

· 临床论著 ·

异体骨髓间充质干细胞治疗乙型肝炎终末期肝病的短期疗效及对 Th1/Th2 的影响

于君 彭亮 林炳亮 张耿林 王培培 曹会娟 高志良 罗光汉

【摘要】 目的 初步探讨异体骨髓间充质干细胞(MSCs)治疗终末期肝病的短期疗效及其对Th1/Th2平衡的影响。**方法** 35例乙型肝炎终末期肝病患者分为两组,干细胞治疗(治疗组)13例,均采用内科综合基础上加用MSCs移植治疗;对照组22例,予以内科综合治疗。观察治疗前,治疗后2和4周的丙氨酸氨基转氨酶(ALT)、总胆红素(TBil)、白蛋白(ALB)与凝血酶原活动度(PTA)等指标变化。应用流式细胞仪检测患者外周血IFN- γ 与IL-4的水平,分析Th1/Th2的变化。比较两组患者治疗前后生化指标及治疗组Th1/Th2的变化情况。**结果** 13例患者干细胞移植全部成功且未出现不良反应和并发症,治疗组后4周无死亡病例。治疗组患者的肝功能及凝血功能恢复优于对照组,其中ALT、PTA与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$);而ALB、TBil与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗组患者干细胞治疗后IFN- γ 均升高,其中慢性乙型肝炎肝衰竭患者干细胞治疗后IL-4升高,而乙型肝炎肝硬化患者干细胞治疗后IL-4下降。治疗组干细胞治疗后Th1/Th2较治疗前升高。**结论** MSCs治疗乙型肝炎终末期肝病是安全有效的,对Th1/Th2轴可能有免疫调节作用,但其机制有待进一步研究。

【关键词】 间质干细胞;终末期肝病;肝炎病毒,乙型;Th1-Th2平衡

Short-term effect of allogeneic mesenchymal stem cells in patients with end stage of liver diseases due to HBV and effects on the balance of Th1/Th2 axis YU Jun, PENG Liang, LIN Bing-liang, ZHANG Geng-lin, WANG Pei-pei, CAO Hui-juan, GAO Zhi-liang, LUO Guang-han. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Guangxi medical University, Nanning 530021, China
Corresponding authors: GAO Zhi-liang, Email: zhilianggao@21cn.com; LUO Guang-han, Email: luoguanghan@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the short-term effect of allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) in treatment of the end stage liver disease and effects on the balance of Th1 / Th2 axis. **Methods** Total of 35 patients were divided into two groups, 13 patients were in the group of MSCs combined with internal medical therapy. The others were in the control group. The improvement of liver function and coagulation were compared before and 2, 4 weeks after transplantation. IFN- γ -producing cells (Th1 cells) and IL-4-producing cells (Th2 cells) from the peripheral blood were detected by flow cytometry in the treatment group and the ratio of Th1/Th2 axis was analysed. **Results** The stem cells transplantation were successful in all patients, with no side effects. Four weeks after transplantation, there was no death. The improvement of liver function and blood coagulation in transplantation group were better than control group. Compared with control group, the levels of ALT and PTA in the treatment group were statistically significant ($P < 0.05$). But there was no significant difference in ALB and TBil ($P > 0.05$). The level of Th1 cells increased after stem cells transplantation. Th2 cells level in patients with liver failure were higher after stem cells transplantation than baseline. In patients with liver cirrhosis, the level of Th2 cells decreased after transplantation. All the ratio of Th1/Th2 increased in the treatment group. **Conclusions** Transplantation of allogeneic MSCs can improve liver function of patients with the end stage liver disease due to HBV. And it may have some immune-regulation on the balance of Th1/Th2 axis, though the exact mechanism need further investigation.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; End stage liver disease; Hepatitis B virus; Th1-Th2 balance

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.01.004

基金项目:国家“十一五”计划:艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项项目(2008ZX10002-005)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学第一附属医院感染科(于君、罗光汉);中山大学附属第三医院感染科(彭亮、林炳亮、张耿林、王培培、曹会娟、高志良)

