

# 异体骨髓间充质干细胞治疗不同时相慢加急性乙肝肝衰竭患者的疗效

翁伟镇, 陈俊峰, 梅咏予, 李建国, 曹会娟, 谢冬英, 高志良, 林炳亮\*  
(中山大学附属第三医院传染病学教研室, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】探讨异体骨髓间充质干细胞治疗慢加急性乙肝肝衰竭患者合适时机。【方法】91例慢加急性乙肝肝衰竭患者分为两大组, 干细胞治疗组45例, 其中进展期12例, 平台期33例; 对照组46例, 进展期13例, 平台期33例。首要研究终点是比较12周不同组不同期患者生存状况; 次要研究终点是观察干细胞治疗组患者与对照组患者不同时点的胆红素、终末期肝病模型(MELD)评分变化情况。【结果】与对照组相比, 疾病进展期患者12周累积生存率(6/12, 50%)与对照组进展期患者生存率(6/13, 46.2%)比较无统计学差异( $P = 0.202$ ), 疾病平台期患者12周累积生存率(28/33, 84.8%)较对照组平台期患者生存率(18/33, 52.2%)高( $P = 0.0037$ )。在干细胞治疗组中, 疾病进展期患者12周累积生存率较疾病平台期患者12周累积生存率低, 且有统计学差异( $P = 0.009$ )。干细胞组平台期患者总胆红素( $\mu\text{mol/L}$ )在2周、4周较基线变化分别为 $-97 \pm 124$ 、 $-189 \pm 166$ , 而进展期患者在2周、4周较基线变化分别为 $10 \pm 206$ 、 $-10 \pm 275$ , 差异有统计学意义( $P_{2w} = 0.040$ ;  $P_{4w} = 0.013$ )。平台期患者MELD评分在4、12周较基线变化分别为 $-3.8 \pm 4.5$ 、 $-12.5 \pm 5.1$ , 而进展期患者在4、12周较基线变化分别为 $3.8 \pm 8.1$ 、 $-4.7 \pm 5.3$ , 差异有统计学意义( $P_{4w} = 0.000$ ;  $P_{12w} = 0.005$ )。【结论】在慢加急性乙肝肝衰竭疾病平台期进行异体骨髓干细胞移植可以提高患者的生存率。

**关键词:** 骨髓间充质干细胞; 慢加急性肝衰竭; 乙型肝炎

中图分类号: R5 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2013)03-0422-07

## Treatment Effect of Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplantation to Patients in Different Phase of HBV Acute-on-chronic Liver Failure

WENG Wei-zhen, CHEN Jun-feng, MEI Yong-yu, LI Jian-guo, CAO Hui-juan, XIE Dong-ying,  
GAO Zhi-liang, LIN Bing-liang\*

(Department of Infectious Diseases, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the best time for the patients with HBV acute-on-chronic liver failure to undergo allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells transplantation. 【Methods】 A total of 91 inpatients with HBV related acute on chronic liver failure (HBV-ACLF) were recruited and randomized into two groups: MSC-treatment group ( $n = 45$ ) and control group ( $n = 46$ ). 45 patients who received bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSC) transplantation were divided into two subgroups: MSC-advanced group ( $n = 12$ ) and MSC-plateau ( $n = 33$ ); 46 patients as control group received standard medical treatment were divided into two subgroups: Control-advanced ( $n = 13$ ) and Control-plateau ( $n = 33$ ). Primary endpoint include 12 weeks cumulative survival rate in different treatment phase of MSC groups and control groups, and the secondary endpoints are changes of MELD scores and serum total bilirubin in different groups and subgroups. 【Results】 The 12-week cumulative survival rate of the patients was slightly increased in MSC-advanced group (6/12, 50%), but not significantly different than that in control-advanced group (6/13, 46.2%) ( $P = 0.202$ ). And the 12-week cumulative survival rate of patients in MSC-plateau group (28/33, 84.8%) was much higher than that of patients in control-plateau group (18/33, 52.2%) ( $P = 0.0037$ ). Within the MSC treatment groups, the 12-week cumulative

收稿日期: 2013-01-31

基金项目: “十一五”国家重大专项(2008ZX10202); “十二五”国家科技重大专项; (2012ZX10002004); 广东省科技计划项目(2007B060401001); 广东省自然科学基金(9151040701000019)

