

· 经验交流 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.29.007

## EBV-CTL 治疗异基因造血干细胞移植后难治性 EB 病毒感染的分析\*

缪晓娟, 杨 慧, 孙浩平, 付 利, 范方毅, 王 译, 何光翠, 赖思含, 侯严堂, 李业成, 易 海<sup>△</sup>, 苏 毅  
(成都军区总医院血液科, 成都 610083)

**[摘要]** 目的 研究 EB 病毒特异性细胞毒 T 淋巴细胞(EBV-CTL)治疗异基因造血干细胞移植后难治性 EBV 感染的疗效。方法 报道 4 例 EBV-CTL 治疗异基因造血干细胞移植后难治性 EBV 感染病例并结合文献分析。结果 3 例取得了较好疗效, 分别于治疗后 1、2、3 个月转阴, 分别随访 8、12、6 个月未复发, 仅有 1 例在 EBV-DNA 转阴后第 6 个月复发, 再次 EBV-CTL 治疗后, 迅速进展为移植后淋巴细胞增殖性疾病(PTLD), 治疗无效死亡。结论 EBV-CTL 是治疗难治性 EBV 感染的一种有效手段, 但仍有部分病例治疗无效, 值得进一步探讨和研究。

**[关键词]** 疱疹病毒 4 型, 人; 特异性细胞毒 T 淋巴细胞; 异基因造血干细胞移植

**[中图分类号]** R457.7

**[文献标识码]** B

**[文章编号]** 1671-8348(2015)29-4051-03

EB 病毒(EBV)感染是异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)后常见并发症, 通常采用减停免疫抑制剂、抗病毒药物和 CD20 单克隆抗体(利妥昔单抗)治疗, 部分病例病情可以得到有效控制, 但仍有部分病例病情进展, 成为难治性 EBV 感染, 甚至可发展成移植后淋巴细胞增殖性疾病(post-transplantlymphoproliferativedisease, PTLD)<sup>[1]</sup>。因此, 如何治疗常规治疗无效的难治性 EBV 感染仍是亟待解决的问题。近年来 EBV 特异性细胞毒 T 淋巴细胞(EBV-CTL)为这一感染提供了新的治疗手段<sup>[2]</sup>。本文采用 EBV-CTL 治疗 4 例 allo-HSCT 后难治性 EBV 感染, 获得了较好的疗效, 现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2012 年 1 月至 2014 年 12 月共 4 例患者, 其中男 1 例, 女 3 例; 平均年龄(14.0±11.6)岁; 1 例再生障碍性贫血, 2 例复发难治急性髓系白血病, 1 例复发难治急性淋巴细胞白血病。

**1.2 EBV-CTL 的制备方法** 主要试剂与仪器: RPMI1640 细胞培养基、重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)、重组人白细胞介素(rhIL)4、rhIL-7、rhIL-12、rhIL-15 购于 PEPROTECH 公司, rhIL-2 购于江苏金丝利公司, 淋巴分离液(Ficoll1.077)购于天津斯坦姆生物科技有限公司, PepMix、EBV 购于 JPT 公司, PGE2 购于 SIGMA 公司, 血细胞分离机购于费森尤斯公司。制备方法: (1)常规使用血细胞分离机分离血细胞悬液。(2)将分离好的血细胞悬液与生理盐水按照 1:1 等量混匀, 2 000 r/min 离心 15 min, 弃去上清液。(3)抽取适量淋巴分离液(Ficoll1.077), 将弃去上清液的细胞液与生理盐水按照 1:1 等量混匀, 再缓缓加入 Ficoll 上层, 2 000 r/min 离心 20 min。(4)弃上清液, 收集 PBMC 层液至离心管中, 加入生理盐水 30 mL 混匀, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 重复 3 次后计数。(5)用 RPMI1640 完全培养基重悬细胞于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 放置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内培养 24 h, 将悬浮细胞(制备 CTL)与贴壁细胞(制备 DC)分开培养, 悬浮细胞内加入 rhIL-2、rhIL-15、rhIL-7、rhIL-12, 贴壁细胞内加入 GM-CSF、rhIL-4。D6; DC 内加入 PGE2, D7; DC 内加入 Pepmix。EBV, 4 h 后加入 CTL 中并继续培养 3~5 d, 后收集细胞, 台盼

