

经皮脾动脉自体骨髓细胞移植治疗2型糖尿病5例

王攀¹, 吴正蓉¹, 田景伦², 戚龙¹

Autologous bone marrow cell transplantation via spleen artery in 5 patients with type 2 diabetes mellitus

Wang Pan¹, Wu Zheng-rong¹, Tian Jing-lun², Qi Long¹

Abstract

BACKGROUND: Recently, more and more people try to use stem cells to treat diabetes mellitus. Application of autologous bone marrow stem cells is a simplest and safest method, but no reports have addressed autologous bone marrow stem cells for type 2 diabetes mellitus. There are several reports concerning the outcomes of diabetes mellitus treatment. Thus, there is no final conclusion at present.

OBJECTIVE: To observe effectiveness of autologous bone marrow stem cells for type 2 diabetes mellitus via splenic artery transplantation, and to explore its feasibility, safety and validity.

METHODS: A total of 5 patients with acute myocardial infarction and type 2 diabetes mellitus had been enrolled at the ICU Department, Wenjiang People's Hospital from March to July 2009. They received insulin combined with oral administration of sugar-reducing drugs, but blood sugar was not fully controlled, and then subjected to autologous bone marrow cell transplantation. ①Patients received multipoint puncturation in the bilateral posterior superior iliac spine in a prone position following local anesthesia. A total of 100-150 mL bone marrow blood was collected. This test was accomplished within 60 minutes. Bone marrow cells were harvested from bone marrow blood, washed, and then diluted using saline into mononuclear cell suspension about 20-30 mL. ②Through femoral artery intubation, 4.0 cm judkins 5 or 6F right coronary arteriography catheter was inserted into the celiac trunk. The catheter direction was regulated, and the catheter entered splenic artery. Following injection of 5-10 mL ultravist, the catheter position was determined, and bone marrow cell suspension was inserted. ③Blood glucose levels and insulin dosage were followed up at 3 and 9 months following transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: A total of 5 patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus received successful transplantation and were followed up. ①During autologous bone marrow cell transplantation, no adverse reaction was detected; two cases developed abdomen fever; one case suffered from light nausea. ②Compared with pretransplantation, fasting blood glucose was reduced by 23% and 27% at 3 and 9 months after the transplantation. ③Compared with pretransplantation, daily insulin requirement was significantly reduced by 22% and 42% at 3 and 9 months after the transplantation. These results have demonstrated that selective spleen arterial transplantation of autologous bone marrow cells is safe and can decrease blood glucose level and daily insulin dose in patients with type 2 diabetes mellitus.

Wang P, Wu ZR, Tian JL, Qi L. Autologous bone marrow cell transplantation via spleen artery in 5 patients with type 2 diabetes mellitus. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(23): 4355-4358. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景:近年来,不断有人尝试干细胞治疗糖尿病,尽管应用自体骨髓干细胞是众多手段中最简便而安全的方法,但目前尚无治疗2型糖尿病的正式报道,对糖尿病的治疗效果仅仅见于零星报道,目前还没有定论。

目的:观察自体骨髓细胞经脾动脉移植治疗2型糖尿病的效果,探讨其可行性、安全性和有效性。

方法:选取2009-03/07成都市温江区人民医院ICU科收治的5例急性心肌梗死合并2型糖尿病患者,并正在接受胰岛素联合口服降糖药物治疗,而血糖控制不理想,实施了自体骨髓细胞移植。①患者俯卧位局麻,双侧髂后上棘行多点穿刺,抽取骨髓血100-150 mL,要求在60 min内完成。将采集的骨髓血进行骨髓细胞分离、洗涤,用生理盐水稀释单个核细胞悬液至20-30 mL。②经股动脉插管,送入4.0 cm judkins 5或6F右冠状动脉造影导管至腹腔干,调整导管方向进入脾动脉开口处,注入优维显5-10 mL后确定导管位置,注入骨髓细胞悬液。③分别于移植后3,9个月进行随访血糖控制水平及胰岛素用量。

