

两种类型的干细胞经门静脉注入治疗失代偿期肝硬化患者近期疗效观察

王方, 云升皓, 寇俊峰, 蔡国芳, 陈瑞丽, 周新人, 杨兴坤 (兰州军区总医院安宁分院 感染科, 兰州 730030)

摘要: 目的 比较自体骨髓干细胞和脐带血干细胞经门静脉注入治疗失代偿期肝硬化患者的安全性及对肝功能和PTA的近期改善作用。方法 选择失代偿期肝硬化患者59例, 随机分为骨髓组31例和脐血组28例。骨髓组患者经门静脉注入自体骨髓干细胞治疗, 脐血组经同样途径注入脐带血干细胞治疗。治疗8周后检测两组患者血清ALT、AST、TBil、PTA、ALB和AFP水平变化。同时观察对比患者临床症状的改善情况及术后的不良反应。结果 细胞治疗3天, 两组患者乏力、纳差症状均有改善, 差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。治疗8周, 骨髓组和脐血组ALB水平分别上升至 (34.8 ± 6.3) g/L 和 (36.8 ± 8.1) g/L, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); PTA水平上升至 (54.3 ± 13.8) %和 (57.0 ± 15.2) %, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 骨髓组血清ALT、AST、TBil和AFP分别为 (43.2 ± 13.8) U/L、 (50.8 ± 14.2) U/L、 (34.5 ± 14.7) μ mol/L、 (10.0 ± 3.1) μ g/L, 脐血组分别为 (46.3 ± 12.3) U/L、 (49.1 ± 15.0) U/L、 (31.4 ± 12.5) μ mol/L、 (8.8 ± 3.2) μ g/L, 两组差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。结论 经门静脉注入自体骨髓干细胞和脐带血干细胞治疗失代偿期肝硬化患者有一定的安全性及疗效, 脐带血干细胞疗效优于自体骨髓干细胞, 但两组疗效差异无统计学意义。

关键词: 肝硬化; 干细胞; 门静脉

Clinical effect of autologous bone marrow stem cells and umbilical cord blood stem cells injecting through portal vein in patients with decompensated liver cirrhosis

WANG Fang, YUN Sheng-hao, KOU Jun-feng, CAI Guo-fang, CHEN Rui-li, ZHOU Xin-ren, YANG Xing-kun
(Department of Infectious Diseases, Anning Branch of General Hospital of Lanzhou Military Area Command, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Objective To compare the safety and near-term curative effect in liver function and prothrombin activity of autologous bone marrow stem cells and umbilical cord blood stem cells injecting through portal vein in patients with decompensated liver cirrhosis. **Methods** Total of 59 patients with decompensated liver cirrhosis were randomly divided into bone marrow group (injecting autologous bone marrow stem cells) and umbilical cord blood group (injecting umbilical cord blood stem cells). The differences of symptoms, serum biochemical index and adverse events after 8 weeks in two groups were recorded and analyzed. **Results** All patients in two groups achieved an obviously improvement in their clinical symptoms such as fatigue and inappetence after 3 days. The difference has no significance. At eight weeks post therapy, the level of ALB was increased to (34.8 ± 6.3) g/L and (36.8 ± 8.1) g/L in bone marrow group and umbilical cord blood group, respectively. The level of PTA was increased to (54.3 ± 13.8) % and (57.0 ± 15.2) %, respectively. The above differences were not significant. The level of ALT, AST, TBil and AFP were (43.2 ± 13.8) U/L, (50.8 ± 14.2) U/L, (34.5 ± 14.7) μ mol/L, (10.0 ± 3.1) μ g/L in bone marrow group, respectively, and (46.3 ± 12.3) U/L, (49.1 ± 15.0) U/L, (31.4 ± 12.5) μ mol/L, (8.8 ± 3.2) μ g/L in umbilical cord blood group, respectively. There were

not significantly different between two groups. **Conclusions** Injecting autologous bone marrow stem cells and umbilical cord blood stem cells through portal vein are safe and effective in treatment of patients with decompensated liver cirrhosis. The latter is better than the former, but has no difference between two groups.

