

肝纤维化的干细胞治疗进展

丁亚楠, 潘兴华, 马丹, 朱向情, 庞荣清, 杨仁华

丁亚楠, 潘兴华, 马丹, 朱向情, 庞荣清, 杨仁华, 中国人民解放军昆明总医院干细胞与组织器官工程研究中心 云南省昆明市 650032
丁亚楠, 马丹, 昆明医学院昆明总医院临床学院 云南省昆明市 650031
云南省自然科学基金重点资助项目, No. 2003C013Z
作者贡献分布: 文献检索, 资料分析和论文撰写由丁亚楠完成; 选题和审校由潘兴华完成; 庞荣清, 杨仁华, 马丹及朱向情对此文进行修改。
通讯作者: 潘兴华, 650032, 云南省昆明市, 中国人民解放军成都军区昆明总医院干细胞与组织器官工程研究中心。
xinghuapan@yahoo.com.cn
收稿日期: 2008-01-07 修回日期: 2008-09-18
接受日期: 2008-09-22 在线出版日期: 2008-10-18

Progress in treatment of liver fibrosis by stem cells

Ya-Nan Ding, Xing-Hua Pan, Dan Ma, Xiang-Qing Zhu, Rong-Qing Pang, Ren-Hua Yang

Ya-Nan Ding, Xing-Hua Pan, Dan Ma, Xiang-Qing Zhu, Rong-Qing Pang, Ren-Hua Yang, Research Center of Stem Cells, Tissue and Organ Engineering, Kunming General Hospital of Chengdu Military District of Chinese PLA, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Ya-Nan Ding, Dan Ma, Clinical School of Kunming General Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China
Supported by: the Key Natural Science Foundation of Yunnan Province, No. 2003C013Z
Correspondence to: Xing-Hua Pan, Research Center of Stem Cells, Tissue and Organ Engineering, Kunming General Hospital of Chengdu Military District of Chinese PLA, Kunming 650032, Yunnan Province, China. xinghuapan@yahoo.com.cn
Received: 2008-01-07 Revised: 2008-09-18
Accepted: 2008-09-22 Published online: 2008-10-18

Abstract

Latest studies from home and abroad indicate that stem cells exist in different adult tissues and various stages of individual development. There are stem cells not only derived from liver, but also from other tissues, such as bone marrow and pancreas in liver, which can differentiate into mature hepatocyte-like cells finally. Therefore, stem cell replacement therapy offers a new way for the clinical treatment of hepatic fibrosis in patients with end-stage liver diseases. This paper summarizes the progress in treating liver fibrosis by stem cells in recent years.

Key Words: Stem cell; Differentiation; Liver fibrosis;

Cell therapy

Ding YN, Pan XH, Ma D, Zhu XQ, Pang RQ, Yang RH. Progress in treatment of liver fibrosis by stem cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(29): 3299-3302

摘要

近年来国内外研究表明, 在个体发育的不同阶段及不同成体组织中均存在着干细胞。肝脏内不仅存在肝源性干细胞, 还存在其他组织来源的干细胞(如骨髓干细胞, 胰腺干细胞等), 这些干细胞最终可以分化为成熟的肝样细胞。因此, 干细胞的替代疗法为终末期肝病患者的肝纤维化治疗提供了新的思路。本文就近年来干细胞治疗肝纤维化方面的相关研究进展作一综述。

关键词: 干细胞; 分化; 肝纤维化; 细胞治疗

丁亚楠, 潘兴华, 马丹, 朱向情, 庞荣清, 杨仁华。肝纤维化的干细胞治疗进展。世界华人消化杂志 2008; 16(29): 3299-3302
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3299.asp>

