

文章编号: 1001-6325(2023)01-0012-09

成体干细胞基础创新与临床转化

间充质干细胞移植治疗肝脏疾病的研究进展

周嘉航, 陈鉴瑶, 曹红翠*

浙江大学医学院附属第一医院 传染病诊治国家重点实验室 国家感染性疾病临床医学研究中心
感染性疾病诊治协同创新中心, 浙江 杭州 310003

摘要: 肝脏疾病严重危害人类健康,然而目前对于肝硬化和肝衰竭等终末期肝脏疾病的内科治疗方法疗效欠佳。间充质干细胞(MSCs)因其具有多向分化潜能和免疫调节功能,有望在临床上用于治疗各种病因所致的肝硬化、慢加急性肝衰竭、慢性肝衰竭以及肝移植后的并发症等。MSCs可通过直接分化为肝细胞样细胞,间接分泌可溶性因子以产生抗氧化、抗调节性细胞死亡、抗纤维化、抑制炎症反应、抑制免疫反应等作用,从而减轻肝脏损伤和提高生存率。完善的质量标准评价体系和更加深入的机制探索是未来MSCs用于临床治疗肝脏疾病的前提。

关键词: 肝脏疾病;间充质干细胞;临床治疗;作用机制

中图分类号:R575.3 文献标志码:A

DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2023.01.0012

Research progress of mesenchymal stem cells in the treatment of liver disease

ZHOU Jiahang, CHEN Junyao, CAO Hongcui*

State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Clinical Research Centre for Infectious Diseases,
Collaborative Innovation Centre for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital,
Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China

Abstract: Liver disease is a serious threat to human health. However, there is still no effective medical treatment for end-stage liver diseases such as cirrhosis and liver failure. Mesenchymal stem cells (MSCs) are expected to be used clinically for liver cirrhosis caused by various etiologies, acute-on-chronic liver failure, chronic liver failure, and complications post-liver transplantation by their multi-directional differentiation and immunomodulatory abilities. MSCs can directly differentiate into hepatocyte-like cells and indirectly secrete soluble factors to achieve goals such as antioxidant, anti-regulated cell death, anti-fibrosis, inhibiting inflammation, inhibiting immune response, etc., so to reduce liver damage and improve survival rate. A sound quality standard evaluation system and a more in-depth mechanism exploration are the prerequisites for MSCs to be used in the clinical treatment of liver diseases in the future.

Key words: liver disease; mesenchymal stem cells; clinical treatment; mechanism

病毒、酗酒、药物、代谢紊乱和自身免疫攻击均可引发急性、慢性肝损伤,从而导致肝衰竭和肝硬

化,对人类健康构成重大威胁。原位肝移植是治疗肝硬化和肝衰竭确切有效的治疗方法。然而,合适

收稿日期:2022-07-13 修回日期:2022-10-10

基金项目:国家重点研发计划“干细胞及转化研究”专项(2020YFA0113003);国家自然科学基金(81971756)

*通信作者(corresponding author):hccao@zju.edu.cn

的供体器官数量非常有限,迫切需要为肝硬化和肝衰竭患者寻找更有效和可行的治疗方法。

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)因其易获得性、体外培养的稳定性和低免疫原性和多向分化潜能等众多优势在多种细胞治疗中被认为是肝脏疾病最有希望的候选疗法。MSCs 还可以分泌可溶性因子等物质,有利于损伤肝脏的再生和修复。本文拟对 MSCs 在肝脏疾病的临床应用以及在肝脏疾病的动物模型中的作用机制进行综述。

1 间充质干细胞的来源与特性

MSCs 是一种来源于中胚层的多能干细胞,可在体外增殖为具有可塑性的贴壁细胞。国际细胞治疗学会(International Society for Cellular Therapy, ISCT)间充质和组织干细胞委员会给出人源 MSCs 最低定义标准:镜下呈成纤维细胞样,在体外可形成集落,并可分化为骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞,高表达 CD105、CD73 和 CD90,不表达或低表达 CD45、CD34、CD14 或 CD11、CD79a 或 CD19 和 HLA-DR 等表面分子^[1]。

MSCs 于 1995 年首次作为细胞药物在人类受试者中进行临床验证^[2],此后成为全球临床研究最活跃的实验性治疗细胞。在临床试验中, MSCs 已被用于治疗各种组织损伤和免疫相关疾病。对于肝脏疾病,组织损伤的发生和炎性反应的过度激活总是如影随形。因此, MSCs 将是肝脏疾病细胞治疗的最佳候选者。

