

人神经前体细胞移植治疗重度脑瘫患儿疗效观察

刘卫鹏 屈素清 栾佐 龚小军 汪兆艳

(海军总医院儿科,北京 100048)

[摘要] **目的** 观察人神经前体细胞(human neural progenitor cells, hNPCs)移植治疗重度脑性瘫痪(cerebral palsy, CP)患儿的临床疗效。**方法** 45例重度CP患儿自愿接受hNPCs移植治疗。取孕10~12周人胚胎脑细胞,经体外培养扩增为人神经干细胞球,在超声引导下经侧脑室穿刺注入患儿脑室。49例接受常规康复治疗的重度CP患儿作为对照组。**结果** 移植后疗效最早出现的1例患儿于术后3d睡眠、激惹、肌张力明显改善,大部分患儿于术后1个月出现明显改善,3~6个月疗效逐渐减缓。移植组患儿术后1年粗大运动、精细动作及认知发育水平均明显优于对照组。移植治疗后无1例患儿出现危及生命或导致患儿生活质量较术前下降的并发症,移植5年以上随访未见肿瘤发生。**结论** hNPCs移植治疗重度CP是一种新的、安全有效的方法,值得进一步研究探索。
[中国当代儿科杂志,2012,14(10):759-762]

[关键词] 神经前体细胞;移植;脑性瘫痪;儿童
[中图分类号] R651 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)10-0759-04

Treatment of cerebral palsy with transplantation of human neural progenitor cells

LIU Wei-Peng, QU Su-Qing, LUAN Zuo, GONG Xiao-Jun, WANG Zhao-Yan. Department of Pediatrics, Navy General Hospital, Beijing 100048, China (Luan Z, Email: luanzuo@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the clinical efficacy of transplantation of human neural progenitor cells (hNPCs) in the treatment of severe cerebral palsy (CP) in children. **Methods** Forty-five children with CP were voluntarily accepted transplantation of hNPCs. The cells obtained from the forebrain of 10 to 12-week-fetus were cultured and amplified into hNPCs. Then the hNPCs were injected into the cerebral ventricle of the patients with the supersonic guidance. **Results** Dyssomnia, irritability and muscular tension were improved in one patient 3 days after transplantation. The clinical improvements were observed in the majority of the patients 1 month after transplantation. The therapeutic effects slowed down 3 to 6 months after transplantation. One year after transplantation the gross and fine motor skills and the cognition ability in the transplantation group were considerably surpassed to those in the control group. No delayed severe complications were observed after transplantation. No tumorigenesis was noted 5 years after transplantation. **Conclusions** The transplantation of hNPCs as a novel therapy is effective and safe for severe CP. Many investigations are needed to evaluate the effect of the therapy.
[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14 (10):759-762]

Key words: Human neural progenitor cell; Transplantation; Cerebral palsy; Child

目前中国小儿脑瘫(cerebral palsy, CP)发病率为2.0‰~2.8‰^[1],这些患儿需要终身监护和治疗,根据Gross Motor Function Classification System(GMFCS)分级,Ⅳ级以上的重度CP患儿占有患儿的22%~34%,他们的生活质量更差,部分患儿甚至不能生活自理,而且这部分患儿康复训练困难,疗效十分有限^[2-3]。因此,CP患儿,尤其重度CP患儿迫切需要一种更有效的治疗措施,改善运动功能,提高生存质量,延长寿命。

20世纪80年代国内外研究机构即开始了细胞

移植治疗中枢神经系统难治性疾病的研究,并在动物实验及临床应用中治疗多种神经系统疾病,包括中风、脑外伤、帕金森病、亨廷顿病等,证实了细胞治疗的安全性及有效性^[4-7],我院应用人神经前体细胞(human neural progenitor cells, hNPCs)移植治疗皮质盲、重度新生儿缺氧缺血性脑病和一氧化碳中毒性脑病也取得了显著疗效^[8-10]。以上研究为重度CP患儿的治疗带来了希望。因此,自2005年5月至2006年5月我院对45名重度CP患儿进行了hNPCs移植治疗,现将治疗情况报道如下。

