

· 专家论坛 ·

DOI:10.3969/j.issn.1001-5256.2023.05.003

间充质干细胞治疗终末期肝病的临床研究进展

冯宇, 陈俊峰, 林炳亮

中山大学附属第三医院感染性疾病科, 广州 510630

通信作者: 林炳亮, linbingl@mail.sysu.edu.cn (ORCID:0000-0003-4069-6287)

摘要: 终末期肝病 (ESLD) 包括失代偿期肝硬化和肝衰竭, 其病情凶险, 预后不佳。肝移植是唯一可以治愈 ESLD 的方法, 但因肝源短缺、免疫排斥和费用昂贵等问题, 其在临床中的应用受到很大限制。间充质干细胞 (MSC) 可分化为肝细胞样细胞, 并可通过旁分泌调节机体免疫功能, 改善肝纤维化, 在治疗 ESLD 领域具有极广的应用前景。很多临床研究已经证明输注 MSC 治疗 ESLD 在短期内是安全有效的, 其长期应用的安全性和有效性也有一定的临床证据支持。MSC 分泌的外泌体没有完整的细胞结构, 可通过多种机制促进肝细胞再生, 其临床应用价值日益受到重视, 但与之相关的临床研究仍寥寥可数。干细胞治疗 ESLD 的核心机制、制备干细胞的标准化流程等是当下亟待解决的问题。

关键词: 终末期肝病; 干细胞; 间质干细胞; 治疗学

基金项目: 国家自然科学基金 (82070612, 81901940); 国家科技重大专项 (2018ZX10302204, 2017ZX10203201003); 广东省自然科学基金 (2021A1515010306); 广州市科技计划项目 - 重点研发计划 (2023B03J0154)

Clinical research advances in mesenchymal stem cells for the treatment of end - stage liver disease

FENG Yu, CHEN Junfeng, LIN Bingliang. (Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat - Sen University, Guangzhou 510630, China)

Corresponding author: LIN Bingliang, linbingl@mail.sysu.edu.cn. (ORCID:0000-0003-4069-6287)

Abstract: End - stage liver disease (ESLD) includes decompensated liver cirrhosis and liver failure, which usually have dangerous conditions and a poor prognosis. Liver transplantation is the only effective therapy for ESLD, but its clinical application is limited due to shortage of liver donors, immunological rejection, and expensive costs. Mesenchymal stem cells (MSCs) can differentiate into hepatocyte - like cells and alleviate liver fibrosis by regulating immune function through paracrine, and therefore, MSCs have a wide application prospect in the field of ESLD treatment. A number of clinical studies have shown that MSC infusion is safe and effective in the treatment of ESLD during a short period of time, and there is also certain clinical evidence for its long - term safety and efficacy. MSC - derived exosomes (MSC - Exo) do not have a complete cellular structure and can promote hepatocyte regeneration through a variety of mechanisms, and their clinical value has attracted more and more attention, but there are few studies on this issue. Currently, the core mechanism of MSC therapy for ESLD and the standardized process of MSC preparation are the problems needing to be solved urgently.

Key words: End Stage Liver Disease; Stem Cells; Mesenchymal Stem Cells; Therapeutics

Research funding: National Natural Science Foundation of China (82070612, 81901940); National Science and Technology Major Project of China (2018ZX10302204, 2017ZX10203201003); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2021A1515010306); Guangzhou Science and Technology Project - Key R&D Plan (2023B03J0154)

肝脏具有消化、解毒、内分泌等多种功能,并且有强大的自我再生能力。终末期肝病(end-stage liver diseases, ESLD)是指各种损伤引起的肝脏结构和功能不可逆改变已经到了晚期阶段,包括各种类型的肝衰竭、失代偿期肝硬化,预后通常很差。肝移植是治愈此阶段患者唯一的方法,但肝源短缺、移植后免疫排斥、费用昂贵等问题极大限制了其在临床上的应用。近年来兴起的细胞疗法得到了广泛关注,其中的干细胞疗法更被认为是具有极大前景的肝移植替代疗法^[1]。

1 间充质干细胞(MSC)是肝病治疗领域应用最广的干细胞

干细胞是一组具有多向分化潜能的细胞群,在体外适宜条件下可以被诱导分化为肝细胞样细胞(hepatocyte-like cells, HLC),具有完整的肝细胞功能。此外,它还可以旁分泌很多细胞因子,改变受损肝脏的局部微环境,调节免疫功能减轻肝脏炎症损伤,刺激肝细胞再生。临床上常用的干细胞包括:MSC、胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)等。ESC受限于免疫排斥问题,而HSC体外增殖能力有限,故应用MSC治疗肝病的研究最为广泛。

MSC主要集中在人的骨髓和脐带血,从来源上可将MSC分为骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BM-MSC)、脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSC)、脂肪间充质干细胞(adipose derived mesenchymal stem cells, AMSC)等。因其不表达MHC II类抗原,很少表达MHC I类抗原,故免疫原性很低,MSC移植具有较高的安全性。BM-MSC迁移能力最强,旁分泌功能强大^[2],是当下研究的热点。其分泌的外泌体(Exo)是一种细胞外囊泡,携带了多种生物活性物质,包括蛋白质、miRNA和DNA等^[3]。它可以代替“母细胞”通过调节不同靶细胞的信号通路发挥作用,是很有前景的“无细胞”治疗方案。