2 间充质干细胞治疗肝脏疾病的临床研究

MSCs 已被证明在肝脏疾病的临床治疗中发挥有益作用,包括改善肝硬化及其发展而来的慢加急性肝衰竭和慢性肝衰竭,以及减轻肝移植术后的免疫排斥。

2.1 肝硬化

肝硬化是因病毒感染、酒精、药物等一种或多种病因长期或反复作用形成的弥漫性肝纤维化病变。代偿期可无明显症状,失代偿期(即肝衰竭)以肝功能损害和门脉高压为主要表现。肝衰竭是一种以肝细胞大量坏死为特征的严重的临床综合征。在中国,以肝硬化发展而来的慢加急性(亚急性)肝衰竭和慢性肝衰竭为主,其中乙肝病毒(hepatitis B

virus, HBV)感染相关肝衰竭比例最高。

2.1.1 乙型肝炎病毒相关性肝硬化

2.1.1.1 慢加急性肝衰竭:一些慢性乙型肝炎患者可能会迅速发展为慢加急性肝衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF),这是一种严重的、危及生命的疾病^[3]。脐带和骨髓等多种来源的 MSCs 被用于临床治疗 ACLF 研究。

一项 2012 年发表的研究评估了脐带来源的间充质干细胞(umbilical cord-derived MSCs, UC-MSCs)输注对 HBV 相关性 ACLF(HBV-ACLF)患者的安全性和初步疗效。共有 43 例 ACLF 患者参加了这项研究,其中 24 例患者接受了 UC-MSCs 治疗,19 例患者接受了 0.9%氯化钠溶液作为对照。试验期间未观察到明显的不良反应,输注 UC-MSCs 显著提高了 ACLF 患者的存活率,降低了终末期肝病模型(model for end-stage liver disease, MELD)评分,增加了血清白蛋白(albumin, ALB)、胆碱酯酶、凝血酶原活性和血小板数,并且显著降低了血清总胆红素(total bilirubin, TBIL)和丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)。这项研究证明 UC-MSCs 输注在临床上是安全的,可作为 HBV-ACLF 患者的一种新的治疗方法^[4]。

骨髓来源的间充质干细胞(bone marrow-derived MSCs, BM-MSCs)也被用于临床治疗 HBV-ACLF。一项研究纳入 110 例患者,其中 54 例对照组患者仅接受标准药物治疗,56 例实验组患者每周输注异体 BM-MSCs,证实了外周输注异体 BM-MSCs 对 HBV-ACLF 患者安全、方便,并且可通过改善肝功能、降低严重感染发生率从而显著提高 24 周生存率^[5]。

由此可见,临床上使用 MSCs 治疗 HBV-ACLF 是安全的,但由于 ACLF 发病和进展都十分迅速,使得用 MSCs 治疗此病的临床研究开展不够广泛。因此,还需要更多的临床研究来证实 MSCs 的使用对 ACLF 患者生存率的提高。

2.1.1.2 慢性肝衰竭:慢性肝衰竭(chronic liver failure, CLF)是在肝硬化基础上肝功能进行性减退导致的以腹水、门静脉高压、凝血功能障碍和肝性脑病等为主要表现的慢性肝功能失代偿性疾病^[6]。目前临床上已开展了许多关于 MSCs 治疗 CLF 的研究。因其进展缓慢,除了异体 MSCs 输注外,有足够的时间可取患者自体骨髓或脂肪来源的 MSCs 进行

体外培养并回输治疗。

迄今 HBV-CLF 仍是临床治疗的难点。在一项自体 BM-MSCs 治疗乙肝肝衰竭的研究中,53 例患者接受经肝固有动脉单次移植自体 BM-MSCs 移植的成功率为 100%,未出现严重的不良反应或并发症;移植后 2~3 周,移植组患者 ALB、TBIL 及 MELD 评分较对照组明显改善。然而,在 192 周的随访中,两组的肝细胞癌发病率或死亡率没有显著差异。上述结果提示 MSCs 移植治疗肝脏疾病至少短期疗效是显著的^[7]。

另一项类似的研究纳入 39 例患者(移植组 20 例,对照组 19 例),发现自体 BM-MSCs 经肝动脉移植入肝脏中可以改善患者的肝功能。此外,与对照组相比,移植组调节性 T 细胞(regulatory T cell, Treg)显著增加,辅助性 T 细胞 17(T helper cell 17, Th17)显著减少,导致 Treg/Th17 比值增加。这提示 BM-MSCs 产生修复作用的机制与调节 Treg/Th17 细胞平衡有关^[8]。

