

非清髓性移植后供者淋巴细胞输注治疗血液病的疗效观察

李庆山,毛平,王顺清,朱志刚,王汉平,许艳丽,应逸,莫文健
(广州市第一人民医院血液科,广东广州 510180)

摘要: **目的** 研究非清髓性造血干细胞移植治疗血液病和供者淋巴细胞输注的疗效及并发症。**方法** 以抗淋巴细胞球蛋白(anti-T-lymphocyte globulin, ALG)或抗胸腺细胞球蛋白(anti-thymocyte globulin, ATG)为基础,减量化疗的非清髓性预处理方案治疗血液病6例,包括急性淋巴细胞白血病1例、多发性骨髓瘤2例、慢性粒细胞白血病1例、急性髓细胞白血病1例、骨髓纤维化1例,6例血液病于+28 d~+30 d进行第1次供者淋巴细胞输注,每隔3~4周1次,平均4.2(2~8)次,逐渐增加输注细胞数量,输注的T细胞数由 $(1.2\sim 9.5)\times 10^4/\text{kg}$ 逐渐增加至 $(0.75\sim 2.15)\times 10^8/\text{kg}$ 。**结果** 移植早期均形成混合性嵌体和血液学部分缓解(1例进步),供者淋巴细胞输注后,6例血液病中4例逐渐形成供者型完全嵌合体,并达到血液学完全缓解,骨髓纤维化患者仍然为混合性嵌合体和进步状态,并发急性移植物抗宿主病2例,慢性移植物抗宿主病2例,骨髓抑制2例,1例死于严重感染。**结论** 以ATG/ALG为基础的非清髓性造血干细胞移植,可实现异基因造血干细胞的成功植入。通过供者淋巴细胞输注可实现混合性嵌合体向供者完全嵌合体的转变,移植物抗宿主病和骨髓抑制为其主要并发症。

关键词: 造血干细胞移植,非清髓性;供者淋巴细胞输注;血液病

中图分类号:R457.7;R773.7

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2004)06-0573-04

Treatment of Hematologic Diseases by Nonmyeloablative Stem Cell Transplantation Followed by Donor Lymphocyte Infusion

LI Qing-shan, MAO Ping, WANG Shun-qing, ZHU Zhi-gang, WANG Han-ping,
XU Yan-li, YING Yi, MO Wen-jian

(Department of Hematology, The First Municipal People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the efficacy and complications of donor lymphocyte infusion (DLI) following nonmyeloablative stem cell transplantation (NSCT) for the patients with hematologic diseases. **Methods** The protocol was designed on the nonmyeloablative conditioning regimen based on anti-T-lymphocyte globulin (ALG) (90~120 mg/kg) or anti-thymocyte globulin (ATG) (20~25 mg/kg) with reduced-dose chemotherapy for six patients including acute lymphoblastic leukemia ($n=1$), multiple myeloma ($n=2$), chronic myelogenous leukemia ($n=1$), myelofibrosis ($n=1$), and acute myeloid leukemia ($n=1$). The six patients received first donor lymphocyte infusion (DLI) on day 28~30 after transplantation, and the infused dose of T cells was controlled by escalating dose regimen (EDR) from $(1.2\sim 9.5)\times 10^4/\text{kg}$ to $(0.75\sim 2.15)\times 10^8/\text{kg}$. The whole procedures were performed at an average of 4.2 (range, 2~8) procedures at intervals of 3~4 weeks. **Results** Engraftment was documented in the form of donor-receiver hematopoietic cells mixed chimera with partial remission (progression of case 6) at early stage posttransplant. Four patients were converted gradually into complete chimera with hematologic complete remission complicated by acute graft-versus-host disease (aGVHD) ($n=2$) and chronic GVHD (cGVHD) ($n=2$) and

收稿日期 2004-03-27

基金项目 广东省重点科研基金资助项目 (000261)

作者简介 李庆山(1967-),男,安徽桐城人,1997届中山医科大学血液学专业硕士,副主任医师. E-mail: guhaijing@163.net

myelosuppression ($n=2$), one patient died from severe infection. One myelofibrosis patient continuously remained mixed chimera and progression status. **Conclusions** Allogeneic donor stem cell engraftment into host can be achieved by NSCT based on ATG/ALG. Transient mixed chimera may be successfully converted into complete chimera by donor lymphocyte infusion post transplant. The main complications of donor lymphocyte infusion are GVHD and myelosuppression.

