

脐带间充质干细胞治疗产后盆底功能缺陷的初步临床研究^{*}

杜心洁,刘冬梅,张 峰,张丽君^{**}

(临沂市妇幼保健院妇科,临沂 276000)

【摘要】 目的:探讨人脐带间充质干细胞(huCMSCs)复合富血小板血浆(PRP)盆底肌多点注射治疗产后盆底功能缺陷的疗效。方法:选择2017年10月至2018年10月在临沂市妇幼保健院已完成产后盆底康复训练,但恢复效果不佳的二胎及以上经阴分娩高龄女性10例,行自体 huCMSCs 复合 PRP 盆底肌多点注射治疗。比较治疗前及治疗后1年其静息、缩肛、Valsava 三种状态下盆膈裂孔面积、盆底 I 类和 II 类肌纤维的肌力分布及阴道收缩压变化,并进行问卷调查,了解满意度及整体印象改善度(PGI-I)评分。结果:盆膈裂孔面积治疗后静息状态较治疗前显著变小($P<0.05$),治疗前后盆底 I 类、II 类肌纤维肌力分布差异有统计学意义($P<0.01$),肌力明显增加;治疗后阴道收缩压力除1例外均有不同程度增加,整体呈现上升趋势,治疗前后阴道收缩压明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后 CD3、CD4、CD4/8、B 细胞、NK 细胞等淋巴细胞亚群无明显变化($P>0.05$);治疗后满意度评分较治疗前明显改善(4.61 ± 0.42 vs 2.13 ± 0.45 , $P<0.05$),PGI-I 评分为 6.47 ± 0.25 。结论:huCMSCs 复合 PRP 盆底肌多点注射治疗对产后盆底功能缺陷具有治疗作用,且无免疫原性,是治疗产后盆底功能缺陷安全、微创、有效的治疗办法。

【关键词】 脐带间充质干细胞;血小板血浆;注射治疗;盆底功能缺陷

中图分类号:R714 文献标志码:A 文章编号:1004-7379(2020)08-0580-04

DOI: 10.13283/j.cnki.xdfckjz.2020.08.035

A preliminary clinical study on the treatment of postpartum pelvic floor dysfunction with umbilical cord mesenchymal stem cell. Du Xinjie, Liu Dongmei, Zhang Feng et al. Department of Gynecology, Linyi Maternal and Child Health Care Hospital, Linyi 276000

【Abstract】 Objective: To investigate the prospective effect of human umbilical cord mesenchymal stem cell(huCMSCs) combined with platelet-rich plasma(PRP) multi point injection in the treatment of postpartum pelvic floor dysfunction. **Methods:** From Oct.2017 to Oct. 2018, 10 elderly women after vaginal delivery, who had completed the training of postpartum pelvic floor rehabilitation in Linyi Maternal and Child Health Care Hospital were selected to use huCMSCs and PRP multi-point injection into the pelvic floor. Before and 1 year after treatment, the levator hiatus area, the distribution of type I and Type II muscle fibers in the pelvic floor and the change of vaginal systolic pressure were compared under the three conditions of rest, contraction of anus and Valsava. Understanding satisfaction and overall impression improvement PGI-I score. **Results:** After treatment, the levator hiatus area in resting state became smaller than before treatment ($P<0.05$). There was significant difference in the distribution of type I and Type II muscle fibers in the pelvic floor before and after treatment ($P<0.01$). There were no significant changes in the subpopulations of CD3, CD4, CD48, Bcell and NK cells ($P>0.05$), and after treatment, the satisfaction score was significantly improved (2.13 ± 0.45 vs 4.61 ± 0.42 , $P<0.05$), PGI-I score was 6.47 ± 0.25 . **Conclusion:** The therapy of multiple injections of huCMSCs and PRP into pelvic floor muscle to treatment of postpartum pelvic floor

dysfunction is a safe and effective method for the treatment of postpartum pelvic floor dysfunction.

