doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.036

脐带间充质干细胞辅助治疗难治性类风湿性关节炎的临床观察

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:观察脐带间充质干细胞辅助治疗难治性类风湿性关节炎的疗效和安全性。**方法:**将细胞总数为(5~7)×10⁷个脐带间充质干细胞通过静脉输注途径移植到自愿接受干细胞移植的2例难治性类风湿性关节炎患者体内,4次为1个疗程,每次间隔1周。治疗后随访1年定期观察患者临床症状及各项生化和免疫学指标的变化并进行综合分析。**结果:**脐带间充质干细胞辅助治疗后1月余,2例患者的临床症状明显改善,28个关节的疾病活动度评分(DAS-28)由3.6和4.0分别降低为2.2和2.6,血沉、C反应蛋白水平和类风湿因子抗体滴度也较治疗前明显降低。随访1年余未观察到与治疗有关的副作用,并且症状持续缓解无复发。**结论:**脐带间充质干细胞辅助治疗可缓解难治性类风湿性关节炎的临床症状,且未观察到与治疗有关的副作用,安全性好,值得临床进一步研究其远期疗效。

关键词:干细胞移植;难治性类风湿性关节炎;治疗;脐带间充质干细胞

中图分类号:R593.22 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)21-4137-03

Clinical Observation on the Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in the Adjuvant Treatment of Refractory Rheumatoid Arthritis

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

(1 Department of Hematology, Renming Hospital, Hu Bei University of Medicine, Shiyan, Hubei, 442000, China;

2 Center of Cell Therapy, Taihe Hospital, Hu Bei University of Medicine, Shiyan, Hubei, 442000, China)

ABSTRACT Objective: To observe the clinical effect and safety of UC-MSC (umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSC) transplantation in the adjuvant treatment of refractory rheumatoid arthritis. **Methods:** Two patients with refractory rheumatoid arthritis were received UC-MSC transplantation (4 times as a course of treatment which every time interval one week) with total cellular number of UC-MSC was 5~7×10⁷ by intravenous infusion. Both patients were followed up regularly for one year after transplantation. Clinical symptoms and various biochemical and immunological index were observed and literature review was performed. **Results:** After transplantation, the clinical symptoms of both patients improved obviously. After transplantation, DAS-28 score of 28 arthrosis of 2 patients decreased from 3.6 and 4.0 to 2.2 and 2.6 respectively. There were significant reduction in ESR, CRP level and RA antibody titer at 1 months after transplantation than those pre-treatment. No significant difference was observed when compared post-treatment with pre-treatment of biochemical parameters, which contains blood routine, hepatic function, renal function, serum immunoglobulin, complement C3/C4. Both patient's condition was continuously catabatic and no recurrence was found after one year was followed up. **Conclusion:** The UC-MSC transplantation could ameliorate clinical manifestations and delay progression of rheumatoid arthritis. It was convenient, safe and effective in the treatment of refractory rheumatoid arthritis, but further observation was still required to evaluate its long term efficacy.

Key words: Stem cell transplantation; Rheumatoid arthritis; Treatment; Umbilical cord mesenchymal stem cells

Chinese Library Classification: R593.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)21-4137-03

前言

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以多系统损害为特征的慢性系统性自身免疫病,传统药物治疗主要包括抗炎药、糖皮质激素和改变病情的抗风湿药。近年来发展的针

对细胞因子靶向治疗的生物治疗方法具有抗炎和防止骨破坏的作用,但生物制剂的使用容易导致注射部位局部的皮疹、感染,并且长期使用使淋巴系统肿瘤的患病率增加,限制了其在临床上的广泛使用。有研究表明来源于脐带结缔组织中的脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSC)不仅具有造血支持作用,而且还具有免疫调节作用,在免疫性疾病中的临床治疗中显示出其良好的前景^[1-3]。我院采用UC-MSC移植辅助治疗2例难治性RA患者取得较好效果,现报道如下。

1 资料和方法

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、鲍红霞, E-mail: yanghuaqiang2004@126.com, 电话: 13986871847

(收稿日期:2013-10-19 接受日期:2013-11-15)

