

粒细胞集落刺激因子治疗失代偿期肝硬化的机制及疗效研究

邢同京 徐洪涛 戚建春 沈美龙 李浩 叶军 张立新

【摘要】 目的 探讨应用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员治疗失代偿期肝硬化的疗效及其机制。**方法** 采用流式细胞术和酶联免疫吸附法,对不同慢性HBV感染者外周血中造血干细胞及其受体的表达和干细胞迁移相关细胞因子的水平进行检测;对应用G-CSF动员治疗前后患者造血干细胞受体的表达以及肝功能变化进行动态观察。**结果** 与正常对照组比较,乙型肝炎肝硬化患者的CD34⁺细胞比例明显升高,差异有统计学意义[(0.21±0.09)% vs. (0.30±0.13)%; $F=5.45, P=0.006$];慢性乙型肝炎患者和乙型肝炎肝硬化患者基质细胞衍生因子1 α (SDF-1 α)、干细胞因子(SCF)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达水平明显升高($F=13.65, P=0.001$; $F=23.28, P=0.000$; $F=18.98, P=0.000$)。与治疗前比较,G-CSF动员治疗后患者的CD34⁺干细胞比例明显增加[(0.31±0.14)% vs. (0.95±0.46)%, (0.81±0.37)%; $F=20.33, P=0.000$];治疗后患者外周血中SCF及MMP-9的表达水平明显升高($F=4.52, P=0.015$; $F=3.85, P=0.027$)。治疗组与对照组比较,治疗前后TBil、ALB以及PT的变化水平差异均无统计学意义,两组患者的治愈好转率也无明显差异。**结论** 乙型肝炎肝硬化患者存在基础水平的造血干细胞动员,可能与肝脏损伤的修复有关;G-CSF可通过调控干细胞动员相关因子的表达水平,促进肝硬化患者的造血干细胞动员;G-CSF动员治疗对改善乙型肝炎肝硬化患者的生化指标及短期预后无明显效果。

【关键词】 肝功能衰竭; 粒细胞集落刺激因子; 造血干细胞

Mechanism and efficacy of mobilization of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of decompensated liver cirrhosis XING Tong-jing, XU Hong-tao, XIAN Jian-chun, SHEN Mei-long, LI Hao, YE Jun, ZHANG Li-xin. Department of Infectious Diseases, Taizhou People's Hospital, Taizhou 225300, China
Corresponding author: XING Tong-jing, Email: xingtj518@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the efficacy of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilization in the treatment of decompensated liver cirrhosis and the mechanism of its action. **Methods** The proportions of cluster-of-differentiation (CD)-34⁺ cells and their receptor-CXCR4, were detected by flow cytometry in patients with different types of chronic HBV infection. The levels of chemokines and cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** The proportion of CD34⁺ cells in patients with cirrhosis was significantly increased compared with the healthy controls [(0.30±0.13)% vs. (0.21±0.09)%, $P<0.05$]. The expression levels of SDF-1 α , SCF, and MMP-9 were significantly elevated in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis ($P<0.01$). The proportion of CD34⁺ cells in patients with cirrhosis was increased obviously after treatment by G-CSF mobilization ($P<0.01$). The expression levels of SCF and MMP-9 were significantly elevated in the peripheral blood of patients with liver cirrhosis after treatment with G-CSF ($P<0.05$). No significant differences were found in the levels of total bilirubin, albumin, and prothrombin time between the treated and control groups; Furthermore, no significant differences were observed in the cure and improvement rates between the two groups. **Conclusions** (1) The basal levels of stem cell mobilization in patients with liver cirrhosis might be associated with the repair of liver injury. (2) G-CSF could promote hematopoietic stem cell mobilization through the regulation of the expression level of stem-cell-mobilization-related factors in patients with liver decompensated cirrhosis. (3) No apparent effects of G-CSF therapy on both liver function and short-term prognosis in patients with liver cirrhosis were confirmed.

