

文章编号: 1672-3384(2010)-02-0048-04

干细胞治疗失代偿期肝硬化应注意的问题

【作者】 江学良 权启镇 孙自勤

山东省济南军区总医院消化内科 (济南 250031)

【摘要】 失代偿期肝硬化临床缺乏特异的治疗方案,干细胞研究为肝功能衰竭的治疗提供了新的思路,有望实现肝病细胞治疗的新突破。本文对干细胞治疗失代偿期肝硬化应注意的问题进行阐述,包括选择何种来源的干细胞,怎么样有效获得存活率好的干细胞,用什么途径将干细胞移植到受损的组织器官及临床疗效和应用前景。

【关键词】 肝硬化; 干细胞; 失代偿期

【中图分类号】 R575.2

【文献标识码】 A

失代偿期肝硬化目前临床上缺乏特异的治疗方法,主要是给予放腹水、输蛋白等对症支持治疗。虽然肝脏移植为部分患者带来希望,但由于肝脏供体来源有限,手术复杂,而且移植费用昂贵,移植后需要长期应用抗排斥药物等原因,绝大部分患者都没有条件接受肝移植手术,最后常死于肝功能衰竭等严重并发症。因此,如何改善终末期肝病患者肝功能成为临床研究难点和重点。近年来,干细胞研究为肝功能衰竭患者的治疗提供了新的思路,有报道骨髓和脐带血干细胞在体内外可以分化为功能完备的肝细胞^[1],干细胞替代成熟肝细胞治疗肝病^[2],有望使细胞治疗在肝病应用方面取得突破。

但是选择什么样来源的干细胞,怎么样有效获得存活率好的干细胞,用什么途径将干细胞移植到受损的组织器官,是临床上需要探索的问题。

1 干细胞治疗失代偿期肝硬化要解决的问题

干细胞治疗失代偿期肝硬化是指医生可以用结构和功能正常的细胞作为“药物”输给患者,以修复受损硬化的肝组织,改善肝功能,达到改善病人一般状况的目的,起到临床治疗疾病作用。

2 治疗失代偿期肝硬化选择何种来源干细胞

骨髓、脐带血、外周血干细胞都可以选择。骨髓可以采集于患者自体,也可采取异体捐赠方式。脐带血可以采取捐赠方式获得。骨髓、脐带血、外周血干细胞比较见表1。

表1 脐带血、骨髓、外周血干细胞的比较

	CFV-GM 集落数量	培养集落 出现时间	集落构 成特点	对CSF反 应敏感性(%)	CD34 ⁺ CD38 ⁻ (%)
脐带血	48±6	4~5d	单核巨 噬细胞 为主	中度敏感 57±16	24±7.3
骨髓	112±4	4~6d	粒单混合	中度敏感 9.6±7.8	4.6±3.2
外周血	12±2	7d以上	嗜酸性 粒细胞 为主	9.0±4.9	9.1±4

注:CFV-GM:粒细胞-巨噬细胞集落形成单位;CSF:集落刺激因子

表1可以看出:骨髓中的干细胞比外周血的干细胞更为原始;脐带血比骨髓更为原始。脐带血的干细胞自我增殖能力最强,繁殖速度最快,骨髓次之,外周血最差。脐带血中干细胞的比率最大,骨髓次之,外周血最低。外周血中的干细胞更接近终端细胞或叫祖细胞或前体细胞。因此,如果条件允许,首选用脐带血干细胞。

3 干细胞治疗肝硬化是否需要做人类白细胞抗原配型

异体骨髓移植必须做人类白细胞抗原(HLA)配型。异体骨髓做局部细胞治疗时,是否需要HLA配型报道不一。脐带血干细胞在进行移植时,必须做HLA配型。HLA半相合移植成功率远高于骨髓。因为:①脐带血干细胞比骨髓更原始;②脐带血干细胞表面抗原性远比骨髓弱。脐带血干细胞