【Key words】 Umbilical cord mesenchymal stem cell; Platelet plasma; Injection therapy; Pelvic floor dysfunction

盆底功能障碍性疾病 (pelvic floor dysfunction, PFD) 是影响女性生活质量的常见病,包括压力性尿失禁 (stress urinary incontinence, SUI)、盆腔脏器脱垂和性功能障碍等,发病率可高达 20%~40%^[1]。妊娠和分娩是常见的诱发因素之一。全面二孩政策实施后,更多的高龄妇女面临二胎妊娠、分娩,由于其自身修复能力下降,PFD 的发病几率大大升高。据报道产后 6 周及 6 月 SUI 发病率达 6.9%、5.0%^[2]。药物治疗、盆底康复治疗、手术治疗是该病的常用治疗办法,对于不愿意及无法接受手术且康复治疗失败的生育期患者目前尚无有效治疗途径。近年来,间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 由于具有可再生、促进组织修复能力,开始应用于 PFD 的治疗。本文就利用人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, huCMSCs) 复合富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP) 进行盆底肌多点注射治疗产后盆底功能缺陷的前瞻性临床研究进行探讨性报道。

1 资料与方法

1.1 资料来源 本研究为前瞻性自身对照研究,选择 2017 年 10 月至 2018 年 10 月在临沂市妇幼保健院治疗的高龄经产二胎及以上女性 (年龄 35~50 岁) 10 例。纳入标准: (1) 均为经阴分娩; (2) 已完成产后盆底康复训练超过 1 年,但盆底肌力无改变或阴道内压力增加 $<5\text{cmH}_2\text{O}$,拒绝手术治疗; (3) 既往无生殖泌尿系统手术史,未行相关药物治疗。排除标准: 精神、神经、心脑血管、血液、免疫系统及传染病异常 (如乙肝、HIV、梅毒等)。患者自愿加入本研究,均签署知情同意书。本研究经临沂市妇幼保健院伦理委员会批准 (2019-YKLL-002)。干细胞制备、鉴定及 PRP 悬液制备由青岛奥克生物有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 干细胞制备及鉴定 采集于临沂市妇女儿童医院足月剖宫产分娩的健康产妇脐带,产妇自愿免费提供并签署知情同意书。使用组织块培养法,分离 huCMSCs,并扩增培养至 P5 代次冻存。所有患者均使用同一志愿者的同批次细胞^[3]。(1) 形态鉴定: 显微镜下观察单个细胞为长梭形,细胞群呈现旋涡样贴壁生长。(2) 细胞表面标记物鉴定: 采用流式抗体标定的方法,鉴定干细胞表面阳性标记物 CD44、CD90、CD105 和 CD73 的表达情况,和阴性标记物 CD45、CD34、CD14、CD79 和 HLA-DR 的表达情况。(3) 干细胞分化能力鉴定: 通过特定诱导培养基,刺激 MSCs 向骨细胞、软骨细胞或脂肪细胞分化,根据不同分化细胞的特异性标志成分 (钙结节、透明质酸、油脂),选择特异性染液着色,用以标记 MSCs 是否分化成功。

1.2.2 间充质干细胞 PRP 悬液制备过程 取 -80°C 冰箱冻存的去白单采血小板血浆 1 个治疗量,由临沂市妇幼保健院血库提供,在 37°C 水浴中快速融化。取冻存 P5 代脐带间充质干细胞 1.0×10^7 /人, 37°C 水浴快速复苏。按照 1:9 体积比,每一管细胞使用 9ml 生理盐水稀释到 15ml 离心管中。1000r/min 4°C 离心 10min,弃上清,使用 4ml 血小板血浆重悬细胞沉淀为单细胞悬液。转移到 10ml 灭菌的西林瓶中,压盖密封。24h 内使用,使用前加入 50 μl 注射用氯化钙溶液。

1.2.3 盆底肌注射方法 术前超声评估定位盆底肌薄弱受损位置,包括子宫、膀胱脏器脱垂,肛提肌断裂,肛提肌裂孔面积增大,肛门扩约肌损伤,直肠膨出等。注射时,患者采取膀胱截石位,经超声评估残余尿量 $<50\text{ml}$,静脉丙泊酚麻醉,置尿管,于盆底肌薄弱受损部位进行深部肌肉注射,注射位点为 6~10 个,包括尿道中段括约肌周围、肛提肌板及环阴道侧旁组织。单次治疗使用细胞总量为 1.0×10^7 个,单个位点细胞总量为 1.0×10^6 个,总体积 4ml,平均每个位点注射 0.4ml。注射时间 3~5min。1 月后同种方法注射第二次。

1.2.4 盆底三维超声检测 腹部三维凸阵探头评估治疗前及二次注射后 1 年静息、缩肛、Valsalva 三种状态下盆膈裂孔面积 (LH)。

1.2.5 盆底肌电诊断及阴道内压力测定 采用 PHENIX 盆底肌康复治疗仪对治疗前及二次注射后 1 年盆底 I 类和 II 类肌纤维的肌力 0~V 级检测,0 级为无收缩,V 级为强力收缩。方法参照法国国家卫生诊断论证局 (ANAES) 认证肌力测定方法^[4]。采用 PHENIX 盆底肌康复治疗仪对治疗前及二次注射后 1 年阴道收缩压行测定。