Key words: Liver cirrhosis; Stem cells; Portal vein

失代偿期肝硬化是各种类型慢性肝病的终末期状态,我国是肝炎高发区,故失代偿期肝硬化在我国发病率较高且预后差。目前尚缺乏特异有效的治疗方法,成为临床治疗的难点和热点问题。近几年,干细胞在医学领域内取得了令人瞩目的成就,为失代偿期肝硬化患者的治疗提供了新的方法。目前报道^[1-9]多采用脐血干细胞、自体骨髓干细胞和外周血造血干细胞等,在临床上取得了一定的效果。有研究^[10-15]称脐血内干细胞数量和质量较骨髓内更为优越,更具有自我更新、增殖分化和体外扩增潜能。本科室分析自体骨髓干细胞和脐带血干细胞经门静脉途径注入治疗失代偿期肝硬化患者59例的安全性及近期疗效,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2006年12月至2012年12月本科室住院的失代偿期肝硬化患者59例,包括男性39例,女性20例,年龄30~68岁,平均年龄45岁。59例患者根据疾病类型分为乙型肝炎肝硬化48例,丙型肝炎肝硬化6例,酒精性肝硬化5例。乙型肝炎肝硬化诊断符合《慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)》^[16]。入组患者肝功能Child-Pugh分级均属于Child-Pugh B/C级,排除原发性肝癌、活动性消化道出血、肝性脑病和感染等并发症。

59例患者随机分为自体骨髓干细胞治疗组(骨髓组)31例和脐带血干细胞治疗组(脐血组)28例。骨髓组包括Child-Pugh B级22例,Child-Pugh C级9

例。脐血组包括Child-Pugh B级20例,Child-Pugh C级8例。骨髓组腹水患者为15例;脐血组为14例。两组患者基线指标差异无统计学意义,见表1。两组中乙型肝炎肝硬化患者在干细胞治疗前和治疗同时已经开始启动核苷类药物抗病毒治疗。

1.2 方法 两组患者给予门冬氨酸钾镁注射液30 ml/次、维生素C 3.0 g加入10%葡萄糖注射液250 ml静脉输注,每日1次;还原性谷胱甘肽1.2 g加入5%葡萄糖注射液100 ml静脉输注,每日1次。骨髓组在上述治疗基础上经门静脉注入自体骨髓干细胞治疗,脐血组在上述治疗基础上经门静脉注入脐带血干细胞治疗。

1.3 干细胞的分离和注入 患者术前签署细胞治疗知情同意书,治疗前1天晚上开始予以流质饮食。骨髓组在无菌条件下,选择两侧髂后上棘为穿刺点,消毒、局部麻醉,以18号骨髓穿刺针穿刺,抽取骨髓约160~190 ml,肝素抗凝。脐血组在妇产科医生的协助下选择HBsAg阴性、抗-HCV、抗-HIV和梅毒螺旋体抗体阴性的健康产妇,在孕妇分娩后马上用负压脐血袋取脐带血约90~120 ml,检测血型 and 患者血型相同后使用。应用细胞分离试剂盒(宁夏中联达生物有限公司生产)分离自体骨髓和脐带血干细胞,每例分离的干细胞数量约 $(1\sim5)\times 10^7$ 个。在超声介入条件下,将分离好的细胞悬液经门静脉注入肝内,穿刺点消毒包扎,术后3天内避免剧烈运动。

表1 两组患者基线指标比较

	男性[例(%)]	年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	Child-Pugh B级[例(%)]	ALB (g/L, $\bar{x} \pm s$)	PTA (% , $\bar{x} \pm s$)
骨髓组 (n=31)	20/31 (64.5)	49.0 \pm 19.0	22/31 (70.9)	26.8 \pm 7.0	49.6 \pm 15.1
脐血组 (n=28)	18/28 (62.2)	50.0 \pm 20.0	20/28 (71.4)	25.9 \pm 7.8	48.4 \pm 14.9
P	0.375	0.125	0.190	0.125	0.125
	ALT (U/L, $\bar{x} \pm s$)	AST (U/L, $\bar{x} \pm s$)	TBil (μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)	AFP (μ g/L, $\bar{x} \pm s$)	腹水[例(%)]
骨髓组 (n=31)	51.4 \pm 12.0	55.4 \pm 13.2	39.4 \pm 15.0	8.6 \pm 3.9	15/31 (48.0)
脐血组 (n=28)	50.2 \pm 11.9	53.9 \pm 14.0	40.5 \pm 14.8	9.4 \pm 4.7	14/28 (50.0)
P	0.190	0.375	0.250	0.190	0.250

