

异基因脐带间充质干细胞移植治疗类风湿 关节炎疗效及安全性[△]

王 秦, 李小峰^{*}, 马丽辉, 李军霞, 陈俊伟, 李 芳, 薛丽巾, 白 洁

(山西医科大学 第二医院风湿免疫科, 太原 030002)

摘要: 目的 探讨异基因脐带间充质干细胞 (uhcMSC) 移植治疗难治性类风湿关节炎 (RA) 的疗效及安全性。方法 从足月顺产供者脐带中分离培养 MSC, 给予 3 例 RA 患者行 MSCs 移植治疗, 移植细胞数 (1×10^6 /kg 体重)。评价患者移植前后的临床表现和实验室检查指标的改变。结果 异基因 MSC 移植后, 3 例 RA 患者随访 9~11 个月, 所有患者均无移植相关并发症。移植后 1 月疾病活动评分 (DAS-28) 由 5.13 降低为 2.16 ($n=3$), 1 例血液系统受累患者血细胞 (中性粒细胞、红细胞、血小板) 均上升。移植前后比较抗环瓜氨酸 (CCP) 抗体滴度降低。1 例患者移植前后比较 Th17 细胞明显升高, Treg 细胞降低。结论 异基因脐带 MSC 移植治疗难治性 RA 有效、安全。uhcMSC 取材方便, 扩增迅速, 输注安全经济。

关键词: 脐带间充质干细胞; 类风湿关节炎; 移植

中图分类号: R593.22; R457.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-8705(2011)03-0202-05

Allogenic Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation for 4 Patients with Rheumatoid Arthritis[△]

WANG Qin, LI Xiao-feng^{*}, MA Li-hui, LI Jun-xia, CHEN Jun-wei, LI Fang, XUE Li-jin, BAI Jie

(Department of Rheumatology and Immunology, the Second Hospital Affiliated
Medical College of Shanxi University, Taiyuan 030002, China)

Objective To explore the clinical efficacy and safety of allogenic derived mesenchymal stem cells transplantation (MSCT) in patients with refractory rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Three patients with refractory RA (all were female patients) aged 43 - 47 were enrolled in the study and the Ethics Committee of the Affiliated The Shanxi Medical University approved informed consent was obtained for each patient. The umbilical cord of healthy donors were aspirated and the mesenchymal stem cells (MSC) were expanded *in vitro*. MSC 1×10^6 /kg body weight was infused intra-venously for each patient. Before MSCT, all patients were administrated with cyclophosphamide (CTX) 400 - 600 mg. The clinical manifestations and laboratory tests were compared before and after MSCT. **Results** The three patients were followed up for nine to eleven months after MSCT. No patient had developed transplantation related complications. The rheumatoid arthritis disease activity scord (DAS-28) score decreased from 5.13 to 2.16 one month after MSCT ($n=3$). Erythrocyte sedimentation rate (ESR) decreased significantly one month after MSCT ($n=$

[△]基金项目: 山西省卫生厅科技攻关项目 (2009), 山西省教育厅创新基金项目 (2010030); *通信作者 电话: 13753189359, 电子邮件: lixf2003@yahoo.com.cn

3). Three patients were followed up for nine months, anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody titer decreased significantly. One patients had increased whole blood cell counts one month after MSCT. Bone pain disappeared one month after MSCT. In two patients, blood Treg cells fell down mildly and Th17 cell were increased. **Conclusion** Treating refractory RA with allogenic MSCT is effective and safe. However, further observation is required to evaluate long term efficacy.

Key words: mesenchymal stem cells; rheumatoid arthritis; transplantation

Chin J Allergy Clin Immunol, 2011, 5(3):202-206

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种高度致残性自身免疫性疾病, 临床特征为对称性多关节炎, 病理改变为滑膜炎、软骨及骨破坏, 最终导致关节畸形。在我国 RA 的发病率约为 0.34%, 患病总人数达 500 万, 每年直接用于 RA 的治疗费用和因劳动力丧失带来的间接经济损失很大。目前国际公认的 RA 最佳治疗策略是早期联合使用改善病情的抗风湿药物, 这些联合方案使 RA 患者的致残率有所下降, 但其临床缓解率仅能达到 40%~70%^[1]。近年的研究发现间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 具有免疫调节作用, 这为调节 RA 患者机体免疫紊乱, 以及修复受损关节带来了新的希望^[2]。本研究在用异基因脐带 MSC 移植治疗胶原关节炎大鼠 (CIA) 有效的基础上, 尝试用异基因 MSC 移植治疗 RA。目前已完成 3 例难治性 RA 患者治疗, 取得较好疗效。