2 干细胞治疗肝病的机制

2.1 干细胞可以分化为HLC发挥功能并向受损肝脏归巢 20世纪初,Yan等^[4]通过体外培养从肝硬化失代偿期患者外周血中分离BM-MSC,发现重组人肝细胞生长因子可以诱导干细胞转分化为HLC。进一

步在动物实验中借助示踪蛋白发现移植的BM-MSC首先向肺部累积,之后才向损伤的肝脏归巢^[5]。Yu等^[6]将人的UC-MSC移植入肝脏受损的小鼠体内,小鼠肝脏HE染色显示坏死肝脏面积缩小,且人白蛋白、细胞角蛋白-18染色呈阳性,说明人UC-MSC可以归巢到受损组织并分化为有功能的肝细胞。但到目前为止,MSC归巢的机制还未完全阐明,干细胞分化程度不足、效率低下的问题仍需更多实验来探索解决。

2.2 干细胞通过旁分泌机制调节免疫、抑制纤维化修复受损肝脏 随着研究的深入,人们认识到MSC通过旁分泌机制改变肝脏局部微环境比向HLC转分化对于肝脏的修复更重要^[7],这种机制主要通过MSC旁分泌细胞因子的方式调节机体的免疫,进而改善肝脏的纤维化,这些细胞因子包括吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)、前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)、转化生长因子 β (transforming growth factor-beta, TGF- β)等^[8]。对固有免疫来说,MSC可以诱导巨噬细胞向M2亚型极化,分泌IL-10并清除坏死的肝细胞,缓解肝脏炎症损伤^[9]。NK细胞的功能也不同程度受到MSC影响,表现为功能激活或功能抑制。对适应性免疫来说,T淋巴细胞和B淋巴细胞功能均被抑制。已有研究^[10]表明,MSC释放的TGF- β 可以抑制ERK1/2的磷酸化,影响细胞周期蛋白使之停止在G1期,进而减少T淋巴细胞的增殖。还有临床研究结果^[11]表明T淋巴细胞的增殖亦受MSC影响,自体BM-MSC移植治疗HBV相关性肝硬化患者的外周血中Th17细胞向肝脏流入减少,调节性T淋巴细胞(regulatory T cell, Treg)数量增加。与MSC共培养的B淋巴细胞的增殖能力和分泌抗体能力也出现大幅下降,其表面CXCR4等趋化因子受体表达减少^[12]。

MSC可以通过下调TGF- β 1受体和平滑肌 α 肌动蛋白(smooth muscle α -actin, α -SMA)等的表达间接减轻肝脏纤维化^[13]。MSC分泌乳脂小球-EGF因子8(milk fat globule-EGF factor 8, MFGE8)减少星状细胞表面的TGF- β 1受体表达,还可以通过激活Notch通路下调星状细胞的 α -SMA表达,从而抑制星状细胞的活化^[14]。除Treg和Th17细胞比例失调外,IL-17水平也有显著下降,两者共同抑制了星状细胞活化并促进其凋亡,进而影响了I型胶原的沉积

及胞外基质的合成^[15],相关动物实验结果表明这可能和 TGF- β /Smad 通路、NADPH 氧化酶通路被抑制有关^[16]。此外, MSC 还可以分泌基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-9、MMP-14 等直接降解胞外基质^[17]。直接和间接两种途径协同减轻了肝脏纤维化的程度。

2.3 Exo 通过多种机制减少肝脏损伤并助其再生

Exo 是一种携带多种生物活性物质的细胞外囊泡,从 MSC 分泌的 Exo 由于其无细胞特性日益受到重视。和细胞相比, Exo 体积更小, 结构更简单, 更容易合成和保存, 形成肿瘤的风险也更小。更重要的是, 因其膜蛋白数量更少故免疫原性也远低于 MSC, 能避免干细胞直接移植带来的很多问题。研究^[18]发现, MSC-Exo 能减轻肝移植中肝的缺血再灌注程度, 这可能和 Exo 激活鞘氨醇激酶和鞘氨醇-1-磷酸通路有关。在刀豆球蛋白-A (concanavalin A, Con-A) 诱导的肝损伤小鼠模型^[19]中发现, Exo 可以迁移到肝脏, 增加肝组织增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 的表达, 使肝细胞从 G0 期进入 G1 期。Zhao 等^[20]发现 Exo 通过自噬途径减少肝细胞的凋亡, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增多, 促凋亡蛋白 cleaved caspase-3 表达减少。Lin 等^[21]发现 Exo 中 let-7a-5p 通过 MAP4K3 通路增加转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 的核转位来增强肝脏自噬活动, 最终缓解慢加急性肝衰竭 (acute on chronic liver failure, ACLF) 患者的肝损伤。

Exo 还可以通过抑制 NLRP3 炎症小体通路减轻肝细胞炎性损伤。有研究^[22]发现增加 Exo 中 miR-223 的表达强度明显降低了小鼠肝组织中 NLRP3 的表达; 急性肝损伤动物模型中也发现 MSC 的 Exo 可以阻断 IL-6 介导的信号通路^[23] 和下调 NLRP3 通路^[24]。此外, 它还可以降低血管内皮黏附分子 1 的表达下调免疫强度发挥抗炎作用^[25]。Exo 同样可以下调 CCl₄ 诱导肝纤维化大鼠的肝星状细胞中 Wnt/ β -catenin 通路的信号强度^[26], 降低星状细胞的活化程度, 以此减轻肝纤维化。

