

- [16] Eiseman B, Silen W, Bascom GS, et al. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis[J]. Surg, 1958, 44(5): 854-859.
- [17] Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of clostridium difficile infections[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(3): 529-549.
- [18] Kelly CP, Lamont JT. Clostridium difficile-more difficult than ever[J]. N Engl J Med, 2008, 359(18): 1932-1940.
- [19] Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, et al. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent clostridium difficile infection[J]. Am J Gastroenterol, 2012, 107(7): 1079-1087.
- [20] Khoruts A, Dicksved J, Jansson JK, et al. Changes in the

composition of the human fecal microbiome after bacteriotherapy for recurrent clostridium difficile-associated diarrhea[J]. J Clin Gastroenterol, 2010, 44(5): 354-360.

- [21] van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent clostridium difficile[J]. N Engl J Med, 2013, 368(5): 407-415.
- [22] Agito MD, Atreja A, Rizk MK. Fecal microbiota transplantation for recurrent C difficile infection: ready for prime time? [J]. Cleve Clin J Med, 2013, 80(2): 101-108.

(收稿日期: 2012-12-08 修回日期: 2013-02-21)

· 综 述 ·

脐带间充质干细胞研究现状与临床治疗

王 艳¹, 张晋林², 黄晓兵², 张潇潇³综述, 朱一帆^{4△}审校

(1. 遵义医学院研究生院, 贵州遵义 563000; 2. 四川省人民医院血液科, 成都 610072; 3. 四川省人民医院妇产科, 成都 610072; 4. 四川省人民医院器官移植研究所, 成都 610072)

关键词: 脐带; 间充质干细胞; 临床治疗

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.043

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)18-2161-03

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类起源于中胚层的成体干细胞,可以从骨髓、脂肪、胎盘、脐带血以及脐带中分离出来,具有自我更新、高度增殖和多向分化的潜能。1991年 McElreavey 首次从人脐带华尔通胶(Wharton's jelly, WJ)分离培养出一种具有多项分化潜能的成纤维样细胞,即人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)。hUC-MSCs 比来源于骨髓、胎盘及其他组织的 MSCs 更具有优势。首先,脐带的来源不受伦理争议,并且成本较低;其次, hUC-MSCs 不会引起畸胎瘤,且具有抑癌性。由于 hUC-MSCs 还具有低免疫原性、免疫调节、基质支持、旁分泌、迁移和基因稳定性,故具有良好的临床治疗潜能。

1 hUC-MSCs 的培养与生物学标志

1.1 hUC-MSCs 的培养 可使用全脐带或分离脐带动静脉和羊膜后的华尔通胶分离出 hUC-MSCs。一般采用组织块贴壁培养法和酶消化法,后者又分为单纯胶原酶消化和胶原酶、胰酶双酶消化。酶消化法分离培养 hUC-MSCs 的原代培养时间明显短于组织块贴壁培养法。

1.2 细胞生物学标志 流式细胞检测表明, hUC-MSCs 高度表达 MSCs 相关的细胞表面标志,如 CD13、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 和人类白细胞抗原-1 类分子(HLA-1),低表达造血干细胞相关的细胞表面标志,如 CD45、CD34、CD14、CD19 和 HLA-DR。

2 hUC-MSCs 的分化潜能

大量研究发现 hUC-MSCs 具有强大的分化潜能,能够分化成内胚层、中胚层及外胚层 3 个胚层的细胞。在肝细胞生长

因子、成纤维生长因子联合诱导下, hUC-MSCs 可表达出肝细胞特异性抗原甲胎蛋白、清蛋白,证实 hUC-MSCs 可以分化为肝细胞。同时该研究证实, hUC-MSCs 体外特定条件下可以诱导分化成脂肪细胞和成骨细胞,且可在体外连续传代 40 次以上,形态和表型保持稳定^[1]。

