

自体骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血32例：是否安全、可行及有效？★

朱建新¹, 李忠民¹, 肖太武², 陈双峰³, 耿凤阳¹, 傅强¹, 郭传军¹

Whether autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation is safe, feasible, and effective to the treatment of intracerebral hemorrhage: A 32-case analysis

Zhu Jian-xin¹, Li Zhong-min¹, Xiao Tai-wu², Chen Shuang-feng³, Geng Feng-yang¹, Fu Qiang¹, Guo Chuan-jun¹

Abstract

BACKGROUND: Previous animal studies demonstrated that bone marrow mesenchymal stem cells could differentiate into nerve cells under a certain condition; however, the clinical application for treating nervous system disease has been less reported.

OBJECTIVE: To observe a short-term effect of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on treating cerebral hemorrhage.

METHODS: A total of 32 patients with cerebral hemorrhage who were selected from the Department of Neurosurgery, Liaocheng Brain Hospital between November 2007 and January 2009 were considered as a treatment group. According to general data and the amount of hematoma, they were treated by drilling drainage or hematoma evacuation. Drainage tubes were detained into hematoma cavity, and 3.5 mL autologous bone marrow mesenchymal stem cell suspension was injected through drainage tube. A total of 40 additional patients who did not treated with stem cell transplantation were considered as a control group. Neurologic impairment (NIHSS) and activities of daily living (Barthel index) were performed before and 6 months after transplantation; meanwhile, the brain MRI, serum biochemical and tumor marker were evaluated to detect security of stem cell transplantation.

RESULTS AND CONCLUSION: The NIHSS score and Barthel index in the treatment group were similar to those in the control group before transplantation. Compared with control group, NIHSS scores were significantly decreased in the treatment group ($P < 0.01$), but Barthel index was significantly increased 6 months after transplantation ($P < 0.01$). Compared with before transplantation, NIHSS score were significantly decreased ($P < 0.01$), but Barthel index was significantly increased in the treatment group 6 months after transplantation ($P < 0.01$). Two patients in the treatment group had febrile, which was recovered after treatment. The following-up 6 months after transplantation demonstrated that brain MRI and biochemical indicators were normal except an increasing of CA-153 caused by lung cancer in one patient. The autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of cerebral hemorrhage is safe and effective in a short-term period; however the long-term effect still needs to be further studied.

¹Department of Neurosurgery, Liaocheng Brain Hospital, Liaocheng 252000, Shandong Province, China; ²Department of Hematology, ³Central Laboratory, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, Shandong Province, China

Zhu Jian-xin★, Master, Attending physician, Department of Neurosurgery, Liaocheng Brain Hospital, Liaocheng 252000, Shandong Province, China
jxzh558@163.com

Received: 2009-11-01
Accepted: 2009-12-26

Zhu JX, Li ZM, Xiao TW, Chen SF, Geng FY, Fu Q, Guo CJ. Whether autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation is safe, feasible, and effective to the treatment of intracerebral hemorrhage: A 32-case analysis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(6): 1097-1100. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 大量动物实验证实骨髓间充质干细胞在适宜条件下能够定向分化为神经细胞,但目前其应用于临床治疗神经系统损伤性疾病的报道较少。

目的: 观察自体骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血的近期疗效。

方法: 以 2007-11/2009-01 聊城市脑科医院神经外科收治的 32 例脑出血患者作为治疗组,根据患者一般状况及血肿量大小,分别行钻孔引流或开颅血肿清除,均留置血肿腔引流管,退至血肿腔边缘,通过引流管注射自体骨髓间充质干细胞悬液 3.5 mL。选择同期入院但未行干细胞移植的 40 例患者作为对照组。分别于移植前和移植后 6 个月进行神经功能缺损程度评定(NIHSS 评分)和日常生活活动能力评定(Barthel 指数),行颅脑 MRI、血生化指标、肿瘤标记物检查,监测干细胞移植的安全性。