3 干细胞治疗 ESLD 的临床研究

在治疗肝病方面最常用的干细胞是 MSC, 其次是预先用粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony

stimulating factor, G-CSF) 动员后获得的骨髓源性干细胞 (bone marrow derived stem cell, BMSC), 前者以 BM-MSc 和 UC-MSc 多见, 供体干细胞来源多为自体或同种异体。

3.1 干细胞治疗肝衰竭 自体 MSC 移植对治疗 ACLF 患者是安全的, 在短期内可以改善肝衰竭患者的肝功能。Salama 等^[27]对 HCV 相关肝衰竭患者的 BM-MSc 进行 G-CSF 动员后由外周静脉自体输注, 随访 26 周后发现, 移植组 54% 的患者转氨酶、白蛋白、胆红素等水平得到改善。该团队^[28]还应用自体 BM-MSc 经肝动脉或门静脉移植入 48 例肝衰竭患者, 半年后患者的凝血功能国际标准化比值 (international normalized ratio, INR) 恢复正常水平, 肝功能和腹水有所好转。Garg 等^[29]亦发现 BM-MSc 可以明显降低 ACLF 患者的肝功能评分 (包括 Child-Pugh、MELD 和 SOFA 评分)。有研究^[30]将自体 BM-MSc 在体外诱导分化为 HLC 后回输入体内, 随访 6 个月后发现移植组患者的下肢水肿和腹水明显改善。Peng 等^[31]将自体 BM-MSc 从肝动脉输入 HBV 相关肝衰竭患者体内, 48 周后观察到血清总胆红素下降, 白蛋白升高, MELD 评分降低。

一项非盲随机对照研究^[32]旨在探究 BM-MSc 治疗肝衰竭的有效性, 共有 56 例 HBV 相关 ACLF 患者接受注射同种异体的 BM-MSc [(1~10) $\times 10^5$ 个/kg], 每周 1 次, 连续 4 周, 随访 24 周后发现患者血清总胆红素水平、MELD 评分改善, 移植组的严重感染发生率较对照组显著下降 (16.1% vs 33.3%, $P=0.04$), 24 周累积生存率移植组显著高于对照组 (73.2% vs 55.6%, $P=0.03$)。这至少表明同种异体 BM-MSc 在短期内可以改善肝衰竭患者的肝功能, 且安全性较好。

还有研究者^[33]将 UC-MSc 由肝动脉注入 11 例 HBV 相关 ACLF 患者体内 (1 $\times 10^8$ 个/次), 4 周后发现血清中白蛋白、转氨酶、胆红素、INR 水平和 MELD 评分较前改善, 继续随访 24 个月, 未观察到和输注相关的严重不良事件的发生。

3.2 干细胞治疗病毒性肝炎引起的失代偿期肝硬化 BM-MSc 治疗病毒引起的失代偿肝硬化患者具有不错的安全性和效果。Xu 等^[11]将乙型肝炎肝硬化失代偿期患者的自体 BM-MSc 经肝动脉输入体内, 随访 24 周, 移植组 20 例完成随访, 对照组 19 例完成随访。结果显示移植组的肝功能、MELD 评分显著优于对照

组。除乙型肝炎引起的失代偿肝硬化外,有研究^[34]提示 MSC 治疗由 HCV 引起的肝硬化同样可以降低患者的 Child - Pugh 评分和 MELD 评分,同时发现 MSC 的注射途径和是否分化为 HLC 并不影响整体治疗效果。但并非所有 BM - MSC 移植后都呈现满意的疗效。Mohamadnejad 等^[35]的研究纳入了 27 例肝硬化失代偿期患者,15 例从外周血注射自体 BM - MSC,剩余对象注射生理盐水作为对照。1 年后两组间肝功能评分和 INR 无明显差异,该结果不排除和注射途径、BM - MSC 的质量有关。

G - CSF 动员后的干细胞同样可以改善失代偿肝硬化患者的病情。Guo 等^[36]利用 G - CSF 先将失代偿期肝硬化患者的 CD34⁺ BMSC 动员至外周血,之后富集外周血中的干细胞并由肝动脉回输至肝脏,发现富集后回输组的治疗效果优于单纯 G - CSF 动员组。之后约 10 年的随访结果显示,患者血清白蛋白、胆碱酯酶水平提高,凝血功能改善, MELD 评分下降,平均生存期由 71 个月延长至 94 个月,5 年生存率由 52.1% 升高至 71.2%。Khan 等^[37]针对 HBV 和 HCV 引起的肝硬化患者,从肝动脉注入 G - CSF 动员后的 BM - MSC,6 个月后结果提示白蛋白升高,转氨酶和胆红素下降,Child - Pugh 评分改善。国外其他类似的研究^[38-39]也发现患者移植经过或未经过动员的 BMSC 后未出现严重不良反应,肝功能血清学指标好转,肝功能评分明显下降,患者的临床症状和相关并发症得到缓解。G - SCF 动员后,不管被移植入的是 BM - MSC 还是 BMSC,患者都表现出了不错的耐受性,肝功能明显好转,肝脏再生活动基因表达上调^[40]。在由肝动脉注射 BM - MSC 的研究中,HBV 相关的肝硬化患者 6 个月的 Child - Pugh 评分远低于对照组^[41]。

