

· 临床经验 ·

脐带间充质干细胞治疗儿童造血干细胞移植后出血性膀胱炎 8 例观察

贾锐 杨晓凤 陆岩 吕乃武 刘福庆 张轶斌 王红梅 周金旭 刘心平 吕欣 林宁

(中国人民解放军第 463 医院细胞治疗中心, 辽宁 沈阳 110042)

[中图分类号] R726.9 [文献标识码] D [文章编号] 1008-8830(2012)07-0554-04

出血性膀胱炎(hemorrhagic cystitis, HC)是儿童异基因造血干细胞移植(hemotoic stem cell transplantation, allo-HSCT)术后主要并发症之一,可从镜下血尿、肉眼血尿发展到肾功能衰竭,直接影响移植成功率和患儿生存率。目前,HC 的发病原因仍未完全明确,缺乏针对性的预防和治疗措施,已知治疗方法有水化、碱化、利尿、膀胱冲洗及药物灌注等,难治性、致死性 HC 经常借助外科干预^[1]。以上各种治疗疗效并不十分理想,且部分治疗为侵袭性操作,患儿依从性差,同时也带来了出血及感染的风险,故临床上难以广泛推广。间充质干细胞是一种具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞,经静脉移植到体内后,会散在分布于各个组织和器官^[2],而当组织有炎症或者损伤时,会对这些炎症或者损伤所表达的因子应答,从而迅速归巢到炎症或者损伤部位^[3],发挥免疫调节及组织修复作用。我院细胞治疗中心在常规治疗基础上联合应用脐带间充质干细胞(umbilical cord-mesenchymal stem cells, UC-MSCs)静脉输注治疗 HC,取得较好疗效,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

2009 年 12 月至 2011 年 7 月共 31 例进行性肌营养不良症(muscular dystrophy, DMD)男性患儿接受 allo-HSCT 治疗,其中 8 例术后出现血尿,排除泌尿系统细菌和真菌感染及全身出血性疾病而确诊。患儿年龄 6~12 岁,中位年龄 9.8 岁。造血干细胞来源于无关供者脐带血 1 例,血缘关系外周血 3 例(父供子),血缘关系外周血+骨髓联合移植 4 例(父供子)。HLA 配型证实 8 例均为单倍体移植

(3/6~5/6)。见表 1。

1.2 预处理方案

移植患儿均采用环磷酰胺 90~100 mg/kg + 马利兰 6.4~7.0 mg/kg + 氟达拉滨 100~120 mg/m² 方案。

1.3 移植植物抗宿主病的预防

全部患儿均给予吗替麦考酚酯(MMF) + 他克莫司(FK-506) + 兔抗人胸腺细胞球蛋白(ATG)方案预防移植植物抗宿主病(GVHD)。

1.4 感染的防治与支持治疗

患儿移植前全面体检,拔除蛀牙,清除口腔、耳鼻、肛周等潜在感染灶。移植前 10 d 起口服氟康唑、复方新诺明(SMZ-CO)、氟哌酸。供、受者均检测巨细胞病毒抗原(CMV-Ag),阳性者予更昔洛韦治疗直至转阴。移植前 1~8 d 常规予更昔洛韦预防 CMV 感染,予阿昔洛韦静脉滴注预防病毒感染,静脉用丙种球蛋白每日 2.5~5.0 g,连用 7 d,以预防感染,移植后 1 d 起用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)每日 5~7 μg/kg 皮下注射直到白细胞(WBC) > 4 × 10⁹/L 并稳定 3 d 后停药。当血红蛋白(Hb) < 70 g/L 输注洗涤红细胞,当血小板(PLT) < 20 × 10⁹/L 输注机采 PLT,所有血制品均经铯 137(¹³⁷Cs)照射 25~50 Gy 后输注。

1.5 HC 的预防

移植患儿充分水化、碱化,预处理阶段补液量达每日 2.5~3.0 L/m²(碱化液占 1/3),保持尿 pH > 8.0,强迫利尿,使尿量达到 100~150 mL/h,在使用环磷酰胺的同时和其后 3 h、6 h、9 h 给予美斯钠,总剂量为环磷酰胺的 120%~160%。

