

间充质干细胞在肝硬化治疗中的研究进展

张邸涵婧 陆伦根

上海交通大学医学院附属第一人民医院消化内科,上海 200080



摘要 肝硬化是各种慢性肝病的终末期,主要由活化的肝星状细胞产生胶原并累积在细胞外基质形成假小叶从而导致肝纤维化和肝硬化。间充质干细胞具有多能分化的能力,可参与多种疾病的细胞治疗。近年来,越来越多的实验研究证明了间充质干细胞可用于肝硬化的治疗。本文将对间充质干细胞治疗肝硬化的研究进展进行总结及展望。

关键词 间充质干细胞;肝硬化;治疗

中图分类号 R575.2 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzz20240102

Research progress on mesenchymal stem cells in the treatment of liver cirrhosis. ZHANGDI Han-jing, LU Lun-gen. Department of Gastroenterology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China

Corresponding author: LU Lun-gen, E-mail: lungenlu1965@163.com

Abstract Liver cirrhosis is the end stage of chronic liver disease. Collagen is produced by activated hepatic stellate cells and accumulates in the extracellular matrix to form pseudolobules, leading to liver fibrosis and cirrhosis. Mesenchymal stem cells (MSCs) have the ability of multipotent differentiation and can be involved in cell therapy for a variety of diseases. In recent years, more and more experimental studies have proved that mesenchymal stem cells can participate in the treatment of liver cirrhosis. This article summarizes the research progress and prospect of mesenchymal stem cells in the treatment of liver cirrhosis.

Key words Mesenchymal stem cells; Liver cirrhosis; Treatment

肝硬化是由于慢性肝损伤而引起的肝脏结构和功能进行性恶化的疾病,是影响人类健康的重大慢性疾病之一。肝硬化的发病原因多种多样,包括长期酗酒、慢性病毒性肝炎(如乙型和丙型肝炎)、自身免疫性肝病、遗传代谢性疾病、肝血管性疾病等,导致肝脏遭受持续的炎症、氧化应激、细胞死亡和纤维化等损伤,肝细胞在受到各种损伤因素的刺激后,会释放细胞因子、炎症介质和氧化应激物质等,这些物质可以直接或间接地促进肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)^[1]的活化。活化的HSC通过分泌胶原蛋白促进纤维组织的增生和沉积,最终形成肝硬化^[2]。目前,肝硬化的治疗方法主要包括药物治疗、减轻症状的支持治疗、肝移植以及新兴的细胞治疗方法。近年来,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为一种有潜力的细胞治疗手段备受关注。

MSCs是一类具有自我更新和多向分化潜能的干细胞,最早发现于骨髓中^[3]。MSCs具有高度的增殖和再生能力,可以分化成多种细胞类型,如成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞,以及在特定细胞因子的作用下可分化成神经元、肝细胞等非骨髓衍生性细胞。MSCs具有诸多特点,使其在疾病治疗中具有巨

大的潜力。首先,它们易于获取。目前的研究发现, MSCs存在于多个组织中,包括骨髓、脐带血、脂肪组织等,因此不同来源的MSCs可以根据病患的具体需要而选择^[4]。其次, MSCs具有免疫调节作用。它们能够抑制炎症反应,调节免疫细胞的活性,并分泌多种免疫调节因子,从而减轻炎症损伤和改善肝功能^[2]。此外, MSCs具有较低的免疫原性,不易引发排斥反应,而且从其他来源获得的MSCs可以通过体外扩增获得高产量。这一特性为MSCs在治疗中的应用提供了便利和广泛的选择。

目前MSCs在疾病治疗领域显示出了潜在的应用前景。MSCs已经在心血管疾病、自身免疫病、器官移植、骨科疾病和神经退行性疾病等领域进行了临床试验^[5]。研究人员在MSCs治疗肝硬化的领域中也进行了较为深入的探索和研究^[6],并已经展开了MSCs治疗肝硬化的初步临床转化工作^[7]。作为一种细胞治疗方式, MSCs的移植治疗将为临床肝硬化治疗提供新的思路。