Key words: hematopoietic stem cell transplantation, nonmyeloablative; donor lymphocyte infusion, haematologic disease

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(6): 573 - 576 605]

以往清髓性造血干细胞移植的结果,均提示大剂量的放、化疗预处理并不能彻底杀灭患者体内的肿瘤细胞,自从 Kolb 等^[1]报道异基因骨髓移植(allo-BMT)治疗慢性粒细胞白血病患者复发,经过供者淋巴细胞输注(donor lymphocyte infusion, DLI)后再次获得血液学和细胞遗传学缓解以来,许多研究报告已肯定了 DLI 用于恶性血液病异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后复发的治疗作用,其疗效与移植物抗白血病(Graft versus leukemia, GVL)效应密切相关。我们自 1998 年 9 月至今采用非清髓性造血干细胞移植(nonmyeloablative stem cell

transplantation, NSCT)形成混合性嵌合体后,采用 DLI 治疗 6 例血液病,观察其疗效和并发症,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般病例资料

供者资料和受者移植前疾病状态资料见表 1。均为同胞供者的异基因造血干细胞移植,例 1 的 HLA 配型 1 个位点不合,其余全相合,诊断和治疗标准见文献[1]。

表 1 供者资料和患者移植前疾病状态资料
Table 1 Characteristics of patients and donors

Case	Patient age/sex	Diagnosis	Remission status before transplantation	Contra-indication to conditioning regimen	Donor age/sex	Donor/Receipient blood group
1	21/F	ALL-L2	CR ₁	HLA-mismatched	23/M	A/A
2	51/F	MM(ⅢA)	NR	Dysfunction of liver	37/M	O/A
3	41/M	MM(ⅢA)	PR	Abnormal liver and renal function	49/M	O/B
4	41/M	CML-CP	No treatment	Dysfunction of liver	33/M	O/O
5	13/M	AML(M _{2a})	CR ₁	Refusal of conventional conditioning regimen	17/M	B/B
6	48/M	MF	No treatment	Hep C positive	42/M	O/B

ALL: acute lymphoblastic leukemia; AML: acute myeloid leukemia; CML: chronic myelogenous leukemia; CR: complete remission; MF: myelofibrosis; MM: multiple myeloma; NR: no response; PR: partial remission

1.2 移植方案和移植物抗宿主病(GVHD)的预防

①预处理方案(见表 2):分 3 d(-3 d、-2 d、-1 d)以总量 90~120 mg/kg 的 ALG(例 1、4、5)或 20~25 mg/kg 的 ATG(例 2、3、6)(均为法国 Pasteur Merieu 公司产品)为基础,减量化疗:环磷酰胺(CTX)30~60 mg/kg(-3 d、-4 d),马利兰(BU)2 mg/kg(-7 d、-6 d、-5 d、-4 d),马法兰(Mel)120 mg/m²(-4 d)。②GVHD 的预防:环孢素 A(CSA)联合短程的甲氨喋呤(MTX)。MTX 在 +1 d 为 15 mg/m², +3 d、+6 d、+11 d 为 10 mg/m²;

CSA 3mg/(kg·d)持续静脉滴注,可以口服时改为 3~5 mg/(kg·d)。根据 CSA 浓度调整剂量, CSA 浓度维持在 200~400 μg/L,用药 8 个月逐渐减量并停药。③药物副作用的预防:苯妥英钠防治马利兰引起的惊厥,水化、碱化尿液和应用美斯钠(Mesna)预防出血性膀胱炎;持续静脉滴注前列腺素 E₁(PGE₁)7.2 μg/(kg·d),按 0.3 μg/(kg·h)输注(-6 d~+22 d)预防肝静脉闭塞病(VOD)。④干细胞来源:外周血(例 2、3、5、6),骨髓(例 1、4)。

1.3 感染的防治和造血因子的应用

+1d 起 G-CSF 300 μg/d 皮下注射,至白血

胞 $> 4.0 \times 10^9/L$ 停药,均未使用红细胞生成素治疗。移植期间住层流病房,予抗生素预防肠道感染,白细胞低下期间给予伊曲康唑和广谱抗生素,粒细胞缺乏期间加用人丙种球蛋白。

1.4 嵌合体的检测

性染色体、ABO 血型、微卫星法 DNA 指纹图,选取微卫星 DNA 位点,采用降落 PCR (DP-PCR) 扩增 80 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳。例 4 采用原位逆转录多聚酶链反应技术 (In Situ-RT-PCR) 定量检测 bcr/abl 融合基因,方法见参考文献 [3]。

