

脐带血干细胞治疗肝硬化失代偿期疗效观察

乔飞¹, 张馨¹, 盛云峰¹, 耿家宝¹, 陈小军², 钟晶², 赵颖², 隋云华¹, 何长伦¹, 高蕾¹, 汪茂荣¹ (1. 解放军第81医院 全军肝病中心, 南京 210002; 2. 解放军第81医院 放射科, 南京 210002)

摘要: 目的 观察脐带血干细胞治疗肝硬化失代偿期患者的临床疗效。方法 肝硬化失代偿期患者16例, Child-Pugh分级均为B或C级。无菌采集正常分娩或剖宫产胎儿脐带血, 分离干细胞, 经肝动脉介入将干细胞悬液定植入肝脏。分别观察干细胞治疗前及治疗后2、4、12周患者临床症状、腹水、血液生化指标、凝血相关因素、甲胎蛋白等变化, 测量肝脏体积改变并完成12周随访。结果 经脐带血干细胞治疗后12周, 患者乏力、纳差、腹胀等症状明显改善, 14例患者腹水消失(87.5%), 所有患者下肢浮肿消失。术后12周白蛋白合成明显增加, 白蛋白水平由术前29.8 g/L升至36.2 g/L, 增幅达6.4 g/L ($P < 0.01$); 前白蛋白(PA)水平由72.46 mg/L升至107.11 mg/L, 增幅达34.65 mg/L ($P < 0.01$); 凝血酶原活动度(PTA)由46.4%升至53.26% ($P < 0.01$)。所有患者均未发现与治疗相关的严重不良反应及并发症。有11例患者治疗12周后, 肝脏体积有所增加(69.0%), 平均增加幅度为9.7%。结论 脐带血干细胞治疗晚期肝硬化失代偿期, 可明显改善临床症状, 促进腹水消退, 提高肝脏合成白蛋白和前白蛋白能力, 显著改善凝血功能。

关键词: 脐带血; 干细胞, 治疗; 肝硬化

Therapeutic effect of umbilical blood stem cell transplantation on patients with decompensated liver cirrhosis

QIAO Fei¹, ZHANG Xin¹, SHENG Yun-feng¹, GENG Jia-bao¹, CHEN Xiao-jun², ZHONG Jing², ZHAO Ying², SUI Yun-hua¹, HE Chang-lun¹, GAO Lei¹, WANG Mao-rong¹ (1. Liver Disease Center of PLA, The 81 Hospital of PLA, Nanjing 210002, China; 2. Department of Radiology, The 81 Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical therapeutic effect of umbilical blood stem cell transplantation on patients with decompensated liver cirrhosis. **Methods** Total of 16 patients with decompensated liver cirrhosis treated with umbilical stem cells were Child-Pugh class B or C. The therapeutic stem cells were collected and isolated from the umbilical blood of fetal delivered by normal or uterine-incision woman. The isolated stem cells were transplanted into the liver via hepatic artery. The manifestation, ascites, biochemical test, prothrombin function and AFP were observed before and after treatment for 2,4,12 weeks. The volume of liver by MRI were measured and also 12 weeks' follow-up visit were finished. **Results** After 12 weeks of stem cells treatment, the clinical symptoms improved obviously. The refractory ascites disappeared in 14 cases (87.5%); the edema of lower extremity disappeared in all patients. The albumin level were elevated from 29.8 g/L to 36.2 g/L, the amplification reached 6.4 g/L ($P < 0.01$), and pre-albumin were elevated from 72.46 mg/L to 107.11 mg/L, the amplification reached 34.65 mg/L ($P < 0.01$). The prothrombin time activity (PTA) increased from 46.4 % to 53.26% ($P < 0.01$). The serious adverse effects were not observed in all patients. The liver volume detected by MRI enlarged in 11 of 16 patients (69%), the average amplification reached 9.7%. **Conclusions** Umbilical blood stem cell therapy was effective in the symptoms improvement, ascites clearance, the liver synthetic potency of albumin and pre-albumin and prothrombin function improvement on patients with decompensated liver cirrhosis.

