DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20230301

成体气道上皮基底细胞的功能与再生应用研究进展

郑琦，任涛*

（上海交通大学医学院附属第六人民医院，上海 200233）

【摘要】基底细胞是成人气道上皮的主要细胞类型，分子标志为P63和KRT5，具有自我更新能力和多向分化潜能。基底细胞的分化主要受Notch信号调控。基底细胞功能低下或耗竭可启动肺组织异常修复和/或病理性重塑。支气管扩张症、特发性肺纤维化、COPD患者气道上皮存在自我更新能力的基底细胞，并可被体外扩增。经支气管镜气道植入自体基底细胞后，支气管扩张症与特发性肺纤维化患者的肺结构、肺功能与运动能力出现不同程度的改善。

【关键词】组织干细胞；气道上皮；基底细胞；肺再生；特发性肺纤维化

中图分类号：Q25，R364.3+3　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2023）03-0002-04

Functions and regenerative applications of adult human airway epithelial basal cells

Zheng Qi, Ren Tao*

(Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200233, China)

【**Abstract**】Basal cells are the major cell type of the adult airway epithelium, expressing the molecular markers P63 and KRT5, and possessing tissue stem cell properties such as self-renewal capacity and multidirectional differentiation potential. Basal cell differentiation is mainly regulated by Notch signaling. Insufficiency or depletion of basal cells can initiate abnormal repair and/or pathological remodeling of lung tissue. Residual basal stem cells are present in the airway epithelium of patients with bronchiectasis, idiopathic pulmonary fibrosis, and COPD and can be cultured and expanded in vitro. After transbronchoscopic airway implantation of autologous basal cells, patients with bronchiectasis and idiopathic pulmonary fibrosis may show some improvement in lung structure, lung function and exercise capacity.

【**Keywords**】Tissue stem cell; Airway epithelium; Basal cells; Lung regeneration; Idiopathic pulmonary fibrosis(IPF)

肺脏是人体内表面积最大的器官，每天约有8 000 L空气流经气道上皮，空气中含有大量的微颗粒如污染物、微生物和氧化剂等会与气道上皮直接接触并造成损伤[1]，呼吸上皮的稳态维持与损伤后修复持续成为研究热点。成人气道从气管开始，经过23级分级逐渐分支变细直到肺泡囊，包括终末细支气管在内的前16级气道构成肺的传导区，容量约150 mL，始于呼吸性细支气管的最后7级气道因为肺泡结构的出现参与气体交换，构成了肺的呼吸区，容量约2 500~3 000 mL。近来，围绕肺传导区和功

收稿日期：2023-08-01；**修回日期**：2023-08-13

基金项目：国家自然科学基金重点项目（81930001）

通信作者：任　涛（1971-），男，山东兰陵人，教授，主要从事肺组织干细胞的功能与再生应用研究。E-mail: rentao305@163.com

能区等不同段位开展的单细胞转录组学、细胞谱系示踪以及细胞空间定位等研究，不断更新人们对呼吸上皮细胞新类型或细胞新功能的认知水平[2]。

1 成人气道上皮基底细胞具有干细胞特征

成人呼吸上皮中至少有15种功能明确的上皮细胞，如多纤毛细胞（Multiciliated Cells，MCCs）、棒状（Club）细胞、基底细胞（Basal Cells，BCs）、中间细胞、黏液细胞和肺神经内分泌细胞[3]。气道上皮表面纤毛细胞和非纤毛细胞的比例大致相等。BCs与纤毛细胞和棒状细胞一样同属气道最常见的上皮细胞类型，外观呈小圆形至金字塔形，位于上皮基底层，通过半桥粒和整合素将细胞骨架紧密粘附于上皮基底层。BCs的分子标志为转录调节因子-转化蛋白63（p63）和中间丝细胞角蛋白-角蛋白5（Krt5）及其异源二聚体伙伴分子-角蛋白14（Krt14）。