1.6 HC 的诊断、分度与分型

诊断依据参照文献^[4]:(1)不同程度的肉眼血尿;

[收稿日期]2012-12-06;[修回日期]2012-03-16
[作者简介]贾锐,男,主治医师。

(2)伴有尿频、尿急、尿痛、排尿不畅等症状;(3)尿细菌及真菌培养均为阴性;(4)除外细菌性膀胱炎、血管内溶血及败血症等疾病。按文献标准,HC 分为4 度^[4]:镜下血尿为Ⅰ度,肉眼血尿为Ⅱ度,肉眼血尿伴血块为Ⅲ度,肉眼血尿伴血块和尿道梗阻为Ⅳ度。Ⅰ~Ⅱ度为轻度,Ⅲ~Ⅳ度为重度。HC 按发生时间分为早发型(预处理结束的3 d 内发生)和迟发型(预处理结束3 d 后发生);按病程长短分为短暂型(HC 病程≤7 d)和持续型(HC 病程>7 d)。

1.7 HC 发病情况

31 例 allo-HSCT 患儿中,8 例(26%)发病。发病时间为移植前2 d 至移植后50 d(平均22.1 d),其中Ⅱ度2 例,Ⅲ度5 例,Ⅳ度1 例。早发型3 例,迟发型5 例。病程平均持续25.4(12~40)d,均为持续型。4 例患儿伴随Ⅱ~Ⅳ度GVHD,2 例患儿伴随CMV 感染。见表1。

1.8 UC-MSCs 治疗

1.8.1 UC-MSCs 制备 经解放军第463 医院伦理委员会批准,所用脐带来源于足月剖宫产健康孕妇。采集前产妇需做乙肝、丙肝、梅毒、HIV、支原体等检测,全部合格方可采集脐带。于我院细胞治疗中心实验室(经GMP 认证)无菌工作环境下,应用改良酶原消化法^[5]进行UC-MSCs 分离及培养,去脐带羊膜,取华尔通胶,剪碎成0.5~1.5 mm³的组织块,加入Ⅳ型胶原酶(1.0 g/L),置37℃恒温振荡培养箱振荡消化3 h 后,用80 目滤网过滤,将滤过的细胞悬液离心洗涤。用UltraCULTURE 无血清培养液混匀细胞,以1.0×10⁵/cm²接种于T 75 cm²培养瓶中,置于37℃、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养。制备的细胞贴壁后,每隔3~4 d 换液。融合至80%~90%传代培养,加入2.5 g/L 胰酶(含EDTA)消化,按1:2 或1:3 传代至T 175 cm²培养瓶中。第2 代脐带源贴壁细胞成骨定向诱导14 d,镜下见细胞间布满黑

色颗粒,大小不均一,提示有矿化基质沉积;脂肪定向诱导14 d 后,镜下细胞可见油红O 染色呈强阳性,倒置显微镜下可见细胞浆中含有脂肪空泡,提示培养细胞具有成脂和成骨分化能力。细胞消化后经台盼蓝染色分析细胞活力均>92%,病原微生物学检测均为阴性,流式细胞仪测定细胞表面标记CD105、CD73、CD90 阳性率>95%,CD45、CD34、CD14、CD79、HLA-DR 等阳性率<2%。

1.8.2 UC-MSCs 应用方法 所用UC-MSCs 为第2~4 代细胞,因其不表达CD14、CD34、CD11a、CD31、CD45 及HLA-Ⅱ类抗原,不表达或低表达HLA-I 类抗原及移植排斥相关表面标记CD80、CD86、CD40、CD40L,无免疫原性,同种异体间输注无排斥反应,故无需配型及进行抗排斥相关处理。患儿确诊HC 后即给予UC-MSCs 外周静脉输注,输注时间不少于30 min,每周1 次,直至血尿、尿痛症状改善后停用。8 例患儿共接受19 次UC-MSCs 输注治疗,输注3 次者4 例,输注2 次者3 例,输注1 次者1 例。单次输注细胞数量为0.61~2.27×10⁶/kg,平均每例患儿接受UC-MSCs 治疗剂量为(1.44±0.83)×10⁶/kg。见表1。

