

人脐带间充质干细胞治疗失代偿期肝硬化的近期效果**

张月凡¹, 李楠², 翟俊山², 姜丽君², 曹建宁³

Short-term effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in treatment of patients with decompensated cirrhosis

Zhang Yue-fan¹, Li Nan², Zhai Jun-shan², Jiang Li-jun², Cao Jian-ning³

Abstract

BACKGROUND: Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UCMSCs) can differentiate into hepatocyte-like cells.

OBJECTIVE: To investigate short-time clinical effects of UCMSCs transplantation in treatment of patients with decompensated cirrhosis.

METHODS: Thirty patients with decompensated cirrhosis were involved. Eighteen patients in the control group were treated with conventional therapy, while twelve patients in the transplantation group were treated with UCMSCs transplantation via hepatic artery based on conventional therapy.

RESULTS AND CONCLUSION: After transplantation, albumin level in the transplantation group showed an ascend trend and had a significant increase ($P < 0.05$) compared with the control group from 2 weeks to 12 weeks of transplantation. Meanwhile, both alanine aminotransferase and prothrombin time levels began to decrease at 2 weeks after transplantation and were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$) from 8 weeks to 12 weeks of transplantation. In contrast to the controls, the level of total bilirubin in the transplantation group showed an ascend trend and had a significant increase ($P < 0.05$) from 4 weeks to 12 weeks of transplantation. The differences in clinical symptoms and signs between the two groups were not significant ($P > 0.05$). The transplantation of UC-MSCs via hepatic artery is effective in short time for treatment of patients with decompensated cirrhosis.

Zhang YF, Li N, Zhai JS, Jiang LJ, Cao JN. Short-term effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in treatment of patients with decompensated cirrhosis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14): 2585-2588. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 脐带间充质干细胞可分化为肝细胞样细胞。

目的: 观察人脐带间充质干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的近期临床效果。

方法: 选择肝硬化失代偿期患者 30 例, 对照组 18 例给予内科常规治疗, 移植组 12 例在内科综合治疗基础上经肝动脉移植人脐带间充质干细胞悬液治疗。

结果与结论: 移植后, 移植组白蛋白有上升趋势, 从第 2 周开始明显高于对照组($P < 0.05$), 并持续至第 12 周; 谷丙转氨酶和凝血酶原时间有下降趋势, 从第 8 周开始明显低于对照组($P < 0.05$), 并持续至第 12 周; 总胆红素水平有下降趋势, 从第 4 周开始明显低于对照组($P < 0.05$), 并持续至第 12 周。两组临床症状、体征改善情况差异无显著性意义($P > 0.05$)。说明经股动脉移植人脐带间充质干细胞是治疗失代偿期肝硬化近期有效。

关键词: 肝硬化; 脐带; 间充质干细胞; 失代偿期; 肝动脉; 移植

缩略语注释: UC-MSCs: human umbilical cord mesenchymal stem cells, 人脐带间充质干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.14.024

张月凡, 李楠, 翟俊山, 姜丽君, 曹建宁. 人脐带间充质干细胞治疗失代偿期肝硬化的近期效果[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14):2585-2588. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Postgraduate Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China;
²Department of Gastroenterology, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China;
³Beike Bio-Technology Co., Ltd., Shenzhen 518057, Guangdong Province, China

Zhang Yue-fan★, Studying for master's degree, Postgraduate Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China
zyf490@163.com

Corresponding author: Li Nan, Doctor, Chief physician, Doctoral supervisor, Department of Gastroenterology, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China
linan957@sina.com

Supported by: Wu Jieping Medical Foundation, No. 320.6710.10001*

Received: 2011-10-09
Accepted: 2011-11-18

0 引言

目前临床治疗肝硬化除内科综合治疗外, 肝移植是治疗的最理想方法, 但存在供体缺乏、手术并发症多、移植排斥反应和手术费用昂贵等不足。随着干细胞研究在医学领域取得的显著成就, 间充质干细胞, 尤其是人脐带间充质干细胞(human umbilical cord mesenchymal stem cells, UCMSCs)逐渐显现出其优越性, 并已被广泛应用于治疗临床各种疾病, 这也为失代偿期肝硬化患者的治疗提供了新思路。