Key words: Cord blood; Stem cells, therapy; Liver cirrhosis

原位肝移植(orthotopic liver transplantation, OLT)是终末期肝病最理想的治疗选择,但由于供体肝脏紧缺,移植后免疫排斥反应以及高额的医疗费用等因素限制了其临床应用。近年来,全球掀起了干细胞的研究热潮,为某些疾病的治疗提供了新思路 and 手段。动物研究中,干细胞治疗肝功能损伤已有较多的报道并取得肯定的疗效,临床上也有较多研究证实干细胞可以改善患者某些肝脏功能。干细胞治疗作为一种新的治疗方法,已经越来越受关注,并呈现巨大的应用前景^[1-3]。本研究采用肝动脉插管注入脐带血干细胞治疗肝硬化失代偿期患者,以探讨该治疗的疗效和安全性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2010年5月至2011年1月本院行干细胞治疗的乙型肝炎肝硬化失代偿期患者16例,并完成12周的随访。16例患者包括男性14例,女性2例,年龄28~69岁,平均48岁。疾病诊断均符合2009年《慢性乙型肝炎防治指南》标准,Child-Pugh分级为B或C级。所有患者均为反复使用利尿剂及静脉输注人血白蛋白支持治疗3个月以上且腹水未完全消退者,治疗前均使用核苷类似物(NAs)抗病毒治疗4周以上且HBV DNA全部低于检测下限。患者行干细胞治疗前已签署知情同意书。患者治疗前多有乏力、纳差、腹胀等症状,腹部超声或MRI检查证实有肝硬化及腹水。治疗前检测生化指标、电解质、凝血功能、AFP、肝纤维化指标、超声测定门脉宽度、门脉流速、脾脏大小、MRI测定肝脏体积等。术后常规给予抗病毒、保肝降酶、利尿及营养支持等治疗。

1.2 方法

1.2.1 脐血干细胞采集和分离制备 脐血干细胞来自本院健康分娩的孕妇,分娩前常规检查HBV、HCV、HIV等病原学检查,签署知情同意书。操作严格按照脐血采集标准和要求进行,每

次采集脐带血60~150 ml,采用负压收集法分离提取干细胞。使用沈阳赛欧“骨髓血、脐带血有核细胞处理试剂盒”,按照使用说明书步骤分离、提取脐带血单个核细胞,2%台盼蓝染色、计数,判断细胞存活率。细胞存活率大于95%,计数大于 1.0×10^9 个的干细胞用生理盐水10 ml悬浮,干细胞悬液冰水浴保存,用于干细胞治疗。

1.2.2 肝动脉介入干细胞定位植入 经皮穿刺股动脉,置入导管入肝总动脉造影,了解肝动脉解剖并排除肝内占位性病变,进一步插管于肝固有动脉左支,脉冲法缓慢灌注已分离好的脐血干细胞悬液5 ml,将导管退出肝固有动脉左支,剩余的5 ml干细胞悬液缓慢注入全肝。

1.3 疗效观察 术后2、4、12周常规观察患者症状、体征、实验室指标及影像学检查,包括乏力、纳差、黄疸、腹胀、尿量及腹水消失情况,肝肾功能、凝血功能、腹部超声及肝脏MRI测量体积大小。术后视情况应用护肝药物、HGF、抗感染、止血等对症支持治疗,尽量减少或不用人血白蛋白治疗,出院后停用白蛋白治疗。

1.4 统计学处理 应用SPSS 13.0软件进行统计,数据经检验均符合正态分布,治疗前后疗效数据采用 t 检验,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 干细胞治疗对肝硬化患者生化指标的影响 干细胞治疗后2周,白蛋白开始升高,4周达到顶峰,较治疗前明显升高,增幅达8.2 g/L (27.5%), $P < 0.01$ 。12周时仍能维持在36 g/L左右。前白蛋白(PA)水平亦有明显改善,几乎与白蛋白同步升高,4周时增幅达79.7%, $P < 0.01$ 。TBil、ALT、GGT、AKP、肾功能、电解质等指标在干细胞治疗前后无明显变化, $P > 0.05$,见表1。

2.2 治疗前后凝血相关指标的改善 凝血酶原时

表1 干细胞治疗对患者生化指标的影响

	TBil ($\mu\text{mol/L}$)	ALT (U/L)	ALB (g/L)	PA (mg/L)	AKP (U/L)	CR ($\mu\text{mol/L}$)
治疗前	27.16 \pm 18.25	37.00 \pm 31.86	29.80 \pm 4.10	72.46 \pm 52.63	107.68 \pm 46.95	159.22 \pm 292.34
治疗后2周	25.45 \pm 17.59	26.43 \pm 11.70	33.60 \pm 6.23 ^b	96.28 \pm 56.25	107.55 \pm 38.55	175.20 \pm 359.43
治疗后4周	28.63 \pm 17.55	40.00 \pm 20.33	38.00 \pm 6.53 ^b	130.27 \pm 100.65 ^a	117.63 \pm 45.72	165.30 \pm 338.16
治疗后12周	27.04 \pm 20.88	35.00 \pm 13.33	36.20 \pm 5.62 ^b	107.11 \pm 74.04 ^b	106.72 \pm 51.30	153.00 \pm 328.41

