

· 论 著 ·

脐带间充质干细胞联合 HLA 单倍型相合造血干细胞治疗 重型再生障碍性贫血的临床观察*

李云龙, 高 蕾[#], 陈幸华, 张 诚, 高 力, 龚 奕, 刘焕凤, 刘 学, 张 曦[△]
(第三军医大学新桥医院血液科, 重庆 400007)

摘要:目的 观察人脐带间充质干细胞(HUC-MSC)在联合人类白细胞抗原(HLA)单倍型相合移植治疗重型再生障碍性贫血的疗效和安全性。方法 对 8 例重型再生障碍性贫血患者进行 HUC-MSC 联合 HLA 单倍型相合移植治疗, 观察移植疗效及相关并发症。结果 所有患者均重建供者造血, 中性粒细胞大于 $0.5 \times 10^9/L$ 和血小板大于 $20 \times 10^9/L$ 的恢复中位时间分别为 12.1 d 和 15.2 d。8 例患者均出现粒细胞缺乏症伴感染, 1 例(12.5%)发生急性移植物抗宿主病(aGVHD), 予甲泼尼松龙和布地奈德后治疗控制。巨细胞病毒(CMV)感染 1 例, 无 1 例发生肝静脉闭塞病(VOD)。结论 HUC-MSC 联合 HLA 单倍型相合移植治疗重型再生障碍性贫血安全有效, 可加快造血重建。

关键词: 贫血, 再生障碍性; 人脐带间充质干细胞; 联合; 单倍型

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.30.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)30-3032-02

Observation of transplantation of combined human umbilical cord derived mesenchymal stem cells and HLA haploidentical hematopoietic stem cells for aplastic anemia*

Li Yunlong, Gao Lei[#], Chen Xinghua, Zhang Cheng, Gao Li, Gong Yi, Liu Huanfeng, Liu Xue, Zhang Xi[△]
(Hematology Department, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the efficacy and safety of transplantation of combined human umbilical cord derived mesenchymal stem cells and HLA haploidentical hematopoietic stem cells for aplastic anemia. **Methods** Eight patients with AA were carried out and treated with transplantation of combined human umbilical cord derived mesenchymal stem cells and HLA haploidentical hematopoietic stem cells, and the efficacy and correlated complication were observed. **Results** When the neutrophils count and platelet count in patients respectively reached more than $0.5 \times 10^9/L$ and $20 \times 10^9/L$, the median time were 12.1 days and 15.2 days after transplantation respectively. 8 patients occurred agranulocytosis, and Acute GVHD developed in one case(12.5%) was finally controlled by Methylprednisolone and budesonide. One case occurred CMV infection, while there was no VOD in all 8 cases. **Conclusion** The transplantation of combined human umbilical cord derived mesenchymal stem cells and HLA haploidentical hematopoietic stem cells for aplastic anemia was effective, and can promote the function recovery of hematopoietic cells.

Key words: anemia, aplastic; human umbilical cord derived mesenchymal stem cells; combined; partially mismatched peripheral blood stem cell

重型再生障碍性贫血发病急、病情重、进展快, 死亡率较高, 免疫抑制治疗存在疗效差、复发率较高及继发克隆性疾病等风险, 而人类白细胞抗原(HLA)全相合移植仍是目前治疗重型再生障碍性贫血的优先选择, 但由于干细胞来源等多种条件的限制, 严重制约了异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)在临床上的应用。亲缘间 HLA 单倍型相合有效地解决了供者来源问题, 但由于相关移植并发症和造血重建困难等原因, 使其应用受到了很大局限。人脐带间充质干细胞(HUC-MSC)具有低免疫原、免疫调控等特点, 使其对造血支持、促进干细胞植入、对抗移植物抗宿主起到了一定的作用。本文通过第三方细胞-HUC-MSC 联合输注, 观察造血重建时间、移植物抗宿主病(GVHD)的发生、巨细胞病毒(CMV)感染等, 评价其疗效和安全性, 以及在移植中可能发挥的作用。

1 资料与方法

1.1 病例选择 共收集本科从 2009 年 9 月至 2010 年 9 月重型再生障碍性贫血患者 8 例, 年龄 19~45 岁, 中位年龄 29 岁, 男 3 例, 女 5 例。所有患者均接受血常规、网织红细胞计数、骨髓细胞形态学、骨髓活检、荧光原位杂交(FISH)和流式细胞检查, 并除外其他能引起全血细胞减少的疾病^[1]。诊断和分型标