国内外学者在大量实验中已经证实 UC-MSCs 可诱导分化为肝细胞样细胞^[1-4], 如

Zhao 等^[5]诱导 UC-MSCs 分化为肝细胞样细胞, 并从基因和蛋白水平证实其表达肝细胞特异标记, 具有肝细胞特定的功能, 如分泌白蛋白、摄取低密度脂蛋白、产生尿素等。迄今为止, 临床上利用 UC-MSCs 移植治疗终末期肝病的报道仍较少。本文将本院开展的经肝动脉 UC-MSCs 移植治疗肝硬化患者的近期疗效作一分析。

1 对象和方法

设计: 完全随机设计病例对比分析。

时间及地点: 于 2009-03/2010-12 在解放军第 309 医院消化科完成。

¹解放军军医进修学院, 北京市 100853; ²解放军第309医院消化内科, 北京市 100091; ³深圳市北科生物科技有限公司, 广东省深圳市 518057

张月凡★, 女, 1985年生, 河北省保定市人, 解放军军医进修学院在读硕士, 主要从事炎症性肠病基础与临床研究工作。
zyf490@163.com

通讯作者: 李楠, 主任医师, 博士, 博士生导师, 解放军第309医院消化科, 北京市 100091
linan957@sina.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)14-02585-04

收稿日期: 2011-10-09
修回日期: 2011-11-18
(20110822018/GW·L)

对象:

失代偿期肝硬化诊断标准^[6-7]: ①有病毒性肝炎、长期大量饮酒等可导致肝硬化的有关病史。②有肝功能减退和门静脉高压的临床表现。③肝功能实验有血清白蛋白下降、血清胆红素升高及凝血酶原时间延长等指标提示肝功能失代偿。④B超或CT提示肝硬化以及内镜发现食管胃底静脉曲张。⑤肝活组织检查见假小叶形成是诊断本病的金标准。

纳入标准: ①临床确诊为肝硬化失代偿期者。②经其他传统治疗无效或效果不满意者。③年龄18~75岁, 男女不限, 育龄期妇女孕检阴性者。④本人或其近亲属自愿接受干细胞移植治疗, 签署干细胞移植治疗同意书, 并报医院伦理委员会批准。

排除标准: 肝内占位性病变、伴有严重并发症或其他严重疾病者。

选择2009-03/2010-12在本院确诊并住院治疗的失代偿期肝硬化患者30例。随机分为两组: ①移植组12例, 其中男8例, 女4例, 年龄26~74岁, 平均(48.63±11.04)岁; 其中肝炎后肝硬化8例, 酒精性肝硬化4例; 肝功能Child-Pugh A级2例, B级5例, C级5例。②对照组18例, 其中男13例, 女5例, 年龄23~70岁, 平均(49.86±10.32)岁; 其中肝炎后肝硬化13例, 酒精性肝硬化5例; 肝功能Child-Pugh A级5例, B级9例, C级4例。

UC-MSCs细胞来源: 由深圳市北科生物科技有限公司提供, 供者均为足月顺产或剖腹产健康产妇, 同意捐献, 并签同意书。

实验方法:

UC-MSCs细胞的制备: 参考文献[8-9]分离、培养、纯化UC-MSCs细胞, 并进行表型鉴定, 取第3代细胞, 制成细胞悬液10 mL, 细胞数量不少于 2×10^7 。

两组治疗方式: 移植组在保肝、利尿、补充白蛋白及营养支持等内科综合治疗基础上, 给予经肝动脉移植UC-MSCs细胞悬液治疗, 对照组给予保肝、利尿、补充白蛋白及营养支持等常规治疗。

