论著

文章编号:1000-5404(2012)01-0074-04

自体骨髓干细胞移植治疗2型糖尿病的安全性及有效性

姚金萍,段 炼,童 强,徐梓辉 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院内分泌科)

[摘要] **目的** 探讨自体骨髓干细胞(bone marrow stem cells,BMSCs)经胰背动脉移植治疗2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)的有效性及安全性。**方法** 回顾性分析2009年6月至2011年4月在我科住院符合纳入标准的6例2型糖尿病患者(3男3女),年龄(45.67±14.92)岁,实施自体骨髓干细胞移植。①动员骨髓;②采集骨髓;③分离骨髓干细胞;④将骨髓干细胞注入胰背动脉;⑤观察移植前后血糖、糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)、胰岛功能、C肽曲线下面积(area under curve for C-peptide, AUCC)及胰岛素用量等变化,记录治疗过程中及治疗后的不良反应;对干细胞移植的安全性及疗效进行评估。**结果** 移植前后:①糖化血红蛋白由(10.33±2.78)%降至(7.05±0.90)%,有2例患者的糖化血红蛋白<7%;②空腹C肽(fasting C-peptide, FC-P)由(0.71±0.54)ng/ml升至(1.54±0.63)ng/ml($P<0.05$),餐后2 h C肽(2 h postprandial C-peptide, 2 h C-P)由(1.63±0.88)ng/ml升至(4.67±2.31)ng/ml($P<0.05$),C肽曲线下面积由(2.29±1.31)ng/ml增至(6.05±2.94)ng/ml($P<0.05$);③胰岛素用量由(27.17±13.08)U/d降到(18.63±7.04)U/d,其中2位患者停用皮下注射胰岛素改为口服药物降糖治疗;④自体骨髓干细胞移植过程中及术后随访均未观察到不良反应,移植前后肿瘤标志物及血淀粉酶均正常。**结论** 自体骨髓来源干细胞移植可改善2型糖尿病患者的胰岛功能,减轻其对外源性降糖药物的依赖,且安全性可行。

[关键词] 骨髓细胞移植;2型糖尿病;安全性;疗效
[中图法分类号] R587.105; R331.22; R617 [文献标志码] A

Efficacy and safety of autologous bone marrow stem cells transplantation for type 2 diabetes mellitus

Yao Jinping, Duan Lian, Tong Qiang, Xu Zihui (Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] Objective To study the efficacy and safety of autologous bone marrow stem cells (BMSCs) transplantation *via* dorsal pancreatic artery (DPA) for type 2 diabetes mellitus (T2DM). Methods Six T2DM patients aged 45.67±14.92 years (3 males and 3 females) admitted to our department from June 2009 to April 2011 were enrolled in this study. The patients underwent BMSCs transplantation. Their bone marrow was mobilized and collected. BMSCs were isolated and infused into the DPA. Changes in fasting and postprandial blood glucose level, glycosylated hemoglobin (HbA1c) value, function of pancreatic islets, area under curve for C-peptide (AUCC), and insulin dose were observed. Adverse reactions of BM-SC transplantation for T2DM were recorded during and after operation with its safety and efficacy assessed. Results The HbA1c value decreased from (10.33±2.78)% before operation to (7.05±0.90)% after operation, which was <7% in 2 patients. The fasting C-peptide (FC-P) level increased from (0.71±0.54) ng/ml before operation to (1.54±0.63) ng/ml after operation. The 2 h postprandial C-peptide (2 h C-P) level increased from (1.63±0.88) ng/ml before operation to (4.67±2.31) ng/ml after operation. The mean AUCC increased from (2.29±1.31) ng/ml before operation to (6.05±2.94) ng/ml after operation. The insulin dose decreased from (27.17±13.08) U/d before operation to (18.63±7.04) U/d after operation. Subcutaneous insulin injection was withdrawn in 2 patients who changed to have oral hypoglycemic drugs. No adverse reaction occurred during autologous BMSCs transplantation and follow-up. The tumor markers and amylase level were normal before and after BMSCs transplantation. Conclusion Autologous BMSCs transplantation can improve the function of pancreatic islets of T2DM patients and decrease their dependence on hypoglycemic drugs with rather good safety.