结果与结论:试验选取5例冠心病合并2型糖尿病患者,移植全部成功并完成随访。①自体骨髓细胞移植过程中无需要处理的不良反应,2例有腹部发热感,1例有轻度恶心感。②与移植前相比,自体骨髓细胞移植后3,9个月血糖平均下降23%和27%。③与移植前相比,自体骨髓细胞移植后3,9个月每日胰岛素用量平均减少22%和42%。提示经皮脾动脉移植自体骨髓细胞,可降低2型糖尿病患者血糖水平及每日胰岛素用量,且安全可行。

关键词:自体骨髓细胞移植;2型糖尿病;经皮;脾动脉;血糖;胰岛素

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.23.039

王攀,吴正蓉,田景伦,戚龙.经皮脾动脉自体骨髓细胞移植治疗2型糖尿病5例[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(23):4355-4358. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹ICU Department, ²Department of Endocrinology, Wenjiang People's Hospital, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

Wang Pan, Attending physician, ICU Department, Wenjiang People's Hospital, Chengdu 611130, Sichuan Province, China wangpan761@163.com

Correspondence to: Qi Long, Associate chief physician, ICU Department, Wenjiang People's Hospital, Chengdu 611130, Sichuan Province, China qilong70@126.com

Received: 2010-01-06 Accepted: 2010-02-20

成都市温江区人民医院, ¹ICU室, ²内分泌科, 四川省成都市611130

王攀,男,1978年生,四川省安岳县人,汉族,2002年泸州医学院毕业,主治医师,主要从事重症监护临床工作。 wangpan761@163.com

通讯作者:戚龙,副主任医师,成都市温江区人民医院ICU室,四川省成都市611130 qilong70@126.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:1673-8225 (2010)23-04355-04

收稿日期:2010-01-06
修回日期:2010-02-20
(20100106025/WL-Q)

0 引言

糖尿病常伴有广泛的并发症, 其死亡率居第3位。胰岛素注射是临床上治疗糖尿病的主要方法, 但许多患者的血糖并不能得到有效控制, 也无法防止并发症及根治糖尿病。胰腺移植存在供体短缺和严重的排异反应, 基因治疗技术还不成熟, 所以目前比较有前景的治疗方法是胰岛移植, 阻止了糖尿病的发展及并发症的发生, 有望从根本上治疗糖尿病^[1], 然而同样因为供体不足和排异反应问题难以在临床上广泛实施。

近年来, 不断有人尝试干细胞治疗糖尿病, 尽管应用自体骨髓干细胞是众多手段中最简便而安全的方法, 但目前尚无治疗2型糖尿病的正式报道, 对糖尿病的治疗效果仅仅见于零星报道, 目前还没有定论。为此, 实验进行了初步观察。

1 对象和方法

设计: 回顾性病例分析。

时间及地点: 病例来自2009-03/07温江区人民医院ICU室。

对象: 选取温江区人民医院收治的25例急性心肌梗死合并2型糖尿病患者, 选取5例符合条件者进行试验, 均为严重多支冠状动脉病变, 并失去了支架置入和外科搭桥机会的患者, 糖尿病病史6~21(13.60±5.73)年, 男4例, 女1例, 年龄51~75(61.60±12.58)岁, 体质量指数19.2~30.0(24.04±4.51)kg/m², 吸烟者2例(40%), 治疗前空腹血糖9.8~14.2(12.04±1.98) mmol/L。

所有患者均已经接受了胰岛素联合至少一种口服降糖药治疗, 包括二甲双胍、噻唑烷二酮类、磺脲类, 3例二甲双胍联合噻唑烷二酮类治疗, 1例3种口服药联合, 1例应用二甲双胍。治疗前胰岛素用量为42~68 U (53.6±9.74) U/d。

