

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.07.037

网络首发 [https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200212.0814.002.html\(2020-02-12\)](https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200212.0814.002.html(2020-02-12))

多种来源干细胞治疗终末期肝病的研究进展*

何娜娜¹, 张 顺¹, 何丽荣¹, 廖振云¹综述, 史巧芸¹, 蔡 挺², 林 杰^{1△}审校

(1. 中国科学院大学宁波华美医院医学实验部/浙江省消化系统肿瘤诊治及研究重点实验室, 浙江宁波 315100; 2. 中国科学院大学华美医院肝病科, 浙江宁波 315100)

[摘要] 终末期肝病(ESLD)是指由各种慢性肝损伤所造成的肝病晚期阶段,严重时可使肝功能极度减退甚至导致肝衰竭,进而危及生命。目前,肝移植治疗 ESLD 效果显著,但由于供体短缺,手术损伤大,排斥风险高,手术成本高等缺点,限制了其在临床上的应用。因此,在临床上急需找到 ESLD 的治疗手段。此时,干细胞治疗作为一种新疗法进入人们的视野。干细胞由于具有自我更新和多向分化潜能等特性,可用于再生受损的肝组织。近些年,在临床上利用不同来源干细胞治疗肝相关疾病的研究取得了很大的进展,干细胞治疗 ESLD 具有很好的疗效。该文旨在阐述不同来源干细胞在 ESLD 治疗中的进展,提出研究存在的问题并展望未来的应用前景,为临床治疗 ESLD 提供了新的思路。

[关键词] 终末期肝病;干细胞;分化;临床

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)07-1189-05

Research progress of end-stage liver disease treated with stem cells from multiple sources*

HE Nana¹, ZHANG Shun¹, HE Lirong¹, LIAO Zhenyun¹, SHI Qiaoyun¹, CAI Ting², LIN Jie^{1△}

(1. Department of Experimental Medical Science, HwaMei Hospital of University of Chinese Academy of Sciences/Zhejiang Key Laboratory of Diagnosis, Treatment and Research of Digestive System Tumor, Ningbo, Zhejiang 315100, China; 2. Department of Liver Diseases, HwaMei Hospital of University of Chinese Academy of Sciences, Ningbo, Zhejiang 315100, China)

[Abstract] End stage liver disease (ESLD) refers to the advanced stage of liver disease caused by various chronic liver injuries, in severe cases, liver function can be extremely reduced or even liver failure, which is life-threatening. At present, liver transplantation is effective in treating ESLD, but due to shortage of donors, surgical damage, risk of rejection and high cost, its clinical application is limited. Therefore, there is an urgent need to find a treatment for ESLD in clinic. As a new therapy, stem cells can be used to regenerate damaged liver tissue, due to their self-renewal and multi-directional differentiation potential. In recent years, research on stem cells for the treatment of liver-related diseases has made great progress stem cell therapy has a good effect on ESLD. This article aims to illustrate the progress, problems and application prospects of stem cells from multiple sources in the treatment of ESLD, in order to provide new ideas for clinical ESLD treatment.

[Key words] end-stage liver disease; stem cells; differentiation; clinical

终末期肝病(end stage liver disease, ESLD)是急性或慢性肝损伤的最后阶段,通常发展迅速,造成不可逆转的肝衰竭,并伴随门静脉高压、肝性脑病、肝肾综合征等多种高危并发症。目前,在临床上肝移植是治疗 ESLD 效果比较显著的方法。但是该治疗方法存在许多弊端,如供体短缺、手术风险大、移植后出现排斥及手术成本高等,这些缺点很大程度上限制其在临床上的应用。近年来,以干细胞移植为主的细胞治

疗法受到广泛关注,在临床上被认为是最具前景的治疗方法^[1-2]。

干细胞是具有自我更新能力和多向分化潜能的一类细胞,在体外适宜的诱导条件下可以分化形成不同的组织器官。多项研究表明,不同来源的干细胞均可在特定条件下向肝细胞分化,并且形成的细胞具有肝细胞的正常功能,包括合成糖原,分泌尿素和蛋白等^[3-4]。目前临床上用于治疗 ESLD 的干细胞主要