[**Key words**] bone marrow stem cell transplantation; type 2 diabetes mellitus; safety; therapeutic effect

Corresponding author: Xu Zihui, Tel: 86-23-68755709, E-mail: zihuixu@yahoo.com.cn

[通信作者] 徐梓辉,电话:(023)68755709,E-mail:zihuixu@yahoo.com.cn

2 型糖尿病的主要病理生理改变为从以胰岛素抵抗为主伴胰岛素分泌不足到以胰岛素分泌不足为主伴胰岛素抵抗。研究证明当 2 型糖尿病临床诊断时 B 细胞功能降低超过 50%,随着疾病的发生 B 细胞数量将进一步减少[1]。英国前瞻性糖尿病研究(UKPDS)发现糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)每降低 1%,微血管并发症的风险降低 37%,并显示控制血糖对降低大血管并发症有益[2]。因此,治疗糖尿病的主要目标是保存胰岛功能,降低 HbA1c,从而达到控制血糖,并且还可以延缓并发症的发生。

目前替代 B 细胞的方式有胰腺移植、胰岛细胞移植以及干细胞移植,但供体来源不足及免疫排斥反应限制了胰腺移植及胰岛细胞移植的临床应用。干细胞移植目前被认为是治疗糖尿病最有前景的选择。干细胞是具有自我更新并分化为其他类型细胞的原始细胞。骨髓易于采集,且利用自体骨髓即可避免免疫排斥问题又可避免伦理问题,因此自体骨髓干细胞是替代 B 细胞的重要来源。有基础实验及动物研究已经证明骨髓干细胞能够分化为胰岛样细胞,分泌胰岛素,从而使血糖维持正常[3-4]。目前利用自体骨髓干细胞对 2 型糖尿病的治疗进入了临床应用前的研究阶段,Bhansali 等[5]利用自体骨髓干细胞移植治疗 10 例 2 型糖尿病,其中 7 例患者为有效者,胰岛素用量较术前减少 75%,HbA1c 及 C 肽有显著改善,并未观察到不良反应。这项技术为 2 型糖尿病患者带来了福音。

本研究收集 6 例 2 型糖尿病患者,进行自体骨髓干细胞移植。通过短期的随访观察以对该技术的疗效和安全性作出初步的评价。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究纳入 2009 年 6 月至 2011 年 4 月在本科住院符合纳入标准的 6 例 2 型糖尿病患者(3 男 3 女),年龄 21~60(45.67±14.92)岁,并经本院伦理委员会讨论通过。诊断标准:符合 1999 年 WHO 关于糖尿病的诊断标准及分型标准。病例纳入标准:2 型糖尿病患者,性别不限,年龄 16~60 岁,服用药物或注射胰岛素难以控制血糖的患者,并愿意行干细胞移植术并承担费用,签署知情同意书。病例排除标准:①严重的心、肺、肝、肾等重要器官功能不全者,不能耐受介入手术者;②有血液系统疾病和出血倾向者;③内分泌系统其他疾病;④肿瘤患者;⑤活动性肝炎或患有其他传染病患者;⑥精神病患者;⑦妊娠患者。6 例患者一般资料见表 1。

1.2 研究方法

1.2.1 主要实验室术前检查 术前常规三大常规、凝血 4 项、肝肾功、电解质、血淀粉酶、肿瘤标志物;计算体质指数(BMI)、HbA1c、行葡萄糖耐量试验及 C 肽释放试验检测空腹 C 肽(FC-P)与餐后 2 h C 肽(2 h C-P);以及行动态血糖监测、心电图、腹部超声、腹部三维成像等影像学检查。

1.2.2 胰岛素泵强化治疗 予以胰岛素泵强化治疗,控制血糖达标[末梢空腹血糖(FBG)<6 mmol/L,餐后 2 h 血糖(2 h BG)≤8 mmol/L]后进行骨髓来源的干细胞移植。

1.2.3 骨髓来源的干细胞(BMSCs)移植 ①骨髓动员:移植前 3 d 预先根据患者的理想体质量按 5 μg/kg,皮下注射粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员骨髓,以动员骨髓干细胞进入外周血,使其在外周血中达到一定数量,每日复查血常规观察动员效果,确保白细胞数:20×10^9/L 以上;②骨髓采集:手术当日严格按照无菌手术在无菌手术室进行骨髓采集,患者俯卧位腰麻,双侧髂后上棘多点穿刺,采取 200 ml 骨髓血,抗凝储存;③骨髓干细胞分离:并立即在层流实验室采用人类骨髓干细胞/祖细胞体外分离纯化,分离骨髓间充质干细胞,并计数;④骨髓干细胞介入:经腹股沟动脉插管介入将骨髓来源的干细胞注入胰背动脉。

