

骨髓间充质干细胞移植治疗硬皮病样慢性移植物抗宿主病： 4例免疫机制变化☆

周虹¹, 郭梅², 孙琪云², 黄珊¹, 杨卓¹, 边春景¹, 曾洋¹, 艾辉胜², 赵春华¹

Bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: Immunologic mechanism changes in 4 cases

Zhou Hong¹, Guo Mei², Sun Qi-yun², Huang Shan¹, Yang Zhuo¹, Bian Chun-jing¹, Zeng Yang¹, Ai Hui-sheng², Zhao Chun-hua¹

Abstract

BACKGROUND: The immunomodulatory ability of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) gives it a promising future in treating graft-versus-host disease (GVHD), especially with previous success in treating patients with acute GVHD. However, there are fewer reports concerning BMSCs in treating chronic GVHD, particularly for sclerodermatous chronic graft-versus-host disease (ScGVHD).

OBJECTIVE: To evaluate the efficacy and safety of treatment of BMSCs for ScGVHD, and to primarily explore the immunological mechanism of clinical efficacy.

METHODS: Four ScGVHD patients at the Affiliated Hospital of Academy of Military Medicine Science, between September 2006 and August 2008, were enrolled for this trial. The median patient age was 41 years, 1 female and 3 male. The patients received BMSCs infusion at a dose of $(1.0-2.0) \times 10^7$ cells every time by intrabone marrow injection from the anterosuperior iliac spine and BMSCs from the same donor for the same patient were infused more than once. Concomitant medications for ScGVHD were individualized for each patient, but all were current standard medicines and the doses were significantly tapered.

RESULTS AND CONCLUSION: After BMSCs infusion, the ratio of Th1 to Th2 was dramatically overturned, with an increase of Th1 and a decrease of Th2 reaching at a new balance. Correspondingly, symptoms of all the four patients gradually improved. During the course of BMSCs treatment, the life signs and laboratory results from the recipients remained normal. By the time of this report, there has been no recurrence of leukemia in the four patients. Although this study alone cannot guarantee the application of BMSCs in ScGVHD, the results are strongly in favor of the idea that the BMSCs treatment for ScGVHD patients is therapeutically practical without any detectable side effects, which may provide a new insight into the matter of treating ScGVHD clinically, thus will greatly increase the survival rate of leukemia after allogeneic bone marrow transplantation.

Zhou H, Guo M, Sun QY, Huang S, Yang Z, Bian CJ, Zeng Y, Ai HS, Zhao CH. Bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: Immunologic mechanism changes in 4 cases. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(10): 1885-1891.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞由于具有免疫调节能力使其能用于治疗移植物抗宿主病, 特别是治疗急性移植物抗宿主病已获临床成功, 但是对于治疗慢性移植物抗宿主病, 特别是硬皮病样慢性移植物抗宿主病(ScGVHD)的研究报道还很少。

目的: 评价骨髓间充质干细胞治疗 ScGVHD 的有效性及安全性, 同时探讨取得疗效的免疫学机制。

方法: 于 2006-09/2008-08 在解放军 307 医院血液移植科接受骨髓间充质干细胞髓内注射 ScGVHD 患者 4 例, 男 3 例, 女 1 例; 中位年龄 41 岁。骨髓间充质干细胞髓内注射具体方法: 取右髂前上棘为穿刺注射点, 注射骨髓间充质干细胞悬液, 4 例患者的给药剂量基本控制在 $(1.0-2.0) \times 10^7$ 个细胞/次, 行间断多次给药。合并用药亦有差异, 但都为治疗 ScGVHD 的传统药物, 且用量大为减少。

结果与结论: 经过多次骨髓内输注骨髓间充质干细胞后, Th 细胞的比例发生了明显的变化, Th1 的比例上调, Th2 的比例相应的下调, 从而使两者达到了新的平衡点。与之相应, 患者的临床症状也逐渐好转。而且在骨髓间充质干细胞治疗的随访期内, 患者的生命体征和实验室检查指标均未发现异常, 也未出现白血病的复发。证明骨髓间充质干细胞对 ScGVHD 是有治疗效果的, 为临床治疗 ScGVHD 开辟了一个新的方法, 从而能提高白血病患者骨髓移植的存活率。但由于样本数较少, 需要进一步扩大规模进行临床研究, 以进一步证实其安全性和疗效。

关键词: 慢性移植物抗宿主病; 硬皮病样慢性移植物抗宿主病; 免疫机制; 骨髓间充质干细胞; 干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.10.038

周虹, 郭梅, 孙琪云, 黄珊, 杨卓, 边春景, 曾洋, 艾辉胜, 赵春华. 骨髓间充质干细胞移植治疗硬皮病样慢性移植物抗宿主病: 4 例免疫机制变化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(10):1885-1891.
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Center of Excellence in Tissue Engineering, Institute of Basic Medical Sciences & School of Basic Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China; ²Department of Hematology and Transplantation, Affiliated 307th Hospital of Academy of Military Medicine Science, Beijing 100039, China

