

# 预防性G-CSF动员后供者淋巴细胞输注对高危白血病患者非清髓造血干细胞移植术后复发及移植物抗宿主病的影响

赵红霞 孙万军 李洁 乔均晓 黄雅静 胡海兰 艾辉胜

**【摘要】** 目的 观察预防性G-CSF动员后供者淋巴细胞输注(pG-DLI)对高危白血病患者非清髓造血干细胞移植(NST)术后复发及移植物抗宿主病(GVHD)的影响。方法 12例高危白血病患者中Ph<sup>+</sup>急性淋巴细胞白血病(ALL)1例,ALL未缓解1例,伴中枢神经系统白血病的急性髓系白血病(AML)3例,AML未缓解1例,急性双表型白血病1例,骨髓增生异常综合征(MDS)转化的AML 2例,慢性髓性白血病(CML)加速期1例、急变期2例。在HLA全相合同胞NST后30天(+30 d)~+40 d内,在无GVHD发生情况下,预防性给予冻存的pG-DLI。观察pG-DLI对供者细胞植入率、GVHD发生以及疾病复发的影响。结果 12例高危白血病患者中位年龄38(29~52)岁,pG-DLI中位时间为+35(+32~+40) d,输注单个核细胞中位数为 $2.3(1.8\sim 4.5)\times 10^8/\text{kg}$ ,CD34<sup>+</sup>细胞中位数为 $1.7(0.9\sim 3.9)\times 10^6/\text{kg}$ ,CD3<sup>+</sup>细胞中位数为 $0.6(0.4\sim 1.1)\times 10^8/\text{kg}$ 。在pG-DLI后有2例患者由供受者混合嵌合转变为完全供者嵌合。仅2例发生输注相关的Ⅱ度急性GVHD,治疗后控制。有6例患者发生慢性GVHD,其中累及皮肤3例,累及皮肤、肠道2例,累及肝脏1例。有1例患者因慢性GVHD死亡。中位随访40(24~64)个月,总生存率为58.3%,无病生存率为58.3%。结论 NST术后早期进行pG-DLI在一定程度上增加移植物抗白血病效应,控制疾病复发而不增加急性GVHD风险。

**【关键词】** 造血干细胞移植,非清髓; 供者淋巴细胞输注; 白血病

**Prophylactic G-CSF mobilized donor lymphocytes infusion after non-myeloablative stem cell transplantation prevents relapse in patients with high-risk leukemia** ZHAO Hong-xia\*, SUN Wan-jun\*, LI Jie, QIAO Jun-xiao, HUANG Ya-jing, HU Hai-lan, AI Hui-sheng. \*Department of Hematology, The Second Artillery General Hospital, Beijing 100088, China  
Corresponding author: SUN Wan-jun, Email: sunwanjun1974@sohu.com

**【Abstract】** **Objective** To evaluate the anti-leukemia effects of prophylactic G-CSF mobilized donor lymphocytes infusion (pG-DLI) and its relationship with the incidence of graft-versus-host disease (GVHD) in high-risk leukemia patients with non-myeloblastic stem cell transplantation (NST). **Methods** 12 patients with high-risk leukemia were analyzed, including Ph<sup>+</sup> acute lymphocytic leukemia ( $n=1$ ), acute leukemia (AL) with persistent non-complete remission ( $n=2$ ), acute myeloid leukemia (AML) with central nervous system (CNS) relapse ( $n=3$ ), hybrid AL ( $n=1$ ), secondary AML evolving from myelodysplastic syndrome (MDS/AML) ( $n=2$ ), chronic myeloid leukemia in accelerated phase (CML-AP) ( $n=1$ ), CML in blastic phase (CML-BP) ( $n=2$ ). All patients received non-myeloablative conditioning and pG-DLIs were administered 30–40 days post transplantation if no signs of GVHD were present. The percentage of donor cell chimera was analyzed by short tandem repeat-polymerase chain reaction (STR-PCR) just before and after pG-DLI. The incidence of leukemia relapse and GVHD were observed. **Results** 12 high-risk leukemia patients with a median age of 38 (range: 29–52) years received pG-DLI at a median interval of 35 (32–40) days. The median numbers of infused mononuclear cells (MNCs), CD34<sup>+</sup>, and CD3<sup>+</sup> cells/kg recipient body weight was  $2.3\times 10^8/\text{kg}$ ,  $1.7\times 10^6/\text{kg}$ , and  $0.6\times 10^8/\text{kg}$ , respectively. 10 of 12 patients had full donor chimera before pG-DLIs and conversion from mixed to full donor chimera occurred in the other 2 patients shortly after pG-DLI. Grade II acute GVHD (aGVHD) was observed in only 2 patients and chronic GVHD (cGVHD) developed in 6 patients, including involvement