在用做细胞治疗时可以忽略 HLA 配型问题,就如同临床上输血一样,不用 HLA 配型。原因:①脐带血干细胞的表面抗原性很弱,弱到可不被受体的免疫系统识别。②用于细胞治疗的脐带血干细胞不替代原有的组织器官,原有的组织器官还在起作用。

4 分离提取干细胞的方法选择

获取纯度高,存活率良好的干细胞/祖细胞是治疗是否关键。

《骨髓、脐带血有核细胞体外分离试剂盒》是专门用于临床分离骨髓和脐带血中有核细胞的,其重要成分是由蛋白酶和无机盐离子组成,是一种新型而简便的富集高纯度干细胞的方法,是世界上分离、纯化干细胞最优化的方法之一。其原理是以蛋白酶选择性地与非靶细胞结合,使非靶细胞表面活性发生变化,细胞密度发生了变化,通过密度梯度离心的方法分离获得所需的靶细胞,由于是负筛

选,所以收集的靶细胞没有任何标记。一个试剂盒设计分离 200mL 骨髓或 200mL 脐带血,能有效全部除去红细胞、血小板、及去全部血浆物质, LIN 抗体阴性,只回收有核细胞,分离纯化后的有核细胞回收率 85% 以上,细胞存活率 98% 以上,不损伤干细胞,干细胞表面无任何标记物,能完整地保持干细胞原有的生物学活性。常用干细胞提取方法比较见表 2:

目前市场上有几种分离提取干细胞的方法,经过筛选我们选择负收集混合法,同时可以分离纯化骨髓和脐带血的“骨髓、脐带血干细胞/祖细胞体外分离试剂盒”。该试剂盒的设计适合临床的需求:干细胞/祖细胞的回收率 $\geq 85\%$;分离提取的干细胞/祖细胞存活率 $\geq 96\%$;分离、纯化过程能有效保留全部种类的干细胞/祖细胞。试剂盒能有效除去全部的红细胞、血小板、血浆物质,能除去绝大部分成熟的白细胞、淋巴细胞。不需要采购大型的设备,

表 2 常用的各种干细胞各种分离提取方法比较

分离原理	靶细胞表面标记物	收集靶细胞种类	血浆残留	分选对象	细胞体积	细胞回收率	细胞存活率	投资成本	每分离一份标本的成本	
负收集混合法	选择性地除去红细胞、血小板、全部的血浆物质、成熟的白细胞、淋巴细胞。保留 Lin-细胞	无	能收集所有 Lin-干细胞/祖细胞	无	骨髓、脐带血、外周血	几个立方毫米	$\geq 85\%$	$\geq 98\%$	≤ 10 万元	15000 元左右
流式细胞仪法	除去所有未标记的细胞	有	选择性的收集 CD34、CD133、C-Kit、Sca-1 等	有	骨髓、脐带血、外周血	5~10mL	依据抗体含量决定,抗体含量足,回收率可达到 99%	$\leq 90\%$ 万元	机器 ≥ 60	一种抗体至少 7000 元,一个病人 5 万~10 万元
磁珠法	除去所有未标记的细胞	有	选择性的收集 CD34、CD133、C-Kit、Sca-1 等	有	骨髓、脐带血、外周血	5~10mL	依据抗体含量决定,抗体含量足,回收率可达到 99%	$\leq 95\%$ 万元	仪器 ≥ 10	一种抗体至少 7000 元,一个病人 5 万~10 万元
外周血细胞分选仪法	除去大部分红细胞、血小板	无	保留了所有的白细胞、淋巴细胞、干细胞、祖细胞,还残留一些红细胞	有	外周血	50~100mL	$\leq 70\%$	$\geq 98\%$	机器 ≥ 50 万元	3000 元左右
Ficoll 法(淋巴细胞分离液)	除去密度 ≥ 1.077 的有形成分	无	只能保留体积和重量相当的单个核细胞,其他的干细胞全部丢失	无	骨髓、脐带血、外周血	几个立方毫米	$\leq 50\%$	$\geq 75\%$	≤ 10 万元	1000 元左右