作者简介: 翁伟镇, 硕士研究生, 主要从事干细胞治疗慢加急性肝衰竭的研究; \* 通信作者: 林炳亮, 博士, 主任医师, 硕士生导师 E-mail: lamikin@126.com

survival rate in MSC-plateau group (84.8%, 28/33) was greater than that of MSC-advanced group (50%, 6/12) ( $P = 0.009$ ). Serum total bilirubin levels of patients in the MSC-plateau group improved from baseline in 2, 4 weeks were  $(-97 \pm 124)\mu\text{mol/L}$ ,  $(-189 \pm 166)\mu\text{mol/L}$  while there were  $(10 \pm 206)\mu\text{mol/L}$ ,  $(-10 \pm 275)\mu\text{mol/L}$  in MSC-advanced group. MELD scores of patients in the MSC-plateau group improved from baseline in 4 and 12 weeks were  $(-3.8 \pm 4.5)$  and  $(-12.5 \pm 5.1)$  while there were  $(3.8 \pm 8.1)$  and  $(-4.7 \pm 5.3)$  in MSC-advanced group. 【Conclusion】 Operating allogeneic peripheral BM-MSCTransplantation in the plateau patients with HBV-ACLF can improve survival rate of the patients.

**Key words:** bone marrow mesenchymal stem cells; acute-on-chronic liver failure; hepatitis B virus

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2013, 34(3):422-428]

慢加急性肝衰竭(acute-on-chronic liver failure, ACLF)是在慢性肝病基础上出现的急性肝功能失代偿<sup>[1]</sup>。在中国,乙型肝炎是导致慢加急性肝衰竭的最常见原因<sup>[2]</sup>,其中肝移植是 ACLF 唯一特效的方法,但由于供体肝源紧缺,移植后排斥反应以及使用免疫抑制剂不良反应限制了其应用<sup>[3]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCT)是一类能在体外分化、增殖,具有自我更新、多向分化潜能的低免疫原性的成体干细胞<sup>[4]</sup>。临床上已将其运用于器官移植后的免疫抑制治疗<sup>[5]</sup>、心肌缺血损伤<sup>[6]</sup>、多发性硬化<sup>[7]</sup>、骨/软骨疾病<sup>[8]</sup>、肝纤维化<sup>[9]</sup>等,并取得良好疗效。本课题组研究显示自体 MSC 治疗终末期肝病、异体 MSC 治疗慢加急性肝衰竭<sup>[10]</sup>取得一定疗效,提示 MSC 作为慢加急性肝衰竭的一种新型治疗手段,有其广阔前景,但其治疗时机的选择是否会影响到干细胞治疗的疗效,目前尚未有相关研究。慢加急性肝衰竭的病程一般经历了疾病进展期、平台期及恢复期<sup>[11]</sup>。在病程的不同时期患者肝脏受到的损伤打击、体内免疫状态均不尽相同<sup>[12]</sup>。因此在疾病发生发展过程中何时选用干细胞治疗,是临床上值得探讨的一个问题。本研究对所有进行异体骨髓间充质干细胞移植患者治疗前后的病情进行分析,将患者划分为疾病进展期和疾病平台期,进而比较不同时相患者进行干细胞治疗的效果,为临床选择合适的干细胞治疗时机提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对象

所有病例均为本院 2010 年 10 月到 2012 年 9 月住院病人,共 91 人;其中经单纯内科治疗患者 46 例,年龄 $(40.1 \pm 9.5)$ 岁,在内科治疗基础联合骨髓间充质干细胞治疗患者 45 例,年龄 $(44.7 \pm 9.2)$ 岁。所有患者均符合 2009 年 APASL 关于慢加

急性乙肝肝衰竭诊断标准,年龄 16 ~ 60 岁,并且排除重叠其他肝炎病毒、自身免疫性疾病、酒精性肝病、药物性肝病,合并严重并发症、心肺肾等重要脏器功能衰竭、恶性肿瘤患者。根据 7 d 内总胆红素平均每日上升是否 $\geq 17.1 \mu\text{mol/L}$ ,以及患者从总胆红素大于  $171 \mu\text{mol/L}$  到输入干细胞的时间(进展期约 20 d,平台期约 40 d)为基础,将不同组患者划分为疾病进展期和平台期,其中干细胞组疾病进展期(MSC-Advance)12 人,平台期(MSC-plateau)33 人,对照组疾病进展期(Control-Advance)13 人,平台期(Control-plateau)33 人。各组患者年龄、性别及治疗前血清学指标、并发症差异均无统计学意义(表 1)。

### 1.2 研究方法

1.2.1 治疗方案 所有患者均接受标准内科综合治疗,包括抗感染、护肝、退黄、输注血浆、白蛋白、恩替卡韦抗病毒治疗等;干细胞治疗组在标准内科综合治疗基础上,按体质量通过外周静脉注入异体骨髓间充质干细胞,每周 1 次,共 4 次,每次移植 BM-MSCT 量为  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6/\text{kg}$ 。

