脐带间充质干细胞移植对脑瘫患儿运动功能的影响*

杨华强^{1,2} 张荣环^{3△} 杜玲¹ 李东升¹ 袁雅红¹ 刘瑜^{2△}

(1 湖北医药学院附属太和医院 细胞治疗中心 湖北 十堰 442000 2 湖北医药学院附属太和医院 血液科 湖北 十堰 442000 ;
3 湖北省十堰市妇幼保健院 妇保科 湖北 十堰 442000)

摘要 目的 探讨脐带间充质干细胞移植治疗对脑瘫患儿运动功能的影响及其应用价值。方法 25 例脑瘫患者给予脐带间充质干细胞移植治疗 移植方法采用静脉输注联合腰穿鞘内注射的方法。移植术前及移植术后定期采用粗大运动评估量表(Gross Motor Function Measure, GMFM)及 Berg 平衡量表(Berg Balance Scale, BBS)对运动功能的改善情况进行评估并进行综合分析。结果 移植术后 6 月 25 例脑瘫患儿中有 22 例患者主观上运动功能较前有明显好转,客观上 25 例患者 GMFM 与 BBS 与术前比较有明显改善($P < 0.05$) 随访 6 月未发现与移植相关的副作用。结论 脐带间充质干细胞移植是一种安全有效的治疗方法,可在一定程度上改善脑瘫患者的后遗症,提高脑瘫患者的运动功能和生活质量。

关键词 脑瘫 治疗 移植 脐带间充质干细胞

中图分类号: R742.6 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)02-250-03

Effect of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation Therapy for Cerebral Palsy on Motor Function *

YANG Hua-qiang^{1,2}, ZHANG Rong-huan^{3△}, DU Ling¹, LI Dong-sheng¹, YUAN Ya-hong¹, LIU Yu^{2△}

(1 Center of Cell Therapy, Taihe Hospital, Hu Bei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, P.R. China;

2 Department of Hematology, Taihe Hospital, Hu Bei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, P.R. China;

3 Department of women's health, Maternal and Child Health Hospital, Shiyan, Hubei 442000, P.R. China)

ABSTRACT Objective: To observe the effect and application value of umbilical cord mesenchymal stem cells (UC-MSC) transplantation therapy for cerebral palsy (CP) on motor function. **Methods:** Twenty-five patients with CP were received UC-MSC transplantation by intravenous infusion and lumbar puncture intrathecal injections. All patients were followed up for more than six months after transplantation. The changes of motor function were comprehensive analysis by Gross Motor Function Measure (GMFM) and Berg Balance Scale(BBS) before treatment and post-treatment regularly. **Results:** After six months of transplantation, 22 of 25 cases with CP subjectively had improvement in motor function compared with prior treatment. All patients objectively had improvement in scores of GMFM and BBS post-treatment than pretherapy. Various biochemical indicators were normal and the patient had no severe complications and clear side effects after transplantation. All patients' condition was continuously catabatic and no recurrence was found after six months was followed up. **Conclusions:** The UC-MSC transplantation can ameliorate sequelae and improve motor function and quality of life of CP. It is convenient, safe and effective in the treatment of CP.

Key words: Cerebral palsy; Treatment; Transplantation; Umbilical cord blood mesenchymal stem cells

Chinese Library Classification: R742.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)02-250-03

前言

小儿脑性瘫痪(cerebral palsy, CP)是因脑功能障碍引起的以运动功能障碍及姿势异常为主体的一组症候群。在我国本病患病率为 0.2~0.4 左右,目前本病没有特效治疗方法,以康复治疗为主,但疗效不确切。我院自 2008 年 12 月至 2010 年 12 月使用脐带间充质干细胞(UC-MSC)治疗 25 例脑瘫患者,取得了较好效果,现报告如下。

1 资料和方法

1.1 病例资料

25 例脑瘫患儿均为我院 2008 年 12 月至 2010 年 12 月儿科住院患者,其诊断标准参照 1988 年全国小儿脑瘫会议制定的诊断与分型标准进行诊断,其中男 18 例,女 7 例,年龄 1~12 岁,平均(7.5±3.4)岁。25 例患者当中痉挛型 15 例、强直型 3 例、手足徐动型 2 例、共济失调型 1 例、迟缓型 2 例、混合型 2 例。所有患者入院以后均经过营养神经、活化脑细胞、康复及支持对症治疗但症状无明显改善而采用 UC-MSC 移植治疗。UC-MSC 移植治疗均经医院伦理委员会批准、在上级卫生行政主管部门备案并且在患者知情同意情况下进行。

* 基金项目 湖北省教育厅基金资助项目(B20092404)

