

讲 座

细胞移植治疗的临床应用及发展 ——细胞移植治疗连载之三

王佃亮 *

(第二炮兵总医院药学部 北京 100088)

摘要 细胞移植治疗在临床上的应用在几百年前就有尝试,但规模化的临床应用还是近年来的事。细胞移植治疗的临床应用领域包括血液系统疾病、心血管系统疾病、消化系统疾病、神经系统疾病、免疫系统疾病、呼吸系统疾病、泌尿系统疾病、骨骼系统疾病以及抗衰老、角膜损伤、视网膜损伤、皮肤损伤、烧伤等。加拿大、韩国、美国等国已有干细胞药物被批准临床应用。2013年,中国干细胞移植治疗管理也实现了从“技术”到“制剂(药物)”的转变。细胞移植治疗将具有良好的发展前景。

关键词 细胞移植 细胞治疗 临床应用 干细胞制剂 干细胞药物

中图分类号 Q819

1 细胞移植治疗的临床应用

细胞移植治疗在临床上的应用设想和尝试虽然在几百年前就有,但正规化、规模化的临床应用还是近年来的事,并呈现出稳步发展的势头。目前细胞移植治疗已在一些难治性疾病中得到应用,包括血液系统疾病、心血管系统疾病、消化系统疾病、神经系统疾病、免疫系统疾病、呼吸系统疾病、骨骼系统疾病、抗衰老等^[1-3]。

1.1 血液系统疾病

血液系统疾病或血液病是指原发于造血系统的疾病,或影响造血系统并伴发血液异常改变,以贫血、出血、发热为特征的疾病。造血系统主要有血液、骨髓单核-巨噬细胞系统和淋巴组织,凡涉及造血系统病理、生理并以其为主要表现的疾病都属于血液病。它包括:红细胞疾病,如再生障碍性贫血、溶血性贫血、缺铁性贫血、真性红细胞增多症等;白细胞疾病,如白血病、传染性单核细胞增多症等;骨髓增生性疾病,如骨髓纤维化等;出血和血栓性疾病,如血小板减少症、血友病等;

其他,如多发性骨髓瘤、恶性组织细胞病等。

某些血液病,包括白血病、淋巴瘤等,可以采用骨髓移植或脐带血移植进行治疗(表1),其中发挥治疗作用的主要还是干细胞。

新鲜骨髓中含有多种干细胞群,它们统称为骨髓干细胞,主要包括造血干细胞、间充质干细胞、内皮前体细胞、肝祖细胞等。骨髓移植没有分选出具体的具有特定功能的干细胞,但在骨髓移植中发挥治疗作用的主要还是造血干细胞,因而也可直接分离提取造血干细胞进行移植。

造血干细胞是CD34⁺细胞,是高度未分化的细胞,具有良好的分化增殖能力,具有自我更新能力并能分化为各种血细胞前体细胞,最终生成各种血细胞成分,包括红细胞、白细胞和血小板。从骨髓中分离造血干细胞的步骤较复杂,需先用集落刺激因子(G-CSF)动员,使骨髓中的造血干细胞释放到外周血中,然后经由血液分离机收集CD34⁺细胞。造血干细胞移植可分为自体和异体两种。异体造血干细胞移植可帮助患者重建造血系统,恢复正常造血功能,能直接杀死肿瘤细胞;自体造血干细胞移植有免疫调理作用,能杀死肿瘤细胞。

脐带血(umbilical cord blood, UCD)移植较骨髓移植在取材等方面具有优越性。通常情况下,人的脐带血被抛弃不用,但它含有多种干细胞,是公认的造血干细胞重要来源之一。相对于骨髓移植和外周血来源的

造血干细胞移植,脐带血移植在细胞收集使用、干细胞增殖能力以及移植物抗宿主反应等方面都具有明显的优势。相关临床研究实验数据显示,因 HLA 配型等原因而无法进行骨髓移植的患者应该尽早进行脐带血移植。

表 1 骨髓移植与脐带血移植的比较

Table 1 Comparison between bone marrow transplantation and umbilical cord transplantation

区别	骨髓移植	脐带血移植
细胞种类不同	造血干细胞、间充质干细胞、内皮前体细胞、肝祖细胞等	造血干(祖)细胞、间充质干细胞等
细胞数量不同	造血干细胞数量为脐带血移植的 10 倍	造血干细胞数量为骨髓移植的 1/10
细胞能力不同	增殖能力弱 归巢能力弱	增殖能力强 归巢能力强
移植效果	高 造血恢复快 移植失败率低	低 造血恢复慢 失败率高
来源	较难	方便
异体移植免疫排斥	强	弱
临床治疗疾病谱	恶性血液病(急性白血病、恶性淋巴瘤等);骨髓衰竭综合征;遗传性疾病(黏多糖病、肾上腺脑白质发育不良、血红蛋白病、免疫缺陷病等)	儿童及成人的良恶性血液系统疾病;中枢神经系统疾病、实体瘤、缺血性下肢血管病、组织再生等