[收稿日期]2011-03-02;[修回日期]2012-06-02
[作者简介]刘卫鹏,女,硕士研究生,主治医师。
[通信作者]栾佐,主任医师。

1 资料与方法

1.1 研究对象

移植组来自2005年5月至2006年5月我院收治的45例重度CP患儿,其中男31例,女14例,年龄72 d至37个月(平均年龄12.99个月)。其中痉挛型脑瘫20例(四肢瘫17例,双瘫3例),不随意运动型10例,混合型10例,未分型5例(<6月龄)。MRI显示白质髓鞘化延迟和白质容积少者14例次,脑室周围白质软化9例次,脑实质多发软化9例次,基底节丘脑信号异常15例次,脑萎缩8例次,脑回移行异常1例次。均为重度脑损伤患儿,GMFCS分级在Ⅳ级以上,术前平均康复治疗时间6个月以上,无明显疗效。

对照组为2005年5月至2006年5月我院常规康复治疗的49例重度CP患儿,其中男32例,女17例,年龄75 d至40个月(平均年龄12.83个月),包括痉挛型脑瘫25例(四肢瘫20例,双瘫5例),不随意运动型9例,混合型10例,未分型5例(<6月龄)。MRI显示白质髓鞘化延迟和白质容积少14例次,脑室周围白质软化14例次,脑实质多发软化10例次,基底节丘脑信号异常11例次,脑萎缩9例次。均为重度脑损伤患儿,GMFCS分级在Ⅳ级以上,入组前平均康复治疗时间6个月以上。性别、年龄、脑瘫类型以及脑损伤类型构成与移植组比较差异无统计学意义。

所有观察患儿CP的诊断符合2005年全国小儿CP专题研讨会讨论通过的小儿CP的诊断标准^[11]:出生前到生后1个月内因各种原因所引起的脑损伤或发育缺陷所致的运动障碍及姿势异常;引起CP的脑损伤为非进行性;病变在脑部,症状在婴儿期出现,部分患儿合并智力障碍、癫痫、感知觉障碍及其他异常;除外进行性疾病所致的大脑运动障碍及正常小儿暂时性的运动发育迟缓。6月龄以下患儿自围产期发生脑损伤后,未中断康复治疗,较早出现严重神经伤残症状,CP诊断明确,但因年龄较小,两组各5例患儿分型不明确。

移植手术前,向患儿监护人交待细胞移植治疗的方法、细胞来源、分选培养的条件、安全性保障、手术风险、可能出现的不良反应等情况,签署知情同意书,法定监护人自愿要求手术治疗,提请我院伦理委员会和科学委员会讨论通过,在伦理委员会监督下完成治疗。

1.2 研究方法

1.2.1 供体的选择 对早期妊娠要求人工流产的孕妇,在自愿捐献胚胎组织的前提下,详细追溯家

族史,流行病史,遗传性疾病、染色体疾病、感染性疾病病原学筛查无异常,提请医院伦理学委员会讨论通过,并签署知情同意书和自愿捐献胚胎书。

1.2.2 hNPCs培养及鉴定 取孕10~12周水囊引产人胚胎脑组织,无菌条件下机械分散法制备成单细胞悬液,接种于T25培养瓶,接种活细胞量为每瓶 $5 \times 10^5/5$ mL。培养液添加表皮生长因子20 ng/mL + 白血病抑制因子10 ng/mL + 成纤维细胞生长因子10 ng/mL,于37℃,5% CO₂ 孵箱静置培养,每3.5 d换液1次,培养10 d时获取生长旺盛的细胞球,制成细胞悬液,调整细胞终浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,移植前,室温下留置5 min。术前行细胞培养微生物检测(无任何微生物污染,包括细菌、真菌、病毒、支原体等);干细胞染色体分析(核型正常,无染色体畸变);干细胞活性鉴定(活性>95%);内毒素检测(低于2 EU/mL);牛血清残余量检测(低于2 ng/mL);干细胞表面标志分析(hNPCs:CD133阳性率不低于40%,nestin阳性不低于90%)。

1.2.3 细胞移植 移植组患儿在基础麻醉状态下,囟门未闭患儿经前囟侧角,囟门已闭患儿经颅骨钻孔处,用美国库克公司22 G穿刺针,在彩色多普勒超声引导下侧脑室穿刺,缓慢注入胎脑来源hNPCs 7×10^6 个/mL,拔出穿刺针,贴膜包扎伤口。

