

# 肾脏前体干细胞对慢性肾病治疗的疗效：一项队列研究

尽管现代医疗科学取得了巨大成就，慢性肾病(CKD)仍然被认为是无法攻克疾病。慢性肾病由各种各样的病理因素引起，其特点是由于存在功能性肾单位损失导致肾功能逐步恶化。由于缺乏确定性治疗，慢性肾病将可能形成晚期肾衰竭，导致不得不进行血液透析或肾移植。本文展示了干细胞治疗应用于 3a 和 3b 期慢性肾病患者的合并数据。在一组共 23 名 3a 和 3b 期患者中，研究了前体细胞移植对肾功能状况指标的影响。移植六个月和一年后，干细胞移植结果评估表明，78.5%的 3a 期慢性肾病患者的血清肌酐水平和肾小球滤过率均得到了改善和提高。在 3b 期慢性肾病患者组，66.7%肾功能检测指标得到了改善，并出现了慢性肾病降期。胚胎前体细胞在慢性肾病治疗中的应用是一种前景广阔的治疗模式，需要进行进一步分析和持续的临床试验。

**关键词：**肾；肾功能衰竭；前体干细胞；异种器官移植；肾脏修复

## 前言

慢性肾病的特点是，功能性肾单位损失导致肾功能逐步恶化。慢性肾病的主要病因包括高血压、糖尿病、肾结石、复发性尿路感染以及各种自身免疫系统失调等。尽管现代医学科技取得了巨大成就，慢性肾病仍然被认为是不可逆的，并且会逐步恶化，最终将导致晚期肾功能衰竭 (ESRF)，随后患者将不得不采取常规的血液透析或肾移植。血液透析意味着需要面临高发病率、高成本治疗以及终身术后管理和后续治疗(El Nahas 和 Bello, 2005)。

这种情况促使医生探索先进的新型疗法，从而恢复肾功能，或者至少显著延缓慢性肾病进展。最近的研究表明，干细胞治疗法是最有希望恢复肾单位功能的疗法(Hopkins 等, 2009; Benigni 等, 2010; Gilbert 等, 2012; Li 和 Wingert, 2013)。

成人的肾脏由几十万到一百万肾单元组成。肾脏由各类肾细胞组成，包括肾小球足细胞、肾小管上皮细胞、肾小管内皮细胞、肾小管周皮细胞、间质纤维母细胞和树突细胞(Martin 和 Parkhurst, 2004; Romagnani, 2011; Romagnani 等, 2013)。一生中，不同的肾细胞具有不同的细胞周期，但总体上来说，肾脏细胞周期明显低于其他器官细胞(Ronconi 等, 2009a, b; Smeets 等, 2013; Liu, 2011)。

由于急慢性损伤，例如炎症、缺血及自身免疫过程，肾脏会启动各种再生机制，包括肾代偿性肥大、细胞增殖、内源性肾细胞重编程、肾祖细胞分化、肾系膜细胞增殖及转移、骨髓细胞迁移到肾脏和血管生成(Liu, 2011; Choudhury 和 Levi, 2011)。一些细胞，例如间充质干细胞，能够分化为上皮细胞，有些肾上皮细胞具备去分化能力，从而进一步增殖、迁移和分化为必要的细胞类型(Lazzeri 等, 2007; Ezquer 等, 2012; Fleig 和 Humphreys, 2014; Maeshima 等, 2006)。然而，在怀孕 36-38 周肾器官形成后，万能肾祖干细胞池将不再出现(Aggarwal 等, 2013; Sagrinati 等, 2006)。肾脏的再生潜能如此有限，导致我们在治疗肾功能衰竭时别无选择，只能使用干细胞(Romagnani 和 Remuzzi, 2013)。

本文的目的是为了评估干细胞对慢性肾病治疗的应用以及评价胚胎前体干细胞疗法对于缓解肾功能衰竭程度的潜力的现有数据。

## 文献综述

### 干细胞变体疗法

当前，只有少数几种干细胞可供使用：骨髓源细胞 (BMDCs)、胚胎 (ES) 干细胞、自体脂肪间充质干细胞(ADMSCs)，诱导多能干细胞(iPS)以及肾祖干细胞。

