

· 论 著 ·

脐带血有核细胞移植治疗肌萎缩侧索硬化的临床研究

赖福生, 卢少军, 王一芳, 焦冬生, 李惠俊, 江一帆, 钱时德

[摘要] 目的 观察脐带血有核细胞治疗肌萎缩侧索硬化(ALS)的疗效并探讨机制。方法 采集新生儿脐带血, 获取含干细胞的有核细胞混悬液, 每份平均含有核细胞 4.29×10^8 个, 通过腰椎穿刺, 将其移植入蛛网膜下腔。结果 移植后第 5 天患者单手握力较移植前平均增加 1.68 kg; 移植后第 1 个月 94.46% 患者病情好转; 第 2 个月 5.12% 持续好转, 73.04% 保持稳定; 第 3 个月 36.06% 保持稳定; 第 4 个月 18.85% 保持稳定; 第 5 个月 10.61% 保持稳定。结论 脐带血有核细胞蛛网膜下腔移植在一定时间内可有效缓解 ALS 的临床症状。

[关键词] 肌萎缩侧索硬化; 运动神经元病; 脐带血; 有核细胞; 移植

中图分类号: R591.44 文献标志码: A 文章编号: 1672-271X(2010)06-0515-04

Clinical study of treating amyotrophic lateral sclerosis with transplantation of umbilical cord blood nuclear cells

LAI Fu-sheng, LU Shao-jun, WANG Yi-fang, JIAO Dong-sheng, LI Hui-jun, JIANG Yi-fan, QIAN Shi-de. Department of Neurology, 454 Hospital of PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To investigate the curative effect of umbilical cord blood nuclear cells transplantation on treating ALS and the mechanism of this therapy. **Methods** Umbilical cord blood was collected, and the nuclear cell suspensions containing stem cells were made and injected into subarachnoid space of the patients. Each suspension contained 4.29×10^8 nuclear cells averagely. The movement functions of the cases were evaluated. **Results** 5 days after transplantation, the single hand holding strength of patients averagely increased 1.68 kg compared with before treatment. 94.46% patients improved in the first month. 5.12% patients continued to improve and 73.04% patients maintain in stable condition in the second month. 36.06% patients maintained in stable condition in the third month. 18.85% patients maintained in stable condition in the forth month. 10.61% patients maintained in stable condition in the fifth month. **Conclusion** Umbilical cord blood nuclear cells transplantation may improve patient's movement function in a certain time.

[Key words] amyotrophic lateral sclerosis; motor neuron disease; umbilical cord blood; nuclear cells; transplantation

肌萎缩侧索硬化(又名运动神经元病)属神经系统变性疾病,主要表现为上下运动神经元不明原因的变性坏死,患者多在 3~5 年内死于呼吸衰竭,其发病原因至今不明^[1]。力如太是唯一被批准用于肌萎缩侧索硬化治疗的药物^[2],但其临床效果非常有限,且有一定的毒副作用。探索新的治疗手段是目前医学研究的热点之一。我们曾采用含有干细胞的自体骨髓有核细胞悬液蛛网膜下腔移植治疗这

种疾病,取得一定效果,并提出血脑屏障对某些神经营养因子转运功能障碍可能是运动神经元病的发病原因^[3]。2005 年 6 月至 2010 年 7 月我们采用新生儿脐带血有核细胞蛛网膜下腔移植治疗肌萎缩侧索硬化 316 例,近期效果明显,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 316 例患者诊断均符合 1994 年西班牙会议 EI ESCORIAL 标准^[4],男 187 例女 129 例;年龄 22~76 岁,平均 (50.9 ± 11.8) 岁;病程 1~21 年,平均 (2.5 ± 1.6) 年。316 例 632 只手单手握力 0~42.3 kg,平均 (8.43 ± 5.16) kg。本组患者均行磁共