【Key words】 Liver failure; Granulocyte colony-stimulating factor; Hematopoietic stem cells

供了新的手段^[2]。粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)是一种造血干细胞的有效动员剂,动物实验和临床研究均发现 G-CSF 可通过动员造血干细胞促进肝脏严重损伤后的肝细胞再生,改善肝功能^[3-4],但其机制目前尚不清楚。为此,本研究采用流式细胞术和酶联免疫吸附法,对不同类型慢性 HBV 感染者外周血中造血干细胞受体的表达以及造血干细胞迁移相关细胞因子进行检测,同时应用 G-CSF 动员治疗 21 例失代偿期乙型肝炎肝硬化患者,对治疗前后造血干细胞受体表达以及肝功能变化进行动态观察,探讨 G-CSF 动员治疗慢性肝衰竭的疗效及其机制。

资料和方法

一、病例来源

收集 2009 年 1 月至 2011 年 6 月我院慢性 HBV 感染者 72 例,其中慢性乙型肝炎 28 例,男:女比例为 20:8,平均年龄(38.1 ± 11.6)岁;乙型肝炎肝硬化(失代偿)患者 44 例,男:女比例为 35:9,平均年龄(48.0 ± 9.1)岁;其中应用 G-CSF 动员治疗患者 21 例,对照组乙型肝炎肝硬化(失代偿)患者 23 例,两组基线资料见表 1,诊断标准按 2005 年中国慢性乙型肝炎防治指南^[5]。排除标准:(1)合并上消化道大出血者;(2)合并Ⅲ度及以上肝性脑病者;(3)合并严重感染者;(4)合并肝肾综合征者;(5)合并恶性肿瘤者;(6)合并其他器官的严重疾病者。正常对照组 26 例,来源于我院健康体检者,男:女为 15:11,平均年龄(35.8 ± 7.2)岁。所有患者均签订知情同意书。

二、治疗方案

所有肝硬化患者均接受常规治疗,治疗组患者在常规治疗基础上加用 G-CSF(瑞白,齐鲁制药有限公司)5 μg/kg,皮下注射,1 次/d,连续 5 d。治疗组患者在干细胞动员前均查白细胞计数和分类。用药前、用药后 3 d、7 d 分别采集抗凝血 5 ml,分离血浆, -70 °C 保存备用。

三、疗效评价

分别观察治疗后 6 个月 TBil、ALB 及 PT 指标的变化情况;临床预后:随访 6 个月时患者临床症状减轻或

消失,生化指标改善为治愈好转,反之则为无效(死亡);不良反应。

四、流式细胞仪检测

取抗凝血 100 μl,用红细胞凝集素去除红细胞,之后加入抗 CD34-PE(美国 Invitrogen 公司)和 CXCR4-APC(美国 eBioscience 公司)各 20 μl,室温下孵育 30 min,应用美国 BD 公司流式细胞仪进行检测,分析 CD34 和 CXCR4 双阳性细胞占 CD34⁺细胞的百分比(图 1),CD34⁺细胞检测按照 ISHAGE 方法进行^[6]。

五、外周血血浆中细胞因子的检测

不同人群外周血血浆中基质细胞衍生因子 1α(SDF-1α)、干细胞因子(SCF)以及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)分子的表达水平,采用酶联免疫吸附方法测定,按试剂盒(美国 RD 公司)说明书进行操作。

六、统计学分析

结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用两样本均数 *t* 检验,多组间比较应用方差分析并 SNK-*q* 检验,方差不齐采用非参数检验(Kruskal-Wallis *H* 检验),计数资料采用 χ^2 检验。偏态资料以中位数(四分位数间距)表示,采用 Mann-Whitney *U* 检验。应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同类型慢性 HBV 感染者 CD34⁺细胞及其受体 CXCR4 的表达(图 2,3):与正常对照组比较,乙型肝炎肝硬化患者的 CD34⁺细胞比例明显升高,差异有统计学意义[(0.21 ± 0.09)% vs. (0.30 ± 0.13)%; *F* = 5.45, *P* = 0.006],慢性乙型肝炎[(0.22 ± 0.10)%]患者的 CD34⁺细胞数量无明显差异;与正常对照组比较,慢性乙型肝炎与乙型肝炎肝硬化患者 CXCR4 的表达水平均无明显差异[(42.33 ± 17.06)%, (37.57 ± 16.73)%, (32.00 ± 15.76)%; *F* = 2.48, *P* = 0.091]。

2. 不同类型慢性 HBV 感染者外周血中干细胞迁移相关细胞因子的表达(表 2):与正常对照组比较,慢性乙型肝炎患者和乙型肝炎肝硬化患者外周血中 SDF-1α、SCF、MMP-9 的表达水平均明显升高,差异有统计学意义(*F* = 13.65, *P* = 0.001; *F* = 14.09, *P* = 0.000;

