

干细胞治疗自闭症:安全性和有效性观察★

刘敏¹, 孙良伟¹, 吕涌涛¹, 郇英¹, 葛汝村², 曹毓琳³, 郭传琴⁴, 陈兴旺¹

Stem cells for treatment of autism: Safety and efficacy

Liu Min¹, Sun Liang-wei¹, Lü Yong-tao¹, Huan Ying¹, Ge Ru-cun², Cao Yu-lin³, Guo Chuan-qin⁴, Chen Xing-wang¹

Abstract

BACKGROUND: Autism is associated with several neurophysiological alterations, especially immune abnormalities and neural hyperperfusion appear to be broadly consistent.

OBJECTIVE: To evaluate the feasibility, safety and efficacy of stem cells for treating autism.

METHODS: A total of 42 children of autism were divided into three groups: umbilical cord blood group, combination group and control group. Umbilical cord blood group was treated with umbilical cord blood mononuclear cells. Combination group was treated with umbilical cord blood mononuclear cells combined with umbilical cord mesenchymal stem cells. Control group received rehabilitation treatment. Related lab examinations were taken for umbilical cord blood and combination groups before treatment, 4 weeks after treatment and 4 months after treatment. Whether there were adverse reactions were observed. Childhood Autism Rating Scale and Clinical Global Impression Scale were employed to assess the children of autism before treatment, 4 weeks and 4 months following first treatment in patients of each group.

RESULTS AND CONCLUSION: There was no statistical difference in lab examinations between umbilical cord blood and combination groups before treatment, 4 weeks and 4 months following treatment. There were no severe adverse reactions following stem cell treatment. Childhood Autism Rating Scale was significantly decreased in the umbilical cord blood and combination groups before treatment, 4 weeks and 4 months following treatment. Clinical Global Impression Scale demonstrated that total efficiency was greater in the combination group compared with umbilical cord blood group. Results indicated that it is safe to use umbilical cord blood mononuclear cells and umbilical cord mesenchymal stem cells for treating children autism and the therapeutic effect of the umbilical cord blood and combination groups was noticeably higher than that of the control group with rehabilitation treatment.

Liu M, Sun LW, Lü YT, Huan Y, Ge RC, Cao YL, Guo CQ, Chen XW. Stem cells for treatment of autism: Safety and efficacy. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu*. 2010;14(32): 5967-5970.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 自闭症伴随许多神经生理学上的改变,特别是免疫异常和神经系统的组织灌注不足。

目的: 评价干细胞治疗自闭症的可行性、安全性和有效性。

方法: 42例自闭症患者随机分为脐血组、混合组和对照组,脐血组应用脐血单个核细胞治疗;混合组应用脐血单个核细胞联合脐带间充质干细胞治疗;对照组行康复训练治疗。脐血组和混合组患者治疗前和首次治疗后4周、4个月行相关指标实验室检查,并观察有无不良反应发生。3组患者在治疗前、首次治疗后4周和4个月分别行儿童自闭症评定量表(CARS)和临床总体印象量表(CGI)评估。

结果与结论: 脐血组和混合组患者在治疗前和首次治疗后4周、4个月相关指标实验室检查未发现显著异常变化,干细胞治疗后无严重不良反应发生。脐血组和混合组CARS评分在治疗前、首次治疗后4周、首次治疗后4月之间比较均明显降低,CGI量表发现混合组总有效率高于脐血组。结果提示,应用脐血单个核细胞和脐带间充质干细胞治疗自闭症是安全的,其疗效显著高于康复训练治疗。

关键词: 自闭症;单个核细胞;间充质干细胞;临床评价;安全性

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.32.017

刘敏, 孙良伟, 吕涌涛, 郇英, 葛汝村, 曹毓琳, 郭传琴, 陈兴旺. 干细胞治疗自闭症:安全性和有效性观察[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(32):5967-5970. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