通讯作者:高志良,Email: zhilianggao@21cn.com;罗光汉,Email: luoguanghan@163.com

目前临床上对乙型肝炎相关终末期肝病的治疗尚缺乏切实有效的方法,病死率仍较高。内科综合治疗、抗病毒治疗、人工肝及肝移植手术治疗均存在明显不足之处,难以达到彻底修复肝细胞、提高预后、改善患者生活质量乃至恢复健康的目的,因此临床上亟需寻找其他更有效的治疗措施。研究表明骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有自我更新、高度增殖、多向分化潜能并具有免疫调节等功能,且国内外已有研究表明其可有效改善肝病患者的肝功能^[1-2]。本课题组既往对自体 MSCs 治疗终末期肝病进行了尝试,虽有一定疗效,但由于干细胞数量不足及活性低下,限制其临床推广应用^[3];而异体 MSCs 具有取材方便、扩增迅速和低免疫源性等特点,有望成为治疗乙型肝炎相关终末期肝病的有效措施。

乙型肝炎相关终末期肝病的发病机制复杂、影响因素众多,目前认为体内炎症因子瀑布式的暴发,免疫细胞活性异常,打破免疫平衡,其中 Th1/Th2 的失衡起着重要作用,导致大量肝细胞坏死凋亡,最终引起肝功能衰竭^[4-5]。多项动物模型及体外研究已证实 MSCs 具有广泛的免疫调节及修复肝细胞的作用,但对乙型肝炎相关终末期肝病患者的具体疗效及免疫细胞的调节尚未见报道^[6]。本研究首次报道异体 MSCs 治疗乙型肝炎相关终末期研究的短期疗效及其对 Th1/Th2 平衡的影响。

资料与方法

一、病例选择

病例来源于 2010 年 10 月至 2011 年 3 月在中山大学附属第三医院感染科住院的乙型肝炎相关终末期肝病患者 35 例,其中慢性肝衰竭患者 19 例,失代偿肝硬化 16 例。异体 MSCs 治疗组 13 例,其中肝衰竭患者 6 例,失代偿肝硬化 7 例,均签署知情同意书,符合本院伦理道德委员会规定;其余 22 例设为对照组。所有患者均给予护肝、退黄、抗感染、支持及抗病毒等内科综合治疗,未行人工肝治疗及激素等可能引起免疫变化的治疗措施。两组年龄、性别及治疗前血清学指标差异均无统计学意义(表

1)。肝衰竭及肝硬化诊断及分期均符合 2006 年《肝功能衰竭诊疗指南》和 2010 年《慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准^[7-8]。

二、排除标准

孕妇、哺乳期女性;前 6 个月内接受过干扰素、免疫调节治疗、化疗者;重叠感染 HCV、HDV、HEV 者;自身免疫性疾病、药物性肝损害、酒精性肝病、遗传代谢性肝病患者;合并 HIV 感染、先天免疫功能缺陷性疾病者;确诊为肝癌或其他部位恶性肿瘤患者。

三、异体骨髓间充质干细胞的来源

异体骨髓间充质干细胞为中山大学干细胞与组织工程研究中心保存,干细胞的提取与体外培养符合国家药典及人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则^[9]。

四、干细胞移植方式

3 例终末期肝病患者行外周静脉输注,室温下严格遵守无菌操作,异体 MSCs(细胞数为 5×10^6)重悬于 100 ml 等渗盐水中,输注 30 min 以上,然后用 100 ml 等渗盐水冲管。

五、观察项目

1. Th1/Th2 检测:治疗组患者中慢性乙型肝炎肝衰竭患者于术前和术后 1~4 周,乙型肝炎肝硬化患者于术前和术后 2、4 周分别抽取外周血。分离外周血 T 淋巴细胞,以肝素抗凝。患者外周血用 PBS 倍比稀释后,用淋巴细胞分离液(Ficoll-Hypaque)分离外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC),PBS 洗涤 2 次。计数后以含 10% FBS 的 RPMI-1640 重悬,加入刺激剂,刺激 4.5 h 后标记(IFN- γ 代表 Th1, IL-4 代表 Th2)上机检测。

