

格列卫治疗慢性粒细胞白血病 Ph 染色体转阴后进行自体外周血干细胞移植的结果

孟凡义袁小 竞袁刚启发袁徐 丹袁杨龙江袁宋兰林袁叶晓力袁徐 兵袁周淑芸袁第一军医大学南方医院血液科袁广东 广州 510515 冤

摘要 目的 探讨格列卫治疗慢性粒细胞白血病 Ph 染色体阴性后自体外周血干细胞移植的可行性遥方法 对 2 例成人慢性粒细胞白血病慢性期患者采用 Ph 染色体阳性细胞和间期荧光原位杂交 FISH 冤检查 bcr/abl 融合基因阳性细胞均 90% 袁 IFN-琢治疗半年耐药袁改用格列卫 0.3~0.4 g/d 分别治疗 130 和 168 d 袁期间 3 次复查 Ph 染色体和 FISH 检测 bcr/abl 融合基因均示阴性袁后应用阿糖胞苷 2.0 g/d 和足叶乙甙 0.2 g/d 分别静脉注射 3 d 袁环磷酰胺 1.0 g 静脉注射 1 次遥当白细胞 <1.0伊0⁹/L 时袁应用 G-CSF 300 滋/d 袁至白细胞 >10伊0⁹/L 时应用 CS 3000 Plus 分离外周血单个核细胞并用液氮保存待用遥应用 MiniMAC 富集的 CD34⁺ 细胞 渊纯度分别为 83% 和 93% 冤的 bcr/abl 阳性率分别为 11% 和 14% 遥动员完成后 3~4 周给予全身照射 9 Gy 袁分 2 次照射袁每天以环磷酰胺 60 mg/kg 袁和足叶乙甙 300 mg 分别静脉注射 2 d 袁静脉输注液氮保存的外周血干细胞袁单个核细胞分别为 4.17 和 3.9伊0⁸/kg 袁 CD34⁺ 细胞为 4.89 和 4.8伊10⁶/kg 袁移植 -1~14 d 应用 CsA 联合 IL-2 诱导移植抗宿主病 渊GVHD 冤遥结果 移植后中性粒细胞绝对值 >0.5伊10⁹/L 平均需要 11 d 袁血小板 >20伊0⁹/L 平均需要 20 d 袁无 GVHD 样表现遥随访观察 120 d 和 300 d 袁患者血液学持续缓解袁 I-FISH 检测骨髓细胞 bcr/abl 融合基因阳性率分别为 20% 和 40% 遥结论 格列卫治疗 CML 获细胞遗传学完全缓解后进行自体外周血干细胞移植袁白血病还可以复发遥

关键词 慢性粒细胞白血病 / 药物治疗 / 格列卫 / 造血干细胞移植 / Ph 染色体

中图分类号 733.72 文献标识码 文章编号 000-2588(2003)12-1301-02

Autogeneic peripheral blood hemopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate-induced negavitation of Philadelphia chromosome

MENG Fan-yi, SUN Jin, LIU Qi-fa, XUDan, YANG Long-jiang, SONG Lan-lin, LIU Xiao-li, XU Bing, ZHOU Shu-yun
Department of Hematology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the possibility of curing chronic myeloid leukemia with autogeneic hemopoietic stem cell transplantation in patients with negative Philadelphia (Ph) chromosome induced by imatinib mesylate (STI 571) treatment. Methods Two patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase, who had 90% Ph chromosome-positive cells and bcr/abl fusion gene-positive cells as shown by interphase fluorescence in situ hybridization (I-FISH), failed to respond favorably to interferon-琢 therapy in the treatment courses of 7 and 8 months, respectively. Treatment with STI 571 at a daily dose of 300 to 400 mg for 5 months to 8 months was subsequently implemented, after which the Ph chromosome and bcr/abl fusion genes became normal in detection for 3 times. Peripheral blood haemopoietic stem cell mobilization was then initiated by intravenous injection of cytarabine (2.0 g/d) for 3 days, etoposide (0.2 g/d) for 3 d and cyclophosphamide (1.0 g/d) for one day. When the white blood cell was below 1.0伊0⁹/L, the G-CSF (300 滋/d) was administered subcutaneously for 5 or 6 d, and the peripheral blood mononuclear cells were collected by CS3000 Plus blood cell separator. The percentage of bcr/abl fusion gene-positive cells among CD34⁺ cells enriched by MiniMAC ranged from 11% to 14%. After 3 or 4 weeks, the patients received total body irradiation at 9 Gy given in 2 fractions, with intravenous injection of cyclophosphamide (60 mg/kg daily) and etoposide (300 mg/d) for 2 d. On the day of transplantation, the collected mononuclear cells were 4.17伊0⁸/kg and 3.9伊0⁸/kg, with CD34⁺ cells reaching 4.89伊0⁶/kg 袁 and 4.8伊0⁶/kg. CsA was also used since day -1 to day +13 of the transplantation for prevention of graft-versus-host disease. G-CSF was administrated daily at the dose of 300 滋 subcutaneously from day +3 to +12. Results After the transplantation, the absolute neutrophil count (ANC) took a mean of 11 d to exceed 0.5伊0⁹/L in these two patients, and 19 and 21 d, respectively, were needed for the pletelet count to exceed 20伊0⁹/L. The two patients showed cytogenetic relapse at 120 and 300 d after the transplantation, respectively. Conclusion Autogeneic preperial blood stem cells transplantation after Ph chromosome is negative in patients with chronic myeloid leukemia, who receive STI 571 treatment, may also relapse, and more radical elimination of Ph chromosome-positive cells is needed.