Zhang 等^[42]的研究将 UC - MSC 从外周静脉注入乙型肝炎相关失代偿期肝硬化患者体内,48 周后发现患者腹水减少,肝功能和 MELD 评分均改善。同样的治疗方法在乙型肝炎相关 ACLF 患者中得到相同的结论^[43]。Lin 等^[44]的研究探讨了 UC - MSC 治疗在肝硬化患者中的安全性,在移植干细胞后不同时段监测血清中血糖、总胆固醇、尿素氮、甲胎蛋白、白细胞数和凝血酶原活动度,结果表明很少有患者发生致瘤或其他严重不良反应,且 UC - MSC 治疗对上述血清学指标影响微乎其微,表明 UC - MSC 可以提高患者的生

存质量,安全性值得肯定。该团队还对 HBV 相关的肝硬化失代偿患者作了长达 7 年的预后随访研究,219 例患者分为 UC - MSC 处理组 108 例和对照组 111 例,处理组共接受了 3 次 MSC 注射,每次间隔 4 周。结果显示,在 13 ~ 75 个月的总体生存率处理组高于对照组,但肝细胞癌患病率两组之间并无显著差异;48 周内处理组的白蛋白、总胆红素、胆碱酯酶和凝血酶原活动度明显改善,且未出现治疗相关的并发症,结果表明 UC - MSC 在改善 HBV 相关肝硬化患者的长期生存率方面也有积极的作用^[45]。

3.3 干细胞治疗其他原因引起的失代偿期肝硬化

BM - MSC 可以减轻酒精性肝硬化患者的肝纤维化程度。有研究应用自体 BM - MSC 治疗酒精性肝硬化失代偿期患者,结果显示除肝功能和评分改善外,肝纤维化相关蛋白,如 I 型胶原蛋白、TGF - β 1 等表达减少,肝脏病理也提示肝脏结构有所恢复,输注 2 次后肝脏组织胶原含量减少了 37%^[46],Jang 等^[47]的类似研究结果也提示患者肝组织学改善。Pai 等^[48]在酒精性肝硬化人群中应用 BM - MSC 治疗后观察到胆红素、转氨酶水平降低,Child - Pugh 评分下降,以及腹水减少。这充分说明了自体干细胞治疗失代偿期肝硬化患者的有效性。

随着对干细胞治疗机制的认识加深,其免疫调节功能被越来越多应用于治疗某些自身免疫性疾病。在自身免疫性肝病中应用 G - CSF 动员后的 CD34⁺ BMSC 治疗,患者肝功能指标可以恢复正常^[28];某些自身免疫性疾病(如类风湿性关节炎、原发性干燥综合征等)引起的肝硬化患者移植 UC - MSC 后表现出了良好的耐受性,随访 2 年间肝功能逐步恢复^[49]。针对原发性胆汁性胆管炎(PBC)患者的两项干细胞治疗的临床研究^[50]结果显示,移植 BM - MSC 和 UC - MSC 后,患者肝功能的血清学指标显著改善,包括转氨酶、 γ - 谷氨酰转氨酶和碱性磷酸酶等,同时 IL - 10、CD4⁺/CD25⁺ T 淋巴细胞水平都有所上升。但对于免疫性疾病导致的失代偿期肝硬化,个别利用干细胞治疗案例出现了很严重的后果。有研究^[51]利用 BM - MSC 治疗 PBC 和自身免疫性肝炎(AIH)导致的肝硬化患者各 1 例,结果虽然显示肝功能得到了好转,但患者出现了肾衰竭及其他并发症。该团队之后用骨髓干细胞由外周静脉输入 2 例 PBC 和 4 例 AIH 患者体内治疗,患者的肝功能并未好转甚

至出现了 2 例死亡^[36]。以上结果提示利用干细胞治疗免疫相关 ESLD 还需谨慎。

最后,针对其他原因(如药物性肝炎、遗传性肝病、特发性肝病等)导致的 ESLD,干细胞疗法亦有可喜的成效。通过将自体 BM - MSC 或 G - CSF 动员后的干细胞直接经肝脏注射治疗后,患者未出现明显不良反应,肝功能和相关评分均得到改善^[52]。对于非病毒性肝炎引起的肝硬化失代偿期患者而言,自体 BM - MSC 移植后血清白蛋白水平和 MELD 评分改善显著^[53]。而对 BM - MSC - Exo 的治疗作用仍处在基础研究阶段,暂时没有相关临床研究报道。

4 干细胞治疗 ESLD 的问题

尽管干细胞治疗 ESLD 取得了不错的成果,细胞治疗肝病是一条新的极有前景的道路,但仍有太多问题亟待解决。

4.1 干细胞转分化为 HLC 及肝脏归巢机制不明 干细胞治疗机制不明一定程度上是由于缺乏对移植细胞的有效定位手段,无法得知干细胞肝脏归巢及向 HLC 详细转化的过程。此外,长期培养 MSC 会降低其分化能力^[54]。由于 BM - MSC 在肝脏受损时会自发向肝脏归巢,如果清楚其归巢的条件及促进肝脏内源性再生的机制就能避免 BM - MSC 移植的弊端,这是今后极具挑战和富有意义的研究方向。

