

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.01.012

· 临床研究 ·

混合造血干细胞移植联合 DLI-IL-2 治疗急性髓性白血病的疗效

王存邦, 白海, 葱瑞, 潘耀柱, 张茜, 周进茂, 吴涛, 徐淑芬(兰州军区总医院 全军血液病中心, 甘肃 兰州 730050)

[摘要] 目的: 探讨急性髓性白血病(acute myelogenous leukemia, AML)患者采用自体外周血干细胞混合 HLA 半相合异体骨髓移植(autologous peripheral blood stem cell mixed with HLA haploidentical allogeneic bone marrow transplantation, Mixed-HSCT)联合供体淋巴细胞输注+白介素 2(donor lymphocyte infusion combined interleukin-2, DLI-IL-2)治疗的疗效。方法: 采用联合治疗方案的试验组 23 例 AML 患者中男性 15 例、女性 8 例, 中位年龄 22(17~41)岁; 采用单纯移植治疗的对照组 14 例 AML 患者中男性 10 例、女性 4 例, 中位年龄 21(19~40)岁。两组患者在完全缓解期采用 TBI+VEMAC 方案预处理, 对照组患者接受单纯 Mixed-HSCT 移植, 试验组患者接受 Mixed-HSCT 且造血重建后继续 DLI-IL-2 治疗 1~8 次; 各组在治疗前后进行染色体核型分析及骨髓检查。随访时间 >3 年。结果: 两组患者均获得造血重建, 无移植抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)发生。试验组有 6 例形成混合嵌合体(46XX/46XY), 随访显示存活 15 例, 长期无病存活率(disease-free survival, DFS)为 65.2%; 对照组有 3 例形成混合嵌合体(46XX/46XY), 随访显示存活 7 例, DFS 为 50.0%。两组患者治疗后的不良反应(口腔溃疡、出血性膀胱炎、发热等)相似。结论: Mixed-HSCT 联合 DLI-IL-2 治疗对 AML 患者长期无病生存有积极意义, 无严重不良反应。

[关键词] 急性髓性白血病; 混合造血干细胞移植; 供者淋巴细胞输注; 白介素-2

[中图分类号] R733.7; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2011)01-0055-04

Efficacy of mixed hematopoietic stem cell transplantation combined with donor lymphocyte infusion and IL-2 in treatment of acute myelogenous leukemia

WANG Cun-bang, BAI Hai, XI Rui, PAN Yao-zhu, ZHANG Qian, ZHOU Jin-mao, WU Tao, XU Shu-fen (Hematology Center of PLA, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, Gansu, China)

[Abstract] **Objective:** To study the efficacy of mixed-HSCT (autologous peripheral blood stem cell mixed with HLA haploidentical allogeneic bone marrow transplantation) combined with donor lymphocyte infusion plus interleukin-2 (DLI+IL-2) in treatment of acute myelogenous leukemia (AML) patients. **Methods:** Twenty-three AML patients (15 males and 8 females, median age 22 years) were enrolled in this study as mixed-HSCT combined DLI+IL-2 group, and 14 AML patients (10 males and 4 females, median age 21 years) were enrolled as control group. All patients in the two groups received TBI+VEMAC therapy after complete remission, patients in the control group were treated with mixed-HSCT alone, and those in the experimental group were treated with Mixed-HSCT and further treatment with DLI+IL-2 for 1-8 times after hematopoietic reconstruction. All the patients were followed up for at least 3 years. **Results:** All patients in the two groups achieved hematopoietic reconstruction and had no graft-versus-host disease (GVHD). During 3 years, 6 cases in the experimental group formed mixed chimerism (46XX/46XY) and 15 survived, with the disease-free survival rate (DFS) being 65.2%. Three cases in the control group formed mixed chimerism (46XX/46XY) and 7 cases survived, with the DFS being 50.0%. All patients in the two groups had similar adverse reactions (oral cavity ulcer, hemorrhagic cystitis, fever, etc.) after therapy. **Conclusion:** Mixed-HSCT combined with DLI+IL-2 has a positive effect on

[基金项目] 全军“十一五”杰出人才基金资助项目(No.06J005), 兰州军区医药科研基金项目(No.LXH-2007006)。Project supported by the Outstanding Talents Foundation of PLA “11th Five-Year Plan” (No.06J005), and the Medical Research Foundation of Lanzhou Military Area Command of PLA (No.LXH-2007006)

[作者简介] 王存邦(1966-), 男, 青海省西宁市人, 医学博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事造血干细胞移植研究。E-mail: wangcunbang98@163.com

[通信作者] 王存邦(Wang Cun-bang, corresponding author), E-mail: wangcunbang98@163.com

[网络出版] 2011-01-25; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20110125.1122.025.html>

DFS of AML patients, with no noticeable adverse reactions.

