

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.45.034 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]
杨屹, 陈熹, 徐心, 吴涛, 黎一鸣. 干细胞移植用于肝再生治疗的研究[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(45):8543-8550.

干细胞移植用于肝再生治疗的研究*☆

杨屹, 陈熹, 徐心, 吴涛, 黎一鸣

文章亮点: 因干细胞容易采集, 可以避免移植排斥反应的发生, 移植过程简单, 易于操作, 而且不同来源的干细胞均可定向分化为肝样细胞, 具有正常肝脏细胞的功能, 故已成为目前肝再生研究的热点, 一些实验研究显示, 骨髓干细胞、胚胎干细胞、脂肪干细胞和外周血造血干细胞均可以移植治疗损伤肝脏以及促进肝脏再生修复, 并且可以获得良好的治疗效果。

关键词: 肝脏; 干细胞; 移植; 肝再生; 门静脉栓塞; 粒细胞集落刺激因子; 甲胎蛋白; 白蛋白; 肝损伤; 肝细胞

摘要

背景: 肝脏终末期疾病的常规综合治疗不能达到理想的治疗效果, 因此, 干细胞移植治疗肝脏疾病成为研究的热点之一, 并且已经成为治疗肝脏疾病的新方法。

目的: 明确干细胞移植用于肝再生治疗的实验研究和临床应用结果。

方法: 分别对不同来源的干细胞如骨髓干细胞、胚胎干细胞、脂肪干细胞以及外周血造血干细胞移植分化治疗肝脏疾病进行体外和体内实验研究分析, 并且应用免疫组化染色、病理学以及血清中各项生化指标检测与正常肝脏细胞的生物特性及功能进行比较分析, 确定干细胞移植治疗肝脏疾病的效果。

结果与结论: 骨髓干细胞、胚胎干细胞、脂肪干细胞以及外周血造血干细胞均可以在特定条件下诱导分化成为肝样细胞, 对损伤肝脏不仅有治疗作用而且能够促进肝脏的修复和再生, 同时还可以进行干细胞移植转基因治疗。除此之外, 干细胞移植可以避免免疫排斥反应的发生, 可用于治疗各种类型的肝脏疾病。

Stem cells transplantation for liver regeneration

Yang Yi, Chen Xi, Xu Xin, Wu Tao, Li Yi-ming

Abstract

BACKGROUND: Satisfactory therapeutic effects can not be acquired in treatment of end-stage liver diseases by the routine comprehensive treatments. Therefore, stem cells transplantation for treatment of liver disease has become an interesting issue and has been considered as a new method in treatment of this disease.

OBJECTIVE: To clarify the experimental research and clinical application of stem cells transplantation for liver regeneration.

METHODS: *In vitro* and *in vivo* experimental studies regarding liver disease treatment by transplantation of different kinds of stem cells were analyzed, including bone marrow stem cells, embryonic stem cells, adipose stem cells and peripheral blood stem cells. The biological characteristics and functions were compared between normal liver cells and transplanted cells using immunohistological staining, pathological observation and biochemical index detection to determine the treatment effects of stem cells transplantation for the treatment of liver disease.

RESULTS AND CONCLUSION: Bone marrow stem cells, embryonic stem cells, adipose stem cells and peripheral blood stem cells can be induced to differentiate into hepatocyte-like cells under certain conditions, and these cells have therapeutic effects on the injured liver and can also promote the repair and regeneration of the liver. Meanwhile, these cells can be used for transgenic therapy in stem cells transplantation. In addition, stem cells transplantation can be used for treatment of various liver diseases without immunological rejections.

Yang Y, Chen X, Xu X, Wu T, Li YM. Stem cells transplantation for liver regeneration. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(45): 8543-8550.

西安交通大学医学院第二附属医院普外科, 陕西省西安市 710004

杨屹☆, 男, 1972年生, 陕西省户县人, 汉族, 西安交通大学医学院博士在读, 主治医师, 主要从事肝脏再生及梗阻性黄疸研究。
yangyi2009@mail.xjtu.edu.cn

通讯作者: 黎一鸣, 硕士, 教授, 主任医师, 博士后导师, 西安交通大学医学院第二附属医院普外科, 陕西省西安市 710004
Liyiming2003@sina.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344 (2012)45-08543-08

收稿日期: 2012-08-05
修回日期: 2012-09-12
(20120424009/SJ-C)

Department of
General Surgery,
Second Affiliated
Hospital of Xi'an
Jiaotong University
College of Medicine,
Xi'an 710004,
Shaanxi Province,
China

Yang Yi☆, Doctor,
Attending physician,
Department of
General Surgery,
Second Affiliated
Hospital of Xi'an
Jiaotong University
College of Medicine,
Xi'an 710004,
Shaanxi Province,
China
yangyi2009@
mail.xjtu.edu.cn

Corresponding
author: Li Yi-ming,
Master, Professor,
Chief physician,
Postdoctoral
supervisor,
Department of
General Surgery,
Second Affiliated
Hospital of Xi'an
Jiaotong University
College of Medicine,
Xi'an 710004,
Shaanxi Province,
China
Liyiming2003@
sina.com

Supported by: Special
Fund for Fundamental
Research of Higher
Education Institutes in
China*

Received:2012-08-05
Accepted:2012-09-12

0 引言

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞,能产生表现型和基因型与自己完全相同的子代细胞,同时还能分化为祖细胞。根据其发育阶段可以分为2类:胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞是一种高度未分化细胞,它具有发育的全能性,能分化出成体动物所有组织和器官细胞,包括生殖细胞。成体干细胞普遍存在于机体的大多数干细胞的研究发展过程中的重大事件^[2]:

时间	事件	评述
1967年	美国华盛顿大学的多纳尔·托马斯发表报告称,如果将正常人的骨髓移植到患者体内,可以治疗造血功能障碍	干细胞研究是从血液系统开始的
1998年	美国威斯康星大学的科学家在美国《科学》杂志发表报告称,他们已经成功使人类胚胎干细胞在体外生长和增殖	这带动世界范围内的干细胞研究热潮。此项进展使科学家们看到了干细胞生物工程的曙光:在体外培育所需的组织细胞,取代患者体内的坏损组织细胞
1999年	美国科学家在《美国科学院院刊》报告称,小鼠肌肉组织的成体干细胞可以“横向分化”为血液细胞。随后世界各国的科学家相继证实,成体干细胞包括人类的成体干细胞具有可塑性	成体干细胞的可塑性研究,为干细胞的临床应用开辟了更为广泛的空间
1999年	干细胞研究进展被《科学》杂志评选为该年度世界十大科学进展之首	科学界认为干细胞的研究与应用将打开疾病治疗的“突破口”
2000年	日本启动“千年世纪工程”,干细胞工程为核心技术的再生医疗成为这项工程的四大重点之一,第一年度投资金额达108亿日元	日本把干细胞技术视作在生命科学和生物技术领域赶超欧美国家的绝好机遇
2001年	英国议会上院通过法案,允许科学家克隆人类早期胚胎,并利用它进行医疗研究	克隆人类早期胚胎后,可以从中提取未经完全发育的胚胎干细胞。此项法案的通过,经过了英国上下3年的激烈争论,参与者包括科学界、宗教界、企业界、政界等人士以及普通老百姓
2001年	美国科学家发现,从患者臀部和大腿处抽取的脂肪中,含有大量类似干细胞的细胞,这些细胞可以发育成健康的软骨和肌肉等	这一发现有可能使脂肪成为干细胞的主要来源,科学家今后可能将不必从胚胎组织或骨髓中提取干细胞,从而既降低成本,又避免伦理上的争论
2001年	美国国立卫生研究院决定取消原定举行的人类胚胎干细胞研究经费申请案的审查会议	该申请案是美国第1例人类胚胎干细胞研究经费申请案。有关方面认为,这意味着美国政府将不对人类胚胎干细胞研究进行资助
2009年	美国杰龙生物医药公司宣布,该公司利用人胚胎干细胞医治脊髓损伤患者的试验,已经获得美国食品和药物管理局批准	这是美国药物管理局首次批准将胚胎干细胞用于人体疾病治疗试验

目前,干细胞移植已经被广泛应用于临床的各种疾病治疗,也有大量实验研究表明干细胞可以促进损伤肝脏的修复及再生,可以明显改善患者的临床症状,提高肝脏疾病患者的生存率^[3-4]。文章对干细胞移植用于肝再生治疗的相关文献进行实验数据分析,对干细胞的研究以及干细胞移植用于肝再

组织器官中,包括造血干细胞、神经干细胞脂肪干细胞等,具有修复和再生能力的细胞,在特定条件下,成体干细胞或者产生新的干细胞,或者按一定程序分化,形成新的功能细胞,从而使组织和器官保持生长和衰退的动态平衡。不同来源的干细胞均可在特定条件下诱导分化成为肝样细胞,具有分泌尿素和白蛋白等正常肝细胞的功能^[1]。

干细胞的研究发展时间虽然较短,但却给生物医学带来重大的意义,成为生物医学领域研究的热点之一。

生的治疗研究提供重要的辅助参考信息。

1 资料和方法

1.1 检索内容 干细胞移植用于肝再生治疗的相关研究文献。

1.2 纳入标准 ①急性肝衰竭。②慢性肝衰

竭。③肝硬化。④部分肝脏切除患者。⑤酒精性肝损伤。⑥脂肪肝。⑦遗传、代谢等原因引起的肝损伤。

1.3 排除标准 ①肝硬化终末期合并严重并发症。②恶性肿瘤患者。③合并严重感染患者。④胆管疾病。

1.4 分析指标 ①干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析。②骨髓干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析。③胚胎干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析。④脂肪间充质干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析。⑤外周血造血干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析。

1.5 资料来源 文章检索获取。检索时间范围 2002 至 2011 年, 检索词为“干细胞(stem cell); 移植(transplantation); 肝再生(liver regeneration)”, 选取实验分析文献 14 篇^[5]。

2 结果

2.1 干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析

2.1.1 内源性干细胞动员用于肝再生治疗的实验研究分析 Mark 等研究分析干细胞用于治疗急性肝衰竭的动物实验模型, 实验方法及结果见表 1, 2。

表 1 内源性干细胞动员治疗急性肝衰竭的动物模型研究实验方法

第一作者	实验模型	干预药物	评估项目
Mark AL ^[6]	小鼠急性肝衰竭	腹腔注射单一致死量四氯化碳; 12 h 后, 注射普乐沙福和粒细胞集落刺激因子	观察小鼠生存情况; 通过测量血清转氨酶的活性评估肝损伤情况, 同时进行肝损伤的病例分析

表 2 内源性干细胞动员治疗急性肝衰竭的动物模型研究实验结果

第一作者	生存率	组织病理学评估	外周血象评估	免疫组化评估
Mark AL ^[6]	注射四氯化碳后的 7 d 生存率为 25%; 注射四氯化碳后 12 h 随之注射普乐沙福和粒细胞集落刺激因子, 结果导致 87% 的生存率	与对照组相比, 注射普乐沙福和粒细胞集落刺激因子后有较少的肝损伤	注射普乐沙福和粒细胞集落刺激因子使造血干细胞的循环周期增加	干细胞分化后, 造血干细胞浸润到肝实质中

通过对干细胞移植治疗急性肝衰竭的动物实验模型研究分析可以得出实验结论: 对于急性肝衰竭的患者, 肝移植或者死亡是常见的结果, 但是干细胞移植可能是急性肝衰竭治疗的一种新策略。药物应用动员内源性造血干细胞分化并浸润到损伤的肝脏实质组织中, 参与或者促进肝脏的再生。干细胞移植治疗可以使急性肝