1.2 心血管系统疾病

心血管系统是一个封闭的管道系统,由心脏和血管组成,其中血管包括动脉、静脉和毛细血管。心血管疾病包括高血压、冠心病、动脉粥样硬化、心肌梗死、心肌炎、心律失常、心力衰竭、扩张型心肌病等。心血管疾病有着很高的致死率和致残率,而且发病率呈逐年增加趋势。心脏仅有有限的自我再生能力,心肌受损或梗死后的治疗需要外源性的细胞移植加以修复。目前,利用细胞移植治疗缺血性心血管疾病,多采用干细胞移植或干细胞动员的策略,以实现心肌和血管的再生,改善组织、器官的功能。干细胞移植用于心肌、血管再生是基于人们对干细胞生物学特性的认识,通过将某种来源的干细胞体外诱导分化为功能细胞或直接移植到病变区域,使其增殖分化为心肌细胞或血管内皮细胞,从而修复损伤。通过将不同来源的干细胞,在体外诱导分化为心肌细胞或血管内皮细胞,临床研究中较多采用自体骨髓干细胞,或直接移植到患者的病变区域,从而修复损伤的心肌及血管。干细胞移植使干细胞治疗缺血性心血管疾病的手段有望成为不同于内科传统药物治疗、心血管介入治疗和外科手术治疗的又一全新治疗方法,为心血管疾病的治疗开辟了一条新的途径^[4-5]。

1.3 消化系统疾病

消化系统是由食管、胃肠、肝、胆囊和胰等器官组成,主要功能是对食物进行消化吸收,为机体新陈代谢

提供物质和能量来源。消化系统疾病包括消化器官的器质性和功能性异常,譬如各种肝炎、肝硬化、胰腺炎、胃溃疡、十二指肠溃疡等。细胞移植可用于对某些消化系统疾病治疗,包括肝炎、肝硬化等^[6-7]。近年来随着肝干细胞分离、培养、鉴定及其增殖技术的发展和成熟,多种来源的肝干细胞被用作细胞移植、生物人工肝装置以及基因治疗的主要来源。脂肪来源干细胞治疗消化道瘘管等。肝脏是重要的代谢器官,有“化学工厂”之称。因肝细胞大量坏死而引发的肝功能衰竭,会导致机体代谢严重紊乱和毒性物质大量堆积;二者又反过来进一步加重肝损伤,影响残存肝细胞再生,从而形成肝功能衰竭的恶性循环。临幊上以重型肝炎为代表的肝功能衰竭,尤其是急性肝功能衰竭比较常见。将获得的完整正常肝脏或手术切下的部分肝组织,在体外进行肝细胞分离纯化,并把纯化的肝细胞植体内,恢复或重建肝功能是治疗肝功能衰竭的有效方法之一。

Mito 等率先将肝细胞移植应用于治疗肝衰竭的患者,其方法是:切除三段肝左叶,分离肝细胞,立刻注射 $1 \times 10^7 \sim 6 \times 10^8$ 个肝细胞于患者脾脏。治疗一段时间后发现,患者肝脏功能得到了一定改善。Liu 等将肝细胞和骨髓下细胞用胶囊共同包裹后进行移植,并评价移植后其去除氨的能力及治疗小鼠高胆红素血症的效果,发现与单独肝细胞移植相比,用胶囊共同包裹后进行移植的方法,不仅在体外可增强去除氨的能力,而且

还可降低体内总胆红素水平,移植成功的几率也大大增加。美国、日本等发达国家经过 20 余年的基础研究与临床应用,肝细胞移植技术已相对成熟,国内解放军 302 医院等单位目前也在开展这方面的工作。近年来几种以培养肝细胞为基础的生物人工肝已进行 I ~ III 期临床试验,取得了令人鼓舞的疗效。但体外生物人工肝要真正得到临床推广应用还存在一些限制因素,譬如体外装置在具体应用时会有诸多不便。