作者简介 杨华强(1973-) 男,硕士,副主任医师,副教授,主要从事干细胞基础和临床应用研究

△通讯作者 张荣环、刘瑜 E-mail:yanghuaqiang2004@126.com telephone:13986871847

(收稿日期 2011-06-29 接受日期 2011-07-23)

1.2 脐带间充质干细胞制备及移植方法

取足月妊娠剖宫产健康胎儿的脐带,以 PBS 充分冲洗,剔除脐动、静脉,剩余的间质组织切割成直径约 1~2mm 大小的组织块,置 DMEM 培养液(含 10%胎牛血清、25mM 谷氨酰胺、100U/ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素)中,于含有 5%CO₂、37℃ 饱和湿度培养箱中培养,细胞达 80%汇合后,以 0.2%的胰酶/EDTA 消化并按 1:3 的比例传代。收集第 3 代细胞,细胞总数为 (2~6) $\times$ 10⁷。流式细胞仪检测细胞表型并确定为脐带间充质干细胞。移植前由患者签署干细胞知情同意书。间充质干细胞治疗次数:4~6 次为 1 疗程,每次间隔 1 周,治疗途径采用静脉输注联合腰穿鞘内注射干细胞的方法,腰穿术后去枕平卧 6~8 小时,24 小时内严密观察患者生命体征的变化。

1.3 临床检查和评价方法

1.3.1 治疗前后所行检查 所有患者治疗前均常规行血液 HIV-DNA 抗体、梅毒抗体、肝炎标志物(甲、乙、丙、丁、戊 IgM 抗体)、Torch 5 项检查。干细胞治疗前及结束后测定免疫球蛋白(IgA、IgG、IgM)、补体 C3、补体 C4、T 细胞亚群,肝肾功能、血脂、血糖、电解质、血清酶学(方法均按试剂盒要求进行),血尿常规检查。所有患者治疗前后均经过全面的临床评价,均记录详细的登记表。

1.3.2 疗效观察 移植术后定期随访,采用当前国际上通用的残疾评价方法——粗大运动评估量表(Gross Motor Function Measure,GMFM)及 Berg 平衡量表(Berg Balance Scale,BBS)对运动功能的改善情况进行评估并进行综合分析。

GMFM 是粗大运动功能评估方法和诊断标准采用评价,共 88 项运动指标,顺序分为 5 个功能区: a 区:仰卧位与翻身(17 项) b 区:坐位(20 项) c 区:爬和跪(14 项) d 区:站与立(13 项) e 区:走、跑、跳(24 项)。卧位与翻身能区总分为 51 分、坐位能区总分为 60 分、爬与跪能区总分为 42 分、站立位能

区总分为 39 分、行走与跑跳能区总分为 72 分。每一项指标根据完成程度评分,完全不能做为 0 分,完成动作 <10%为 1 分;10%~99%为 2 分,99%以上为 3 分。最后评分结果取两项: (1) 功能区得分 = 每一功能区得分之和 / 最大评分数 $\times$ 100 (2) 总分 = 每一功能区得分相加 / 检查功能区总数。

Berg 平衡量表是平衡运动功能的评估方法,测试时选择了 14 个动作对被测试者进行评定,每个动作又依据被测试者的完成质量分为 0~4 分五个级别予以记分,最高分 56 分,最低分 0 分,评分越低,表示平衡功能障碍越严重。0~20 分,限制轮椅;21~40 分,辅助下步行;<40 分,有摔倒的危险;41~56 分,完全独立。

1.4 统计学处理

运用 SPSS 11.5 统计软件包进行配对样本 t 检验。

2 结果

25 例脑瘫患儿 22 例(痉挛型 14 例、强直型 3 例、手足徐动型 1 例、共济失调型 1 例、迟缓型 2 例、混合型 1 例)患儿在治疗后 6 月主观上运动功能较前明显改善,具体表现为痉挛型和强直型患者行走时步态较前平稳、四肢肌张力较前明显降低,牵张反射也较前明显好转;手足徐动型患者表现为四肢、躯干或颜面舞蹈样和徐动样的不随意运动较前明显减少;共济失调型患者表现为步态和平衡功能较前明显好转,迟缓型患者表现为躯干和四肢肌张力较前明显增强,随意和不随意运动较前增多等。随访 6 月所有患者 GMFM 与 BSS 与术前比较有明显改善,差异具有显著性 ($P < 0.05$),详见表 1。所有患者 UC-MSc 移植后血液分析、免疫功能及各项生化指标均未发生明显异常,腰穿术后 3 例患者发生轻微低颅压头痛,经平卧休息、补液及对症治疗后头痛缓解,余无不适感,无严重不良反应发生。