of skin ( $n=3$ ), skin and intestine ( $n=2$ ), liver ( $n=1$ ). 1 patient died of cGVHD. With a median follow-up of 40 (24–64) months, 7 patients are alive in remission, with 3-year actuarial overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) rates of the same 58.3%. **Conclusion** Our findings indicate that pG-DLI after NST does not increase the risk of aGVHD, but could enhance the capacity graft-vs-leukemia and prevent relapse in high-risk leukemia patients.

**【Key words】** Non-myeloablative stem cell transplantation; Donor lymphocytes infusion; Leukemia

非清髓造血干细胞移植(NST)是20世纪90年代后期发展起来的一种移植方法。近年来NST得到快速发展,据欧洲骨髓移植中心统计,2005年NST已占异基因造血干细胞移植(HSCT)的34%<sup>[1]</sup>;国内也有多中心大样本的临床报告<sup>[2]</sup>。由于较轻的预处理毒性,NST治疗相关死亡率明显降低,但复发与移植物抗宿主病(GVHD)仍是NST面临的两大问题。供者淋巴细胞输注(DLI)是治疗HSCT后复发的重要手段,国内外对具有高复发风险患者进行预防性DLI,取得了较好疗效<sup>[3-4]</sup>。传统DLI通常会诱发GVHD,导致全血细胞减少。Hasskarl等<sup>[5]</sup>采用动员后DLI(G-DLI),引发GVHD及全血细胞减少的风险下降,而在抗肿瘤效应上与传统DLI相似。我们对12例高危白血病患者在NST治疗基础上进行了预防性G-DLI(prophylactic G-DLI, pG-DLI),观察其对疾病复发和GVHD的影响,现报告如下。

### 病例和方法

1. 病例:2005年11月至2010年3月我院12例高危白血病患者在HLA全相合同胞NST基础上进行了pG-DLI,诊断和分型参照国内标准<sup>[6]</sup>。男5例,女7例,中位年龄38(29~52)岁。其中Ph<sup>+</sup>急性淋巴细胞白血病(ALL)1例,ALL未缓解1例,伴中枢神经系统白血病的急性髓系白血病(AML)3例,AML未缓解1例,急性双表型白血病1例,骨髓增生异常综合征(MDS)继发的AML2例,慢性髓性白血病(CML)加速期1例、急变期2例。

2. 非清髓预处理<sup>[7]</sup>:以FAC方案[氟达拉滨(Flu)+抗胸腺细胞球蛋白(ATG)+环磷酰胺(CTX)]为基础,根据患者不同疾病状态,适当调整。急性白血病患者加用阿糖胞苷(Ara-C),CML患者加用白消安(Bu),合并中枢神经系统白血病者加用卡莫司汀(BCNU)。预处理方案的剂量和应用:Flu 30 mg/m<sup>2</sup>,共5 d;ATG 1.5~2.0 mg/kg,共4 d;CTX 35~45 mg/kg,共2 d;Ara-C的总量200~300 mg/kg,分3 d应用;Bu的总量8~10 mg/kg,分3 d应用;BCNU

250 mg/m<sup>2</sup>,共1 d。

3. 供者及干细胞动员:12例均为HLA配型全相合亲缘供者,使用rhG-CSF(日本Kirin公司产品)5~10 μg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,连续皮下注射5 d,第5、6天用CS-3000 Plus血细胞分离机(美国Baxter公司产品)分离外周血干细胞。每次循环血量10 L,终体积为0.1 L。每例受者在满足输注的单个核细胞(MNC)数>4×10<sup>8</sup>/kg,CD34<sup>+</sup>细胞数>2×10<sup>6</sup>/kg要求后,留取部分细胞冻存备用。

4. GVHD预防:环孢素(CsA)1.5 mg/kg,静脉滴注,-5 d开始,正常进食后改为口服3 mg/kg,维持血药浓度在200~400 μg/L,12周后逐渐减量至停用。霉酚酸酯(MMF)30 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,-5 d开始,4周后减量至停用。