Zhou Hong☆, Studying for doctorate, Center of Excellence in Tissue Engineering, Institute of Basic Medical Sciences & School of Basic Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China
comeoniris@yahoo.com.cn

Correspondence to: Zhao Chun-hua, Doctor, Professor, Doctoral supervisor, Center of Excellence in Tissue Engineering, Institute of Basic Medical Sciences & School of Basic Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Correspondence to: Ai Hui-sheng, Chief physician, Department of Hematology and Transplantation, Affiliated 307th Hospital of Academy of Military Medicine Science, Beijing 100039, China

Received: 2009-11-18
Accepted: 2009-12-28

¹ 北京协和医学院, 中国医学科学院组织工程中心, 北京市 100005;
² 解放军军事医学科学院附属 307 医院血液病移植科, 北京市 100039

周虹☆, 女, 1981年生, 河北省唐山市人, 汉族, 北京协和医学院在读博士, 主要从事干细胞的基础研究与临床应用。
comeoniris@yahoocom.cn

通讯作者: 赵春华, 博士, 教授, 博士生导师, 北京协和医学院, 中国医学科学院组织工程中心, 北京市 100005

并列通讯作者: 艾辉胜, 主任医师, 解放军军事医学科学院附属 307 医院血液病移植科, 北京市 100039

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)10-01885-07

收稿日期: 2009-11-18
修回日期: 2009-12-28
(20091118031/M:Z)

0 引言

慢性移植抗宿主病 (chronic graft-versus-host disease, cGVHD) 多发生于异基因造血干细胞移植术 100 d 之后, 是异基因造血干细胞移植主要的后期并发症, 在 25%~40% 的患者中出现^[1]。cGVHD 的发病机制并不完全清楚, 但更多学者认为由 Th2 细胞比例增高所介导的免疫缺陷及自身免疫反应在 cGVHD 的发病中占主导地位^[2-3]。cGVHD 几乎影响到所有的器官及组织, 但皮肤损害最为常见, 患者出现硬皮病样的皮肤损害, 称为“硬皮病样慢性移植抗宿主病”(sclerodermatous cGVHD, ScGVHD)。主要临床表现包括苔藓样损伤, 硬斑样损伤, 色素沉着异常和貂皮样斑疹^[4-6]。

尽管皮质激素与环孢素 A 或他克莫司的广泛联合应用, 但是对广泛性 cGVHD 的治疗, 结果仍不令人满意。到目前为止, 仍无有效的特异性药物阻断 cGVHD 病情的发展。况且, ScGVHD 是最严重的疾病类型, 对传统的标准药物更是不敏感^[7-9], 因此临床迫切需要寻找一种更有效, 不良反应更小的方法用于治疗 cGVHD 尤其是 ScGVHD。

近几年有很多研究报道骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 在体内外都具有免疫调节能力^[10-11], 而且在正常 Th 细胞分化中下调 Th1 的分化, 进一步影响细胞免疫的功能, 使其能对急性 GVHD 的治疗有效^[12-15]。本实验室曾经选择 BXSB 小鼠作为评价 BMSCs 对病理状态下免疫系统影响的模型, 结果显示其能纠正系统性红斑狼疮异常的 Th0 分化平衡, 即下调病理状态下显著活化的白细胞介素 4 生成细胞, 进一步抑制异常活化的体液免疫。而且对肾脏功能的改善也是非常显著和持久的^[16]。这些结果提示 BMSCs 在骨髓移植治疗自身免疫性疾病中有重要作用。那么, BMSCs 治疗 ScGVHD 是否有效呢? 基于此, 应用 BMSCs 髓内注射治疗 4 例 ScGVHD 患者, 初步取得较好的临床疗效, 并探讨其发挥疗效的免疫机制。

1 对象和方法

设计: 回顾性病例分析。

时间及地点: 病例来自于 2006-09/2008-08 军事医学科学院附属 307 医院血液病移植科。

对象: 选取接受 BMSCs 髓内注射的

ScGVHD 患者 4 例, 男 3 例, 女 1 例; 年龄 38~42 岁, 中位年龄 41 岁。患者的临床基本情况见表 1, 4 例患者由于造血系统恶性肿瘤均进行过非清髓造血干细胞移植并且在移植后的中位时间 11.5 个月 (4~19 个月) 出现 ScGVHD 的临床症状; 4 例患者在接受间充质干细胞治疗前均进行了标准的免疫抑制药物治疗, 治疗的中位时间为 17.3 个月 (4.5~37.3 个月), 但病情未得到任何改善。按《医院管理条例》规定对治疗及风险进行如实告知^[17], 患者均签署知情同意书, 治疗方案经医院医学伦理委员会批准。

BMSCs 的供者均为健康志愿者, 签署了知情同意书。

表 1 患者基本情况表
Table 1 Baseline characteristics of patients

ID	Gender	Diagnosis	Bone marrow transplantation	
			Graft	Donor
1	Male	AML/M4b	Nonmyeloablative HSCT	Sib/sister
2	Female	AML/M4	Nonmyeloablative HSCT	Sib/brother
3	Male	MM	Nonmyeloablative HSCT	Sib/sister
4	Male	ALL	Nonmyeloablative HSCT	Sib/sister

