

· 论 著 ·

父供女 HLA 半相合造血干细胞移植后供者 DC-CIK 细胞输注治疗儿童难治复发性急性髓细胞白血病 1 例并文献复习

文 钦, 张 曦[△], 陈幸华, 高 蕾, 张 诚, 高 力, 王庆余
(第三军医大学新桥医院血液科, 重庆 400037)

摘要:目的 探索儿童难治复发性急性髓细胞白血病的治疗方法。方法 对 1 例难治复发性急性髓细胞白血病 M1 患儿, 行父供女人类白细胞抗原(HLA)半相合造血干细胞移植, 移植前骨髓原始粒细胞 16%, 原幼单核细胞 44.5%, 未缓解。供者为其父亲, HLA 半相合; 预处理方案采用洛莫司汀+阿糖胞苷+白消安+环磷酰胺+抗胸腺细胞球蛋白(ATG); 用骁悉、环孢素、甲氧蝶呤及 ATG 预防移植物抗宿主病(GVHD)。结果 患儿移植后 14 d 造血功能重建, 移植后 21 d 复查骨髓完全缓解, 骨髓染色体检查完全转为供者型, 移植后 23 d 开始每周输注供者树突状细胞-细胞因子诱导为杀伤细胞(DC-CIK)共 5 次, 细胞数按梯度递增。患者定期监测血常规各项指标均基本正常, 移植后 130 d 复查骨髓示完全缓解, 现继续随访中。结论 供者 DC-CIK 细胞过继性治疗降低了异基因造血干细胞移植后白血病的复发概率, 是有效且值得探索的新手段。

关键词:急性髓细胞白血病; 造血干细胞移植; HLA 半相合; DC-CIK 细胞

中图分类号: R733.71; R392.4

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)14-1852-02

Treatment of refractory and relapsing childhood acute myelocytic leukemia with HLA partially mismatched stem cell transplantation with father as donor and donor DC-CIK cells infusions; a case report and literature review

WEN Qin, ZHANG Xi[△], CHEN Xing-hua, et al.

(Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the effective method to treatment refractory and relapsing childhood acute myelocytic leukemia. **Methods** A childhood patient with refractory and relapsing acute myelocytic leukemia received HLA partially mismatched haemopoietic stem cell transplantation from her farther as a donor. There were 16% myeloblast and 44% primitive and naive monocytes in marrow before transplantation which confirmed non-remission. The condition regimen included CCNU, Ara-C, busulfan, cyclophosphamide and antihuman thymocyte globulin. Cytosporin A, methotrexate, mycophenolate mofetil and antithymus globulin were used to prevent graft versus host disease. **Results** The patient obtained haematopoietic reconstitution on day 14. Bone marrow aspiration was performed and confirmed complete remission and the examinations of sexual chromosome indicated full donor-type on day 21. Five times donlymphocyte infusions with quantity of cells increasing by degrees were respectively performed once a week from day 23. regularly monitoring the blood routine shows all indexes of the patient are normal. Bone marrow aspiration was performed and confirmed complete remission on day 130. **Conclusion** Adoptive immunotherapy with DC-CIK cells which is a new effective method to reduce probability of palindromia of leukemia followed allogenic transplantation.

Key words: acute myelocytic leukemia; hematopoietic stem cell transplantation; HLA partially mismatch; DC-CIK cell

难治复发性儿童急性髓细胞白血病化疗效果极差, 诱导缓解率低, 预后不佳, 一直以来缺乏有效的治疗手段。异基因造血干细胞移植 (Allo-HSCT) 为该类白血病的治疗提供了有效手段, 但移植后白血病复发率高仍是临床面临的一个重要问题。树突状细胞-细胞因子诱导为杀伤细胞 (DC-CIK) 是与树突状细胞共培养的细胞因子诱导的杀伤细胞, 并用患者的白血病细胞冻融抗原进行有效刺激, 具有存活率高、增殖力强、对肿瘤细胞特异性杀伤等特点, 对急性髓细胞白血病移植后微小残留病灶治疗具有较大的应用价值。现报道本科 1 例复发难治性急性髓细胞白血病患儿行人类白细胞抗原 (HLA) 半相合造血干细胞移植后予以患者白血病抗原致敏的供者 DC-CIK 细胞输注获得持续完全缓解, 并进行相关文献复习。

