

·临床研究·

间充质干细胞移植治疗脊髓损伤患者的疗效分析

代喜平¹ 冯 梅¹ 卢爱丽¹ 高红霞¹ 庄壮锋¹

摘要

目的:探讨间充质干细胞(MSCs)移植治疗脊髓损伤的临床疗效。

方法:对23例脊髓损伤患者在腰椎穿刺方式下分别行骨髓MSCs或脐血MSCs移植术,术前和术后均进行安全性指标评价,干细胞移植前和移植3个月后分别进行美国脊髓损伤学会损伤分级评分。

结果:所有患者干细胞治疗前后安全性指标评价差异无显著性意义($P>0.05$),未出现严重的不良反应,同时不完全脊髓损伤患者行干细胞移植3个月内在运动功能、轻触觉及针刺觉方面均有明显改善($P<0.05$),而完全性脊髓损伤患者则在轻触觉及针刺觉方面有改善($P<0.05$),运动功能未见明显进步($P>0.05$),同时骨髓MSCs移植的患者3个月后运动功能的改善优于脐血MSCs移植的患者。

结论:MSCs移植治疗可以改善脊髓损伤患者的感觉功能,但不完全脊髓损伤患者运动功能的恢复优于完全性脊髓损伤患者,同时骨髓MSCs移植的患者运动功能的改善优于脐血MSCs移植的患者。

关键词 脊髓损伤;间充质干细胞;移植

中图分类号:R744 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2012)-06-0538-04

Treatment effect of mesenchymal stem cell transplantation on spinal cord injury: 23-case curative effect analysis/ DAI Xiping, FENG Mei, LU Aili, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2012, 27(6): 538—541

Abstract

Objective: To investigate the effect of mesenchymal stem cells (MSCs) transplantation on spinal cord injury (SCI).

Method: Twenty-three SCI patients were enrolled into the bone marrow MSCs or umbilical cord blood-derived MSCs transplantation via lumbar puncture. Preoperative and postoperative safety index were evaluated. The severity of SCI was assessed with ASIA scale before transplantation and 3 months after that.

Result: Statistical results showed that safety index of all patients before and after the treatment had no significant difference($P>0.05$) and there was no serious side effect happened. At the same time, improvement of motor function, tactile sense and sensation of pinprick were observed obviously ($P<0.05$) in patients with incomplete SCI 3 months after the transplantation. However, in complete SCI group, tactile sense and sensation of pinprick improved($P<0.05$) with barely advance in motor function ($P>0.05$). Three months after transplantation motor function improved markedly in bone marrow MSCs group compared with the umbilical cord blood-derived MSCs group.

Conclusion: MSCs transplantation could promote sensory function and motor function recovery that was better in incomplete SCI patients than the complete SCI ones. Bone marrow MSCs transplantation was more effective for improving motor function than umbilical cord blood-derived MSCs.

Author's address University City Branch of Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, 510002

Key word spinal cord injury; mesenchymal stem cells transplantation

由于脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后出现一系列的神经元破坏、轴索的髓鞘脱失、神经胶质细胞的功能异常,最终导致了脊髓功能缺损^[1]。近年来,细胞移植在脊髓损伤动物实验中取得了一定进展,提示存在修复损伤脊髓结构的连续性及恢复脊髓神经功能的可能性^[2-3]。而间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为一种成体干细胞,具有分化为神经细胞的潜能,而利用这一特点,众多的临床和实验研究表明,MSCs移植治疗脊髓损伤具有一定的疗效^[4-6]。但何种来源的MSCs的疗效更好以及MSCs移植对于脊髓损伤的适应人群的研究鲜有报道,本研究对23例脊髓损伤患者分别使用了骨髓MSCs和脐血MSCs进行干细胞移植,采用腰椎穿刺方式下经蛛网膜下腔注射MSCs,评价MSCs移植对于脊髓损伤患者的安全性,同时初步评价了不同的间充质干细胞种类和脊髓损伤严重程度的不同对于临床疗效的影响,现报道如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料

