

文章编号: 1004-0374(2010)04-0367-05

骨髓间充质干细胞移植治疗终末期肝病: 现状与前景

赵磊, 曲强*, 卫金花, 何小东

(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院基本外科, 北京 100730)

摘要: 应用骨髓间充质干细胞及其分化来源的肝细胞移植来改善肝功能、桥接肝脏器官移植的治疗方法具有许多优势。目前已有实验研究和小规模临床实践运用这一方法, 但是其临床疗效尚需评估, 同时治疗机制也需要进一步探讨。该文就目前骨髓间充质干细胞分化为肝细胞及应用的临床和基础研究现状进行综述, 对存在的问题及发展前景进行探讨。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 肝细胞; 移植; 肝病

中图分类号: Q813; R512.6 **文献标识码:** A

Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for end-stage liver diseases: current status and perspectives

ZHAO Lei, QU Qiang*, WEI Jin-hua, HE Xiao-dong

(Department of General Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

Abstract: The transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC) and/or MSC-derived hepatocytes can be used to ameliorate liver function and to be a bridge to liver transplantation, and has many advantages. Currently a few clinical trials and experimental research have made progress, however, the curative effect and mechanism need to be evaluated. This review focuses on recent development of hepatocyte differentiation from MSC and its use in cell transplantation. Moreover, problems and perspectives associated with the cell transplantation are discussed.

Key words: bone marrow; mesenchymal stem cell; hepatocyte; transplantation; liver disease

肝脏是维持体内合成与分解代谢、解毒、胆汁分泌、免疫及激素调节等功能稳定的重要器官。因此, 多种原因引起的肝脏功能衰竭临床病死率高, 是临床治疗中至今尚未克服的难题。异体肝脏移植是目前治疗终末期肝病的最有效手段, 移植后长期生存率可达70%~85%^[1]。但是, 有限的肝脏供体远远不能满足临床需求, 有报道, 等待肝移植的患者在等待期病死率达15%。目前针对肝功能衰竭的其他治疗方法有通过膜滤或树脂交换作用的体外人工肝、体外应用同种或异种肝细胞的生物人工肝, 以及体内肝细胞移植等。近年来, 肝细胞移植作为改善肝功能、桥接肝移植的治疗方法已越来越被人们所认识, 已有实验研究和大规模临床实践

开展。我们在极限肝切除动物实验中也证实骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)分化来源的肝细胞移植可以降低死亡率, 改善肝功能^[2]。

在应用MSC及其分化来源的肝细胞进行移植的研究中, 很多问题尚存疑问, 如MSC向肝细胞分化的表型标准; 何种分化程度为移植的最佳时机; 细胞移植的临床适应症; 如何检测受体肝脏内移植细胞的状态和功能; 排斥反应及其他副作用等。干细胞被定义为具有多向分化潜能和自我更新的细

收稿日期: 2009-09-28; 修回日期: 2009-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871427)

*通讯作者 Tel: 010-88068082; E-mail: qiangqu@hotmail.com

胞。除胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)外,目前研究表明,可以用于治疗各种肝病的细胞来源有成熟肝细胞及可分化为肝细胞的其他干细胞,后者包括肝源性和非肝源性干细胞。肝源性干细胞主要指位于汇管区的卵圆细胞。非肝源性干细胞主要来源于骨髓MSC、脐带血干细胞、胰腺上皮干细胞等^[3,4](图1)。本文仅对肝外源性骨髓MSC临床应用的可能性及应用前景等相关问题做重点论述。

1 骨髓MSC临床应用现状

应用成熟肝细胞移植治疗遗传代谢性疾病已有十余年历史,大多数临床病例可以看到症状改善,并维持一年以上,但对于急慢性肝功能衰竭患者,应用肝细胞移植或结合肝细胞的生物人工肝治疗的疗效尚不肯定。成熟肝细胞来源有限,很大程度限制了其应用。而以干细胞为来源的细胞移植相比成熟肝细胞有许多优势。首先,肝外干细胞,如骨髓MSC来源相对丰富,既可取自自体,又可自体取用,且可多次重复采取;其次,干细胞的特性决定其具有较强增殖和保持功能状态能力,分化后具有多种治疗潜力。