衰竭的患者避免肝脏移植, 同时还可以用于治疗其他类型的肝脏损伤患者。

普乐沙福与粒细胞集落刺激因子联合促进干细胞进入肝脏血流, 并且可以促进干细胞分化增殖, 快速增加循环血液中的干细胞数目, 促进肝脏再生, 在最短时间内发挥治疗损伤肝脏的作用。

2.1.2 干细胞移植用于肝再生治疗的相关研究文献 干细胞移植用于肝再生治疗的相关研究文献大多为综述类文献, 其他类型文献较少, 选取 10 篇相关研究文献举例见表 3。

表 3 干细胞移植用于肝再生治疗的 10 篇相关研究文献举例

文题	作者	来源期刊	发表时间
Stem cells in liver regeneration and therapy ^[7]	Cantz T, Manns MP, Ott M	<i>Cell and Tissue Research</i>	2008
Hepatic stem cells: In search of ^[8]	Walkup MH, Gerber DA	<i>Stem Cells</i>	2006
Stem cells for liver tissue repair: Current knowledge and perspectives ^[9]	Lysy PA, Campard D, Smets F, et al	<i>World Journal of Gastroenterology</i>	2008
Commitment of stem cells into functional hepatocytes ^[10]	Ochiya T, Yamamoto Y, Banas A	<i>Differentiation</i>	2010
Factors influencing stem cell differentiation into the hepatic lineage in vitro ^[11]	Heng BC, Yu H, Yin Y, et al	<i>Journal of Gastroenterology and Hepatology</i>	2005
Prospects for Stem Cell Transplantation in the Treatment of Hepatic Disease ^[12]	Stutchfield BM, Forbes SJ, Wigmore SJ	<i>Liver Transplantation</i>	2010
The role of stem cells in physiology, pathophysiology, and therapy of the liver ^[13]	Sharma AD, Cantz T, Manns MP, et al	<i>Stem Cell Reviews</i>	2006
Implication of stem cell factor in human liver regeneration after transplantation and resection ^[14]	Baccarani U, De Stasio G, Adani GL, et al	<i>Growth Factors</i>	2006
Cell therapy for the diseased liver: from stem cell biology to novel models for hepatotropic human pathogens ^[15]	Brezillon N, Kremsdorf D, Weiss MC	<i>Disease Models and Mechanisms</i>	2008
Use of hepatocyte and stem cells for treatment of post-resectional liver failure: are we there yet? ^[16]	Ezzat TM, Dhar DK, Newsome PN, et al	<i>Liver International</i>	2011

2.2 骨髓干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析

2.2.1 骨髓 CD133 阳性干细胞移植用于肝再生治疗的分析 骨髓干细胞在特定条件下可以转化成肝脏干细胞, 从而参与和促进肝脏的再生。

Furst 等、Esch 等和 Zocco 等分别对自体骨髓 CD133 阳性干细胞移植用于肝再生治疗进行了研究分析, 实验方法及结果见表 4。

表4 骨髓 CD133 阳性干细胞移植用于肝再生治疗研究的实验方法和实验结果

第一作者	实验病例	实验方法	实验结果
Furst G ^[17]	13 例肝脏第 1 节段和第 4-8 节段门静脉栓塞的患者	在肝脏第 2 节段和第 3 节段给予骨髓干细胞移植。其中 A 组 6 例患者平均年龄 61 岁, 剩余肝脏体积小于 25% 和/或限制肝脏实质的质量, 门静脉栓塞不予单独实施; B 组 7 例患者平均年龄 69 岁, 剩余肝脏体积小于 25%, 门静脉栓塞给予单独实施; 放射线及 CT 扫描检测肝脏及肿瘤的体积变化, 测试比较 2 组病例每天剩余肝脏体积、绝对剩余肝脏体积以及相对剩余肝脏体积。	A 组患者平均绝对对剩余肝脏体积的增加明显高于 B 组患者, 且有统计学差异 ($P < 0.05$); 门静脉栓塞后相对剩余肝脏体积的增加 A 组也明显高于 B 组, 且差别有统计学意义 ($P < 0.05$); A 组每天肝脏增长率明显高于 B 组, 并且有统计学差异 ($P < 0.05$); A 组治疗时间为 16-38 d, B 组治疗时间为 24-66 d, 2 组患者治疗时间比较无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。
Esch JSA ^[18]	6 例右侧肝脏节段门静脉栓塞的患者	3 例给予自体骨髓 CD133 阳性干细胞移植来促进左右外侧剩余肝脏体积的增加, 而另 3 例患者不予骨髓干细胞移植治疗, CT 扫描比较 2 组剩余肝脏体积变化情况。	CT 扫描显示给予自体骨髓 CD133 阳性干细胞移植治疗患者左右外侧肝脏节段的生长率是没有给予骨髓干细胞移植治疗患者增长率的 2.5 倍。
Zocco MA ^[19]	29 例不同程度肝脏切除的患者	术后在不同的时间点应用流式细胞仪循环监测骨髓 CD133 阳性干细胞; 通过酶链聚合反应检测肝脏实质中骨髓干细胞的分化情况; 肝脏标本在术中治疗时给予病理分析; 通过酶联免疫吸附试验检测血清中肝细胞生长因子和粒细胞集落刺激因子的水平。	在大部分肝脏切除, 尤其是存在潜在疾病的患者, 发现有骨髓干细胞的分化, 在慢性肝脏疾病的患者中发现胆管反应, 肝祖细胞表达 CD133 分子、细胞角质蛋白 19 和甲胎蛋白; 肝细胞生长因子和粒细胞集落刺激因子的增加水平与肝脏切除及同时存在的肝脏疾病有关。

Furst 等、Esch 等和 Zocco 等分别用不同的实验方法对自体骨髓 CD133 阳性干细胞移植用于肝再生治疗进行了研究分析, 结果均显示骨髓 CD133 阳性干细胞可参与或促进肝脏的再生, 对肝脏的修复治疗起到一定的作用。3 组实验分析研究得出的实验结论见表 5。