自闭症是一种以严重的、广泛的社会相互影响和沟通技能损害以及刻板的行为、兴趣和活动为特征的疾病,根据全世界的统计,自闭症的发病率大约为万分之五。自闭症的症状通常在患儿12~18个月时就有表现^[1],但确诊却要在患儿24~36个月时才能做出,有个别的患者甚至到成人时才被诊断患有自闭症^[2]。该病目前尚无特效的治疗方法。干细胞是一类具有自我

更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞,目前研究发现其具有免疫调节和改善脑内微循环的功能。近期作者应用脐血单个核细胞(mononuclear cells, MNCs)和脐带间充质干细胞(mesenchymal Stem Cells, MSCs)治疗自闭症取得较好疗效。

1 材料和方法

设计: 对比观察。

时间及地点: 于2009-01/12在山东省交通

¹Department of Neurology, Shandong Traffic Hospital, Jinan 250031, Shandong Province, China; ²Cell Rescue Center of Shandong Traffic Hospital, Jinan 250031, Shandong Province, China; ³Shenzhen Beike Biotechnology Research Center, Shenzhen 518028, Guangdong Province, China; ⁴Shandong Mental Health Center, Jinan 250014, Shandong Province, China

Liu Min★, Master, Attending physician, Department of Neurology, Shandong Traffic Hospital, Jinan 250031, Shandong Province, China
lm-jtyy@163.com

Received: 2010-05-23
Accepted: 2010-07-10

山东省交通医院, ¹神经内科, ²细胞治疗中心, 山东省济南市 250031; ³深圳北科生物科技研究中心, 广东省深圳市 518028; ⁴山东省精神卫生中心, 山东省济南市 250014

刘敏★, 女, 1974年生, 山东省日照市人, 2007年山东大学医学院毕业, 硕士, 主治医师, 从事脑血管病及老年痴呆的基础与临床研究工作。
lm-jtyy@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)32-05967-04

收稿日期: 2010-05-23
修回日期: 2010-07-10
(20100523008W · Q)

医院神经内科及干细胞治疗中心完成。

对象: 选取2009-01/12在山东省交通医院神经内科住院行干细胞治疗的自闭症患者28例, 随机分为脐血组和混合组各14例, 其中脐血组男12例, 女2例, 年龄最大11岁, 最小3岁2个月, 平均6.47岁; 混合组男12例, 女2例, 年龄最大10岁, 最小3岁3个月, 平均6.32岁。另选取在“济南明天康复中心”行康复训练治疗的自闭症患者14例为对照组, 其中男11例, 女3例, 年龄最大10岁, 最小3岁2个月, 平均6.41岁。3组患者入选标准: 年龄在3~12岁, 性别不限; 符合DSM-IV儿童自闭症诊断标准, 并有精神科专科医师诊断; 儿童自闭症评定量表(Childhood autism rating scale, CARS)评分 ≥ 30 分; 无其他重大或慢性病史。3组患者在年龄、性别组成以及病情轻重程度上经统计学分析无显著性差异, 有可比性。本研究经医院伦理委员会审查并通过。根据国务院《医疗机构管理条例》规定^[3], 患儿监护人知情同意。

方法:

干细胞来源及治疗方法: 干细胞来自健康分娩孕妇的脐血和脐带(产妇知情同意), 均经过艾滋病毒、梅毒抗体、肝炎标志物5项、Torch5项等检测, 经过分离、提取、培养、扩增及传代4~6代, 每份治疗细胞数量为 2×10^6 /kg。

干细胞治疗次数: 患者1疗程共治疗4次, 治疗1次/周。治疗方式: 脐血组: 静脉输注1次、腰椎穿刺蛛网膜下腔注射3次MNCs; 混合组: 静脉输注1次、腰椎穿刺蛛网膜下腔注射1次MNCs, 腰椎穿刺蛛网膜下腔注射2次MSCs; 对照组在“济南明天康复中心”由专业康复师行感觉统合及行为康复训练治疗。3组患者在研究期间不接受其他治疗。