作者简介: 赖福生(1962-),男,安徽铜陵人,硕士,主任医师,从事神经病学临床研究工作

作者单位: 210002 江苏南京,解放军 454 医院神经科

振等检查,排除脊髓压迫症、脊髓空洞症、多发性硬化等疾病。按照 ALS 功能分级量表^[5],根据言语、流涎、吞咽、书写、自行进食、穿衣、翻身、行走、登楼和呼吸等 10 项内容将病情分为 4 级:轻度(40~31 分)57 例,中度(30~21 分)114 例,重度(20~11 分)112 例,极重度(10~0 分)33 例。

1.2 方法

1.2.1 移植前准备 ①脐带血有核细胞蛛网膜下腔移植方案经医院伦理委员会审查通过。②签署脐带血有核细胞蛛网膜下腔移植治疗知情同意书。③常规检查患者血尿粪常规,心电图、胸部 X 线片,肝、胆、胰、脾、肾 B 超,肝肾功能、血糖、梅毒抗体、人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体、丙肝抗体、乙肝两对半。④临产孕妇知情同意,梅毒抗体、HIV 抗体、丙肝抗体和乙肝两对半检测,结果均为阴性,新生儿足月顺产健康。

1.2.2 移植过程

1.2.2.1 脐带血采集 使用一次性采血袋(内含 40 ml 保养液)采集脐带血 80~120 ml,4℃ 保存,24 小时内使用。

1.2.2.2 有核细胞分离 ①标本取样,计算有核细胞总数。②按 4:1(V:V)加入羟乙基淀粉液混匀,将血袋倒置 1000 rpm 离心 5 min(离心机半径为 50 cm),转移出红细胞。③转移出的红细胞中加生理盐水至原体积,按 4:1(V:V)加入羟乙基淀粉液混匀,将血袋倒置,自然沉淀 40 min,转移去除红细胞。④2 次所得样品混合,混合样品 1000 rpm 离心 10 min,弃上清,留沉淀细胞。沉淀细胞液中加入红细胞裂解液,裂解红细胞,再 2000 rpm 离心 10 min,去除上清液。⑤所得沉淀细胞液用生理盐水反复洗涤 4 次,再用生理盐水调整为 5 ml。⑥取样计数,台盼蓝拒染率 100%,计算出有核细胞总数为 $(3.0 \sim 8.6) \times 10^8$,平均 $(4.29 \pm 2.16) \times 10^8$ 。

1.2.2.3 有核细胞回输 局麻下行腰椎穿刺,收集脑脊液 15~30 ml,作常规、生化检查。抽取细胞混悬液 5 ml、地塞米松 2 mg 缓慢注入蛛网膜下腔,随后回输脑脊液 10~20 ml,患者俯卧或去枕平卧 6 h 后,继续卧床 2 d。起床后观察 3~20 d 出院。

1.2.3 辅助治疗 移植后予肌苷注射液、刺五加注射液等静脉滴注 3~6 d。根据中医原理辨证,给予中药汤剂口服。

1.2.4 观察项目 ①移植前与移植后第 5 天由专门医师对患者运动功能进行检查。移植前后单手握力采用 WCS-100 型电子握力计(北京鑫东华腾体育器械有限公司)测定。②分别在患者移植后的第 1、2、3、4、5 个月电话随访,按 ALS 运动功能评分标准记录患者病情变化。

1.2.5 临床效果评价^[3] 移植后 1、2、3、4、5 个月生活能力分别与前一个月情况比较,明显好转:自觉症状改善,ALS 功能评分提高 5 分以上;好转:自觉症状改善,ALS 功能评分提高 0~4 分;稳定:自觉症状无改善,ALS 功能评分无变化;加重:自觉症状加重,ALS 功能评分降低。

1.2.6 统计学处理 握力增加值和 ALS 评分数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,治疗前后比较采用 *t* 检验。移植细胞总数与移植后第 1 个月 ALS 评分增加值之间的关系采用直线相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 握力变化 移植后第 5 天单手握力较移植前增加值为 $-3.2 \sim 7.4$ kg,平均增加 (1.68 ± 1.62) kg ($n = 632$, $t = 26.071$, $p < 0.05$)。

