

# 骨髓干细胞移植与肝硬化

刘浏<sup>1</sup>, 贾柳萍<sup>1</sup>, 杨冬华<sup>2</sup> (1. 南方医科大学附属南海医院 消化内科, 佛山市 528200; 2. 澳门科技大学基金会科大医院, 澳门 510630)

肝硬化(liver cirrhosis)是由多种病因引起的肝脏慢性进行性、弥漫性病变,是在肝细胞广泛变性和坏死基础上,肝脏纤维组织弥漫性增生并形成再生结节和假小叶,导致正常肝小叶结构和血管解剖破坏。日益加重的门静脉高压症会导致腹水、消化道出血、肝性脑病等一系列严重并发症,最终导致肝功能衰竭<sup>[1]</sup>。原位性肝移植(orthotopic liver transplantation, OLT)被认为是治疗肝硬化的惟一有效手段,但由于肝供体严重缺乏、围手术期风险、术后免疫抑制剂长期使用及移植后肝炎、并发肿瘤、费用高昂以及生存期仍不理想等一系列问题,限制了OLT的广泛应用<sup>[2,3]</sup>。近年来,随着干细胞研究领域的发展及分子生物学和细胞生物工程技术的长足进步,通过干细胞移植治疗肝硬化逐渐成为研究的热点,干细胞移植有望成为替代OLT治疗肝硬化的一条重要途径。

## 1 骨髓干细胞概述

干细胞(stem cells)是指人体中尚未分化的细胞,是一类具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞群体,存在于早期胚胎、骨髓、脐带、胎盘和部分成年人细胞中,常见的干细胞包括胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和成体干细胞(adult stem cell, ASC),后者又可分为骨髓干细胞(bone marrow stem cell, BMSC)、唾液上皮干细胞、神经干细胞、胰腺上皮干细胞等<sup>[4]</sup>。BMSC包括造血干细胞(hemopoietic stem cells, HSC)和间充质细胞(mesenchymal stem cells, MSC),是目前研究最多、来源最为方便的成体干细胞,它可横向分化为多种其他类型的细胞和

组织如神经细胞、心肌细胞、血管内皮细胞及肝细胞等<sup>[4-6]</sup>,有着很强的“因地分化”特性,如在肝脏微环境调节下可生长发育为骨髓源性肝干细胞、肝细胞及胆管细胞,再通过分化增殖长出新的肝脏组织,来修复受损伤的肝细胞,从而为干细胞移植治疗肝硬化提供了理论基础<sup>[7]</sup>。另外,BMSC还具有易采集且能体外大量扩增、体积较小利于进入肝实质区、自体移植而无免疫排斥和不涉及伦理产生道德问题等诸多优势,被认为是最具治疗潜力的供体细胞<sup>[4,8]</sup>。

## 2 骨髓干细胞制备

正常供者在应用造血因子4~6天,通过血细胞分离机采集外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMC),采集物中CD34<sup>+</sup>细胞 $> 2 \times 10^6/\text{kg}$ ,通常可保证快速而稳定的造血重建。BMSC可以通过骨髓、外周血及脐带血中获取,其中经骨髓和外周血是获得自体BMSC的最佳途径<sup>[9]</sup>。Pai等<sup>[10]</sup>对9例酒精性肝硬化行G-CSF动员,采用白细胞分离法采集外周血CD34<sup>+</sup>细胞,体外培养扩增5倍,采集总真核细胞计数达 $2.3 \times 10^8/\text{ml}$ 。Han等<sup>[11,12]</sup>对失代偿期肝硬化患者用同样方法分离PBMC,未经体外培养扩增,收集PBMC达 $10^7 \sim 10^8/\text{kg}$ ,移植后患者后肝功能明显改善。郭晓钟等<sup>[13]</sup>经术前予G-CSF动员,抽取患者骨髓约180~200 ml,采用负筛选法进行BMSC的体外分离及纯化,获取单个核细胞计数 $3.6 \times 10^8 \sim 1.8 \times 10^{11}/\text{ml}$ ,流式细胞仪检测CD34<sup>+</sup>干细胞为 $10^6 \sim 10^9/\text{ml}$ ;曹葆强等<sup>[14]</sup>术前未予G-CSF动员,用同样方法从骨髓中获得单个核细胞总数为 $(0.46 \sim 2.76) \times 10^8/\text{ml}$ ,平均为 $(8.6 \pm 3.7) \times 10^7/\text{ml}$ ,移植入肝后均取得了较好的疗效。但采用血细胞分离机收集PBMC操作更

