肠道菌群的组成与人类已知所有疾病几乎都有显著关联，包括但不限于胃肠道疾病、肥胖症、糖尿病、癌症，甚至神经及其退行性疾病如抑郁症、自闭症、焦虑及帕金森病等。

一、肠道菌群影响造血干细胞的命运选择

目前，肠道菌群相关基础研究和临床研究已如火如荼开展。2022 年 1 月 21 日，*Cell Stem Cell* 在线发表了美国阿尔伯特爱因斯坦医学院 Paul Frenette 研究组关于肠道菌群与造血干细胞 (HSC) 的最新研究进展，题为《肠道菌群通过控制骨髓中铁元素的可用性影响造血干细胞的命运》。该工作揭示了肠道菌群、巨噬细胞及铁元素可用性之间的相互关联，并证实了三者在压力下

调节关键 HSC 的重要作用。

该研究组为探索肠道菌群在 HSC 中的作用，使用 4~6 周广谱抗生素清除了小鼠体内肠道菌群。发现尽管小鼠血液中总中性粒细胞和衰老的中性粒细胞明显减少，但骨髓中的 HSC 稳态并没有显著变化。然后，研究者用化疗药物 5-氟尿嘧啶 (5FU) 处理小鼠后 (会导致严重的骨髓损伤后迅速再生)，意外发现 ABX (广谱抗生素青霉素、万古霉素、新霉素及甲硝唑混合物) 处理的无菌动物骨髓及淋巴细胞再生明显延迟。骨髓情况分析证实使用 5FU 后的 ABX 处理动物中，HSC 遭遇压力后激活并进入细胞周期的能力未发生变化，但向多种细胞谱系分化受阻，恢复静止状态时也出现明显延迟。该研究进一步发现，ABX 处理组小鼠在进行小鼠骨髓细胞连续移植 (BMTs) 后，其长期移植成功率为 100%。这些结果表明，ABX 处理增强了 HSC 的自我更新能力，但在分化产生下游细胞谱系方面表现出巨大缺陷。

二、肠道菌群影响红细胞的清除效率

随后发现，与对照组小鼠相比，5FU 处理明显加速了红细胞清除效率。然而，在 ABX 处理动物的骨髓再生过程中，红细胞清除时间被显著延迟。稳定状态下的红细胞吞噬通过巨噬细胞介导，主要发生在脾脏、骨髓，肝脏中也会发生。稳态下骨髓吞噬活动很少，在 5FU 诱导压力下，骨髓再生的早期阶段触发了强大的红细胞吞噬作用，ABX 处理明显降低了这种吞噬作用。这些结果显示，肠道菌群会调节压力诱导的骨髓巨噬细胞的吞噬作用。

红细胞 (RBC) 过早被吞噬的现象提示它们可能在再生过程中发挥了关键作用。在稳定状态下，巨噬细胞对 RBC 的吞噬功能是为红细胞生成提供铁元素。细胞内铁平衡与否可直接影响 HSC 功能。因此，压力诱导 RBC 在骨髓中的回收可能有助于造血再生，并通过

调节铁的可用性影响 HSC 自我更新。为评估肠道菌群消除产生的低铁可用性是否影响 HSC 的结局，研究人员分析了 HSC 表面的转铁蛋白受体 1 (Tfr1，也称为 CD71) 表达，它与细胞内铁水平呈负相关。在 5FU 处理后，ABX 处理的小鼠 HSC CD71 表达明显增加。综合其他结果证实，肠道菌群枯竭在骨髓中可诱导铁缺乏，在造血压力期由 RBC 回收提供的局部铁可能会促进 HSC 分化。

三、肠道菌群可通过其代谢物调节宿主生理过程

为研究肠道菌群相关代谢物调节宿主生理过程，研究人员筛选了一系列菌群代谢物，包括短链脂肪酸 (SCFAs)、1,3-二氨基丙烷 (1,3-DAP)、三磷酸肌醇 (IP3) 及维生素 B12 (VB12)，这些代谢物可影响宿主细胞功能。结果证实只有丁酸盐可显著增强巨噬细胞对 RBC 的吞噬作用。SCFAs 主要由肠道厌氧菌通过发酵膳食纤维产生，肠道菌群耗竭会降低肠道中 SCFAs 种类。ABX 处理导致 3 种主要的 SCFAs 降低，包括丁酸盐、丙酸盐和乙酸盐。为研究丁酸盐能否在体内调节巨噬细胞功能及 HSC 再生反应，通过在 ABX 处理的动物中重新添加丁酸盐进行实验。再生早期阶段，丁酸盐的补充恢复了骨髓巨噬细胞吞噬功能的缺陷，明显增加了骨髓巨噬细胞中参与 RBC 回收基因的表达水平。此外，小鼠再生整个过程中，丁酸盐的补充可明显改善局部铁缺乏和骨髓细胞系分化，同时逆转 HSC 的扩增、细胞周期和 CD71 表达水平。这些结果表明，肠道菌群代谢物丁酸盐协调了骨髓再生事件，为再生的 HSC 提供了快速铁获取方法。尽管缺铁可能会导致菌群失调，使结果解释复杂化，但后续研究表明，肠道菌群可通过骨髓中的铁供应调节 HSC 的自我更新和分化结局，饮食诱导的铁缺乏可调节独立于肠道菌群的 HSC 自我更新和扩增。

四、肠道菌群—骨髓巨噬细胞—铁元素通路在 HSC 领域的应用潜力

维持移植 HSC 的扩增及长期活性是一个重大应用挑战。如果限制铁的可用性会促进 HSC 的自我更新并抑制再生过程分化，优化铁水平将增强 HSC 的体外扩增效率。*Nature* 杂志发表的一项研究证实了在含有聚乙烯醇 (PVA) 的无血清培养基中添加造血细胞因子血小板生成素 (TPO) 和干细胞因子 (SCF) 可将小鼠功能性 HSC 扩增多倍。PVA 培养系统中铁浓度比其他已发表的无血清培养系统 (100~200 mg/L 转铁蛋白，结合 2.5~5.0 μ M 铁) 低很多。因此，低铁供应可能有助于维持及扩大体内功能性 HSC 数目。为测试这种可能性，在保持所有其他成分不变的情况下，向 PVA 培养系统中添加不同浓度的转铁蛋白 (0.005~500 mg/L)，发现培养系统中的转铁蛋白水平明显影响了 HSC 扩增效率。转铁蛋白浓度为 0.5 mg/L (这一水平明显低于以往研究中使用的浓度) 能够最大程度提升 HSC 扩增效率。虽然较高浓度转铁蛋白诱导 HSC 分化及表型 HSC 数目降低，但低于 0.5 mg/L 的转铁蛋白水平同样会引发生存压力，转铁蛋白低于 0.005 mg/L 则导致 HSC 发生死亡。移植试验显示，较低浓度的转铁蛋白培养基有助于提高 HSC 长期活性。这些结果表明铁水平是调节 HSC 自我更新和分化的关键因素。综上，这项工作揭示了一个全新的肠道菌群—骨髓巨噬细胞—铁元素调节通路，其对 HSC 在应激状态下的结局选择与功能起着重要调控作用。

五、总结与展望

HSC 是生产所有血液与免疫细胞的始祖细胞，其在稳态时处于静息状态，这种状态可保护 HSC，并保持长期自我更新及重建造血系统能力。在遭遇造血压力时，HSC 可被激活并快速分化产生子代细胞谱系

专家介绍



夏荣木

现任厦门承葛生物科技有限公司学术部主管。主要从事肿瘤分子生物学和药物干预研究，干细胞分子生物学、肠道菌群微生态健康领域的相关基础及临床转化研究。在探索肿瘤疾病发生发展相关机制，干细胞自我更新机制方面具有较好经验。目前在国际期刊发表研究性文章 10 余篇。部分相关工作发表在国际知名期刊 *Oncogene*、*Journal for ImmunoTherapy of Cancer*、*Clinical and Translational Medicine*、*Frontiers in Cell and Developmental Biology*。申请实用新型专利 1 项，1 项发明专利进入实审，1 项发明专利正接受审查。