脂肪间充质干细胞(ADMSCs)能够分化成脂肪、骨骼、软骨以及肌肉细胞。脂肪间充质干细胞容易大量培养和收获，并具有抗炎症和免疫调节功能(D'Addio 等, 2014; Ni 等, 2015)。然而，其好处在于会受炎症过程的抑制，并无数据证实脂肪间充质干细胞可分化为肾细胞。因此，就肾功能衰竭降期或减缓进展而言，脂肪间充质干细胞并没有显著的作用。

肾衰竭中最常用的干细胞是骨髓间充质干细胞(MSCs)。目前关于骨髓间充质干细胞对于肾衰竭的疗效的科学证据尚且存在争议(Ezquer 等, 2008, 2009; Reinders 等, 2013; Volarevic 等, 2011; Chamberlain 等, 2007; Zhang 和 Zhao, 2014)。一些研究指出了骨髓间充质干细胞在阻止肾间质纤维化方面的作用，认为这主要是为了避免进一步的损伤，而非因为受损肾实质的再生(Lv 等, 2014; Ezquer 等, 2015)。其他的研究则缺乏对骨髓间充质干细胞移植的临床试验(Liu, 2011; Leuning 等人, 2014; Herrera and Mirotsoiu, 2014)。尽管存在骨髓间充质干细胞对治疗肾衰竭具有潜在优势的数据，底线依旧是骨髓间充质干细胞只有极小的肾分化潜质。

胚胎干细胞(ESC)是来源于囊胚的内细胞团的多功能干细胞。理论上，这些细胞有望被用于任何器官和组织的再生疗法。实际上，几乎没有实验证明胚胎干细胞能分化为肾上皮细胞，然而，胚胎干细胞曾经直接引导形成后肾，可相当有效地分化为肾小管上皮细胞(Lam and Bonventre, 2015; Couri 和 Voltarelli, 2009; Roche 等, 2006; Chou 等, 2014)。然而，多项研究证实，胚胎干细胞移植导致由全部三胚层所组成的分化型肿瘤的形成，这类似于自发性人类畸胎瘤。Yamamoto 等人(2006)的研究表明，胚胎干细胞可能会在移植 14 到 28 天后形成畸胎瘤(Hannes 等, 2009)。

