

• 临床研究 •

抗胸腺细胞球蛋白联合脐带间充质干细胞 治疗重型再生障碍性贫血 1 例

王方方¹ 顾健¹ 何斌¹ 谢晓艳¹

【摘要】 目的:探索脐带间充质干细胞(UC-MSCs)与抗胸腺细胞球蛋白(ATG)联合治疗重型再生障碍性贫血患者的可行性、安全性和作用机制。**方法:**采用 UC-MSCs 联合 ATG 治疗 1 例重型再生障碍性贫血 I 型,观察血常规、网织红细胞、骨髓细胞学变化,采用流式细胞仪检测干扰素(IFN)- γ 、调节 T 细胞(Treg)变化。**结果:**UC-MSCs 输注后 2 周,患者血细胞计数、网织红细胞计数开始上升,骨髓增生活跃,粒系和红系增生,输血间隔时间延长至每 11~12 d 1 次,IFN- γ 水平下降,Treg 细胞水平上升;无呼吸道感染及肝肾功能异常。**结论:**UC-MSCs 与 ATG 联合治疗有利于促进再生障碍性贫血患者骨髓造血能力的恢复,无不良反应发生。

【关键词】 贫血,再生障碍性;脐带间充质干细胞;抗胸腺细胞球蛋白;造血功能

【中图分类号】 R556.5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1004-2806(2013)07-0450-03

Effect of antithymocyte globulin and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on patients with severe aplastic anemia

WANG Fangfang GU Jian HE Bin XIE Xiaoyan

(Institute of Hematology, the Subei People's Hospital, Yangzhou, 225001, China)

Corresponding author: GU Jian, E-mail: maolujiu918@yahoo. com. cn

Abstract Objective: To study the effect of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) combined with antithymocyte globulin (ATG) on patients with severe aplastic anemia (SAA). **Method:** A patient of SAA-I was treated with ATG and UC-MSCs. Blood cell count, reticulocyte and marrow hyperplasia were performed. Flow cytometry was used to determine IFN- γ and regulatory T cells (Treg). **Result:** The blood cell count, reticulocyte and Treg of the patient elevated, bone marrow hyperplasia became more active than before, the interval time of blood transfusion extended and the level of IFN- γ descended. There was no respiratory infection, abnormality of the hepatic and renal function. **Conclusion:** ATG and UC-MSCs can improve the hematogenesis of bone marrow in aplastic anemia without obviously adverse reaction.

Key words aplastic anemia; umbilical cord-derived mesenchymal stem cells; antithymocyte globulin; hemato-poiesis

再生障碍性贫血(aplastic anemia, AA)是一种由免疫因素介导的骨髓衰竭性疾病,以全血细胞减少、骨髓增生减低和输血依赖为特征,目前认为其发病与 T 淋巴细胞的异常活化有关^[1]。因此,AA 的治疗关键是抑制 T 淋巴细胞的活化与增殖,目前选择强化免疫抑制治疗是促进 AA 患者造血恢复的常用手段。然而,免疫抑制疗法存在治疗时间长、起效慢及部分患者治疗无效等问题,需要寻找新的治疗途径。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)输注可能是一个很好的选择。MSCs 是骨髓造血微环境的重要组成部分,不仅具有造血支持作用,还具有免疫抑制作用。陈新等^[2]研究发现,人脐带间充质干细胞(umbilical cord-derived

MSCs, UC-MSCs)在体外对 AA 患者 T 淋巴细胞具有免疫调节作用。本文对 1 例重型再生障碍性贫血(severe aplastic anemia, SAA) I 型患者在抗胸腺细胞球蛋白(ATG)方案的基础上联合 UC-MSCs 治疗,取得了较好的效果,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料