2.2 移植后患者病情转归 临床疗效随访结果见表 1、表 2。

表 1 脐带血有核细胞蛛网膜下腔移植
治疗前后患者 ALS 评分

时间	随访(例)	失访(例)	ALS 功能评分
治疗前	316		22.31 \pm 8.20
第 1 个月	307	9	24.42 \pm 10.03 [*]
第 2 个月	293	23	24.22 \pm 9.21 [*]
第 3 个月	269	47	23.63 \pm 10.60
第 4 个月	260	56	22.71 \pm 9.51 [△]
第 5 个月	245	71	21.82 \pm 9.44 [△]

注:与治疗前相比,^{*} $P < 0.05$;与治疗第 1 个月相比,[△] $P < 0.05$

表 2 脐带血有核细胞蛛网膜下腔移植治疗后 ALS 患者病情转归

时间	随访(例)	失访(例)	明显好转[例(%)]	好转[例(%)]	平稳[例(%)]	加重[例(%)]
第 1 个月	307	9	7(2.3)	283(92.18)	12(3.91)	5(1.63)
第 2 个月	293	23	0	15(5.12)	214(73.04)	64(21.84)
第 3 个月	269	47	0	0	97(36.06)	172(63.94)
第 4 个月	260	56	0	0	49(18.85)	211(81.15)
第 5 个月	245	71	0	0	26(10.61)	219(89.39)

2.3 影响疗效的相关因素 对移植细胞总数与移植后第 1 个月 ALS 评分增加值进行直线相关分析, 无相关性($r=0.032, P>0.05$)。

2.4 不良反应 移植后出现多汗症状占 8.86% (28/316); 一过性低热 ($37.2 \sim 38.3^{\circ}\text{C}$) 占 4.75% (15/316); 轻度头痛占 6.96% (22/316); 轻微眩晕占 0.95% (3/316); 低颅压头痛占 2.22% (7/316)。

3 讨论

数十年来, 众多学者对肌萎缩侧索硬化发病机理进行了全面的研究, 提出了各种理论。这些理论包括自身免疫损伤、超氧化物歧化酶缺陷、兴奋性氨基酸中毒、神经营养因子缺乏和慢性病毒感染等等, 确切病因至今无法确定^[5]。包括糖皮质激素、神经生长因子等多种药物曾被尝试用于治疗这种疾病, 均告失败。得到认可的只有力如太(氨基-2-三硫甲氧-6-苯并噻唑), 其抑制谷氨酸的兴奋性神经毒性作用可稍稍延缓该病的进展速度, 距离理想的治疗效果相去甚远^[1]。

鉴于干细胞巨大的增殖和分化潜力, 近年来国内外专家纷纷尝试应用干细胞治疗该类疾病^[6]。动物实验证实干细胞蛛网膜下腔移植治疗肌萎缩侧索硬化安全有效^[7]。目前已应用于临床的细胞包括神经干细胞、骨髓干细胞、脐带血干细胞、嗅鞘细胞等^[8-9]。Martinez 等^[10]将自体 CD133(+) 造血干细胞注射到患者额叶运动皮质区, Deda 等^[11]将骨髓干细胞注射到患者脊髓前部, 均取得一定效果。Janson 等^[12]将外周血干细胞、Zurn 等^[13]将异基因细胞、曹红宾等^[9]将胎脑神经干细胞注入患者蛛网膜下腔, Mazzini 等^[14]将自体骨髓间充质干细胞植入脊髓, 均无明显不良反应。移植干细胞究竟发挥替代作用还是神经保护作用目前尚无定论^[15]。