蓝染色, 并做流式检测, 输注前常规进行微生物学送检, 确保无污染后输注患者。

**1.3 EBV-CTL 输注** 输注 CTL 前给予地塞米松 2.5 mg 静推; EBV-CTL 输注总量为(5.0~11.5)×10<sup>6</sup>/kg, 输注时间为 0.5 h, 共 4 d, 1 次/月。

**1.4 患者随访** 监测 EBV-DNA 定量(通过实时荧光定量 PCR 方法检测外周血 EBV-DNA, 拷贝数小于 10<sup>3</sup> 为阴性), 1 次/2 周。

### 2 结 果

**2.1 EBV-CTL 制备产品的检测** 采用流式分析所得 EBV-CTL CD3<sup>+</sup> 细胞中位数为 92.9%(88.4%~94.6%), 其中 CD8<sup>+</sup> 细胞占 83.6%(76.5%~95.2%), CD4<sup>+</sup> 细胞占 8.8%(2.6%~11.7%), 而 CD56<sup>+</sup> 的 NK 细胞占 6.3%(3.2%~10.9%), CD19<sup>+</sup> 的 B 细胞占 0.4%(0.2%~0.8%)。

**2.2 治疗结果** 病例 1, 女, 7 岁。诊断: 重型再生障碍性贫血。移植前外周血 EBV 情况: 阴性。预处理方案: 氟达拉滨+ATG+环磷酰胺。移植方式: 母供女(7/10)半相合 allo-HSCT。移植后给予常规口服环孢素预防移植物抗宿主病(GVHD)。84 d 后, 患者出现反复低热, 体温 38℃ 左右, 伴咳嗽咳痰, 外周血查 EBV-DNA 定量: 4.23×10<sup>4</sup> copy/mL, 考虑移植后 EBV 感染。立即将环孢素减量, 给予阿昔洛韦 200 mg 8 h 1 次静脉滴注及人免疫球蛋白 5 g 每周 1 次静脉滴注, 2 周后无好转, 给予利妥昔单抗(美罗华)100 mg 静脉滴注 1 次/周, 4 周后患者仍间断低热, 咳嗽咳痰症状无明显好转, 复查 EBV-DNA 进行性升高至 2.35×10<sup>5</sup> copy/mL。考虑为难治性 EBV 感染, 给予 EBV-CTL 治疗 1 次/月, 输注 1 次后患者体温基本恢复正常, 咳嗽咳痰基本缓解, EBV-DNA 明显下降, 输注第 2 次后, EBV-DNA 转为阴性。该例患者随访 13 个月, EBV-DNA 始终为阴性。

病例 2, 女, 31 岁。诊断: 复发难治性急性髓系白血病(M5 型)。移植前外周血 EBV 情况: 阴性。预处理方案: 白消安+环磷酰胺+氟达拉滨+ATG。移植方式: 父供女(5/10)半相合 allo-HSCT。移植后给予口服环孢素预防 GVHD, 出现血压升高、伴眼痛及头痛, 故改用他克莫司口服预防 GVHD。56 d

\* 基金项目: 成都军区总医院院管项目(2013YG-B045)。 作者简介: 缪晓娟(1985-), 硕士, 住院医师, 主要从事血液方面的研究。

<sup>△</sup> 通讯作者, Tel: 13699418229; E-mail: yihaimail@163.com。

之后,外周血查 EBV-DNA: $2.22 \times 10^3$  copy/mL。将他克莫司减量,给与阿昔洛韦 350 mg 8 h 1 次静脉滴注及人免疫球蛋白 10 g 1 次周静脉滴注,2 周后 EBV-DNA 进行性升高,故给予美罗华 500 mg 静脉滴注 1 次/周,4 周后复查 EBV-DNA 进行性升高至  $7.84 \times 10^3$  copy/mL。考虑为难治性 EBV 感染,给予 EBV-CTL 治疗 1 次/月,输注 1 次后 EBV-DNA 转为阴性。该例患者随访至今已 8 个月,EBV-DNA 始终为阴性。