2. 肝功能检测:对照组与治疗组患者在干细胞治疗前和治疗后 2、4 周进行肝功能检测,分别检测 ALT、ALB、TBil 与 PTA 等指标。

六、统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料的比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 治疗组与对照组治疗前的基线情况比较($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	年龄(岁)	性别(男/女)	ALT(U/L)	ALB(g/L)	TBil(μ mol/L)	PTA(%)
治疗组	13	43.46 \pm 11.47	12/1	65.38 \pm 81.18	34.96 \pm 4.97	241.91 \pm 212.44	46.31 \pm 12.54
对照组	22	47.45 \pm 11.10	17/5	70.36 \pm 37.42	31.89 \pm 4.20	254.58 \pm 200.71	41.22 \pm 13.76
P		0.317	0.377	0.805	0.060	0.861	0.284

注:ALT:丙氨酸氨基转氨酶;ALB:白蛋白;TBil:总胆红素;PTA:凝血酶原活动度

结 果

一、安全性评估

13 例患者干细胞移植全部成功,其过程中未出现不良反应,之后也未出现过敏反应、血管栓塞等并发症,治疗后 4 周内无死亡病例。

二、治疗组生化指标及细胞因子水平与 Th1/Th2 变化

1. 治疗组生化指标变化:治疗组患者血清学指标在治疗后 2 周开始出现变化,至治疗后 4 周多项指标出现显著变化,其中治疗后 4 周 TBil 与治疗前及治疗后 2 周相比,差异均具有统计学意义(P 分别为 0.011 和 0.017),显著优于治疗前及治疗后 2 周;治疗后 4 周 PTA 与治疗前及治疗后 2 周相比,差异具有统计学意义(P 分别为 0.012 和 0.025),显著优于治疗前及治疗后 2 周(见表 2)。

2. 细胞因子水平与 Th1/Th2 的变化情况:治疗组慢性乙型肝炎肝衰竭患者共 6 例,其治疗后 IFN- γ (Th1)较治疗前升高,其中治疗后 3 周与治疗后 1 周比较差异具有统计学意义($P = 0.032$);IL-4 (Th2)与 Th1/Th2 治疗后较治疗前升高,但差异无统计学意义(表 3)。治疗组乙型肝炎肝硬化失代偿期患者共 7 例,其 IFN- γ (Th1)治疗后较治疗前升高;IL-4 (Th2)治疗后较治疗前降低;Th1/Th2 比值治疗后较治疗前升高,其中治疗后 4 周与治疗后 2 周比较差异具有统计学意义($P = 0.020$)(表 4)。

表 3 慢性乙型肝炎肝衰竭患者细胞因子水平与 Th1/Th2 变化情况($\bar{x} \pm s$)

观察时间	例数	IFN- γ (%)	IL-4(%)	Th1/Th2
治疗前	6	17.77 \pm 12.44	2.36 \pm 1.01	7.23 \pm 3.27
治疗后 1 周	6	16.94 \pm 10.97	2.42 \pm 1.11	7.88 \pm 4.50
治疗后 2 周	6	19.29 \pm 7.53	2.95 \pm 1.57	7.27 \pm 2.68
治疗后 3 周	6	22.62 \pm 10.57 ^a	2.89 \pm 1.47	8.12 \pm 1.63
治疗后 4 周	4	18.07 \pm 7.66	2.36 \pm 0.85	7.85 \pm 3.51

注:^a 表示术后 3 周与术后 1 周比较 $P < 0.05$

表 2 治疗组治疗前后肝功能变化情况($\bar{x} \pm s$)

观察时间	ALT(U/L)	ALB(g/L)	TBil(μ mol/L)	PTA(%)
治疗前	65.38 \pm 81.18	34.96 \pm 4.97	241.91 \pm 212.44	46.31 \pm 12.54
治疗后 2 周	35.77 \pm 19.50	37.68 \pm 6.08	201.77 \pm 194.19 ^b	49.62 \pm 13.52 ^b
治疗后 4 周	32.23 \pm 14.02	38.66 \pm 5.60	143.34 \pm 138.42 ^a	53.93 \pm 14.36 ^a

注:^a 表示术后 4 周与术前比较 $P < 0.05$; ^b 表示术后 4 周与术后 2 周比较 $P < 0.05$

表 4 乙型肝炎肝硬化失代偿期患者细胞因子水平与 Th1/Th2 变化情况($\bar{x} \pm s$)

