

间充质干细胞治疗肝病的研究进展

魏玉华(综述),施宝民(审校)

同济大学附属同济医院普外科,上海 200065

[摘要] 各种急慢性肝病严重危害人类健康,但目前对于多种肝病治疗仍缺乏有效方法。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是多能干细胞,具有多向分化的潜能,其来源广泛,异体移植免疫原性较低,被广泛应用于多种临床疾病治疗,其有效性已得到证实。现今,MSCs也被运用于肝病治疗的研究,而且已经取得了一定的成果。但MSCs治疗肝病的具体作用机制还不明确,如何提高其治疗效果以及治疗效率等问题,还有待解决。现作一综述,总结MSCs治疗肝病的研究进展,并探讨未来MSCs的应用前景。

[关键词] 肝病; 间充质干细胞; 机制; 外泌体

[中图分类号] R575 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-378X(2020)02-0105-05

doi: 10.3969/j.issn.2095-378X.2020.02.010

Advances on treatment of liver diseases using mesenchymal stem cells

WEI Yuhua, SHI Baomin

Department of General Surgery, Tongji Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200065, China

[Abstract] Various acute and chronic liver diseases seriously affect human health, but there is still a lack of effective treatment methods. Mesenchymal stem cells (MSCs) are pluripotent stem cells with the potential for multidirectional differentiation. They come from a wide range of sources and have low immunogenicity in allotransplantation. They are widely used in the treatment of a variety of clinical diseases and have been proved effective. Nowadays, MSCs have also been used in the studies about the treatment of liver diseases, and some achievements have been made. However, the specific mechanism of MSCs in the treatment of diseases is still unclear, and how to improve its treatment effect and efficiency need to be solved. This review summarized the research advances on MSCs in the treatment of liver diseases, and discussed the application prospect of MSCs in the future.

[Key words] Liver diseases; Mesenchymal stem cells; Mechanism; Exosome

肝病早期往往发生纤维化,如果不及时治疗或控制,随着肝纤维化程度的进一步加重,最终可能发展为肝硬化,甚至转化为肝癌^[1]。我国的肝细胞癌发病率位列所有肿瘤的第2位,且发病率仍呈现上升趋势^[2]。肝病肝纤维化形成的主要包括肝炎病毒、酒精、自身免疫等,这些病因都会引起正常肝细胞的凋亡和肝星状细胞(HSCs)的激活,造成肝内细胞外基质(ECM)的过度积累和肝结构的破坏^[3]。近些年,对于肝病肝纤维化的治疗,仍没有特别有效

的方法,对于已发展为终末期肝病的患者,目前最有效的治疗手段是肝移植,但是供体器官短缺,免疫排斥以及费用较高等问题,限制了肝移植治疗^[4]。因此,进一步研究治疗肝病的有效方法,意义重大。

目前,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)治疗肝病被认为是一种很有效的治疗策略,其优点是具有持续的自我更新、增殖、多能分化和免疫调节活性,而且其抗原性低,可以进行同种异体MSCs移植^[5-7]。许多研究已经开始阐明可能的机制,包括向肝细胞样细胞的转化、调节免疫功能以及分泌外泌体等。

[作者简介] 魏玉华(1992—),男,博士在读,从事临床外科工作

[通信作者] 施宝民,电子信箱:baominsh@163.com

1 MSCs的来源及特性

MSCs最初由骨髓中鉴定和分离出来的,在体内和体外都可以分化成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞等。MSCs广泛分布于体内组织,具有持续的自我更新和多向分化的能力^[8]。现在,研究发现多种组织中都可以分离出MSCs,包括滑膜、脂肪组织、脐带血、羊水和胎盘等都可以作为MSCs的提取来源^[8]。国际细胞治疗学会提出了一套界定MSCs的最低标准^[9]:(1)可塑性黏附;(2)一套特定的细胞表面标记物(CD73,CD90,CD105),同时缺乏CD14、CD34、CD45和人白细胞抗原DR;(3)体外分化为脂肪细胞、软骨细胞和成骨细胞的能力。