以抵抗压力。HSC 从自我更新到分化的过程涉及多方面程序再编程及多种因素的网络精细调控。目前关于 HSC 的自我更新和分化过程已有了大量研究，该研究证实了肠道菌群在骨髓再生期间可调节 HSC 的自我更新和分化过程，这可能为理解 HSC 机制开拓一个新领域，同时也可为解决 HSC 移植提供一个潜在的潜在策略。

肠道菌群相关的研究是一个新兴领域，尽管其关键进展在最近几年才出现，但肠道菌群相关研究规模正在快速扩大，研究的深度和广度也都在快速发展。大量的临床试验或新技术已经应用于临床，科学家和资本正涌进来，这将是一个大有可为的蓝海领域。

(ID: yxckbsc202203031)

上接第 2 版

要得到多方面支持。首先需要基础研究的支持，作用机制的研究有助于新产品的开发及实现精准治疗，干细胞与新材料的结合可提高干细胞对某些疾病治疗效果，免疫排斥的解决会真正推进细胞替代治疗。干细胞技术产品的发展也离不开产业链的支持，目前整个干细胞产业化相关产业链发展还不太完善，适合规模化制备的培养容器、培养基、自动化生产设备还有很大发展空间，随着干细胞技术产品

产业转化的发展，将带动相关产业链的发展。

干细胞技术产品的研发和转化必须合规。按药物管理的干细胞技术产品最终要发展为满足药物要求的生物制品，即干细胞药品，这些药品能进入医院药房，整个转化流程能遵循 GLP、GMP、GCP 及 GSP 等管理要求，生产出质量有保证、产品有疗效、百姓用得着的干细胞药品才能推进再生医学领域真正进入干细胞药物时代。

(ID: yxckbsc202203021)

血红蛋白病离体干细胞基因治疗与同种异体造血干细胞移植比较

福建医科大学附属协和医院 廖联明 陈丽吉

专家简介



廖联明 研究员

现任福建医科大学协和医院中心实验室研究员。主要从事间充质干细胞临床应用和造血干细胞分化研究,为中华医学会医学工程学会干细胞工程专业委员会委员,《中华细胞与干细胞杂志》《中国临床药理学杂志》和 *Vascular Investigation and Therapy* 杂志编委。在 *Diabetes*、*JAMA*、*J Clin Oncol*、*Cytotherapy* 等杂志发表多篇干细胞的临床应用研究论文。

作为红细胞疾病,SCD和TDT均可通过Allo-HSCT治愈。然而,可用的HLA相同的同胞供体和匹配的非亲缘供者(matched unrelated donor, MUD)都很少,使得Allo-HSCT无法普及。采用基因转染或基因修饰的自体造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)可能成为治愈SCD和TDT患者的治疗方法之一。

二、Allo-HSCT治疗TDT和SCD适用范围

TDT是Allo-HSCT的主要指征。应尽早为有HLA相同同胞的TDT儿童进行HSCT治疗,以免长期输血和铁过载相关的并发症。SCD的临床症状很多,因此哪些SCD患者需采用Allo-HSCT治疗并没有公认标准。一般认为,存在中枢神经系统疾病的患者可接受Allo-HSCT治疗。此外,服用HU并出现复发性血管闭塞危象(VOC)、复发性急性胸部综合征、骨坏死、肾病、红细胞同种异体免疫、肺动脉高压和其他严重并发症也视为适合进行Allo-HSCT治疗的指征。

TDT和SCD患者接受HLA相同同胞供者捐献的骨髓(bone marrow, BM)进行Allo-HSCT后5年的总生存期(overall survival, OS)超过90%。清髓性及非清髓性预处理对OS没有影响。与BM来源地HSC相比,HLA匹配的同胞脐血(CB)来源HSC移植后OS相似,但CB来源地HSC移植后急性移植物抗宿主病(aGVHD)和慢性移植物抗宿主病(cGVHD)发生率较低。相反,与BM相比,使用外周血干细胞移植的患者,尽管2年的OS相似,但aGVHD和cGVHD发生率均显著高于BM来源的HSC。

采用HLA不相合同胞供体的-HSCT目前还处于试验阶段。

与匹配的同胞HSCT相比,MUD-HSCT治疗TDT的aGVHD和cGVHD发生率较高,OS较短。因为GVHD排斥率高,MUD-HSCT极少用于治疗SCD。

不相合的CB-HSCT移植失败率高,也很少用于SCD患者。血液和骨髓移植临床试验网络(BMT CTN 0601)项目中已经停止了CB-HSCT治疗SCD的部分。改善不相合CB-HSCT结果的策略包括使用多份脐带血;将脐带血与T细胞去除地HLA半相合CD34⁺HSC联合进行移植,及脐带血来源的干细胞和祖细胞体外扩增后移植。

HLA半相合HSCT的主要障碍是移植物排斥反应和GVHD的发生率较高。目前的策略包括去除T细胞(即PTCy法或选择性移植CD34⁺细胞)。此外,也可以把全身照射剂量增加至400cGy(NCT03263559)。

三、TDT基因替代治疗

TDT的基因替代治疗指将正常功能的β-珠蛋白基因导入自体HSC,在患者进行清髓预处理后将携带β-珠蛋白基因的自体HSC输注体内。携带β-珠蛋白基因的载体主要是慢病毒(Lentivirus, LV)。

NCT01745120和NCT02151526研究中,22例TDT患者接受了β-珠蛋白的抗镰状变体基因(β^{T87Q}, LentiGlobin BB305)转染后的自体HSC。在中位随访26个月,

地中海贫血和镰状细胞病(sickle cell disease, SCD)是全球最常见的单基因病,目前还没有理想的治疗药物。近年来同种异体造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Allo-HSCT)和基因修饰后的自体造血干细胞移植为患者提供了新的治疗选择。

同种异体造血干细胞移植受到供者配型、移植并发症、移植物抗宿主病和移植排斥的限制。基因治疗的主要问题是长期安全性和费用较高。国际细胞和基因治疗协会干细胞工程委员会就输血依赖性地中海贫血(transfusion-dependent thalassemia, TDT)和SCD的治疗进行比较,供医疗机构和患者参考。

一、遗传性血红蛋白病治疗手段

重型地中海贫血和SCD是最常见的遗传性血红蛋白病,每年30万~40万患者中有80%在低收入或中等收入国家。虽然通过定期输血、祛铁剂治疗、脾切除和抗生素预防,TDT患者的存活时间可显著延长,但无法治愈,且输血治疗的风险和铁过载导致的器官损伤仍然存在。促进红细胞(RBC)成熟的药物包括Luspatercept和羟基脲(HU)。Luspatercept只用于治疗18岁以上的TDT。HU可有效减少SCD相关并发症,在婴儿出生后9个月内胎儿血红蛋白(HbF)水平下降后可作为保护性常规用药。其他减轻疼痛的药物包括L-谷氨酰胺和crizanlizumab,改善贫血的voxelotor。

13例非β0/β0基因型患者中有12例患者不需要红细胞输注治疗,其他9例患者(β0/β0基因型患者或2个IVS1-110突变拷贝)年输血量中位值减少了73%,其中3例停止了红细胞输注。患者体内HbA^{T87Q}的水平从3.4g/dl增至10.0g/dl。

NCT02453477研究包括9例TDT受试者,方法是骨髓腔内直接注射GLOBE LV转染的自体HSC。LV载体编码的β-珠蛋白基因的增强子区域经过改良。18个月的中位随访发现3例可评估儿童均不再需要输血,3例成人减少了输血需求量。不良事件与化疗有关,和病毒载体无关。

