

## · 临床研究 ·

# 自体骨髓间充质神经干细胞移植治疗脑梗死的疗效观察

刘定华 韩伯军 洪珊珊 王庆广 杜春艳 高恒 韩兰秀 万美荣 叶英

**【摘要】目的** 探讨自体骨髓间充质神经干细胞移植治疗脑梗死的疗效及安全性。**方法** 选取 2010 年 12 月至 2012 年 12 月在我院治疗的脑梗死患者 58 例,采用随机数字表法分为对照组和移植组,每组 29 例。2 组患者均给予常规药物治疗及康复干预;移植组在此基础上辅以自体骨髓间充质神经干细胞移植治疗,首先抽取移植组患者骨髓并分离、培养骨髓间充质神经干细胞,待培养细胞达到治疗要求时进行神经干细胞移植治疗,共进行 4 次细胞移植治疗,每次间隔 5~10 d。于治疗前、治疗 4 周、治疗后 3 个月时分别采用神经功能缺损评分量表(CNS)、美国国立卫生研究院卒中量表(NIHSS)、Fugl-Meyer 运动功能评定量表(FMA)及改良 Barthel 指数(MBI)评分对 2 组患者神经功能、肢体运动功能及日常生活活动(ADL)能力进行评定。**结果** 经治疗 4 周及治疗后 3 个月时,发现 2 组患者 CNS、NIHSS、MBI、上肢 FMA 及下肢 FMA 评分均较治疗前明显改善,并且治疗 4 周及治疗后 3 个月时移植组患者 CNS 评分[分别为(26.20±1.39)分、(17.14±1.64)分]、NIHSS 评分[分别为(11.52±1.23)分、(9.51±1.05)分]、MBI 评分[分别为(53.55±1.75)分、(60.09±2.17)分]、上肢 FMA 评分[分别为(34.60±2.08)分、(48.49±2.76)分]及下肢 FMA 评分[分别为(23.70±2.05)分、(30.41±2.32)分]改善幅度均显著优于对照组水平,组间差异均具有统计学意义( $P<0.05$ );并且治疗过程中未发现移植组患者出现严重不良反应。**结论** 自体骨髓间充质神经干细胞移植可促进脑梗死患者神经功能恢复,且治疗过程中未发现明显不良反应,安全性较好。

**【关键词】** 骨髓间充质神经干细胞; 脑梗死; 移植; 自体

**Transplanting autologous mesenchymal nerve stem cells in the treatment of cerebral infarction** Liu Dinghua\*, Han Bojun, Hong Shanshan, Wang Qingguang, Du Chunyan, Gao Heng, Han Lanxiu, Wan Meirong, Ye Ying. \*Department of Neurology, Jiangyin Hospital Affiliated with Southeast University Medical School, Jiangyin 214400, China

Corresponding author: Liu Dinghua, Email: Liudinghuacn@163.com

**【Abstract】Objective** To explore the curative effect and safety of transplanting autologous mesenchymal nervous system stem cells after cerebral infarction. **Methods** Fifty-eight patients with cerebral infarction were randomly divided into a control group and a research group with 29 cases in each. There was no statistically significant difference in terms of age, course, illness or treatment time between the groups. Mesenchymal nervous system stem cells were isolated from their bone marrow, cultured and administered as treatment. Before treatment and 4 weeks and 3 months after treatment, clinical nerve function limitation scores (CNS) were recorded, the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) and Fugl Meyer assessment (FMA) were administered, and the modified Barthel index (MBI) was evaluated. **Results** After 4 weeks and after 3 months the CNS and NIHSS scores in the research group were significantly lower than before treatment, and MBI and FMA scores were significantly higher. Compared with the controls, the CNS and NIHSS scores in the research group were significantly lower and the MBI and FMA scores were significantly higher after both 4 weeks and 3 months. **Conclusion** Transplanting autologous mesenchymal nervous system stem cells can safely improve nerve function after cerebral infarction.