临床检查和评价方法

安全性评价: 脐血组和混合组患者在治疗前和首次治疗后4周、4个月行血常规, 肝肾功能、免疫球蛋白、补体C3、C4、T细胞亚群等常规化验检查, 观察两组患者在研究期间有无严重不良反应及实验室指标异常变化作为安全性评价指标。

有效性评价: 3组患者行干细胞治疗和康复训练治疗前和首次治疗后4周、4个月分别进行CARS和临床总体印象量表(Clinical Global Impression Scale, CGI)评估^[4]。病情严重程度(severity of illness, SI), 采用0~7分的8级记分法, 根据具体患者的病情与同一研究的其他同类患者比较, 作出评定: 0分: 无病; 1分: 基本无病; 2分: 极轻; 3分: 轻度; 4分: 中度; 5分: 偏重; 6分: 重度; 7分: 极重。疗效总评(global improvement, GI): 采用0~7分的8级记分法。根据被评者目前病情与入组时相比, 作出评定。0分: 未评; 1分: 显著进步; 2分: 进步; 3分: 稍进步; 4分: 无变化; 5分: 稍恶

化; 6分: 恶化; 7分: 严重恶化。

设计、实施、评估者: 设计、实施者为本文作者, 评估者为第七作者, 评估方式采取双盲法。

主要观察指标: 血常规, 肝肾功能、免疫球蛋白、补体C3、C4、T细胞亚群等指标; CARS和CGI量表评估。

统计学分析: 定量数据采用例数、均数、标准差描述, 定性数据采用频数、构成比或百分比描述。用SAS统计软件包进行统计分析, 3组间比较及治疗前后比较采用t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 参与者数量分析 纳入患儿42例, 分为3组, 无脱落, 全部进入结果分析。

2.2 安全性评价 脐血组和混合组患者在治疗前和首次治疗后4周、4个月常规化验血常规, 肝肾功能、免疫球蛋白、补体C3、C4、T细胞亚群等指标经前后比较未发现有意义异常变化。

脐血组和混合组患者在行干细胞治疗后部分病例伴有轻微不良反应, 表现为: 低热12例(43%), 头痛4例(14%), 腰痛3例(23%), 乏力4例(14%), 恶心、呕吐2例(7%), 经过对症处理后, 均在一两天内症状消失, 无严重不良反应发生。

2.3 功能量表评价 脐血组和混合组CARS评分在治疗前、首次治疗后4周、首次治疗后4个月组内之间比较均有显著性改善。对照组在治疗前、首次治疗后4周、首次治疗后4个月之间比较差异无显著性意义, 见表1~3。

表1 行干细胞治疗的患者治疗前后肝肾功能指标变化
Table 1 Result of liver kidney function indicators in patients before and after stem cell treatment

Indicator	Pretreatment	4 wk posttreatment	4 mon posttreatment
ALT(nkat/L)	461.92±163.70	445.09±157.03	459.42±141.03
ALT(nkat/L)	577.95±141.53	583.45±122.36	596.12±162.20
TBIL(μmol/L)	13.10±7.20	12.78±4.33	13.45±6.15
BUN(mmol/L)	5.67±1.32	6.10±1.24	5.72±1.56
Cr (μmol/kg)	44.30±8.20	42.56±7.46	43.57±8.43

ALT: alanine aminotransferase; TBIL: total bilirubin; BUN: blood urea nitrogen; Cr: creatine

表2 各组 CARS 评分结果
Table 2 Results of Childhood Autism Rating Scale in each group

Group	Pretreatment	4 wk post-treatment	4mon post-treatment
Umbilical cord blood	45.71±5.88	40.50±6.36 ^a	34.10±7.26 ^b
Combination	45.43±9.43	39.00±6.25 ^a	35.00±6.83 ^b
Control	44.00±4.10	43.70±3.70	42.00±4.10