表5 骨髓 CD133 阳性干细胞移植用于肝再生治疗研究的实验结论

第一作者	实验结论
Furst G ^[17]	在肝脏恶性疾病的患者, 与单独门静脉栓塞治疗相比较, 结合门静脉栓塞与骨髓 CD133 阳性/阴性干细胞移植治疗可以增加肝脏的再生。
Esch JSA ^[18]	研究显示门静脉栓塞结合骨髓 CD133 阳性干细胞移植治疗可能成为治疗肝脏疾病的一种新的方法, 这种治疗方法可以加速肝脏的再生。
Zocco MA ^[19]	肝脏修复主要是内源性修复过程, 在肝切除术后, 尤其是存在潜在肝脏疾病及肝祖细胞被激活的患者, 骨髓干细胞移植治疗变得特别重要, 肝细胞生长因子和粒细胞集落刺激因子可能是骨髓干细胞促进肝再生的动力。

通过对 3 组实验的研究分析可知, 门静脉栓塞结合骨髓 CD133 阳性干细胞移植治疗可以促进肝脏再生和修复, 而肝细胞生长因子和粒细胞集落刺激因子

可能是骨髓干细胞促进肝脏再生修复的动力。

2.2.2 骨髓 CD45 阳性干细胞移植和骨髓 CD34 阳性干细胞移植用于肝再生治疗的分析 骨髓 CD45 阳性干细胞移植和骨髓 CD34 阳性干细胞移植特定条件下均可以促进肝脏再生和修复, 研究分析二者用于肝脏再生修复治疗的实验方法和实验结果见表 6。

表6 骨髓 CD45 阳性干细胞移植和骨髓 CD34 阳性干细胞移植用于肝再生治疗研究的实验方法和实验结果

第一作者	实验方法	实验结果
Wulf GG ^[20]	进行特定处理后, 通过流式细胞仪对小鼠肝脏的侧群细胞进行分离, Y 染色体原位杂交被用于跟踪监测肝脏中的供体细胞, 骨髓侧群细胞被移植入肝脏造血系统, CD45 等位基因与 Y 染色体原位杂交后的基因链被用于跟踪监测肝脏子代干细胞的增殖情况。	①在体外, 肝脏 CD45 阳性和 CD45 阴性侧群细胞引起造血系统的克隆, 并且促进造血系统克隆和肝脏再生分化相融合。 ②供体肝脏侧群细胞促进成熟肝实质及胆管上皮细胞的再生。 ③骨髓侧群细胞移植后, 肝脏 CD45 阳性和 CD45 阴性侧群细胞均可以在供体细胞中获得, 并且能够促进肝脏损伤的在修复治疗。
Leviar N ^[21]	给予 5 例慢性肝脏疾病患者进行门静脉或肝动脉注射骨髓 CD34 阳性干细胞移植治疗, 并随访 12-18 个月, 观测评估不良反应、毒性和临床变化、血液生化指标。	①所有患者对治疗的耐受性都很好, 没有相关并发症和不良反应出现。 ②在第 6 个月随访时, 4 例患者出现了血清胆红素水平的改善, 在第 12 个月随访时, 仅有 3 例患者血清胆红素水平出现轻微升高, 而第 4 例患者血清胆红素水平在第 18 个月随访时出现增加。 ③CT 扫描和血清甲胎蛋白水平检测均显示没有局部病灶。

骨髓 CD45 阳性干细胞移植和骨髓 CD34 阳性干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析显示了骨髓干细胞移植用于肝脏再生修复治疗的促进作用, Wulf GG 等对骨髓 CD45 阳性干细胞移植用于肝再生治疗的实验结论为: 研究介绍了肝脏侧群细胞作为兼性肝脏再生细胞群, 在侧群细胞水平上显示了细胞组织的互换性, 同时显示了骨髓侧群细胞移植可能被用于肝脏疾病的治疗以及肝脏损伤的再生修复。Leviar N 等对骨髓 CD34 阳性干细胞移植用于肝再生治疗研究分析的实验结论为: 研究通过有无肿瘤的形成显示了干细胞移植治疗短期和长期的安全性, 而且显示了有利的影响改变持续到第 12 个月, 实验表明干细胞移植治疗可能成为肝脏再生治疗的可行性方案。

2.2.3 骨髓间充质干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析 Kuo TK 等和 van Poll D 等分别对骨髓间充质干细胞移植用于肝再生治疗的研究进行了实验分析, 实验方法及结果见表 7。

表 7 骨髓间充质干细胞移植用于肝再生治疗研究的实验方法和实验结果

第一作者	实验方法	实验结果
Kuo TK ^[22]	对存在非肥胖型糖尿病联合免疫功能缺陷, 并且引发致命的爆发性肝功能衰竭的小鼠诱导四氯化碳灌胃, 并给予不同剂量间充质干细胞来源的肝细胞和间充质干细胞脾内移植或静脉注射。	①间充质干细胞来源的肝细胞和间充质干细胞均通过脾内移植或静脉注射移植到肝脏受体, 分化成功能性肝细胞, 治疗肝衰竭。 ②静脉注射移植治疗肝衰竭比脾内移植治疗肝衰竭更有效, 而间充质干细胞更耐氧化应激反应的发生, 同时加速损伤肝脏的再生修复。
van Poll D ^[23]	建立 D-半乳糖诱导急性肝损伤模型, 间充质干细胞系统灌注条件培养基提供了小鼠模型重要的生存环境, 同时阻止肝损伤标记物的释放。	①间充质干细胞条件培养基治疗使凋亡肝细胞死亡数量减少了 90%, 使增殖肝细胞的数量增加了 3 倍。 ②体外实验证明了间充质干细胞对肝细胞的抗凋亡作用和促进肝细胞的分化作用。