**【Key words】** Bone marrow; Mesenchymal stem cells; Nerve regeneration; Cerebral infarction; Transplantation; Autologous transplants

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2014.06.006

作者单位:214400 江阴,东南大学医学院附属江阴医院神经内科(刘定华、韩伯军、洪珊珊、王庆广、杜春艳);江苏省干细胞与生物医用材料重点实验室江阴临床干细胞研究室(高恒、韩兰秀);徐州医学院附属医院中心实验室(万美荣);江苏省麻醉学重点实验室(叶英)

通信作者:刘定华, Email: Liudinghuacn@163.com

目前临床针对脑梗死的治疗主要有溶栓及介入治疗等,但对脑梗死半暗带区的保护疗效仍不理想,无法有效促进受损脑区脑血管及脑神经细胞再生,这也是脑梗死后致残率、致死率居高不下的主要原因。随着生物医学技术发展,干细胞移植为脑梗死治疗提供了一种全新手段。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal

stem cells, BMSCs) 具有高度增殖、自我更新能力及多向分化潜能, 在不同条件下可诱导分化为多种组织细胞(如神经元、神经胶质细胞等), 可作为受损脑区移植治疗的理想种子细胞来源<sup>[1-2]</sup>。基于上述背景, 本研究拟采用由 BMSCs 经诱导分化而来的神经干细胞治疗脑梗死患者, 发现临床疗效满意。

### 对象与方法

#### 一、研究对象

选取 2010 年 12 月至 2012 年 12 月在我院治疗的脑梗死患者 58 例, 患者纳入标准包括: ①符合 1995 年全国第 4 届脑血管病学术会议制订的脑梗死诊断标准<sup>[3]</sup>; ②均经 CT 或 MRI 检查诊断为脑梗死; ③初发脑梗死, 病程 1 d ~ 3 周; ④偏瘫侧上肢或/和下肢肌力 < 4 级, 症状持续时间超过 48 h; ⑤年龄 35 ~ 70 岁; ⑥简易智力精神状态检查 (mini-mental state examination, MMSE) 量表评分  $\geq 27$  分; ⑦签署知情同意书。患者剔除标准包括: ①患有心、肺、肝、肾等重要器官功能不全; ②合并有肺炎或严重全身感染; ③过敏体质; ④伴有其它脑部器质性病变(如脑肿瘤等); ⑤血清 HIV 阳性、肿瘤指标阳性者; ⑥伴有严重精神疾病、认知功能障碍等情况。采用随机数字表法将上述患者分为移植组及对照组, 每组 29 例, 2 组患者性别、年龄、病程等数据详见表 1, 表中数据经统计学比较, 发现组间差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。

#### 二、治疗方法

对照组患者给予常规药物治疗(包括脑保护剂、改善血循环、他汀类药物及抗血小板药物等)及综合康复干预, 综合康复干预包括早期良肢位摆放、体位转换、偏瘫肢体被动活动、床边坐站训练、双下肢交替屈伸运动、坐位及站立位平衡训练、偏瘫侧肢体负重训练及作业治疗等。上述训练每次持续 120 min, 每周训练 5 d, 共连续治疗 4 周。移植组患者签署知情同意书后, 在对照组患者治疗基础上辅以自体 BMSCs 移植治疗。

#### 三、BMSCs 的分离、培养及鉴别

首先于移植组患者髂前上棘部位抽取骨髓组织约 40 ml, 采用密度梯度离心法分离出骨髓单个核细胞, 按照 Dharmasaroja 等<sup>[4]</sup>介绍的方法分离、培养 BMSCs。培养基采用 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium,

DMEM)/F12, 将细胞分装于 75 ml 培养瓶内, 置于 37 °C、饱和湿度体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 d 后, 用生理盐水悬浮 4 ml, 取约  $1 \times 10^7$  个培养细胞进行鉴定。采用流式细胞仪检测第 5 代培养细胞表面抗原表达为 CD33 (1.8%)、CD34 (0.7%)、CD45 (0.2%)、CD29 (96.9%)、CD44 (96.6%)、SH2 (97.4%) 和 SH3 (97.2%), 并显示其具有向骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞分化的能力, 证明所培养细胞确为 BMSCs。当培养的 BMSCs 数量达到治疗要求时 (BMSCs 移植注射标准为患者每千克体重注射  $1.0 \times 10^7$  个 BMSCs) 即可用于移植治疗。

