

院士论坛

非扩增性干细胞治疗理念的形成及其应用前景

戴尅戎

上海交通大学医学院附属第九人民医院骨科, 上海 200011

[摘要] 20 世纪干细胞的研究为临床细胞治疗打开了神奇的大门, 但从 20 世纪下叶至今, 始终只有血液疾病的干细胞治疗获得了推广, 其他领域的干细胞治疗始终处于缓慢发展的阶段。其中一个重要原因, 是干细胞的临床应用往往需要进行体外扩增。但扩增培养的过程长、易污染、成本高, 理化因素影响大, 在一定程度上增加了治疗前后的风险。如使用胚胎干细胞, 其获取、培养扩增时动物血清的使用和干细胞体外扩增后可能出现的非二倍体不稳定细胞, 也使其受到伦理学的限制。由此, 离心技术、免疫磁珠技术、干细胞筛选-富集-复合循环系统等非扩增性干细胞治疗技术逐步受到重视, 形成了系统理念, 并不断发展。上述技术无需体外培养, 即可获得足够治疗剂量的干细胞, 直接用于移植治疗。这种技术在临床应用和推广中已逐步展现出良好的应用前景。

[关键词] 干细胞; 非扩增技术; 细胞治疗

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2020.10.002 **[中图分类号]** R459.9, R329.2 **[文献标志码]** A

Concept formation of non-expansion technology in stem cell therapy and its application prospect

DAI Ke-rong

Department of Orthopaedics, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

[Abstract] Stem cell research starting in the 20th century has opened a magical door for clinical cell therapy. However, stem cell therapy has been only promoted in blood diseases up to now, while in other clinical fields, it still remains in the stage of slow development. One of the important restrictions is that the clinical application of stem cells usually need *in vitro* expansion, resulting in consequences such as the longtime-culture process, tendency to contaminate, high cost, and physical and chemical impact factors, and these could in a certain extent increase the risk both in pre- and post-treatment. As for the use of embryonic stem cells, it could be questioned by ethics for the harvest, the use of animal serum, and the non-diploid unstable cells that may appear after stem cell expansion *in vitro*. Then, some non-expansion technologies, such as the centrifugation technology, immunomagnetic beads technology, and stem cell screen-enrich-combine (-biomaterials) circulating system, have gradually been paid more attentions, and formed the new concept that are continuously developed. By these techniques, efficient therapeutic doses of stem cells could be obtained without culture *in vitro*, and the stem cells could be transplanted directly. These technologies have gradually shown good prospects in clinical application and promotion.

[Key words] stem cell; non-expansion technology; cell therapy

非扩增性干细胞治疗技术是通过非体外培养、非细胞增殖的方式, 从组织或组织液中直接获取干细胞, 通过物理方式或依靠细胞本身的特性浓缩聚集干细胞(如离心、富集等), 直接应用或与材料混合后回植患者体内, 进行细胞治疗。该类技术具有耗时短、污染可能性小、伦理问题少等优势。其中, 利用骨髓间充质干细胞本身黏附特性的干细胞筛选-富集-复合循环系统[screen-enrich-combine (-biomaterials) circulating system, SECCS]作为一种非扩增性干细胞治疗技术, 已经用于 230 余例临床的骨修复病例, 疗效满意^[1-4]。

自 20 世纪下叶起, 人体干细胞的研究和应用逐步成为热点, 干细胞多能性和无限增殖能力备受关注, 特别是

多能干细胞应用技术越来越多地受到相关科学家和临床医生的重视, 被认为具有巨大的研究价值和应用潜力。干细胞可望治疗多种疾病, 在组织再生和延缓衰老方面将发挥重要作用, 是一种可以改变现代治疗模式的新型技术, 可以带来巨大的经济价值和社会贡献。1999 年, *Science* 杂志将人类胚胎干细胞研究成果评为当年世界十大科技进展之首。但是, 近 20 年来, 干细胞的应用研究发展并未加速。其中一个重要因素是伦理问题。胚胎干细胞等相关的核转移技术涉及人源性祖细胞, 受到广泛质疑甚至反对。相对而言, 成体干细胞的应用获得多数学者的认可。但这也同时存在一些难以回避的问题。传统技术通过干细胞分离、培养、诱导, 从而得到有效数量的干细胞, 这通常