1.2.4 基础治疗 两组患儿临床试验前后,包括观察期间行综合康复治疗。

1.2.5 观察方法 于术前及术后1年,采用根据CP患儿特点制定的统一调查问卷完成随访观察,无退出病例,并将两组病例随访的问卷进一步分析,以发育顺序及功能获得情况分设了不同功能阶段:大运动发育分为抬头、翻身、独坐、爬行、扶站、独走6个阶段;精细动作发育分为双手中线位活动、主动抓握、倒手、捏取、手眼协调5个阶段;认知能力发育分为认识亲人、懂得表情、会欢迎再见、会叫爸妈、懂简单名词、听懂简单指令、指示大小便、回答问题8个阶段;在调查问卷全部收回后,将移植组与对照组问卷进行第三方单盲分析,阶段功能完全获得1项记2分,功能部分获得1项记1分,未获得功能项记0分,以功能获得所得分数代表每个患儿功能发育水平,将两组进行对比。

1.3 统计学分析

采用SPSS 16.5进行统计学分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,功能获得评分比较采用重复测量单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 移植疗效

移植后疗效最早出现的1例患儿于术后3 d睡眠明显好转,哭闹明显减少,激惹好转,与人出现对视及视线追踪,扭转痉挛及角弓反张减轻。22例患儿在术后1个月左右出现疗效,4例皮质盲的患儿出现光感,并逐渐出现视线转移,恢复追视;康复训练效果不理想的患儿术后康复进步速度明显增快,头控增强,肌张力降低,异常姿势得到控制,肢体功能获得更多;24例合并智力障碍的患儿认知能力提高,对语言的理解和交流能力提高,能听懂简单指令,会看大人表情,语言发育加快。激惹状态改善10例,扭转痉挛明显减少11例,皮质盲改善5例,吞咽协调性改善6例,1例疗效出现较晚患儿在术后2~3个月之间逐渐出现疗效。术后3~6个月疗效呈减缓趋势,但无一例患儿疗效倒退或消失。

2.2 两组患儿随访发育水平比较

所有CP患儿观察随访1年,两组各功能情况在观察入组时差异无统计学意义,1年后移植组患儿的大运动、精细运动和认知发育水平均高于对照组。与术前比较,移植组1年后患儿的发育水平有明显改善;对照组1年后患儿的发育水平也有明显改善,但改善幅度较小(表1)。

表1 两组患儿1年前后发育水平的比较 (功能得分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	粗大运动	精细运动	认知能力
对照组				
入组前	49	1.4 ± 1.3	1.3 ± 1.8	2.0 ± 2.4
1年后	49	3.9 ± 2.3 ^b	2.5 ± 1.9 ^b	4.1 ± 2.9 ^b
移植组				
移植前	45	1.4 ± 1.3	1.3 ± 1.9	2.0 ± 2.5
术后1年	45	5.7 ± 2.9 ^{a,b}	5.2 ± 2.9 ^{a,b}	7.6 ± 4.8 ^{a,b}

a:与同时时间点对照组比较, $P < 0.01$; b:与同组1年前比较, $P < 0.01$

2.3 并发症与不良反应

45例移植患儿中有1例在穿刺过程中出现颅内出血,表现为术后低热,出现右侧面瘫,2周后症状消失,未遗留后遗症;6例患儿术后出现无菌性发热,持续时间1~7 d;对于合并大脑异常放电的患儿,无明显增加或减轻作用,尚在进一步观察中。对所有移植患儿进行了长期随访,术后5年复查头颅MRI未发现神经系统占位及肿瘤发生情况,无患儿出现功能倒退现象。

3 讨论

近年大量临床研究发现,hNPCs在多种神经系统疾病治疗方面具有较好的疗效。首先,hNPCs进入宿主体内通过释放的一些神经营养因子,包括GDNF、NT-3、BDNF及NGF等^[12-14],以及调节局部免疫反应^[15-17]和抑制星形胶质细胞瘢痕形成,改善局部微环境,明显促进内源性神经干细胞的增殖、迁移和神经发生^[17-18]。其次,移植的hNPCs能够促进宿主神经轴突的再生^[19],研究证实hNPCs释放的多种神经营养因子均具有促进神经轴突再生的作用^[20]。再次,中枢神经系统各突触之间的效能并不相同,存在一定比例的静息突触,这些突触具有正常的解剖结构,只是由于突触前膜不能释放神经递质或突触后膜缺乏相应的受体而处于静息状态^[21-22],研究显示静息突触在一定条件下可转化为有功能的突触;神经营养因子如NGF、BDNF等能够调节突触效能,促进神经递质的释放,在静息突触向功能突触转化的过程中发挥重要的作用^[23-25]。最后,hNPCs进入宿主体内,与宿主细胞结构上整合,建立突触连接,并可分化为多种神经细胞,替代损失神经细胞部分功能。

