

- X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial[J]. Lancet, 2015, 385(9972): 956-965. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61933-4.
- [31] Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, et al. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology, 2013, 145(3): 574-582, e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.05.042.
- [32] 何方平. 非酒精性脂肪性肝病的治疗: 欧洲肥胖-2型糖尿病 - 消化临床实践指南解读 [J]. 中华肝病杂志, 2017, 25(2): 119-121. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.02.008.
- He FP. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease: an interpretation of the European clinical guidelines for obesity, type 2 diabetes, and digestive disease[J]. Chin J Hepatol, 2017, 25(2): 119-121. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.02.008.
- (收稿日期: 2016-12-05)
(本文编辑: 朱红梅)

间充质干细胞及其外泌体治疗肝病的研究进展

牛文惠 张金卷 朱争艳

300000 天津医科大学三中心临床学院 天津市人工细胞重点实验室 天津市肝胆疾病研究所
卫生部人工细胞工程技术研究中心(牛文惠、朱争艳); 300000 天津市第三中心医院肝胆
外科(张金卷)

通信作者: 朱争艳, Email: 13821646170@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.10.018

【摘要】 目前,对急性肝功能衰竭、晚期肝硬化最有效的治疗仍是肝移植,但是由于器官供体不足、财政考虑和对终身免疫抑制的要求,其使用及推广受到限制。近年来,绕过使用整个肝脏的替代方法,如干细胞移植,已被建议作为肝脏疾病的有效替代疗法。间充质干细胞,也称为多潜能间质基质细胞,是在几乎所有出生后的器官和组织,包括肝脏中发现的自我更新细胞,其分化为肝细胞的潜力以及它们的免疫调节特性为其在急、慢性肝病的治疗打开了思路。现对近年来间充质干细胞的特性以及治疗急、慢性肝病的机制情况进行综述,并对相关风险进行了探讨。

【关键词】 肝功能衰竭; 肝硬化; 间充质干细胞

Research advances in the role of mesenchymal stem cells and their exosomes in treatment of liver diseases Niu

Wenhui, Zhang Jinjuan, Zhu Zhengyan

Tianjin Medical University Three Center Clinical College, Tianjin Key Laboratory of Artificial Cell, Tianjin Institute of Hepatobiliary Disease, Artificial Cell Engineering Technology Research Center of Public Health Ministry, Tianjin 300000, China (Niu WH, Zhu ZY); Tianjin Third Central Hospital Hepatobiliary Surgery, Tianjin 300000, China (Zhang JJ)

Corresponding author: Zhu Zhengyan, Email: 13821646170@163.com

【Abstract】 At present, liver transplantation remains the most effective treatment for acute liver failure and advanced cirrhosis, but its use and promotion are limited by insufficient organ donors, financial consideration, and requirements for lifelong immunosuppression. In recent years, stem cell transplantation has been recommended as an effective substitutive therapy for liver disease. Mesenchymal stem cells, also known as pluripotent interstitial stromal cells, are self-renewing cells that can be found in almost all postnatal organs and tissues, including the liver. Their potential to differentiate into hepatocytes and immunomodulatory properties provide new insights into the use of mesenchymal stem cells in the treatment of acute and chronic liver diseases. This article reviews the characteristics of mesenchymal stem cells, their mechanisms in the treatment of acute and chronic liver diseases, and related risks.

【Key words】 Liver failure; Liver cirrhosis; Mesenchymal stem cells

急性肝衰竭,其继发于感染、毒素或免疫介导的攻击,是潜在致命的临床综合征,其特征是肝细胞功能障碍的快速发展,弥漫性肝内浸润炎症细胞和大量多泡坏死。肝硬化是慢性肝病共有的病理改变。它表现出连续且重叠的病变过程,包括严重炎症、肝细胞坏死和高病死率^[1]。肝硬化相关的免疫功能障碍是一种动态现象,包括增加的全身炎症和免疫缺陷,并造成 30% 的病死率。它也在急性和慢性代偿失调中起重要作用^[2]。其发生机制是不同病因引起的慢性肝损伤,导致肝组织内细胞外基质合成增多,降解不足,过多异常沉积继而导致肝脏结构与功能发生异常改变的一种病理变化,最终发展为肝硬化。病毒性肝炎仍然是世界范围内的重大威胁,尽管有几项成功的治疗研究和疫苗接种策略。肝衰竭和肝硬化等急性和慢性感染相关的并发症,是造成高发病率和病死率的原因^[3]。

