

自体骨髓和脐带血有核细胞移植治疗肌萎缩侧索硬化

赖福生*, 卢少军, 王一芳, 焦冬生, 钱时德, 李惠俊, 王燕燕, 方春艳
(解放军第 454 医院神经科, 南京 210002)

[摘要] **目的:**研究自体骨髓和脐带血有核细胞治疗肌萎缩侧索硬化(ALS)的疗效。**方法:**采集 1 例 ALS 患者的自体骨髓或新生儿脐带血,获取含干细胞的有核细胞悬液,每份平均含有核细胞 4.72×10^8 个。通过腰椎穿刺,将其移植入该患者的蛛网膜下腔。在 4 年内分别对本例 ALS 患者进行骨髓及新生儿脐带血有核细胞移植治疗 3 次和 50 次,观察患者治疗后运动功能的变化,脑脊液常规、生化指标和不良反应。**结果:**第 1 次自体骨髓移植后病情好转,第 3 次移植后达到最好状态。此后患者病情逐渐加重,但较移植治疗前进展速度明显减缓。治疗过程中患者脑脊液压力、常规生化指标均在正常范围内,无明显不良反应。**结论:**自体骨髓和脐带血有核细胞移植治疗 ALS 有短期效果,可延缓 ALS 的进展,该方法是安全的。

[关键词] 肌萎缩侧索硬化;自体骨髓;脐带血;有核细胞;移植

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0269-03

Observation of Curative Effects of Autologous Bone Marrow and Umbilical Cord blood Nuclear Cells Transplantation Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis

LAI Fu-sheng*, LU Shao-jun, WANG Yi-fang, JIAO Dong-sheng,
QIAN Shi-de, LI Hui-jun, WANG Yan-yan, FANG Chun-yan

(Department of Neurology, No. 454 Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the curative effects of autologous bone marrow and umbilical cord blood nuclear cells transplantation treating amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **Method:** The autologous bone marrow of a patient with ALS or umbilical cord blood were collected. Then the nuclear cell suspensions containing stem cells were made. Each suspension contained 4.72×10^8 nuclear cells averagely. The suspensions were injected into subarachnoid space of the patient by lumbar puncture. In 4 years we performed 3 transplantations of autologous bone marrow nuclear cells and 50 transplantations of umbilical cord blood nuclear cells on the patient respectively. The changes of movement function, cerebrospinal fluid (CSF) and adverse reactions of the patient were observed. **Result:** The patient's condition improved after the first transplantation, and to the best after the third transplantation. From then on the patient's condition worsened gradually, but the worsening speed was slower than before the transplantation. The pressure, routine test and biochemistry indicators of CSF were normal in the 4 years. No severe adverse reactions were observed. **Conclusion:** Autologous bone marrow and umbilical cord blood nuclear cells transplantation has short-term effect in treating ALS. It can slow down the progression of the disease, and the treatment is safe.

[Key words] amyotrophic lateral sclerosis; autologous bone marrow; umbilical cord blood; nuclear cells; transplantation

肌萎缩侧索硬化(ALS)是神经系统变性疾病,主要表现为上下运动神经元变性坏死,患者多在发病后 3~5 年内死于呼吸衰竭。其发病原因至今未明^[1],目前仍缺乏有效的治疗手段,许多治疗方法尚在尝试之中。干细胞移植被认为是治疗神经系统变性疾病较有希望的方法。我们曾采用含有干细胞的自体骨髓有核细胞及脐带血有核细胞悬液蛛网膜下腔移植治疗 ALS,近期效果良好,但移植的效果随时间延伸逐渐衰退^[2-3]。近年来我科对 1 例 ALS 患者反复实施自体骨髓和脐带血有核细胞蛛网膜下腔移植,研究该治疗方法对 ALS 的疗效。

