

# 脐带间充质干细胞联合骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化：1年随访对照

曾芝雨, 李东良, 方坚, 阮梅, 夏磊, 张志强, 张世安(解放军南京军区福州总医院肝胆内科, 福建省福州市 350025)

## 文章亮点:

- 1 促进肝细胞再生, 寻找具有完备功能的细胞来源替代坏死肝细胞, 实现有效的肝功能恢复, 是终末期肝病治疗中亟需解决的难题。
- 2 脐带间充质干细胞联合骨髓干细胞治疗慢性肝衰竭是一种新的尝试和探索。脐带间充质干细胞联合骨髓干细胞移植能够较快地改善失代偿期肝硬化患者临床症状, 安全性好, 但其疗效与对照组相比并无明显差异, 因此其确切疗效有待扩大样本量进一步深入研究。

## 关键词:

干细胞; 移植; 脐带间充质干细胞; 骨髓干细胞; 失代偿期肝硬化; 疗效; 安全性; 肝功能; 凝血酶原时间; Child-Pugh 评分; MELD 评分; 1年生存率

## 主题词:

脐带; 间质干细胞移植; 骨髓祖代细胞; 肝硬化; 治疗结果

## 基金资助:

福建省社会发展重点资助项目(2011Y0043); 南京军区医学科技创新基金资助项目(2007534)

## 摘要

**背景:** 骨髓干细胞应用于治疗失代偿期肝硬化有较多单中心研究报道, 效果均不理想, 其原因可能与肝硬化患者年龄大、体质弱, 骨髓造血功能差, 能够获取的干细胞数量少, 再生和增殖能力弱有关, 而脐带间充质干细胞具有易获得、来源广、免疫原性弱等特点。二者联合移植有可能提高其对失代偿期肝硬化患者的治疗效果。

**目的:** 探讨脐带间充质干细胞联合骨髓干细胞治疗失代偿期肝硬化的疗效及安全性。

**方法:** 失代偿期肝硬化患者 32 例随机分为两组, 对照组 19 例单纯内科综合治疗, 干细胞组 13 例在内科治疗基础上进行脐带间充质干细胞联合骨髓干细胞移植。跟踪观察随访 1 年, 分别于治疗后 4, 12, 52 周观察并详细记录患者肝功能(丙氨酸转氨酶、总胆红素、白蛋白)、凝血酶原时间、Child-Pugh 评分、MELD 评分、患者 1 年生存率、临床生活质量评分(QOL)及干细胞治疗相关不良反应。

**结果与结论:** 在治疗后 4, 12, 52 周, 干细胞组和对照组肝功能、凝血酶原时间、Child-Pugh 评分、MELD 评分等指标较治疗前均有改善, 但两组对比差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 移植后 4 周患者临床症状及临床生活质量评分(QOL)有较快改善, 与对照组相比差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 在治疗后 12, 52 周时差异无显著性意义( $P > 0.05$ ); 两组患者 1 年生存率无明显差异, 未发生与细胞治疗相关的严重并发症。结果表明脐带间充质干细胞联合骨髓干细胞移植能够较快地改善失代偿期肝硬化患者临床症状, 安全性好, 但对其确切疗效有待扩大样本量进一步深入研究。

曾芝雨, 李东良, 方坚, 阮梅, 夏磊, 张志强, 张世安. 脐带间充质干细胞联合骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化: 1年随访对照[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(10):1533-1538.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.10.011

## Umbilical cord mesenchymal stem cells with bone marrow stem cells in the treatment of decompensated cirrhosis: a 1-year follow-up study

Zeng Zhi-yu, Li Dong-liang, Fang Jian, Ruan Mei, Xia Lei, Zhang Zhi-qiang, Zhang Shi-an (Department of Hepatobiliary Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** There are most single-center studies about bone marrow stem cells applied to treat decompensated cirrhosis, but the therapeutic results are not ideal. It is possibly related to aging, physical weakness, poor bone marrow hematopoietic function, less available number of stem cells and feeble ability of regeneration and proliferation in liver cirrhosis patients. Umbilical cord mesenchymal stem cells are characterized of easy to obtain, wide source and weak immunogenicity. Co-transplantation of bone marrow stem cells and umbilical cord mesenchymal stem cells may improve the therapeutic effects on decompensated cirrhosis patients.

**OBJECTIVE:** To investigate the efficacy and safety of co-transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells and bone marrow stem cells on decompensated cirrhosis.