为简便、迅速,经动员后采集的干细胞数远远高于治疗有效量,且无多部位骨髓穿刺的痛苦和不便,易为患者所接受,值得推广应用。

### 3 骨髓干细胞移植途径

BMSC可通过体内转化、体外诱导两种方式向肝系细胞分化,前者包括异体移植和自体移植,后者包括直接诱导和分选后诱导,体外诱导及异体移植主要见于细胞及动物实验研究。目前,BMSC治疗肝硬化的临床研究多数采用自体移植途径如经门静脉、肝动脉、脾静脉及脾内移植、肝内局部注射、外周静脉、腹腔注射等<sup>[15]</sup>。研究发现,经脾静脉及脾内移植、肝内局部注射、外周静脉、腹腔注射等途径虽具有操作简单、迅速等优点,但到达肝内的干细胞数量有限、疗效不确切,且有引起出血及腹腔感染的危险,已逐渐被淘汰。而介入经门静脉或肝动脉移植虽然操作较复杂,但到达肝内的干细胞数量较多、疗效确切,移植入肝后不会引起栓塞等并发症,已成为临床最常见的移植途径<sup>[15]</sup>。曹葆强等<sup>[14]</sup>建立“门静脉导管-皮下药盒系统”为多次移植及化疗提供了一个新途径,通过外科技术,在胃网膜右静脉插入防返流静脉导管至门静脉开口处,导管另一端经腹壁穿至皮下,与相应药盒相连接,穿刺药盒注入造影剂证实造影剂顺利进入肝脏后,缝合固定药盒于皮下,作为日后行干细胞移植及化疗的通道。然而,由于肝硬化患者肝内再生结节形成,使血管受压扭曲变形、狭窄甚至闭塞,导致移植入肝后的干细胞分布不均匀,且门静脉注射可加重门静脉高压;而肝动脉强大压力及快速回流使干细胞定植困难。因此,干细胞在肝脏存留及定植的最佳移植途径仍需更多研究以进一步优化。

### 4 骨髓干细胞移植后疗效评价

目前,国内外干细胞移植治疗肝硬化的动物实验及临床前探索研究显示其疗效仍存在一定争议。国内多数小样本的临床报道其疗效可靠,值得进一步推广应用。姚鹏等<sup>[16]</sup>抽取患者骨髓,分离单个核细胞,经肝动脉移植入患者肝内,治疗失代偿期肝硬化患者30例,术后随访12

周,ALT、总胆红素和白蛋白等肝功能指标均得到明显改善,凝血酶原活动度也有不同程度的升高。郭晓钟等<sup>[13]</sup>用同样方法治疗失代偿期肝硬化患者78例,术后随访发现患者临床症状和体征、实验室指标(如ALT、白蛋白、凝血酶原时间、纤维蛋白原等)、Child-Pugh分级评分均得到明显改善,而无明显感染、肝区疼痛、出血等并发症的发生。Han等<sup>[12]</sup>将40例乙型肝炎后肝硬化患者随机分为移植组和对照组,治疗前均予G-CSF动员,移植组通过白细胞分离法分离和收集外周血单个核细胞(PBMC),再经肝动脉介入将PBMC移植入患者体内,随访6个月后发现,2组患者肝脏合成功能指标(白蛋白和凝血酶原时间)均较前明显改善,但酶学指标(ALT、AST)和胆红素无明显变化( $P > 0.05$ ),与对照组相比,移植组患者临床症状体征(腹水消退情况)和肝功能改善(白蛋白增高、Child-Pugh评分降低)更为明显( $P < 0.05$ ),2组治疗前后患者的HBV病毒载量无明显改变,随访结束2组均有3例患者死于肝硬化并发症,与PBMC移植治疗无关。在国外,BMSC应用于肝硬化的研究同样方兴未艾,但临床研究结果存在较大争议。英国学者Pai等<sup>[10]</sup>对9例酒精性肝硬化患者采集外周血CD34<sup>+</sup>细胞,并在体外培养扩增,移植后随访,所有患者均完成治疗,未见明显不良反应发生,患者肝功能如白蛋白、ALT、AST等均得到明显改善,7例患者Child-Pugh评分降低,5例患者腹水减少,认为外周血CD34<sup>+</sup>细胞治疗酒精性肝硬化安全有效,值得进一步扩大临床研究。而Mohamadnejad等<sup>[17]</sup>从4例失代偿期肝硬化患者骨髓中收集约 $(3 \sim 10) \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>细胞,经肝动脉介入移植,随访发现仅有1例患者肝功能(白蛋白、凝血酶原时间)和MELD评分得到改善,并有1例患者出现放射性肾炎和肝肾综合征,最终死于肝衰竭,认为经肝动脉介入移植CD34<sup>+</sup>细胞治疗失代偿期肝硬化并不安全,可能导致一系列严重的并发症。因此,干细胞移植治疗肝硬化的疗效需谨慎评估,其长期有效性和安全性还需长时间的随访、更大样本的临床随机对照研究来证实<sup>[18]</sup>。

