

医学参考报

干细胞与再生医学专刊

Stem Cell and Regenerative Medicine

第四期 NO.04

专家简介



管阳太 教授

主任医师、教授、博士研究生导师，现任上海交通大学医学院附属仁济医院神经内科主任，兼任中国医药生物技术协会神经修复与再生分会主任委员、中华医学会神经病学分会常务委员、中国医师协会神经内科医师分会常务委员、中国医师协会神经修复学专业委员会常务委员、中国医师协会神经内科医师分会神经免疫学组组长、中华医学会神经病学分会神经免疫学组副组长、中国神经科学学会神经免疫学分会副主任委员，获上海领军人才/优秀学术带头人/医学领军人才、国家重点研发计划“干细胞及转化研究”重点专项首席科学家。

导 读

iPSC来源NK细胞治疗肿瘤的研究进展

2版

肠道菌群调节肠道干细胞影响炎症肠病进程的机制

3版

表观遗传时钟：抗衰老的理想指标

4版

指尖上的诺贝尔奖：神经环路修复与重建

5版

在体内将脾脏重编程成为一个功能正常的“肝脏”

6版

心肌球细胞显著延缓杜氏肌营养不良症患者的疾病进展

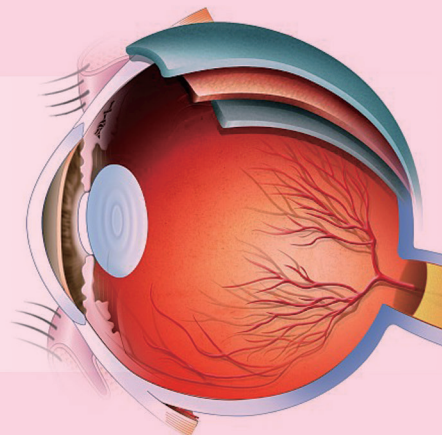
7版

人类多能干细胞衍生的胰岛可改善非人灵长类动物的糖尿病

8版

间充质干细胞治疗视神经脊髓炎谱系疾病的临床研究进展

上海交通大学医学院附属仁济医院 管阳太



视神经脊髓炎谱系疾病（neuromyelitis optica spectrum disorders, NMOSD）是一组中枢神经系统炎性脱髓鞘疾病，具有高复发率及致残率，当前治疗手段有限。间充质干细胞（mesenchymal stem cells, MSC）具有低免疫原性、免疫调节和组织修复作用等特点，成为目前临床研究使用最广泛的干细胞。已有研究表明，MSC在治疗NMOSD中具有特定疗效和优势，为NMOSD的治疗提供了新策略。本文对目前MSC治疗NMOSD的研究进展进行概述，为后续临床研究提供新思路。

一、NMOSD的发病机制与治疗现状

（一）NMOSD的发病机制

NMOSD是一种罕见的中枢神经系统自身免疫性炎症型脱髓鞘疾病，以反复急性发作和可检出水通道蛋白4免疫球蛋白（AQP4-IgG）抗体的存在为特征，其发病机制尚不明确。目前认为这是一组自身抗体介导的以体液免疫为主、多种免疫细胞因子参与的自身免疫性疾病，主要累及视神经和脊髓。AQP4抗体的检出在临床上具有高度特异性及一定的敏感性，80%以上的患者AQP4-IgG阳性，它与星形胶质细胞上的AQP4通道结合，触发经典补体级联反应，导致脱髓鞘和神经元丢失。具体来讲，AQP4抗体与星形胶质细胞质膜上存在的AQP4胞外表位结合，通过补体依赖的细胞毒性和抗体依赖的细胞毒性作用触发星形胶质细胞损伤；同时，还可能通过旁路机制对周围细胞造成毒性损伤。NMOSD的病理特征包括活化补体伴广泛的血管中心免疫复合物沉积、星形胶质细胞中AQP4表达缺失、中性粒细胞及

巨噬细胞浸润、小胶质细胞活化、嗜酸性粒细胞脱颗粒、髓鞘磷脂成分减少等。NMOSD病理生理过程复杂，发病机制仍需不断深入探究。

（二）NMOSD治疗现状与困境

NMOSD治疗分为急性发作治疗和长期预防复发治疗。急性期治疗目的为最大程度挽救神经功能，防止、减轻、延缓进一步神经损害；长期治疗则主要为了降低复发率，减轻患者致盲、致残的严重程度。急性发作治疗包括大剂量皮质类固醇药物及血浆置换。缓解期药物常用免疫抑制剂和免疫调节剂，包括硫唑嘌呤、霉酚酸酯和利妥昔单抗。指南建议对所有诊断为NMOSD的患者进行长期预防复发治疗，研究表明5年后停用免疫抑制剂也可能增加患者的复发风险，免疫疗法需维持的最佳时长目前尚未达成共识。

近年来，随着对NMOSD病理生理机制的挖掘，也开发了许多新的治疗药物。如抗白细胞介素6受体（IL-6R）的单克隆抗体satralizumab、CD19单克隆抗体inebilizumab，补体C5的重组人源单克隆抗体eculizumab。这些新开发的生物制剂与传统的一线二线药物相比，在一定程度上显示了有效性和良好的耐受性，但仍缺乏大样本、双盲、随机临床研究来证实其实效性、安全性和耐受性。尤其是这些药物对AQP4-IgG阴性的NMOSD患者和难治性患者疗效不明显。

二、MSC治疗NMOSD的研究进展

（一）MSC治疗NMOSD的机制

MSC对所有免疫细胞几乎

均具有调节作用，具有强大的自我更新、免疫抑制功能，在多种临床研究中广泛应用，可通过免疫抑制细胞因子分泌、抑制程序性细胞死亡信号传导，来防止活化的T细胞扩增。由于这一特点，MSC被视为免疫相关炎症和疾病的潜在治疗方法。临床研究中常用的MSC来源于骨髓、脂肪、脐带等。人脐带间充质干细胞（human umbilical cord mesenchymal stem cell, hUC-MSC）较其他来源的MSC具有生长和分泌能力旺盛、遗传稳定、病原微生物感染风险低、来源充足、免疫原性低等众多优点，成为临床研究的首选细胞。

MSC用于NMOSD治疗，除本身的替代作用、修复潜力外，更多是通过旁分泌、免疫调节发挥作用，包括抑制T细胞的增殖与功能，抑制B细胞增殖分化和免疫球蛋白产生，促进巨噬细胞向抗炎表型转化等，从而保护胶质细胞、视网膜神经节细胞，减轻炎症反应，保护神经。

此外，MSC可促进髓鞘再生，降低视网膜神经节细胞损伤。MSC治疗变态反应性脑脊髓炎（EAE）小鼠结果显示，MSC治疗可抑制T细胞反应并改善临床评分。研究表明MSC可减少炎症细胞因子的产生，减轻轴突损伤，缓解脱髓鞘，改善EAE小鼠及大鼠的神经功能。笔者团队前期采用低频聚焦超声联合微泡技术、可逆性开通血脑屏障等技术，建立了能更好模拟NMOSD临床表现的动物模型，结合开展的NMOSD临床研究数据，对血脑屏障开通等技术参数进行验证，进一步明确了NMOSD的疾病特点，为hUC-MSC疗效评价提供了理论依据。

（二）MSC治疗NMOSD的新策略

MSC作为NMOSD治疗的新兴策略，在基础研究和临床研究中均有一系列新进展。笔者团队利用NMOSD患者来源的AQP4抗体诱导小鼠和食蟹猴NMOSD模型，证实hUC-MSC治疗NMOSD安全有效，并分析hUC-MSC与免疫细胞、神经细胞的相互作用，发现hUC-MSC通过免疫调控和神经修复等机制治疗NMOSD。MSC对免疫调节和髓鞘修复的影响，主要通过旁分泌信号和分泌的可溶性分子共同完成。也有研究表明MSC在免疫调节中具有二元性，甚至可能加剧症状。MSC的临床安全性、有效性、细胞转归、经济成本高等问题仍亟待解决。

（三）MSC治疗NMOSD的临床研究现状

根据美国国立卫生院（NIH）临床试验中心统计显示，截至2022年8月世界范围hUC-MSC治疗相关临床试验已申报196项，其中24项已进入Ⅲ期临床阶段。动物研究证实，hUC-MSC治疗NMOSD安全、有效，但目前尚无治疗NMOSD的干细胞药物及其制备工艺。

有关MSC治疗NMOSD的临床试验方面，一项研究表明15例NMOSD患者静脉输注自体MSC，2年内神经残疾持续改善，无严重不良事件。一项研究发现hUC-MSC治疗5名血清阳性NMOSD患者，在24个月的随访期内，患者复发率均显著改善，10年随访无不良事件。最近的一项Ⅱ期临床试验表明，静脉内和鞘内注射MSC，可延缓进行性多发性硬化患者疾病进程，并改善步行速度。