0 引言

肝纤维化是多数终末期肝病发展的共同阶段, 这一阶段若得不到有效治疗, 最终会发展为肝硬化, 甚至导致患者死亡, 因而逆转或延缓肝纤维化过程是肝病治疗的一个重要环节。近年来肝纤维化治疗方面的研究主要集中在如何逆转或延缓肝纤维化过程以及如何解决功能肝细胞迅速减少的问题这两个方面。肝脏移植目前被认为是治疗肝纤维化的最有效方法之一, 但由于肝源供应不足、移植费用昂贵、手术风险高以及移植后并发症严重等限制, 难以推广。生物人工肝治疗肝纤维化虽然在很大程度上能够替代肝脏的部分代谢、解毒等功能, 但是同样存在异体排斥反应、体外培养细胞受限、解毒有限等问题, 并不能从根本上解决肝细胞减少的病理生理过程。而干细胞在一定条件下可以分化为肝样细胞, 从而在一定程度上可以逆转和延缓肝纤维化并补充纤维化过程中损伤的肝细胞, 为临床终末期肝病治疗提供新的思路。干细

■背景资料

肝纤维化是多数终末期肝病发展的共同阶段, 这一阶段若得不到有效治疗, 最终会发展为肝硬化, 甚至导致患者死亡。而干细胞在一定条件下可以分化为肝样细胞, 从而在一定程度上可以逆转和延缓肝纤维化并补充纤维化过程中损伤的肝细胞, 为临床终末期肝病治疗提供新的思路。

■同行评议者

倪润洲, 教授, 南通大学附属医院消化内科

■ 研发前沿

干细胞临床应用前景可观,但是目前尚处于起步阶段,治疗疾病的原理尚未研究清楚,技术方法还不完善。

细胞(stem cells)是具有无限增值和自我更新能力,并能产生至少一种高度分化子代细胞的细胞群体。主要分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)和成体干细胞(adult stem cells, ASCs),而成体干细胞中的骨髓干细胞又可分为造血干细胞(haematopoietic stem cells, HSCs)和间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。

1 胚胎干细胞

近年来研究表明,胚胎干细胞具有分化成多种组织细胞的潜能,并可在体外诱导分化为人类所需要的各种组织细胞,如心肌细胞、胰腺细胞、造血细胞、肝细胞等^[1]。并能在原始未分化状态无限繁殖。因而,成为细胞替代治疗最合适的细胞资源^[2]。

胚胎干细胞体外诱导分化为肝细胞的研究为数不多,主要集中在研究不同细胞因子干预、细胞共培养和转基因对肝细胞分化的作用和多种肝细胞标志物对肝细胞的鉴定等方面^[3-5]。Ishizaka *et al*^[6]运用贴壁法体外培养大鼠胚胎干细胞时发现,不管有无肝细胞特异性生长因子刺激或是否通过肝细胞核转录因子-3 β 转染,胚胎干细胞在体外均能分化成肝样细胞^[6-7]。蒯小玲 *et al*^[8]采用胚胎干细胞与肝细胞生长因子(HGF)共培养,将小鼠胚胎干细胞成功诱导为肝细胞,检测有肝细胞特异性标志物表达。国外Jung *et al*^[9]应用组织外植体系证实了FGF1和FGF2能替代心脏中胚层的诱导效应。因此,在向肝细胞分化中,FGFs可能是向肝细胞诱导的重要启动因子。Yamamoto *et al*^[10]证实了胚胎干细胞移植能明显改善由CCl₄造成的肝损害。Teratani *et al*^[11]的研究则表明胚胎干细胞移植对小鼠肝硬化有显著疗效。尽管胚胎干细胞研究取得很大成绩,但是由于其存在伦理上争议,使其研究受到限制。近几年科学家试图通过新的手段获得具有全能性的类似胚胎干细胞功能的细胞。即将成体细胞进行逆向分化,使其还原为胚胎干细胞。国外有研究证实了成体干细胞逆向分化的可行性^[12]。这一发现为干细胞逆向分化带来了新的动力。

2 成体干细胞

成体干细胞存在于成人各种组织中,其基本功能是提供稳定的内环境,替代由于损伤和疾病导致的衰老和死亡的细胞,即负责生理性更新正常生理死亡和病理性修复、再生其定居部位的组织。大多研究认为成体干细胞具有多向分化潜能,不仅可以分化为相应胚层来源的组织