本研究显示1例患儿在术后3 d即有明显疗效,多数在1个月内出现疗效,仅有1例患儿是在2个月时出现疗效,3个月后疗效有减缓趋势,但无一例出现疗效倒退现象。细胞移植的效果在这么短的时间内出现,推测其主要机理是hNPCs通过分泌神经营养因子快速激活了宿主脑组织的自身修复及静息突触连接,这与Seledtsov等^[26]细胞治疗CP疗效观察的结果相同。本研究中,移植组与对照组患儿均为重度CP患儿,在病因、疾病类型和功能水平上无明显差异,康复治疗效果差。移植组患儿自愿接受细胞移植治疗,在为期1年的观察期结束时,功能改善及发育水平明显优于对照组,证明hNPCs移植能够有效提高CP患儿的智力认知水平,改善和提高粗大和精细运动功能。

国外的很多临床研究是采用经脑损伤部位或蛛网膜下腔进行细胞移植^[26-27],本研究选择脑室作为移植途径,主要是考虑到CP患儿的脑损伤为双侧半球多部位损伤,并不局限在某一特定区域,临床多部位移植损伤大,操作复杂,难以实现,而脑室移植只需一次穿刺,植入脑室的神经干细胞能从脑室室管膜下区,沿胼胝体、外囊向外迁移至全脑,并到达损伤区发挥疗效,另外,脑室内移植神经干细胞接近室

管膜区,如前所述,更利于与内源性神经干细胞相互作用,提高移植效率^[28]。而且侧脑室穿刺为儿科常规有创操作之一,方法成熟,操作简单,颅内出血的风险较小。本组病例中1例出现颅内出血,出血量少,保守治疗后迅速好转。术后6例患儿出现无菌性反应性发热,考虑与培养基物质随移植细胞进入脑脊液有关,在采集和收获细胞过程中增加清洗细胞的次数,并保证细胞活性及收获率后,发热病例逐渐减少。

本研究对45例移植患儿进行12个月以上的远期随访观察,无1例出现临床倒退现象,有效患儿部分功能改善后,在移植作用减缓后,也未出现倒退现象。移植治疗后目前无1例患儿出现危及生命或导致患儿生活质量较术前下降的并发症,移植5年以上患儿复查头颅MRI,未见颅内占位及肿瘤形成。因此,hNPCs移植治疗CP是一种有效的、全新的、安全的方法,将为小儿脑损伤的治疗开辟一片新的天地。

[参 考 文 献]

[1] 沈晓明,王卫平. 儿科学[M]. 第7版. 北京:人民卫生出版社, 2008;373.

[2] Blair E. Epidemiology of the cerebral palsies[J]. Orthop Clin North Am, 2010, 41(4): 441-455.

[3] Madhavan L, Daley BF, Paumier KL, Collier TJ. Transplantation of subventricular zone neural precursors induces an endogenous precursor cell response in a rat model of Parkinson's disease[J]. J Comp Neurol, 2009, 515(1): 102-115.

[4] Bachoud-Lévi AC, Gaura V, Brugières P, Lefaucheur JP, Boissé MF, Maison P, et al. Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study[J]. Lancet Neurol, 2006, 5(4): 303-309.

[5] Keene CD, Sonnen JA, Swanson PD, Kopyov O, Leverenz JB, Bird TD, et al. Neural transplantation in Huntington disease: long-term grafts in two patients[J]. Neurology, 2007, 68(24): 2093-2098.

[6] Freeman TB, Cicchetti F, Hauser RA, Deacon TW, Li XJ, Hersch SM, et al. Transplanted fetal striatum in Huntington's disease: phenotypic development and lack of pathology[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(25): 13877-13882.