1.4 实验室检测 采用广州标佳公司的速率法试剂检测肝功能,雅培公司的试剂检测凝血指标,北京北方生物试剂研究所生产的放射免疫法试剂检测AFP。

1.5 统计学处理 应用SPSS 16.0软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床症状改善情况 两组患者治疗3天乏力、纳差症状均有不同程度的改善,组间差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。治疗8周,骨髓组腹水消退者为8例(8/15, 53.3%),脐血组为8例(8/14, 57.1%),两组腹水消退患者差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 肝功能和PTA改善情况 两组患者自治疗第2周开始,血清白蛋白水平均上升。脐血组治疗8周血清ALB、PTA水平均高于骨髓组,但差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。两组患者治疗8周ALT、AST、TBil、AFP均有下降趋势,但组间差异均无统计学意义(P 均 > 0.05),见表2。

2.3 不良反应 两组患者治疗期间未发生严重不良反应及并发症。

3 讨论

肝硬化病变一旦发展到失代偿期,即已到终末期阶段,患者最终会死于各种并发症,这是临床上治疗的一大难题,目前内科治疗尚无理想办法,其最根本的治疗措施是肝移植,但因受制于供体来源困难、治疗费用昂贵及免疫排异反应等问题亦不能广泛应用于临床。干细胞是一类具有多项分化潜能和不断自我更新能力的细胞,在一定的条件下可以分化为各种功能细胞而发挥修复作用。近年来,有

报道^[1-3]应用于干细胞治疗失代偿期肝硬化患者,取得了很好的疗效。

干细胞治疗失代偿期肝硬化患者疗效较好^[1-3]。目前有报道^[1-9]应用于临床的干细胞有脐血干细胞、自体骨髓干细胞、外周血造血干细胞等,脐带血所含干细胞在数量和质量上明显优于骨髓血和外周血所含干细胞,研究^[10,12-15]证实脐带血造血干细胞比骨髓和动员外周血来源的造血干细胞更原始、更具有自我更新、增殖分化和体外扩增潜能。周汉超等^[10]报道分离后的脐血干细胞的CD34⁺、CD38⁺数量明显多于骨髓血干细胞。据报道脐带血中的CD34⁺细胞所占比例与骨髓相似,但在质量上,脐血CD34⁺细胞体外长期培养中的CD34⁺CD45⁺细胞明显高于骨髓,CD34⁺CD38⁻和CD34⁺CD33⁻细胞在脐血中的比例均高于骨髓,而且脐血CD34⁺CD38⁻细胞的增殖分化能力高于骨髓^[12,13]。存在于脐血中CD34⁺CD38⁻细胞群中的人SCID小鼠再植细胞远高于骨髓和细胞因子动员后的外周血^[13]。此外,脐带血中造血干/祖细胞的含量及增殖能力也均高于骨髓^[15]。这些原因可能即是为何少量脐带血可以替代大量的骨髓来满足临床的移植需要。

据文献^[10]报道脐血干细胞治疗失代偿期肝硬化患者后,其临床症状和体征改善的患者例数明显高于骨髓干细胞治疗后,但亦有报道^[11]显示两组患者治疗效果相似,差异无统计学意义。本研究使用脐带血和骨髓血干细胞治疗患者59例,比较两组在疗效方面有无差异。结果发现两组患者在临床上均取得较好疗效,且在临床症状改善方面相似;脐血组生物化学指标改善方面优于骨髓组,但两组差异无统计学意义。不同的研究者报道的疗效间有所差异,可能与所选取的患者特征、抽取的骨髓量、脐血量、分离的方法、所得细胞数量等因素不同有

表2 两组患者治疗8周肝功能、PTA和AFP的比较($\bar{x} \pm s$)

		ALB (g/L)	PTA (%)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBil (μ mol/L)	AFP (ng/L)
骨髓组 (n=31)	治疗前	26.8 \pm 7.0	49.6 \pm 15.1	51.4 \pm 12.0	55.4 \pm 13.2	39.4 \pm 15.0	8.6 \pm 3.9
	治疗后	34.8 \pm 6.3 ^a	54.38 \pm 13.8 ^b	43.2 \pm 13.8 ^c	50.8 \pm 14.2 ^d	34.5 \pm 14.7 ^e	10.0 \pm 3.1 ^f
脐血组 (n=28)	治疗前	25.9 \pm 7.8	44.4 \pm 14.9	50.2 \pm 11.9	53.9 \pm 14.0	40.5 \pm 14.8	9.4 \pm 4.7
	治疗后	36.8 \pm 8.1	57.0 \pm 15.2	46.3 \pm 12.3	49.1 \pm 15.0	31.4 \pm 12.5	8.8 \pm 3.2