资料和方法

病例选择

2010 年 2 月至 2010 年 4 月于本院就诊的 RA 患者 3 例, 诊断均符合美国风湿病学院 (ACR) 1997 年修订的 RA 分类标准。3 例患者均为女性, 年龄 43~47 岁, 病程 3 月~20 年。疾病活动评分 (DAS-28) 11.7 ± 5.1 , 其中 1 例存在双侧股骨头坏死, 1 例患者血液系统受累合并重度血小板减少, 临床资料见表 1。本研究程序符合本单位伦理委员会所制定的伦理学标准, 并得到该委员会批准, 取得所有患者的知情同意。

MSC 移植适应证及禁忌证

MSC 移植主要用于难治性结缔组织病 (connective tissue disease, CTD), 常规激素、免疫抑制剂控制欠佳如狼疮性肾炎、肺动脉高压、重度血细胞减少,

表 1 MSC 移植前患者基本资料
Table 1 Basic information of patients before MSCs translations

病例	年龄 (岁)	病程 (月)	移植前 DAS-28	移植前用药
1	45	290	5.13	MTX 10 mg/周, CTX 0.2 g/3 周, 英利昔单抗 0.1 g×3 次
2	47	3	6.14	P 60 mg/d, CTX 0.2 g/3 周, VCR 1 mg×3 次, LEF 10 mg/d
3	43	86	3.65	MMF 0.5 g/d

DAS-28: 疾病活动评分; P: 强的松; MTX: 甲氨蝶呤; CTX: 环磷酰胺; MMF: 吗替麦考酚酯; VCR: 长春新碱; LEF: 来氟米特

终末期器官功能衰竭患者除外。纳入标准: 符合 1997 年美国风湿病协会 (ARA) 修订的 RA 诊断标准, 年龄 16~65 岁; 排除标准: 晚期畸形残废、丧失劳动力者; 女性妊娠者不作验证; 不符合纳入标准, 未按规定用药, 无法判断疗效或资料不全等影响疗效或安全性判断者; 不愿签署进入临床研究知情同意书者。

移植方法

对 3 例患者行异基因脐带 MSC 移植。

异基因脐带 MSC 来源: MSC 由深圳北科生物有限公司提供, 采集、分离、扩增和培养步骤如下: 取足月顺产、无并发症的新生儿脐带, 生理盐水冲洗, 切割至乳糜状, 接种于 75 cm² 培养瓶中, 每瓶含 20 ml 低糖细胞培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 完全培养液 (含 10% 胎牛血清), 置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养。24~48 h 后换液, 去掉非贴壁细胞, 之后每 3 d 以低糖 DMEM 完全培养液换液 1 次。培养至贴壁细胞 90% 融合时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按 1:3 的比例传代, 扩增后的

MSC 计数并鉴定,加入 5% 人体白蛋白溶液中静脉回输。低糖 DMEM、胎牛血清和 0.25% 胰蛋白酶均购自美国 BD 公司。

移植方案:移植前予 CTX 0.4 ~ 0.6 g, 静脉输注,输注后予 MSC 移植,每周输注 1 次,连续 4 周,移植细胞数为 $1 \times 10^6/\text{kg}$ 体重。移植前 MSC 用 0.25% 胰蛋白酶消化,反复洗涤后加入 5% 人体白蛋白溶液中静脉回输。移植前给予地塞米松 5 mg 预防过敏反应。

疗效评价:移植后随访时间为 9 ~ 11 个月,对移植前后患者临床表现改善情况和实验室检查如血清类风湿因子 (RF)、抗环瓜氨酸抗体 (a-CCP)、抗核周因子 (APF)、抗角蛋白抗体 (AKA),免疫功能、T 细胞亚群等指标进行比较以及移植相关并发症等方面进行评价。

移植后维持治疗

所有患者均采用移植前原方案维持治疗(移植前原方案无效)。观察 1 周后免疫抑制剂逐渐减量。

统计学方法

计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,常规进行正态性、方差齐性检验。多组间均数比较,采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),以 LSD 法进行两两比较。当方差不齐时,采用 DunnettT3 进行两两比较。应用 SPSS13.0 软件进行统计,制图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义

结 果

MSC 移植后的随访与评价

所有移植患者输注异基因 MSC 时均无并发症。

病例 1,女 43 岁,1986 年出现双肩关节疼痛,后逐渐延及双膝关节、伴双手小关节疼痛,一直以中药治疗效果不佳。1995 年开始出现双手掌指关节、近端指间关节肿胀畸形,晨僵时间 $> 1 \text{ h}$,仍以中医中药治疗,关节反复肿痛,开始出现乏力、头晕。2004 年因症状加重就诊当地医院,化验 RF 阳性,血红蛋白 43 g/L ,诊断为类风湿关节炎、重度营养不良性贫血。给予泼尼松 40 mg,每日 1 次口服;甲氨蝶呤 (MTX) 10 mg,每周 1 次口服,症状缓解。出院后服用上述 2 种药物 4 年,因恐惧药物毒性,自觉症状缓解逐渐减停。停药后 2 周于 2008 年 4 月底再次

