脐血干细胞移植治疗肝硬化的临床研究

贺 莉 蒋明德 曾维政 陈 丽 王群茹 翁 敏

(成都军区总医院消化内科 四川 成都 610083)

摘要 目的：观察脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化的临床疗效。**方法：**对 60 例失代偿期肝硬化患者进行自身对照的临床研究。在无菌条件下取健康产妇足月生产的脐带血，分离纯化脐血干细胞，通过肝动脉途径，将纯化的脐血干细胞移植入患者肝脏内，于移植后 2 周、4 周、8 周进行肝功能、凝血指标检测，并于 4 周及 8 周行腹部 B 超及胃镜检查，观察患者移植后不同时间症状改善情况及术后不良反应的发生情况。**结果：**60 例接受脐血干细胞移植的肝硬化患者术中术后无明显不良反应发生。移植后，患者临床症状改善明显，食欲不振、乏力、腹水等减轻甚至消失；血清学检测：白蛋白水平较术前明显升高，凝血酶原时间、总胆红素较术前明显下降；术后 8 周复查胃镜，食道静脉曲张没有明显变化。**结论：**脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化是一种安全、有效的方法，尤其是在提高白蛋白水平及改善凝血功能方面有很好的疗效，可作为肝移植治疗的过渡或补充治疗。

关键词：脐血干细胞；移植；肝硬化

中图分类号：R575.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2012)25-4869-03

Clinical Observation of the effect of Umbilical Cord Blood Stem Cell Transplantation on Patients with Decompensated Cirrhosis

HE Li, JIANG Ming-de, ZENG Wei-zheng, CHEN Li, WANG Qun-ru, WENG Min

(Internal Medicine Department of Digestion, General Hospital of Cheng'du Military Region, Chengdu, Sichuan, 610083, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the clinical therapeutic effect of umbilical blood stem cell transplantation on patients with decompensated liver cirrhosis. Methods: By using self-controlled, 60 cases of patients with decompensated cirrhosis were studied. Umbilical cord blood was collected from mature fetuses delivered by healthy parturient women under sterile conditions. Stem cells were separated and were transplanted into a patient's liver through the hepatic arteries. At different time (2, 4 and 8 wk) after transplantation, liver function and coagulation index tests were performed. Abdominal ultrasounds and gastroscopes were obtained 4 and 8 wk after the operation. Changes and adverse reactions in the 60 patients were observed. Results: No remarkable side effect was discovered in all 60 patients. Their clinical symptoms, such as poor appetite, physical weakness, and peritoneal dropsy were either relieved or entirely disappeared. Albumin levels increased and total bilirubin remarkably decreased. No evident change took place in the esophagus varix based on the gastroscopy performed 8 wk post-transplant. Conclusions: CBSCT is a safe and effective therapy for decompensated hepatocirrhosis. Albumin levels and liver coagulation capacity are improved. CBSCT can serve as an alternative or a supplement to liver transplantation.

Key words: Umbilical cord blood stem cell; Transplantation; Hepatocirrhosis

Chinese Library Classification(CLC): R575.2 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)25-4869-03

前言

失代偿期肝硬化是一种常见的良性终末期肝病，其特征性的病理表现为肝细胞坏死、纤维组织增生、肝结构的破坏及假小叶的形成。目前的内科治疗多采用保肝、利尿及补充白蛋白等措施，但大多数患者的肝功能减退是不可逆的，患者的肝细胞数量逐渐降低。肝移植是最理想的治疗方法，但由于受限于供体肝的缺乏、移植后的免疫排斥反应及高额的治疗费用，使其广泛的临床应用受到了限制。近年来，干细胞的临床应用为肝硬化的治疗开辟了新途径。研究表明，脐带血中的干细胞数量明显高于成人外周血及骨髓血中的干细胞[1]，且与骨髓及外周血相比，脐带血干细胞自我繁殖能力最强、繁殖速度最快。本研究通过体外提取、富集脐血干细胞，利用肝动脉途径将分离纯化好的干细胞局部移植到失代偿期肝硬化患者体内，初步观察脐血干细胞移植（Cord Blood Stem Cell Transplantation，CBSCT)治疗失代偿期肝硬化的临床疗效及安全性。

作者简介：贺莉(1980-)，女，硕士，医师，主要从事胃肠道及肝脏病的研究，电话：028-86570307，E-mail：green00008@163.com

(收稿日期：2012-03-14 接受日期：2012-04-08)

