

脐血间充质干细胞治疗神经系统疾病的临床研究

韩小改(河南省红十字血液中心,河南 郑州 450012)

摘要:目的 观察骨髓间充质干细胞(MSCs)移植治疗脊髓损伤(SCI)、脑外伤(TBI)、脑外伤后视神经萎缩、脑瘫和下肢静脉闭塞的临床疗效和不良反应。方法 脊髓损伤 2 例,TBI 4 例,TBI 后视神经萎缩 1 例,脑瘫 3 例,下肢静脉闭塞 4 例,脐血采集前经产妇知情同意并签订知情同意书,各项检测指标均为阴性。分离脐血后 MSCs 后经静脉途径和/或蛛网膜下腔内或局部一次性或分次注射。干细胞治疗前、后对患者神经功能变化及不良反应分别进行评价。结果 脐血 MSCs 治疗脊髓损伤 2 例,1 例有感觉、运动和自主神经功能改善,治疗 TBI 4 例,2 例运动功能明显改善,1 例感觉基本恢复,肌力Ⅲ级,1 例持续植物状态患者 PVS 评分由 5 分提高到 8 分。治疗脑外伤后视神经萎缩 1 例,患者鼻侧盲区有视力恢复,治疗 3 例脑瘫患者,2 例患者肌张力恢复明显,1 例患者 IQ 评分增加,运动功能改善,4 例下肢静脉闭塞患者皮温均接近正常,下肢水肿均减轻,感觉明显恢复。MSCs 移植常见的不良反应包括发热(6/15 例)、头痛(3/14 例)、腹胀(1/14 例);1 例于蛛网膜下腔内注射时出现双下肢麻木、脑膜刺激征。结论 脐血 MSCs 移植治疗脊髓损伤、TBI、TBI 后视神经萎缩、脑瘫、下肢静脉闭塞等疾病近期疗效明显,不良反应较少,但其远期疗效还需要进一步随访和观察。

关键词:脐血间充质干细胞(MSCs);移植;脊髓损伤;神经疾病;下肢静脉闭塞

中图分类号:R331.2⁺2 R322.8 文献标识码:A 文章编号:1004-549X(2012)10-1096-04

MSCs in the treatment of diseases of the nervous system HAN Xiaogai. The Red Cross Blood Center of Henan, Zhengzhou 450012, China

Abstract: Objective To observe the transplantation of umbilical cord blood mesenchymal stem cells (UCMSCs) for treatment of spinal cord injury (SCI), brain trauma (TBI), traumatic brain injury, optic atrophy, cerebral palsy and lower extremity venous occlusion of the clinical efficacy and adverse reactions. **Methods** There were 2 cases of spinal cord injury and 4 TBI, TBI optic atrophy one cases of cerebral palsy three cases, venous occlusion four cases of maternal informed consent and signed informed consent form before the cord blood collection, the indexes were negative. After separation cord blood MSCs by the intravenous route and / or subarachnoid or in part (once or several times injection). Before and after the stem cell treatment of neurological function in patients with change and adverse reactions were evaluated. **Results** Cord blood MSCs in the treatment of spinal cord injury in 2 cases, one case of sensory, motor and autonomic nerve function improvement, treatment of TBI 4 cases, 2 cases of motor function improved significantly, one cases feel basic recovery, muscle strength grade III patients with persistent vegetative state patients, that the score of PVS is 5 to 8 points. Optic atrophy patients after treatment of traumatic brain injury, patients with nasal blind spot visual acuity, the treatment of three cases of cerebral palsy, 2 patients with muscle tension recovery, patients IQ scores increased improvement in motor function, 4 cases of patients with lower extremity venous occlusion leather temperature were close to normal, lower extremity edema were reduced, the feeling was restored. MSCs transplantation common adverse reactions include fever (6/15 patients), headache (3/14 patients), abdominal distension (1/14), which were injected in the subarachnoid space, numbness of the lower limbs, meningeal irritation. **Conclusion** Cord blood MSCs transplantation in the treatment of spinal cord injury and optic atrophy after TBI, TBI, cerebral palsy, lower limb venous occlusion term effect of the disease significantly fewer adverse reactions, but its long-term efficacy need further follow-up and observation.