有:胚胎干细胞(embryonic stem cells,ESC)、骨髓衍生的造血细胞(hematopoietic stem cell,HSC)、间充质基质细胞(mesenchymal stem cells,MSC)及人诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells,iP-SC)。这些干细胞均可分化形成肝细胞样细胞(hepatocyte-like cells,HLC),并且这些分化细胞具有成熟肝细胞的形态特征,不仅可以表达肝细胞的特异性基因,而且还具有合成和分泌清蛋白、代谢尿素、解毒和内分泌调节等功能^[5-6],见图1。本文对多种来源干细胞治疗ESLD的国内外研究进行总结分析,为临床上干细胞治疗ESLD提供理论依据。

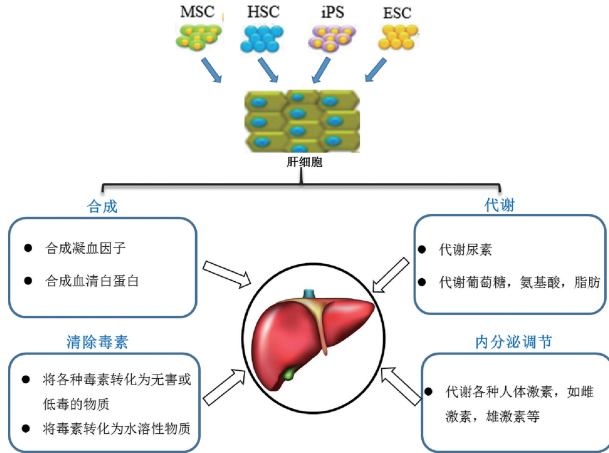


图1 多种干细胞治疗肝病的机制

1 不同来源干细胞用于肝病治疗的临床前研究

1.1 MSC 用于肝病治疗

MSC 是一类具有多向分化潜能的成体干细胞。它存在于多种组织中,其中在骨髓中含量最多,其他组织如脐带、脂肪、胎盘等组织中的含量也较丰富。作为肝病治疗的一种方式,MSC 可以很容易地在体外扩增而不会丧失分化潜能,并且它们也可以迁移到组织器官受损区域以响应归巢信号^[7]。此外,MSC 具有免疫调节特性,通过适应性和先天免疫系统,分泌多种细胞因子,从而促进受损的肝脏再生^[8-9]。因此,MSC 是目前实验和临床上用于肝病治疗研究最广泛的一类干细胞。

已有大量研究证明,啮齿动物和人类 MSC 在体内和体外均可以分化形成 HLC,这是 MSC 治疗肝病的机制之一^[10-11]。因此,MSC 可以解决限制肝细胞移植应用的问题。目前,已有研究证明骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs)、脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)和脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, AT-MSCs)均可在体外分化为 HLC,并且这些分化细胞具有成熟肝细胞的形态特征,不仅可以表达肝细胞的特异性基因,而且还具有合成和分泌清蛋白、代谢尿素和解毒等功能^[12-13]。

KUO 等^[14]研究表明,将 BM-MSCs 移植到四氯化碳(CCl₄)介导的肝损伤小鼠中,使受损肝细胞功能得到有效的恢复,促进肝脏再生;同时研究发现相较于脾内注射,静脉注射方式效果更佳。基于四氯化碳介导的肝纤维化和肝硬化小鼠模型发现,移植 BM-MSCs 在一定程度上可以延缓肝纤维化和肝硬化进程,改善小鼠肝功能指标^[15-16]。

LIN 等^[17]和 YANG 等^[18]将 UC-MSCs 通过尾静脉注射到肝纤维化的小鼠模型中,结果发现移植后小鼠肝组织的细胞角蛋白-18 和清蛋白表达量显著上调,这表明移植 UC-MSCs 能够在一定程度上减轻肝脏纤维化,使肝功能得到改善。此外,研究表明将人 UC-MSCs 移植到肝脏受损的小鼠体内,发现小鼠肝组织中清蛋白、细胞角蛋白-18 染色均呈阳性,并且 HE 染色结果表明肝脏坏死细胞数量减少,这些结果提示人 UC-MSCs 能在肝脏受损部位定植并进一步分化为有功能的肝脏细胞^[19-21]。