注:与脐血组治疗后比较,^a $P=0.075$,^b $P=0.087$,^c $P=0.098$,^d $P=0.125$,^e $P=0.098$,^f $P=0.125$

关。总体来讲,脐血干细胞治疗组的疗效优于骨髓组。这与上述基础研究的结果是一致的。与骨髓和外周血干细胞相比,脐血干细胞纯度较高,无肿瘤细胞污染,其免疫原性较弱,移植物抗宿主病发生率低,具有更强的增殖分化能力,而且成本低廉,从配型到获得细胞时间短,克服了社会伦理和法律问题。而自体骨髓干细胞移植时骨髓穿刺有创伤,患者有不适,且年龄大的肝病患者骨髓质量不好。所以相比骨髓干细胞而言,脐血干细胞更有优势,尤其对于年龄较大的患者行脐带血干细胞治疗可能会更获益。

本研究结果表明,自体骨髓和脐带血干细胞经门静脉注入治疗后,两组患者血清PTA和ALB水平有明显的提升,说明细胞注入后发挥了修复病肝的作用,肝脏合成功能有改善和提高,故患者血清PTA和ALB水平才会升高,但干细胞进入肝脏如何发挥修复作用的具体机制并不清楚。现有研究推测其可能的机制有以下几个方面:①干细胞在肝脏内可能分泌一些细胞因子,这些细胞因子可以促进肝细胞的再生;②在肝脏的微环境下进入肝脏的干细胞通过诱导“归巢”受体将自身融合入肝脏,并逐渐分化为实质肝细胞而发挥修复作用;③干细胞能够产生支持造血的生长因子和重要的细胞-细胞间接触,促进病肝的修复。这将是未来干细胞研究者们需要进一步明确的问题。

参考文献

- [1] 王方,张静,周新人,等.经门静脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化18例疗效观察[J].实用肝脏病杂志,2011,14:200-201.
- [2] Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy[J]. Stem Cells,2006,24:2292-2298.
- [3] 王方,寇俊峰,云升皓,等.两种途径移植自体骨髓干细胞治疗肝硬化患者疗效比较[J].临床肝胆病杂志,2013,29:844-847.
- [4] Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, et al. Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study[J]. Transplant Proc,2008,40:1140-1144.
- [5] Tang XP, Yan X, Tan H, et al. Clinical and experimental study on therapeutic effect of umbilical cord blood transplantation on severe viral hepatitis[J]. World J Gastroenterol,2003,9:1999-2003.
- [6] 高远征,贾素华,刘玉英,等.异基因脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的疗效观察[J].临床肝胆病杂志,2010,26:613-617.
- [7] 陈海鸥,胡小宜,刘洪娟,等.脐血干细胞移植治疗肝硬化的疗效观察[J].肝脏,2010,15:81-83.
- [8] 杨华强,王云甫,杜玲,等.脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的临床疗效[J].现代生物医学进展,2010,10:4497-4499.
- [9] 王方,张俊,周一鸣,等.自体骨髓干细胞移植治疗终末期肝病15例疗效观察[J].中国肝脏病杂志(电子版),2008,1:24-27.
- [10] 周汉超,刘黎,周健,等.骨髓、脐血干细胞中淋巴细胞和单核细胞与CD34、CD38亚型细胞百分比在治疗肝硬化中的比较[J].中华临床医师杂志(电子版),2011,5:1731-1733.
- [11] 李翠莹,赵景兰,张利,等.脐血与自体外周血干细胞移植治疗肝硬化腹水的疗效比较[J].中国输血杂志,2010,23:182-184.
- [12] 韩忠朝.造血干细胞的血管分化及其在肢体缺血性疾病中的治疗作用[J].中国医学科学院学报,2005,27:782-785.
- [13] Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT. A functional comparison of CD34⁺CD38⁻ cells in cord blood marrow[J]. Blood,1995,86:3745-3753.
- [14] Bhatia M, Wang JG, Kapp U, et al. Purification of primitive human hematopoietic capable of repopulating immunodeficient mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94:5320-5325.
- [15] Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of potential for transplantation of adults[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1992,89:4109-4113.
- [16] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].中国肝脏病杂志(电子版),2011,3:40-56.

收稿日期: 2013-12-28