1.4 神经系统疾病

神经系统是机体内起主导作用的功能调节系统,由神经元和神经胶质细胞组成。神经系统疾病是指发生于中枢神经系统、周围神经系统、植物神经系统的以感觉、运动、意识、植物神经功能障碍为主要表现的疾病,又称神经病,包括颅脑损伤及后遗症、脊髓损伤、胶质瘤、帕金森病、脑血管疾病、癫痫、脑炎、脑膜炎、听力障碍等临幊上常见。神经病中慢性病占多数,往往迁延不愈,给患者的工作、生活带来很大影响,致残率很高。细胞移植疗法的主要目的不只是用新的细胞替代宿主体内有缺陷的细胞,而是使宿主细胞恢复功能。干细胞可以分化成神经元和胶质细胞,通过启动再生相关基因的表达,使损伤轴突再生。同时产生多种胞外基质,填充脑损伤后遗留的空腔,为再生的轴突提供支持物,补充外伤后缺失的神经元和胶质细胞。使残存脱髓鞘的神经纤维和新生的神经纤维形成新的髓鞘,保持神经纤维功能的完整性。所以通过干细胞移植可以用来治疗脑脊髓损伤以及脑外伤,很大程度地减少后遗症的发生和改善后遗症的状况。干细胞分化的神经元和胶质细胞能够分泌多种神经营养因子,可以改善脑局部微环境,从而改善缺血性疾病。通过细胞移植疗法,在内耳损伤后移入成体神经干细胞,能产生嗅球神经元,可以实现听力功能的改善。临床应用较多的是成人帕金森氏病、脑中风、脑瘫、小儿自闭症、神经退行性疾病、脑血管疾病、脑梗塞、亨廷顿氏病、老年性痴呆及脑外伤等。移植后部分病人出现了神经运动功能的改善,但也有部分病人病情无明显变化。考虑患者多为老年人,脑内环境较差,不利于神经干细胞的存活及分化,移植的长期疗效仍在进一步观察中。

北京海军总医院曾为一名出生 70 天的小儿脑性瘫痪女婴进行了神经干细胞移植手术。出生在河北省的这名女婴住进该院时出生仅 72 天,全脑皮质严重萎缩,呈现空洞脑,诊断为严重的缺血、缺氧性脑病,脑性瘫痪前期。经医院伦理委员会和学术委员会批准,小

儿干细胞移植中心主任栾佐教授等先从正常流产胎儿大脑中取出脑组织,随后进行细胞培养和扩增。在 B 超引导下,于患儿头颅穿刺,用探针将处理过的健康的来源明确的 4.7×10^6 个干细胞种植到其受损的大脑部位。17 天以后,这名女婴会笑了,眼睛灵活了,可以玩拨浪鼓,还能认出妈妈。经观察测评,孩子的智力发育已经追赶上同龄的小儿。智力运动评估从入院时不足 1 月龄基本达到 3 月龄水平。军事医学科学院情报部门检索证实,这种用神经干细胞移植的方法,成功治疗缺血缺氧性脑—小儿脑性瘫痪,目前在世界上尚属首例。

1.5 免疫系统疾病

免疫系统执行机体的免疫应答和免疫功能,是机体防御病原体入侵的最有效武器,它能发现并清除异物、外来病原微生物等。这个系统由免疫器官(骨髓、胸腺、脾脏、淋巴结、扁桃体、小肠集合淋巴结、阑尾、胸腺等)、免疫组织(消化道、呼吸道等的粘膜内存在的无被膜的淋巴组织)、免疫细胞(淋巴细胞、单核吞噬细胞、中性粒细胞、嗜碱粒细胞、嗜酸粒细胞、肥大细胞、血小板等)以及免疫分子(补体、免疫球蛋白、干扰素、白细胞介素、肿瘤坏死因子等)组成。免疫系统分为固有免疫和适应免疫,其中适应免疫又分为体液免疫和细胞免疫。免疫系统疾病是指自身免疫调节功能紊乱,引起失控和过度的自身免疫反应,造成机体的器质性损害和功能障碍。由自身免疫引起的疾病主要有糖尿病、艾滋病、系统性红斑狼疮、风湿性心脏病、类风湿性关节炎、过敏性疾病等。自身免疫系统疾病病因病理复杂,传统方法治疗效果不理想。自体或异体的免疫细胞或干细胞移植对治疗某些自身免疫性疾病具有较好效果。目前细胞移植治疗的自身免疫性疾病主要有糖尿病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、多发性溃疡、重症肌无力以及过敏性疾病等,其中糖尿病的细胞移植治疗在临幊上较为成熟。

胰岛细胞移植是一种已经得到确认的治疗糖尿病的临床手段。胰岛细胞移植通常通过皮肤注入肝门静脉系统。因此,此疗法与肝细胞治疗的环境相似,考虑到细胞注射方式可能作为细胞治疗的初级模型。不过,基础 C-肽 $> 0.5 \text{ ng/ml}$ 、胰岛素非依赖性低于 40% 的胰岛细胞移植一年后的临床结局不能达到胰岛素非依赖性 70% 的胰腺全器官移植之后一年的有效率。成人胰腺导管结构中含有可分化成朗罕氏胰岛干细胞,并从非肥胖型糖尿病 (non-obese diabetic, NOD) 小鼠的长

