

## • 血液肿瘤的细胞免疫治疗专题 •

## 人脐带间充质干细胞治疗移植物抗宿主病的临床观察\*

文钦<sup>#</sup> 陈幸华<sup>#</sup> 高蕾<sup>△</sup> 张曦 张诚 高力 曾韫璟 孔佩艳 刘红 彭贤贵

(第三军医大学 新桥医院 血液科 全军血液病中心 重庆 400037)

**摘要:** 目的 探讨人脐带间充质干细胞(UCMSCs)在急性移植物抗宿主病(aGVHD)中的疗效及安全性。方法 40名对激素无效的aGVHD患者分为两组,UCMSCs组:接受他克莫司+甲氨蝶呤(MTX)+UCMSCs抗GVHD治疗,常规治疗组:仅接受他克莫司+MTX治疗。结果 UCMSCs组治愈率及治疗有效率均高于常规治疗组( $P < 0.05$ )。UCMSCs组治疗组及常规治疗组治疗起效的平均时间分别为( $16.15 \pm 6.34$ )d、( $20.8 \pm 6.94$ )d,( $P > 0.05$ )。治愈的平均时间分别为( $25.5 \pm 7.18$ )d、( $30.4 \pm 8.07$ )d,( $P < 0.05$ )。UCMSCs组无1例因感染死亡。UCMSCs组在输注UCMSCs过程中没有出现不良反应。UCMSCs及常规治疗组发生aGVHD各2例,无1例本病复发。

**讨论** UCMSCs治疗aGVHD有效、安全。

**关键词:** 人脐带间充质干细胞; 急性移植物抗宿主病; 造血干细胞移植

中图分类号: R457.1 R331.2<sup>2+2</sup> 文献标识码: A 文章编号: 1004-549X(2012)02-0123-04

**Observation on human umbilical cord-mesenchymal Stem Cell for the Treatment of acute graft versus host disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation** WEN Qin ,CHENG Xinghua ,GAO Lei<sup>△</sup> ,ZHANG Xi ,ZHANG Cheng ,GAO Li ,ZENG Wenjing ,KONG Peiyan ,LIU Hong ,PENG Xiangui. <sup>△</sup>Corresponding author: GAO Lei. Department of Hematology Xinjiao Hospital ,Third Military Medical University ,Chongqing 400037 ,China

**Abstract: Objective** To evaluate the efficacy and safety of human umbilical cord mesenchymal Stem Cell (UCMSCs) for the treatment of acute graft versus host disease (aGVHD). **Methods** Forty patients with aGVHD were divided into two groups. Twenty patients received treatment with tacrolimus, methotrexate and UCMSCs. Twenty patients received treatment with tacrolimus and methotrexate. **Results** The recovery rate and effective power of UCMSCs-group is higher than the other group ( $P < 0.05$ ). The initial action time of UCMSCs-group and the other group is ( $16.15 \pm 6.34$ ) days and ( $20.8 \pm 6.94$ ) days respectively ( $P > 0.05$ ). The time to complete remission of UCMSCs-group and the other group is ( $25.5 \pm 7.18$ ) d and ( $30.4 \pm 8.07$ ) d respectively ( $P < 0.05$ ). No patient died of infection in UCMSCs-group, there is no adverse reaction during the infusion of UCMSCs. There are two Patients with aGVHD in UCMSCs-group and two in the other group. The recurrence of the disease is never occur in the both groups. **Conclusion** The infusion of UCMSCs is an effective and safe treatment for aGVHD.

