

自体骨髓间充质干细胞移植治疗脑梗死的临床分析^{*}

谢旭芳, 刘诗英, 金光华, 屈新辉, 张昆南, 吴晓牧[△] (江西省神经病学研究所/江西省人民医院神经内科, 南昌 330006)

【摘要】 目的 探讨自体骨髓间充质干细胞经蛛网膜下腔移植治疗脑梗死的临床疗效及安全性。**方法** 选择 2011 年 1 月至 2012 年 7 月在江西省人民医院神经科住院的 60 例脑梗死患者, 随机分为治疗组和对照组, 每组各 30 例。对照组给予常规药物治疗, 并尽早进行康复训练; 治疗组在对照组治疗的基础上, 行自体骨髓间充质干细胞经蛛网膜下腔移植治疗, 每周 1 次, 两周为 1 个疗程。分别于移植前, 移植后 3、6 个月对两组患者进行神经功能缺损程度评定(NIHSS 评分)和日常生活活动量表(Barthel 指数)评分, 同时观察治疗组患者的不良反应。**结果** 两组患者移植前 NIHSS 评分及 Barthel 指数评分与对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 治疗组移植后 3、6 个月的 NIHSS 评分均明显低于对照组($P<0.01$), 而 Barthel 指数评分明显高于对照组($P<0.01$)。治疗组移植术后 3 例出现低热, 4 例出现头痛, 均未经治疗症状自行消失。**结论** 自体骨髓间充质干细胞经蛛网膜下腔移植治疗脑梗死是安全可行的, 可明显改善脑缺血后神经功能损伤, 为脑梗死的治疗开辟了一条新的途径。

【关键词】 骨髓间充质干细胞; 移植; 脑梗死

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.21.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)21-2955-03

Clinical analysis of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treating cerebral infarction^{*}

XIE Xu-fang, LIU Shi-ying, JIN Guang-hua, QU Xin-hui, ZHANG Kun-nan, WU Xiao-mu[△] (Department of Neurology, Jiangxi Provincial People's Hospital • Jiangxi Provincial Research Institute of Neurology, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

【Abstract】 Objective To investigate the clinical efficacy and safety of subarachnoid transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in the treatment of cerebral infarction. **Methods** 60 inpatients with cerebral infarction in the neurology department of our hospital from January 2011 to July 2012 were selected and randomly divided into the treatment group and the control group, 30 cases in each group. The control group received the conventional treatment and conducted the rehabilitation training as early as possible. On the basis of the control group treatment, the treatment group was given the treatment of autologous bone marrow mesenchymal stem cells subarachnoid transplantation once a week, with 2 weeks as 1 course of treatment. The neurological deficit degree(NIHSS score) and the function assessment of activities of daily living(Barthel Index, BI) were evaluated before transplantation, in 3, 6 months after transplantation in the two groups, at the same time the adverse reactions were observed in the treatment group. **Results** The NIHSS score and BI before treatment in both groups had no statistical difference compared with the control group($P>0.05$); the NIHSS scores in 3, 6 months after transplantation in the treatment group were significantly lower than those in the control group($P<0.01$), but BI was significantly higher than that in the control group, the differences had statistical significance($P<0.01$). 3 cases in the treatment group appeared low fever after transplantation and 4 cases had headache, all symptoms disappeared without treatment. **Conclusion** Autologous bone marrow mesenchymal stem cells subarachnoid transplantation in the treatment of cerebral infarction is safe and feasible, can significantly improve the neurological functional damage after cerebral ischemia, which opens up a new approach for treating cerebral infarction.

【Key words】 bone marrow mesenchymal stem cells; transplantation; cerebral infarction

脑血管病具有发病率高、致残率高、病死率高三大特点, 严重影响着人们的生活质量。脑血管疾病 80% 为脑梗死, 其发病原因是脑血流突然中断致脑组织缺血坏死, 从而引起神经功能损伤。近年来尽管在使用重组组织型纤溶酶原激活剂溶栓治疗方面取得了很大的进展, 但由于溶栓时间窗过于狭窄, 只有极少部分患者受益, 因此迫切需要寻找一种新方法来治疗脑梗死。大量动物实验已证实, 骨髓间充质干细胞经脑实质和脑脊液移植可达到病变部位, 并分化成神经干细胞, 能安全有效