期培养基中分离得到胰岛干细胞,且诱导分化成胰岛细胞。当移植入 NOD 小鼠时,可以逆转胰岛素依赖型糖尿病,这进一步证实从胰腺分离胰岛干细胞可初步应用于临床治疗糖尿病,并取得了可喜进展。

1.6 呼吸系统疾病

呼吸系统疾病主要病变在气管、支气管、肺部及胸腔,病变轻者多咳嗽、胸痛、呼吸受影响,重者呼吸困难、缺氧,甚至呼吸衰竭而致死。由于大气污染、吸烟、人口老龄化及其他因素,使国内外的慢性阻塞性肺病(简称慢阻肺,包括慢性支气管炎、肺气肿、肺心病)、支气管哮喘、肺癌、肺部弥漫性间质纤维化,以及肺部感染等疾病的发病率、死亡率有增无减。干细胞已成功治愈各种哮喘、气管炎、肺气肿等顽固性呼吸道疾病。在呼吸系统中已经发现了很多干细胞,如气管-支气管上皮干细胞、末梢气道干细胞、肺泡上皮干细胞等。动物实验结果表明,成体干细胞可以转化为受损伤的肺组织细胞,从而治疗相关疾病。目前一些医院已经开始用脐带血间充质干细胞治疗过敏性哮喘、气管炎、肺气肿等疾病。免疫细胞(DC、CIK)已在临幊上大量用于肺癌的治疗。

1.7 骨骼系统疾病

人体骨骼系统具有支撑身体作用,其中硬骨组织和软骨组织皆是人体结缔组织的一部分(硬骨是结缔组织中唯一较为坚硬的细胞间质)。成人有 206 块骨头,而小孩有 213 块。骨骼系统的疾病主要有颈椎病、肩周炎、关节炎、股骨头坏死、软骨损伤、骨折、骨裂等。关节软骨主要由软骨细胞和细胞外基质组成,没有血管和神经,损伤后自我修复能力很差。软骨损伤后的修复一直是骨科界的难题之一。目前治疗软骨损伤的方法主要有微骨折、开放性自体骨膜移植、马赛克移植等,但都不理想。自 1994 年《新英格兰医学杂志》(The New England Journal of Medicine) 报道利用自体软骨细胞移植(autologous chondrocyte implant)治疗软骨损伤且疗效较为理想,迄今在国外已有近 20 年的治疗历史,但国内还刚刚起步。

2011 年,浙江大学医学院附属邵逸夫医院骨科施培华等利用自体软骨细胞移植术治疗了 6 例膝关节软骨缺损患者。病例均为外伤或剥脱性骨关节炎导致的单侧股骨髁关节面软骨缺损,缺损大小为 3.8~11.6 cm²,平均 7.3 cm²。利用自体软骨细胞移植术进行治疗:(1)关节镜下,在膝关节股骨髁间非负重区获取 200~300 mg(约 0.5 cm × 1 cm 大小)软骨组织,同时抽

取患者肘正中静脉血 80 ml,提取其中的血清用作软骨细胞培养;(2)将自体软骨组织送临床细胞培养室,依照中国药品生物制品检验所的要求和标准对自体软骨细胞进行分离、培养、扩增及质量监控,培养周期一般为 14~21 天,并在手术当日收集软骨细胞后送医院,分析细胞的各项生化指标,对培养液进行细菌和支原体检测,以保证移植的软骨细胞不受污染;(3)第二次手术,在胫骨结节下 5 cm 处作 2~3 cm 小切口,显露骨膜,在胫骨前内侧裁取与清理后缺损面积等大的骨膜,用 6-0 带线针可吸收缝合线将骨膜完好固定于缺损边缘(将骨膜生发层朝向软骨面),利用冻干人纤维蛋白胶封住缝线区域,此时骨膜的覆盖使得缺损区成为封闭空间,用生理盐水注入确定该空间无缝隙漏液,然后将软骨细胞和少量培养液小心注入软骨缺损腔内,再以纤维蛋白胶封口,最后检查移植物固定情况,被动伸屈关节几次,确定无移位后缝合伤口。术后进行严格的康复训练并定期进行随访。分别于治疗后 6 个月和 12 个月检查,发现所有病例软骨缺损区基本得到了修复,无一例出现术后感染等严重并发症。

骨髓间充质干细胞(bone marrow stroma stem cell, BMSC)首次分离后被证明在不同的诱导环境下可以分化为骨、软骨等不同组织细胞,是目前治疗骨骼疾病最常用的种子细胞,但随着体外培养时间的延长,其移回体内后成骨能力明显下降,而且其多向分化能力也逐渐丢失,需要进行深入研究。

