

纯化供者CD34⁺细胞输注治疗单倍型造血干细胞移植后移植物功能不良12例临床分析

费新红 贺俊宝 程昊钰 殷宇明 张维婕 张书芹 王筱璨 王静波

【摘要】 目的 观察输注纯化供者CD34⁺细胞治疗单倍型造血干细胞移植后移植物功能不良的疗效和安全性。**方法** 对2014年1月至2018年3月期间接受供者纯化CD34⁺细胞治疗的12例单倍型造血干细胞移植后移植物功能不良患者进行回顾性分析。**结果** 12例患者中男9例、女3例,中位年龄26(14~54)岁;急性淋巴细胞白血病4例,急性髓系白血病5例,慢性髓性白血病2例,慢性粒-单核细胞白血病1例。分选产物CD34⁺细胞纯度为92.0%(44.0%~97.0%),回收率为55.0%(45.0%~96.7%),回输CD34⁺细胞的中位数为 $1.9(0.9\sim 4.4)\times 10^6/\text{kg}$,CD3⁺细胞中位数为 $0.6(0.3\sim 2.0)\times 10^4/\text{kg}$ 。中性粒细胞恢复中位时间为18(14~39)d,血小板恢复中位时间为29(16~153)d,红细胞恢复中位时间为60(9~124)d。12例患者输注过程中未发生严重不良反应,10例获得完全缓解,1例患者获得部分缓解,1例患者无效,未发生重症感染和重度GVHD。**结论** 回输供者纯化CD34⁺细胞是单倍型造血干细胞移植后植入功能不良的一种安全、有效治疗方法。

【关键词】 CD34⁺细胞; 移植物功能不良; 异基因造血干细胞移植; 移植物抗宿主病

Effects of CD34⁺ selected stem cells for the treatment of poor graft function after allogeneic stem cell transplantation Fei Xinhong, He Junbao, Cheng Haoyu, Yin Yuming, Zhang Weijie, Zhang Shuqin, Wang Xiaocan, Wang Jingbo. Aerospace Center Hospital of Peking University, Beijing 100049, China
Corresponding author: Wang Jingbo, Email: dpwangjingbo@sina.com

【Abstract】 Objective To evaluate the efficacy and safety of purified CD34⁺ stem cell boost in the treatment of poor graft function (PGF) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). **Methods** 12 patients with poor graft function, reported in our hospital during January 2014 to March 2018, were retrospectively analyzed; The donors of 12 patients were HLA mismatched family members, and all treated with donor purified CD34⁺ stem cell after G-CSF mobilization, calculating and statistical analyzing the purity of separation and the recovery rate of CD34⁺ stem cells. The related complications and the recovery of blood cells after infusion were observed. **Results** The purity of CD34⁺ cells in the separation products was 92.0%(44.0%–97.0%), and the recovery rate was 55.0%(45.0%–96.7%). The median number of CD34⁺ cells was $1.9(0.9\sim 4.4)\times 10^6/\text{kg}$ with CD3⁺ cells as $0.6(0.3\sim 2.0)\times 10^4/\text{kg}$. The median durations of white blood cells, platelet and red blood cells recoveries were 18(14–39), 29(16–153) and 60(9–124) days, respectively. All 12 patients didn't experience serious adverse reactions in the process of infusion, 10 patients achieved hematopoietic recovery, 1 case partial remission, 1 case no recovery, without occurrence of aggravated infection, graft versus host disease and other complications. **Conclusion** The infusion of donor purified CD34⁺ stem cell was a safe and effective method for PGF after allogeneic HSCT.