纳入标准: ①血糖控制不佳的2型糖尿病患者。②必须是在口服降糖药物联合胰岛素治疗3个月以上者, 口服药物包括至少以下之一: 二甲双胍、噻唑烷二酮类、磺脲类等, 胰岛素用量≥ 40 U/d。③任何时间空腹血糖>8 mmol/L。④符合以上条件且同意接受骨髓细胞移植治疗者。

排除标准: ①NYHA心功能分级<IV级者。②并发严重肺部疾病者。③对造影剂过敏者。④心室率≤ 45次/min未安装起搏器者。⑤心源性休克者。⑥因严重心力衰竭经最佳的药物治疗后, 平卧时间仍然<30 min者。⑦其他禁忌证者: 如有严重肝、肾功能不全者等。⑧不接受干细胞移植治疗者。

病例一般资料如下:

病性例	年龄(岁)	糖尿病病史(年)	体质量指数(kg/m ²)	吸烟史	治疗前空腹血糖(mmol/L)	降糖药治疗情况	技术路线
1	男 51	13	19.2	有	9.8	二甲双胍、噻唑烷二酮类、胰岛素 52 U/d	经皮脾动脉自体骨髓细胞移植
2	男 62	6	30.0	无	11.8	二甲双胍、噻唑烷二酮类、磺脲类、胰岛素 56 U/d	经皮脾动脉自体骨髓细胞移植
3	男 75	15	25.9	有	10.4	二甲双胍、胰岛素 42 U/d	经皮脾动脉自体骨髓细胞移植
4	男 63	21	23.1	无	14.2	二甲双胍、噻唑烷二酮类、胰岛素 68 U/d	经皮脾动脉自体骨髓细胞移植
5	女 57	13	22.0	无	14.0	二甲双胍、噻唑烷二酮类、胰岛素 50 U/d	经皮脾动脉自体骨髓细胞移植

技术路线:

常规检查: 入院后立即查血常规、凝血功能、血型、血气分析、肝功能、肾功能、血脂、血糖、电解质、心肌酶谱、肌钙蛋白 I、心电图、超声心动图等。

常规处理: 口服降糖药物及饮食、运动治疗方案尽可能保持不变, 包括用药种类、剂量、时间; 移植前6~12 h行双腹股沟、大腿、下腹部备皮。

移植前准备: ①由家属签署手术同意书。②对比剂、抗生素皮试。③导管室常规准备。

骨髓血采集与分离: 送患者到无菌手术室, 俯卧位, 常规消毒铺巾, 利多卡因局麻, 双侧髂后上嵴行多点穿刺, 首次抽取骨髓0.5 mL行骨髓学和病原学检测, 继之用10 mL肝素注射器抽取骨髓血100~120 mL, 要求在60 min内完成。将采集的骨髓血送干细胞分离室, 进行骨髓细胞分离、洗涤, 最后用生理盐水稀释单个核细胞悬液至20~30 mL, 进行细胞计数、活性检测。整个操作过程严格实施无菌操作。

骨髓细胞的移植: ①送患者入心脏导管室, 常规消毒铺巾, 行股动脉或桡动脉穿刺, 植入6F动脉鞘, 沿动脉鞘侧管推注肝素2 000 U。②沿血管鞘送入4.0 cm judkins 5或6F右冠状动脉造影导管至腹腔干, 调整导管方向进入脾动脉开口处, 每次注入优维显5~10 mL造影, 并采取多角度投照, 以明确导管位置及观察脾动脉大小、走向及分支情况。③沿造影导管尾端连接含骨髓细胞悬液的注射器, 回抽残留气体后, 缓慢注射细胞悬液, 每2 min暂停注射, 注入对比剂少许, 同时透视观察导管位置, 以确保未脱位, 然后继续推注细胞悬液。依次进行, 直至骨髓细胞推注完毕。④术中密切观察患者症状、心电图及压力曲线变化。⑤移植结束后拔管, 局部加压包扎止血, 将患者送入CCU病房, 做相应处理。