1.8 泌尿系统疾病

大量研究显示,骨髓间充质干细胞在肾损伤后再生过程中起主要的作用。Herrera 等给小鼠肌肉注射丙三醇诱导急性肾功能衰竭后,灌注间充质干细胞,可见间充质干细胞集中分布于肾小管上皮,并表达细胞角蛋白。Morigi 等发现接受骨髓间充质干细胞治疗的小鼠肾皮质切片中,间充质干细胞不仅可以向肾小管上皮细胞方向分化,并且,肾小管细胞增长速度较未接受间充质干细胞治疗组快 4 倍,说明间充质干细胞可以加速肾小管上皮细胞的再生。干细胞在临幊上用于治疗肾衰竭,因干细胞具有“无限”增殖,多向分化潜能,具有造血支持,免疫调控和自我复制等特点。可作为理想的种子细胞用于病变引起的组织器官损伤修复。近年来基础研究发现,干细胞可分化成肾固有细胞,肾实质细胞等,干细胞移植后对肾脏功能具有良好的修复和重建作用,其与微化中药渗透疗法的作用原理相同,所以二者具有相辅相成的作用。正是由于干细胞

所具备的这些免疫学特性和优势,使其在肾病治疗方面具有广阔的临床应用前景。

1.9 抗衰老

衰老是一种自然过程。由于身体细胞群在人的生命周期中长期受到内外环境冲击和伤害,引起身体各组织器官功能逐渐缓慢地退化,并导致许多身体功能丧失的一种综合性疾病,也就是所谓的慢性病。这种病发源于你的成年期、在中年期“正式”患上,50岁以后明显加重。细胞移植抗衰老就是取患者自体皮肤或其他组织,运用组织工程技术在GMP实验室中进行分离、纯化、培养、扩增,制成自体间充质干细胞或成纤维前体细胞注射液,然后再回输到患者颜面皱纹或凹陷性疤痕下真皮层内。间充质干细胞具有多向分化和免疫调节功能,可用于老化皮肤的修复再生,延缓衰老。成纤维细胞可产生患者自体胶原蛋白、透明质酸和弹性纤维等营养物质,以达到让患者重生理性除皱、祛疤的目的,变得更加年青。细胞抗衰老在欧洲、澳洲、北美和南韩已经产业化,在国外已有近十年的临床观察经历和近万例临床报告。

1.10 其他疾病

除上面提到的外,细胞移植治疗的疾病还包括角膜损伤、视网膜损伤、皮肤损伤、烧伤等。日本大阪大学西田幸二接纳了4名50岁至80岁的角膜上皮损伤、接近失明的患者。西田先在患者口腔中切一个小口提取黏膜,再从黏膜中分离出干细胞。经过两个星期培养,干细胞转化成了薄膜,其透明度等与角膜上皮十分相似。西田将这种薄膜植入患者眼部,手术1年后患者视力恢复情况良好,其中一位患者的视力达到了0.7。衬垫在人类眼球后部的视网膜是中枢神经系统向外延伸的特殊感觉神经组织。从流产胎儿眼球组织中分离克隆出人视网膜干细胞,注射到玻璃体和视网膜之间的腔隙中。可观察到视网膜干细胞移植对视神经再生的促进作用。骨髓间充质干细胞、脐带血间充质干细胞等作为种子细胞构建的组织工程皮肤,可用于皮肤损伤的治疗。目前普遍用于治疗烧伤的疗法是取患者未烧伤部位的皮肤进行移植,但这一疗程可能持续数周甚至数月,其间患者的创口很可能出现感染。另一方面,虽然数十年前科学家就能人工培植皮肤,但是通过长达2周至3周的培植过程获得的人造皮肤往往非常脆弱。移植人造皮肤后,皮下的分泌物可能形成水疱,进而对人造皮肤造成损伤。干细胞移植能够加速烧伤皮肤的愈合,有望克服上述障碍。目前此项技术

只能用于治疗二度烧伤,但未来此项技术可发展到治愈三度烧伤的水平。

2 细胞移植治疗的发展

细胞移植治疗本质上是细胞水平的再生医学。当前再生医学的核心研究内容是细胞移植治疗和组织工程治疗,其中细胞移植治疗最具有发展前景^[8-9](图1)。细胞移植治疗从十七世纪后半叶的直接用动物血进行治疗到二十世纪初的将组织块溶解于生理盐水后进行治疗,经过了近三百年时间。但在整个二十世纪,细胞移植治疗得到了快速发展^[10-14]。