一、MSCs在肝硬化中的治疗机制

MSCs属于干细胞的一个重要部分,其来源广泛,且具有多向分化潜能。由于MSCs在体内移植后可迁移到纤维化的肝组织中,并分化为肝细胞样

细胞以保护肝功能,研究者纷纷对不同组织来源的 MSCs 进行了深入的研究,以探求其治疗作用和机制。其中最初被发现的 MSCs 是源于骨髓的间充质干细胞 (bone marrow MSCs, BMSCs)^[3],研究发现 BMSCs 通过多种机制参与治疗肝硬化。Feng 等^[8]研究发现 BMSCs 通过抑制 HSC 中的长链非编码 RNA BIHAA1/mo-miR-667-5P 轴缓解 HSC 活化,从而起到抑制肝硬化进展的作用。Zhang 等^[9]发现 BMSCs 来源的外泌体通过在肝硬化大鼠体内抑制肝细胞凋亡缓解肝硬化。脂肪组织间充质干细胞 (adipose tissue-derived MSCs, ADMSCs) 也是一类丰富且易于获取的 MSCs。通过脂肪抽取手术可大量获取 ADMSCs。研究显示,ADMSCs 可以分化为肝细胞样细胞,其分泌的外泌体也能参与调控 HSC 的活化并缓解肝硬化^[10]。脂肪组织作为 ADMSCs 的来源越来越受到研究者的欢迎,因为获得脂肪组织的侵入性比获得骨髓组织小,因此非常适合临床应用^[11,12]。Sayyed 等^[13]发现脐带源间充质干细胞 (umbilical cord MSCs, UCMSCs) 能更有效地提高白蛋白水平,并且降低丙氨酸转氨酶 (ALT)、一型胶原 (COL1A1)、转化生长因子 (transforming growth factor, TGF)- β 1 和 α -平滑肌肌动蛋白 (alpha smooth muscle actin, α -SMA) 的水平。源于骨髓中的骨髓间充质干细胞 (dental pulp MSCs, DPSCs) 也能参与肝硬化的治疗。将表达了人类肝细胞生长因子的大鼠 DPSC 移植到肝硬化大鼠体内,大鼠的肝功能在一定程度上得到了缓解^[14]。近年来,毛囊间充质干细胞 (hair follicle MSCs, HF-MSCs) 在肝硬化治疗中也逐渐有所研究。HF-MSCs 来源于毛囊的突起,具有来源材料丰富、易获得、免疫原性低、几乎不受年龄限制等特点,有很强的增殖能力。Liu 等^[15]报道 HF-MSCs 通过阻断 TGF- β /Smad 通路,抑制 HSC 活化,从而部分逆转肝硬化。Park 等^[16,17]研究发现,扁桃腺来源间充质干细胞 (tonsil-derived MSCs, T-MSCs) 仅对肝硬化疾病组织有反应,因为它们在受损的肝脏中被检测到,而在健康的肝脏中没有,同时还发现移植的 T-MSCs 分化为肝细胞样细胞,并通过激活自噬和下调 TGF- β 信号通路来消除肝纤维化。

MSCs 可通过多种机制参与保护肝脏及部分逆转肝纤维化。研究表明, MSCs 可以通过促进肝细胞增殖和再生的机制参与治疗肝硬化。Yan 等^[18]发现重组人肝细胞生长因子可以诱导 BMSCs 转化为肝细胞样细胞。MSCs 通过旁分泌作用诱导肝脏修复、改善系统性炎症、促进血管生成、抑制细胞死亡