[**Key words**] acute myelogenous leukemia; mixed hematopoietic stem cell transplantation; donor lymphocyte infusion; IL-2

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(1): 55-58]

急性髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)患者异基因造血干细胞移植需要 HLA 相匹配的供者,且移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)总体发生率高^[1]。AML 患者自体外周血干细胞(autologous peripheral blood stem cell, APBSC)移植不受供者限制,移植后造血恢复快,并发症少,但存在复发率高的问题,其原因可能是移植物中有残留的肿瘤细胞,或是缺乏移植物抗白血病(graft versus leukemia, GVL)效应。如何减弱 GVHD,诱导 GVL 是提高患者长期生存率的关键。在异基因造血干细胞移植时,供者的 T 细胞是 GVL 的效应细胞之一。两者混合移植,即自体外周血干细胞混合 HLA 半相合异体骨髓移植(autologous peripheral blood stem cell mixed with HLA haploidentical allogeneic bone marrow transplantation, Mixed-HSCT),可发挥前者不受供者限制、并发症少和后者复发率低、可诱导 GVL 效应的优点。本课题在发现 Mixed-HSCT 可提高患者长期生存率^[4-5]的基础上,进一步采用供者淋巴细胞回输加白细胞介素 2(donor lymphocyte infusion combined interleukin-2, DLI-IL-2)联合 Mixed-HSCT 移植治疗 AML,为探索提高血液肿瘤疗效的新方法提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 病例资料

试验组 23 例 AML 患者中男性 15 例、女性 8 例,中位年龄 22 岁(17 ~ 41 岁),其中 M2a 12 例, M4 3 例, M5a 8 例。对照组 14 例 AML 患者中男性 10 例、女性 4 例,中位年龄 21 岁(19 ~ 40 岁),其中 M2a 5 例, M3a 2 例, M4 3 例, M5a 4 例。

所有患者移植前均采用 DA(柔红霉素 + 阿糖胞苷, daunorubicin + cytarabine)、HA(高三尖杉酯碱 + 阿糖胞苷, homoharringtonine + cytarabine)或 EA(表柔比星 + 阿糖胞苷, epirubicin + cytarabine)方案联合化疗诱导缓解,中位诱导达完全缓解的疗程为 1(1 ~ 3)个、中位巩固及强化疗程 6(4 ~ 8)个。确诊至完全缓解中位时间为 28(12 ~ 80)d,完全缓解至移植的中位时间为 180(150 ~ 270)d。试验组患者采用 Mixed-HSCT 移植,并在获得造血重建后给予 DLI-IL-2 治疗。对照组患者采用 Mixed-HSCT 移

植,移植后未给予任何治疗。所有患者治疗前均签署知情同意书,并报医院伦理委员会批准。

1.2 Mixed-HSCT 移植相关处理

1.2.1 APBSC 的动员、采集、保存 采用化疗(环磷酰胺 1.5 g/m², 依托泊苷 300 mg/m²)联合重组人粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF)方法动员 APBSC。化疗后 7 d,应用 rhG-CSF 150 μg/12 h,持续应用 4 ~ 6 d;在第 5 天开始应用 CS-3000 PLUS 血细胞分离机采集 APBSC,连续采集 2 ~ 3 次。将 APBSC 保存于液氮中,保存时间为 5 ~ 7 d。

1.2.2 Mixed-HSCT 移植前预处理方案 以移植当天为 0 d,应用 TBI + VEMAC 方案实施预处理。具体为: -5 d 直线加速器全身照射(TBI),剂量为 6(5 ~ 7.5)Gy,肺部为 5(4.0 ~ 5.5)Gy,平均剂量率 < 10 cGy/min; -5 d 应用长春新碱 2 mg、依托泊苷 200 mg, -5、-4、-3 d 应用米托蒽醌 10 mg × 3 d, -4、-3 d 应用阿糖胞苷 1 000 mg × 2 d, -2 d 应用环磷酰胺 60 mg/kg, -1 d 休息。