表 1 治疗组和对照组患者的基线资料

组别	性别 (男/女)	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	TBil[μmol/L, 中位数 (四分位数间距)]	ALB (g/L, $\bar{x} \pm s$)	PT (s, $\bar{x} \pm s$)	HBV DNA (log ₁₀ copies/ml, $\bar{x} \pm s$)	抗病毒治疗 (例)	WBC (×10 ⁹ /L, $\bar{x} \pm s$)
治疗组	16/5	48.19 ± 8.64	46.30(49.75)	28.04 ± 3.19	18.46 ± 3.50	4.87 ± 1.44	15	3.98 ± 1.02
对照组	19/4	47.86 ± 9.74	48.90(36.90)	27.40 ± 3.89	17.74 ± 2.32	5.05 ± 1.28	17	4.27 ± 1.13
<i>z</i> / <i>t</i> / χ^2 值	0.28	0.12	0.15	0.59	0.82	0.45	0.03	0.89
<i>P</i> 值	0.60	0.91	0.88	0.56	0.42	0.65	0.85	0.41

$F = 18.98, P = 0.000$); 而慢性乙型肝炎患者与乙型肝炎肝硬化患者比较无统计学差异。

表2 不同类型慢性HBV感染者外周血中细胞因子的表达水平

组别	例数	SDF-1 α (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)	SCF [pg/ml, 中位数 (四分位数间距)]	MMP-9 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)
正常对照组	26	2235.37 \pm 879.85	232.24 (224.37)	20.91 \pm 4.02
慢性乙型肝炎组	28	3668.01 \pm 1633.21	639.80 (367.02)	28.10 \pm 6.82
乙型肝炎肝硬化组	44	3077.19 \pm 1470.34	545.64 (340.22)	26.60 \pm 4.78
<i>z/F</i> 值		13.65	23.28	18.98
<i>P</i> 值		0.001	0.000	0.000

3. G-CSF 动员前后失代偿肝硬化患者 CD34⁺ 细胞数量及 CXCR4 的表达(图4,5): 与治疗前比较, 动员后患者的 CD34⁺ 干细胞比例明显增加, 差异有统计学意义 [(0.31 \pm 0.14)% vs. (0.95 \pm 0.46)% , 0.81 \pm 0.37% ; $F = 20.33, P = 0.000$]; 而 CXCR4 的表达水平略增高, 差异无统计学意义 [(32.97 \pm 15.54)% vs. (36.54 \pm 17.07)% , (35.66 \pm 15.03)% ; $F = 0.287, P = 0.751$]。

4. G-CSF 治疗前后肝硬化患者外周血细胞因子的表达(表3): 与治疗前比较, 治疗后患者外周血中 SCF、MMP-9 的表达水平明显升高, 差异有统计学意义 ($F = 3.78, P = 0.028$; $F = 3.85, P = 0.027$); 而 SDF-1 α 的表达水平无统计学差异。

表3 治疗组患者治疗前后外周血中细胞因子表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SDF-1 α (pg/ml)	SCF (pg/ml)	MMP-9 (ng/ml)
治疗前	21	3238.12 \pm 1542.33	535.25 \pm 233.59	27.09 \pm 5.03
治疗后3 d	21	3194.68 \pm 1093.31	467.20 \pm 229.51	30.97 \pm 8.51
治疗后7 d	21	3653.80 \pm 1369.25	705.81 \pm 321.29	33.65 \pm 8.96
<i>F</i> 值		0.743	4.52	3.85
<i>P</i> 值		0.480	0.015	0.027

5. 两组肝硬化患者治疗6个月治愈好转率的比较: 应用G-CSF治疗失代偿肝硬化患者21例, 随访6个月, 其中无效或死亡5例, 其治愈好转率为76.2%; 对照组23例患者, 无效或死亡6例, 其治愈好转率为73.9%。两组比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.03, P = 0.86$)。

6. 两组肝硬化患者治疗前后主要生化指标的比较: 对治疗组失代偿肝硬化患者, 随访6个月, 治愈好转16例; 对照组23例患者中治愈好转17例。与治疗

前比较, 16例治愈好转患者的 TBil、PT 水平明显下降, ALB 水平明显升高, 差异均有统计学意义 ($t = 3.98, P = 0.000$; $t = 5.93, P = 0.000$; $t = 3.82, P = 0.001$, 表4); 对照组中治愈好转的17例患者的 TBil、PT 水平明显下降, ALB 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($t = 3.46, P = 0.002$; $t = 4.18, P = 0.000$; $t = 3.21, P = 0.003$, 表5)。治疗组与对照组比较, 治疗前后 TBil、ALB 以及 PT 水平变化差异均无统计学意义, 提示 G-CSF 治疗对失代偿肝硬化患者的生化指标无明显改善。