和纤维化^[19]。旁分泌作用是基于细胞因子、趋化因子、营养因子和细胞外囊泡 (extracellular vesicles, EVs) 的分泌^[20-22]。MSCs 可通过分泌肝脏营养因子,促进肝细胞增殖,重新编程 HSC,在疾病初期逆转纤维化,如肝细胞生长因子^[23]、神经生长因子^[24]、表皮生长因子^[6]、TGF^[23] 和胰岛素样生长因子-1^[25]。此外, MSCs 作为多种免疫细胞的调节因子^[1],在肝硬化的治疗中可分泌多种免疫抑制性可溶性介质抑制 T 细胞增殖和活化,如 IL-10^[26,27] 和吲哚胺 2,3-双加氧酶^[28]。在肝硬化发生时, MSCs 的抗氧化能力也参与抗纤维化的机制。BMSCs 在肝纤维化动物模型中迁移到损伤部位^[29,30],显著减少活性氧产生^[31],下调脂质过氧化^[29],提高超氧化物歧化酶活性^[31,32],并通过 Nrf2/HO-1 信号通路增加 GSH 和抗氧化酶水平^[29,33]。近期研究发现, MSCs 通过参与调控 HSC 的铁死亡和自噬,参与肝纤维化的治疗。人 UCMSCs-外泌体 (exosome, EXs) 衍生的 BECN1 通过降低 xc-/GPX4 系统的活性诱导人肝星状细胞发生铁死亡^[34];而过表达 miR-181-5p 的 ADMSCs 在 Exs 的介导下与大鼠肝星状细胞相互作用, miR-181-5p 通过下调 STAT3/Bcl-2/Beclin 1 信号通路诱导大鼠肝星状细胞发生自噬^[35]。

二、MSCs 治疗肝硬化的临床进展

近年来, MSCs 为各种重大疾病的治疗带来了新希望,其中就包括肝硬化。迄今为止,在美国国立卫生院的临床试验网站 (<https://clinicaltrials.gov>) 上记录了大约 52 项 MSCs 应用于肝硬化治疗的临床研究项目,其中有 11 项已完成,有 12 项正在招募患者,其余项目正在进行。目前参与临床治疗的 MSCs 主要是 BMSCs 和 UC-MSCs,由于这 2 种细胞较容易从自体或者脐带血中获取和大量培养增殖,并且具有低免疫原性以及更符合伦理要求。目前常见的 MSCs 移植途径为经外周静脉、门静脉、下腔静脉和肝动脉注射,其中外周静脉、门静脉和下腔静脉移植注射采用单次或分 3 次进行移植 (每隔 4 周进行 1 次,一共注射 3 次)^[36-40],肝动脉移植注射分为直接肝动脉移植注射和经股动脉至肝动脉注射,采用单次注射或分 2 次注射移植 (2 次间隔时间为 30 d)^[41]。MSCs 移植治疗的患者耐受较好,多数患者肝功能有所改善,生活质量得到提高,在一些相关的实验研究中发现 MSCs 移植治疗后的患者血清中白介素 (IL)-17、I 型胶原、 α -SMA 和多种基质金属蛋白酶 (MMP-2、MMP-9、MMP-13、TIMP-1 等) 降低, IL-10、IL-6、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α ,

TNF- α)和TGF- β 增加^[19,38,42],这意味着MSCs的移植治疗参与改善患者的免疫微环境,起到了部分逆转肝纤维化的作用。然而由于临床的治疗过程相比动物实验中的治疗过程更复杂,以及很难得到患者肝脏的病理标本,MSCs的移植治疗疗效主要通过患者肝功能、影像学检查、血清学检查以及患者的症状缓解程度来判断。

三、MSCs治疗肝硬化的临床前景

目前MSCs正在逐渐参与到临床肝硬化的治疗中,但是单纯的MSCs移植治疗效果不稳定,存在个体差异,科学家们正在深入探究更有效的MSCs治疗方法。在动物实验中,使用了基因工程技术修饰MSCs可以改善肝病的治疗效果^[43]。Liu等^[44]使用慢病毒过表达ECM1修饰HF-MSCs,在小鼠体内通过抑制TGF- β /Smad信号通路逆转HSC的活化。此外,ECM1修饰的HF-MSCs迁移到肝脏损伤部位并表达肝细胞特异性表面标记物,从而改善肝纤维化,促进肝脏修复和增强肝功能。此外,Ye等^[45]使用HGF-4 α 修饰的BMSCs,通过NF- κ B信号通路下调库普弗细胞的激活并促进iNOS的表达,从而减少肝脏炎症。因此,修饰MSCs中的特定基因是提高其治疗肝纤维化能力的一种潜在的新策略。在未来的临床治疗肝硬化中,可以根据不同患者的疾病情况移植基因工程技术修饰后的MSCs,以提高治疗效果,减少个体差异。