Key words: chronic myeloid leukemia/drug therapy; imatinib mesylate; hemopoietic stem cells transplantation; Philadelphia chromosome

收稿日期 2003-08-16

基金项目 广东省科技重大专项课题 渊30202 冤

Supported by Key Sci-tech Research Project of Guangdong Province (B30202)

作者简介 孟凡义 渊1955- 冤男 袁安徽肖县人 袁1993 年毕业于解放军军医进修学院 袁硕士 袁教授 袁主任医师 袁硕士生导师 袁电话 20-61641611

作者报告 2 例应用格列卫 STI 571 冤治疗慢性粒细胞白血病慢性期 Ph 染色体转阴后自体外周血造血干细胞移植的初步结果遥

1 资料与方法

1.1 病例

2 例患者均为男性,年龄分别为 33 岁和 46 岁。初诊时脾大平脐,血红蛋白 120 g/L,白细胞 150~210伊0⁹/L,血小板 100~150 g/L,中性粒细胞碱性磷酸酶阴性,骨髓增生极度活跃,中晚幼粒细胞增生为主,诊断为 CML 慢性期。ML-CP 冤

应用羟基脲治疗, WBC 达到正常水平后,以 IFN-琢 300 万~500 万单位皮下注射,隔日 1 次,间断加用羟基脲 0.5 g/次/d,治疗疗程至第 7 和 8 个月期间,血液学持续缓解,中性粒细胞碱性磷酸酶正常,细胞培养法检查染色体,观察分裂像细胞 20~40 个,冤和荧光原位杂交技术检测间期细胞,冤FISH 冤cr/abl 融合基因,冤cr/abl 融合基因探针为双色双融合,冤于 vysis 公司,冤每次观测间期细胞 500 个,冤Ph 染色体阳性细胞和 bcr/abl 融合基因阳性细胞分别为 90% 和 96%,冤后停用 IFN-琢和羟基脲,改用格列卫 0.3~0.4 g/口服,冤次/d,冤治疗满 3 个月时复查染色体和 I-FISH,冤h 染色体和 bcr/abl 融合基因均为阴性,冤继续以格列卫分别治疗 2 和 3 个月,冤复查 Ph 染色体和 I-FISH 2 次,仍然全部阴性,冤

1.2 外周血造血干细胞动员和骨髓细胞激活

1.2.1 动员方案 2 例患者分别在格列卫治疗第 168 天和 130 天时停用格列卫并开始动员外周血干细胞,冤动员方案为:冤应用环磷酰胺,冤TX 冤.0 g/冤₁₋₃,冤应用阿糖胞苷 2.0 g/d 和足叶乙甙,冤VP16 冤.2 g/d,冤均静脉输注,冤例分别在化疗后第 7 和第 8 天, WBC < 1.0伊0⁹/L 时开始应用惠尔血,冤-CSF 冤00 滋/d,冤皮下注射 5 d 和 6 d,冤当 WBC 达到 冤1.6~14.9冤伊0⁹/L 时应用 CS3000 Pluse 采集外周血单个核细胞 1 次,冤循环血量 10 和 12 L,冤液氮保存待用,冤

1.2.2 产品分析 单个核细胞占 98%~99%,冤流式细胞术分析 CD34⁺ 细胞分别占 0.91% 和 1.04%,冤比分离前增加 1.0 和 2.5 倍,冤D34⁺/CD38⁻ 细胞分别占 CD34⁺ 细胞的 20.66% 和 30.7%,冤粒单系集落形成单位,冤FU-GM 冤平均为 144 依0/2伊0⁵ 个细胞,冤产品经 miniMAC 分选富集 CD34⁺ 细胞,冤获得 CD34⁺ 细胞纯度分别为 83% 和 93%,冤将动员后的产品和富集的 CD34⁺ 细胞分别应用 I-FISH 技术检测 bcr/abl 融合基因,冤纯化前 bcr/abl 融合基因阳性细胞分别为 3% 和 4%,冤纯化后阳性率分别上升为 14% 和 11%,冤

