

自体外周血单核细胞移植治疗重度下肢缺血的临床疗效

方征东, 王晓天, 胡何节, 孙小杰, 葛新宝, 程灿

(安徽医科大学附属医院血管外科, 合肥 230001)

[摘要] **目的** 探讨自体外周血单核细胞治疗重度下肢缺血的长期疗效和安全性。**方法** 回顾性分析行自体外周血单核细胞治疗的重度下肢缺血患者的临床资料。根据引起下肢缺血的原因, 患者分为2组: 动脉硬化闭塞(ASO)组, 共29例; 血栓闭塞性脉管炎(TAO)组, 共43例。采用临床症状及下肢血流改变进行疗效评价, 随访所有患者治疗后3年内疗效及不良反应情况。**结果** ASO组患者临床症状评分和血流灌注参数在6个月内明显改善, 但随着随访时间延长又逐渐恶化至术前水平; TAO组患者临床症状评分和血流灌注参数在改善后能得到长时间维持($P < 0.05$)。随访结束, ASO组免截肢率为17.2%, TAO组免截肢率为65.1% ($F = 15.99$, $P < 0.05$)。**结论** 自体外周血单核细胞移植是治疗重度下肢缺血安全、有效的方法, 适合于血栓闭塞性脉管炎引起的重度下肢缺血。

[关键词] 闭塞性动脉硬化; 闭塞性血栓性脉管炎; 下肢; 细胞移植; 单核细胞

中图分类号: R543.5; R654.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/J.issn.1672-6790.2017.04.003

Clinical analysis of autologous peripheral blood mononuclear cells for treating critical limb ischemia

Fang Zhengdong, Wang Xiaotian, Hu Hejie, Sun Xiaojie, Ge Xinbao, Cheng Can (Department of Vascular Surgery, Anhui Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, China)

Corresponding author: Wang Xiaotian, Email: wangxiaotian1967@163.com

[Abstract] **Objective** To evaluate long-term clinical outcomes after autologous peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) implantation in patients with critical limb ischemia (CLI). **Methods** The clinical data of 72 patients with CLI were analyzed retrospectively. There were 29 patients with arteriosclerosis (ASO) and 43 patients with thromboangiitis obliterans (TAO). A series of clinical outcomes and laboratory findings were compared between the ASO and TAO group. **Results** In patients with ASO, clinical symptoms, ankle brachial pressure index (ABI) and transcutaneous oxygen pressure (TcPO₂) improved after 1 month, but gradually decreased during 3-year follow-up and returned to baseline levels. In TAO group, clinical symptoms, ABI and TcPO₂ were significantly increased after 1 month and remained high during 3-year follow-up. The amputation-free rates after PBMNC implantation were 17.2% in ASO group and 61.5% in TAO group. **Conclusions** PBMNC implantation is safe and effective in patients with CLI. Compared with ASO, PBMNC implantation is more effective in CLI patients with TAO disease.

[Key words] Arteriosclerosis obliterans; Thromboangiitis obliterans; Lower extremity; Cell transplantation; Monocytes

外科旁路手术和经皮血管腔内成形术是外周动脉疾病(PAD)行血管重建的主要方式, 对于伴有严重肢体缺血(CLI)的PAD患者, 如果无法行血管重建, 有时必须行截肢手术。近年来研究表明^[1-2], 使用骨髓或外周单核细胞, 以及内皮祖细胞移植的细胞治疗可明显改善严重肢体缺血

患者的临床症状, 降低截肢率, 但仍缺乏长期研究数据。本研究回顾性分析我科自2004年以来接受自体外周血单核细胞(PBMNC)治疗的CLI患者临床资料。根据引起下肢缺血的原因, 评估外周血单核细胞对CLI患者的临床疗效及安全性。

基金项目: 安徽省自然科学基金(1408085MH177); 安徽省公益性技术应用研究联动计划(1704f0804013)