总结2009年4月—2011年6月广东省中医院细胞治疗科收治的脊髓损伤患者23例,其中男性16例,女性7例;年龄2—72岁,平均 (28.22 ± 16.19) 岁;病程 (12.91 ± 15.77) 个月,其中病程最长的为72个月,最短的为1个月。病因:外伤19例,脊髓型颈椎病2例,脊髓栓系综合征2例。损伤部位:颈髓9例,胸髓10例,腰髓2例,颈胸髓联合损伤1例,胸腰髓联合损伤1例。均经CT/MR扫描确诊,已行椎体内固定术治疗的17例。根据ASIA损伤分级标准,属于完全性脊髓损伤(即A级)的患者10例,不完全性脊髓损伤(即B、C、D、E级)的患者13例。我科已通过广东省中医药局审批,具有干细胞治疗资质,本治疗方案获得我院医学伦理委员会批准。

1.2 术前准备

患者入院后采取常规术前检查评估病情,确定患者是否有间充质干细胞移植的适应证,排除禁忌证,患者自愿接受干细胞治疗并签署干细胞移植同意书,根据患者情况决定进行何种干细胞移植,具体如下:

1.2.1 骨髓MSCs移植的适应证:年龄在4—50岁之

间;无严重血液、呼吸、循环、代谢和消化系统疾病,无严重的脊柱畸形;血常规、肝肾功能、电解质、凝血功能、肝炎标志物、HIV、RPR、心电图等指标均在正常范围。

1.2.2 脐血MSCs移植的适应证:年龄小于4岁或大于50岁;无严重血液、呼吸、循环、代谢和消化系统疾病,无严重的脊柱畸形;血常规、肝肾功能、电解质、凝血功能、肝炎标志物、HIV、RPR、心电图等指标均在正常范围;或拒绝行骨髓MSCs移植治疗者。

1.3 干细胞采集和制备

1.3.1 骨髓MSCs:在无菌手术室内行骨髓多点采集术,根据患者感觉损伤平面决定是否实施局部麻醉,取双侧髂后上嵴为穿刺点,每侧3—5个点,每点抽取骨髓10—20ml,儿童按照5ml/kg体重计算采集的骨髓量,成人采集骨髓量为180—200ml。采集的骨髓用肝素抗凝,采集后立即送细胞培养实验室,加入冰醋酸溶解红细胞,过200目/cm²滤网除去小凝血块,以PBS缓冲液洗涤2次,同时去除上层脂肪滴,再用含自体血清的DMEM/F12(Gibco公司)等倍稀释,以1.5:1的比例缓慢加于Percoll分离液(Pharmacia公司)的表面,2500转/min离心30min,制备单个核细胞(MNCs)。用培养基洗涤细胞2次,将所获得的细胞记数,按 $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于一次性塑料培养瓶(Gibco公司)中,加入DMEM/F12培养液(含自体血清,100U/ml青霉素,100U/ml链霉素),置37℃,5%CO₂的培养箱中培养,3d后弃去未贴壁细胞,更换培养液,以后每3—4d换液1次;待需用时,用0.25%胰酶室温下消化5—6min,1500转/min离心15min,洗涤2次,并将所获得的细胞记数^[7]。每次制备骨髓MSCs悬液2ml左右,细胞数量为 2×10^7 — 3×10^7 个/份。

1.3.2 脐血MSCs:由深圳市北科细胞工程研究所提供脐血MSCs,均来自健康分娩孕妇的脐血(检测艾滋病病毒、梅毒抗体、肝炎标志物5项、TORCH 5项等),进行分离、提取、培养后制成细胞悬液,所有的脐血MSCs均由东莞市中心血站检验科检测后出具检验合格证,每份细胞为2ml左右,细胞数量为 2×10^7 — 3×10^7 个/份。

1.4 移植

干细胞制备完成后,每4—5d进行1次干细胞移

植,方法为腰椎穿刺下经蛛网膜下腔注射干细胞。患者取侧卧位,成人取L3—L4椎间隙为穿刺点,小儿取L4—L5椎间隙为穿刺点,是否进行局部麻醉取决于患者脊髓损伤后感觉障碍平面与穿刺点的位置,在无菌操作下将骨髓MSCs/脐血MSCs缓慢注入蛛网膜下腔,术后去枕平卧6h,每个疗程进行4—6次移植治疗。

1.5 移植前后进行安全性指标评价

分别由2名神经科主治医师完成干细胞移植前和移植后3个月ASIA评分。评价指标包括安全性指标的比较、不同脊髓损伤程度的患者治疗前后疗效评价及接受不同干细胞类型的脊髓损伤患者治疗前后疗效评价。