投资少见效快。分离提取出的干细胞/祖细胞的总数能满足临床的治疗要求,200mL骨髓可获得的细胞总数一般在 $(0.5 \sim 5.0) \times 10^9$,200mL脐带血可获得的细胞总数一般在 $(0.2 \sim 2.0) \times 10^9$ 。

5 干细胞治疗失代偿期肝硬化的途径选择

干细胞的治疗途径有门静脉、肝内、股动脉、脾内、外周静脉、腹腔等,各种治疗途径都有优缺点。

5.1 门静脉移植途径

从理论上讲,肝脏本身是干细胞治疗的最佳器官之一,因为门静脉内含高浓度的嗜肝细胞因子和局部生长因子,并且肝内微循环和门脉血中的营养成分对干细胞生长发育有益。多个门静脉内输注的研究显示,干细胞可在不改变器官微结构的情况下与受体肝实质相融合^[3-5]。而且干细胞直径小,移植入肝后不会引起栓塞等并发症,因此,门静脉是经常使用的移植途径。但在肝硬化门脉高压的患者,由于门静脉压力升高,出现逆肝血流,注入门静脉的干细胞可以随侧支循环分散到食管胃底等其他部位。而且此种方法具有出血倾向,故临床上受到患者凝血机制的限制。

5.2 肝内移植途径

肝内注射也可以作为干细胞治疗的途径之一^[6]。但是此种方法也具有出血倾向,故临床上受到患者凝血机制的限制。

5.3 股动脉移植途径

姚鹏等^[7]已经将骨髓干细胞移植应用于临床,用自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化30例。在X线透视下,经股动脉插管至肝固有动脉,将分离好的骨髓干细胞注入肝内,移植后大多数患者临床症状有明显改善,多数患者谷丙转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)逐渐降低,清蛋白(ALB)、凝血酶原活动度(PTA)逐渐升高。在30例移植患者中未发现严重不良反应及并发症。近年来介入技术的开展,为干细胞动脉移植提供了便利条件,而且此种方法具有创伤小、操作简单等优点,故首

先应用于临床。

5.4 脾内移植途径

有人认为,外源干细胞移植于坏死的肝内不易存活,所以,对于外源干细胞参与肝损伤修复的研究多将干细胞移植于脾内。脾内移植也可认为是骨髓干细胞移植的途径之一。脾内肝细胞移植为效果比较确切的方法,但是移植于脾内的干细胞多呈结节状生长,而且对肝功能恢复的确切效果有限。

5.5 外周静脉移植途径

由于外周静脉移植细胞,要经过全身血液循环后才可能到达肝脏,这样是否会影响到达肝脏定居分化的细胞数量?国内外众多学者都已证明,经尾静脉移植的骨髓干细胞可以定居肝脏并分化成肝细胞^[9-14],但这种分化的肝细胞是否能起到治疗肝病的作用,仍没有定论。

5.6 腹腔移植途径

技术简单,移植的细胞数量大,营养和代谢产物交换面积大,但植入的异种肝细胞炎症反应和细菌感染的可能性也较大,易引起腹膜炎和腹腔粘连。鉴于成熟肝细胞腹腔移植的经验,腹腔移植也可能是干细胞移植的途径之一^[15]。

因为干细胞定向分化为肝细胞的研究涉及到干细胞分化的重要机制^[16-17],又与今后可能的临床应用密切相关,近年对此方面的研究成为热点。同时,众多学者也期望为终末期肝病的治疗寻找一个经济易行的方法。但是对于干细胞科学,其临床应用中仍有许多尚未解决的问题。尽管许多文献报道骨髓干细胞可以分化为肝细胞,但是其分化率报道不一,而且这种分化在没有肝损伤存在的条件下是否能够发生,仍然未得到解决。只有当一定数量的移植细胞定居到肝脏并在肝脏增生时,才能替代病变肝组织的功能,移植的部位不同是否会影响到移植细胞的归巢和治疗效果仍在探讨之中。张刚庆等^[18]比较了门静脉和尾静脉两条途径移植骨