曾芝雨, 女, 1988 年生, 福建省宁德市人, 硕士, 医师, 主要从事干细胞与肝病的临床与基础研究。

通讯作者: 李东良, 主任医师, 教授, 解放军南京军区福州总医院肝胆内科, 福建省福州市 350025

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)10-01533-06

稿件接受: 2015-02-07

http://www.crter.org

Zeng Zhi-yu, Master, Physician, Department of Hepatobiliary Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Corresponding author: Li Dong-liang, Chief physician, Professor, Department of Hepatobiliary Medicine, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Accepted: 2015-02-07

**METHODS:** Thirty-two decompensated cirrhosis patients were randomly divided into two groups: in stem cell group, 13 patients received co-transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells and bone marrow stem cells based on regular medical treatment; in control group, 19 patients only underwent the regular medical treatment. All the patients were follow-up for 1 year. Alanine aminotransferase, albumin, total bilirubin, prothrombin time, Child-Pugh score and Model for End-Stage Liver Disease score, 1-year survival rate, Quality of Life score and adverse reactions related to stem cell therapy were observed and recorded in the two groups at 4, 12, 52 weeks after treatment.

**RESULTS AND CONCLUSION:** At 4, 12, 52 weeks after treatment, improvements in the liver function, prothrombin time, Child-Pugh score and Model for End-Stage Liver Disease score were found in the two groups, but there was no difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). At 4 weeks after transplantation, the clinical symptoms and Quality of Life score in the stem cell group were significantly improved, which were better than those in the control group ( $P < 0.05$ ). But at 12 and 52 weeks after treatment, no difference was found between the two groups ( $P > 0.05$ ). In addition, the 1-year survival rate showed no difference between the two groups, and no severe adverse reactions related to stem cell therapy occurred during the follow-up. Co-transplantation of umbilical cord mesenchymal stem cells and bone marrow stem cells is safe and effective to improve the clinical symptoms of decompensated cirrhosis patients. However, further studies with larger samples are warranted to better clarify the co-transplantation effects.

**Subject headings:** Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cell Transplantation; Myeloid Progenitor Cells; Liver Cirrhosis; Treatment Outcome

**Funding:** the Key Project of Fujian Province Science and Technology, No. 2011Y0043; the Medical Science and Technology Innovation Foundation of Nanjing Military Region, No. 2007534

Zeng ZY, Li DL, Fang J, Ruan M, Xia L, Zhang ZQ, Zhang SA. Umbilical cord mesenchymal stem cells with bone marrow stem cells in the treatment of decompensated cirrhosis: a 1-year follow-up study. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(10):1533-1538.

## 0 引言 Introduction

因肝炎相关性肝硬化所致的肝衰竭发生率及死亡率极高。目前对失代偿期肝硬化患者尚无特效的治疗方法, 原位肝移植被认为是最可靠的方法, 但由于供体严重短缺、费用昂贵等缺陷限制了其广泛应用。因此, 迫切需要一种安全、有效、经济、实用的治疗肝衰竭的新方法。

近年来, 大量基础研究显示骨髓来源及脐带来源的间充质干细胞在一定条件下具有向肝样细胞分化及促进肝再生和肝功能恢复的作用。而且有一些单中心小样本研究显示骨髓间充质干细胞、外周血干细胞、脐血干细胞也具有改善肝硬化患者肝功能及终末期肝脏疾病模型(model for end stage liver disease, MELD)评分的作用<sup>[1-5]</sup>, 但这些研究样本量偏少, 而且多数研究存在未设立对照组, 观察时间较短等不足。因此, 目前对于干细胞治疗肝衰竭及失代偿期肝硬化的有效性、安全性、干细胞类型、数量、输入途径、治疗次数、适应证等问题仍存在较多的不确定性, 需要进一步深入研究。课题组开展了这项脐带间充质干细胞联合骨髓干细胞与内科综合治疗对照前瞻性队列研究, 探讨脐带间充质干细胞联合自体骨髓干细胞治疗失代偿期肝硬化患者的疗效及安全性。

## 1 对象和方法 Subjects and methods

**设计:** 前瞻性队列研究。

**时间及地点:** 于2010年2月至2013年2月在解放军南京军区福州总医院肝胆内科完成。

**对象:**

**纳入标准:** 不同病因的肝硬化诊断分别符合2000年中华医学会肝病学分会修订的《病毒性肝炎防治方案》、2005年中华医学会肝病学分会修订的《慢性乙型肝炎防治指南》、

2004年中华医学会肝病学分会修订的《丙型肝炎防治指南》、2006年中华医学会肝病学分会修订的《酒精性肝病及非酒精性脂肪肝病诊疗指南》的肝硬化临床诊断标准, 分别诊断为乙型肝炎肝硬化、丙型肝炎肝硬化和(或)酒精性肝病肝硬化, 且Child-Pugh分级为B、C级(失代偿期肝硬化)。