随访: 移植后3个月和9个月分别进行以下内容的随访空腹血糖及胰岛素用量。

主要观察指标: ①自体骨髓细胞移植过程中的不良反应。②自体骨髓细胞移植后不同时间的血糖变化。③自体骨髓细胞移植后不同时间的胰岛素用量。

统计学分析: 由第二作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理, 试验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 计量资料行配对 t 检验及相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 参与者数量分析 试验选取5例冠心病合并糖尿病患者全部顺利完成自体骨髓细胞移植, 成功率100%, 无移植过程中、移植后医院内死亡者, 均完成移植后3个月和9个月随访。

2.2 骨髓细胞采集与分离结果 骨髓采集量为100~150(126.00±18.17)mL; 移植的单个核细胞数为(1.08~1.57)×10⁸个, 平均(1.27±0.18)×10⁸个。

2.3 自体骨髓细胞移植过程中的不良反应 3例在造影时出现轻度不良反应, 分别是: 2例诉腹部发热感, 1例轻度恶心感, 停止注射对比剂后均在3 min内消失, 未行药物处理。注射骨髓细胞中及移植后无特殊不适。

2.4 自体骨髓细胞移植后不同时间体质量指数变化 治疗前后体质量指数差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

表1 自体骨髓细胞移植后不同时间体质量指数变化
Table 1 Body mass index in patients before and after undergoing autologous bone marrow cell transplantation at various time points
($\bar{x}\pm s$, $n=5$, kg/m²)

Follow-up	Body mass index
Before the procedure	24.04±4.51
3 mon after the procedure	24.36±4.13
9 mon after the procedure	24.02±5.75

2.5 骨髓细胞移植前后血糖水平的变化 见表2。

表2 骨髓细胞移植前后血糖水平的变化
Table 2 Fasting blood glucose level before and after autologous bone marrow cell transplantation
($\bar{x}\pm s$, $n=5$, mmol/L)

Follow-up	Fasting blood glucose	Reductive values
Before procedure	12.04±1.89	2.78±2.18
At 3 mon	9.26±1.54 ^a	0.48±1.35
At 9 mon	8.78±2.30 ^a	3.26±2.64

^a $P < 0.05$, vs. before the procedure

与骨髓细胞移植前相比, 移植后3个月及9个月空腹血糖分别下降23%和27%, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.6 骨髓细胞移植前后胰岛素用量变化 见表3。

表3 骨髓细胞移植前后胰岛素用量变化
Table 3 Exogenous insulin requirements before and after autologous bone marrow cell transplantation
($\bar{x}\pm s$, $n=5$, U/d)

Follow-up	Insulin requirement	Reduction of insulin requirement
Before the procedure	53.60±9.74	11.60±6.69
At 3 mon	42.00±8.37 ^a	10.80±13.46
At 9 mon	31.20±11.71 ^a	22.40±16.99

^a $P < 0.05$, vs. before the procedure

与骨髓细胞移植前相比, 移植后3个月和9个月胰岛素日用量分别减少22%和42%, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

骨髓细胞中的间充质细胞具有较强的自我增殖能力和多向分化潜能。它们易于分离培养扩增, 遗传背景稳定, 体内植入反应较弱, 在特定的诱导条件下可分化为胰岛样细胞。

试验的一个主要出发点就是要观察自体骨髓细胞移植对治疗2型糖尿病(DM2)患者中应用的安全性和有效性。5例患者在胰岛素注射联合口服降糖药物治疗基础上, 血糖水平不能满意控制, 在骨髓细胞移植前所有患者的空腹血糖 ≥ 8 mmol/L, 并且每例胰岛素用量超过40 U。但本试验未发现骨髓采集和经脾动脉注射自体骨髓细胞本身有需要药物处理的不良反应, 没有手术死亡病例, 这说明自体骨髓细胞移植治疗2型糖尿病是安全的。经动脉注入骨髓细胞往往担心动脉栓塞事件的发生^[2]。但课题组独立完成的5例患者中, 骨髓采集量和移植细胞过程中没有发现与动脉栓塞事件有关的问题。然而, 不容置疑, 娴熟的导管技术和规范的细胞采集、分离是安全的重要保证。