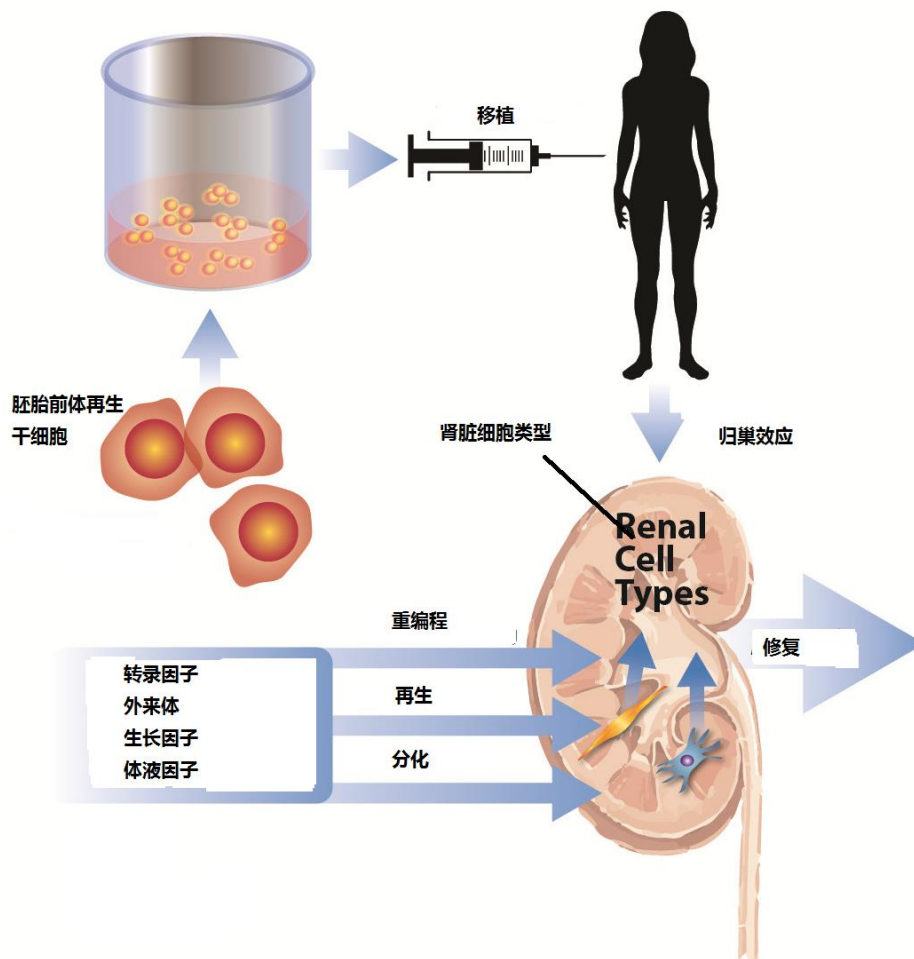


图 1. 活体前体干细胞疗法的机理是以归巢效应以及旁分泌反应为基础的。旁分泌反应促进了肾脏的重编程、再生和分化。

Takahashi 和 Yamanaka (2006)在细胞转分化领域内的一个发现开启了使用诱导多能干细胞进行肾脏再生的可能性。诱导多能干细胞最初是在真皮成纤维细胞重编程为多能干细胞时被发现的，其过程需要通过逆转录病毒引导，组合 Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc 这四个特定过表达转录因子来完成。

然而，诱导多能干细胞也有局限性，并非所有成人细胞都能够以同样的方式重编程：未分化的诱导多能干细胞导入患者体内时，具有形成畸胎瘤的风险；因为 Klf4 和 c-Myc 致癌因子具有致癌风险；由诱导多能干细胞分化形成的分化细胞可能引起 T 细胞产生相应的免疫反应 (Herrera 和 Mirotsov, 2014; Lam 和 Bonventre, 2015; Kobayashi 等, 2008; Hayashi, 2006)。

### 干细胞异种移植

干细胞异种移植 (SCX) 是指干细胞从一类生物到另一类生物的移植。其核心优势是器官特异性前体细胞的可接入性—胚胎细胞失去了其全能性和多能性，却保留有多潜能性—有能力在一个胚层里分化为一些细胞类型。

前体干细胞由动物产前生长的最后阶段的胚胎器官制得 (Hayashi, 2006; Goligorsky, 2014; Li and Ikehara, 2014)。各类动物都被使用过。目前全世界都在研究异种移植，近日，日本开始将猪源性细胞移植到一型糖尿病患者体内。然而，我们认为最好的胚胎细胞原料应该是绵羊和兔子的细胞。绵羊和兔子可抵抗多种疾病，易于和便于维持群落，也不存在相关的文化宗教禁忌 (Yang 和 Cheng, 2013; Yamashita 等, 2005; Lee 等, 2010; Solomon, 1977; Messier 和 Leblond, 1960; Hartman 等, 2007)。

用于提供干细胞的捐赠动物来自于封闭群——一个备有记录的、在饲养中心饲养超过 30 代、且未接触外环境的世系。按照国际标准和常规监测程序建立封闭类群，并实施长期监护。

在采购、准备、制造及储存运输时，重点考虑了速度、效率、严格无菌及温度条件。

### 前体细胞疗法原理

活体前体细胞疗法的机制是以靶向对准特异性器官（归巢效应）及受损细胞池的替换，以及诱导受者组织修复的特定细胞因子的激活/刺激为基础。大多数研究和已发表的文献显示，运用放射性核素分析时，发现植入细胞在 48-72 小时内从靶器官或组织的植入位置消失，这符合器官的特异性原理 (图一, Solomon, 1977; Messier 和 Leblond, 1960; Schmid 和 Stein, 1967)。

一些细胞在被移植后，被吞噬细胞释放的活性细胞物质所吞噬。SCX 的这些行为机制基于与原有细胞之间的旁分泌相互作用，通过释放生长因子和抗炎症因子、细胞激素、前列腺素、外来体、血管内皮细胞生长因子以及类胰岛素生长因子等，从而引起了这种生物效应。此类机制也解释了器官特异性的临床效果（尽管比起前体细胞疗法的程度还较低），而在欧洲，器官特异性细胞提取物的成功应用有近百年的历史。移植后五小时内，放射性标记注射材料显示了其分布情况。通常情况下，有效的临床效果和目标参数的变化至少需要在移植后 3-4 周才能显现出来 (Hayashi, 2006; Yamashita 等, 2005)。