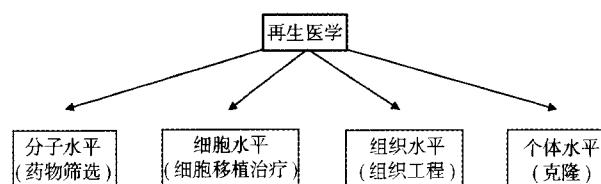


图1 细胞移植治疗与再生医学层次

Fig. 1 Cell transplantation therapy and regeneration medicine levels

2.1 免疫细胞移植治疗的发展

生物免疫治疗最早可追溯到十八世纪。1796年英国医生 Jenner Edward 给人接种牛痘病毒疫苗 (cowpox virus vaccine) 预防天花病毒感染,这是全世界最早的生物治疗。

1982年 Grimm 等首先报道外周血单个核细胞中加入 IL-2 体外培养 4~6 天,能诱导出一种非特异性的杀伤细胞 (LAK 细胞),这类细胞可以杀伤多种对 CTL、NK 不敏感的肿瘤细胞。许多实验表明, LAK 细胞的前体细胞是 NK 细胞和 T 细胞。1984 年 Rosenberg 研究组经美国食品药品管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准,首次应用 IL-2 与 LAK 协同治疗 25 例肾细胞癌、黑素瘤、肺癌、结肠癌等肿瘤患者,具有显著疗效。1985 年 Rosenberg 首先报告白细胞介素-2 (IL-2) 和 LAK 细胞治疗晚期肿瘤有效。1986 年 Rosenberg 研究组又首先报道了肿瘤浸润淋巴细胞 (tumor infiltrating lymphocyte, TIL)。用机械处理和酶消化方法,从肿瘤局部分离出肿瘤浸润的淋巴细胞,加入高剂量 IL-2 体外培养,残存的肿瘤细胞 7~13 天全部死亡。从手术切下的肿瘤组织、肿瘤引流淋巴结、癌性胸腹水中获得淋巴细胞,加 IL-2 培养后,其生长、扩增能力强于 LAK 细胞,副作用也明显低于 LAK/IL-2

疗法。

1973年美国学者 Steinman 及 Cohn 在小鼠脾组织分离中发现了 DC, 因为其细胞的形态具有树突样或伪足样突起而得名。DC 是人体内功能强大的主要的抗原递呈细胞, 除了能够诱导抗原特异性细胞毒 T 淋巴细胞反应外, 还可通过直接或间接方式影响 β 细胞的增殖, 活化体液免疫应答。早期由于对其来源、分化、发育、成熟等方面的知识缺乏了解, 只能从不同的组织中分离 DC, 这样获得的细胞数量极少并极大地限制了对其功能特点的研究。1992 年 Steinman 建立了应用 GM-CSF 从小鼠骨髓中大规模培养制备 DC 的方法, 之后又建立并完善了多种培养扩增 DC 的方法, 对 DC 的研究才得以深入。1994 年, Schmidt-wolf 从外周血单个核细胞中诱导产生 CIK 细胞, 兼具 T 淋巴细胞强大的杀瘤活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性, 故又被称为 NK 细胞样 T 淋巴细胞, 将具有高效杀伤活性的 CIK 细胞和具有强大肿瘤抗原递呈能力的 DC 共同培养来治疗恶性肿瘤业已证明具有良好的效果, 近年来已在国内许多具备条件的三级甲等医院进行临床应用。

2.2 干细胞移植治疗的发展

早在 1867 年, Cohnheim 在实验中给动物静脉注射一种不溶性染料 analine, 结果在动物损伤远端的部位发现含有染料的细胞, 包括炎症细胞和与纤维合成有关的成纤维细胞, 由此他推断骨髓中存在非造血功能的干细胞。1930 年瑞士的 Daul Niehans 首先从羊胚胎器官分离出细胞并注入人体, 没有引发拒绝异体蛋白的天生免疫反应, 于是开始应用这类羊胎素活细胞进行皮肤年轻化治疗。

干细胞真正的研究始于 20 世纪 60 年代, 加拿大科学家 Ernest McCulloch 和 James E Till 在 1963 年首次证明了血液中干细胞的存在, 并发现造血干细胞能发展成数百种不同类型的人体组织细胞。60 年代, 研究者通过对几个近亲种系的小鼠睾丸畸胎瘤的研究, 表明了其是来源于胚胎生殖细胞的, 这项工作证实了胚胎癌细胞是一种干细胞。

1981 年, Evan Kaufman 和 Martin 从小鼠胚泡内细胞群分离出胚胎干细胞, 并建立了胚胎干细胞适宜的体外培养条件, 培育成干细胞系。由这些胚胎干细胞细胞产生的干细胞系有正常的二倍型, 能够像原生殖细胞一样产生三个胚层的衍生物。将获得的胚胎干细胞系注入小鼠体内, 能诱导形成畸胎瘤。1984 年, 在一次由 Bogse 博士主持的会议上, 他和 Broxmeyer 博士讨