人体BCs的分布广泛，遍布大小气道（包括最远端终末细支气管区域），小鼠BCs的分布较为局限，主要见于气管，而肺内支气管几乎缺如[4,5]。上皮组织修复过程中，增殖状态的BCs从气道基底层迁移至气道上皮细胞下方，分化形成中间态BCs，该群细胞会因p63表达下调而失去典型的基底细胞标记。多项研究利用谱系示踪分析和单细胞转录组分析方法，证实$Krt5^+$BCs能够分化形成所有的气道上皮细胞类型，包括新发现的离子细胞和罕见的刷状细胞亚群[6]。

最近的研究发现，成体气道上皮中还有其他细胞类型具备干细胞/祖细胞特性，分别为Club细胞、支气管-肺泡干细胞（Bronchioalveolar Stem Cells，BASCs）、黏膜下腺体（Submucosal Glands，SMG）肌上皮细胞和肺神经内分泌细胞（Pulmonary Neuroendocrine Cells，PNECs）。Club细胞的分子标志为Cyp2f2、SCGB1A1、SCGB3A1、SCGB3A2，具有自我更新和分化为多纤毛细胞的能力，成人近端气道上皮不包含Club细胞，仅在终末气道呈低比例出现，约占上皮细胞的11%~20%，小鼠气管、近端肺内支气管和终末细支气管上皮Club细胞占比分别为50%、60%和70%[7]。最近研究显示，成人终末气道上皮中$SCGB3A2^+SCGB1A1^+$Club细胞具有肺泡上皮细胞分化能力[8]。PNECs广泛分布于上下呼吸道，常以单体细胞或多个细胞构成的细胞小体的形式存在，人体组织中可见PNECs细胞增殖，严重肺损伤时，PNECs增殖并发挥祖细胞功能，分化形成Club细胞和纤毛细胞[9,10]。BASCs位于小鼠支气管向肺泡的过渡区域，严重肺损伤时小鼠BASCs显示出气道上皮和肺泡上皮的双向修复能力[11,12]。SMG肌上皮细胞的功能研究主要来自严重肺损伤小鼠模型，研究发现肺损伤后小鼠肌上皮细胞增殖，然后迁移到气道上皮细胞中发挥祖细胞功能，分化形成纤毛细胞、Club细胞和杯状细胞，人体气道黏膜下腺体也存在肌上皮细胞增殖的证据[13]。

可见，成人气道上皮中广泛分布的BCs不仅是纤毛细胞、杯状细胞、刷状细胞等终末分化细胞的起始细胞，还具有向Club和PNECs等祖细胞转化的能力，是气道上皮稳态维护和损伤后修复的细胞主力[14]。

2 气道基底细胞的功能调控

与肠道等经常暴露于外部刺激物的黏膜表面不同，呼吸上皮细胞在生理状态下处于相对静止状态，若一旦受伤，呼吸上皮干细胞及其邻近细胞构成的干细胞生态位会作出快速响应，立即修复受伤上皮区域，尽快恢复呼吸上皮的屏障功能。基础研究证实BCs的更新与分化主要受到经典再生信号Wnt、Notch以及细胞微环境等多重因素的影响[15]。

Wnt信号激活可趋化BCs至损伤部位，促进小鼠BCs分化为2型肺泡上皮细胞（Alveolar Epithelial Type 2 Cell，AT2）。具体表现为气道上皮损伤后，干细胞扩增并上调表达Wnt7b，Wnt7b通过促进平滑肌细胞分泌Fgf10诱导干细胞池的扩增并趋化至损伤区域[16]。Notch信号则主动参与气道上皮的稳态维持与损伤后修复，生理状态下小鼠气道BCs的Notch信号呈低活跃状态，再生与修复状态下Notch信号得以强化，促进BCs分化为分泌细胞。近来发现Notch2维持未分化BCs的稳态并限制BCs向纤毛细胞分化，Notch3则抑制BCs分化为分泌细胞[17]。非常有趣的发现当属母代BCs也能为其子代细胞提供Notch信号支持，维持子代细胞的分化状态[18]。可见，围绕再生信号与细胞微环境，有望形成BCs分化方向的精准调控措施。