1.2.3 Mixed-HSCT 移植 -1 d ~ +30 d 给予环孢菌素 A 250 mg/日预防 GVHD。0 d 实施移植。回输自体单个核细胞 2.4 × 10⁸ ~ 4.5 × 10⁸/kg, CD34⁺ 细胞 4.6 × 10⁶ ~ 9.6 × 10⁶/kg。采集 HLA 半相合异体骨髓(与患者不同性别的同胞兄弟姐妹),间隔 1 ~ 6 h 后,按回输自体单个核细胞数的 1/10 ~ 1/6 输注给患者,输注的异体单个核细胞为 0.34 × 10⁸ ~ 0.86 × 10⁸/kg, CD34⁺ 细胞为 0.57 × 10⁶ ~ 1.84 × 10⁶/kg。

1.2.4 Mixed-HSCT 移植并发症的防治及支持治疗

患者在移植期间均住无菌层流病房,以美司钠和碱化尿液、利尿等措施防治出血性膀胱炎,复方丹参注射液、前列腺素 E、安体舒通片预防肝静脉闭塞病,氟康唑预防霉菌感染。间断输注血小板预防出血,必要时输注红细胞悬液。在粒细胞降至 0 时应用 rhG-CSF 150 g/12 h,部分患者应用 IL-11 1.5 mg/12 h,促进造血恢复。

1.3 Mixed-HSCT 移植后 DLI-IL-2 处理

试验组患者造血恢复(白细胞 > 4 × 10⁹/L, 血小板 > 50 × 10⁹/L)后,应用血细胞分离机采集供者淋巴细胞输注。输注 CD3⁺ 淋巴细胞中位数 1.51

$(1.17 \sim 2.77) \times 10^8/\text{kg}$, CD4^+ 细胞中位数 $1.07 (0.75 \sim 1.74) \times 10^8/\text{kg}$, CD8^+ 细胞中位数 $0.43 (0.33 \sim 0.91) \times 10^8/\text{kg}$, 中位输注次数 $6 (1 \sim 8)$ 次。输注后即开始应用 rhIL-2 100 万 U/d $\times 10$ d 治疗。

1.4 治疗前后患者的染色体核型分析

每次 DLI-IL-2 治疗前做染色体核型分析及骨髓检查,治疗全部结束后每 3 个月做染色体核型分析及骨髓检查,共 4 次。对照组患者造血恢复后未做特殊治疗,仅每 3 个月做染色体核型分析及骨髓检查,共 4 次。所有患者随访时间 > 3 年。患者经随访 3 年以上无病存活、骨髓完全缓解为治愈标准。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件包进行生存曲线分析,以 $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 联合治疗和单纯移植治疗患者均获良好的造血重建

全部 AML 患者 +5 ~ +7 d 中性粒细胞均降至 0。试验组和对照组 AML 患者中性粒细胞 $\geq 50 \times 10^9/\text{L}$ 的中位时间分别为 14(12 ~ 17)d 和 14(11 ~ 16)d,白细胞 $\geq 4.0 \times 10^9/\text{L}$ 的中位时间分别为 17(16 ~ 21)d 和 18(16 ~ 20)d,血小板 $\geq 50 \times 10^9/\text{L}$ 的中位时间分别为 25(24 ~ 27)d 和 25(23 ~ 26)d; +16 ~ +21 d 时骨髓呈恢复期骨髓象。全部 AML 患者均获良好的造血重建。

2.2 Mixed-HSCT 移植联合 DLI-IL-2 治疗对 AML 患者长期无病存活有积极意义

试验组中 5 例 M2a、1 例 M5a 患者接受 1 ~ 3 次 DLI-IL-2 治疗后于 +3 ~ +7 个月复发死亡;1 例 M2a 患者接受 2 次 DLI-IL-2 治疗后 1 年出现治疗相关骨髓增生异常综合征,死于脑出血;1 例 M5a 患者应用 DLI-IL-2 治疗 1 次后出现不明原因高热、抽搐,死于癫痫持续状态。其余 15 例患者随访 3 年以上均无病存活,其中 2 例 M2a、1 例 M4、3 例 M5a 患者有混合嵌合体形成,长期生存率为 65.2%。对照组有 3 例 M2a、2 例 M4、1 例 M5a 移植后 +1 ~ +7 个月复发死亡;1 例 M3a 患者于 +25 d 死于脑出血。其余 2 例 M2a、1 例 M3a、1 例 M4、3 例 M5a 随访 3 年以上均无病存活,其中后 3 例有混合嵌合体形成,长期无病存活率为 50.0% (图 1)。结果说明, Mixed-HSCT 移植和 DLI-IL-2 联合治疗对 AML 患者长期无病生存有积极意义。

2.3 联合治疗后染色体核型无异常

染色体核型分析显示,试验组 6 例患者形成混合嵌合体(46XX/46XY),持续存在时间 3 ~ 12 个月;对照组 3 例患者形成混合嵌合体,持续存在时间 3 ~ 6 个月。结果说明,DLI-IL-2 治疗后染色体核型无异常。