1.2.4 动态随访 待患者出院后,每两星期对患者进行电话随访,询问患者血糖控制情况及胰岛素用量,根据患者血糖调整胰岛素用量,随访期间根据患者血糖水平进行个体化治疗,胰岛素注射次数、方式以及胰岛素剂型(速短效、中长效)等不受限制。于移植后患者来院随访评估安全性及疗效。复查血常规、肿瘤标志物、血淀粉酶、HbA1c,并复行口服葡萄糖耐量试验及同步 C 肽释放试验。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件完成统计处理,试验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料行配对 t 检验。

表 1 接受骨髓干细胞移植的 6 例 2 型糖尿病患者一般临床资料

编号	性别	年龄(岁)	病程(年)	体质指数(kg/m^2)	空腹血糖(mmol/L)	餐后 2 h 血糖(mmol/L)	糖化血红蛋白(%)	空腹 C 肽(ng/ml)	餐后 2 h C 肽(ng/ml)	C 肽曲线下面积(ng/ml)	胰岛素剂量(U/d)	血淀粉酶	肿瘤标志物
1	女	40	15	25.40	7.2	18.26	7.5	0.51	1.11	1.42	41	阴性	阴性
2	男	41	2	21.67	8.0	20.96	7.4	0.33	0.60	0.89	12	阴性	阴性
3	男	21	0.5	22.40	8.3	16.59	14.3	0.56	1.34	1.91	14	阴性	阴性
4	女	60	17	23.83	8.8	19.97	9.1	1.79	2.85	4.51	40	阴性	阴性
5	女	60	3	24.00	3.5	17.73	12.2	0.52	2.57	3.07	18	阴性	阴性
6	男	52	0.17	23.23	5.3	15.52	11.5	0.55	1.33	1.93	38	阴性	阴性

表2 2型糖尿病患者骨髓干细胞治疗术前后各指标观察($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

时间	体质指数 (kg/m^2)	空腹血糖 (mmol/L)	糖化血红蛋白(%)	空腹C肽 (ng/ml)	餐后2 h C肽 (ng/ml)	C肽曲线下面积 (ng/ml)	胰岛素剂量 (U/d)
术前	23.42±1.31	6.85±2.05	10.33±2.78	0.71±0.54	1.63±0.88	2.29±1.31	27.17±13.08
术后6个月	23.59±1.88	6.73±2.12	7.05±0.90	1.54±0.63[a]	4.67±2.31[a]	6.05±2.94[a]	18.63±7.04

a: $P<0.05$, 与术前比较

2 结果

2.1 6例2型糖尿病患者移植前后观察指标变化情况

4例患者移植后的糖化血红蛋白较术前降低,其中2例(3、6号)患者移植后糖化血红蛋白小于7%,且此2例患者于移植后半年内不同时期停用胰岛素,3例患者移植后胰岛素用量较移植前不同程度地减少,有1例患者胰岛素用量较移植术反而增加。每例患者的胰岛功能较术前均得到了提高(表2)。

2.2 骨髓干细胞移植对6例患者各项指标的影响

6例2型糖尿病患者手术后空腹C肽、餐后2 h C肽及C肽曲线下面积增加($P<0.05$),而糖化血红蛋白及胰岛素注射剂量手术前后的比较差异无统计学意义($P>0.05$),体质量指数及空腹血糖无明显影响($P>0.05$,表2)。

2.3 不良反应

有1例患者在术后第1天出现低颅压综合征;其他患者于移植前后均未观察到不良反应。未出现急性胰腺炎、骨髓抑制、出血、甲状腺功能异常等严重不良反应。移植后肿瘤标志物、血淀粉酶均正常。