应用骨髓MSC治疗肝病的临床实验近两年来已有小量病例报道。Terai等^[5]选择9例肝硬化患者抽取其自体骨髓,将未分选的单核细胞经外周静脉

回输,发现在24周的观察期内,患者血浆白蛋白、总蛋白水平提高。Mohamadnejad等^[6]采取抽取自体骨髓体外培养的方法,将富含干细胞标记的细胞亚群回输治疗4例等待肝移植患者,所有患者在等待期内存活,1年内MELD评分有所改善。Lyra^[7]分离骨髓单个核细胞自体回输10例慢性肝病患者,发现患者血清总胆红素下降,白蛋白升高。在一组非双盲随机对照临床实验中,30例患者被随机分为细胞治疗组和安慰剂组,细胞治疗组采用自体回输骨髓单个核细胞。90d的随访观察发现,治疗组较安慰剂组白蛋白水平升高,Child-Pugh评分下降,提示骨髓干细胞治疗明显有益于晚期肝硬化患者^[8]。

以往动物实验显示部分肝切除后应用粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)可以促进肝再生,其机制可能与血液中CD133⁺或CD34⁺细胞动员有关。已有证据显示体外培养G-CSF动员后人CD133⁺细胞可表达肝细胞特异性标志物^[9]。为进一步验证CD133⁺细胞对肝再生的促进作用,am Esch等^[4]在选择性栓塞门静脉的同时,回输自体骨髓分离的CD133⁺细胞,发现细胞移植组非栓塞部分肝脏体积明显增大,患者可以尽早耐受和接受肝切除手术。这一结果提示骨髓细胞经动员后部分细胞亚群有加速向肝细胞分化潜能。

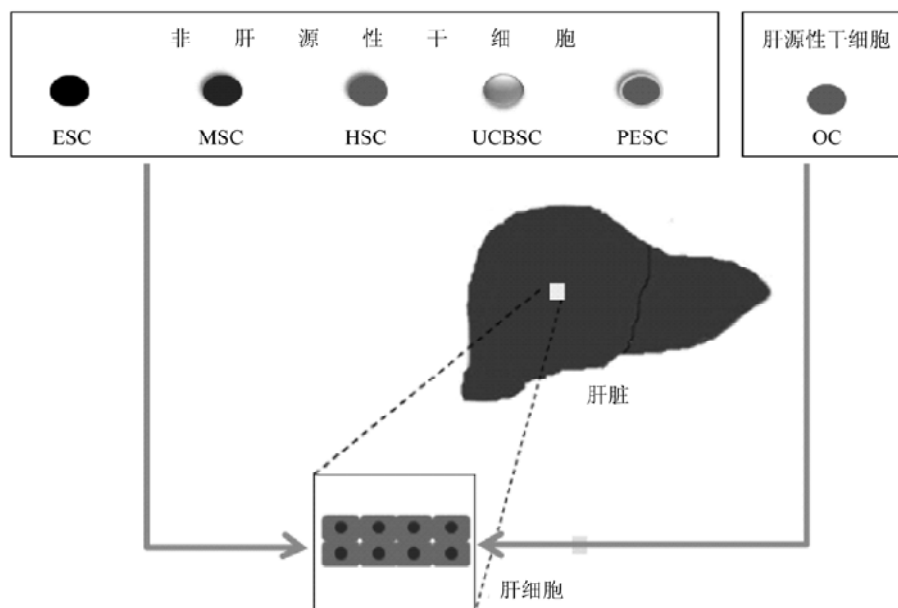


图1 可用于治疗终末期肝病的移植干细胞来源

MSC: 间充质干细胞; HSC: hematopoietic stem cells, 造血干细胞; ESC: 胚胎干细胞; PESC: 胰腺上皮干细胞; UCBSC: 脐带血干细胞; OC: 卵圆细胞。

虽然骨髓MSC移植已在临床小规模开展,但对其取得的临床疗效尚需谨慎评价。首先,由于慢性肝病临床过程有波动,而细胞移植后治疗观察期较短,不排除有安慰剂影响;其次,目前多数研究为小样本研究,缺乏相应对照;再次,对移植细胞产生疗效的机制尚不清楚,具有某些特异表型的细胞亚群的作用有待明确;最后,在细胞移植过程中的其他辅助治疗,如透析、输注白蛋白等,对临床疗效亦有影响。总之,为确切回答细胞移植的安全性和有效性,临床实验必须符合一般研究标准,即实验设计必须符合随机、对照、双盲要求。同时,应进一步加强细胞治疗的机制研究。