出现多关节肿痛,并持续加重,不能行走,当地医院诊断为双侧股骨头坏死,一直服用中草药治疗,疗效差。2009 年 12 月病情再次加重,就诊于当地医院予以注射人鼠嵌合肿瘤坏死因子单抗 (Infliximab IFX,商品名:类克) 200 mg,治疗 3 次,联合 MTX 15 mg,每周 1 次,症状无明显缓解。为进一步诊治入住我科。入院后患者卧床,双手双足关节畸形,双侧股骨头疼痛明显,以静息痛为主,影响睡眠,DAS-28 评分为 5.13。在获得患者知情同意后行异基因脐带间充质干细胞 (hucMSC) 移植治疗。移植前用药见表 1,细胞移植 2 次后,患者双侧股骨头静息痛明显减轻,睡眠质量明显改善;治疗 4 周后,病情缓解明显,2、3、4 周红细胞沉降率 (ESR) 分别为 53 mm/h 、 50 mm/h 、 43 mm/h ,DAS-28 评分分别为 5.13、4.75、4.24,双侧股骨头静息痛消失,左膝关节、左髌区、双踝关节疼痛明显减轻,可拄杖行走,双手伸直度较前改善。D-二聚体 (D-Dimer) 由 1 019 降为 509,治疗药物减量为 MTX 10 mg,每周 1 次;CTX 0.2 g,每 3 周 1 次,出院后继续免疫抑制剂治疗。移植 3 月后复查血清自身抗体滴度明显减低,免疫功能提示 B 细胞总数减少,Ts 细胞稍升高 (表 2、3)。移植后 6 个月,一般情况良好,MTX 7.5 mg 口服,每周 1 次,CTX 0.2 g,每 3 周 1 次。

病例 2,女 47 岁,因对称性多关节肿痛 3 月,加重 20 d 入住我院。患者 2009 年底出现对称性小关节肿痛,累及双手、双足小关节。伴晨僵约 30 min,未在意,入院前 2 周关节症状加重。就诊于当地医院查 RF 增高,伴重度血小板 (PLT) 减少,为进一步诊治入住我科。入院后查 $\text{PLT } 36 \times 10^9/\text{L}$;化验给予醋酸泼尼松 60 mg/d,口服,静脉用丙种球蛋白 22.5 g,连用 5 d,来氟米特 (LEF) 10 mg/d、长春新碱 1 mg,每周 1 次,并输注单采 PLT 1U,CTX 200 mg/3 周。PLT 恢复不理想,最低至 $17 \times 10^9/\text{L}$,给予间充质干细胞治疗 2 次后,患者一般状况明显改善,ESR 从 62 mm/h 降为 22 mm/h ,DAS 评分由 6.14 降为 2.14,PLT 水平恢复正常,血清抗体水平及免疫功能在移植后 3 个月复查明显改善 (表 2、3)。尤其是 Th 亚群的检测,可以看到该患者移植前及移植后 3 个月 Th1/Th2 比值下降,Th17 细胞从 2.14 降为 0.06,Treg 细胞升高至 1.5。移植后 6 个月、9 个月复查,病情平稳,目前激素及免疫抑制

剂减量中。

病例3，女45岁，因双手关节反复肿痛7年，化验RF 800 IU/ml、抗CCP > 200 RU/ml，诊断为类风湿关节炎。予口服非甾体消炎药、白芍总甙及LEF等药物，症状缓解，但出现肝酶升高，胆红素升高。因患者对免疫抑制剂的治疗不能耐受，经患者同意后行间充质干细胞移植治疗。治疗4周后患者自觉症状明显改善，移植后3个月血清抗体较移植前明显降低（表2）。但移植后6个月患者再次出现左手掌指关节肿痛，抗体水平再次升高，加用LEF等药，又出现肝功能异常。目前换用重组人肿瘤坏死因子受体融合蛋白（商品名为益赛普）治疗，一般情况尚可。

表2 移植前后患者血清抗体滴度比较

Table 2 Serum antibody titers compared before and after transplantation

血清抗体	病例1		病例2		病例3	
	移植前	移植后3月	移植前	移植后3月	移植前	移植后3月
RF (RU/ml)	320	80	160	40	320	40
a-CCP (RU/ml)	587.6	102.6	>1600	318.6	569.5	98.5
ANA	1:640H	1:80	1:160S	1:20	(-)	(-)
AKA	(-)	(-)	1:20	(-)	(-)	(-)
APF	1:20	(-)	1:80	(-)	(-)	(-)