然而,Mohamadnejad 等进行的临床随机对照试验表明,经外周静脉的自体 BM-MSCs 移植可能对肝硬化患者无益处。此研究共纳入 27 例患者(移植组 15 例,安慰剂组 12 例),在 12 个月的随访中,移植组和安慰剂组的 Child 评分、MELD 评分、ALB、国际标准化比值(INR)、血清转氨酶和肝体积的绝对变化没有显著差异。基于该随机对照试验,有必要对更多患者进行进一步研究,以更好地阐明通过外周静脉或门静脉输注 MSCs 对肝硬化的影响^[9]。

除自体来源的 BM-MSCs 外,同种异体 UC-MSCs 也被用于临床治疗 HBV-CLF。3 项临床研究^[10-12]均证实将 UC-MSCs 经外周静脉输注到 CLF 体内,可以显著提高患者的长期生存率和肝功能,如提高血清 ALB 和降低血清 TBIL 水平,并且未观察到明显的不良反应和并发症。以上提示 UC-MSCs 或许是治疗 CLF 的合适选择。

2.1.2 丙型肝炎病毒相关性肝硬化:目前临床研究多用自体来源的 BM-MSCs 治疗丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)相关肝硬化。Amer 等纳入 20 例终末期肝衰竭患者进行 BM-MSCs 经肝或脾脏内注射移植,结果显示移植组腹水、下肢浮肿、低蛋白血症等均较对照组有显著改善,Child 评分、MELD 评分均有降低;并且肝内组和脾内组之间没有观察到差

异。这一结果证明了自体 BM-MSCs 注射液治疗肝硬化的安全性和短期疗效^[13]。

另一项针对 20 例慢性 HCV 引起的肝纤维化患者的临床试验中,通过脾动脉注射自体 BM-MSCs,临床随访 24 周,结果显示患者肝功能显著提高,起到了逆转肝纤维化进程的目的^[14]。

两项通过静脉输注 BM-MSCs 来治疗肝硬化的临床研究同样证实了外周静脉输注与之前报道的肝内输注同样有效^[15-16]。并且,在粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF)动员后静脉输注 BM-MSCs 可在前 2 周内改善血清 ALB,并在 1 个月后改善凝血酶原浓度和 ALT。这些结果提示联合使用细胞因子可以提高 BM-MSCs 的疗效^[16]。

2.1.3 酒精性肝硬化:一项试点研究关注自体 BM-MSCs 对酒精性肝硬化(alcoholic cirrhosis, AC)疗效^[17],纳入了 12 例患者,通过肝动脉注射两次 BM-MSCs,观察到治疗后组织学改善和纤维化指标的降低。

此课题组在后续的研究中纳入更多的 AC 患者(72 例),并设置对照组、一次及两次经肝动脉注射细胞组,证实了自体 BM-MSCs 移植可安全改善 AC 患者的组织学纤维化和肝功能,以及一次和两次注射组的治疗效果并无明显差异^[18]。这些结果显示自体 BM-MSCs 移植对 AC 患者有较好的疗效。

2.1.4 自身免疫性肝硬化:熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)是一种治疗原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)患者有效的药物;然而,40% PBC 患者对 UDCA 治疗的反应不佳。已有临床研究证实同种异体的 BM-MSCs^[19]和 UC-MSCs^[20]经外周静脉输注到对 UDCA 反应不完全的 PBC 患者体内,没有观察到移植相关的不良反应;并且细胞治疗后大部分患者的乏力、瘙痒等症状明显减轻,肝功能明显改善。

近年来,Liang 等进行的临床试验纳入 26 例自身免疫性疾病(包括 PBC、原发性干燥综合征、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、系统性硬化症)所致肝硬化的患者,通过外周静脉输注 MSCs 进行治疗,其中 23 例患者接受了 UC-MSCs,2 例患者接受了脐带血来源的间充质干细胞(umbilical cord blood-derived MSCs, UCB-MSCs),1 例患者接受了

BM-MSCs。随访半年,肝功能和 MELD 评分均有所改善^[21]。

从以上结果看,无疑需要纳入更多的临床病例以及设置对照组来支持这一结果。

2.1.5 综合比较:同种异体 BM-MSCs 被用于 4 例病因各异 (HBV/HCV/非酒精性/酒精性) 的 ACLF 患者,未表现出输注相关的不良反应,且未观察到存活率的显著提高,但 Child 评分和 MELD 评分显著改善^[22]。

Kantarcioglu 等^[23]和 Kharaziha 等^[24]分别在两项临床研究中多种病因 (如 HBV、HCV、酒精性、自身免疫性、病因不明) 导致的肝硬化患者通过静脉输注自体 BM-MSCs 进行治疗,均证实了 MSCs 治疗的安全性和有效性。

Sakai 等^[25]用新鲜分离的自体 AD-MSCs 对 4 例肝硬化患者 (HBV/HCV/非酒精性) 进行了治疗,随访一年,并未观察到严重的不良事件,并且患者肝功能有所恢复。这项临床研究证明自体 AD-MSCs 用于治疗肝硬化是安全的。