ID	aGVHD grade	Type	ScGVHD	
			Issp. before BMSCs transplantation (mg/d)	Duration before BMSCs transplantation (mon)
1	II	Ext.	TDM(150)-PDN(30)-TAC(35)	15.5
2	0	Ext.	CSA(75)-PDN(30)	12
3	I	Ext.	TDM(200)-PDN(30)-TAC(30)	4.5
4	II	Ext.	CSA(75)-TDM(150)-PDN(15)-MMF(2000)	37.3

BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells; AML: acute myeloid leukemia; MM: multiple myeloma; ALL: acute lymphocytic leukemia; HSCT: hematopoietic stem cell transplantation; Sib: HLA-identical sibling; Ext.: extensive; Issp.: immunosuppression; CSA: cyclosporine A; MMF: mycophenolate mofetil; MTX: methotrexate; TAC: tacrolimus; TDM: thalidomide; PDN: prednisone

干预措施:

BMSCs 的分离、培养及鉴定: 采集供者骨髓 20~30 mL, 用淋巴细胞分层液 (密度 1.077 g/mL), 分离外周血单个核细胞按 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种于培养瓶, 用体积分数为 2% 胎牛血清的 DMEM/F12, 40% MCD B-201 培养液, 置 37 °C, 体积分数为 5% CO₂ 培养箱培养, 48 h 后弃去非贴壁细胞, 以后每 3 d 半量换液, 当细胞达 80%~

90%融合时, 0.125%胰酶常规消化传代, 到第3代后进行形态、表型、多系分化及免疫调节功能检测。当细胞达到要求数目后, 消化收集细胞并用生理盐水清洗细胞2次, 计数, 锥虫蓝拒染法判断细胞活性在95%以上, 然后重悬于生理盐水中备用。将培养BMSCs的上清液、运输细胞容器用生理盐水冲洗, 进行乙肝、巨细胞病毒、HIV、支原体检测为阴性, 细菌、真菌培养未见生长。

有丝分裂原刺激的T细胞增殖: 采集正常人外周血, 用淋巴细胞分离液梯度离心分离单个核细胞, 用体积分数为10%胎牛血清、RPMI 1640完全培养基培养2 h, 收获悬浮细胞。加入96孔板, 每孔加入0.1 mL含50 mg/L植物血球凝集素(PHA)的RPMI 1640培养基, 含T细胞 1×10^5 。分为3组: ①空白对照组: 只加T细胞, 不加PHA刺激。②反应组: 加入PHA刺激的T细胞。③正常MSC组: 加入PHA刺激的T细胞和正常志愿者的MSC(MSC:T细胞=1:10)。每组设3个平行孔。在体积分数为5%CO₂饱和湿度条件下培养2 d后, 加入 37×10^3 Bq/孔的³H-TdR(上海放射医学研究所), 18 h后收获, 用闪烁计数器计数, 结果用counts/min(cpm)表示。

BMSCs的髓内注射: 输注情况见表2。

表2 BMSCs 输注情况
Table 2 Summary of bone marrow mesenchymal stem cells infusion

ID	Frequency	Inversion time (d)	Dose (cells/2 mL)	Concomitant medications (mg/d)
1	1	0	1.2×10^7	PDN(20)-TAC(19)-TDM(50)
	2	+9	2.0×10^7	
	3	+14	1.0×10^7	
	4	+22	2.0×10^7	
	5	+28	2.0×10^7	
	6	+35	2.0×10^7	
	7	+49	2.0×10^7	
	8	+52	1.5×10^7	
2	1	0	1.0×10^7	PDN(5)
	2	+14	2.1×10^7	
	3	+39	1.1×10^7	
	4	+47	1.0×10^7	
3	1	0	1.8×10^7	TAC(19)
	2	+8	1.5×10^7	
	3	+15	1.0×10^7	
	4	+22	2.0×10^7	
4	1	0	2.2×10^7	PDN(5)-MMF(0.25)
	2	+7	1.7×10^7	
	3	+14	1.4×10^7	
	4	+28	2.1×10^7	
	5	+38	2.0×10^7	
	6	+45	1.9×10^7	
	7	+52	1.0×10^7	

PDN: prednisone; TAC: tacrolimus; TDM: thalidomide; MMF: mycophenolate mofetil

取右髂前上棘为穿刺注射点, 以2%利多卡因2 mL局部麻醉, 缓慢抽取骨髓液约4 mL腾空, 再注射BMSCs

悬液2 mL。4例患者的给药剂量基本控制在 $(1.0 \sim 2.0) \times 10^7$ 个/次; 给药次数因各种原因(如病情、家庭、医院等因素)影响, 分布于4~8次之间, 中位给药次数为5.75次; 合并用药亦有差异, 但都为治疗ScGVHD的传统药物, 且用量大为减少。

疗效评估标准:

分泌胞内因子的T淋巴细胞的百分率的检测: 采集患者外周血5 mL, 按上述方法分离单个核细胞, 用体积分数为10%胎牛血清、RPMI1640完全培养基培养于24孔板内, 每孔加入1 mL, 含 1×10^6 细胞。

分为4组: ①白细胞介素2组: 加入刺激因子豆蔻佛波醇乙酯(PMA) (500 μg/L)、Calcium Ionophore (50 g/L)各10 μL, 以GolgiStop™ 0.67 μL终止刺激反应, 6 h后收集细胞。②γ-干扰素(IFN-γ)组: 与白细胞介素2组相同。③白细胞介素10组: 加入刺激因子脂多糖(LPS)(100 mg/L) 10 μL, 以GolgiStop™ 0.67 μL终止刺激反应, 24 h后收集细胞。④白细胞介素4组: 加入刺激因子植物血球凝集素(0.5 g/mL) 60 μL, 3 d后离心弃上清, 用1 mL上述培养基重悬细胞种回原24孔板, 同时加入重组人白细胞介素2 (1 g/L)、重组人白细胞介素4 (2 g/L)各10 μL, 2 d后再加入刺激因子豆蔻佛波醇乙酯、Calcium Ionophore各10 μL, 以GolgiStop™ 0.67 μL终止刺激反应, 4 h后收集细胞。

将上述各组收集的细胞1 400 r/min离心6 min, 1 mL 40 g/L多聚甲醛于4 °C固定10 min, 用洗液(含0.5%的牛血清白蛋白的PBS)洗涤1次, 加入1 mL 0.1%皂素室温破膜1 h, 离心弃上清后加入2 μL一抗(一抗为PE标记的小鼠抗人单克隆抗体白细胞介素2、γ-干扰素、白细胞介素10、白细胞介素4)于4 °C孵育30~40 min。孵育结束后, 洗涤细胞两次, 并悬浮在500 μL的PBS中, 置于冰上待流式细胞仪检测。

皮肤硬化程度通过改良的Rodnan评分法(RS)进行评估:

在治疗前及治疗后, 根据皮肤受累的严重程度按改良的Rodnan评分法^[18]对所有患者进行评估。该方法是将患者面部、胸部、腹部、左右侧肢体、手足背等划分为17个评估部位, 每个部位根据皮肤受累的程度按0~3分评估: 0分=正常皮肤; 1分=轻度硬厚; 2分=明显硬厚, 不能推动; 3分=严重硬厚, 不能捏起, 总记分为0~51分。

主要观察指标: 分泌胞内因子T淋巴细胞的百分率的检测, 改良的Rodnan评分, 患者病情评估, 安全性评估。

设计、实施、评估者: 为本文作者。均经过正规专业培训。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 12.0软件完成统计处理, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 BMSCs的基本生物学特性

细胞形态:

原代培养的细胞大部分于24 h内即贴壁, 呈梭形。经过换液、传代, 造血细胞基本消失, 视野中均为成纤维样细胞, 见图1a。

分化潜能:

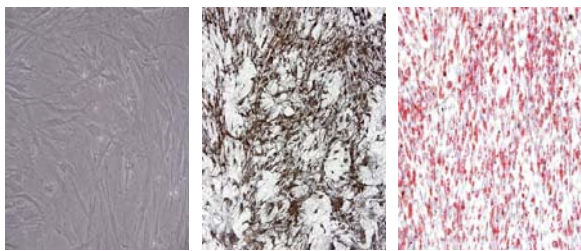
细胞在成脂培养体系中培养14 d, 光镜下可见胞浆中充满脂肪小泡, 细胞油红O染色呈阳性, 见图1b; 在成骨培养体系中培养, 第14天von Kossa染色显示有大量钙化基质沉积, 见图1c。

免疫表型:

流式细胞仪检测显示细胞高表达Fik-1, 同时高表达黏附分子CD29、CD44、CD106、CD105; 但造血内皮细胞的标记CD34、CD31均为阴性, 同时也不表达MHC-II类分子HLA-DR, 见图2。

免疫调节T细胞增殖:

来源于正常志愿者的BMSCs能明显抑制T细胞的增殖, 在两者比例为1:10的情况下, T细胞的增殖可以抑制到不和BMSCs共培养时的66.7%, 与以前的实验结果类似, 见图3。



a: The cell morphology of BMSCs at 3rd passage (x100) b: Von Kossa staining of BMSCs after osteogenic induction (x100) c: Oil-red O staining of BMSCs after adipogenic induction (x100)

Figure 1 Morphology and differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs)

图 1 骨髓间充质干细胞的形态及分化潜能

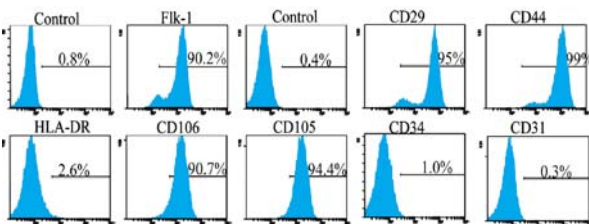
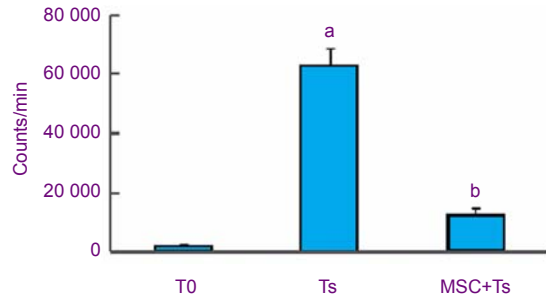