有研究提出, MSCs传统黏附单层培养系统具有许多限制,为了提高MSCs培养的质量和效率^[10]。利用传统的二维(2D)单层培养方案进行MSCs的培养,不能模拟体内原生的细胞微环境,这可能导致MSCs表型的改变、归巢和迁移能力的损伤。所以,他们在探索3D培养体系,将人脐带源性间充质干细胞(hUC-MSCs),置于猪来源的脱细胞真皮基质的三维培养系统中培养,观察到hUC-MSCs在3D系统培养时,其表达的Toll样受体(Toll-like receptor, TLRs)和趋化因子受体4型(CXCR 4)等因子发生变化。而且与2D培养相比,在3D培养中CD105阳性细胞百分比显著降低,CD34⁺和CD271阳性细胞显著增加。TLR2、TLR3、TLR4、TLR6和CXCR4的mRNA和蛋白表达水平显著增加。近年来,有研究^[11]发现,在低氧环境培养出的MSCs(hypo-MSCs)比在正常氧环境下培养出的MSCs(nor-MSCs)具有更强的治疗作用,主要体现在以下几个方面。(1)hypo MSCs产生更多的前列腺E合酶(PGES);(2)产生较多miR-210,减少肝星状细胞和肝细胞的凋亡;(3)能产生前列腺素E2,激活抗炎巨噬细胞;(4)具有降低氧化应激的作用。

MSCs具有很强的自我更新能力,是较为理想的细胞移植来源,在组织工程和再生医学方面的治疗具有巨大潜能。MSCs可以分化成内胚层细胞以及大多数中胚层和外胚层细胞^[12]。MSCs还表现出抗炎、抗氧化、血管生成和抗纤维化作用,然而MSCs的功能分化由许多因子决定,包括趋化因子、细胞因子、生长因子和外泌体等。有研究证明,由成年小鼠的不同器官和组织中产生的MSCs都具有类似

于骨髓来源MSCs的形态、生长特性及免疫表型^[13]。但在众多的MSCs的来源中,人脐带源性间充质干细胞(hUC-MSC)是最理想的来源^[14]。因为hUC-MSCs不仅具有骨髓间充质干细胞的共同属性,而且具有更稳定的生物学特性、相对容易获得、来源丰富以及无伦理问题等优点,hUC-MSCs成为了目前研究的焦点。

2 MSCs治疗肝病的效果

近年来,有很多研究者将MSCs用于肝病的治疗,包括基础实验和临床研究,其治疗的有效性及其安全性逐渐被证明^[5,15-20]。Sang等^[5]对包括717名肝硬化患者的14项试验,进行了meta分析,其中研究证明了MSCs联合传统药物治疗组与单用传统药物治疗组相比, MSCs联合传统药物有更好的治疗效果,肝功能明显改善,体现在总胆红素、丙氨酸转氨酶、凝血酶原时间等指标明显降低,而血清白蛋白、胆碱酯酶、凝血酶原活性等明显升高。Liang等^[7]进行临床试验,包括肝硬化患者26例。通过外周静脉移植同种异体MSCs,其中移植脐带MSCs 23例,脐血MSCs 2例,骨髓MSCs 1例。随访6个月后,总胆红素和凝血酶原时间均值下降;血清白蛋白水平有所升高;在6个月后,进行终末期肝病(MELD)评分也有所改善。Fang等^[19]进行的临床试验表明,对失代偿期肝硬化患者,经静脉移植注射骨髓MSCs后,患者的血清白蛋白,总胆红素以及凝血酶原时间都得到了明显改善。MSCs组患者治疗后的Child-Pugh评分也明显优于对照组,而且MSCs组的死亡率要低于对照组。有临床试验对MSCs治疗乙肝相关肝病的效果进行研究,110名乙肝相关ACLF患者被纳入这项开放标签、非盲随机对照研究^[20]。对照组($n=554$)仅采用标准药物治疗(SMT);实验组($n=556$)输注异基因骨髓间充质干细胞4周,观察24周。MSCs组的累积生存率为73.2%;SMT组为55.6%。在随访的第5~24周,输注MSCs患者没有与输液相关的副作用,但与SMT患者相比,发热更为频繁。两组试验患者均未发生肿瘤。与对照组相比,异基因骨髓间充质干细胞治疗显著改善了血清总胆红素和终末期肝病评分模型等临床实验室指标。而且MSCs组多器官衰竭和严重感染的死亡率低于SMT组(17.9%对37.0%)。这些研究都证明了外周静脉行同种异体MSCs移植治疗肝病的有效性。