与 BM-MSCs 相似,AT-MSCs 在体外适宜诱导条件下分化形成功能性 HLC,衍生的肝细胞可以进入宿主肝脏,从而改善肝功能。SALOMONE 等^[22]研究表明,将 AT-MSCs 体外诱导形成的 HLC,移植到 CCl₄ 肝损伤模型的小鼠体内,发现它们可稳定整合到小鼠肝脏中,并进一步改善肝功能。然而, HUANG 等^[23]研究却发现 AT-MSCs 移植到肝脏 3 d 后并不会分化成肝细胞。尽管研究表明 MSC 对肝病治疗有很好的效果。然而,MSC 由于具有多向分化潜能,移植到体内后由于分化不确定性可能会有移植风险。因此,MSC 对肝病的精确治疗机制尚未得到充分而阐明,需要进一步深入探究。

1.2 HSC 用于肝病治疗

与 MSC 一样,HSC 在骨髓中的含量较为丰富,约占正常成人骨髓有核细胞的 0.35%~1.71%,同时在脐带血、外周血及胎盘中也有一定分布。目前大部分研究主要集中在骨髓 HSC 对肝病的治疗。1999 年 PETERSEN 等^[24]发现在小鼠肝内,骨髓 HSC 不仅可以分化为肝卵圆细胞,而且还可以进一步分化为成熟的肝细胞和胆管细胞。有研究^[25-26]对 CCl₄ 介导的小鼠肝纤维化模型进行正常小鼠骨髓细胞移植治疗,发现骨髓中只有 HSC 能在体内转分化为肝细胞,并在受体内形成供体源造血和肝细胞再生。目前关于骨髓 HSC 治疗肝病的研究不少,但实验研究仍处于基础研究阶段,在临床上的应用需要进一步深入研究。

1.3 ESC 用于肝病治疗

ESC 是早期胚胎(原肠胚期之前)或原始性腺中分离出来的一类细胞,具有无限增殖、自我更新和多向分化等特性,在体外适宜的诱导条件下可分化为肝细胞样细胞,且分化形成的细胞具有成熟肝细胞的某

些特性^[27]。体外培养的 ESC 和 ESC 分化的肝细胞都已被证明表达许多肝细胞相关基因和模拟肝功能^[28]。ESC 分化形成的肝细胞在移植后具有成熟肝细胞和定植肝组织的典型形态,这些衍生的肝细胞样细胞通过细胞替代和旁分泌机制促进受损肝脏的细胞恢复,以刺激内源性再生^[3,29]。目前这方面的研究尽管取得了令人鼓舞的结果,但人类 ESC 的应用一直被免疫排斥和伦理道德等问题所限制。

1.4 iPSC 用于肝病治疗

iPSC 是由日本东京大学 Yamanaka 博士于 2006 年从小鼠成纤维细胞中被重新编程为类似于 ESC 的多能性干细胞;iPSC 的出现避开了伦理方面的争议,因此成为干细胞研究的热点。目前已有大量研究表明 iPSC 可分化形成 HLC^[30-32]。然而,iPSC 衍生的 HLC 显示出极小的活性,仅为原代肝细胞活性的 0.3%~10.0%^[33-34],治疗效果不佳。在动物实验中,移植 iPSC 来源的 HLC 后阻止致死性急性肝衰竭,促进了肝再生,并改善了肝功能^[35]。目前,iPSC 在临床应用上仍存在很多问题有待解决,包括畸胎瘤形成和致癌性,关于免疫原性的争议,长期安全性和有效性,以及最佳重编程和制造过程。