3 基底细胞功能异常与慢性呼吸系统疾病

近来越来越多的课题组开始关注BCs与慢性阻塞性肺病（Chronic Obstructive Pulmonary Disease，COPD）、特发性肺纤维化（Idiopathic Pulmonary Fibrosis，IPF）和闭塞性细支气管炎（Obliterans Bronchiolitis，OB）等呼吸系统常见病和难治性疾病发生和发展的关系，发现上述疾病均存在BCs功

能异常，具体表现为BCs自我更新能力不足、细胞衰老和分化异常等。

COPD目前位居全球死亡原因的第四位，在我国，40岁以上人群中COPD患病率高达8.2%。COPD的气流受限特征呈进行性发展，与气道重塑引起的管壁增厚、管腔变窄并被过多分泌的黏液堵塞以及终末细支气管缺失有关。Ghosh等[19]选择了50例年龄在40岁以上且吸烟史超过10年的受试者，19例诊断为COPD，31例为非COPD，支气管镜下活检获取气道上皮组织，制备单细胞悬液并行基底干细胞培养，分别检测细胞克隆形成能力、自我更新能力和分化能力，该研究发现COPD受试者气道上皮中具有细胞克隆形成能力的BCs明显减少，仅为非COPD的42%，且干细胞的自我更新能力下降。用气液界面培养检测BCs的分化状态，计数Krt5$^+$BCs、Muc5b$^+$分泌细胞和ACT$^+$纤毛细胞，发现COPD气道上皮BCs向纤毛细胞分化的能力明显不足，仅为非COPD受试者的12%。评估基底干细胞缺失与肺功能受损的关系时发现基底干细胞数量减少与气体流速指标（如FEV1、FEV1/FVC、FEF、FEF25-75和FEF25-75/FVC）下降相关。研究结果表明，COPD患者的气道基底干细胞的数量、自我更新能力和多向分化潜能均存在不足，并有可能是引起COPD患者呼吸气流受限的关键因素。

IPF的发病机制依然不明，最近的研究结果提示，小气道上皮结构与功能异常已成为IPF新的病变特征，并可能是IPF的早期病变环节[20]。Yao等[21]为了更好地界定IPF肺上皮衰老细胞类型，使用荧光激活细胞分选IPF肺组织纤维化区域上皮细胞，进行单细胞RNA测序（scRNA-Seq），分析AT1、AT2、Club、SCGB3A2$^+$Club、纤毛细胞、前纤毛细胞、MUC5AC高表达杯状细胞、MUC5B高表达杯状细胞、Krt15$^+$BCs、Krt17$^+$BCs以及离子细胞的分子特征，并对上述细胞亚群的衰老状态进行评分，发现IPF患者肺泡区域的干细胞AT2以及气道区域干细胞Krt17$^+$BCs的细胞衰老状态非常明显。

OB的病理特征为终末细支气管和呼吸性细支气管周围炎症和纤维化，导致管腔变窄甚至完全闭塞，是肺移植患者的主要死因，约50%的肺移植患者会在5年内出现OB相关性死亡。Swatek等[22]借助雪貂肺移植OB模型以及临床肺移植后OB病理标本，评估气道上皮P63$^+$Krt5$^+$BCs以及黏膜下腺体（Submucosal Glands，SMG）干细胞的耗竭状态，发现随着OB的进展，SMG逐渐被破坏，具有上皮干细胞特征的肌上皮细胞明显减少，近端大气道上皮BCs的细胞数量和增殖能力随着OB的严重程度而相应下降，OB远端小气道BCs几乎完全消失。研究认为，气道上皮干细胞的大量耗竭成为肺异体移植失败的关键原因之一。