**排除标准:** ①< 18岁及孕妇或哺乳期妇女。②不愿参加试验和签订知情同意书或不能遵守试验要求者。③合并自发性腹膜炎等感染性或活动性消化道出血患者。④严重心脏、肺功能衰竭, 极高危高血压及其他严重疾病不能耐受治疗的患者。⑤经肿瘤标志物及MR等相关检查提示可疑恶性肿瘤或既往有恶性肿瘤病史的患者。⑥凝血功能严重障碍(凝血酶原时间大于25 s)及血小板极度降低( $< 2 \times 10^9 L^{-1}$ )未纠正, 肝动脉介入治疗有诱发出血风险的患者。⑦Child-Pugh分级为A级的患者。⑧碘过敏的患者。

失代偿期肝硬化(Child-Pugh B、C级)住院患者665例, 其中符合入选条件, 并愿意签署知情同意书和手术同意书入组治疗的患者32例, 男27例, 女5例; 年龄40-73岁; 乙型肝炎肝硬化25例, 酒精性肝病肝硬化7例。按照1:1.5的比例分为两组, 其中干细胞治疗组13例, 内科综合治疗对照组19例, 两组患者的基线资料差异无显著性意义。

**方法:**

**骨髓干细胞制备方法:** 于手术当日在无菌条件下, 局麻后从髂骨抽取患者骨髓血15-20 mL, 在百万级层流实验室按1:1比例加入到含有骨髓稀释液的无菌离心管中, 振荡混匀。用无菌注射器吸取淋巴细胞分离液, 将其铺设于待分离的骨髓液下方, 以 $250 \times g$ ,  $4^\circ C$ 条件下离心30 min(注意将离心机的刹车装置关闭), 用无菌注射器吸取分离液与骨髓液之间的淡黄色液层即单个核细胞层, 将收集到的单个核细胞按1:1比例与骨髓稀释液混合, 再以 $250 \times g$ ,  $4^\circ C$ 条件下离心

15 min, 弃上清后用骨髓稀释液重新悬浮沉积到试管底部的骨髓细胞, 制成总体积为50 mL骨髓细胞悬液, 取2 mL锥虫蓝染色后活细胞计数及流式细胞仪骨髓干细胞标志检测, 其余骨髓干细胞用于患者肝动脉介入治疗。

**脐带间充质干细胞制备方法:** 脐带干细胞的采集分离、培养、鉴定等制备方法和治疗肝病的适应证, 通过了上级卫生主管部门鉴定验收和批准。每次给患者移植的脐带干细胞数为 $(6.0-7.0) \times 10^7/\text{kg}$ , 制成50 mL细胞悬液备用。

**脐带间充质干细胞鉴定:** 流式细胞仪检测脐带间充质干细胞表面标志物CD34、CD45、CD29、CD90。将已制备好的脐带干细胞悬液, 调整细胞浓度为 $10^{10} \text{ L}^{-1}$ 。取8管100  $\mu\text{L}$ 细胞悬浮液, 分别加入CD34、CD45、CD29、CD90单克隆荧光抗体各20  $\mu\text{L}$ 充分混匀, 其中3管同型对照, 1管为阴性基数对照, 室温避光孵育40 min。用PBS洗涤两次, 洗去未结合荧光抗体。用PBS重悬细胞, 流式细胞仪检测CD34、CD45、CD29、CD90抗原的表达。

#### 分组治疗:

**对照组:** 采取内科综合治疗主要包括戒酒、抗病毒、保肝、营养支持及对症治疗。

**干细胞治疗组:** 在上述内科治疗的基础上加脐带间充质干细胞联合骨髓干细胞移植治疗。首次干细胞治疗所有患者均采取肝动脉介入移植, 经肝固有动脉分别将骨髓细胞50 mL[骨髓有核细胞为 $(1.0-5.0) \times 10^6/\text{kg}$ ], 脐带干细胞50 mL[脐带间充质干细胞数为 $(6.0-7.0) \times 10^7/\text{kg}$ ]缓慢注入肝动脉内。7 d后从外周血管再次输入脐带间充质干细胞悬液100 mL[细胞数为 $(6.0-7.0) \times 10^7/\text{kg}$ ]。

**主要观察指标:** 分别于治疗前(基线情况)、治疗后4, 12, 52周观察并详细记录患者主要及次要观察指标的变化。

主要观察指标为肝功能(丙氨酸转氨酶、总胆红素、白蛋白)、凝血酶原时间、Child评分、MELD评分, 患者1年生存率。

次要观察指标为患者主要临床症状的改善情况(采用生存质量评分, 包含食欲、精神、睡眠、疲乏、腹胀或水肿、日常生活)及干细胞治疗相关不良反应。

**统计学分析:** 应用SPSS 11.5统计软件包进行统计分析, 各组计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐计量资料采用两个独立样本的 $t$ 检验, 方差不齐计量资料采用非参数Kruskal-Wallis  $H$ 秩和检验; 计数资料采用卡方检验, 其中等级频数资料采用非参数Kruskal-Wallis  $H$ 秩和检验, 随访中脱落患者的数据做为无效处理。两组生存情况采用Kaplan-Meier分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