正在进行的NCT01639690研究采用TNS9.3.55载体,TNS9.3.55是一种编码正常β-珠蛋白基因的LV载体。

四、SCD的基因替代治疗

治疗SCD患者的外源基因包括抗镰状β-珠蛋白或γ-珠蛋白基因。通常受试者采用普乐沙福动员干细胞后采集外周血干细胞。普乐沙福动员后采集的外周血CD34⁺细胞产量高,转导效率比BM来源地HSC高。

目前SCD患者的基因治疗处于1/2期试验(NCT02140554)。该研究评估了用LentiGlobin BB305转染的自体CD34⁺HSC的安全性和有效性。在16例可评估的患者中进行超过6个月的随访。患者镰状细胞减少,在术后最后一次随访时没有患者需要再输注红细胞,疼痛减轻。

2021年2月16日,NCT02140554和NCT04293185因意外发现疑似有急性髓系白血病被暂停。在项目暂停之前,有1人因移植前清髓预处理并发症死亡。

NCT03282656研究最近公布了6例受试者(7~25岁)数据。患者接受BCH-BB694基因治疗(LV载体,表达靶向BCL11a的短发夹RNA以增加γ-珠蛋白表达),随访7~29个月。HbF诱导率为20.4%~41.3%。受试者SCD疾病相关症状减轻或消失。本研究项目也已暂停,等待NCT02140554和NCT04293185研究的调查结果。

NCT02186418是一项旨在研究γ-珠蛋白基因转移的有效性和安全性的1/2期研究试验。已有3例患者入组,没有发现与治疗相关的不良反应,所有受试者的血管闭塞情况均有所改善。

五、TDT的基因编辑治疗

除基因替代治疗外,TDT和SCD也可采用增加HbF表达水平的治疗策略。NCT03655678是一项采用CRISPR-Cas9靶向BCL11A红细胞特异性增强子以增加HbF表达的研究。第一个患者已摆脱输血。HbF水平原来为0.3g/dl,第18个月增至13.1g/dl。

六、SCD的基因编辑治疗

NCT03745287是一项采用CRISPR-Cas9靶向BCL11A红细胞特异性增强子的研究。数据显示,2例患者总Hb水平分别为10.3g/dl(12个月随访)和10.0g/dl(3个月随访),不再输注红细胞。

另一项NCT03653247研究项目正在评估使用BIVV003(一种使用锌指核酸酶技术的基因编辑疗法),进行自体HSCT的安全性、耐受性和有效性,结果尚未公布。

七、TDT和SCD治疗同种异体HSCT与基因治疗的比较

全球数以千计的TDT和SCD患者接受了Allo-HSCT。使用BM或CB进行Allo-HSCT对有症状的SCD患者是一种标准治疗,其中有HLA匹配的同胞供体的患者的OS>90%。有生育需求的患者进行HSCT时要考虑保存生育能力。

TDT和SCD的基因治疗病例数较少。试验数据表明非β0/β0基因型TDT和SCD患者可能治愈,并且可考虑用于没有HLA相合的同胞患者。基因治疗相关风险不能忽视。LV基因将整合到宿主基因组,插入突变可多达数千个。CRISPR诱导的DNA修饰存在脱靶效应。

未来HSCT与基因治疗的可能性上需要考虑一下因素。

1. 医疗机构

Allo-HSCT和基因治疗都需要专门治疗中心。移植前都要采集干细胞,移植期间需要进行清髓处理。所需的资源包括输血支持、实验室服务、筛查血源性感染的专业治疗能力。干细胞采集需要熟练的单采团队和干细胞处理实验室。基因治疗需要经过GMP认证的多功能实验室。TDT和SCD患者最多的是中低收入国家,在这些国家,可获得的医疗服务有限。

2. 随访

HSCT患者需要进行免疫抑制以防止移植物排斥和GVHD。因此,患者的免疫功能持续低下,需要数月至数年密切监测和随访。

基因治疗方法的优点是不需要免疫抑制剂来预防GVHD。因此,基因治疗的后期工作相对简单,主要监测恶性肿瘤等长期并发症。

TDT和SCD患者HSCT后性腺功能减退和不孕风险都很高。

3. 费用

按照目前上市产品的价格,基因治疗的费用高达90~210万美元。基因治疗

基于人类多能干细胞体外造血发生体系研究及本课题组最新进展

中国医学科学院 / 北京协和医学院输血研究所 陈波

一、哺乳动物造血发生研究历史回顾及最新进展

哺乳动物（包括人类）造血发生均源于中胚层（mesoderm），主要可分为原始造血（primitive hematopoiesis）和成体造血（definitive hematopoiesis）。已知造血发生最早起源位点为卵黄囊（Yolk sac），相当于小鼠胚胎 7.5 天（E7.5），属原始造血，只能分化为髓系及红系的少数几种细胞类型，无淋系的发育。其产生的红细胞体积较大且不脱核，主要表达胚胎型血红蛋白。成人血细胞的造血发生过程称为成体造血，很可能最初产生于胚胎主动脉 / 性腺 / 中肾（aorta/gonad/mesonephros, AGM）区域（E8.25），至妊娠中后期胎儿肝脏（E11.5）及胸腺（E14.5）成为血细胞产生的主要位置，然后转移至胎儿骨髓（E16.5），出生后骨髓成为永久造血中心。

最新研究表明，在原始造血和成体造血间，还有一些其他来源的与造血干细胞类似的细胞产生，分布于头部、尿囊、脐带 / 胎盘等区域，其血细胞特征类似成体造血，但不是成体造血的直系祖先，而在胚胎晚期消失。由此形成“三个波次”的造血发生理论。但详尽的血液细胞发生谱系仍未被清晰阐明。特别是起源于中胚层的造血发生最初是多点起源还是单点起源，三个波次造血起源是否有前后继承关系，前两个波次与最后人体内造血的起源关系，都需进一步澄清。

二、基于 hESC 的体外造血发生体系的建立和发展

目前大多数造血发生机制均源于小鼠模型的造血研究，但由于人和小鼠在造血发生机制方面存在一定差异，其造血发生生理机制不能直接套用于人类。人类造血发生机制研究由于伦理及操作原因进展较为缓慢，也难以深入。

人类胚胎干细胞（human embryonic stem cell, hESC）分离培养技术和成体细胞重编程技术的发明，使得 hESC / 诱导多能干细胞（human induced pluripotent stem cell, hiPSC）一统称为人类多能干细胞（human pluripotent stem cell, hPSC）一成为体外分化培养体系的重要起始细胞来源。利用体外共培养方法进行血细胞分化的尝试

已取得重大进展，从小鼠 AGM 区域及脑颅区域分离的 AGM-S3 和 OP9 基质细胞系可诱导 hESC / hiPSC 分化得到各种类型的血细胞和免疫细胞，不但为体外生产这些细胞提供了可能性，也为研究造血分化的分子调控机制提供了良好研究模型。

采用小鼠胚胎 AGM 区域来源的基质细胞系 AGM-S3，AGM 培养系统最大程度地模拟了成体造血发育最初的微环境，其产生的血细胞接近成体类型，研究者可在体外观察接近于人类真实造血分化过程中的每一个步骤和环节，这是研究其分子调控机制最好的研究模型之一，同时也是造血分化关键基因筛选的最好体系，还可以筛选对造血有促进作用的单一化合物以研发生血药物。最近人类 AGM 基质细胞系的建立，使得这个体系更加接近人类真实的造血发生环境。

OP9 培养系统是最广泛应用的体外造血分化体系，通过 OP9 细胞系中转基因过表达 *DLL1* 及 *DLL4* 基因，已建立了专门用于分化 T 细胞和红细胞的基质细胞系。由于没有知识产权的限制，OP9 细胞系可自由进行基因工程改造以提高特定血细胞和免疫细胞造血分化效率，利于人工血细胞的大规模生产。