然而目前纳入各种病因所致肝硬化的临床研究多缺乏对照组,并且缺乏对 MSCs 治疗不同病因所致肝硬化的疗效的差异研究。

2.2 肝移植术后并发症

肝移植是目前治疗终末期肝病的唯一有效手段。然而,肝移植术后的并发症如胆道并发症、急性排斥反应和感染等会影响移植效果,严重威胁移植受者的生存。迫切需要一种新颖有效的治疗策略。由于免疫抑制和再生的特性, MSCs 可能是一个有效的治疗方法。

Zhang 等^[26]将同种异体 UC-MSCs 通过外周静脉多次输注到 12 例肝移植后缺血型胆道病变患者体内,与对照组相比,细胞治疗组未观察到明显的 MSCs 相关不良事件,并且治疗组的肝功能和短期存活率都有所提高。此课题组后续将 UC-MSCs 通过静脉输注到 11 例 ABO 血型不合肝移植 ((ABO-incompatible liver transplantation, ABO-iLT) 受者体内,评估在 ABO-iLT 中使用 MSCs 替代利妥昔单抗的安全性和可行性^[27]。在为期两年的随访期间,未观察到严重的 MSCs 相关不良事件;在降低急性排斥发生率方面, MSCs 治疗产生了与利妥昔单抗相当、甚至更好的结果; MSCs 组的胆道并发症和感染率显著

降低。但是,两组患者 2 年存活率无显著差异。这两项研究提示了 MSCs 的短期疗效。

与之类似, Shi 等^[28]也评估了同种异体 UC-MSCs 对治疗急性移植物排斥反应的肝移植患者的安全性和临床可行性。此研究发现在经静脉给予 UC-MSCs 后 4 周, Tregs 百分比和 Treg/Th17 比率显著增加;相比之下, Th17 百分比呈下降趋势;表明 MSCs 可能通过对 T 细胞亚群的免疫抑制来发挥治疗作用。

除 UC-MSCs 外, BM-MSCs 也在临床试验中被用于治疗肝移植患者。在一项临床试验中^[29], 20 例肝移植患者被 1:1 随机分配为细胞治疗组和对照组。细胞治疗组在移植前经静脉接受单次同种异体 BM-MSCs 移植。随访一年,细胞治疗的患者均未出现输注相关并发症;与对照组相比,细胞治疗组循环 Treg 细胞和耐受性 NK 细胞亚群在 CD56^{bright} NK 细胞中的比例比基线略有增加,但移植物功能和存活率并未明显提高。类似地, Detry 等^[30]也将同种异体 BM-MSCs 经静脉单次输注在 10 例肝移植患者体内并随访一年, MSCs 输注后并未出现器官功能的损害,但是总体排斥率或移植物存活率没有差异。

综上,肝移植受者的移植前或后同种异体 BM-MSCs 输注是安全的,但对促进耐受和提高存活率方面并未表现出明显效果。在抑制肝移植后并发症方面,目前临床实验结果显示 UC-MSCs 优于 BM-MSCs, 前者的使用剂量大大高于后者可能是原因之一。未来还需要更多的控制变量的临床试验来得出更可靠的结论。

3 间充质干细胞治疗肝脏疾病的机制

MSCs 除了可直接分化为肝细胞样细胞 (hepatocyte-like cells, HLCs) 外,更重要的是在受损肝脏中分泌各种可溶性因子来达到抗氧化、抗调节性细胞死亡、抗纤维化、抑制炎症反应、抑制免疫反应等作用。

3.1 分化为肝细胞样细胞

MSCs 对 3 个胚层的细胞都有分化潜能。大多数体外研究表明, MSCs 能够在特定生长因子,如肝细胞生长因子、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、成纤维细胞生长因子和制瘤素 M 的

作用下分化成具有肝脏特异性形态和功能的 HLCs^[31-34]。最近,Zhao 等^[35]通过非病毒的 4 个步骤将 AD-MSCs 有效地诱导成 HLCs,使其成功地表达肝细胞标志物、药物代谢酶和转运蛋白;并在后续的研究^[36]中阐明 AD-MSCs 向特定的内胚层分化的调控机制,有助于开发新的策略来提高 MSCs 的分化效率。