**2.1 参与者数量分析** 见图1。根据纳入及排除标准, 共32例纳入分析, 在随访4周时, 无脱落病例, 两组均进入结果分析。随访12周时, 干细胞组1例因肝肾综合征死亡而脱落, 对照组2例因上消化道出血及肝性脑病死亡, 7例

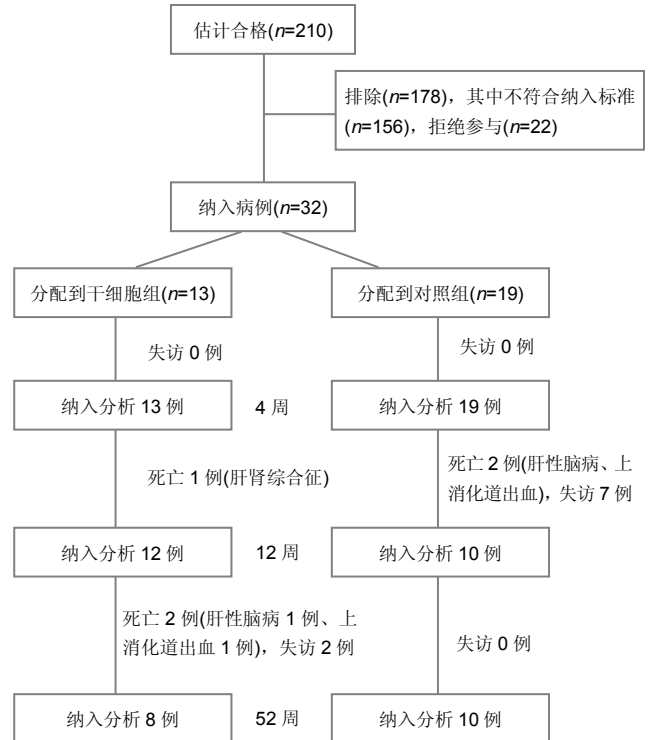


图1 患者入组流程图

Figure 1 Flowchart of patient's enrollment and grouping

失访而脱落。随访52周时, 干细胞组2例因上消化道出血及肝性脑病死亡, 2例失访; 对照组无失访及死亡病例。随访过程中死亡及失访病例均纳入分析, 死亡及失访患者均按照无效处理。

**2.2 两组患者基线情况** 两组患者的一般情况、主要症状及主要观察指标的基线特征基本一致, 具体见表1, 2。

表2 两组患者基线 Child 和 MELD 评分情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Patient's general information, Child-Pugh score and Model for End-Stage Liver Disease score at baseline

组别	Child 评分	MELD 评分
干细胞组(n=13)	9.08±1.66	11.25±5.02
对照组(n=19)	9.37±1.67	13.79±9.39
$t$	-0.486	-0.890
$P$	0.631	0.381

**2.3 干细胞表型鉴定** 流式细胞仪检测结果显示血管源性干细胞表型CD34和CD45的阳性率分别为0%–0.50%和0%–0.70%, 而间充质干细胞表型CD29和CD90的阳性率为分别为85.4%–96.5%, 88.7%–99.5%, 为纯度较高脐带间充质干细胞(图2)。

#### 2.4 治疗效果

**2.4.1 主要观察指标的变化** 两组患者治疗后4, 12, 52周各观察指标的平均值均较治疗前有所好转, 但干细胞治疗组与对照组相比差异均无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见表3。

**2.4.2 临床症状改善情况** 两组患者治疗后大部分患者食欲、精神、腹胀、水肿、乏力、日常生活能力等均有不同程度改善, 且在早期(4周)评估时干细胞组患者生活质量

表 1 两组患者基线一般情况及肝功能主要指标

( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 General data and the main indicators of liver function at baseline in the two groups

组别	年龄(岁)	男/女(n)	乙肝肝硬化/酒精性肝硬化(n)	丙氨酸转氨酶(U/L)	总胆红素( $\mu\text{mol/L}$ )	白蛋白(g/L)	凝血酶原时间(s)
干细胞组(n=13)	51.31 $\pm$ 9.10	11/2	10/3	48.00 $\pm$ 24.64	47.754 $\pm$ 44.219	31.18 $\pm$ 6.439	15.692 $\pm$ 3.206
对照组(n=19)	49.79 $\pm$ 9.62	16/3	15/4	85.00 $\pm$ 89.68	81.368 $\pm$ 136.794	30.58 $\pm$ 4.073	16.618 $\pm$ 3.420
统计值	-0.113 <sup>a</sup>	0.001 <sup>b</sup>	0.019 <sup>b</sup>	-1.456 <sup>a</sup>	-0.815 <sup>a</sup>	0.327 <sup>a</sup>	-0.771 <sup>a</sup>
P	0.910	0.683	0.611	0.153	0.401	0.746	0.447

