

· 论著 ·

自体外周血干细胞移植治疗 62 例缺血性下肢血管病的临床研究

杨晓凤 吴雁翔 王红梅 许忆峰 吕欣 张轶斌 王法 张悦

【摘要】目的 观察自体外周血干细胞(PBSC)移植治疗缺血性下肢血管病的临床疗效及相关影响因素。**方法** 62 例自愿接受自体 PBSC 移植的患者中糖尿病足 34 例,动脉硬化闭塞症 22 例,血栓闭塞性脉管炎 4 例,结节性多动脉炎 1 例,雷诺病 1 例。发生足部溃疡或坏疽 38 例,合并感染 14 例。累及双下肢病变 52 例,其中 3 例患者移植前已行一侧肢体截肢术;单肢病变 10 例,共移植 111 条下肢。全部患者均给予重组人粒细胞集落刺激因子 450~600 $\mu\text{g}/\text{d}$,皮下注射,行 PBSC 动员 5 d,第 6 天用血细胞分离机采集单个核细胞(MNC),总量 82~148 ml, MNC 数量(718.2~224.6) $\times 10^9/\text{L}$ 。将 MNC 悬液按 3 cm \times 3 cm 距离进行缺血肢体移植术,术后第 1 天至 6 个月定期观察各项指标综合评估。**结果** PBSC 移植后 7~30 d 54 例(87.1%)疼痛有不同程度的缓解,7~30 d 56 例(90.3%)患肢冷感明显改善,4~16 周 16 例(40.0%)溃疡或足趾坏疽好转,感染得到控制;踝肱指数 12 例(34.3%)有不同程度的改善,26 例(42.3%)经皮氧分压改善,5 例数字减影下肢动脉造影结果显示新侧支血管形成明显增加。2 例糖尿病足合并脑梗死患者在干细胞动员期间症状加重,经治疗好转,其余患者未出现并发症和明显不良反应。**结论** 自体 PBSC 治疗缺血性下肢血管病是一种安全、有效的手段,尤其对于下肢动脉没有流出道的患者有特殊意义,可使一部分患者免除截肢或降低截肢平面,改善生活质量。

【关键词】 造血干细胞移植; 糖尿病足; 血管疾病

Autologous peripheral blood stem cells transplantation in treatment of 62 cases of lower extremity ischemic disorder YANG Xiao-feng, WU Yan-xiang, WANG Hong-mei, XU Yi-feng, LÜ Xin, ZHANG Yi-bin, WANG Fa, ZHANG Yue. Cell Treatment Center, PLA 463 Hospital, Shenyang 110042, China
Corresponding author: YANG Xiao-feng, Email: YXF463@Hotmail.com

【Abstract】Objective To observe the clinical efficacy of autologous peripheral blood stem cells (PBSC) transplantation in 62 cases with ischemic lower extremity disorder. **Methods** Totally 62 patients with 34 cases of diabetic foot and 28 cases of various lower extremity ischemic disorders received recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) 450-600 $\mu\text{g}/\text{d}$ by hypodermic injection for 5 days to mobilize stem cells. On the sixth day, PBSC were collected by COBE 6.1 Spectra Version with an amount of 82-148 ml; the number of mononuclear cells (MNC) is (718.2-224.6) $\times 10^9/\text{L}$. CD_{34}^{+} cells were tested. The PBSC were injected into the ischemic lower extremity and foot intramuscularly at 3 cm \times 3 cm distance. The clinical and laboratory findings were monitored from first day to 24 th week. **Results** In 62 patients with PBSC transplantation, free of severe pain was found in 54 cases (87.1%) from 7 to 30 days, improvement of foot cool feeling in 56 patients (90.3%) from 7 to 30 days, improvement of foot ulcer in 16 cases (40.0%) from 4 to 16 weeks. Ankle/brachial index (ABI) increased in 12 cases (34.3%), TcPO_2 improved in 26 cases (42.3%). Digital subtraction angiographic scores were performed in 5 patients after 8-12 weeks, there was formation of new collateral vessels. No related complication or adverse effect was observed except in 2 patients with diabetic foot and cerebral infarction exacerbation of symptoms during the process of stem cells mobilization in all process. **Conclusion** Autologous PBSC transplantation might be a safe and effective method for lower extremity ischemic disorder. It could improve the quality of life of many patients as amputation of lower extremity or foot might be avoided.