细胞,还可以跨胚层分化为其他胚层来源的组织细胞类型,比如骨髓间充质干细胞可以分化为皮肤、血管、神经、肝、胰岛、软骨、肾等十几种类型的成熟细胞,其中包括了外、中、内3个胚层来源的组织细胞。成体干细胞具有来源丰富、可塑性强、具有多向分化潜能和便于体外操作等特点,而且可以实现个体化治疗,无免疫排斥问题,因此是最具临床应用潜能的种子细胞。成体干细胞中的造血干细胞和间充质干细胞是目前研究最多、来源最为方便的成体干细胞。新近的大量研究发现BMSCs可分化为类肝样细胞,这为急慢性肝病的治疗带来了曙光。

2.1 造血干细胞 肝脏与造血之间有着内在的联系。在个体发育过程中,胎肝是主要的造血器官,是造血干细胞生存的场所。在成年个体,肝脏是主要的储血器官之一。因此造血干细胞向肝细胞横向分化看起来是可行的,相关的研究也开展较早。目前的研究表明,造血干细胞可以向肌细胞、肝细胞、神经细胞、肠上皮细胞、表皮细胞等多种细胞分化。造血干细胞这种向在发育上无关的其他系列的细胞类型分化的特性称为“可塑性”(plasticity)^[13]。多年来,人们利用多种表面标记来识别、分离、纯化骨髓和外周血来源的造血干细胞。未分化的造血干细胞和造血祖细胞通常表达c-Kit, CD34和H-2K,不表达或者低表达Lin。通常用于移植的细胞为CD34Thy-1⁺Lin⁻。骨髓中存在着与肝脏相同标志(包括c-Kit, CD34, Thy-1⁺等)的干细胞,并能在体外分化为成熟肝细胞表型^[14]。因此,造血干细胞作为潜在的细胞来源可能会在肝脏再生或重建治疗中发挥作用。例如研究显示在肝脏严重受损时,造血干细胞会对肝实质进行一定程度的修复^[15]。CD34造血干细胞可以在体外诱导分化为肝样细胞,植入体内可以修复肝损伤^[16]。Lagasse *et al*^[17]用正常成年小鼠骨髓细胞移植治疗模型小鼠I型酪氨酸蛋白血症,观察模型小鼠的生长状况及其肝脏生化功能恢复情况,另一组仅用纯化的造血干细胞(C-kit^{high}、Thy^{low}Lin⁻、Sca-1)进行移植,观察其疗效。结果发现骨髓中的造血干细胞在体内转分化为肝细胞,使小鼠产生供体源造血和肝细胞的再生,使受体小鼠肝脏的生化功能得以恢复。还有学者则从功能学上进行了证明:他们将人造造血干细胞或脐血细胞移植入上述老鼠模型,并在老鼠血清中发现了人白蛋白并有人mRNA的表达^[18]。Sakaida *et al*^[19]也证明自体骨髓干细胞移植是治

疗肝病的很好的方法. 但也有研究认为造血干细胞移植对正常及损伤后肝脏的再生均无作用, 因此造血干细胞移植治疗肝病尚需严格评估^[20]. 利用HSC的可塑性将体外转分化的肝前体细胞或HSC由门脉注入患者肝内, 有望维持和改善其衰竭的肝功能.

2.2 间充质干细胞 间充质干细胞主要是源于骨髓的具有高度自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞. 近年来研究表明, 这些源于中胚层的骨髓间充质干细胞可以跨越胚层向内胚层及外胚层的组织、细胞分化. 比如分化为肝细胞、胆管上皮细胞、内皮细胞、骨骼肌细胞、心肌细胞、神经元细胞、视网膜细胞等. 研究者称之为“可塑性”或“横向分化”(transdifferentiation). 骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSC)在特定条件下横向分化为肝细胞的研究为其移植治疗肝纤维化提供了理论依据.

