

· 专家论坛 ·

自体干细胞移植规范化治疗下肢慢性缺血性疾病的

专家共识

中华医学会医学工程学分会干细胞工程专业委员会

中华医学会外科学分会血管外科学组

一、概述

下肢缺血是一种常见症状。在我国造成下肢缺血的主要病因是动脉粥样硬化闭塞症、血栓闭塞性脉管炎和糖尿病足等。下肢动脉硬化闭塞症的发病率10%。随着年龄的增长,其发病率呈上升趋势,70岁以上人群的发病率在15%~20%。下肢动脉硬化闭塞症的预后较差,其中间歇性跛行患者5年病死率30%,而静息痛、溃疡和坏疽的下肢缺血患者5年病死率达70%,主要死亡原因是冠心病和脑血管疾病。下肢缺血的主要临床表现为下肢凉、麻木、无力、间歇性跛行、静息痛和肢体缺血性溃疡、坏疽等。国内外临床常用的分期方法有Fontaine法和Rutherford法。下肢缺血的治疗目的是增加行走的距离,缓解疼痛,促进溃疡愈合和避免截肢。血管重建是治疗重症下肢缺血的最佳方案,但要根据患者的临床症状和全身情况选择。主要治疗方法包括药物治疗、血管腔内治疗、手术治疗以及干细胞移植和基因治疗等。由于对全身情况和血管条件的限制,动脉旁路手术和血管腔内成形术(球囊扩张、支架植入)适用于多数有条件的患者。对于不适合上述治疗及上述治疗效果不佳或术后复发者,尤其是糖尿病下肢缺血和血栓闭塞性脉管炎患者,病变多累及下肢远端小动脉,缺乏安全和有效的治疗方法,这部分患者面临截肢的危险,甚至危及生命。自体干细胞移植作为近年来血管再生的新技术,为这部分患者提供了一种新的治疗选择。

自体干细胞移植治疗下肢缺血的主要目标是促进下肢血管新生。其中起主要作用的是能形成血管的成体干细胞(包括血管内皮祖细胞、间充质干细胞和造血干细胞等)。正常情况这些干细胞主要存在于骨髓中,外周血液循环中很少。当存

在肢体缺血时,这些干细胞将动员到外周血中,归巢到缺血组织,发挥血管新生的作用。通过药物进行骨髓动员刺激后这些干细胞也可以被动员到外周血液循环中。

目前研究认为,骨髓单个核细胞中的CD34阳性细胞是内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)的主要来源,CD34(造血干细胞及EPC的共有表面标记物)细胞在末梢血中只有骨髓的0.2%。可测定的最幼稚细胞在1ml末梢血中仅有2.9个,为骨髓的1%。提示骨髓细胞有可能提供更多的EPC用于血管新生疗法。成年个体的骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cell, BM-MNC)中含有多种干细胞成分,其中CD34阳性细胞含量约占BM-MNC总数的3%,为外周血的15倍,同时BM-MNC移植还可以提供多种促血管生长因子,故BM-MNC移植兼具EPC和细胞生长因子的作用。在老龄、糖尿病和动脉粥样硬化等病理状态下,患者EPC的数量、增殖潜能、黏附和成血管能力均降低,说明这些患者自发的血管新生潜能降低,进一步支持了对这些患者进行干细胞移植的必要性。

根据干细胞的不同来源,目前临床上自体干细胞移植治疗慢性下肢缺血的方式分3种:即自体骨髓干细胞移植、自体外周血干细胞移植和改良的自体骨髓干细胞移植(即骨髓动员后的自体骨髓干细胞移植)。

自体干细胞移植至少有几个优点(1)不存在异体干细胞的免疫排斥(2)没有胚胎干细胞的伦理道德问题(3)作为自体的细胞,仅仅是采用富集提纯的办法,没有在体外进行诱导分化和增殖,也不存在异种血清污染和基因突变等风险(4)在严格无菌下操作,体外分离时间短(2h),微生物污染的可能性小(5)正如患者本身的植皮一样,都是患者本身的组织,具有取材方便的特点(6)自体干细