1.2.6 淋巴细胞亚群测定 对治疗前及二次注射后 1 年抽取患者静脉血,观察 CD3、CD4、CD4/CD8、B 细胞、NK 细胞等淋巴细胞亚群变化。用于判断间充质干细胞是否存在免疫原性,是否会在患者体内发生排斥反应,如无变化,提示无排斥反应的发生。

1.2.7 疗效评价 注射前及二次注射后 1 年进行满意度评分,非常满意评 5 分,非常不满意评 1 分,并进行患者整体印象改善度问卷 (PGI-I) 评分,治疗前对患者进行主观问卷调查,填写最想解决的主要问题作为治疗前目标,利用 PGI-I 对治疗后目标达到程度进行评分^[5],1 分为非常差,7 分为非常好。

1.3 统计方法 采用 Stata15.1 进行数据分析,计数资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用配对 t 检验或符号秩和检验。计量资料采用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况概述 共 10 例患者,年龄 (38.9 ± 8.1) 岁,体质量 (58.3 ± 10.75) kg,孕次 (2.9 ± 0.54) 次,均无吸烟史、哮喘史及绝经史。其盆底肌力较产后盆底康复训练前无改变或阴道内压力增加 $<5\text{cmH}_2\text{O}$,均拒绝手术治疗。其中 SUI 6 例,合并阴

道前壁膨出 3 例;单纯阴道前壁膨出 2 例;后壁膨出 1 例;轻度子宫脱垂 1 例。

2.2 治疗前后三维超声检测结果 静息状态治疗后盆膈裂孔面积较治疗前显著变小($P<0.05$);缩肛状态及 Valsalva 状态盆膈裂孔面积治疗前、后无明显差异($P>0.05$),见表 1。

2.3 治疗前后盆底肌力检测结果 治疗后盆底 I 类、II 类肌纤维肌力较治疗前明显增加($P<0.01$),见表 2。

2.4 治疗前后阴道收缩压检测结果 10 例患者分别于治疗前、治疗后 3 个月、6 个月、12 个月 4 个时间点测定阴道收缩压力变化,除 1 例治疗后阴道压力下降外,其余均有不同程度增加,整体呈上升趋势

势,见图 1、2。治疗前、治疗后 12 个月阴道压力差异有统计学意义 [102.1 ± 21.73 cmH₂O vs (119.2 ± 11.07) cmH₂O $t=-2.44$ $P=0.04$]。

2.5 治疗前后淋巴细胞亚群测定结果 治疗后 CD3、CD4、CD8、CD4/8、Bcell、NK 细胞等淋巴细胞亚群较治疗前无差异($P>0.05$)。见表 3。

表 1 治疗前后三维超声检测结果比较

组别	n	盆膈裂孔面积 (cm ²)		
		静息	缩肛	Valsalva
治疗前	10	16.48±3.69	10.85±1.83	20.49±4.46
治疗后	10	14.95±3.93	10.21±1.85	19.99±4.00
P/t		0.044/1.918	0.05/1.789	0.3/0.534

表 2 治疗前后盆底肌力检测结果比较

组别	n	I 类肌						II 类肌					
		0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级	V 级	0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级	V 级
治疗前	10	3	4	2	1	0	0	4	3	2	1	0	0
治疗后	10	0	0	2	4	3	1	0	1	1	3	3	2

表 3 治疗前后淋巴细胞亚群测定结果比较(%)

组别	CD3	CD4	CD8	CD4/8	NK	Bcell
治疗前	73.63±8.68	38.59±7.75	32.72±10.36	1.299±0.51	10.86±5.30	11.81±3.39
治疗后	74.80±6.19	38.52±8.09	26.8±7.98	1.552±0.54	10.25±5.29	11.88±3.53
P/t	0.627/-0.503	0.870/0.168	0.111/1.767	0.097/-1.852	0.730/0.356	0.925/-0.096