表4 治疗组患者随访6个月主要生化指标的变化

组别	例数	TBil [μ mol/L, 中位数 (四分位数间距)]	ALB (g/L, $\bar{x} \pm s$)	PT (s, $\bar{x} \pm s$)
治疗前	16	30.55 (38.33)	28.70 \pm 3.21	18.51 \pm 3.61
治疗后6个月	16	20.35 (11.40)	37.61 \pm 5.07	14.67 \pm 1.78
<i>z/t</i> 值		2.38	5.93	3.82
<i>P</i> 值		0.017	0.000	0.001

表5 对照组患者随访6个月主要生化指标的变化

组别	例数	TBil [μ mol/L, 中位数 (四分位数间距)]	ALB (g/L, $\bar{x} \pm s$)	PT (s, $\bar{x} \pm s$)
治疗前	17	28.70 (21.60)	27.67 \pm 4.08	17.95 \pm 2.45
治疗后6个月	17	23.20 (11.00)	35.58 \pm 6.65	15.47 \pm 2.04
<i>z/t</i> 值		2.77	4.18	3.21
<i>P</i> 值		0.006	0.000	0.003

讨 论

大量研究表明, 各种原因造成的严重肝损伤均可动员骨髓源性干细胞(BMDSC)进入外周血继而迁移到肝脏发挥修复作用^[7-8]。当肝脏遇到损害时, 它会产生大量的信号分子来诱导骨髓干细胞转移和分化, 如肝细胞生长因子(HGF)、MMP-9和SDF-1等, 其中SDF-1与其受体CXCR4的相互作用与BMDSC向损伤肝脏迁移以及诱导内源性的肝干细胞增殖密切相关^[9-10]。本研究结果显示, 与正常对照组比较, 慢性HBV感染者外周血CD34阳性细胞数量升高, 以乙型肝炎肝硬化患者为最明显, 差异有统计学意义; 而CXCR4的表达水平降低, 但差异无统计学意义; 而慢性乙型肝炎和肝炎肝硬化患者外周血中SDF-1、SCF、MMP-9的表达水平均明显升高, 差异具有统计学意义。提示严重肝损伤患者干细胞迁移相关因子的表达水平及CD34阳性细胞数量升高, 存在反应性的骨髓干细胞动员, 这可能有助于肝脏严重损伤的修复。