1 资料与方法

1.1 一般资料

经医院伦理委员会审核批准，60 例病例选自我院 2009 年 8 月至 2010 年 6 月住院的失代偿期肝硬化患者，其中男性 42 例，女性 18 例；年龄 35～72 岁；44 例为乙肝后肝硬化，6 例为酒精性肝硬化，5 例为胆汁性肝硬化，4 例为丙肝后肝硬化，1 例为血吸虫性肝硬化；Child-Pugh 分级：A 级 7 例，B 级 10 例，C 级 43 例。所有病例均符合失代偿期肝硬化的诊断标准，术前、术后均给予内科保守治疗。所有治疗患者均在知情同意情况下签订《脐血干细胞移植治疗同意书》。

1.2 脐血干细胞采集、分离、计数

选择本院健康足月产妇，术前行输血前九项等的检测，排

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

除乙型肝炎、丙型肝炎、艾滋病、梅毒及其他传染病。胎儿娩出后，在胎盘未娩出时，立即用装有 ACD-B 保存液的一次性采血袋以封闭的方式采血，每袋脐带血量约 70～100 mL。采好的脐带血迅速送入百级层流实验室，采用宁夏中联达生物有限公司生产的《骨髓、脐带血细胞处理试剂盒》[宁（银）食药监械（准）字 2008 第 1400008 号，批号：080611] 提取脐血干细胞，该试剂盒主要利用负收集方法分离，分离过程严格无菌操作，分离完成后，将分离好的细胞用 10～15 mL 生理盐水稀释，混合均匀，取出 10 μL 用流式细胞仪进行单个核细胞与 CD 34+ 细胞计数。其余细胞送入介入室行局部干细胞移植术。

1.3 脐血干细胞移植

经股动脉穿刺插管，行肝固有动脉造影排除肝癌后，将制备好的脐血干细胞悬液以均匀的速度缓慢注入肝左或肝右动脉，术后常规穿刺点加压、包扎，患者穿刺肢制动 24 小时。

1.4 疗效观察

术后常规静脉滴注促肝细胞生长素 1 周，术后 2 周、4 周、8 周观察患者临床症状（乏力、纳差、腹胀、尿量、双下肢水肿）改变及有无不良反应（发热、疼痛、过敏等）发生，同时进行肝功能、凝血的检测，并于 4 周、8 周行腹部 B 超及胃镜检查。

1.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析，数据以均数± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用非参数 Firedman 检验，检验水准为 $\alpha=0.05$，$P<0.05$ 有显著统计学意义。

2 结果

2.1 体外分离纯化脐血干细胞的数量

采集的脐带血量为 70 mL～100 mL，有核细胞计数（Nucleated cell count，TNC）为 6.3×10^7/mL～3.2×10^8/mL，脐带血量与有核细胞总数呈正相关。分离后的干细胞制剂中 CD34＋细胞数为 7.8×10^5/mL～5.6×10^6/mL。

2.2 脐血干细胞移植后患者一般情况

移植后 2 周，54 例（90%）患者食欲明显改善，49 例（81.7%）患者体力好转，41 例（68.3%）患者尿量增多。移植后 4 周，47 例（78.3%）患者腹胀明显减轻。移植后 8 周，37 例（61.67%）患者双下肢水肿消失，47 例（78.3%）患者腹胀明显减轻。

2.3 脐血干细胞移植后生化指标的改变

移植前后对比，血清白蛋白变化最为明显，于第 1 周即可见升高，第 8 周明显升高，统计学 $P<0.01$；干细胞移植后，凝学酶原时间第 8 周下降最明显，统计结果显示 $P<0.01$。总胆红素水平、直接胆红素水平、间接胆红素水平术后均有下降，统计学结果 $P<0.05$。ALT、AST 术后有下降，统计学结果 $P<0.05$，有统计学意义（见表一）。

2.4 脐血干细胞移植后 B 超检查腹水及胃镜检查食道静脉曲张的情况

并发腹水的 51 例患者行腹部 B 超检查，术后 8 周 43 例（84.3%）患者腹水明显减少，4 例（7.8%）腹水消失，3 例（5.9%）腹水增多，1 例（2.0%）腹水无明显变化。60 例患者中有 49 例（81.7%）患者有中度以上的食道静脉曲张，行脐血干细胞移植治疗 8 周后复查胃镜，发现食道静脉曲张没有明显变化。

