

# 脐带血、新生儿外周血混合移植治疗 1例重型 $\beta$ -地中海贫血

方建培<sup>1</sup>, 黄绍良<sup>1</sup>, 陈纯<sup>1</sup>, 吴燕峰<sup>1</sup>, 包蓉<sup>1</sup>, 李树浓<sup>2</sup>

(1. 中山医科大学孙逸仙纪念医院儿科, 广东 广州 510120; 2. 中山医科大学病理生理教研室, 广东 广州 510089)

**摘要:**【目的】观察脐带血、新生儿外周血混合的造血干细胞移植治疗1例重型 $\beta$ -地中海贫血的疗效和副作用。【方法】采集1例产前HLA配型相合男性(XY)胎儿的脐带血53 mL,并于供者娩出后5 h内抽取未作任何药物“动员”的新生儿外周血28 mL。测定脐带血、新生儿外周血的各项造血指标。重型 $\beta$ -地中海贫血女性(XX)患儿经总量马利兰20 mg/kg,环磷酰胺200 mg/kg,马法兰90 mg/m<sup>2</sup>和抗胸腺淋巴细胞球蛋白90 mg/kg组成的方案预处理后,输入HLA相合同胞的脐带血53 mL和新生儿外周血28 mL,患儿共获得有核细胞数 $5.7 \times 10^7$ /kg, CFU-GM  $4.93 \times 10^5$ /kg, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>细胞 $3.1 \times 10^5$ /kg。【结果】术后14 d中性粒细胞绝对值 $> 0.5 \times 10^9$ /L, 34 d血小板 $> 20 \times 10^9$ /L, 聚合酶链一反向点杂交检测患儿术后为 $\beta$ -654杂合子,性染色体从术前的XX转变为XY。术后14 d起脱离红细胞输注,血红蛋白从86 g/L稳步升至110 g/L以上。现已脱离地中海贫血状态存活197 d。供者于生后9个月内的追踪观察表明生长发育正常。【结论】新生儿外周血中含有一定量的造血干/祖细胞,对脐血细胞数量不足者,联合适量的新生儿外周血进行移植是一种有效的策略。

关键词: 造血干细胞移植; 脐带血; 新生儿外周血;  $\beta$ 地中海贫血

中图分类号: R556 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)03-0205-04

## Transplantation with Combination of Umbilical Cord Blood and Neonatal Peripheral Blood in the Treatment of A Patient with $\beta$ -thalassemia Major

FANG Jian-pei, HUANG Shao-liang, CHEN Chun, WU Yan-feng, BAO Rong, LI Shu-nong

(1. Department of Pediatrics, Memorial Hospital, 2. Department of Pathology and Physiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】 To observe the efficacy and side effects of hematopoietic stem cell transplantation with combination of umbilical cord blood (UCB) and neonatal peripheral blood (NPB) in the treatment of  $\beta$ -thalassemia major. 【Methods】 28 mL NPB was drawn from a HLA identical neonate within 5 hours after his birth to complement stem cell of the UCB he donated for transplantation to his sibling with  $\beta$ -thalassemia major. Various items of hematopoiesis reconstruction were detected in UCB and NPB respectively. After conditioning with chemotherapy by using busulfan 20 mg/kg, cyclophosphamide 200 mg/kg, melphalan 90 mg/m<sup>2</sup> and antithymocyte globulin (ATG) 90 mg/kg, the patient received the 53 mL UCB and 28 mL NPB, achieving  $5.7 \times 10^7$ /kg nucleated cells (NC),  $93 \times 10^5$ /kg CFU-GM and  $3.1 \times 10^5$ /kg CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells from his HLA-identical sibling. 【Results】 Absolute nucleated cell (ANC) reached  $0.5 \times 10^9$ /L on 14th day post transplant, and platelets reached  $20 \times 10^9$ /L on 34th day after transplant. The heterozygosity of  $\beta$ -654 mutation point was detected by the PCR-RDB. The sexual chromosome changed from XX pretransplant to XY posttransplant. The patient was free red blood cell transfusion from 14th day post transplant. Her hemoglobin rose progressively from 86 g/L to 110 g/L. The patient survived for 197 days free from disease after transplantation. Following up for 9 months,

收稿日期: 2000-08-11

基金项目: 美国中华医学基金会资助(96630)

作者简介: 方建培(1962-),男,广东顺德人,硕士导师,副主任医师。

© 1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

the donor grew and developed normally. **【Conclusion】** The NPB contains a lot of stem cells. The transplantation with combination of suitable NPB and UCB is an effective tactics when the UCB cells are deficient.