Kuo等和van Poll等分别对骨髓间充质干细胞移植治疗爆发性肝衰竭进行了实验研究分析, 2组实验结果均显示骨髓间充质干细胞移植不仅可以治疗急性肝损伤, 而且还可以促进肝脏的再生修复, 对于急性肝脏疾病的治疗是一种有潜能的治疗方法。

2.3 胚胎干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析 Strick-Marchand等和Imamura等分别对胚胎干细胞分化成肝细胞样细胞以及胚胎干细胞对肝再生的促进作用进行了实验研究分析, 实验方法和实验结果见表8。

表 8 胚胎干细胞移植用于肝再生治疗研究的实验方法和实验结果

第一作者	实验方法	实验结果
Strick-Marchand H ^[24]	实验模型为白蛋白激酶纤溶酶原激活/重症联合免疫缺陷转基因小鼠, 观察胚胎干细胞移植到肝脏后 3-8 周增殖、分化以及对肝脏再生的促进作用情况。	胚胎干细胞增殖分化成肝细胞和胆管细胞, 形成可以检测到的大小不同的集落, 胚胎干细胞对宿主细胞发出生长、分化和表达部分代谢酶的信号作出反应, 调节细胞角蛋白和肝脏富集转录因子的表达。
Imamura T ^[25]	胚胎干细胞在聚丙烯锥形管中培养后形成胚胎体, 胚胎体被置入到由胶原支架形成的三维培养系统中并给予外源性生长因子和激素刺激诱导肝组织的生成。	胚胎源性细胞表达肝脏组织的特异性基因, 蛋白阳性细胞形成二维单层培养系统中不存在的带状结构, 电子显微镜观察到不成熟的肝样细胞间有紧密连接、粗面内质网和细胞间小管, 将含有胚胎体源性肝样细胞的支架移植到部分肝脏切除的小鼠中, 7-14 d 后白蛋白阳性细胞和角蛋白 18 阳性细胞均出现在移植体中, 并且形成集合集落。

通过对胚胎干细胞移植用于肝再生治疗的实验研究, Strick-Marchand 等获得实验结论: 干细胞不仅参与损伤组织的修复, 而且能够分化成2类主要的上皮细胞—肝细胞和胆管细胞。

而Imamura等得出实验结论: 胶原支架三维培养系统和肝脏再生的微环境可以诱导胚胎干细胞分化形成肝样细胞和肝小叶样集落, 在胶原支架培养系统中分化的胚胎干细胞能够被用于发展生物人工肝脏、二次肝脏和制药模型。

肝细胞的细胞膜之间局部凹陷形成管状结构即为胆小管, 胆小管之间互相连接形成的网状结构与肝细胞共同形成肝脏的主要结构肝小叶, 因此肝脏的再生治疗即为肝细胞的增殖分化再生。

通过对2组胚胎干细胞移植用于肝再生治疗的实验研究, 可以明确胚胎干细胞在特定的条件下可以分化形成肝细胞, 从而参与并促进肝脏的再生修复治疗。

2.4 脂肪间充质干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析 对脂肪间充质干细胞移植用于肝再生治疗进行了研究分析, 实验方法和实验结果见表9。

表 9 脂肪间充质干细胞移植用于肝再生治疗研究的实验方法和实验结果

第一作者	实验方法	实验结果
Banas A ^[26]	脂肪间充质干细胞移植到四氯化碳灌注后肝脏损伤的小鼠腹腔中。	①观察发现肝脏生化指标、氨、尿酸、谷丙转氨酶和谷草转氨酶恢复到接近正常水平。 ②进行体外细胞因子和生长因子产生的分析。 ③与骨髓间充质干细胞和正常皮肤成纤维细胞进行比较。 ④发现脂肪间充质干细胞分泌白介素 1 α 受体、白介素 6、白介素 8、粒细胞集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、单核细胞趋化蛋白 1、神经生长因子和肝细胞生长因子, 并且分泌量均高于骨髓间充质干细胞和正常皮肤成纤维细胞分泌量。
Banas A ^[27]	对体外产生的脂肪间充质干细胞来源的肝细胞进行肝细胞特异标志物及功能检测, 之后, 移植到肝脏损伤的裸鼠中, 24 h 后对血清生化参数进行检测评价。	①脂肪间充质干细胞在 13 d 内分化成为肝细胞并达到初级肝细胞的功能水平。 ②移植到急性肝损伤的裸鼠后脂肪间充质干细胞来源的肝样细胞能够恢复氨和嘌呤的代谢功能。 ③肝脏损伤的标记物丙氨酸转氨酶、谷草转氨酶以及氨也分别下降。
Li H ^[28]	脂肪间充质干细胞由腺病毒载体诱导转化后移植到小鼠肝脏中。	①脂肪间充质干细胞可被重组腺病毒载体 1 型诱导转化。 ②移植到小鼠肝脏后, 体外转染脂肪间充质干细胞表达的转基因产物人 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶。 ③抗胰蛋白酶的平均水平一直持续维持, 并且在所有受体中没有抗胰蛋白酶抗体出现。

3组实验分别通过不同的实验方法研究分析脂肪间充质干细胞对损伤肝脏的再生治疗作用, 实验结果均显示了脂肪间充质干细胞对肝脏损伤具有修复治疗以及促进再生的作用, 3组实验结论见表 10。

表 10 脂肪间充质干细胞移植用于肝再生治疗研究的实验结论

第一作者	实验结论
Banas A ^[26]	研究显示脂肪间充质干细胞在肝脏损伤的动物模型上产生了广泛的治疗效果, 可以应用于临床肝脏疾病的治疗。
Banas A ^[27]	实验数据展示了脂肪间充质干细胞的突出性能, 在体外具有干细胞分化的特殊亲和力, 在体内促进肝脏再生, 因此, 脂肪间充质干细胞可能是损伤肝脏治疗的一个卓越的选择。
Li H ^[28]	实验结果表明脂肪间充质干细胞可以被腺病毒载体转化, 并移植到受体肝脏, 促进肝脏再生, 同时可以作为不会引起免疫反应的转基因表达的平台, 脂肪间充质干细胞的转基因治疗为肝脏疾病提供了一种新的治疗方法。