2 干细胞在肝病临床研究的研究

近些年,干细胞被应用于临床上治疗 ESLD 的研究越来越多,并且在实际临床应用中都取得了可观的结果。其中,MSC 在临床上用于治疗肝病的研究比较多。在两项早期临床试验研究中,根据 BM-MSCs 的安全性和短期疗效分为两组,每组 20 例患者,发现与对照组相比少数患者自体注射 BM-MSCs 后显示 Child-Pugh 和 MELD 评分显著改善,表明肝功能得到改善^[36]。随后的研究继续证实,BM-MSCs 移植在不同大小的样本中均具有改善肝功能的作用^[37-38]。在一项开放标签随机对照研究中,BM-MSCs 移植组通过向 56 例乙型肝炎病毒(HBV)相关的急性慢性肝衰竭患者(ACLF),每周注射同种异体 BM-MSCs(1~10×10⁵ 个/kg),持续 4 周,随访 24 周后发现这些患者血清总胆红素(TBIL)水平和 ESLD 模型(MELD)评分均发生下调,表明肝功能得到改善。然而,在随访 192 周后,BM-MSCs 移植组和对照组之间肝细胞癌的发病率或病死率没有显著差异^[39]。在另一项为期 24 个月的前瞻性研究中,研究人员使用单次输注 1×10⁸ 个 UC-MSC 通过肝动脉治疗 11 例 HBV 相关

的 ACLF^[40]。治疗组在 UC-MSC 移植 4 周后,血清中 ALB、ALT、AST、胆红素、直接胆红素、PT、国际标准化比值(INR)和 MELD 评分均有显著改善^[40]。综上,在临床上通过肝动脉的自体 MSC 移植对 ESLD 患者是安全的,并且在短期治疗期间可改善患者 Child 评分、Meld 评分、血清清蛋白、血清胆红素、ALT 水平,以及改善患者的临床症状,降低患者短期的病死率,且无严重不良反应。

总而言之,相关干细胞治疗 ESLD 的临床试验已经证实了移植干细胞后可以改善受损的肝功能。然而,长期的治疗效果并没有显著的改善。因此,只能暂时得出结论,使用干细胞治疗可能略优于目前的常规治疗。

3 干细胞治疗 ESLD 的问题

不同来源的干细胞作为细胞疗法治疗 ESLD 各有利弊(表 1)。例如,尽管 ESC 和 iPSC 在体外具有最大的潜力分化形成 HLCs,但在临床应用中存在最大的问题就是伦理问题,其中 ESC 在临床应用方面存在的免疫排斥、来源有限及伦理问题,而 iPSC 潜在致癌性是不可忽视的一个难题。HSC 是基础研究和临床应用中最早的成体干细胞,由于其具有较强可塑性而成为近些年的研究热点,且由于其来源丰富,取材相对容易,可来源于自身,避免免疫排斥反应,实现个体化治疗以及无伦理、法律问题而具有广阔的应用前景。然而,有关造血干细胞如何归巢,科学上知之甚少,临床上无法正确归巢,将造成细胞浪费,并且细胞移植效率大大降低。MSC 与 HSC 一样已成为生物医学研究中首选的种子细胞,并开始被广泛应用于各种疾病的基础与临床研究。在各种来源的干细胞中, MSC 作为一种个性化的细胞疗法被大量研究。MSC 提取操作简便、体外增殖明显,参与免疫调节且不存在排斥反应,用于临床潜能较大。MSC 由于其优点而引起了人们的关注,并且已经在实验研究和临床试验中进行了广泛的研究。尽管如此,仍有许多问题需要解决。首先, MSC 的具体作用机制尚未阐明,迄今为止在临床试验中尚未标准化。根据注射途径, MSC 分化为肌成纤维细胞而非肝细胞。在比较临床试验结果时,细胞最佳剂量和注射次数是另一个实际问题。其次,仍然缺乏跟踪移植的 MSC 的有效方法。因此,不能准确预测移植细胞的命运。最后,迄今为止报道的临床研究质量远远不足以得出明确的结论。

表 1 不同来源的干细胞治疗 ESLD 利弊

细胞类型	优点	缺点
ESC	分化潜能大;无限增殖	免疫排斥;来源有限;伦理问题
iPSC	分化潜能大;无限增殖	免疫排斥;来源有限;伦理问题、致癌性
HSC	来源丰富;取材容易;无免疫排斥	增殖有限;归巢机制不明确;临床移植率低
MSC	来源丰富;取材容易;免疫排斥;体外增殖快	体外易分化

