

• 细胞治疗: 临床应用专题 •

治疗用脐血干细胞的制备及初步临床应用

范娅涵¹ 蒋天伦¹ 黎儒青¹ 杨仕明² 赵树铭[△]

(1. 中国人民解放军重庆血站 第三军医大学 西南医院 输血科, 重庆 400038; 2. 第三军医大学 西南医院 消化内科)

摘要:目的 制备满足临床干细胞治疗需要的脐带血干细胞制剂, 观察脐血干细胞局部移植治疗肝硬化失代偿和股骨头坏死的初步临床疗效。**方法** 建立标准化操作规程(SOP), 进行脐带血的采集、分离和检测, 制备脐带血干细胞制剂进行局部移植。选择进行局部移植干细胞制剂治疗的相关疾病患者共 11例, 其中肝硬化 9例、股骨头缺血坏死 2例; 年龄 30—65岁, 平均 51岁, 男 9例, 女 2例。**结果** 制备的脐带血干细胞制剂有核细胞计数达 $(3.8 \pm 1.73) \times 10^9$ 个, 均达到治疗剂量, 其中 CD34⁺ 细胞比率为 $(1.93 \pm 0.54)\%$, CD105⁺ 细胞比率为 $(97.9 \pm 4.0)\%$ 。肝硬化失代偿期患者治疗后白蛋白水平逐步升高, 1个月后与治疗前相比有明显升高 ($P < 0.05$)。肝硬化和股骨头缺血坏死患者经治疗后临床症状均有好转。**结论** 脐带血干细胞移植可为临床多种疾病的有效治疗提供一种新手段。

关键词: 脐带血干细胞; 肝硬化; 股骨头缺血

中图分类号: R457.1 R575.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-549X(2010)03-0179-04

Preparation of umbilical cord blood stem cells and preliminary clinical application FAN Yahan¹, JIANG Tianlun¹, LI Ruqing¹, YANG Shiming², et al Corresponding author: ZHAO Shuming¹. 1 Department of Blood Transfusion Southwest Hospital Third Military Medical University Chongqing 400038, China; 2 Institute of Gastroenterology Southwest Hospital Third Military Medical University

Abstract: Objective To prepare umbilical cord blood (UCB) stem cells for clinical local transplantation and to investigate the therapeutic effect on patients with decompensated liver cirrhosis and femoral head necrosis. Methods Stem cells from UCB units were collected, separated and identified. Eleven patients aged 30 to 65 years (average 51 years) from March to November in 2009 were treated by stem cell transplantation. Among them, 9 patients suffered from decompensated liver cirrhosis and 2 patients had femoral head necrosis. Liver function tests before and after the stem cell therapy were performed. Results The average number of total nucleated cells of the stem cell unit was $(3.8 \pm 1.73) \times 10^9$, which was over the therapeutic dose. The percentage of CD34⁺ was $(1.93 \pm 0.54)\%$, and CD105⁺ was $(97.9 \pm 4.0)\%$. After transplantation, levels of albumin were increased, especially one month later ($P < 0.05$). Clinical symptoms of patients with decompensated liver cirrhosis and femoral head necrosis were improved. Evaluation of long-term efficacy was continuing. Conclusion Using stem cells from UCB may provide a new tool for the treatment of patients with various diseases.

Key words: Umbilical cord blood; Decompensated liver cirrhosis; Femoral head necrosis

作者简介: 范娅涵, 女, 医师, 硕士, 主要从事干细胞研究; △通信作者: 赵树铭, 男 (1965—), 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事临床输血及血液代用品研究, 电话: 023-68765475, Email: shuming-zhao@yahoo.com