2.5 脐血干细胞移植后不良反应的发生情况

60 例中 1 例患者出现发热，给予对症处理后体温下降至正常，2 例患者因过度紧张感穿刺处疼痛，给予心理安慰后，疼痛缓解，余患者未发现白细胞下降、感染、过敏、出血等不良反应和并发症。

表 1 60 例肝硬化患者干细胞移植前后肝功及凝血指标的变化

Table 1 Changes in Liver Functions and Coagulation Index before and after Stem Cell Transplantation in 60 Patients with Hepatocirrhosis

Before CBSCT		After CBSCT*		
		2 wk	4 wk	8wk
PT (s)	15.22± 2.64	15.01± 2.56	14.36± 2.44	13.63± 2.01
ALB (g/L)	28.51± 4.84	29.89± 3.95	31.68± 3.79	34.96± 4.18
TBIL (μmol/L)	55.28± 40.58	53.11± 47.63	46.98± 43.49	42.95± 31.14
DBIL (μmol/L)	24.68± 23.37	22.76± 26.20	20.23± 23.71	17.25± 16.95
IBIL (μmol/L)	31.86.± 22.74	31.59± 25.61	27.96± 22.25	26.16± 16.45
ALT(IU/L)	52.24± 63.13	47.98± 39.34	43.58± 31.21	41.56± 27.39
AST(IU/L)	69.90± 33.99	64.77± 36.42	61.72± 39.36	57.12± 27.94

* 注：治疗前与治疗后肝功能及凝血指标相比，$P<0.05$，有统计学意义。

*Note: Compared with before treatment and after treatment, liver function and coagulation index has statistics significance ($P<0.05$).

3 讨论

干细胞是人体内最原始的细胞，是一种具有多分化潜能和自我复制功能的未分化细胞，大量研究证明干细胞不仅可分化为中胚层细胞，还分化为内胚层及外胚层细胞[2,3]，表明干细胞可以跨系、跨胚层分化，具有强大的可塑性。同时，干细胞具有化学趋向性。根据干细胞的这些特性，临床可用于治疗各种细胞或组织损伤性疾病，如肝硬化、糖尿病足[4-6]、溃疡性结肠炎等[7,8]。

目前，临床上用于治疗肝硬化的干细胞，主要包括自体骨

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

髓干细胞和脐血干细胞。国外 Takami T、Ismail A 等[9,10]利用骨髓干细胞治疗肝硬化患者或肝硬化合并肝癌的患者，结果表明患者的肝功能较未治疗组明显好转，且无严重不良反应发生。国内郭晓钟、赵和平[11,12]等利用骨髓干细胞治疗肝硬化也取得了一定的疗效。但自体骨髓干细胞治疗需要采集自体骨髓，患者需承受穿刺的痛苦及承担一定的风险，同时采集得到的干细胞质量受年龄的限制。而脐血干细胞是近年来发现的一类具有与骨髓干细胞相同的多向分化潜能的原始祖细胞。研究表明，脐血干细胞移植在特定环境下可分化成肝细胞样细胞及肝细胞[13-17]，从而参与肝结构和功能的修复和重构。由于脐血干细胞具有取材方便，造血干细胞和间充质干细胞含量丰富，不需要 HLA 严格配型，移植后排异反应弱，移植物抗宿主病（GVHD）出现少，反应轻等特点[18]，越来越受到临床的广泛关注。Zhang Z[19]等利用脐血干细胞治疗了 30 例失代偿期肝硬化患者。随访 1 年，干细胞治疗组与注射生理盐水对照组相比，患者的肝功能明显好转。

本研究通过 60 例脐血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化患者，临床观察及实验室数据分析表明：患者在移植术后 2 周，腹胀、纳差、乏力、尿少等症状明显改善；移植前与移植术后 8 周相比，肝功检测指标中白蛋白水平升高明显，胆红素水平均有一定程度的下降，凝血酶原时间较术前明显缩短。术后 8 周复查 B 超，84.3%的患者腹水明显减少；复查胃镜结果显示，干细胞移植治疗对门脉高压引起的食道静脉曲张无明显疗效。60 例接受治疗的患者术后除 1 例出现发热，2 例穿刺部位疼痛外，余无明显不良反应发生。因此，脐带血干细胞移植治疗失代偿期肝硬化是一种安全、有效的方法，尤其是在提高白蛋白水平及改善凝血功能方面有很好的疗效，但能否能够逆转肝纤维化，还需要长期的随防与肝脏穿刺活检证实。