Key words: Cord blood mesenchymal stem cells (MSCs); Transplantation; Spinal cord injury; Neurological diseases; Leg vein occlusion

间充质干细胞(MSCs)移植是近来医学领域乃至整个生命科学领域的研究热点和前沿,干细胞因其具有高度自我更新和多向分化潜能性,是细胞移植的首选靶细胞。目前,对于中枢神经系统的疾病和中枢神经系统损伤引起的神经系统功能障碍最佳

的治疗方案是神经细胞移植以期恢复神经系统的正常功能。脐血作为 MSC 的来源之一具有含量较丰富,易于采集与保存,且不存在伦理问题,与骨髓相比,MSCs 具有来源充足免疫原性更弱等优点,预示脐血比骨髓间质干细胞有更广阔的应用前景,而成

为近几年干细胞研究的热点。

1 资料与方法

1.1 临床资料 住院患者共 15 例 ,其中脊髓伤患

者 2 例 ,脑外伤 3 例 ,脑外伤后视神经萎缩 1 例(郑州市第二人民医院神经外科) 脑瘫 3 例(郑州市第一人民医院儿科) 下肢静脉闭塞 4 例(郑州人民医院周围血管外科) 病 1 例(表 1) 。

表 1 进行脐血间充质干细胞移植患者资料及治疗方法

编号	性别	年龄(岁)	病情简介	脐血量(ml)	注射细胞量及注射途径
1	男	35	脊髓损伤	100	2×10^7 静脉滴注 1 周注射一次 4 周一疗程
2	女	28	脊髓损伤	95	2×10^7 静脉滴注 1 周注射一次 4 周一疗程
3	男	43	TBI	94	2×10^7 静脉滴注 1 周注射一次 4 周一疗程
4	男	39	TBI	102	2×10^7 静脉滴注 1 周注射一次 4 周一疗程
5	女	25	TBI	97	2×10^7 静脉滴注 1 周注射一次 4 周一疗程
6	男	33	TBI	95	2×10^7 静脉滴注 1 周注射一次 4 周一疗程
7	男	31	TBI 后视神经萎缩	95	2×10^7 静脉滴注 1 周注射一次 4 周一疗程
8	女	2.5	脑瘫(痉挛型)	100	2×10^7 鞘内注射 1 周注射一次 4 周一疗程
9	女	1	脑瘫(痉挛型)	101	2×10^7 鞘内注射 1 周注射一次 4 周一疗程
10	男	4	脑瘫(手足徐动型)	98	2×10^7 鞘内注射 1 周注射一次 4 周一疗程
11	女	66	下肢血管闭塞	98	2×10^7 局部点状注射 1 周注射一次 4 周一疗程
12	男	71	下肢血管闭塞	93	2×10^7 局部点状注射 1 周注射一次 4 周一疗程
13	男	45	下肢血管闭塞	97	2×10^7 局部点状注射 1 周注射一次 4 周一疗程
14	男	67	下肢血管闭塞	99	2×10^7 局部点状注射 1 周注射一次 4 周一疗程

1.2 方法

1.2.1 脐血采集 方法脐血来自郑州市妇幼保健院正常足月分娩的胎儿脐带血 ,取标本前征得产妇及家属同意 ,产妇体健 ,无肝炎、梅毒、艾滋病等传染性疾病 ,胎儿无先天性异常 ,ADA-A 抗凝 ,血量在 70 ~140 ml ,平均体积 90 ml。脐血分离前按卫生部血液检测标准进行检测。

1.2.2 细胞的分离、培养 将脐血采集袋用无菌接口机与一空袋相连 ,离心分出部分血浆 ,剩余的红细胞内加入生理盐水等倍稀释。加入盛有淋巴细胞分离液的多联袋主袋内 ,离心后分出白膜层 ,重复洗涤两次 ,以 1.0×10^6 mL/L 的密度接种于含 DMEM/

F12 培养液的培养瓶中 ,加入 B27 ,bFGF ,置于 5% CO_2 37℃ 及饱和湿度条件下培养。

1.2.3 治疗方法和评价 提取传至第 3 代的贴壁细胞 ,将细胞浓度调至 2×10^7 ,脑瘫患者采用蛛网膜下腔注射 ,下肢静脉血管闭塞采用局部注射 ,其余患者采用静脉注射。脐血间充质干细胞治疗前后 7 d、14 d、21 d、28 d、60 d、90 d 对患者神经功能及不良反应进行评价。脊髓损伤患者评价感觉、运动功能和 ADL 评分 ,脑外伤患者进行 Fugl-Meyer 评分和 ADL 评分。

2 结果(表 1 2)