1.9 疗效观察

每日询问病史及体格检查,记录体温、症状、体征、尿量、尿色,每日1 次尿常规检查。

2 结果

2.1 疗效观察

本组8 例患儿全部治愈,尿路刺激症状消失时间为治疗后16.5 d(8~30 d),肉眼血尿消失时间为治疗后20.3 d(12~35 d),镜下血尿消失时间为治疗后25.4 d(12~40 d)。见表1。

表 1 8 例 allo-HSCT 患儿并发 HC 治疗前后的临床资料

病例	年龄 (岁)	移植类型	HLA 配型	GVHD	CMV	HC 发病 时间	病情	病程(d)	MSCs 输 注次数	MSCs 输注量 (×10 ⁶ /kg)	症状消失 时间(d)	肉眼血尿消 失时间(d)
例 1	8	脐血	5/6	Ⅳ	+	+49 d	Ⅲ	16	2	2.67	8	12
例 2	12	外周血	4/6	无	-	-1 d	Ⅲ	30	3	4.44	17	20
例 3	11	外周血	4/6	无	-	+2 d	Ⅱ	22	2	2.42	12	16
例 4	6	外周血+骨髓	3/6	Ⅱ	+	+43 d	Ⅲ	29	3	4.56	21	24
例 5	8	外周血+骨髓	3/6	无	-	+20 d	Ⅱ	23	2	2.71	15	18
例 6	10	外周血	4/6	Ⅲ	-	+16 d	Ⅳ	40	3	4.05	30	35
例 7	11	外周血+骨髓	4/6	无	-	-2 d	Ⅲ	31	3	6.82	20	25
例 8	12	外周血+骨髓	3/6	Ⅱ	-	+50 d	Ⅲ	12	1	0.61	9	12

2.2 安全性观察

所有患儿输注 UC-MSCs 后,均无发热、皮疹等过敏反应,伴随 GVHD 的 4 例患儿未出现 GVHD 相关病情加重。治疗后患儿多次进行乙肝、丙肝、梅毒、HIV 等传染性疾病相关检测,均无异常。

2.3 随访情况

8 例患儿治疗后中位随访时间为 172 d (70 ~ 520 d),无一例出现膀胱炎复发。除例 1 患儿因出现肺部严重感染于移植后 152 d 转至外院而失访,其余 7 例均病情平稳。

3 讨论

尽管已采取多种预防措施,HC 仍是儿童造血干细胞移植术后常见的并发症。关于 HC 在儿童患者中的发病率,国内鲜有大样本的统计数据,国外 Hale 等^[6]报道 245 例儿童(骨髓转移)中 HC 发生率为 11.0% (27/245),与 Seber 等^[7]报道的成人发病率(10.9%)接近。早期 HC 主要是由于预处理使用环磷酰胺,尿道及膀胱黏膜与环磷酰胺代谢产物丙烯腈接触后发生组织学改变,引起黏膜损伤、出血,同时引起膀胱纤维化。Hassan 等^[8]研究表明马利兰 + 环磷酰胺应用时,体内谷胱甘肽和 P450 显著减少,两种药物体内代谢减慢,药物积聚,增加了 HC 的发生率。本组病例的 HC 发生率为 26%,明显高于上述文献所报道,分析可能原因如下:(1)本组病例预处理方案单一,且均以马利兰 + 环磷酰胺为主要药物。(2)本组病例多为亲缘供者 HSCT,且均为单倍体。而文献中以自体 HSCT 和亲缘全相合供者 HSCT 为主,而己知自体 HSCT 受者的 HC 发生率显著低于异基因 HSCT,而异基因 HSCT 中单倍体 HSCT 受者 HC 的发生率又高于亲缘全相合 HSCT 受者。(3)移植患儿中位年龄 9.8 岁,已有研究证明受者移植年龄 ≥ 6 岁为 HC 发生的主要危险因素^[9]。