胞移植治疗血液疾病已有几十年的历史。因此,目前自体干细胞移植治疗肢体缺血性疾病呈现出广阔的前景。

二、自体干细胞移植的方法

(一)自体骨髓干细胞移植

先局麻下抽取患者的骨髓血,然后将抽取的骨髓血在干细胞实验室分离纯化得到 BM-MNC,再通过肌注或动脉内注射的方式进行缺血肢体的移植。在单纯骨髓干细胞移植中,骨髓血的抽取量一般在 400~500 ml,得到的 BM-MNC 总数在 $(1\sim 3)\times 10^9$ 个。由于患者大多年龄比较大,体弱并多伴有糖尿病、高血压、冠状动脉硬化性心脏病或/和动脉硬化症等,如果 1 次抽取过多的骨髓血,会增加心脑血管并发症的发生。可通过同时输血或减少采髓量的办法来克服这一缺点。

(二)自体外周血干细胞移植

先采用骨髓动员的方法 [皮下注射粒细胞集落刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) 5~7 d] 将骨髓中的干细胞动员到外周血液循环中,通过专用的单个核细胞分离机,将含有造血干细胞的单个核细胞分离出来,然后再移植到患者本人的缺血局部(通过缺血局部肌肉注射或者通过动脉腔内注射),从而达到促进血管新生,缓解肢体缺血的目的。患者不会失血,而一次得到的单个核细胞总数一般可达 10^{10} 量级。缺点是长时间的骨髓动员会使大量有核细胞进入血液循环,导致血液黏稠度增加,血管内血栓形成的机会增加,增加心肌梗死和脑梗塞发生的危险。因此,在骨髓动员早期就应采用正规的抗凝措施,在整个过程中需要注意心脑血管并发症的发生。

(三)改良的骨髓干细胞移植

为避免在单纯骨髓干细胞移植中抽取骨髓血量过多的问题,首都医科大学宣武医院谷涌泉等发明了改良的骨髓干细胞移植方法。即骨髓动员刺激以后的骨髓干细胞移植。主要步骤是在抽取骨髓前先用 G-CSF 短期动员骨髓(2~3 d),在大量增殖的干细胞仍在骨髓中未进入外周血之前,抽取骨髓血 200 ml,在干细胞实验室分离纯化 BM-MNC 后再进行移植。从临床研究的资料中发现:无论是主观评价指标,还是客观评价指标均比单纯的骨髓干细胞移植和外周血干细胞移植的疗效更好,而且

不良反应也较外周血干细胞少。与前 2 种方式相比较,此方式的主要优点是(1)抽取骨髓血量少(200 ml),对患者全身影响不大(2)动员时间短,外周血液中单个核细胞的数量不高,血液黏稠度比外周血干细胞低,发生心脑血管意外的几率较小;(3)可以获得大量的骨髓干细胞。

三、临床应用

(一)实施条件

1. 技术准入:尽管是自体干细胞移植,没有异体干细胞的免疫排斥,也不存在胚胎干细胞的伦理道德问题,但是专家们一致认为,要有医院的医学伦理委员会和新技术委员会或相关部门的批准。

2. 人员资质准入(1)专业人员需经过相关的业务培训(2)需要相关专业副主任医师以上人员负责实施。

3. 实验室设施和条件(1)万级实验室(2)离心机(3)拟行外周血干细胞移植的单位要有血细胞分离机。

(二)患者的选择

1. 适应证(1)各种原因导致的慢性下肢缺血性疾病无法行手术搭桥或者介入治疗,而保守治疗无效者(2)无法耐受旁路手术和介入治疗的患者。

2. 禁忌证(1)过去 5 年内明确有恶性疾病的患者或血中肿瘤标记物(AFP, CEA, PSA, CA19-9, CA125)水平明显升高者(2)严重心、肺、肝、肾功能衰竭或一般状况很差不能耐受干细胞移植手术者(3)近期有心肌梗死或脑梗塞病史者禁忌(4)主动脉、髂动脉等大动脉闭塞者。

(三)自体干细胞移植的围手术期处理

1. 患者的思想准备:详细地向患者说明干细胞移植方法及其优点和不足之处,使患者有比较充分的准备。特别要说明干细胞的微创性,使患者消除顾虑,轻装上阵。

2. 患者的身体准备:在取髓和移植部位要备皮。需要血管腔内介入的患者,术前先行碘过敏试验,对糖尿病与肾功能不全、脱水患者术前开始水化,糖尿病患者术前停用二甲双胍。有感染的患者合理选用抗生素抗感染治疗。