下转第5版 ▶▶

iPSC 来源 NK 细胞治疗肿瘤的研究进展

成都云测医学生物技术有限公司 晏翔

肿瘤作为当今社会的一大类常见病，已成为人类死亡的重要原因之一。在我国，肿瘤紧随心脑血管疾病，高居人口死亡病因的第三位。目前肿瘤治疗除传统的手术、化疗及放疗，还包括靶向治疗和免疫治疗等新兴疗法。靶向治疗的出现基于细胞分子生物学的进步，通过识别肿瘤细胞表达的靶分子进行杀伤，虽然在治疗效果和毒副作用方面具有明显的改善，但存在肿瘤耐药及脱靶等问题。免疫治疗主要分为免疫检查点抑制治疗和免疫细胞治疗两大类，其中，免疫细胞治疗已经实现了部分患者临床痊愈。本文将对免疫细胞疗法中的 iPSC 来源 NK 细胞治疗肿瘤的相关研究进展进行介绍。

一、免疫细胞治疗肿瘤的困境

目前用于肿瘤治疗比较成熟的免疫细胞产品是嵌合抗原受体 T 细胞（CAR-T 细胞）。CAR-T 细胞治疗过程包括获取患者自身 T 细胞、CAR 基因表达系统敲入、体外细胞扩增及 T 细胞回输。虽然 CAR-T 细胞疗法在临床上取得了瞩目的效果，甚至部分病例实现持续性的临床治愈，但存在毒副作用严重（炎症因子风暴、神经相关毒性、移植物抗宿主病等）、制备周期长（从获取患者血液细胞到回输 CAR-T 细胞需要 2~4 周）、治疗费用高昂（CAR-T 细胞制备模式属于个体化定制）等临床推广的诸多问题。目前除进一步对这类细胞产品的设计、制备及其应用方案进行探索外，其他免疫细胞治疗产品也在开发中。

相比于 T 细胞，同属于淋巴细胞的 NK 细胞对实体瘤治疗效果更好，且在临床试验中未报道严重的炎症因子风暴、神经相关毒性、移植物抗宿主病等不良反应。目前临床研究

的 NK 细胞来源主要有外周血、脐带血、NK 细胞系和 iPSC。外周血和脐带血来源的 NK 细胞，避免了 CAR-T 细胞的严重不良反应，但依然存在个体化定制和制备周期长等弊端。此外，脐带血 NK 细胞还存在获取来源受限的问题。NK 细胞系（如 NK92）则属于肿瘤细胞，虽然可以大规模扩增和储备，但输入体内前需要进行辐照以破坏其增殖成瘤能力，这一处理同样会降低对肿瘤治疗的效果。基于上述因素，外周血、脐带血、NK 细胞系来源的 NK 细胞产品在临床应用上均受到较大限制，肿瘤治疗领域期待着更好疗效的通用现货型 NK 细胞产品，iPSC 来源的 NK 细胞应运而生。

二、iPSC 来源 NK 细胞制备工艺的开发

iPSC 由山中伸弥团队在 2006 年率先研制成功，后经多个实验室的努力，已发展出多种制备方法，可对多种的细胞进行重编程。使用 iPSC 分化生产 NK 细胞具有多方面的优势。首先，成熟的细胞重编程技术能够保证 iPSC 的来源稳定、细胞均一，不依赖特定供体。其次，iPSC 可以大规模扩增，有利于 NK 细胞的大量生产存储，降低生产成本、缩短制备到使用的时长。最后，相比于原代 NK 细胞，iPSC 更容易进行基因编辑和病毒感染，从而制备多种基因修饰的 iPSC 细胞株，满足不同肿瘤治疗的需求。

目前，已有多个实验室对 iPSC 分化 NK 的工艺进行了开发，均为途经造血前体细胞的分化路线。与自然分化类似，大致分为造血前体细胞形成和 NK 细胞形成两个阶段。但在具体工艺方面，各实验室方案差别明显。在造血前体细胞形成阶段，除了采用滋养细胞共培养的方案，更多的实验室

采用拟胚体分化方案。拟胚体的形成，通常包括悬浮培养自发形成和离心两种方法。离心的方法能更好地控制起始细胞数量、保证拟胚体均一性。在 NK 细胞形成阶段，一种方案是用滋养细胞与造血前体细胞共培养，另一种采用拟胚体贴壁的方案使前体细胞迁出拟胚体进一步分化。此外，各实验室开发的工艺所采用的分化培养基也各不相同。需要注意的是培养基中血清的使用，在一定程度影响后续的药品开发。

iPSC 分化成 NK 细胞后，需进一步对 NK 细胞进行扩增以获得治疗所需的细胞量。目前除个别实验室外，其余方案均采用滋养细胞刺激的方式进行 NK 细胞扩增。滋养细胞以慢性髓系白血病患者细胞系 K562 为主。为了增加扩增效率，IL15、IL2 和 IL21 等细胞因子常作为扩增刺激因子加入扩增培养基。也有实验室通过转基因技术，使滋养细胞以膜蛋白的形式表达部分细胞因子，进而用于 NK 细胞扩增。此外，人源血清也作为促进 NK 细胞扩增的添加剂用于扩增。目前这些扩增方案都获得了显著的扩增效果。有研究表明，扩增环节可明显提高 NK 细胞的杀伤效率。NK 细胞的扩增将为临床试验的开展提供重要的保障。

三、iPSC 来源 NK 细胞治疗肿瘤的效果

与外周血来源的 NK 细胞相比，iPSC 来源 NK 细胞体外杀伤肿瘤的能力，各家报道不一。这种情形可能与分化扩增方案及靶细胞的选择有关，也可能与 iPSC 的不同来源有关。基于 iPSC 基因修饰分化的 NK 细胞，在治疗中有明显优势，目前 iPSC 基因修饰的报道主要集中于 Kaufman 实验室。不论是敲除 CISH，过表达 CD16，还是加载 CAR，都明显提高

了 iPSC 来源 NK 细胞的杀伤效率。这一结果在体外实验和小鼠体内实验得到了一致性的检验。由于 iPSC 比原代 NK 细胞更容易进行各种方式的基因修饰，上述结果无疑巩固了 iPSC 来源 NK 细胞在肿瘤等疾病方面的优势。

迄今为止，仅有 Fate Therapeutics 公司完成了 iPSC 来源 NK 细胞治疗肿瘤的一期临床试验。进行临床试验的细胞药品共有 5 款，包括未经修饰及各种基因修饰的 iPSC 来源 NK 细胞。该公司披露的部分临床试验数据显示，不同基因修饰（包括未经修饰）的 iPSC 来源 NK 细胞均具有良好的安全性和耐受性，未出现与 NK 细胞有关的严重不良事件。在有效性方面，未经修饰的 iPSC 来源 NK 细胞对包括实体瘤在内的多种肿瘤具有一定的疗效，试验中多数患者能够维持一定时间的稳定无进展状态。经过基因修饰的 iPSC 来源 NK 细胞治疗复发性 / 难治性淋巴瘤，在总体缓解率和完全缓解率方面均具有良好的表现。目前的临床数据显示，iPSC 来源的 NK 细胞，特别是经过特定基因修饰的 NK 细胞具有良好的临床应用前景。

尽管 iPSC 来源 NK 细胞在临床肿瘤治疗上显示出明显的优越性，但仍然存在一些值得注意甚至必须解决的问题。首先是 iPSC 残留和分化过程中的基因突变等因素皆可带来致癌风险，特别是基因修饰的细胞。因此，在成药阶段必须进行严格的质量控制。其次，制备及活化扩增过程中使用的滋养细胞常为肿瘤细胞系，同样存在致癌风险，需进一步完善制备工艺，避免滋养细胞的使用。最后，相比于 T 细胞，NK 细胞在体内的半衰期较短，需要多次给药。这可能造成部分患者因病情变化无法完成细胞

作者简介



晏翔

四川大学博士、博士后，现任成都云测医学生物技术有限公司研发总监，拥有多年生命科学领域研发工作经验，目前主要从事人诱导多能干细胞相关的细胞药物研发工作；参与国家重点研发项目（神经干细胞和造血干细胞命运的调控）2 项、国家自然科学基金项目多项，发表 SCI 论文多篇。

输注计划，从而限制 NK 细胞发挥治疗效果。

四、展望

iPSC 来源 NK 细胞用于肿瘤治疗，相比于较为成熟的 CAR-T 细胞，不仅大大降低了不良反应风险，也可极大降低制药成本，且更易通过基因修饰以强化 NK 细胞对肿瘤的杀伤效能。积极的临床试验结果也初步显示，iPSC 来源 NK 细胞治疗肿瘤具有光明前景。同时，iPSC 来源 NK 细胞用于肿瘤治疗也存在一定问题。不论是 NK 细胞本身特性还是制备工艺，均需要研究人员不断地探索改进。虽然 iPSC 来源 NK 细胞治疗肿瘤的相关产品及治疗方案的开发已有众多参与者，但该领域仍处于发展早期阶段，需要整个行业的持续努力使其不断完善成熟，并推出多样化的产品及治疗方案服务于患者。

（ID：yxckbsc2022040201）

医学参考报

理事长兼总编辑：巴德年
副理事长兼副总编辑：曹雪涛等
理事会秘书长：周 赞

社 长：魏海明
副社长：吕春雷
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



肠道菌群调节肠道干细胞影响炎症肠病进程的机制

厦门承葛生物科技有限公司 夏荣木

的过程，深入研究三者间的关系有助于寻找缓解炎症性肠病的新策略。

一、肠道菌群衍生代谢物对 ISC 的直接影响

在健康及结肠炎隐窝相关黏液凝胶中存在大量的共生细菌，人类结肠隐窝主要由厚壁菌门定殖，在急性溃疡性结肠炎患者肠道中细菌计数显著减少。越来越多的证据表明益生菌或肠道菌群移植治疗能够缓解 IBD 的相关症状。此外，在没有肠道菌群的情况下肠道黏膜修复能力显著降低，且在无菌动物中无法诱发结肠炎，这些证据表明肠道菌群是 IBD 进展的相关因素。