Figure 2 Immunophenotypes of bone marrow derived mesenchymal stem cells

图 2 骨髓间充质干细胞的免疫表型

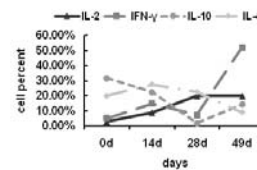


^aP < 0.05, vs. T0; ^bP < 0.05, vs. Ts

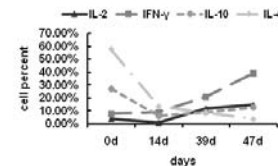
Figure 3 The inhibitory effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) on T lymphocyte proliferation in mitogen proliferative assays

图 3 骨髓间充质干细胞在有丝分裂原刺激的T细胞增殖实验中抑制T细胞的增殖

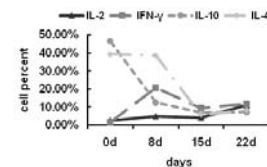
2.2 BMSCs能明显逆转患者外周血中辅助性T淋巴细胞亚群的比例 见图4。



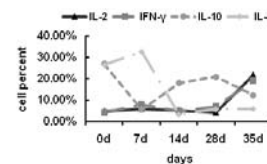
a: Patient 1, polygram detected by flow cytometry at days 0, +14, +28, and +49 of BMSCs infusion



b: Patient 2, polygram detected by flow cytometry at days 0, +14, +39, and +47 of BMSCs infusion



c: Patient 3, polygram detected by flow cytometry at days 0, +8, +15, and +22 of BMSCs infusion



d: Patient 4, polygram detected by flow cytometry at days 0, +7, +14, +28, and +35 after BMSCs infusion

Figure 4 Percentage of intracellular cytokines producing T lymphocyte subsets detected by flow cytometry

图 4 流式细胞仪检测分泌胞内因子的T淋巴细胞的百分率

为了观察ScGVHD患者及经BMSCs治疗后体内Th1和Th2细胞的比例变化情况, 在治疗前后多个时间点提取患者外周血单个核细胞经过刺激因子的刺激后, 应用流式细胞术检测 γ -干扰素、白细胞介素2、白细胞介素10、白细胞介素4生成细胞的比例。胞内细胞因子检测结果显示4例患者在BMSCs治疗前白细胞介素10和白细胞介素4生成细胞的比例显著高于白细胞介素2和 γ -干扰素生成细胞的比例, 两种细胞的比例明显失衡, 而且通过白细胞介素10和白细胞介素4抗体及白细胞介素2和 γ -干扰素抗体进行流式细胞术检测结果一致, 提示ScGVHD患者体内Th0细胞的分化失衡, Th0倾向于向Th2细胞的分化; 而经过BMSCs的多次注射治疗后, 患者体内的白细胞介素10和白细胞介素4生成细胞的比例逐渐下降, 而白细胞介素2和 γ -干扰素生成细胞的比例对应逐渐上升, 4例患者的总体变化趋势是一致的。

将4例患者BMSCs治疗前及治疗后的最后一次流式结果进行统计学分析, 显示分泌4种胞内因子T细胞的百分率均具有统计学差异, 见图5, 提示BMSCs在患者体内对过度升高的Th2细胞的分化发挥了适当的调节作用, 下调了Th0向Th2的分化, 从而使Th1细胞的比例上调, 进而扭转了Th1细胞和Th2细胞的比例失衡而达到新的平衡点。

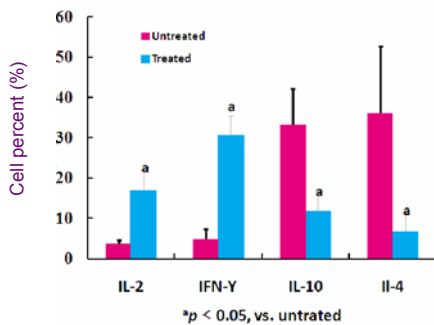


Figure 5 Comparison of the four intracellular cytokines producing cells percentage between pre-infusion and the last infusion of bone marrow derived mesenchymal stem cells

图5 BMSCs治疗前及治疗后分泌4种胞内因子的T细胞的百分率的比较

2.3 患者病情评估结果 全部病例随访的中位时间为14.1个月(4.6~23个月), 4例患者的RS值均显著降低(>75%), 见图6。症状和体征也获得了明显的改善, 输注BMSCs后的前两周, 患者四肢皮肤略变软, 肿胀减轻, 下肢皮肤疼痛减轻, 双足皮溃处形成黄痂, 干燥无渗液; 局部硬化皮肤色泽明显变浅。经间断多次输注BMSCs后全身皮肤较前软化, 皮肤自觉瘙痒, 多处皮肤新生, 新生皮肤脱屑减少, 无破溃和溢脓现象, 毛发