**Key words:** hematopoietic stem cell transplantation; umbilical cord blood; neonatal peripheral blood;  $\beta$ -thalassemia

脐带血(umbilical cord blood, UCB)作为新的造血干细胞来源备受瞩目,但脐血移植(umbilical cord blood transplantation, UCBT)可能存在着供给某些病者的细胞数不足,以致植入延迟或低植入率的问题。新生儿外周血(neonatal peripheral blood)富含造血干/祖细胞(HSC)可部分补充高体重同胞脐血移植时的供者细胞不足。作者等<sup>[1]</sup>在国内首例脐血移植取得成功的基础上,首次采用 HLA 相合同胞供体脐带血和未作“药物”动员的新生儿外周血混合移植,成功地治疗了 1 例  $\beta$ -地中海贫血患儿,为脐血移植的广泛应用提供了又一新的策略,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 对象

患儿女,5岁,体质量 18 kg。生后 6 个月起出现进行性面色苍白,血红蛋白 40 g/L。肝肋下 3 cm,脾肋下 2 cm。血红蛋白 A<sub>2</sub> 0.021,血红蛋白 F 0.51,  $\beta$  地中海贫血基因分析为 IVS-II-654 (C→T) 纯合子。父母均为 IVS-II-654 杂合子。3 岁起每月高量输血或红细胞,维持血红蛋白 90~140 g/L,肝活检示:肝纤维化 II 期(四期分类法),肝汇管区可见多量铁沉积。肝功能正常,乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和人巨细胞病毒抗体均阴性。

### 1.2 方法

1.2.1 供者的产前诊断、HLA 配型 母孕 16 周时先接受羊水脱落细胞 DNA 检查,经聚合酶链-反向点杂交法(PCR-RDB)诊断胎儿为  $\beta$ -654 杂合子;母孕 28 周时在 B 超引导下,经脐带穿刺术抽取脐血 2 mL 作 HLA 配型,结果 HLA 与患儿全相合,红细胞血型不合,详见表 1。

表 1 供受者 HLA 配型和 ABO 血型情况

Table 1 State of the Donor-Receiver HLA typing and ABO blood type

	HLA typing										ABO blood type
	A		B		BW		DR		DQ		
Donor	33(19)	1 101	75(15)	58(17)	4	6	03	15	02	06	A
Receiver	33(19)	1 101	75(15)	58(17)	4	6	03	15	02	06	O

1.2.2 UCB、NPB 的采集和造血指标检测 1999 年 9 月 13 日胎儿娩出时,断脐后即采集胎盘、脐带血 53 mL,置入单采输血袋内(含 50 mL 抗凝保养液,上海市血站出品)。脐带血的有核细胞总数  $4.48 \times 10^8$ 。因供给患儿的有核细胞数未达到  $3.7 \times 10^7/\text{kg}$  的阈值,征得家属同意后,在心电监护下,于新生儿生后 5 h 内抽取未作任何药物“动员”的新生儿外周血 28 mL,置入另一单采输血袋中。脐带血、新生儿外周血分别加防冻剂(二甲亚砷,人血白蛋白和 PBMI 1640 等)分装,经程控降温仪(plener 公司)降温后,置  $-196^\circ\text{C}$  液氮内冻存于脐血库。冻存前检测脐带血、新生儿外周血的造血指标,见表 2。

1.2.3 预处理方案 马利兰  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 4 \text{ d}$

表 2 脐带血、新生儿外周血的各项造血指标

Table 2 The items of hematopoiesis in umbilical cord blood (UCB) or neonatal peripheral blood (NPB)