表注: 干细胞组与对照组两组基线对比。<sup>a</sup>: 两个独立样本 *t* 检验统计值; <sup>b</sup>: Kruskal-Wallis *H* 秩和检验统计值。

表 3 干细胞治疗后不同时间两组患者主要观察指标变化

( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 The main outcome measures in the two groups at different time after treatment

组别	4 周					
	丙氨酸转氨酶(U/L)	总胆红素( $\mu\text{mol/L}$ )	白蛋白(g/L)	凝血酶原时间(s)	Child 评分	MELD 评分
干细胞组(n=13)	41.92 $\pm$ 17.96	44.08 $\pm$ 46.73	31.32 $\pm$ 8.62	15.438 $\pm$ 3.175	8.62 $\pm$ 2.18	12.096 $\pm$ 7.810
对照组(n=19)	33.32 $\pm$ 27.94	72.41 $\pm$ 114.32	31.89 $\pm$ 5.39	15.588 $\pm$ 3.294	8.79 $\pm$ 1.62	13.030 $\pm$ 9.637
统计值	-0.978 <sup>a</sup>	0.13 <sup>b</sup>	-0.234 <sup>a</sup>	-0.128 <sup>a</sup>	-0.259 <sup>a</sup>	-0.290 <sup>a</sup>
P	0.336	0.719	0.816	0.899	0.797	0.774
组别	12 周					
	丙氨酸转氨酶(U/L)	总胆红素( $\mu\text{mol/L}$ )	白蛋白(g/L)	凝血酶原时间(s)	Child 评分	MELD 评分
干细胞组(n=12)	34.08 $\pm$ 16.44	49.27 $\pm$ 65.21	30.93 $\pm$ 5.84	15.38 $\pm$ 2.95	8.33 $\pm$ 2.02	11.631 $\pm$ 10.357
对照组(n=10)	40.10 $\pm$ 38.15	36.10 $\pm$ 28.78	32.90 $\pm$ 4.89	15.40 $\pm$ 2.96	8.56 $\pm$ 1.51	12.620 $\pm$ 7.906
统计值	-0.496 <sup>a</sup>	0.591 <sup>a</sup>	-0.846 <sup>a</sup>	0.186 <sup>a</sup>	-0.229 <sup>a</sup>	-0.248 <sup>a</sup>
P	0.626	0.561	0.408	0.854	0.807	0.807
组别	52 周					
	丙氨酸转氨酶(U/L)	总胆红素( $\mu\text{mol/L}$ )	白蛋白(g/L)	凝血酶原时间(s)	Child 评分	MELD 评分
干细胞组(n=8)	34.50 $\pm$ 17.78	28.86 $\pm$ 18.15	31.76 $\pm$ 8.29	14.31 $\pm$ 1.56	8.29 $\pm$ 2.14	14.533 $\pm$ 10.586
对照组(n=10)	27.20 $\pm$ 12.48	25.70 $\pm$ 16.99	33.10 $\pm$ 5.09	14.03 $\pm$ 2.19	7.89 $\pm$ 2.15	10.189 $\pm$ 7.689
统计值	1.024 <sup>a</sup>	0.381 <sup>a</sup>	-0.422 <sup>a</sup>	0.304 <sup>a</sup>	0.367 <sup>a</sup>	1.010 <sup>a</sup>
P	0.321	0.708	0.678	0.678	0.719	0.327

表注: 干细胞组与对照组两组治疗后对比。<sup>a</sup>: 两个独立样本 *t* 检验统计值; <sup>b</sup>: Kruskal-Wallis *H* 秩和检验统计值。

评估较好、良好等级的比例高于对照组, 两组相比差异有显著性意义( $H=3.862$ ,  $P=0.05$ )。但随着治疗时间的延长在12周和52周评估时两组患者无明显差别(图3)。

**2.4.3 患者生存情况** 干细胞组13例患者在1年的随访中失访及死亡5例, 对照组19例患者, 失访及死亡9例; 死亡原因均为肝衰竭并发肝肾综合征、感染、消化道大出血、肝性脑病等严重并发症。1年的生存率分别为61.5%和52.6%, 两组比差异无显著性意义( $\chi^2=0.249$ ,  $P=0.729$ , 图4)。

**2.5 不良反应及安全性** 除个别患者于干细胞治疗后当日会出现低热外, 未发现其他与干细胞治疗相关的不良反应。

### 3 讨论 Discussion

肝硬化是多种肝脏疾病的一种不良临床结局。失代偿期肝硬化是慢性肝病的终末阶段, 5年生存率只有14%<sup>[6]</sup>。目前对失代偿期肝硬化患者尚无特效的治疗方法, 原位肝移植被认为是最可靠的方法, 但由于供体严重短缺、费用昂贵等缺陷限制了其广泛应用。干细胞问世及前期研究成