3 MSCs治疗肝病的作用机制

3.1 MSCs诱导分化为肝细胞样细胞

MSCs移植注射到体内后,分化为肝细胞样细胞(HLCs),可能是MSCs移植治疗肝病的机制之一^[21]。有研究发现,使用CCl₄建立大鼠肝纤维化和肝硬化模型,然后输注人源性hUC-MSCs后,观察小鼠肝纤维化的相关指标,检测产物发现,小鼠体内出现人源性ALB、AFP、CK18和CK19,但未检测到鼠源性ALB、AFP、CK18和CK19^[22]。说明hUC-MSCs可以在小鼠体内转化为具有肝细胞功能的细胞,MSCs可被诱导分化为HLCs。而且,MSCs可以在体外被诱导培养产生iPSCs,iPSCs再被诱导分化产生HLCs,且由MSCs诱导分化的iPSCs端粒酶活性较高、有更强的免疫调节能力及对炎症细胞因子敏感性更低^[21]。由iPSCs分化产生的肝细胞与人体肝组织细胞相似性极高,体外培养的MSCs可以被诱导培养产生多能干细胞(iPSCs),然后,iPSCs再分化为HLCs。所以,MSCs可作为HLCs理想的细胞来源^[23]。虽然,通过MSCs诱导分化产生的HLCs,具有一定的肝细胞相关功能和生物活性,但有研究认为其表达水平要低于原肝细胞的表达水平。所以,在考虑用HLCs替代全肝细胞功能时应慎重^[23]。

3.2 MSCs的免疫调节作用

MSCs具有免疫调节特性,通过多种途径调节机体免疫反应^[25]。Yousefifard等^[26]认为,MSCs是通过充当“转导细胞”来影响各种“效应细胞”,例如T细胞、B细胞和巨噬细胞。MSCs可以分泌多种生物活性分子,包括多种细胞因子、HGF和IL-10。IL-10是免疫调节细胞因子,具有抑制血清中炎症细胞因子的功能,包括IL-6、TNF-1、干扰素- γ 等,可以改善肝硬化大鼠的肝组织中淋巴细胞增殖,可促进肝脏修复,抑制肝硬化的发生。在注射MSCs后,失代偿期肝硬化患者的外周血中Treg细胞、TGF β 和IL-10水平明显升高,而血清IL-6、TNF- α 和CD8⁺T细胞水平显著下降^[19]。MSCs可以通过上调TGF-1和Treg细胞,显著降低小鼠外周血中的CD4⁺T和CD8⁺T细胞。Luo等^[27]研究采用静脉移植骨髓MSCs,发现移植后,肝组织中F4/80⁺、CD206⁺活化的M2巨噬细胞和基质金属蛋白酶13(MMP13)表达明显增加,而F4/80⁺、iNOS⁺活化的M1巨噬细胞表达明显受到抑制。IL-10基因表达升高,IL-12 β 、IFN- γ 、TNF- α 和IL-6基因表达降低。BM-MSC条件培养基处理的JS1细胞(肝星状细胞株的TGF- β 1)和胶

原-1分泌减少,caspase-3分泌增加。而且,骨髓间充质干细胞能有效抑制肝内与肝纤维化呈正相关的 α -SMA、天狼星红和胶原-1的表达。这说明骨髓MSCs移植可促进表达MMP13的M2巨噬细胞活化,抑制M1巨噬细胞进一步抑制肝星状细胞(HSCs),有效减轻肝纤维化。

最近,Wang等^[28]研究认为TSG-6是MSCs的主要抗纤维化细胞因子。MSCs表达产生的肿瘤坏死因子(TNF)刺激基因6(TSG-6)。在动物实验中,外源性单用TSG-6就可减轻肝纤维化,而TSG-6被敲除的MSCs(Lv-TSG-6mscs)则无抗纤维化作用。而且实验进一步的研究证实了TSG-6可以通过调节M2巨噬细胞和增加基质金属蛋白酶12(MMP12)的表达来抗纤维化。他们发现TSG-6、MMP12和促炎细胞因子(TNF- α 、IL-6和IL-1 β)之间存在一个反馈环,可能有助于进一步了解肝硬化的加重过程,以及TSG-6和MSCs的抗纤维化机制。