手术当天要禁食水,静脉输液保证患者基本的需求量和营养。如果术前血色素低于 10 g/L,建议备血 200 ml,在抽取骨髓血时缓慢输血。

3. 干细胞移植术前骨髓动员:皮下注射 G-CSF $5 \sim 10 \mu\text{g} / \text{kg}$, 1次/d, 外周血干细胞移植动员 4~5d, 改良骨髓干细胞移植动员 2~3d, 每日监测 WBC 不超过 $5 \text{万} / \mu\text{l}$, 外周血干细胞移植最好待外周血 $\text{CD}34^+$ 细胞数达 $10 \sim 20 \text{个} / \mu\text{l}$ 再采集外周血干细胞。动员开始即应给予抗凝和抗血小板治疗, 阿司匹林 0.1g , 1次/d; 低分子肝素 $0.4 \sim 0.6 \text{ml}$, 皮下注射, 1次/12h 或普通肝素 4000u , 皮下注射, 1次/8h。抗凝和抗血小板治疗至少持续至外周血白细胞恢复正常。

(四) 实验室的处理(干细胞制备)

骨髓血的收取、转送应由专人负责, 以免混淆。制备过程必须严格无菌操作, 流程规范化, 使用密度梯度离心法进行分离制备, 也可以选用不同型号的全自动细胞分离系统, 干细胞以生理盐水稀释至所需容量, 制备的干细胞只能在 4°C 冰箱短时间保存, 计数细胞总数, 活力测定, 有条件时推荐用流式细胞仪鉴定骨髓干细胞的成分。

(五) 干细胞移植的方法、步骤和措施

一般移植方法有 2 种, 分别为缺血肢体的局部肌肉注射移植和下肢动脉腔内注射移植。医生可根据患者的全身情况和病变情况选择适合的方法进行移植。

1. 局部缺血肌肉注射法 (1) 麻醉多选用静脉复合麻醉, 也可选用硬膜外或者腰麻, 由于注射范围广, 次数多, 局部麻醉不推荐 (2) 抽取 $20 \sim 50 \text{ml}$ 的生理盐水稀释制备好的干细胞悬浊液, 然后抽取上述稀释后的干细胞悬液备用; (3) 在缺血肢体划出要注射的具体位置, 一般针距 2cm , 每针注射 $0.75 \sim 1 \text{ml}$ (4) 注射后用酒精纱布消毒皮肤后包扎注射部位。

2. 下肢动脉腔内注射 (1) 一般选用局部麻醉, 穿刺动脉, 放置动脉鞘管, 肝素抗凝 (2) 用导丝和导管选择到下肢病变动脉, 送入并充盈球囊, 阻断动脉后将干细胞悬液缓慢推入动脉腔内, $3 \sim 5 \text{min}$ 完成, 放松球囊并撤除 (3) 退出动脉鞘, 压迫并包扎穿刺点。

(六) 干细胞移植术后的处理

1. 术后根据需要应用抗生素。
2. 对于局部注射患者, 术后 $2 \sim 3 \text{d}$ 撤除包扎的纱布。

3. 对于动脉腔内注射患者, 一般术后需下肢制动 6h, 卧床 24h。术后建议用低分子肝素预防血栓形成。

(七) 干细胞移植术后评价

1. 安全性评价: 干细胞移植的安全性问题不容回避。对干细胞移植安全性的忧虑主要是免疫排斥和肿瘤生长的问题。对于安全性的评价, 必须注意下面几点: 是否有致瘤性, 有无局部的不良反应, 包括局部有无红、肿、热、痛等炎症反应及过敏反应, 有无全身的不良反应, 术后肝肾等功能的变化。一旦出现严重不良事件应按规定报告医院相关主管部门。

2. 有效性评价: 临床观察有效性的主要指标和方法主要包括主观指标和客观指标。其中主观指标包括以下几点: 疼痛、冷感和麻木等症状的改善程度。

(1) 疼痛评分: 标准为 0 分: 无疼痛; 1 分: 偶有疼痛, 被问及能回忆起; 2 分: 疼痛经常出现但能耐受, 不需或偶用一般止痛剂; 3 分: 经常用一般止痛剂; 4 分: 因疼痛影响睡眠, 一般止痛药剂难以缓解。