MSCs移植多数移植途径会选择通过外周血管静脉注射治疗,但是有出现栓塞的风险。于是在动物实验中,研究者们提出了基于MSCs的无细胞治疗法,即提取MSCs培养基分泌的微小囊泡进行移植治疗^[46]。这些MSCs衍生微小囊泡避免了基于MSCs治疗的潜在致瘤性、细胞排斥、栓塞形成、不期望的分化和感染性转移。EVs是MSCs分泌的重要旁分泌因子,是膜结合的囊泡,包括凋亡小体、微泡和外泌体^[47]。人BMSCs衍生的EVs在小鼠模型中有效地靶向炎症灶并减少纤维化,同时伴有血清天门冬氨酸转氨酶(AST)、胆汁酸和ALT水平的降低。来自MSCs的EXs相比于单纯的MSCs具有优势,它们比细胞更小、更不复杂,因此更容易产生储存以及修饰。基于动物模型的研究表明,EVs可能是治疗肝病的有效无细胞治疗剂。MSCs衍生的EVs发挥有益的治疗作用。然而,目前还没有MSCs衍生EVs在肝脏疾病中的临床试验。

随着细胞培养技术的发展,传统的二维(2D)培养MSCs在治疗肝硬化方面存在一些不足,包括细

胞大规模扩增、体内存活率低以及失去原有特性^[48]。球体培养是一种新型的三维(3D)培养方法,它保留了干细胞和分泌等自然特性,促进了细胞间和细胞-基质间的交流,创造了一种类似活体的生长微环境,并改善了生存和增殖^[49]。据报道,MSCs球体培养可以提高MSCs的治疗潜力^[50]。在动物实验模型中,在CCl4诱导的肝硬化小鼠模型中,UC-MSCs-3D治疗增强了肝细胞分化,促进了肝脏的功能恢复,ALT和AST显著降低,白蛋白轻度升高^[51]。研究还表明,3D培养的MSCs球体通过组织良好的胶原纤维和血管生成生物标志物CD31的高表达显著促进伤口愈合^[52]。这些发现表明MSCs球可能在今后作为一种新的治疗方法,在肝硬化的临床治疗中具有良好的应用前景。

四、总结与展望

近年来,研究者们对MSCs控制肝硬化进展并逆转纤维化方面进行了深入研究,在MSCs如何改善肝纤维化方面取得了实质性进展。然而,如何提高MSCs治疗肝脏疾病的疗效和增加其临床应用仍面临诸多挑战。MSCs来源多样,具有独特的生物学特性,很难将MSCs移植治疗进行标准化^[53]。MSCs临床治疗肝硬化的安全性和有效性还需要在临床试验中继续进行研究。

参考文献

- Cao Y, Ji C, Lu L. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis/cirrhosis [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(8):562.
- Gao Y, Yin X, Ren X. Advance of mesenchymal stem cells in chronic end-stage liver disease control [J]. *Stem Cells Int*, 2022:1526217.
- Friedenstein A, Petrakova K, Kurulesova A, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues [J]. *Transplantation*, 1968, 6(2):230-247.
- Yang X, Li Q, Liu W, et al. Mesenchymal stromal cells in hepatic fibrosis/cirrhosis: from pathogenesis to treatment [J]. *Cell Mol Immunol*, 2023; 20(6):583-599.
- Renesme L, Pierro M, Cobey KD, et al. Definition and characteristics of mesenchymal stromal cells in preclinical and clinical studies: a scoping review [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2022, 11(1):44-54.
- An SY, Jang YJ, Lim H-J, et al. Milk fat globule-EGF factor 8 secreted by mesenchymal stem cells protects against liver fibrosis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(5):1174-1186.
- Terai S, Tsuchiya A, Watanabe Y, et al. Transition of clinical and basic studies on liver cirrhosis treatment using cells to seek the best treatment [J]. *Inflamm Regen*, 2021, 41(1):27.
- Feng Y, Li Y, Xu M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit hepatic fibrosis via the AABR07028795. 2/mo-miR-667-5p axis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1):375.
- Zhang Y, Zhangdi H, Nie X, et al. Exosomes derived from BMSCs mitigate the hepatic fibrosis via anti-pyoptosis pathway in a cirrhosis model [J]. *Cells*, 2022, 11(24):4004.
- Wu B, Feng J, Guo J, et al. ADSCs-derived exosomes ameliorate hepatic fibrosis by suppressing stellate cell activation and remodeling hepatocellular glutamine synthetase-mediated glutamine and ammonia homeostasis [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1):494.
- Naji A, Eitoku M, Favier B, et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(17):3323-3348.