无滋养层血细胞分化体系中引入纳米材料，以期得到更好的造血分化效率。

三、体外造血发生体系产生的造血干 / 祖细胞、末端分化血细胞及免疫细胞应用于临床所面临的主要问题

这些体外造血分化体系的最新进展，显示了其成为未来人造血细胞及免疫细胞制造工厂的巨大潜力。未来 hiPSC 取代 hESC 作为初始材料，完全摆脱医学伦理对人类胚胎应用的限制，并实现个体精准化治疗；同时也摆脱对人类细胞来源的限制，可无限量提供初始细胞。但这些体系并非完美无缺，也存在一些重大瓶颈问题，极大限制了其在临床的应用。

首先遇到的是造血分化效率问题。目前无论 AGM 系统、OP9 系统还是无滋养层培养系统，其单位数量 hESC 所能分化的造血干 / 祖细胞、各类血细胞祖细胞及末端分化血细胞 / 免疫细胞的数量都相当有限。其中最大的问题是人工红细胞和血小板（前体是巨核细胞）的产量不足。由于人类体内红细胞和血小板周期短，输血需求巨大，使得体外生产相关的人工血细胞在规模和经济性上远不能满足临床需求，也使得其无法代替献血成为人类血液

方面，诱导 hESC 分化得到的人工红细胞品质问题最大，其表达的血红蛋白更接近胚胎型血红蛋白（ γ 和 ϵ 型）而不是成体型血红蛋白（ α 和 β 型），同时脱核率很低，使得大量输注人工红细胞会面临携氧载体不匹配及致癌性的潜在风险。这些都极大地限制了人工血细胞的临床应用。

四、调控造血发生效率的细胞 / 分子机制——本课题组所做的一些初步探索

为彻底解决体外造血分化体系产生血细胞应用于临床的困难，明确真实造血发生过程的调控机制并找到关键性瓶颈极为必要。血细胞品质问题同各种末端分化血细胞及其祖细胞的具体发育微环境密切相关，具有各自问题特点，需要分别逐一进行探索。造血分化效率低下则带着普遍性问题，是所有血细胞分化都面临的困难。为探索人类造血发生的普遍规律，找到难以提高造血分化效率的症结所在，本课题组最近做了一些有益探索。

本课题组最初的研究选择了成体造血发生中最关键的调控基因 *RUNX1*。已有报道显示，*RUNX1* 一个异构体 *RUNX1a* 地过表达会强烈刺激造血分化。课题组首先构建了与 AGM-S3 体系相配套的基于 *piggyBac* 转座子的 PB-Tet-on-OE 载体系统，与传统的慢病毒系统相比，这个系统能够在 hESC 培养过程及造血分化过程中高效持久地过表达 *RUNX1* 的所有主要异构体 *RUNX1a/b/c/205*，发现在 AGM-S3 体系中，除了 *RUNX1a* 以外，其他异构体过表达都造成了类似效应：当在早期（D0-D2）过表达 *RUNX1* 异构体时，会极大抑制造血发生；当在后期（D8-D10）过表达 *RUNX1* 异构体时，则会极大促进造血发生。其他一些造血相关基因，包括 *HOX* 基因家族成员（如 *HOXA9* 和 *HOXC4*），及细胞周期抑制因子（CKIs，如 P15、P18 和 P21 等）在早期过表达同样会强烈抑制造血发生；而 *HOXA9*、*HOXC4*、*P18* 等基因在后期过表达也会强烈刺激造

专家简介



陈波 副研究员

中国医学科学院 / 北京协和医学院输血研究所副研究员，硕士研究生导师。博士毕业于中国科学院水生生物研究所，2007—2013 年在美国进行访问学者及博士后研究。回国后主要研究领域为干细胞生物学和再生医学，主要运用分子遗传学手段在人类胚胎干细胞共培养体系模型中研究人类造血发生过程中的分子调控机制。建立了一系列重要造血相关基因过表达或沉默的多能干细胞系并摸索最优诱导分化模式，同时运用各种方式进行功能筛选以发现新的造血相关基因，以最终提高体外造血分化效率及品质。同时也开展细胞治疗及基因治疗研究，为未来基因治疗 / 细胞免疫治疗 / 干细胞治疗搭建通用平台。已发表论文共 30 篇，授权国家发明专利 2 项。

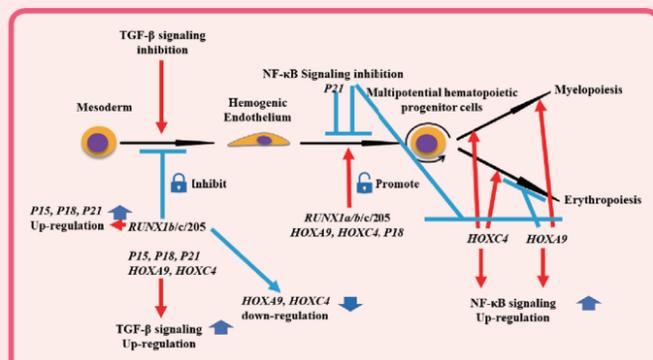


图 1 与造血发生密切相关的重要基因及信号通路在不同共培养阶段的上调或下调对造血发生效率的影响和相互关系概念图

此外，基于细胞外基质（extracellular matrix, ECM）或纳米材料的无滋养层细胞体系也在蓬勃发展。以多种基质蛋白为基础的培养体系可高效诱导 hESC 向造血分化。本课题组最近应用胶体自组装模式材料（cSAPs）成功刺激 hESC 造血潜能的提高，在后续 AGM 体系中能够获得 2~7 倍的各种造血祖细胞及血细胞，显示出纳米材料在这方面的良好潜能。本课题组正在揭示相关的详细分子机制，并试图在以往

主要来源。

另一个重要问题是血细胞品质不足。理论上讲，体外造血分化体系可分化出所有种类的血细胞 / 免疫细胞及其祖细胞。就祖细胞而言，人类造血干细胞（hHSC）是体外造血分化体系所希望分化的最具有临床应用价值的细胞类型，可替代骨髓移植治疗各种遗传疾病及癌症。但至今没有体外体系能成功诱导 hESC 分化出 hHSC 并被鉴定具有可完全重建造血体系的功能。在末端分化细胞

血发生。以上结果显示这些造血相关基因在不同时期过表达会产生完全不同的效应。

为更清晰探索效应背后的分子机制，本课题组进行了大规模小分子抑制剂 / 激活剂的筛选，结果发现这些基因早期过表达以后，共培养细胞的 TGF- β 信号有显著提升，而对该信号通路的抑制可很大程度缓解其对造血的抑制效应。后期过表达这些基因后，共培养细胞的 NF- κ B 信号显著提升，抑制该信号通路则完全消除了其刺激造血的效应。这说明 TGF- β 及 NF- κ B 信号通路很可能深度参与了早期抑制造血效应或后期促进造血效应。（图 1）

五、如何突破体外分化体系造血发生效率的瓶颈——本课题组一些思考及对未来的展望

本课题组初步探索发现早期控制造血发生效率的关

下转第 7 版



定量谱系分析确定肝-胰-胆系祖细胞生态位

【据《Nature》2021年9月报道】题：定量谱系分析确定肝-胰-胆系祖细胞生态位（英国伦敦大学国王学院干细胞与再生医学中心 作者David Willnow等）

在胚胎发育过程中，干细胞和祖细胞群体通过限制谱系潜能，并随着发育的进行获得特定命运来驱动器官发生，最终产生所有成熟的终末分化细胞类型。干细胞和祖细胞群体一直被认为是离散的同质群体，然而，基于单细胞的研究挑战了传统观点，揭示了干细胞和祖细胞区室存在巨大的细胞异质性。