【Key words】 Hematopoietic stem cell transplantation; Vascular diseases; Diabetic food

作者单位:110042 沈阳,解放军第 463 医院 细胞治疗中心

通信作者:杨晓凤,Email:YXF463@Hotmail.com

缺血性下肢血管病是一组严重危害人类健康、降低患者生活质量的疾病,在我国随着人们生活模式的变化,其发病率呈明显上升趋势,尤其是下肢动脉流出道阻塞且未形成侧支的患者,常导致足部溃疡或坏疽而截肢致残。最近自体外周血干细胞(PBSC)移植血管再生技术受到国内外学者的关注,我们于 2003 年 11 月开展了自体 PBSC 移植治疗缺血性下肢血管病的临床研究,现将 62 例患者临床研究报告如下。

资料和方法

1. 对象:62 例均为我科住院患者,男 39 例,女 23 例,年龄 36 ~ 85 岁,平均年龄 66.6 岁,病程 6 个月至 13 年。糖尿病足 34 例,动脉硬化闭塞症 22 例,血栓闭塞性脉管炎 4 例,结节性多动脉炎 1 例,雷诺病 1 例。62 例患者中累及双下肢病变 52 例,其中 3 例已行一侧肢体截肢术;10 例为单肢病变,本组下肢血管病变累及的肢体为 111 条。全部患者均有足部和(或)下肢发凉、疼痛、间歇性跛行,发展为静息痛 52 例。足部皮肤色泽异常 108 只,足趾和(或)足部溃疡 19 只,坏疽 30 只,合并感染 14 只。62 例中高血压 45 例,血脂异常 57 例,高血糖 34 例,冠心病 42 例,合并陈旧性心肌梗死 8 例,脑梗死 16 例,类风湿关节炎 2 例。4 例曾接受血管搭桥手术,3 例行血管内支架置入术,术后 2 个月至 2 年再次闭塞。

2. 分级方法:根据患者症状的严重程度,按 Fontaine 分期法分为 4 期。62 例中 I 期 0 例,II 期 4 例(6.4%),III 期 15 例(24.2%),IV 期 43 例(69.4%),III 期加 IV 期为 58 例(93.6%)。设自身前后对照方法观察 62 例患者全部在 PBSC 移植前接受前列腺素-E1(PGI-E1)、丁格地尔、刺五加等药物系统治疗 3 个月以上,未能阻止下肢血管病变进展。在 PBSC 移植期间同时应用上述药物,如获得疗效包括:疼痛、冷感、皮温、踝肱指数(ABI)、经皮氧分压、足底深感觉、数字减影(DSA)血管造影,可视为 PBSC 治疗有效。

3. 下肢缺血检查:(1)62 例均经下肢血管彩色多普勒检查,股浅、股深动脉狭窄或闭塞 40 例,腘动脉狭窄或闭塞 32 例,62 例均有不同程度的胫前、胫后或腓动脉狭窄或闭塞,足背动脉全部闭塞。(2)DSA 血管造影 46 例,12 例髂外动脉闭塞,股深、股浅动脉狭窄或闭塞 41 例,46 例全部有腘动脉以下

流出道狭窄或闭塞,尤以糖尿病足和血栓闭塞性脉管炎严重,而且罕见侧支建立。(3)ABI:用日本林电器株式会社制造的 ES-1000SPM 多普勒血流探测仪检测下肢末梢血流,全部患者血流波幅减低,ABI 0.12 ~ 0.73(平均 0.42)。(4)红外线皮温仪检测:用瑞士产 PICCOLO 多功能红外线体温仪检测下肢皮温,62 例皮温均降低为 24 ~ 35℃(平均 32.5℃)。(5)下肢足底深感觉检测:用美国产 Bio-Thesiometer 感觉检测仪检查足部深感觉,56 例感觉减退或消失(> 15 MV)。(6)经皮氧分压(TcPO₂)检测:用丹麦雷度经皮氧分压监测仪 TCMTM400 检测 26 例患者下肢、足部的经 TcPO₂ 检测后,均显著降低为 0 ~ 34 mm Hg(17 mm Hg)(1 mm Hg = 0.133 kPa)。