通过对脂肪间充质干细胞用于肝再生治疗的研究分析, 可以明确脂肪间充质干细胞可以移植到损伤肝脏促进肝脏修复和再生, 另外还可以进行转基因治疗, 为肝脏的干细胞移植治疗提供了一种新的选择方法。

2.5 外周血造血干细胞移植用于肝再生治疗的研究分析
Gehling等对造血干细胞移植用于肝再生治疗进行实验研究, 实验方法及实验结果见表11。

表 11 外周血造血干细胞移植用于肝再生治疗研究的实验方法和实验结果

第一作者	实验方法	实验结果
Gehling UM ^[29]	部分肝切除后的12 h, 应用抗体对抗CD133、CD34、CD45、CD14、c-kit和bcrp-1, 在体外应用免疫分离检测CD133阳性细胞的功能片段。	几乎所有受体样本都显示了CD133阳性细胞的表达明显增加, 而且几乎所有CD133阳性细胞的都联合表达CD45和CD14, 仅仅一小部分表达CD34, 没有检测到表达c-kit和bcrp-1, 在体外免疫检测CD133阳性细胞显示了粒细胞前体的特性, 此外, 富含CD133阳性分子的细胞群还表达CK8、甲胎蛋白和白蛋白。

通过对外周血造血干细胞移植用于肝再生治疗的实验研究进行分析, 可以得出实验结论: 部分肝脏切除诱导动员不同数量的粒祖细胞, 此类细胞在体外有肝脏分化的潜能, 对于部分肝脏切除的患者此类细胞在肝脏再生的治疗中发挥重要的作用。

3 讨论

肝脏干细胞主要分为肝源性干细胞和非肝源性干细胞。肝源性干细胞主要是肝卵圆细胞, 来源于肝脏内的骨髓干细胞或者来源于肝脏Hering管的肝脏干细胞, 生物学特性与胆管细胞和成熟肝细胞类似, 表明肝卵圆细胞是肝脏干细胞的后代。肝卵圆细胞具有双向分化的潜能, 可进一步分化为成熟肝细胞和胆管上皮细胞^[30]。非肝源性干细胞主要是骨髓干细胞, 在特定条件下可以诱导分化成为骨组织细胞、脂肪细

胞、肝细胞、上皮细胞、肌肉细胞和神经细胞等成熟组织细胞分化^[31]。而胚胎干细胞、脂肪干细胞、外周血造血干细胞等也可以在一定条件下分化成为肝脏干细胞。

目前采用的干细胞移植治疗肝脏疾病的主要途径有脾内移植、经肝动脉介入移植和经门静脉移植途径。对于肝实质结构损害的疾病, 脾内移植可以更少造成门脉血流的异常及肺内迁移, 但是有研究指出, 脾内移植对于肝功能的恢复作用有限^[32-33]。经肝动脉介入干细胞移植技术是干细胞移植常用的方法之一, 但其远期临床效果尚未确定。门静脉内含有高浓度的嗜肝细胞因子和生长因子, 理论上为干细胞移植的最佳部位。经皮经肝在超声下将干细胞直接注入门静脉^[34-35], 或者在放射线的透视下行门脉造影后将干细胞注入门静脉^[36], 能够使干细胞最大限度的停留在肝脏, 为其增殖分化提供合适的微环境。但有研究显示, 门脉移植可能会导致一过性的门脉高压以及移植干细胞向肺、脑等组织迁移的倾向^[37-38]。

干细胞通过自我增殖分化可以促进肝脏的再生修复, 多项试验研究已经显示了干细胞移植治疗肝脏疾病获得的良好效果, 但是干细胞的应用人存在很多问题: 干细胞的获得效率、最佳的移植途径、移植数量和时间、移植后定位跟踪、体内分化、致瘤性等以及有研究报道干细胞移植发生的一些相关并发症^[39-43]。随着肝再生治疗选择干细胞的类型、诱导分化的条件以及临床应用的方式等的不断完善, 干细胞移植将成为治疗肝脏疾病安全有效的方法。

4 参考文献

- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-49.
- 李军, 章莉. 人类干细胞研究的科学与伦理学之争[J]. *中国医学伦理学*, 2002, 15(4):23-24.
- Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One*. 2007;2(9):e941.
- Wan Z, You S, Rong Y, et al. CD34+ Hematopoietic Stem Cells Mobilization, Paralleled with Multiple Cytokines Elevated in Patients with HBV-Related Acute-on-Chronic Liver Failure. *Dig Dis Sci*. 2012.
- SCI数据库. Web of Science via ISI Web of Knowledge[EB/OL]. <https://anulib.anu.edu.au/online/eresources/>, 2012-05-20.
- Mark AL, Sun Z, Warren DS, et al. Stem cell mobilization is life saving in an animal model of acute liver failure. *Ann Surg*. 2010;252(4):591-596.

