

骨髓干细胞分化为肝细胞的多种移植途径

穆丽雅, 韩明子

穆丽雅, 韩明子, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 穆丽雅, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科. lqz321521@163.com

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2005-11-30 接受日期: 2005-12-20

摘要

近年来许多研究证实, 人类和啮齿类动物的骨髓细胞可分化为多种细胞类型, 包括骨骼肌细胞、心肌细胞、神经细胞和肝细胞等, 这些骨髓干细胞的可塑性研究, 为肝细胞移植提供了新的供体来源. 骨髓干细胞替代肝细胞进行移植具有来源丰富, 费用相对低廉, 对患者损伤小等优点, 且自体骨髓干细胞移植可以完全避免移植排斥反应, 同时, 骨髓干细胞只有 5-15 μm , 移植后不会发生栓塞等并发症. 因此骨髓干细胞移植在治疗肝病以及解决供体肝脏来源短缺方面具有广泛的应用前景. 本文就骨髓干细胞的移植途径做一综述.

关键词: 干细胞; 门静脉; 尾静脉; 脾静脉; 腹腔; 肝内; 移植

穆丽雅, 韩明子. 骨髓干细胞分化为肝细胞的多种移植途径. 世界华人消化杂志 2006;14(6):607-610

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/607.asp>

0 引言

肝功能衰竭是死亡率极高的危重病, 近年来干细胞移植的研究为急性肝功能衰竭患者的治疗提供了新思路. 骨髓干细胞在体内外均可以分化为功能完备的肝细胞^[1-12], 用骨髓干细胞替代成熟肝细胞进行移植治疗肝病^[13-16], 有望使细胞移植在肝病治疗方面取得重大突破. 骨髓干细胞的移植途径有门静脉、肝内、股动脉、脾内、外周静脉、腹腔等, 本文就各种移植途径的优、缺点做一综述.

1 门静脉移植

从理论上讲, 肝脏本身是肝细胞移植的最佳器官, 因为门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, 对移植的肝细胞有益. 多个门脉内输注的研究显示^[17-21], 移植肝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. Avital *et al*^[19]利用两步免疫磁珠技术分离大鼠骨髓中的 $\beta 2\text{m}^+/\text{Thy-1}^+$ 细胞经门静脉移植到同系大鼠体内, 移植的细胞整合到受体肝板, 分化成表达肝细胞特异性标记的细胞, 并且能够合成尿素. 同时有动物实验证明^[20], 原位肝移植术后, 经门静脉注入 $\beta 2\text{m}^+/\text{Thy-1}^+$ 细胞, 可以明显减轻肝脏的移植排斥反应. 王平 *et al*^[21]将DAPI标记的大鼠骨髓基质细胞, 经门静脉移植入受体(移植细胞数为 10^5 /只), 各组受体鼠分别于移植后2 h、1 wk、2 wk、3 wk、4 wk处死. 结果发现, DAPI标记的细胞在肝脏内分布出现由门静脉小分支逐渐向肝实质内迁移的过程, 细胞大约在1 wk开始通过血管间隙向肝实质移行, 至第4周几乎全部散在分布于肝实质内, 与肝细胞紧密结合呈索状排列. 同时在肺脏的冰冻切片则未见明显DAPI标记细胞, 在一定程度上提示经过门静脉途径移植细胞可以起到良好的细胞选择性分布作用. 而且骨髓干细胞直径小, 移植入肝后不会引起栓塞等并发症, 因此, 门静脉是普遍使用的移植途径.

2 肝内移植

吴理茂 *et al*^[22]用肝脏局部注射乙醇的方法复制急性局限性肝损伤模型, 然后在肝脏坏死区边缘多点注射骨髓干细胞悬液(1×10^7 个), 2 wk后发现移植骨髓干细胞组的肝组织坏死区明显小于模型组. 作者又用复合因素(CCl_4 、乙醇、高脂、低蛋白)刺激复制大鼠肝纤维化模型, 采用肝右大叶3点移植骨髓干细胞(1×10^6 个), 5 wk后, 移植的细胞在汇管区聚集较多, 有些以单个细胞散在形式存在, 有些以小克隆形式存在, 部分已经迁移到肝实质深处, 大部分表现肝细胞的形态, 免疫组化双标技术显示骨髓来源的干细胞表达肝细胞特有的角蛋白CK18. 因此, 肝内注射也可以作为干细胞移植的途径之一. 但是此种方法具有出血倾向, 故临床应用上受到患

■背景资料

骨髓干细胞研究的不断深入, 为肝细胞移植提供了新的种子细胞. 大量的实验证明, 骨髓干细胞可以分化成肝细胞, 但是其分化机制各学者观点不一, 移植的干细胞是否能起到治疗肝病的作用仍在探讨之中. 有学者提出, 采取不同的移植途径, 在肝脏定居的细胞数是有差异的, 但是此种观点缺乏实验依据. 而且有关比较移植途径的实验研究也较少, 故本文就骨髓干细胞的移植途径做一综述, 供广大学者参考.