干细胞作为一类具有自我更新、多系分化和高度增殖的非特异性细胞, 在特定的生理或实验条件下, 能够分化成机体器官和组织的特定的功能细胞,

如肝脏细胞、神经细胞、心肌细胞和骨细胞等^[1]。研究表明,干细胞有损伤部位趋化性和部位专一性分化,在干细胞移植治疗,组织细胞再生领域蕴含广阔的医疗前景。干细胞按其来源分类可以分为外周血干细胞、骨髓干细胞和脐带血干细胞。与骨髓和外周血相比,脐带血具有采集方便、细胞免疫性不成熟、移植过程中不需要严格配型等优点,因而脐带血造血干/祖细胞具有极大的临床应用价值。我们采用体外提取、富集脐血干细胞的方法制备供临床局部移植使用的干细胞制剂,旨在建立临床体外分离纯化干细胞制备干细胞制剂的标准化程序,并应用于细胞性损伤疾病的治疗,初步观察了应用干细胞制剂局部移植治疗的 9 例肝硬化和 2 例股骨头坏死的治疗效果,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 人类骨髓、脐带血干细胞 粗细胞体外分离纯化试剂盒 [宁(银)食药监械(准)字 2008 第 1400008 号,宁夏中联达生物技术有限公司,批号:15023],采血袋(四川南格尔生物医学股份有限公司,批号:080611),HIVAb/Ag 检测试剂盒(万泰公司,批号:20081015),HBsAg 检测试剂盒(科华公司,批号:20090109),抗 HCV 检测试剂盒(吉比爱公司,批号:20090112),HCVAg 检测试剂盒(湖南景达制药有限公司,批号:20090101),抗 TP 检测试剂盒(万泰公司,批号:N20081110),鼠抗人 CD34-FITC CD105-PE 同型对照鼠 IgG1-FITC 鼠 IgG1-PE (ebioscience 公司,批号:E09850-168, E035-066),OLYMPUS AU2700 生化分析仪, BacT/Alert 3D 全自动细菌培养仪和配套标准的血培养瓶(生物梅里埃公司,批号:1022899),流式细胞计数仪(BD 公司)。

1.2 病例选择 经医院伦理委员会审核批准,选择 2009 年 3—11 月本院消化内科住院患者 9 名,平均年龄 51 岁,其中女性 2 名,男性 7 名,均为肝硬化失代偿期,其中肝炎后肝硬化 7 例,酒精性肝硬化 2 例。9 名患者术前均存在肝硬化常见症状和体征。关节外科 2 名单侧股骨头缺血坏死患者,均为Ⅱ期,年龄分别为 45 岁和 37 岁,均为男性。所有治疗均在患者知情同意后进行,并签署了《知情同意书》。手术前填写《干细胞 粗细胞体外分离申请单》,送输血科做相应准备。

1.3 临床用干细胞制剂的制备与输注

1.3.1 建立脐带血干细胞制剂体外分离纯化的标准化作业程序 脐带血干细胞制剂体外分离纯化的

标准化作业程序(SOP),包括从临床干细胞治疗体外分离的申请到干细胞移植后不良反应回报的整个治疗过程。制定了质量手册,程序文件,管理文件以及各种记录表格。科室设置了百级层流实验室,配置了低温低速离心机等细胞分离设备,建立了细胞分离实验室。当临床科室有需要细胞治疗的病例时,在完成医院伦理委员会初步审核后,填写《干细胞 粗细胞体外分离申请单》和《干细胞治疗知情同意书》后,即可按 SOP 进行干细胞制剂的制备。患者同时做术前准备,干细胞制剂制备完成后立即局部移植给患者以达到细胞治疗的目的。

1.3.2 脐血干细胞制剂的分离制备与输注 无菌采集自本院产科健康足月产妇(均知情同意)的脐血,胎盘娩出后(剖腹产)清洁状态下迅速采集脐血于采血袋中,CPDA 抗凝,(70—120)ml 例。采集好的脐血迅速送至百级层流实验室,应用人类骨髓、脐带血干细胞 粗细胞体外分离纯化试剂盒体外分离纯化脐血干 粗细胞,留取 10^6 细胞做流式细胞检测。药用生理盐水洗涤 3 次后,用生理盐水重悬细胞制备成干细胞悬液制剂。摇匀,取 $10 \mu\text{l}$ 用于细胞计数以及细胞活性和无菌试验等。常规检查合格后,将干细胞制剂立即送往手术室行局部移植干细胞手术。由消化科医生行介入手术对肝硬化患者经肝动脉或门静脉局部移植干细胞制剂治疗,可用 10ml 生理盐水重悬细胞制备干细胞制剂。由外科医生对股骨头坏死采用关节镜下钎棒植入结合干细胞移植,用 2ml 生理盐水重悬细胞制备干细胞制剂。