准按张之南《血液病诊断和疗效标准》。

1.2 预处理方案 所有患者均采用氟达拉滨(Flu)+环磷酰胺(CTX)+抗胸腺细胞球蛋白(ATG, 德国 FreseniusAG 公司)治疗, Flu 30 mg/m^2 用 5 d, CTX 45 mg/kg 用 2 d, ATG: 5 mg/kg 用 4 d。预处理: Flu 30 mg/mL 移植前 6 d 至前 2 d 静脉滴注; CTX 45 mg/kg 移植前 6 d 至移植前 5 d 静脉滴注; ATG(德国) $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 移植前 5 d 至移植前 3 d 静脉滴注。

1.3 造血干细胞动员、采集和输注 采用重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF) $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 进行造血干细胞动员 4 d, 在第 5 天采集外周血造血干细胞, 第 6 天在持续硬膜外麻醉或腰麻下行双侧髂前、髂后行动员后的骨髓干细胞采集术, 分别进行单个核细胞(MNC)、CD34⁺计数, 达到有效数量后即通过中心静脉导管回输患者体内, 特殊情况如 ABO 血型主、次侧不合等给予相应处理后(如去除红细胞和血浆等)再回输。

1.4 人脐带间充质干细胞输注 本观察所使用人脐带间充质干细胞由四川新生命干细胞科技有限公司提供, 数量 3×10^7 个(约 100 mL), 在征得医院伦理委员会的同意及患者、家属签署书面同意后, 于移植 01 天在输注外周血干细胞前 4 h 通

过输血器由中心静脉导管输注。

1.5 移植并发症的防治

1.5.1 GVHD 预防 所有患者均采用联合预防方案。环孢素 A(ciclosporin, CsA) 从移植前 7 d 开始输注, $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 至移植前 1 d 开始加至 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 造血重建后肠胃功能恢复正常时改为口服, 移植后 180 d 开始减量, 至移植后 1 年停药; 吗替麦考芬酯 (MMF) 从移植前 7 d 开始口服, 500 mg/d , 至移植后 90 d 停药; 甲氨蝶呤 (MTX), 在移植后 1 d 以 15 mg/m^2 静脉注射, 在移植后 3、6、11 d 以 10 mg/m^2 静脉注射。

1.5.2 CMV 防治 移植前 7 d 至前 1 d 予以更昔洛韦 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot (12 \text{ h})^{-1}$ 或膦甲酸钠 $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot (12 \text{ h})^{-1}$ 静脉输注预防 CMV 感染, 每周监测血 CMV-DNA 和 TORCH, 移植后 1 d 至 45 d 予以阿昔洛韦预防。

1.5.3 肝静脉闭塞病 (VOD) 多发生在移植过程中和移植后 3 个月内。予低分子肝素钙 $5000 \mu\text{g}$ 皮下注射 1 次/日, 低分子右旋糖苷 $250 \sim 500 \text{ mL/d}$ 和复方丹参注射液 $20 \sim 40 \text{ mL/d}$ 静脉滴注, 前列腺素 E $20 \sim 40 \mu\text{g/d}$ 静脉滴注, 血小板小于 $30 \times 10^9/\text{L}$ 时停用复方丹参注射液。

1.5.4 感染 8 例患者在移植过程中至造血重建前均出现不同程度的粒细胞缺乏感染, 经美罗培南、亚胺培南联合抗 G^+ 菌药物如万古霉素等抗感染治疗后好转。

1.6 植入证据检测 所有患者经短小片段重复序列 (STR) DNA 嵌合状态证实为供者造血重建, 供受者性别不同时加做荧光原位杂交 (FISH) 行性染色体 (X/Y) 检测。因血型转换较慢, 一般血型不同患者在移植后半年左右进行血型转换检验。

2 结 果

2.1 造血重建 所有患者均获造血重建。中性粒细胞 (ANC) $\geq 0.5 \times 10^9/\text{L}$ 的中位时间为 12.1 (11~17) d; 血小板 (PLT) $\geq 20 \times 10^9/\text{L}$ 的中位时间为 15.2 (14~25) d。所有患者分别经 STR 检测、性染色体检测和 (或) ABO 血型证实为完全嵌合体。

2.2 GVHD 8 例患者中有 1 例 (12.5%) 患者在移植后第 36 天出现胃肠道 aGVHD^[2], 表现为持续大量腹泻、水样便, 间断胃肠绞痛、便血和肠道黏膜脱落等症状^[3], 无皮疹、肝功能损害、血尿等症状。按西雅图急性 GVHD 分级标准为胃肠道 II 度 GVHD^[1], 在继续使用 CsA、MMF 并维持有效浓度的同时, 予以甲基泼尼松龙 (MP) $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 冲击治疗 5 d 后症状得到控制, 继续给予 CsA、MMF 同时 MP 逐渐减量, 过渡到口服泼尼松后逐渐减停, 相关症状在移植后第 61 天完全好转。