4 气道基底细胞治疗呼吸疾病的初步实践

上皮的反复损伤与修复可能会削弱成体干细胞有丝分裂的潜能，进而引发细胞池耗竭和细胞再生与修复能力不足。任涛教授课题组首先关注了病理状态下气道上皮干细胞的获取与体外扩增问题，利用支气管镜下气道上皮刷检技术，解决了无创或微创条件下气道上皮干细胞的取材问题，目前已经成功获取COPD、间质性肺病、支气管扩张症、气管支气管骨化症等患者的气道上皮BCs，并形成多种干细胞培养体系，满足自体干细胞临床转化的细胞数量要求[23-25]。

随后，课题组不断完善经支气管镜下气道上皮干细胞原位移植技术，纠正干细胞耗竭，恢复BCs对患者气道上皮的稳态维持、损伤后修复以及保护性免疫反应等作用。课题组先后围绕气道上皮功能与结构异常的支气管扩张症、COPD和IPF患者进行自体BCs的临床治疗探索，首先发现自体SOX9$^+$BCs移植可改善支气管扩张症患者的肺部结构和功能，且在1年内无死亡和不良反应[26,27]。2020年10月课题组发起的自体气道BCs经支气管镜下输注治疗IPF的临床探索获得上海申康医院发展中心临床研究创新行动计划的支持（SHDC2020CR3063B；ChiCTR2000036648），临床研究选取轻-中度IPF患者，采取单次自体细胞治疗，每次2×10^6/kg体重；对照组接受常规治疗。受试者将在入组后第8周、16周和24周接受访视，收集临床指标，评价肺功能、运动能力、生命质量等。自体气道上皮BCs的采集、分离和培养方法如下，受试者局麻下，经支气管镜刷检4~6级支气管上皮，获取微量组织，分离并提取气道上皮细胞，利用课题组自主研发的气道上皮培养基进行克隆挑选与细胞扩增。约3-4周后，获取充足数量的BCs。细胞治疗的具体措施包括：（1）局麻下经鼻插支气管镜，局部生理盐水缓慢灌洗叶或段支气管，每次约30~60 mL；（2）灌洗结束且生命体征平稳后，经支气管镜将上皮细胞悬液注入选定的叶或段支气管；（3）支气管镜细胞输注后，受试者平卧状态2 h左右。目前已完成76例受试者筛选，20例受试者接受细胞治疗，其中10例完成24周访视。中期分析结果如下：（1）自体气道BCs经支气管镜移植治疗安全性高，未见呼

吸困难、发热、咳嗽加重等不良反应；（2）肺功能改善显著，尤其是小气道通气功能受损的个体会出现弥散功能与氧合快速改善，随后出现通气量增加；（3）6 min步行距离增大；（4）生命质量有明显改善。

5 总结与展望

组织干细胞具有生理稳态维持和组织损伤后修复的双重功能，正常修复可使肺的结构快速恢复到损伤前水平，并能够对后续损伤做出恰当反应，异常修复则会启动病理性组织重塑，引发COPD、IPF、OB和气管支气管骨化症等多种呼吸系统疾病，成体干细胞功能异常已成为许多呼吸系统常见病、难治性疾病和部分罕见疾病的共性特征。因此，围绕成体气道上皮组织干细胞的类型、功能、修复能力及其调控机制和临床转化等展开系列研究恰逢其时且尤为必要，成体组织干细胞将会成为解析多种肺部疾病发生机制的新环节。

干细胞的分裂方式有对称分裂和不对称分裂，对称分裂产生的2个子代细胞均保留在生态位，并在微环境的维护下保持干细胞特性，多见于骨髓和肠道等细胞快速更新组织，有助于增加组织干细胞的数量。不对称细胞分裂的结果则是产生一个保留在生态位子代细胞，保留干细胞特性，第二个子代细胞离开生态位成为短暂扩充细胞群（Transit-Amplifying Cells，TACs）的起始细胞，TACs短期内不断增殖，随后退出细胞周期，进入分化途径。不对称分裂有利于产生终末分化细胞和维持组织细胞数量。深入解析成体干细胞的分裂调控机制，将会加快成体干细胞临床转化的速度，如对称分裂调控机制有助于高效干细胞培养基研发，而不对称分裂调控机制则有望用于移植后干细胞多向分化潜能的精准调控，进而充分发挥干细胞的修复性细胞功能。