胆汁酸是肠道菌群影响 IBD 的介质之一。研究发现 IBD 中的胆汁酸成分发生了改变，即初级胆汁酸增加，次级胆汁酸减少，且肠道梭菌属成员减少。胆汁酸已被公认为是上皮细胞生理学及病理生理学的调节因子，除了能够通过膜结合的 GPBAR1 (TGR5) 起到抗炎作用外，这些胆汁酸 (BA) 还通过细胞受体调节 ISC 数量及功能。BA-TGR5 相互作用驱动 SRC/yes 相关蛋白 (YAP) 再生信号通路，从而在稳态及损伤诱导的上皮再生期间促进 ISC 自我更新并分化为肠内分泌细胞。

SCFA 是微生物驱动的不可消化的膳食多糖厌氧发酵产生的代谢物。SCFA 被证明对 ISC 的增殖及分化有影响。口服 SCFA 可通过 GPCR 介导的 MEK-ERK 信号激活恢复隐窝上皮的增殖及分化能力。另外研究表明用 SCFA 处理肠道类器官可通过调节转录因子 Foxo3 抑制 ISC 增殖并促进其分化。SCFA 的这种差异效应体现出肠道菌群来源的代谢物影响 ISC 的复杂性。此外，结肠黏膜中丁酸盐代谢紊乱、粪便 SCFA 水平降低及肠道菌群功能或组成改变也是 IBD 的显著特征。

基于肠道菌群的色氨酸代谢途径改变与 IBD 发生发展过程显著相关。色氨酸是一种必需的芳香族氨基酸，通过宿主细胞驱动的犬尿氨酸及血清素途径或肠道菌群介导的吲哚途径代谢。吲哚的代谢物通过充当宿主细胞上芳烃受体 (AhR) 的配体，从而影响肠道上皮屏障完整性及免疫反应。IBD 与

吲哚的代谢物、血清色氨酸水平及炎症黏膜中的 AhR 表达呈负相关。此外，犬尿氨酸途径的代谢产物与 AhR 相互作用，激活 E3 泛素连接酶活性，促进细胞增殖相关的 Akt、ERK 和 p38 激酶降解，从而阻碍细胞中 Wnt 及 Notch 信号传导，最终抑制细胞增殖。因此，色氨酸的代谢产物可在体内影响 IBD 发病期间 ISC 微环境。

二、细菌细胞壁衍生抗原

细菌细胞成分，如细胞壁分子脂磷壁酸、肽聚糖、脂多糖、脂质 A、胞壁酰二肽 (MDP) 及鞭毛蛋白也是肠道上皮增殖、分化的关键调节剂。

MDP 是细菌共有的肽聚糖基序，是 NOD2 的激动剂，ISC 表达这些细胞质模式识别受体。用 MDP 处理可促进小肠类器官生长。微生物衍生的 MDP 可清除 ISC 中过量的活性氧物质，从而维持上皮再生能力。MDP 刺激后的这种 ROS 清除依赖于线粒体 ATG16L1 及 NOD2 基因，但这些基因已被公认为是 IBD 易感基因座。

细菌鞭毛蛋白也是调节 ISC 增殖能力的一种因素。ISC 上鞭毛蛋白—TLR5 相互作用信号上调，ISC 特异性表达 NOX1，导致 ROS 含量上升，从而激活 EGFR 并增强 ISC 的增殖。NOX1 能够支持肠隐窝细胞的增殖，以响应由细菌刺激驱动的黏膜损伤。NOX1 功能缺失突变体已被证明在 IBD 患者中普遍存在。此外，先前研究证实鞭毛蛋白的有益作用，其中鞭毛蛋白在小肠隐窝上皮细胞中能够保护细胞免受辐射损伤。

细菌脂多糖 (LPS) 通过与细胞表面的 TLR4 相互作用，从而激活 NF- κ B 等多种炎症信号通路，发挥其免疫调节作用。LPS 水平与 CD 疾病的严重程度密切相关，其抗增殖作用已在小肠类器官模型及 ISC 特异性 TLR4 敲除小鼠中得到证实。从机制上讲，LPS 诱导的细胞凋亡是通过 TNF 依赖性的方式上调 p53 凋亡通路的上游细胞凋亡相关因子。总的来说，LPS 对 ISC 微环境具有双重作用，首先是抑制 ISC 的死亡，其次是促进 ISC 的分化。

三、肠道菌群通过上皮途径调节 ISC

潘氏细胞位于隐窝底部，与肠上皮干细胞相邻。可通

过 TLR-Myd88 途径感知微生物成分，进而通过释放抗菌肽、溶菌酶及磷脂酶 A 来增强抗菌防御。由乳酸杆菌及双歧杆菌等肠道细菌产生的乳酸可被潘氏细胞上的 G 蛋白偶联受体感知，触发隐窝中 Wnt3 释放，促进 ISC 增殖并保护小鼠肠道免受辐射及化疗引起的损伤。产乳酸菌是公认的用于缓解 IBD 症状的益生菌疗法。考虑到乳酸在维持上皮增殖中的作用，这些益生菌在 IBD 中的有益作用可能归因于它们刺激潘氏细胞释放 Wnt。

肠内分泌细胞 (EEC) 是人体最大的内分泌器官之一，EEC 与肠道菌群的紧密定位与调节 GLP-2 的释放有关。这些细胞会产生 GLP-2，一种可促进肠道屏障完整性及隐窝增殖的分子。GLP-2 还通过与上皮成纤维细胞上的 GLP-2 受体结合，作为一种微环境信号，诱导 EGF 及 IGF 等生长因子表达。这些生长因子依次结合并激活隐窝中的细胞增殖潜力。在使用 SCFA 或产 SCFA 的细菌处理后，大肠组织及血清 GLP-2 水平增加。具体来说，SCFA 与肠细胞上的 FFA3 (或 GPR41) 受体结合，促进 GLP-2 释放，从而加强上皮紧密连接并刺激上皮细胞增殖，缓解炎症。IBD 发病时血液及组织相关的 GLP-2 水平显著降低，而上皮损伤恢复能力与 GLP-2 水平正相关。GLP-2 激动剂可缓解小鼠 IBD 模型的症状，对隐窝细胞具有抗凋亡及促增殖作用，其激动剂 (替度鲁肽) 在临床实践中用于治疗短肠综合征。

四、肠道菌群通过免疫途径调节 ISC

肠道固有层中富集的 CD4⁺ T 淋巴细胞、树突状细胞、巨噬细胞及先天性淋巴细胞，负责协调肠道免疫系统以响应来自肠道菌群及饮食抗原的信号。肠道菌群能够调节肠道 Th 细胞，控制它们的成熟、分化及可塑性。这种调节作用呈双向性，辅助性 T 细胞通过 ISC 表面表达的 MHC- II 分子与 ISC 相互作用，诱导 Treg 细胞产生 IL-10，从而在稳态下促进 ISC 自我更新。肠道菌群调节的犬尿氨酸途径酶—IDO1—有助于肠道 Treg 扩增，以促进肠道菌群与 ISC 的相互作用。

IBD 的部分特点是肠道菌

作者简介



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。在 *Oncogene*、*Journal for ImmunoTherapy of Cancer*、*Clinical and Translational Medicine*、*Frontiers in Cell and Developmental Biology* 等期刊发表论文 10 余篇。申请实用新型专利 1 项，发明专利 2 项。

群失调及异常的 Th1 和 Th17 反应。然而，肠道菌群失调是这种异常免疫反应的“原因”还是“结果”？研究显示，肠道活性氧水平及代谢重编程的改变可导致兼性厌氧菌分布异常增加，初步说明肠道菌群失调是 IBD 微环境改变的“原因”。另一方面，将 IBD 相关细菌转移至无菌小鼠中可提高 Th17 细胞及其相关细胞因子含量，从而诱导肠道炎症发生。不管这种“因果关系”如何，肠道菌群—Th 细胞—ISC 的相互作用可能在 IBD 中失调，导致肠道 Th 细胞反应不稳定，引起肠道菌群失调。

肠道固有层的先天淋巴样细胞 (ILC) 是相对较新的调节性细胞类型，它们在维持肠道稳态中发挥作用。固有层常驻 ILC3 及其细胞因子 IL-22 可通过激活细胞内 STAT3 磷酸化维持 ISC 的增殖能力。肠道菌群可通过与 ILC3 相互作用，促进 IL-22 分泌，影响肠道上皮再生进程。

五、基质细胞介导的肠道菌群—ISC 串扰

基质细胞曾被称为间充质细胞，是肠道上皮层与黏膜

下转第 4 版 ▶▶

表观遗传时钟：抗衰老的理想指标

福建医科大学附属协和医院 廖联明

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。

衰老伴随着身体和认知能力的下降及疾病风险的增加。在细胞水平，衰老的标志包括基因组不稳定、端粒磨损、表观遗传改变、蛋白质稳态丧失、线粒体功能障碍、细胞衰老、干细胞衰竭。但寿命较短的非脊椎动物模型的遗传学研究初步表明衰老可以减缓。