1 临床资料

患儿, 女, 2 岁零 9 个月。于 2008 年 9 月无明显诱因出现咳嗽、面色苍白、面部出血点。于当地医院就诊, 查体: 贫血貌, 浅表淋巴结未扪及肿大, 胸骨压痛, 双肺未见异常, 心率 90 次/分, 率齐, 肝脾未及。实验室检查: 血常规, WBC $107.77 \times 10^9/L$, 血红蛋白 62 g/L, 血小板 $36 \times 10^9/L$; 骨髓增生极度活跃, 粒系 0.87, 原始粒细胞 0.93。诊断急性髓细胞白血病 M1 型。2008 年 10 月 14 日予以第 1 次诱导化疗 VHDEA 方案 (长春新碱 0.7 mg d1, 三尖杉酯碱 1.4 mg d1~7, 柔红霉素 19 mg d8~10, 依托泊苷 50 mg d8~10, 阿糖胞苷 100 mg d8~14), 症状好转, 但骨髓未获完全缓解 (原始粒细胞 7.5%)。2008 年 11 月 10 日予以第 2 次诱导化疗 DAE 方案 (柔红霉素 19 mg d1~3, 依托泊苷 50 mg d1~3, 阿糖胞苷 100 mg d1~7), 仍未

[△] 通讯作者, 电话: (023)68774330; E-mail: zhangxxi@sina.com。

获完全缓解(骨髓原始粒细胞 17.5%)。2008 年 12 月 16 日予以第 3 次诱导化疗 IDA 方案(去甲氧柔红霉素 66 mg d1~2, 阿糖胞苷 100 mg d1~7), 达完全缓解。其后分别于 2009 年 1 月 15 日、2009 年 2 月 15 日、2009 年 3 月 20 日予以中剂量 EA 方案(依托泊苷 55 mg d1~2, 阿糖胞苷 1.1 g d1~4)2 个疗程, 中剂量 DA 方案(柔红霉素 20 mg d1~2, 阿糖胞苷 1.1 g d1~4)1 个疗程化疗, 每次化疗前复查骨髓均提示完全缓解。2009 年 4 月转至本科继续治疗, 复查骨髓示完全缓解。2009 年 4 月 17 日予以 TA 方案(吡喃阿霉素 10 mg d1~3, 阿糖胞苷 100 mg d1~7)化疗。2009 年 5 月 18 日复查骨髓提示粒单系前体细胞异常增多, 考虑复发。5 月 22 日予以 FAG 方案(氟达拉滨 18 mg d1~5, 阿糖胞苷 1 g d1~4, 粒细胞集落刺激因子(G-CSF)150 μ g d1~5)化疗后复查骨髓原始粒细胞 5%, 原幼单核细胞 8%。于 2009 年 6 月 18 日予以 CAG 方案(阿克拉霉素 20 mg d1~2, 10 mg d3, 阿糖胞苷 10 mg q12 h d1~14, G-CSF 150 μ g d1~14)化疗后复查骨髓原始粒细胞 11%, 原幼单核细胞 22.5%, 提示诊断为急性髓细胞白血病 M4 型。化疗期间共行鞘内化疗 4 次, 脑脊液未见异常。为对患儿进行抢救性治疗, 在与家属沟通后启动异基因造血干细胞移植。