注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

间(PT)在治疗后2周有所缩短,但差异无统计学意义。治疗后4周PT则较治疗前明显缩短($P < 0.05$),而治疗后12周,PT降幅达7.6%($P < 0.01$);凝血酶原活动度在治疗后2周开始升高,随时间延长呈进行性升高,治疗后12周较治疗前上升14.8%($P < 0.01$);治疗前后血小板计数无明显变化,见表2。

2.3 腹水、肝脏血流动力学及体积变化情况 干细胞治疗后12周,超声检查结果显示有14例患者腹水消失,2例患者较治疗前明显减少,腹水消失率87.5%,治疗前后门静脉宽度及门静脉流速无明显变化;MRI测定肝脏体积结果显示有11例(69%)患者肝脏体积有所增加,平均增幅为9.7%。所有患者治疗前后肝脏体积差异无统计学意义, $P = 0.075$,见表3。

2.4 临床症状及体征的变化情况 干细胞治疗后4周,所有患者下肢浮肿症状消失,14例患者食欲改善明显、体力好转、腹水消失,占87.5%。16例患者中,有1例患者治疗前反复发生肝性脑病,治疗后随访12周,未再发生肝性脑病。

2.5 干细胞治疗前后白蛋白使用量的变化 所有患者在治疗前需反复大量补充白蛋白,血清白蛋白水平仍未维持在32 g/L以上。干细胞治疗后,白蛋白水平迅速上升,治疗后2周,少数患者白蛋白用量为每次10 g,每周1~2次。2周后基本不需使用白蛋白。仅1例患者在治疗前每月需使用白蛋白

150~250 g,但治疗后用量明显下降,第9~12周仍需使用白蛋白,但仅需30 g即能使白蛋白水平维持在32 g/L以上。

2.6 不良反应 经干细胞治疗后,所有患者未发生严重不良反应及并发症,且均在治疗后10~14天出院,仅1例治疗后出现低热,体温在37.5℃左右,24小时内未经处理自行缓解。

3 讨论

本文通过采集分离正常分娩胎儿脐带血干细胞,经股动脉穿刺插管介入肝固有动脉注入脐带血干细胞治疗晚期肝硬化失代偿期患者16例,并完成12周的随访。结果表明,脐带血干细胞治疗可明显改善乏力、纳差等症状,对双下肢水肿、肝性脑病有明显改善。治疗后12周,患者白蛋白水平明显提高、凝血功能明显改善,有效率达100%。治疗后4周,白蛋白水平增幅达27.5%,PA水平亦有明显提高,腹水消失率达87.5%。治疗后12周,11例患者肝脏体积有所增加,占69%。特别是患者治疗后白蛋白的产生明显增加,大大减少了外源性白蛋白的补充。虽然干细胞治疗给患者带来了较大的治疗成本,但白蛋白使用的减少,使患者后续的治疗费用大大降低。因此,本项治疗在未明显增加患者总治疗费用的情况下,显著提高了肝硬化失代偿期患者的疗效。

肝硬化失代偿期是肝病的终末期阶段,平均存活时间仅为5~7年。如何提高肝硬化失代偿期

表 2 干细胞治疗对凝血相关指标的影响

	PT (s)	PTA (%)	纤维蛋白原 (g/L)	PLT ($10^9/L$)
治疗前	15.16 ± 2.22	46.40 ± 15.50	1.82 ± 1.34	65.43 ± 38.63
治疗后2周	15.12 ± 2.91	49.30 ± 16.49 ^a	1.90 ± 1.02	66.43 ± 40.32
治疗后4周	14.60 ± 2.64 ^a	50.79 ± 15.67 ^a	2.14 ± 1.31	68.54 ± 44.26
治疗后12周	14.00 ± 1.71 ^b	53.26 ± 12.74 ^b	2.01 ± 1.41	60.56 ± 35.24

注: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

表 3 干细胞治疗前后超声检查及MR测肝体积变化

	腹水深度 (cm)	门静脉宽度 (cm)	门静脉流速 (m/s)	肝脏体积 (mm^3)	脾脏厚度 (cm)
治疗前	2.94 ± 2.29	1.29 ± 0.16	0.16 ± 0.01	916427.50 ± 254564.50	5.08 ± 0.85
治疗后12周	1.09 ± 0.48 ^a	1.33 ± 0.17	0.16 ± 0.01	956163.00 ± 246644.60 ^b	5.15 ± 0.88