胚胎前体细胞异种移植的最大优势在于可运用多种细胞，无数细胞均可用于移植。根据世界上前体细胞异种移植数十年的经验，该疗法对于慢性肾小球缺陷有很好的疗效 (Yamashita 等, 2005; Solomon, 1977)。治疗方案的核心是肾脏前体细胞。然而，来自其他器官并能形成更好的临床疗效的干细胞也应该得到应用。建议加入肾上

腺皮质、间质前体细胞以及血管内皮以及胎盘前体细胞。后者将会提供各种生长因子和细胞激素，这在修复肾脏时能刺激产生旁分泌反应(图 2; Schmid 和 Stein, 1967; Molnar, 2006)。

治疗方案应因患者情况而异。对于自身免疫疾病，可按规定加入取自胸腺、脾脏的前体细胞；对于糖尿病，应再增加糖尿病治疗方案(Schmid 和 Stein, 1967; Molnar, 2006)。

通常，胚胎前体细胞疗法适于任何联合疗法。尽管如此，为了消除对移植细胞的潜在损伤，我们仍然建议避免在移植前后 48-72 小时内服用其他药物(Molnar, 2006)。

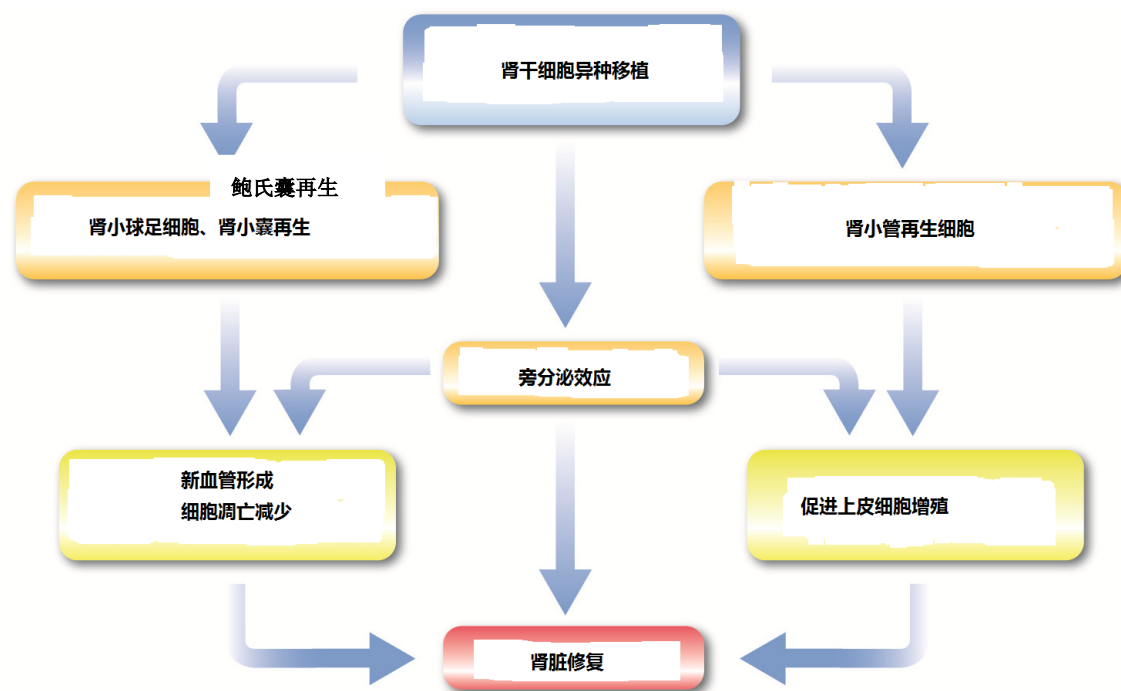


图 2 在前体干细胞植入后肾脏再生的路径—肾脏的再生是通过肾小管细胞和肾小球足细胞再生以及旁分泌反应完成

通常，患者能很好地耐受植入物。是否会有速发性应答取决于患者的状况。从注射后第二天开始，患者可能会有一些疲劳以及短暂的低烧。建议此时休息几天，在接下来的一个月避免体育运动和其他活动，如日光浴、水疗和大量的户外活动，同时戒烟戒酒，避免接种疫苗(Molnar, 2006)。