患者,男,20 岁,学生,因鼻腔、牙龈出血 4 d 入院。入院时血常规:WBC $1.6 \times 10^9/L$,中性粒细胞 29.9% (绝对值 $0.48 \times 10^9/L$),淋巴细胞 66.7% (绝对值 $1.07 \times 10^9/L$),RBC $3.17 \times 10^{12}/L$,Hb 106 g/L,PLT $3 \times 10^9/L$;网织红细胞百分比 0.1%,绝对值 $0.005 \times 10^{12}/L$ 。2 次骨髓涂片示:增生度、粒、红系增生均重度减低,巨核细胞未见,淋巴细胞计数 96%,浆细胞 2%;骨髓活检示:增生减低,脂肪细胞增多,粒红系增生减低,全片巨核细

¹江苏省苏北人民医院血液科 扬州市血液学研究所(江苏扬州,225001)
通信作者:顾健, E-mail: maolujiu918@yahoo. com. cn

胞少见。诊断 SAA-I 型。立即给予 ATG(兔源性)3 mg/(kg·d)×5 d,环孢菌素 5 mg/(kg·d),粒细胞集落刺激因子(G-CSF)300 μg/d,促红细胞生成素 6 000 μ/d 和白细胞介素(IL)-11 3 mg/d。为预防 ATG 血清学反应,同时口服甲泼尼龙。该方案治疗 2 个月后,患者骨髓增生度仍减低,血常规无改善。加用 UC-MSCs 输注(由江苏泰州北科干细胞库提供),G-CSF 维持 200 μg/d×10 d,100 μg/d×10 d,100 μg qd 至出院。UC-MSCs 治疗 2 周后,患者头昏乏力症状减轻,WBC 计数开始上升,骨髓常规示增生度活跃,输血间隔时间延长 2~4 d。

1.2 治疗方案

ATG 3 mg/(kg·d)×5 d,环孢菌素 5 mg/(kg·d),2 个月后加用 UC-MSCs 1×10⁶/kg,q2w,iv,gtt,共 2 次。输注前常规给予地塞米松、异丙嗪。以血细胞和网织红细胞计数、干扰素(IFN)-γ 水平、调节 T 细胞(Treg 细胞)比例、骨髓增生度、肝肾功能、输血间隔时间等作为疗效和安全性评价指标。

2 结果

UC-MSCs 输注后观察 2 个月发现,患者 WBC、中性粒细胞、RBC、Hb、PLT 和网织红细胞计数升高,输血时间延长了 2~4 d(表 1)。此外,UC-MSCs 输注后患者骨髓增生度活跃(图 1a~d),Treg 细胞增加,IFN-γ 水平降低(表 1),无感染发生和肝肾功能异常。

3 讨论

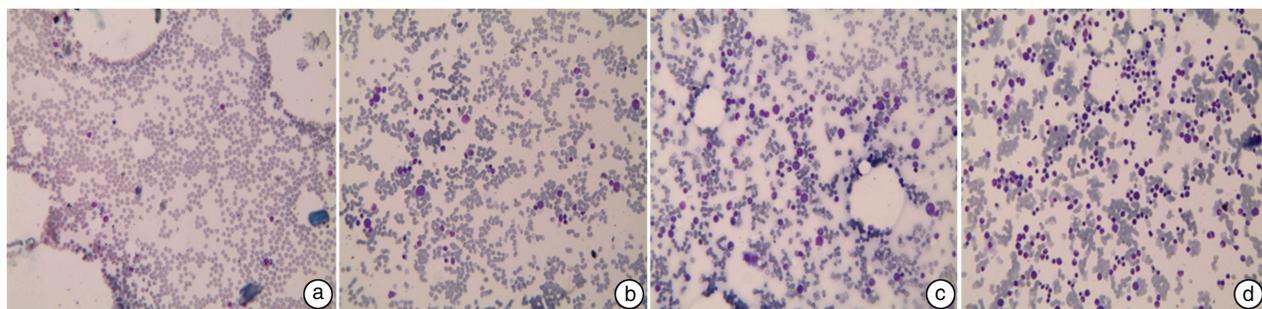
关于 AA 的发病机制,目前普遍认为这是由于 T 淋巴细胞异常活化致骨髓微环境紊乱,损伤造血干