1.2.2 骨髓间充质干细胞的采集、分离、冻存、复苏 从健康志愿者髂骨中抽取骨髓约 50 mL,然后用 1:1 磷酸盐缓冲液(PBS 液)稀释,加入聚蔗糖-泛影葡胺分离液( $1.077 \text{ g/mL}$ ,华精生物高科技有限公司,中国上海), $2\ 000 \text{ r/min}$ (离心半径  $r = 10 \text{ cm}$ ), $20 \text{ min}$ ,收集单个核细胞,在加入  $100 \text{ mL/L}$  胎牛血清的低糖 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(L-DMEM;Hyclone, Logan, Utah)中重悬,在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  体积分数 5%的  $\text{CO}_2$  的环境中培养,待贴壁细胞长至 80%左右换液,以后约每 3 d 进行传代培养,第 10 代冻存于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ ,待需要时复苏解冻,于生理盐水中  $1\ 100 \text{ r/min}$ , $4 \text{ min}$  洗涤 3 次,根据患者所需要细胞数重悬于  $40 \text{ mL}$  生理盐水中以备患者使用。

1.2.3 干细胞输注方法 将  $40 \text{ mL}$  混有骨髓间充

表 1 干细胞治疗组与对照组各期患者基线情况比较

Table 1 Comparison of clinical, biochemical and virological characteristics of patients in the MSC treatment and control

Group	Stage	group		[ $\bar{x} \pm s$ or (M; Q3-Q1)]								
		n	male	Age(years)	ALT(U/L)	ALB(g/L)	TBil( $\mu$ mol/L)	PTA(%)	HBeAg(+/-)	HBV-DNA loads(lg U/mL)	MLED score	
MSC	Advanced	12	12	39.9 $\pm$ 9.9	137;711)	34.6 $\pm$ 5.2	587 $\pm$ 143	35 $\pm$ 12	4/8	3.9; 6.0	27.0 $\pm$ 4.9	
	Plateau	33	32	40.2 $\pm$ 9.5	69; 692)	37.2 $\pm$ 5.4	493 $\pm$ 164	36 $\pm$ 10	10/23	3.5; 2.2	24.6 $\pm$ 3.6	
Control	Advanced	13	13	45.2 $\pm$ 6.8	221; 2233)	33.8 $\pm$ 3.5	530 $\pm$ 82	30 $\pm$ 11	5/8	5.1;2.4	27.7 $\pm$ 3.3	
	Plateau	33	33	44.5 $\pm$ 10	64;52	36.3 $\pm$ 4.4	477 $\pm$ 123	35 $\pm$ 11	8/25	4.5; 2.5	25.6 $\pm$ 4.4	
$\chi^2$ or <i>F</i>				1.777	1.812	24.027	2.011	1.812	1.305	1.031	6.956	2.288
<i>P</i>				0.620	0.151	0.000	0.118	0.151	0.278	0.794	0.073	0.084

ALT, alanine aminotransferase; ALB, albumin; PTA, prothrombin activity; HBeAg, hepatitis B e antigen; HBV, hepatitis B virus; MELD, Model for End-Stage Liver Disease. 1) vs. MSC-Plateau; Z=-2.837, P = 0.004; 2) vs. Control-Plateau; Z = -0.449, P = 0.653; 3) vs. Control-Plateau; Z=-3.819, P=0.000.

质干细胞的生理盐水用 50 mL 注射器抽取后,用静脉输液泵经外周静脉缓慢输注,时长约 30 min,期间监测患者生命体征。

1.2.4 肝肾功能检测 检测患者基线、2 周、4 周、8 周、12 周肝肾功能、凝血功能,并根据终末期肝病模型(model for end stage liver disease, MELD)评分公式计算 MELD 评分: $9.6 \times \ln [\rho_{Cr}/(\text{mg/dL})] + 3.8 \times \ln [\rho_{Tbil}/(\text{mg/dL})] + 11.2 \times \ln(\text{INR}) + 6.4$ ,其中,  $\rho_{Cr}$  为血清肌酐质量浓度,  $\rho_{Tbil}$  为血清总胆红素质量浓度, INR 为国际标准化比值。

1.3 统计方法

使用 SPSS 13.0 软件包统计,患者的临床及生化指标采用平均数  $\pm$  标准差或中位数、四分位间距进行描述;使用 *t* 检验、卡方检验/Fisher 确

