

• 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[#] 陈幸华[#] 高蕾[△] 张曦 张诚 高力 曾韞璟 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 ± 6.34) d、(20.8 ± 6.94) d、($P > 0.05$);治愈的平均时间分别为(25.5 ± 7.18) d、(30.4 ± 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⁺2 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[△], ZHANG Xi, ZHANG Cheng, GAO Li, ZENG Wenjing, KONG Peiyan, LIU Hong, PENG Xiangui. [△]Corresponding author: GAO Lei. Department of Hematology, Xinqiao 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 ± 6.34) days and (20.8 ± 6.94) days respectively ($P > 0.05$). The time to complete remission of UCMSCs-group and the other group is (25.5 ± 7.18) d and (30.4 ± 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 1 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 \times 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

磷酸胺 60 mg/kg × 2 d); 急性淋巴细胞白血病及淋巴瘤细胞淋巴瘤 HLA 全相合患者采用 TBI/Cy 方案 (TBI8-40Gy 分 2 d; 环磷酸胺 60 mg · kg⁻¹ × 2 d)。HLA 半相合患者采用 CCNU + Bu + CTX + Ara-c + ATG 方案预处理 (CCNU200 mg/m² × 1 d; 白消安 0.8 mg · kg⁻¹ q6 h × 3 d; 阿糖胞苷 2 g/m² q12 h × 2 d; 环磷酸胺 1.8 g/m² × 2 d; ATG 5 mg · kg⁻¹ × 4 d)。

1.3 GVHD 的预防及诊断标准 采用环孢素 A (CsA) 联合短疗程甲氨喋呤 (MTX) 及骁悉 (MMF) 预防 GVHD: 亲缘间 HLA 全相合患者 CsA 于移植 - 1 d 开始使用, 剂量为 2.5 mg · kg⁻¹ d⁻¹ 持续 24 h, 至患者造血重建胃肠道功能恢复耐受口服后更换为 5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 口服药物治疗, 若患者至 +90 d 未发生急性 GVHD, CsA 逐渐减量。HLA 半相合患者 CsA 于移植 - 7 d 开始使用, 剂量为 1.5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 持续 24 h, 至移植 - 1 d 开始将剂量为增至 2.5 mg · kg⁻¹ d⁻¹, 胃肠功能恢复后换为口服, 若患者未发生 GVHD, 于移植 +150 d 开始逐渐减量。CsA 浓度维持在 200 ~ 400 ng/ml。亲缘间 HLA 全相合患者 MTX 于移植 +1 d 15 mg/m²、+3 d、+6 d 10 mg/m² 静脉用药。HLA 半相合及非血缘关系全相合患者 MTX 于移植 +1 d 15 mg/m²、+3 d、+6 d、+11 d 10 mg/m² 静脉用药。亲缘间 HLA 全相合患者 MMF 于移植 1 d 开始使用, 若患者至 +30 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 d 开始使用, 若患者至 +90 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^[1]。

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 d (移植 +18 d ~ +88 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 d (移植 +17 d ~ +76 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 μl, 混匀 37℃ 过夜消化约 20 h, 加 1% 的 HAase 1 ml 37℃ 消化 20 min pH7.5; 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 2 500 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℃、5% CO₂ 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 × 10⁷/100 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 mg · kg⁻¹ · 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 mg/m²) × 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 d (14 d ~ 36 d), 每次输注 MSCs 数量为 3 × 10⁷ 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 mg · kg⁻¹ · 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($10\text{mg}/\text{m}^2$) \times 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 χ^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为(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($80\text{d}\sim3$ 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^[2]。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^[3-5];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^[6]。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^[7]。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抗白血病反应(graft-versus-leukemia, GVL)的结论^[8]。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