#### 四、自体 BMSCs 移植

治疗前嘱移植组患者侧卧于硬板床上, 两手抱膝紧贴腹部, 使躯干呈弓形, 以髂后上棘连线与后正中线交会处为穿刺点, 穿刺点皮肤经常规消毒后, 采用 2% 利多卡因由皮肤至椎间韧带行局部浸润麻醉。术者以左手拇指、食指固定穿刺点皮肤, 右手持穿刺针以垂直于背部方向缓慢刺入, 进针深度为 4 ~ 6 cm, 可见无色透明脑脊液流出。待脑脊液缓慢流出 3 ml 后, 以 0.5 ml/min 速度注入 BMSCs 细胞悬液 (患者每千克体重约注射  $1.0 \times 10^7$  个 BMSCs, 细胞悬液 BMSCs 浓度为  $4 \times 10^8$  个/ml ~  $9 \times 10^8$  个/ml)。注射完毕后伤口采用消毒纱布覆盖并用胶布固定, 嘱患者去枕仰卧 4 ~ 6 h, 观察该期间患者有无异常反应。每位移植组患者均给予 4 次自体 BMSCs 移植治疗, 每次移植治疗间隔时间为 5 ~ 10 d。

#### 五、疗效评定标准及不良事件观察

于治疗前、治疗 4 周、治疗 3 个月后对上述患者进行疗效评定, 包括: ①患者神经功能评定采用神经功能缺损评分量表 (clinical nerve function limitation scores, CNS) 及美国国立卫生研究院卒中量表 (National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS), CNS 量表满分为 45 分, 如评分为 0 ~ 15 分表示轻度缺损, 16 ~ 30 分表示中度缺损, 31 ~ 45 分表示重度缺损; NIHSS 评分 < 7 分表示轻度缺损, 7 ~ 15 分表示中度缺损, > 15 分表示重度缺损<sup>[5]</sup>; ②患者肢体运动功能评定采用简式 Fugl-Meyer 运动功能量表 (Fugl-Meyer assessment, FMA), 该量表主要对受试者上、下肢屈伸肌协同运动、反射、协调能力及运动速度等进行评定, 上肢最高分为 66 分, 下肢最高分为 34 分, 分值越高表示受试者肢体运动功

表 1 2 组患者基本资料及病情比较

组别	例数	性别(例)		平均年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$ )	平均病程 (d, $\bar{x} \pm s$ )	脑梗死部位(例)			
		男	女			额叶	颞叶	顶叶	基底核区
移植组	29	18	11	55.34 ± 3.63	14.28 ± 4.71	3	2	8	16
对照组	29	20	9	56.87 ± 4.39	14.31 ± 4.49	5	1	10	13

能越好<sup>[5]</sup>; ③患者日常生活活动(activities of daily living, ADL)能力评定采用改良 Barthel 指数(modified barthel index, MBI)评分,该量表评分内容包括进食、洗澡、穿衣、大便控制、小便控制、用厕、床椅转移、平地行走、上下楼梯等,满分为 100 分,≥60 分表示轻度功能障碍;59~41 分表示中度功能障碍,需要帮助才能完成日常生活活动;≤40 分表示重度功能障碍,患者多数日常生活活动均不能完成或需他人照料<sup>[5]</sup>。

本研究同时观察并记录 2 组患者治疗期间不良事件发生情况,要求患者如实反映治疗后病情变化,避免诱导性提问,无论不良事件是否与 BMSCs 移植有关均详细记录,包括不良反应出现时间、症状、体征、程度、持续时间、实验室检查指标、处理方法、经过、结果及随访时间等。另外本研究还监测患者治疗 4 周及治疗后 3 个月时的血常规、生化全套、凝血五项、肿瘤标志物等数据,以全面评估 BMSCs 移植治疗安全性。

#### 六、统计学分析

本研究所得计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 16.0 版统计学软件包进行数据分析,组内均数比较采用配对样本 *t* 检验,组间均数比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 结 果

本研究中,移植组患者经 BMSCs 移植治疗后均未出现明显不良反应,通过监测治疗 4 周及治疗后 3 个月时的血常规、生化全套、凝血五项、肿瘤标志物等指标均未见明显异常,提示自体 BMSCs 移植治疗脑梗死的安全性较好。治疗前、治疗 4 周及治疗后 3 个月时 2 组患者神经功能、ADL 能力及肢体运动功能恢复情况详见表 2。通过组间比较发现,治疗前移植组与对照组 CNS、NIHSS、MBI 及 FMA 评分组间差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );经治疗 4 周后,发现 2 组患者 CNS、NIHSS、MBI 及 FMA 评分均较治疗前明显改善;并且移植组患者 CNS、NIHSS 评分均显著低于对照组,MBI 评分、上肢及下肢 FMA 评分均显著高于

对照组,组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );治疗后 3 个月时,发现 2 组患者 CNS、NIHSS、MBI 及 FMA 评分均较治疗前进一步改善,并且此时移植组上述指标改善幅度仍显著优于对照组,组间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 讨 论