肝-胰-胆管器官系统来源于一个小的内胚层祖细胞区室，能够产生多种不同的成体组织，包括肝、胰、胆

囊和肝外胆管，在发育器官中维持多能性祖细胞具有重要意义。如果不能维持这样的多能性祖细胞，可能会出现表现为肝、胰和胆囊的多器官表型的人类遗传综合征和畸形，但内胚层祖细胞区室分离为肝、胆管和胰腺结构的精确谱系树和一连串事件尚未确定。

本研究中，英国伦敦大学国王学院干细胞与再生医学中心的 Francesca Spagnoli 团队将计算建模方法与遗传系谱追踪结合起来，准确地重建了肝-胰-胆管谱系树。作者发现位于胰胆管芽和肝脏之间的一个胰腺祖细胞亚群被来自邻近肠道的信号维持在多能性状态。研究首先通过构建数学模型

建立肝胆道发育模型，揭示 LV (liver progenitors) 和 PB (pancreato-biliary progenitors) 存在相互转换，并且证明 PB 贡献 LV 的程度更大。接下来研究人员使用谱系追踪的方法验证了数学模型的正确性，通过单细胞测序找到对 PB 和 LV 谱系做出贡献的多能祖细胞群体 IMP (intermediate progenitors)，以免疫荧光染色实验验证了 scRNA-seq 结果。最后通过 GO 富集分析探索富含在 IMP 池中的信号分子，研究发现 IMP 群体受到来自邻近十二指肠的 Hedgehog (HH) 的信号调控，使其在细胞分化过程中长时间维持多能状态。这些发现共同表明肝-胰-胆管发育的持续可塑性，这也可能解释了

肝脏快速扩张时胰胆管生长减弱的原因。

综上所述，作者结合计算模型和小鼠遗传学方法发现具有潜在产生肝-胰-胆管细胞谱系的多能性祖细胞在胚胎发育中持续存在。这项跨学科研究扩大了科学家们对驱动早期器官生成细胞过程的理解。在人类中研究这种可塑性的多能性祖细胞群体，并将它们用于再生医学，这也可能有助于阐明表现为肝、胰和胆囊的多器官表型的人类遗传综合征和畸形的形成机制。

（同济大学附属东方医院再生医学研究所 崔洋洋 何志颖 编译）
(ID: yxckbsc2022030601)

LepR 阳性骨骼细胞的单细胞转录组学揭示异质应激依赖性干祖细胞库

【据《EMBO Journal》2021年12月报道】题：LepR 阳性骨骼细胞的单细胞转录组学揭示异质应激依赖性干祖细胞库（中国上海市东方医院/同济大学 作者 Rui Yue 等）

骨骼干细胞和祖细胞 (skeletal stem and progenitor cells, SSPCs) 有助于骨骼的发育、维持和重塑，但该种群内的异质性和谱系层次一直未被解析。之前研究表明，瘦素受体 (LepR) 能够标记成人骨髓中的 SSPCs，而且在很大程度上与 CAR 细胞和 Nestin-GFP^{low} 细胞有重合。通过 LepR-Cre 遗传谱系追踪标记出生后早期小鼠的骨髓基质细胞 (BMSCs)，这些细胞在衰老或辐射后产生成骨细胞 (OBs) 和脂肪细胞，它们也会在骨折或关节损伤后产生软骨细胞。而肢骨中 LepR

的条件缺失导致成骨的增加和脂肪生成减少，表明 LepR 可以调节 SSPCs 的维持和分化。LepR⁺ 细胞定位于成人骨髓的血管周围区域，它产生大量的细胞外基质蛋白和成骨因子促进骨形成。LepR⁺ 细胞还分泌高水平的造血干细胞 (HSC) 维持因子来创造造血微环境，可见它们在协调造血和成骨中的关键作用。然而，LepR⁺ 细胞的异质性以及它们与其他 HSC 生态位细胞的重叠程度仍在探究。深入解析稳态和应激状态下 LepR⁺ 细胞的功能亚群及关键转录调控网络对促进骨骼损伤修复和治疗骨质疏松等重大骨科疾病意义重大。

作者首先结合小鼠遗传谱系示踪系统和 scRNA-seq，平行比较了 Prrx1-Cre (最常用的四肢骨骼特异性 Cre)

和 LepR-Cre 标记细胞的异同。结果显示 Prrx1-Cre 比 LepR-Cre 标记了更多软骨细胞、平滑肌细胞和骨膜细胞，但两者在 BMSCs 和成骨细胞类群中的标记效率相当。接下来，研究人员通过对 5 种不同生理和应激状态 (年轻小鼠、老年小鼠、罗格列酮喂食、亚致死剂量辐照、长骨折折) 下的 LepR-Cre 及 tdTomato 小鼠长骨进行流式分选和 scRNA-seq。生物信息学整合分析将 17 224 个单细胞划分为 8 个类群，主要包括成脂 (adipogenic)、成骨 (osteogenic)、骨外膜 (periosteal) 3 大谱系细胞类群及一个分裂期 (cycling) 的细胞类群。结合体内外功能实验，作者分别对成脂、成骨、骨外膜 3 个细胞类群进行了详细探索，从而在成脂细胞类群中发现了一个紧贴骨髓血管壁且相

对静息的 Notch3⁺ 细胞亚群，在成骨细胞类群中发现了多个能够促进成骨和成软骨的关键转录因子 (如 Hoxb2 和 Npdc1 等)，最后在骨外膜的 LepR-Cre⁺ 细胞类群中发现了一个位于骨外膜且成克隆和成脂分化能力较强的 Sca-1⁺ 细胞亚群。

综上所述，此研究通过对不同生理和应激状态下的长骨 LepR⁺ 细胞进行单细胞转录组测序 (scRNA-seq)，绘制了全面深入的成体骨骼干祖细胞图谱，并将视线聚焦于 2 个有重要意义的细胞亚群，为治疗各种骨科疾病及促进骨折损伤修复等提供了新思路。

（同济大学附属东方医院再生医学研究所 罗以何志颖 编译）
(ID: yxckbsc2022030602)

上接第 1 版

和更多的血管新生等有关，而早期和晚期单次移植归巢率均最低约为 4%。

鉴于干细胞治疗作用是通过旁分泌机制而实现，干细胞来源的外泌体则是旁分泌的载体。国际研究已证明 MSCs 来源外泌体具有 MSCs 本身相同的效果。笔者研究团队对新一代 MSCs (经他汀预处理的 MSCs) 产生的外泌体进行了实验探索，MI 区心肌内注射移植新一代 MSCs 的外泌体，能使大鼠心肌梗死 4 周后的 LVEF 突破性提高了 27%，机制是通过上调了长链非编码 RNA (lncRNA) H19，促进血管再生并进一步保护心肌而起作用。笔者团队还探索了外泌体与干细胞联合移植，假设协同

作用能获得更好的治疗效果。先在心肌梗死后 30 min 心肌内注射移植经荧光标记外泌体示踪其分布，发现在术后第 1 天、第 3 天和第 7 天均可见其在 MI 周边区分布，但第 3 天的滞留量已显著降低，为第一天的 51.03%，至第 7 天时，进一步降至 23.38%。进一步对比了心肌梗死后 30 min 移植外泌体联合心肌梗死后第 1、第 3 或第 7 天联合移植新一代 MSCs 的治疗效果。结果表明：联合移植组均能显著提高心功能，其中心肌梗死后第 3 天联合移植组改善效果最为明显，与 AMI 对照组对比，将 LVEF 提高约 27.91%，梗死面积由 AMI 组的 37.58% 缩小至 18.48%。研究结果提示，通过 AMI 当天先移植心肌内注射外泌

体可有效改善急性期心肌梗死微环境，使 AMI 后 3 天时梗死周边区炎症反应明显消退，处于相对较低的状态，而此时 SDF-1 水平仍然在高峰期，移植经 ATV 预处理的高表达 CXCR4 的新一代 MSCs，不仅能提高干细胞归巢率，并且为 MSCs 的存活提供更加有利的微环境，达到显著提高心肌梗死后心功能、缩小梗死面积的效果。