1.1 病例资料

患者 1,男,60 岁,双腕、掌指、近端指、踝关节肿痛 16 个月,四肢肿胀、疼痛、行动困难 3 个月入院。体格检查:生命体征稳定,心肺听诊未闻及异常,腹软,肝脾各肋缘下未及,双手、双足呈轻度弥漫性肿胀,双腕及掌指关节、手指近端关节、双踝关节轻微肿胀伴压痛。实验室检查:血常规:白细胞 $6.9 \times 10^9/L$,血红蛋白 106 g/L,血小板 $291 \times 10^9/L$;大小便常规无异常;血沉(ESR)为 68 mm/h 末,类风湿因子(RF)57.8 U/ml,抗链球菌溶血素 O (ASO) 阴性,C-反应蛋白 (CRP)14.6 mg/L,抗核抗体、ds-DNA 和 ENA 多肽谱阴性,肾功能、肌酶学检查正常,血清补体 C3 和 C4 升高,双手和双足 X 线检查:见关节周围软组织肿胀,关节间隙狭窄,未见关节面软骨破坏,其他项目正常,28 个关节的疾病活动度评分(DAS-28)为 3.6 分。临床诊断为:类风湿性关节炎,入院以后给予美洛昔康、强的松及来氟米特口服及支持对症治疗 1 月后症状逐渐减轻,但在激素减量过程中上述症状又加重,在征得医院医学伦理委员会的批准和患者知情同意的基础上给予每周 1 次,共 4 次 UC-MSc 移植治疗。移植后 1 月,患者临床症状明显好转,饮食、睡眠、体力、疲劳等临床症状方面也有明显改善,DAS-28 评分降为 2.2 分,ESR 降为 15 mm/h 末,RF17.8 U/ml,CRP5.6 mg/L。出院后至今随访 1 年余,未观察到与治疗相关的副作用,并且症状持续缓解无复发。

患者 2,女,53 岁,以不规则低热伴双手及双踝关节疼痛 20 天,不能行走,逐渐加重 5 天,于 2005 年 7 月 22 日来我院就诊。既往有双手和双脚关节及全身骨关节疼痛病史 3 年。查体:T37.3 °C,行走困难,双手腕关节、掌指、近端指间和双侧踝关节轻度肿胀,未见肌肉萎缩和关节畸形,心肺听诊未闻及异常,腹软,肝脾各肋缘下未触及。入院以后血常规提示:血红蛋白 100 g/L,白细胞 $8.9 \times 10^9/L$,血小板 $391 \times 10^9/L$;骨髓细胞学无明显异常;RF60.9 U/ml,CRP17.4 mg/L,ASO 202.3 mmol/L,ESR 80 mm/h 末,抗核抗体、ds-DNA 和 ENA 多肽谱阴性,肾功能、肌酶学检查正常,心电图正常,DAS-28 评分 4.0。双手和双足 X 线检查:关节周围软组织肿胀,关节间隙狭窄,未见关节面软骨破坏。入院以后给予美洛昔康、强的松及甲氨蝶呤口服及支持对症治疗 2 月后症状有所减轻,但在激素减量和甲氨蝶呤停用后上述症状复又加重,在征得医院伦理委员会的批准和患者知情同意的基础上给予每周 1 次,共 4 次 UC-MSc 移植治疗。移植后 1 月患者临床症状明显好转,DAS-28 评分降为 2.6,ESR 降为 20 mm/h 末,RF27.4 U/ml,CRP 7.6 mg/L。出院后至今随访 1 年,未观察到与治疗相关的副作用,并且症状持续缓解无复发。

1.2 UC-MSc 来源和移植途径

取足月妊娠剖宫产健康胎儿的脐带,采用组织块贴壁培养法于含有 5% CO₂、37 °C 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。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 次为 1 疗程,每次间隔 1 周,治疗途径采用静脉输注,治疗后 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 两例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。治疗前,2 例患者均需排除潜在的病毒感染性疾病。干细胞治疗前及结束后测定补体 C3、C4、肝功能、ESR、CRP、RF 等。

1.3.2 评价方法 根据文献按 ARA 临床缓解标准进行临床评价,DAS-28 ≤ 2.6 分提示病情处于缓解期;2.6~3.2 分之间提示病情处于低活动度;3.2~5.1 分之间提示病情为中活动度;>5.1 分提示病情为高活动度。

1.4 并发症和不良反应

治疗后随访观察 1 年,定期观察患者临床症状、血液生化和各项免疫指标的变化以观察其有无不良反应的发生。

2 结果

在 UC-MSc 治疗后,2 例患者的临床症状均明显缓解,饮食、睡眠、体力、疲劳等临床症状也明显改善;2 例患者的 28 个关节的疾病活动度评分(DAS-28)由 3.6 和 4.0 分别降低为 2.2 和 2.6;治疗后 1 月 ESR、CRP 和 RF 抗体滴度也较治疗前有明显改善。随访 1 年余未观察到与治疗有关的副作用,并且症状持续缓解无复发。