将人 hUC-MSCs 与大鼠胰岛细胞共同培养,在第 3、7、14 天采用放射免疫法检测,发现共培养的 hUC-MSCs 随葡萄糖浓度的增高而分泌的胰岛素量也增加,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测到共培养组有 Pdx-1 基因表达^[2]。该研究又将未诱导的 hUC-MSCs 通过尾静脉移植入糖尿病鼠体内,移植后第 60 天 RT-PCR 检测到病鼠胰腺有人胰岛素基因表达,提示人 hUC-MSCs 具有在体内外的微环境中向胰岛样细胞分化的潜能。

Cho 等^[3]采用次声波振动(SSV)诱导 hUC-MSCs,可使其分化为神经细胞。分化后的细胞表达神经细胞的一些特殊标记,如 MAP2、NF-L 和 NeuroD1。该研究提示 SSV 可能通过激活 ERK 的机制诱导 hUC-MSCs 分化为神经细胞。

3 hUC-MSCs 的研究现状及临床治疗进展

3.1 移植物抗宿主病(GVHD)的治疗 血液病患者接受同种异体造血干细胞移植术后,急性移植物抗宿主病(aGVHD)可导致高病死率。目前,糖皮质激素是 aGVHD 最初治疗的黄金标准。但仅对部分患者有效。有研究报道, MSCs 对 aGVHD 治疗有效^[4]。国内研究者将 40 例 aGVHD 患者分为 hUC-MSCs 组和常规治疗组, hUC-MSCs 组:接受他克莫司加甲氨蝶呤(MTX)+hUC-MSCs 抗 GVHD 治疗,常规治疗组:仅接受他克莫司+MTX 治疗。结果 hUC-MSCs 组治愈率及治疗

有效率均高于常规治疗组 ($P < 0.05$), hUC-MSCs 组起效的平均时间及治愈的平均时间均短于常规治疗组^[5]。

3.2 自身免疫性疾病的治疗 狼疮性肾炎模型小鼠在接受了 hUC-MSCs 输注后 11 周在治疗鼠的肾脏发现人的细胞。该研究认为 hUC-MSCs 移植可能通过抑制 MCP-1 和 HMGB-1 的产生, 有希望成为治疗狼疮性肾炎的一种新方法^[6]。

Liu 等^[7]研究表明, hUC-MSCs 体外可以抑制类风湿关节炎 FLSs 和 T 细胞 (Th1 向 Th2 转化), 并能诱导 Treg 生成, 维持 Treg 的免疫抑制功能。并将 hUC-MSCs 输入 CIA 模型鼠体内证实可以减缓其关节炎的发展, 该研究认为 hUC-MSCs 可能成为治疗类风湿关节炎的一种治疗方法。

Sun 等^[8]对 16 例活动性系统性红斑狼疮 (SLE) 患者进行了同种异体 hUC-MSCs 移植, 结果表明 hUC-MSCs 移植可以减轻 SLE 的活动性, 对其中 15 例伴有狼疮性肾炎的患者可以减少蛋白尿的生成, 改善患者肌酐和尿素氮指标, 并提示 hUC-MSCs 移植 3 个月后外周 CD4⁺ FoxP3⁺ Treg 细胞百分比明显提升。该研究证实同种异体 hUC-MSCs 移植对 SLE 患者治疗有效。

3.3 神经系统疾病的治疗 于靛霞等^[9]将 hUC-MSCs 移植到重症肌无力大鼠中, 发现经静脉输注的 hUC-MSCs 能快速迁移到炎症部位和局部淋巴结, 而且在淋巴结的髓质区也可以检测到人源化的细胞。并发现 hUC-MSCs 与淋巴细胞直接接触能有效抑制 AChR 特异性抗体的分泌, 并且能显著减少 CD4⁺ T 细胞分泌的 IFN- γ 的浓度, 在一定程度上缓解重症肌无力体内的 Th1/Th2 细胞失衡的免疫状态。该研究认为 hUC-MSCs 可能通过相互接触和 (或) 释放细胞因子而调节机体的免疫反应, 为重症肌无力提供了一种潜在的治疗新途径。