三、对新一代异体骨髓 MSCs 及其外泌体展望

在他汀改善“土壤”即 MI 区炎症的恶劣微环境，并使用他汀预处理的新一代骨髓 MSCs 及其外泌体“种子”移植，能使治疗 AMI 的效果突破性提高后，

从临床转化或需求角度看，自体 MSCs 的突出问题是需要体外培养 2~3 周，大大影响了临床 AMI 患者急救的可及性和老年患者的可获得性。基于骨髓 MSCs 本身的免疫调节和抑制作用，尤其是外泌体几乎无免疫原性的特性，新一代异体骨髓 MSCs 及其外泌体的临床转化研究是唯一解决方案。这一点目前已经超越“曙光初现”阶段，下一步应该加速临床前研究，争取尽早进入临床试验阶段，尽快解决骨髓干细胞治疗 AMI 疗效微弱的国际难题，既可为 AMI 救治、预防心力衰竭提供有力武器，更能支持我国在生物制药产业上实现弯道超车，在国际上处于领跑地位。

(ID: yxckbsc2022030101)

探秘 Barrett 食管来源——食管癌早筛新突破

【据《Science》2021年8月报道】题：分子表型揭示了 Barrett 食管来源及其恶性转变（英国剑桥大学作者 Karol Nowicki-Osuch 等）

组织化生往往是一种恶性病变的开端，它通常发生在不同类型上皮细胞的过渡部位，如鳞状上皮和柱状上皮交界处（SCJ）。Barrett 食管（BE）是典型的组织化生现象，起始于胃食管交界处，食管下段有不正常的柱状上皮覆盖，在胃反流患者中发生率高达 10%，会增加食管腺癌（EAC）的患病风险。正常食管是鳞状上皮，因此 EAC 的腺状表型被认为与 BE 相关。存在争议的是，50% 的 EAC 患者被诊断出来时并未发现存在 BE。

这个争议可通过探索 BE 的起源来解释。关于 BE 的起源有很多种假说，如来源于食管黏膜下腺（SMG）或者胃食管交界处（GEJ）的多种特异性细胞群。BE 起源研究的难点在于谱系追踪的小鼠模型并不能完全反映人体胃食管的生理状态（角质化的鳞状前胃和缺乏黏膜下腺）。此外，在人新鲜组织中分离 SMG 也存在一定难度。此研究目的在于确定 BE 的细胞来源，论证是否所有的 EAC 亚型都来源于 BE。

研究人员首先利用体视显微镜将 SMG 从人体食管中分离出来，并通过免疫荧光和 3D 激光共聚焦对获得组织的细胞类型进行鉴定。研究者在 SMG 的夹层和主管道中发现了一群 P63⁺KRT5⁺KRT17⁺ 的细胞，类似于过渡性基底祖细胞，之前有文献报道它们存在于 SCJ 表面能导致 BE。

对 SMG 进行单细胞 RNA 测序并通过免疫荧光进行验证，他们发现了 SMG 中 4 种主要的上皮细胞类型，仅不到 0.1% 的 SMG 细胞表达细胞分裂标记物 *MKI67* (*ki67*)，这表明它们处于静止状态（细胞增殖不活跃）。将本次的 SMG 结果与来自人类细胞谱系计划及近期的一项 SMG 研究的食管细胞进行比较，发现食管活检组织中很少存在 SMG 表型。

移行基底细胞和 GEJ 中残留的胚胎细胞也曾被认为可能是 BE 的来源。研究者从 8 位正常供体中收集了正常的鳞-柱状上皮交界处（N-SCJ）组织进行单细胞 RNA 测序，研究其细胞组成，发现除了食管鳞状上皮细胞和胃柱状细胞外，还有一小部分 *KRT7^{high}* 的细胞群。将 N-SCJ 的单细胞转录组谱数据与正常食管（NE）、正常胃贲门（NG）及患者 SMG 作对比，可以发现 N-SCJ 与

SMG 中 *KRT7^{high}* 细胞群最为相似。总的来说，以上结果表明过渡性基底祖细胞、残余胚胎细胞、*MUC5B^{high}* 细胞可能都来源于 *KRT7^{high}* 细胞，它们可能与 SMG 有共同的细胞来源。

在初步确定 SMG 和 N-SCJ 区域的细胞表型后，研究者通过单细胞 RNA 测序在更多的样本中进行验证。他们发现 BE 细胞（来源于 BE-SCJ 和 BE）与胃贲门细胞（来自 NG 和 N-SCJ）很相似。此外，BE 细胞不同于 SMG 细胞及 N-SCJ 中 *KRT7^{high}* 的细胞群，BE-SCJ 中也不存在 *KRT7^{high}* 细胞，由此推断 NE 不太可能转化为 BE。

为进一步探索 BE 的起源，研究者利用甲基化谱、ATAC-seq 及全基因组测序这三种谱系追踪方法在 NE、NG、SMG 和 BE 中进行相互验证，结果表明 BE 与 NG 在基因组和表观遗传方面具有相似之处。

为进一步研究 BE 形成的机制，研究者对 BE 和 NG 分化的不同阶段基因表达进行基因富集分析和因果分析。NG 和 BE 未分化表型的差异分析表明 BE 中 CDX1、CDX2 和 MYC 被激活，BE 柱状分化细胞中转录因子 *HNF4A* 被激活，而 BE 未分化细胞中 *MYC* 被激

活。免疫组化染色结果表明 *c-MYC* 和 *HNF4A* 在 BE 活检组织中高表达，正常组织中不表达。研究者还通过构建正常 NG 类器官来研究 *c-MYC* 和 *HNF4A* 在组织转化过程中发挥的作用。研究发现胃细胞中 *c-MYC* 和 *HNF4A* 的异位表达驱动了 BE 表型相关基因的表达。

为探究是否所有 EAC 都源于 BE，研究者对两种表型不同的食管癌（食管鳞状细胞癌和 EAC）进行分析。结果发现 EAC 与 BE 细胞相似，但与临床表现无关，包括 TNM（肿瘤/淋巴结/转移）分期、Siewert 分型、预后。分化的 BE 细胞其标志物在向 EAC 转化过程中表达下降，而未分化的 BE 细胞其标志物在此过程中表达并不下降。此外，分化及未分化的 NG 细胞标志物与 EAC 没有任何相似性。这表明 EAC 起源于相同的化生前体，即使在诊断或病理标本中仍未发现 BE 的组织化生。

该研究阐明了一种 EAC 的早期诊断策略，有望在未分化的 BE 细胞甚至在无病理可识别的化生前体情况下，对食管腺癌进行早期诊断。

（浙江省台州医院 陈圆圆 编译）
（ID：yxckbsc2022030701）

上接第 5 版

键是 TGF- β 信号通路，*RUNX1b* 过表达上调了 TGF- β 信号，后者又诱导了 *P15* 和 *P21* 的表达（很可能还有 *P18*），*RUNX1-TGF β -CKIs* 级联强烈地负调控早期造血分化效率。其生理意义可能在于，早期发育中静止的胚胎并不需要太多的血液细胞来供氧，因此血液细胞的产生受到严格控制。而 *RUNX1* 基因在胚胎发育早期对造血发生有着很强的促进作用，过高的 *RUNX1b* 表达水平很可能导致过多血细胞的产生，并造成不利生理效应，也浪费了有限的发育资源。作为造血发生规模的控制阀门，TGF- β 信号因 *RUNX1b* 过表达上调，并引发下游 CKI 基因表达，抑制造血发生，这样就把早期胚胎的造血规模牢牢控制在一个合理有限范围内而不会过高。