Source	Nucleated cells ( $\times 10^7$ )	CFU-GM ( $\times 10^5$ )	$\text{CD}_{34}^+ \text{CD}_{38}^-$ cells ( $\times 10^5$ )
UCB	46.9	38.2	23.7
NPB	55.8	50.6	32.2

(术前第 9 天~第 6 天,即  $-9 \text{ d} \sim -6 \text{ d}$ ,以“-”表示术前,下同);环磷酰胺  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 4 \text{ d}$  ( $-5 \text{ d} \sim -2 \text{ d}$ );马法兰  $45 \text{ mg}/\text{m}^2 \times 2 \text{ d}$  ( $-5 \text{ d} \sim -4 \text{ d}$ )和马抗胸腺淋巴细胞球蛋白(ATG,法国产)  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 3 \text{ d}$  ( $-4 \text{ d} \sim -2 \text{ d}$ )。

1.2.4 输注脐带血、新生儿外周血 患儿经预处

理后,于1999年12月23日(0 d)和12月24日(1 d),分别取出一196 $^{\circ}\text{C}$ 分袋冻存的脐带血、新生儿外周血移植物,40 $^{\circ}\text{C}$ ~41 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中融冻,5 min内分批静脉输注。输注前予碱化尿液,水化,利尿,抗过敏等综合治疗。复温的脐带血、新生儿外周血标本常规复查有核细胞数、 $\text{CD}_{34}^{+}\text{CD}_{38}^{-}$ 细胞数,CFU-GM培养和作台盼蓝拒染率。供给患儿的有核细胞数为 $5.7\times 10^7/\text{kg}$ ,CFU-GM  $4.93\times 10^5/\text{kg}$ , $\text{CD}_{34}^{+}\text{CD}_{38}^{-}$   $3.1\times 10^5/\text{kg}$ ,台盼蓝拒染率100%。

1.2.5 预防和治疗急性移植物抗宿主病 -1 d起以环孢素A  $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 静滴以预防急性移植物抗宿主病。12 d出现发热,皮疹,腹泻等急性移植物抗宿主病表现后,予甲基强的松龙  $2\sim 3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,5 d内病情控制。控制急性移植物抗宿主病后以环孢素A口服维持。

1.2.6 支持治疗 于3 d当血白细胞计数为“0”时,开始使用格拉诺赛特(中外制药公司出品) $6\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,至血白细胞计数 $\geq 4.0\times 10^9/\text{L}$ 始渐减量停用。当血红蛋白 $< 80\text{ g/L}$ ,血小板计数 $< 20\times 10^9/\text{L}$ 或临床因血小板减少而出血时,给予 $\gamma$ 射线照射处理后的成分血输注。

## 2 结果

### 2.1 造血重建

脐带血、新生儿外周血混合移植后,3 d血白细胞计数为“0”,14 d中性粒细胞 $> 0.5\times 10^9/\text{L}$ ,19 d血白细胞计数 $> 4.0\times 10^9/\text{L}$ ,34 d血小板 $> 20\times 10^9/\text{L}$ 。19 d骨髓象:有核细胞增生活跃,各阶段比例正常,未见巨核细胞,血小板分布稀疏。14 d起脱离红细胞输注,血红蛋白 $> 86\text{ g/L}$ ;43 d血红蛋白 $> 100\text{ g/L}$ ;此后一直维持在115~141 g/L之间。55 d血小板 $> 50\times 10^9/\text{L}$ 。80 d骨髓象正常,现已无病存活197 d。

### 2.2 并发症

当12 d白细胞计数 $0.3\times 10^9/\text{L}$ 时开始发热,皮疹和腹泻。皮疹面积约30%,临床诊断急性移植物抗宿主病I度,予甲基强的松龙  $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 静滴后热退,但皮疹、腹泻未控制,增加甲基强的松龙至 $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,3 d内渐控制病情。126 d起再腹泻,口腔粘膜广泛性糜烂,双手掌面皮疹明显加深,增多;血小板从 $200\times 10^9/\text{L}$ 渐降至 $12\times 10^9/\text{L}$ ,骨髓巨核细胞2个,成熟障碍。予静脉用