研究发现, 骨髓中存在多种可以分化为肝细胞的细胞亚群, 如KTLS细胞 (Lin⁻CD45⁺CD38⁺CD34⁺)^[21]等. 这些细胞亚群涉及多个不同的表面标志, 代表了骨髓干细胞不同发育阶段或谱系中的不同分支. 而存在于细胞微环境中的参与黏附过程的信号分子以及参与正常细胞发育、分化、成熟的细胞因子对于其向肝细胞分化起到很大的诱导作用. Petersen *et al*^[22]、Theise *et al*^[23]和Alison *et al*^[24]的研究表明, 骨髓干细胞或造血干细胞能够在鼠肝内转化成为肝卵圆细胞甚至成熟的肝细胞和胆管细胞, 并证明此现象也同样存在于人类体内. 他们用高浓度的肝细胞生长因子(HGF)体外诱导大鼠骨髓细胞, 后用RT-PCR检测发现诱导后的细胞能够表达AFP、白蛋白及CK8/18等肝前体细胞的特征性标记. 磁珠细胞筛选法分离人或大鼠骨髓细胞中的 $\beta 2m^{+}$ Thy-1⁺细胞, 同样能够表达肝细胞的特征性标记^[25]. 这些骨髓来源的肝干细胞(BDHSC)肝内移植后很快可以整合入肝板, 并最终分化为成熟的肝细胞. 而体外培养时加入胆汁化血清可促进这些细胞向肝细胞方向分化. Inderbitzin *et al*^[26]从鼠骨髓中分离出表达 $\beta 2$ -微球蛋白/Thy-1⁺的细胞亚群, 与肝细胞共培养, 结果发现该细胞亚群的氨代谢提高. 提示该亚群骨髓干细胞有向肝干细胞分化的能力. 总之, 以上研究有力证实: 骨髓中确实存在能分化为肝细胞的干细胞, 直接将其移植到肝脏, 在肝脏微环境调节下可分化为肝细胞; 将骨髓干细胞作

为肝细胞移植的细胞来源有重要的临床意义.

2.3 肝干细胞 肝干细胞(hepatic stem cell, HSC)是指肝脏自身组织中那些具有自我更新并能够分化为肝细胞和胆管细胞的干细胞(最近有人证实他也可分化为血管内皮细胞^[27]). 肝干细胞的基本特征可概括为两点: (1)具有多向分化能力, 可向肝细胞、胆管上皮细胞、肝脏血管内皮细胞分化. (2)具有自我更新与自我维持能力, 对肝脏损伤或疾病产生反应并进行修复. 该类细胞不仅在胚胎肝组织中存在, 而且在成年肝组织中也存在. 肝内的肝干细胞称为卵圆细胞(hepatic oval cell, HOC)或小肝细胞^[28]. 肝卵圆形细胞(oval cells)被认为是双潜能的肝干细胞, 研究表明, 他们还可跨胚层分化为其他组织的细胞类型, 姚鹏 *et al*^[29]在基础培养液中添加肝细胞生长因子(HGF)、表皮生长因子(EGF)、胰岛素和地塞米松, 诱导WB2F344肝干细胞系分化为肝细胞. Mitaka *et al*^[30]还发现, 当肝星形细胞长入小肝细胞克隆时, 后者的成熟化被激活, 表现一系列成熟肝细胞的形态. 现在认为小肝细胞是肝细胞的前体细胞, 在胚胎发育晚期, 肝母细胞先分化为小肝细胞, 后者在非实质细胞(如肝星形细胞)分泌的细胞外基质的作用下分化成熟; 在成体肝内, 卵圆细胞先分化为小肝细胞, 然后才能形成成熟肝细胞.