营养感应通路是衰老的调节因子，如雷帕霉素的 mTOR 通路和胰岛素/胰岛素样生长因子(IGF)通路。对这些通路进行调控可延长小鼠等哺乳动物寿命。基于细胞重编程的研究（如 iPSC）表明，在表观遗传水平上小鼠和人类逆龄成为可能。为有效量化抗衰老措施的效果，需要寻找一种推断生物学年龄的生物标志物，这是一种比实际年龄（chronological age, chAge, 也称时间年龄、日历年龄）更能预测个体健康和寿命的生物指标。

一、表观遗传时钟

DNA 甲基化（DNAm），特别是 5- 甲基 - 胞嘧啶（5mC），是生物年龄最有效的标志。在过去十年中，研究人员开发了大量 DNAm 年龄预测方法，称为表观遗传时钟（epigenetic clock）。这些时钟通常选择一组与年龄相关的 CpG，采用回归模型（例如弹性网络或 LASSO）构建，以年龄相关的高甲基化和低甲基化的关键 CpG 为变量，建立加权方程式，然后根据给定样本中这些 CpG 位点的甲基化百分比计算生物年龄。不同表观遗传时钟反映衰老的不同方面，以能够对衰老程度和

抗衰老方法进行定量研究。

表观遗传时钟计算的年龄通常被称为 DNAm 年龄或表观遗传年龄（epigenetic age, eAge）。eAge 和 chAge 之间的差异称为年龄加速程度，采用 eAge 和 chAge 之间的平均绝对偏差或中值绝对偏差标示。

eAge 计算出来的年龄加速与许多疾病和条件有关。例如唐氏综合征、艾滋病、肥胖症、亨廷顿病患者往往表现出年龄正加速的趋势，eAge 大于 chAge。维生素 D 充足的个体表现出年龄负加速的趋势，eAge 小于 chAge，有较长的白细胞端粒长度（LTL）。吸烟会增加气道细胞和肺组织中的 eAge。

二、表观遗传时钟年龄预测

使用 Illumina DNAm 阵列技术的表观遗传时钟包括 Bocklandt、Koch & Wagner、Passage Number、Horvath（Pan-Tissue）、Skin & Blood（S&B）、Zhang（Elastic Net）、Zhang（BLUP）、Hannum、Boroni Skin 和 Pediatric Buccal Epigenetic（PedBE）等。

早期表观遗传时钟在测试数据中包含相对较少的 CpG 位点和样本。Bocklandt 等人从 68 个样本中创建了一个时钟，通过唾液预测年龄，平均误差为 5.2 年。

第一个多组织年龄预测方法（称为 Horvath 或泛组织 Pan-Tissue 时钟）使用 353 个 CpG，平均误差为 3.6 年。用于构建时钟的试验数据库包含来自 82 项研究的 8 000 个样本，其中包括 51 种健康组织和细胞类型。由于 Horvath 时钟可使用相对较少数量的 CpG 预测多个组织年龄，并揭示组织可能以不同速率老化，因此在科学界广受欢迎。但 Horvath 时钟也存在一些局限性，如 Horvath 时钟计算结果显示儿童早衰症没有出现年龄加速。

Zhang 生物在预测血细胞年龄方面也优于 Horvath 和 Hannum 时钟，且能够像 Horvath clock 一样准确预测乳房、肝脏、脂肪和肌肉组织的年龄。

目前已为单个组织开发出多个 CpG 时钟。并为血液开发了多个时钟，第一个是 Hannum 时钟，用于血细胞。Boroni 等人基于 2 266 个 CpG 研发出了准确的皮肤年龄预测方法。儿童口腔表观遗传（PedBE）时钟用于 0~20 岁的人。

三、最小化 CpG 时钟

依赖于 Illumina Infinium 阵列的时钟价格高，限制了 eAge 技术的使用。法医领域使用与年龄相关的 CpG（如 *ELOVL2* 和 *FHL2* 基因）开发了多个最小化 CpG（通常少于 10 个）时钟，专为犯罪现场发现的常见组织而设计，如血液、唾液、口腔拭子和精液。最小化时钟使用多种技术，例如用于焦磷酸测序的 Qiagen 平台，具更优的成本效益比。

四、复合表观遗传时钟

采用 CpG 和生理或细胞衰老指标（例如胆固醇或蛋白质丰度）相结合构建的时钟相较于一般时钟，具有捕获更多与年龄相关的生物学信息的潜力，因此有更高的准确度。第一个复合生物标志物年龄预测方法包含了十个与年龄显著相关的生物标志物（例如 C 反应蛋白、糖化血红蛋白、收缩压、总胆固醇）。

Lu 等人使用了与吸烟相关的 CpG 甲基化和与寿命相关的 7 种血浆蛋白水平开发了 GrimAge 时钟。GrimAge 年龄加速程度与疾病和生活方式因素有关，而且在预测死亡时间、患冠心病时间和患癌时间方面优于之前的时钟。GrimAge 年龄加速程度还与皮质萎缩、妊娠期缩短和出生体重降低显著相关。

DNAm 端粒长度(DNAmTL)时钟包括 LTL 和血液细胞 140 个 CpG 甲基化数据。DNAmTL 不仅准确地预测 LTL，而且还显示出更准确的寿命、冠心病发生时间和充血性心力衰竭发生时间的预测能力。

五、表观遗传时钟机制

eAge 加速（eAge 高于 chAge）或减速（eAge 低于 chAge）反映在许多疾病（例如唐氏综合征）和环境因素（例如吸烟）中。目前尚不清楚的 eAge 和已知的生理 / 细胞衰老现象（例如端粒长度、衰老）的因果关系。

eAge 形成的机制非常复杂，目前没有统一的理论解析。如同一个体不同组织细胞有不同的增殖率，但 eAge 一致，表明 eAge 和细胞增殖没有直接关系。虽然 eAge 随细胞传代次数而变化，但 Horvath 方法并不依赖于细胞分裂，因为它可以检测到非增殖组织中的 eAge。

有丝分裂时钟 EpiTOC 可检测细胞分裂，并且该时钟检测发现癌症细胞 eAge 加速。LTL 缩短是最早的衰老生物标志。但多项研究表明 eAge 与端粒长度无关。一个合理的解析是 eAge 受细胞分化控制。干细胞会随着胚胎的成熟而分化成不同细胞类型，eAge 会发生变化。也有研究发现，与未分化、增殖的角质形成细胞相比，分化的角质形成细胞中未观察到 eAge 增加。

有人推测与 eAge 相关的变化反映在称为“时钟细胞”的细胞亚群中。“时钟细胞”可能是成熟的体细胞，也可能是干细胞，这些细胞在衰老过程中会减少。需要注意的是，eAge 可以在神经细胞中被检测，而这些细胞是终末分化的细胞，缺乏干细胞。

随着与年龄密切相关的 CpG 的发现，如 *ELOVL2*、*FHL2* 和 *PENK1* 的 CpG 岛中的 CpG，DNAm 成为一种潜在的衰老生物标志物。与 *ELOVL2* 相邻的 CpG 会随着年龄的增长而高度甲基化，并已被用于多个法医时钟。*ELOVL2* 是一种参与长链多不饱和脂肪酸延伸及二十二碳六烯酸（DHA）生产的酶。Chen 等人发现 *Elov12* 启动子在老年小鼠视网膜中的甲基化程度更高，并且该位点的去甲基化可增加 *Elov12* 的表达，恢复与年龄相关的视觉功能。这是为数不多的年龄相关 CpG 与表型衰老之间因果关系的研究之一。

六、结论与展望

eAge 预测是一种强有力的方法，它彻底改变了实验老年学。随着表观遗传时钟的数量和多样性增加，人们对生物年龄的理解也更加深入。

多项研究表明，仅使用少数与年龄高度相关的 CpG 就可构建精确的最小化时钟。另一方面，当使用大量 CpG 时，时钟可能会更加稳定。对生物衰老预测能力的提高将大大促进抗衰老药物和非药物抗衰老疗法的研究，而不是仅仅停留在昆虫或小鼠等小型动物的层面。

虽然 DNAm 是衰老和疾病最准确和最通用的生物标志物之一，但对它还在不断深入了解中。也许将 DNAm 与其他基于非 DNAm 的生物标志物结合起来，将拓宽人类对生物衰老和死亡率的理解和预测能力，PhenoAge 和 GrimAge 这样的复合时钟的研发是这个方向迈出的第一步。

（ID：yxckbsc2022040401）

上接第 3 版

下层之间的主要组成部分，能够与 ISC 在内的上皮细胞直接接触。基质细胞群可分泌 Wnt、PGE2、EGF 及其他必需生长因子，维持 ISC 增殖所需的微环境。肠隐窝周围的成纤维细胞群是 Wnt 及 BMP 配体的重要来源。在 CD 及 UC 发病过程中，SMA⁺、Tenascin-C⁺、Gli1⁺ 及 CD142⁺ 的细胞基质细胞数量显著增加。肠道成纤维细胞表达细菌成分受体，如 TLR 1-9 及 NOD-1/2，用活细菌及其抗原刺激成纤维细胞会产生趋化因子（CCL-2）、细胞因子（包括 IL-1）及生长因子（GM-CSF）等。这些因子与周围细胞相互作用以调节黏膜免疫反应，并间接影响上皮细胞增殖能力。肠道菌群产生的乳酸可与隐窝周围基质细胞相互作用并触发 Wnt 释放，从而增强 ISC 增殖