■ 相关报道

- 1 肝干细胞的可塑性和分化机制的研究进展. 生物化学与生物物理进展 2003; 30: 864-867
- 2 一种肝细胞移植的新来源—骨髓干细胞可塑性的应用研究. 国外医学外科学分册 2002; 29: 200-202

者凝血机制的限制.

3 股动脉移植

北京军区总医院的姚鹏 *et al*^[23] 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光透视下, 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)、白蛋白(ALB)逐渐降低, 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.

4 脾内移植

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. 脾窦巨大的储存量有利于移植细胞的存留, 来自门脉血的丰富营养物质, 尤其是脾红髓的网状组织结构, 有利于细胞间的相互作用, 同时具有诱导免疫耐受的作用. 蔡云峰 *et al*^[24] 采用免疫磁珠法从骨髓中分离β2m⁺细胞, 体外培养后经脾移植到肝再生模型鼠体内, 在移植2 wk后观察到脾内肝细胞样细胞集落, 同样表达白蛋白、AFP、CK8/18等, 说明β2m⁺细胞在脾内能够向肝细胞分化, 故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^[25-26]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^[27], 而且对肝功能恢复的确切效果有限.

5 外周静脉移植

Wang *et al*^[28] 通过 I 型酪氨酸蛋白血症模型小鼠的实验证实, 通过外周静脉骨髓干细胞移植, 骨髓干细胞替代肝细胞的过程是少量而且缓慢的, 同时这种替代的现象与肝功能已受损程度无关. Mitchell *et al*^[29-30] 认为, 只有选择压力存在即肝功能继续损害的前提下, 才有相当数量的骨髓干细胞向肝细胞分化而可能达到治疗作用. 此外, Kanazawa *et al*^[31] 研究了三种肝损伤模型小鼠: (1)CCl₄肝损伤小鼠; (2)白蛋白-尿激酶转基因小鼠; (3)乙肝病毒转基因小鼠. 作者将骨髓细胞通过尾静脉移植到三种模型小鼠体内, 结果在分析的18只小鼠中只有5只小鼠的肝内发现骨髓来源的肝细胞. 因此作者对于骨髓源性的肝细胞修

复损伤肝脏的可能性提出质疑. 由于经过外周静脉移植细胞, 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^[32-35]. 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. 但是值得一提的是 Lagasse *et al*^[36] 在FAH缺陷大鼠模型中证实, 经外周静脉移植的骨髓造血干细胞能在肝脏内分化为功能完备的肝细胞, 改善FAH缺陷大鼠的症状, 只要50个干细胞就能达到良好的效果.

6 腹腔移植

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黏连. 鉴于成熟肝细胞腹腔移植^[37-39]的经验, 腹腔移植也可能是干细胞移植的途径之一^[40-41].

因为骨髓源性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^[42-45], 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, 还处于黑暗年代, 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^[46], 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位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移植细胞的归巢和治疗效果仍在探讨之中. 张刚庆 *et al*^[47] 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, 优先定植于受损伤的靶器官, 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.

总之, 骨髓干细胞自体移植刚刚起步, 尚存在一些问题: 如(1)移植的方式和部位; (2)移植细胞的数量; (3)移植后干细胞在体内的归巢和定位等. 随着这些问题的解决, 骨髓干细胞将有着广阔的应用前景.

