

脐血间充质干细胞治疗慢性乙型肝炎加急性肝衰竭的疗效分析

杨 丽 马英杰 刘桂举 韩 莉

摘 要 **目的** 探讨脐血间充质干细胞(umbilical cord - derived mesenchymal stem cells, UCMSCs)在治疗慢性乙型肝炎加急性肝衰竭的疗效。**方法** 收集笔者医院 2013 ~ 2015 年收治的慢性乙型肝炎加急性肝衰竭患者 84 例,根据治疗方案分为对照组 44 例,观察组 40 例。对照组采用标准治疗以及人工肝等综合治疗,观察组在综合治疗的基础上加用脐血间充质干细胞输注。观察两组患者治疗过程中的临床症状改善情况,并在治疗前后分别检测两组患者血清白蛋白(ALB)、总胆红素(TBil)、和凝血酶原活动值(PTA)。**结果** 观察组患者有效率明显高于对照组,住院时间短于对照组,死亡患者的生存时间长于对照组。**结论** 脐血间充质干细胞可有效的改善慢性乙型肝炎加急性肝衰竭症状,提高生存率。

关键词 间充质干细胞 肝衰竭 治疗

中图分类号 R456

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.039

Study of Human Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells in Treatment of HBV - related Acute - on - chronic Liver Failure. Yang Li, Ma Yingjie, Liu Guiju, et al. Department of Gastroenterology, Zhengzhou People's Hospital, Henan 450003, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of injection of human umbilical cord - derived mesenchymal stem cells in treatment of HBV - related acute - on - chronic liver failure. **Methods** Eighty - four patients with HBV - related acute - on - chronic liver failure in our hospital from December 2013 to December 2015 were included. They were randomly assigned to two groups, with 44 patients in control group and 40 patients in observation group. The control group was given the standard therapy of severe hepatitis and artificial liver support system. The observation group was given the standard therapy for HBV - related acute - on - chronic liver failure and artificial liver support system combined with intravenous infusion of human umbilical cord - derived mesenchymal stem cells. Changes of clinical efficacy were observed in each group during the treatment period. The levels of ALB, TBIL, PTA of each group were detected before and after comprehensive therapy. **Results** The effective rate in observation group was higher than that in control group. The average duration of hospital stay of observation group was significantly shorter than that of the control group, while the mean survival time of observation group was longer than that of the control group. **Conclusion** Symptoms in patients suffered from HBV - related acute - on - chronic liver failure with intravenous infusion of human umbilical cord blood combined can get quickly alleviated, and the survival rate is greatly improved.

Key words Mesenchymal stem cells; Liver failure; Treatment

慢加急性肝衰竭是我国肝衰竭的主要类型,临床症状主要表现为重度黄疸,凝血功能障碍,肝性脑病,病死率极高^[1]。而乙型病毒性肝炎是亚洲地区引起慢加急性肝衰竭的主要原因^[2]。目前临床治疗主要以抗病毒治疗联合人工肝,但效果并不理想^[3,4]。虽然肝移植是唯一认定慢加急性肝衰竭的有效治疗,但是合适的供体缺乏以及高昂的移植手术费用又限制了广泛推广^[5,6]。笔者医院近年开展的脐血间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)在治疗慢性乙型肝炎加急性肝衰竭方面取得了一定效果,现报道如下。

资料与方法

1. 临床资料:收集笔者医院 2013 ~ 2015 年收治的慢性乙型肝炎加急性肝衰竭患者 84 例,其中男性 51 例,女性 33 例,患者平均年龄 43 ~ 62 岁,所有患者诊断均符合 2012 年中华医学会感染病学分会修订的肝衰竭诊疗指南标准,包括:①严重的腹胀、乏力、食欲不振;②血清总胆红素急剧增加超过 $171 \mu\text{mol/L}$;③凝血酶原激活度 $< 40\%$;④慢性肝病症状(包括脾大、肝左右叶比例失调);⑤HBV - DNA 阳性;⑥出现Ⅱ级以上的肝性脑病症状。排除标准:①酒精性肝病、药物性肝炎、自身免疫性肝炎以及合并其他病毒性肝炎;②恶性肿瘤;③严重的心、脑、肾、肺疾病。