1.5 供者淋巴细胞的输注

6 例血液病,供者未经动员,采用 Baxter CS-3 000 plus 血细胞分离机采集淋巴细胞; +28 d ~ +36 d 首次 DLI,以后每 3~4 周 1 次,DLI 的细胞数采用逐渐增加剂量的方案,首次给予小剂量的 T

淋巴细胞 $(1.2 \sim 9.5) \times 10^4/kg$,如无 I 度以上 GVHD 或外周血细胞下降时,逐渐增加至 $(0.75 \sim 2.15) \times 10^8/kg$ 。采集的淋巴细胞在输入患者体内之前未结处理,在采集后即予输注。

2 结果

2.1 造血干细胞的植入及移植并发症

移植后均达到供者造血干细胞的植入,均形成供受者的混合性嵌合体。例 4 出现 2 级的口腔粘膜炎症。例 5 于 +8 d 出现真菌性败血症,经两性霉素 B 治疗控制。所有的患者均达到血液学 PR,例 6 为进步。

2.2 供者淋巴细胞输注的临床观察

DLI 的疗效、并发症和患者生存状态详见表 2。

表 2 非清髓性造血干细胞移植临床结果

Table 2 Clinical data on the outcome following nonmyeloablative stem cell transplantation

Case	Conditioning regimen	CD34 ⁺ infused ($\times 10^6/kg$)	MNC infused ($\times 10^8/kg$)	The lowest WBC post NSCT	ANC $> 0.5 \times 10^9/L$ (d)	PLT $> 20 \times 10^9/L$ (d)	DLIs (times)	Complication of DLI	Duration observed (month)	Result
1	BU/CTX	3.12	3.08	0.1	+18	+8	9	aGVHD	49	DFs
2	BU/CTX	3.52	2.06	0.3	+15	+10	2	-	2	Died of severe infection
3	MeI	4.40	6.50	0.1	+15	+12	3	Myelosuppression/aGVHD	21	DFs
4	CTX/BU	2.69	2.70	0.4	+20	+25	5	cGVHD	16	Died of MOF
5	MeI/CTX	4.26	10.49	0.1	+11	+21	4	Myelosuppression/cGVHD	23	Died of IP
6	CTX	2.05	5.80	0.5	+8	Never	< 3	-	8	Lost follow-up

aGVHD: acute GVHD; cGVHD: chronic GVHD; DFs: disease free survival; IP: interstitial pneumonia; MOF: multiple organ failure

2.2.1 供者淋巴细胞输注的疗效 6 例血液病经过 DLI 后,例 2 于 2 次 DLI 后死于严重感染,例 6 保持混合嵌合体状态和血液学进步。例 1、3、4、5 分别经过 7、3、2、3 次 DLI 由混合嵌合体逐渐转变为供者型完全嵌合体状态,并达到血液学完全缓解。例 3 移植后,骨髓中骨髓瘤细胞占 1.5%,血清 M 蛋白 26.8%,DNA 指纹图及性染色体 (46,XX 占 64%) 均为 MC; 2 次 DLI 后,血清 M 蛋白减至 12.3%,骨髓瘤细胞为 0.4%,46,XX 染色体占 80%,第 3 次 DLI 后达到供者型完全嵌合体,未见骨髓瘤细胞及 M 蛋白;第 10、11 个月血型为混合象 (弱 B 型),1 年后完全转变为 O 型。例 1 于 +27 d 性染色体 XY/XX 比值为 1/2,经过 6 次 DLI 仍为混合性嵌合体,7 次 DLI 后性染色及 DNA 指纹图体为完全供者型。例 5 移植后,性染色体供者细胞占 90%,经过 2 次 DLI,性染色体及 DNA 指纹图

为供者的完全嵌合体。例 4 移植后 30 d 为血液学部分缓解,但 bcr/abl 融合基因阳性细胞占 5%,经过 1 次 DLI 消除微小残留病 (micro residual disease, MRD),2 次达到血液学及遗传学完全缓解。

2.2.2 供者淋巴细胞输注的并发症 例 1、3 于 DLI 后出现局部皮疹的 I 度 aGVHD,其中例 3 经过 CsA 和甲基强的松龙治疗很快控制,而例 1 未处理,观察后自行消退。例 4 在 +5 个月后出现广泛型 cGVHD,手掌局部皮肤和口腔难愈性溃疡、眼球结膜炎,未积极配合治疗,+14 个月病情恶化,出现多脏器功能衰竭后死亡。例 5 于 +8 个月后发现局限型 cGVHD,表现为局部皮疹和黄疸、肝功能受损,经过环孢素 A 和甲基强的松龙处理控制。