切概率法、Mann-Whitney U 及 Kruskal-Wallis H 秩和检验进行两者间比较,使用方差分析、Kruskal-Wallis H 秩和检验进行多组定量资料的比较,卡方检验进行多组定性资料的比较,使用 Greenhouse-Geisser 进行重复测量定量资料的分析;通过 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,并用 Log-rank 法进行生存曲线比较。当  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干细胞平台期患者较对照组平台期患者生存率高

与对照组相比,干细胞治疗组疾病进展期患

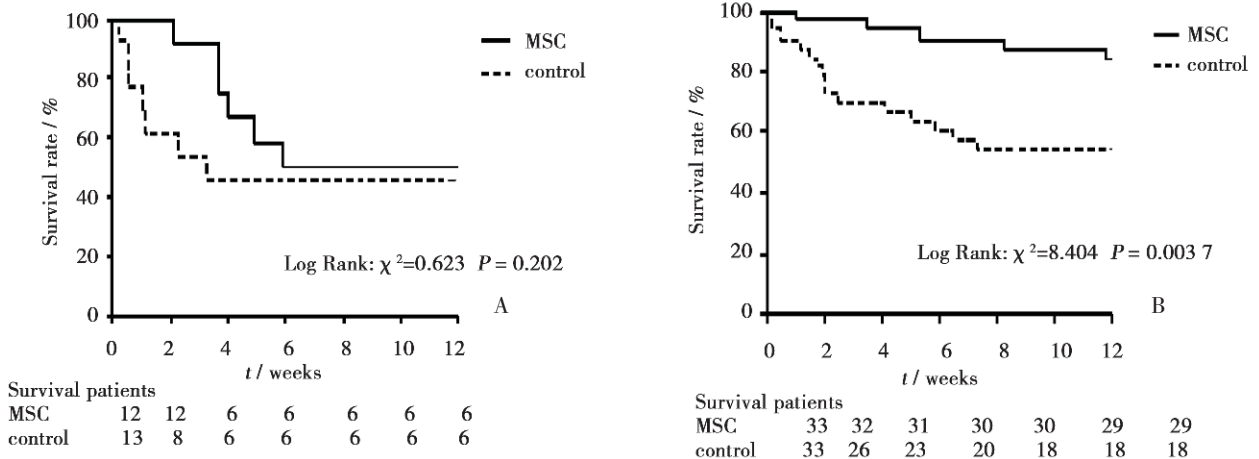


图 1 两组患者与对照组患者 12 周累积生存率比较

Fig.1 12-week cumulative survival rate of patients in MSC-advanced group and control-advanced group

A: Advanced stage. The 12-week cumulative survival rate in MSC-advanced group and control-advanced group has no statistical difference,  $\chi^2=0.623$ ,  $P=0.202$ . B: Plateau stage. The 12-week cumulative survival rate in MSC-plateau group was higher than that of control-plateau group,  $\chi^2=8.404$ ,  $P=0.0037$

者 12 周累积生存率(6/12, 50%)与对照组进展期患者生存率(6/13, 46.2%)比较无统计学差异( $\chi^2 = 0.623, P = 0.202$ ),干细胞治疗组疾病平台期患者 12 周累积生存率较对照组平台期患者生存率高( $\chi^2 = 8.404, P = 0.0037$ ;图 1A、B)。

### 2.2 干细胞治疗平台期患者较干细胞治疗进展期患者生存率高

经干细胞治疗平台期患者生存率较干细胞治疗进展期患者生存率高。在干细胞治疗组中,疾病进展期患者 12 周累积生存率较疾病平台期患者 12 周(28/33, 84.8%)累积生存率低,且有统计学差异( $\chi^2 = 6.651, P = 0.009$ ;图 2)。

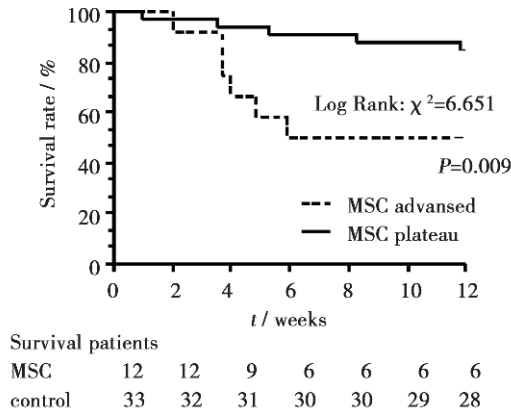


图 2 干细胞治疗进展期与平台期患者 Kaplan-Meier 生存曲线

Fig.2 12-week cumulative survival rate of patients in MSC-plateau group and MSC-advanced group