RF：类风湿因子；a-CCP：抗环瓜氨酸抗体；ANA：抗核抗体；AKA：抗角蛋白抗体；APF：抗核周因子

表3 移植前后患者血清免疫功能的变化

Table 3 Serum changes of immune function before and after transplantation

细胞表型	病例1				病例2			
	移植前		移植后3月		移植前		移植后3月	
	百分数	绝对值	百分数	绝对值	百分数	绝对值	百分数	绝对值
CD34 ⁺ CD19 ⁻	66	605	60	1895	47	1433	86	1850
CD34 ⁺ CD19 ⁺	21	200	12	628	46	1378	5	90
CD3 ⁺ CD4 ⁺	34	293	27	308	25	784	60	1405
CD3 ⁺ CD8 ⁺	24	206	31	346	18	570	2	580

讨 论

MSC是存在于骨髓中的一类干细胞，能分化为分泌多种细胞因子、黏附分子的骨髓基质细胞，支持造血和调节免疫功能且无免疫原性。体内、外研究均表明MSC具有诱导免疫耐受和免疫调节作用、抑制T细胞增殖、治疗移植排斥宿主病（GVHD）等。瑞典斯德哥尔摩Huddinge大学医院临床免疫/干细胞移植中心和血液科联合，于2003年首次将异基因骨髓MSC移植用于人GVHD的治疗^[3]。

本研究进一步研究了RA患者骨髓MSCs的生物学特性及分化功能，前期研究发现RA-MSC存在异常表现：1）RA患者骨髓MSC体外生长较正常人缓慢，存在早衰，不能长期传代；2）RA患者MSC分泌细胞因子如白细胞介素-6（IL-6）、IL-17减低；3）MSC移植治疗胶原诱导关节炎（collagen induced arthritis，

CIA）大鼠，发现MSC使Th1/Th2平衡向Th2偏移。推测MSC的异常可能在RA的发病中起重要作用，而MSC缺陷为原发性而非继发性。前期对CIA模型及RA的研究中，我们还观察到RA患者体内存在T细胞亚群紊乱，存在Th17的高表达^[4]。前期的动物实验进一步证实MSC移植治疗胶原关节炎大鼠均无并发症，关节炎评分及关节病理有明显改善，检测T细胞亚群Th17及Treg均提示有免疫调控作用，其疗效肯定。进一步提示MSCs能调节RA患者机体免疫紊乱，阻止病情进展^[5]。因此，推测MSC移植治疗RA患者有效，而且提出RA患者自体MSC移植不合适，应选择异体（异基因）MSC移植的观点。在此基础上本研究治疗难治性RA患者3例，行异体脐带MSC移植。移植后观察MSCs能显著改善病情，降低DAS-28评分，减少免疫抑制剂的用量。在对T淋巴细胞的观察发现，移植前后有一定的变化，其中病例2患者观察到Th17/Treg的比值由移植前的39:1降到移植

后(3个月)的1:25,变化较明显,提示患者体内T细胞亚群在疾病的发生发展中可能有一定的作用,尤其是Th17/Treg的平衡,但因病例数尚少,还需继续观察。本研究目前为止未见明显不良反应的发生,提示异体(异基因)MSC移植是安全的。

异体脐带MSC移植可治疗多种疾病,其疗效肯定,没有排斥反应,不需要组织配型,移植后不需要用抗排斥药物;移植细胞来源丰富,体外易大量培养扩增;安全无明显不良反应。此项技术的全面开展,将为类风湿关节炎及其他自身免疫性疾病的治疗提供新方法^[6],为阐述MSC在自身免疫性疾病发病中的作用及致病机制提供了新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 李小峰. 重视类风湿关节炎发病机制及治疗的研究进展. 中华风湿病杂志 [J], 2008, 12:1-3.
- [2] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses [J]. Blood, 2005, 105:1815-1822.
- [3] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells [J]. Lancet, 2004, 363:1439-1441.
- [4] Sarkar S, Cooney LA, Fox DA. The role of T helper type 17 cells in inflammatory arthritis [J]. Clin Exp Immunol, 2010, 159:225-237.
- [5] Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells [J]. Blood, 2007, 110: 3499-3506.
- [6] Ikehara S. Bone marrow transplantation: a new strategy for intractable diseases [J]. Drugs Today (Barc), 2002, 38:103-111.

(2011-03-21 收稿)