例 5 第 2 次 DLI 后出现血小板下降至 $30 \times 10^9/L$,未处理动态观察 2 周后逐渐恢复正常。例 3

第 2 次 DLI 后出现外周血三系的下降,血象最低降至血红蛋白 56 g/L,白细胞 $3.0 \times 10^9/L$,血小板 $50 \times 10^9/L$,经成份输血及 G-CSF 处理后 2 周恢复。

3 讨 论

传统的清髓性移植的移植相关毒性、死亡率和近远期并发症发生率高。目前认为异基因造血干细胞移植 (allo-HSCT) 治疗的机制在一定程度上是通过免疫效应细胞介导的 GVL 效应达到治疗目的, DLI 是 NSCT 的一个重要组成部分。

Slavin 等^[4]率先采用以强的免疫抑制剂氟达拉滨为基础的非清髓性移植方案,减轻预处理的毒性,建立稳定的混合性嵌合体状态,在此基础上行 DLI 达到供者型完全嵌合体。本组以 ATG/ALG 为基础的预处理方案的 6 例患者均有不同程度的肝肾功能不良,在预处理和移植的过程中呈现出较小的毒性,无预处理相关的死亡,均形成混合性嵌合体状态,表明该方案的安全性和有效性。例 2 在进行 2 次 DLI 后,出现感染性休克,虽经过盐酸头孢吡肟(马斯平)强有力的抗感染治疗并行血培养,由于病情发展迅速而死亡,血培养提示肺炎克雷白杆菌败血症,可能与患者采用强力的免疫抑制和 CsA 致患者免疫功能低下有关,因而移植后患者的感染防治工作十分重要。

本组有 4 例分别经过 DLI 后均获得由混合嵌合体向完全嵌合体的转变。尤其观察到例 3 经 DLI 后,嵌合体逐渐转变,骨髓瘤细胞及 M 蛋白的下降过程;例 4 通过分子生物学检测到移植后微小残留病,早期 DLI 治疗,达到血液学和遗传学的完全缓解。表明 DLI 强的 GVL 效应和早期治疗的重要性。

有研究发现^[5,6]DLI 后 GVHD 的发生与临床疗效呈正相关,显效者常伴有轻度至中度的急性和/或慢性 GVHD。本组 4 例由混合性嵌合体转变为供者完全嵌合体者均发生 aGVHD 或 cGVHD;而例 6 行 DLI 后均无 GVHD 的发生,仍为混合性嵌合体。但也有认为疗效与 GVHD 无关,即二者分离,采用去除 CD8⁺的 T 细胞输注未减弱 GVL 效应, GVHD 的发生率明显的降低,不影响供者造血细胞的植入和免疫功能的恢复^[7]。但 Mackinnon 等^[8]提出的逐渐增量输注的模式渐为大家认可。

动物实验和临床实践表明^[9,10],早期 DLI 会加

重 GVHD 发生,后期发生率则明显降低。但是非清髓性移植后持续性 MC 状态容易引起疾病的复发^[11]。我们在移植后 4~5 周形成嵌合体、无 I 度以上 aGVHD 时实施 DLI,间隔 3~4 周逐渐增加输注的 T 细胞数,由 $(1.2 \sim 9.5) \times 10^4/kg$ 增至 $(0.75 \sim 2.15) \times 10^8/kg$,达到理想疗效。

骨髓抑制是 DLI 的另一主要并发症,各家报道不一,轻微的无需处理。例 5 在 DLI 后单纯血小板降低,自行恢复。例 3 第 2 次 DLI 后,外周血三系降低,程度较轻,经 G-CSF 和输注红细胞、血小板,2 周后血象恢复。有研究发现可采用经过造血因子动员后的供者单个核细胞输注,这样可以在输注供者淋巴细胞的同时,输注一定量的供体造血干细胞以加快供体细胞的植入,使全血细胞减少的发生率及程度均降低,同时亦减少 GVHD 发生^[12]。

参考文献:

- [1] Kolb H J, Mittermuller J, Clemm C, *et al.* Donor leukocyte transplantation for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients[J]. *Blood*, 1990, 76(12): 2462-5.
- [2] 张之南. 血液病诊断及治疗标准 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1998. 168-94, 214-8, 219-28, 373-80, 421-3.
- [3] Chang H Y, Glassman A B, Bueso-ramos C E, *et al.* Applicability of direct in situ reverse transcription-polymerase chain reaction on bone marrow smears[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 1998, 28(1): 34-42.
- [4] Slavin S, Nagler A, Naparstek E, *et al.* Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to convention none marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases[J]. *Blood*, 1998, 91(6): 756-63.
- [5] Collins R H, Shpilberg O, Drobyski W R, *et al.* Donor leukocyte infusion in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation [J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(2): 443-4.
- [6] de Lima M D, Bonamino M, Vasconcelos Z, *et al.* Prophylactic donor lymphocyte infusion after moderately ablative chemotherapy and stem cell transplantation for hematological malignancies: high remission rate among poor prognosis patients at the expense of graft-versus host disease[J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2001, 27(1): 73-8.
- [7] Soiffer R J, Alyea E P, Hochberg E, *et al.* Randomized

(下转第 605 页 to page 605)

除心肌缺血,以防随着时间推移发展到缺血性心脏病,心功能减退。心肌梗死后 12 个月内倒置 T 波未恢复直立者,预示心功能减退可能,此时应积极使用血管紧张素转换酶抑制剂和 β 受体阻滞剂以改善预后。

参考文献:

- [1] 叶任高, 陆再英. 内科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 304-5.
- [2] 王新房, 李治安, 邓又斌. 超声心动图学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 283-4.
- [3] Hahalis G, Stathopoulos C, Apostolopoulos D, *et al.* Contribution of the sST elevation/T-wave normalization in Q-wave leads during routine, pre-discharge treadmill exercise test to patient management and risk stratification after acute myocardial infarction: a 2.5-year follow-up study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40(1): 62-70.
- [4] Bodi V, Sanchis J, Llacer A, *et al.* ST-segment elevation on Q leads at rest and during exercise: relation with myocardial viability and left ventricular remodeling within the first 6 months after infarction[J]. *Am Heart J*, 1999, 137(6): 1107-15.
- [5] Kanemoto N, Wang Y, Fukushi H, *et al.*

Electrocardiographic characteristics of patients with left circumflex-related myocardial infarction in the acute phase without tented T waves or definite ST elevation[J]. *J Cardiol*, 1995, 26(3): 149-58.

- [6] Agetsuma H, Hirai M, Hirayama H, *et al.* Transient giant negative T wave in acute anterior myocardial infarction predicts R wave recovery and preservation of left ventricular function[J]. *Heart*, 1996, 75(3): 229-34.
- [7] Sakata K, Yoshino H, Houshaku H, *et al.* Myocardial damage and left ventricular dysfunction in patients with and without persistent negative T waves after Q-wave anterior myocardial infarction[J]. *Am J Cardiol*, 2001, 87(5): 510-5.
- [8] Lancellotti P, Gerard P L, Kulbertus H E, *et al.* Persistent negative T waves in the infarct-related leads as an independent predictor of poor long-term prognosis after acute myocardial infarction[J]. *Am J Cardiol*, 2002, 90(8): 833-7.
- [9] Maeda S, Imai T, Kuboki K, *et al.* Pathologic implications of restored positive T waves and persistent negative T waves after Q wave myocardial infarction[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 28(6): 1514-8.

(编辑 黄小延)

(上接第 576 页 from page 576)

- trial of CD8⁺ T-cell depletion in the prevention of graft-versus-host disease associated with donor lymphocyte infusion[J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2002, 8(11): 625-32.
- [8] Mackinnon S, Papadopoulos E B, Carabasi M H, *et al.* Adoptive immunotherapy evaluating doses of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation. separation of graft versus host disease[J]. *Blood*, 1995, 86(4): 1261-8.
- [9] Blazar B R, Lees C J, Martin P J, *et al.* Host T cell resist graft-versus-host disease mediated by donor leukocyte infusions[J]. *J Immunol*, 2000, 165(9): 4901-9.
- [10] Georges G E, Storb R, Thompson J D, *et al.* Adoptive immunotherapy in canine mixed chimera after

nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation[J]. *Blood*, 2000, 95(10): 3262-9.

- [11] Beck J F, Klingebiel T, Kreyenberg H, *et al.* Relapse of childhood ALL, AML and MDS after allogeneic stem cell transplantation can be prevented by donor lymphocyte infusion in a critical stage of increasing mixed chimerism [J]. *Klin Padiatr*, 2002, 214(4): 201-5.
- [12] Nawa Y, Teshima T, Sunami K, *et al.* G-CSF reduces IFN- γ and IL-4 production by T cell after allogeneic stimulation by indirectly modulating monocyte function [J]. *Bone Marrow Transplantation*, 2000, 25(10): 1035-40.

(编辑 黄小延)