地促进损伤的神经功能恢复, 但其临床应用还处在摸索阶段^[1]。本院采用自体骨髓间充质干细胞经蛛网膜下腔移植治疗脑梗死患者, 以探讨其临床疗效及安全性。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 1 月至 2012 年 7 月在本院神经内科住院的脑梗死患者, 诊断符合 1995 年全国第四届脑血管病会议制定的诊断标准^[2], 经头颅 MRI 确诊, 并符合以下入选条件: (1) 年龄 18~70 岁, 为首次发病, 病程 1 周内, 意识清楚、病

^{*} 基金项目: 江西省主要学科科学技术带头人培养计划资助项目(20113BCB22006); 江西省卫生厅科技计划资助项目(20123017)。

作者简介: 谢旭芳, 女, 本科, 主任医师, 主要从事脑血管病及癫痫的临床研究。[△] 通讯作者, E-mail: wuxm79@163.com。

情稳定。(2)发病后出现失语、偏瘫及共济失调等神经功能缺损症状。(3)无心、肝、肾、肺及其他脏器严重功能障碍,无凝血机制障碍。(4)非高敏体质,无严重过敏史。符合入选条件患者 60 例,随机分为治疗组和对照组,每组各 30 例。治疗组男 19 例,女 11 例,年龄 34~72 岁,平均(51.4±7.2)岁,出现共济障碍 5 例,失语者 7 例,运动障碍 30 例,吞咽困难 6 例。对照组男 18 例,女 12 例,年龄 32~75 岁,平均(53.7±6.1)岁,出现失语者 4 例,吞咽困难 5 例,运动障碍 28 例,共济障碍 4 例。两组患者的年龄、性别构成比差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经医院医学伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 治疗方案 对照组:入院后给予常规药物治疗,包括抗血小板药物(阿司匹林片 100 mg/d),改善脑循环药物(丹参注射液静脉滴注 14 d 为 1 个疗程),他汀类药物(氟伐他汀钠 40 mg/d),脑保护剂(依达拉奉静脉滴注 14 d 为 1 个疗程)等,同时在康复治疗师的指导下尽早进行康复训练。

治疗组:在对照组治疗的基础上,经患者和家属签署知情同意书后,完成血常规、出凝血时间、心电图等术前常规检查后,于发病后 1~4 周内行自体骨髓间充质干细胞移植治疗,具体方法为患者进入百级层流室,在局部麻醉下以双髂后上棘为穿刺点,行骨髓穿刺,采集自体骨髓液 120~200 mL,在超净工

作台内将骨髓加入干细胞提取专用试剂中,经过除去红细胞、离心、提取、清洗等步骤分离出骨髓干细胞,体外连续培养和传代增值获得骨髓干细胞悬液 2~5 mL(含 107 级细胞数),通过腰穿注入蛛网膜下腔,每周 1 次,2 次为 1 个疗程。

1.2.2 干细胞移植治疗的安全性检测 治疗组患者于干细胞移植术后 2 周内密切观察生命体征变化及是否出现不良反应,术后 3 个月复查血常规、肝肾功能、肿瘤标记物检查;术后 6 个月复查头颅 MRI,以观察干细胞移植治疗的安全性。

1.2.3 疗效评估 分别于移植治疗前,治疗后 3、6 个月对两组患者采用美国国立卫生试验院卒中量表(NIHSS)及日常生活活动量表(Barthel 指数)评分进行神经功能缺损程度评定和日常生活活动功能评定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者治疗前后 NIHSS、Barthel 指数评分比较 两组患者治疗前,NIHSS 评分及 Barthel 指数评分与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。而治疗组移植治疗后 3、6 个月的 NIHSS 评分明显低于对照组($P<0.01$),Barthel 指数评分明显高于对照组($P<0.01$)。见表 1。

表 1 两组治疗前后 NIHSS、Barthel 指数评分比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	<i>n</i>	治疗前		治疗后 3 个月		治疗后 6 个月	
		NIHSS 评分	Barthel 指数评分	NIHSS 评分	Barthel 指数评分	NIHSS 评分	Barthel 指数评分
对照组	30	18.9±10.7	28.8±11.3	17.5±7.4	35.2±19.6	14.8±6.3	41.1±21.9
治疗组	30	19.1±11.5	27.9±12.8	13.8±7.1	44.9±18.4	9.5±5.9	61.5±20.3
<i>t</i>	—	1.45	1.36	8.372	6.564	8.687	6.862
<i>P</i>	—	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:—此项无数据。