1.2.3 骨髓细胞激活 预处理前在局部麻醉下抽取患者骨髓血 500 ml,冤分离单个核细胞后按以往常用的方法与 IL-2 混合,冤置于 37 益,冤含 5% 二氧化碳的孵箱中培养 72 h,冤最终所得骨髓单个核细胞分别为 0.54伊0⁸/kg,冤b.w. 和 1.39伊0⁸/kg,冤b.w. 冤

1.3 移植方案

1.3.1 预处理方案 动员后分别于第 3 和第 4 周开始预处理,冤期间停用格列卫,冤3 d 全身照射,冤BI 冤 Gy,冤2 次照射,冤-3 尧 2 d 每天静脉滴注 CTX 60mg/kg,冤b.w. 和 VP16 300 mg/冤 d 回输液氮冻存的外周血干细胞和 IL-2 激活的骨髓细胞,冤输注的单个核细胞,冤INC 冤分别为 4.17伊0⁸/kg,冤b.w. 和 3.9伊0⁸/kg,冤b.w.,冤D34⁺ 细胞分别为 4.89 和 4.8伊0⁶/kg,冤b.w. 冤

1.3.2 移植后治疗 2 例患者均在 -1 d~+14 d 每天应用 CsA 2 mg/kg,冤b.w. 联合皮下注射 IL-2 100 万 U/d 诱导移植抗宿主病,冤3 d~+12 d 皮下注射 G-CSF 300 滋/d,冤血小板严重减少者输注血小板悬液,冤造血恢复后口服百仕欣 30 mg/d 治疗,冤其中 1 例在移植后 5 个月加用格列卫 400 mg/d 治疗 3 个月,冤

1.3.3 移植后监测 定期检测血常规,冤肝肾功能,冤3 个月复查骨髓细胞分类和染色体及 I-FISH 检测 bcr/abl 融合基因,冤并记录不良反应,冤

2 结果

2.1 造血重建

移植后中性粒细胞绝对值,冤ANC 冤0.5伊0⁹/L 分别需要 12 和 10 d,冤血小板 > 20伊0⁹/L 分别需要 21 和 19 d,冤其中 1 例在移植后第 5 个月血小板才恢复至 60伊0⁹/L,冤未见有移植抗宿主病,冤VHD 冤表现,冤例发生细菌感染被抗生素治愈,冤肝肾功能均正常,冤

2.2 随访

造血重建后每 1~2 周检查血常规 1 次,冤3 个月复查染色体和 I-FISH 检测 bcr/abl 融合基因,冤例在移植后 300 d 和 120 d bcr/abl 阳性细胞分别为 40% 和 20%,冤其中 1 例 WBC 10伊0⁹/L,冤无自觉症状,冤肝脾不大,冤应用 IFN-琢 治疗,冤另 1 例每日口服格列卫 0.5~0.6 g 治疗 2 月余,冤目前 2 例患者血液学仍然持续缓解,冤

3 讨论

应用化学药物治疗 CML 容易取得血液学缓解,冤在其后进行自体外周血造血干细胞移植的白血病复发率很高,冤其主要原因是移植中残留较多的 Ph 阳性克隆细胞没能清除,冤格列卫是 2001 年 5 月研发上市的基因靶向药物,冤临床治疗 3 个月能使 CML-CP 患者的 Ph 染色体转阴率高达 68%,冤明显优于目前应用的其他药物,冤但长期应用易产生耐药,冤停药后又有白血病复发的危险,冤因此我们设想在 Ph 染色体转阴后进行移植治疗,冤有可能进一步消灭残留白血病细胞,冤解决格列卫长期治疗带来的问题,冤类似的研究目前尚未见报告,冤

遗传背景知识有的还需使用特殊探针遥诸多因素限制了这些技术在真菌常规鉴定和大规模流行病学研究中的应用遥

PCR 指纹技术能迅速扩增未知序列靶细胞基因组片段获得大量多态性信息目前被广泛用于生物分类鉴定临床标本诊断基因定位谱系分析多态性分析和流行病学调查等多个领域遥作者应用 PCR 指纹技术研究假丝酵母菌耐药性与基因型关系袁系初步尝试其优缺点尚待大量流行病学调查数据的积累和更为详尽的分析遥

参考文献院

咱暂 Bossche HV, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi咱暂 Trends Microbiol, 1994, 2: 393-400.
 咱暂 Bossche HV. Mechanisms of antifungal resistance咱暂 Rev Iberoam Micol, 1997, 14(1): 44-9.
 咱暂 Pfaller MA, Lockhart SR, Pujol C, et al. Hospital specificity, region specificity, and fluconazole resistance of candida albicans bloodstream isolates咱暂 J Clin Microbiol, 1998, 36(6): 1518-29.
 咱暂 Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, et al. Molecular characteri-

zation of new clinical isolates of Candida albicans and C. dubliniensis in japan: analysis reveals a new genotype of C. albicans with group iintron咱暂 J Clin Microbiol, 2001, 39: 4309-15.