(2) 冷感评分: 标准为 0 分: 无冷感; 1 分: 患者偶述受累肢体有发凉、怕冷的感觉; 2 分: 受累肢体经常有发凉、怕冷的感觉; 3 分: 受累肢体有明显的冷、凉感觉, 需要采用局部保温措施, 症状能得到一定程度的缓解; 4 分: 受累肢体有明显的冷、凉感觉, 采用局部保温措施, 症状也无明显改善。

(3) 麻木评分: 标准为 0 分: 无麻木; 1 分: 偶感轻度麻木; 2 分: 经常有轻度麻木不适; 3 分: 麻木感觉明显, 但可以忍受; 4 分: 麻木非常明显, 难以忍受, 严重影响日常生活。

3. 客观评价标准主要包括 (1) 间歇跛行的距离(干细胞移植前后跛行距离的变化): 主要测定无痛步行时间(分)或跛行距离(米), 此项指标带有一定的主观性, 但是如果使用平板实验, 则是一种非常简单和客观的指标 (2) 皮肤的温度差(双下肢): 移植前后的变化 (3) 经皮氧分压(TCPO₂): 作为全球通用的 3 大评估血管疾病金标准之一, 直接反映血管向组织供氧情况, 可以对肢体缺血情况的定量评估, 可以评估组织存活率, 是一种无创, 低成本并可重复使用的检查方法, 经皮氧分压测定, 是一种比较客观的指标, 国外经常用此项检查作为截

肢与否和预测截肢平面,一般临床上以 20 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa) 作为临界值,不过受周围环境影响较大,因此检查前患者一定静息平卧 30 min 以上,检查室内温度要保持恒温。(4)患肢紫绀及溃疡的面积和深度(mm),坏疽范围测量并标记,作为客观的评价指标之一,能够证明干细胞移植后是否有效。不过,即使血供得到了改善,溃疡面的愈合仍需要一定的时间,尤其是较大溃疡者,一般近期疗效中仅适用于小溃疡者。(5)静息状态下踝肱指数(ankle brachial index, ABI)及趾肱指数(toe brachial index, TBI):是一种简单、方便和有效的客观评价指标,但是不少患者在短期内不会明显增加。(6)激光多普勒血流量的测定:作为一种评价下肢血供的金标准之一,具有灵敏度高,操作简单的优点,是一种非常好的无创检查的评价指标。(7)数字减影血管造影术(digital subtraction angiography, DSA):观察侧支血管形成情况并评分。根据新生侧支血管评估分 4 级:0 级(无新生侧支血管)、+1 级(少许新生侧支血管)、+2 级(中量新生侧支血管)和 +3 级(丰富新生侧支血管)。(8)截肢率及截肢平面的变化:由于血管性截肢与血液供应具有相关

性,截肢平面经常受到血液供应的影响,如果移植前后的截肢平面有一定的变化,能够达到降低截肢平面的目的,也能够说明干细胞移植的有效性。

(八)术后随访

推荐术后第 1、3、6 和 12 个月时各随访 1 次,第 2 年每半年随访 1 次。此后每年随访 1 次。

执笔人:谷涌泉(首都医科大学宣武医院血管外科)

本专家共识由中华医学会医学工程学分会干细胞工程专业委员会和中华医学会外科学分会血管外科学组颁布,历时 2 年多时间,经过国内(血管外科、内分泌、干细胞研究等专业)汪忠镐(院士)、吴祖泽(院士)、付小兵(院士)、曹谊林、韩忠朝、张传森、辛世杰、李晓强、金毕、舒畅、胡何节、杨镛、毕伟、高涌、周兴立、郭连瑞、崔凤琴、沈飞霞、赵湜、王富军、王怀林、胡玲、黄文、吕晓霞、苗俊英、周慧敏、贾黎静等 50 多名专家反复讨论共同修改完成。

(收稿日期:2012-01-24)

(本文编辑:吕艳萍)

中华医学会医学工程学分会干细胞工程专业委员会,中华医学会外科学分会血管外科学组. 2012 年自体干细胞移植治疗下肢慢性缺血的专家共识 [J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志:电子版, 2012, 2(1): 1-4.