病例 3,男,12 岁。诊断:复发难治性急性淋巴细胞白血病(L2 型)。移植前外周血 EBV 情况:阴性。预处理方案:白消安+环磷酰胺+氟达拉滨+ATG。移植方式:父供子(6/10)半相合 allo-HSCT。移植后给予口服环孢素预防 GVHD。34 d 之后,患儿出现发热,体温  $39^\circ\text{C}$  左右,伴咳嗽咳痰、呼吸困难,EBV-DNA 定量: $1.52 \times 10^5$  copy/mL。肺 CT 提示双肺弥漫磨玻璃样改变,考虑移植后 EBV 感染。立即停用环孢素,给予膦甲酸钠 300 mg 1/天静脉滴注及人免疫球蛋白 10 g 1 次/周静脉滴注,2 周后患者体温无明显下降,呼吸困难进行性加重,复查 EBV-DNA 定量: $7.81 \times 10^5$  copy/mL。给予美罗华 400 mg 静脉滴注 1 次/周,4 周后患者体温仍无明显下降,呼吸困难进行性加重,复查 EBV-DNA 进行性升高至  $1.42 \times 10^6$  copy/mL。考虑为难治性 EBV 感染,给予 EBV-CTL 治疗 1 次/月,输注 2 次后患者体温逐渐恢复正常,呼吸困难症状逐渐缓解。输注第 4 次后 EBV-DNA 转为阴性。该例患者随访至第 10 个月时,再次出现发热,体温  $38^\circ\text{C}$  左右,伴咳嗽咳痰,EBV-DNA  $6.20 \times 10^5$  copy/mL。考虑 EBV 感染复发。再次给予 EBV-CTL 治疗 2 次后,患者体温及呼吸道症状进行性加重,且出现双侧颈部及腋窝淋巴结无痛性肿大,大者约  $2\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ ,疾病进展为 PTLD。给予美罗华联合 EBV-CTL 治疗后,患者病情继续进展,最终因多器官功能衰竭死亡。

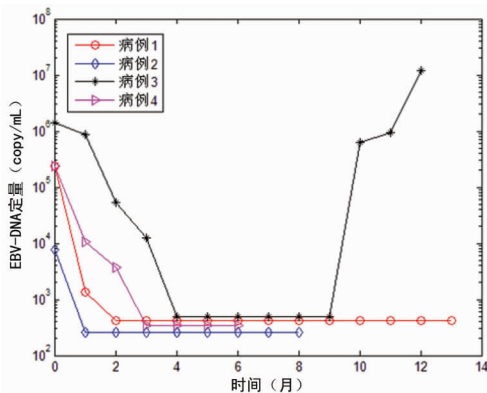


图 1 4 例患者输注 EBV-CTL 后外周血 EBV-DNA 变化曲线

病例 4,女,6 岁。诊断:复发难治性急性髓系白血病(M2 型)。移植前外周血 EBV 情况:阴性。预处理方案:白消安+环磷酰胺+氟达拉滨+ATG。移植方式:非血缘全相合 allo-HSCT。移植后静滴环孢素预防 GVHD,患者出现抽搐、失语、意识短暂丧失,考虑环孢素所致,改用他克莫司小剂量口服预防 GVHD。23 d 之后,患儿低热,颈部可触及数个黄豆大串珠样排列状肿大淋巴结。EBV-DNA: $5.23 \times 10^3$  copy/mL。外周血(流式法)PTLD 筛查:B 细胞占有核细胞 2.28%,Kappa/Lambda 比值偏高,其中 0.46%(占有核细胞)可疑为单克隆 B 细胞。考虑:(1)EBV 感染;(2)PTLD 可疑。立即停用他克莫司,给予阿昔洛韦 200 mg 1/8 h 及人免疫球蛋白 10 g 1 次/周

抗病毒治疗,2 周后无明显好转,给予美罗华 100 mg 静脉滴注 1 次/周,4 周后,患儿仍偶有低热,伴咳嗽咳痰,颈部淋巴结无明显缩小,复查 EBV-DNA 进行性升高至  $2.34 \times 10^5$  copy/mL。给予 EBV-CTL 治疗 1 次后,患儿体温恢复正常,EBV-DNA 下降,治疗 3 次后,患儿颈部淋巴结缩小,EBV-DNA 转阴。该病例随访至今已 6 个月,EBV-DNA 始终为阴性。

4 例患者使用 EBV-CTL 治疗后的 EBV-DNA 具体变化见图 1。

### 3 讨论

EBV 感染是 allo-HSCT 后特别是接受 T 细胞去除移植体或免疫重建延迟的患者常见并发症之一。van Esser 等<sup>[3]</sup>报道 EBV 再激活发生率在非去除 T 细胞的移植患者中为 31.0%,而在去除 T 细胞移植的患者中为 65.0%。曹新辉等<sup>[4]</sup>报道 allo-HSCT 后 EBV 再激活的累积发生率 42.27%,EBV 再激活发生的危险因素有 HLA 配型不合、应用抗胸腺细胞球蛋白、Ⅲ~Ⅳ度急性移植体抗宿主病及年龄小于 20 岁。