5. pG-DLI:12例患者在+30 d内无急性GVHD表现,遂给予pG-DLI,所用细胞即之前冻存备用的供者外周血干细胞采集物,输注后不额外增加GVHD预防措施。

6. 供者嵌合比例检测:于+28 d以及pG-DLI后不同时间点抽取受者骨髓标本进行短串联重复序列多态性(STR-PCR)技术分析,判断供者细胞嵌合比例。

### 结 果

1. 造血恢复及供者植入状态分析:12例患者均获造血重建,白细胞和血小板植活的中位时间分别为11(9~14)d和14(10~19)d。输注的供者MNC数为(4.8~10.1)×10<sup>8</sup>/kg,CD34<sup>+</sup>细胞数为(3.6~9.0)×10<sup>6</sup>/kg。在+28 d,12例患者中10例为完全供者嵌合,2例为供受者混合嵌合,供者细胞比例分别为75%和56%。2例供受者混合嵌合的患者,均在+35 d进行了pG-DLI;在+45 d复查,1例即转变为完全供者嵌合,另1例CML急变期患者的供者细胞比例上升至69%,随后在+60 d时转变为完全供者嵌合。

2. pG-DLI的时间、剂量:12例患者中,11例在+32~+40 d内按预期给予pG-DLI;1例患者因出现发热、出血性膀胱炎,在+59 d给予pG-DLI治疗。输

注的MNC数为 $(1.8\sim 4.5)\times 10^8/\text{kg}$ ,  $\text{CD}34^+$ 细胞数为 $(0.9\sim 3.9)\times 10^6/\text{kg}$ ,  $\text{CD}3^+$ 细胞数为 $(0.4\sim 1.1)\times 10^8/\text{kg}$ 。具体情况见表1。

3. pG-DLI相关的GVHD发生情况: 12例患者在pG-DLI前均无急性GVHD表现。在pG-DLI后, 有2例患者出现急性GVHD, 其中1例于pG-DLI后13 d发生Ⅱ度皮肤、肝脏GVHD, 1例于pG-DLI后23 d发生Ⅱ度肠道GVHD, 均在给予糖皮质激素治疗后得到控制。有6例患者发生慢性GVHD, 其中累及皮肤3例, 累及皮肤、肠道2例, 累及肝脏1例, 在给予治疗后病情好转; 未见明确的肺部受累。但是累及肝脏的1例于移植后6个月病情再次加重死亡。

pG-DLI后12例患者无一例发生与之相关的血细胞减少现象。

4. 疾病复发及生存: 12例患者中, 有4例分别于NST后3、6、6、7个月出现疾病复发, 并导致死亡; 有1例虽然病情完全缓解, 但是于NST后6个月死于慢性GVHD(肝脏)。其余7例患者中位随访40(24~64)个月, 均长期无病生存, 统计学分析3年总生存率和无病生存率均为58.3%。

### 讨 论

1990年Kolb等<sup>[8]</sup>应用DLI治疗移植后复发的CML患者获得成功, 此后DLI逐渐成为治疗移植后复发的重要手段, 也是移植抗白血病(GVL)效应存在的最为直接的证据。Schmid等<sup>[9]</sup>对75例高危AML或MDS患者在强化疗后进行减低预处理强度

的HSCT, 中位随访35.1个月, 2年无病生存率达40%; 其中有12例患者在移植后160(120~294) d接受了预防性DLI, 而这12例患者的3年无病生存率可达92%。Abbi等<sup>[10]</sup>将G-CSF动员后供者淋巴细胞输注(G-DLI)与传统DLI进行比较后发现, 两者疗效接近, G-DLI甚至可以取代传统DLI。本研究我们将pG-DLI用于接受了NST治疗的高危白血病患者, 58.3%的患者取得了长期DFS, 同时避免了严重并发症的发生, 结果同样令人鼓舞。