结果与结论: 移植前两组患者 NIHSS 评分及 Barthel 指数基本相似。与对照组比较,移植后 6 个月治疗组 NIHSS 评分显著降低($P < 0.01$), Barthel 指数显著升高($P < 0.01$)。与移植前比较,治疗组在移植后 6 个月 NIHSS 评分显著降低($P < 0.01$), Barthel 指数显著升高($P < 0.01$)。治疗组 2 例患者在移植后出现一过性发热,予对症处理后症状缓解。移植后 6 个月随访,除 1 例患者因肺癌导致肿瘤标记物 CA-153 升高外,颅脑 MRI 及血生化指标均未出现明显异常,说明自体骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血是安全可行的,且在近期内疗效确定,远期疗效尚待进一步观察。

关键词: 脑出血;移植;自体;骨髓间充质干细胞;干细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.06.031

朱建新, 李忠民, 肖太武, 陈双峰, 耿凤阳, 傅强, 郭传军. 自体骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血 32 例: 是否安全、可行及有效? [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(6):1097-1100. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹ 聊城市脑科医院
神经外科, 山东省
聊城市
252000; 聊城市
人民医院,² 血液
科,³ 中心实验室,
山东省聊城市
252000

朱建新★, 男,
1977 年生, 山东
省聊城市人, 汉
族, 2000 年山东
大学医学院毕业,
硕士, 主治医师,
主要从事脑血管
疾病及干细胞方
面的研究。
jxzh558@163.
com

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2010)06-01097-04

收稿日期: 2009-11-01
修回日期: 2009-12-26
(20091101003/
ZS-H)

0 引言

大多数脑出血患者发病后都有不同程度的神经功能缺损症状, 如失语、偏瘫、尿便障碍等, 如何促进受损脑组织修复和神经功能恢复尤为重要。近年来随着对干细胞研究的深入, 由脑血管疾病而产生的种种不可逆性脑损害的修复与功能再现似乎将成为现实。很多学者分别应用不同方法将神经干细胞直接注入缺血性鼠脑中, 发现其中部分神经干细胞可以在脑中成活, 并向受损部位迁移, 有限地增殖分化为损伤缺失的神经细胞^[1-2]。虽然成活的神经干细胞数量有限, 但接受移植后的大鼠与对照组相比, 在行为学和认知能力方面均有明显改善。国内外大量动物学实验证实, 神经干细胞移植对于脑血管疾病的实验性动物模型的治疗效果肯定^[3-5], 但其临床应用的可行性、安全性还处于进一步探索中。

目前应用于临床治疗的干细胞主要来源于骨髓、脐血、成熟动物脂肪组织或脑组织中。来源于异体的干细胞受取材困难、伦理学和法律制约的影响, 在现实应用方面遇到不小的阻碍。实验采用的骨髓间充质干细胞是一类来源广泛、易取材、易移植且可被调控诱导分化的干细胞, 它来源于自体, 避免了免疫排斥和伦理学争议, 与神经干细胞相比, 更适合应用于临床治疗。

作者所在科室在综合大量动物实验的基础上, 通过自体骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血后神经功能障碍, 收到良好效果。

1 对象和方法

设计: 病例分析。

对象: 2007-11/2009-01聊城市脑科医院神经外科收治的32例脑出血患者作为治疗组, 男21例, 女11例; 年龄39~74岁, 平均(56.3±2.9)岁; 发病后表现为意识障碍19例, 语言障碍12例, 运动障碍30例, 其中患侧肢体肌力0级13例, I~II级11例, III~IV级6例; CT检查证实出血全部位于基底核区, 出血量20~30 mL 10例, 30~50 mL 14例, > 50 mL 8例; 全部患者均行手术治疗, 单纯钻孔引流12例, 小骨窗开颅血肿清除15例, 骨瓣开颅血肿清除5例。选择同期入院, 但未行干细胞移植的40例患者作为对照组。两组患者入院时NIHSS评分、Barthel