杨华强等^[10]对 2 例遗传性痉挛性截瘫患者行 hUC-MSCs 静脉输注和腰穿鞘内注射, 发现移植后患者临床症状改善, 随访 1 年余, 2 例患者的症状持续缓解无复发。说明 hUC-MSCs 移植治疗遗传性痉挛性截瘫近期疗效明显, 可以改善患者的临床症状, 延缓病情的进展。Wang 等^[11]对 51 例经腰椎穿刺鞘内注射 hUC-MSCs 治疗的无智力障碍、近 1 年无明显进展的脑瘫患者, 进行日常生活活动能力 (ADL) 评估。发现治疗前、后 ADL 总分、步行动作、床上运动、认识交流动作得分比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。研究认为 hUC-MSCs 对无智力障碍脑瘫患者治疗有效。

3.4 1 型糖尿病的治疗 有研究证实, hUC-MSCs 可在体外诱导分化后或直接应用以治疗 1 型糖尿病。Wang 等^[12]在体外将 hUC-MSCs 诱导分化为胰岛素分泌细胞, 输注给糖尿病鼠。通过葡萄糖耐受实验发现移植后的小鼠血糖降低, 在小鼠的肝脏检测到人源的 C 肽和细胞核。该实验证实, hUC-MSCs 分化的胰岛素分泌细胞对糖尿病鼠的高血糖症状有改善作用。

于文龙等^[13]选择 6 例病程小于 3 个月的初发 1 型糖尿病患者进行 hUC-MSCs 和胰岛素治疗, 对照组 6 例行单纯胰岛素治疗。随访 9 个月, 干细胞治疗组的空腹血糖、糖化血红蛋白及 C 肽水平都有明显的改善, 而对照组 C 肽水平明显下降, 其他指标变化不明显。该研究提示 hUC-MSCs 治疗初发 1 型糖尿病疗效良好。

hUC-MSCs 用于治疗糖尿病并发症亦有效果。周芬莉等^[14]将 hUC-MSCs 经左后肢沿坐骨神经行程选 4 点肌内注射到链脉佐菌素 (STZ) 诱导糖尿病周围神经病大鼠模型, 发现糖尿病周围神经病大鼠的坐骨神经电生理和病理显著改善, 但干

细胞并未直接参与神经重建, 提示可能通过其他间接途径起作用。

3.5 肝脏疾病的治疗 近几年多项实验已证实间充质干细胞可诱导分化为肝细胞, 并有促进肝细胞再生和抑制肝细胞凋亡的作用。国内研究者对 60 例肝硬化失代偿期 (Child-Pugh B 级、C 级) 患者进行了 hUC-MSCs 移植, 移植 2、4、8、12 周后, 患者血清清蛋白、前清蛋白水平逐渐升高 ($P < 0.05$), 总胆红素、凝血酶原时间明显低于治疗前水平 ($P < 0.05$)^[15]。移植后患者乏力、腹胀、纳差明显好转, 未发生与移植相关的严重并发症。研究认为 hUC-MSCs 治疗终末期肝硬化安全有效, 能改善患者的肝功能、凝血功能及临床症状。Zhang 等^[16]对进行 hUC-MSCs 移植的肝硬化失代偿期患者随访 1 年, 同样证实 hUC-MSCs 移植可以改善患者肝功能、减轻患者腹水症状。

3.6 血液系统疾病的治疗 柴晔等^[17]将人 hUC-MSCs 对 AA 患者外周血单个核细胞 (AA-PBMC) 按不同比例体外共培养, 以 3 色流式细胞仪测定 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg 细胞占外周血 CD4⁺ T 细胞比例, 结果显示 Treg 细胞占外周血 CD4⁺ T 细胞比例明显增加, 差异有统计学意义, hUC-MSC: AA-PBMC 为 10:1 组差异更显著 ($P < 0.01$)。郭鹏等^[18]研究表明脐带来源的华尔通胶间充质干细胞 (Wharton's jelly mesenchymal stem cells, WJCs) 对重型再生障碍性贫血 (SAA) 患者 T 淋巴细胞 (TLCs) 的抑制作用呈剂量依赖性, 通过上调 Foxp3 的表达而发挥 CD4⁺ CD25⁺ 调节性 T 细胞的免疫调节作用可能是其机制之一。Ma 等^[19]将免疫性血小板减少性紫癜 (ITP) 患者的外周血单个核细胞和骨髓单个核细胞分别与 hUC-MSCs 共培养, 结果发现自身反应性 T 和 B 淋巴细胞的增殖和自体血小板的破坏均被 hUC-MSCs 抑制。hUC-MSCs 不仅可以抑制共刺激分子 CD80、CD40 和 FasL 的表达, 而且间接改变 ITP 患者 Th1、Th2、Treg 细胞因子的转向。该项研究还表明 hUC-MSCs 可以逆转功能障碍的巨核细胞, hUC-MSCs 移植可能是一个潜在的治疗 ITP 的方法。Tian 等^[20]体外研究证实 hUC-MSCs 可以通过增强 p38 MAPK 磷酸化达到抑制白血病细胞增殖的作用, 为 hUC-MSCs 治疗白血病提供了一定的理论基础。