**Key Word:** Human umbilical cord-mesenchymal Stem Cell; acute graft versus host disease; Hematopoietic Stem Cell Transplantation

移植物抗宿主病(acute graft versus host disease,aGVHD)是异基因造血干细胞移植术后的主要并发症之一,是影响患者移植后生存率及生存质量的主要因素。目前治疗aGVHD仍以类固醇激素及其他免疫抑制剂为主,部分病人可取得较好的疗效,但仍有部分患者疗效欠佳,且激素及免疫抑制剂的长期使用增加了移植患者感染的风险。因此,从新的角度探讨aGVHD的治疗实属必要。间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)是一种具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞,具有免疫调节能

力,其免疫调节作用使其在aGVHD治疗中具有较好的应用前景。本文回顾性分析了本院40例发生aGVHD的异基因造血干细胞移植患者,依据其是否在治疗过程中加用了人脐带间充质干细胞(UCMSCs)分为两组,以观察UCMSCs在aGVHD中的疗效及安全性,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 临床资料** 2008年9月~2011年6月,本院40例发生aGVHD的异基因造血干细胞移植患者中20例于治疗过程中加用了UCMSCs,20例采用常规方案(表1)。

**1.2 预处理方案** 急性髓系白血病HLA全相合患者采用Bu/cy方案(白消安0.8 mg/kg q6 h × 4 d;环

\* 第三军医大学新桥医院临床科研课题资助项目(2011D262、2010D249);#共同第一作者;△通信作者:高蕾(1976.6~),女,副主任医师,副教授,医学博士,从事临床用血、细胞治疗等方面研究,电话:023-68774309,Email:gaolei7765@163.com

磷酰胺  $60 \text{ mg/kg} \times 2 \text{ d}$ ); 急性淋巴细胞白血病及淋巴母细胞淋巴瘤 HLA 全相合患者采用 TBI/Cy 方案 (TBI  $8-10 \text{ Gy}$  分  $2 \text{ d}$ ; 环磷酰胺  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \times 2 \text{ d}$ )。HLA 半相合患者采用 CCNU + Bu + CTX + Ara-c + ATG 方案预处理 (CCNU  $200 \text{ mg/m}^2 \times 1 \text{ d}$ ; 白消安  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ q6 h} \times 3 \text{ d}$ ; 阿糖胞苷  $2 \text{ g/m}^2 \text{ q12 h} \times 2 \text{ d}$ ; 环磷酰胺  $1.8 \text{ g/m}^2 \times 2 \text{ d}$ ; ATG  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \times 4 \text{ d}$ )。

**1.3 GVHD 的预防及诊断标准** 采用环孢素 A (CsA) 联合短疗程甲氨蝶呤 (MTX) 及骁悉 (MMF) 预防 GVHD: 亲缘间 HLA 全相合患者 CsA 于移植  $-1 \text{ d}$  开始使用, 剂量为  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$  持续  $24 \text{ h}$ , 至患者造血重建胃肠道功能恢复耐受口服后更换为  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  口服药物治疗, 若患者至  $+90 \text{ d}$  未发生急性 GVHD, CsA 逐渐减量。HLA 半相合患者 CsA 于移植  $-7 \text{ d}$  开始使用, 剂量为  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  持续  $24 \text{ h}$ , 至移植  $-1 \text{ d}$  开始将剂量增至  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , 胃肠功能恢复后换为口服, 若患者未发生 GVHD, 于移植  $+150 \text{ d}$  开始逐渐减量。CsA 浓度维持在  $200 \sim 400 \text{ ng/ml}$ 。亲缘间 HLA 全相合患者 MTX 于移植  $+1 \text{ d}$   $15 \text{ mg/m}^2$ 、 $+3 \text{ d}$ 、 $+6 \text{ d}$   $10 \text{ mg/m}^2$  静脉用药。HLA 半相合及非血缘关系全相合患者 MTX 于移植  $+1 \text{ d}$   $15 \text{ mg/m}^2$ 、 $+3 \text{ d}$ 、 $+6 \text{ d}$ 、 $+11 \text{ d}$   $10 \text{ mg/m}^2$  静脉用药。亲缘间 HLA 全相合患者 MMF 于移植  $1 \text{ d}$  开始使用, 若患者至  $+30 \text{ d}$  未发生急性 GVHD, 可逐渐减停。HLA 半相合及非血缘关系全相合患者 MMF 于移植  $-7 \text{ d}$  开始使用, 若患者至  $+90 \text{ d}$  未发生急性 GVHD, 可逐渐减停。aGVHD 诊断标准: 按照西雅图标准进行分级及总分度<sup>[1]</sup>。