指数无明显差异($P > 0.05$)。

纳入标准: ①年龄<80岁。②发病后出现失语、偏瘫、尿便障碍等神经功能缺损症状。③有手术指征, 或行单纯钻孔引流, 或行小骨窗开颅血肿清除, 或行骨瓣开颅血肿清除。④无心、肝、肾和其他脏器重大严重功能障碍, 无凝血机制障碍。⑤患者家属对治疗及实验知情同意并签字。

排除标准: ①年龄≥80岁。②高度过敏体质或者有严重过敏史者。③无手术指征, 单纯药物保守治疗患者。④合并心、肝、肾和其他脏器重大严重功能障碍。⑤凝血机制障碍。⑥期望值过高或不切实际要求者。

干预方法:

自体骨髓间充质干细胞的分离与移植: 入院后完善术前检查, 根据患者一般状况及血肿量制定手术方案, 行小骨窗开颅血肿清除和骨瓣开颅血肿清除者术中放置并保留血肿腔引流管。选择脑内血肿引流基本彻底, 可拔除引流管前行自体骨髓间充质干细胞移植治疗。具体方法为患者入百级层流手术室, 首先在局麻下由血液科医师通过髂穿抽取自体骨髓血200 mL(枸橼酸钠抗凝), 然后在超净工作台内将骨髓血加入至干细胞提取专用试剂中, 经过去除红细胞、离心、提取、清洗等步骤, 获得干细胞悬液约0.5 mL, 加入庆大霉素盐水稀释至4 mL, 留取0.5 mL进行有核细胞和骨髓间充质干细胞计数, 余3.5 mL通过引流管注入血肿腔, 注射前将引流管退至血肿腔边缘, 注射后拔除引流管。术后预防性应用抗生素3 d。

有核细胞计数: 从骨髓血中分离得到干细胞悬液, 步骤同上, 稀释后提取0.5 mL充分混匀。于中心实验室内由专业技师使用微量加样枪, 取细胞稀释液5.0~10.0 μL充到细胞计数池内, 放好盖玻片, 静置2.0~3.0 min。用低倍镜计数4个大方格内的细胞数, 并进行计算。

$$\text{细胞数/L} = (\text{4个大方格内的细胞数}/4) \times 10 \times 10^6 \times 8$$

骨髓间充质干细胞计数: 采用流式细胞仪检测法, 用已知抗体标记后测定CD44⁺, CD29⁺, CD166⁺, CD106⁺, CD166⁺细胞, 并进行计数。

功能测评^[6]: 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), 分别于移植前和移植后6个月进行神经功能缺损程度评定和日常生活活动能力评定。

干细胞移植的安全性检测: 治疗组患者在移植后6个月, 行颅脑MRI、血生化指标、肿瘤标记物检查, 监测干细胞移植的安全性。

主要观察指标: ①神经功能缺损程度和日常生活活动能力的变化。②干细胞移植的安全性。

设计、实施、评估者: 实验设计为第一、二作者, 干预实施为第一~四作者, 结果评估为第六、七作者, 均经过系统培训, 未使用盲法评估。

统计学分析: 由第一作者应用SPSS 13.0软件进行数据处理, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较行配对 t 检验分析, 显著性标准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 参与者数量分析 治疗组32例患者与对照组40例患者全部进入结果分析, 中途无脱落。

2.2 细胞计数 治疗组32例患者全部取样行有核细胞计数和骨髓间充质干细胞计数, 见表1。

表1 治疗组32例患者细胞计数结果
Table 1 Cell count of 32 cases in the treatment group (n)

Type	Max	Min	Mean
Karyocyte	6.4×10^9	7.0×10^8	3.7×10^9
Mesenchymal stem cell	1.2×10^6	7.9×10^5	9.3×10^5