1.6 统计学分析

应用SPSS 17.0软件进行统计学处理。计量资料采用均数±标准差表示,治疗前后的比较采用配对t检验,计数资料采用描述性分析及χ²检验。

2 结果

纳入的所有患者均顺利完成MSCs移植治疗疗程,其中骨髓MSCs移植15例,脐血干细胞移植8例。

2.1 安全性指标检验

对患者治疗前后的血常规、二便常规、肝肾功能、电解质、凝血功能、肝炎标志物、HIV、RPR、CEA、AFP、心电图等指标进行对比,差异无显著性意义(P>0.05)。3例患者在治疗后出现一过性发热、头痛,经退热、补液等对症处理后,均可缓解。

2.2 疗效评价

对23例脊髓损伤患者干细胞移植前后进行ASIA评分,评估患者接受干细胞移植后疗效,见表1—2。

3 讨论

脊髓损伤是指由于外界直接或间接因素导致脊髓损伤,在损害的相应节段出现各种运动、感觉和括约肌功能障碍,肌张力异常及病理反射等相应改变^[8]。近年来,随着交通和建筑业的发展,脊髓损伤的发生率每年都在上升。由于脊髓损伤的常规治疗方法效果不理想,故一旦发生脊髓损伤,致残率极

表1 不同脊髓损伤程度的干细胞移植前后ASIA评分 ($\bar{x}\pm s$,分)

脊髓损伤程度及疗效评价时间	例数	运动得分	轻触觉得分	针刺觉得分
不完全性	13			
移植前		57.00±22.65	67.38±24.21	71.15±25.37
移植后3个月		61.77±22.48 ^①	70.31±25.26 ^①	73.92±25.91 ^①
完全性	10			
移植前		33.00±22.75	45.80±24.68	45.90±24.77
移植后3个月		34.20±22.56 ^②	47.20±24.81 ^③	47.20±24.81 ^③

不完全性脊髓损伤组治疗前后比较:①P<0.05;完全性脊髓损伤组治疗前后比较:②P>0.05;③P<0.05

表2 不同干细胞类型的干细胞移植前后ASIA评分 ($\bar{x}\pm s$,分)

干细胞类型及疗效评价时间	例数	运动得分	轻触觉得分	针刺觉得分
骨髓MSCs	15			
移植前		44.07±23.74	58.87±25.08	62.13±27.20
移植后3个月		47.73±24.71 ^①	61.33±26.01 ^①	64.47±27.69 ^①
脐血MSCs	8			
移植前		51.25±29.05	56.38±30.03	56.50±30.01
移植后3个月		53.63±29.80 ^②	58.25±30.92 ^③	58.25±30.92 ^③

骨髓MSCs组治疗前后比较:①P<0.05;脐血MSCs组治疗前后比较:②P>0.05;③P<0.05

高,将极大地影响患者今后的生存质量,也会给家人及社会带来沉重的负担。干细胞是具有自我复制能力和产生分化细胞能力的细胞^[9],干细胞移植也是利用这一特性,成为了近年来新兴的一种治疗脊髓损伤的手段,越来越得到了人们的重视。

MSCs作为目前研究最多、应用最广的成体干细胞,由于避免了免疫排斥、伦理道德、细胞来源等方面的问题,更是引起了众多学者的关注。20世纪70年代,有学者发现在骨髓细胞培养中,小部分黏附细胞能够分化形成类似骨或软骨的集落。后来证实这些贴壁细胞就是骨髓MSCs,人们还先后从脐带血和外周血及其他组织中分离得到MSCs。这些来源的MSCs具有与骨髓来源的MSCs相似的特性^[10—11]。实验研究表明,MSCs移植能促进脊髓损伤的神经结构修复及神经功能恢复,其机制可能与替代作用、营养作用、诱导作用、桥接作用等有关^[12]。Hostetter等^[13]把绿色荧光蛋白转基因鼠的骨髓MSCs移植到小鼠脊髓损伤处,2周后在损伤处发现表达神经元特异表型的神经元样细胞,我国学者程洪斌等^[14]对60例脊髓损伤后遗症患者行CT引导下脊髓穿刺骨髓MSCs移植,并进行术前和术后半年ASIA损伤分级评分,结果表明患者感觉功能、运动功能、日常生活活动能力明显改善。同样,脐血MSCs在脊髓损伤