- 12 Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2004, 14(4~6): 311-324.
- 13 Sayyed HG, Osama A, Idriss NK, et al. Comparison of the therapeutic effectiveness of human CD34+ and rat bone marrow mesenchymal stem cells on improvement of experimental liver fibrosis in Wistar rats [J]. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2016, 8(3): 128-139.
- 14 Cao X, Jin S, Sun L, et al. Therapeutic effects of hepatocyte growth factor-overexpressing dental pulp stem cells on liver cirrhosis in a rat model [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15812.
- 15 Liu Q, Lv C, Jiang Y, et al. From hair to liver: emerging application of hair follicle mesenchymal stem cell transplantation reverses liver cirrhosis by blocking the TGF- β /Smad signaling pathway to inhibit pathological HSC activation [J]. *Peer J*, 2022, 10: e12872.
- 16 Kim Y-H, Cho K-A, Park M, et al. Conditioned medium from tonsil-derived mesenchymal stem cells relieves CCl₄-induced liver fibrosis in mice [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2018, 16(1): 51-58.
- 17 Park M, Kim Y-H, Woo S-Y, et al. Tonsil-derived mesenchymal stem cells ameliorate CCl₄-induced liver fibrosis in mice via autophagy activation [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8616.
- 18 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.
- 19 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 Gastro Hepatol*, 2018, 33(4): 774-780.
- 20 Han Y, Yang J, Fang J, et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 92.
- 21 Wang J, Cen P, Chen J, et al. Role of mesenchymal stem cells their derived factors and extracellular vesicles in liver failure [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 137.
- 22 Liu W, Song F, Ren L, et al. The multiple functional roles of mesenchymal stem cells in participating in treating liver diseases [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(3): 511-520.
- 23 Wang J, Bian C, Liao L, et al. Inhibition of hepatic stellate cells proliferation by mesenchymal stem cells and the possible mechanisms [J]. *Hepatol Res*, 2009, 39(12): 1219-1228.
- 24 Lin N, Hu K, Chen S, et al. Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells [J]. *Life Sci*, 2009, 85(7~8): 291-295.
- 25 Choi JS, Park Y-J, Kim S-W. Three-dimensional differentiated human mesenchymal stem cells exhibit robust antifibrotic potential and ameliorates mouse liver fibrosis [J]. *Cell Transplant*, 2021, 30: 963689720987525.
- 26 Wang D, Zhang H, Liang J, et al. Effect of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation in a polyI:C-induced primary biliary cirrhosis mouse model [J]. *Clin Exp Med*, 2011, 11(1): 25-32.
- 27 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.
- 28 Milosavljevic N, Gazdic M, Simovic Markovic B, et al. Mesenchymal stem cells attenuate liver fibrosis by suppressing Th17 cells - an experimental study [J]. *Transp Int*, 2018, 31(1): 102-115.
- 29 Khadravy SM, Mohamed HM, Mahmoud AM. Mesenchymal stem cells ameliorate oxidative stress inflammation and hepatic fibrosis via Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2021, 28(2): 2019-2030.
- 30 Mohamed HE, Elswefy SE, Rashed LA, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells effectively regenerate fibrotic liver in bile duct ligation rat model [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(6): 581-591.
- 31 Cho KA, Woo SY, Seah JY, et al. Mesenchymal stem cells restore CCl₄ - induced liver injury by an antioxidative process [J]. *Cell Biology International*, 2012, 36(12): 1267-1274.
- 32 Sasaki R, Takami T, Fujisawa K, et al. Trans-portal hepatic infusion of cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a steatohepatitis murine model [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2020, 67(3): 274-282.