[作者简介] 戴尅戎 (1934—), 男, 中国工程院院士, 主任医师, 教授, 本科; 电子信箱: krdai@163.com。

[通信作者] 同上。

[Corresponding Author] DAI Ke-rong, E-mail: krdai@163.com.



需要在分离干细胞之后通过体外培养以扩增干细胞数量。但体外培养过程时间久、操作繁琐,并且存在干细胞干性下降、污染等一系列问题。更重要的是,体外培养扩增往往需要使用动物血清,或受到不良的理化因素影响而出现非二倍体的细胞。因此,在应用上一直受到伦理学限制。

细胞治疗实质上是通过将某些特定细胞输注患者体内,通过归巢效应,或直接植入特定区域,利用细胞特性形成组织、修复器官,以治疗相关的临床疾病。21 世纪以来,随着人们对细胞研究的深入,细胞治疗也不断发展。目前,细胞治疗已开始应用于不少临床领域,如利用嵌合抗原受体 T 细胞疗法(chimeric antigen receptor T cell therapy, CAR-T)治疗急性淋巴细胞白血病和淋巴瘤^[5],应用胰岛细胞移植治疗 1 型糖尿病,应用角膜缘干细胞移植修复角膜,应用神经干细胞移植治疗脑外伤和帕金森病,应用骨髓间充质干细胞促进软骨再生修复长节段骨缺损,应用施万(Schwann)细胞、神经干细胞或祖细胞、嗅鞘细胞、少突胶质细胞前体细胞或间充质干细胞治疗脊髓损伤^[6]等。而人类多能干细胞的发现更是有望从根本上重塑再生医学和人类对复杂疾病的研究,目前已开展多项有关人诱导多向潜能干细胞的相关临床试验^[7]。

传统干细胞治疗技术包括样本采集,干细胞分离、培养、移植等过程。而通过干细胞分离得到的干细胞数量往往较少,因此需要体外培养扩增以获得足量细胞数。利用 Ficoll 或 Percoll 等分离液的密度梯度离心法,是实验室常用的从骨髓血中分离骨髓单个核细胞(包含骨髓间充质干细胞)的方法。研究人员应用该方法分离骨髓单个核细胞并用于临床研究^[8]。而为了得到足量的骨髓间充质干细胞,则需进一步通过体外培养。这时除了上述细胞体外培养的常见问题外,密度梯度离心所需的分离液等相关试剂毒性,也成为干细胞治疗过程中的阻碍。因此,如何规避这些繁琐步骤,直接获得足够数量的干细胞用于临床治疗,成为细胞治疗向前发展的重要挑战之一,这也正是发展非扩增性干细胞治疗技术的由来。

离心技术是细胞治疗最常用的一种非扩增性方式。获取的组织或组织液,通过离心浓缩富集获得组织中的干细胞成分,但往往还混有一些其他细胞。如直接一起应用,有时也起到一定的相辅相成作用^[2]。离心分离是最早期常用的非体外培养干细胞富集技术。离心技术包括差速离心和密度梯度离心。差速离心根据大小不同的细胞在同一介质中沉降所需流速不同以分离不同的细胞。一般适用于分离大小悬殊的细胞。而密度梯度离心则是借助离心力作用形成一系列连续或不连续的密度梯度不同的细胞分层,以

达到分离细胞的目的;如 COBE 2991(美国 Gambro BCT 公司)或 Celution 系统(美国 Cytori 公司)正是通过此原理实现对血液或脂肪组织液中干细胞的分离,而不需要体外培养^[9]。但通过离心技术很难实现干细胞的精准分离。

