

自体骨髓单个核细胞治疗脊髓损伤的临床研究

崔贵祥¹ 宋成忠¹ 李义召² 岳寿伟^{1,3}

摘要 目的:观察自体骨髓单个核细胞移植治疗脊髓损伤患者的近期疗效及其安全性。方法:34例脊髓损伤患者,采用随机表法分为治疗组和对照组。治疗组16例,对照组18例,均经CT或MRI确诊并行手术或非手术治疗。两组在年龄、病程、损伤程度(ASIA分级)等方面均具有可比性($P>0.05$)。患者知情同意并签署知情同意书。治疗组在综合康复治疗的基础上给予自体骨髓单个核细胞(mononuclear cells,MNCs)治疗,经髂骨穿刺采集自体骨髓,分离提取骨髓单个核细胞后经静脉途径和/或蛛网膜下腔1次性或分次注射。对照组仅给予综合康复治疗。两组均于入院当天、治疗后第7、15、30、60、90天进行运动与感觉功能、日常生活活动能力、膀胱功能评定。结果:①治疗组感觉、运动和膀胱功能均有改善,但与对照组比较差异无显著性意义;②ASIA分级评定:治疗组共有5例患者在第90天评估中分别提高1—2级,对照组4例患者在第90天评估中分别提高1级;③MNCs移植的不良反应包括蛛网膜下腔移植后出现低热9例,头痛4例,腹胀1例;1例患者在注射后出现双下肢麻木、脑膜刺激征。经对症处理均于72h内消失。结论:自体骨髓MNCs移植治疗脊髓损伤近期有一定疗效而且安全,但远期疗效有待于进一步观察。

关键词 骨髓细胞;干细胞;移植;自体;脊髓损伤

中图分类号:R493, R651.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-04-0309-04

**Clinical study of autologous marrow mononuclear cells transplantation in patients with spinal cord injury/
CUI Guixiang, SONG Chengzhong, LI Yizhao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24
(4): 309—312**

Abstract Objective: To observe the short-term curative effect and safety of autologous bone marrow mononuclear cells(MNCs) transplantation on patients with spinal cord injury(SCI). **Method:** A total of 34 inpatients with SCI were randomly divided into treatment group and control group. The patients knew the experiment and signed the consent. A total of 16 cases in the treatment group and 18 cases in the control group were diagnosed with CT or MRI. It was comparable between the two group in age, course of disease, degree of injury (ASIA rating) ($P>0.05$). On the basis of comprehensive rehabilitation treatment, those in the treatment group received autologous MNCs treatment. The bone marrow(160—280ml) was harvested from the patients' ilia and then MNCs were isolated. The MNCs were injected intravenously or into subarachnoid space through lumbar puncture once or several times. Those in the control group only received comprehensive rehabilitation treatment. Motor function and sense, activity of daily living and bladder function were evaluated on the first day of rehabilitation, 7,15,30,60 and 90 days after treatment in the two groups. **Result:** All 34 patients were involved in the result analysis. ①The sense, motor and autonomic nerve function were improved to some extent in 16 patients of treatment group. Compared with the control group, there was no significant difference. ②In the treatment group, there were 5 cases elevated 1—2 grades respectively on the 90th day, In the control group, there were 4 cases elevated 1 grade respectively on the 90th day. ③The side effects during MNCs transplantation included fever (9 cases), headache (4 cases), and abdominal distension (1 cases). Of them, 1 case appeared numbness in his legs and meningeal stimulation after subarachnoid space injection, and disappeared within two or three days. **Conclusion:** MNCs transplantation in treatment of SCI is effective and safe in the short term, but long-term curative effect needs more observation.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, Qilu Hospital, Shandong University, Ji'nan, 250012

Key words bone marrow cells; stem cells; autologous transplantation; spinal cord injury

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后脊髓功能永久性障碍的主要原因是神经元、神经胶质细胞的丧失以及胶质瘢痕的形成阻碍了轴突的再生^[1-2]。结果显示,骨髓干细胞有向多种细胞分化的潜力,骨髓单个核细胞(mononuclear cells,MNCs)所包含的多种骨髓干细胞可作为多潜能干细胞对脊髓外伤或缺血性