^a $P < 0.05$, vs. pretreatment; ^b $P < 0.01$, vs. 4 wk posttreatment

表3 各组 CARS 评分组内变化显著性比较(P值)
Table 3 Significant comparison of Childhood Autism Rating Scale results in each group(P value)

Time	Umbilical cord blood group	Combination group	Control group
4 wk post-treatment	0.033 0	0.043 1	0.840 0
4 mon post-treatment	0.000 1	0.002 5	0.208 0

3组患者经CGI病情严重程度(severity of illness, SI)评分发现在首次治疗后4周和首次治疗后4月均有不同程度改善, 但经统计学分析差异无显著性意义, 见表4。

表4 各组 CGI(SI)评分结果
Table 4 Results of Clinical Global Impression Scale test in each group

Group	Pretreatment	4 wk post-treatment	4 mon post-treatment
Umbilical cord blood	5.07±1.21	4.14±1.03	4.78±1.30
Combination	4.71±1.38	4.00±0.82	3.75±0.50
Control	4.70±1.00	4.40±0.70	4.32±0.65

经CGI疗效总评(global improvement, GI)量表评估发现首次治疗后4周、首次治疗后4月脐血组总有效率分别为71%、71%, 混合组总有效率分别为79%、93%, 对照组总有效率分别为21%、43%, 混合组高于脐血组, 脐血组高于对照组, 见表5。

表5 各组 CGI(GI)评分结果
Table 5 Results of Clinical Global Impression Scale in each group (n=14, n/%)

Result	4 wk after first treatment			4 mon after first treatment		
	Umbilical cord blood group	Combination Group	Control Group	Umbilical cord blood group	Combination Group	Control Group
Significant progress	1/7	1/7	0/0	0/0	1/7	0/0
Progress	2/14	6/43	0/0	4/28	5/36	1/7
Somewhat progress	7/50	4/28	3/21	6/43	7/50	5/36
No change	3/21	2/14	10/71	2/14	1/7	7/50
Somewhat deterioration	0/0	1/7	0/0	1/7	0/0	1/7
Deterioration	1/7	0/0	1/7	1/7	0/0	0/0
Severe deteriorate	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Efficient: significant progress + progress + somewhat progress

3 讨论

3.1 相关知识点 自闭症又称孤独症, 由Kanner在1943年首次对该病进行了报道, 该患病率各国报道不

一, 在中国为0.002%。自闭症具体致病机制尚不明确, 目前研究认为尽管自闭症伴随有许多神经生理学上的改变, 但更多的变化是免疫异常和神经系统的组织灌流不足, 有人认为这是自闭症的主要病因。国外研究发现在自闭症患儿脑中有颞叶特殊区域灌流不足的表现, 可以导致认知^[5], 社会交往以及语言能力的下降^[6-7], 支持了组织灌流不足是自闭症致病因素之一的观点。这种缺陷包括了基础循环的灌流不足以及在受刺激下组织灌流减少^[8-9]。此外, 免疫功能异常也与自闭症的发生密切相关。国外研究发现自闭症患儿体内能检测出多种自身免疫抗体, 这些自身免疫抗体包括髓磷脂基础蛋白抗体^[10]、脑提取物抗体^[11-12]、蒲肯野细胞和麦醇溶蛋白抗体^[13], 中性因子抗体以及神经元轴突丝和神经胶质纤维蛋白抗体^[14-16]。此外, 研究也发现自闭症患儿的家庭成员与正常对照组相比更容易罹患自身免疫疾病^[17]。国外报道自闭症患儿存在着全身性的T细胞和B细胞的功能异常。这些异常包括了系统性的T淋巴细胞减少, 对丝裂原的反应增殖减少以及细胞因子的产生异常^[18]。Vargas等^[19]通过比较自闭症患儿与正常儿童的尸检标本, 发现在自闭症患者的大脑皮质、白质, 特别是在小脑中存在着神经组织炎症病变。自闭症患者普遍存在类似自身免疫的病理生理学的改变, 由此推断自身免疫也是致病因素之一。