表 1 治疗前患者一般情况、疾病类型和移植方式

	USMSc 组	常规组
性别 男	12	8
女	9	11
中位年龄(岁)	24(15~63)	27(17~59)
疾病类型及移植前状态		
AML( CR)	10	11
ALL( CR)	9	9
NHL IV 期( PR)	1	
移植方式 同胞间全相合	14	12
亲缘间单体型	5	6
非血缘全相合		1

**1.4 GVHD 的发生情况** UCMSCs 组 20 例患者中: Ⅲ度 aGVHD 7 例 (皮肤 aGVHD 4 例, 皮肤合并肝功能损害 3 例); Ⅳ度 aGVHD 13 例 (单纯皮肤 aGVHD 3 例; 皮肤合并肝功能损害 3 例; 肠道 aGVHD 7 例)。aGVHD 发生中位时间为移植  $+28 \text{ d}$  (移植  $+18 \text{ d} \sim +88 \text{ d}$ )。对照组: Ⅲ度 aGVHD 6 例 (皮肤 aGVHD 5 例, 皮肤合并肝功能损害 1 例); Ⅳ度 aGVHD 14 例 (皮肤 aGVHD 6 例; 肝脏 aGVHD 2

例; 肠道 aGVHD 6 例)。aGVHD 发生中位时间为移植  $+23 \text{ d}$  (移植  $+17 \text{ d} \sim +76 \text{ d}$ )。

### 1.5 UCMSCs 的制备

**1.5.1 UCMSCs 的分离和培养** 无菌收集足月顺产或剖腹产脐带 (经产妇同意, 并签署知情同意书), 浸没于含 1% 双抗 (青链霉素) 的 DMEM 培养基中, 生物安全柜中剪取约 10 cm 长的脐带, 用生理盐水清洗脐带中血管中的血污; 用解剖刀在脐带一端 (离顶端 1 cm 处) 圆周划开外表皮, 用夹子固定脐带此端, 用两把镊子用力撕下脐带外表皮, 再分离两根动脉, 最后将静脉内皮剔除。将剩余脐带组织剪碎成肉糜状, 转移到离心管中, 加入 20 ml 消化液 (100~200 U (200 mg Collagenase II/ml 的 DMEM 液)、DNase I (5 mg/ml 浓度) 400  $\mu\text{l}$ ), 混匀 37°C 过夜消化约 20 h, 加 1% 的 HAAse 1 ml 37°C 消化 20 min, pH 7.5; 用 200 目滤筛过滤, 除去未消化的组织及其他杂质; 生理盐水稀释消化滤液, 2500 rpm 离心 5 min 收集细胞, 用完全培养基重悬细胞, 并用细胞计数板在倒置显微镜下计细胞数量; 接种原代细胞于 0.2% 明胶包被的培养瓶中, 加入无血清专用培养基, 置 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养; 细胞多数贴壁后全量换液, 除去未贴壁细胞和杂质, 以后每 3~4 d 半量换液; 待细胞生长达 80% 融合后, 消化后传代培养。传至 2~4 代 MSCs 进行细胞成分鉴定, 并用生理盐水调整至  $1 \times 10^7/100 \text{ ml}$ , 以备临床使用。

