

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.035

脐带间充质干细胞辅助治疗糖皮质激素耐药的慢性移植抗宿主病 5 例并文献复习

杨华强^{1,2} 李红^{1△} 胡明均¹ 李玉玲¹ 覃骏¹ 鲍红霞¹ 吕晓娟¹

(1 湖北医药学院附属十堰市人民医院血液科 湖北 十堰 442000; 2 湖北医药学院附属太和医院细胞治疗中心 湖北 十堰 442000)

摘要 目的:探讨脐带间充质干细胞输注治疗糖皮质激素耐药的慢性移植抗宿主病的疗效和安全性。**方法:**5 例糖皮质激素耐药的慢性移植抗宿主病患者在原有免疫抑制剂治疗基础上联合脐带间充质干细胞治疗, 2~4 次为 1 个疗程, 每次间隔 1 周。对患者进行定期随访观察其治疗效果、移植相关死亡、输注相关不良事件和复发率。**结果:**5 例患者接受脐带间充质干细胞输注后 2 例获得完全缓解(CR), 2 例获得部分缓解(PR), 1 例患者死亡。2 例 CR 患者分别在脐带间充质干细胞治疗 368、452d 后停用免疫抑制剂, 随访 1~1.5 年慢性移植抗宿主病无复发; 2 例 PR 患者在脐带间充质干细胞治疗 84、96d 后开始进入免疫抑制剂减量阶段, 目前病情仍稳定并存活。1 例患者死于原发病无复发性肺部严重感染。治疗过程中及治疗后未观察到与治疗有关的副作用。新鲜制备脐带间充质干细胞的细胞活力(92%~95%)高于液氮冻存 37℃ 水浴复苏细胞活力(72%~76%)。**结论:**脐带间充质干细胞辅助治疗可以改善糖皮质激素耐药的慢性移植抗宿主病的临床症状且不增加恶性血液病复发率, 新鲜制备间充质干细胞活性高于液氮冻存复苏细胞。

关键词: 干细胞移植; 移植抗宿主病; 脐带间充质干细胞

中图分类号: R733 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)11-2139-03

Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of 5 cases of Steroid-resistant Chronic Graft-versus-host Disease and Literature Review

YANG Hua-qiang^{1,2}, LI Hong^{1△}, HU Ming-jun¹, LI Yu-ling¹, QIN Jun¹, BAO Hong-xia¹, LV Xiao-juan¹

(1 Department of Hematology, Shiyan Renming Hospital, Hubei Medical College, Shiyan, Hubei, 442000, China;

2 Center of Cell Therapy, Taihe Hospital, Hu Bei Medical College, Shiyan, Hubei, 442000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the clinical effect and safety of UC-MSC(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSC) transplantation in the treatment of conventional therapy-resistant chronic graft-versus-host disease (GVHD). **Methods:** Five patients with steroid-resistant chronic GVHD were received UC-MSC transplantation (2~4 times as a course of treatment which every time interval one week) with total cellular number of UC-MSC was $5 \sim 7 \times 10^7$ by intravenous infusion. All patients were followed up regularly after transplantation. The treatment response, transplantation-related mortality, events associated with infusion and relapse rate were analyzed and literature review was performed. **Results:** After transplantation, the clinical symptoms of all patients were obviously improved. Among 5 patients, 2 patients had complete response(CR), 2 showed partial response(PR) and 1 died. 2 CR patients discontinued all of the immunosuppressive agents on 368 to 452 days after the UC-MSC infusion and without relapse after followed up 1 to 1.5 years. 2 PR patients decrement all immunosuppressive agents after 84 to 96 days and now the patient's condition of the two patients is stable and both patients are alive. All patients had no severe complications and clear side effects during and after transplantation. The cell viability of freshly prepared UC-MSC is higher (92-95%) by trypan blue staining than the cell viability of programmatically frozen and thawed UC-MSC (72-76%). **Conclusion:** Infusion of UC-MSC expanded in vitro was an effective therapy for patients with steroid-resistant chronic GVHD without negative impact on relapse. Freshly prepared UC-MSC are superior to frozen and thawed cells in terms of cell viability.