逐渐长密变黑, 出汗较前明显增多; 四肢皮肤肿胀好转, 疼痛减轻甚至消失; 关节活动度增加, 甚至可自行行走; 双手掌皮肤可见皮纹; 皮溃处黄痂脱落, 干燥无渗液; 免疫力也增强, 感冒发烧次数明显减少, 见图7。

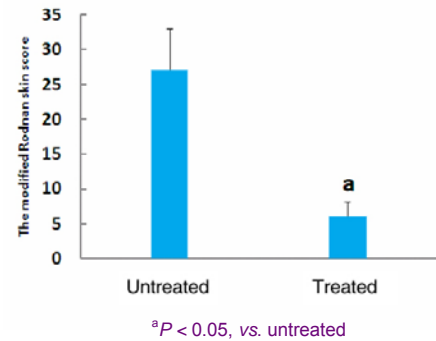


Figure 6 Comparison of Rodnan score between pre-infusion and the last infusion of bone marrow derived mesenchymal stem cells

图6 四例患者在BMSCs治疗前及治疗后进行Rodnan评分比较



a: Change process of skin lesion of the right ankle at days 0, +14, and +123 after BMSCs initial infusion



b: Change process of skin lesion of the right ankle at days 0, +14, and +123 after BMSCs initial infusion

Figure 7 The change process of skin lesion before and after of bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) infusion

图7 ScGVHD患者BMSCs治疗前后皮损的变化过程

另外, BMSCs治疗期间的合并用药显著减量, 见表1和表2。综上所述, BMSCs于治疗后的前两周即开始发挥疗效, 使患者的临床症状改善, 再经后续BMSCs的输注, 疗效得以维持。

2.4 安全性评估 全部病例在进行BMSCs输注前后及过程中均密切监测了心电图、血氧饱和度、体温、脉搏、皮肤颜色、呼吸和血压的变化, 以及有无其他不良反应的发生, 并且进行了肝肾功能等相关的血液生物化学检查, 均未发现异常。另外, 在中位时间为14.1个月(4.6~23个月)的治疗随访期内, 并未出现白血病的复发。从而提

示BMSCs的治疗是安全可靠的。

3 讨论

Th淋巴细胞亚群主要包括Th0、Th1及Th2三种细胞状态, Th0细胞在一定的信号刺激下可分化成Th1和Th2细胞, 前者主要分泌 γ -干扰素和白细胞介素2, 而后者主要分泌白细胞介素10和白细胞介素4。目前认为Th1/Th2比例的平衡消长是决定机体免疫状态的基本因素^[19]。Th细胞的比例失衡是很多免疫疾病很重要的病理机制, 在免疫系统异常疾病的研究中越来越受到关注。研究已表明急性GVHD是一种Th1升高的疾病^[20], 相反, 在纤维化疾病中, 则常见Th2细胞比例增高^[21]。而且在本研究中也观察到了cGVHD患者体内确实存在着Th细胞的比例失衡问题, 表现为Th2的比例升高。

BMSCs具有易扩增、低免疫原性及免疫调节功能, 在免疫系统异常疾病的治疗方面具有非常广阔的应用前景。而且也有一些研究结果显示BMSCs能够影响Th淋巴细胞的分化, 但是其对正常和异常免疫系统的影响可能并不一致。本实验室在以前的研究中发现BMSCs对正常Th细胞分化的影响主要是抑制Th0向Th1细胞的分化^[22]。但更为有趣的是BMSCs对Th细胞比例升高或降低的免疫系统异常的疾病均具有治疗作用。目前不仅在动物模型中证实BMSCs可以治疗急性GVHD, 同时这种治疗方法已经应用于临床, 获得了很好的疗效^[12-15]。BMSCs移植研究的结果显示, BMSCs在急性期治疗肝纤维化和肺纤维化也均具有很好的疗效^[23-24]。由此可推, BMSCs可用于治疗ScGVHD。

在正常骨髓中, BMSCs的数量是很少的, 仅占单个核细胞的 10^4 到 10^5 分之一, 因此, 在正常情况下, BMSCs可能并不影响免疫系统对外来抗原发生的免疫反应, 这一点与体外的研究结果是一致的: 在PHA刺激的T细胞增殖和混合淋巴细胞反应中, 当BMSCs与T细胞的比例为1:100时, BMSCs对T细胞增殖的抑制作用消失。而且BMSCs移植于正常体内后, 对正常免疫系统的免疫能力的调节作用亦呈剂量依赖性, 当移植的BMSCs数量降至 10^4 数量级时, 对正常免疫系统的调节能力不复存在^[10]。但是BMSCs在体外极易扩增, 抽取少量的骨髓即能在短期内培养出数百万的BMSCs, 而且低免疫原性, 因此可进行BMSCs的大量移植用于治疗免疫系统异常疾病。此外, 本实验室在小鼠体内的研究结果表明在BMSCs移植后一到两周的时间内, 对细胞的免疫调节作用最明显, 随着时间的推移, 3周后免疫调节作用已明显减弱, 在移植4周后免疫调节作用已基本消失^[22]。加之ScGVHD是慢性发展的疾病, 所以本研究对患者进行BMSCs的输注采用间隔多次给药法, 时间间隔控制在一到两周并且剂量控制在 10^7 数量