患儿与其父亲行 HLA 配型为半相合, 2009 年 7 月 24 日入层流病房, 入仓前复查骨髓原始粒细胞 16%, 原幼单核细胞 45.5%。预处理方案: 洛莫斯汀+白消安+环磷酰胺+阿糖胞苷+抗胸腺细胞球蛋白(ATG)(洛莫斯汀 120 mg \times 1 d, 白消安 16 mg q6 h \times 3 d, 环磷酰胺 1 g \times 2 d, 阿糖胞苷 1.1 g q12 h \times 2 d, ATG 60 mg \times 1 d, 70 mg \times 3 d)。2009 年 8 月 2 日移植其父亲外周血干细胞, 有核细胞(MNC)10.1 \times 10⁸/kg, CD34⁺细胞 4.8 \times 10⁸/kg。2009 年 8 月 3 日移植其父亲骨髓干细胞, MNC 0.87 \times 10⁸/kg, CD34⁺细胞 1.2 \times 10⁸/kg。移植抗宿主病(GVHD)的预防: 甲氨蝶呤 15 mg/m², 第 1 天, 10 mg/m², 第 3、6、11 天, 环孢霉素 A(CsA)移植前 8 d 开始 1.5 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ 静脉滴注, 移植前 1 d 增量至 2.5 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 口服时改为 5 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 骁悉 0.25 g/d, 移植前 7 d 开始。移植后于第 7 天开始予以 G-CSF 150 μ g/d, WBC 升至 6 \times 10⁹/L 停用, 移植后 42 d 骁悉减半, 移植后 71 d 停用。

供者 DC-CIK 细胞的制备: 患者入仓前抽其未缓解的骨髓细胞 50 mL 冻融抗原备用, 2009 年 7 月 31 日待患儿 HLA 半相合造血干细胞移植成功后用血细胞分离机采集供者单个核细胞行 DC-CIK 细胞的培养, 用患者白血病细胞冻融抗原体外诱导供者 DC-CIK 细胞增殖, 将孵育好的供者 DC-CIK 细胞按梯度冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。2009 年 8 月 26 日(移植后 24 d)开始每周给患者输注供者 DC-CIK 细胞 5 次, 回输细胞数按梯度递增: 0.5 \times 10⁹、1 \times 10⁹、2 \times 10⁹、4 \times 10⁹、8 \times 10⁹。回输过程中监测患儿生命体征、心电图、血常规、肝肾功能变化情况。患者未出现不良反应。

2 结 果

移植后 14 d 患儿造血功能重建(中性粒细胞大于 0.5 \times 10⁹/L, 血小板大于 20 \times 10⁹/L); 移植后 21 d 复查骨髓: 骨髓增生活跃, 其中粒系占 66%, 红系占 23%, 粒系增生活跃, 各阶段可见, 形态大致正常, 红系增生活跃, 以中晚幼红细胞增生为主, 形态未见异常, 淋巴细胞占 9.5%, 形态正常, 巨核细胞 45

个, 产板巨核 13 个, 血小板可见。骨髓染色体检查示 XY 染色体 100%(荧光免疫杂交技术), 证明移植成功。

移植后供者 DC-CIK 细胞输注 5 次, 患儿均未出现不良反应。患儿于供者 DC-CIK 细胞治疗结束后出院。院外定期复查血常规、肝肾功能、巨细胞病毒指标, 均在正常范围内, 移植后 130 d 复查骨髓示完全缓解, 继续随访中。

3 讨 论

开展 HLA 半相合造血干细胞移植能够解决 90% 患者造血干细胞来源不足的问题。对本例患儿而言, 由于本身是难治和复发性疾病, 多次常规化疗不能达到完全缓解, 进行抢救性异基因造血干细胞移植是该患儿治疗的惟一希望。然而, 此类患者移植后的复发率非常高, 如何应对是目前临床面临的难题。本研究尝试采用患儿白血病细胞冻融抗原刺激的供体 DC-CIK 细胞在移植造血功能重建后分次输注, 以期达到清除残留白血病, 降低复发率, 改善预后的目的。