注: ^a $P < 0.05$; ^b $P = 0.075$

的治疗效果是目前研究的热点问题。肝移植是治疗终末期肝病最有效的方法,但由于器官供体缺乏、价格昂贵、并发症及移植后排斥反应多等因素,临床尚未广泛应用。

干细胞是一类具有自我更新和分化能力的细胞,在一定环境下可分化为多种功能细胞。近年来,干细胞治疗在很多领域显示出较好的疗效,如血液病、糖尿病、神经系统疾病等。干细胞移植治疗终末期肝病的尝试亦越来越受到重视,研究表明,干细胞分化成的肝细胞样细胞,具有正常肝细胞功能,如分泌尿素和白蛋白等,干细胞治疗可以促进肝细胞的再生、抑制肝纤维组织的形成,使其可能成为治疗终末期肝病的一种新手段^[3]。目前,干细胞治疗肝硬化取得疗效的机制尚未完全清楚。动物实验表明,脐带血干细胞在一定条件下,可以分化成肝细胞或肝样细胞。人脐血间充质干细胞移植到SD鼠的肝脏内,1周后发现这些干细胞能整合到SD鼠的肝脏组织,并可检出人源性的白蛋白^[4]。Lee等^[5]报道,脐带间充质干细胞通过体外诱导后输注体内,可随血液循环植入肝脏增殖分化成肝细胞,从而改善肝功能。亦有研究表明,移植的干细胞可整合到受体肝板并分化为成熟的肝细胞^[6]。在肝损伤环境中,脐带间充质干细胞可以分泌不同水平的细胞因子相互影响,表现出抗纤维化、抗感染反应及免疫调节的作用^[7,8]。

目前文献报道用于临床治疗肝硬化的干细胞,主要为自体骨髓干细胞和脐带血干细胞^[2,3,9]。国内刘晓天、曹葆强等^[10,11]经肝动脉或门静脉进行骨髓干细胞治疗肝硬化均获得了一定的疗效。本院亦进行了部分自体骨髓干细胞治疗晚期肝硬化获得类似的治疗效果(另文报道)。但自体骨髓干细胞治疗需要采集自体骨髓,操作时间长、采

集过程存在一定的困难和风险、患者有较大顾虑及痛苦。脐带血干细胞采集比较容易,时间比较短,免除患者骨髓穿刺的痛苦,因而患者接受性较好。由于脐带血干细胞的免疫原性极低,几乎不产生免疫反应,因此脐带血干细胞治疗的不良反应发生率很低。本研究中,除1例患者出现轻度发热外,其余未发生不良反应,再次证明脐带血干细胞治疗具有较高的安全性。

参考文献

- [1] 闰俊卿, 韩涛, 朱争艳. 脐血间充质干细胞向肝细胞分化的研究进展[J]. 武警医学院学报, 2008, 17: 250-252.
- [2] 王方, 张小岗, 张静, 等. 自体骨髓干细胞治疗失代偿期肝硬化患者50例疗效观察[J]. 实用肝脏病杂志, 2010, 13: 272-274.
- [3] Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Gastroenterology, 2008, 134: 2111-2121.
- [4] Beerheide W, Mach M, Ringel C, et al. Downregulation of microglial-ulin in human cord blood somatic stem cells after transplantation into livers of SCID-mice: an escape mechanism of stem cells[J]. Bio Biophys Res, 2002, 294: 1052-1063.
- [5] Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. Hepatology, 2004, 40: 1275-1284.
- [6] Wang P, Wang JH, Yan ZP, et al. Isolation, culture and intraportal transplantation of rat marrow stromal cell[J]. Clin J Radiol, 2004, 38: 129-132.
- [7] 杨光忠, 陈文明. 间充质干细胞的免疫调节功能[J]. 中国全科医学, 2009, 12: 1547-1549, 1557.
- [8] 陈国忠, 姜海行, 陆正峰, 等. 骨髓间充质干细胞共培养对肝星状细胞增殖、凋亡和RohA表达的调控[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18: 1643-1649.
- [9] 张丽欣, 邢利和, 张丽丽, 等. 脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的临床效果研究[J]. 中国全科医学, 2010, 13: 2680-2682.
- [10] 刘晓天, 崔玲时, 利平. 自体骨髓干细胞移植多支血管介入治疗肝硬化的临床研究[J]. 中国医疗前沿, 2010, 5: 25-26.
- [11] 曹葆强, 林继宗, 钟跃思, 等. 自体骨髓细胞经门静脉移植治疗肝硬化与肝功能不全的临床研究[J]. 中华普通外科杂志, 2007, 22: 386-389.

收稿日期: 2011-02-12