Lee 等^[10]回顾性分析 210 例 allo-HSCT 患者,认为重度 GVHD 及病毒感染是迟发型 HC 最重要的危险因素。可能的原因有:(1)GVHD 可以破坏实质器官内皮细胞,从而引起多个器官的损伤,而膀胱是 GVHD 的一个重要靶器官,受者膀胱尿路上皮细胞,尤其是表达病毒抗原的细胞更易遭到供者淋巴细胞的攻击。因此,GVHD 可以直接导致 HC 的发生。(2)治疗 GVHD 时免疫抑制剂的应用,使免疫重建延缓,从而引起腺病毒、多瘤病毒、巨细胞病毒等的感染或激活,HC 发生率明显增加^[11]。本组资料 5 例迟发型 HC 中有 4 例合并 GVHD,2 例合并

CMV 感染,进一步证实 GVHD 及病毒感染与 HC 的密切联系。

在机体正常的组织损伤修复过程中,MSCs 在组织损伤引起的特殊信号作用下迁徙至损伤部位,在局部增殖,并根据不同的损伤信息沿着不同的途径分化^[12]。MSCs 通过两种功能发挥促组织再生作用:(1)在局部微环境作用下,定向分化为某一特定类型功能细胞,直接参与组织损伤修复过程;(2)分泌多种生物活性物质,包括细胞因子和细胞生长因子等,以改善组织损伤部位微环境,促进宿主组织中残存的干/祖细胞增殖分化,间接参与组织修复过程。MSCs 改善组织再生微环境,表现为细胞所分泌的生物活性物质具备的多种功能,包括:(1)趋化周围的宿主干/祖细胞迁徙至损伤部位;(2)促进干/祖细胞的增殖分化;(3)抑制受损细胞凋亡;(4)促进毛细血管发芽,加速血管新生;⑤激活周围细胞金属蛋白酶活性,抑制瘢痕及纤维化形成;⑥调节免疫细胞功能,抑制炎症反应。基于以上特性,MSCs 可促进膀胱黏膜再生,减轻 HC 引发的炎症反应及组织纤维化,达到治疗目的。Ringden 等^[13]用 MSCs 治疗了 7 例造血干细胞移植后并发 II ~ IV 度出血性膀胱炎成人病例,MSCs 大部分来自 HLA 不相合或半相合的第三方供者,通过静脉输注,中位细胞数为 $1 \times 10^6/\text{kg}$ ($0.7 \times 10^6/\text{kg} \sim 2 \times 10^6/\text{kg}$),其中 5 名患者在输注 MSCs 后 HC 得到控制,1 名患者的膀胱中被证实了 MSCs 供者 DNA 的存在。本研究将 MSCs 应用于儿童,同样证实了 MSCs 的疗效,且中位输注数量 ($1.44 \times 10^6/\text{kg}$) 也与文献接近。

上述文献所用 MSCs 均来源于骨髓,本组病例应用脐带来源的 MSCs 取得了更佳的疗效。目前已经证实,脐带来源的 MSCs 具有典型的 MSC 特点和遗传稳定性,相对于骨髓,更具有组织来源丰富、细胞原始、增殖能力强和安全无病毒感染风险等优点,人脐带 MSCs 目前可稳定地在体外分离,并且扩增迅速,无来源及数量上的限制,可为今后临床应用需求提供更为理想的种子细胞。

综上所述,UC-MSCs 的应用为儿童 HSCT 术后中、重度 HC 的治疗提供了另一种安全、有效、便捷的方法。虽然目前对于 MSCs 治疗 HC 的经验仅限于少数个别病例,并且缺乏对照,但临床已经看到了显著的疗效。相信随着研究的进一步深入,MSCs 将会有更广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

[1] 唐晓文,刘一之,朱晓黎,徐静,仇惠英,马骁,等. 选择性双侧

髓内动脉栓塞治疗异基因造血干细胞移植术后重度出血性膀胱炎[J]. 中华器官移植杂志, 2006, 27(6): 345-347.