能力。沙门菌感染可触发隐窝周围肌成纤维细胞表达 IL-33，IL-33 通过 ST2 依赖的信号传导诱导 ISC 及祖细胞分化为分泌型细胞。

六、结论

IBD 是遗传易感、环境刺激及肠道菌群紊乱共同作用的结果，失调的肠道菌群是 IBD 炎症通路的主要“启动”开关，因此 IBD 的治疗主要集中在炎症免疫途径及肠道菌群的恢复。IBD 相关 ISC 微环境的重塑已被确定为 IBD 病理生理学过程中的关键事件。了解 IBD 期间 ISC 微环境调节及其变化的特定微生物相关机制有助于开发新的治疗策略，也能够为 IBD 期间进行肠道菌群移植、服用益生菌或益生元等提供理论及实践依据。

（ID：yxckbsc2022040301）

指尖上的诺贝尔奖：神经环路修复与重建

上海中医药大学 郑娅 毛也然 许东升

本体感觉是高等动物特有的生物功能，对人类而言，是避免机体陷入险境维护身体健康的基础保障能力之一。2021年获 Nobel 生理学或医学奖的研究，揭示了肢体肌腱和骨骼细胞上的压力感受器及信号通路的关键分子——机械敏感性离子通道受体 Piezo2 的重要意义。对 Piezo 受体功能的揭示，成为人类研究压力感知过程的里程碑。神经环路调控所关注的自下而上的感知刺激和训练的基本理念与 Nobel 奖揭示的感知激活机制，在多个维度不谋而合。值得关注的是，神经损伤后神经环路修复与调控康复过程中，干细胞和功能成体细胞的激活与功能化是神经调控的目标和结果。因此，神经调控技术，特别是神经磁调控技术，可能成为未来干细胞功能研究的热点。

一、本体感觉的发散与可塑特质

本体感觉的三级神经功能涵盖：一级肌肉、肌腱、韧带及关节的位置觉、运动觉、负重觉（包括条件反射）；二级前庭的平衡觉和小脑的运动协调感觉（涉及小脑）；三级大脑皮质的综合运动感觉。在其管理模式中，一切运动技能都在本体感觉的基础上形成。没有本体感觉输入，就没有运动功能再获得。据文献报道，脑卒中患者本体感觉障碍发生率为 47.7%，其中 69% 经康复训练可于 8~16 周后基本恢复正常。本体感觉及平衡功能受损对脑卒中后的综合运动功能恢复有很

大阻碍，是影响患者预后的重要因素之一。

幸运的是，本体感觉可通过康复训练重新提高水平，即使指尖上的运动也可能调控大脑皮质的多种功能，显示其可塑性的特质。这在日常的体育训练中已取得相关经验，如训练篮球运动员运球快速进攻时，训练水平高的运动员其控球能力强，失球次数少，且速度极快，表现出本体感受器较高的灵敏性。那么，对严重脑损伤的患者而言，常规康复治疗是否足以提升减退的本体感觉？远端肌肉、肌腱、韧带及关节组织上 Piezo2 受体和下游信号通路的激活是否足以改变缺失的神经功能？经验证明依然存在瓶颈。

二、神经环路调控：从外周到大脑

现代神经调控体系已逐步探索自上而下和自下而上的多模态运动感觉刺激对神经环路重建的价值。就临床策略而言，以脑卒中 / 脊髓损伤为例，常规运动康复训练（多为自下而上）与认知 / 动机训练及神经调控技术（多为自上而下，如经颅磁刺激）的有机融合，体现了康复干预的协同增强与完整性（包括多模态的本体感觉输入）；就神经环路调控而言，视觉相关运动平衡环路激活、认知相关运动学习环路激活、小脑协调运动环路激活，均可能起到协同增强运动康复的效果。其中，感觉（本体感觉和触觉等）运动神经环路的研究与应用最受关注。

不完全脊髓损伤的康复是世界难题，医学界正在探索干细胞移植、神经调控、脑机接口等技术，并进行深入研究和临床试验。近年来，笔者所在课题组通过对不完全性脊髓损伤感觉运动神经环路（neural circuit magnetic stimulation, NC-MS）的重建治疗肢体运动障碍，此临床试验已取得长期稳定治疗效果，并近期在 *Neural Regeneration Research* 连续发表数篇报道，通过动物电生理研究和临床试验研究，初步阐明了基于感觉运动神经环路的双靶区刺激技术，促进不完全脊髓损伤的运动功能康复。目前，国际上对脊髓损伤尚无公认的 A 级或 B 级推荐指南，这些研究将有力支撑了神经调控在不完全脊髓损伤中康复治疗的价值，具有较大应用前景。

三、神经环路调控：干细胞的引擎？

近年来，笔者所在团队在干细胞再生修复、神经可塑性、神经环路调控等方向取得初步进展。包括骨髓来源的间充质干细胞（MSC）外泌体促进脑微血管内皮细胞增殖和迁移；内皮细胞分泌的外泌体促进神经干细胞存活，并改善缺血再灌注后大鼠的运动功能；双靶点磁刺激促进脑卒中损伤修复与功能重建，与突触和大脑的可塑性相关；MSC 外泌体对再灌注模型大鼠运动皮质内神经递质水平的影响。笔者所在课题组正在进一步研究神经调控技术是否可能激活神经系统的干

细胞和功能成体细胞，启动神经保护和修复过程，进而促进神经环路的重建。目前，在脊髓损伤研究中，课题组已初步发现令人振奋的结果，如对髓鞘蛋白、旁分泌抑炎因子、旁分泌生长因子和外泌体的激活作用，论文正在投稿中，期待获得干细胞研究工作者的共同关注。

从临床维度上，无论是运动或是感觉，在康复过程中，感觉运动神经环路的结构和功能重建，是运动功能康复的初级目标。从细胞维度上，内源或移植干细胞基础上的神经修复则是神经环路功能和结构重建的阶段目标。因此，干细胞功能研究的任务不仅在神经修复本身，还涉及神经环路乃至神经网络任务导向的功能重建。

回到最初主题，分布在肢体肌肉、肌腱关节的 Piezo2 受体的研究已被关注多年，对 Piezo2 研究在康复医学的潜在价值是作为一种机械压力敏感性通道，可能被诸多康复手段激活，从而作为研究康复过程本体感觉的初级生物标志物；可以期待，神经调控技术的发展可能成为在体或移植干细胞神经修复（微环境调节或细胞替代）的助推器或引擎，促进真正意义上的神经修复与功能康复；随着神经调控技术与脑机接口技术融合，植入性神经芯片或非植入性靶区刺激，在干细胞富含的脑区，可能对干细胞分化、定向迁移、突触重塑、脑网络形成，发挥着更精准作用。

（ID：yxckbsc2022040501）

专家简介



许东升 教授

教授，博士研究生，主要从事再生康复医学、神经修复与调控、智能运动康复的基础研究与临床转化。现任上海中医药大学康复医学院副院长，上海中医药研究院康复医学研究所副所长，上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院康复中心副主任。 *Brain Network and Modulation* 杂志主编，美国 Nebraska 大学医学中心兼职教授。兼任上海市医师协会康复医师分会副会长，上海康复医学会重症康复专业委员会副主任委员，上海康复医学会脑检测与调控康复专业委员会副主任委员，上海市医学会物理医学与康复学专业分会神经学组组长，中国研究型医院学会神经再生与修复专业委员会神经环路调控与康复研究学组组长。主持国家自然科学基金重大研究计划 1 项，面上项目 5 项；参与科技部重大、973 和重点研发计划 3 项，2020 年科技部重点研发计划（主动健康）肢体运动康复系统研发课题组组长。获 2019 年华夏医学科技一等奖，2019 年中国康复医学学会优秀康复医师奖。

上接第 1 版

自体 MSC 的优势在于降低了感染风险、避免了潜在的组织排异，但治疗有效所需剂量远高于从骨髓或脂肪组织中提取的情况。与健康对照相比，NMOSD 供体的 BM-MSC 以较低速率增殖，并且细胞死亡率也更高。既往研究尚未阐明 MSC 的最佳给药途径和前处理方法，MSC 治疗 NMOSD 的潜力需要更多研究来探索。

笔者团队开展的“脐带源间充质干细胞治疗视神经脊髓炎谱系疾病的前瞻性多中心随机对照研究”，经过 3 年多的时间，已入组完毕，包括低中高 3 个剂量组共 30 余人。已完成的低剂量组、中剂量组的患者多数反应症状较前改善，复发率较治疗前显著降低。输注后的主要不良反应包括心动过缓、低血压、肺部小斑点灶、尿路感染等，均为轻度可能相关的不良反应。第 1 例安全性研究患者已随访 3 年，目前尚无明显不良反应报告。目前随访的研究结果振奋人心，为 hUC-MSC 治疗 NMOSD 的漫漫征途提供了坚实的基础。