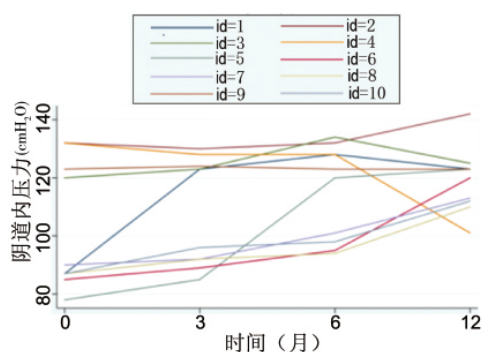


图 1 10 例患者阴道收缩压随时间变化趋势

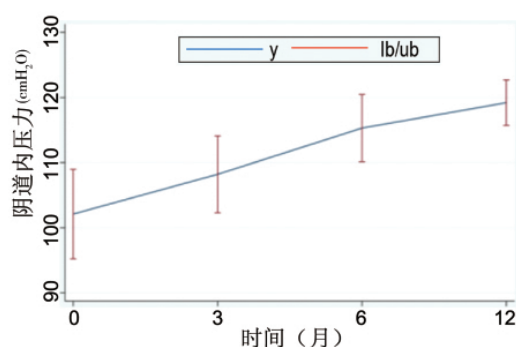


图 2 10 例患者整体阴道收缩压随时间变化趋势

2.6 治疗后整体印象改善度评分 治疗前满意度评分为 2.13 ± 0.45 , 治疗后满意度评分为 4.61 ± 0.42 , 较治疗前明显改善($P<0.05$), 治疗后 PGI-I 评分为 (6.47 ± 0.25) 分。无一例并发症发生。其中 1 例受试者反映治疗后阴道局部干涩症状改善, 湿润度增加, 性生活满意度增加。

3 讨论

目前治疗 PFD 的措施主要包括康复训练、手术治疗等。女性盆底康复训练是目前女性分娩后预防

PFD 的主要治疗措施。但患者盆底肌肉受损类型及受损程度直接影响到康复训练的效果。对于严重肌肉萎缩、神经细胞损伤所致的肌肉失去神经控制, 盆底韧带断裂, 物理疗法无法彻底使损伤愈合。尤其是针对二胎高龄产妇而言, 两次分娩过程会加速盆底组织病理生理性改变, 且年龄的增长会影响机体的自我修复能力, 盆底肌康复训练可能存在恢复疗程漫长, 恢复效果差等问题。手术治疗 PFD 可有自体组织修复, 但复发率高, 网片植入学性良好、效果明显, 但术

后网片侵蚀暴露并发症处理困难,性生活活跃的年轻女性不宜选择。而目前尚无有效的力学性好、相容性好的生物补片满足临床需要。

从骨骼肌、脂肪组织、骨髓和尿液中提取的干细胞由于其可再生、多向分化、改善组织修复能力强,已被广泛用于治疗 SUI 的动物模型和临床前研究中,成为治疗 PFD 的新方法。研究表明^[6],自体骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)在 SUI 治疗中具有显著的修复作用。而 Kuismanen 等^[7]从 5 例女性 SUI 患者皮下脂肪分离脂肪间充质干细胞(adipose tissue-derived stromal cells, ASC),并扩增 ASC 3 周,将 ASC 和胶原蛋白经膀胱镜混合注射到尿道括约肌,1 年后患者病情均显著改善。huCMSCs 其取材容易,无创伤性,可异体提供,亦可自体获得,因免疫原性、排斥反应低,再生分化能力强,成为盆底修复治疗的新思路。

研究发现^[8],干细胞复合脂肪组织、胶原等生物支架材料输入到人体后能够有效延长细胞在体内的存活时间。这些支架材料可以起到细胞外基质的作用,为细胞的生存提供三维空间和微环境,在一定程度上促进了细胞的生长和分泌,起到支撑解剖结构的作用。

本研究对 10 例 PFD 患者应用 huCMSCs 复合 PRP 进行盆底肌多点注射治疗,探讨对 PFD 的疗效。PRP 是通过离心法从血中提取出来的血小板浓缩物,亦称之为血小板凝胶,其含有高浓度的血小板、白细胞和纤维蛋白,且含多种生长因子,在促进组织修复再生等方面作用显著。目前已知的主要生长因子包括 PDGF、TGF- β 1、TGF- β 2、VEGF、EGF、FGF、IGF 等,参与调控组织生长的微环境,促进血管和组织再生,抑制受损组织纤维化,刺激成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,并促进胶原蛋白的产生^[9]。PRP 在钙离子激活下可形成凝胶状结构。前期试验中我们加入 CaCl₂、PRP 及 MSCs 混悬液在 3~5min 形成凝胶状支架,既起到填充作用,又形成富含生长因子的干细胞生长骨架,细胞不会成团,且机体可吸收^[3]。