细胞。近年有研究发现,AA 患者的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)体外造血支持作用显著降低,提出造血支持作用和免疫抑制能力减低可能与患者 BMSCs 的增殖能力降低及分泌干细胞因子减少有关。因此,国内很多学者进行了 MSCs 治疗 AA 方面的实验研究。李佩恩等^[3]采用 MSCs 治疗 AA 小鼠,发现小鼠股骨病理切片中脂肪细胞比例明显低于 AA 模型组,提示 MSCs 可能通过调控免疫细胞影响 AA 小鼠骨髓造血功能。MSCs 除了促进骨髓造血功能外,还能抑制 AA 患者造血负调控因子 IFN-γ 的分泌,增加 AA 患者 Treg 细胞比例^[2-6]。

本文采用 ATG 联合 UC-MSCs 治疗 1 例 SAA 患者,于 ATG 治疗 2 个月后输注 UC-MSCs,以血细胞计数、网织红细胞计数、骨髓增生度和输血间隔时间判断患者的造血功能情况;以 IFN-γ 水平和 Treg 细胞比例了解 UC-MSCs 对 AA 治疗的作用机制。结果发现,ATG 治疗 AA 的起效慢,血细胞计数上升不明显,伴感染和口腔、皮肤出血。研究发现,ATG 治疗后 2 个月输注 UC-MSCs,输注后 2 周观察到血细胞和网织红细胞计数开始上升,骨髓增生度活跃,输血间隔时间延长,临床感染次数未增加。该例患者血清中升高的造血负调控因子 IFN-γ 在 UC-MSCs 输注后下降,Th1/Th2 比例趋于正常;Treg 细胞比例明显上升。说明 UC-MSCs 能促进骨髓造血功能恢复,与高颀等^[7]研究结果一致。Treg 细胞是一类重要的免疫调节细胞,目前研究认为 MSCs 抑制淋巴细胞是通过增高的 Treg 细胞来实现的。我们的研究结果初步证明,UC-MSCs 治疗 AA 的机制与抑制负调控因子生成及

表 1 UC-MSCs 治疗前后输血间隔时间、Th1/Th2 及 Treg 细胞变化

组别	RBC/d	PLT/d	Th1/Th2			Treg 细胞/%
			IFN-γ/%	IL-4/%	IFN-γ/IL-4	
治疗前	5~10	3~7	6.6	0.6	11.0	4.8
治疗后 15 d	9~12	9~11	6.1	0.7	8.7	10.8
治疗后 1 个月	9~12	9~11	6.0	0.6	10.0	11.0



a: 治疗前;b: 治疗后 15 d;c: 治疗后 1 个月;d: 治疗后 2 个月。

图 1 UC-MSCs 治疗前后骨髓增生度变化

使机体清除抗白血病细胞的能力减弱有关。AML 患者达到缓解后,免疫系统对肿瘤的监视和清除是维持缓解状态的重要因素之一。但 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数量的增高,使免疫系统对机体的白血病细胞清除功能下降,引起其不断增殖,患者复发白血病。Szczepanski 等^[9]的研究表明,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞调节的数量在急性白血病患者中增加,而且数量较高的患者对常规化疗不敏感,数量较低的患者通常可以达到缓解。有研究表明,AML 患儿的 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞数量高于健康儿童,并且与疾病的危险度和治疗的效应有一定的关系^[10]。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的表达是否可以作为 AML 患者缓解后复发预测的一个指标,有待于更进一步的研究和跟踪。

迄今为止,CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞与白血病细胞的相互关系尚未明了。CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞促进机体对肿瘤细胞的低反应性,提供了肿瘤细胞免疫逃逸的内环境。相反,白血病细胞是否对 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的数量增多和功能活化起作用以及如何起作用,有待于进一步研究。

参考文献

[1] 徐文鑫,翁开枝. 免疫细胞在白血病免疫治疗应用中的研究进展[J]. 医学综述,2006,12(12):739-742.
 [2] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2007:131-133.
 [3] WANG X, ZHENG J, LIU J, et al. Increased population of CD4(+)CD25(high), regulatory T cells with

their higher apoptotic and proliferating status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients[J]. Eur J Haematol,2005,75:468-476.