## 5 骨髓干细胞治疗肝硬化的可能机制

目前, BMSC治疗肝硬化的研究日益增多, 其抗肝纤维化作用已得到证实, 但具体作用机制仍未完全明确。研究认为可能涉及细胞融合、转分化为肝细胞、启动内源性肝细胞增生及促进肝脏胶原基质降解等方面。其中, 转分化为肝细胞及促进肝脏胶原基质降解机制可能占主导地位。1999年Petersen等<sup>[19]</sup>最早提出大鼠骨髓中可能含有能够分化为肝潜能的干细胞-肝卵原细胞, 并能够进一步分化为肝细胞和胆管上皮细胞。随后, 英国科学家Theise等<sup>[20]</sup>在人类证实了该现象的发生, 研究者用性染色体杂交法在接受男性骨髓或全肝移植的女性患者肝脏标本中检测到了Y染色体阳性的肝细胞和胆管细胞, 且丙型肝炎合并胆汁淤积性肝硬化的肝移植患者肝脏中该Y染色体阳性的细胞比例更高, 结果表明骨髓来源的干细胞可归巢到肝脏, 向肝细胞分化。而Mctaggart等<sup>[21]</sup>通过对CCl<sub>4</sub>诱导的小鼠肝硬化模型和无肝硬化对照组, 从尾静脉移植经绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的BMSC, 4周后研究组有25%的肝脏细胞是GFP阳性标记细胞, 而对照组无GFP阳性标记细胞出现, 骨髓移植组的血清白蛋白明显高于非骨髓移植组, 从而进一步证实BMSC可分化为肝细胞, 且肝纤维化环境是其分化的适宜环境。肝纤维化是肝脏中胶原蛋白等细胞外基质增生与降解失去平衡, 导致肝脏内纤维结缔组织异常沉积的病理过程, 干细胞可能通过释放增殖因子或促进纤维组织降解来阻滞肝纤维化的进展, 而多种细胞因子和生长因子如IL-10、TNF- $\alpha$ 、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等可加强BMSC在肝内定植与分化, 促进肝脏再生和修复, 抑制肝脏炎症反应、促进细胞外基质降解, 从而改善肝脏炎症及纤维化程度<sup>[22,23]</sup>。Higashiyama等<sup>[24]</sup>将雄性鼠的MSC移植入肝纤维化鼠, 移植后肝脏I型胶原基因表达减少, 血清羟脯氨酸浓度减低, 肝脏纤维化及肝功能明显改善。然而, 最近有研究<sup>[25]</sup>指出, 骨髓干细胞能促进肝脏内具有瘢痕形成功能的肝星状细胞和肌成纤维细胞的形成, 移植入肝纤维

化患者或小鼠体内的BMSC更倾向于分化为少量上述两种细胞而非肝细胞, 在慢性肝损伤条件下能被激活, 潜在的促进肝纤维化发展。因此, BMSC治疗肝病的研究必须警惕加剧肝纤维化形成的可能。

## 6 总结

迄今为止, 国内外大多研究证实, BMSC移植能有效改善受损肝的肝功能和纤维化, 为众多肝纤维化及肝硬化患者带来曙光, 被认为是最具应用前景的治疗措施之一。但其具体作用机制仍未完全明确, 需要深入研究和探讨, 且干细胞移植真正应用于临床还有一系列问题需要解决, 如移植的规范和标准化方案(包括移植细胞的种类、剂量、移植的最佳时机及途径)、如何提高移植后肝细胞的转化率、移植后远期效果观察, 特别是移植后的干细胞是否会加重肝纤维化及分化为肿瘤细胞等仍需密切关注。相信不久的将来, 随着上述问题的解决, 干细胞必将为肝硬化的治疗开辟一片新天地。