2.4 两种方法治疗均无严重不良反应

所有患者不同程度地出现口腔溃疡,随着造血恢复在 7 ~ 10 d 内溃疡消失。两组各有 1 例患者出现出血性膀胱炎,经治疗后治愈。7 例试验组患者和 4 例对照组患者出现发热($37.5^\circ\text{C} \sim 39^\circ\text{C}$),经积极治疗体温得到控制。无肝静脉闭塞病和 GVHD 发生。结果提示,DLI-IL-2 治疗的并发症可以得到控制。

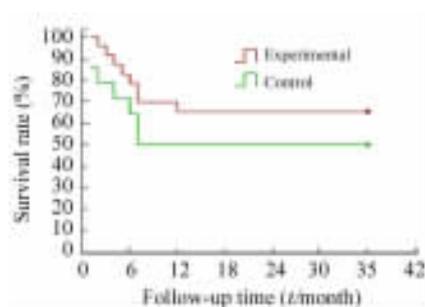


图 1 Mixed-HSCT 移植和 HLI-IL-2 联合治疗对 AML 患者长期无病存活有积极意义

Fig. 1 Mixed-HSCT transplantation combined with HLI + IL-2 showed positive effect on disease free survival of AML patients

3 讨论

自体造血干细胞移植后复发率高的原因是移植物中有残留的白血病细胞,且缺乏 GVL 效应。而异基因造血干细胞移植虽可使白血病的长期存活率达 50% 以上,但部分患者 GVHD 严重,生活质量低下。T 细胞是 GVL 的效应细胞之一。因此本课题前期研究尝试 Mixed-HSCT 治疗,以发挥前者并发症少、后者复发率低且有可能诱导出现 GVL 效应的优点,结果证实 Mixed-HSCT 可以提高 AML 患者的疗效^[4-5],部分患者在混合移植后给予 DLI-IL-2 治疗,发现长期无病生存率进一步提高且无明显的 GVHD 出现^[6]。故本研究对无 HLA 相合供者的 AML 患者采用 Mixed-HSCT 联合 DLI-IL-2 治疗,并与单纯接受 Mixed-HSCT 治疗的 AML 患者长期生存率相比较。结果表明,前者长期生存率达 65.2%,而后者则为 50.0%。Mixed-HSCT 联合 DLI-IL-2 治疗的方法使 AML 患者的长期生存率有了一定程度的提高。尽管病例数偏少,但该方法可以作为 AML 患者的有效治疗方法之一作进一步深入研究。

研究提示^[7-10], GVL效应可能针对的是白血病特异性抗原。供者淋巴细胞与宿主白血病细胞之间的次要组织相容性抗原(minor histocompatibility complex, MiHC)差异是引起免疫攻击的重要靶分子。MiHC特异的T细胞可以识别并溶解白血病细胞,在DLI后诱导产生GVL效应而无GVHD反应中起重要的作用^[11-12]。DLI这种抗白血病作用,与输入的异体免疫活性细胞诱导的过继性免疫反应有关,这种异源性供者淋巴细胞可以介导受者体内GVL效应;而IL-2等细胞因子可增强DLI的GVL效应^[13]。但并非所有白血病患者对DLI有反应。白血病细胞对GVL的敏感性存在很大的差别,髓系白血病更为敏感,而淋巴细胞白血病反应最差^[14],这也是本研究仅对AML患者实施该治疗的原因。采用过继性免疫治疗不仅对白血病可以提高长期生存率,治疗晚期实体瘤也可取得明显疗效^[15-16],显示了供者淋巴细胞输注为主、联合IL-2等细胞因子治疗恶性肿瘤的良好前景。半相合供者淋巴细胞输注抗白血病的机制可能与完全相合供者淋巴细胞输注抗白血病机制相同。供者淋巴细胞输注可能通过促使白血病细胞凋亡,从而发挥抗白血病作用,其中CD4⁺T细胞可能更多地引起白血病细胞的凋亡^[17]。Leis等^[18]认为,相合供者淋巴细胞主要通过3条途径发挥GVL效应:CD8⁺T细胞和NK细胞通过钙依赖的穿孔素途径直接溶解靶细胞,CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞通过Fas抗原途径诱导靶细胞凋亡,细胞因子介导白血病细胞死亡。