3.3 MSCs衍生的外泌体

MSCs衍生的外泌体也被认为是促进肝细胞增殖、维持肝细胞功能的主要作用机制之一^[29]。最近,MSCs的外泌体对肝纤维化的治疗作用引起人们的重视^[30]。MSCs外泌体还有一定的优势,外泌体比其母细胞小,易于生产和储存,膜表面蛋白含量较低,其免疫原性也低于其母细胞,特别是,不存在肿瘤形成的风险^[31]。因此,MSCs产生的外泌体,有望成为替代MSCs细胞移植的治疗方法,作为一种新型的无细胞治疗手段^[32]。

MSCs的旁分泌功能是通过分泌可溶性因子和释放细胞外小泡(EVs)来发挥的,主要含外泌体(Exosome)。外泌体主要由miRNA、mRNA、蛋白质和脂质等构成,可以从分泌细胞转移到靶细胞发挥作用^[33-34]。miRNA是构成外泌体含量的重要部分,也是外泌体发挥生物学功能的关键。外泌体的主要功能是作为载体将miRNA转移到受体细胞。外泌体作为载体,通过转移生物活性分子来介导细胞间的沟通,其含有的miRNA具有特定的基因序列,可以调控靶细胞的表达^[35]。所以,外泌体对于细胞与细胞间的通讯至关重要。YIN等^[14]研究证明了通过MSCs衍生的外泌体,治疗不同疾病的有效性,包括缺血性心脏病,肝纤维化和脑血管疾病。有研究^[31]认为,输注MSCs产生的外泌体有利于促进肝损伤修复,改善肝功能。所以,他们认为MSCs分泌的具有生物活性的细胞因子才是促进肝细胞修复的主要原因。

4 问题与展望

MSCs 体外培养分化诱导后再移植到体内对治疗肝病的有效性已得到证实,但仍存在一些问题,如 MSCs 直接注射或在肝脏中植入的长期有效性、干细胞恶性转化的潜在风险^[36]以及体内治疗的效率和能力等。以前,大部分研究都集中在体外培养 MSCs,再将 MSCs 移植到动物模型或者肝病患者体内,随后评估肝功能指标的变化用于证明 MSCs 治疗肝病作用。但近来,有研究^[33,37]证明,损伤部位的功能改善与 MSCs 细胞植入或分化之间缺乏相关性。MSCs 主要作用机制不是细胞本身到达受损肝脏组织,而是通过其分泌的外泌体,转移到靶细胞,维持细胞内稳态,增强组织修复功能^[38]。

综上, MSCs 是一种非常有前景的治疗肝病的方法,而且其有效性已经得到证实。但其安全性、具体作用机制还不明确,以及如何提高其治疗效果和治疗效率等问题还有待解决。