[4] BEYER M, KOCHANNEK M, DARABI K, et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4⁺CD25 high regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine [J]. Blood,2005,106:2018-2025.
 [5] 张帆,徐菁,朱镭. 血液系统恶性肿瘤患者 CD4⁺CD25⁺调节性 T 细胞的变化及意义[J]. 山西医科大学学报,2007,38(12):1106-1108.
 [6] RALAINIRINA N, POLI A, MICHEL T, et al. Control of NK cell functions by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells[J]. J Leukoc Biol,2007,81:144-153.
 [7] 陆春伟,佟海侠,陆美言. 急性白血病患者外周血淋巴细胞亚群和调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2010,18(11):2230-2233.
 [8] 杨云,何爱丽,张王刚,等. 急性白血病患者调节性 T 细胞的检测及临床意义[J]. 临床血液学杂志,2010,23(3):71-73.
 [9] SZCZEPANSKI M J, SZAINIK M, CZYSTOWSKA M, et al. Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia[J]. Clin Cancer Res,2009,15:3325-3332.
 [10] 张爱梅,翟志敏,王宁玲,等. CD4⁺CD25 高表达调节性 T 细胞与儿童急性淋巴细胞白血病的关系[J]. 白血病. 淋巴瘤,2008,17(4):267-270.

(收稿日期:2012-12-26)

与临床康复,2009,13(40):7908-7912.

[3] 李佩恩,吴秉毅,李真慧,等. 间充质干细胞可能通过调控免疫细胞促进再生障碍性贫血小鼠骨髓的造血功能[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(5):987-990.
 [4] 夏云金,高清平,万楚成,等. 肝细胞生长因子对 ALL 小鼠骨髓移植后 GVHD 和血清 Th1/Th2 相关细胞因子的影响[J]. 中国实验血液学杂志,2005,13(1):35-38.
 [5] 刘增慧,肖扬,蒋祖军,等. 骨髓间充质干细胞上调再生障碍性贫血患者 CD4+CD25+Foxp3+调节性 T 细胞的临床研究[J]. 实用医学杂志,2011,27(9):1582-1585.
 [6] 柴晔,刘瑛,孙媛媛,等. 人脐带间充质干细胞对再生障碍性贫血患者 Treg 细胞的影响[J]. 中国免疫学杂志,2011,27(9):837-839.
 [7] 高颯,肖扬,蒋祖军,等. 骨髓间充质干细胞治疗再生障碍性贫血的疗效及安全性[J]. 广东医学,2010,31(21):2797-2800.

(收稿日期:2013-01-08)

(上接第 451 页)

升高 Treg 细胞水平有关。治疗过程中,患者未出现肝肾功能、体温、消化道等异常反应,说明 UC-MSCs 输注是安全的。

脐带中具有相当数量的造血干细胞和丰富的 MSCs,其具有易获得性、扩增性、自我复制和多向分化潜能,ATG 联合 UC-MSCs 输注可加强 ATG 的免疫抑制作用,有利于促进造血功能恢复,展示了良好的研究和应用前景。UC-MSCs 有可能成为治疗 SAA 的一种有效可行的细胞治疗方法,但其远期疗效和安全性有待观察更多的病例进一步证实。

参考文献

[1] KAITO K, OTSUBO H, USUI N, et al. Th1/Th2 lymphocyte balance in patients with aplastic anemia [J]. Rinsho Byori,2004,52:569-573.
 [2] 陈新,华建媛,石庆之. 人脐带间充质干细胞对再生障碍性贫血 T 细胞的调节作用[J]. 中国组织工程研究