3 讨论

RA 的发病机理至今尚未完全阐明,非甾体抗炎药、改变病情的抗风湿药及糖皮质激素治疗 RA 已为人们所熟知,但这些药物均具有不同的缺点和局限性。生物治疗具有抗炎和防止骨破坏的作用,但容易导致注射部位局部的皮疹、感染,并且长期使用使淋巴系统肿瘤患病率增加,限制了其在临床上的广泛使用。近年来,基础和临床实验研究表明间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSc)具有免疫调节和再生修复的生物学特性,为 RA 的治疗提供了崭新的前景。

张效北等^[4]探讨 MSc 治疗 RA 的临床疗效,将 60 例 RA 患者随机分为观察组和对照组,每组 30 例,对照组采用常规治疗,观察组采用 MSc 治疗,比较两组患者的临床疗效,结果表明观察组的显效和有效率均显著高于对照组。李慧等^[5]观察了 UC-MSc 对 RA 免疫炎性病理过程的干预作用,将 UC-MSc 治疗组于造模后第 4 周经大鼠尾静脉注射 UC-MSc,模型组注射生理盐水,结果表明治疗后第 7 天及第 35 天模型组大鼠血清 IL-1、IL-6、IL-18、TNF-α、血管细胞黏附分子 1 和中性粒细胞表面 CD11b 的表达水平均高于正常组,UC-MSc 治疗后各因子水平显著低于模型组,治疗后第 35 天显著低于第 7 天,表明 UC-MSc 能明显抑制 CIA 大鼠的炎症因子释放和抑制内皮细胞的异常活化,有利于缓解 RA 的免疫炎性关节症状。苏毅等^[6]采用纯化的自体外周血造血干细胞移植治疗难治性幼年型 RA,对 3 例难治性幼年型 RA 患者进行纯化的 CD34⁺ 细胞移植,结果发热的 2 例患者体温均降至正常,大关节肿痛均完全消失,四肢活动自如,ESR、CRP 和 RF 各项指标正常,随访中患者病情稳定,提示采用纯化的自体外周血造血干细胞移植可使患者造血功能得到较快重建,近期临床症状改善。毛飞等^[7]观察骨髓 MSc 对 RA 小鼠脾脏单个核细胞表达 TLR8 及 TLR9 等的影响,将 DBA/1J 小鼠随机分 3 组,非造模组不造模,阳性对

对照组和实验组制备Ⅱ型胶原诱导的小鼠 RA 模型,实验组尾静脉注射移植大鼠骨髓 MSC,结果表明与阳性对照组比较,实验组小鼠关节直径明显减小,关节炎症细胞浸润程度明显降低,但比非造模组略高;小鼠脾脏单个核细胞表达 TLR8、TLR9 和 IL-1 β 的水平较阳性对照组明显降低;阳性对照组与实验组中 TLR8 与 TLR9 的表达均无明显相关性,说明骨髓 MSC 下调了 RA 小鼠脾脏单个核细胞表达 TLR8 及 TLR9 的水平,但 TLR8 与 TLR9 的表达无相关性。王黎明等^[9]应用静脉输注 UC-MSC 的方式治疗 RA 并探讨其疗效,2 例 RA 合并强直性脊柱炎的病人同时还给予局部注射,结果表明所有患者饮食、睡眠、体力、疲劳等临床症状均明显改善,全部患者满足 ACR20 标准,15 例患者 DAS-28<3.2,12 例患者满足 ACR70 标准,DAS-28 评分 <2.6,1 例 JRA 患者 UC-MSC 治疗 4 天后临床症状明显好转,治疗前后血液各项生化指标无明显变化。Liang 等^[9]主要探讨了异基因 MSC 治疗难治性 RA 的疗效和安全性,4 例类风湿持续活动的患者接受了 MSC 的治疗,采用直观类比标度(VAS 100mm)疼痛评分、CRP、ESR 和 DAS-28 进行评估,结果表明 4 例患者中有 3 例 ESR、DAS-28 和疼痛 VAS 积分在移植后 1 个月和 6 个月明显降低,两例患者在移植后 6 个月达到了欧洲风湿病防治联合会的中等缓解标准,但这两例患者分别在 7 个月和 23 个月后又复发。4 例患者没有 1 例患者获得了 DAS-28 确定的缓解标准,治疗过程中没有观察到与治疗有关的严重的副作用。