果为失代偿期肝硬化治疗带来了新的希望。骨髓干细胞不仅易于培养, 而且可大量扩增, 其遗传背景相对稳定且多向分化特性不会受到影响, 因此, 成为临床上被用于细胞(或组织)替代治疗研究的热点<sup>[7]</sup>。1999年Petersen等<sup>[8]</sup>研究者报道, 用2-AFF来阻断大鼠的肝细胞增殖, 用CCL4造成肝细胞损伤, 进行性别交叉骨髓细胞移植或者全肝移植后, 在肝脏中发现来源于骨髓的肝细胞。Theise等<sup>[9]</sup>报道了女性患者接受男性供体的骨髓移植后, 受体的一些肝细胞和胆管上皮细胞核内发现含有Y染色体。这两个研究均证明了骨髓干细胞或造血干细胞能够在人和鼠的肝脏内转化为肝细胞和胆管细胞。Terai等<sup>[10]</sup>发现荧光蛋白阳性标记的骨髓细胞可定植在肝小叶门脉周围, 4周后肝脏中骨髓细胞占有全部细胞的25%, 并横向分化为能分泌白蛋白的成熟肝细胞。以上均表明, 促进骨髓间充质干细胞向肝样细胞转化的关键因素是机体内环境和肝脏本身微环境, 分化形成的肝样细胞能够对损伤肝脏起到一定的修复作用。

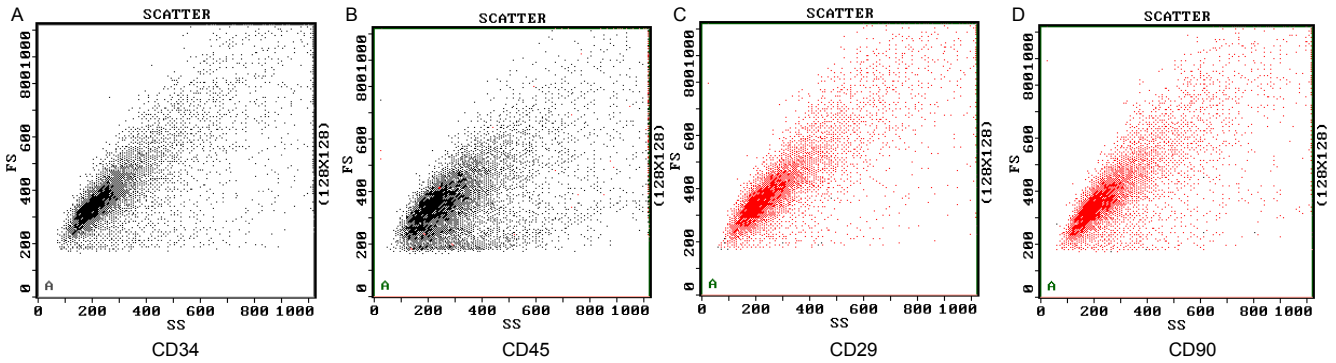


图2 流式细胞仪检测脐带间充质干细胞表面标志物

Figure 2 Surface markers of umbilical cord mesenchymal stem cells detected by flow cytometry

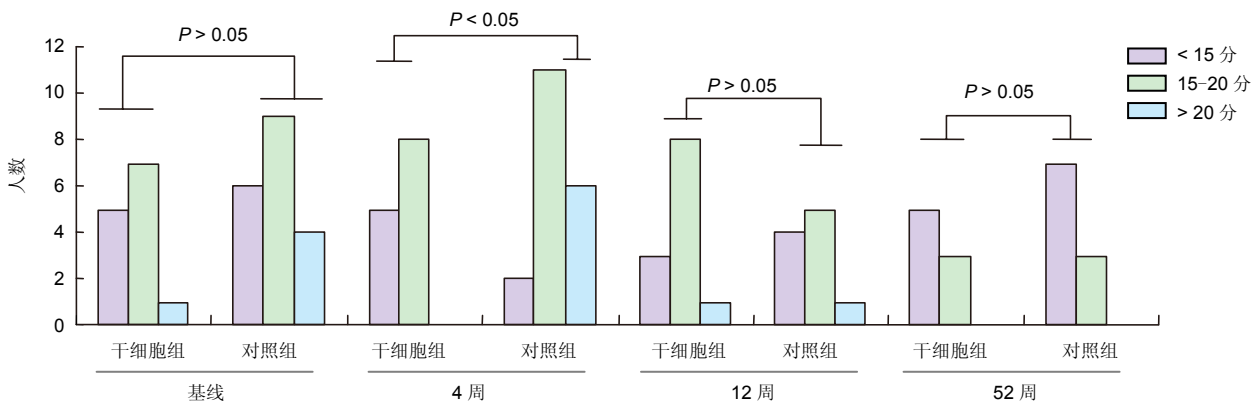


图3 干细胞组与对照组临床症状质量评分情况

Figure 3 The clinical symptoms quality assessment of stem cell group and control group