- [7] Cantz T, Manns MP, Ott M. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res.* 2008;331(1):271-282.
- [8] Walkup MH, Gerber DA. Hepatic stem cells: In search of. *Stem Cells.* 2006;24(8):1833-1840.
- [9] Lysy PA, Campard D, Smets F, et al. Stem cells for liver tissue repair: Current knowledge and perspectives. *World J Gastroenterol.* 2008;14(6):864-875.
- [10] Ochiya T, Yamamoto Y, Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation.* 2010;79(2):65-73.
- [11] Heng BC, Yu H, Yin Y, et al. Factors influencing stem cell differentiation into the hepatic lineage in vitro. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005;20(7):975-987.
- [12] Stutchfield BM, Forbes SJ, Wigmore SJ. Prospects for Stem Cell Transplantation in the Treatment of Hepatic Disease. *Liver Transpl.* 2010;16(7):827-836.
- [13] Sharma AD, Cantz T, Manns MP, et al. The role of stem cells in physiology, pathophysiology, and therapy of the liver. *Stem Cell Rev.* 2006;2(1):51-58.
- [14] Baccarani U, De Stasio G, Adani GL, et al. Implication of stem cell factor in human liver regeneration after transplantation and resection. *Growth Factors.* 2006;24(2):107-110.
- [15] Brezillon N, Kremsdorf D, Weiss MC. Cell therapy for the diseased liver: from stem cell biology to novel models for hepatotropic human pathogens. *Dis Model Mech.* 2008;1(2-3):113-130.
- [16] Ezzat TM, Dhar DK, Newsome PN, et al. Use of hepatocyte and stem cells for treatment of post-resectional liver failure: are we there yet? *Liver Int.* 2011;31(6):773-784.
- [17] Fürst G, Schulte am Esch J, Poll LW, et al. Portal vein embolization and autologous CD133(+) bone marrow stem cells for liver regeneration: Initial experience. *Radiology.* 2007;243(1):171-179.
- [18] am Esch JS 2nd, Knoefel WT, Klein M, et al. Portal application of autologous CD133(+) bone marrow cells to the liver: A novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells.* 2005;23(4):463-470.
- [19] Zocco MA, Piscaglia AC, Giuliante F, et al. CD133+ stem cell mobilization after partial hepatectomy depends on resection extent and underlying disease. *Dig Liver Dis.* 2011;43(2):147-154.
- [20] Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, et al. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished by bone marrow stem cells. *Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished by bone marrow stem cells. Haematologica.* 2003;88(4):368-378.
- [21] Levicar N, Pai M, Habib NA, et al. Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34(+) cells in patients with chronic. *Cell Prolif.* 2008;41 Suppl 1:115-125.
- [22] 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. *Gastroenterology.* 2008;134(7):2111-2121
- [23] van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology.* 2008;47(5):1634-1643.
- [24] Strick-Marchand H, Morosan S, Charneau P, et al. Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(22):8360-8365.
- [25] Imamura T, Cui L, Teng R, et al. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies in three-dimensional culture system form hepatocyte-like cells invitro and in vivo. *Tissue Eng.* 2004;10(11-12):1716-1724.
- [26] Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells.* 2008;26(10):2705-2712.
- [27] Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(1):70-77.
- [28] Li H, Zhang B, Lu Y, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-based liver gene delivery. *J Hepatol.* 2011;54(5):930-938.
- [29] Gehling UM, Willems M, Dandri M, et al. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J Hepatol.* 2005; 43(5):845-853.
- [30] Kakinuma S, Nakauchi H, Watanabe M. Hepatic stem/progenitor cells and stem-cell transplantation for the treatment of liver disease. *J Gastroenterol.* 2009;44(3):167-172.
- [31] Mimeault M, Batra SK. Recent progress on normal and malignant pancreatic stem/progenitor cell research: therapeutic implications for the treatment of type 1 or 2 diabetes mellitus and aggressive pancreatic cancer. *Gut.* 2008;57(10):1456-1468.
- [32] Nagata H, Ito M, Shirota C, et al. Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen. *Transplantation.* 2003;76(4):732-734.
- [33] Koenig S, Stoesser C, Krause P, et al. Liver repopulation after hepatocellular transplantation: integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. *Cell Transplant.* 2005;14(1):31-40.
- [34] 孙厚坦, 陈朝旻, 赵威武, 等. 超声引导下经门静脉穿刺干细胞移植治疗肝纤维化[J]. *中国介入影像与治疗学*, 2011, 8(4):354-355.
- [35] 王方, 张静, 周新人, 等. 经门静脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化18例疗效观察[J]. *实用肝脏病杂志*, 2011, 14(3):200-201, 206.
- [36] 李楠, 石玉玲, 李娜, 等. 经门静脉外周血干细胞移植治疗肝硬化失代偿期的疗效研究[J]. *中国全科医学*, 2010, 13(8):852-854.
- [37] 刘晓琬, 李波. 干细胞移植用于肝再生治疗的相关研究进展[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2007, 21(2):184-187.
- [38] 刑秀伟, 李建生. 干细胞移植治疗肝脏疾病的研究进展[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(6):1115-1118.
- [39] 陈曦, 杨世忠, 刘青梅, 等. 干细胞移植治疗肝病的研究现状[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(8):1525-1528.
- [40] Tichelli A, Bucher C, Rovó A, et al. Premature cardiovascular disease after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood.* 2007;110(9):3463-3471.
- [41] Chakrabarti S, Mackinnon S, Chopra R, et al. High incidence of cytomegalovirus infection after nonmyeloablative stem cell transplantation: potential role of Campath-1H in delaying immune reconstitution. *Blood.* 2002;99(12):4357-4363.

- [42] Erard V, Guthrie KA, Varley C, et al. One-year acyclovir prophylaxis for preventing varicella-zoster virus disease after hematopoietic cell transplantation: no evidence of rebound varicella-zoster virus disease after drug discontinuation. *Blood*. 2007;110(8):3071-3077.
- [43] Richardson P. Hemostatic complications of hematopoietic stem cell transplantation: from hemorrhage to microangiopathies and VOD. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33 Suppl 1:50-53.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 本研究获中央高校基本科研业务费专项资金资助。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

本期专题: 肿瘤与肿瘤干细胞

- 1 5-氟尿嘧啶对乳腺癌 MCF7 细胞中干细胞相关基因 Oct4、Bmi-1 表达的影响, 见 2012 年 16 卷 10 期 1822 页。
- 2 MCF7 细胞中肿瘤干细胞的增殖特征, 见 2011 年 15 卷 45 期 8404 页。
- 3 LMP1-CTAR3 对鼻咽癌干细胞 SP18 生长的影响, 见 2011 年 15 卷 45 期 8395 页。
- 4 组织芯片观察 CD44+/CD166+结直肠癌干细胞的形态及分布, 见 2011 年 15 卷 36 期 6714 页。
- 5 利用藻酸盐与骨髓间充质干细胞及前列腺癌细胞混合培养: 观察干细胞对癌细胞增殖速度及成簇大小的影响, 见 2010 年 14 卷 6 期 1009 页。