级^[25-26]。Gao等^[27]报道小鼠骨髓来源的BMSCs细胞体积较大, 大于小鼠最小的肺毛细血管直径, 经静脉输注后, 48 h内大部分阻留于肺, 影响其归巢骨髓。所以本实验采用了骨髓内输注BMSCs。经过多次输注BMSCs后, Th细胞的比例发生了明显的变化, Th1的比例上调, Th2的比例相应的下调, 从而使两者达到了新的平衡点。与之相应, 患者的临床症状也逐渐的好转, 而且合并用药显著减量。提示cGVHD的发病确实与Th细胞的比例失衡有关, 并且BMSCs对其有明显的逆转作用, 进而发挥了治疗此病的疗效。

本研究所选患者均为原发白血病治疗缓解后进行非清髓造血干细胞移植后发生的cGVHD。以前有报道表明BMSCs的髓内移植能够增加白血病的复发^[28]。一些研究显示异基因造血干细胞移植后发生GVHD的受者复发率较不发生者低、生存期延长, 这些正向效应是通过移植抗白血病来实现的^[29], GVHD往往与移植抗白血病并存, 如果GVHD的作用减弱, 那么移植抗白血病的作用也会相应的减弱, 从而导致白血病的复发。但在本研究中, 从患者进行BMSCs治疗开始至治疗后的随访期(中位时间14.1个月)内, 并未出现白血病的复发。提示BMSCs的免疫调节作用具有选择性而且具有把握度。同时也未发现任何与BMSCs治疗相关的不良反应或副作用出现。提示BMSCs的治疗是安全可靠的。而且, 为了证实体外分离、培养的BMSCs临床应用的安全性, 本实验室采用恒河猴BMSCs输注联合造血干细胞移植实验证实了BMSCs体内移植具有安全性。并且在I期临床试验中, 健康志愿者输注自体骨髓培养的原始间充质干细胞分为3个剂量组 5×10^4 /kg, 5×10^5 /kg, 2×10^6 /kg, 均证明安全, 耐受性良好^[25]。

综上所述, BMSCs对ScGVHD是有治疗效果的, 为临床治疗ScGVHD开辟了一个新的方法, 从而能提高白血病患者骨髓移植的存活率。但由于样本数较少, 需要进一步扩大规模进行临床研究, 以进一步证实其安全性和疗效。

4 参考文献

- [1] Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, et al. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood*. 1981; 57(2): 267-276.
- [2] Kim J, Choi WS, Kim HJ, et al. Prevention of chronic graft-versus-host disease by stimulation with glucocorticoid-induced TNF receptor. *Exp Mol Med*. 2006;38(1):94-99.
- [3] Nagler A, Abadi U, et al. Oral tolerization ameliorates liver disorders associated with chronic graft versus host disease in mice. *Hepatology*. 2000;31(3):641-648.
- [4] Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(12):945-956.
- [5] Cho BS, Min CK, Eom KS, et al. Feasibility of NIH consensus criteria for chronic graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2009;23(1):78-84.
- [6] Peñas PF, Jones-Caballero M, Aragués M, et al. Sclerodermatous graft-vs-host disease: clinical and pathological study of 17 patients. *Arch Dermatol*. 2002;138(7):924-934.

