

间充质干细胞治疗疑难肝病的机遇与挑战

徐若男 林沪 吕飒 王福生

【摘要】 间充质干细胞(MSC)是一群来源于中胚层的多能干细胞,具有多项分化发育潜能。MSC的多潜能性、可扩增性、取材广泛性(骨髓、脐带、脐带血、羊膜、脂肪等组织)等诸多特点为其临床应用奠定了重要基础。在国外, MSC已经获得了临床新药批号,用于移植物抗宿主病(GVHD)的治疗。此外,在心血管疾病、骨及软骨损伤、血液系统疾病、肝脏疾病和自身免疫性疾病等方面,也展示了良好的安全性和初步疗效。尤其是在疑难肝病例如:急性肝衰竭、慢加急性肝衰和失代偿性肝硬化等的临床治疗中也取得了一定效果。疑难肝病的死亡率高,治疗手段有限,需要研发新型、有效的治疗手段来降低死亡率。本文将分析本领域的相关进展,同时分析有关需要解决的问题。

【关键词】 间充质干细胞; 安全性; 死亡率; 肝病

Mesenchymal stem cells for the treatment of end-stage liver diseases: opportunities and challenges Xu Ruonan, Lin Hu, Lyu Sa, Wang Fusheng. Research Center for Biological Therapy, the Institute of Translational Hepatology, Beijing 302 Hospital, Beijing 100039, China
Corresponding author: Wang Fusheng, Email: fswang302@163.com

【Abstract】 Mesenchymal stem cells (MSC) are adults stem cells that originate from bone marrow, umbilical cord, cord blood, amniotic membrane, adipose tissue, etc. These cells show self-renewal and multidirectional differentiation potential, which are important for their application. Now, MSC have been authorized to treat graft-versus-host disease as a novel drug. In addition, MSC have been documented for their safety and preliminary efficacy in cardiovascular disease, severe osteogenesis imperfect, hematological disease, autoimmune disease, and liver disease including acute liver failure, acute-on-chronic liver failure and decompensated liver cirrhosis. To date, treatment options of end-stage liver diseases are limited and exclusively supportive. In this respect, more therapeutic strategies are needed in order to reduce the mortality. This review focuses on potentially relevant development in this field and analyzes the associated problems.

【Key words】 Mesenchymal stem cell; safety; mortality; liver diseases

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)不仅具有多项分化发育潜能,同时还具有免疫调节和抑制炎症等作用。所有MSC的这些功能为其临床应用奠定了重要基础。目前, MSC已经获得了临床新药批号,用于移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)的治疗。此外,在心血管疾病、骨及软骨损伤、血液系统疾病和自身免疫性疾病的治疗方面,显示出了较好的安全性和初步疗效。近年来

的研究表明: MSC在慢加急性肝衰(或慢性肝衰竭)和失代偿性肝硬化等的临床治疗中也显示出良好的应用前景。本文分别将相关的基础研究、临床试验和亟待解决的相关临床应用方面的问题进行了综述。

一、MSC与疑难肝病的基础研究

MSC首先由Friedenstein等^[1]于1966年从骨髓中发现,传统理论认为这群细胞在特定诱导条件下可向三种组织细胞即骨、软骨和脂肪细胞分化。近来,越来越多的研究发现, MSC具有向多种细胞包括肌腱、韧带、肝细胞、心肌细胞和骨髓基质等分化发育的潜能^[2-3]。2005年Sato等^[4]通过将人的

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-1221.2014.04.009

作者单位: 100039 北京,解放军第302医生生物治疗研究中心

通讯作者: 王福生, Email: fswang302@163.com

MSC 移植入大鼠体内,首次证实 MSC 可以在体内定居、分化。随后 Campard 等^[5]用肝细胞生长因子通过两步法在体外将脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cell, UC-MSC)成功诱导成在形态和分子标记物上都具有肝细胞特征的细胞,后续又通过白蛋白和尿素分泌、糖元贮积、低密度脂蛋白摄取和细胞色素 P450 活化等研究,进一步证实人的 MSC 能够分化成有功能的肝细胞。2011 年 Gholamrezanezhad 等^[6]所在的研究小组发现,将标记高放射性元素的 MSC 静脉注射入肝硬化患者后,该群细胞 20 min 后迅速聚集到肝脏组织,随后向肝脏和脾脏迁移,大概在 10 d 后,大量的聚集到上述两个组织。在后续 1 个月的随访过程中 MSC 持续存在。基于上述研究,2014 年 Pan 等^[7]通过体外长期培养,发现 MSC 自发转化为肿瘤细胞的几率很低,只有超长时间的连续培养后,才会发生少量细胞癌变,证实了 MSC 的安全性。