Key words: Stem cell transplantation; Graft-versus-host disease; Umbilical cord mesenchymal stem cells

Chinese Library Classification(CLC): R733 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2139-03

前言

异基因干细胞移植(allo-HSCT)现已广泛应用于恶性血液病及某些实体瘤的治疗, 但慢性移植抗宿主病(cGVHD)仍是 allo-HSCT 后晚期非复发性致死的最主要原因, 严重影响移植后疗效及存活患者的生活质量。目前, cGVHD 治疗主要是糖皮

质激素及其他免疫抑制剂联合应用, 但据报道该治疗仅对约一半的患者有效。本研究中, 5 例激素耐药性 cGVHD 患者在原有治疗基础上联合脐带间充质干细胞(UC-MSC)应用取得了较好的疗效, 现报道如下。

1 临床资料

1.1 病例资料

5 例均为我院 2009 年 12 月至 2011 年 12 月行 allo-HSCT 后发生 cGVHD 患者, 其中男 4 例, 女 1 例, 中位年龄 30(20~40)岁。原发病包括: 慢性粒细胞白血病(CML)1 例、急性粒细胞白血病(AML)1 例、急性淋巴细胞白血病(ALL)1 例、急性双表型

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: 李红, E-mail: yanghuaqiang2004@126.com, 电话: 13986871847

(收稿日期: 2013-10-29 接受日期: 2013-11-25)

白血病(AUL)1例、非霍奇金淋巴瘤(NHL)1例。供受者 HLA 基因位点完全相合 3 例、1 个基因位点不相合 1 例、2 个基因位点不相合 1 例。3 例为血缘相关同胞供者、1 例为母亲供者、1 例为血缘非相关供者。4 例接受外周血干细胞移植(PBSCT)、1 例行骨髓移植。3 例采用全身化疗(TBI)+ 环磷酰胺(Cy)、2 例采用马利兰 + 环磷酰胺(BuCy)预处理方案。3 例 cGVHD 患者由急性 GVHD(aGVHD)迁移发展至 cGVHD,另 2 例 cGVHD 发生中位时间为 123(121~145)d。

1.2 GVHD 的预防及 cGVHD 的诊断

HLA 全相合相关移植采用标准的环孢素 A(CsA)+ 短程甲氨蝶呤(MTX)方案,其中 1 例移植前原发病仍未缓解的单用 CsA。HLA 不全相合相关及无关移植采用 CsA+MTX+ 抗淋巴细胞球蛋白(ATG)或霉酚酸酯(MMF)方案。5 例 allo-HSCT 后均发生 aGVHD,接受以激素为基础的免疫抑制剂治疗后,3 例达到完全缓解 (CR) 后出现 cGVHD、2 例由 aGVHD 迁延为 cGVHD。按照 cGVHD 诊断标准,5 例均为广泛型。根据 2006 年分级标准:中度 3 例,重度 2 例。3 例采用 CsA+MMF+ 甲基泼尼松 (MP) 或 6-MP “三联”治疗,2 例采用 MP+MMF+FK506+6-MP“四联”治疗。cGVHD 治疗中位时间 16.5(8~24)个月。

1.3 激素耐药性 cGVHD 的诊断标准及疗效判断标准

根据参考文献^[1-3],当具有以下特征之一时提示患者可能对激素治疗耐药:(1)激素治疗 1 个月以后疾病才趋稳定;(2)应用激素治疗后 2 个月未见部分缓解;(3) 激素治疗 1~2 周后疾病仍持续进展。本组 5 例均接受以激素为基础的三联或以上方案治疗中位时间 16.5 个月,症状及体征仍无改善。

疗效判断标准:完全缓解(CR):cGVHD 症状及体征消失;部分缓解 (PR):1 个或多个受累器官临床症状及相关指标明显改善 > 50%, 并且其他器官症状无加重; 疾病稳定(SD):cGVHD 症状及体征无改变;疾病进展(PD):治疗期间 cGVHD 症状进行性加重。

1.4 UC-MSc 的来源、扩增及鉴定

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,置无血清的临床级 DMEM 培养液中,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 (5~7)× 10⁷,流式细胞仪检测细胞表型并确定为 UC-MSc。