4. 治疗方法:(1)自体 PBSC 动员:重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF,吉粒芬,杭州九源基因工程有限公司)450 ~ 600 μg/d,皮下注射,连用 5 d。为防止因高白细胞血症引起心脑血管意外或血栓形成,在干细胞动员的同时给予低分子肝素钙 5000 U/d,皮下注射。每天监测外周血白细胞总数、出凝血指标及临床症状变化。62 例干细胞动员第 5 天白细胞总数达(20.2 ~ 71.4) × 10⁹/L(平均 42.4 × 10⁹/L)。采用流式细胞仪(美国 BD 公司 CALIB)监测采集前后 CD₃₄ 阳性细胞数。(2)PBSC 采集:第 6 天用 COBE 6.1 Spectra Version 血细胞分离机采集单个核细胞(MNC)。根据患者采集前 CD₃₄ 阳性细胞数、外周血白细胞总数和 MNC、患者下肢病变程度及身体状况决定循环血量,总采集量在 82 ~ 148 ml(平均 95.4 ml),MNC 数量(718.2 ~ 224.6) × 10⁹/L(平均 463.7 × 10⁹/L),CD₃₄⁺ 细胞移植总数为 235.5 ~ 1386.0/μl(平均 672.6/μl)。(3)PBSC 移植术:在手术室进行 PBSC 移植术,严格按照无菌操作要求进行。患者行硬膜外麻醉,将采集的 MNC 配制成(2 ~ 8) × 10⁸/ml 的细胞混悬液,按 3 cm × 3 cm 间距进行缺血下肢肌肉内注射。(4)其他治疗:在干细胞移植的同时给予 PGI-E1、丁格地尔、刺五加等药物治疗。糖尿病患者进行强化治疗,使血糖、血脂、血压、心脏功能等各项指标达标。足部溃疡定期局部换药及清创治疗。

5. 手术与随访观察:4 例(5 只足)发生全足坏疽的患者在 PBSC 移植的同时行膝下截肢术,观察截肢创面愈合情况。其余 26 例足部坏疽患者先行 PBSC 移植术,择期进行截趾、截肢术。62 例患者接

受 PBSC 移植后(7、30)d、(3、6)个月进行疗效评估,包括疼痛、冷感、行走间距及各项仪器检测指标数据变化。

结 果

1. 临床治疗情况:(1)主观感觉(见表1):结果显示:移植后7~30d有54例(87.1%)疼痛有不同程度的缓解;7~30d有56例(90.3%)患肢冷感明显改善。其中部分患者从移植后第3天开始皮温及疼痛就已有改善。(2)溃疡、坏疽及仪器检查(见表2):19只溃疡足中有13只于PBSC后的1~6个月溃疡好转或愈合。30只坏疽足中3~6个月有5只明显改善;8只PBSC后足部坏疽界限清晰,局部血液循环好转,行膝下截肢、截趾术,术后创面愈合良好。5只PBSC与截肢同时进行的患者有4只创面愈合良好,1只未愈合于1个月后行高位截肢术;6只坏疽足患者PBSC后疼痛及皮温无改善,且坏疽范围继续扩大而行截肢术。

表1 62例自主症状移植后各阶段疗效观察

术后观察时间	总例数	疼痛缓解		冷感好转		行走间距延长(>100.m)	
		例数	率(%)	例数	率(%)	例数	率(%)
7 d	62	27	43.5	44	70.9	0	0
30 d	58	27	43.5	12	19.4	0	0
3 个月	37	4	6.5	3	4.8	2	3.2
6 个月	25	0	0	0	0	9	8.2