DLI最常见的并发症为GVHD, 发生率可高达50%~60%<sup>[11-12]</sup>。在本研究中, pG-DLI后仅2例发生Ⅱ度急性GVHD, 常规治疗后即获缓解。DLI后GVHD的发生与输注的 $\text{CD}3^+$ 细胞数量有关。输注的 $\text{CD}3^+$ 细胞数 $>1\times 10^8/\text{kg}$ 时, 超过50%~60%的患者会发生GVHD; 输注的 $\text{CD}3^+$ 细胞 $<1\times 10^7/\text{kg}$ 时, GVHD的发生率可降至10%以下。在本研究中, 12例患者所输注的 $\text{CD}3^+$ 细胞中位数为 $6\times 10^7/\text{kg}$ 。既往研究中, 为避免影响GVL效应, 预防性DLI多在患者停止使用免疫抑制剂1个月后进行, DLI后多不使用或仅短期、小剂量使用免疫抑制剂。虽然早期停用免疫抑制剂在理论上有利于GVL效应发生, 但GVHD发生率增加, 总体生存未获改善。de Lima等<sup>[13]</sup>对12例预期生存不超过6个月的恶性血液病患者在NST后30天给予预防性DLI( $\text{CD}3^+$ 细胞 $1\times 10^7/\text{kg}$ )治疗, 为最大程度地发挥GVL效应, DLI后快速减停CsA, 中位随访450 d, 急性GVHD的发生率高达70%, 治疗相关死亡率高达75%, 仅3例患者存活。与传统DLI比较, G-DLI除 $\text{CD}34^+$ 细胞的

表1 预防性G-CSF动员后供者淋巴细胞输注的时间、剂量及患者临床转归

| 例号 | 诊断                  | 输注时间<br>(d) | MNC<br>( $\times 10^6/\text{kg}$ ) | $\text{CD}34^+$ 细胞<br>( $\times 10^6/\text{kg}$ ) | $\text{CD}3^+$ 细胞<br>( $\times 10^8/\text{kg}$ ) | 输注相关  |       | 转归        |
|----|---------------------|-------------|------------------------------------|---|--|-------|-------|-----------|
|    |                     |             |                                    |   |  | aGVHD | cGVHD |           |
| 1  | Ph <sup>+</sup> ALL | 35          | 3.1                                | 1.4   | 0.6  | 无     | 无     | 7个月复发死亡   |
| 2  | ALL-NR              | 38          | 3.8                                | 2.6   | 0.7  | 无     | 无     | 6个月复发死亡   |
| 3  | AML-CNSL            | 35          | 2.5                                | 1.2   | 0.6  | 无     | 无     | DFS 24个月  |
| 4  | AML-CNSL            | 35          | 2.1                                | 1.1   | 1.1  | 无     | 无     | DFS 42个月  |
| 5  | AML-CNSL            | 40          | 4.5                                | 2.5   | 0.5  | 无     | 无     | 6个月复发死亡   |
| 6  | AML-NR              | 32          | 3.2                                | 1.0   | 0.7  | 无     | 皮肤、肠道 | DFS 40个月  |
| 7  | Hybrid AL           | 37          | 2.3                                | 1.9   | 0.5  | 无     | 皮肤、肠道 | DFS 33个月  |
| 8  | MDS/AML             | 35          | 1.8                                | 0.9   | 0.4  | Ⅱ度    | 无     | 3个月复发死亡   |
| 9  | MDS/AML             | 37          | 2.3                                | 1.7   | 0.5  | 无     | 皮肤    | DFS 60个月  |
| 10 | CML-AP              | 59          | 2.0                                | 3.9   | 0.4  | 无     | 皮肤    | DFS 64个月  |
| 11 | CML-BP              | 35          | 3.3                                | 2.6   | 0.9  | 无     | 皮肤    | DFS 36个月  |
| 12 | CML-BP              | 38          | 2.5                                | 1.1   | 0.6  | Ⅱ度    | 皮肤、肝脏 | 6个月GVHD死亡 |

注: Ph<sup>+</sup>ALL: Ph<sup>+</sup>急性淋巴细胞白血病; NR: 未缓解; AML: 急性髓系白血病; CNSL: 中枢神经系统白血病; MDS: 骨髓增生异常综合征; AP: 加速期; BP: 急变期; MNC: 单个核细胞; aGVHD: 急性移植物抗宿主病; cGVHD: 慢性移植物抗宿主病; DFS: 无病生存

数量明显增加外, G-CSF 动员还可以促进 T 细胞向 TH2 型细胞分化, 增加调节性 T 细胞数量, 扩增不成熟的抗原呈递细胞, 上述变化均有利于降低急性 GVHD 的发生。Huang 等<sup>[14]</sup>以 G-DLI 替代传统 DLI, 在 G-DLI 后应用 2~4 周 CsA, 研究发现此策略可明显降低急性 GVHD 发生, 且不影响 GVL 效应。在本研究中, 12 例患者接受 pG-DLI 的中位时间为 NST 术后 35 d, 在 pG-DLI 前不减停免疫抑制剂, 在 pG-DLI 后 1~2 个月逐渐减停 CsA, 同样获得了良好疗效。