- 33 Ayatollahi M, Hesami Z, Jamshidzadeh A, et al. Antioxidant effects of bone marrow mesenchymal stem cell against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rat livers [J]. *Int J Organ Transplant Med*, 2014, 5(4): 166-173.
- 34 Tan Y, Huang Y, Mei R, et al. HucMSCs-derived exosomes delivered BECN1 induces ferroptosis of hepatic stellate cells via regulating the xCT/GPX4 axis [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 319.
- 35 Qu Y, Zhang Q, Cai X, et al. Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(10): 2491-2502.
- 36 Wang L, Han Q, Chen H, et al. Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with UDCA-resistant primary biliary cirrhosis [J]. *Stem Cells Development*, 2014, 23(20): 2482-2489.
- 37 Shi M, Li Y-Y, Xu R-N, 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.
- 38 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 Gastro Hepatol*, 2012, 27(suppl 2): 112-120.
- 39 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.
- 40 Kharazilha P, Hellström PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial [J]. *Europ J Gastroenterol-Hepatol*, 2009, 21(10): 1199-1205.
- 41 Suk KT, Yoon J, 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.
- 42 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 T reg/ T h17 cells [J]. *J Gastro Hepatol*, 2014, 29(8): 1620-1628.
- 43 Hu C, Zhao L, Li L. Genetic modification by overexpression of target gene in mesenchymal stromal cell for treating liver diseases [J]. *J Mol Med*, 2021, 99(2): 179-192.
- 44 Liu Q, Lv C, Huang Q, et al. ECM1 modified HF-MSCs targeting HSC attenuate liver cirrhosis by inhibiting the TGF- β /Smad signaling pathway [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 51.
- 45 Ye Z, Lu W, Liang L, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte nuclear factor-4 alpha alleviate liver injury by modulating anti-inflammatory functions in mice [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 149.
- 46 Phinney DG, Pittenger MF. Concise review: MSC-Derived exosomes for cell-free therapy [J]. *Stem Cells*, 2017, 35(4): 851-858.
- 47 Doyle LM, Wang MZ. Overview of extracellular vesicles their origin composition purpose and methods for exosome isolation and analysis [J]. *Cells*, 2019, 8(7): 727.
- 48 Qiao Y, Xu Z, Yu Y, et al. Single cell derived spheres of umbilical cord mesenchymal stem cells enhance cell stemness properties, survival ability and therapeutic potential on liver failure [J]. *Biomaterials*, 2020, 227: 119573.
- 49 Murphy KC, Hoch AI, Harvestine JN, et al. Mesenchymal stem cell spheroids retain osteogenic phenotype through $\alpha 2\beta 1$ signaling [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2016, 5(9): 1229-1237.
- 50 Zhang X, Hu M-G, Pan K, et al. 3D spheroid culture enhances the expression of antifibrotic factors in human adipose-derived MSCs and improves their therapeutic effects on hepatic fibrosis [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 4626073.
- 51 El Baz H, Demerdash Z, Kamel M, et al. Induction of hepatic regeneration in an experimental model using hepatocyte-differentiated mesenchymal stem cells [J]. *Cellular Reprogramming*, 2020, 22(3): 134-146.
- 52 Nilforoushzadeh MA, Khodadadi Yazdi M, Baradaran Ghavami S, et al. Mesenchymal stem cell spheroids embedded in an injectable thermo-sensitive hydrogel: an in situ drug formation platform for accelerated wound healing [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(9): 5096-5109.
- 53 Wang L, Liu K, Sytwu H, et al. Advances in mesenchymal stem cell therapy for immune and inflammatory diseases: Use of cell-free products and human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10(9): 1288-1303.