**1.5.2 UCMSCs 的鉴定** 采用流式细胞仪检测 MSCs 表面 CD105、CD44、CD13、CD29、CD34、CD45、CD31、CD106、CD166 和 HLA-DR 等标记分子的表达情况。

**1.5.3 UCMSCs 培养体系微生物指标检测** 留取人脐带来源 MSCs 培养液, 采用快速检测试剂盒检测巨细胞病毒、肝炎和细菌指标检测, 保证细胞制品的安全。

**1.6 GVHD 的常规治疗及 MSCs 的使用** UCMSCs 组 20 例 aGVHD 患者在明确诊断后首先予以甲强龙  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  冲击治疗, 18 名患者无效, 2 名患者仅部分缓解。此后 20 名患者均将环孢素换为他克莫司加强抗 GVHD 治疗, 均同时加用小剂量 MTX ( $10 \text{ mg/m}^2$ )  $\times 2$  次, 在使用免疫抑制剂的同时加用了 UCMSCs 2 次 (每月 1 次), 加用 MSCs 的中位时间为明确 aGVHD 后  $23 \text{ d}$  (14 d~36 d), 每次输注 MSCs 数量为  $3 \times 10^7$  个。对照组 20 例 aGVHD 患者在明确诊断后也均首先予以甲强龙  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  冲击治疗, 17 名患者无效, 3 名患者部分缓解。

此后 20 名患者将环孢素换为他克莫司加强抗 GVHD 治疗,均同时加用小剂量 MTX(10mg/m<sup>2</sup>) × 2 次,但未加用 MSCs。

**1.7 统计学分析** 数据用 SPSS13.0 软件统计分析率的比较采用  $\chi^2$  检验,2 组均数之间的差异比较采用  $t$  检验,以  $P = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

**2.1 aGVHD 缓解情况** UCMSCs 组 15 例治愈 5 例好转;常规治疗组 9 例治愈,6 例好转,5 例无效,在加用了 CD25 单抗后 4 例缓解,1 例仍未缓解,最终合并严重肺部感染死亡。UCMSCs 组和常规治疗组治愈率分别为 75% 和 45%,差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 1.875, P < 0.05$ )。UCMSCs 组和常规治疗组有效率分别为 100% 和 75%,差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 2.857, P < 0.05$ )。UCMSCs 组治疗起效的平均时间为 (16.15 ± 6.34) d,常规治疗组起效的平均时间为 (20.8 ± 6.94) d,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。UCMSCs 组治愈的中位时间为 (25.5 ± 7.18) d,常规治疗组治愈的中位时间 (30.4 ± 8.07) d,差异有统计学意义 ( $t = 2.468, P < 0.05$ )。

**2.2 感染发生情况** UCMSCs 组在治疗过程中有 5 例出现巨细胞病毒感染,予以膦甲酸钠、静脉人免疫球蛋白抗病毒治疗后复查巨细胞病毒 DNA 拷贝数转阴;3 例出现发热,未找到感染灶,予以经验性抗感染治疗好转,无 1 例因感染死亡。常规治疗组在治疗过程中:4 例出现巨细胞病毒感染,1 例出现带状疱疹,予以抗病毒、对症治疗后痊愈;1 例出现发热,经抗感染治疗痊愈,2 例出现严重肺部感染,1 例治愈,1 例死亡。

**2.3 其他不良反应** UCMSCs 组 20 名患者有 2 名出现肝功轻微异常,予以保肝治疗好转。3 名患者出现一过性全血细胞减少,考虑与 GVHD 有关。20 名患者在 1 次或多次输注 MSCs 过程中均无畏寒、发热等不良反应。

**2.4 随访** 患者随访中位时间为 6 月 (80d ~ 3 年)。UCMSCs 组及常规治疗组在院外均定期复查血常规、肝肾功、巨细胞病毒,两组患者各项指标均在正常范围。UCMSCs 组及常规治疗组患者均无 1 例本病复发。UCMSCs 组患者发生 cGVHD 的有 3 例,常规治疗组发生 cGVHD 的有 2 例,发生率分别为 15% 和 10.5%,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