2.3 CMV 感染 上述患者在移植后第 32 天定期复查 CMV-DNA 和 TORCH 均为阴性, 但在移植后 39 d, 即出现胃肠道 aGVHD 后 3 d 定期复查 CMV-DNA 和 TORCH 时发现 CMV-DNA 拷贝数明显增高, 达 $3.7 \times 10^4 \text{ copy/mL}$, 后予膦甲酸钠 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot (8 \text{ h})^{-1}$ 和人免疫球蛋白 10 g/2 d (共 6 次), 7 d 后复查 CMV-DNA 拷贝数降至小于 $1 \times 10^3 \text{ copy/mL}$, 后每隔 3 天复查 CMV-DNA, 连续 3 次阴性后停用膦甲酸钠, 之后定期复查 CMV-DNA 未再出现巨细胞病毒血症。

2.4 VOD 8 例患者在移植过程中和移植后均未出现 VOD。

3 讨 论

再生障碍性贫血是一种由化学、物理、生物因素等因素引起的骨髓造血功能衰竭、造血细胞减少的一种疾病。急性再生障碍性贫血和慢性再生障碍性贫血急性发展均为重型再生障碍性贫血, 此类疾病患者如无及时、有效治疗, 多死于感染、出血^[4]。对于多数非重型再生障碍性贫血进展较慢, 目前常用免疫抑制疗法 (IST)、大剂量的 CTX、雄激素和补充造血原料等

治疗, 而对重型再生障碍性贫血行异基因造血干细胞移植是目前可能达到有效治愈的最佳手段。从风险评估和相关性上看, 亲缘间 HLA 全相合的供者是最佳选择, 因独生之女家庭的增多, 在我国仅有 20%~40% 的再生障碍性贫血患者有合适的亲缘间供者, 并受着一些如健康、工作、学习等条件的限制; 从骨髓库中寻找非亲缘关系全相合造血干细胞供者概率低、耗时长, 操作较复杂, 严重制约了 allo-HSCT 在临床上的应用, 使一些患者失去了最佳治疗时机或因并发症而死亡。亲缘间 HLA 单倍型 (3/6~5/6 相合) 相合造血干细胞可有效解决造血干细胞的来源问题, 在一些如急性白血病等血液系统疾病中已经有了很好的应用^[5-6], 但诸如急性 GVHD、慢性 GVHD、肺部感染、肠道感染、病毒感染等并发症发生率较高, 造血重建时间较长, 风险较大^[6-7]。有学者认为不同的造血干细胞源可有不同的疗效^[8-9]。骨髓中基质细胞等成分有助于机体缺陷的造血微环境得到改善, 但造血重建时间较长; 外周血造血干细胞采集方便, 中性粒细胞及血小板数恢复较快, 但维持时间较短和 GVHD 发生率高^[10]; 间充质干细胞 (MSC) 具有免疫逃逸特性和免疫调节作用^[11-13], 可多向分化和提供造血支持^[14], 扩增培养的 MSC 联合造血干细胞 (HSC) 移植可以实现自身的归巢定位并促进 HSC 的植入, 降低移植风险^[15], 提高移植存活率^[16]。

本文观察了 8 例重型再生障碍性贫血患者在行 HUC-MSC 联合 HLA 单倍型相合造血干细胞移植治疗后的效果, 并观察了 HUC-MSC 在联合移植治疗中的可能作用。移植后检查所有患者均重建供者造血, 造血重建时间明显缩短, 中性粒细胞和血小板重建的中位时间分别为 12.1 d 和 15.2 d, 只有 1 例患者发生胃肠道 aGVHD 和 CMV 感染, 给予相应处理均好转, 无论是并发症的发生率还是造血重建时间均好于单独实行 HLA 单倍型相合造血干细胞治疗^[7], 亦证明了前述观点。所以重型再生障碍性贫血患者, 在条件适合时应及早予 HUC-MSC 联合 HLA 单倍型相合造血干细胞移植治疗, 但有效数量的 HUC-MSC 的供给需要有经验的单位的配合。总之, 作者认为 HUC-MSC 与骨髓、外周血造血干细胞联合移植是一种优化治疗方案, 但由于本文报道例数较少, 观察时间较短, 后期疗效尚需进一步随访观察, 并进一步积累经验。

参考文献:

- [1] 张之南, 沈悌. 血液病诊断和疗效 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007.
- [2] 陈幸华, 刘林, 孔佩艳, 等. 非血缘异基因外周血干细胞移植治疗慢性粒细胞白血病的临床研究 [J]. 重庆医学, 2005, 34(9): 1283-1285.
- [3] 马军, 张伯龙. 白血病 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2007: 218-224.
- [4] 叶任高, 陆再英. 内科学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 572.
- [5] 高蕾, 陈幸华, 张曦, 等. HLA 单倍相合造血干细胞移植治疗恶性血液病的临床研究 [J]. 中国实用内科杂志, 2009, 29(6): 529-531.
- [6] 张诚, 陈幸华, 张曦, 等. HLA 单倍体外周血联合骨髓干细胞移植治疗急性混合细胞白血病的临床观察 [J]. 重庆医学, 2009, 28(5): 564-566.
- [7] 龚奕, 张曦, 陈幸华, 等. 异基因造血干细胞移植治疗重型再生障碍性贫血临床研究 [J]. 重庆医学, 2010, 39(14): 1842-1845.