本研究中,2 例难治性 RA 患者在常规治疗疗效欠佳的情况下接受 UC-MSC 治疗后饮食、睡眠、体力、疲劳等临床症状明显改善,2 例患者的 28 个关节的疾病活动度评分(DAS-28)降低;治疗后 1 月,ESR、CRP 和 RF 抗体滴度也较治疗前有明显下降。随访 1 年余,未观察到与治疗有关的副作用,且症状持续缓解无复发。这些结果表明采用 UC-MSC 辅助治疗对难治性 RA 安全、有效,值得临床推广应用。结合国内外学者的动物实验和临床研究结果,我们分析 UC-MSC 治疗 RA 的可能机制如下^[10-15]:① MSC 具有独特的免疫调节作用,能调节多种先天性或获得性免疫功能,进而调控机体的免疫应答;② MSC 具有自我更新和多向分化潜能,在一定的条件下能生成脂肪细胞、成骨细胞、成软骨细胞、神经细胞和成肌细胞等非造血成体细胞,可能参与受损组织的再生修复;③ MSC 具有趋化作用,可以阻止炎性介质的释放,减轻炎症反应,减轻组织损伤,有利于阻止病情进展。由于本研究病例数较少且随访时间较短,UC-MSC 辅助治疗难治性 RA 的临床疗效及副作用还需扩大样本量进一步观察。

参考文献(References)

- [1] 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
- [2] Dazzi F, Krampera M. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2011, 24(1): 49-57
- [3] 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
- [4] 张效北,李江涛,赵和泰,等.间充质干细胞治疗类风湿性关节炎患者临床分析[J].中国现代医生,2011,49(34):139-140
- [5] Zhang Xiao-bei, Li Jiang-tao, Zhao He-tai, et al. Clinical analysis about mesenchymal stem cell therapy in patients with rheumatoid arthritis[J]. China Morden Doctor, 2011, 49(34): 139-140
- [6] 李慧,顾健,林传明,等.脐带间充质干细胞对 CIA 大鼠炎症因子的干预[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(36):6701-6704
- [7] Li Hui, Gu Jian, Lin Chuan-ming, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells effect on inflammatory responses of rats with type II collagen-induced arthritis [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2011, 15(36): 6701-6704
- [8] 苏毅,赖思含,易海,等.纯化的自体外周血造血干细胞移植治疗难治性幼年型类风湿性关节炎的初步研究 [J].实用医院临床杂志,2011,8(4):33-34
- [9] Su Yi, Lai Si-han, Yi Hai, et al. Study of purified autologous peripheral blood stem cell transplantation in treatment of patients with refractory juvenile rheumatoid arthritis [J]. Practical Journal of Clinical Medicine, 2011, 8(4): 33-34
- [10] 毛飞,钱晖,朱伟,等.骨髓间充质干细胞下调类风湿性关节炎小鼠脾脏单个核细胞 TLR8 及 TLR9 的表达 [J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(45):8371-8375
- [11] Mao Fei, Qian Hui, Zhu Wei, et al. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on down-regulation of Toll-like receptor 8 and Toll-like receptor 9 in spleen mononuclear cells in collagen-induced arthritis mice [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2011, 15(45): 8371-8375
- [12] 王黎明,周建军,白雯,等.脐带间充质干细胞治疗 17 例类风湿性关节炎患者的临床疗效观察 [J].中国免疫学杂志,2010,26(7):659-662
- [13] Wang Li-ming, Zhou Jian-jun, Bai Wen, et al. Therapeutic efficacy of umbilical cord mesenchymal stem cells for rheumatoid arthritis in seventeen patients [J]. Chinese Journal of Immunology, 2010, 26(7): 659-662
- [14] Liang J, Li X, Zhang H, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in patients with refractory RA [J]. Clin Rheumatol, 2012, 31(1): 157-161
- [15] De Miguel MP, Fuentes-Juliá n S, Blázquez-Martí nez A, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications[J]. Curr Mol Med, 2012, 12(5): 574-591
- [16] Daikeler T, Tyndall A. Stem cell treatment of autoimmune disease[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2011, 136(33): 1684-1686
- [17] Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration[J]. Vet Surg, 2006, 35(3): 232-242
- [18] Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone[J]. Injury, 2007, 38(Suppl 1): S26-32
- [19] Li X, Liu L, Meng D, et al. Enhanced apoptosis and senescence of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(13): 2387-2394
- [20] Liang J, Zhang H, Hua B, et al. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(8): 1423-1429