既往认为,干细胞移植可提供肝细胞样细胞分化的种子细胞,从而补充正常肝脏所需的合成和代谢功能,从而有针对性的治疗肝脏疾病。然而,越来越多的实验证明,干细胞借助于改变组织微环境的旁分泌机制比干细胞向肝细胞的直接转化更有意义^[8-9]。MSC 对肝脏炎症的抑制作用与其对免疫系统的调控密不可分。研究证实, MSC 对免疫细胞进行的多层次调控表现为:抑制 T 细胞、B 细胞的激活和增殖;影响 DC 细胞的移位、成熟,降低 T 细胞对抗原的识别能力;与 NK 细胞表面的特定受体结合,诱导 NK 细胞的免疫耐受等^[10]。同时 MSC 还可以通过抑制炎症因子 IL-1、TNF- α 的产生发挥抗凋亡效应。MSC 的免疫调控效应不存在组织来源特异性,无论是脐带、骨髓或脂肪来源的 MSC 均可以发挥相同的作用。更为有意义的是,供者来源、受者来源甚至“第三方”来源的 MSC 在体内都可以发挥相同的功能。

基于 MSC 的上述特点,人们开始考虑应用 MSC 治疗肝脏疾病,并首先在动物模型中进行了初步探索。2008 年 Kuo 等^[11]以爆发性肝衰竭小鼠模型为研究对象,给予 MSC 治疗,结果显示直接输注 MSC 治疗效果明显好于输注 MSC 诱导后的肝细胞(MSC derived hepaocytes)样细胞,且静脉回输效果明显高于脾脏注射。2012 年,李兰娟教授课题组以猪的急性肝衰竭模型为研究对象,通过肝门静脉回输人源的骨髓 MSC 成功改善了猪的肝脏功能,猪体内 ALT, PT 和 TB 等肝功能指标明显降低,提

高了模型动物的长期(> 6 个月)存活率^[12]。

二、MSC 治疗疑难肝病的临床试验

动物模型的研究成果促进了临床试验的开展。目前,仅在 Clinicaltrials.gov 网站上注册的关于 MSC 治疗肝脏疾病的临床试验就有 40 余项,多数处于临床试验的早期或中期,主要包括肝硬化、肝衰竭、遗传代谢性肝病等。初步的结果显示, MSC 治疗肝脏疾病安全性好、可以改善肝脏功能、并提高患者的生活质量。2011 年,高志良教授课题组尝试通过单次肝固有动脉回输自体骨髓来源的 MSC 治疗慢性乙肝基础上发生的肝衰竭,虽然长期疗效并不显著,但是他们首次证明该方法应用于人体是安全的,可以在短期内改善多种肝脏功能的相关指标(ALB、TBIL、PT 和 MELD 等),并且对肝硬化有一定的改善作用^[13]。傅青春教授等^[14]于 2010 年开展的人 UC-MSC 剂量递增静脉注射治疗失代偿肝硬化的安全性研究结果显示,失代偿肝硬化患者静脉输注 MSC 是安全的,细胞治疗能部分改善患者的肝脏功能,在为期 2 年的随访中没有发现诱发肿瘤的风险。Kharaziha 等^[15]开展的自体 MSC 治疗失代偿肝硬化患者的临床研究证实, MSC 治疗 6 个月后,患者的 MELD 评分降低,肝功能和白蛋白合成功能得到改善。笔者团队一直致力于 UC-MSC 治疗疑难性肝病的研究,分别对慢加急性肝衰竭、失代偿性肝硬化和难治性原发性胆汁性肝硬化进行了相关的临床研究。2012 年,本课题组应用 UC-MSC 治疗失代偿性肝硬化患者的临床研究观察到, UC-MSC 治疗能降低肝硬化患者胆红素水平、减少腹水生成、提高肝脏白蛋白合成能力。为期 1 年随访中没有发现 UC-MSC 的毒副作用^[16]。同年,本课题组应用 UC-MSC 治疗乙肝慢加急性肝衰竭的患者,临床结果证实, UC-MSC 回输患者后可明显提高患者的生存率^[17]。2013 年,本课题组通过回输 UC-MSC 尝试治疗难治性原发性胆汁性肝硬化患者,结果显示:该治疗方法可以明显改善患者的特异性生化指标(ALP 和 GGT),抑制疾病的进展(Mayo risk 评分和 MELD 评分),并且明显改善患者的疲劳和瘙痒等临床症状,取得了很好的疗效^[18]。Jang 等^[19]采用自体骨髓 MSC 治疗酒精性肝硬化患者的临床试验,从组织学角度进一步验证了 MSC 治疗的有效性。在接受 2 次肝动脉细胞回输后,不仅酒精性肝硬化患者的 Child 评分、平滑肌蛋白、 α 型胶原蛋白、TGF- β 的水平均明显降低,作为金标准的组织病理学结果也得到明显改善。

近期临床试验的结果并不完全一致,来自伊朗的一项实验结果显示,自体骨髓来源的 MSC 治疗失代偿性肝硬化无效。细胞治疗后肝功能、MELD 评分、Child 评分、血浆白蛋白水平、凝血酶原活动度等指标在实验组和对照组之间没有明显差异^[20],但上述阴性结果不能排除乙肝患者自身骨髓来源的 MSC 存在增殖缺陷的风险^[21]。临床试验也在探讨 MSC 分化与否对于肝硬化治疗效果的差异。来自埃及的研究显示,骨髓 MSC 治疗能改善丙肝肝硬化患者肝脏功能、降低胆红素水平、降低 MELD 评分,但在实验室和临床观察中,分化后的干细胞与原始干细胞比较并没有显示出明显优势^[22],进一步提示 MSC 的旁分泌效应比干细胞向肝细胞的转化更重要。