UC-MSCs移植方法: 术前1 d行碘过敏实验、双侧腹股沟备皮, 术前4 h禁食水, 在数字减影血管造影下经股动脉穿刺插管, 置管于肝固有动脉进行造影, 观察肝内血管情况及有无占位性病变。将UC-MSCs细胞悬液10 mL于20~30 min内经左右肝动脉缓慢注入; 术毕拔管, 穿刺点加压包扎后返回病房, 穿刺侧下肢制动

6 h^[10]。术后预防性使用抗感染及对症治疗3 d。

主要观察指标: 两组患者治疗前、治疗后2, 4, 8, 12周肝功能指标, 包括白蛋白、谷丙转氨酶、总胆红素、凝血酶原时间, 并观察临床症状改善情况和不良反应。

统计学分析: 使用SPSS 11.0统计软件进行统计分析, 率的比较资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

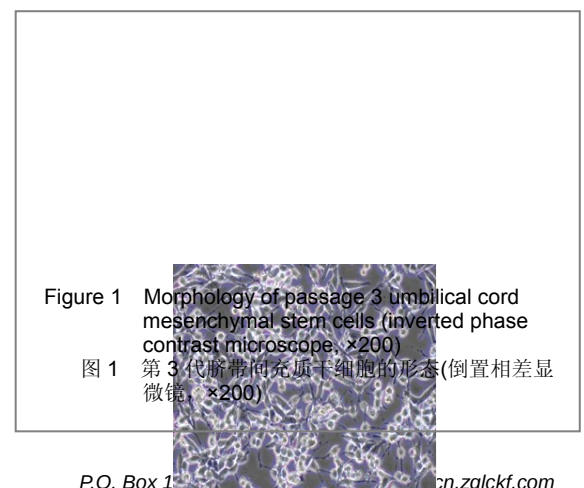
2.1 参与者数量分析 按意向性分析处理, 两组患者均进入结果分析, 无脱落。

2.2 两组基线资料比较 见表1。

表1 两组患者基线资料比较 Table 1 Comparison of baseline information of patients in both groups		
Item	Transplantation group	Control group
Age ($\bar{x} \pm s$, yr)	48.63±11.04	49.86±10.32
Male/Female	8/4	13/5
Liver function grade (A/B/C)	2/5/5	5/9/4
Albumin (g/L)	29.38±3.81	29.36±4.00
Alanine aminotransferase (nkat/L)	1 855.87±799.66	1 769.85±645.46
Total bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	120.87±8.10	117.77±7.62
Prothrombin time (s)	23.87±3.90	23.13±4.03

由表1可见, 两组病例在性别、年龄分布、治疗前肝功能各项实验指标差异无显著性意义。

2.3 UC-MSCs细胞形态和免疫表型分析 取第3代UC-MSCs细胞在倒置显微镜下观察, 细胞生长均匀, 呈梭形, 形态似“成纤维样细胞样”。与脐带造血干细胞比较, 细胞表面抗原不表达CD34、CD45, 表达CD105, 证实为UC-MSCs细胞^[11-12], 见图1, 2(图片由深圳市北科生物科技有限公司提供)。



a: Control group

b: Phenotype of umbilical cord hematopoietic stem cells, CD34⁺CD45⁺CD105⁺c: Phenotype of umbilical cord mesenchymal stem cells, CD34⁺CD45⁺CD105⁺

Figure 2 Flow cytometry analysis of umbilical cord hematopoietic stem cells and umbilical cord mesenchymal stem cells

图2 脐带造血干细胞和脐带间充质干细胞的流式细胞分析

2.4 两组临床症状改善比较 UC-MSCs细胞移植后多数患者第4周临床症状、体征开始改善,第8周改善明显,其中食欲好转7例(58%),腹胀减轻5例(42%),体力好转8例(67%),腹水减轻8例(67%),但与对照组比较,差异均无显著性意义($P > 0.05$)。具体见表2。