作者简介: 方征东, 副主任医师, Email: fangzhegdong@126.com

通信作者: 王晓天, 副主任医师, Email: wangxiaotian1967@163.com

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2004年1月至2016年12月我科收治接受自体外周血单核细胞移植治疗的下肢缺血患者临床资料,共计72例,其中男65例,女7例;<65岁58例,≥65岁14例;年龄24~88岁,平均年龄(50.5±6.2)岁;合并高血压17例、冠心病9例、糖尿病6例、脑梗死3例;3例曾接受血管旁路手术,2例行血管支架置入术;病程2~21个月,平均(13.8±4.7)个月。接受PBMNC治疗的患者均满足以下条件:(1)Fontaine分期为Ⅱb期~Ⅳ期的慢性下肢缺血患者;(2)CTA或其他影像学检查证实下肢远端没有动脉流出道,无法进行下肢动脉旁路手术或血管腔内治疗;(3)药物保守治疗效果不佳;(4)近5年内无明确恶性疾病的患者。并根据引起下肢严重缺血症状的原因分为两组:(1)由下肢动脉硬化闭塞症(ASO)引起,又称ASO组,29例患者;(2)由血栓闭塞性脉管炎(TAO)引起,又称TAO组,43例患者。

1.2 治疗方法 (1)PBMNC动员、采集:所有患者经粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员后,于第3天开始查血常规,计数单核细胞数,当白细胞>20×10⁹/L且单核细胞(MNC)>30%时,使用血细胞分离仪3000Plus采集外周血单核细胞,制备PBMNC悬液,按每肢30~50 mL浓缩成细胞悬浊液,采集后的细胞悬液中MNC的浓度一般为1×10⁸/mL,细胞总数约为5×10⁹个。(2)PBMNC移植:单个核细胞采集后于3 h内移植至患肢。于患肢缺血部位取40~60个注射点,各点间距2~3 cm,深度1~1.5 cm,肌肉注射,每点注射0.7~1 mL细胞悬液。

1.3 术后处理 术后予以抗血小板、改善微循环处理,并根据具体情况予以控制血压、血糖,溃疡创面予以清创、换药,并定期随访。

1.4 观察指标 对下肢间歇性跛行、疼痛及皮肤改变等临床症状通过评分评估,对肢体血流量通过踝肱指数(ABI)和经皮氧分压(TcpO₂)测量。

1.5 评分标准

1.5.1 间歇性跛行距离 4分:行走<100 m时出现疼痛或者伴有静息痛;3分:行走100~200 m时有疼痛感;2分:行走200~400 m时有疼痛感;1分:行走400~500 m时有疼痛感;0分:行走>500 m时无疼痛感。

1.5.2 疼痛评分 4分:疼痛难以忍受,影响睡眠、食欲;3分:经常疼痛,需用止痛剂;2分:经常疼痛,可忍受;1分:偶有疼痛;0分:无疼痛。

1.5.3 皮肤改变 4分:溃疡形成或者坏疽;3分:皮肤呈紫黑色;2分:皮肤色泽变暗;1分:皮肤变苍白或者发干;0分:无变化。

1.6 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料进行正态性检验后,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用t检验。两组的疗效资料为多时点观测数据,行两因素重复测量方差分析。组间两两比较采用LSD-t检验,组内时间比较采用差值t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线资料 两组在性别、缺血分级以及病程等方面差异无统计学意义,但与ASO组患者相比,TAO组基本为年轻患者($P < 0.05$),没有心血管疾病发生的相关危险因素($P < 0.05$),多有吸烟史($P < 0.05$)。见表1。

2.2 临床症状 两组患者均于移植术后1个月开始随访,随访3~90个月,平均43个月。从表2中可以看出,在术后1个月,两组患者的疼痛、间歇性跛行及皮肤改变评分均较术前明显降低($P < 0.05$),表示各组患者经自体外周血单核细胞治疗后下肢缺血症状有明显缓解,其中ASO组在术后半年评分降低较术前仍有统计学意义($P < 0.05$),然而,随着随访时间的延长,ASO组患者临床症状的各项评分逐渐恢复到术前水平,部分甚至加重($P > 0.05$)。与术前相比,TAO组临床症状的各项评分在术后1个月开始降低,且在术后2到3年,其评分