DLI 后超过三分之一的患者会发生慢性 GVHD<sup>[15]</sup>。Sohn 等<sup>[16]</sup>对 17 例高危恶性血液病患者在异基因外周血干细胞移植后给予 pG-DLI, 长期无病生存的 4 例患者均发生了慢性 GVHD。在本研究中, 7 例长期生存的患者中有 6 例出现慢性 GVHD。尽管慢性 GVHD 的发生对防止疾病复发, 提高患者无病生存起到至关重要的作用, 但治疗相关死亡以及对患者生存质量的影响仍是 pG-DLI 不可忽视的问题。在本研究中, 有 1 例患者因慢性 GVHD 控制不佳而死亡。

DLI 作为 NST 的重要组成部分在预防以及治疗疾病复发中起到非常重要的作用。本研究结果显示, 对高危患者在 NST 术后给予 pG-DLI, 能够有效控制疾病复发, 同时并不增加急性 GVHD 风险。但由于病例数较少, 如何进一步优化 pG-DLI 的时间、剂量、频次以使其更有利于 GVL 效应的发挥需要更加深入的研究。

#### 参考文献

- [1] Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, et al. Results of the EBMT activity survey 2005 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on increasing use of unrelated donors. *Bone Marrow Transplant*, 2007, 39: 71-87.
- [2] 艾辉胜, 黄晓军, 乔振华, 等. 非清髓异基因造血干细胞移植治疗血液病多中心临床报告. *中华血液学杂志*, 2009, 30: 505-508.
- [3] Lutz C, Massenkeil G, Nagy M, et al. A pilot study of prophylactic donor lymphocyte infusions to prevent relapse in adult acute lymphoblastic leukemias after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2008, 41: 805-812.
- [4] 刘代红, 黄晓军, 陈欢, 等. 异基因造血干细胞移植后供者外周血造血干细胞输注预防高危白血病复发. *中华血液学杂志*, 2006, 27: 6-9.
- [5] Hasskarl J, Zerweck A, Wäsch R, et al. Induction of graft versus malignancy effect after unrelated allogeneic PBSCT using donor lymphocyte infusions derived from frozen aliquots of the original graft. *Bone Marrow Transplant*, 2012, 47: 277-282.
- [6] 张之南, 沈悌. *血液病诊断及疗效标准*. 3 版. 北京: 科学出版社, 2007: 103-121.
- [7] 艾辉胜, 余长林, 王丹红, 等. 非清髓异基因外周血造血干细胞移植治疗血液病的临床观察. *中华血液学杂志*, 2003, 24: 86-90.
- [8] Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood*, 1990, 76: 2462-2465.
- [9] Schmid C, Schleuning M, Ledderose G, et al. Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*, 2005, 23: 5675-5687.
- [10] Abbi KK, Zhu J, Ehmann WC, et al. G-CSF mobilized vs conventional donor lymphocytes for therapy of relapse or incomplete engraftment after allogeneic hematopoietic transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2013, 48: 357-362.
- [11] Marks DI, Lush R, Cavenagh J, et al. The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 2002, 100: 3108-3114.
- [12] Deol A, Lum LG. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited. *Cancer Treat Rev*, 2010, 36: 528-538.
- [13] de Lima M, Bonamino M, Vasconcelos Z, et al. Prophylactic donor lymphocyte infusions after moderately ablative chemotherapy and stem cell transplantation for hematological malignancies: high remission rate among poor prognosis patients at the expense of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 27: 73-78.
- [14] Huang XJ, Wang Y, Liu DH, et al. Administration of short-term immunosuppressive agents after DLI reduces the incidence of DLI-associated acute GVHD without influencing the GVL effect. *Bone Marrow Transplant*, 2009, 44: 309-316.
- [15] Raiola AM, Van Lint MT, Valbonesi M, et al. Factors predicting response and graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusions: a study on 593 infusions. *Bone Marrow Transplant*, 2003, 31: 687-693.
- [16] Sohn SK, Jung JT, Kim DH, et al. Prophylactic growth factor-primed donor lymphocyte infusion using cells reserved at the time of transplantation after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with high-risk hematologic malignancies. *Cancer*, 2002, 94: 18-24.

(收稿日期: 2013-05-29)

(本文编辑: 董文革)