（四）hUC-MSC 治疗 NMOSD 治疗方案制定

鉴于 MSC 巨大的应用价值，建立符合药物审评规定、有效治疗 NMOSD 的临床级 hUC-MSC 标准化生产工艺和质量管理体系至关重要。虽然 MSC 能够表达

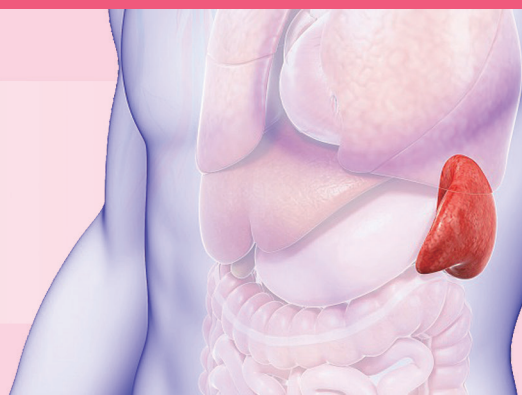
先天和适应性免疫反应的有效抑制因子，但这些可能不足以抵抗同种异体来源的排异反应。供体 MSC 和受体之间的免疫兼容性可能在某些情况下至关重要，例如对于需要促进骨髓移植定植的情况，或是需要长期重复给药的患者。在 NMOSD 的治疗中，此类重复给药的患者更需要长期随访观察以了解 MSC 的临床安全性及有效性。因此，在临床研究中，开发针对 NMOSD 治疗的临床级 hUC-MSC 培养体系，以明确临床级 hUC-MSC 治疗 NMOSD 的有效性与安全性至关重要，同时应建立干细胞输注后不良反应检测标准及补救治疗管理评价标准。制定 hUC-MSC NMOSD 治疗临床应用标准化方案是今后 MSC 治疗 NMOSD 的关键所在。

三、展望

干细胞研究与应用正不断取得新突破，已有团队对 MSC 治疗 NMOSD 患者的安全性和有效性进行研究，但仍欠缺长期的大样本观察。目前对 MSC 治疗 NMOSD 的作用机制已有初步揭示，但 MSC 治疗 NMOSD 如何发挥作用、如何转归，长期是否存在致癌风险仍不明确。此外，MSC 的标准化、商业化制备工艺仍在不断探索中。未来，MSC 治疗 NMOSD 应在扩大样本量的多中心临床研究基础上，进一步规范、合理化临床治疗流程，使干细胞治疗做到更有效，更安全。

（ID：yxckbsc2022040101）

在体内将脾脏重编程 成为一个功能正常的“肝脏”



【据《Gut》2022年1月报道】题：在体内将脾脏重编程成为一个功能正常的“肝脏”（中国南京大学 作者董磊等）

肝脏再生仍是世界范围内一个关键的临床挑战。一个被忽视但重要的挑战是在哪里再生肝脏。尽管传统上认为一个受损的器官应该在原位再生，但长期以来，肝脏再生一直面临着严峻挑战。首先，肝脏是一个很大的器官，即使要发挥其基本功能，也需移植大量活的、有功能的肝细胞，这极为困难。更难的是，衰竭的肝脏通常已失去支持移植肝细胞的固有结构和能力，这就促使人们想要在体内另找地方来容纳肝细胞。据以往及目前研究，脾脏

是恢复肝功能的理想部位。第一，操纵纵脾脏的细胞功能对身体影响小。第二，脾脏空间大结构疏松，可容纳大量细胞。第三，广泛血液供应，直接与主循环相连，可支持再生肝脏的生长和功能。另外，在脾脏中生长肝组织也可以解决胆汁问题，因为脾静脉是门静脉系统的一部分，直接进入肝脏，脾脏产生的胆汁可通过留在原肝中的功能性胆道在肝脏中收集。

在这项研究中，研究团队首先将脾脏从腹腔移位至皮下，再对脾脏注射SiO₂纳米颗粒，促进脾脏内成纤维细胞的增殖。接着，使用慢病毒为载体，让脾脏细胞过表达肝脏特异性转录因

子（Foxa3、Gata4 及 Hnf1a），使脾脏中SiO₂重塑的脾成纤维细胞原位分化为 2×10^6 个有功能的肝细胞。

最后，通过用慢病毒作载体转导肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）进入脾脏并过表达表皮生长因子（EGF）及肝细胞生长因子（HGF）进一步促进脾内转分化肝细胞的增殖。转化后的脾脏内肝细胞（iHeps）数量达到了 8×10^6 个，且能够稳定存在长达6个月时间，具有典型肝脏生理功能。更为重要的是，在90%肝切除诱导的急性肝衰竭实验中，成功构建转化脾的小鼠存活率为50%，而未改造的小鼠全部死亡，说明转化脾能够代偿肝脏

发挥功能。

在这项研究中，研究团队通过原位重编程将脾成纤维细胞转化为肝细胞样细胞，证实了小鼠脾脏肝功能的体内恢复。与现有的全器官移植、组织工程及细胞移植等方法不同，该项研究的策略提供了一种直接和有效的方法来恢复小鼠肝功能至生理水平，可挽救受损肝脏。且这种方法不移植任何可能引起免疫排斥或意外安全问题的外源性细胞或器官，为终末期肝脏疾病治疗提供了全新的解决策略。

（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：yxckbsc2022040601）

通过人类肿瘤类器官模型研究肿瘤的可塑性

【据《Trends in Cancer》2022年3月报道】题：通过人类肿瘤类器官模型研究肿瘤的可塑性（美国哥伦比亚大学欧文医学中心 作者 John R. Christin 等）

细胞状态的改变往往会影响细胞的表型，进而表现出肿瘤细胞的可塑性。导致细胞表型改变的因素有很多，包括基因组、表观遗传组、转录组和蛋白质组的改变。这些细胞状态的改变可能是出于细胞内部的因素，如发生新的突变或者表观遗传修饰发生改变，也可能是外在因素，如肿瘤微环境的改变或者肿瘤治疗方案的调整。

普遍认为肿瘤的可塑性是肿瘤异质性以及肿瘤进展的主要驱动因素。表型可塑性已在多个实体肿瘤模型中得到证实，如致癌损伤的积累会导致正常组织谱系限制丧失。此外，肿瘤的可塑性也是导致肿瘤耐药的重要因素，如前列腺癌经过一段时间的雄激素抑制剂治疗可转为雄激素非依赖性的神经内分泌前列腺癌；非小细胞肺癌在长期使用表皮生长因子受体（EGFR）抑制剂后，可转变为小细胞肺癌，从而产生耐药性。

尽管体内诱导可观察到肿瘤的可塑性，但想在体外揭示肿瘤可塑性的分子机制依然困难重重。因此，基因可控的细胞培养系统是研究肿瘤可塑性分子机制的理想方案。传统的细胞系通常无法在体内观察到肿瘤异质性和表型的可塑性。类器官是在体外3D培养条件下生长的自组装细胞团簇，既有细胞系的特征，也表现出一定的组织结构，是理想的肿瘤研究模型，通过靶向改造可用于

评估药物反应。最近一些研究表明，人类肿瘤来源类器官模型可用于筛选和验证肿瘤细胞可塑性调控因子。

一、诱导多能干细胞（iPSC）衍生的类器官构建胰腺癌可塑化模型

通过刺激iPSC分化可绕过收集人体组织标本，是获得人类器官的重要方法。此外，iPSC来源的类器官可在培养过程中发生致癌转化，可作为人类肿瘤模型。利用这个方法，近期有2个课题组研究了癌基因激活和抑癌基因丢失在iPSC来源的胰腺癌类器官中发挥的作用。

有研究表明，iPSC可分化为管腔状和腺泡状类器官，其中*KRAS*^{G12D}激活可以显著促进细胞增殖，在导管样类器官中，*KRAS*^{G12D}激活可促进前体样状态。在腺泡状类器官中，*KRAS*^{G12D}可下调腺泡标志基因，上调导管相关的调节因子，导致其向导管状类器官转化。此外，通过TGF- β 刺激类器官，或者将*CDKN2A*敲除可观察到部分上皮-间充质转化（ETM）。因此，iPSC定向分化后发生致癌转化为肿瘤可塑性研究提供了可靠的技术支撑。

二、通过结肠癌肿瘤类器官研究肿瘤干细胞

从患者肿瘤组织中分离培养的肿瘤类器官可以再现复杂的疾病状态并保留人类肿瘤的基因组特征，可用于后续的研究。初步研究表明，患者来源的类器官通常能保留肿瘤异质性，与传统的细

胞系模型相比，可更好地预测患者对于药物的敏感性。患者来源的类器官已被用于结肠癌肿瘤干细胞的谱系追踪。通过CRISPR-介导的基因编辑技术，可在结肠癌类器官中实现干细胞标志物LGR5和分化标记物KRT20的可视化表达及谱系追踪。通过将基因编辑过的类器官移植到小鼠中，可以观察到，表达*LGR5-CreER*等位基因的细胞可启动肿瘤生长并产生分化的KRT20⁺后代。为了研究LGR5对于肿瘤生长的必要性，研究人员设计了*LGR5-iCaspase9*等位基因，该等位基因在二聚体化合物的作用下诱导LGR5⁺细胞凋亡，他们发现，诱导LGR5⁺细胞凋亡可阻止移植瘤的生长，但是移除二聚体后，KRT20-CreER标记的细胞可以表现出可塑性，转化为LGR5⁺肿瘤干细胞，从而使肿瘤恢复生长，表明肿瘤可塑性会促进肿瘤复发。研究还发现，将LGR5⁺细胞消融联合常规化疗可在异种移植中获得了更持久的治疗效果。这些发现证明了类器官模型在研究癌症干细胞的特性和可塑性对治疗响应方面的作用。