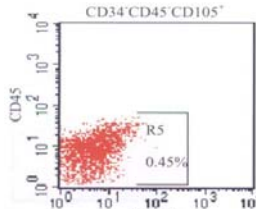


表2 治疗后第8周两组临床症状改善情况比较

Group	Abdominal distension	Physical fatigue	Ascites
Transplantation	5/58	7/42	4/67
Control	12/33	12/33	7/61
P	> 0.05	> 0.05	> 0.05

2.5 两组治疗后肝功能改变情况 见表3。

由表3可见,移植组白蛋白于移植后有上升趋势,并从第2周开始明显高于对照组($P < 0.05$),并持续至第12周;谷丙转氨酶和凝血酶原时间水平均在移植后有下降趋势,从第8周开始明显低于对照组($P < 0.05$),并持续至第12周。

2.6 UC-MSCs移植不良反应 12例患者经肝动脉UC-MSCs移植成功率为100%,未发现严重不良反应及并发症。术后2例患者发热,24 h内自行缓解;穿刺部位无出血及渗出;无出血、感染、肝区疼痛等并发症。

表3 两组治疗后肝功能水平比较
Table 3 Comparison of liver function between the two groups after transplantation (x±s)

Time after transplantation	Transplantation group	
	Alanine aminotransferase (nkat/L)	Albumin (g/L)
0 wk	1 855.87±799.66	29.38±3.81
2 wk	1 715.68±691.81	32.81±1.81 ^c
4 wk	1 178.07±514.27	34.27±1.64 ^d
8 wk	838.33±242.72 ^a	35.13±1.58 ^e
12 wk	523.77±77.02 ^b	36.08±1.68 ^f
Time after transplantation	Transplantation group	
	Total bilirubin (μmol/L)	Prothrombin time (s)
0 wk	120.87±8.10	23.87±3.90
2 wk	112.56±9.07	21.00±3.71
4 wk	80.93±4.84 ^g	19.52±3.35
8 wk	62.37±4.14 ^h	17.13±1.91 ⁱ
12 wk	56.05±3.22 ^j	15.31±4.00 ^k
Time after transplantation	Control group	
	Alanine aminotransferase (nkat/L)	Albumin (g/L)
0 wk	1 769.85±645.46	29.36±4.00
2 wk	1 581.82±641.63	30.19±2.95
4 wk	1 260.42±528.11	31.62±3.90
8 wk	1 181.74±515.77	32.91±3.19
12 wk	947.36±394.91	33.91±2.09
Time after transplantation	Control group	
	Total bilirubin (μmol/L)	Prothrombin time (s)
0 wk	117.77±7.62	23.13±4.03
2 wk	110.16±8.62	22.24±2.81
4 wk	94.98±9.55	21.06±3.26
8 wk	85.53±4.20	21.68±6.67
12 wk	75.16±8.47	19.35±3.47

^a $P=0.046$ 9, ^b $P=0.001$ 1, ^c $P=0.010$ 7, ^d $P=0.035$ 2, ^e $P=0.033$ 6, ^f $P=0.005$ 6, ^g $P=0.000$ 1, ^h $P=0.000$ 0, ⁱ $P=0.000$ 0, ^j $P=0.029$ 8, ^k $P=0.006$ 5, vs. control group

3 讨论

干细胞包括间充质干细胞和造血干细胞。目前造血干细胞技术比较成熟,临床上多用于血液系统疾病,而间充质干细胞相关基础研究和临床应用成为国内外学者研究的热点。

间充质干细胞为中胚层发育的早期细胞,具有全能干细胞特点,且具有多向分化潜能。研究发现间充质干细胞具有肯定的支持造血功能,而且在一定的实验条件下可分化为骨、软骨、脂肪、肌腱、肌肉、神经、基质、肝和内皮等多种细胞^[13]。因此作为组织工程种子细胞具有广阔的临床前景。间充质干细胞存在于身体的很多部位,骨髓、脐带和脐血是间充质干细胞最主要来源。