当体外体系进行造血发生时，这套内在的调控机制仍在起作用，因此极大限制了过表达 *RUNX1* 等促进造血基因对早期造血的刺激作用，从源头上就限制了体外体系整体造血发生效率。如果能够利用 TGF- β 信号通路抑制剂及其他遗传学方法打开这个阀门，让造血发生不再受到 *RUNX1-TGF β -CKIs* 限制，那么很可能可以让造血规模指数级增长，相当于上游打开了阀门，下游各种血细胞的产量都有可能急剧增加。当然本课题组也发现，尽管 TGF- β 信号通路抑制剂能够强烈促进早期 CD34^{low} CD43⁻ 细胞群的产生，但 *RUNX1b* 地过表达对下游 CD34^{high} CD43⁻、CD34⁺ CD43⁺ 和 CD34⁺ CD45⁺ 细胞群的抑制没有明显改善，说明还有其他可能机制在抑制造血规模，有待于进一步探索。

NF- κ B 信号通路是调控造血分化效率的另一个关键信号通路。本课题组发现所有后期过表达能够促进造血的基因，它们的促进效应都伴随着该信号提升，并且这些效应都能因该通路的抑制完全抵消。甚至在纳米材料提升 hESC 造血分化潜

能的实验中，类似的现象也存在。这些证据显示 NF- κ B 信号通路在造血分化后期（D8）成为一个提升造血分化效率所要涉及的关键通路。如果能够以恰当方式刺激或改变 NF- κ B 信号通路，或许就能直接提升造血分化效率，而无须操作众多的相关基因，可能是一条相对便捷的技术路线。

此外，本课题组最近还进行了基于慢病毒敲除文库的大规模功能基因筛选，发现 hESC 中很多神经分化相关基因被敲除以后造血分化效率有了很大提高，这同样给了我们关键性启示。当 hESC 向造血分化时，与之竞争的应该主要是向神经方向分化，如果能够通过敲除这些神经分化关键基因来阻断其向神经方向的分化途径，那么就有极大可能提高造血分化效率。本课题组正将筛选出来的基因进行逐一验证，其中效果明显的基因可联合起来应用于 hESC 的基因修饰来大幅度提高造血分化效率，相信应该是一个很好的研究思路。

六、展望

本课题组通过一系列基因诱导过表达实验，找到了造血发生早期和后期重要的调控因子：TGF- β 和 NF- κ B 信号通路，并初步查明了其影响造血发生效率的方式。推测如果能够以正确方式影响这两个信号转导通路，就有可能彻底打破现有体外造血分化体系分化效率的瓶颈。同时，阻止 hESC 向神经方向的分化很可能会强烈促进其向造血分化趋势，极大提高造血分化效率。相信在未来探索中，本课题组能够利用这些线索，找到突破现有体外分化体系瓶颈的办法，实现人工血细胞的大规模工业化生产，使其成为人类血液的一种有效替代品，最大程度满足临床及紧急情况下大量输血需要；同时也能满足细胞免疫疗法、干细胞疗法和基因治疗对人工血细胞和免疫细胞的广泛复杂需求，保障人类健康安全。

（ID：yxckbsc2022030501）

原发性肝癌空间结构的全面分析

【据《Science Advances》2021年12月报道】题：原发性肝癌空间结构的全面分析（中国东方肝胆外科医院 作者 陈磊等）

原发性肝癌（primary liver cancer, PLC）是第二大致致死性肿瘤，其中肝细胞癌（HCC）和肝内胆管癌（ICC）是两种主要的组织学亚型。慢性肝炎病毒感染、过度应激、黄曲霉素暴露等复杂的肿瘤微环境和生物多样性导致 PLC 具有较高异质性。目前，针对 PLC 的有效手术治疗策略很少，也缺乏有效的药物治疗靶点，这主要是由于原发性肝癌肿瘤间和肿瘤内的异质性。因此，全面、准确地评估肿瘤细胞的时间和空间异质性对理解肿瘤的进展和研发有效的治疗方法至关重要。近几年，单细胞 RNA 测序技术促进了研究人员对肿瘤细胞异质性、浸润免疫细胞亚群的理解，但单细胞组学技术会丢失空间信息。最近发展的空间转录组学（ST）可以克服单细胞组学的限制，获得空间位置信息。

研究中，作者收集了 7 例患者的 21 个组织切片进行空间转录组测序，共获得 84 823 个点。7 例患者包括肝细胞癌、肝细胞癌合并胆管癌及胆管癌患者，21 个切片主要取自正常（N）部位、癌旁与正常组织交界区域（L）部位、肿瘤（T）部位、门静脉肿瘤癌栓（P）部位，通过 21 个样本的空间转录组测序绘制了 PLC 的空间转录组图谱。

通过空间转录组分析，作者发现：① PLC 组织内部肿瘤亚群具有区域分布和混合分布 2 种模式。② L 部位中分布在有包膜和无包膜的免疫细胞样本有差异，T 细胞、B 细胞、髓系细胞主要聚集在有包膜样本的正常区域，在无包膜的样本中，肿瘤侧主要富集耗竭性 T 细胞，同时伴随着 CTLA4、PDCD1、LAG3、TIM3 免疫检查点的增加，因此，包膜的完整性与免疫细胞的分布密切相关。③ 同一个

下转第 8 版



用人胎肝类器官模拟肝母细胞瘤的发展 揭示 YAP1 的激活足以导致肿瘤的发生

【据《Protein & Cell》2021年12月报道】题：用人胎肝类器官模拟肝母细胞瘤的发展揭示 YAP1 的激活足以导致肿瘤的发生（中国复旦大学 作者赵冰、李晋等）

肝母细胞瘤（HB）是一种主要的肝肿瘤，它起源于胚胎发生过程中肝前体细胞（肝母细胞）的异常分化。大约20%的乙肝患儿在诊断时出现肺转移，提示预后不良。深入了解 HB 进展的分子机制是开发靶向治疗的关键。但因缺乏人 HB 发生模型，其发病机制研究尚不清晰，药物策略尚不明确。之前研究所建立的模型在小鼠分化成熟的肝实质细胞中建立，无法呈现肝母细胞瘤来源于肝前体细胞的基本事实。

作者利用胎肝类器官建立人 HB 起

始模型。基于最近报道的生长因子维持的胎儿肝脏类器官培养系统，使用8~12周人胚胎原代肝母细胞培养人胎肝类器官。在第7天用小分子复合物代替生长因子组合来优化方案，并进行长期扩张。培养得到的类器官保留了肝母细胞的特性和原组织的细胞谱系和功能。

作者为确定 β -catenin (β -catenin ^{Δ ex3}) 或 YAP1 (YAP1^{5SA}) 的活性形式是否可以诱导胎肝类器官中 HB 的癌发生，通过体外实验，以慢病毒为载体分别将 GFP、 β -catenin ^{Δ ex3}、YAP1^{5SA} 转染进胎肝类器官中进行培养，发现二者均可促进类器官的增殖，但只有 YAP1 的激活可以促进 HB 成瘤。同时， β -catenin 转录活性抑制剂 IWP-2 对 YAP1^{5SA} 驱

动 HB 成瘤没有明显影响，说明 Hippo-YAP 激活足以驱动肝母细胞瘤的发展，但不依赖于 Wnt- β -catenin 信号通路，Wnt/ β -catenin 激活引起的 Hippo-YAP 激活是引起 HB 启动的关键。作者对 YAP1 激活的胎肝类器官进行转录组分析发现其获得了 HB 的关键特征，证明 Hippo-YAP 的激活使胎肝类器官转变为 HB 类器官。然后将其形成的人 HB 类器官移植到 NSG 免疫缺陷小鼠肝包膜下，发现人 HB 类器官可导致人肝母细胞瘤的形成，并发生自发性的肺定向转移，高度模拟肝母细胞瘤的临床行为特征。通过进一步代谢组学分析发现 Hippo-YAP 激活导致人胎肝类器官一碳代谢紊乱，揭示 YAP1-G9a 轴是肝母细胞瘤发生的分子机制，且 G9a 抑制剂可