2 应用骨髓MSC移植主要机制

2.1 骨髓MSC的分化

2000年,Alison等^[10]在9位曾经移植了男性骨髓细胞的女性患者肝脏内发现了Y染色体阳性的肝细胞,揭示了骨髓干细胞在人体内可以分化为肝细胞的潜能。在随后的几年中,体内体外实验均证明在适当条件下,骨髓MSC可以分化为肝细胞样细胞。这些分化细胞表现成熟肝细胞的形态和特征,如表达肝细胞特异性基因,具有合成和分泌白蛋白、储存糖原、代谢尿素及解毒功能等。应用克隆化人骨髓MSC进行异种移植时,发现MSC中某些特殊细胞亚群具有向肝细胞分化特质^[11,12]。但是,骨髓MSC来源的肝细胞在分化过程中经历了多少阶段,其详细分化进程目前尚不清楚。我们在体外将MSC诱导向肝细胞分化过程中发现,在肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等生长因子刺激下,分化早期细胞首先表达肝细胞特异性转录因子肝细胞核因子-4 α (hepatocyte nuclear factor-4 α , HNF-4 α),其表达具有时间依赖性。HNF-4 α 的表达促进下游成熟肝细胞标志物的表达^[13],而在阻断HNF-4 α 后,肝细胞分化受到显著抑制。除此之外,对于分化肝细胞样细胞的特征鉴定尚需统一。目前认为,成熟肝细胞鉴定除应包括肝细胞相对特异因子在核酸和蛋白水平的表达外,还应注重对肝细胞合成蛋白及各种酶的功能测定。在形态学方面,应注重肝细胞微结构特征,如细胞膜和细胞内极化结构及功能等^[14]。

2.2 移植条件

骨髓MSC或其分化来源的肝细胞样细胞的临床移植方法远未统一。如前所述,细胞来源选择上有未经分选的骨髓单个核细胞、经分选的CD133⁺细

胞,以及体外培养扩增后的具有肝细胞特征的肝细胞样细胞。在移植细胞数量方面,多采用一次性输入 $10^6 \sim 10^9$ 个细胞^[3,15]。在移植输入途径方面,多选择经肝动脉或经外周静脉,有报道在行门静脉栓塞时先行细胞移植^[4]。由于各组报道临床病例数量有限,目前尚无条件比较各种方法的优势,但大多数患者均可耐受移植治疗。

2.3 移植细胞的旁分泌功能

越来越多的证据显示移植的骨髓MSC可以对内源性肝细胞产生旁分泌影响。由于肝硬化等肝病原因,内源性肝细胞在反复再生修复刺激下增生能力衰竭,肝纤维化时I型胶原富集进一步抑制肝细胞再生^[16,17]。研究表明,移植的骨髓MSC通过释放促细胞增生因子和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)刺激内源性肝细胞再生^[18,19],同时,骨髓MSC中其他干细胞亚群,如内皮祖细胞等可能释放促血管生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及胶原降解因子(如MMP-2, -13)等协助^[19,20]。Poll等^[21]发现在不移植细胞情况下,单纯输入培养骨髓MSC的条件培养基可以刺激肝细胞再生,抑制肝细胞凋亡,提示骨髓MSC移植对于肝损伤的治疗作用不但可以通过细胞本身的存在发挥功能,也可通过细胞分泌的可溶性因子实现。Parekkadan等^[22]在暴发性肝衰竭动物实验中发现,应用骨髓MSC条件培养基后动物的死亡率明显减少。这可能是骨髓MSC移植发挥临床疗效的重要机制。