Within the MSC treatment groups, the 12-week cumulative survival rate in MSC-plateau group was higher than that of MSC-advanced group,  $\chi^2 = 6.651, P = 0.009$

### 2.3 干细胞组不同时相患者各时点总胆红素、MELD 评分的比较

进展期患者与平台期患者不同分组与时间进展的相互作用有统计学意义 ( $F = 5.584, P = 0.014$ ),比较其各时间点的情况:平台期患者在 2 周、4 周时总胆红素下降较进展期快,而在 4 周、12 周时 MELD 评分的下降也较进展期患者快。比较两期患者的总胆红素、MELD 评分下降程度的差异,平台期患者在 2 周( $t = 2.123, P = 0.040$ )、4 周( $t = 2.597, P = 0.013$ )时总胆红素( $\mu\text{mol/L}$ )下降分别为 $-97 \pm 124$ 、 $-189 \pm 166$ 较进展期患者  $10 \pm$

$206, -10 \pm 275$  快,而 8 周、12 周无差异 ( $P > 0.05$ );平台期患者在 4 周( $t = 3.884, P = 0.000$ )、12 周( $t = 3.069, P = 0.005$ )时 MELD 评分分别为 $-3.8 \pm 4.5$ 、 $-12.5 \pm 5.1$ 下降较进展期  $3.8 \pm 8.1$ 、 $-4.7 \pm 5.3$ 快( $P > 0.05$ ;图 3)。

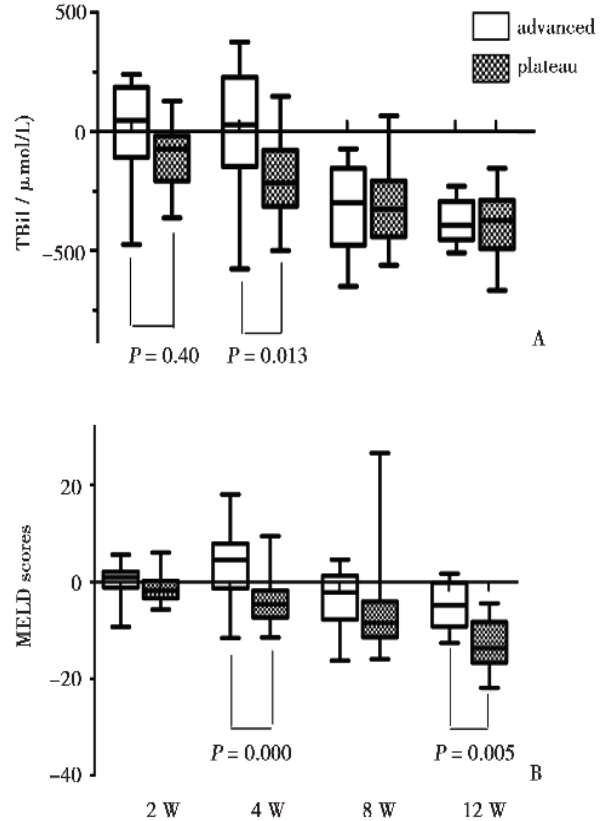


图 3 干细胞治疗组进展期与平台期患者总胆红素、MELD 评分与基线变化的比较

Fig.3 Improvement of TBil and MELD score from baseline in MSC-advanced and MSC-plateau

A: Total bilirubin decreased more in patients in MSC-advanced group than patients in MSC-plateau group at the time point of 2nd week and 4th week,  $P_{2w} = 0.040, P_{4w} = 0.013$ . B: MELD score decreased more in patients in MSC-advanced group than patients in MSC-plateau group at the time point of 4th week and 12th week,  $P_{4w} = 0.000, P_{12w} = 0.005$ . Neither total bilirubin nor MELD score had statistical difference at other time point.

## 3 讨论

目前,干细胞治疗已经作为一种潜在的有效疗法逐渐开始使用于临床各领域,包括肝硬化<sup>[13]</sup>、肝衰竭<sup>[10]</sup>等,动物实验也见应用于肝脏缺血再灌

注<sup>[14]</sup>、非酒精性肝炎<sup>[15]</sup>等,结果提示其安全性、可行性和疗效均较佳。本课题组通过对慢加急性肝衰竭患者行骨髓间充质干细胞治疗,结果显示干细胞治疗组平台期的患者病死率下降。但如何优化骨髓间充质干细胞移植的疗效,诸如移植途径、移植剂量、移植时机目前仍缺乏相关的研究。本研究提示异体骨髓间充质干细胞移植可以提高平台期慢加急性乙肝肝衰竭患者的生存率,而对进展期患者的疗效欠佳。