4.2 干细胞移植的安全性无法完全保证 2019 年的一项评估 MSC 致瘤性的研究^[55]并未发现对照组和 BM - MSC 输注组肿瘤发病率存在差异,但之前有研究^[56]观察到 BM - MSC 在体外培养时会发生染色体畸变。除致瘤可能导致移植风险外,由于干细胞移植是有创操作,在此过程中就存在传播病毒的风险,如巨细胞病毒、单纯疱疹病毒和细小病毒 B19 等。

4.3 不同来源干细胞质量无法保证 每种来源的干细胞都有各自的优势和不足,如何选择哪种干细胞适合用作移植?首先要建立一套统一的干细胞质量评价体系。其次,如何通过对干细胞预处理来优化待移植干细胞的总体质量?有必要对干细胞的分离纯化流程进行标准化,并借用相关技术来提升干细胞活性,如基因编辑、G - CSF 动员或选用相关细胞因子诱导,这些都有赖于基础实验的突破来为临床提供正确的指导。

4.4 干细胞使用缺乏标准化导致临床研究质量参差

不齐 干细胞在临床试验中的使用未经标准化,包括适应证和禁忌证、最佳注射途径、注射剂量、注射次数等。从现有的临床研究中总结来看:纳入对象包括各种病因引起的 ESLD,缺乏同质性;单次注射干细胞数量跨度太大,范围在 $10^5 \sim 10^9$,部分研究按体质量计算单次注射量;随访时间多为 2 ~ 12 个月;输注途径主要有外周静脉和肝脏注射(肝动脉或门静脉),部分研究通过脾脏注射。相关动物研究^[57]提示由外周静脉输注的 MSC 相当一部分都滞留在肺部,远不如由门静脉注射的疗效好。而通过门静脉和肝动脉输注干细胞的归巢效率分别为小于 5% 和 20% ~ 30%,所以可能肝动脉是最佳的输注途径^[58],但也有研究^[29]显示不同注射方式之间的疗效没有显著差异。以上现象导致大多数的临床实验质量参差不齐,难以获得足够的高质量研究得出可靠的结论。同时,缺乏横向对比,如探究不同注射方式、注射剂量的疗效有无差别,且其长期疗效缺乏足够的临床事实肯定。

5 展望

当前,肝移植是治愈 ELSD 的唯一手段,但由于肝源缺乏等问题导致等待肝移植患者的死亡率逐年升高。在此形势下,众多的临床研究结果表明,干细胞治疗已经展现出了极大的潜力。其中,关于 MSC 的研究最多,大多数结果均肯定了其短期改善肝功能的疗效,表现为肝脏血清学指标的改善、临床症状的缓解、肝脏相关评分的好转、肝脏病理表现有所恢复,且很少发现和其相关的严重不良反应。UC - MSC 在 HBV 相关肝硬化人群中的长期疗效已经得到证实,但其他种类的干细胞在各类 ELSD 患者中的长期疗效还未有充足的临床证据;对于少数由于注射干细胞出现的不良事件,提示未来需要更加谨慎地评估相关人群的干细胞治疗条件。这不仅依赖于临床研究中 MSC 使用过程进行标准化来增加研究结论的可靠性,还需基础实验领域对 MSC 治疗肝病的作用机制研究有进一步的突破,包括体内归巢、实现抗纤维化和免疫调节的具体通路和调控方式。

目前关于 BM - MSC 的研究主要集中在如何提高其治疗 ESLD 的效果,可以增加 MSC 本身的数量或功能,包括用细胞因子对 MSC 预处理,或进行基因编辑、富集分选等。值得一提的是,有学者^[59]发现某些中药可以增强 BM - MSC 的分化能力,相比于其他处理手

段更加安全和廉价,有望成为 MSC 移植的潜在辅助手段。相比之下,Exo 由于体积更小,更易获取,膜蛋白数量更少所以免疫排斥性要小于 BM - MSC;且其本身为膜结构,致瘤可能性比 MSC 更小,安全性更高;还可以直接跨膜传递信息,调控损伤肝细胞的修复和再生过程,是非常好的药物治疗载体,所以通过提高 MSC - Exo 的分泌数量达到可观的治疗效果是今后针对 ELSD 极有前景的治疗方法之一。目前已有一些方法可以提高 Exo 的分泌数量,如正切流动过滤法(tangential flow filtration, TFF)可以比单纯的超速离心大大增加 Exo 的数量,超声降解更是可以将其产量提高到 20 倍^[60],还有 3D 培养、利用特殊介质如海藻酸水凝胶对 MSC 进行培养等^[61]。早在 2015 年我国就颁布了《干细胞临床研究管理办法(试行)》^[62],在制度的规范下,还需开展大规模的多中心临床随访研究保证其用于人体的安全性和有效性,相信不远的未来干细胞治疗会给更多的 ESLD 患者带来福音。