1.6 UC-MSc 治疗

移植前由患者签署干细胞治疗知情同意书,并且该治疗征得医院伦理委员会的批准。5 例 cGVHD 患者均在原有免疫抑制剂治疗的基础上接受 UC-MSc 治疗,首次应用 UC-MSc 至诊断 cGVHD 的中位时间为 185(120~298)d。UC-MSc 治疗次数:2~4 次为 1 疗程,每次间隔 1 周,治疗途径采用静脉输注的方法,24 小时内严密观察患者生命体征的变化。

2 结果

5 例患者接受 UC-MSc 输注后 2 例获得完全缓解(CR)、2 例获得部分缓解 (PR),1 例患者死亡。2 例 CR 患者分别在 UC-MSc 治疗 368、452d 后停用免疫抑制剂,随访 1~1.5 年慢性移植物抗宿主病无复发;2 例 PR 患者在 UC-MSc 治疗 84、96d 后开始进入免疫抑制剂减量阶段,目前病情仍稳定并存

活。1 例患者死于原发病无复发性肺部严重感染。治疗过程中及治疗后未观察到与治疗有关的副作用。新鲜制备 UC-MSc 的细胞活力(92~95%)高于液氮冻存 37℃ 水浴复苏细胞活力(72~76%)。

3 讨论

急、慢性移植物抗宿主病(GVHD)是 allo-HSCT 术后的主要并发症,是移植相关死亡的重要原因。对于激素耐药的重度 GVHD 患者,目前仍缺乏安全有效的治疗手段,患者的长期生存率不足 10%,国际上也缺乏统一的治疗规范,迫切需要寻找新的治疗方式来解决这一制约 allo-HSCT 的瓶颈问题。

间充质干细胞(MSC)是具有自我更新和多向分化潜能,能生成脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞、神经细胞和成肌细胞的非造血成体干细胞。研究证实,MSC 不仅能通过分泌众多细胞因子,改善造血微环境,促进移植后造血功能的重建,而且具有低免疫原性和免疫调节的特性,可以避免和减轻宿主免疫应答,诱导特异性免疫耐受的形成^[4-8]。包晓晨等^[9]建立以 C57BL/6 小鼠为供体、致死剂量照射的 BALB/c 小鼠为受体的急性移植物抗宿主病(acutegraft-versus-host disease, aGVHD)动物模型,观测小鼠骨髓间充质干细胞(MSC)对 aGVHD 的预防及治疗作用,并探讨其干预机制。结果表明供体 MSC 可显著控制小鼠的 aGVHD 症状,延长 aGVHD 小鼠的平均生存时间;MSC 可明显减少 aGVHD 环境中 Th1 类炎症因子的分泌;绿色荧光蛋白基因(Ad-EGFP)成功高效转染 MSC,输注入 aGVHD 模型鼠 6 d 后,共聚焦显微镜下发现 MSC 可大量分布至肺及小肠,而肝脾及肾脏有少量分布。这个结果提示我们 MSC 可促进异基因 T 淋巴细胞凋亡、抑制其二次活化功能、减少 Th1 类炎症因子的分泌表达、参与修复 aGVHD 靶器官组织,可有效防治 aGVHD。吕璐璐等^[10]以脾淋巴细胞半相合移植建立小鼠 GVHD 模型,将人脐血 MSC 通过静脉途径输入 GVHD 小鼠,结果表明人脐血 MSC 可减轻小鼠 GVHD 的症状,延长 GVHD 小鼠存活时间。周虹等^[11]评价骨髓 MSC 治疗硬皮病样慢性移植物抗宿主病(ScGVHD)的有效性及其安全性,同时探讨取得疗效的免疫学机制,经过多次骨髓内输注骨髓 MSC 后,Th 细胞的比例发生了明显的变化,Th1 的比例上调,Th2 的比例相应的下调,从而使两者达到了新的平衡点。与之相应,患者的临床症状也逐渐好转。而且在骨髓 MSC 治疗的随访期内,患者的生命体征和实验室检查指标均未发现异常,也未出现白血病的复发,证明骨髓 MSC 对 ScGVHD 是有治疗效果的,为临床治疗 ScGVHD 开辟了新的方法,从而提高白血病患者骨髓移植的存活率。房伯俊等^[12]用脂肪源间充质干细胞 (adult adipose tissue-derived mesenchymal stem clls,AMSC) 治疗 3 例行 allo-HSCT 术后发生 aGVHD 患者,并探讨 AMSC 治疗 aGVHD 的分子机制,结果表明患者发生 aGVHD 时,有 TCR V133 及其他亚家族基因表达,输注 AMSC 后,GVHD 得以有效控制,V133 不表达;当患者 GVHD 复发时,Vβ3 基因又表达,治疗后不表达;与输注 AMSC 前相比,输注 AMSC 后,CD8⁺T 细胞中的 CD8⁺CD28⁻亚群显著上调(P<0.05),同时,患者的 aGVHD 得以有效控制。吴冠宇等^[13]采用无血清培养体系体外培养骨髓 MSC,将骨髓 MSC 与外周血造血干细胞共移植治疗 5 例恶性血液病,探讨自体骨髓 MSC 与外周血造血干细胞共移植治疗恶性血液病的安全性和疗效,5 例患者骨髓 MSC 经体外培养扩增后,与采集的自体外周血造血干细胞共同回输,WBC 和