目前多数学者研究集中于骨髓来源的间充质干细胞,但由于其存在高度病毒污染的可能,采集时创伤性

大,且随着年龄增长其细胞数量和扩增分化能力出现明显下降趋势,故应用受到了一定限制。因此寻找一种能替代骨髓源性间充质干细胞,并可弥补其缺陷的间充质干细胞,已越来越受到各国学者的关注。脐带和脐血都是在胚胎娩出后,与胎盘一起存在的医疗废物。与脐血相比,脐带来源的间充质干细胞更丰富,取材更方便,具有肿瘤和微生物污染机会少等优点,分离出的间充质干细胞纯度更高,且免疫原性低,不表达主要组织相容性复合体抗原,能耐受更大程度HLA配型不符^[14]。有文献报道足月分娩胎儿脐血间充质干细胞培养成功率偏低,此时获取间充质干细胞最佳途径应该是脐带^[14]。

近年来,已有学者着手研究UC-MSCs在糖尿病、系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎等免疫系统疾病中的临床应用,临床研究表明UC-MSCs移植对上述疾病治疗取得了一定疗效,这也为失代偿期肝硬化患者的治疗提供了新思路。Ren等^[15]利用四氯化碳诱导的肝硬化模型证实了人脐血间充质干细胞移植后可以分化为肝细胞样细胞,但不促进肝窦毛细血管化和小静脉化,从而缓解肝功能。Jung等^[16]研究发现,脐血间充质干细胞通过干扰参与糖代谢过程的关键酶的水平,进而改善肝硬化大鼠模型的糖代谢紊乱状态,糖代谢异常是影响肝硬化患者病情进展和预后的重要因素。Zhang等^[17]利用肝细胞生长因子和成纤维细胞生长因子4诱导UC-MSCs成功分化为肝细胞样细胞后,从分子水平上证实其表达白蛋白、甲胎蛋白、CK-18等肝细胞特异性标记。

本实验采用经肝动脉移植UC-MSCs治疗肝硬化失代偿期患者,并以内科常规治疗组做对照。研究发现:移植组白蛋白水平于移植后有上升趋势,并从第2周开始与对照组比较差异有显著性意义,持续至第12周($P < 0.05$);谷丙转氨酶和凝血酶原时间水平均在移植后有下降趋势,但从第8周开始与对照组比较差异有显著性意义,持续至第12周($P < 0.05$);总胆红素水平于移植后有下降趋势,但从第4周开始与对照组比较差异有显著性意义,并持续至第12周($P < 0.05$)。临床症状和体征示:多数患者第4周临床症状、体征开始改善,第8周改善明显,其中食欲好转7例(58%),腹胀减轻5例(42%),体力好转8例(67%),腹水减轻8例(67%),但与对照组比较,差异均无显著性意义($P > 0.05$)。此次移植未发现严重不良反应及并发症。本实验表明,经肝动脉移植UC-MSCs后,患者肝功能指标明显好转,临床症状和体征也得到改善,说明经肝动脉移植UC-MSCs治疗肝硬化失代偿期安全有效,与国内学者研究一致^[10,18-19]。

UC-MSCs治疗失代偿期肝硬化具有广泛的应用前景,但由于本实验样本量较少,疗效观察时间较短,并且关于干细胞治疗的干细胞种类、来源、数量、输注途径及疗程长短等问题尚未达成一致意见,故需要进一步探索。