CIK 细胞是将人外周血单个核细胞在体外用多种细胞因子共培养后获得的一群异质细胞, CD3⁺、CD56⁺、T 细胞是其主要的效应细胞。CIK 细胞兼有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性与 NK 细胞的非主要组织相容性抗原(MHC)限制性杀瘤特点, 与其他过继性免疫治疗细胞相比, CIK 细胞增殖速度更快, 杀瘤活性更强, 杀瘤谱更广。DC 细胞是目前已知的功能最强的专职抗原提呈细胞, 可以在体内外向 T 淋巴细胞递呈抗原, 并诱发细胞毒 T 淋巴细胞反应。国内外研究已经证实将外周血来源的 CIK 细胞和同源 DC 细胞共培养一段时间后发现, DC 和 CIK 细胞的增殖能力明显增强, DC 细胞白细胞介素(IL)-12 的分泌量明显增加, CIK 细胞群中的免疫抑制 T 细胞(Treg 即 CD4⁺、CD25⁺ 细胞)明显降低, 使 Treg 对抗肿瘤免疫细胞的抑制作用削弱, 从而增强 CIK 在体内发挥细胞毒活性, 使 CIK 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性显著提高^[1-2]。

目前, 临床研究在自体 DC-CIK 细胞的治疗方面报道较多, 白血病患者自体 CIK 细胞具有杀伤自体及异体白血病细胞, 清除残留白血病细胞的作用^[3]。北京大学人民医院细胞治疗中心 CIK 细胞治疗急性白血病的临床研究结果显示, DC-CIK 细胞治疗具有明显清除微小残留白血病细胞, 预防复发的作用, 静脉输注安全^[4]。研究显示经过自体移植的血液病患者, 用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)动员的外周血单个核细胞可以扩增出 DC-CIK 细胞并可用于移植后患者的免疫治疗^[5]。DC-CIK 细胞治疗后, 机体外周血 T 淋巴细胞亚群比例明显变化, CD3⁺/CD56⁺ 数量明显增多, 有利于监测及清除体内残留的白血病细胞, 从而防治白血病复发^[4]。

本例患儿在 HLA 半相合造血干细胞移植成功后进行经过患者白血病细胞冻融抗原刺激的供体 DC-CIK 细胞输注, 国内文献尚未见报道。作为一个新的治疗尝试, 供体 DC-CIK 细胞输注结合异基因造血干细胞移植在本例患儿的治疗中是成功的, 临床观察 6 个月以上患儿的病情仍然完全缓解。临床疗效主要来自两个方面: (1) HLA 半相合造血干细胞移植重建患者造血和免疫功能; (2) 供者特异性肿瘤杀伤细胞的输注进一步清除了残留白血病, 为临床复杂情况的处置提供了有价值的参考。

表 1 两组患者治疗前、后血液流变学变化情况

组别	n	全血黏度高切 (mPa. S)	全血黏度低切 (mPa. S)	血浆黏度 (mPa. S)	HCT (L/L)	红细胞 聚集指数	Fg(g/L)
观察组	治疗前 60	5.75±0.71	11.26±1.22	2.01±0.44	0.45±0.04	2.18±0.28	3.89±0.71
	治疗后 60	5.05±0.27▲▲★	10.01±0.45▲▲★	1.72±0.08▲▲★	0.44±0.03▲▲★	1.89±0.09▲▲★	3.37±0.49▲▲★
对照组	治疗前 60	5.41±0.45	11.00±0.98	1.98±0.11	0.45±0.04	2.10±0.27	3.81±0.47
	治疗后 60	5.21±0.41▲	10.17±0.78▲	1.89±0.14▲	0.44±0.03▲	1.90±0.18▲	3.35±0.39▲

与治疗前比较,▲: P<0.05,▲▲: P<0.01;与对照组比较,★: P<0.05。

明显增快,差异有统计学意义(P<0.01)。对照组差异也有统计学意义(P<0.05)。两组比较差异有统计学意义。收缩期血流改变(P<0.01),舒张期末流速改变(P<0.05)。