表 2 患者行 MSCs 治疗的临床效果及不良反应

编号	临床治疗效果	不良反应
1	注射 2 周双下肢肌张力减低 ,疼痛减轻 ,1 个疗程后运动平面下降 1 个节段	无
2	注射后 7d 感觉平面下降 1 个节段 ,14d 下降 2 个节段 ,排尿功能改善	发热
3	治疗 1 周后出院 ,病情无变化 ,3 个月后随访 ,感觉平面下降 1 个节段 ,形成自主膀胱 ,运动功能无改善	无
4	治疗 4 个月 ,病情无变化 ,植物状态	无
5	注射 2 周时下肢肌力肢 IV + ,3 周时下肢肌力 V - ,运动功能持续改善	头痛 ,发热
6	注射 7d 后 ,感觉平面下降 2 个节段 ,14d 后形成反射性膀胱 ,1 个疗程结束时 ,肌力又 0 级至 I 级	腹胀
7	视力较治疗前好转 ,对光反射较灵敏 ,瞳孔直径基本正常 ,	头痛
8	注射 14d 后肢体痉挛减轻 ,3 周后足内翻可纠正 ,1 个疗程后锥体束症减轻	无
9	注射 7d 后上肢肌张力降低 ,14d 后牵张反射稍亢进 ,	发热 ,抽搐
10	注射 2 周后言语较治疗前清晰 ,颜面肌肉活动减少 ,1 个疗程后全身肢体活动较治疗前减少	头痛 ,发热
11	注射 1 周后下肢皮温较治疗前升高 ,疼痛减轻 ,1 个疗程后麻木感减轻	无
12	注射 10d 后皮肤颜色由青白色转红色 ,疼痛感减轻 ,1 个疗程后可在搀扶下行走	无
13	注射 2 周后皮肤针刺感基本消失 ,皮肤破溃处开始愈合 ,皮温增高	无
14	1 个疗程后麻木感消失 ,疼痛减轻	注射部位红肿 ,自行消失

3 讨论

MSCs 是目前备受关注的一类具有多向分化潜能的组织干细胞,来源于中胚层。在一定诱导条件下可以向成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、肌腱细胞、脂肪细胞以及基质细胞等中胚层细胞分化; MSCs 还可以向外胚层的神经细胞分化。大量动物实验已证实, MSCs 经各种途径移植后均可到达病损部位,并分化成神经干细胞、成熟神经元和胶质细胞,能安全有效地改善中枢神经损伤后的功能恢复^[1~3]。神经系统干细胞移植的途径包括脑实质内移植、血液内移植和脑脊液内移植。本组资料采用蛛网膜下腔内移植或静脉内移植方法对脊髓损伤、脑外伤、Parkinson's 病和多发性硬化等疾病的临床疗效和不良反应进行了初步观察,取得了一定的临床效果^[4]。

脐带血中有大量的 HSC 及 MSCs,且单份脐带血扩增后已能够满足成人移植所需要的单个核细胞数。临床采用 UCBT 治疗疾病已有 18 年历史,已逐渐成为一种成熟的现代治疗技术。临床上已将脐血作为干细胞移植的重要来源,移植治疗的病种范围不断的扩大,移植细胞的迁移有赖于以下机制^[5]: 1) 脑损伤导致血脑屏障的破坏,有利于移植细胞的移动; 2) 受伤脑组织在受伤初期强烈的炎症反应,使脑缺血组织释放趋化性蛋白和黏附分子,而趋化性蛋白和黏附分子介导移植细胞向受损部位移动^[6]; 3) 移植的细胞表达几种与迁移有关黏附蛋白。作者将 UCB-MSCs 植入大鼠脑内,在未使用免疫抑制剂的情况下细胞能够生存、迁移,说明成年大鼠脑内局部的微环境并未抑制 UCB-MSCs 的生长和发育,从移植区向损伤区迁移,修复局部组织的损伤和坏死,显示了体外培养的 UCB-MSCs 具有较低的免疫原性,作为细胞移植是安全的,这种细胞可能成为中枢神经系统疾病移植治疗的细胞来源^[7~9]。但临床中枢神经系统疾患病例中,原位神经干细胞在中枢神经系统疾病发生过程中,并未发挥自我修复作用。其可能原因有^[10]: 1) 原位诱导出功能特异的神经元可能需要多种刺激和特定细胞因子的作用。2) 患者中枢神经系统的干细胞缺陷或无法激活。因此神经干细胞的发现和体外培养成功及移植治疗,为中枢神经系统病的细胞替代疗法拓宽了道路。虽然如上所述神经系统疾病细胞替代治疗最理想的种子细胞是神经干细胞,但神经干细胞取材困难,特别是胎脑的来源有限,还有伦理和法律上的束缚,限制了其临床应用^[11]。2000 年 Woodberry 证实骨髓基质细胞在特定条件下能分化为神经样细胞