2.3 神经功能缺损程度和日常生活活动能力的测评 移植前两组患者NIHSS评分及Barthel指数均基本相似, 具有可比性。与对照组比较, 移植后6个月治疗组NIHSS评分显著降低($P < 0.01$), Barthel指数显著升高($P < 0.01$)。与移植前比较, 治疗组在移植后6个月NIHSS评分显著降低($P < 0.01$), Barthel指数显著升高($P < 0.01$), 见表2。

表2 移植前后两组患者NIHSS评分与Barthel指数的比较
Table 2 Comparison of NIHSS score and Barthel index between the two groups before and after transplantation ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Before transplantation	
		NIHSS score	Barthel index
Treatment	32	19.67 ± 11.30	27.84 ± 13.12
Control	40	18.89 ± 11.20	29.14 ± 15.10
Group	n	6 months after transplantation	
		NIHSS score	Barthel index
Treatment	32	10.06 ± 8.87^{ab}	57.38 ± 23.50^{ab}
Control	40	14.35 ± 10.14	46.90 ± 20.29

^a $P < 0.01$, vs. control group; ^b $P < 0.01$, the treatment group compared with before transplantation

2.4 干细胞移植的安全性 治疗组2例患者在移植后出现一过性发热, 发生率6.25%, 最高体温不超过38.5℃, 予对症处理后症状缓解。

移植后6个月随访颅脑MRI、血生化、肿瘤标记物CA-153、NSE、ALP等结果显示, 除1例患者因肺癌导致CA-153升高外, 其余均未出现明显异常, 说明自体骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血是安全的。

3 讨论

3.1 移植的可行性 很多实验都已证实骨髓间充质干细胞具有向不同组织的“横向分化”潜能, 表现出很强的可塑性, 其定向分化为神经细胞是应用于脑血管疾病治疗的基础^[7-8]。Woodbury等^[9]用 β -巯基乙醇、丁羟基茴香醚以及二甲基亚酚等来诱导骨髓间充质干细胞, 6 d后检测到神经元特异性表面标志, 如神经元特异烯醇化酶、神经元核心抗原、神经微丝M和Tau蛋白等的表达。国内侯玲玲等^[10]对脐血来源的骨髓间充质干细胞诱导分化, 其中神经元特异烯醇化酶和神经微丝M的阳性率高达70%。这些实验结果均说明在适宜条件下, 骨髓间充质干细胞能够向神经细胞转换, 可作为神经细胞移植供体用于脑血管疾病所致的脑损伤的治疗。

3.2 移植部位 Kelly等^[11]认为, 在脑血管意外疾病中神经干细胞直接移植的部位与病灶的位置关系是决定移植入的细胞成活的重要因素之一。实验中治疗组32例患者全部经血肿腔引流管直接注入基底节区, 干细胞移植后6个月临床症状改善有效率达84.375%(27/32), 与对照组比较, NIHSS评分显著降低($P < 0.01$), Barthel指数显著升高($P < 0.01$), 显示干细胞移植的有效性。认为经颅直接注入基底节的优点是不需经过血脑屏障, 且功能区浓聚干细胞, 它可直接在基底节附近进行增殖、迁移, 并可直接参与周围功能区的重建。之所以要在注射前将引流管退至血肿腔边缘, 是考虑到脑血管意外发生后病灶区大量的细胞死亡、水肿带形成、各种炎性反应产生, 导致微环境的改变, 不利于移植细胞成活^[12-13]。相反若移植到血肿腔周围, 不仅能提高移植细胞成活率, 还可以大量挽救损伤区域周边(缺血半暗带)的神经细胞, 从而显著降低致残率和残疾程度^[14]。