7 参考文献

- 1 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM,

- Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- 2 Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 691-695
- 3 Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Shar-kis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539
- 4 Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2818-2822
- 5 Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 500-504
- 6 Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 24-30
- 7 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- 8 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
- 9 Danet GH, Luongo JL, Butler G, Lu MM, Tenner AJ, Simon MC, Bonnet DA. ClqRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10441-10445
- 10 Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
- 11 Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 487-500
- 12 蔡云峰, 闵军, 何劲松, 魏菁, 莫隽全, 陈积圣. 骨髓源性肝干细胞的确认及定向分化的实验研究. *中国普通外科杂志* 2003; 12: 287-290
- 13 Kumar KS, Lefkowitz J, Russo MW, Hesdorffer C, Kinkhabwala M, Kapur S, Emond JC, Brown RS Jr. Successful sequential liver and stem cell transplantation for hepatic failure due to primary AL amyloidosis. *Gastroenterology* 2002; 122: 2026-2031
- 14 Terai S, Yamamoto N, Omori K, Sakaida I, Okita K. A new cell therapy using bone marrow cells to repair damaged liver. *J Gastroenterol* 2002; 37: 162-163
- 15 王平, 王建华, 颜志平. 骨髓干细胞移植: 肝功能衰竭治疗的一个新研究方向. *中华放射学杂志* 2004; 38: 202-205
- 16 安伟德, 胡祥, 曹亮, 王金晶, 刘巨超, 李力, 宋旭华, 徐迎新. 骨髓间充质干细胞定向分化肝细胞及肝内移植研究. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 917-919
- 17 王温芳, 南雪, 尉承泽, 李艳华, 张锐, 管立东, 岳文, 裴雪涛. 丙稀醇致肝损伤微环境定向诱导骨髓干细胞向肝细胞分化. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 274-277
- 18 展玉涛, 魏来, 陈红松, 丛旭, 费然, 王宇. 骨髓干细胞在大鼠肝纤维化形成环境中的分化. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 673-675
- 19 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 156-164
- 20 Avital I, Ferrareso C, Aoki T, Hui T, Rozga J, Demetriou A, Muraca M. Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection. *Surgery* 2002; 132: 384-390
- 21 王平, 王建华, 颜志平, 胡美玉, 王艳红, 李文涛, 林根来. 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. *中华放射学杂志* 2004; 38: 129-132
- 22 吴理茂, 李连达, 刘红, 宁可永, 李贻奎. 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. *中国工程科学* 2004; 6: 34-44
- 23 姚鹏, 王帅, 胡大荣, 闻炜, 周一鸣, 龚丽娟. 肝动脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化30例. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1639-1640
- 24 蔡云峰, 陈积圣, 闵军, 魏菁, 何劲松, 莫隽全. 骨髓源性肝干细胞定向分化及脾内移植研究. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 551-553
- 25 巴明臣, 周晓东, 陈积圣, 刘丽. 倒千里光碱处理SD大鼠永生代肝细胞同种脾内移植增殖实验研究. *第一军医大学学报* 2003; 23: 546-552
- 26 钱世鹏, 张天顺, 肖晓琴, 厉鼎琦, 高良辉, 卢盛祁. DiI荧光示踪剂在大鼠脾内肝细胞移植中的研究. *中华器官移植杂志* 2000; 21: 337-338
- 27 苏娟, 姚玉成, 余宏宇, 朱海英, 王新民, 王忠华, 胡以平. 肝干细胞在小鼠脾脏中集落样生长. *科学通报* 2001; 46: 1625-1628
- 28 Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002; 161: 565-574
- 29 Mitchell C, Fausto N. Bone marrow-derived hepatocytes: rare but promising. *Am J Pathol* 2002; 161: 349-350
- 30 Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, Fabre M, Guidotti JE, Renia L, Coulombel L, Kahn A, Gilgenkrantz H. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* 2002; 35: 799-804
- 31 Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11850-11853
- 32 周播江, 钟翠平, 顾云娣, 张新华, 梁春敏, 吴超群. 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. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 730-733
- 33 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
- 34 马军, 段芳龄, 李文晰, 颜伏归, 王晓, 王智卿, 朱武凌, 陈香宇, 高天慧. 大鼠移植骨髓细胞向肝细胞转化的实验研究. *胃肠病和肝病杂志* 2003; 12: 138-143
- 35 Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolta JA. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human he-

■同行评价

本文对骨髓干细胞分化为肝细胞的移植途径进行了综述, 基本包括了动物实验及临床上使用的所有移植途径, 具有一定的新颖性。

- matopoietic stem cells. *Blood* 2003; 101: 4201-4208
- 36 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234
- 37 徐兵, 江家骥, 潘晨, 李丽, 胡盈莹, 陈怡, 李勤光. 胶原凝胶包埋肝细胞体外培养和腹腔移植. 中西医结合肝病杂志 2001; 11: 9-10
- 38 李羽, 白雪帆, 张海, 张岩. 肝细胞移植对大鼠实验性肝衰竭的疗效研究. 第四军医大学学报 2002; 23: 896-899
- 39 张阳德, 马仁, 何剪太, 彭健. 微囊化同系、同种异体、异种肝细胞腹腔移植对急性肝衰竭治疗作用. 中华实验外科杂志 2001; 18: 47-49
- 40 张国新, 赵志泉. 肝脏干细胞移植. 中华消化杂志 2004; 24: 382-384
- 41 Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic *in vivo* distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001; 169: 12-20
- 42 Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003; 422: 901-904
- 43 Alvarez-Dolado M, Pardo R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; 425: 968-973
- 44 Dahlke MH, Popp FC, Larsen S, Schlitt HJ, Rasko JE. Stem cell therapy of the liver--fusion or fiction? *Liver Transpl* 2004; 10: 471-479
- 45 Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901
- 46 Crosby HA, Strain AJ. Adult liver stem cells: bone marrow, blood, or liver derived? *Gut* 2001; 48: 153-154
- 47 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. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1198-1201

电编 李琪 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

第十届全国临床营养支持学术会议通知

本刊讯 经中华医学会外科学分会批准,“第十届全国临床营养支持学术会议”将于2006-05在上海召开。本次会议由中华医学会外科学分会营养支持学组主办、复旦大学附属中山医院承办,主要内容为临床营养支持领域的基础和临床实践总结。现将征文要求通知如下:

1 征文要求

请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要邮寄到上海市医学院路136号,上海中山医院外科吴国豪收,邮编:200032;同时请用Email将论文全文及摘要发送到prowugh@yahoo.com.cn,注明上海中山医院外科吴国豪收。征文请自留底稿,恕不退稿。

2 截稿日期

征文截止日期:2006-03-15。

本次会议举行优秀论文评奖活动,欢迎踊跃投稿。会议向正式代表颁布中华医学会继续教育学分。