丙种球蛋白  $1\text{ g/kg}$ ,甲基强的松龙  $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,改环孢素A静滴2周后血小板回升,口腔粘膜糜烂好转,但皮疹和腹泻未改善,加用霉酚酸酯后皮疹减轻,血小板回升至 $(110\sim 175)\times 10^9/\text{L}$ ,仍腹泻。150 d停用环孢素A、霉酚酸酯,改用他克莫司  $0.25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,腹泻止,结肠镜未见粘膜糜烂或溃烂。

### 2.3 植入证据

2.3.1 地中海贫血基因 于20 d,90 d,180 d用PCR-RDB法检测外周血地中海贫血基因,术后为 $\beta$ -654杂合子。

2.3.2 性染色体检测 术前、20 d、90 d、160 d XY比例分别为0%、83%、94%、100%。

2.3.3 红细胞血型 50 d起受者血型从“O”转为“A”。

2.3.4 血红蛋白水平 14 d起脱离红细胞输注,血红蛋白 $> 86\text{ g/L}$ ,并稳步上升,48 d起血红蛋白 $> 110\text{ g/L}$ 。

## 3 讨论

### 3.1 产前配型对节省医疗资源的意义

按遗传规律,同胞间的HLA相合概率仅约25%~30%。为此,开展产前配型,HLA相合者才留取脐带血,对节省有限的医疗资源和降低患儿家庭的经济负担均具有重要的意义。

### 3.2 采集适量新生儿外周血是“补充”造血干细胞的策略

动物实验研究<sup>[2]</sup>已经肯定:新生鼠外周血富含造血干细胞,可替代“胎血”用于同种异体鼠的造血重建。Li等<sup>[3]</sup>检测了20例生后1.8~13 h内新生儿外周血的有关干/祖细胞等重建造血的指标,证实此时期内的新生儿循环血中富含造血干细胞,可与脐带血相媲美。但由于正常足月新生儿的血循环量仅为体重的10%,大量采集可致血容量不足,甚至危及生命。实践证明<sup>[4]</sup>,一般情况下,以足月儿作为供者采集其骨髓的量小于其血容量的20%( $< 60\text{ mL}$ )是安全的。Li等<sup>[3]</sup>报告了世界首例(也是迄今报告的唯一1例)HLA相合新生儿供者,出生时为无症状性红细胞增多,接受了抽取83 mL新生儿外周血,并以脐带血、新生儿外周血混合移植治疗了1例重型 $\beta$ 地中海贫血患儿,获得了成功。本例仅采集了供者的新生儿外周血28 mL,是其血循环量的9%,供者的血红蛋白从采集前的188 g/L降至采集后的153 g/L,生命体征稳定,不

必作输血治疗。供者新生儿期, 婴儿期生长发育情况的追踪表明: 其生后 1~9 个月的身高、体重、营养状况和动作能、语言能、应人、应物能均符合同龄正常儿水平, 生后 1、6、9 个月的血红蛋白分别为 129 g/L、116 g/L、119 g/L。因此, 本例采集新生儿供者外周血是安全的, 提示适量抽取新生儿供者的外周血以获得更多的造血干细胞是一条“补充”性策略。

### 3.3 新生儿外周血可能有加快造血重建的作用

Gluckman 等<sup>[5]</sup> 报告, 当患者获得脐带血的有核细胞数  $\geq 3.7 \times 10^7/\text{kg}$  时, 植入成功率为 62%, 若有核细胞数  $< 3.7 \times 10^7/\text{kg}$  则其植入率仅 42%, 且平均植入时间分别为 25 d 和 35 d, 差异显著。因此, 使患儿行脐血移植时获得的有核细胞数  $\geq 3.7 \times 10^7/\text{kg}$  有利于移植术的成功和加快患儿的造血重建速度。本文中患儿仅得到脐带血有核细胞数  $2.61 \times 10^7/\text{kg}$ , 针对新生儿外周血富含造血干/祖细胞的特点, 采集了 28 mL, 使受者获得的总有核细胞数为  $5.7 \times 10^7/\text{kg}$ , 为争取脐血移植的成