近年来脑卒中发病率呈逐渐上升趋势,针对脑卒中患者的治疗一直是康复领域研究的热点及难点之一,积极探寻治疗脑卒中的有效方法具有重要的临床及社会意义。BMSCs 是一种具有独特表型及细胞化学特征且处于未分化状态的非定向干细胞,可以表达、分泌多种细胞因子,对神经元存活、轴突再生、局部微血管再生等均具有影响作用<sup>[6-7]</sup>;并且 BMSCs 来源广泛、易于采集、制备及保存,通过自体移植 BMSCs 能避免免疫排斥反应,且不涉及社会、伦理及法律等问题,目前已逐渐应用于神经系统疾病临床治疗领域<sup>[1-2]</sup>。

相关研究发现,BMSCs 能横向分化为神经元细胞,通过向受损脑区移植 BMSCs 可促进内源性神经组织再生,加速内源性神经干细胞(neural stem cells, NSCs)分化为成熟神经元,减少星形胶质细胞分化,具有确切神经保护作用<sup>[8]</sup>。既往动物实验也发现,模型大鼠经 BMSCs 移植治疗后,其脑梗死灶体积较对照组显著缩小,神经功能缺损程度也明显减轻<sup>[9]</sup>。另有研究指出,脑梗死后神经发生及神经功能恢复与病灶区血管发生、重塑密切相关,如 Zacharek 等<sup>[10]</sup>将局灶性脑缺血大鼠缺血脑组织提取液与 BMSCs 共培养后,发现脑源性神经营养因子、神经生长因子、血管内皮生长因子表达均明显增强,同时还观察到缺血性脑损伤能募集血循环中内皮祖细胞归巢到缺血病灶,并促其增殖及加速血管生成。詹三华等<sup>[11]</sup>也发现 BMSCs 移植治疗能促进急性脑梗死患者神经功能恢复。本研究也得到类似结果,如入选脑梗死患者在常规药物及康复干预基础上辅以自体 BMSCs 移植治疗,经治疗 4 周及治疗后 3 个月时发现患者神经功能、肢体运动功能、ADL

表 2 治疗前、后 2 组患者临床疗效结果比较(分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	CNS 评分	NIHSS 评分	MBI 评分	FMA 评分	
					上肢	下肢
移植组						
治疗前	29	39.62 ± 2.09	16.23 ± 0.94	23.41 ± 1.34	24.34 ± 1.93	12.58 ± 1.18
治疗 4 周后	29	26.20 ± 1.39 <sup>ab</sup>	11.52 ± 1.23 <sup>ab</sup>	53.55 ± 1.75 <sup>ab</sup>	34.60 ± 2.08 <sup>ab</sup>	23.70 ± 2.05 <sup>ab</sup>
治疗 3 个月	29	17.14 ± 1.64 <sup>ab</sup>	9.51 ± 1.05 <sup>ab</sup>	60.09 ± 2.17 <sup>ab</sup>	48.49 ± 2.76 <sup>ab</sup>	30.41 ± 2.32 <sup>ab</sup>
对照组						
治疗前	29	40.41 ± 2.13	16.82 ± 1.35	24.02 ± 1.52	25.54 ± 2.07	13.29 ± 1.54
治疗 4 周后	29	29.54 ± 2.40 <sup>a</sup>	13.74 ± 2.01 <sup>a</sup>	52.56 ± 1.33 <sup>a</sup>	32.62 ± 1.84 <sup>a</sup>	22.90 ± 1.37 <sup>a</sup>
治疗 3 个月	29	18.71 ± 1.98 <sup>a</sup>	11.42 ± 2.54 <sup>a</sup>	55.51 ± 2.95 <sup>a</sup>	45.48 ± 2.97 <sup>a</sup>	28.38 ± 1.17 <sup>a</sup>

注:与组内治疗前比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与对照组相同时间点比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

能力等均较治疗前及对照组明显改善。

关于 BMSCs 移植促进脑梗死患者神经功能恢复的作用机制可能包括:①BMSC 植入后通过与神经细胞相互作用,能促进自身或周围神经细胞分泌多种神经营养因子,加速血管发生或直接参与新生血管形成并改善内环境,有助于受损神经功能恢复<sup>[12]</sup>;②BMSCs 可直接分化为神经元并建立新的突触联系,参与受损神经组织形态、结构及功能等多方面修复<sup>[12]</sup>;③BMSCs 能通过分泌某些特定细胞因子,激活处于休眠状态的受体细胞发挥功能,并启动相关再生基因表达,活化内源性 NSCs,促进受损神经中枢修复<sup>[13-14]</sup>。另外本研究移植组患者经治疗后均未出现明显不良反应,且治疗后随访发现患者各项血液及生化指标均未见明显异常,同时由于 BMSCs 免疫原性较弱,经自体移植治疗后可尽量避免使用免疫抑制剂,故移植部位不容易形成肿瘤,可见通过自体移植 BMSCs 治疗脑梗死安全性较好。