表1 接受PBMNC移植患者的临床基本资料对比

组别	例数	性别(例)		年龄 ($\bar{x} \pm s$,岁)	Fontaine 分级[例(%)]			病程 ($\bar{x} \pm s$,月) [例(%)]	吸烟 [例(%)]	高血压 [例(%)]	糖尿病 [例(%)]	冠心病 [例(%)]
		男	女		Ⅱb	Ⅲ	Ⅳ					
ASO组	29	24	5	65.5±13.8	1(3.4)	23(79.3)	5(17.3)	9.8±4.0	19(65.5)	17(58.6)	6(20.7)	9(31.0)
TAO组	43	41	2	41.4±8.0	6(14.0)	24(55.8)	13(30.2)	14.6±2.7	42(97.7)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
<i>F(t)</i> 值		3.08		(9.36)		4.6		(6.06)	11.46	32.54	9.57	15.04
<i>P</i> 值		0.79		0.001		0.1		0.13	0.001	0.000	0.003	0.000

的降低仍差异有统计学意义($P < 0.05$),也明显低于同期 ASO 组患者($P < 0.05$)。这些结果表明自体外周血单核细胞治疗后,下肢缺血症状改善能维持更为持久的时间。到随访结束,ASO 组仅有 5 例患者未行截肢治疗,免截肢率为 17.2%,TAO 组有 28 例患者未行截肢治疗,免截肢率为 65.1%,明显好于 ASO 组($F = 15.99, P < 0.05$)。

2.3 血流量的恢复 从表 2 中可以看出,在术后 1 个月,两组患者 ABI 和肢体末梢 $TcpO_2$ 较术前均有显著增高($P < 0.05$)。但 ASO 组 ABI 及 $TcpO_2$ 值在术后半年达到峰值后,快速下降,术后 2 年逐渐恢复到术前水平。而 TAO 组 ABI 及 $TcpO_2$ 的改善能够维持到术后 3 年,明显好于 ASO 组($P < 0.05$)。

2.4 安全性观察 部分患者下肢肌肉注射后,短期内有疼痛不适,一般 1 周左右消失,未见注射部位感染发生。术后 3 个月内,未发生因注射引起的心脑血管意外及糖尿病视网膜病变加重情况,复查血常

规及肝功能均未见明显异常。经过最长近 10 年的随访,注射 PBMNC 后肢体及其他部位未见肿瘤发生。

3 讨论

EPCs 大量存在于正常骨髓、脐血、外周血和脾中,2002 年日本 Kansai 医科大学^[3]首次报道了应用骨髓单核细胞移植治疗人的下肢缺血性疾病的临床研究,并显示出了积极的效果。通过干细胞移植改善下肢缺血肢体的血液供应,可能与以下因素有关^[4]:①干细胞可被诱导分化为内皮细胞或平滑肌细胞,从而作为种子细胞参与血管壁的组成;②干细胞分泌促血管生成因子来促进缺血区域血管生成;③干细胞通过旁分泌途径促进侧支循环的建立,改善缺血肢体的血流灌注。近年来,随着干细胞动员药物及血液细胞分离机的广泛应用,使动员骨髓中的干细胞进入外周血循环并进行分离纯化成为可能。

表 2 ASO 和 TAO 患者接受 PBMNC 移植前后的疗效($\bar{x} \pm s$)