2.2 干细胞移植治疗的不良反应 治疗组 3 例术后第 2 天出现低热,体温波动于 37~38 ℃,持续 24~48 h 后自行退热,4 例术后第 1 天诉有头痛,经卧床 6 h 后症状均消失。30 例患者于治疗 3 个月后复查血常规、肝肾功能正常,肿瘤标记物癌胚抗原(CEA)、癌抗原 125(CA125)、甲胎蛋白(AFP)、糖类抗原 199(CA199)均阴性,于治疗 6 个月后复查头颅 MRI 未出现明显异常。

3 讨 论

目前临床治疗脑梗死的方法包括早期溶栓、改善脑血循环、促进脑代谢、使用抗血小板药物等,但梗死后缺血中心神经细胞的死亡仍无法避免,是脑梗死致残率和病死率高的主要原因。因此,受损脑组织的修复与神经功能的恢复是人们追求的理想治疗境界。近年来随着干细胞工程的推进,干细胞治疗通过取代及修复受损的神经细胞而成为治疗脑血管病的新途径。

近年来国外研究发现中枢神经系统中存在神经干细胞(NSC),在体外可扩增分化为神经元、星形细胞和尖突少胶质细胞^[3-4]。然而由于成体细胞组织中 NSC 数量少且取材困难,异体移植还存在免疫排斥及伦理学问题等,使 NSC 在神经系统疾病治疗中受到一定限制。来源于中胚层的骨髓间充质干细胞(BMSCs)除具有干细胞的基本特点外,还具有以下特点:(1)取材方便,可以从自体骨髓中取材;(2)可在体外快速培养扩增并定向诱导分化;(3)在宿主脑组织中可长期生存并进行

整合;(4)便于自体移植,避免了免疫排斥且不涉及伦理道德问题,是干细胞治疗的理想种子细胞。大量动物实验已证实骨髓间充质干细胞经脑实质移植、血液内移植和脑脊液内移植后均可达到缺血部位,并分化成神经干细胞、成熟神经元和胶质细胞,能安全有效地促进中枢神经缺血损伤的脑功能恢复^[5-7],为 BMSCs 移植治疗脑梗死的临床研究提供了有力证据。

目前国内外有关 BMSCs 移植治疗脑血管病的临床研究已取得了一些进展。I 期临床试验证明,有序地植入自体 BMSCs 是安全的^[8]。2005 年 Bang 等^[9]首次在 30 例脑卒中患者中通过静脉途径移植自体 BMSCs,经过 1 年观察证实移植组神经功能较对照组明显改善,并且未发现不良反应,为 BMSCs 在脑血管疾病中的应用开创了良好的开端。国内张儒有等^[10]采用蛛网膜下腔移植的方法将 BMSCs 移植给 50 例脑卒中患者,采用美国功能独立性测评分对患者术前及术后 6 个月进行评定,结果所有患者移植后的评分高于移植前,提示 BMSCs 移植治疗脑卒中取得了一定的临床疗效。

在 BMSCs 移植治疗脑血管病的研究中,移植途径主要包括 3 种:(1)通过立体定向或开颅的方式直接注入脑实质;(2)经血管(颈动脉或静脉)注入;(3)经腰穿注入蛛网膜下腔。不同的移植途径各有优缺点,采用立体定向或开颅注入至病灶的方法需要干细胞的量少,移植的干细胞直接在病损部位发挥作用,但创伤大,会损伤正常脑组织;经血管移植的干细胞要通过

血脑屏障,且有一部分细胞被脾、肺等器官摄取而影响疗效,而采用经腰穿注入蛛网膜下腔的移植方式则避免了血脑屏障的阻碍,有利于更多的细胞进入脑内。缺血性卒中后最适宜干细胞移植治疗的时机目前仍不是很清楚,但移植时间窗对治疗效果的影响很大。虽然移植的细胞在脑卒中的各阶段均能存活,但在急性期的存活率低于亚急性期和晚期^[11]。移植时间的选择和脑梗死的病理变化过程是密切相关的,多数学者认为最佳移植时间点的选择要考虑超早期大量炎症因子、氧自由基和毒性神经递质对移植细胞的影响,同时也要顾及梗死后慢性期瘢痕形成对移植细胞生长、整合的阻碍。因此本研究选择在患者发病后的 1~4 周,取自体骨髓间充质干细胞经蛛网膜下腔移植治疗 30 例脑梗死,结果发现治疗组的 NIHSS 评分明显低于对照组($P<0.01$),而且 Barthel 指数评分明显高于对照组($P<0.01$)。虽然治疗组移植后 3 例出现低热、4 例出现头痛,但未经处理均在 2 d 内症状消失,说明骨髓间充质干细胞经蛛网膜下腔移植治疗脑梗死不良反应少,近期疗效肯定,能明显改善患者的神经功能,提高其生活能力。骨髓间充质干细胞治疗脑梗死的机制目前尚不明确,可能从以下几方面发挥作用:(1)刺激内源性干细胞和神经祖细胞的增殖分化,从而促进神经功能的恢复^[12];(2)自身分化为神经元样细胞和神经胶质样细胞,代替损伤细胞重建神经环路^[13];(3)通过促进新生血管生成,改善局部血液供应来实现改善神经功能的作用^[14];(4)自身分泌和促进宿主分泌神经生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、脑源性神经营养因子等细胞因子来修复缺血性损伤^[15]。