【Key words】 CD34⁺-selected stem cell; Poor graft function; Allogeneic stem cell transplants; Graft-versus-host disease

移植物功能不良是异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)的严重并发症之一,发生率为5%~

27%^[1-2]。以往研究显示,移植物功能不良的高危因素包括供者类型、HLA相合程度、ABO血型不合、输注细胞数量、预处理方案的强度、移植物抗宿主病(GVHD)、病毒感染、骨髓抑制药物的应用等^[3-4]。移植物功能不良的治疗方法包括二次移植、供者骨髓或外周干细胞输注、生长因子(红细胞生成素和

血小板生成素)以及纯化 CD34⁺细胞输注^[5]。采用二次移植和直接输注未分选的造血干细胞会导致较高的 GVHD 发生率和治疗相关死亡率^[6-7],移植后长期应用细胞因子的疗效和安全性尚待明确^[8-9]。CD34⁺细胞是理想的造血干/祖细胞移植物,可以重建髓系和淋系造血干细胞以及大量造血祖细胞,而且纯化的 CD34⁺细胞轻松实现 T 细胞的体外去除,有效减少严重 GVHD 的发生。近年来,我们采用纯化供者 CD34⁺造血干/祖细胞治疗 12 例移植物功能不良患者,报告如下。

病例与方法

1. 临床资料:本研究对我院 2014 年 1 月至 2018 年 3 月期间 12 例接受供者纯化 CD34⁺细胞治疗的单倍型造血干细胞移植(haplo-HSCT)后移植物功能不良患者进行回顾性分析。纳入标准:移植物功能不良均为移植后获得造血重建后发生,疾病复发状态或嵌合率 < 90% 以及合并严重感染的患者除外。12 例患者中男 9 例、女 3 例,中位年龄 26(14 ~ 54)岁;原发病:急性淋巴细胞白血病 4 例,急性髓系白血病 5 例,慢性髓性白血病 2 例,慢性粒-单核细胞白血病 1 例。移植前疾病状态:完全缓解(CR)2 例,未缓解(NR)10 例;输注纯化 CD34⁺细胞前患者中位 WBC 为 1.7(0.9 ~ 2.9) × 10⁹/L,中位 PLT 为 16(6 ~ 25) × 10⁹/L,中位 HGB 为 73(60 ~ 80)g/L。

移植物功能不良的定义参照文献^[3]:移植后至少两系或三系细胞减少持续 2 周伴骨髓增生低下

(ANC < 0.5 × 10⁹/L, PLT < 30 × 10⁹/L 或血小板或红细胞输注依赖),嵌合率完全供者型,排除复发、严重 GVHD、感染以及药物相关的骨髓抑制。12 例患者的临床资料见表 1。

本研究经航天中心医院生物医学伦理委员会批准(20160420-XYZZ-01),全部患者及其供者均知情同意。

2. 疗效评价标准:原发性植入不良:发生于移植后 28 d 内;继发性植入不良:发生于移植后血细胞恢复后。中性粒细胞恢复:ANC > 0.5 × 10⁹/L 持续 7 d;血小板恢复:PLT > 50 × 10⁹/L 持续 7 d;红细胞恢复:HGB > 90 g/L 且脱离红细胞输注。完全缓解:三系均获得改善;部分缓解:血小板和(或)中性粒细胞恢复但未脱离红细胞输注;无效:输注 CD34⁺细胞后三系均未获得改善。CD34⁺细胞回收率(%) = 分选后 CD34⁺细胞数/动员后采集的 CD34⁺细胞数 × 100%。

3. 供者造血干细胞的采集及分选:使用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)5 ~ 10 μg · kg⁻¹ · d⁻¹进行供者外周血造血干细胞动员,第 5 天采集供者外周血干细胞。采集的有核细胞总数为(4 ~ 6) × 10¹⁰。应用 CliniMACS Plus 系统(德国 Miltenyi Biotec 公司产品)对采集的造血干细胞进行 CD34⁺细胞分选,流式细胞术测定 CD34⁺细胞和 CD3⁺细胞数。