4 展望与结论

目前,ESLD 的治愈性治疗仅限于原位肝移植,并且全世界供体器官短缺导致等待器官的患者病死率升高。基于干细胞的疗法已成为一种有前景的替代疗法,并积累了来自基础和临床研究的证据。已有研究证实了各种干细胞,包括 MSC、HSC、EPC、ESC 和 iPSC 的可行性和(或)临床潜力。其中,MSCs 研究最多,作用机制相对较好理解。已提出主要作用机制为旁分泌效应而非转分化作用。从功能改善和临床参数的角度来看,临床试验的结果似乎非常有希望。然而,尚未证实长期疗效,需要标准化的试验方案。总之,干细胞所体现出来的一系列优势和特点,并且通过医学的进步和科技的发展,其必将为 ESLD 患者带来治愈的希望。

参考文献

- [1] BEATH S V. End stage liver disease[J]. *Paediatr Child Health*,2013,23(12):535-544.
- [2] PANDURO A, TIRIBELLI C, CHOVEZTAP IA N C, et al. Renovation of annals of hepatology's scientific scope: towards preventing rather than treating end-stage liver disease[J]. *Ann Hepatol*,2018,17(4):539-540.
- [3] LIU Z, ZHANG Q B, BU C, et al. Quantitative dynamics of proteome, acetylome and succinylome during stem cells differentiation into hepatocyte-like cells[J]. *J Proteome Res*,2018,17(7):2491-2498.
- [4] FISCHER L, HAY D C, O'FARRELLY C. Innate immunity in stem cell-derived hepatocytes[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*,2018,373(1750):20170220.
- [5] LEIVA D F G. Highlight report: quality control of stem cell-derived hepatocytes[J]. *Arch Toxicol*,2018,92(3):1-2.
- [6] LUO X, GUPTA K, ANTHANARAYAN A, et al. Directed differentiation of adult liver derived mesenchymal like stem cells into functional hepatocytes[J]. *Sci Rep*,2018,8(1):2818.
- [7] ASARI S, ITAKURA S, FERRERI K, et al. Mesenchymal stem cells suppress B cell terminal differentiation[J]. *Exp Hematol*,2009,37(5):604-615.
- [8] CHAMBERLAIN G, FOX J, ASHTON B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells; their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing[J]. *Stem Cells*,2010,25(11):2739-2749.
- [9] GEBLER A, ZABEL O, SELIGER B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells[J]. *Trends Mol Med*,2012,18(2):128-134.
- [10] ZHENG S, YANG J, YANG J, et al. Transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells via different routes in rats with acute liver failure[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(12):15854-15862.
- [11] HUANG B, CHENG X, WANG H, et al. Mesenchymal stem cells and their secreted molecules predominantly ameliorate fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis in mice respectively[J]. *J Transl Med*,2016,14(1):45.
- [12] GILSANZ C, ALLER M A, FUENTESJULIAN S, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells slow disease progression of acute-on-chronic liver failure[J]. *Biomed Pharmacother*,2017,91:776-787.
- [13] TAUTENHAHN H M, BRÜCKNER S, BAUMANN S, et al. Attenuation of postoperative acute liver failure by mesenchymal stem cell treatment due to metabolic implications[J]. *Ann Surg*,2016,263(3):546-556.
- [14] KUO T K, HUNG S P, CHUANG C H, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Gastroenterology*,2008,134(7):2111-2121.
- [15] CAI Y, ZOU Z, LIU L, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits hepatocyte apoptosis after acute liver injury[J]. *Int J Clin Exp Pathol*,2015,8(1):107-116.
- [16] LI J, XIN J, HAO S, et al. Return of the metabolic trajectory to the original area after human bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of fulminant hepatic failure[J]. *J Proteome Res*,2012,11(6):3414-3422.
- [17] LIN H, ZHANG Z, SHI M, et al. The effect of human umbilical cord derived-mesenchymal stem cells transplantation on patients with decompensated liver cirrhosis: a prospective and