更低^[14-15]。脐血来源 MSCs 所具有的生物学特性使其成为治疗 aGVHD 的一种新途径。本研究中有 6 例患者在免疫抑制剂治疗效果不佳情况下加用了脐血来源 MSCs, 有 5 例取得了较好的疗效, 且 6 例患者均未出现重症感染, 提示脐血来源 MSCs 和免疫抑制剂的联合应用可成为治疗重度肠道 aGVHD 的优先选择。但由于缺乏足够数量的病例及随机对照研究, 其总体疗效、安全性以及使用方法均需进一步研究证实及明确。

aGVHD 是移植后常见并发症之一, 病死率高。随着对其机制研究的深入, 各种新型药物及新治疗方法不断问世和成熟, aGVHD 的治疗将会取得越来越好的疗效, 有利于异基因造血干细胞移植患者实现长期生存。

参考文献:

- [1] Ross WA, Couriel D. Colonic graft-versus-host disease [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2005, 21(1): 64-69.
- [2] Thompson B, Salzman D, Steinhauer J, et al. Prospective endoscopic evaluation for gastrointestinal graft-versus-host disease; determination of the best diagnostic approach [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2006, 38(5): 371-376.
- [3] Cruz-Correa M, Poonawala A, Abraham SC, et al. Endoscopic findings predict the histologic diagnosis in gastrointestinal graft-versus-host disease [J]. *Endoscopy*, 2002, 34(10): 808-813.
- [4] Washington K, Bentley RC, Green A, et al. Gastric graft-versus-host disease: a blinded histologic study [J]. *Am J Surg Pathol*, 1997, 21(9): 1037-1046.
- [5] Watanabe N, Okazaki K, Yazumi S, et al. Acute graft-versus-host disease in the small intestine [J]. *Gastrointest Endosc*, 2002, 55(6): 716-722.
- [6] Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk Factors for cytomegalovirus infection after human bone marrow transplantation [J]. *J Infect Dis*, 1986, 153(3): 478-488.
- [7] Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem

cells [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(12): 2169-2179.

- [8] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(10): 2566-2573.
- [9] Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive defect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals [J]. *Blood*, 2003, 25(10): 102-110.
- [10] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells [J]. *Lancet*, 2004, 363(9419): 1439-1441.
- [11] Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses [J]. *Exp Hematol*, 2000, 33(28): 875-884.
- [12] Ma L, Feng XY, Cui BL, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2005, 118(23): 1987-1993.
- [13] Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's Jelly of the human umbilical cord [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1330-1337.
- [14] Lu LL, Liu YJ, Yang SG, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis supportive function and other potentials [J]. *Haematologica*, 2006, 91(8): 1017-1026.
- [15] La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, et al. Isolation and characterization of Oct-4⁺/HLA-G⁺ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix; differentiation potential and detection of new markers [J]. *Histochem Cell Biol*, 2009, 131(2): 267-282.

(收稿日期: 2011-04-17 修回日期: 2011-05-25)

(上接第 3033 页)

- [8] Liu YC, Chang CS, Liu TC, et al. Comparisons between allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and allogeneic bone marrow transplantation in adult hematologic disease: a single center experience [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2003, 19(11): 541-545.
- [9] Schrezenmeier H, Passweg JR, Marsh JC, et al. Worse outcome and more chronic GVHD with peripheral blood progenitor cells than bone marrow in HLA-matched sibling donor transplants for young patients with severe acquired aplastic anemia [J]. *Blood*, 2007, 110(4): 1397-1400.
- [10] Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, et al. Acute and chronic Graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood Stem-cell and bone marrow transplantation: a metaanalysis [J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(6): 3685-3687.
- [11] Fang B, Song Y, Lin Q, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graft-versus-host disease in two children [J]. *Pediatr Transplant*, 2007, 11(7): 814-816.
- [12] Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchy-

mal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11(5): 389-392.

- [13] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells [J]. *Lancet*, 2004, 363(9419): 1439-1441.
- [14] Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, 11(5): 389-398.
- [15] Koc ON, Gerson SL, Cooper BM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 18(2): 307-312.
- [16] 宋希章, 何炜, 韩俊领, 等. 人脐带间充质干细胞的生物学特性及其在血液系统疾病中的应用 [J]. *医学综述*, 2009, 15(2): 166-169.

(收稿日期: 2011-04-17 修回日期: 2011-05-25)