的神经修复方面也体现了优势,韩国的学者Kuh SU等发现脐血干细胞能分化为神经细胞,并且能提高中等程度脊髓损伤大鼠模型的运动功能^[15],而国内的实验研究和临床研究也都发现人脐血MSCs移植可以促进脊髓损伤的功能恢复^[17-18]。目前众多的临床研究集中在MSCs的疗效评价方面,很少有研究对不同的MSCs种类及脊髓损伤严重程度对于脊髓损伤患者进行干细胞移植的受益进行评价和比较,本研究分别运用骨髓MSCs和脐血MSCs移植治疗脊髓损伤的患者,治疗前和治疗后3个月的ASIA评分对比表明:两种MSCs均可在一定程度上改善脊髓损伤患者的感觉功能(包括轻触觉、针刺觉),但在运动功能的改善方面,不同脊髓损伤程度的患者显示了不同的疗效,完全性脊髓损伤的患者3个月后的运动得分无明显改善($P>0.05$),而不完全性脊髓损伤的患者移植前和移植后3个月的运动得分比较则体现出了显著性差异($P<0.05$),这与既往研究结果相一致^[7],其中的原因考虑后者可能存在脊髓自身恢复,能为骨髓干细胞通过传递某些“信息”或分泌某种物质激活了“休克的神经细胞”,使残存的神经纤维恢复了传导功能。在完全截瘫病例中,解剖组织学发现,有的残存不少神经纤维,但临床无功能,如能使这些神经纤维恢复传导功能并达到一定数量,就可能使截瘫肢体恢复部分功能^[19],但目前来说,达到这一点是困难的。另外,脐血MSCs移植与自体骨髓MSCs移植的疗效相比,自体骨髓MSCs移植在运动功能的改善体现了更好的疗效,结合入选的病例特点,考虑原因可能与入选脐血MSCs移植的患者年龄为小于4岁或大于50岁,年龄小于4岁的患儿由于理解力、注意力等发育尚未成熟,故在ASIA量表评估中的配合程度受到影响,而年龄超过50岁的患者本身的神经再生能力下降,故在一定程度上影响了脐血MSCs移植的疗效评价。同时由于入组的病例数不多,故对于统计结果也造成了一定的影响。

目前世界上许多的研究都表明MSCs能够在一定程度上促进脊髓损伤的修复,其可能机制是移植的MSCs本身能够分泌大量不同种类的神经营养因子和支持因子,改变了脊髓损伤的局部微环境,从而给受损神经再生提供了条件,促进神经轴突和髓鞘

的再生,同时MSCs在合适的环境条件下具有分化为神经细胞的可能,神经细胞从结构上修复脊髓损伤,使受损的神经通路得以再通^[20];MSCs还能破坏胶质细胞瘢痕屏障,兴奋静息的神经细胞等^[21]。以上的多种可能机制也为MSCs在脊髓损伤中的运用提供了有力的理论支持。

总之,通过本研究的安全性及疗效评价,了解到MSCs(自体骨髓MSCs/脐血MSCs)移植对于脊髓损伤患者是安全的,且在一定程度上能改善脊髓功能,特别是感觉功能,但由于现纳入的病例数仍偏少,且对于何种损伤程度的脊髓损伤患者适宜做干细胞移植、选择何种干细胞的疗效更好等方面的研究仍处于探索阶段,需在以后的研究工作中进一步总结。

参考文献

- [1] Chen S, Lin J. Advances in repair of spinal cord injury by transplantation of marrow mesenchymal stem cells[J]. Zhongguo XiuFu Chongjian Waike Zazhi, 2007, 21(5):507—511.
- [2] 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.
- [3] Okano H, Okada S, Nakamura M, et al. Neural stem cells and regeneration of injured spinal cord[J]. Kidney Int, 2005, 68(5):1927—1931.
- [4] Liu WG, Wang ZY, Huang ZS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells expressing the bFGF transgene promote axon regeneration and functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. Neurol Res, 2011, 33(7):686—693.
- [5] Ban DX, Ning GZ, Feng SQ, et al. Combination of activated Schwann cells with bone mesenchymal stem cells: the best cell strategy for repair after spinal cord injury in rats[J]. Regen Med, 2011, 6(6):707—720.
- [6] 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—687.
- [7] 李自营,步星耀,张圣旭,等.自体骨髓间充质干细胞联合周围神经移植治疗脊髓损伤[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(16):3041—3044.
- [8] 燕铁斌,窦祖林,冉春风.实用瘫痪康复[M].第2版.北京:人民卫生出版社,2010.616.
- [9] Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution[J]. Cell, 2000, 100(1):157—168.

(下转第550页)