综上所述,本研究结果表明,在常规药物、康复干预基础上辅以自体 BMSCs 移植,可进一步促进脑梗死患者受损神经及运动功能恢复,促其早日回归家庭及社会,并且治疗过程中未见明显不良反应、安全性较好;但目前国内采用自体 BMSCs 移植治疗脑梗死在临床上还处于起步阶段,其确切治疗机制、长期有效性及安全性等问题均有待进一步研究证实。

参 考 文 献

[1] Einstein O, Ben-Hur T. The changing face of neural stem cell therapy in neurologic diseases[J]. Arch Neurol, 2008, 65(4):452-456.

[2] Gonzalez-Martinez JA, Bingaman WE, Toms SA, et al. Neurogenesis in the postnatal human epileptic brain[J]. J Neurosurg, 2007, 107(3):628-635.

[3] 中华神经科学会, 中华神经外科学会. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志, 1996, 29(6):379-380.

[4] Dharmasaroja P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke[J]. J Clin Neurosci, 2009, 16(1):12-20.

[5] 周维金, 孙启良. 瘫痪康复评定手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006:11-12, 46-50, 120-121.

[6] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(1):6-13.

[7] 叶英, 万美荣, 戴如飞, 等. 脑脊液诱导人问充质干细胞定向分化为神经干细胞神经前体细胞的研究[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2009, 30(5):394-398.

[8] Kamei N, Tanaka N, Oishi Y, et al. Bone marrow stromal cells promoting corticospinal axon growth through the release of humoral factors in organotypic cocultures in neonatal rats[J]. J Neurosurg Spine, 2007, 6(5):412-419.

[9] Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, et al. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model[J]. Mol Ther, 2004, 9(2):189-197.

[10] Zacharek A, Shehadah A, Chen J, et al. Comparison of bone marrow stromal cells derived from stroke and normal rats for stroke treatment[J]. Stroke, 2010, 41(3):524-530.

[11] 詹三华, 张鲁峰, 姚卫民, 等. 骨髓间充质干细胞治疗急性脑梗死患者 60 例[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(10):2189-2190.

[12] Lu J, Moomchhala S, Moore XL, et al. Adult bone marrow cells differentiate into neural phenotypes and improve functional recovery in rats following traumatic brain injury[J]. Neurosci Lett, 2006, 398(1-2):12-17.

[13] Liu N, Deguchi K, Yamashita T, et al. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells ameliorates tissue plasminogen activator-induced brain damage after cerebral ischemia in mice detected by in vivo and ex vivo optical imaging[J]. J Neurosci Res, 2012, 90(11):2086-2093.

[14] Sun B, Feng M, Tian X, et al. DL-3-n-Butylphthalide protects rat bone marrow stem cells against hydrogen peroxide-induced cell death through antioxidation and activation of PI3K-Akt pathway[J]. Neurosci Lett, 2012, 516(2):247-252.

(修回日期:2014-03-13)  
(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

2014 年现代假肢矫形器新技术论坛会讯

2014 年现代假肢矫形器新技术论坛拟于 2014 年 7 月 25 至 27 日在福建省福州市召开。本次会议的目的在于推广现代假肢矫形器新技术。会议由中国康复医学会康复治疗专业委员会、香港义肢矫形师学会共同主办,福建省康复医学会、福建漳州肢残康复中心、伊贝欧力假肢矫形器技术(漳州)有限公司协办。会议将邀请国内外知名专家主讲,内容包括现代假肢矫形器新技术的临床应用等。

欢迎广大从事康复医学、矫形外科、神经科、儿科等相关临床科室工作的医生、治疗师、假肢矫形器师、护士积极参会。欢迎民政、残联系统各级肢残康复医疗机构及假肢矫形器中心等单位的医生、假肢矫形器或康复辅具适配专业技术人员参加。

联系人:胡耀全;联系电话:0596-2961553, 13906945202; Email: zckangfu@126.com。

中国康复医学会康复治疗专业委员会