观察指标	例数	IFN- γ (%)	IL-4(%)	Th1/Th2
治疗前	7	16.29 \pm 4.90	3.11 \pm 1.58	6.70 \pm 4.99
治疗后 2 周	6	15.61 \pm 5.93	2.38 \pm 0.93	6.34 \pm 2.35
治疗后 4 周	7	16.80 \pm 5.91	2.52 \pm 1.68	8.13 \pm 3.92 ^a

注:^a 表示术后 4 周与术后 2 周比较 $P < 0.05$

三、两组患者生化指标比较

治疗组患者的 ALT 复常情况优于对照组,术后 2、4 周治疗组与对照组患者 ALT 水平差异具有统计学意义(P 分别为 0.040 和 0.018);术后 4 周治疗组与对照组患者的 PTA 水平差异具有统计学意义($P = 0.036$);而 ALB、TBil 指标与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 5)。

讨 论

目前,乙型肝炎相关的终末期肝病患者的治疗手段,病死率仍较高。虽然肝移植是治疗终末期肝病最有效的治疗手段,但受限于供体不足,费用高昂,术后排斥反应等问题。张阳等^[10]研究证实体外培养扩增的 MSCs 生物学特性正常,无致瘤性,未发现近/远期毒副作用,是作为细胞治疗和基因治疗的理想种子。近年来异体 MSCs 移植治疗乙型肝炎终末期肝病一直是研究的焦点问题。

本研究初步表明异体 MSCs 治疗乙型肝炎终末期肝病安全性良好,治疗过程中患者均未出现严重不良反应和并发症。治疗后患者的肝功能及凝血功能得到恢复,表现为 ALT 与 TBil 水平下降,ALB 与 PTA 水平升高,以上指标提示治疗组的短期疗效优于对照组,但只有部分指标具有统计学差异。异体 MSCs 对恢复肝脏功能,改善预后可起到一定作用。但目前对于异体 MSCs 移植仅作为治疗终末期肝病的一种新的治疗方法加以探索,研究病例数尚少,随访时间短,其远期疗效及最佳移植数量与移植方式,在体内的定植、示踪、具体分化过程及功能重建均有待于进一步的研究。

表 5 移植组与对照组治疗前后血清学指标的变化情况($\bar{x} \pm s$)

分组	ALT(U/L)	TBil(μ mol/L)	ALB(g/L)	PTA(%)
治疗前				
治疗组	65.38 \pm 81.18	241.91 \pm 212.44	34.96 \pm 4.97	46.31 \pm 12.54
对照组	70.36 \pm 37.42	254.58 \pm 200.71	31.89 \pm 4.20	41.22 \pm 13.76
治疗后 2 周				
治疗组	35.77 \pm 19.50 ^a	201.77 \pm 194.19	37.68 \pm 6.08	49.62 \pm 13.52
对照组	62.68 \pm 42.65	282.90 \pm 253.76	36.04 \pm 4.59	40.86 \pm 12.87
治疗后 4 周				
治疗组	32.23 \pm 14.02 ^a	143.34 \pm 138.42	38.66 \pm 5.60	53.93 \pm 14.36 ^a
对照组	51.36 \pm 31.14	225.36 \pm 246.59	38.18 \pm 4.30	41.50 \pm 15.31