论了利用脐带血的可能性。Broxmeyer 介绍了在体外发现脐带血内有干/祖细胞后, Bogse 认为人的脐带血可能是临床移植造血干细胞的一种来源。在他们讨论后, 美国多个学科开始合作研究, 后来又进行国际合作研究。在巴黎 Saint Louis 医院, Gluckman 博士领导的骨髓移植科首次用 HLA 相合病人胞妹的脐带血干细胞治疗 1 例 Fanconi 贫血患儿并获得成功。20 世纪 70 年代, 当时选择人类白细胞抗原相同的健康人的骨髓, 对白血病患者进行骨髓移植, 并获得良好的治愈效果; 20 世纪 80 年代, 外周血干细胞移植术获得了推广, 不过大多移植自体外周血干细胞, 仍然主要用于治疗白血病。1990 年后这种治疗手段迅速发展。1990 年 Niehans 报道了 6500 例患者接受了细胞治疗的方法。全世界 1997 年移植例数达到 4.7 万例以上, 自 1995 年开始, 自体造血干细胞移植例数超过异基因造血干细胞移植, 占总数的 60% 以上。造血干细胞移植目前广泛应用于恶性血液病、非恶性难治性血液病、遗传性疾病和某些实体瘤治疗, 并获得了较好的疗效。

2004 年, *Massachusetts Advanced Cell Technology* 杂志报道克隆小鼠的干细胞可以通过形成细小血管的心肌细胞修复心衰小鼠的心肌损伤。这种克隆细胞比来源于骨髓的成体干细胞修复作用更快、更有效, 可以取代 40% 的瘢痕组织和恢复心肌功能。这是首次显示克隆干细胞在活体动物体内修复受损组织。2007 年美国威斯康星大学詹姆斯·汤姆森的研究小组将体细胞转变成“诱导性多能干细胞”, 几乎同时日本京都大学教授山中申弥领导的研究小组也创建出 iPS 细胞。同年, 美国怀特黑德生物医学研究所的雅格布·汉纳等人提取了患病实验鼠的皮肤细胞, 而后植入一组基因, 通过基因重新编排, 使之具备了胚胎干细胞所具有的功能。2009 年 1 月美国食品药品管理局(FDA)首次批准将胚胎干细胞用于治疗截瘫患者的临床实验, 干细胞的研究经快速通道从基础进入到临床, 截止到 2009 年 1 月, 已有 20 项临床试验在美国国立卫生院 clinicaltrials.gov 登记注册, 早期结果令人鼓舞。2009 年 5 月, 中国国家卫生部出台的《医疗技术临床应用管理办法》, 为严格有序地开展细胞生物治疗提供了指导和依据, 也保证了生物治疗的安全和规范。细胞治疗所运用的独特的生物学特性将会使其在人类疾病的治疗中发挥巨大的应用价值^[15]。

2.3 普通体细胞移植治疗的发展

在早期的细胞移植治疗中, 移植物包含了普通体

细胞、干细胞和免疫细胞,其中发挥疗效作用的是其中的干细胞和/或免疫细胞。后来随着细胞移植治疗的深入发展,干细胞或免疫细胞才从普通体细胞群中分离出来,在体外进行扩增后用于临床治疗。

代谢性疾病常被归因于某种细胞功能障碍或缺陷,细胞移植合乎逻辑地应用于这些疾病的治疗,如胰岛细胞移植和肝细胞移植。第一例同种异体胰岛细胞移植开展于1990年。2000年,Edmonton研究组通过胰岛细胞移植使7例脆性1型糖尿病患者摆脱了胰岛素。胰岛细胞植入肝门静脉后可全面改善葡萄糖自我平衡,但在移植数年后胰岛细胞功能会逐渐减退。目前胰岛移植还受到一些限制,如:胰岛来源严重不足;移植后的免疫排斥反应等。

肝细胞具有很多功能,对遗传性代谢缺陷病人移植“正常”肝细胞似乎合乎逻辑。截至2006年,全世界仅进行了78例肝细胞移植,其中有21例是患有遗传性代谢缺陷的病人。1976年,Matas等报道,从门静脉注入肝细胞使Crigler-Najjar模型大鼠血浆胆红素水平下降。人体肝细胞移植于1992年第一次临床试验成功。1993年Mito等人第一次报道了肝细胞移植在治疗慢性重型肝炎中的应用。1998年Fox等人报道了应用该方法治疗小儿Crigler-Najjar I型疾病,18个月后胆红素水平降低了60%。1998年美国FDA 6880条款通过了人类肝细胞体内移植可作为终末期肝病的一项有效的治疗技术,并于当年通过了美国FDA认证。目前国内解放军304医院等单位在开展肝细胞移植治疗工作,并取得了一定成就。

普通体细胞由于不具有免疫细胞和干细胞那样独特的生物学特性,单独应用于临床移植治疗时会有很大限制。但是,某些种类的普通体细胞和干细胞混合移植,将有利于干细胞的定向诱导分化,增强干细胞的治疗效果。