1.3.3 干细胞制剂的实验检测 1)母体血标本的病原微生物检测:术术前用 ELISA 方法常规进行母体标本的病原微生物检测,包括 HIVAb/Ag HBsAg 抗 HCV,HCVAg TP 等病原微生物。2)细菌学检查:干细胞制剂制备完成后,用全自动细菌培养仪和配套标准的血培养瓶进行真菌和细菌检测。3)脐血干 粗细胞含量检测:细胞存活率检测,使用溴芬蓝染色法计数活细胞数目。使用血常规计数仪计数单个核细胞总数。使用流式细胞计数仪计数 $\text{CD}105^+$ 干细胞和 $\text{CD}34^+$ 干细胞。

1.4 疗效观察 肝硬化患者疗效观察,观察术后患者临床症状(乏力、纳差、腹胀等)改善情况及不良反应的发生,检测术前及术后白蛋白的水平变化。股骨头缺血坏死患者临床疗效观察以及观察术后不良反应的发生。

1.5 统计学分析 数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 软件进行统计学分析,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 干细胞制剂实验室检测结果

2.1.1 干细胞制剂安全性检测 11份脐血和其母体标本的病原微生物指标检测全部合格。干细胞制剂标本经 5 d 的细菌、真菌培养,未发现细菌、真菌的污染。

2.1.2 体外分离纯化脐血干细胞 粗细胞产量 脐血在手术当天以剖宫产方式取得,保证无菌足量。采集的净脐血量为 $88.9 \pm 15.4 (70-120) \text{ ml}$,有核细胞计数(TNC)为 $(3.8 \pm 1.73) \times 10^9 [(2.0-6.7) \times 10^9]$,净脐带血量与有核细胞总数呈正相关。

2.1.3 干细胞表面抗原分析 制备的 11份干细胞制剂中 $\text{CD}34^+$ 干细胞比率为 $(1.93 \pm 0.54)\%$, $\text{CD}105^+$ 干细胞比率为 $(97.9 \pm 4.0)\%$ 。流式分析结果见图 1。

2.2 临床疗效

2.2.1 肝硬化患者 肝硬化病例术后症状均有所改善,患者自述食欲改善,体力好转等。已完成病例中,至今死亡 2例,均为移植后 4 个月后死亡,其中 1例为消化道大出血死亡,1例死亡失访。其余 7例肝硬化失代偿期病例目前观察治疗效果较好,其中有 1例术后未滿 3 个月。干细胞治疗前后对比,血清 Alb 变化最为明显(表 1)。

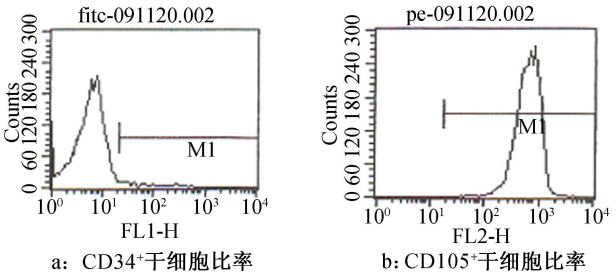


图 1 干细胞制剂流式分析结果

表 1 肝硬化失代偿期干细胞治疗前后白蛋白变化

	白蛋白 (g/L)
正常值	38-51
治疗前	27.83±3.17
治疗后 1周	27.78±4.25*
治疗后 1月	36.13±2.45*
治疗后 3月	35.54±4.82*

* 与治疗前比较, t 分别为 0.02, 5.86, 3.78, P 分别为 >0.05, <0.05, <0.05

2.2.2 股骨头坏死患者 股骨头坏死干细胞治疗 2例病例移植后患者自述髋关节疼痛改善,行走距离延长。而其影像学观察需 3 个月以上,正在随访中。

2.3 不良反应和并发症 本研究所用干细胞治疗的病例均未发现严重不良反应和并发症。

3 讨论

干细胞是具有多分化潜能和自我复制的细胞系,不论在体内还是体外培养都能表现为长期存活,不断的自我繁殖,在一定的微环境下可以诱导分化为所需要的组织细胞,有很强的可塑性。目前许多种疾病均可用干细胞局部移植治疗,包括神经系统疾病、糖尿病、肝脏疾病、心脏疾病、股骨头坏死等细胞损伤性疾病。