利益冲突声明:本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明:林炳亮提出研究选题,设计研究方案;冯宇负责调研整理文献、撰写论文;陈俊峰、林炳亮提供指导性支持及修订、终审论文。

参考文献:

- [1] PANDURO A, TIRIBELLI C, CHÁVEZ - TAPIA NC, 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. DOI: 10.5604/01.3001.0012.0913.
- [2] LI G, ZHANG XA, WANG H, et al. Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta: implication in the migration[J]. *Proteomics*, 2009, 9(1): 20 - 30. DOI: 10.1002/pmic.200701195.
- [3] RAZEGHIAN E, MARGIANA R, CHUPRADIT S, et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a vehicle for cytokine delivery: an emerging approach for tumor immunotherapy [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 721174. DOI: 10.3389/fmed.2021.721174.
- [4] YAN L, HAN Y, WANG J, et al. Peripheral blood monocytes from the decompensated liver cirrhosis could migrate into nude mouse liver with human hepatocyte - markers expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(4): 635 - 638. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.04.058.
- [5] LI Q, ZHOU X, SHI Y, et al. In vivo tracking and comparison of the therapeutic effects of MSCs and HSCs for liver injury [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62363. DOI: 10.1371/journal.pone.0062363.
- [6] YU YB, SONG Y, CHEN Y, et al. Differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocytes in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 2009 - 2016. DOI: 10.3892/mmr.2018.9181.
- [7] FANG X, LIU L, DONG J, et al. A study about immunomodulatory effect and efficacy and prognosis of human umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with chronic hepatitis B - induced decompensated liver cirrhosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 33(4): 774 - 780. DOI: 10.1111/jgh.14081.
- [8] TSUCHIYA A, TAKEUCHI S, WATANABE T, et al. Mesenchymal stem cell therapies for liver cirrhosis: MSCs as "conducting cells" for improvement of liver fibrosis and regeneration[J]. *Inflamm Regen*, 2019, 39: 18. DOI: 10.1186/s41232-019-0107-z.
- [9] LUO XY, MENG XJ, CAO DC, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stromal cells attenuates liver fibrosis in mice by regulating macrophage subtypes[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 16. DOI: 10.1186/s13287-018-1122-8.
- [10] GLENNIE S, SOEIRO I, DYSON PJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells[J]. *Blood*, 2005, 105(7): 2821 - 2827. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3696.
- [11] XU L, GONG Y, WANG B, et al. Randomized trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for hepatitis B virus cirrhosis: regulation of Treg/Th17 cells[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(8): 1620 - 1628. DOI: 10.1111/jgh.12653.
- [12] CORCIONE A, BENVENUTO F, FERRETTI E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B - cell functions [J]. *Blood*, 2006, 107(1): 367 - 372. DOI: 10.1182/blood-2005-07-2657.
- [13] XUAN J, FENG W, AN ZT, et al. Anti - TGF β - 1 receptor inhibitor mediates the efficacy of the human umbilical cord mesenchymal stem cells against liver fibrosis through TGF β - 1/Smad pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 429(1 - 2): 113 - 122. DOI: 10.1007/s11010-017-