动物模型研究发现, G-CSF能够动员骨髓造血干细

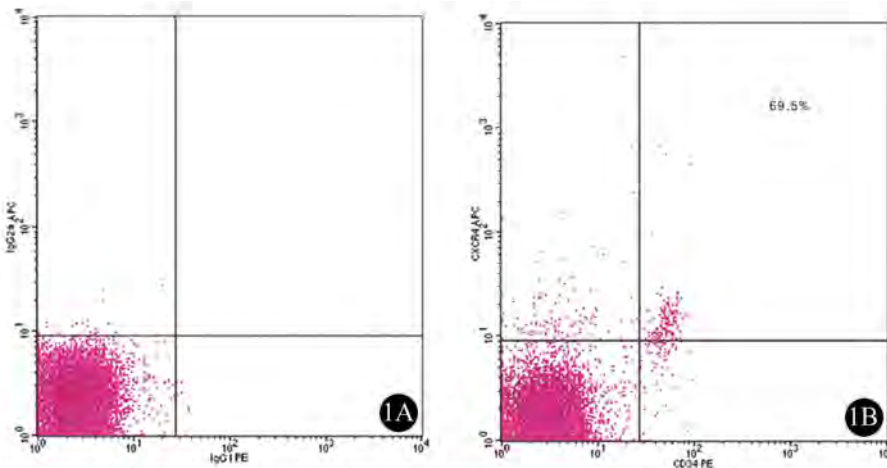


图1 流式细胞仪检测CD34和CXCR4阳性分子的表达。1A: 同型对照; 1B: CD34和CXCR4阳性细胞

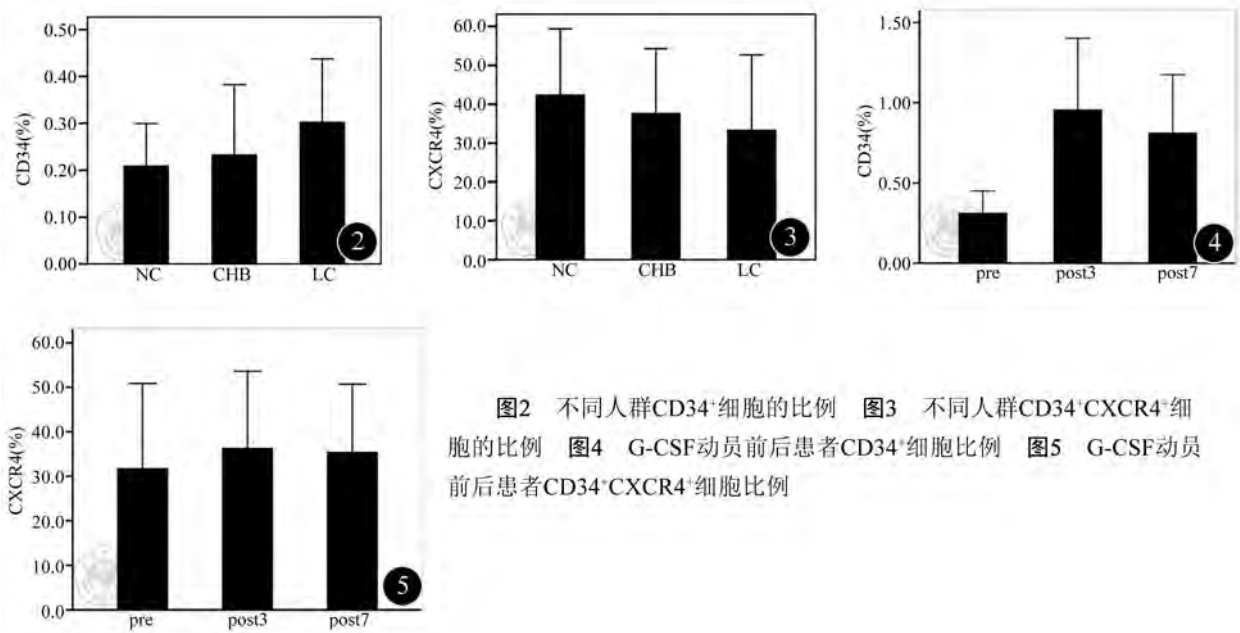


图2 不同人群CD34⁺细胞的比例 图3 不同人群CD34⁺CXCR4⁺细胞的比例 图4 G-CSF动员前后患者CD34⁺细胞比例 图5 G-CSF动员前后患者CD34⁺CXCR4⁺细胞比例

胞,使其移居受损肝脏定向分化为肝细胞,修复肝组织损伤,改善肝功能,而有关 G-CSF 治疗肝衰竭患者的报道结果并不一致,有些结论甚至完全相反^[11-13],分析原因可能与病例数量少且缺乏对照组、病情严重程度以及治疗干预方法不同等有关。近来 Garg 等^[14]应用 G-CSF 治疗 10 例慢加急性肝衰竭患者,发现其短期疗效明显优于对照组,但该研究随访期很短(2 个月),且病例数很少。本研究结果显示,随访治疗组和对照组患者 6 个月,两组治愈好转率比较,差异无统计学意义。治疗组和对照组治愈好转患者的生化指标如 TBil、PT 和 ALB 均得到明显改善,差异有统计学意义;但是两组患者治疗前后 TBil、PT 和 ALB 指标的改善水平相比较,差异无统计学意义。提示 G-CSF 治疗失代偿肝硬化患者的肝功能指标和短期预后无明显改善。治疗过程中除 1 例患者因出现发热终止治疗外,其余患者均未见明显不良反应,提示应用 5 μg/kg 的 G-CSF