本试验发现, 经脾动脉灌注骨髓细胞后3个月, 严重2型糖尿病患者的相关指标出现了有显著性意义的改善, 而且这种效果在9个月后有进一步改善的趋势。

在其他类似的研究中, Dor等^[3]应用自体骨髓细胞治疗2型糖尿病18例, 3个月随访时, 胰岛素用量从平均(29.8±16.9)U/d降到(14.7±11.3)U/d, 平均用量减少15 U (50%); 空腹血糖水平从(9.1±2.1)mmol/L降低到(7.1±0.9)mmol/L, 空腹血糖水平下降22%; 糖化血红蛋白从(9.1±2.2)%下降到(7.2±1.1)%, 减少22%; 同时C-肽水平升高。与本试验结果相似, 但细胞移植数量显著低于Dor等的研究, 似乎疗效与移植的细胞数量无明显关系。

本组5例患者移植后3个月和9个月, 原有的口服降糖药物种类和剂量没有变化, 只是胰岛素用量减少, 而没有完全停用的案例, 也没有空腹血糖水平低于6.1 mmol/L的案例。最近, 有人采用骨髓造血干细胞移植治疗1型糖尿病取得的疗效更令人鼓舞^[4], 15例应用造血干细胞移植联合免疫抑制剂, 经7~36个月的随访, 14例完全不用胰岛素而血糖保持接近正常的水平。但2型糖尿病的机制与1型糖尿病有很大不同, 除了晚期病例胰岛素分泌不足以外, 胰岛素抵抗是一个重要原因^[5], 即使细胞移植后胰岛B细胞功能恢复, 血糖异常仍需要饮食、运动及口服降糖药物等综合治疗。本试验中惟一1例疗效不满意的患者体质量指数达30 kg/m², 治疗前用二甲双胍、罗格列酮及磺脲类药物联合治疗, 胰岛素用量为56 U/d, 细胞移植9个月时体质量指数增加到33 kg/m², 胰岛素用量为50 U/d, 空腹血糖水平与治疗前无显著改善, 提示该患者存在较严重的胰岛素抵抗导致细胞治疗无效。这与最近的研究结果不完全一致, Bhansali等^[13]及对8例2型糖尿病患者实施自体骨髓细胞移植后6个月, 7例病情得到有效控制, C-肽水平显著升高, 其中3例完全停用胰岛素治疗; 这与另一项研究结果基本相似^[14], 在体质量指数不变的情况下, 自体骨髓细胞移植治疗糖尿病, 降低了空腹和餐后血糖以及糖化血红蛋白水平, 显著增加C-肽水平, 减少胰岛素用量, 并且这种改变与体质量指数无明显相关性。

自体骨髓细胞移植对2型糖尿病患者产生有益效应的可能机制是单个核细胞群中“恰当”的干细胞通过脾动脉到达功能衰竭的胰腺, 经过转移分化机制形成有功能的胰岛B细胞再生^[15-17], 由此胰腺功能得以修复^[6, 18-19], 除了上述涉及的骨髓干细胞对胰腺功能可能产生影响外, 新的研究已经明确, 干细胞还有其他的作用机制: 外生的干细胞刺激内生的祖细胞增殖^[7], 或通过新生血管的形成或旁分泌信号的激活机制, 促进干细胞的增殖^[8]。还有研究证明, 细胞移植使干细胞微环境得以修复, 促进了胰腺细胞自我复制的能力^[9-10]。当然, 还有其他被提到的机制: 外生的干细胞通过供体细胞与胰腺细胞的融合达到胰腺功能的恢复^[11, 20]。最近的临床试验已经证明, 骨髓造血干细胞移植可以长久改善血清C-肽水平, 提示其疗效与胰岛素分泌水平的恢复有关^[12]。