注:^a 表示移植组与对照组比较 $P < 0.05$

随着对干细胞的认识,发现其不仅具有细胞修复作用,还具有免疫调节作用,被人们称为“细胞修复的工程师”和“免疫系统的调节者”^[11-12]。干细胞对患者体内免疫微环境的影响尚未有报道,终末期肝病患者体内免疫处于失衡状态,特别是 Th1/Th2 比例失衡。本研究首次观察了治疗组患者治疗前后外周血 Th1、Th2 细胞的水平,患者外周血 Th1 细胞治疗后较治疗前升高。慢性乙型肝炎肝衰竭患者 Th2 细胞治疗后升高,乙型肝炎肝硬化患者 Th2 细胞治疗后较治疗前降低,而 Th1/Th2 治疗后较治疗前升高。林炳亮等^[13]研究证实随着病情加重,Th1/Th2 比值下降,提示短期预后不良,与本研究结果一致,故推测 MSCs 可能对 Th1/Th2 轴具有一定的调节作用。多项体外研究表明 MSCs 抑制 T 细胞的增殖,并抑制其细胞因子的分泌,但并不诱导其凋亡^[14-16]。本研究首次监测了经异体 MSCs 治疗前后患者体内 Th1/Th2 的短期变化,人体内免疫微环境复杂,影响因素众多,具体调控机制尚不明确。推测 MSCs 对治疗后 Th1/Th2 的影响与以下几个因素有关:(1)间充质干细胞治疗的数量;(2)间充质干细胞的移植方式;(3)体内 T 淋巴细胞的数量;(4)体内细胞因子对间充质干细胞趋化到病灶部位的影响^[17];(5)MSCs 自身分泌的可溶性细胞因子(PGE-2、HGF、TGF- β 和 IDO)对体内免疫的影响^[18];(6)患者体内的自身调节。MSCs 对患者体内免疫微环境的调节可能并不是单向的,而是双向、动态的调节。本研究仅监测了患者短期变化,标本例数少,且仅监测了 Th1 与 Th2 两个指标的变化。在后续的研究中应加大研究样本例数,增加监测指标,并进行长时间的动态监测。

参 考 文 献

- 1 Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*, 2006, 24(10): 2292-2298.
- 2 高志良, 彭亮, 崇雨田, 等. 骨髓间充质干细胞自体移植治疗终末期肝病初步临床应用. *中华传染病杂志*, 2007, (3): 181-183.
- 3 Peng L, Li H, Gu L, et al. Comparison of biological characteristics of marrow mesenchymal stem cells in hepatitis B patients and normal adults. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(11): 1743-1746.
- 4 陈瑜, 吴炜, 李兰娟. 重型肝炎患者乙型肝炎病毒特异性细胞毒性 T 淋巴细胞应答功能研究. *中华肝脏病杂志*, 2006, (9): 658-661.
- 5 Masubuchi Y, Sugiyama S, Horie T. Th1/Th2 cytokine balance as a determinant of acetaminophen-induced liver injury. *Chem Biol Interact*, 2009, 179(2-3): 273-279.
- 6 Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 2005, 105(4): 1815-1822.
- 7 中华医学会感染病学分会肝功能衰竭与人工肝学组、中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝功能衰竭诊疗指南. *中华传染病杂志*, 2006, 24(6): 422-425.
- 8 中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版). *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(1): 13-24.
- 9 国家食品药品监督管理局. 人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则. *中国医药技术与市场*, 2003, (4): 11-14.
- 10 张阳, 彭亮, 高志良, 等. 初探体外培养乙肝患者骨髓间充质干细胞的生物安全性及质量控制. *中华肝脏病杂志*, 2011, (6): 445-449.
- 11 Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 2003, 57(1): 11-20.
- 12 van den Berk LC, Figdor CG, Torensma R. Mesenchymal stromal cells: tissue engineers and immune response modulators. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2008, 56(5): 325-329.
- 13 林炳亮, 黄育波, 张晓红, 等. 慢性重型乙型肝炎 Th1/Th2 平衡状态与预后关系的研究. *中华临床感染病杂志*, 2009, 2(5): 264-267.
- 14 Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 2002, 99(10): 3838-3843.
- 15 Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 2005, 105(7): 2821-2827.
- 16 Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, et al. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*, 2007, 25(7): 1753-1760.
- 17 Inderbitzin D, Avital I, Keogh A, et al. Interleukin-3 induces

hepatocyte-specific metabolic activity in bone marrow-derived liver stem cells. J Gastrointest Surg, 2005, 9(1): 69-74.

(收稿日期: 2011-07-12)

- 18 Guo Z, Zheng C, Chen Z, et al. Fetal BM-derived mesenchymal stem cells promote the expansion of human Th17 cells, but inhibit the production of Th1 cells. Eur J Immunol, 2009, 39(10): 2840-

(本文编辑: 孙荣华)

于君, 彭亮, 林炳亮, 等. 异体骨髓间充质干细胞治疗乙型肝炎终末期肝病的短期疗效及对 Th1/Th2 的影响[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(1): 15-19.