此外,一些动物实验也证实了 MSCs 在体内可以分化为 HLCs。Sato 等^[37]首次证明了 MSCs 的体内肝分化。在该研究中,将人 BM-MSCs 直接移植到烯丙醇处理的大鼠肝脏中,第 28 天观察到人 BM-MSCs 分化而来的 HLCs,其表达人特异性标志物如甲胎蛋白、ALB、细胞角蛋白 18 (cytokeratin 18, CK18)、CK19 和去唾液酸糖蛋白受体。Cao 等^[38]证明了人胎盘来源的间充质干细胞(placenta-derived MSCs, PMSCs)不仅可以在体外和体内分化成 HLCs,而且可以延长 D-半乳糖胺(D-galactosamine, D-Gal)诱导的 ALF 中国小型猪的存活时间。

除了骨髓和胎盘,脂肪组织^[39]、脐带^[40]等来源的 MSCs 也可以向肝细胞分化。这些研究结果均表明 MSCs 可以在体内分化为 HLCs。然而,只有一小部分 MSCs(不到肝脏总质量的 3%)经历了肝细胞转分化^[41]。MSCs 衍生的 HLCs 发挥作用不仅需要表达成熟肝细胞的基因,而且表达水平需要达到或接近正常肝细胞;而实际上分化的 MSCs 中缺乏一些肝细胞标志物,如 HepPar1 (hepatocyte paraffin 1) 或肝细胞核因子 4,这意味着它们的分化没有达到成熟肝细胞的水平^[40]。总的来说,MSCs 介导的治疗效果很可能更依赖于其他机制,MSCs 直接分化为 HLCs 这一机制只占极其有限的部分。

3.2 抗氧化

氧化应激是导致肝脏损伤的一个关键因素,其中活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)是公认的有害分子。与 MSCs 共培养的肝细胞内 ROS 减少;硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)诱导的肝损伤小鼠经 MSCs 治疗后表现出改善的氧化参数^[42]。类似地,在治疗四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)诱导的肝损伤小鼠中,MSCs 显著增加超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性并抑制受损肝脏中 ROS 的产生^[43]。这些均证实了 MSCs 可通过抗氧化活性和保肝作用减少肝损伤,显示出治疗肝

脏疾病的潜力。

3.3 抗调节性细胞死亡

在损伤肝脏中,肝细胞已被证明可能以多种形式发生调节性细胞死亡,如凋亡和铁死亡等,以应对氧化应激等压力^[44]。

在 D-Gal 诱导的暴发性肝衰竭大鼠模型中,通过输注 MSCs 条件培养基(MSCs-conditioned medium, MSCs-CM)使凋亡性肝细胞死亡减少了 90%,增殖肝细胞数量增加了 3 倍。提示 MSCs-CM 可通过抑制肝细胞死亡和刺激再生为受伤的肝脏提供营养支持^[45]。

最近,肝细胞铁死亡被证明是 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤中的重要机制。小鼠 BM-MSCs 及其来源的外泌体治疗可下调小鼠肝脏中前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 和脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)的 mRNA 水平,同时恢复溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7, member 11, SLC7A11)的蛋白水平,从而抑制肝细胞铁死亡,减轻小鼠急性肝损伤^[46]。

以上结果表明 MSCs 具有的抗凋亡和抗铁死亡等功能可为 ALF 的治疗提供新的途径。

3.4 抗纤维化

当肝脏受损时,静止的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)转分化为活化的 HSCs,这是肝纤维化形成的主要环节。MSCs 可分泌各种细胞因子抑制 HSCs 活化,从而预防或减少肝纤维化。乳脂球-EGF 因子 8(milk fat globule EGF factor 8, MFGE8)是 MSCs 分泌的一种抗纤维化蛋白,可与 HSCs 上的 avb3 整合素结合来下调转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β) 1 型受体的表达,从而抑制 TGF-β 信号传导并减少小鼠细胞外基质沉积和肝纤维化^[47]。此外,MSCs 释放肿瘤坏死因子 α 刺激基因-6(tumor necrosis factor α stimulated gene 6, TSG-6),可显著下调 HSCs 活化标志物,诱导 HSCs 转化为干细胞样细胞;经 TSG-6 处理的 HSCs 类器官可以修复肝纤维化,表明 TSG-6 直接重编程 HSCs 可能是肝纤维化的有用策略^[48]。Wang 等^[49]的进一步研究证实了 TSG-6 的重要性,并拓展其通过调节 M2 型巨噬细胞和增加基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)12 表达的抗纤维化机制。MSCs 还可通过吡啶胺 2, 3-双加氧酶(in-

doleamine 2,3-dioxygenase, IDO)降低肝脏中 Th17 细胞数量以及血清 IL-17 水平,从而减轻 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化^[50]。

3.5 抑制炎症反应

MSCs 可以通过分泌多种生物活性因子来调节组织免疫反应,从而抑制炎症反应,改善或修复受损肝组织。有研究证明 MSCs 中白细胞介素 1 受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL1Ra)的表达有助于促进巨噬细胞向 M2 表型转换,从而提高血清 IL-10 水平,减少刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A)诱导的小鼠肝损伤^[51]。