表 1 脐带间充质干细胞移植前后 GMFM 和 BSS 的变化情况

Table 1 The changes of GMFM and BSS in patients with CP between prior-treatment and post-treatment

Time	Scores of each domain of GMFM					Total GMFM scores	BSS
	a domain	b domain	c domain	d domain	e domain		
Priortreatment	32.12 $\pm$ 10.12	44.23 $\pm$ 11.12	20.13 $\pm$ 12.31	22.12 $\pm$ 10.14	50.12 $\pm$ 12.12	30.12 $\pm$ 6.12	36.18 $\pm$ 4.18
Posttreatment (six months)	35.14 $\pm$ 18.16 ^a	49.17 $\pm$ 10.15 ^a	28.15 $\pm$ 10.43 ^b	29.14 $\pm$ 8.12 ^b	55.13 $\pm$ 13.12 ^a	38.15 $\pm$ 8.14 ^a	40.22 $\pm$ 5.16 ^a

Note: Compared with the prior-treatment, a $P < 0.05$ b $P < 0.01$

3 讨论

脑性瘫痪(cerebral palsy, CP)是指婴儿出生前到出生后一个月内,由于各种原因导致的非进行性脑损害综合症,主要表现为先天性运动障碍及姿势异常,包括痉挛性双侧瘫、手足徐动等锥体系与锥体外系症状,可伴有不同程度的智力低下、语言障碍及癫痫发作等,其临床异质性非常明显,病情严重者可能会丧失运动和行走能力,给社会和家庭带来沉重的经济负担和精神负担^[1],由于本病的病理学改变可以表现为大脑的出血性或缺血性损害,显微镜下可见皮质各层次的神经细胞退行

性变、神经细胞数目减少、白质萎缩、部分中枢结构胶质细胞增生等结构异常,使这类疾病在临床上缺乏行之有效的治疗方法。目前该病的治疗主要是支持对症、物理疗法、康复治疗和手术治疗,以改善患者的临床症状为主,但不能完全治愈本病,正因为如此,此类疾病的难治性激发着科学家和临床医生不断探索与研究各种创新性治疗方法的热情,由此干细胞疗法在神经系统疾病中的治疗研究也应运而生^[2]。

间充质干细胞是一种来源于中胚层,具有多向分化潜能的一类干细胞,存在于人体骨髓、脂肪组织、新生儿的脐带、胎盘等组织中,研究证明间充质干细胞不仅具有向骨、软骨、脂肪及

成肌细胞分化的潜能,还具有向神经元分化的潜能。由于其具有获取方便、来源丰富、容易扩增、免疫原性低及多向分化潜能等优点,使得间充质干细胞广泛应用于心血管系统疾病、神经系统疾病、骨骼肌肉相关疾病、肝病、糖尿病等多种疾病的临床试验中,并且取得初步疗效,展示了其广泛的临床应用前景^[3,4]。王梦洪等^[5]评价不同时机骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植治疗急性心肌梗死(AMI)的疗效,结果表明AMI急诊介入术后行BMSCs移植可以显著提高左室射血分数和明显降低心肌灌注缺损,此外该研究还表明AMI后前3周行BMSCs移植比较理想,并且该治疗方法在临床上是安全的。崔桂祥等^[6]观察BMSCs移植治疗脊髓损伤、脑外伤、Parkinson's病和多发性硬化的临床疗效和不良反应,结果表明BMSCs移植治疗这些神经系统疾病近期疗效明显,不良反应较少。杨晓凤等^[7]采用骨髓和脐血间充质干细胞联合移植治疗进行性肌营养不良82例,观察干细胞联合移植对肌力的影响,结果82.9%的患者获得临床症状改善,运动功能及肌力提高。柳林等^[8]经肝动脉途径移植自体脂肪间充质干细胞治疗晚期肝病,测定移植前及移植后2、4、8周治疗组与对照组ALT、TBIL、ALB、PTA指标的变化,评价自体脂肪间充质干细胞介入移植对晚期肝病的临床疗效,结果表明经肝动脉途径移植自体脂肪间充质干细胞治疗晚期肝病短期疗效确切。陈兵等^[9]用体外扩增的自体BMSCs移植治疗糖尿病足40例,结果表明移植后1个月患者肢体疼痛、冷感、间歇性跛行均有所改善,踝肱指数明显升高,双下肢血管显像血流灌注有所增加,与常规治疗组比较差异均有显著性意义。