三、微环境在调节肿瘤亚型可塑性中的作用

细胞内因素往往驱动肿瘤细胞的可塑性，而来自肿瘤微环境的外部信号也可以调节肿瘤的可塑性。一项患者来源膀胱癌类器官的大样本研究发现，具有管腔表型的原代肿瘤组织建立的类器官在经过初步培养后，会迅速表现出基质和鳞状特征。然而在进

行原位异种移植后，基质表型的类器官又重新表现出管腔样特点。对这些类器官和异种移植体进行靶向测序发现，在类器官培养和异种移植的过程中并未出现克隆选择。这些结果提示，膀胱肿瘤与其周围微环境的相互作用可以决定肿瘤表型，微环境的外部信号可以抑制肿瘤的可塑性。

有研究进一步探讨了膀胱肿瘤微环境的作用，发现具有表型可塑性的膀胱肿瘤类器官在与肿瘤相关的成纤维细胞（CAFs）共培养时可保持管腔表型。过表达管腔主调控因子FOXA1可诱导基质表型的类器官向管腔表型转化，相反，在管腔表型的类器官中敲除FOXA1可诱导其转化为基质表型。此外，CAFs中骨形态发生蛋白（BMPs）的表达可诱导FOXA1的表达并诱导管腔表型，相反，CAFs中BMP的缺失可诱导基质表型。这些研究表明，膀胱癌的管腔-基质可塑性是由BMP-FOXA1信号轴调节的。

类器官与CRISPR介导的基因编辑技术联用为肿瘤可塑性研究提供了有力支持。获益于患者来源肿瘤类器官模型与原始肿瘤组织的高度相似性，未来将有更多的工具可以运用于肿瘤类器官，以此研究肿瘤的可塑性。此外，将免疫和基质成分纳入到类器官共培养体系中，可用于探究肿瘤可塑性的外部基质。总之，类器官模型为研究肿瘤可塑性的复杂问题提供了一个可靠的平台。

（浙江省台州医院 陈圆圆 编译）

（ID：yxckbsc2022040602）

心肌球细胞显著延缓杜氏肌营养不良症患者的疾病进展

【据《Lancet》2022年3月报道】题：多次静脉输注心肌球细胞治疗晚期杜氏肌营养不良症（HOPE-2）的多中心、随机、双盲、安慰剂对照2期临床试验（美国加州大学 作者 Craig M McDonald 等）

杜氏肌营养不良症是一种严重的、进行性的X连锁遗传性疾病。患者表现为进行性四肢无力及心肌病，通常在20~40岁死亡。杜氏肌营养不良症的肌肉损伤会引发炎症及免疫反应失调，从而抑制肌肉修复能力。心肌球衍生细胞（Cardiosphere-derived cell, CDC）是一种祖细胞，临床前及临床I期研究表明，CDC通过分泌外泌体，在杜氏肌营养不良症中发挥免疫调节、抗纤维化及再生作用。

CAP-1002 是 Capricor Therapeutics 公司开发的人类异基因 CDC 细胞产品，用于治疗杜氏肌营养不良症。在

1期 HOPE 临床研究中，一次性输注 CAP-1002 至冠状动脉后能改善上肢及心功能。

最近 Craig M McDonald 等在《柳叶刀》报告了2期 HOPE 试验的长期安全性及有效性数据。HOPE-2 是一项随机、多中心、双盲、安慰剂对照的2期临床试验，旨在评估静脉注射 CAP-1002 治疗杜氏肌营养不良症的安全性及有效性。研究于2018年3月至2020年3月在美国7个州进行。对象为晚期非卧床男性患者（10米步行时间 > 10秒）及卧床男性患者，年龄10岁或以上，PUL 得分为2~5，且之前接受糖皮质激素治疗至少12个月。患者以1:1的比例随机分配给 CAP-1002 或安慰剂。每次注射 1.5×10^8 个 CDC，20 ml 总体积。细胞每3个月静脉注射1次，共4次。所有患者随访12个月。



主要终点指标为上臂肌肉力量评分，12个月后 CAP-1002 优于安慰剂，输注 CAP-1002 可减缓71%的功能丧失。心脏 MRI 评估显示 CAP-1002 治

疗后心脏功能及结构有所改善。左心室射血分数是衡量心脏泵功能的一个整体指标，安慰剂组随着时间的推移显著降低，但 CAP-1002 组略有改善。在研究过程中，CAP-1002 组患者的 CK-MB 占总 CK 的比例显著降低，表明心肌损伤减轻。

已知在 CDC 外泌体中具有生物活性的成分包括 microRNA（特别是 miR-146a 及 miR-181b）。这些非编码 RNA 物种改变巨噬细胞和其他靶细胞中的基因表达，减轻肌营养不良症（及各种其他炎症性疾病）的全身炎症反应并刺激组织再生。

研究的主要局限性是样本量小，研究持续时间为12个月，需要更长时间的试验来证明疾病稳定的益处。

（福建医科大学附属协和医院
廖联明 编译）

（ID：yxckbsc2022040701）

肝癌祖细胞的恶性进展需要 KAT7- 乙酰化及细胞质易位的 G 蛋白 G α S

【据《Hepatology》2022年3月报道】题：肝癌祖细胞的恶性进展需要 kat7- 乙酰化和细胞质易位的 G 蛋白 G α S（海军军医大学 作者 Ye Zhou 等）

在恶性肿瘤中，肝癌是全球发病率及每年死亡率最高的癌症之一。肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）在原发性肝癌中占80%，且主要发生在男性。肝脏炎症主要由病毒感染、酒精滥用或脂质累积引起，在肝癌发生中起着关键作用。持续的肝细胞损伤、死亡，肝脏先天免疫细胞激活及肝损伤后肝细胞的代偿性增殖导致肝恶性转化，通过含有 HCC 祖细胞（HePC）的癌前病变，发展为完全建立的 HCC。然而，肝脏恶性转化过程的潜在机制在很大程度上尚不清楚，阐明 HePC 中的失调分子及其在从癌前 HePC 到已建立 HCC 的恶性进展中的作用具有重要的科学意义。

G α S 是 G 刺激蛋白的 α 亚单位，可结合 GTP 催化腺苷酸环化酶（AC）激活 G 蛋白偶联受体（GPCR），然后通过产生的环磷酸腺苷（cAMP）参与各种细胞生理及病理过程。由于 GTPase 结构域失活及 AC 过度激活，G α S 过度激活突变在依赖于 cAMP 下游信号的各种癌症中非常普遍。然而，对于 HCC，这些突变在 HCC 患者中不到1%。考虑到肝癌中 G α S 过度激活突变的发生率较低，作者想知道 G α S 是否通过非规范方式参与了肝癌的发生及发展。目前，G α S 在炎症诱导的肝癌发生中的作用尚不清楚，尤其是在从癌前 HePC 到完全建立的 HCC 阶段。

为了识别 HePC 中的失调分子，作者应用定量质谱法检测了 DEN 给药后5个月小鼠肝脏中非聚集性肝细胞及聚集物之间不同水平的蛋白质，发现聚集物中8个蛋白质表达上调，且 G α S 蛋白水平的增多最为显著。因此，作者构建了 G α S 肝细胞特异性敲除小鼠，方便本研究重点研究 G α S 在炎症诱导的肝癌发生中的作用及潜在机制。研究发现异源三聚体 G 蛋白亚基 G α S 蛋白水平在 HePC 中显著升高，促进其对致癌及促炎细胞因子 IL-6 反应，诱导癌前 HePC 发展为完全形成的 HCC。在机制上，G α S 位于肝细胞内的膜上，在 HePC 中通过 IL-6 下的乙酰转移酶 KAT7 在 K28 乙酰化，导致 APT1 介导的 G α S 去棕榈酰化及其细胞质易位，这由 G α S K28A 模拟去乙酰化或 K28Q 模拟乙酰化突变小鼠及肝乙酰转移酶 KAT7 敲除小鼠确定。然后，细胞质乙酰化 G α S 与 STAT3 相关，以阻止其与 SOCS3 相互作用，从而前馈促进 HePC 中的 STAT3 磷酸化及对 IL-6 的反应。临床上，在人类肝脏癌前发育不良结节中，G α S 尤其是 K28 乙酰化的 G α S 被确定为增加，并与 STAT3 磷酸化增强呈正相关，这与小鼠模型中获得的数据一致。

综上所述，HePC 的恶性进展需要增加 K28 乙酰化及细胞质易位的 G α S，导致对 IL-6 反应增强，并促使癌前 HePC 发展为完全建立的 HCC，这为预防肝癌发生提供了机制见解及潜在靶点。

（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：yxckbsc2022040702）



人类多能干细胞衍生的胰岛可改善 非人灵长类动物的糖尿病



【据《Nature Medicine》2022年2月报道】题：人类多能干细胞衍生的胰岛可改善非人灵长类动物的糖尿病（中国北京大学 作者 Yuanyuan Du 等）