目前,对急性肝衰竭、晚期肝硬化最有效的治疗仍是肝移植,但是由于器官供体不足,财政考虑和对终身免疫抑制的要求,其使用及推广受到限制。近年来,绕过使用整个肝脏的替代方法,如干细胞移植,已被建议作为肝脏疾病的有效替代疗法^[1]。

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs),也称为多潜能间质基质细胞,是可以在几乎所有出生后的器官和组织,包括肝脏中发现的自我更新细胞^[4];其分化为肝细胞的潜力以及它们的免疫调节特性为在急、慢性肝病的治疗中使用 MSCs 打开了思路^[5]。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 是存在于骨髓中除造血干细胞以外的另一种具有高度自我更新能力和多向分化潜能的干细胞,同时, BMSCs 作为治疗手段与传统的方法相比,具有明显的优势:比如可直接取材于患者本身,比较容易;可以进行体外培养与扩增,并有目的地处理为靶细胞后回输给患者;细胞来源于自身比较安全,没有排斥反应,而且避免了胚胎干细胞的伦理学争论。但是骨髓也存在一些自身局限性。据报道脐带中富含 MSCs,人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs) 有较多的优点,脐带中干细胞含量较多且更原始,有很强的增殖分化能力,免疫原性较低,病原微生物的感染可控性强,不存在伦理问题,易于向肝样细胞分化,可直接代替肝细胞用于移植治疗肝脏疾病,从而解决肝细胞来源困难及增殖能力有限的问题。因此, hUC-MSCs 成为干细胞治疗研究与应用领域中理想的种子细胞,成为研究的热点^[6-8]。

外泌体 (exosomes) 是细胞内多囊泡体 (multivesicular bodies, MVBs) 与细胞膜的融合,并释放到细胞外直径大小为 40 ~ 100 nm 的囊泡样小体,其内含有与细胞来源相关的蛋白质、miRNA 及 mRNA 等物质。2010 年 Lai 等^[9]报道 MSCs 源性外泌体 (MSC-exosomes),由于 MSCs 的外泌体分泌能力较强,越来越多的研究者热衷于 MSC-exosomes 治疗急、慢性肝病的应用前景^[10]。

本文总结了 MSCs 及其外泌体在治疗急性肝衰竭、肝硬化中的潜力,论述了它们在促进再生和免疫调节中的作用。

一、MSCs 的生物学特性

MSCs 是一类具有高度自我更新能力和多向分化潜能的干细胞,是当代生命科学研究的重点和难点。MSCs 可以在体外长期保持未分化状态,易于在体外分离、培养与扩增,并且扩增后仍能保持原有分化能力,在体外可分化为成纤维细胞、软骨细胞、肝细胞、神经细胞等多种细胞。研究者们研究了 MSCs 的体外培养特征、生物学特征等,为急、慢性肝病的治疗带来新的曙光。

迄今为止,尚未发现 MSCs 高度特异性的表面抗原,并且不同来源 MSCs 的表面标志物也并不完全相同。Neuhuber 等^[11]在对 MSCs 的 CD 分子分析中显示:非造血干细胞阴性标志物有 CD34、CD45、CD14、CD31、CD133 等,自身阳性标志物有 CD29、CD105、CD166、CD54、CD55、CD13、CD44 等。李晓峰等^[12]用流式细胞仪检测结果显示培养的第 3 代 BMSCs 均一表达 CD44、CD90、CD105,而 CD34、CD45 呈阴性;杨丽等^[13]、张君红等^[14]、韩玮等^[15]流式细胞检测结果显示第 3 代 BMSCs 均一表达 CD29、CD44,而 CD34、CD45 呈阴性。有报道流式细胞仪检测显示 hUC-MSCs 高表达 CD29、CD49、CD90、CD105 及人类白细胞抗原 -I,基本不表达造血干细胞标志物 CD34、CD45 和内皮细胞标志物 CD31。