表2 各种临床表现不同阶段疗效观察结果

临床表现	总检测肢数	各阶段有效/随访例数			
		7 d	30 d	3 个月	6 个月
溃疡	19	0/19	2/16	5/14	6/7
坏疽	30	0/30	0/27	3/21	2/15
皮温仪	111	63/111	22/38	6/22	2/11
ABI	111	0/111	0/71	4/44	8/21
足底深感觉	111	0/111	0/71	3/44	11/21
DSA 造影	83	0/83	0/55	5/5	0/0
TcPO ₂	47	0/47	0/32	7/19	4/13

2. 并发症和不良反应:2例糖尿病足合并脑梗死患者在干细胞动员期间脑梗死症状加重,经治疗后好转。其余患者的心电图和肝肾功能无特殊改变,出凝血时间正常,未出现其他不良反应。

讨 论

缺血性下肢血管病是一种截肢致残率较高的疾病,常规药物治疗收效甚微,部分患者经介入或血管

搭桥手术其远期疗效也不理想,尤其是下肢动脉流出道闭塞而且缺乏代偿性侧支的患者,采用任何手段很难使血管再通,造成足部坏疽甚至危及生命。PBSC 移植血管再生技术是最近国内外研究的一个热门课题,动物实验证实,将自体骨髓或 PBSC 和内皮祖细胞(EPC)植入缺血心肌或肢体后可在局部形成新的毛细血管,应用人类自体骨髓、PBSC 和 EPC 治疗缺血性下肢血管病成为一种崭新的疗法^[1]。将骨髓或 PBSC 及 EPC 移植到缺血部位,可从先前存在的血管床发芽生成新的毛细血管,能给血管狭窄或闭塞的患者提供一个治疗性生物“旁路”^[2],临床研究证实 PBSC 治疗缺血性心脏病已取得可喜的成效^[3,4]。

2002年 Tateishi-Yuyama 等^[5]在国际上首次报道了应用患者自体骨髓 PBSC 治疗缺血性下肢血管病,取得了满意疗效,未发现明显的不良反应。但由于骨髓采髓量较大(约500ml),对患者的全身情况要求高,使临床应用受到一定限制。2003年黄平等^[6]采用自体 PBSC 移植治疗1例下肢动脉硬化闭塞症,取得显著疗效,使这例患者避免了截肢致残的后果。我们采用自体外周血干细胞移植治疗缺血性下肢血管病62例,发现在移植早期大部分患者足部疼痛减轻,皮温升高,皮肤色泽好转,但此时新生血管尚未形成,考虑可能是由于干细胞或 EPC 分泌多种血管生成因子如血管内皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子及白细胞介素等^[7],促进局部血液循环的改善。通过对患者干细胞移植前后各项指标的综合评估,证实自体外周血干细胞移植能有效地增加患者的下肢血流,使一部分患者避免截肢或降低截肢平面,尤其对于高龄合并心脑血管疾病的患者、经介入手术或血管搭桥效果不佳的患者及各种病因导致缺血性下肢血管病的患者提供了一种新的治疗手段。如果足部已发生坏疽,截肢将不可避免,所以患者在疾病早期进行干细胞移植对于保留肢体是非常有意义的。

我们的临床研究显示,影响疗效的主要因素有(1)外周血干/祖细胞动员的质量;(2)干/祖细胞采集的数量;(3)干细胞移植的部位;(4)患者自身影响干细胞存活和增殖的因素(目前尚未明确)。本组患者在治疗中未发生严重并发症和不良反应,且方法简便、安全有效,是治疗缺血性下肢血管病的一种新手段。但尚有许多问题需要解决,如干细胞移植的最佳时机、移植后干细胞和 EPC 在缺血组织内

增殖潜能及影响因素、新生血管的舒缩功能以及新生血管再狭窄预防等,均有待进一步研究。

参 考 文 献

1 Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, 85:221-228.

2 Hu J, Takatoku M, Sellers SE, et al. Analysis origin and optimization of expansion and transduction of circulating peripheral blood endothelial progenitor cells in the rhesus macaque model. *Hum Gene Ther*, 2002, 13: 2041-2050.