MSCs 还被证明可通过前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)的分泌抑制肝巨噬细胞中的 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体活化,诱导其为抑炎巨噬细胞(M2),从而减少炎症细胞因子的产生;此机制不仅在修复小鼠肝脏缺血/再灌注损伤中起着关键作用^[52],并且在减轻 D-Gal/脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠急性肝损伤中扮演重要角色^[53]。除此之外, MSCs 还可通过抑制促炎单核细胞的募集、促进其向抑炎巨噬细胞的分化等来维持肝脏巨噬细胞稳态,从而减轻 CCl₄ 诱导的小鼠急性肝损伤中的炎症反应,提高存活率^[54]。

3.6 抑制免疫反应

T 细胞是导致肝移植后产生免疫排斥的关键细胞,已有大量体外实验证明 MSCs 能够通过产生可溶性因子而对 T 细胞产生抑制作用。干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)诱导 MSCs 产生的 IDO 能催化色氨酸向犬尿氨酸转化。体外研究证明 MSCs 高表达的 IDO 不仅能够在混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte response, MLR)中抑制同种异体 T 细胞反应^[55],并且能够通过诱导活化的 T 细胞凋亡来抑制 T 细胞增殖^[56],从多个方面对 T 细胞产生抑制作用。

此外, MSCs 产生的一氧化氮(nitric oxide, NO)也是抑制 T 细胞的主要介质之一。有研究证明在 MSCs 存在下,NO 参与 Stat5 磷酸化和 T 细胞增殖的抑制^[57]。进一步的研究发现,NO 与趋化因子的协同作用还可诱导 MSCs 对 T 细胞的反应性产生抑制作用,有助于预防小鼠移植物抗宿主病^[58]。

虽然目前缺乏在肝移植动物模型中对上述机制进行的实验验证,但是这些结果为 MSCs 诱导的免疫抑制机制带来了新的见解,并可能有助于开发其临床应用,以控制人类肝移植免疫相关的不良反应。

基于上述研究, MSCs 被认为主要以两种方式表现出积极的治疗效果:直接通过细胞分化和间接通过旁分泌效应。对于肝脏疾病的治疗, MSCs 的旁分泌作用可能起着更重要的作用。然而上述治疗机制不一定同时出现在治疗同一疾病的过程中。根据不同肝脏疾病的基本特征, MSCs 在治疗过程中的作用机制表现有所侧重。例如, MSCs 治疗肝功能衰竭的疗效可能主要取决于其分化成肝细胞样细胞的特性;而在治疗与炎症反应相关的肝病如急性肝损伤时, MSCs 的抗炎、抗氧化和抑制凋亡的功能可能起到更重要的作用;对于肝纤维化, MSCs 对活化 HSCs 命运的影响则更多地体现在参与治疗过程;在治疗与免疫相关的肝病如肝移植并发症时, MSCs 的免疫调节功能可能起到更重要的作用。

4 问题与展望

在治疗 HBV、HCV 或酒精等病因引起的肝硬化、肝衰竭以及肝移植引起的并发症等肝病患者的临床试验中, MSCs 被证实是一种安全且有前景的治疗策略。然而, MSCs 是一类典型的异质性细胞群体,在其治疗的应用中仍然存在一些尚未解决的重要问题。首先,缺乏统一的标准来评估每个试验中 MSCs 的质量,包括体外长期培养细胞的稳定性,需要建立完善的 MSCs 质量标准评价体系。其次,缺乏对 MSCs 治疗最佳注射时机、次数、间隔时间、最佳细胞来源、最少有效细胞数量以及最佳给药途径的相关研究,需要平衡相应的治疗效果以及获得相应剂量 MSCs 所需的时间和经济成本来确定最佳的治疗方案。最后也是最关键的一点是,目前对 MSCs 产生治疗作用的机制了解得不够深入;例如, MSCs 在何种环境下会被激活,通过分泌何种细胞因子达到抗炎、抗氧化、抑制纤维化等效果,哪些信号通路参与其中,不同来源的 MSCs 发挥治疗作用的机制有什么差别等问题,均未得到清晰而全面的阐明。总之,随着上述问题的解决, MSCs 移植作为一种极具潜力的肝病治疗方式有望得到更广泛的临床应用。

参考文献:

- [1] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 726-736.
- [2] Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, *et al.* *Ex vivo* expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use.[J]. *Bone Marrow Transplant*, 1995, 16: 557-564.
- [3] Arroyo V, Moreau R, Kamath PS, *et al.* Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis[J]. *Nat Rev Dis Prim*, 2016, 2: 1-18.
- [4] 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: 725-731.
- [5] Lin BL, Chen JF, Qiu WH, *et al.* Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure: a randomized controlled trial[J]. *Hepatology*, 2017, 66: 209-219.
- [6] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2018 年版)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35: 38-44.
- [7] 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: 820-828.
- [8] Xu L, Gong Y, Wang B, *et al.* Randomized trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for hepatitis B virus cirrhosis: regulation of Treg/Th17 cells[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 29: 1620-1628.
- [9] 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: 1490-1496.
- [10] 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: 112-120.
- [11] Fang X, Liu L, Dong J, *et al.* A study about immunomodulatory effect and efficacy and prognosis of human umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with chronic hepatitis B-induced decompensated liver cirrhosis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2018, 33: 774-780.
- [12] Shi M, Li YY, Xu RN, *et al.* Mesenchymal stem cell therapy in decompensated liver cirrhosis: a long-term follow-up analysis of the randomized controlled clinical trial [J]. *Hepatol Int*, 2021, 15: 1431-1441.
- [13] Amer MEM, El-Sayed SZ, El-Kheir WA, *et al.* Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 23: 936-941.
- [14] Amin MA, Sabry D, Rashed LA, *et al.* Short-term evaluation of autologous transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with cirrhosis: Egyptian study[J]. *Clin Transplant*, 2013, 27: 607-612.
- [15] 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 Reports*, 2012, 8: 972-981.
- [16] Salama H, Zekri ARN, Medhat E, *et al.* Peripheral vein infusion of autologous mesenchymal stem cells in Egyptian HCV-positive patients with end-stage liver disease [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5: 70.
- [17] 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: 33-41.
- [18] Saadatmand S, Vos JR, Hoening MJ, *et al.* Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial[J]. *Hepatology*, 2016, 64: 2185-2197.
- [19] Wang L, Han Q, Chen H, *et al.* Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with UDCA-resistant primary biliary cirrhosis [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23: 2482-2489.
- [20] Wang L, Li J, Liu H, *et al.* A pilot study of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transfusion in patients with primary biliary cirrhosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28: 85-92.

- [21] Liang J, Zhang H, Zhao C, *et al.* Effects of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of liver cirrhosis caused by autoimmune diseases [J]. *Int J Rheum Dis*, 2017, 20: 1219-1226.
- [22] Schacher FC, Martins Pezzi Da Silva A, Silla LMDR, *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells in acute-on-chronic liver failure grades 2 and 3: a phase I-II randomized clinical trial[J]. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2021, 2021: 3662776.
- [23] Kantarcioglu M, Demirci H, Avcu F, *et al.* Efficacy of autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with liver cirrhosis [J]. *Turkish J Gastroenterol*, 2015, 26: 244-250.
- [24] 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: 1199-1205.
- [25] Sakai Y, Takamura M, Seki A, *et al.* Phase I clinical study of liver regenerative therapy for cirrhosis by intrahepatic arterial infusion of freshly isolated autologous adipose tissue-derived stromal/stem (regenerative) cell [J]. *Regen Ther*, 2017, 6: 52-64.
- [26] Zhang YC, Liu W, Fu BS, *et al.* Therapeutic potentials of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells for ischemic-type biliary lesions following liver transplantation [J]. *Cytotherapy*, 2017, 19: 194-199.
- [27] Zhang Y, Zhang J, Yi H, *et al.* A novel MSC-based immune induction strategy for ABO-incompatible liver transplantation: a phase I/II randomized, open-label, controlled trial[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12: 1-15.
- [28] Shi M, Liu Z, Wang Y, *et al.* A pilot study of mesenchymal stem cell therapy for acute liver allograft rejection[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6: 2053-2061.
- [29] Casiraghi F, Perico N, Podestà MA, *et al.* Third-party bone marrow-derived mesenchymal stromal cell infusion before liver transplantation: a randomized controlled trial [J]. *Am J Transplant*, 2021, 21: 2795-2809.
- [30] Detry O, Vandermeulen M, Delbouille MH, *et al.* Infusion of mesenchymal stromal cells after deceased liver transplantation: a phase I-II, open-label, clinical study [J]. *J Hepatol*, 2017, 67: 47-55.
- [31] Alizadeh E, Eslaminejad MRB, Akbarzadeh A, *et al.* Upregulation of miR-122 via trichostatin A treatments in hepatocyte-like cells derived from mesenchymal stem cells [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2016, 87: 296-305.
- [32] Xu F, Liu J, Deng J, *et al.* Rapid and high-efficiency generation of mature functional hepatocyte-like cells from adipose-derived stem cells by a three-step protocol [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2015, 6: 1-10.
- [33] Zhao Q, Ren H, Li X, *et al.* Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells into low immunogenic hepatocyte-like cells[J]. *Cytotherapy*, 2009, 11: 414-426.
- [34] An SY, Han J, Lim HJ, *et al.* Valproic acid promotes differentiation of hepatocyte-like cells from whole human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells [J]. *Tissue Cell*, 2014, 46: 127-135.
- [35] Li H, Zhu L, Chen H, *et al.* Generation of functional hepatocytes from human adipose-derived MYC⁺ KLF4⁺ GMNN⁺ stem cells analyzed by single-cell RNA-seq profiling[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2018, 7: 792-805.
- [36] Li J, Yang Y, Fan J, *et al.* Long noncoding RNA ANCR inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells toward definitive endoderm by facilitating the association of PTBP1 with ID2[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 492.
- [37] 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: 756-763.
- [38] Cao H, Yang J, Yu J, *et al.* Therapeutic potential of transplanted placental mesenchymal stem cells in treating Chinese miniature pigs with acute liver failure [J]. *BMC Med*, 2012, 10: 56.
- [39] Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, *et al.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue *in vitro* promotes hepatic integration *in vivo* [J]. *Gut*, 2009, 58: 570-581.
- [40] 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: 833-848.
- [41] Gentile P, Garcovich S, Bielli A. Human menstrual blood-derived stem cells ameliorate liver fibrosis in mice by targeting hepatic stellate cells via paracrine mediators [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6: 272-284.
- [42] Quintanilha LF, Takami T, Hirose Y, *et al.* Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury *in vitro* and *in vivo* [J]. *Hepatol Res*, 2014, 44: E206-E217.