3 结论

大量实验表明, 不同源性干细胞可以定向分化为功能肝样细胞, 这就为临床治疗肝病提供了实验依据. 国内外一些医生应用自体骨髓干细胞移植来治疗一些终末期肝病, 并获得很好的疗效, 因此, 干细胞临床应用前景可观. 但是目前尚处于起步阶段, 治疗疾病的原理尚未研究清楚, 技术方法还不完善, 这就要求我们在干细胞培养、扩增、分化等技术层面的进一步提高, 在干细胞移植要求的细胞数量、活性以及移植途径选择等应用层面的进一步优化, 在干细胞移植后临床观察、指标对比及预后等疗效评估层面进一步完善. 骨髓源性干细胞自体移植用于肝病只是个好的开端, 相信随着研究的不断深入, 其他来源的干细胞同样对许多肝脏疾病有良好的治疗作用. 体外培养的肝干细胞不仅为生物人工肝提供了一种新的细胞来源, 而且其细胞移植可以替代坏死的组织, 并刺激受体组织再生以达自身修复的效果, 同样具有很好的应用前景. 相信干细胞在肝脏疾病治疗领域

■ 相关报道

大量实验表明, 不同源性干细胞可以定向分化为功能肝样细胞, 这就为临床治疗肝病提供了实验依据.

同行评价

本文对干细胞治疗终末期肝病的研究进展进行了综述,层次清楚,文字简练,能使读者对该领域的研究概况有较清楚的了解。

会发挥越来越大的作用,为终末期肝病患者带来新的希望。

参考文献

- 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
- Moriya K, Yoshikawa M, Saito K, Oujii Y, Nishiofuku M, Hayashi N, Ishizaka S, Fukui H. Embryonic stem cells develop into hepatocytes after intrasplenic transplantation in CCl₄-treated mice. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 866-873
- Jones EA, Tosh D, Wilson DI, Lindsay S, Forrester LM. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 2002; 272: 15-22
- Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Arii S, Takase K, Sato C, Terada N, Teraoka H. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 2002; 36: 22-29
- Kuai XL, Cong XQ, Li XL, Xiao SD. Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl* 2003; 9: 1094-1099
- Ishizaka S, Shiroy A, Kanda S, Yoshikawa M, Tsujinoue H, Kuriyama S, Hasuma T, Nakatani K, Takahashi K. Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. *FASEB J* 2002; 16: 1444-1446
- Kanda S, Shiroy A, Oujii Y, Birumachi J, Ueda S, Fukui H, Tatsumi K, Ishizaka S, Takahashi Y, Yoshikawa M. In vitro differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells promoted by gene transfer of hepatocyte nuclear factor 3 beta. *Hepatol Res* 2003; 26: 225-231
- 蒯小玲, 丛笑倩, 李秀兰, 萧树东. 小鼠胚胎干细胞诱导为肝细胞的研究. *胃肠病学* 2003; 8: 6-10
- Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999; 284: 1998-2003
- Yamamoto H, Quinn G, Asari A, Yamanokuchi H, Teratani T, Terada M, Ochiya T. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 2003; 37: 983-993
- Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, Ochiya T. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology* 2005; 41: 836-846
- Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S. Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J Am Chem Soc* 2004; 126: 410-411
- 程吴钰, 何明生. 造血干细胞的可塑性及其临床应用的研究进展. *国外医学·内科学分册* 2005; 32: 200-202
- Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 2003; 21: 98-104
- Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, Katada T, Miyamoto K, Shinoda K, Nishina H, Okita K. An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 2003; 134: 551-558
- Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 532-539
- 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
- Newsome PN, Johannessen I, Boyle S, Dalakas E, McAulay KA, Samuel K, Rae F, Forrester L, Turner ML, Hayes PC, Harrison DJ, Bickmore WA, Plevris JN. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* 2003; 124: 1891-1900
- Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol* 2005; 38: 197-202
- 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
- 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 U S A* 2002; 99: 10441-10445
- 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
- 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
- Alison MR, Poulson 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
- 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
- Inderbitzin D, Avital I, Keogh A, Beldi G, Quarta M, Gloor B, Candinas D. Interleukin-3 induces hepatocyte-specific metabolic activity in bone marrow-derived liver stem cells. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 69-74
- Gao Z, McAlister VC, Williams GM. Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *Lancet* 2001; 357: 932-933
- Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol* 2001; 158: 1313-1323
- 姚鹏, 胡大荣, 詹轶群, 许望翔, 李长燕, 杨晓明. 细胞生长因子体外对大鼠肝干细胞的影响. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 33-36
- Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T, Yokono T, Mochizuki Y. Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 1999; 29: 111-125