总之,对AML患者采用Mixed-HSCT联合DLI-IL-2治疗安全性好、无严重不良反应,对患者获得长期无病生存有着积极意义,值得进一步开展基础和临床研究。

【参考文献】

- [1] 宋阿霞, 杨栋林, 魏嘉璘, 等. 异基因造血干细胞移植治疗75例完全缓解期急性髓系白血病的疗效及预后分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(1): 161-166.
- [2] 王荷花, 冯四洲, 王玫, 等. 急性白血病患者第一次完全缓解期自体 and 异基因造血干细胞移植疗效的比较[J]. 中华血液学杂志, 2004, 25(7): 389-392.
- [3] 冯四洲, 魏嘉璘, 邹德惠, 等. 自体造血干细胞移植治疗急性白血病患者143例疗效分析[J]. 内科急危重症杂志, 2005, 11(3): 112-115.
- [4] Da WM, Liu Y, Zhong JT, et al. Autologous bone marrow mixed with HLA-haploidentical allogeneic marrow transplantation for treatment of patients with malignant blood diseases[J]. Bone Marrow Transplant, 1997, 19(2): 107-112.
- [5] 白海, 欧英贤, 达万明, 等. 自体骨髓移植与混合HLA半相合异体骨髓的自体骨髓移植治疗恶性血液病的比较[J]. 西北国防医学杂志, 2000, 21(1): 12-14.
- [6] 王存邦, 白海, 欧英贤, 等. 混合造血干细胞移植后输注供者淋巴细胞和白细胞介素2对AML疗效的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(24): 4777-4780.
- [7] Xia G, Truitt RL, Johnson BD. Graft-versus-leukemia and graft-versus-host reactions after donor lymphocyte infusion are initiated by host-type antigen presenting cells and regulated by regulatory T cells in early and long-term chimeras[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2006, 12(4): 397-407.
- [8] Hess AD, Thoburn CJ. Immune tolerance to self-major histocompatibility complex class II antigens after bone marrow transplantation: Role of regulatory T cells[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2006, 12(5): 518-529.
- [9] Doderio A, Camiti C, Raganato A, et al. Haploidentical stem cell transplantation after a reduced-intensity conditioning regimen for the treatment of advanced hematological malignancies: Post transplantation CD8-depleted donor lymphocyte infusion contribute to improve T-cell recovery[J]. Blood, 2009, 113(19): 4771-4779.
- [10] Stem M, Ruggeri L, Mancusi A, et al. Survival after T cell-depleted haploidentical stem cell transplantation is improved using the mother as donor[J]. Blood, 2008, 112(7): 2990-2995.
- [11] Kloosterboer FM, van Luxemburg-Heijs SA, van Soest RA, et al. Direct cloning of leukemia reactive T cells from patients treated with donor lymphocyte infusion shows a relative dominance of hematopoiesis restricted minor histocompatibility antigen HA-1 and HA-2 specific T cells[J]. Leukemia, 2004, 18(1): 798-808.
- [12] Kloosterboer FM, van Luxemburg-Heijs SA, van Soest RA, et al. Minor histocompatibility antigen specific T cells with multiple distinct specificities can be isolated by direct cloning of IFN γ 2 secreting T cells from patients with relapsed leukemia responding to donor lymphocyte infusion[J]. Leukemia, 2005, 19(1): 83-90.
- [13] Gesundheit B, Shapira MY, Resnick IB, et al. Successful cell-mediated cytokine-activated immunotherapy for relapsed acute myeloid leukemia after hematopoietic stem cell transplantation[J]. Am J Hematol, 2009, 84(3): 188-190.
- [14] 王喆, 段连宁. 造血干细胞移植后供者淋巴细胞输注研究进展[J]. 军医进修学院学报, 2010, 31(1): 82-83.
- [15] 韩颖, 于津浦, 李慧, 等. HLA半相合外周血活化干细胞治疗晚期实体瘤的疗效[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(1): 7-12.
- [16] Ferrantini M, Capone I, Marincola FM, et al. International meeting. Immunotherapy of cancer, challenges and needs. [J]. Cancer Immunol Immunother, 2007, 56(4): 581-585.
- [17] 仲任, 罗斌, 胡俊斌, 等. 半相合供者淋巴细胞输注抗急性非淋巴细胞白血病的实验研究[J]. 临床血液学杂志, 2004, 17(5): 277-279.
- [18] Leis J, Porter DJ. Unrelated donor leukocyte infusion to treat relapse after unrelated donor bone marrow transplantation[J]. Leuk Lymphoma, 2002, 43(1): 9-17.

【收稿日期】 2010-11-05

【修回日期】 2010-12-17

【本文编辑】 韩丹