Plt 低谷时间分别为 4~7d 和 4~9d, 造血重建 ($ANC \geq 0.5 \times 10^9/L$ 和 $Plt \geq 20 \times 10^9/L$) 时间分别为 8~11d (中位时间 9d) 和 7~10d (中位时间 8.3d)。除口腔、咽部轻度感染外, 无其他严重的移植相关并发症。张乐施等^[14]在原有免疫抑制剂基础上联合 MSC 治疗 12 例激素耐药性 cGVHD 患者, 并探讨 MSC 治疗糖皮质激素耐药性 cGVHD 的疗效及作用机制, 结果表明 12 例患者接受 MSC 输注后 3 例获得完全缓解 (CR), 6 例获得部分缓解 (PR), 总有效率为 75% (9/12)。

3 例 CR 患者在 MSC 治疗 471(372~731)d 后停用免疫抑制剂, 随访 129 (100~292)d cGVHD 无复发; 6 例 PR 患者在 MSC 治疗 64(60~79)d 后开始进入免疫抑制剂减量阶段, 目前除 1 例继发舌癌致死外, 其他患者应用小剂量免疫抑制剂维持治疗随访中位生存时间 1152(795-1914)d 病情仍稳定并存活。3 例无效患者中, 1 例疾病稳定患者目前仍需联合三种免疫抑制剂治疗, 另 2 例疾病进展患者分别于输注 MSC 8 个月及 10 个月死于白血病复发及肺脏 cGVHD。输注 MSC 后 12 例患者 CD4/CD8 比例及调节性 T 细胞均显著升高, B 细胞无明显改变。陈广华等^[15]用 UC-MSC 输注治疗 19 例糖皮质激素耐药的严重型 aGVHD 患者, 对患者进行随访观察治疗反应及副作用, 结果表明 11 例获得完全缓解, 4 例获得部分缓解, 4 例无效, 未观察到 UC-MSC 输注相关的不良反应。

本研究中, 5 例对糖皮质激素耐药的 cGVHD 患者接受 UC-MSC 输注后 2 例获得完全缓解 (CR), 2 例获得部分缓解 (PR), 1 例患者死亡。2 例 CR 患者分别在 UC-MSC 治疗 368、452d 后停用免疫抑制剂, 随访 1~1.5 年慢性移植抗宿主病无复发; 2 例 PR 患者在 UC-MSC 治疗 84、96d 后开始进入免疫抑制剂减量阶段, 目前病情仍稳定并存活。1 例患者死于原发病无复发性严重感染。治疗过程中及治疗后未观察到与治疗有关的副作用。这些结果表明采用 UC-MSC 辅助治疗对糖皮质激素耐药的 cGVHD 安全、有效。

综上所述, 体外培养扩增的人 UC-MSC 输注是糖皮质激素耐药的 cGVHD 的有效辅助治疗且不增加恶性血液病复发率, UC-MSC 可作为骨髓 MSC 的替代, 与冻存细胞相比新鲜制备 MSC 可以提高细胞活性而且避免 DMSO 的毒性, 值得临床推广应用。

参考文献 (References)