- [43] Cho K, Woo S, Seoh J, *et al.* Mesenchymal stem cells restore CCl₄-induced liver injury by an antioxidative process [J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36: 1267-1274.
- [44] Tang D, Kang R, Berghe TV, *et al.* The molecular machinery of regulated cell death[J]. *Cell Res*, 2019, 29: 347-364.
- [45] Van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepato-cellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo*[J]. *Hepatology*, 2008, 47: 1634-1643.
- [46] Lin F, Chen W, Zhou J, *et al.* Mesenchymal stem cells protect against ferroptosis via exosome-mediated stabilization of SLC7A11 in acute liver injury[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13: 271.
- [47] An SY, Jang YJ, Lim HJ, *et al.* Milk fat globule-EGF factor 8, secreted by mesenchymal stem cells, protects against liver fibrosis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152: 1174-1186.
- [48] Wang S, Kim J, Lee C, *et al.* Tumor necrosis factor-inducible gene 6 reprograms hepatic stellate cells into stem-like cells, which ameliorates liver damage in mouse[J]. *Biomaterials*, 2019, 219: 119375.
- [49] Wang M, Zhang M, Fu L, *et al.* Liver-targeted delivery of TSG-6 by calcium phosphate nanoparticles for the management of liver fibrosis [J]. *Theranostics*, 2020, 10: 36-49.
- [50] Milosavljevic N, Gazdic M, Simovic Markovic B, *et al.* Mesenchymal stem cells attenuate liver fibrosis by suppressing Th17 cells-an experimental study [J]. *Transpl Int*, 2018, 31: 102-115.
- [51] Lee KC, Lin HC, Huang YH, *et al.* Allo-transplantation of mesenchymal stem cells attenuates hepatic injury through IL1Ra dependent macrophage switch in a mouse model of liver disease[J]. *J Hepatol*, 2015, 63: 1405-1412.
- [52] Li C, Jin Y, Wei S, *et al.* Hippo signaling controls NLR family pyrin domain containing 3 activation and governs immunoregulation of mesenchymal stem cells in mouse liver injury[J]. *Hepatology*, 2019, 70: 1714-1731.
- [53] Wang J, Liu Y, Ding H, *et al.* Mesenchymal stem cell-secreted prostaglandin E2 ameliorates acute liver failure via attenuation of cell death and regulation of macrophage polarization[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12: 1-13.
- [54] Zhou J, Feng X, Zhu J, *et al.* Mesenchymal stem cell treatment restores liver macrophages homeostasis to alleviate mouse acute liver injury revealed by single-cell analysis[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 179: 106229.
- [55] Meisel R, Zibert A, Laryea M, *et al.* Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation[J]. *Blood*, 2004, 103: 4619-4621.
- [56] Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, *et al.* Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells[J]. *Leukemia*, 2005, 19: 1597-1604.
- [57] Sato K, Ozaki K, Oh I, *et al.* Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells[J]. *Blood*, 2007, 109: 228-234.
- [58] Ren G, Zhang L, Zhao X, *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2: 141-150.