在细胞移植治疗领域,我国科学家已紧紧跟上了国际先进技术的脚步,并成为某些领域的领头者。估计未来人们可以用自身或他人的干细胞、干细胞衍生组织和器官替代病变或衰老的组织、器官,并可以广泛涉及用于治疗传统医学方法难以医治的多种顽症,如白血病、早老性痴呆、帕金森病、糖尿病、肝硬化、中风和脊髓损伤等一系列目前尚不能治愈的疾病。

21世纪是细胞移植治疗的世纪^[16]。自2009年被划为三类医疗技术管理后,国内细胞移植治疗处于爆发式的增长阶段。2013年3月7日,中国国家卫生部、

国家食品药品监督管理局颁布了《干细胞临床试验研究管理办法(试行)》、《干细胞临床试验研究基地管理办法(试行)》和《干细胞制剂质量控制和临床前研究指导原则(试行)》,对干细胞移植治疗技术进行整顿和规范化管理,这符合国际发展趋势。实现了干细胞移植治疗管理从“技术”到“药物”的转变。目前在加拿大、韩国、美国等国,某些干细胞已被批准作为药物进行临床应用。预计在今后几十年内,一大批干细胞制剂(产品)将被批准应用于临床,同时免疫细胞移植治疗、体细胞移植治疗和混合种类的细胞移植治疗也会得到快速发展,并且会被中国国家卫生主管部门批准应用于临床。

参考文献

- [1] Snow J L, Kawut S M. Surrogate end points in pulmonary arterial hypertension: assessing the response to therapy. *Clin Chest Med*, 2007, 28:75-89.
- [2] Tse H F, Kwong Y L, Chan J K, et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*, 2003, 361:47-49.
- [3] Wang Y, Yang D, Song L, et al. Mifepristone-inducible caspase-1 expression in mouse embryonic stem cells eliminates tumor formation but spares differentiated cells *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cells*, 2012, 30(2):169-179.
- [4] Weiss D J, Kolls J K, Ortiz L A, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, 5(5):637-667.
- [5] Yoon C H, Hur J, Park K W, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*, 2005, 112: 1618-1627.
- [6] Wilkinson N, Scott-Conner C E. Surgical therapy for colorectal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin. North Am*, 2008, 37(1): 253-267.
- [7] Young W F, McGloin J, Zittleman L, et al. Predictors of colorectal screening in rural Colorado: testing to prevent colon cancer in the high plains research network. *J Rural Health*, 2007, 23(3):238-245.
- [8] Thornton A J, Alsberg E, Albertelli M, et al. Shape-defining scaffolds for minimally invasive tissue engineering. *Transplantation*, 2004, 77:1798-1803.
- [9] Zhou P, Liang P, Dong B, et al. Phase I clinical study of combination therapy with microwave ablation and cellular immunotherapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther*,

- 2011, 11(5):450-456.
- [10] Thenappan A, Li Y, Shetty K, et al. New therapeutics targeting colon cancer stem cells. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 2009, 5(4):209.
- [11] Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6:127-135.
- [12] Tonnesen H H, Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 2002, 28:621-630.
- [13] van Laake L W, Qian L, Cheng P, et al. Reporter-based isolation of induced pluripotent stem cell- and embryonic stem cell-derived cardiac progenitors reveals limited gene expression variance. *Circ Res*, 2010, 107:340-347.
- [14] Vinent-Johansen J, Zhao Z Q, Jiang R, et al. Myocardial protection in reperfusion with postconditioning. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2005, 3:1035-1045.
- [15] Watt F M, Driskell R R. The therapeutic potential of stem cells. *Biol Sci*, 2010, 365(1537):155-163.
- [16] Ilie D, Polak J. Stem cell based therapy—where are we going? *Lancet*, 2012, 379(9819):877-878.

The Clinic Application and Development of Cell Transplantation Therapy

WANG Dian-liang

(Department of Pharmacy, The Second Artillery General Hospital, Beijing 100088, China)

Abstract Cell transplantation therapy was used in clinic since hundreds of years ago, however until recent years it began to large-scale apply in clinic. The application area of cell transplantation therapy include diseases in hematological system, cardiovascular system, digestive system, nervous system, immune system, respiratory system, urinary system, and skeletal system, also include anti-aging, corneal injury, retina injury, skin injury, and empyrosis etc. Stem cell drugs have already been approved to apply in clinic in Canada, Korea, and America. In 2013, the administration of cell transplantation therapy in China begin to transform from technique to agent or drug. Cell transplantation therapy will have good development prospect.

Key words Cell transplantation Cell therapy Clinic application Stem cell agent Stem cell drug