- 2940 – 1.
- [14] SHENG M, LIN Y, XU D, et al. CD47 – Mediated Hedgehog/SMO/GLI1 signaling promotes mesenchymal stem cell immunomodulation in mouse liver inflammation[J]. *Hepatology*, 2021, 74(3): 1560 – 1577. DOI: 10.1002/hep.31831.
- [15] CHEN X, GAN Y, LI W, et al. The interaction between mesenchymal stem cells and steroids during inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(1): e1009. DOI: 10.1038/cddis.2013.537.
- [16] KIM MD, KIM SS, CHA HY, et al. Therapeutic effect of hepatocyte growth factor – secreting mesenchymal stem cells in a rat model of liver fibrosis [J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46(8): e110. DOI: 10.1038/emm.2014.49.
- [17] KHALIFA YH, MOURAD GM, STEPHANOS WM, et al. Bone marrow – derived mesenchymal stem cell potential regression of dysplasia associating experimental liver fibrosis in albino rats[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5376165. DOI: 10.1155/2019/5376165.
- [18] DU Y, LI D, HAN C, et al. Exosomes from Human – Induced Pluripotent Stem Cell – Derived Mesenchymal Stromal Cells (hiPSC – MSCs) protect liver against hepatic ischemia/ reperfusion injury via activating sphingosine kinase and sphingosine – 1 – phosphate signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(2): 611 – 625. DOI: 10.1159/000480533.
- [19] TAMURA R, UEMOTO S, TABATA Y. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cell – derived exosomes on a concanavalin A – induced liver injury model [J]. *Inflamm Regen*, 2016, 36: 26. DOI: 10.1186/s41232 – 016 – 0030 – 5.
- [20] ZHAO S, LIU Y, PU Z. Bone marrow mesenchymal stem cell – derived exosomes attenuate D – GalN/LPS – induced hepatocyte apoptosis by activating autophagy in vitro [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2887 – 2897. DOI: 10.2147/DDDT.S220190.
- [21] LIN D, CHEN H, XIONG J, et al. Mesenchymal stem cells exosomal let – 7a – 5p improve autophagic flux and alleviate liver injury in acute – on – chronic liver failure by promoting nuclear expression of TFEB [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(10): 865. DOI: 10.1038/s41419 – 022 – 05303 – 9.
- [22] CHEN L, LU FB, CHEN DZ, et al. BMSCs – derived miR – 223 – containing exosomes contribute to liver protection in experimental autoimmune hepatitis [J]. *Mol Immunol*, 2018, 93: 38 – 46. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.11.008.
- [23] SHAO M, XU Q, WU Z, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate IL – 6 – induced acute liver injury through miR – 455 – 3p [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 37. DOI: 10.1186/s13287 – 020 – 1550 – 0.
- [24] ZHANG S, JIANG L, HU H, et al. Pretreatment of exosomes derived from hUCMSCs with TNF – α ameliorates acute liver failure by inhibiting the activation of NLRP3 in macrophage [J]. *Life Sci*, 2020, 246: 117401. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.117401.
- [25] ANGIONI R, CALÌ B, VIGNESWARA V, et al. Administration of human MSC – derived extracellular vesicles for the treatment of primary sclerosing cholangitis: preclinical data in MDR2 knockout mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8874. DOI: 10.3390/ijms21228874.
- [26] RONG X, LIU J, YAO X, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells – derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ β – catenin pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 98. DOI: 10.1186/s13287 – 019 – 1204 – 2.
- [27] SALAMA H, ZEKRI AR, MEDHAT E, et al. Peripheral vein infusion of autologous mesenchymal stem cells in Egyptian HCV – positive patients with end – stage liver disease [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(3): 70. DOI: 10.1186/scrt459.
- [28] SALAMA H, ZEKRI AR, ZERN M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end – stage chronic liver diseases [J]. *Cell Transplant*, 2010, 19(11): 1475 – 1486. DOI: 10.3727/096368910X514314.
- [29] GARG V, GARG H, KHAN A, et al. Granulocyte colony – stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute – on – chronic liver failure [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(3): 505 – 512. e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.11.027.
- [30] AMER ME, EL – SAYED SZ, EL – KHEIR WA, et al. Clinical and laboratory evaluation of patients with end – stage liver cell failure injected with bone marrow – derived hepatocyte – like cells [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 23(10): 936 – 941. DOI: 10.1097/MEG.0b013e3283488b00.
- [31] PENG L, XIE DY, LIN BL, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short – term and long – term outcomes [J]. *Hepatology*, 2011, 54(3): 820 – 828. DOI: 10.1002/hep.24434.

- [32] LIN BL, CHEN JF, QIU WH, et al. Allogeneic bone marrow – derived mesenchymal stromal cells for hepatitis B virus – related acute – on – chronic liver failure: A randomized controlled trial [J]. *Hepatology*, 2017, 66 (1): 209 – 219. DOI: 10.1002/hep.29189.
- [33] LI YH, XU Y, WU HM, 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 Rep*, 2016, 12(6): 645 – 653. DOI: 10.1007/s12015 – 016 – 9683 – 3.
- [34] EL – ANSARY M, ABDEL – AZIZ I, MOGAWER S, et al. Phase II trial: undifferentiated versus differentiated autologous mesenchymal stem cells transplantation in Egyptian patients with HCV induced liver cirrhosis [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2012, 8(3): 972 – 981. DOI: 10.1007/s12015 – 011 – 9322 – y.
- [35] MOHAMADNEJAD M, ALIMOGHADDAM K, BAGHERI M, et al. Randomized placebo – controlled trial of mesenchymal stem cell transplantation in decompensated cirrhosis [J]. *Liver Int*, 2013, 33(10): 1490 – 1496. DOI: 10.1111/liv.12228.
- [36] GUO C, GUO G, ZHOU X, et al. Long – term outcomes of autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with cirrhosis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17(6): 1175 – 1182. e2. DOI: 10.1016/j.cgh.2018.10.034.
- [37] 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(4): 1140 – 1144. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.03.111.
- [38] NAKAMURA T, TORIMURA T, IWAMOTO H, et al. CD34 (+) cell therapy is safe and effective in slowing the decline of hepatic reserve function in patients with decompensated liver cirrhosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29(10): 1830 – 1838. DOI: 10.1111/jgh.12622.
- [39] CAI T, DENG Q, ZHANG S, et al. Peripheral blood stem cell transplantation improves liver functional reserve [J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 1381 – 1386. DOI: 10.12659/MSM.892990.
- [40] LANTHIER N, LIN – MARQ N, RUBBIA – BRANDT L, et al. Autologous bone marrow – derived cell transplantation in decompensated alcoholic liver disease: what is the impact on liver histology and gene expression patterns? [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 88. DOI: 10.1186/s13287 – 017 – 0541 – 2.
- [41] 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(4): 390 – 396. DOI: 10.1080/14653240802129901.
- [42] 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 Suppl 2: 112 – 120. DOI: 10.1111/j.1440 – 1746.2011.07024.x.
- [43] SHI M, ZHANG Z, XU R, et al. Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute – on – chronic liver failure patients [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, 1(10): 725 – 731. DOI: 10.5966/sctm.2012 – 0034.
- [44] LIN H, ZHANG Z, SHI M, et al. Prospective controlled trial of safety of human umbilical cord derived – mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis [J]. *Chin J Hepatol*, 2012, 20(7): 487 – 491. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007 – 3418.2012.07.002.
- 林沪, 张政, 施明, 等. 人脐带间充质干细胞治疗肝硬化腹水患者的安全性 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2012, 20(7): 487 – 491. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007 – 3418.2012.07.002.
- [45] SHI M, LI YY, XU RN, et al. Mesenchymal stem cell therapy in decompensated liver cirrhosis: a long – term follow – up analysis of the randomized controlled clinical trial [J]. *Hepatol Int*, 2021, 15(6): 1431 – 1441. DOI: 10.1007/s12072 – 021 – 10199 – 2.
- [46] SUK KT, YOON JH, KIM MY, et al. Transplantation with autologous bone marrow – derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial [J]. *Hepatology*, 2016, 64(6): 2185 – 2197. DOI: 10.1002/hep.28693.
- [47] JANG YO, KIM YJ, BAIK SK, 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. DOI: 10.1111/liv.12218.
- [48] PAI M, ZACHAROULIS D, MILICEVIC MN, et al. Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow – derived CD34 + cells into patients with alcoholic liver cirrhosis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2008, 103(8): 1952 – 1958.