损伤等造成的功能缺失具有显著的治疗作用。与其

1 山东大学齐鲁医院康复医学科,济南,250012

2 山东省残疾人康复中心

3 通讯作者

作者简介:崔贵祥,男,主任医师,硕士

收稿日期:2008-08-15

他细胞来源相比具有明显的优点:①取材方便,可从患者本人骨髓采集;②在宿主脑组织中可长期生存并进行整合;③可在体外快速培养扩增,并定向诱导分化;④避开了免疫排斥的难题;⑤不存在伦理道德和复杂的技术问题;⑥可进行基因修饰。本研究采用未经处理的自体MNCs移植治疗SCI,评价患者在治疗前后感觉、运动评分,日常生活活动(activity of daily living, ADL)能力和膀胱功能变化。

1 资料与方法

1.1 对象

脊髓损伤住院患者34例,采用随机表法分为治疗组和对照组。治疗组16例,男12例,女4例;17—45岁,病程1—11个月。颈髓损伤3例,胸髓损伤7例,腰髓6例。按美国脊髓损伤协会(ASIA)分级:A级9例,B级3例,C级2例,D级2例。对照组18例,男14例,女4例;18—45岁;病程1—12个月。颈髓损伤4例,胸髓7例,腰髓7例。ASIA分级:A级8例,B级5例,C级3例,D级2例。两组均经CT或MRI确诊并行手术或非手术治疗,两组在年龄、病程、损伤程度等方面均具有可比性($P>0.05$)。患者知情同意并签署知情同意书。由两名非参与治疗的专业医师进行盲法评估,均受过专业训练。

1.2 治疗方法

1.2.1 治疗组治疗方法:在综合康复治疗的基础上给予自体骨髓单个核细胞移植。①骨髓采集方法:在无菌手术室内局部麻醉下行骨髓穿刺术。取髂骨上缘为穿刺点,每侧3—5个点,每点抽取骨髓8—20ml,共采集骨髓160—280ml。术中监测患者心电图、脉搏、血压等生命体征,术后在监护病房观察12h,患者均无不适感。②细胞的分离、提取和保存:采集的骨髓用肝素抗凝,采集后立即送实验室,密度梯度离心法进行细胞分离,同时行细胞计数和细胞学鉴定,除外感染、恶性病变等情况。分离后的细胞不进行扩增,置4℃冰箱备用。③治疗方法:提取的MNCs悬液约5—10ml经静脉途径和/或蛛网膜下腔1次性注射,或对部分单核细胞进行保存,分别间隔1个月进行第二、三次注射。分离后剩余的血液含

有核细胞,立即经静脉回输给患者。静脉注射:单个核细胞数 $(4.07\text{--}12.90)\times10^7$,有核细胞数 $(20.56\text{--}58.87)\times10^8$;椎管内注射:单个核细胞数 $(4.08\text{--}11.20)\times10^7$,有核细胞数 $(18.72\text{--}50.63)\times10^8$ 。同时给予丹参注射液20ml静脉滴注治疗10d。

1.2.2 对照组治疗方法:仅给予综合康复治疗,根据患者损伤程度、脊柱稳定情况及功能状况采用抗痉挛体位、肌力训练、电动直立床站立、坐位平衡训练、转移训练、轮椅技巧训练、减重步行训练、日常生活活动能力训练、肢体按摩、针灸或功能电刺激、配合矫形器的应用等。

1.3 功能评定

1.3.1 运动功能评定:上下肢10块肌肉,分别是屈肘肌(C5)、伸腕肌(C6)、伸肘肌(C7)、屈指肌(C8)、小指展肌(T1)、屈髋肌(L2)、伸膝肌(L3)、踝背屈肌(L4)、拇长伸肌(L5)、踝跖屈肌(S1),按照Lovett肌力标准(0—5级)评分,总分100分;感觉评定为皮节的痛觉和触觉,按0,1,2共3级,痛觉共112分,触觉共112分。