时间	疼痛(分)		间歇性跛行(分)		皮肤改变(分)	
	ASO 组	TAO 组	ASO 组	TAO 组	ASO 组	TAO 组
术前	3.03 ± 0.91	3.88 ± 1.22 ^a	3.45 ± 0.78	3.63 ± 0.95	3.07 ± 1.30	3.6 ± 1.2
术后 1 月	1.66 ± 1.2 ^b	1.56 ± 1.16 ^b	1.72 ± 1.19 ^b	1.77 ± 1.13 ^b	1.41 ± 1.12 ^b	1.65 ± 1.09 ^b
术后半年	1.97 ± 1.32 ^b	1.42 ± 1.07 ^b	1.86 ± 1.22 ^b	1.47 ± 1.03 ^b	1.62 ± 1.27 ^b	1.58 ± 0.79 ^b
术后 1 年	2.69 ± 1.23	1.35 ± 1.06 ^{ab}	2.34 ± 1.26 ^b	1.37 ± 1.09 ^{ab}	2.66 ± 1.29	1.35 ± 0.92 ^{ab}
术后 2 年	3.24 ± 1.43	1.47 ± 1.03 ^{ab}	3.48 ± 1.40	1.46 ± 1.32 ^{ab}	3.00 ± 1.22	1.86 ± 1.32 ^{ab}
术后 3 年	3.55 ± 1.38	1.51 ± 1.12 ^{ab}	3.55 ± 1.38	1.63 ± 1.23 ^{ab}	3.14 ± 1.23	2.09 ± 1.19 ^{ab}
整体分析	(HF 系数:0.549)		(HF 系数:0.943)		(HF 系数:0.588)	
组间 F 值, P 值	10.874,0.002		3.066,0.084		10.998,0.001	
时间 F 值, P 值	92.298,0.000		203.700,0.000		125.701,0.000	
交互 F 值, P 值	60.095,0.000		68.957,0.000		56.550,0.000	

时间	ABI		$TcpO_2$ (kPa)	
	ASO 组	TAO 组	ASO 组	TAO 组
术前	0.23 ± 0.1	0.24 ± 0.12	1.43 ± 0.65	1.36 ± 0.78
术后 1 月	0.42 ± 0.15 ^b	0.56 ± 0.22 ^{ab}	2.57 ± 1.04 ^b	2.97 ± 1.18 ^b
术后半年	0.48 ± 0.18 ^b	0.68 ± 0.25 ^{ab}	3.22 ± 1.06 ^b	3.43 ± 1.14 ^b
术后 1 年	0.35 ± 0.15 ^b	0.63 ± 0.14 ^{ab}	2.49 ± 1.12 ^b	3.53 ± 1.16 ^{ab}
术后 2 年	0.27 ± 0.11	0.58 ± 0.19 ^{ab}	1.44 ± 0.8	3.45 ± 1.27 ^{ab}
术后 3 年	0.25 ± 0.11	0.56 ± 0.16 ^{ab}	1.43 ± 0.95	3.35 ± 1.18 ^{ab}
整体分析	(HF 系数:0.416)		(HF 系数:0.587)	
组间 F 值, P 值	30.672,0.000		13.997,0.000	
时间 F 值, P 值	109.694,0.000		307.929,0.000	
交互 F 值, P 值	422.603,0.000		137.189,0.000	

注:整体分析为两因素重复测量方差分析;ASO 组为 29 例,TAO 组为 43 例;组间两两比较为 LSD- t 检验,两组相比,^a $P < 0.05$;时间比较为差值 t 检验,与术前比较,^b $P < 0.05$

对于不同原因引起的下肢缺血,随着时间的延长,PBMNC 移植后疗效明显不同。在本研究中,无论 TAO 组或 ASO 组患者在 PBMNC 移植后半年内都能明显改善临床症状,增加远端血流量。但 1 年后随访发现,临床症状评分和血流灌注参数如 ABI 和 $TcpO_2$ 在 ASO 组开始下降,并逐渐恢复至基线水平,而在 TAO 组,临床症状评分和血流灌注参数改善能得到长时间维持。多年的随访也发现,ASO 组免截肢率仅为 17.2%,TAO 组为 65.1%,证实随着时间的延长,ASO 组有更多的患者发生截肢或死亡。同样,Idei 等^[5]在利用骨髓单核细胞治疗下肢缺血的研究中发现,糖尿病和血液透析与术后高截肢发生率有一定关系,因此对于接受血液透析的糖尿病患者,存在 CLI 时,不建议行细胞治疗。为解决 EPCs 的功能及老化问题,通过基因转染技术可以使靶细胞功能得到显著改善,并能持续释放促血管因子。Iwaguro 等^[6]将编码 VEGF 的基因导入 EPCs,再应用于动物模型当中发现转基因的 EPCs 展示出更强大的增殖、黏附及整合能力,并且还能通过旁分泌作用促进其他已分化成熟的内皮细胞增殖、迁移。这些经过基因修饰的 EPCs 具有诱发和促血管新生的双重功能,其血管新生效率比内皮细胞高出 30 倍。