功和缩短重建造血的时间提供了细胞数的基础。

#### 参考文献:

- [1] 黄绍良, 方建培, 周敦华, 等. 脐血造血干细胞移植治疗重型  $\beta$ -地中海贫血[J]. 中华儿科杂志, 1998, 36(11): 671.
- [2] Harrison D E, Astle C M. Short and long-term multilineage repopulating hematopoietic stem cells in late fetal and newborn mice: models for human umbilical cord blood [J]. *Blood*, 1997, 90(1): 174.
- [3] Li K, Li C K, Fok T F, *et al.* Neonatal blood: a source of hematopoietic stem cells for transplantation [J]? *Lancet*, 1998, 351(9103): 647.
- [4] Chan K W, Galimski J L, Supkis D, *et al.* Use of minors as bone marrow donors: current attitude and management, a survey of 56 pediatric transplantation centers [J]. *Pediatrics* 1996, 128(5): 644.
- [5] Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chamard A, *et al.* Outcome of cord blood transplantation from related and unrelated donors [J]. *N Eng J Med* 1997, 337(6): 373.

(编辑 关淡庄)

(上接第 204 页)

其中 1 项对 7 个 X-连锁疾病患者的 PGD 研究中<sup>[10]</sup> 发现, 胚胎无规律分裂有个人特异性。染色体异常的胚胎和发育缓慢的胚胎中嵌合率和无规律分裂现象更常见, 提示无规律分裂现象与染色体异常也有关。Coon 等<sup>[7]</sup> 对 2 例罗氏易位患者进行的 5 个周期的 PGD 治疗中, 87% 染色体异常, 其中 36% 为非整倍体或非整倍体嵌合体, 51% 为无序分裂。这一现象也进一步说明了胚胎活检时取 2 个卵裂球, 在 2 个卵裂球均正常情况下才选择移植以减少误诊的必要性。

#### 参考文献:

- [1] Jacobs P A, Melville M, Ratcliffe S, *et al.* Cytogenetic survey of 11 680 newborn infants [J]. *Ann Hum Genet*, 1974, 37(5): 359.
- [2] 庄广伦, 顾正田, 周灿权. Buserelin 在体外受精中的应用及其对排卵前卵泡液类固醇的影响 [J]. 中华妇产科杂志, 1992, 28(1): 15.
- [3] Handyside A H, Kontogianni E H, Hardy K, *et al.* Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y specific DNA amplification [J]. *Nature* 1990, 344(10): 768.
- [4] Verlinsky Y, Kuliev A. An atlas of preimplantation ge-

netic diagnosis [M]. New York: The Parthenon Publishing Group Inc, 2000. 28~29.

- [5] 徐艳文, 庄广伦, 李 满, 等. 荧光原位杂交技术在胚胎植入前性别诊断中的应用 [J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(8): 465.
- [6] Munr  S, Fung J, Cassel M J, *et al.* Preimplantation genetic analysis of translocations: case-specific probes for interphase cell analysis [J]. *Hum Genet*, 1998, 102(9): 663.
- [7] Coon C M, Harper J C, Winston R M L, *et al.* Infertile couples with Robertson translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions [J]. *Hum Genet*, 1998, 102(2): 117.
- [8] Santalo J, Veiga A, Calafell J M, *et al.* Evaluation of cytogenetic analysis for clinical preimplantation diagnosis [J]. *Fertil Steril*, 1995, 64(1): 44.
- [9] Delhanty J D A, Handyside A H. The origin of genetic defects in the human and their detection in the preimplantation embryo [J]. *Hum Reprod Update*, 1995, 1(3): 201.
- [10] Delhanty J D A, Harper J C, Ao A, *et al.* Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients [J]. *Hum Genet*, 1997, 99(10): 755.

(编辑 关淡庄)