根据 2008 年欧洲移植-感染会议制定的指南定义:在血液检测出 EBV-DNA,且无临床症状的患者可诊断为 EBV 血症。部分 EBV 感染的患者最终可发展成严重致死性疾病 PTLD,死亡率极高。PTLD 最常见的临床表现是发热、淋巴结肿大,其他还包括肝脾肿大、咽炎及中枢神经系统症状等。

EBV 感染主要治疗措施有:(1)免疫抑制剂减量,是治疗 EBV 血症的首选方法。而对于 HSCT 后 EBV 感染患者,因为免疫功能尚未重建,减停免疫抑制剂并不能恢复 T 细胞功能,并有可能诱发严重 GVHD<sup>[1,5]</sup>。(2)抗病毒治疗,但抗病毒药物是否能够降低 PTLD 危险性并不确定。(3)抗 CD20 单克隆抗体(利妥昔单抗)。PTLD 患者 B 淋巴细胞稳定高表达 CD20 抗原,为单克隆抗体治疗提供理想靶点。美罗华常规剂量为  $375\text{ mg/m}^2$ ,每周 1 次,一般 1 个疗程不超过 4 次。大部分患者在接受利妥昔单抗治疗后,血液中 EBV-DNA 定量水平可出现大幅下降。Milpied 等<sup>[6]</sup>报道,应用美罗华治疗 32 例 PTLD 患者,患者年龄 3~67 岁;20 例患者取得了完全缓解,2 例取得部分缓解,有效率达 68.75%;其中 6 例骨髓移植患者中 5 例完全缓解,完全缓解率为 83.00%。尽管利妥昔单抗具有良好的安全性,但它会导致 B 细胞 6~8 个月的缺乏以及一些未知的长期的不良反应<sup>[7]</sup>。虽然罕见,使用利妥昔单抗导致 CD20 阴性淋巴瘤的复发已报道<sup>[8]</sup>。

EBV 原发感染后,EBV 潜伏于 B 细胞中,能启动细胞增殖程序,最终可发展为恶性增殖的淋巴组织。在正常人体内,T 细胞可控制 B 细胞增殖从而阻止这一进程的发生。当感染 EBV 的宿主是已接受 allo-HSCT 的患者时,由于该类患者免疫功能低下,并缺乏有效的免疫监视,可导致 EBV 出现再激活,病毒大量复制,同时大量表达 EBV 相关基因,其中一些癌基因可引起 B 细胞异常增生,最终可能发展为 PTLD<sup>[9-10]</sup>。而 EBV-CTL 通过过继细胞免疫,可重建 T 细胞免疫反应,不仅可直接清除受感染 B 淋巴细胞,抑制 B 淋巴细胞扩增治疗 PTLD,还可以产生长期记忆效应,防止疾病复发。Bollard 等<sup>[11]</sup>报道了一项为期 7 年的临床研究,56 例患者年龄 9 个月至 20 岁,均行去 T 细胞 HSCT,所有患者预防性输注了供者来源的 EBV-CTL;输注 CTL 的中位时间为移植后 88 d,其中 26 例输注的 CTL 标记有新霉素抵抗基因;56 例患者均未发生 PTLD,而对照组的 PTLD 发生率为 11.50%;应用实时定量 PCR 方法检测,发现患者外周血中新霉素抵抗基因持续时间

最短为 69 个月;有 3 例因不适合预防性输注而发展为 PTLD 的患者,接受了 EBV-CTL 输注治疗,2 例患者病情得以缓解,治疗无效的患者淋巴瘤细胞中发现了抗原逃逸变异。Heslop 等<sup>[12]</sup>进行的一项单中心研究中,114 例患者在接受 HSCT 后使用供者来源的 EBV-CTL 进行预防或治疗 PTLD,结果显示,所有患者均可很好地耐受治疗,无一例患者在输注淋巴细胞后发生 GVHD。其中 101 例血清 EBV-DNA 阳性的患者,最终没有发展为 PTLD,而 11 例疑似 PTLD 患者治疗后均达到完全缓解,并且无复发。

结合本研究这 4 个病例,发生 EB 病毒感染后,先后给予了抗病毒药物、人免疫球蛋白、利妥昔单抗(美罗华)治疗,均未取得疗效,发展成难治性 EBV 感染。给予 EBV-CTL 后,4 例患者中,其中 3 例取得了较好疗效,仅有 1 例患者在 EBV-DNA 转阴后第 6 个月复发,在 EBV-CTL 治疗后,迅速进展为 PTLD 治疗无效死亡。4 例患者无一例出现治疗相关不良反应或 GVHD。