前体细胞疗法的禁忌：近期感染或已经感染、移植前一个月内接种过疫苗、急性疾病（即心肌梗塞、中风）、定期服用抑制细胞生长药物、或正在接受化疗及放疗(Schmid 和 Stein, 1967; Molnar, 2006)。

分类并评估胚胎前体细胞疗法是一项极度艰巨的任务。这主要是因为各种情况下会采用不同方法，治疗方案和规定标准化存在困难，而且还要考虑治疗成本。再者，大多数的患者分散在各地，联系他们各自的主治医生或医疗机构，导致无法轻易获取医疗数据和治疗结果，难以达到系统分析的目的。

## 队列研究的材料和方法

我们搜集了 23 位患有糖尿病性肾病并接受胚胎前体细胞治疗的患者的临床数据。

队列为多中心队列；患者的种族、年龄和合并病症存在差异；入选标准为 3a 和 3b 期慢性肾病。按照肾小球过滤率（GFR）等级划分肾衰竭病期：14 位患者为 3a 期（肾小球过滤率在 45-59 mls/min/1.73m<sup>2</sup> 之间），9 位患者为 3b 期（GFR 在 30-44 mls/min/1.73m<sup>2</sup> 之间）。慢性肾病 3a 期组有 9 男 5 女，年龄在 39-62 岁之间（平均年龄 44.2 岁）。慢性肾病 3b 病期组有 5 男 4 女，年龄在 37-64 岁之间（平均年龄 54.8 岁）。

表 1 两个观察组中肾小球过滤率水平变化：移植前、移植 6 个月后和移植一年后的对比值 (p<0.5)

平均肾小球过滤率 (mls/min/1.73m <sup>2</sup> )	3a 期慢性肾病 (14 人)		3b 期慢性肾病 (9 人)	
	男性 (9 人)	女性 (5 人)	男性 (5 人)	女性 (4 人)
0 天	52	43	39	38
6 个月	54	47	41	40
一年	57	49	42	41

慢性肾病 3a 期组男性患者血清肌酐平均水平为 132.44±0.32 μmol/l，平均肾小球过滤率为 52 mls/min/1.73m<sup>2</sup>，女性患者分别为 121±0.02 μmol/l 和 43 mls/min/1.73m<sup>2</sup>。慢性肾病 3b 期组男性患者血清肌酐平均水平为 169.8±0.01μmol/l，平均肾小球过滤率为 39 mls/min/1.73m<sup>2</sup>，女性患者分别为 135.5 μmol/l 和 38 mls/min/1.73m<sup>2</sup>。

在移植前，所有患者均签署了知情同意书，并接受了全面的临床生化检查，以确定可能的治疗禁忌，并记录基线肾功能状况。干细胞疗法的标准操作包括肾前体细胞的组合；肾小球前体细胞、肾小管上皮前体细胞、肝前体细胞，胰腺 β 细胞、间质、血管内皮细胞、心肌细胞、胃肠粘膜细胞以及骨髓细胞的混合。

在前体细胞移植后的维持治疗期间，患者需要获取器官特异性肽（肾脏、胰腺、肝脏、心脏和间质细胞提取物）。在初次移植一个月和一年后评估细胞疗法的应答。

## 结果

植入后，多数患者身体状况有好转。两位 3a 期慢性肾病患者有不明显的临床疗效，肾小球过滤率仍然维持在最初的水平。一位患者的血清肌酐水平略有上升（从 143 到 144 μmol/l）。11 位患者出现了进展：整体状况得到了显著的改善，肾小球过滤率大幅变化，男性患者的血清肌酐水平下降至 128±0.02 μmol/l，肾小球过滤率达到 54 mls/min/1.73m<sup>2</sup>；女性患者分别为 113±0.2 μmol/l 和 GFR 47 mls/min/1.73m<sup>2</sup>。因此，78.5%的 3a 期慢性肾病患者均得到了明显的改善，并且实现了慢性肾病降期。

在 3b 期慢性肾病患者中，6 人的肾小球过滤率下降了(66.7%)。在 3b 期慢性肾病患者中，平均血清肌酐下降到 161.7 μmol/l，肾小球过滤率平均值为 41 mls/min/1.73m<sup>2</sup>。女性患者分别 129 μmol/l 和 40 mls/min/1.73m<sup>2</sup> (表 1)。