[7] Krystkowiak P, Gaura V, Labalette M, Rialland A, Remy P, Peschanski M, et al. Alloimmunisation to donor antigens and immune rejection following foetal neural grafts to the brain in patients with Huntington's disease[J]. PLoS One, 2007, 2(1): e166.

[8] 栾佐,尹国才,胡晓红,屈素清,吴南海,严凤清,等. 人神经干细胞移植治疗重度新生儿缺氧缺血性脑病一例[J]. 中华儿科杂志,2005, 43(8): 580-583.

[9] 屈素清,栾佐,刘卫鹏,席小辉,汪兆艳. 人神经干细胞移植治疗脑性瘫痪并重度视觉障碍患儿的疗效[J]. 实用儿科临床杂志,2009,24(10):771-774.

[10] 屈素清,栾佐,刘卫鹏,胡晓红,龚小军. 人神经干细胞移植治疗重度新生儿一氧化碳中毒的初步探讨[J]. 海军总医院学报,2008,21(3):142-144.

[11] 《中华儿科杂志》编辑部. 小儿脑性瘫痪的定义、诊断条件及分型[J]. 中华儿科杂志,2005,43(3):262.

[12] Yasuhara T, Matsukawa N, Hara K, Yu G, Xu L, Maki M, et al. Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease[J]. J Neurosci, 2006, 26(48): 12497-12511.

[13] Imitola J, Park KI, Teng YD, Nisim S, Lachyankar M, Ourednik J, et al. Stem cells: cross-talk and developmental programs[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2004, 359(1445): 823-837.

[14] Madhavan L, Ourednik V, Ourednik J. Neural stem/progenitor cells initiate the formation of cellular networks that provide neuroprotection by growth factor-modulated antioxidant expression[J]. Stem Cell, 2008, 26(1): 254-265.

[15] Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells[J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(5): 395-406.

[16] Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, Foo WC, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(32): 11839-11844.

[17] Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G, Dina G, et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis [J]. Nature, 2003, 422(6933): 688-694.

[18] Park DH, Eve DJ, Sanberg PR, Musso J 3rd, Bachstetter AD, Wolfson A, et al. Increased neuronal proliferation in the dentate gyrus of aged rats following neural stem cell implantation[J]. Stem Cells Dev, 2010,19(2): 175-180.

[19] Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2003, 181(2): 115-129.

[20] Haastert K, Ying Z, Grothe C, Gómez-Pinilla F. The effects of FGF-2 gene therapy combined with voluntary exercise on axonal regeneration across peripheral nerve gaps[J]. Neurosci Lett, 2008, 443(3): 179-183.

[21] Voronin LL, Altinbaev RS, Bayazitov IT, Gasparini S, Kasyanov AV, Saviane C, et al. Postsynaptic depolarisation enhances transmitter release and causes the appearance of responses at "silent" synapses in rat hippocampus[J]. Neuroscience, 2004, 126(1): 45-59.

[22] Isaac JT. Postsynaptic silent synapses: evidence and mechanisms [J]. Neuropharmacology, 2003, 45(4): 450-460.

[23] Berardi N, Lodovichi C, Caleo M, Pizzorusso T, Maffei L. Role of neurotrophins in neural plasticity: what we learn from the visual cortex[J]. Restor Neurol Neurosci, 1999, 15(2-3): 125-136.

[24] Itami C, Mizuno K, Kohno T, Nakamura S. Brain-derived neurotrophic factor requirement for activity-dependent maturation of glutamatergic synapse in developing mouse somatosensory cortex[J]. Brain Res, 2000, 857(1-2): 141-150.

[25] Tongiorgi E. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions[J]. Neurosci Res, 2008, 61(4): 335-346.

[26] Seledtsov VI, Kafanova MY, Rabinovich SS, Poveshchenko OV, Kashchenko EA, Fel'de MA, et al. Cell therapy of cerebral palsy [J]. Bull Exp Biol Med, 2005, 139(4): 499-503.

[27] Mehta T, Feroz A, Thakkar U, Vanikar A, Shah V, Trivedi H. Subarachnoid placement of stem cells in neurological disorders [J]. Transplant Proc, 2008, 40(4): 1145-1147.

[28] Madhavan L, Collier TJ. A synergistic approach for neural repair: cell transplantation and induction of endogenous precursor cell activity[J]. Neuropharmacology, 2010, 58(6): 835-844.

(本文编辑:邓芳明)