3 讨论

目前恢复胰岛功能的方式有胰岛或胰腺移植以及干细胞移植。1966年,Teixeira等[6]通过胰腺移植治疗12例胰岛素依赖型糖尿病患者,其中10例患者血糖明显控制,开辟了胰腺移植的新途径。但胰腺移植手术较复杂,胰漏等围术期并发症发生率及死亡率均较高,且需要终身使用免疫抑制剂[7]。而胰岛移植操作简便、安全,可多次移植,手术并发症及死亡风险均明显降低,2000年Sharpiro等[8]开始胰岛移植,至2006年时Sharpiro等[9]利用糖皮质激素联合胰岛移植已治疗36例1型糖尿病,每例患者需2个胰腺来源,经过随访观察到58%的患者达到脱离胰岛素,然而2年后有其中76%的患者再次需注射胰岛素,且28%的患者在移植后1年移植的胰岛缺失,胰岛缺失可能是免疫抑制剂的毒性所导致,且供体来源不足限制胰岛移植临床广泛的应用,且胰岛移植远期疗效的失败促使寻求更多的B细胞来源。目前最合适的来源就是干细胞。基础实验研究显示,移植糖尿病小鼠的骨髓干细胞于发病的糖尿病小鼠体内,可提高B细胞数量,降低血糖,使血糖控制于正常水平[10-11];同样有研究证明利用干细胞在胰腺微环境下分化为胰岛样细胞,胰岛素水平与对照组比较明显增加[12-13]。鉴于此临床应用模拟动物模型,采用自体骨髓干细胞移植的方法,将自体骨髓来源干细胞介入注入胰背动脉以分化成新的胰岛样细胞,有望控制病情变化甚至治愈糖尿病。国内齐鲁医院对52例1型和2型糖尿病患者进行自体骨髓干细胞移植,并设置对照组,经过1年的随访观察,与对照组相比,空腹血糖、餐后血糖及糖化血红蛋白下降有意义,在减少外源性胰岛素量也能很好的控制血糖,并且C肽水平及曲线下面积增加了,其中28.3%的患者达到了完全脱离胰岛素[14]。国内外还有多家研究所及医院开展自体骨髓干细胞移植治疗2型糖尿病均取得了较好的效果[15-17]。

本组6例患者(3男3女)病程(6.28±7.63)年,在进行了术前多项检查试验及评估后,进入自体骨髓干细胞移植治疗程序。在治疗过程有1例患者出现低颅压综合征,考虑腰麻所致,予对症处理后未诉不适,其术后随访中无不适;其他患者在治疗过程中及随访期间均未观察到胃肠道反应、发热、消瘦、出血等症状。无死亡病例发生。

就疗效而言,术后随访观察到糖化血红蛋白由术前(10.33±2.78)%降到(7.05±0.9)%,其中有2例患者的糖化血红蛋白<7%,然而糖化血红蛋白移植前后未达到统计学意义,考虑病例数不足导致无显著性差异。术后随访空腹C肽、餐后2 h C肽及C肽曲线下面积较移植前增加,移植后胰岛功能改善有统计学意义;胰岛素用量由术前(27.17±13.08)U/d降至(18.63±7.04)U/d,其中2位患者停用皮下注射胰岛素改为口服药物降糖治疗。2例糖化血红蛋白小于7%的患者停用胰岛素,予口服降糖药即可控制血糖。1例患者AUCC由术前1.91 ng/ml升至术后3.73 ng/ml;1例患者AUCC由术前1.93 ng/ml升至术后10.66 ng/ml,此2例患者胰岛功能取得显著疗效可能病程有关,2例患者病程都不超过半年,另外也有可能为胰岛素泵强化降糖治疗所致。有研究表明通过给予强化胰岛素治疗以达到严格的血糖控制,逆转高血糖对胰岛B细胞的毒性作用,可延缓B细胞的衰竭,保护B细胞功能,使B细胞的功能得到恢复,甚至有可能一定程度逆转B细胞的功能损害[18]。

目前国外有报道利用自体骨髓移植治疗糖尿病,

Bhansali 等[5]报道的结果与本研究相一致。Estrada 等[15]利用自体骨髓干细胞联合高压氧治疗 25 例 2 型糖尿病,经 1 年随访观察到胰岛功能得到改善,且减少外源性胰岛素用量,与本研究相一致。Esmatjes 等[19]研究利用自体骨髓干细胞移植治疗 1 型糖尿病,本研究与其研究对象不同,但研究细胞来源及研究方法相同,他们得到的结果未取到良好的疗效,与本研究结果并不一致。他们未取得良好的疗效分析原因可能如下:①采集骨髓血量或分离出干细胞数量不够,或者到达胰腺的干细胞数量不够,不足以使移植后胰岛功能显著改善;②干细胞受到自身免疫的排斥,从而使注入体内的干细胞受到破坏。国内还有报道利用自体造血干细胞移植治疗 1 型糖尿病也取得了一定的疗效[20-21]。

本研究还存在很多不足之处,只对患者进行单中心、移植前后对照,未设置多中心、随机对照研究;随访时间短,远期疗效不明确;样本量少,代表性不强。总之,自体骨髓干细胞治疗糖尿病对残存的胰岛功能有一定改善,安全性相对较高。干细胞移植治疗糖尿病虽然具有潜在的应用价值,但该项技术目前还处于临床探索性阶段并存在明显的局限性,例如该项临床研究为单中心,自身前后对照的研究设计,缺乏对照组,样本量偏小,观察时间较短等不足;此项技术开展时间短,对其适应证的把握、治疗时间的选择以及细胞数量要求需要进一步探索以规范应用;如何提高疗效及观察安全性,特别是长期疗效、安全性等均有待进一步的临床研究。因此,干细胞治疗潜能是巨大的,但实际临床应用还需要强有力的科学证据。

参考文献:

[1] Bagust A, Beale S. Deteriorating beta-cell function in type 2 diabetes: a long-term model[J]. QJM, 2003, 96(4): 281-288.