致谢:感谢深圳北科生物科技有限公司提供干细胞相关技术的支持。

4 参考文献

- [1] Lee OK,Kuo TK,Chen WM,et al.Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.Blood.2004; 103(5):1669-1675.
- [2] Ohgushi H,Caplan AI.Stem cell technology and bioceramics:from cell to gene engineering. J Biomed Mater Res.1999;48(6):913-927.
- [3] Erices A,Conget P,Minguell JJ.Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood.Br J Haematol.2000;109 (1):235-242.
- [4] Xiong ZH,Xu Q,Lu DY,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(7):1252-1255.
熊中华,许倩,陆德云,等.冻存人脐血间充质干细胞向类肝细胞的诱导分化[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(7): 1252-1255.
- [5] Zhao Q,Ren H,Li X,et al.Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells into low immunogenic hepatocyte-like cells.Cytherapy.2009;11(4): 414-426.
- [6] Sarin SK,Kumar A,Almeida JA,et al.Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL).Hapatol Int.2009;3(1):269-282.
- [7] Lu ZY,Zhong NS,Xie Y,et al.Beijing:Renmn Weisheng Chbanshe. 2008:446-456.
陆再英,钟南山,谢毅,等.内科学[M]. 7版.北京:人民卫生出版社,2008: 446-456.
- [8] Sun L,Wang D,Liang J,et al.Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum.2010,62(8):2467-2475.
- [9] Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem cells, 2006, 24(5):1294-1301.
- [10] Dong Y,Zhu TG,Zhang FH,et al.Zhonghua Quanke Yixue. 2011; 9(1):29-30.
董毅,朱太岗,张飞虎,等.脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的临床效果研究[J].中华全科医学,2011,9(1):29-30.
- [11] Qian YX,Shu Q, Cai YX,et al.Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(1):187-190.
钱燕翔,舒群,蔡红霞,等.人脐带间充质干细胞冻存复苏后细胞表面标志物分子学变化[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(1):187-190.
- [12] Fan MS,Yang XF,Wu YX,et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(1): 33-36.
樊明世,杨晓凤,吴雁翔,等.人脐带间充质干细胞移植改善糖尿病兔下肢缺血[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(1): 33-36.
- [13] Hifiker A,Kasper C,Hass R,et al.Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation?Langenbecks Arch Surg.2011;396(4):489-497.
- [14] Zhang HF,Xu JT,Sun L,et al.Shandong Yiyao.2010;50(11):16-18.
张华芳,徐景涛,孙丽,等.早产胎儿脐血和脐带间充质干细胞分离培养的比较[J].山东医药,2010,50(11):16-18.
- [15] Ren H,Zhao Q,Cheng T,et al.No contribution of umbilical cord mesenchymal stromal cells to capillarization and venularization of hepatic sinusoids accompanied by hepatic differentiation in carbon tetrachloride-induced mouse liver fibrosis.Cytherapy. 2010; 12(3):371-383.
- [16] Junq KH,Uhm YK,Lim YJ,et al.Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve glucose homeostasis in rats with liver cirrhosis. Int J Oncol.2011;39(1): 137-143.
- [17] Zhang YN,Lie PC,Wei X.Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. Cytotherapy.2009;11(5):548-558.
- [18] Weng JB,Wei L,Ruan HL,et al.Shizhen Guoyi Guoyao. 2010;21(8): 2054-2056.
翁敬飏,韦玲,阮海兰,等.人脐带干细胞外周静脉移植治疗酒精性肝硬化的可行性研究[J].时珍国医国药,2010,21(8): 2054-2056.
- [19] Yu H,Wang GY,Sun DX,et al.Ganzang. 2011;16(3):185-187.
于宏,王更银,孙殿兴,等.脐带间充质干细胞经肝动脉灌注治疗失代偿期肝硬化患者临床分析[J].肝脏,2011,16(3):185-187.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 吴阶平医学基金会资助项目(320.6710.10001)。

作者贡献: 第一、二、三、四作者进行实验设计,实验实施为第一、二、三、四、五作者,实验评估为第一作者,资料收集为第三、四作者,第一作者成文,第二作者审核,第一、二作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。