细胞治疗的安全性,尤其是长期安全性是一直人们关注的重点^[7]。Miyamoto 等^[8]报道,血栓闭塞性脉管炎细胞治疗期间,有少量患者出现不适,其中 1 例 30 岁患者在治疗后 20 个月突然死亡。在研究中,本组也发现动脉粥样硬化的 PAD 患者死亡率在随访期间明显高于血栓闭塞性脉管炎患者,这种差异可能与动脉粥样硬化患者心血管并发症有关,与细胞治疗关系不大。在基本临床资料对比中,本研究发现血栓闭塞性脉管炎患者除吸烟外,通常不具有心血管疾病的危险因素(高血压、糖尿病、高血脂),因此其心血管疾病发病率与健康人群无明显差别。最近的一项临床试验也显示,骨髓单核细胞移植不会改变 CLI 患者的死亡率^[9]。另一方面,治疗性血管新生的一潜在风险为在促进缺血区域的血管新生的同时,可能促进隐匿存在的恶性肿瘤的血管新生,从而导致其生长,还有可能促使增殖性或出血性视网膜病变加重。在本研究中,包括 ASO 及 TAO 患者在内,PBMNCs 移植后,除注射部位有胀痛不适外,通过长期随访,没有发现与 PBMNCs 移植有

关的严重不良反应。

总之,通过本组长期研究发现,自体 PBMNC 移植对严重肢体缺血的治疗是有效的,操作简单。相对于动脉硬化闭塞引起的肢体缺血,自体外周血单核细胞移植更适合于血栓闭塞性脉管炎患者。

参考文献

- [1] SUN L, WU L, QIAO Z, et al. Analysis of possible factors relating to prognosis in autologous peripheral blood mononuclear cell transplantation for critical limb ischemia[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(8): 1110-1116.
- [2] 闫波, 苏少飞, 田玉峰, 等. 自体骨髓干细胞移植治疗严重下肢缺血性疾病疗效的影响因素分析[J]. *中国血管外科杂志: 电子版*, 2016, 8(2): 146-149
- [3] TATEISHI-YUYAMA E, MATSUBARA H, MUROHARA T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells; a pilot study and a randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2002, 360(9331): 427-435.
- [4] HO IA, CHAN KY, NG WH, et al. Matrix metalloproteinase 1 is necessary for the migration of human bone marrow derived mesenchymal stem cells toward human glioma[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(6): 1366-1375.
- [5] IDEI N, SOGA J, HATA T, et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation reduces long-term major amputation risk in patients with critical limb ischemia; a comparison of atherosclerotic peripheral arterial disease and Buerger disease[J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2011, 4(1): 15-25.
- [6] IWAGURO H, YAMAGUCHI J, KALKA C, et al. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration[J]. *Circulation*, 2002, 105(6): 732-738.
- [7] 赵亲明, 胡何节, 邓福生, 等. 人 VEGF165 基因转染人外周血内皮祖细胞的实验研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2009, 18(12): 1263-1266.
- [8] MIYAMOTO K, NISHIGAMI K, NAGAYA N, et al. Unblinded pilot study of autologous transplantation of bone marrow mononuclear cells in patients with thromboangiitis obliterans[J]. *Circulation*, 2006, 114(24): 2679-2684.
- [9] MOLAVI B, ZAFARGHANDI MR, AMINIZADEH E, et al. Safety and efficacy of repeated bone marrow mononuclear cell therapy in patients with critical limb ischemia in a pilot randomized controlled trial[J]. *Arch Iran Med*, 2016, 19(6): 388-396.

(收稿日期: 2017-04-11)