传统的干细胞分离方法包括：流式细胞仪法、磁珠法、Ficoll（淋巴细胞分离液）法。这些方法操作过程繁琐，存在干细胞丢失较多等问题。《骨髓、脐带血有核细胞体外分离试剂盒》是采用负筛选的一种操作简便获取高纯度干细胞的方法，该试剂盒不损伤干细胞，能完整的保持干细胞原有的生物学活性。我们利用该试剂盒进行脐血干细胞的分离，通过流式细胞仪检测有核细胞回收率 85%以上，细胞存活率 95%以上。在脐血干细胞移植治疗肝硬化的过程中需注意，因脐血有引起疾病传播的风险，故采集前要通过检测排除乙型肝炎、丙型肝炎、艾滋病、梅毒及其他传染病等。

脐血干细胞技术是一项新兴起的技术，目前仍存在很多难题：1、脐血干细胞数量较少，不能满足成年患者的需要。2、脐血干细胞经肝动脉途径到达肝脏后，有多少干细胞能定植于肝脏？有多少细胞能分化为肝脏细胞？定植及转化受到那些因素的影响？3、移植多少干细胞能达到最佳效果，脐血干细胞移植的最佳适应症是什么等。这些问题尚需要我们进一步深入的研究与探讨。

参考文献（References）

[1] Rocha V, Cornish J, Sievers EL, et a1.Comparison of outcomes of unrelated bone morrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia [J]. Blood, 2001, 97(10):2962-2971

[2] Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: implications for neovascularization [J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(1):57-71

[3] Park HW, Lim MJ, Jung H, et al. Human mesenchymal stem cell derived Schwann cell-like cells exhibit neurotrophic effects, via distinct growth factor production, in a model of cord injury [J].Glia, 2010, 58 (9):1118-1132

[4] 彭嘉睿,柯亭羽,车永哲,等.糖尿病足的干细胞治疗[J].生物医学工程与临床,2011,15(4): 385-388
Peng Jia-rui, Ke Ting-yu, Che Yong-zhe, et al. Stem cell treatment of diabetic foot [J]. Biomedical Engineering and Clinical Medicine, 2011, 15(4): 385-388

[5] 杨华强,李东升,杜玲,等.脐血间充质干细胞移植治疗糖尿病足二例并文献复习[J].中国综合临床,2010, 26(9):918-920
Yang Hua-qiang, Li Dong-sheng, Du Ling, et al. Literature review on treatment of type 2 diabetic foot cases with umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation [J]. Clinical Medicine of China, 2010,26(9): 918-920

[6] 闻进朝，黄平平.自体外周血单个核细胞移植治疗严重肢体缺血 30 例:3 年安全性随访 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14 (45):8526-8530
Wen Jin-chao Huang Ping-ping. Autologous peripheral blood mononuclear cells transplantation in treatment of 30 cases of critical limb ischemia: 3-year safety follow-up [J]. Journal of clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(45):8526-8530

[7] 顾嫣, 冉志华.骨髓干细胞治疗炎症性肠病的研究进展[J].胃肠病学和肝病学杂志, 2009, 18(10):889-892
Gu Yan, Ran Zhi-hua. Research progress of stem cell based therapy in inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2009, 18(10):889-892

[8] 江学良.非清髓脐带血干细胞治疗激素抵抗型溃疡性结肠炎临床研究[J].中华消化内镜杂志,2010, 27(8):423-426
Jiang Xue-liang. Non-myeloablative Cord blood stem cell treatment for hormone resistent ulcerative colitis [J]. Chinese Journal of Digestive Endoscopy, 2010, 27(8):423-426

[9] Takami T, Terai S, Sakaida I, et al. Stem cell therapy in chronic liver disease[J].Curr Opin Gastroenterol, 2012, 28(3):203-208

[10] Ismail A, Fouad O, Abdelnasser A, et al. Stem cell therapy improves the outcome of liver resection in cirrhotics [J]. J Gastrointest Cancer, 2010, 41(1):17-23

[11] 郭晓钟,王迪,李宏宇,等.二次自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化与首次移植对比研究 [J]. 中华消化杂志, 2011, 31(8): 545-549
Guo Xiao-zhong, Wang Di, Li Hong-yu, et al. Comparation between first and second autologous bone marrow stem cells transplantation treatment in decompensated liver cirrhosis patients[J]. Chinese Journal of Digestion, 2011,31(8):545-549

[12] 赵和平,丁保华,邵丹,等.自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化患者的疗效观察[J].实用肝脏病杂志,2011,14(6): 424-426
Zhao He-ping, Ding Biao-hua, Shao Dan, et al. Transplantation of autologous bone marrow stem cells via hepatic artery in 425 patients with decompensated cirrhosis [J]. Journal of Clinical Hepatology, 2011,14(6):424-426