在初次移植一年后的结果证明，前体细胞异体移植具有强持续效果。没有患者表现出肾功能恶化，并且多数患者的血清肌酐水平和肾小管过滤呈持续改善的趋势（图 3）。

观察接受治疗的患者，未发现过敏、不良反应或并发症。关于大多数接受反复细胞疗法的患者的结果，将在后续文章中报告。

## 讨论

查阅现有的慢性肾病干细胞疗法的文献资料，发现在肾功能领域取得有效的进步相当困难。由于致畸胎瘤率高的缘故，胚胎干细胞和诱导多能干细胞治疗方法至今无法广泛应用。已经证明来源不同的各类间质干细胞对治疗慢性肾病患者有一定效果；

然而，他们并不能提高肾小球过滤率，也无法降低慢性肾病的病期。

毫无疑问，在胚胎形成最后阶段的部分分化肾脏的胚胎前体干细胞是最安全、最可靠的替换细胞池。从法律、伦理和医学的角度来看，不可能供给足够的人类肾脏前体干细胞。这就给了异体胚胎前体干细胞的广泛应用绝佳的机会。欧洲几十年的成功应用证明，异体器官细胞疗法是安全的。日本批准了批量使用动物干细胞移植治疗糖尿病的方案。这种进步推动了细胞疗法的发展，为未来器官再生技术开拓了途径。

以上队列研究促进了对肾脏再生潜力的深入了解。胚胎前体细胞异种移植可以有效降低近乎三分之二患者慢性肾衰竭的病期。这种治疗也显示出了良好的稳定性，因为一年内未出现不良反应。在后续报告中，我们会更新研究进展，并提供更多有效数据。

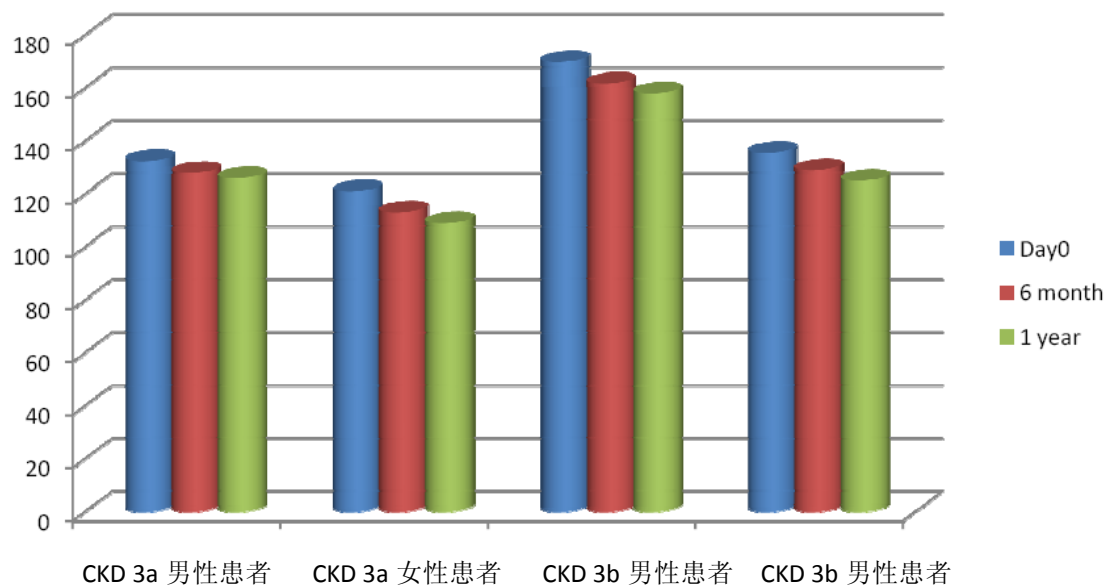


图 3.慢性肾病患者中观察到的平均血清肌酐水平动态变化

## 总结

总之，肾脏结构非常复杂，因而其修复及再生成为了一项极具挑战性的任务，从而造成了慢性肾病治疗的困境。尽管当今世界已经可获得各类干细胞，胚胎前体干细胞的出现依然会是最有希望延缓肾衰竭的一种方案。干细胞异体移植应引起科学家和研究人员更多的关注，并且有待进一步的研究和开发。