3.3 移植时间 目前关于干细胞移植治疗脑出血的最佳时机还未明确, 动物实验显示移植的神经干细胞在各阶段的脑出血模型中均能成活^[15-16]。作者认为在出血后急性期脑组织局部所分泌的一些兴奋性神经递质、自由基以及炎性因子形成的微环境对移植物的存活不利, 虽然有报道认为一些促炎性因子有促进细胞增殖和趋化作用^[17], 但过多的毒性递质可能对细胞具有杀伤作用, 不利于移植细胞的成活。同时, 还应考虑到出血后脑损伤的自然恢复过程, 如选择在发病后几个月甚至1年后

再行干细胞移植, 则错过了神经结构早期修复的最佳时机。实验将移植时间选择在脑内血肿引流基本彻底后, 一般为脑出血后的1周左右, 虽然刚刚渡过急性期, 可能还不是干细胞在脑内存活的最佳时机, 但选择在拔管前移植, 还是避免了择期细胞移植时再次置管的二次创伤。

3.4 移植安全性 治疗组2例患者移植后出现一过性发热, 发生率6.25%, 最高体温不超过38.5℃, 予对症处理后24 h内症状缓解。因移植干细胞取自自体骨髓, 所以这种不良反应的发生认为并非免疫排斥, 而是可能与单核细胞、粒细胞释放内生制热源有关, 同时也不排除移植过程中出现非严格的无菌操作。

另外, 干细胞与肿瘤之间的关系长期以来一直是研究者广泛关注的问题。近代关于肿瘤起源的假说中即有肿瘤起源于干细胞的观点^[18-19]。目前研究表明, 移植到体内的神经干细胞在宿主微环境的影响下更容易分化为胶质细胞, 这是由于神经系统发生外伤或变性时, 常常会伴发强烈的胶质反应、血脑屏障的破坏以及炎症反应, 而这些因素可以触发机体的胶质再生信号, 削弱神经再生信号的作用, 使植入的神经干细胞偏离预定的分化方向^[20-21]。当这种胶质再生反应过于强烈时, 是否会导致植入的神经干细胞形成胶质增生样病变, 甚至形成胶质瘤尚不得而知。据最新文献检索, 到目前为止还没有关于脑移植或者骨髓间充质干细胞移植以后脑内产生肿瘤的报道。对移植患者于术后6个月行肿瘤标记物检查, 未发现1例因继发颅内肿瘤引起指标异常。最早接受移植患者已随访近2年, 颅脑MRI及肿瘤标记物检查均未出现明显异常。

当然, 本组病例数较少, 随访时间不长, 能观察到的只是移植后的短期效果, 最佳移植部位、移植时间均尚待进一步探讨; 是否存在长期致癌性也有待深入临床随访观察。

4 参考文献

- [1] Fukunaga A, Uchida K, Hare K, et al. Differentiation and angiogenesis of central nervous system cells implanted with mesenchyme into ischemic rat. Cell Transplant. 1999;838(1-2):1-10.
- [2] Park KI. Transplantation of neural stem cells: Cellular and gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury. Yonsei Med J. 2000; 41(6): 825-835.
- [3] Zinkova NN, Gilerovich EG, Sokolova IB, et al. Mesenchymal stem cells based therapy of brain ischemic stroke in rat. Tsitol. 2007;49(7):566-575.
- [4] Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. J Intern Med. 2007;262(5): 509-525.
- [5] Li QJ, Tang YM, Liu J, et al. Treatment of Parkinson disease with C17.2 neural stem cells overexpressing NURR1 with a recombinant adeno virus containing the NURR1 gene. Synapse. 2007;61(12): 971-977.
- [6] Zhang YS, Chen XH. Xiandai Kangfu. 2000;4(10):1517. 张永淑, 陈晓红. 日常生活活动能力评定对外伤性截瘫患者效果分析[J]. 现代康复, 2000, 4(10):1517.
- [7] Gonzalez-Martinez JA, Bingaman WE, Toms SA, et al. Neurogenesis in the postnatal human epileptic brain. J Neurosurg. 2008;108(4): 841-842.
- [8] Einstein O, Ben-Hur T. The changing face of neural stem cell therapy in neurologic diseases. Arch Neurol. 2008;65(4): 452-456.