肝衰竭的发生发展过程在临床上存在 4 个时相:进展前期、进展期、平台期、恢复期<sup>[11]</sup>。本课题组研究显示乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭患者其肝组织依次经受了免疫损伤、缺血缺氧和内毒素血症等三重致死性打击<sup>[12]</sup>。慢加急性肝衰竭的发展是由于级联事件的发生导致的肝脏损伤进行性加重所致,比如感染、出血、黄疸、腹水等,其中感染与肝功能紊乱导致的促炎环境继续进展将加剧内循环紊乱,使肝脏细胞持续大量坏死并最终导致多器官功能衰竭<sup>[16]</sup>。一些关于干细胞治疗脊髓损伤<sup>[17]</sup>、肾损伤<sup>[18]</sup>的临床试验以及动物试验提示在损伤的早期阶段或者疾病的急性/亚急性阶段是最佳的干细胞治疗时机。本课题组根据患者 7 d 内总胆红素每日上升是否  $\geq 17.1 \mu\text{mol/L}$ , 以及患者从总胆红素大于  $171 \mu\text{mol/L}$  到输入干细胞的时间为基础,将患者划分为疾病进展期和疾病平台期进行干细胞治疗,发现患者在疾病进展期进行干细胞治疗患者 12 周累积生存率与对照组 12 周累积生存率相近,而患者在疾病平台期进行干细胞治疗者 12 周累积生存率明显高于对照组 12 周累积生存率组,且进展期患者 12 周生存率明显较平台期患者 12 周生存率低。比较两期患者总胆红素、MELD 评分,显示平台期患者总胆红素在 2 周、4 周较进展期患者下降快,而在第 8 周及 8 周以后进展期患者与平台期患者总胆红素差别无统计学意义,可能与进展期患者在 8 周内死亡人数较多,8 周后患者例数太少有关;而平台期患者 MELD 评分在 4 周、12 周较进展期患者下降快,提示干细胞对平台期患者近期以及远期 MELD 评分改善均有所帮助。

而关于 MSC 治疗肝病的临床实验以及动物实验已见相关报导,效果较显著。本课题组利用骨髓间充质干细胞治疗慢加急性肝衰竭患者,同样提示干细胞治疗对患者存活率有所提升,并对胆

红素、MELD 评分改善有所帮助。MSC 主要通过以下几个机制发挥作用:①分化成不同的细胞系发挥组织修复功能;②释放、刺激细胞自分泌对细胞生存和增殖有利的可溶性因子;③确切地转移至损伤部位并通过细胞接触、释放可溶性免疫抑制因子发挥免疫调节作用<sup>[19]</sup>。MSC 已被证实在体外能被诱导并分化成内胚层系如肺细胞、肌细胞,中胚层系如成骨、脂肪细胞,外胚层如上皮细胞等<sup>[4]</sup>,关于 MSC 促进肝脏细胞再生已有不少相关研究。研究表明,骨髓间充质干细胞在体外与纤维原细胞生长因子-4<sup>[20]</sup>、肝细胞生长因子<sup>[21]</sup>、致瘤素 M<sup>[22]</sup>、白血病抑制因子<sup>[23]</sup>、肝细胞核因子-3 $\beta$ <sup>[24]</sup>等共培养后能分化成肝细胞样细胞,并表现出肝细胞的特征如分泌甲胎蛋白、甲状腺运转蛋白、角化蛋白、尿素、白蛋白等。同时也有研究发现将骨髓间充质干细胞与小鼠肝细胞<sup>[25]</sup>、人类肝细胞<sup>[26]</sup>共培养也可使干细胞分化成肝细胞样细胞。另外,一些动物实验提示 MSC 能促进部分肝切除或肝移植的小鼠其肝脏再生,均提示 MSC 能促进肝脏细胞再生,完成损伤组织修复<sup>[27]</sup>。