1.3.2 日常生活活动能力评定:采用改良的Barthel指数(MBI)。

1.3.3 膀胱功能:观察尿失禁次数、自主排尿情况,膀胱容量及残余尿量测定。两组均于入院当天、治疗后第7、15、30、60、90天进行评定。

1.4 统计学分析

采用SPSS 11.0软件包进行统计学分析。两组治疗前后神经功能评分比较采用组间计量资料t检验。

2 结果

2.1 两组患者治疗前后神经功能评定情况

与对照组相比,治疗组患者感觉功能、膀胱自主排尿功能近期均有改善,但差异无显著性意义,特别是运动功能的改善不明显,见表1。

2.2 ASIA分级评定和ADL评分

治疗组ASIA分级A级的9例患者中,有2例在第90天评估中恢复为B级。B级患者3例,1例在第90天评估中恢复为C级。C级患者2例,1例

表1 两组患者治疗前后神经功能、MBI及膀胱残余尿量变化

($\bar{x}\pm s$)

项目	对照组					治疗组						
	治疗前	第7天	第15天	第30天	第60天	第90天	治疗前	第7天	第15天	第30天	第60天	第90天
感觉评分	86.6±16.3	86.5±18.7	87.8±20.1	88.6±18.4	96.5±20.7	101.2±21.2	87.8±15.9	87.3±17.9	89.1±19.9	96.7±21.5	101.4±21.8	105.1±26.2
运动评分	34.7±12.3	37.8±11.3	38.2±11.2	39.1±12.2	39.5±12.8	40.4±13.3	36.5±11.2	38.6±10.3	40.0±10.5	41.1±11.6	43.5±12.1	45.8±11.9
MBI	56.2±9.8	58.5±8.9	61.7±9.5	68.7±9.9	70.7±8.6	84.0±8.8 ^①	55.5±8.9	57.4±8.8	60.8±9.1	67.7±9.3	71.9±9.1	88.5±9.5 ^{①②}
膀胱残余尿量(ml)	226.6±23.1	213.5±19.7	197.8±23.8	162.6±19.2	212.1±22.3	80.4±19.1 ^①	228.7±20.2	217.6±19.8	198.4±19.1	159.2±22.3	106.2±17.6	76.5±15.0 ^{①②}

①两组治疗前后比较 $P<0.01$;②治疗后两组间比较 $P>0.05$

在第30天评估中恢复为D级,第90天评估中恢复为E级,能独立行走,生活完全自理。D级患者2例,其中1例在第90天评估中恢复为E级。对照组A级患者8例,1例在第90天评估中恢复为B级。B级患者5例,治疗后无变化。C级患者3例,1例在第90天评估中恢复为D级。D级患者2例,在第90天评估中恢复为E级。

经过系统康复训练,两组患者的MBI评分均有显著提高,治疗前后比较,均 $P<0.01$,差异有显著性意义。但两组之间比较差异无显著性意义。

2.3 膀胱恢复自主排尿平均时间和膀胱残余尿量测定

治疗组12例恢复自主排尿,平均为(56.7±8.6)d,对照组9例为(61.3±7.9)d,经统计学分析, $P>0.05$,差异无显著性意义。治疗组患者有8例出现尿失禁,6例在治疗后第15天、2例在第30天评估时症状消失;对照组8例患者出现尿失禁,在第90天评估时3例症状消失,5例无变化。采用间歇清洁导尿方法训练膀胱功能,两组患者残余尿量均有显著减少,治疗前后比较,均 $P<0.01$,差异有显著性意义。但两组之间比较差异无显著性意义。

2.4 MNCs移植的不良反应

多发生在蛛网膜下腔注射者,在16例患者中,9例出现低热,伴头痛4例,腹胀1例;1例患者于蛛网膜下腔注射后出现双下肢麻木、脑膜刺激征,经过对症处理均于72h内消失。静脉注射MNCs后未见不良反应。

3 讨论

研究证明,MNCs包含骨髓造血干细胞(hematopoietic stem cells,HSCs)、骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)、骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells,BMSCs)、内皮前体细胞以及功能不明的干细胞。HSCs、MSCs和BMCs是具有多向分化潜能的干细胞,可以分化成为神经细胞和胶质细胞,内皮前体细胞分化成血管细胞有助于血管生成,骨髓造血干细胞可以分化为内皮细胞、平滑肌细胞、神经细胞和胶质细胞。