三、挑战与展望

继药物治疗和手术治疗后,生物治疗成为医学领域的第三大支柱产业。而 MSC 治疗作为生物治疗的重要组成部分,如何被充分利用,从而使我国干细胞治疗肝脏疾病的水平居于世界前列,是每一位转化医学工作者努力的方向。为了实现上述目标,研究人员需要应对诸多挑战:(1)从国家层面上对干细胞的临床研究进行规范管理迫在眉睫。前期,国内多家单位都在进行干细胞治疗的临床项目,也取得了一定的进展,但仍存在一定的乱象。国家卫生部及时发现并做出调整。相继出台了《干细胞临床研究管理暂行办法(试行)》、《干细胞临床研究基地管理暂行办法(试行)》、《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则(试行)》等法规以规范干细胞的临床实验,以促进干细胞研究的良性发展。但如何尽早实施、监管仍是难题;(2)干细胞的临床研究需要符合伦理原则;临床研究的终极目标是要最大限度的受益患者;但在实施过程中需要符合临床实验的伦理原则,保护受试者、捐献者的生命健康权益;同时要考虑技术自身的安全性、有效性,使风险性降到最低;真正有效履行知情同意、保护个人隐私、是干细胞临床研究服务公众健康的基础;(3)MSC 的疗效有待进一步确认;尽管有多篇文章报道了 MSC 治疗各种疑难肝病,并都得到了不错的疗效,但是这些报道多为小样本、单中心、开放、单治疗组的临床试验;要真正获得令人信服的疗效,还需要大样本、多中心、随访、双盲对照的临床试验加以验证;(4)MSC 的安全性问题(致瘤性)值得关注;到目前为止,没有一例报道关于 MSC 治疗肝脏疾病导致肝癌的病例,但这可能与随访时间的长

短有关;随着 MSC 治疗开展时间的延长,其安全性问题会得到最终的证实;(5)如何规范 MSC 输注的途径、细胞的数量(剂量)、间隔时间和治疗疗程,以及明确 MSC 治疗的适应证和禁忌证对于最终的疗效评估至关重要;(6)明确 MSC 进入体内后的半衰期、器官定位、免疫反应、具体治疗机制等都与其后续的合理应用息息相关。

总之,机遇与挑战并存,相信通过广大科研工作者和临床医生的共同努力,中国的干细胞治疗肝病的项目一定会取得令人可喜的成绩。

参 考 文 献

- 1 Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells[J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1966, 16(3):381-390.
- 2 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411):143-147.
- 3 Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. *Science*, 1997, 276(5309):71-74.
- 4 Sato Y, Araki H, Kato J, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion[J]. *Blood*, 2005, 106(2): 756-763.
- 5 Campard D, Lysy PA, Najimi M, et al. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(3):833-848.
- 6 Gholamrezaezhad A, Mirpour S, Bagheri M, et al. *In vivo* tracking of ¹¹¹In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis[J]. *Nucl Med Biol*, 2011, 38(7):961-967.
- 7 Pan XH, Yang XY, Yao X, et al. Bone-marrow mesenchymal stem cell transplantation to treat diabetic nephropathy in tree shrews[J]. *Cell Biochem Funct*, 2014, 32(5):453-463.
- 8 Izadpanah R, Trygg C, Patel B, et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99(5):1285-1297.
- 9 Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A, et al. Human mesenchymal stroma cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1-integrin-dependent mechanism[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(3):798-806.
- 10 English K, Barry FP, Mahon BP. Murine mesenchymal

- stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation[J]. *Immunol Lett*, 2008, 115(1):50-58.
- 11 Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, 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.
- 12 Li J, Zhang L, Xin J, et al. Immediate intraportal transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells prevents death from fulminant hepatic failure in pigs[J]. *Hepatology*, 2012, 56(3):1044-1052.
- 13 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.
- 14 傅青春, 姜舒, 王晓今, 等. 人脐带间充质干细胞剂量递增静脉输注治疗失代偿性肝硬化的安全性研究 [J]. *肝脏*, 2014, 19(1):3-7.
- 15 Kharaziha 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]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(10):1199-1205.
- 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 Suppl 2:112-120.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 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.
- 20 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.
- 21 Zhong YS, Lin N, Deng MH, et al. Deficient proliferation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with chronic hepatitis B viral infections and cirrhosis of the liver[J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(2):438-445.
- 22 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*, 2012, 8(3):972-981.

(收稿日期: 2014-09-15)

(本文编辑: 李少婷)

徐若男, 林沪, 吕飒, 等. 间充质干细胞治疗疑难肝病: 机遇与挑战 [J/CD]. *中华细胞与干细胞杂志: 电子版*, 2014, 4(4):268-271.

中 华 医 学 会