2. 治疗方法:根据患者治疗方案不同将患者分为

对照组 44 例和观察组 40 例,对照组采取慢性乙型肝炎加急性肝衰竭传统的治疗,包括休息、补充足够能量,合理饮食,抗病毒,补充白蛋白、多烯磷脂酰胆碱、腺苷蛋氨酸以及人工肝等综合治疗。观察组在以上综合治疗的基础上加用脐血间充质干细胞输注。脐血间充质干细胞来自于健康分娩孕妇的脐带血,取 50ml 脐带血加肝素混匀,离心,取细胞层加 Hanks 液稀释,离心,吸去上清液,洗涤再离心,制成干细胞原代培养悬液,接种到含胎牛血清的原代培养基中,3 天后换培养液,去除未贴壁的杂细胞,以后每隔 2 天换液 1 次,细胞达到 80% ~ 90% 融合时,胰酶消化,传代扩增后制成细胞悬液 50ml,细胞数量达到 107 个/毫升,流式细胞检测 MSCs 的免疫表型合格后,经外周静脉输注。所有观察组患者接受治疗前均充分告知治疗内容并签署知情同意书。两组患者治疗前及治疗后分别检测患者血清白蛋白 (ALB)、总胆红素 (TBil)、凝血酶原活动度 (PTA),并观察两组患者的临床症状,包括腹胀、乏力、食欲不振等症状的改善情况以及不良反应。

3. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,所有数据资料均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,计数资料的统计分析采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 脐血间充质干细胞 (MSCs) 的分离培养:扩增结果见图 1,流式细胞检测 MSCs 免疫表型分析结果显示 $CD45^- CD34^- CD44^+$ 98.53%, $CD45^- CD34^- CD73^+$ 99.01% (图 2)。

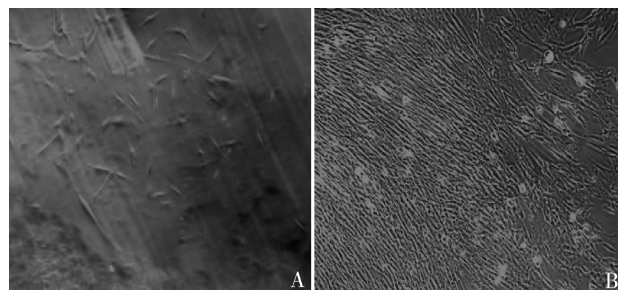


图 1 倒差显微镜下不同时间 MSCs 培养情况 ($\times 100$)