咱暂 McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic Candida albicans subgroups and comparison with Candida dubliniensis and Candida stellatoidea 咱暂 J Clin Microbiol, 1997, 37: 417-21.
 咱暂 National committee for clinical laboratory standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. National committee for clinical laboratory standards, Wayne, Pa.
 咱暂 Imai T, Watanabe K, Tamura YM, et al. Geographic grouping of Cryptococcus neoformans var. gattii by random amplified polymorphic DNA fingerprint patterns and its sequence divergence咱暂 Clin Lab, 2000, 46(7-8): 345-54.
 咱暂 Franz R, Kelly SL, Lamb DC, et al. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical candida albicans strains咱暂 Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42: 3065-72.
 咱暂 彭敬红, 赵均秀, 周有利, 等. 136 株念珠菌的临床分布及耐药性分析咱暂 中华医院感染学杂志, 2002, 12(11): 863-4.
 Peng J, Zhao J, Zhou Y, et al. Clinical distribution and drug resistance of 136 strains咱暂 Chin Hosp Infec J, 2002, 12(11): 863-4.

渊 接 1302 页冤

本组 2 例研究的初步结果显示袁尽管在外周干细胞动员前多次检查染色体和 I-FISH 检测 bcr/abl 融合基因阴性袁但在移植后仍有复发袁分析其主要原因仍然是残留白血病细胞所致遥本研究 CD34⁺ 细胞纯化前后的结果显示袁纯化后的 CD34⁺ 细胞 I-FISH 检测 bcr/abl 融合基因平均阳性率比纯化前和动员前明显增高渊 2.5% 渊 5% 渊 袁进一步证明 CD34⁺ 造血干细胞含有 Ph 阳性克隆的成份袁是慢性粒细胞白血病多系受累的关键机制遥此类细胞处于非增殖期对放疗不敏感袁难以清除袁常常是白血病复发的根源遥又因 Ph 阳性细胞含量少袁用染色体和 I-FISH 技术检测不敏感袁通过动员富集 CD34⁺ 细胞能够提高其检出率袁但技术过程复杂袁用于前瞻性诊断还不实际遥应用定量 PCR 技术检测 bcr/abl 融合基因能够提高敏感性袁有助于指导选择进行自体干细胞移植的最佳时机遥格列卫对造血干细胞生物学行为的影响还在研究中袁其对干细胞移植后造血重建的影响研究报告较少遥本研究的初步结果显示袁用格列卫治疗半年左右时进行外周血干细胞动员的效率及其在移植后造血重建时间均无影响袁用格列卫治疗后的患者可以按常规方法进行干细胞移植治疗遥

咱暂 杜庆锋, 周淑芸, 刘晓力, 等. 应用间期荧光原位杂交技术检测慢性髓系白血病患者肿瘤负荷咱暂 癌症, 2003, 22(6): 612-5.
 Du QF, Zhou SY, Liu XL, et al. Application of interphase fluorescence in situ hybridization for determination of the tumor load in chronic myeloid leukemia咱暂 Chin J Cancer, 2003, 22(6): 612-5.
 咱暂 林 芸, 孟凡义, 杨 艺, 等. 免疫磁珠纯化小鼠 CD34⁺ 造血干细胞咱暂 第一军医大学学报, 2001, 21(12): 908-11.
 Lin Y, Meng FY, Yang Yi, et al. Purification of murine CD34⁺ hematopoietic stem cells using immunomagnetic beads 咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(12): 908-11.
 咱暂 刘启发, 周淑芸, 伍柏松, 等. 激活骨髓自体移植治疗白血病和淋巴瘤的疗效分析咱暂 中华内科杂志, 2000, 39(8): 524.
 Liu QF, Zhou SY, Wu BS, et al. Autologous transplantation with recombinant interleukin-2 activated bone marrow for leukemia and lymphoma: an analysis of factors influencing the effect咱暂 Chin J Intern Med, 2003, 39(8): 524.
 咱暂 Kantarjian HM, Cortes JEO, Brien S, et al. Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic response咱暂 Blood, 2003, 101(1): 97-100.
 孟凡义, 郑维扬, 刘晓力, 等. ST1 571 治疗慢性粒细胞白血病的初步观察咱暂 第一军医大学学报, 2001, 21(12): 908-11.
 Meng FY, Zheng WY, Liu XL, et al. ST1 571 for treating 19 patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia 咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(12): 908-11.

渊 责任编辑 段咏慧 冤

参考文献院