髓间充质(MSC)细胞在肝脏的定居情况,结果发现,所移植的MSC定居于肝脏和是否分化为正常肝细胞和卵圆细胞与其移植途径无明显关系,与肝脏是否受损伤相关,优先定居于受损伤的靶器官,与移植途径和移植后的时间无明显关系。但其具体机制,仍待进一步研究。

目前,国内应用自体骨髓干细胞治疗重症肝炎肝硬化病例已经超过2000例,主要经肝动脉途径治疗,我们应用异基因脐带血干细胞治疗失代偿期肝硬化40例,临床效果显著,近期疗效(0~4周)可缓解症状,如减轻纳差乏力症状,改善精神等;中期疗效(4~12周)可改善肝脏功能(升白蛋白,改善凝血功能,胆红素),减轻腹水;远期疗效(12周后)有的患者肝脏容积增大,肝裂缩小。显示脐带血干细胞治疗肝炎肝硬化将有着广阔的应用前景,值得进一步研究观察和总结。

【参考文献】

- [1] Jang YY, Collector MI, Baylin SB, et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(6): 532-539.
- [2] 安伟德, 胡祥, 曹亮, 等. 骨髓间充质干细胞定向分化肝细胞及肝内移植研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(8): 917-919.
- [3] Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 288(1): 156-164.
- [4] Avital I, Feraresso C, Aoki T, et al. Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection[J]. *Surgery*, 2002, 132(2): 384-390.
- [5] 王平, 王建华, 颜志平, 等. 大鼠骨髓基质细胞分离培养和经门静脉途径移植的初步研究[J]. *中华放射学杂志*, 2004, 38(2): 129-132.
- [6] 吴理茂, 李连达, 刘红, 等. 自体骨髓干细胞移植与归元方联用治疗急性肝损伤实验研究[J]. *中国工程科学*, 2004, 6(1): 34-44.
- [7] 姚鹏, 王帅, 胡大荣, 等. 肝动脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化30例[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(13): 1639-1640.
- [8] 蔡云峰, 陈积圣, 闵军, 等. 骨髓源性肝干细胞定向分化及脾内移植研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(5): 551-553.
- [9] Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, et al. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(2): 565-574.
- [10] Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, et al. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo[J]. *Hepatology*, 2002, 35(4): 799-804.
- [11] Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(Suppl 1): S1850-S1853.
- [12] 周播江, 钟翠平, 顾云娣, 等. 肝再生大鼠血清诱导骨髓干细胞向肝细胞分化的实验研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(12): 730-733.
- [13] Wang X, Ge S, McNamara G, et al. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells[J]. *Blood*, 2003, 101(10): 4201-4208.
- [14] Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo[J]. *Nat Med*, 2000, 6(11): 1229-1234.
- [15] Gao J, Dennis JE, Muzic RF, et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*, 2001, 169(1): 12-20.
- [16] Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion[J]. *Nature*, 2003, 422(6934): 901-904.
- [17] Dahlke MH, Popp FC, Larsen S, et al. Stem cell therapy of the liver-fusion or fiction[J]. *Liver Transpl*, 2004, 10(4): 471-479.
- [18] 张刚庆, 方驰华, 颜政. 同种异体MSC移植在大鼠肝内定居的病理检测[J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(10): 1198-1201.

勘误 2010年第1期16页中的“沙利度胺对胎儿发育影响,仅用于妊娠及有可能受孕的妇女”,应为:沙利度胺对胎儿发育有影响,禁用于妊娠及有可能受孕的妇女,特此更正。