## 参考文献

- [1] Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis[J]. Lancet, 2008, 371: 838-851.
- [2] Popov Y, Schuppan D. Targeting liver fibrosis: strategies for development and validation of antifibrotic therapies[J]. Hepatology, 2009, 50: 1294-1306.
- [3] Biselli M, Gramenzi A, Del Gaudio M, et al. Long term follow-up and outcome of liver transplantation for alcoholic liver disease: a single center case-control study[J]. J Clin Gastroenterol, 2010, 44: 52-57.
- [4] Burt RK, Loh Y, Pearce W, et al. Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases[J]. JAMA, 2008, 299: 925-936.
- [5] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement[J]. Cytotherapy, 2006, 8: 315-317.
- [6] Srivastava D, Ivey KN. Potential of stem-cell-based therapies for heart disease[J]. Nature, 2006, 441: 1097-1099.
- [7] Cantz T, Manns MP, Ott M. Stem cells in liver regeneration and therapy[J]. Cell Tissue Res, 2008, 331: 271-282.
- [8] Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution[J]. Cell, 2000, 100: 157-168.
- [9] Saulnier N, Campli CD, Zocco MA, et al. From stem cell to solid organ. Bone marrow, peripheral blood or umbilical cord blood as favorable source?[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2005, 9: 315-324.

- [10] Pai M, Zacharoulis D, Milicevic MN, et al. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34<sup>+</sup> cells into patients with alcoholic liver cirrhosis[J]. Am J Gastroenterol, 2008, 103: 1952-1958.
- [11] Yan L, Han Y, Wang J, et al. Peripheral blood monocytes from patients with HBV related decompensated liver cirrhosis can differentiate into functional hepatocytes[J]. Am J Hematol, 2007, 82: 949-954.
- [12] Han Y, Yan L, Han G, et al. Controlled trials in hepatitis B virus-related decompensate liver cirrhosis: peripheral blood monocyte transplant versus granulocyte-colony-stimulating factor mobilization therapy[J]. Cytotherapy, 2008, 10: 390-396.
- [13] 郭晓钟, 王迪, 邵晓冬, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化[J]. 中华消化杂志, 2009, 29: 433-436.
- [14] 曹葆强, 林继宗, 钟跃思, 等. 自体骨髓细胞经门静脉移植治疗肝硬化与肝功能不全的临床研究[J]. 中华普通外科杂志, 2007, 22: 386-389.
- [15] Xu YQ, Liu ZC. Therapeutic potential of adult bone marrow stem cells in liver disease and delivery approaches[J]. Stem Cell Rev, 2008, 4: 101-112.
- [16] 姚鹏, 胡大荣, 王帅, 等. 人自体骨髓干细胞移植治疗慢性肝功能衰竭的研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13: 941-942.
- [17] Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, et al. Phase I human trial of autologous bonemarrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13: 3359-3363.
- [18] Lorenzini S, Andreone P. Stem cell therapy for human liver cirrhosis: a cautious analysis of the results[J]. Stem cells, 2007, 25: 2383-2384.
- [19] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells[J]. Science, 1999, 284: 1168-1170.
- [20] Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans[J]. Hepatology, 2000, 32: 11-16.
- [21] McTaggart RA, Feng S. An uncomfortable silence em leader while we all search for a better reporter gene in adult stem cell biology[J]. Hepatology, 2004, 39: 1143-1146.
- [22] Schmidt U, Abramova A, Boucheron N, et al. The protein tyrosine kinase Tec regulates mast cell function[J]. Eur J Immunol, 2009, 39: 3228-3238.
- [23] Oyagi S, Hirose M, Kojima M, et al. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4-injured rats[J]. J Hepatol, 2006, 44: 742-748.
- [24] Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice[J]. Hepatology, 2007, 45: 213-222.
- [25] Russo FP, Alison MR, Bigger BW, et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis[J]. Gastroenterology, 2006, 130: 1807-1821.

收稿日期: 2010-03-24

## • 消息 •

## 本刊加入“万方数据——数字化期刊群”的声明

为了适应科技期刊的发展趋势和我国信息化建设的需要,扩大学术交流渠道,实现期刊编辑、出版工作的网络化,本刊现已入网“万方数据——数字化期刊群”,被“中国核心期刊(遴选)数据库”收录,并通过万方数据资源系统及其镜像系统等对外提供信息服务,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。凡作者不同意文章被收录,请另投他刊或在来稿时向本刊声明,本刊将作适当处理。

“万方数据——数字化期刊群”是国家“九五”重点科技攻关项目。本刊全文内容按照统一格式制作,读者可上网查询浏览本刊内容,并征订本刊。