目前全球有约4.6亿糖尿病患者，我国糖尿病患者更是达到了1.409亿。糖尿病是因体内胰岛素分泌和作用不足，血糖值持续处于高状态的代谢性疾病。其中1型糖尿病（T1DM），主要是由胰岛β细胞遭到机体免疫系统攻击丢失功能细胞而引起。目前，人类胰岛移植已被证明可通过恢复患者的内源性胰岛素分泌来逆转T1DM。然而，能从胰岛移植中受益的患者数量因缺乏易获得的人类胰岛来源而被限制。因此，胰岛移植虽然可以改善患者胰岛素不足的问题，但供源不足，难以在临床上广泛应用。人多能干细胞具有自我更新和定向分化为功能性细胞（包括β细胞）的潜能，人多能干细胞制备的胰岛细胞有望突破此瓶颈。但用于人类移植及治疗的多能干

细胞临床转化仍然存在许多不确定性，这些不确定性很难使用啮齿动物模型进行研究。非人灵长类动物在遗传学、解剖学及生理学方面与人类具有高度相似性，该模型能对潜在疗法进行严格评估，是人类临床试验前解决转化问题的关键模型。

研究者进一步优化并改进了人多能干细胞向胰岛细胞的分化制备方案，重点解决了如何高效率诱导从胰腺前体细胞向胰岛内分泌细胞命运特化的难题，而获得了功能成熟的人化学诱导多能干细胞衍生的胰岛（hCiPSC-islets）。将hCiPSC-islets单剂量门静脉输注至糖尿病非人灵长类动物中可有效恢复内源性胰岛素分泌并改善血糖。

首先，作者通过三维培养诱导前肠后部细胞形成胰岛样细胞团，加入组合小分子化合物后，促进了胰腺内分泌祖细胞的终末分化，并且在不同供体来源的多能干细胞株上实现了稳定、高效

的胰岛细胞诱导分化。此外，从基因表达水平、蛋白表达水平、葡萄糖刺激的C肽分泌、胰岛素分泌、微观颗粒结构、胰岛中内分泌细胞种类鉴定等方面表征了hCiPSC-islets的结构及功能与人原代胰岛相似。

其次，将hCiPSC-islets移植入免疫缺陷糖尿病小鼠肾包膜下，可有效逆转糖尿病。移植小鼠的空腹血糖水平能恢复至生理水平，经腹腔注射葡萄糖耐受实验（IPGTT）证明了移植物体内功能性，且在长达48周的观察周期中，所有移植小鼠中均未观察到移植细胞致瘤现象。同时，移植10周的肾移植物具有和原代人胰岛中内分泌细胞相似的全基因表达谱。

最后，在该基础上，研究团队改进了高效冷冻保存方案，使hCiPSC-islets成为持续可用的细胞来源，并进一步将hCiPSC-islets单剂量门静脉输注至糖尿病非人灵长类动物模型中，观察其长期的安全性及有效性。研究

团队发现所有受体的空腹及平均餐前血糖水平显著下降，C肽分泌能够响应餐食或葡萄糖刺激。值得注意的是，四只长期随访的受体糖尿病模型猴在移植后15周，平均糖化血红蛋白（HbA1c）与移植前相比下降了2%以上，平均外源性胰岛素需求量减少了49%。研究人员还观察到1只表现不稳定糖尿病特征的受体猴在输注hCiPSC-islets后，血糖得到明显改善。这一结果提示人多能干细胞分化的胰岛细胞移植有望用于脆性糖尿病患者的治疗。

综上，这项研究成功地在非人灵长类动物糖尿病模型上证明了hCiPSC-islets在治疗糖尿病中的安全性和有效性。充分展示了hCiPSC-islets作为一种可持续细胞来源具有巨大的临床应用潜力。

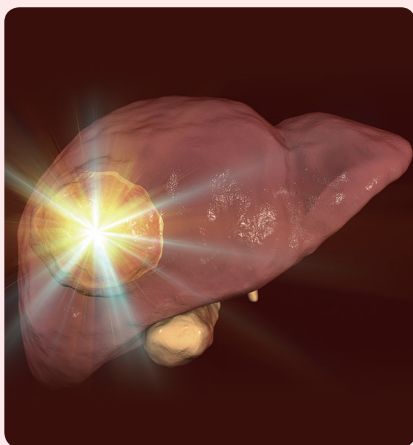
（同济大学附属东方医院再生医学研究所
李玉婷 何志颖 编译）
（ID：yxckbsc2022040801）

谱系示踪和单细胞分析揭示肝癌进展中 Prom1+ 肿瘤增殖细胞 及其动态细胞转变

【据《Gut》2021年9月报道】题：谱系示踪和单细胞分析揭示肝癌进展中 Prom1+ 肿瘤增殖细胞及其动态细胞转变（中国香港大学 作者 Stephanie Ma 等）

肿瘤干细胞（cancer stem cells, CSCs）具有强大自我更新及形成不同亚型的分化潜能，其产生的异质性肿瘤细胞对常规治疗方法产生抗性。因此，CSCs对肿瘤的存活、增殖、转移及复发有着重要作用，清除CSCs及其信号通路和生态位被认为是稳定缓解甚至治愈恶性肿瘤的关键。大量证据表明，CSCs可促进最常见的肝癌形式——肝细胞癌（hepatocellular carcinoma, HCC）的发生发展。HCC的高度肿瘤内异质性导致治疗耐药性及肿瘤复发，CD133/PROM1（Prominin-1）是研究最广泛的肝CSCs功能及表型标志之一。然而，Prom1+细胞在肝癌发生发展中的作用尚未得到充分研究，其复杂的细胞异质性及单细胞水平分子机制尚不清楚。因此，对HCC中CSCs的异质性及潜在命运的深入探究将为肝癌治疗方法提供新的方向。作者研究的目的是通过谱系示踪、谱系清除和scRNA-seq策略来研究Prom1+细胞在肝癌中的作用、异质性和特性。

研究中，作者建立了2个HCC相关的小鼠模型：二乙基亚硝胺加四氯化碳（DEN+CCL4）诱导的慢性纤维化HCC小鼠模型和N-RasV12加Myr-AKT（N-Ras+AKT）诱导的脂肪代谢失衡相关HCC小鼠模型，结合体内谱系示踪、谱系清除实验及scRNA-seq分析，追踪Prom1+细胞的转录组学图谱和HCC中Prom1+细胞的异质性和特性。首先，作者发现在自己的小鼠模型和公共数据库TCGA人类HCC样本中，Prom1的表达随着HCC进展逐渐上调。而后，利用CreER-LoxP技术标记Prom1来源的肿瘤细胞为tdTomato+细胞，将Prom1+细



胞分别与Krt19和Afp共染色，结果显示，Prom1+细胞染色主要与Afp染色重叠而非Krt19，表明这些细胞主要是HCC细胞而不是胆管细胞。在30天追踪期内，tdTomato+细胞显示Hnf4a表达逐渐丧失，但原位祖细胞或胆管细胞标记物并没有增加，这表明Prom1+细胞在肿瘤生长期间具有细胞动态性。研究Prom1+HCC细胞的增殖性质及细胞特性发现其具有较高的增殖性和CSC样特性，在原发性肿瘤中显示克隆性扩增，在3D培养和同种异体移植时显示出越来越强的致瘤性。值得注意的是，在同种异体移植时作者还发现tdTomato+HCC细胞在移植过程中有转为不同谱系癌症如胆管样肿瘤及上皮间质转化样肿瘤的可能性，这体现Prom1+细胞的CSC样特性。

为进一步评估Prom1+细胞在HCC进展中的重要性，作者使用条件性CreER诱导的白喉毒素（DTA）选择性杀死Prom1+细胞，结果发现在两种HCC模型中，肿瘤的大小、体积及结节数量都显著低于对照组，此外Ki67染色表明，Prom1DTA小鼠肿瘤中的肝细胞增殖也显著减少，均表明Prom1+HCC细胞的消除会阻碍肿瘤生长并降

低恶性肿瘤特征。

为阐明Prom1来源HCC细胞的谱系特征和分子特征，作者进行了scRNA-seq。取DEN+CCL4组6个肿瘤样本，标记后第3天、第10天及第30天的tdTomato+和tdTomato-细胞分别进行10X Genomics测序。scRNA-seq结果提示，高度异质性的Prom1+HCC细胞在肿瘤进展过程中经历去分化从而形成具有高增殖能力及干细胞特征的CSC样细胞，这可能有助于Prom1+HCC后代增殖和肿瘤发生。作者后续又鉴定了Prom1+HCC细胞中上调的保守标记物，发现836个表征Prom1谱系特征的基因，这些基因被发现与人类肝癌预后不良相关，且通路富集分析显示其富集至细胞呼吸、嘌呤核苷酸代谢、凋亡信号、氧化解毒等通路中，之后的实验验证证实氧化应激抵抗可能是去分化及谱系繁殖的保护机制。总之，对Prom1+细胞在HCC进展过程中的系统研究为HCC细胞异质性提供了新见解，并为该领域的临床治疗及机制研究开辟了新方向。

（同济大学附属东方医院再生医学研究所 吴国秀 何志颖 编译）
（ID：yxckbsc2022040802）