- DOI: 10.1111/j.1572-0241.2008.01993.x.
- [49] LIANG J, ZHANG H, ZHAO C, et al. Effects of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of liver cirrhosis caused by autoimmune diseases[J]. *Int J Rheum Dis*, 2017, 20(9): 1219-1226. DOI: 10.1111/1756-185X.13015.
- [50] WANG L, LI J, LIU H, et al. Pilot study of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transfusion in patients with primary biliary cirrhosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28 Suppl 1: 85-92. DOI: 10.1111/jgh.12029.
- [51] MOHAMADNEJAD M, ALIMOGHADDAM K, MOHYEDDIN-BONAB M, et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis[J]. *Arch Iran Med*, 2007, 10(4): 459-466.
- [52] LYRA AC, SOARES MB, da SILVA LF, et al. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 22(1): 33-42. DOI: 10.1097/MEG.0b013e32832eb69a.
- [53] SHARMA M, RAO PN, SASIKALA M, et al. Autologous mobilized peripheral blood CD34(+) cell infusion in non-viral decompensated liver cirrhosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(23): 7264-7271. DOI: 10.3748/wjg.v21.i23.7264.
- [54] ZHAO C, IKEYA M. Generation and applications of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 9601623. DOI: 10.1155/2018/9601623.
- [55] MATSUURA K, TAKAMI T, MAEDA M, et al. Evaluation of the effects of cultured bone marrow mesenchymal stem cell infusion on hepatocarcinogenesis in hepatocarcinogenic mice with liver cirrhosis[J]. *Transplant Proc*, 2019, 51(3): 925-935. DOI: 10.1016/j.transproceed.2019.03.011.
- [56] BARKHOLT L, FLORY E, JEKERLE V, et al. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies—bridging scientific observations and regulatory viewpoints[J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(7): 753-759. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.03.005.
- [57] SAAT TC, VAN DEN ENGEL S, BIJMAN-LACHGER W, et al. Fate and effect of intravenously infused mesenchymal stem cells in a mouse model of hepatic ischemia reperfusion injury and resection[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 5761487. DOI: 10.1155/2016/5761487.
- [58] KHAN AA, SHAIK MV, PARVEEN N, et al. Human fetal liver-derived stem cell transplantation as supportive modality in the management of end-stage decompensated liver cirrhosis[J]. *Cell Transplant*, 2010, 19(4): 409-418. DOI: 10.3727/096368910X498241.
- [59] LYU YH, WU SS, WEN ZX, et al. Study on mechanism of Rougan Huaxian Granules bone marrow mesenchymal stem cells homing to treat liver fibrosis in rats[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2021, 39(10): 146-149, 278-279. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2021.10.035.
- [60] WANG L, ABHANGE KK, WEN Y, et al. Preparation of engineered extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells with ultrasonication for skin rejuvenation [J]. *ACS Omega*, 2019, 4(27): 22638-22645. DOI: 10.1021/acsomega.9b03561.
- [61] YAN L, WU X. Exosomes produced from 3D cultures of umbilical cord mesenchymal stem cells in a hollow-fiber bioreactor show improved osteochondral regeneration activity[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2020, 36(2): 165-178. DOI: 10.1007/s10565-019-09504-5.
- [62] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Management measures for clinical research of stem cells (Trial) [EB/OL]. (2015-03-27). <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s3582/201503/ad9098ef20ba4162bafc743133e799f6.shtml>.
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 干细胞临床研究管理办法(试行) [EB/OL]. (2015-03-27). <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s3582/201503/ad9098ef20ba4162bafc743133e799f6.shtml>.

收稿日期:2023-03-13;录用日期:2023-04-13

本文编辑:刘晓红

引证本文: FENG Y, CHEN JF, LIN BL. Clinical research advances in mesenchymal stem cells for the treatment of end-stage liver disease[J]. *J Clin Hepatol*, 2023, 39(5): 1010-1018.

冯宇, 陈俊峰, 林炳亮. 间充质干细胞治疗终末期肝病的临床研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(5): 1010-1018.