[2] Stratton I M, Adler A I, Neil H A, *et al*. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study[J]. BMJ, 2000, 321(7258): 405-412.

[3] Zhang Y H, Wang H F, Liu W, *et al*. Insulin-producing cells derived from rat bone marrow and their autologous transplantation in the duodenal wall for treating diabetes[J]. Anat Rec (Hoboken), 2009, 292(5): 728-735.

[4] Xu Y X, Chen L, Hou W K, *et al*. Mesenchymal stem cells treated with rat pancreatic extract secrete cytokines that improve the glycometabolism of diabetic rats[J]. Transplant Proc, 2009, 41(5): 1878-1884.

[5] Bhansali A, Upreti V, Khandelwal N, *et al*. Efficacy of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Stem Cells Dev, 2009, 18(10): 1407-1416.

[6] Teixeira E, Sharkey E, Colwell J, *et al*. Insulin and glucose levels following pancreas allografting[J]. Surg Forum, 1966, 17: 205-207.

[7] Sutherland D E. Current status of beta-cell replacement therapy (pancreas and islet transplantation) for treatment of diabetes mellitus[J]. Transplant Proc, 2003, 35(5): 1625-1627.

[8] Shapiro A M, Lakey J R, Ryan E A, *et al*. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen[J]. N Engl J Med, 2000, 343(4): 230-238.

[9] Shapiro A M, Ricordi C, Hering B J, *et al*. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation[J]. N Engl J Med, 2006, 355(13): 1318-1330.

[10] Lin P, Chen L, Yang N, *et al*. Evaluation of stem cell differentiation in diabetic rats transplanted with bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Transplant Proc, 2009, 41(5): 1891-1893.

[11] Wu X H, Liu C P, Xu K F, *et al*. Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(24): 3342-3349.

[12] Chang C, Niu D, Zhou H, *et al*. Mesenchymal stem cells contribute to insulin-producing cells upon microenvironmental manipulation *in vitro*[J]. Transplant Proc, 2007, 39(10), 3363-3368.

[13] Choi K S, Shin J S, Lee J J, *et al*. *In vitro* trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 330(4): 1299-1305.

[14] Chen L, Dong J, Hou W, *et al*. Sustained effect of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with diabetes 12 month follow-up[J]. Diabetes, 2008, 57 (Suppl 1): 1962.

[15] Estrada E J, Valacchi F, Nicora E, *et al*. Combined treatment of intrapancreatic autologous bone marrow stem cells and hyperbaric oxygen in type 2 diabetes mellitus[J]. Cell Transplant, 2008, 17(12): 1295-1304.

[16] 季代金, 黄茂涛, 王维萍, 等. 自体骨髓干细胞治疗 2 型糖尿病 2 例[J]. 临床军医杂志, 2011, 39(1): 199-200.

[17] 王攀, 吴正蓉, 田景伦, 等. 经皮脾动脉自体骨髓细胞移植治疗 2 型糖尿病 5 例[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(23): 4355-4358.

[18] Weng J, Li Y, Xu W, *et al*. Effect of intensive insulin therapy on beta-cell function and glycaemic control in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: a multicentre randomised parallel-group trial[J]. Lancet, 2008, 371(9626): 1753-1760.

[19] Esmatjes E, Montana X, Real M I, *et al*. Regeneration of insulin production by autologous bone marrow blood autotransplantation in patients with type 1 diabetes[J]. Diabetologia, 2010, 53(4): 786-789.

[20] 李莉蓉, 沈山梅, 上官海燕, 等. 自体外周造血干细胞移植治疗初发 1 型糖尿病的疗效与安全性[J]. 中国糖尿病杂志, 2010, 18(10): 745-748.

[21] 顾卫琼, 孙首悦, 胡炯, 等. 自体造血干细胞移植治疗 1 型糖尿病的疗效和安全性评价[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2010, 26(12): 1023-1026.

(**收稿**:2011-06-25;**修回**:2011-08-20)

(编辑 栾 嘉)