二、MSCs 治疗肝衰竭和肝硬化的可能机制

1. 改善肝脏炎症和纤维化微环境:在肝衰竭或肝硬化患者中,炎症相关的肝损伤和纤维化通常由异常的先天遗传和适应性免疫应答介导。尽管 MSCs 参与炎症和纤维化过程的许多细节仍然未知,但是已经证明 MSCs 通过产生抑制性细胞因子或诱导调节性 T 淋巴细胞而发挥免疫调节作用。同时, MSCs 治疗可以有效调节肝脏疾病动物模型和临床试验患者自身免疫的免疫应答^[16]。MSCs 还可以通过自身分泌的白细胞介素 10 和肿瘤坏死因子 α 直接抑制肝星状细胞的活化,并且还可以部分地通过 Fas/FasL 途径诱导肝星状细胞凋亡^[17]。MSCs 具有分化为肌成纤维细胞的潜力,在某些情况下在肝脏内充当瘢痕形成细胞。在慢性肝损伤的啮齿动物模型中使用全骨髓作为细胞治疗会导致肝纤维化的发展。因此,我们认为 MSCs 通过多种机制起作用,以协调对肝脏炎症和纤维化的动态综合反应,从而阻止肝脏结构的逐渐变形。hUC-MSCs 能够抑制免疫反应、促进肝细胞再生、缓解肝纤维化进展以及提升肝功能^[7]。人 UC-MSC 治疗可有效改善 HBV-D-LC 患者的胆碱酯酶和白细胞水平,降低 Child-Pugh 评分,且安全性良好,具有一定的临床应用前景^[18]。

2. 补充功能性肝细胞:MSCs 治疗的另一个目标是在患有肝衰竭或肝硬化的患者中用具有功能性的外源性肝细胞替代受损的肝细胞。在这方面,胚胎干细胞和诱导多能干细胞在小鼠和人中最能够产生大量功能性肝细胞样细胞。然而,伦理问题及在体内稳态方式行为的不确定性限制了它们的临床应用^[19]。干细胞通过治疗改善肝脏炎症及纤维化微环境,以此促进残留肝细胞的产生。最近的研究结果表明, MSCs 可以产生各种生长因子和细胞因子,例如肝细胞生长因子对肝损伤发挥保护作用,对肝再生有促进作用^[20]。然而,

MSCs 是通过促进肝干细胞分化成肝细胞, 还是通过扩增残留的肝细胞群以获得足够数量的肝细胞仍有待探索。此外, 未来的研究将需要证明干细胞衍生的肝细胞样细胞是否具有与内源性肝细胞相同的体内功能, 并且确保这些细胞不能在受体内恢复到更原始的状态。

三、MSCs 来源的外泌体研究现状

外泌体广泛分布于血液、尿液等体液中, 是一种重要的细胞间信息传递分子及遗传物质的传递载体。目前, 发现多种类型细胞均可产生外泌体, 尤其 MSCs 被认为是产生外泌体能力最强的细胞。

在 MSCs 外泌体有关研究中, MSC-exosomes 对肿瘤的作用尚未达成共识, 但有很多研究者做过类似分泌物质的研究, 这些旁分泌物质有助于肝脏再生与肝功能的改善。孙琳琳等^[21]报道 hUC-MSCs 的旁分泌物质可以刺激暴发性肝衰竭大鼠肝细胞增殖, 改善暴发性肝衰竭大鼠的肝功能。有报道低浓度的 UC-MSCs 分泌物具有刺激正常的肝细胞再生, 抑制受损肝细胞的凋亡, 改善肝细胞功能等作用。

尽管对于 MSCs 自然分泌的外泌体对肝病的作用仍存在争议, 但毫无疑问 MSC-exosomes 是一种生物靶向治疗的良好载体, 与以往的生物靶向治疗材料相比其优点主要为^[22-23]: 受体细胞可吸收; 不引起免疫排斥反应; 没有致癌性; 可以用自体细胞人工培育生成; 易获得; 可以运载多种 RNA, 实现个性化治疗。为了实现 MSC-exosomes 生物靶向的治疗目标, 多项研究对 MSC-exosomes 的供体细胞以及运载的治疗性成分等各方面进行探索, 其大多数采用的 MSC-exosomes 的供体细胞主要为骨髓干细胞, 治疗成分主要为 miRNA。但是, 目前的研究也存在一些不足, 没有完全的使 MSC-exosomes 带有靶向多肽片段, 实现真正意义的靶向治疗。