A. 培养 4 ~ 5 天; B. 培养 2 周

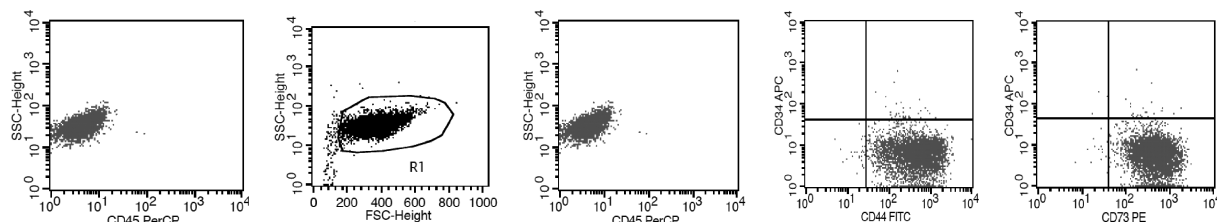


图 2 流式细胞检测的 MSCs 的免疫表型分析结果

2. 两组患者有效率及住院时间比较:对照组 44 例患者中有 34 例出现症状进行性加重,胆红素持续升高,白蛋白及凝血酶原时间延长,后救治无效死亡。34 例患者生存时间为 26 ± 7 天,10 例有效,平均住院时间为 61 ± 8 天,观察组 40 例患者中 25 例死亡。死亡的患者中有 15 例患者住院期间在应用脐血间充质干细胞后都有不同程度的腹胀、乏力等症状的显著改善,但黄疸症状改善并不显著,后 7 例合并感染死亡,5 例并发消化道出血死亡,3 例死于肝性脑病。观察组死亡患者的生存时间 39 ± 9 天,15 例治疗有效出院患者,平均住院日 49 ± 7 天,40 例输注脐血间充质干细胞仅有 1 例输注期间有低热,后自行缓解,两组比较见表 1。

3. 两组有效患者在治疗前及治疗后 3 周、4 周后肝功能各项指标比较:见表 2。

表 1 两组患者有效率、住院时间和生存时间比较

组别	n	有效率 [n (%)]	住院时间 (天)	死亡患者生存 时间(天)
观察组	44	10 (22.7)	61 ± 8	26 ± 7
对照组	40	15 (37.5)	49 ± 7	39 ± 9

P 均 < 0.05

表 2 两组治愈患者治疗前后肝功能各项指标比较

项目	组别	治疗前	治疗后 3 周	治疗后 4 周
总胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)	对照组	261.15 ± 33.63	168.31 ± 36.15	102.36 ± 28.45
	观察组	259.77 ± 31.03	$106.56 \pm 38.43^*$	$62.76 \pm 39.45^*$
白蛋白 (g/L)	对照组	20.5 ± 3.7	24.3 ± 3.2	28.8 ± 3.1
	观察组	21.0 ± 3.9	$28.8 \pm 4.7^*$	$34.2 \pm 3.3^*$
凝血酶原活 动度 (%)	对照组	33.8 ± 18.1	44.5 ± 27.9	51.5 ± 21.6
	观察组	32.9 ± 17.5	$52.6 \pm 31.1^*$	$63.2 \pm 18.8^*$

与对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

慢加急性肝衰竭 (acute on chronic liver failure, ACLF) 是在慢性肝病基础上出现肝功能急性严重受损。常并发 1 个或多个器官衰竭的一组复杂临床综合征, 其中乙型病毒性肝炎引发的慢加急性肝衰竭是我国肝衰竭中最常见的类型, 由于其预后差, 有效治疗手段匮乏, 费用高昂, 因而成为临床治疗难点。MSC 是一类具有自我更新和多向分化潜能的多能干细胞, 主要存在于骨髓、脐带血、外周血、脂肪及肝脏等器官间质和结缔组织中, 因其具有较强的增殖分化能力和独特的免疫调节作用, 近年来成为用于肝病治疗的研究热点^[7,8]。而脐血间充质干细胞由于具有良好的增殖潜力, 其低免疫原性, 临床较易制备, 这些特点使其成为临床应用中的最佳选择^[9]。本研究显示脐血间充质干细胞治疗可明显的提高慢性乙型肝炎加急性肝衰竭患者的生存率, 由于其低免疫原性, 不良反应极低, 本研究观察组 40 例患者中仅有 1 例患者输注过程中有低热轻微不适感。慢加急性肝衰竭的特点是由于肝细胞的广泛坏死导致肝功能急剧恶化, 肝细胞再生差, 如何促进受损干细胞的再生是治疗的关键, 而传统的抗病毒及人工肝治疗对肝细胞的再生并无直接作用, 而国外研究报道, 静脉输注 MSCs 至肝衰竭模型中能成功分化为肝样细胞, 并可以通过分泌多种细胞因子抑制炎症反应, 促进肝细胞增殖及肝脏血管再生^[10,11]。本研究也显示, 观察组治愈患者治疗同期胆红素的下降、白蛋白及凝血酶原活动度的改善均较对照组明显。