我们曾采用含有干细胞的自体骨髓有核细胞悬液蛛网膜下腔移植治疗运动神经元病, 近期效果显著^[3]。本研究表明脐带血有核细胞蛛网膜下腔移植可以得到相近的治疗效果, 这提示两种细胞悬液可能含有相同的有效治疗因素。本研究及其他干细胞移植临床研究结果均有一个相同的特点, 就是近期效果良好, 但长期效果逐渐衰减。对于细胞移植的近期效果, 多数学者认为可能是移植细胞释放细胞因子对运动神经元产生营养支持或激活作用^[16]。本研究所采用的细胞悬液中不仅干细胞, 其他细胞(如淋巴细胞)也能生成和释放各种营养因子, 这些营养因子有助于受损神经细胞的修复^[17]。远期效果递减提示移植细胞在中枢神经系统内未能长期生

存。

本研究中病情好转幅度与移植细胞数量无相关性; 近期减退的功能易于恢复。这些均提示中枢神经系统尚存的变性但未完全坏死的运动神经元是病情好转的基础。

文献报道 ALS 患者的脑脊液可以诱导体外培养的运动神经元变性, 提示患者脑脊液对运动神经元具有毒性^[18]。我们将脐带血有核细胞移植入患者脑脊液中能够使病情保持一段时间稳定, 提示移植细胞可能通过改善运动神经元所处的环境, 从而保护了运动神经元。

血-脑屏障和血-脑脊液屏障为中枢神经系统提供了一个相对独立的环境, 各种物质不能轻易进入。通过血液循环向中枢神经系统移植细胞显然不合理, 直接将细胞注射到脑或脊髓会造成组织损伤, 且操作较复杂。蛛网膜下腔移植可绕过血-脑屏障, 使移植细胞通过脑脊液循环进入脑和脊髓, 操作简便、损伤小, 可反复施行。由于蛛网膜下腔是免疫豁免区, 移植细胞无须配型, 临床应用亦未发现明显的不良反应。

细胞移植的初衷是让干细胞分化成新的神经细胞替代已经坏死的神经细胞。理论上说, 在患者体内原有运动神经元进行性坏死的情况下, 移植的细胞不大可能分化成运动神经元。临床实验中也找不到新生神经细胞的证据。我们认为移植细胞改善患者中枢神经系统内环境是较为合理的解释。

【参考文献】

- [1] Mitchell JD, Borasio GD. Amyotrophic lateral sclerosis[J]. Lancet, 2007, 369(9578): 2031-2041.
- [2] Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. The ALS/Riluzole study group. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis[J]. N Engl J Med, 1994, 330(9): 585-591.
- [3] 赖福生, 王一芳, 李翠萍, 等. 自体骨髓有核细胞蛛网膜下腔移植治疗运动神经元病的临床研究[J]. 临床神经病学杂志, 2005, 18(1): 10-12.
- [4] Brooks BR, Miller RG, Swash M, et al. El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis[J]. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord, 2000, 1(5): 293-299.
- [5] 李焰生, 黄坚, 庄建华. 运动神经元疾病[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2002: 207.
- [6] Kim SU, de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological disease: a review[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(10): 2183-2200.
- [7] Hwang DH, Lee HJ, Park IH, et al. Intrathecal transplantation of human neural stem cells overexpressing VEGF provide behavioral improvement, disease onset delay and survival extension in trans-