本研究采集自体MNCs经腰穿蛛网膜下腔注射和/或静脉内注射的方法对脊髓损伤患者进行治疗,同时给予系统的康复训练,与对照组单用综合康复治疗相比,治疗组患者感觉功能、膀胱自主排尿功能近期疗效较为明显,但差异无显著性意义,特别是运动功能的改善不明显,可能与患者多为完全性、慢性SCI以及观察时间短有关。Carvalho等^[3]的动物实验

研究也提示,细胞移植治疗慢性脊髓损伤,动物行为学改善不明显。研究发现,病程在3个月以内者给予移植治疗效果略优于6个月以上者。Syková等^[4]的临床研究也证明,SCI后3—4周内进行细胞移植治疗,大鼠的运动功能显著改善。Carvalho等^[5]的研究则呈阳性结果,他们将骨髓CD45⁺/CD34⁻细胞移植给急性SCI大鼠模型(损伤后1周)的同时进行运动训练,结果这些动物的运动功能有显著地恢复。上述研究结果提示,移植治疗的时机对于神经功能恢复可能至关重要。

治疗前后两组患者的MBI评分显著提高、膀胱残余尿量明显减少,均 $P<0.01$,有显著性意义,提示运动训练和膀胱功能训练可以改善SCI患者的ADL能力和膀胱功能。但对照组与治疗组之间无差异,表明骨髓干细胞移植治疗对ADL和膀胱功能的改善无明显影响。

MNCs移植治疗SCI功能改善的作用机制可能是多方面的:①MNCs移植后向病变部位组织渗透融合^[6-8],一些移植的MNCs在新的环境下分化成神经样细胞和胶质细胞,表达神经表型,替代损伤细胞,重建神经环路,达到恢复神经功能的目的^[9-12]。Koda等^[13]比较了HSCs和BMCs移植治疗SCI的效果,HSCs来源于GFP转基因大鼠,BMCs经过培养扩增,分别将其注射到SCI 1周后大鼠模型的脊髓损伤部位。移植后,HSCs组GFP⁺细胞表达胶质细胞标志物,BMCs组有部分GFP⁺细胞呈双纤维粘连蛋白阳性,两组动物功能恢复没有差别,提示HSCs和BMCs移植均能促进SCI大鼠功能恢复;②MNCs可产生一些细胞因子,或通过减少细胞凋亡起到神经保护作用,对脊髓功能的恢复可能发挥积极作用^[14-16];③MSCs和BMCs也含有儿茶酚胺并可释放特异性神经递质及神经营养因子,如神经生长因子、脑源性神经生长因子等神经营养因子和神经递质的释放以及多种干细胞的联合移植使脊髓生长因子、细胞移植等多种因素介导的再生环境“允许作用”增强,减弱或消除再生抑制作用,可使轴索实现跨胶质瘢痕屏障的生长,促进脊髓损伤的修复^[17-21];④BMCs移植到缺血性脊髓损伤区后在缺血区内有新生血管生成,并且血管生成促进神经功能的恢复^[16]。实验证明,具有多分化潜能的骨髓细胞可增殖并增补内皮祖细胞,而内皮祖细胞可直接参与神经血管的形成及损伤修复过程。Neuhuber等^[19]和Ankeny等^[22]的研究认为,人骨髓细胞所产生的因子对于介导轴索生长,以及脊髓损伤后的功能恢复至关重要。在早期阶段,功能改善可能主要与细

胞产生的营养因子有关；而在晚期阶段，则可能主要是由于移植的细胞替代变性的宿主细胞^[15,122]。有研究显示，脊髓损伤后给予MNCs移植治疗，MNCs可分泌多种神经生长因子，并可促进中枢神经系统神经生长因子的分泌，并且表达血管内皮生长因子受体和胰岛素样生长因子受体等^[1,24]。骨髓MNCs局部移植后在脊髓内的迁移及经静脉灌注后优先聚集在受损区是发挥治疗作用的必要条件。

Modo等^[25]研究发现，静脉途径和蛛网膜下腔注射这两种移植方法均能改善神经功能，脑脊液内应用移植细胞能更有效地播种在损伤部位，Vaquero等^[26]认为脊髓损伤区域直接注射神经功能改善显著优于静脉注射。本组资料提示，多途径多次注射的效果可能优于单一方法治疗。