参考文献

- [1] Couri T, Pillai A. Goals and targets for personalized therapy for HCC [J]. *Hepatol Int*, 2019, 13(2): 125-37.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] Ferguson S W, Wang J, Lee C J, et al. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: a systems view [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1419.
- [4] Bernal W. Acute liver failure: review and update [J]. *Int Anesthesiol Clin*, 2017, 55(2): 92-106.
- [5] Sang W, Lu B, Li K, et al. Therapeutic efficacy and safety of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for liver cirrhosis in Chinese population: a meta-analysis [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2018, 42(3): 193-204.
- [6] Willis G R, Fernandez-gonzalez A, Anastas J, et al. Mesenchymal stromal cell exosomes ameliorate experimental bronchopulmonary dysplasia and restore lung function through macrophage immunomodulation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018, 197(1): 104-116.
- [7] 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(9): 1219-26.
- [8] Golpanian S, Wdf A, Hatzistergos K E, et al. Rebuilding the damaged heart: mesenchymal stem cells, cell-based therapy, and engineered heart tissue [J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(3): 1127-68.
- [9] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytherapy*, 2006, 8(4): 315-317.
- [10] Zhou P, Liu Z, Li X, et al. Migration ability and Toll-like receptor expression of human mesenchymal stem cells improves significantly after three-dimensional culture [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(2): 323.
- [11] Kojima Y, Tsuchiya A, Ogawa M, et al. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions had a greater therapeutic effect on mice with liver cirrhosis compared to those cultured under normal oxygen conditions [J]. *Regen Ther*, 2019, 20(11): 269-281.
- [12] Jiang H, Wang H, Liu T, et al. Co-cultured the MSCs and cardiomyocytes can promote the growth of cardiomyocytes [J]. *Cytotechnology*, 2018, 70(2): 793-806.
- [13] Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(13): 2345-2360.
- [14] Yin F, Wang W Y, Jiang W H. Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate liver fibrosis *in vitro* and *in vivo*: From biological characteristics to therapeutic mechanisms [J]. *World J Stem Cells*, 2019, 11(8): 548-564.
- [15] Tsuchiya A, Takeuchi S, Watanabe T, et al. Mesenchymal stem cell therapies for liver cirrhosis: MSCs as "conducting cells" for improvement of liver fibrosis and regeneration [J]. *Inflamm Regen*, 2019, 9(39): 18.
- [16] Lanthier N, Lin-marq N, Rubbia-brandt L, et al. Autologous bone marrow-derived cell transplantation in decompensated alcoholic liver disease: what is the impact on liver histology and gene expression patterns? [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 18: 8(1): 88.
- [17] Qi X, Guo X, Su C. Clinical Outcomes of the transplantation of stem cells from various human tissue sources in the management of liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2015, 10(2): 166-180.
- [18] Alfai M, Zom Y W, Newsome P N, et al. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(6): 1272-1285.
- [19] 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(4): 774-780.
- [20] Lin B L, Chen J F, Qiu W H, 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(1): 209-219.
- [21] Zhou X, Cui L, Zhou X, et al. Induction of hepatocyte-like cells from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by defined microRNAs [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(5): 881-93.
- [22] Zhang G Z, Sun H C, Zheng L B, et al. *In vivo* hepatic differentiation potential of human umbilical cord-derived

- mesenchymal stem cells: Therapeutic effect on liver fibrosis/cirrhosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(46): 8152-68.
- [23] Sangiamsuntorn K, Hongeng S, Wongkajornsilp A. Development of hepatocyte-like cell derived from human induced pluripotent stem cell as a host for clinically isolated hepatitis C virus [J]. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2017, 14(42):1-4.
- [24] Ewida S F, Abdou A G, El-rasoul Elhosary A A, et al. Hepatocyte-like versus mesenchymal stem cells in CCl₄-induced liver fibrosis [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2017, 25(10):736-745.
- [25] 万思哲, 朱莹. 间充质干细胞对肝纤维化进展的调控机制 [J]. *生命科学*, 2019, 31(10):1054-1059.
- [26] Yousefifard M, Nasirinezhad F, Shardi Manaheji H, et al. Human bone marrow-derived and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for alleviating neuropathic pain in a spinal cord injury model [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2016, 7(1):36.
- [27] Luo X Y, Meng X J, Cao D C, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stromal cells attenuates liver fibrosis in mice by regulating macrophage subtypes [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1):16.
- [28] 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(1):36-49.
- [29] Jeong D, Han C, Kang I, et al. Effect of concentrated fibroblast-conditioned media on *in vitro* maintenance of rat primary hepatocyte [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):1-14.
- [30] Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani M H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1):63.
- [31] 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):346.
- [32] Phinney D G, Pittenger M F. Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy [J]. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 2017, 35(4):851-858.
- [33] Lai R C, Yeo R W, Lim S K. Mesenchymal stem cell exosomes [J]. *Semin Cell Dev Biol*. 2015, 40:82-88.
- [34] Zhou X, Cui L, Zhou X, et al. Induction of hepatocyte-like cells from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by defined microRNAs [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(5):881-893.
- [35] Zhang S, Chuah S J, Lai R C, et al. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity [J]. *Biomaterials*, 2018, 15(6):16-27.
- [36] 肖帅, 施宝民. 干细胞诱导分化为肝细胞调控机制研究进展 [J]. *外科研究与新技术*, 2017(3):47-50+55.
- [37] Fiore E J, Dominguez L M, Bayo J, et al. Taking advantage of the potential of mesenchymal stromal cells in liver regeneration: cells and extracellular vesicles as therapeutic strategies [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(23): 2427-2440.
- [38] Wu P, Zahng B, Shi H, et al. MSC-exosome: a novel cell-free therapy for cutaneous regeneration [J]. *Cytherapy*, 2018, 20(3):291-301.

(收稿日期:2020-03-02)