图注: 生活质量分级评分标准: <15分为极差及差, 15-20分为一般, >20分为较好及良好; 采用 Kruskal-Wallis  $H$  秩和检验统计值, 两组患者治疗后早期(4周)评估时干细胞组患者生活质量评估较好、良好等级的比例高于对照组, 差异有显著性意义( $H=3.862, P=0.05$ )。但随着治疗时间的延长在12周和52周评估时两组患者无明显差别。

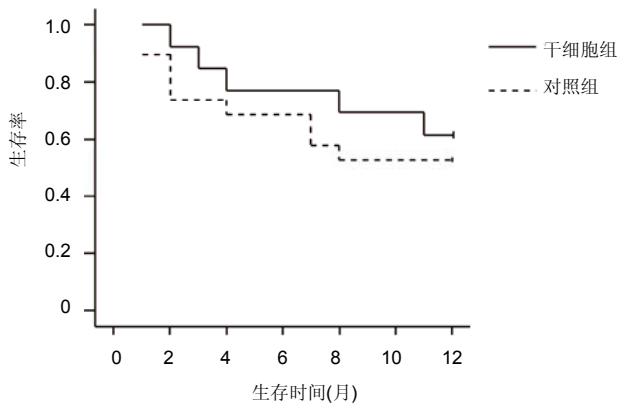


图4 两组患者1年生存分析曲线

Figure 4 The 1-year survival curves of two groups

图注: 1年的生存率分别为61.5%(8/13)和52.6%(10/19), 两组比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

本课题组在前期工作中通过贴壁培养获取大鼠骨髓间充质干细胞, 添加肝细胞生长因子、纤维母细胞生长因子、地塞米松、胰岛素铁硒传递蛋白等生长因子和激素能成功地诱导骨髓间充质干细胞向肝样细胞分化<sup>[11-12]</sup>, 并通过肝大部切除大鼠模型, 证实骨髓间充质干细胞能在肝内归巢、定植和促进肝大部切除及极量肝切除大鼠残肝的再生和肝功能恢复<sup>[13-14]</sup>。但是, 人骨髓间充质干细胞数量及增殖分

化潜能随年龄的增大而下降, 尤其是肝炎病毒感染的肝硬化患者常伴有骨髓造血功能减退及骨髓增生不良, 干细胞增殖分化能力下降, 骨髓穿刺采集的骨髓间充质干细胞数量很难达到干细胞移植治疗需要的细胞数量。再加上患者病情严重, 一次性采集大量骨髓液多数患者不能耐受, 也不安全。这不仅限制了自体骨髓间充质干细胞在肝病治疗方面应用, 也可能是目前疗效尚不理想的重要原因。

人脐带间充质干细胞不仅具有取材方便, 来源广, 数量充足, 长期传代不改变特点外, 还具有更原始的干/祖细胞, 增殖分化能力强, 免疫功能不成熟, 保持一种缄默状态, 不会触发免疫反应及引起移植物抗宿主病等优点<sup>[15]</sup>。Van Poll等<sup>[16]</sup>将间充质干细胞条件培养基全身输注到右旋氨基半乳糖诱导的急性肝损伤鼠模型中, 发现凋亡的肝细胞减少了90%且有直接抗细胞凋亡和促有丝分裂的作用, 提示脐带间充质干细胞具有保护肝细胞及促进肝脏再生的作用。

考虑到脐带间充质干细胞增殖分化能力强, 体外培养扩增技术成熟, 不仅可以保证肝衰竭患者移植所需要足量的细胞数, 还能增强成年人骨髓间充质干细胞的增殖分化能力, 这无疑对促进肝脏再生是有利的。但是, 由于脐带间充质干细胞非自体细胞, 还有较弱的免疫原性, 归巢、定植到肝脏的能力较自体间充质干细胞弱。自体骨髓间充