后,骨髓基质细胞逐渐成为神经科学领域的一个研究热点。体外研究证实其经不同的诱导方法可变为神经样细胞,并分别表达神经干细胞标志物 nestin、成熟神经细胞标志物 NSE、NF、 β Tubulin-III 及胶质细胞特异性标志物 GFAP、GalC。另有研究^[12]从电生理方面证实诱导后的细胞表现出神经细胞样膜电位。大量体内研究也表明骨髓基质细胞脑内移植可存活并改善损伤动物的神经功能。较之神经干细胞,骨髓基质细胞取材方便,来源广泛,但仍然存在供体有限、病毒污染等局限。这些限制了骨髓基质细胞的进一步临床应用。寻找其他来源的骨髓基质细胞成为近年来的研究热点。幸运的是,骨髓基质细胞作为间充质来源的干细胞,不仅存在于骨髓,也广泛存在于胎儿实质性脏器及脐带血。研究证实骨髓基质细胞存在于人脐带中,并且在体外有较强的增殖能力,特定条件下能够分化为神经元样细胞。有学者从冻存的脐带血中分离培养出成纤维细胞样克隆,这些细胞在神经细胞诱导介质中经 7~10 d 的诱导,呈现神经细胞样形态,表达神经细胞的特异性表型,提示冻存的脐带血可用作神经前体细胞的替代来源。本文结果表明,脐血间充质干细胞移植治疗短期内能有效的部分改善脑瘫患儿的粗大运动功能,表现在患儿卧位与翻身、坐位方面改善明显,在跑跳方面虽然改善明显,但仅限于极个别患儿,不具有普遍性。脐血间充质干细胞移植治疗同时能明显降低患儿肌张力,但能否保持长期疗效,且与目前存在的其他治疗方法相比是否具有优越性还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Marvin KW, Keelan JA, Eykholt RL. Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the human amnion and chorion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2002, 187 (3): 728-734.
- [2] Coassin M, Lambiase A, Micera A. Nerve growth factor modulates in vitro the expression and release of TGF- β 1 by amniotic membrane. *Greef's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2006 244(4): 485-491.
- [3] Karcher DM, Fleming-Waddell J N, Applegate TJ. Developmental changes in insulin-like growth factor (IGF)-I and -II mRNA abundance in extra-embryonic membranes and small intestine of avian embryos. *Growth Hormone and IGF Research*, 2009, 19(1): 31-42.
- [4] Yip S, Aboody KS, Burns M. Neural stem cell biology may be well suited for improving brain tumor therapies. *Cancer*, 2003, 9(3): 189-204.
- [5] Sakuragawa N, Tohyama J, Yamamoto H. Immunostaining of human amniotic epithelial cells: possible use as a transgene carrier in gene

- therapy for inborn errors of metabolism. Cell Transplantation ,1995 , 4(3) : 343-346.
- [6] Sakuragawa N ,Yamamoto H ,Sasaki M. Amniotic tissue transplantation: clinical and biochemical evaluations for some lysosomal storage diseases. Brain and Development ,1992 ,14(1) : 7-11.
- [7] 钱永海 ,李维佳 ,史明霞 . 羊膜间充质干细胞对异体外周血淋巴细胞转化的影响 . 肿瘤学杂志 2010 ,7: 537-541.
- [8] Díaz-Prado S ,Muñoz-López E ,Hermida-Gómez T. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. Journal of Cellular Biochemistry ,2010 ,111(4) : 846-857.
- [9] Hchida S ,Suzuki Y ,Araie M. Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells. Neuroscience Letters 2003 ,341(1) : 1-4.
- [10] Berg LC ,Koch T ,Heerkens T. Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. Vet Comp Orthop Traumatol 2009 ,5: 363-370.
- [11] Malgieri A ,Kantzari E ,Patrizi MP. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. Int J Clin Exp Med 2010 ,3(4) : 248-269.
- [12] Wagner W ,Wein F ,Seckinger A. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow ,adipose tissue , and umbilical cord blood. Experimental Hematology ,2005 ,33(11) : 1402-1416.