1 一般资料

系 2007 年 5 月至 2011 年 5 月多次在我院住院的 1 例 ALS 患者,女,42 岁。表现进行性四肢无力 1 年半,言语不清、气短 3 个月余,行肌电图检查示广泛神经源性损害,颅脑及脊髓磁共振检查未见异常,符合 1994 年西班牙会议 EI Escorial 的 ALS 诊断标准^[4]。经坚持服用力如太 1 年无明显效果。既往无其他病史。

2 方法

2.1 移植前准备 ①自体骨髓有核细胞移植方案和脐带血有核细胞移植方案均经医院伦理委员会审查通过;②签署自体骨髓或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、便常规,心电图、胸部 X 光片,肝、胆、胰、脾、肾 B 超,肝、肾功能、血糖、梅毒抗体、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、乙肝两对半检测,结果均为阴性,新生儿足月顺产健康。

2.2 移植方法

2.2.1 自体骨髓采集 局麻下于患者髂骨处行骨髓穿刺术,抽取骨髓 60 mL,枸橼酸钠 1:9 抗凝,注入采血袋。共采集 3 次。

2.2.2 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 h 内使用。

2.2.3 有核细胞分离 ①标本取样,计算有核细胞总数。②按 4:1 加入羟乙基淀粉液混匀,将血袋倒置 1 000 r·min⁻¹ 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)加入羟乙基淀粉混匀,将血袋倒置,自然沉淀 40 min,转移去除红细胞;④ 2 次所

得样品混合,混合样品 1 000 r·min⁻¹ 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 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,去上清;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(1.0~8.0)×10⁸ 个,平均(4.72±2.09)×10⁸ 个。

2.2.4 有核细胞回输 局麻下行腰椎穿刺,测脑脊液压力,收集脑脊液 15~30 mL,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,留脑脊液 4 mL 作常规、生化检查。患者去枕平卧 6 h 后,继续卧床 2 d。开始先行自体骨髓有核细胞移植 3 次后,行脐带血有核细胞移植 50 次。移植间隔 5~65 d,平均间隔 28 d。

2.3 辅助治疗 继续口服力如太 50 mg/次,2 次/d。每次移植后予单唾液酸神经节苷脂、长春西汀等 gtt 2~3 d。

2.4 疗效观察 每次治疗前及治疗后对患者运动功能进行检查,按照 ALS 功能分级量表评分、填表记录^[5],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。每次治疗时均测脑脊液初压,留脑脊液作常规和生化检查。治疗后观察记录患者不良反应。

3 结果

3.1 治疗前后 ALS 功能评分及握力变化 患者在第 1 次自体骨髓有核细胞移植 2 d 后,吞咽、呼吸情况即开始好转,ALS 功能评分由治疗前的 16 分增至 18 分,左手握力由 2.6 kg 增至 6.1 kg,右手握力由 1.4 kg 增至 1.5 kg。2 个月后完成第 3 次自体骨髓有核细胞移植,病情明显改善,临床疗效达到最好,翻身、进食和穿衣能力增强。ALS 功能评分达到 21 分,两手握力均为 6.1 kg。间隔 2 个月再次入院,ALS 功能评分降至 18 分,双手握力均有减退;此后行脐带血有核细胞移植,每次移植后 2~7 d 即感肌力增加、呼吸顺畅,20~30 d 后感到肌力逐渐减退;故反复行脐带血有核细胞移植 50 次。病情呈现起伏态势,间隔时间越长则起伏越明显。治疗期间患者总体运动功能逐渐减退,但较移植治疗前,病情进展速度明显减慢;尤其是言语、呼吸、吞咽和行走能力部分保存;4 年后 ALS 功能评分为 8 分,双手握力均为 0 kg。