2.4 细胞移植后评价

目前骨髓MSC或肝细胞样细胞移植临床报道的随访时间多在一年以内,现有肝功能改善评价方法主要包括Child-Pugh和MELD评分、血液生化指标、吲哚靛青绿滞留实验等。甲胎蛋白、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen)、TNF、IL-6和IL-10等被用来评价肝脏再生程度^[23]。肝穿刺活检后组织学检查对评价肝再生及移植细胞状态有重要意义。若干无创或微创活体内移植细胞示踪方法已有应用,如Y染色体探查应用于不同性别间细胞移植,ALU序列探查应用于不同种属间移植,以及应用cre-Lox方法结合绿色荧光蛋白标记细胞显像等。放射性同位素标记细胞移植后,应用核素显像或PET-CT方法等已在临床有所报道^[24]。这些方法的确立可在不同程度上说明移植细胞的存活和增殖情况,同时,为进一步评价骨髓MSC移植对于肝脏再生和功能恢复的作用提供依据。

2.5 免疫问题

目前对异体肝干细胞移植后的机体免疫反应尚无详细研究。自体骨髓MSC或肝细胞样细胞移植由于不具免疫源性,是最理想的移植细胞来源。但是,对于急性肝衰等情况输注异体来源细胞也许是不可避免的。在进行异体细胞移植时,传统应用免疫抑制剂抑制机体的排异反应。近年来发现,移植细胞,如经冻存或体外培养,其免疫源性可能下降。另外,细胞在体外准备的过程中,利用基因技术调控相关基因表达或利用载体在移植肝细胞内导入外源基因以调控抗排斥反应等方法已有报道。Okada等^[25]利用表达IL-10的病毒载体体外修饰供体肝细胞,移植后可以缓解受体体内T细胞介导的免疫排斥反应,供体肝细胞的存活期明显延长,接近自体肝细胞移植的效果。Reddy等^[26]将载有细胞毒性T淋巴细胞A4免疫球蛋白的重组腺病毒体外修饰供体肝细胞,移植后有效抑制CD8⁺T细胞介导的排斥反应,使移植肝细胞存活时间明显延长,肝细胞活性增强。在发生急慢性移植植物抗宿主反应(graft-versus-host disease, GVHD)时, Ringdén等^[27]移植骨髓MSC后有效的抑制了急性胃肠道GVHD,生存率较对照组明显延长。Kawai等^[28]在行HLA单个单倍体不匹配肾脏移植时同时移植骨髓MSC,发现部分患者可在9~14个月后中断所有的免疫抑制治疗,而肾功能在移植后2~5年期间维持稳定。Streetz^[29]等在肝细胞移植前先行骨髓MSC移植,发现与对照组比较,移植骨髓MSC组肝细胞再生显著增加,其机制可能与骨髓MSC中CD4⁺细胞参与有关。上述研究均从不同侧面提示基因修饰的可行性和有效性,为临床预防和治疗免疫排斥提供了新的思路。

3 总结和展望

骨髓MSC的成功分离及向肝细胞分化的潜能为细胞移植治疗终末期肝病展现了崭新的前景。骨髓MSC分化来源肝细胞不但是对其他来源细胞,如脂肪细胞、脐带血细胞、iPS(induced pluripotent stem cell)等分化来源肝细胞用于细胞移植的补充,也为深入探讨细胞移植治疗机制创立了新平台。但是,有关诱导骨髓MSC分化的方法及评价原型的标准、移植细胞的筛选及移植应用时机、移植后受体疗效评价及术后处理等尚未形成共识,骨髓MSC移植治疗的分子机制也远不清楚,更多例数和更完善的临床实验等待尽快开展。尽管如此,已报道的骨髓MSC移植的可期望的疗效为临床肝病治疗打开了新

窗口,对其机制的进一步研究及对移植方法和技术的改进有望极大地改变肝细胞移植的细胞来源短缺现状,给终末期肝病患者的治疗带来新的手段和希望。

[参 考 文 献]