- genic ALS mice[J]. Gene Ther, 2009 16(10):1234-44.
- [8] 黄红云,陈琳,王洪美,等. 嗅鞘细胞移植治疗肌萎缩侧索硬化症:88 例临床报告[J]. 中国临床康复, 2006, 10(1):39-41.
- [9] 曹红宾,李敏,王海燕,等. 肌萎缩侧索硬化患者神经干细胞移植后中枢内的体液免疫反应[J]. 中国组织工程与临床康复, 2008, 12(38):7439-7442.
- [10] Martinez HR, Gonzalez-Garza MT, Moreno-Cuevas, et al. Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients[J]. Cytotherapy, 2009, 11(1):26-34.
- [11] Deda H, Inci MC, Kurekci AE, et al. Treatment of amyotrophic lateral sclerosis patients by autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year follow-up[J]. Cytotherapy, 2009, 11(1):18-25.
- [12] Janson CG, Ramesh TM, During MJ, et al. Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2001, 10(6):913-915.
- [13] Zurn AD, Henry H, Schluep M, et al. Evaluation of an intrathecal immune response in amyotrophic lateral sclerosis patients implanted with encapsulated genetically engineered xenogeneic cells[J]. Cell Transplant, 2000, 9(4):471-484.
- [14] Mazzini L, Ferrero I, Luparello V, et al. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial[J]. Exp Neurol, 2010, 223(1):229-237.
- [15] Silani V, Calzarossa C, Cova L, et al. Stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: motor neuron protection or replacement[J]? CNS Neurol Disord Drug Targets, 2010, 9(3):314-324.
- [16] Lunn JS, Hefferan MP, Marsala M, et al. Stem cells: comprehensive treatments for amyotrophic lateral sclerosis in conjunction with growth factor delivery[J]. Growth Factors, 2009, 27(3):133-140.
- [17] Graber JJ, Dhib-Jalbut S. Protective autoimmunity in the nervous system[J]. Pharmacol Ther, 2009, 121(2):147-159.
- [18] Vijayalakshmi K, Alladi PA, Sathyaprabha TN, et al. Cerebrospinal fluid from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients induces degeneration of a cultured motor neuron cell line[J]. Brain Res, 2009, 1263(1):122-133.

(收稿日期:2010-07-22;修回日期:2010-08-20)

(本文编辑:黄攸生;英文编辑:王建东)

(上接第 499 页)的金标准^[3]。

SDS 临床表现及鉴别诊断:中年男性,隐匿起病,表现脑供血不足的症状,如头昏或昏厥,或同时伴有其他自主神经、锥体系统或锥体外系症状,直立时血压较卧位降低 30 mmHg 以上,心率不加快,24 h 尿中去甲肾上腺素和肾上腺素排出量低等要点建立诊断。自主神经功能检查及 MRI 对诊断有帮助。本病以昏厥为主要表现时应与单纯性昏厥及低血压昏厥鉴别,后两种昏厥不伴有其他系统受损症状;当以锥体外系症状为主要表现时应与帕金森病鉴别,后者无直立性低血压。

SDS 缺乏有效根治方法,目前仅能对症治疗缓解症状。治疗原则:①心理治疗,寻求配合,增加患者依从性;②起立要慢,避免体位快速变动,卧位时头抬高 20~30 cm,避免跑步及穿紧身衣、弹力袜、腹部绷带,高钠饮食,多饮水等;③选择性外周交感神经系统 α_1 受体激动剂米多君,可增加外周动脉和静脉阻力,能有效改善低血压;④选用麻黄碱、盐酸

哌甲酯等,严重者酌情给予糖皮质激素,直至不再出现直立性低血压或体重明显增加时逐渐减量维持;⑤多种维生素辅酶 Q_{10} 、肌苷等;⑥对症治疗:去氨加压素滴鼻,减少夜尿;金刚烷胺、安坦等可减轻肌强直症状;⑦中药:补中益气汤合生脉散加减。

本病起病隐匿,临床表现形式多样,极易延误诊断,强调早期诊断,早期治疗,以改善预后。

【参考文献】

- [1] 段淑霞,闫立凤. Shy-Drager 综合征误诊 14 例分析[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 7(9):5020.
- [2] 王训,王维治. Shy-Drager 综合征[M]//王维治. 神经病学. 北京:人民卫生出版社, 2006:1457-1459.
- [3] Austin MT, Davis TL, Robertson D, et al. Multiple system atrophy: clinical presentation and diagnosis[J]. Tenn Med, 1999, 92(2):55-57.

(收稿日期:2010-05-04;修回日期:2010-06-28)

(本文编辑:潘雪飞)