剂量是比较安全的。

研究表明,成体骨髓中的肝星状细胞释放入血与骨髓微环境形成的 SDF-1 浓度梯度有关,这种浓度梯度的形成与 MMP-9 等蛋白裂解酶产生增加密切相关^[15]。Lei 等^[16]研究发现 G-CSF 可进一步增强这种浓度梯度,从而趋化 CD34⁺ 干细胞迁移到肝脏。本研究结果显示,G-CSF 动员后,肝硬化患者外周血中 CD34⁺ 干细胞明显增加,差异具有统计学意义,与国外资料报道一致^[17-18];而其表达 CXCR4 的水平亦相对升高,但差异无统计学意义。与治疗前比较,动员治疗后外周血中 SCF、MMP-9 的表达水平明显升高,差异有统计学意义;而 SDF-1 表达水平略升高,差异无统计学意义,提示 G-CSF 可能通过调节上述细胞因子的表达而促进骨髓干细胞动员,与 Carion 等^[19]报道结果一致。但是由于乙型肝炎肝硬化患者本身 SDF-1、MMP-9 的基础水平较高,给予 G-CSF 治疗作用有限,这与其不能改善

患者预后可能是一致的。

总之,本研究结果表明 G-CSF 可通过调控干细胞动员相关因子的表达水平,促进肝硬化患者的造血干细胞动员,但对改善乙型肝炎肝硬化患者的生化指标及短期预后无明显效果,原因可能与乙型肝炎肝硬化患者存在基础水平的造血干细胞动员有关,也可能与应用的剂量与例数较少有关,尚需大规模多中心临床研究进行验证。

参 考 文 献

- [1] Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, 2000, 32:11-16.
- [2] Okumoto K, Saito T, Haga H. Characteristics of rat bone marrow cells differentiated into a liver cells lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver. *J Gastroenterol*, 2006, 41:62-69.
- [3] Zhang L, Kang W, Lei Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment ameliorates liver injury and improves survival in rats with D-galactosamine-induced acute liver failure. *Toxicol Lett*, 2011, 204:92-99.
- [4] Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, et al. G-CSF primed hematopoietic stem cells or G-CSF perse accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol*, 2005, 33:108-119.
- [5] 中华医学会肝病学会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华内科杂志*, 2006, 45:162-168.
- [6] Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother*, 1996, 5:213-226.
- [7] De Silvestro G, Vicarioto M, Donadel C, et al. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology*, 2004, 51:805-810.
- [8] Lemoli RM, Catani L, Talarico S. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells*, 2006, 24:2817-2825.
- [9] Hatch HM, Zheng D, Jorgensen ML, et al. SDF-1 alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cell*, 2002, 4:339-351.
- [10] Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD 34⁺ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*, 2003, 112:160-169.
- [11] Gaia S, Sanedile A, Omede P, et al. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol*, 2006, 45:13-19.
- [12] Lorenzini S, Isidori A, Catani L, et al. Stem cell mobilization and collection in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008, 27:932-939.
- [13] Han Y, Yan L, Han G, et al. Controlled trials in hepatitis B virus-related decompensate liver cirrhosis: peripheral blood monocyte transplant versus granulocyte-colony-stimulating factor mobilization therapy. *Cytotherapy*, 2008, 10:390-396.
- [14] Garg V, Kumar A, Garg H, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) therapy could improve survival in patients with acute-on-chronic liver failure-a randomized placebo controlled trial. 2010, EASL, OP22.
- [15] Dalkas E, Newsome PN, Harrison DJ, et al. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J*, 2005, 19:1225-1231.
- [16] Lei Y, Liu Z, Han Q, et al. G-CSF enhanced SDF-1 gradient between bone marrow and liver associated with mobilization of peripheral blood CD34⁺ cells in rats with acute liver failure. *Dig Dis Sci*, 2010, 55:285-291.
- [17] Di Campli C, Zocco MA, Saulnier N, et al. Safety and efficacy profile of G-CSF therapy in patients with acute on chronic liver failure. *Dig Liver Dis*, 2007, 39:1071-1076.
- [18] Spahr L, Lambert JF, Rubbia-Brandt L, et al. Granulocyte-colony stimulating factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: a randomized trial. *Hepatology*, 2008, 48:221-229.
- [19] Carion A, Benboubker L, Hérault O, et al. Stromal-derived factor 1 and matrix metalloproteinase 9 levels in bone marrow and peripheral blood of patients mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and chemotherapy. Relationship with mobilizing capacity of haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol*, 2003, 122:918-926.

(收稿日期:2012-03-16)

(本文编辑:马超)

邢同京,徐洪涛,咸建春,等. 粒细胞集落刺激因子治疗失代偿期肝硬化的机制及疗效研究[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(15):4263-4267.