- [1] Stockmann HB, IJzermans JN. Prospects for the temporary treatment of acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 14(2): 195-203
- [2] 曲强, 李秉璐, 李晓斌, 等. 中国医学科学院中国协和医科大学科学年会学术论文集[C]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2007, 436-41
- [3] Dabeva MD, Hwang SG, Vasa SRG, et al. Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(14): 7356-61
- [4] am Esch JS 2nd, Knoefel WT, Klein M, et al. Portal application of autologous CD133⁺ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells*, 2005, 23(4): 463-70
- [5] Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*, 2006, 24(10): 2292-8
- [6] Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, et al. Phase I trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med*, 2007, 10(4): 459-66
- [7] Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, et al. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(7): 1067-73
- [8] Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, et al. A pilot randomized controlled study used to evaluate efficacy of autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with advanced chronic liver disease (abstr). *Hepatology*, 2007, 46(Suppl): 271A
- [9] Gehling UM, Willems M, Dandri M, et al. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J Hepatol*, 2005, 43(5): 845-53
- [10] Alison MR, Poulson R, Jeffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 2000, 406(6793): 257
- [11] Tao XR, Li WL, Su J, et al. Clonal mesenchymal stem cells derived from human bone marrow can differentiate into hepatocyte-like cells in injured livers of SCID mice. *J Cell Biochem*, 2009, 108(3): 693-704
- [12] Pozzobon M, Piccoli M, Ditadi A, et al. Mesenchymal stromal cells can be derived from bone marrow CD133⁺ cells: implications for therapy. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(3): 497-510
- [13] 金晔, 曲强, 周立, 等. 骨髓间充质干细胞向肝细胞分化过程中肝细胞相关转录因子的表达. *中国医学科学院学报*, 2009, 31(3): 330-5
- [14] Sancho-Bru P, Najimi M, Caruso M, et al. Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardise the

- process from bench to bedside? *Gut*, 2009, 58(4): 594-603
- [15] Yannaki E, Anagnostopoulos A, Kapetanios D, et al. Lasting amelioration in the clinical course of decompensated alcoholic cirrhosis with boost infusions of mobilized peripheral blood stem cells. *Exp Hematol*, 2006, 34(11): 1583-7
- [16] Trak-Smayra V, Contreras J, Dondero F, et al. Role of replicative senescence in the progression of fibrosis in hepatitis C virus (HCV) recurrence after liver transplantation. *Transplantation*, 2004, 77(11): 1755-60
- [17] Fassett J, Tobolt D, Hansen LK. Type I collagen structure regulates cell morphology and EGF signaling in primary rat hepatocytes through cAMP-dependent protein kinase A. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(1): 345-56
- [18] Payne C, Samuel K, Pryde A, et al. The impact of bone marrow stem cells on liver fibrosis in critically determined by their route of cell trafficking. *Hepatology*, 2007, 46: 710A
- [19] Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M, et al. Significance and therapeutic potential of endothelial progenitor cell transplantation in a cirrhotic liver rat model. *Gastroenterology*, 2007, 133(1): 91-107
- [20] Taniguchi E, Kin M, Torimura T, et al. Endothelial progenitor cell transplantation improves the survival following liver injury in mice. *Gastroenterology*, 2006, 130(2): 521-31
- [21] van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *In vitro* and *In vivo*. *Hepatology*, 2008, 47(5): 1634-43
- [22] Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS ONE*, 2007, 2(9): e941
- [23] Dinant S, Vetelainen RL, Florquin S, et al. IL-10 attenuates hepatic I/R injury and promotes hepatocyte proliferation. *J Surg Res*, 2007, 141(2): 176-82
- [24] Modo M, Meade TJ, Mitry RR. Liver cell labeling with MRI contrast agents. *Methods Mol Biol*, 2009, 481: 207-19
- [25] Okada Y, Saito S, Fujisawa K, et al. Adenovirus-mediated viral IL-10 gene transfer prolongs survival of xenogeneic spheroidal aggregate-cultured hepatocytes. *Transpl Int*, 2000, 13 (Suppl 1): S485-93
- [26] Reddy B, Gupta S, Chuzhin Y, et al. The effect of CD28/B7 blockade on alloreactive T and B cells after liver cell transplantation. *Transplantation*, 2001, 71(6): 801-11
- [27] Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*, 2006, 81(10): 1390-7
- [28] Kawai T, Cosimi AB, Spitzer TR, et al. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med*, 2008, 358(4): 353-61
- [29] Streetz KL, Doyonnas R, Grimm D, et al. Hepatic parenchymal replacement in mice by transplanted allogeneic hepatocytes is facilitated by bone marrow transplantation and mediated by CD4 cells. *Hepatology*, 2008, 47(2): 706-18