3 Ozbaran M, Omay SB, Nalbantgil S, et al; Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, 25: 342-

350.

4 李占全, 张明, 金元哲, 等. 自体外周血干细胞移植治疗急性心肌梗死安全性的观察. *中国实用内科杂志*, 2004, 24:274-276.

5 Tateishi-Yuyama H, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cell: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002, 360:427-435.

6 黄平平, 李尚珠, 韩明哲, 等. 自体外周血干细胞移植治疗下肢动脉硬化闭塞症. *中华血液学杂志*, 2003, 24:308-311.

7 Iba O, Matsubara H, Nozawa Y, et al. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation*, 2002, 106:2019-2025.

(收稿日期:2004-06-14)

(本文编辑:李敬东)

【编后语】 该文是在第五届国际血管外科暨第一届国际糖尿病血管疾病会议中作的大会报告。干细胞移植技术在缺血性下肢血管疾病的应用虽然只有很短的时间,却显示出良好的前景,而且治疗方法简便、安全、有效,尤其是对于下肢动脉没有流出道、经过手术或其他治疗效果欠佳、年老体弱的患者有特殊意义,为一些等待截肢致残的患者带来了一线希望。该文病例数量较多,但观察时间还不长,还望继续获得更有价值的资料。

· 读者 · 作者 · 编者 ·

中华医学会杂志社关于建立“快速通道”的有关规定

为了保证优秀的医学科研成果能够在中华医学会系列杂志上尽快地发表,中华医学会杂志社要求各编辑部建立优秀论文发表的“快速通道”。现将有关事宜规定如下。

1. “快速通道”的定义:对符合“快速通道”要求的论文采用特定审稿流程,在收稿后 1 个月内就论文能否发表给予答复,对符合要求的论文在收稿后 4 个月内予以发表。

2. “快速通道”论文要求:必须具备创新性、重要性和科学性,该论文的早日公布将对临床和科研工作产生重大影响。

3. “快速通道”论文投稿要求:(1)作者在投稿前应与编辑部联系,说明研究的具体情况。在得到编辑部认可的情况下,将论文发送到指定的电子邮箱或通过特快专递将一式三份稿件及软盘送抵编辑部。(2)稿件应符合相关杂志稿约的要求,并附单位介绍信。(3)应提供说明论文需要通过“快速通道”发表理由的书面材料,同时提供省级及以上图书馆或医学信息研究所等单位出具的“查新报告”。(4)作者可推荐 3~5 名审稿专家(需注明其详细联系方式,包括 Email)供编辑部参考。

4. “快速通道”的审稿流程:(1)收稿后 2 天内由编辑部集体讨论做出进入“快速通道”、按普通来稿处理或退稿的决定。编辑部的意见应在 1 周内通知作者。对于同意进入“快速通道”的稿件,应同时向作者说明进入“快速通道”并不意味着该稿件能够最终被发表。(2)对编辑部决定进入“快速通道”的稿件,主管编辑应立即通过电话或 Email 与有关审稿专家联系,确定专家可以承担审稿任务后,立即将稿件从网上送出或用特快专递送出。应至少请两名具有权威性的专家审阅,必要时应同时请统计学方面的专家审阅,然后将审稿意见交给总编辑或副总编辑,由其做出通过“快速通道”发表、退修、按普通稿件处理或退稿的决定。该过程应在 1 个月内完成并通知作者。(3)需要退修的稿件,主管编辑应在 2 天内将审稿意见通过 Email 或特快专递反馈给作者,作者应在 1 周内完成修改并将修改稿和软盘通过特快专递寄给主管编辑。如果通过 Email 发送修改稿,必须同时邮寄纸稿。(4)对于最终决定通过“快速通道”发表的稿件,由编辑部主任安排在最近的一期发表。至于是否在目次中冠以“快速通道”栏目词,可由各编辑部自行决定。

5. “快速通道”稿件处理费每篇最高不能超过 400 元。