总之,骨髓间充质干细胞移植为脑梗死的治疗开辟了一条新的途径,因其来源充足、易于获取,可体外培养和扩增,自体移植避开了排斥反应及伦理学限制,所以具有广阔的临床应用前景。本研究初步证实骨髓间充质干细胞经蛛网膜下腔移植治疗脑梗死是安全可行的,可明显改善脑缺血后神经功能损伤,但因观察时间短病例样本数少,其远期疗效仍有待于进一步深入研究。

参考文献

- [1] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J]. Proc Natl Acad Sci, 1999, 96(19): 10711-10716.
- [2] 中华医学会第 4 次脑血管病学术会议. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1988, 29(8): 367-368.
- [3] Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system[J]. Cell, 1999, 96(1): 25-34.
- [4] Flax JD, Aurora S, Yang C, et al. Engraftable human neu-

ral stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and Express foreign genes[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(11): 1033-1039.

- [5] Li Y, Chen J, Chen XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery[J]. Neurology, 2002, 59(4): 514-523.
- [6] 潘兴华, 贺斌, 庞荣清, 等. 猴脑血管缺血模型复制及骨髓间充质干细胞移植治疗[J]. 热带医学杂志, 2006, 6(5): 533-536.
- [7] Yano S, Kuroda S, Shichinohe H, et al. Do bone marrow stromal cells proliferate after transplantation into mice cerebral infarct:—A double labeling study[J]. Brain Res, 2005, 1065(1/2): 60-67.
- [8] Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplant-ability and therapeutic effects of bone marrow-derived, mesenchymal cells in children with Osteogenesis imperfecta[J]. Nat Med, 1999, 5(3): 309-313.
- [9] Bang OY, Lee JS, Lee PH, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients[J]. Ann Neurol, 2005, 57(6): 874-882.
- [10] 张儒有, 郑永日, 胡韶山, 等. 神经干细胞移植治疗脑卒中后遗症 50 例临床效果分析[J]. 中国临床康复, 2006, 10(9): 138-139.
- [11] Chen JL, Li Y, Wang L, et al. The therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [12] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells[J]. Nat Med, 2003, 9(11): 1370-1376.
- [13] Li Y, Chopp M, Chen J, et al. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(9): 1311-1319.
- [14] Chen JZ, Li Y. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats[J]. Circ Res, 2003, 92(6): 692-699.
- [15] Mudò G, Bonomo A, Di Liberto V, et al. The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain[J]. J Neural Transm, 2009, 116(8): 995-1005.

(收稿日期: 2014-02-24 修回日期: 2014-04-16)

(上接第 2954 页)

- [6] 李红平, 赵逵, 毛万姬, 等. 胃黏膜 TGF- β^1 在幽门螺杆菌感染中的表达及与外周血 T 细胞亚群变化的关系[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 8(5): 506-511.
- [7] 朱冰, 吴丽娟, 陈雪芹, 等. 微生物感染致机体免疫功能改变的回顾性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 9(32): 1681-1683.
- [8] Ichikawa Y, Shimizu H, Takahashi k, et al. Lymphocyte subsets of the peripheral blood in Sjögren's syndrome and

rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Rheumatol, 1989, 7(1): 55-61.

- [9] 汪迅, 李博, 叶志中, 等. 干燥综合征患者外周血中 T 淋巴细胞亚群的分析与临床意义[J]. 中国药物与临床, 2007, 7(4): 268-270.
- [10] 莫扬, 许小东. 流式细胞术检测体液 T 淋巴细胞亚群的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(1): 52-54.

(收稿日期: 2014-02-26 修回日期: 2014-04-15)