有效干预肝母细胞瘤发生发展，YAP1-G9a 轴是 HB 潜在的治疗靶点。

综上，本研究中，作者通过操纵人胎肝类器官中的 Hippo-YAP 信号通路，建立了人 HB 肿瘤发生模型。该模型揭示了 YAP1 的激活足以促进人类 HB 肿瘤的发生，这推翻了 β -catenin 和 YAP1 的激活都是必需的传统理论。体外和体内机制研究表明，组蛋白甲基转移酶 G9a 的上调对 HB 的肿瘤发生至关重要。这些结果强调了 HB 代谢-表观遗传调控的重要性，并提示 YAP1-G9a 可被靶向开发为新的治疗方案。

（同济大学附属东方医院再生医学研究所
马可明 何志颖 编译）

（ID：yxckbsc2022030801）

抗衰老疫苗可改善正常和病理性年龄相关表型，并延长早衰小鼠寿命

【据《Nature Aging》2021年12月报道】题：抗衰老疫苗可改善正常和病理性年龄相关表型，并延长早衰小鼠寿命（日本顺天堂大学/新潟大学/日本医疗研究开发机构 作者 Tohru Minamino 等）

研究表明，年龄增长和压力在组织中积累的老化细胞（senolytic）引发的慢性炎症与年龄增长相关疾病的发病发展有关。通过去除积累的老化细胞，可改善年龄增长相关疾病的病态老化性状。但是，迄今为止报告的老化细胞去除药抑制抗凋亡通路，有可能产生副作用。因此，作者以开发对老化细胞有选择性作用、副作用少的治疗方法为目标进行了研究。

糖蛋白非转移性黑色素蛋白 B (GPMB) 是一种跨膜蛋白。研究显示

GPMB 在骨髓来源间充质干细胞中显示年龄相关差异表达，与骨质流失和衰老中的骨质疏松症和骨关节炎的病理学有关。同时 GPMB 是脂肪生成中重要的调控因子，GPMB 增加白色脂肪组织中脂肪酸合成并加剧饮食诱导的肥胖和胰岛素抵抗。用中和抗体阻断 GPMB 可改善饮食诱导的肥胖和胰岛素敏感性。因此，抑制 GPMB 是肥胖和糖尿病的潜在治疗靶点。也有文献表明，GPMB 抗原与人类衰老相关。

作者采用一种靶向衰老细胞特异表达衰老相关抗原，使用生物信息学方法从衰老的人血管内皮细胞转录组数据寻找具有跨膜结构域的蛋白，在得到候选衰老相关抗原中，作者对已经暗示与人类衰老相关的抗原 GPMB 进行分析。通过对老年小鼠、载脂蛋白 E 基

因敲除小鼠、高脂饮食小鼠主动脉及肺内皮细胞 GPMB 表达及动脉粥样硬化患者主动脉免疫组化染色分析显示，GPMB 可能是用于衰老治疗的一个分子靶点。作者还建立了一个转基因小鼠模型，其中白喉毒素受体 (DTR) 和荧光素酶在 GPMB 基因座表达，发现消除 GPMB 阳性细胞可减轻 HFD 喂养小鼠的代谢异常和动脉粥样硬化。进一步证明 GPMB 可能是衰老治疗的分子靶点。接下来，作者开发了 Gpmb 肽疫苗，以进一步探索接种 Gpmb 疫苗对 HFD 小鼠代谢异常的影响。发现该疫苗消除了 Gpmb 阳性细胞，同时可显著改善内脏脂肪组织衰老样表型变化及小鼠代谢和运动状况。与对照组疫苗相比，使用 Gpmb 疫苗可显著减少动脉粥样硬化的发生，并降低主动脉中依赖 Gpmb

的荧光素酶活性。为研究 Gpmb 疫苗对寿命的影响，作者对一种早衰小鼠模型接种疫苗并评估了它们的生存，注射 Gpmb 疫苗显示出更好的存活率。最后，作者将 Gpmb 疫苗与其他清除衰老细胞的药物进行比较，发现 Gpmb 疫苗接种持续改善了内脏脂肪组织的衰老样表型变化。

综上所述，这篇论文根据老化血管内皮细胞的基因信息鉴定特异表达的老化抗原 GPMB，以 GPMB 为靶点成功开发特异性清除衰老细胞的疫苗，并通过疫苗成功改善各种老化相关疾病的病态老化性状，为衰老细胞疗法提供一种全新策略，促进了抗衰老治疗的进展。

（同济大学附属东方医院再生医学研究所

孙士雯 何志颖 编译）

（ID：yxckbsc2022030802）

上接第4版

的大部分费用是在移植前阶段，包括细胞采集和制备。但基因治疗的患者术后并发症治疗的费用较低。制造商间的竞争和生产过程的优化应该会降低基因治疗费用。基因编辑工具的不断优化也会降低费用，增加基因治疗的可行性。Allo-HSCT 与基因治疗的疗效相似，但治疗慢性并发症的费用可能很高。在评估治疗费用时，还要考虑隐秘的患者费用，评估全面的经济影响和患者生活质量。

最终，基因治疗费用可能需要从按服务收费向基于疗效的付费模式转变。比如患者首次支付20%费用，其余80%的费用和疗效挂钩，逐年支付。其他方法包括采用再保险、治疗贷款、第三方捐赠等渠道支付基因治疗的费用。

（ID：yxckbsc2022030401）

上接第7版

肿瘤切片中不同肿瘤聚类具有不同的功能和拷贝数变异，不同类型的肿瘤细胞之间存在广泛的配受体相互作用，通过诱导血管生成、细胞增殖迁移来促进肿瘤的生长和代谢，因此，空间肿瘤内异质性广泛存在。④肿瘤干细胞（CSC）是肝癌肿瘤内异质性的主要因素，作者在此处探讨了不同 CSC 相关标记 CD47、EPCAM、KRT19、PROM1、SOX9 的功能，发现 CD47⁺PROM1⁺ CSC 生态位比例在 HCC-2 中从 L 到 P 部位逐渐增加，且 CD47⁺PROM1⁺ CSC 富集到上皮间质转化（EMT）、缺氧坏死因子及这些与肿瘤凋亡相关的通路，表明这两种 CSC 生态位与肝癌的肿瘤侵袭和转移呈正相关。⑤作者为了在整体范围内理解肿瘤异质性，研究肿瘤中心到肿瘤外周的变化，选择了一个肿瘤直径为 1 cm 的 HCC 样本，将其分为 4 份进行空转测序，绘制完整肿瘤切面的空间转录组图谱。发现区域分布和混合分布的模式在很早期肝癌中同时存在，且不同肿瘤聚类

也具有不同的通路活性，在不同区域的相同聚类呈现不同变化，从肿瘤中心到肿瘤外围代谢途径呈现梯度变化，因此，在很早期 HCC（1 cm）中存在空间异质性。⑥三级淋巴结构（TLS）是一种异位淋巴结构，是树突状细胞成熟、T/B 细胞活化、抗肿瘤免疫及潜在免疫治疗应答的部位。作者在此处开发了一种 TLS-50 标签用于鉴定三级淋巴结构，并在癌症基因组图谱（TCGA）数据中发现 TLS-50 的高评分与较好的预后相关，同时 TLS 的组成与肿瘤之间的距离相关，且 TLS 内部的部分特征基因表达从中心到外周呈梯度变化。

综上，作者在本研究中呈现了 3 种主要肝癌类型的空间转录组图谱，表明肿瘤细胞和免疫微环境存在广泛异质性。这些发现为寻找新的药物靶点和开发新的治疗策略提供了新见解。

（同济大学附属东方医院再生医学研究所

母晓兰 何志颖 编译）

（ID：yxckbsc2022030702）