免疫磁珠分选技术是一种新兴技术。免疫技术的发展也为非体外培养干细胞治疗技术带来了新思路。通过免疫磁珠标记具有特异性表面分子的细胞,如标记 CD34 或 CD133 阳性的细胞,再通过磁场中磁力的作用,将标有免疫磁珠的细胞(阳性细胞)或未能标记的细胞(阴性细胞)筛选出来。CliniMACs 系统(德国 Miltenyi 公司)就是利用该原理设计出的细胞分离装置。目前已有相关临床研究,通过该方法筛选干细胞治疗心肌梗死^[10-11]。CliniMACs 系统在欧洲一些国家也已用于临床,但应用“阳性”选择在分离外周血中造血干细胞时,CD34 细胞复原率较低,仅为 60%。美国国立卫生研究院(NIH)输血医学部细胞加工实验室使用抗 AC133 的抗体来筛选造血干细胞,抗 AC133 抗体选择的造血干细胞与抗 CD34 抗体选择的细胞群仍存在部分差异,目前尚有许多问题处于研究阶段^[12]。

SECCS,或称非扩增性干细胞富集技术,是利用干细胞的黏附特性,将骨髓血循环过滤于多孔生物材料上,达到筛选干细胞并富集-复合于生物材料,随后回植体内达到修复骨缺损的目的。目前,我们利用该方法已完成相关动物实验及人体体外实验^[2-3],随即在上海交通大学医学院附属第九人民医院和上海交通大学附属第一人民医院进行了相关人体体内临床研究^[4, 13-14],通过对过滤前后细胞特性的分析发现,过滤富集过程并不会影响细胞的凋亡和增殖能力,具有良好的生物安全性。该技术已获得 10 余项国家专利,具有自主知识产权,可在手术同期完成骨髓干细胞采集-筛选-富集-复合生物材料的制备,干细胞数量足以满足质量需求,术中直接回植,无需体外培养。避免了体外长时间培养、易污染、使用异种血清及相关伦理学问题,临床疗效满意。目前已应用治疗 230 多例骨不连、骨缺损、新鲜骨折骨缺损、股骨头坏死、脊柱关节融合、距骨骨软骨损伤、良性骨肿瘤切除后的骨修复等需要骨再生的患者^[15-16],结果提示该方法制备的生物活性材料,其骨修复结果不逊于“金标准”自体骨移植的骨修复疗效,总体有效率达到 95%。

展望干细胞研究与应用的发展,体外培养干细胞治疗技术仍是干细胞治疗的主要方式。非扩增干细胞治疗技术所形成的理念是一种新兴技术思路,目前采用这类技术进行临床研究或临床治疗的报道数量还不多。而随着对于干

胞研究的深入,非体外培养干细胞治疗技术凭借其独特的优势必将在干细胞治疗中获得一席之地,成为干细胞治疗的有效方式之一。非扩增干细胞治疗技术直接或间接地通过增加干细胞分离过程中得到的干细胞数量,省去干细胞体外培养扩增的步骤,从而极大程度地降低干细胞治疗技术的难度,提高了干细胞治疗的安全性,规避了相关伦理