- 1 5-氟尿嘧啶对乳腺癌 MCF7 细胞中干细胞相关基因 Oct4、Bmi-1 表达的影响
燕 丽(郑州大学基础医学院, 河南省郑州市 450052)

推荐理由: 实验将 Oct4 和 Bmi-1 作为间接反应乳腺癌干细胞样细胞数量的标志, 检测人乳腺癌细胞系 MCF7 中 Oct4 和 Bmi-1 基因的表达及 5-氟尿嘧啶作用下表达水平的变化规律, 结果显示 MCF7 中可能存在肿瘤干细胞样细胞; 5-氟尿嘧啶可能诱导 MCF7 中肿瘤干细胞样细胞的数量或比例增加。但究竟是化疗药物作为一种刺激因素引起了干细胞的自我更新, 还是化疗药物使肿瘤细胞群中的非干祖细胞逆向分化为干细胞样细胞仍有待于进一步研究证实。见 2012 年 10 期 1822-1826 页。

- 2 MCF7 细胞中肿瘤干细胞的增殖特征
黄名威(广西医科大学附属肿瘤医院, 广西壮族自治区南宁市 530021)

推荐理由: 以乳腺癌 MCF7 细胞为研究对象, 探讨两种不同方法筛选干细胞样肿瘤细胞的增殖特点, 并提出了自己的观点。目前, 肿

瘤干细胞的理论的确是一个研究热点但仍存在很多争议, 尤其是干细胞 marker 的选择, 目前尚无公认的金标准。作者研究了以往报道的 CD44⁺CD24^{-low} 亚群在不同培养时间点的含量, 并应用克隆形成率分析了干细胞样肿瘤细胞比率, 通过二者的比较, 认为 CD44⁺/CD24^{-low} 亚群并不代表或者富集 MCF7 细胞株中的肿瘤干细胞亚群。文章从另一侧面为研究干细胞样肿瘤细胞的筛选标准提供了依据。见 2011 年 45 期 8404-8407 页。

- 3 LMP1-CTAR3 对鼻咽癌干细胞 SP18 生长的影响

全胜(南华大学附属第一医院肿瘤内科, 湖南省衡阳市 421001; 湖南环境生物职业技术学院, 湖南省衡阳市 421001)

推荐理由: 鼻咽癌的发病与 EB 病毒感染密切相关。EB 病毒编码的潜伏性膜蛋白 1(latent membrane protein, LMP1)是其重要致癌蛋白, 该蛋白发挥生物学作用依赖其羧基末端胞浆区的 3 个活化区域(carboxy terminal activation region, CTAR)活化受体转导胞内信号活化, 发挥致癌作用。为了解 LMP1 羧基末端 CTAR3 缺失突变后(LMP1^{Δ232-351})影响鼻咽癌干细胞 SP18 细胞增殖的作用机制, 检测了细胞中 JAK3 蛋白的磷酸化水平, 研究结果显示 SP18-LMP1^{Δ232-351} 细胞较 SP18-LMP1 细胞中 JAK3 蛋白的磷酸化水平降低。结合 LMP1^{Δ232-351} 促进 SP18 增殖的能力降低, 推测 LMP1 羧基末端 CTAR3 可能通过调节 SP18 细胞中 JAK3 信号通路的活化, 影响 SP18 细胞的增殖, 但具体的信号调节机制, 有待以后进一步深入研究。见 2011 年 45 期 8395-8398 页。

- 4 组织芯片观察 CD44+/CD166+结直肠癌干细胞的形态及分布

罗 雁(甘肃省干细胞与基因药物重点实验室,

解放军兰州军区兰州总医院病理科, 甘肃省兰州市 730050; 兰州大学基础医学院病理教研室, 甘肃省兰州市 730030; 甘肃省医学科学院, 甘肃省兰州市 730050)

推荐理由: 结直肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一, 肿瘤的侵袭转移是患者死亡的主要原因。近几年陆续发现了 CD44、CD166 等结直肠癌肿瘤干细胞标志物。实验利用组织芯片及免疫组织化学、免疫组织化学双染技术, 采用连续切片的方法, 定位标记 CD44⁺/CD166⁺ 双阳性细胞。结果显示, 正常肠黏膜中未见 CD44⁺/CD166⁺ 细胞, 在伴不典型增生腺瘤中可见极少量 CD44⁺/CD166⁺ 细胞, 结直肠癌中可见到少量 CD44⁺/CD166⁺ 双阳性细胞。双阳性细胞主要分布在结直肠癌腺管基底侧, 呈灶状或散在分布; 随着结直肠癌分化程度的降低, 数量增多, 且其数量在浸润较深的癌巢中较多。提示结直肠癌干细胞的数量、位置、分布方式及其形态有助于结直肠癌的诊断及判断预后。见 2011 年 36 期 6714-6717 页。

- 5 利用藻酸盐与骨髓间充质干细胞及前列腺癌细胞混合培养: 观察干细胞对癌细胞增殖速度及成簇大小的影响

解 杰(华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科, 湖北省武汉市 430030)

推荐理由: 以往肿瘤的生长模型有体外培养瓶与动物实验两种, 两者之间缺乏一种更便于监测细胞的生长, 同时还具有体内环境特点的模型。实验设立的模型引入组织工程研究常用的藻酸钙微球模型, 为肿瘤的研究提供了一个可能的新的研究环境。体外构建前列腺癌转移立体模型, 有助于更方便观察肿瘤生长情况及检测各种影响肿瘤生长因素, 在模型中进行各种不同的干预及观察, 从而为体内行肿瘤的治疗提供参考依据。见 2010 年 6 期 1009-1014 页。

内容详见: www.crter.org