MSCs 除具有自我更新和多向分化的潜能外,其

免疫学特性也是目前研究和应用的热点。MSCs 不表达 MHC II 类分子和 FasL,低表达 MHC I 类分子,不表达共刺激分子 B721、B722,使其免受 T 细胞级 NK/T 细胞攻击,从而具有低免疫原性<sup>[2]</sup>。MSCs 还具有免疫调节作用,主要表现在:抑制 T、B 淋巴细胞、NK 细胞、树突状细胞 (DC) 的活化和增殖<sup>[3~5]</sup>;重建人类造血微环境的功能,从而提高造血干细胞移植的成功率。由于 MSCs 的上述免疫学特性,越来越多的临床研究将 MSCs 与 GVHD 的治疗联系在一起,将其用于预防及治疗 GVHD 并取得了较好的疗效。MSCs 主要来源于骨髓,在脐血、外周血、胎盘、肺、羊水、肌肉、网膜等组织中也有少量存在<sup>[6]</sup>。UCMSCs 与 MSCs 相比,其 MHC I 类分子及 CD106 分子表达更低,增值分化能力更强<sup>[7]</sup>。且 UCMSCs 在体外易于分离扩增,纯度高,无肿瘤细胞污染,采集方便,来源广泛,对供者无不利影响,易于保存和运输,是更理想的细胞治疗的种子来源。

我们治疗的 40 名 aGVHD 患者临床表现重,对激素耐药,其中 20 名在加用其他免疫抑制剂的基础上使用了 MSCs,其有效率及治愈率均高于未使用 MSCs 组,且其在治疗起效时间及治愈时间上也占有优势。MSCs 的使用避免了患者更多免疫抑制的同时使用,从而使患者感染风险相对降低,在治疗过程中无严重感染发生,无 1 名患者因感染死亡,证明我们的治疗措施安全、有效。国外临床研究报道接受 allo-HSCT 的患者出现 GVHD 经输注 UCMSCs 治疗后,患者白血病的复发率由未输注组的 20% 上升到了 60%,从而得出 MSCs 治疗 GVHD 的同时也会影响移植物抗白血病反应 (graft-versus-leukemia, GVL) 的结论<sup>[8]</sup>。但我科 20 名患者在随访过程中并未发现本病复发的情况,可能该不利反应的观察需要更长时间随访及病例累积。同时在输注 UCMSCs 后如何采取进一步措施预防 GVL 效应减弱所引起的后果也需进一步探索。从本科室 20 名 aGVHD 患者接受 UCMSCs 治疗所取得的疗效看来,UCMSCs 在 aGVHD 的临床应用中是值得推广的一种治疗方式,但其在治疗中仍然存在安全性、作用持久性、输注时间及剂量的规范化、远期预后等多种尚待完善的问题。随着 MSCs 免疫抑制作用机制研究不断推进及其临床研究的不断深入,上述问题一定会逐步改善, MSCs 在临床治疗上也将拥有更广阔的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Thomas ED,Storb R,Clift RA,et al.Bone marrow transplantation.N Engl J Med,1975,292:832-843.
- [2] Tse W T,Pendleton J D,Beyer W M,et al.Suppression of allogeneic

- 
- neic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation* 2003, 75( 3) : 389-397.
- [3] Aggarwal S ,Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* ,2005; 105 ( 4) : 1815-1822.
- [4] Crop M ,Baan C C ,Korevaar S S ,et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induce explosive T-cell proliferation. *Stem Cells Dev* 2010 ,19( 12) : 1843-1853.
- [5] Huang Y ,Chen P ,Zhang CB ,et al. Kidney-derived mesenchymal stromal cells modulate dendritic cell function to suppress alloimmune responses and delay allograft rejection. *Transplantation* 2010; 90( 12) : 1307-1311.
- [6] Keyser KA ,Beagles KE ,Kiem HP. Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation. *Cell Transplant* 2007 ,16 ( 5) : 555-562.
- [7] Jang Y ,Vaessen B ,Lenvik T ,et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow ,muscle and brain. *Exp Hematol* 2002 ,30( 8) : 890-964.
- [8] Ning H ,Yang F ,Jiang M ,et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: Outcome of a pilot clinical study. *Leukemia* 2008 ,22 ( 3) : 593-599.

( 2011-2-2 收稿 2012-2-6 修回)

本文编辑: 李弘武