综上所述,EBV-CTL 是治疗常规治疗无效的 EBV 感染的一种有效手段,为难治性 EBV 感染提供了新的治疗策略。部分病例反应良好,但在长期随访过程中仍有部分病例 EBV-DNA 再次升高,再次给予美罗华及 EBV-CTL 治疗仍然无效,最终发展为 PTLD,治疗无效死亡,说明 EBV-CTL 治疗移植后难治性 EBV 感染仍然有很多未解之谜。本研究虽然取得了一定疗效,但因病例数较少,后期仍需扩大病例数量,对该方法进行进一步探讨和研究。

#### 参考文献

[1] 陈静,顾晶. 异基因造血干细胞移植后 EB 病毒感染的治疗进展[J]. 世界临床药物,2013,34(3):140-143.

[2] 顾斌,陈广华,吴德沛. 异基因造血干细胞移植后淋巴细胞增殖性疾病诊治进展[J]. 中国实验血液学杂志,2014,22(2):538-542.

[3] van Esser JW, van der Holt B, Meijer E, et al. Epstein-Barr virus(EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation(SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell-depleted SCT[J]. Blood,2001,98(4):972-978.

[4] 曹星辉,范志平. 异基因造血干细胞移植后 EB 病毒再激活的危险因素分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(23):4257-4261.

[5] Cesaro S, Pegoraro A, Tridello G, et al. A prospective study on modulation of immunosuppression for Epstein-Barr virus reactivation in pediatric patients who underwent unrelated hematopoietic stem-cell transplantation [J]. Transplantation,2010,89(12):1533-1540.

[6] Milpied N, Vasseur B, Parquet N, et al. Humanized anti-CD20 monoclonal antibody(Rituximab) in post transplant B-lymphoproliferative disorder:a retrospective analysis on 32 patients[J]. Ann Oncol,2000,11 Suppl 1:S113-116.

[7] Suzan F, Ammor M, Ribrag V. Fatal reactivation of cytomegalovirus infection after use of rituximab for a posttransplantation lymphoproliferative disorder[J]. N Engl J Med,2001,345(13):1000.

[8] Verschuuren EA, Stevens SJ, van Imhoff GW, et al. Treatment of posttransplant lymphoproliferative disease with rituximab; the remission, the relapse, and the complication[J]. Transplantation,2002,73(1):100-104.

[9] Krams SM, Martinez OM. Epstein Barr virus, rapamycin, and host immune responses[J]. Curr Opin Organ Transplant,2008,13(6):563-568.

[10] Salavert M, Granada R, Diaz A, et al. Role of viral infections in immunosuppressed patients [J]. Med Intensiva,2011,35(2):117-125.

[11] Bollard CM, Savoldo B, Rooney CM, et al. Adoptive T-cell therapy for EBV-associated post transplant lymphoproliferative disease[J]. Acta Haematol,2003,110:139-148.

[12] Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients[J]. Blood,2010,115(5):925-935.

(收稿日期:2015-04-12 修回日期:2015-06-19)

(上接第 4050 页)

parable long-term outcomes after reduced-intensity conditioning versus myeloablative conditioning allogeneic stem cell transplantation for adult high-risk acute lymphoblastic leukemia in complete remission[J]. Am J Hematol,2013,88(8):634-641.

[8] Lickliter JD, Taylor K, Szer J, et al. An imatinib-only window followed by imatinib and chemotherapy for Philadelphia chromosome-positive acute leukemia: long-term results of the CMLALL1 trial[J]. Leuk Lymphoma,2015,56(3):630-638.

[9] 刘霆. Ph 阳性急性淋巴细胞白血病的治疗进展与思考[J]. 中华血液学杂志,2012,33(2):73-75.

[10] Gruber F, Mustjoki S, Porkka K. Impact of tyrosine kinase inhibitors on patient outcomes in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia[J]. Br J Haematol,2009,145(5):581-597.

[11] Piccaluga PP, Paolini S, Martinelli G. Tyrosine kinase inhibitors for the treatment of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia[J]. Cancer,2007,110(6):1178-1186.

[12] Miller GD, Bruno BJ, Lim CS. Resistant mutations in CML and Ph(+)-ALL - role of ponatinib[J]. Biologics,2014,8:243-254.

(收稿日期:2015-04-08 修回日期:2015-06-12)