尤其是在学生临床思维培养方面,具有意想不到的效果和收获。

满意度调查显示,观察组 84% 以上的学生在多个方面均认可其教学效果,认为其可以帮助同学们培养临床思维习惯,增强团队协作能力,激发个人学习兴趣,提高学习成绩。就本研究结果而言,思维导图可以更好地提高学生学习成绩,从宏观上掌握所学内容,从细节中分析病因、发病机制,更好地建立临床思维。但由于样本量及应用章节少,就此得出思维导图的优势就高于传统教学法的结论还有待商榷,因此,笔者后期会将思维导图应用到整个病理学的教学过程中,并且做大样本量分析,验证本研究的结果,也为后续的教学及其他学科思维导图的应用提供参考依据和新的教学思路。

参考文献

- [1] 李玉林. 病理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2017:1-4.
 - [2] 胡建萍,高茜,马晓洁. 思维导图对改善鼻咽癌放疗患者生活质量的研究[J]. 护士进修杂志, 2013,28(6):515-517.
 - [3] 张立,刘鲜桂,肖水军. 断指再植术后局部血液循环障碍 28 例总结分析[J]. 现代诊断与治疗, 2015,26(11):2590-2591.
 - [4] 刘起胜,黄娟,杨艳,等. Sandwich 教学法在病理学教学中的应用实践和探索[J]. 卫生职业教育, 2016,34(17):53-54.
 - [5] 徐伟,袁海滨,陶淑霞. 传统教学与翻转课堂相结合的教学模式探究——以“普通昆虫学”课程为例[J]. 通化师范学院学报(自然版), 2019, 40(287):82-85.
 - [6] 陈冬冬,李东辉,李玉见,等. 思维导图在高等医学教育中的应用探索[J]. 中国医药科学, 2014, 4(17):129-130.
 - [7] 杜晨阳,李雄,王丽君,等. 在放射科住院医师培训中开展微课结合思维导图的研究[J]. 影像研究与医学应用, 2019,3(3):250-251.
 - [8] 陈宇,黎荣山,王勇,等. 乳酸与急性心肌梗死介入治疗后微循环障碍关系研究[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018,10(4):432-435.
 - [9] 闫航,张新金. 微循环阻力指数的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2017,38(4):447-450.
 - [10] 王婷. 思维导图在 PCI 围术期健康教育中的应用[J]. 巴楚医学, 2018,1(4):101-103.
 - [11] 马赞,季金华. 思维导图对中青年冠心病患者生活质量的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(11):1429-1432.
 - [12] 严颖. 情绪背景图片对内隐记忆和外显记忆的影响[J]. 潍坊工程职业学院学报, 2018, 31(3): 67-72.
 - [13] 李传秀,张学辉,钟敏. 思维导图在程序设计教与学中的应用探究[J]. 教育教学论坛, 2019, 31(5):165-166.
 - [14] 周巧娟. 概念图与思维导图在微积分教学中的融合应用[J]. 吉林省教育学院学报, 2019, 35(457):72-75.
 - [15] 刘怡,杨策凯,程卫东. 中医药教学中应用思维导图的研究与实践[J]. 中国中医药现代远程教育, 2019,17(1):5-7.
- (收稿日期:2019-09-25 修回日期:2020-01-20)
-
- (上接 1193 页)
- liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2011, 23(10):936-941.
- [37] AMIN M A, SABRY D, RASHED L A, et al. Short-term evaluation of autologous transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with cirrhosis: Egyptian study[J]. Clin Transplant, 2013, 27(4): 607-612.
 - [38] YOON O J, YOUNG J K, SOON K B, et al. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: a pilot study[J]. Liver Int, 2014, 34(1):33-41.
 - [39] LIN B L, CHEN J F, QIU W H, et al. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for HBV-related acute-on-chronic liver failure: a randomized controlled trial [J]. Hepatology, 2017, 66(1):209.
 - [40] LI Y H, XU Y, WU H M, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transplantation in hepatitis B virus related acute-on-chronic liver failure treated with plasma exchange and entecavir: a 24-month prospective study[J]. Stem Cell Rev, 2016, 12(6):645-653.
- (收稿日期:2019-06-10 修回日期:2019-10-16)