自闭症目前无特效治疗, 通过行为干预、特殊教育和康复训练等方法, 可以提高他们在日常生活中自理、认知及适应社会的能力, 但疗效有限。作者应用脐血和脐带干细胞治疗自闭症取得了较好疗效。脐血中主要为MNCs, 其中CD34⁺细胞已被证实有促血管生成的能力, 不仅对外周组织缺血, 而且对脑缺血都有肯定的治疗作用, 脐血已被成功的运用于不同的缺血模型并被证实能刺激血管生成。文献报道含有CD34⁺以及相当于一半CD34⁺细胞数量CD11b⁺细胞的脐血被证实拥有分化为内皮细胞的能力^[20]。免疫能力缺陷的大鼠结扎大脑中动脉后, 运用脐血CD34⁺细胞可减少神经缺损并诱导神经再生, 部分作用是通过分泌血管生成因子来实现的^[21]。脐带中MSCs含量丰富, 易于分离、培养、扩增和纯化, 具有非特异性调节免疫应答的能力, 它是通过抑制成熟树突细胞及其抗原表达能力来实现的, MSCs还能影响B细胞的活力、增殖和分化, 抑制T细胞触发的增殖及细胞因子的产生。MSCs的另一个重要的特性就是具有分泌免疫阻断因子如白细胞介素10和转化生长因子β的能力, 同时保持着对T细胞表达抗原的能力^[22]。

本组实验发现单用MNCs或联合MNCs和MSCs治疗自闭症均有显著疗效, 总有效率达70%以上, 明显高于对照组的传统康复训练治疗。作用机制如下: 干细胞进入体内可调节机体免疫功能, 并通过自身分化和分泌细胞因子和神经肽刺激新生血管形成, 改善脑内缺血缺氧状态, 激活和修复脑内受损的神经细胞。脐血组和混

合组之间比较差异无显著性意义, 但总有效率混合组高于脐血组, 分析可能与MSCs的免疫调节功能有关, MNCs联合MSCs会对神经系统疾病的治疗产生协同作用。CGI(SI)量表在疗效上只是粗略分级, 可能是导致两组间在治疗前后差异无显著性意义的主要原因。两组之间的疗效比较需要进一步增大样本量继续观察研究。

本组实验同时表明应用于干细胞治疗自闭症是安全的, 治疗前后相关指标对比未发现有意义异常变化, 治疗过程中及治疗后未发现严重不良反应发生, 少数病例出现低热、头痛、腰痛、恶心、乏力等表现与轻微免疫反应和腰椎穿刺脑脊液压力变化有关, 经过对症处理后症状在一两天内均得到缓解。

3.2 文章的偏倚或不足 文章对干细胞治疗自闭症的安全性和临床疗效进行了观察研究, 但对其发挥疗效的确切机制及相关实验室指标未进行进一步的探讨。此外, 对干细胞治疗自闭症的远期疗效未进行观察评估, 希望在以后的工作中进行进一步的观察和研究。

3.3 提供临床借鉴的意义 目前自闭症的治疗方法有行为、营养和药物这3条途径, 但疗效均有限, 本组实验发现单用MNCs或联合应用MNCs和MSCs治疗自闭症是安全的, 其疗效显著高于传统的康复训练治疗。实验有望为自闭症的治疗寻求一条更加有效的途径, 对减轻社会和家庭负担, 提高患者生活质量具有重要的意义。

4 参考文献

[1] Mitchell S, Brian J, Zwaigenbaum L, et al. Early language and communication development of infants later diagnosed with autism spectrum disorder. *J Dev Behav Pediatr.*2007;27:S69-78.
 [2] Filipek PA, Accardo PJ, Baranek GT, et al.: The screening and diagnosis of autistic spectrum disorders. *J Autism Dev Disord.* 2009; 29:439-484.
 [3] 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.