[2] Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(11): 4857-4861.

[3] Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3307-3318.

[4] Brugieres L, Hartmann O, Travagli JP, Benhamou E, Pico JL, Valteau D, et al. Hemorrhagic cystitis following high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation in children with malignancies: incidence, clinical course, and outcome[J]. J Clin Oncol, 1989, 7(2): 194-199.

[5] 尹富华, 杨晓凤, 黄胜男, 闫杨, 孙斌, 李晓敏, 昌广萍, 等. 脐带间充质干细胞3种分离制备方法的比较[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(6): 413-414.

[6] Hale GA, Rochester RJ, Heslop HE, Krance RA, Gingrich JR, Benaim E, et al. Hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplantation in children: clinical characteristics and outcome [J]. Bio Blood Marrow Transplant, 2003, 9(11): 698-705.

[7] Seber A, Shu XO, Defor T, Sencer S, Ramsay N. Risk factors for severe hemorrhagic cystitis following BMT [J]. Bone Marrow Transplant, 1999, 23(1): 35-40.

[8] Hassan M, Ljungman P, Ringden O, Hassan Z, Oberg G, Nilsson C, et al. The effect of busulphan on the pharmacokinetics of cyclophamide and its 4-hydroxy metabolite: time interval influence on therapeutic efficacy and therapy-related toxicity [J]. Bone Marrow Transplant, 2000, 25(9): 915-924.

[9] 徐宏贵, 方建培, 黄绍良, 周敦华, 陈纯, 黄科, 等. 儿童造血干细胞移植后出血性膀胱炎: 临床特征与危险因素[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(8): 1596-1600.

[10] Lee GW, Lee JH, Choi SJ, Kim S, Seol M, Kin WK, et al. Hemorrhagic cystitis following allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. J Korean Med Sci, 2003, 18(2): 191-195.

[11] Nevo S, Enger C, Swan V, Wojno KJ, Fuller AK, Altomonte V, et al. Acute bleeding after allogeneic bone marrow transplantation: association with graft versus host disease and effect on survival [J]. Transplantation, 1999, 67(5): 681-689.

[12] 杨晓凤, 张素芬, 郭子宽. 干细胞应用新技术 [M]. 北京: 军事医学出版社, 2010: 173-179.

[13] Ringden O, Uzunel M, Sundberg B, Lonnies L, Nava S, Gustafsson J, et al. Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon [J]. Leukemia, 2007, 21(11): 2271-2276.

(本文编辑: 王庆红)

· 消息 ·

庆祝中国当代儿科杂志创刊十五周年大会暨当代儿科论坛征文通知

为庆祝中国当代儿科杂志成立十五周年, 我刊与中南大学湘雅医院和中国人民解放军医学会儿科学分会联合举办庆祝大会、编委会会议暨当代儿科论坛。本次会议拟定于2013年3月于湖南长沙召开, 届时将邀请国内外儿科学专家莅临, 就儿科专业的热点话题和最新动向作学术报告和现场交流; 同时我们将从本次会议征文中挑选中青年优秀论文进行大会发言, 且优秀论文将优先在《中国当代儿科杂志》刊登。参会者将获得国家级继续教育学分。

现开始征文, 与儿科各专业临床及实验研究有关的、未公开发表的论文均可投稿, 要求提供800字以内的结构式中文摘要。征稿截止日期: 2012年12月31日。

投稿需连同论文回执表一并投至本次会议邮箱: cjcp2013@163.com, 邮件主题为第一作者姓名。回执表可在本次会议网站下载, 网址: www.dangdaierke.com/page.asp?fld=2&id=123。联系人: 万静老师, 电话: 0731-84327402, 传真: 0731-84327922, 丁香客留言版: <http://i.dxy.cn/cjcp>。

欲知详情请登陆会议网站: www.dangdaierke.com。

《中国当代儿科杂志》编辑部
2012年3月