3.7 肿瘤疾病的治疗 赵雯红等^[21]研究发现腺病毒介导 IL-12 基因可成功转染 hUC-MSCs 形成 AdIL-12-MSCs, 转染后细胞 IL-12 基因在蛋白及 mRNA 水平均有明显表达。AdIL-12-MSCs 分泌的外源性 IL-12 显著抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖并诱导其凋亡, 并抑制卵巢癌 SKOV3 移植瘤在裸鼠体内的生长 ($P < 0.05$)。

Ma 等^[22]证实 hUC-MSCs 在体内可以显著抑制乳腺肿瘤的生长, 并进一步探讨了机制, 认为 hUC-MSCs 的抑瘤作用可能与细胞周期的阻滞、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制 PI3K 和 AKT 蛋白激酶的活性有关。Wang 等^[23]研究表明 hUC-MSCs 与食管癌细胞人工融合可抑制食管癌细胞生长、增加细胞凋亡和抑制肿瘤的发生; 此外, 表达 *dup6/mkp3* 通路明显增加, 该研究证实融合的 hUC-MSCs 与食管癌细胞可诱导细胞凋亡, 并不是转化成癌症干细胞的途径。Matsuzuka 等^[24]研究表明, IFN- β 基因转染的 hUC-MSCs (IFN- β -hUCMSCs) 可以抑制肺癌 H358 或 SW1573 两种癌细胞的生长, 向这些细胞条件培养基中加入抗 IFN- β 的抗体, 这种抑制消失。向 H358 支气管肺癌模型鼠尾静脉输注 IFN- β -hUCMSCs, 同样证实 IFN- β -hUC-MSCs 可以抑制肺泡癌的生长。卢兆桐等^[25]利用 Lewis 肺癌

动物模型探讨脐带来源的间充质干细胞对肺癌生长及转移的影响。用 16 只 C57BL/6 小鼠分别建立 Lewis 肺癌模型,并随机分为对照组(NS 组)和 MSC 组,每组 8 只。MSC 组分别于接瘤后第 7、12、17 天时尾静脉注射脐带 MSC(1×10^6 /只),在第 21 天时处死全部荷瘤小鼠,结果发现 NS 组和 MSC 组的平均瘤体质量两组相比差异无统计学意义,NS 组和 MSC 组的平均肺转移数分别为(3.75±1.39)个、(1.13±1.13)个,差异有统计学意义,抑制转移率为 70.0%。该研究认为脐带来源的 MSC 对 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌本身的生长无影响,但能够抑制肿瘤的转移。

参考文献:

- [1] 朱华民,张涸. 肝细胞生长因子与成纤维生长因子联合诱导人脐带间充质干细胞向肝样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(45):8811-8816.
- [2] 王爱红,何红燕,罗敏洁,等. 人脐带间充质干细胞向胰岛样细胞的分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(21):4102-4106.
- [3] Cho H, Seo YK, Jeon S, et al. Neural differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells by sub-sonic vibration[J]. Life Sci,2012,90(15-16):591-599.
- [4] von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, et al. Treatment of refractory acute GVHD with thirdparty MSC expanded in platelet lysate-containing medium[J]. Bone Marrow Transplant,2009,43(3):245-251.
- [5] Guo M, Sun Z, Sun QY, et al. A modified haploidentical nonmyeloablative transplantation without T cell depletion for high-risk acute leukemia: successful engraftment and mild GVHD[J]. Biol Blood Marrow Transplant,2009,15(8):930-937.
- [6] Gu Z, Akiyama K, Ma X, et al. Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells alleviates lupus nephritis in MRL/lpr mice[J]. Lupus,2010,19(13):1502-1514.
- [7] Liu Y, Mu R, Wang S, et al. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2010,12(2):210-212.
- [8] Sun L, Wang D, Liang J, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum,2010,62(8):2467-2475.
- [9] 于靛霞,陈芳,孙军,等. 脐带间充质干细胞移植治疗大鼠重症肌无力的研究[J]. 中国实验血液学杂志,2011,19(3):744-748.
- [10] 杨华强,王云甫,李东升,等. 脐带间充质干细胞移植治疗遗传性痉挛性截瘫 2 例[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(1):167-170.
- [11] Wang J, Yin Z, Wen H, et al. Application of umbilical cord mesenchymal stem cells in cerebral palsy treatment: report of 51 cases[J]. Chinese General Practice,2011,14(7):2446-2447.
- [12] Wang HS, Shyu JF, Shen WS, et al. Transplantation of insulin-producing cells derived from umbilical cord stromal mesenchymal stem cells to treat NOD mice [J]. Cell Transplant,2011,20(3):455-466.
- [13] 于文龙,高宏,余霄龙,等. 脐带间充质干细胞移植治疗初发 1 型糖尿病[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(23):4363-4366.
- [14] 周芬莉,张海鸥,吴军,等. 人脐带间充质干细胞治疗糖尿病大鼠周围神经病变的研究[J]. 中风与神经疾病杂志,2011,28(1):21-24.
- [15] 周炳喜,郭俊贤,韩双印,等. 脐带间充质干细胞移植治疗终末期肝硬化的疗效及安全性[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(32):5987-5990.
- [16] Zhang Z, Lin H, Shi M, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients[J]. J Gastroenterol Hepatol,2012,27(2):112-120.
- [17] 柴晔,刘瑛,孙媛媛. 人脐带间充质干细胞对再生障碍性贫血患者 Treg 细胞的影响[J]. 中国免疫学杂志,2011,27(9):837-839.
- [18] 郭鹏,刘传方,赵雯. 人脐带沃顿胶间充质干细胞对重型再生障碍性贫血调节性 T 细胞及 Foxp3 基因的影响[J]. 山东大学学报:医学版,2011,49(1):71-76.
- [19] Ma L, Zhou Z, Zhang D, et al. Immunosuppressive function of mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix in immune thrombocytopenia patients [J]. Thromb Haemost,2012,107(5):937-950.
- [20] Tian K, Yang S, Ren Q, et al. p38 MAPK Contributes to the growth inhibition of leukemic tumor cells mediated by human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Cell Physiol Biochem,2010,26(6):799-808.
- [21] 赵雯红,程建新,史鹏飞,等. 转染 IL-12 基因的人脐带间充质干细胞对卵巢癌细胞的体外增殖和对裸鼠体内移植瘤的抑制作用[J]. 南方医科大学学报,2011,31(5):903-907.
- [22] Ma Y, Hao X, Zhang S, et al. The in vitro and in vivo effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on the growth of breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat,2012,133(2):473-485.
- [23] Wang Y, Fan H, Zhou B, et al. Fusion of human umbilical cord mesenchymal stem cells with esophageal carcinoma cells inhibits the tumorigenicity of esophageal carcinoma cells [J]. Int J Oncol,2012,40(2):370-377.
- [24] Matsuzuka T, Rachakatlal RS, Doi C, et al. Human umbilical cord matrix-derived stem cells expressing interferon-beta gene significantly attenuate bronchioloalveolar carcinoma xenografts in SCID mice [J]. Lung Cancer,2010,70(1):28-36.
- [25] 卢兆桐,李福泉,邹志强,等. 脐带间充质干细胞对 C57BL/6 小鼠 Lewis 肺癌生长及转移的影响[J]. 第二军医大学学报,2012,33(4):355-358.