[13] Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, et a1. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells [J]. Stem Cells, 2003, 21(2):217-227

（下转第 4857 页）

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

in men with varicocele testis and in control subjects [J]. Br J Urol, 1998, 82: 682

[8] Evers JL, and Collins JA. Surgery or embolisation for varicocele in subfertile men[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2004, 3: CD000479

[9] Bedaiwy MA, Sharma RK, Alhussaini TK, et al. The use of novel semen quality scores to predict pregnancy in couples with malefactor infertility undergoing intrauterine insemination [J]. J Androl, 2003, 24: 353-360

[10] Jarow JP, Sharlip ID, Belker AM, et al. Best practice policies for male infertility[J]. J Urol, 2002, 167: 2138-2144

[11] Abdulmaaboud MR, Shokeir AA, Farage Y, et al. Treatment of varicocele: a comparative study of conventional open surgery, percutaneous retrograde sclerotherapy and laparoscopy [J]. Urology, 1998, 52: 294-300

[12] Al-Kandari AM, Shabaan H, Ibrahim HM, et al. Comparison of outcomes of different varicocelectomy techniques: open inguinal, laparoscopic, and subinguinal microscopic varicocelectomy: a randomized clinical trial[J]. Urology, 2007, 69(3): 417-420

[13] Al-Said S, Al-Naimi A, Al-Ansari A, et al. Varicocelectomy for Male Infertility: A Comparative Study of Open, Laparoscopic and Microsurgical Approaches[J]. J Urol, 2008, 180(1): 266-270

[14] Watanabe M, Nagai A, Kusumi N, et al. Minimal invasiveness and effectivity of subinguinal microscopic varicocelectomy: a comparative study with retroperitoneal high and laparoscopic approaches[J]. Int J Urol, 2005, 12(10):892-898

[15] Barbalias GA, Liatsikos EN, Nikiforidis G, et al. Treatment of varicocele for male infertility: a comparative study evaluating currently used approaches[J]. Eur Urol, 1998, 34(5): 393-398

[16] Cayan S, Kadioglu TC, Tefekli A, et al.Comparison of results and complications of high ligation surgery and microsurgical high inguinal varicocelectomy in the treatment of varicocele [J]. Urology, 2000, 55(5):750-754

[17] Ogura K, Matsuda T, Terachi T, et al. Laparoscopic varicocelectomy: invasiveness and effectiveness compared with conventional open retroperitoneal high ligation[J]. Int J Urol, 1994, 1(1):62-66

[18] 鲁可权, 许承斌, 曹希亮, 等. 四种手术方式治疗精索静脉曲张 412 例临床分析[J]. 医学临床研究，2007, 24(12): 2126-2128
Lu Ke-quan, Xu Cheng-bin, Cao Xi-liang, et al. Clinical Analysis on Four Surgical Methods of 412 Cases with Varicocele [J]. J Clin Res, 2007, 24(12): 2126-2128(In Chinese)

[19] Juni P, Altman DG, Egger M. Assessing the quality of controlled clinical trials[J]. BMJ, 2001, 323: 42-46

[20] Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, et al. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing[J]. Hum Reprod, 1997, 12: 987-993

[21] Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men [J]. N Engl J Med, 2001, 345:1388-1393

(上接第 4871 页)

[14] Moon YJ, Yoon HH, Lee MW, et al. Multipotent progenitor cells derived from human umbilical cord blood can differentiate into hepatocyte-like cells in a liver injury rat model[J]. Transplant Proc, 2009, 41 (10):4357-4360

[15] Liang XJ, Chen XJ, Yang DH, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells by hTERT gene transfection in vitro.[J]. Cell Biol Int, 2012,36(2):215-221

[16] Kakinuma S, Asahina K, Okamura K,et al. Human cord blood cells transplanted into chronically damaged liver exhibit similar characteristics to functional hepatocytes [J]. Transplant Proc, 2007, 39 (1): 240-243

[17] Kim S, Kim HS, Lee E, et al.In vivo hepatic differentiation potential of human cord blood-derived mesenchymal stem cells [J]. Int J Mol Med, 2011, 27(5):701-706

[18] Wagner JE, Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years [J]. Semin Hematol, 2010, 47(1):3-12

[19] Zhang Z, Lin H, Shi M，et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012 ,27 (2):112-120

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net