- [9] Woodbury D, Schwab EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res. 2000;61(4): 364-370.
- [10] Hou LL, Cao H, Wei GR, et al. Zhonghua Xueye Zazhi. 2002;23(8): 415-419. 侯玲玲, 曹华, 魏国荣, 等. 人脐血间充质干细胞体外扩增和向神经样细胞定向诱导分化的研究[J]. 中华血液杂志, 2002, 23(8): 415-419.
- [11] Kelly S, Bliss TM, Shah AK, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(32): 11839-11844.
- [12] Li HP, Liu CR, Zhang YL, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2007;11(28): 5622-5625. 李焕萍, 刘春蓉, 张永亮, 等. 骨髓间充质干细胞在医学领域中的应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(28): 5622-5625.
- [13] Li X, Yu X, Lin Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. J Mol Cell Cardiol. 2007;42(2):295-303.
- [14] He XY, Li XG. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2006;10(1):121-123. 何晓英, 李小刚. 神经干细胞移植在脑出血治疗中的应用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2006, 10(1):121-123.
- [15] Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. Leukemia. 2007;21(8):1733-1738.
- [16] Fouillard L, Chapel A, Bories D, et al. Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation. Leukemia. 2007;21(3): 568-570.
- [17] Jeong SW, Chu K, Jung HK, et al. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental stroke. Stroke. 2003;34(9): 2258-2263.
- [18] Keene CD, Sonnen JA, Swanson PD. Neural transplantation in Huntington disease: long-term grafts in two patients. Neurology. 2007;68(24): 2093-2098.
- [19] Zhao F, Ma J, Yu H. Sichuan Jiepouxue Zazhi. 2008;16(4):36-38. 赵峰, 马晶, 余鸿. 影响神经干细胞增殖、分化的外部因素[J]. 四川解剖学杂志, 2008, 16(4):36-38.
- [20] Jin P, Xu RX, Jiang XD, et al. Zhonghua Shenjing Yixue Zazhi. 2004; 3(2): 146-150. 金澎, 徐如祥, 姜晓丹. 细胞替代治疗与神经干细胞[J]. 中华神经医学杂志, 2004, 3(2): 146-150.
- [21] Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. Crit Rev Oncol Hematol. 2004;51(1):1-28.

来自本文课题的更多信息--

文章的倚或不足: 实验设立的对照组仅限于未行干细胞移植的脑出血患者, 缺乏与静脉注射、蛛网膜下腔注射等其他治疗方式的对照。此外, 随访时间较短, 缺乏对干细胞移植长期有效性和安全性的观察。

提供临床借鉴的意义: 有效治疗的基础是恰当的注射时机和准确的注射部位。

目前关于干细胞移植治疗脑出血的最佳时机还未明确, 作者认为在出血后急性期脑组织局部所分泌的一些兴奋性神经递质、自由基以及炎症因子形成的微环境对移植物的存活不利, 虽然有报道认为一些促炎因子有促进细胞增殖和趋化作用, 但过多的毒性递质可能对细胞具有杀伤作用, 不利于移植细胞的成活。同时, 还应考虑到出血后脑损伤的自然恢复过程, 如选择在发病后几个月甚至 1 年后再行干细胞移植, 则错过了神经结构早期修复的最佳时机。为此, 实验将移植时间选择在脑内血肿引流基本彻底后, 一般为脑出血后的 1 周左右, 虽然刚刚度过急性期, 可能还不是干细胞在脑内存活的最佳时机, 但选择在拔管前移植, 还是避免了择期细胞移植时再次置管的二次创伤。

实验通过引流管将自体骨髓间充质干细胞定向注射到脑损伤局部, 为改善脑出血患者的预后、提高生活质量提供了一条有效途径。