[4] 吴文源. 临床疗效总评量表(CGI)[M]. //张明园. 精神科评定量表手册. 长沙:湖南科学技术出版社,1998:150-153.
 [5] Bachevalier J. Medial temporal lobe structures and autism: a review of clinical and experimental findings. *Neuropsychologia.* 1994;32:627-648.
 [6] Gillberg IC. Autistic syndrome with onset at age 31 years: herpes encephalitis as a possible model for childhood autism. *Dev Med Child Neurol.* 1991;33:920-924.
 [7] Lipkin WI, Hornig M. Microbiology and immunology of autism spectrum disorders. *Novartis Found Symp.*2003;251:129-143.
 [8] Ryu YH, Lee JD, Yoon PH, et al. Perfusion impairments in infantile autism on technetium-99m ethyl cysteinate dimer brain single-photon emission tomography: comparison with findings on magnetic resonance imaging. *Eur J Nucl Med.* 2009;26:253-259.
 [9] Bruneau N, Dourneau MC, Garreau B, et al. Blood flow response to auditory stimulations in normal, mentally retarded, and autistic children: a preliminary transcranial Doppler ultrasonographic study of the middle cerebral arteries. *Biol Psychiatry.* 2007;32:691-699.
 [10] Singh VK, Warren RP, Odell JD, et al. Antibodies to myelin basic protein in children with autistic behavior. *Brain Behav Immun.* 2008; 7:97-103.
 [11] Silva SC, Correia C, Fesel C, et al. Autoantibody repertoires to brain tissue in autism nuclear families. *J Neuroimmunol* 2008;152: 176-182.
 [12] Singer HS, Morris CM, Williams PN, et al. Antibrain antibodies in children with autism and their unaffected siblings. *J Neuroimmunol.* 2007;178:149-155.
 [13] Vojdani A, O'Bryan T, Green JA, et al. Immune response to dietary proteins, gliadin and cerebellar peptides in children with autism. *Nutr Neurosci.*2008;7:151-161.
 [14] Connolly AM, Chez M, Streif EM, et al. Brain-derived neurotrophic factor and autoantibodies to neural antigens in sera of children with autistic spectrum disorders, Landau-Kleffner syndrome, and epilepsy. *Biol Psychiatry.*2007;59:354-363.
 [15] Kozlovskaya GV, Kliushnik TP, Goriunova AV, et al. [Nerve growth factor auto-antibodies in children with various forms of mental dysontogenesis and in schizophrenia high risk group]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2008;100:50-52.
 [16] Sweeten TL, Bowyer SL, Posey DJ, et al. Increased prevalence of familial autoimmunity in probands with pervasive developmental disorders. *Pediatrics.*2008;112:e420.
 [17] Comi AM, Zimmerman AW, Frye VH, et al. Familial clustering of autoimmune disorders and evaluation of medical risk factors in autism. *J Child Neurol.* 1999;14:388-394.
 [18] Cohly HH, Panja A. Immunological findings in autism. *Int Rev Neurobiol.*2005;71:317-341.
 [19] Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, et al. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol.*2005;57:67-81.
 [20] Hildbrand P, Cirulli V, Prinsen RC, et al. The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34⁺ progenitors. *Blood.*2004;104:2010-2019.
 [21] Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34⁺ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest.*2004;114:330-338.
 [22] Liu J, Lu XF, Wan L, et al. Suppression of human peripheral blood lymphocyte proliferation by immortalized mesenchymal stem cells derived from bone marrow of Banna Minipig inbred-line. *Transplant Proc.*2004;36:3272-3275.

CRTER 杂志“干细胞研究”的组稿内容: 本刊学术部

在干细胞移植与MRI示踪方面将重点关注:

◎ 离体状态下进行组织学切片分析的干细胞

◎ 活体状态下移植干细胞的实时示踪

◎ 表面带阴离子的氧化铁磁性纳米颗粒标记

◎ 经修饰的氧化铁标记干细胞或其他哺乳

记干细胞

胞体外标记方法

细胞的修饰方法

◎ 磁珠法标记干细胞。