3.2 脑脊液变化 移植治疗前以及移植治疗后患

者脑脊液压力、常规、生化指标均在正常范围内。

3.3 不良反应 患者每次移植治疗后均有双下肢肌张力增高,有时感肛门处发胀,细胞含量多时较为明显,持续 30 min~5 h 自动缓解。

4 讨论

骨髓有极强的再生能力,机体失去少量骨髓,短时间内就可以恢复到正常水平,反复采集对人体没有不良影响。但人体便于骨髓穿刺的部位有限,同一部位初次采集很容易,数次穿刺之后则很难抽出骨髓。这主要是因为穿刺破坏了骨髓的结构,纤维结缔组织增生替代血窦所致。因此不可能无限度的穿刺采集骨髓,反复进行细胞移植只能选择脐带血或其他方式。

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神经系统疾病^[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]。Martinez 等将自体 CD133(+)造血干细胞注射到患者额叶运动皮质区^[8],Deda 等将骨髓干细胞注射到患者脊髓前部^[9],均取得一定效果。干细胞移植和本研究的有核细胞移植有一个共同的特点,就是短期效果良好,远期效果逐渐衰减。这表明移植的干细胞没有转变成具有功能的神经细胞。理论上说,在患者体内原有的运动神经元不断变性坏死的环境中植入的干细胞,使之分化成运动神经元是不可能的。多数学者认为,干细胞的治疗作用可能是移植细胞释放各种神经营养因子对运动神经元产生营养支持或激活作用^[10]。本研究所采用的有核细胞既含有干细胞,也含有其他幼稚和成熟的细胞,释放具有神经营养作用的细胞因子的数量和种类肯定多于纯粹的干细胞。

本例患者有核细胞存在于骨髓不能阻止病情进展,移植进脑脊液中则能使病情有所缓解,这说明骨髓有核细胞中含有不能够透过血脑屏障的治疗 ALS 的有效成分,推测血-脑屏障对某些物质的转运功能障碍可能是运动神经元疾病的发病原因^[1,11]。本研究采用脐带血有核细胞反复移植治疗明显延缓了患者的病情进展,提示脐带血有核细胞和骨髓有核细胞可能含有相同的有效成分。但每次移植后病情仅能维持一段时间,随后继续加重,说明这些有效成分数量的衰减,移植间隔时间超过 1 次治疗的有效期限,病情起伏就不可避免。如果缩短每次移植的时

间间隔,有可能维持病情长时间的稳定。另外,有效成分究竟是什么,有待进一步研究。

移植治疗后短暂的双下肢肌张力增高、肛门处发胀,可能是细胞悬液对神经根的刺激所致。本例患者经过 53 次细胞移植未出现明显不良反应,无 ALS 之外的神经损伤,脑脊液压力、常规和生化一直保持在正常范围内,表明有核细胞蛛网膜下腔移植治疗是安全的。

[参考文献]

- [1] Mitchell J D, Borasio G D. Amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Lancet*, 2007, 369(9578): 2031.
- [2] 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.
- [3] 赖福生,卢少军,王一芳,等. 脐带血有核细胞移植治疗肌萎缩侧索硬化的临床研究[J]. *东南国防医药*, 2010, 12(6): 515.
- [4] Brooks B R, Miller R G, Swash M, et al. Ei Escorial revisited; revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Amyotroph Lateral Scier Other Motor Neuron Disord*, 2000, 1(5): 293.
- [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 S U, de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological disease: A review [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(10): 2183.
- [7] Hwang D H, Lee H J, Park I H, et al. Intrathecal transplantation of human neural stem cells overexpressing VEGF provide behavioral improvement, disease onset delay and survival extension in transgenic ALS mice [J]. *Gene Ther*, 2009 16(10): 1234.
- [8] Martinez H R, Gonzalez-Garza M T, Moreno-Cuevas, et al. Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(1): 26.
- [9] Deda H, Inci M C, Kurekei A E, 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.
- [10] Lunn J S, Hefferan M P, 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.
- [11] 赖福生. 血-脑屏障与神经变性疾病 [J]. *临床神经病学杂志*, 2004, 17(5): 392.

[责任编辑 何伟]