学的问题,其应用范围显然不仅仅限于骨科。随着细胞分离技术的发展,新兴干细胞分离技术,如微流控技术、流式细胞术、吸附技术、过滤富集技术等,也将成为非体外培养干细胞治疗技术的一部分,甚至可以实现细胞的精确分离和定量分离,根据疾病需要,针对性进行细胞治疗,达到经济、有效的治疗效果。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Gan YK, Dai KR. Enrichment techniques of autologous bone marrow stem cells for bone regeneration: translational medicine from bench to bedside. In pushing the boundaries of scientific research: 120 years of addressing global issues[J]. Science, 2016, 351(6278 Suppl): 52-54.
- [2] Chu WX, Zhuang YF, Gan YK, et al. Comparison and characterization of enriched mesenchymal stem cells obtained by the repeated filtration of autologous bone marrow through porous biomaterials[J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 377.
- [3] Chu WX, Gan YK, Zhuang YF, et al. Mesenchymal stem cells and porous β -tricalcium phosphate composites prepared through stem cell screen-enrich-combine-(biomaterials) circulating system for the repair of critical size bone defects in goat Tibia[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1): 157.
- [4] Gan YK, Dai KR, Zhang P, et al. The clinical use of enriched bone marrow stem cells combined with porous β -tricalcium phosphate in posterior spinal fusion[J]. Biomaterials, 2008, 29(29): 3973-3982.
- [5] Gagelmann N, Riecken K, Wolschke C, et al. Development of CAR-T cell therapies for multiple myeloma[J]. Leukemia, 2020, 34(9): 2317-2332.
- [6] Assinck P, Duncan GJ, Hilton BJ, et al. Cell transplantation therapy for spinal cord injury[J]. Nat Neurosci, 2017, 20(5): 637-647.
- [7] Soldner F, Jaenisch R. Stem cells, genome editing, and the path to translational medicine[J]. Cell, 2018, 175(3): 615-632.
- [8] Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial[J]. JAMA, 2012, 308(22): 2369-2379.
- [9] Reinhardt M, Bader A, Giri S. Devices for stem cell isolation and delivery: current need for drug discovery and cell therapy[J]. Expert Rev Med Devices, 2015, 12(3): 353-364.
- [10] Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety[J]. Circulation, 2005, 112(9 Suppl): I178-I183.
- [11] Tendera M, Wojakowski W, Ruzyłło W, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34⁺CXCR4⁺ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial[J]. Eur Heart J, 2009, 30(11): 1313-1321.
- [12] 干耀恺,戴焱戎,汤亭亭. 临床细胞加工与细胞治疗[J]. 国际骨科学杂志, 2007, 28(1): 1-5.
- [13] Zhuang YF, Gan YK, Shi DW, et al. A novel cytotreatment device for rapid screening, enriching and combining mesenchymal stem cells into a biomaterial for promoting bone regeneration[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 15463.
- [14] Chu WX, Wang X, Gan YK, et al. Screen-enrich-combine circulating system to prepare MSC/ β -TCP for bone repair in fractures with depressed tibial plateau[J]. Regen Med, 2019, 14(6): 555-569.
- [15] 王昕,干耀恺,赵杰,等. 新型骨髓干细胞快速筛选-富集-复合系统治疗四肢骨不连[J]. 中华创伤骨科杂志, 2018, 20(2): 93-98.
- [16] 储文祥,干耀恺,赵杰,等. 应用于细胞快速筛选富集技术治疗新鲜骨折骨缺损[J]. 中华创伤骨科杂志, 2018, 20(5): 369-375.

[收稿日期] 2020-07-05

[本文编辑] 崔黎明

学科介绍

上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔医学

上海交通大学口腔医学是教育部第一批高等学校特色专业建设点、教育部“211工程”重点学科、国家“双一流”建设学科,设有国家口腔疾病临床医学研究中心。口腔临床医学是国家级重点学科,口腔基础医学是国家级重点(培育)学科。现有邱蔚六和张志愿2位中国工程院院士,开创了“中国式口腔颌面外科”。目前,口腔医学专业有国家杰出青年基金获得者2名,“长江学者”特聘教授2名,“青年长江学者”1名;研究生导师113人,其中博士生导师59人。近5年来,承担了国家级科研项目146项,其中国家重点研发计划项目(首席)7项,国家自然科学基金委创新研究群体项目1项。作为我国高层次口腔医学专业人才的培养基地,拥有5个国际口腔医师培训中心、基地,获得国家级教学成果奖二等奖以及国家级“金课”荣誉。