本研究表明,应用 huCMSCs 复合 PRP 进行盆底肌多点注射治疗可以改善 PFD 患者症状。根据 Siff 等^[10]的研究,利用超声可有效评估盆底肌治疗效果,因此本研究中主要采用超声进行疗效评估。采用三维凸阵探头评估治疗前及二次注射后 1 年静息、缩肛、Valsava 三种状态下盆膈裂孔面积,发现治疗后静息状态下盆膈裂孔面积较治疗前明显缩小,差异有统计学意义。而缩肛及 Valsava 状态下盆膈裂孔面积较前亦有缩小趋势,这提示通过多点注射异体 MSCs 可以改善盆底肌功能。除了超声之外,研究中同时利用 PHENIX 盆底肌康复治疗仪对患者阴道内压力进行测定,除 1 例患者因习惯性便秘、体重增加明显致结果下降外,其余患者均呈上升趋势,说明 huCMSCs 复合

PRP 盆底肌多点注射治疗产后盆底功能缺陷可取得有效的治疗效果。对 10 例患者进行整体印象改善度评分,获得较高评分及满意度,其中 1 例受试者反映治疗后阴道局部干涩症状改善,湿润度增加,性生活满意度增加。

MSCs 的免疫原性是应用时需要考虑的,本研究表明 MSCs 具有低免疫原性,通过对治疗前及二次注射后 1 年抽取患者静脉血,观察 CD3、CD4、CD8、CD4/8、B 细胞、NK 细胞等淋巴细胞亚群。结果显示治疗前后均无明显差异。MSCs 不表达 MHCII 型分子,少量表达 MHCI 型分子,能够抑制 T 细胞增殖,具有极低的免疫原性,异体使用不会引起免疫排斥反应^[6]。因此 huCMSCs 免疫原性低,临床应用无免疫原性,安全性可靠。

本项目使用 huCMSCs 复合 PRP 盆底肌肉注射疗法对产后盆底康复训练后恢复效果不理想者进行干预治疗,可以缩小盆膈裂孔面积,改善盆底肌肌力分布,增加阴道收缩压,从而改善高龄二胎产妇产后盆底功能缺陷。但本研究样本及病种数量小,且无有效的大样本组间对照,后期需进一步研究充分评估其治疗效果及机制。

参 考 文 献

- [1] Islam RM, Bell RJ, Billah B, et al. The prevalence of symptomatic pelvic floor disorders in women in Bangladesh [J]. Climacteric, 2016, 19(6): 1-7
- [2] 李琳. 中国初产妇女尿失禁发生相关因素的流行病学调查研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2010
- [3] 刘超, 张丽君, 陶昊, 等. 基于细胞生物学方法比较 5 种不同组织来源间充质干细胞的特征[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(33): 5334-5340
- [4] Bo K, Sherburn M. Evaluation of female pelvic-floor muscle function and strength [J]. Phys Ther, 2005, 85(3): 269-282
- [5] 王宇, 韩劲松, 张坤, 等. 盆腔器官脱垂患者治疗前预期目标及治疗后满意度的初步探讨[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(9): 664-667
- [6] Zhou S, Zhang K, Atala A, et al. Stem cell therapy for treatment of stress urinary incontinence: the current status and challenges [J]. Stem Cells Int, 2016, 17(6): 973-975
- [7] Kuismanen K, Sartoneva R, Haimi S, et al. Autologous adipose stem cells in treatment of female stress urinary incontinence: results of a pilot study [J]. Stem Cells Transl Med, 2014, 3(8): 936-941
- [8] O'Loughlin A, Kulkarni M, Creane M, et al. Topical administration of allogeneic mesenchymal stromal cells seeded in a collagen scaffold augments wound healing and increases angiogenesis in the diabetic rabbit ulcer [J]. Diabetes, 2013, 62(7): 2588-2594
- [9] 田雅光, 张倩, 王洪一, 等. 富血小板血浆促进成纤维细胞的生长和迁移[J]. 中国美容整形外科杂志, 2019, 30(8): 487-490
- [10] Siff LN, Hill AJ, Walters SJ, et al. The effect of commonly performed exercise on the levator hiatus area and the length and strength of pelvic floor muscles in postpartum women [J]. Female Pelvic Med Reconstr Surg, 2018, 3(8): 947-949

(收稿日期 2020-03-24)

第一作者简介: 杜心洁(1981-), 女, 临沂市妇幼保健院副主任医师、博士。主要研究方向: 普通妇科。