骨髓MNCs移植治疗SCI在临床上的应用仍处于起步阶段，其作用机制并不十分明确，移植的途径、时间以及取得显著的治疗效果所需的剂量还有待于进一步观察。本组资料显示该治疗方法取材容易，安全性较好，治疗SCI近期有一定临床效果。但由于样本量较小，观察和随访时间较短，其远期疗效还需要大样本的研究。

参考文献

- [1] Garbossa D, Fontanella M, Fronda C, et al. New Strategies for repairing the injured spinal cord: the role of stem cells [J]. *Neurol Res*, 2006, 28(5):500—504.
- [2] Barry FP. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2003, 69(3): 250—256.
- [3] Carvalho KA, Vialle EN, Moreira GH, et al. Functional outcome of bone marrow stem cells (CD45⁺/CD34⁺) after cell therapy in chronic spinal cord injury in Wistar rats [J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(3):845—846.
- [4] Syková E, Homola A, Mazanec R, et al. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury[J]. *Cell Transplant*, 2006, 15(8—9):675—87.
- [5] Carvalho KA, Cunha RC, Vialle EN, et al. Functional outcome of bone marrow stem cells (CD45⁺/CD34⁺) after cell therapy in acute spinal cord injury: in exercise training and in sedentary rats[J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(3):847—9.
- [6] Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(12): 1701—10.
- [7] Sheth RN, Manzano G, Li X, et al. Transplantation of human bone marrow-derived stromal cells into the contused spinal cord of nude rats[J]. *J Neurosurg Spine*, 2008, 8(2):153—62.
- [8] Callera F, de Melo CM. Magnetic resonance tracking of magnetically labeled autologous bone marrow CD34⁺ cells transplanted into the spinal cord via lumbar puncture technique in patients with chronic spinal cord injury: CD34⁺ cells' migration into the injured site [J]. *Stem Cells Dev*, 2007, 16(3): 461—6.
- [9] Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue [J]. *Spine*, 2004, 29(18):1971—1979.
- [10] Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats [J]. *Exp Neurol*, 2004, 190(1):17—31.
- [11] Sheth RN, Manzano G, Li X, et al. Transplantation of human bone marrow-derived stromal cells into the contused spinal cord of nude rats[J]. *J Neurosurg Spine*, 2008, 8(2):153—62.
- [12] Yano S, Kuroda S, Lee JB, et al. In vivo fluorescence tracking of bone marrow stromal cells transplanted into a pneumatoic injury model of rat spinal cord [J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(8):907—918.
- [13] Koda M, Okada S, Nakayama T, et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice[J]. *Neuroreport*, 2005, 16(16):1763—7.
- [14] Dasari VR, Spomar DG, Cady C, et al. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow down regulate caspase-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats [J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(12):2080—93.
- [15] Yoshihara T, Ohta M, Itokazu Y, et al. Neuroprotective effect of bone marrow-derived mononuclear cells promoting functional recovery from spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2007, 24(6):1026—36.
- [16] Shi E, Kazui T, Jiang X, et al. Therapeutic benefit of intrathecal injection of marrow stromal cells on ischemia-injured spinal cord[J]. *Ann Thorac Surg*, 2007, 83(4):1484—90.
- [17] Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increase the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 201(1):33—39.
- [18] Lu P, Jones LL, Tuszyński MH. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2005, 191(2):344—360.
- [19] Neuhuber B, Timothy Himes B, Shumsky JS, et al. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations[J]. *Brain Res*, 2005, 1035(1):73—85.
- [20] Xiang S, Pan W, Kastin AJ. Strategies to create a regenerating environment for the injured spinal cord [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(10):1267—1277.
- [21] Lu P, Jones LL, Tuszyński MH. Axon regeneration through scars and into sites of chronic spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2007, 203(1):8—21.
- [22] Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats [J]. *Exp Neurol*, 2004, 190(1):17—31.
- [23] Tao H, Rao R, Ma DD. Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition [J]. *Dev Growth Differ*, 2005, 47(6):423—433.
- [24] Zhang J, Li Y, Chopp M. Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells[J]. *Brain Res*, 2004, 1030(1):19—27.
- [25] Modo M, Stroemer RP, Tang E, et al. Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage[J]. *Stroke*, 2002, 33(9):2270—2278.
- [26] Vaquero J, Zurita M, Oya S, et al. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 398(1—2):129—34.