综上所述, 慢加急性肝衰竭患者不仅出现常见的消化道症状, 还由于大量的代谢毒素的蓄积导致各组织器官功能的继发性受损, 多脏器衰竭。MSCs 作为一种基质细胞前体细胞, 可以分泌多种细胞因子, 通过组织间隙作用于周围细胞, 发挥重要的旁分泌作用, 调控造血功能外, 还广泛参与免疫调节, 细胞凋亡、增殖、内源性前体细胞的再生、血管再生等病理生理作用^[12-14]。研究表明, 间充质干细胞分泌物质对多种器官损伤模型: 急性心肌梗死、急性肾衰竭、脑卒中、皮肤损伤等都有抑制细胞凋亡、刺激细胞再生作用, 从而促进创伤愈合, 组织修复, 因而对患者的整体症状改善明显^[10,15]。笔者的研究也显示间充质干细胞治疗组患者不仅生存率相对增高, 住院时间也相对缩短, 即使死亡病例其生存时间也相对较长, 并且部分死亡患者中乏力、食欲不振等症状也曾不同程度的改善。本研究显示脐血间充质干细胞在治疗慢性乙型

肝炎加急性肝衰竭中确实有一定的疗效, 有一定的临床应用前景, 但是其治疗和调节机制尚需进一步研究, 并且其远期治疗效果和不良反应还有待于进一步观察。

参考文献

- Sarin SK, Kumar A, Almeida JA, *et al.* Acute - on - chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL) [J]. *Hepatol Int*, 2009, 3 (1): 269 - 282
- Sun LJ, Yu J W, Zhao Y H, *et al.* Influential factors of prognosis in lamivudine treatment for patients with acute - on - chronic hepatitis B liver failure [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25 (3): 583 - 590
- Xu X, Liu X, Ling Q, *et al.* Artificial liver support system combined with liver transplantation in the treatment of patients with acute - on - chronic liver failure [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (3): 58738
- Stadlbauer V, Davies NA, Sen S, *et al.* Artificial liver support systems in the management of complications of cirrhosis [J]. *Semin Liver Dis*, 2008, 28 (1): 96 - 109
- Bahirwani R, Shaked O, Bewtra M, *et al.* Acute - on - chronic liver failure before liver transplantation: impact on posttransplant outcomes [J]. *Transplantation*, 2011, 92 (8): 952 - 957
- Chan AC, Fan ST, Lo CM, *et al.* Liver transplantation for acute - on - chronic liver failure [J]. *Hepatol Int*, 2009; 3 (4): 571 - 581
- Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, *et al.* Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I - II clinical trial [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21 (10): 1199 - 1205
- Takami T, Terai S, Sakaida I. Stem cell therapy in chronic liver disease [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012, 28 (3): 203 - 208
- Hwang WY, Samuel M, Tan D, *et al.* A meta - analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007, 13 (4): 444 - 453
- Francois S, Bensidhoum M, Mouisseddine M, *et al.* Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage [J]. *Stem Cells*, 2006, 24 (4): 1020 - 1029
- Banas A, Teratani T, Yamamoto I, *et al.* IR - TS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury [J]. *Stem Cells*, 2008, 26 (10): 2705 - 2712
- Zhang Y, Cai W, Huang Q, *et al.* Mesenchymal stem cells alleviate bacteria - induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells [J]. *Hepatology*, 2014, 59 (2): 671 - 682
- Liu Z, Meng F, Li C, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stromal cells rescue mice from acetaminophen - induced acute liver failure [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16 (9): 1207 - 1219
- Stock P, Brückner S, Winkler S, *et al.* Human bone marrow mesenchymal stem cell - derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 22, 15 (4): 7004 - 7028
- Baraniak P, McDevitt T. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration [J]. *Regen Med*, 2010, 5 (1): 121 - 143

(收稿日期: 2016 - 10 - 13)

(修回日期: 2016 - 10 - 30)