质干细胞与其相反, 归巢、定植能力比较强, 因此, 作者推测二者联合后有可能会诱导脐带间充质干细胞归巢, 定植到肝脏, 并有降低发生排斥的风险, 课题组开展了这项脐带间充质干细胞联合骨髓干细胞治疗失代偿期肝硬化的前瞻性对照随访研究, 结果与对照组相比并没有获得理想的治疗效果, 除了治疗早期(4周)临床症状质量评分干细胞治疗组优于对照组外, 治疗12周及52周两组患者反应肝脏功能的主要观察指标及两组患者1年生存率均无明显差异。与Mohamadnejad等<sup>[17]</sup>进行的一项随机单盲安慰剂对照研究结果一致, 该研究通过外周血输入骨髓间充质干细胞的肝硬化患者与使用安慰剂治疗的患者相比, 其MELD、Child-Pugh评分及肝功能等均无明显差异。但是, 也有多项临床研究显示骨髓间充质干细胞、外周血干细胞、脐血干细胞分别通过外周血管、门静脉、肝动脉等途径移植到患者体内和肝内, 可以不同程度地改善肝硬化患者肝功能及肝脏疾病终末期模型(MELD)评分<sup>[1-5]</sup>, 这些研究有一个共同的特点, 均无设对照组, 样本数量较小, 所以循证医学证据等级较低。本项研究虽然设了对照组, 但是也存在样本数量少, 观察时间短等缺陷。没有获得理想的治疗效果还有一个很重要的原因可能还与本组患者病情过重, 多数患者为 Child-Pugh C级肝功能, 其肝脏严重受损, 肝脏干细胞耗竭和细胞分化微环境破坏, 从而导致干细胞定植、分化障碍, 必然会影响治疗效果, 确切的治疗效果和作用机制有待进一步深入研究和探讨。

**致谢:** 感谢解放军南京军区福州总医院福建省移植生物学重点实验室提供实验平台和制备脐带间充质干细胞, 感谢解放军南京军区福州总医院泌尿外科全军器官移植中心谭建明副院长、黄梁洪主任技师及介入科杨熙章主任给予的相关技术支持。

**作者贡献:** 设计、实施、评估为全部作者。在研究中, 方坚、阮梅、夏磊、张志强、张世安等协同完成了数据的采集和输入, 以及部分数据的分析过程。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 参与研究的患病个体及其家属自愿参加, 所有供者、受者均应对研究过程完全知情同意, 在充分了解治疗方案的前提下签署“知情同意书”; 干预及治疗方案获医院伦理委员会批准。所使用干细胞由解放军南京军区福州总医院干细胞中心实验室制备, 此干细胞中心实验室于2009年通过中国人民解放军总后勤部卫生部达标验收。

**学术术语:** 间充质干细胞-来源于中胚层间充质的成体干细胞, 主要存在于骨髓、脐血、脐带、胎盘、外周血及肝脏等器官间质和结缔组织中, 它们具有独特的免疫调节作用、自我更新和跨胚层多向分化潜能等特点。它们能够分化为肝细胞样细胞、纤维母细胞、成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌原细胞以及神经外胚泡等。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Gordon MY, Levicar N, Pai M, et al. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells*. 2006;24(7):1822-1830.
- [2] 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. *Arch Iran Med*. 2007;10(4):459-466.
- [3] Liao X, AnCheng JY, Zhou QJ, et al. Therapeutic effect of autologous bone marrow-derived liver stem cells transplantation in hepatitis B virus-induced liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology*. 2013;60(123):406-409.
- [4] 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. *Cytotherapy*. 2008;10(4):390-396.
- [5] 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 Gastroenterol Hepatol*. 2012;27 Suppl 2:112-120.
- [6] Zoulim F, Radenne S, Ducerf C. Management of patients with decompensated hepatitis B virus associated [corrected] cirrhosis. *Liver Transpl*. 2008;14 Suppl 2:S1-7.
- [7] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
- [8] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999;284(5417):1168-1170.
- [9] Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000;32(1):11-16.
- [10] Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, et al. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem*. 2003;134(4):551-558.
- [11] 范敬静, 李东良, 何秀华, 等. 骨髓间充质干细胞向肝样细胞的诱导及分化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(14): 2491-2494.
- [12] Li DL, He XH, Zhang SA, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote hepatic regeneration after partial hepatectomy in rats. *Pathobiology*. 2013; 80(5):228-234.
- [13] 何秀华, 李东良, 江军, 等. 移植途径对大鼠骨髓间充质干细胞归巢及肝功能恢复的影响[J]. *中华细胞与干细胞杂志: 电子版*, 2011, 1(1): 57-62.
- [14] 李东良, 何秀华, 范敬静, 等. 骨髓动员与骨髓间充质干细胞移植促进极量肝切除大鼠肝再生作用的对照研究[J]. *解放军医学杂志*, 2014, 39(8):595-600.
- [15] Chen H, Zhang Y, Yang ZJ, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived oligodendrocyte precursor-like cells for axon and myelin sheath regeneration. *Neural Regen Res*. 2013;8(10): 890-899.
- [16] 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.
- [17] Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Bagheri M, et al. Randomized placebo-controlled trial of mesenchymal stem cell transplantation in decompensated cirrhosis. *Liver Int*. 2013;33(10):1490-1496.