本文报道的25例脑瘫患者经常规治疗临床症状无明显改善而采用UC-MSC移植治疗,4~6次为一疗程,移植途径采用静脉输注加鞘内注射的方法,治疗后22例患者的运动功能主观上明显改善,GMFM和BSS也较治疗前有明显好转,并且随访半年余症状持续缓解无复发,说明该治疗方法近期有效。结合国内外学者的动物实验和临床研究结果,我们分析间充质干细胞治疗脑瘫的可能机制是:①移植的间充质干细胞可以自我分辨并迁移到损伤的神经部位,通过细胞替代作用更换机体已经死亡或受损的神经细胞,修复受损神经网络;②中枢神经系统(包括脑和脊髓)损伤后,损伤中心周边的大量神经细胞虽然健存,但受到损伤的影响,转入休眠或功能抑制状态。移植的干细胞可以分泌大量神经营养因子,激活这些神经细胞,从而改善机体的神经功能^[6,10-12]。干细胞和再生医学是目前医学研究热点,本文25例患者采用UC-MSC移植治疗获得了较好效果,提示我们可以在立足于基础研究,经过认真严格的预实验,进行大量谨慎、安全地选择病种的基础上,对于传统治疗方法疗效不好的神经系统疑难疾病我们可以在力所能及的范围内进行一些主动尝试,利用间充质干细胞在再生医学中的治疗技术,让那些绝望的患者和家属看到希望和光明。本文由于病例数量有限和随访时间较短,其远期疗效及副作用还需要进一步观察。

参考文献(References)

[1] 张冰清,黄红云. 细胞移植治疗小儿脑性瘫痪[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(53): 10596-10600

Zhang Bing-qing, Huang Hong-yun. Cell transplantation for child cerebral palsy [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2008, 12(53):10596- 10600(In Chinese)

[2] Kim SU, de Vellis J. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(10):2183-2200

[3] Harris DT. Non-haematological uses of cord blood stem cells [J]. Br J Haematol, 2009, 147(2):177-184

[4] 许怡薇,冯凯,石炳毅. 干细胞在再生医学领域的临床应用现状及其前景[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(36):7163-7166
Xu Yi-wei, Feng Kai, Shi Bin-yi. Clinical application and prospect of stem cells in the field of regeneration medicine[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13(36):7163-7166 (In Chinese)

[5] 王梦洪,付勇南,郑泽琪,等. 自体骨髓间充质干细胞移植治疗心肌梗死的时机选择[J]. 临床心血管病杂志, 2009, 25(4): 263-265
Wang Meng-hong, Fu Yong-nan, Zheng Zhe-qi, et al. Optimal time for autologous bone marrow mesenchymal stem cells transfer in patients with myocardial infarction [J]. J Clin Cardiol, 2009, 25(4) : 263-265 (In Chinese)

[6] 崔贵祥,李义召,高华,等. 自体骨髓间充质干细胞治疗神经系统疾病初步研究[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(3) : 242-245
Cui Gui-xiang, Li Yi-zao, Gao Hua, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with diseases of nervous system [J]. Chin J Rehabil Theory Practice, 2006, 12(3) : 242-245 (In Chinese)

[7] 杨晓凤,许忆峰,张轶斌,等. 骨髓和脐血间充质干细胞改善肌营养不良患者肌力的临床观察 [J]. 中华医学杂志, 2009, 89(36): 2552-2556
Yang Xiao-feng, Xu Yi-feng, Zhang Yi-bin, et al. Functional improvement of patients with progressive muscular dystrophy by bone marrow and umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation[J]. Natl Med J China, 2009, 89(36):2552-2556 (In Chinese)

[8] 柳林,杨海山,孙昱,等. 自体脂肪间充质干细胞对晚期肝病影响的初步临床研究[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(4) : 473-476
Liu Lin, Yang Hai-shan, Sun Yi, et al. The initial clinical research of self adipose- desmohemoblast stem cells transplanted on advanced hepatopathy[J]. Chin J Lab Diagn, 2007, 11(4) : 473-476 (In Chinese)

[9] 陈兵,陆德宾,梁自文,等. 自体骨髓间充质干细胞体外扩增后移植治疗糖尿病足 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(32): 6227-6230
Chen Bin, Lu De-bin, Liang Zi-wen, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of diabetic foot following amplification in vitro [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13(32): 6227- 6230 (In Chinese)

[10] Yamasaki TR, Blurton-Jones M, Morrisette DA, et al. Neural stem cells improve memory in an inducible mouse model of neuronal loss [J]. J Neurosci, 2007, 27(44):11925-11933

[11] Pueyo R, Junqué C, Vendrell P, et al. Neuropsychologic impairment in bilateral cerebral palsy[J]. Pediatr Neurol, 2009, 40(1):19-26

[12] Leu S, Lin YC, Yuen CM, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats[J]. J Transl Med, 2010, 8(1):63-67