本试验的局限性也很明显, 病例数有限, 未设立随机对照组, 并且由于条件所限, 随访期间未对C-肽、血糖胰岛素水平等情况进行评估。

总之, 本试验初步证明了自体骨髓细胞经脾动脉移

植治疗2型糖尿病的安全性和有效性, 骨髓细胞经脾动脉移植本身没有可见的不良后果。但由于研究本身的局限性, 有必要进行更完整、严谨的科研设计, 以期对该命题进行进一步深入探讨。

4 参考文献

- [1] Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000;343(4):230-238.
- [2] Bonner-Weir S, Weir GC. New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol*. 2005;23(7):857-861.
- [3] Dor Y, Brown J, Martinez OI, et al. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*. 2004;429(6987):41-46.
- [4] Teta M, Rankin MM, Long SY, et al. Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell*. 2007;12(5):817-826.
- [5] Brubaker PL, Drucker DJ. Minireview: Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. *Endocrinology*. 2004;145(6):2653-2659.
- [6] DeFronzo RA, Ratner RE, Han J, et al. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control and weight over 30 weeks in metformin-treated patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(5):1092-1100.
- [7] Kendall DM, Riddle MC, Rosenstock J, et al. Effects of exenatide (exendin-4) on glycemic control over 30 weeks in patients with type 2 diabetes treated with metformin and a sulfonylurea. *Diabetes Care*. 2005;28(5):1083-1091.
- [8] Kaestner KH. Beta cell transplantation and immunosuppression: can't live with it, can't live without it. *J Clin Invest*. 2007;117(9):2380-2382.
- [9] Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2007;297(14):1568-1576.
- [10] Skyler JS. Cellular therapy for type 1 diabetes: has the time come? *JAMA*. 2007;297(14):1599-1600.
- [11] Burns CJ, Persaud SJ, Jones PM. Stem cell therapy for diabetes: do we need to make beta cells? *J Endocrinol*. 2004;183(3):437-443.
- [12] Couri CE, Oliveira MC, Stracieri AB, et al. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 2009;301(15):1573-1579.
- [13] Bhansali A, Upreti V, Khandelwal N, et al. Efficacy of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Stem Cells Dev*. 2009;18(10):1407-1416.
- [14] Estrada EJ, Valacchi F, Nicora E, et al. Combined treatment of intrapancreatic autologous bone marrow stem cells and hyperbaric oxygen in type 2 diabetes mellitus. *Cell Transplant*. 2008;17(12):1295-1304.
- [15] Song WJ, Shah R, Hussain MA. The use of animal models to study stem cell therapies for diabetes mellitus. *LAR J*. 2009;51(1):74-81.
- [16] Zhang YH, Wang HF, Liu W, et al. Insulin-producing cells derived from rat bone marrow and their autologous transplantation in the duodenal wall for treating diabetes. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009;292(5):728-735.
- [17] Palma CA, Lindeman R, Tuch BE. Blood into beta-cells: can adult stem cells be used as a therapy for Type 1 diabetes? *Regen Med*. 2008;3(1):33-47.
- [18] Tessem JS, DeGregori J. Roles for bone-marrow-derived cells in beta-cell maintenance. *Trends Mol Med*. 2004;10(11):558-564.
- [19] Hussain MA, Theise ND. Stem-cell therapy for diabetes mellitus. *Lancet*. 2004;364(9429):203-205.
- [20] Yamanaka N, Wong CJ, Gertsenstein M, et al. Bone marrow transplantation results in human donor blood cells acquiring and displaying mouse recipient class I MHC and CD45 antigens on their surface. *PLoS One*. 2009;4(12):e8489.