- [1] Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2005, 11 (12):945-956
- [2] Pavletic sZ, Martin P, Lee SJ, et al. Measuring therapeutic response in chronic graft-versus-host disease: National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: IV. Response Criteria Working Group report[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2006, 12(3):252-266
- [3] PeUegrino R, Viegi G, Bmsnsco V, et al. Interpretative strategies for lung function tests[J]. Eur Respir J, 2005, 26(5):948-968
- [4] Xu J, Wang D, Liu D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjogren syndrome[J]. Blood, 2012, 120(15):3142-3151
- [5] Dazzi F, Krampera M. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2011, 24(1):49-57
- [6] Scherer HU, van Pel M, Toes RE, et al. Mesenchymal stem cells in autoimmune diseases: hype or hope [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12 (3):126
- [7] Li ZY, Wang CQ, Lu G, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on hematopoietic recovery and acute graft-versus-host disease in murine allogeneic umbilical cord blood transplantation model[J]. Chin J Hematol, 2011, 32(11):786-789
- [8] Xu J, Wang D, Liu D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjogren syndrome[J]. Blood, 2012, 120(15):3142-3151
- [9] 包晓辰, 王健民, 章卫平, 等. 骨髓间充质干细胞对小鼠急性移植抗宿主病的预防及治疗作用 [J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(2): 108-113
Bao Xiao-Chen, Wang Jian-min, Zhang Wei-ping, et al. The role of marrow derived mesenchymal stem cells in the prevention and treatment of acute graft-versus-host in mice [J]. Chin J Hematol, 2010, 31(2):108-113
- [10] 吕璐璐, 宋永平, 魏旭东, 等. 人脐血间充质干细胞对小鼠移植抗宿主病治疗作用的研究[J]. 中华血液学杂志, 2008, 29(2):121-123
LV Lu-lu, Song Yong-ping, Wei Xu-dong, et al. The study of umbilical cord blood mesenchymal stem cells in the treatment of graft-versus-host disease in mice [J]. Chin J Hematol, 2008, 29(2): 121-123
- [11] 周虹, 郭梅, 孙琪云, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗硬皮病样慢性移植抗宿主病: 4 例免疫机制变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1885-1891
Zhou Hong, Guo Mei, Sun Qi-yun, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells transplantation for the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: Immunologic mechanism changes in 4 cases[J]. Chinese Journal of Tissue Tissue Engineering Research, 2010, 14(10):1885-1891
- [12] 房佰俊, 宋永平, 李宁, 等. 脂肪源间充质干细胞治疗 aGVHD 分子机制的初步研究[J]. 生物医学工程与临床, 2008, 12(4): 290-294
Fang Bai-jun, Song Yong-ping, Li Ning, et al. Study on the molecular mechanism of treatment with adult adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in acute graft-versus-host disease [J]. BME & Clin Med, 2008, 12(4):290-294
- [13] 吴冠宇, 李建勇, 郑敏, 等. 自体骨髓间充质干细胞联合外周血造血干细胞移植治疗恶性血液病 [J]. 中华全科医学, 2008, 6(8): 816-817
Wu Guan-yu, Li Jian-yong, Zheng Min, et al. Autologous bone marrow mensenchymal stem cells and peripheral blood stem cells transplantation for patients with hematologic malignancies [J]. Chinese Journal of General Practice, 2008, 6(8):816-817
- [14] 张乐施, 刘启发, 黄科, 等. 间充质干细胞治疗糖皮质激素耐药性慢性移植抗宿主病临床疗效观察 [J]. 中华内科杂志, 2009, 48 (7):542-546
Zhang Le-shi, Liu Qi-fa, Huang Ke, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant chronic graft-versus-host disease [J]. Chin J Intern Med, 2009, 48(7):542-546
- [15] 陈广华, 杨婷, 田璇, 等. 脐带间充质干细胞治疗糖皮质激素耐药的严重型急性移植抗宿主病 19 例分析 [J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(4):303-306
Chen Guang-hua, Yang Ting, Tian Hong, et al. Clinical study of umbilical cord derived mesenchymal stem cells for treatment of nineteen patients with steroid resistant severe acute graft-versus-host disease[J]. Chin J Hematol, 2012, 33(4):303-306