而 MSC 的免疫调节功能同样在其治疗过程中发挥重要作用。MSC 可以通过由粘附分子介导的细胞间接触<sup>[28]</sup>以及可溶性免疫抑制因子如 IDO、PGE2、IFN- $\gamma$ 、TGF $\beta$ 1、iNOS 等<sup>[29-31]</sup>的释放来发挥免疫调节作用,相关研究表明 MSC 对固有免疫细胞如 NK 细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞、DC 细胞以及适应性免疫细胞如 T 细胞、B 细胞等均有抑制作用,可以抑制免疫细胞的活化、增殖以及相关功能<sup>[32]</sup>。而 HBV 所致肝脏损伤主要依赖于宿主的免疫反应,即机体对病毒感染细胞的清除能力。HBV 引起的免疫损伤以细胞免疫为主,体液免疫为辅助,包括树突状细胞、NK 细胞、CTL 细胞等均参与免疫损伤过程<sup>[33]</sup>。NK 细胞作为固有免疫的重要细胞,在抗感染、肿瘤等过程中发挥重要作用。NK 细胞可以通过上调 FasL、TRAIL、Perforin 等表达,直接造成肝细胞死亡,同时也可以通过释放 IL-4、IL-5、IFN- $\gamma$ , 进一步诱导固有免疫细胞 Kupffer 细胞、肝窦内皮细胞、巨噬细胞活化,从而直接促使肝细胞死亡,也可分泌趋化因子 MIP-2、MCP-1、IP-10 等,招募并活化免疫效应细胞如 NK 细胞、NKT 细胞、巨噬细胞至肝脏并造成肝细胞死亡<sup>[34]</sup>。有研究发现,慢加急性肝衰竭患者体内的 NK 细胞活性明显升高,且受体 NKp30 和 NKp46

的升高与疾病的进展有关,同时发现NK细胞介导的肝损伤是通过Fas/FasL及NKG2D/NKG2D配体途径<sup>[35]</sup>。本课题组通过对部分行干细胞治疗的慢加急性肝衰竭患者行NK细胞相关抗体标记并流式检测(结果尚未发表),初步结果显示进展期患者NK细胞比例较平台期患者高,且抑制性受体KIR2DL3在平台期患者表达上升,同时FasL表达在进展期也明显较平台期患者高。考虑在进展期外周血NK细胞更多地聚集于肝脏内,故外周血中NK细胞比例较平台期少;同时进展期抑制性受体KIR2DL3表达较低,FasL表达较高,考虑进展期患者肝脏内NK细胞相对较平台期患者更活跃,较活跃的NK细胞对外来的进入肝脏内的MSC具有杀伤作用,从而使在患者体内发挥作用的MSC数目较少,因此在进展期行干细胞治疗疗效较差。

因此,对于慢加急性乙型肝炎衰竭患者选择干细胞治疗,在疾病平台期行干细胞治疗能取得更好的疗效,同时造成这种疗效差异与患者体内NK细胞状态有关。但由于进展期患者病例数目仍较少,随访时间短,对于远期的生存率、致癌可能性仍未有定论,同时关于干细胞最佳移植细胞数量、移植方式、不同种类干细胞移植疗效是否存在差异均需进一步研讨,而且相关免疫监测指标不足,应在后续研究中增加病例数,对其他免疫细胞如T细胞、B细胞等进行检测,同时行长期的动态检测。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 刘晓燕,胡瑾华,王慧芬. 1977例急性、亚急性、慢加急性肝衰竭患者的病因及转归分析[J]. *中华肝脏病杂志*, 2008, 17(8): 269-282.  
Liu XY, Hu JH. Etiological analysis of 1977 patients with acute liver failure, subacute liver failure and acute-on-chronic liver failure[J]. *Chin J Hepatol*, 2008, 17(8): 269-282
- [3] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南[J]. *中华肝脏病杂志*, 2006, 14(9): 643-646.  
Liver Failure and Artificial Liver Group, Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. Diagnostic and treatment guidelines for liver failure [J]. *Chin J Hepatol*, 2006, 14(9): 643-646.
- [4] Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: A perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches[J]. *Eur Cells Mater*, 2010, 20(9): 121-133.
- [5] Tan J, Wu W, Camillo Ricordi EA. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: A randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2012, 307(11): 1169-1178.
- [6] Mathieu E, Lamirault G, Toquet C, et al. Intramyocardial delivery of mesenchymal stem cell-seeded hydrogel preserves cardiac function and attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction[J]. *PloS One*, 2011, 7(12): 1-12.
- [7] Connick P, Kolappan M, Crawley C. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study[J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11(2): 1-7.
- [8] Davatchi F, Abdollahi BS, Mohyeddin M. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients[J]. *Intern J Rheu Diseases*, 14(2): 211-215.
- [9] Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cells injection: a phase I-II clinical trial [J]. *Eur J Gastroen Hepat*, 2009, 21(10): 1199-1205.
- [10] Peng L, Xie D, Lin B. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes[J]. *Hepatology*, 2011, 54(3): 820-828.
- [11] 张耿林,高志良. 乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭的免疫学特征及治疗策略[J]. *中国病毒病杂志*, 2011, 1(1): 5-8.  
Zhang GL, Gao ZL. The immunological characteristics of and treatment strategies for HBV related acute on chronic liver failure[J]. *Chin J Viral Dis*, 2011, 1(1): 5-8
- [12] 叶一农,高志良. 乙型肝炎肝衰竭发生机制中的三重打击[J]. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(8): 638-640.  
Ye YN, Gao ZL. Three shock hypotheses that may induce liver failure[J]. *Chin J Hepatol*, 2009, 17(8): 638-640.
- [13] Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M. Phase 1 trial of autologous bone marrow

- mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis [J]. Arch Iran Med, 2007, 10(4): 459-466.
- [14] Kanazawa H, Fujimoto Y, Teratani T, et al. Bone marrow -derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model [J]. PLoS One, 2011, 6(4): 1-8.
- [15] Ezquer M, Ezquer F, Ricca M, et al. Intravenous administration of multipotent stromal cells prevents the onset of non-alcoholic steatohepatitis in obese mice with metabolic syndrome [J]. J Hepatol, 2011, 55(5): 1112-1120.
- [16] Sen S, Williams R, Jalan R, et al. The pathophysiological basis of acute-on-chronic liver failure [J]. Liver, 2002, 22(2): 5-13.
- [17] Komatsu K, Honmou O, Suzuki J, et al. Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2010, 1334(7): 84-92.
- [18] de Vasconcelos Dos Santos A, da Costa Reis J, Diaz Paredes B. Therapeutic window for treatment of cortical ischemia with bone marrow-derived cells in rats [J]. Brain Res, 2010, 1306(9): 149-158.
- [19] Wang J, Liao L, Tan J. Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions [J]. Expert Opin Biol Ther, 2011, 11(7): 893-909.
- [20] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells [J]. J Clin Invest, 2002, 109(10): 1291-1302.
- [21] Tang L J, Gao Y, Zhang Z. Human bone marrow multipotent adult progenitor cells differentiate into hepatocyte-like cells with hepatocyte growth factor plus fibroblast growth factor-4 in vitro [J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2005, 13(9): 652-655.
- [22] Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. Hepatology, 2004, 40(6): 1275-1284.
- [23] Lysy PA, Smets F, Najimi M. Leukemia inhibitory factor contributes to hepatocyte-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Differentiation, 2008, 76(10): 1057-1067.
- [24] Ishii K, Yoshida Y, Akechi Y. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta [J]. Hepatology, 2008, 48(2): 597-606.
- [25] Deng X, Chen YX, Zhang X. Hepatic stellate cells modulate the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells [J]. J Cell Physiol, 2008, 217(1): 138-144.
- [26] Jiang ZS, Gao Y, Mu N. Multipotent adult progenitor cells from human bone marrow differentiate into hepatocyte-like cells induced by co-culture with human hepatocyte line [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2007, 87(6): 414-418.
- [27] Fouraschen SM, Pan Q, de Ruiter PE. Secreted factors of human liver-derived mesenchymal stem cells promote liver regeneration early after partial hepatectomy [J]. Stem Cells, 2012, 21(13): 2410-2419.
- [28] Cho JW, Lee CY, Ko Y. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells overexpressing human forkhead box A2 gene in the regeneration of damaged liver tissues [J]. Liver Transplantation, 2012, 27(8): 1362-1370.
- [29] Krampera M, Cosmi L, Angeli R. Role for interferon- $\gamma$  in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2006, 24(2): 386-398.
- [30] Ren G, Zhang L, Zhao X. Mesenchymal stem-cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide [J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 141-150.
- [31] Meisel R, Zibert A, Laryea M. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase mediated tryptophan degradation [J]. Blood, 2004, 103(12): 4619-4621.
- [32] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. Blood, 2005, 105(4): 1815-1822.
- [33] Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells [J]. Trends Mol Med, 2012, 18(2): 128-134.
- [34] 高海兵, 许利军, 潘晨. 慢性乙型肝炎病毒感染者外周血 T 细胞亚群及 NK 细胞的特点及意义 [J]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2009, 3(1): 13-19.
- Gao HB, Xu LJ. Characteristic and clinical significance of peripheral blood T cells subsets and NK cells in patients with chronic hepatitis B [J]. Chin J Exp Clin Infect Dis (E Ed), 2009, 3(1): 13-17.
- [35] Zou Y, Chen T, Han M. Increased killing of liver NK cells by Fas/Fas Ligand and NKG2D/NKG2D Ligand contributes to hepatocyte necrosis in virus-induced liver failure [J]. J Immunol, 2011, 184(1): 466-475.