2.3 血液流变学变化 观察组在降低全血黏度高切、低切,血浆黏度、红细胞聚集指数方面结果优于对照组(P<0.05),见表 1。

3 讨 论

眩晕是临床上常见病症,病情有轻重。眩晕的病因病机:气血亏虚,肝阳上亢,痰浊中阻,外感风热等。本研究患者均为中老年人,大多有颈椎病、动脉粥样硬化、高黏血症。由于颈椎病骨性压迫及动脉粥样硬化造成椎-基底动脉系统狭窄、痉挛、供血不足。血黏度增高加重了脑循环的障碍,由此而导致眩晕及一系列神经系统症状。

眩晕多为气滞血淤,方中川芎、当归、桃仁、红花活血化淤,现代中药研究证实其能增加脑及肢体血量;牛膝活血行气,能治气逆,山楂、神曲可降血脂,助消化作用。现代药理研究表明,血府逐淤汤能抑制血小板的聚集,改变血液流变性,调节血液循环,临床应用,确有良效。

川芎嗪是从中药川芎中提取的生物碱,其对心血管系统的生理药理作用已被广泛证实。近年研究发现,川芎嗪是一种新型的钙离子拮抗剂,具有活血化淤,扩张动脉,改善微循环的功能^[3-5]。另外,川芎嗪具有降低血液黏度,抑制血小板凝聚,故可改善微循环,有利于疾病的痊愈^[6]。再有,川芎嗪还能提高红细胞和血小板表面电荷,降低血黏度,显著减少脑缺血-再灌注损伤后细胞间黏附分子的表达,减少内皮细胞与白细胞的黏附,从而保持血管内皮细胞,抑制内皮素产生,促进血管一氧化

氮分泌,扩张血管,改善脑供血不足^[7]。本组观察证明血府逐淤汤与川芎嗪联用,能显著改善 VA、BA 血流,降低血黏度,临床总有效率达 93.33%,疗效显著且起效快,无明显不良反应。因此,血府逐淤汤联合川芎嗪治疗椎-基底动脉供血不足性眩晕效果显著,值得推广应用。

参考文献:

- [1] 陈婕. 椎-基底动脉缺血性眩晕的诊断:附 69 例分析[J]. 山东医药,1993,33(1):9.
- [2] 顾慎为. 经颅多普勒检测与临床[M]. 上海:上海医科大学出版社,1993:70.
- [3] 徐浩. 川芎嗪心血管药理与钙拮抗作用[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(4):376.
- [4] 刘会芳. 川芎嗪对心血管系统的作用及机制研究进展[J]. 中国药房,2007,18(7):706.
- [5] 赵树藩,启立新,王淑梅,等. 盐酸川芎嗪注射液与 28 种药物配伍的稳定性观察[J]. 中国新药杂志,2002,11(6):552.
- [6] 赵玉清. 磷酸丹参川芎嗪注射液药理毒理研究综述[J]. 时珍国医国药,2007,18(15):1780.
- [7] 高长越,周华东,邓娟,等. 川芎嗪对脑缺血-再灌注损伤后细胞间黏附作用的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志,2002,9(1):135.

(收稿日期:2010-03-25 修回日期:2010-06-15)

(上接第 1853 页)

参考文献:

- [1] Marten A, Ziske C, Schottker B, et al. Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations[J]. J Immunother, 2001,24(6):502.
- [2] Schmidt J, Eisold S, Büchler MW, et al. Dendritic cells reduce number and function of CD4⁺ CD25⁺ cells in cytokine-induced killer cells derived from patients with pancreatic carcinoma[J]. Cancer Immunol Immunother,2004, 53(11):1018.
- [3] Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells;NK-like

T cells with cytolytic specificity against leukemia[J]. Leuk Lymphoma,2003,44:1457.

- [4] 童春容,耿彦彪,陆道培. 自体细胞因子诱导的杀伤细胞治疗急性白血病的临床研究[J]. 北京医科大学学报, 2000,32(5):473.
- [5] Alvarnas JC, Linn YC, Hope EG, et al. Expansion of cytotoxic CD3⁺, CD56⁺ cells from peripheral blood progenitor cells of patients undergoing autologous hematopoietic cell transplantation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2001,7:216.

(收稿日期:2010-03-25 修回日期:2010-06-15)