干细胞治疗是需要多科室合作的新兴治疗技术。临床科室需要进行病例的选择和实施,而干细胞的采集和制备则需要输血科完成。干细胞(包括脐血干细胞和外周血干细胞)是一种特殊的血液细胞,《血站管理办法》等法规将脐血库作为“特殊血库”,明确干细胞的采集与供应属于血站的工作范畴。在美国,治疗性细胞的制备标准由美国血库协会(AABB)制定。建立 SOP 是开展干细胞制剂制备工作的必要条件,本科参照 AABB 的标准编写 SOP 和质量标准,制备出的干细胞经安全性及细胞活性等评估达到良好效果,能提供符合国际标准的治疗性细胞。美国 AABB 制定的细胞治疗相关安全性指标包括相关病原微生物检测、无菌实验、内毒素测定、支原体检测、免疫表型等方面。按其规定制备的细胞先冻存,当各项指标均合格后,则可将其复苏后用于静脉输注。整个操作流程一般要花费 3 个月的时间^[2]。

我们选择用于局部移植的干细胞为脐血干细胞。与其他来源的干细胞相比,干细胞局部移植治疗选用脐血干细胞有其独有的优势。首先,脐血干细胞来源丰富,且相对于自体骨髓干细胞,脐血干细胞获得较简便,受感染几率减少。其次,脐带血中的 T 淋巴细胞表型及功能均为不成熟表现,人类白细胞抗原 II (HLA-II) 类抗原表达率低,几乎没有抗体,移植后排异反应弱或不出现,移植后抗宿主病(GVHD)出现少、且轻^[3-5];脐带血干细胞比外周血干细胞和骨髓干细胞更为原始,其自我繁殖能力最强,繁殖速度最快。我们获得的脐血干细胞制剂经流式细胞检测以 $\text{CD}105^+$ 干细胞为主,含有部分 $\text{CD}34^+$ 干细胞。 $\text{CD}105$ 目前较公认的间充质干细胞的表面标志,而 $\text{CD}34$ 则偏向于造血干细胞的表面标志,这说明获得的干细胞制剂中间充质干细胞浓度很高。间充质干细胞具有低免疫原性,还具有免疫调节作用,在一定条件下具有向脂肪细胞、心肌细胞、成骨细胞、肝脏细胞、神经细胞等多向分化的能力,是干细胞治疗很好的细胞群。

• 细胞治疗:临床应用专题 •

对于肝硬化失代偿期这种难治性病例,经过干细胞治疗后其白蛋白有明显增高,这是其他治疗方法难以达到的效果;对于股骨头坏死病例,应用干细胞治疗后其临床症状都有不同程度的减轻,与相关文献 [6, 7]报道一致。

参 考 文 献

[1] Broxmeyer HE, Stouffer EF, Hango G, et al. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003, 100(2): 645-650.

[2] Arman EM. Cellular therapy: principles, methods, and regulations. *AABB*. 2009, 3.

[3] Kobari L, Giarratana M, Glickman J, et al. Ex vivo expansion does not alter the capacity of umbilical cord blood CD34⁺ cells to generate functional T lymphocytes and dendritic cells. *Stem Cells*

2006, 24(9): 2150-2157.

[4] Hess DA, Craft TB, Wirthlin L, et al. Widespread nonhematopoietic tissue distribution by transplanted human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2008, 26(3): 611-620.

[5] Rocha V, Glickman E. Eurocord and European Blood and Marrow Transplant Group. Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2006, 12(1S1): 34-41.

[6] 王迪,郭晓钟,刘峰,等. 经肝动脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化 40例. *现代消化及介入诊疗*, 2008, 13(4): 258-261.

[7] 王天胜,刘永灿,郭利,等. 干细胞移植在中晚期股骨头坏死治疗过程中的应用. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(3): 505-508.

(2010-02-10收稿)
本文编辑:闻欣