近来，多项研究证实BCs具有异质性。借助scRNA-Seq、类器官和气液界面培养技术，Carraro等[28]发现健康成人与IPF患者气道BCs至少包含多潜能MPBs、增殖亚群PBs、分泌型亚群SPBs和活化型亚群ABs共4个亚群，与健康人不同的是IPF患者气道上皮SPBs亚群占比较高。借助人的胚肺标本，Rao等[29,30]的研究发现BCs的异质性早在胚肺时期已经存在，并且COPD和IPF患者气道上皮中BCs新的异常亚群不断被发现。BCs亚群的构成、功能特征、调控机制及其在疾病发生发展中的作用亟待明确。

参考文献

[1] WIJSENBEEK M, SUZUKI A, MAHER T M. Interstitial lung diseases[J]. Lancet, 2022, 400(10354): 769-786.

[2] SCHNEIDER J L, ROWE J H, GARCIA-DE-ALBA C, et al. The aging lung: physiology, disease, and immunity[J]. Cell, 2021, 184(8):1990-2019.

[3] TRAVAGLINI K J, NABHAN A N, PENLAND L, et al. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing[J]. Nature, 2020, 587(7835): 619-625.

[4] KONKIMALLA A, TATA A, TATA P R. Lung regeneration: cells, models, and mechanisms[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2022, 14(10): a040873.

[5] BASIL M C, KATZEN J, ENGLER A E, et al. The cellular and physiological basis for lung repair and regeneration: past, present, and future[J]. Cell Stem Cell, 2020, 26(4): 482-502.

[6] MONTORO D T, HABER A L, BITON M, et al. A revised airway epithelial hierarchy includes CFTR-expressing ionocytes[J]. Nature, 2018, 560(7718): 319-324.

[7] KADUR LAKSHMINARASIMHA MURTHY P, SONTAKE V, TATA A, et al. Human distal lung maps and lineage hierarchies reveal a bipotent progenitor[J]. Nature, 2022, 604(7904): 111-119.

[8] BASIL M C, CARDENAS-DIAZ F L, KATHIRIYA J J, et al. Human distal airways contain a multipotent secretory cell that can regenerate alveoli[J]. Nature, 2022, 604(7904): 120-126.

[9] SUI P, WIESNER D L, XU J, et al. Pulmonary neuroendocrine cells amplify allergic asthma responses [J]. Science, 2018, 360(6393): eaan8546.

[10] MOU H, YANG Y, RIEHS M A, et al. Airway basal stem cells generate distinct subpopulations of PNECs[J]. Cell Rep, 2021, 35(3): 109011.

[11] SALWIG I, SPITZNAGEL B, VAZQUEZ-ARMENDARIZ A I, et al. Bronchioalveolar stem cells are a main source for regeneration of distal lung epithelia in vivo[J]. EMBO J, 2019, 38(12): e102099.

[12] LIU Q Z, LIU K, CUI G Z, et al. Lung regeneration by multipotent stem cells residing at the bronchioalveolar-duct junction[J]. Nat Genet, 2019, 51(4): 728-738.

[13] LYNCH T J, ANDERSON P J, ROTTI P G, et al. Submucosal gland myoepithelial cells are reserve stem cells that can regenerate mouse tracheal epithelium[J]. Cell Stem Cell, 2018, 22(5): 653-667.

[14] RUSTAM S, HU Y, MAHJOUR S B, et al. A unique cellular organization of human distal airways and its disarray in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am

（下转第13页）