- [7] Marcellus DC, Altomonte VL, Farmer ER, et al. Etretinate therapy for refractory sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 1999;93(1):66-70.
- [8] Baudard M, Vincent A, Moreau P, et al. Mycophenolate mofetil for the treatment of acute and chronic GVHD is effective and well tolerated but induces a high risk of infectious complications: a series of 21 BM or PBSC transplant patients. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30(5):287-295.
- [9] Skert C, Patriarca F, Sperotto A, et al. Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, predictors and outcome. *Haematologica*. 2006;91(2):258-261.
- [10] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105(4):1815-1822.
- [11] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002;30(1):42-48.
- [12] Le Blanc K, Rasmuson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004;363(9419):1439-1441.
- [13] Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005;11(5):389-398.
- [14] Ringden O, Uzunel M, Rasmuson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81(10):1390-1397.
- [15] von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(3):245-251.
- [16] Deng W, Han Q, Liao L, et al. Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSb mice. *DNA Cell Biol*. 2005;24(7):458-463.
- [17] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01. 中华人民共和国国务院. 医疗机构管理条例. 1994-09-01.
- [18] Clements P, Lachenbruch P, Siebold J, et al. Inter and intraobserver variability of total skin thickness score (modified Rodnan TSS) in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1995;22(7):1281-1285.
- [19] Masubuchi Y, Sugiyama S, Horie T. Th1/Th2 cytokine balance as a determinant of acetaminophen-induced liver injury. *Chem Biol Interact*. 2009;179(2-3):273-279.
- [20] Guo H, Qiao Z, Zhu L, et al. Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Am J Hematol*. 2004;75(2):78-83.
- [21] Shao DD, Suresh R, Vakil V, et al. Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol*. 2008;83(6):1323-1333.
- [22] Deng W, Han Q, Liao L, et al. Allogeneic bone marrow-derived flk-1+Sca-1- mesenchymal stem cells leads to stable mixed chimerism and donor-specific tolerance. *Exp Hematol*. 2004;32(9):861-867.
- [23] Fang B, Shi M, Liao L, et al. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation*. 2004;78(1):83-88.
- [24] Yan X, Liu Y, Han Q, et al. Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted Flk-1(+) mesenchymal stem cell in lung. *Exp Hematol*. 2007;35(9):1466-1475.
- [25] Liu L, Sun Z, Chen B, et al. Ex vivo expansion and in vivo infusion of bone marrow-derived Flk-1+CD31-CD34- mesenchymal stem cells: feasibility and safety from monkey to human. *Stem Cells Dev*. 2006;15(3):349-357.
- [26] Guo M, Sun Z, Sun QY, et al. A modified haploidentical nonmyeloablative transplantation without T cell depletion for high-risk acute leukemia: successful engraftment and mild GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(8):930-937.
- [27] Gao J, Dennis JE, Muzic RF, et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(1):12-20.
- [28] 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.
- [29] Miffin G, Russell NH, Franklin I, et al. An analysis of the effect of chronic GVHD on relapse and survival following allogeneic PBSC transplantation. *Cytotherapy*. 2000;2(6):423-428.



骨髓间充质干细胞的成骨分化: 本刊中文版

1 骨形态发生蛋白2和音猬因子体外诱导骨髓间充质干细胞向成骨细胞的分化

徐晓峰(江苏大学附属医院骨科, 江苏省镇江市 212001)

国家自然科学基金资助项目(30570981); 镇江市社会发展基金资助项目(SH2002019)

推荐理由: 传统的间充质干细胞向成骨细胞方向诱导方式包括体内、体外, 但体内诱导存在不足, 所以目前诱导间充质干细胞向成骨细胞分化的研究多在体外进行。在体外诱导间充质干细胞向成骨细胞分化需要特定的诱导条件, 优良的诱导剂以及合适的剂量。骨形态发生蛋白2能诱导和加速骨髓间充质干细胞向成骨样细胞分化。音猬因子则参与调控成骨细胞的发育、增殖过程。

实验通过骨形态发生蛋白2和音猬因子诱导间充质干细胞向成骨细胞转化中发现, 上述两诱导因子的相互作用可以促进碱性磷酸酶的表达和成骨细胞的分化、增殖和骨骼的成形, 见2009年36期7093页。

2 荧光活性染料Dil标记的大鼠骨髓基质干细胞生长增殖及其成骨分化

黎洪棉(中山大学附属中山医院博士后科研工作站, 整形美容外科, 广东省中山市 528403; 南方医科大学博士后科研流动站, 广东省广州市 510515)

第45批中国博士后基金(20090450910); 广西自然科学基金(桂科自0991112)

3 体外培养骨髓基质细胞向成骨细胞的分化

徐展望(山东中医药大学附属医院骨科, 山东省济南市 250012)

山东省科技厅资助项目(2002年度山东省中医药科技发展计划第13号)

4 富血小板血浆诱导犬骨髓间充质干细胞的体外成骨

尹科(中南大学湘雅医院骨科, 中南大学骨科研究所, 湖南省长沙市 410008)

湖南省科技厅科技计划资助(06sk3029-2)

5 瘦素对人骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

李华青(山西医科大学, 山西省太原市 030001)

6 合成成骨生长肽对人骨髓间充质干细胞成骨转化的促进

徐杨(福建省立医院骨一科, 福建省福州市 350001)

福建省科技厅青年人才创新项目(2006F3031)

7 疏密波最佳波段组合诱导大鼠骨髓间充质

干细胞向软骨细胞的分化

吴广文(福建中医学院中西医结合研究院, 福建省福州市 350108)

福建省中医药科研重点课题(WZZG0601-2); 福建省教育厅A类科技项目(JA07113)

8 腺相关病毒导入血管内皮生长因子165基因转染后人骨髓基质细胞的成骨分化

李伟(郧阳医学院附属人民医院骨关节科, 湖北省十堰市 442000)

9 脉冲电磁场对小鼠骨髓间充质干细胞体外成骨分化的影响

方真华(华中科技大学同济医学院附属普爱医院(武汉市骨科医院)足踝外科, 湖北省武汉市 430033)

10 富血小板血浆对人骨髓间充质干细胞成骨诱导的影响

张洪涛(中山大学附属第三医院, 中山大学博士后流动站, 广东省中山市 528403)

中国博士后科研基金项目(20080430810); 中山市科技计划项目(20082A102)

全文详见<http://www.crter.org/sites/MainSite/Detail.aspx?StructID=99386>