简而言之, 对各种急、慢性肝病的生物靶向治疗也将是未来研究与临床应用的热点问题。

四、MSCs 移植治疗肝病的局限性与展望

自体干细胞移植用于临床方案, 还有几个关键问题需要进一步确认, 比如最佳 MSCs 类型、最佳治疗时机、最有效的干细胞数目、最佳给药途径等。基于干细胞治疗的长期临床益处和安全性, MSCs 的临床应用应在大规模随机对照试验中进一步证实。目前, MSCs 治疗是否可诱发并发症尚不清楚, 例如肝动脉夹层和肿瘤发生等。而相对安全的同种异体 MSCs 移植也存在几个障碍。MSCs 在体外存在巨细胞病毒和单纯疱疹病毒感染的风险, 并且与 MSCs 自体移植相反, MSCs 同种异体移植存在传播给接受者病毒的风险^[24]。在 MSCs 同种移植之前, 应筛查 MSCs 供体和接受者巨细胞病毒和单纯疱疹病毒的感染状况, 以防止免疫抑制患者的感染。同时, 同种异体 MSCs 对于受体免疫系统的影响也是不可忽略的, 在移植后, 它们可能引发免疫应答, 导致移植细胞被排斥, 减弱其治疗潜力。这些问题均是 MSCs 治疗研究中需要进一步观察、解决和完善的。MSCs 是一种具有巨大分化潜能的细胞, 在治疗急、慢性肝病方面有很大应用潜力。目前提出将基因修饰和 MSCs 移植相结合的治疗策略, 两者结

合可优势互补。细胞基因治疗是指将正常基因整合到宿主细胞, 再将宿主细胞移植到靶器官, 使之分化并表达特定的基因产物, 以达到治疗目的的技术。怎样趋利避害, 既提高安全性, 又能提高有效性和实用性, 将 MSCs 更好地应用于临床, 是我们未来的研究方向。

利益冲突 无

作者贡献声明 牛文惠: 搜集、整理文献资料, 撰写综述; 张金卷: 搜集、整理文献资料; 朱争艳: 对文章内容作批评性审阅, 审校

参 考 文 献

- [1] Zhang Z, Wang FS. Stem cell therapies for liver failure and cirrhosis[J]. J Hepatol, 2013, 59(1): 183-185. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.01.018.
- [2] Noor MT, Manoria P. Immune dysfunction in cirrhosis[J]. J Clin Transl Hepatol, 2017, 5(1): 50-58. DOI: 10.14218/JCTH.2016.00056.
- [3] Dey D, Banerjee M. Inhibitor-based therapeutics for treatment of viral hepatitis[J]. J Clin Transl Hepatol, 2016, 4(3): 248-257.
- [4] Volarevic V, Ljubic B, Stojkovic P, et al. Human stem cell research and regenerative medicine--present and future[J]. Br Med Bull, 2011, 99: 155-168. DOI: 10.1093/bmb/ldr027.
- [5] Volarevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, et al. Concise review: mesenchymal stem cell treatment of the complications of diabetes mellitus[J]. Stem Cells, 2011, 29(1): 5-10. DOI: 10.1002/stem.556.
- [6] Zhang L, Zhao YH, Guan Z, et al. Application potential of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly in liver tissue engineering[J]. Biomed Mater Eng, 2015, 25(1 Suppl): 137-143. DOI: 10.3233/BME-141232.
- [7] 虞琳, 曾维政, 薛红利, 等. 脐带间充质干细胞及其与肝纤维化的相关性 [J]. 中华肝病杂志, 2017, 25(1): 65-68. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.01.019.
- Tuo L, Zeng WZ, Xue HL, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells and their association with liver fibrosis[J]. Chin J Hepatol, 2017, 25(1): 65-68. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2017.01.019.
- [8] 闫俊卿, 韩涛, 朱争艳. 人脐带间充质干细胞生物学特性及向类肝细胞的分化 [J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(15): 1639-1644.
- Yan JQ, Han T, Zhu ZY. Biological characteristics and differentiation into hepatocyte-like cells of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells [J]. World Chin J Dig, 2008, 16 (15): 1639-1644.
- [9] Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Stem Cell Res, 2010, 4(3): 214-222. DOI: 10.1016/j.scr.2009.12.003.
- [10] Lou G, Chen Z, Zheng M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases[J]. Exp Mol Med, 2017, 49(6): e346. DOI: 10.1038/emmm.2017.63.
- [11] Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, et al. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics[J]. Exp Hematol, 2008, 36(9): 1176-1185. DOI: 10.1016/j.exphem.2008.03.019.
- [12] 李晓峰, 赵劲民, 苏伟, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞的培养与鉴定 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(10): 1721-1725. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2011.10.003.
- Li XF, Zhao JM, Su W, et al. Culture and identification of rat

- bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Chin J Clin Rehabil Tiss Engin Res, 2011, 15(10): 1721-1725. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8225.2011.10.003.
- [13] 杨丽, 张荣华, 谢厚杰, 等. 建立大鼠骨髓间充质干细胞稳定分离培养体系与鉴定 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(6): 1064-1068.
- Yang L, Zhang RH, Xie HJ, et al. Establishment of a stable isolation culture system and identification of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Chin J Clin Rehabil Tiss Engin Res, 2009, 13(6): 1064-1068.
- [14] 张君红, 姜海行, 覃山羽, 等. 全骨髓细胞贴壁法分离与培养大鼠骨髓间充质干细胞的多向分化能力 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(36): 6685-6689. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2012.36.007.
- Zhang JH, Jiang HX, Qin SY, et al. Multiple differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells isolated and cultured by whole bone marrow adherence method[J]. Chin J Tiss Engin Res, 2012, 16(36): 6685-6689. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2012.36.007.
- [15] 韩玮, 苏力坦卡扎·仇曼, 何铁英, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞分离培养及鉴定 [J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(9): 1155-1158. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2016.09.019.
- Han W, Sulidankazha Chouman, He TY, et al. Study on separate culture and identification of rat bone marrow mesenchymal stem cells[J]. J Xinjiang Med Univ, 2016, 39(9): 1155-1158. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2016.09.019.
- [16] 付旭锋, 陈冰冰, 严亚萍, 等. 动物模型在间充质干细胞治疗慢性肝病临床前研究的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 102-106. DOI: 10.3969/j.issn.1005.4847.2017.01.019.
- Fu XF, Chen BB, Yan YP, et al. A review on the application of animal models in preclinical research of the treatment of liver diseases with mesenchymal stem cells[J]. Acta Laborat Anim Sci Sinica, 2017, 25(1): 102-106. DOI: 10.3969/j.issn.1005.4847.2017.01.019.
- [17] Akiyama K, Chen C, Wang D, et al. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis[J]. Cell Stem Cell, 2012, 10(5): 544-555. DOI: 10.1016/j.stem.2012.03.007.
- [18] 于双杰, 陈黎明, 吕飒, 等. 人脐带间充质干细胞治疗失代偿性乙型肝炎肝硬化的安全性与疗效 [J]. 中华肝病杂志, 2016, 24(1): 51-55. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2016.01.010.
- Yu SJ, Chen LM, Lyu S, et al. Safety and efficacy of human umbilical cord derived-mesenchymal stem cell transplantation for treating patients with HBV-related decompensated cirrhosis[J]. Chin J Hepatol, 2016, 24(1): 51-55. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2016.01.010.
- [19] Huang P, He Z, Ji S, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors[J]. Nature, 2011, 475(7356): 386-389. DOI: 10.1038/nature10116.
- [20] 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. DOI: 10.5966/scrm.2012-0034.
- [21] 孙琳琳, 朱争艳, 杜智, 等. 脐带间充质干细胞旁分泌物质对暴发性肝衰竭大鼠肝功能及肝细胞增殖的影响 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2011, 17(4): 313-317. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2011.04.014.
- Sun LL, Zhu ZY, Du Z. Effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell paracrine substance on liver function and hepatocytes proliferation in FHF rats[J]. Chin J Hepatobiliary Surg, 2011, 17(4): 313-317. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2011.04.014.
- [22] Yeo RW, Lai RC, Zhang B, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2013, 65(3): 336-3341. DOI: 10.1016/j.addr.2012.07.001.
- [23] Greening DW, Gopal SK, Xu R, et al. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer[J]. Semin Cell Dev Biol, 2015, 40: 72-81. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.02.009.
- [24] Meier RP, Müller YD, Morel P, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence? [J]. Stem Cell Res, 2013, 11(3): 1348-1364. DOI: 10.1016/j.scr.2013.08.011.

(收稿日期: 2017-06-13)

(本文编辑: 朱红梅)