4. CD34⁺细胞输注:纯化的 CD34⁺细胞输注前储存于 4 °C 冰箱,在分选后 24 h 内输注,输注前计算纯度及 CD3⁺细胞数。输注前应用环孢素 A、他克莫

表 1 12 例接受供者纯化 CD34⁺细胞治疗单倍型造血干细胞移植后移植物功能不良患者的一般资料

例号	性别	年龄(岁)	诊断	移植前疾病状态	高危因素	嵌合率(%)	累及细胞系
1	男	54	AML-M ₃	NR	病毒感染, GVHD	100	P+R
2	男	14	T-ALL	CR	输注 CD34 ⁺ 细胞数低	100	N+P+R
3	女	15	AML	NR	CMV, GVHD	100	N+P+R
4	女	33	AML-M ₂	NR	CMV, GVHD	100	N+P+R
5	男	18	B-ALL	NR	主要 ABO 血型不相容, GVHD	100	N+P+R
6	男	44	CMML	PR	输注 CD34 ⁺ 细胞计数低	100	P+R
7	男	17	T-ALL	NR	CMV, GVHD	100	N+P+R
8	男	43	CML 急变期	NR	CMV, EBV, 输注 CD34 ⁺ 细胞数低	100	N+P+R
9	男	21	CML 加速期	NR	CMV, EBV, 输注 CD34 ⁺ 细胞数低	100	N+P+R
10	女	14	AML-M ₄	CR	CMV, 主要 ABO 血型不相容	100	N+P+R
11	男	28	AML-M ₃	NR	CMV, GVHD	100	N+P+R
12	男	26	T-ALL	NR	GVHD	100	N+P+R

注:AML:急性髓系白血病;ALL:急性淋巴细胞白血病;T-ALL:急性 T 淋巴细胞白血病;CML:慢性髓性白血病;CMML:慢性粒-单核细胞白血病。CR:完全缓解;PR:部分缓解;NR:未缓解。CMV:巨细胞病毒;EBV:EB 病毒;GVHD:移植物抗宿主病。N:中性粒细胞;P:血小板;R:红细胞

司等免疫抑制剂,不需要进行其他预处理。输注后可继续给予生长因子及输血支持治疗。

5. GVHD的评估:急性GVHD和慢性GVHD的诊断和分级参照文献[10-11]。急性GVHD的随访时间为输注后100 d,慢性GVHD的随访时间为输注后1年。

6. 随访:所有患者通过门诊或电话进行随访,随访截止日期为2018年1月。总生存(OS)时间:输注纯化供者CD34⁺细胞到随访截止或死亡的时间;无复发生存(RFS)时间:输注CD34⁺细胞到疾病复发或随访截止的时间。

7. 统计学处理:采用SPSS 20.0进行统计学处理。计量资料用均数±标准差或中位数表示。GVHD的发生率、RFS率和OS率采用Kaplan-Meier曲线分析并描述。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 纯化CD34⁺细胞的回收率:G-CSF动员后采集的有核细胞中位数为 $9.3(7.0 \sim 13.5) \times 10^8/\text{kg}$,CD34⁺细胞中位数为 $3.4(1.3 \sim 6.0) \times 10^6/\text{kg}$ 。CliniMACS系统分选后CD34⁺细胞中位数为 $1.9(0.9 \sim 4.4) \times 10^6/\text{kg}$,CD3⁺细胞中位数为 $0.6(0.3 \sim 2.0) \times 10^4/\text{kg}$,CD34⁺细胞纯度为92.0%(44.0%~97.0%),回收率为55.0%(45.0%~96.7%),详见表2。

2. 疗效及不良反应:12例患者中10例完全缓解,1例患者获得部分缓解,1例患者无效。全部12例患者回输纯化供者CD34⁺细胞后白细胞恢复的中位时间为18(14~39)d,血小板恢复的中位时间为29(16~153)d,红细胞恢复的中位时间为60(9~

124)d,回输后1、2、3个月检测嵌合率均为100%供者型。12例患者输注过程中未发生严重不良反应。

3. GVHD发生情况及生存:12例患者回输纯化供者CD34⁺细胞后,1例患者发生Ⅱ度急性GVHD,给予糖皮质激素、巴利昔单抗治疗有效;3例患者发生慢性GVHD,1例激素治疗有效,其他2例患者给予联合抗GVHD治疗效果不佳。至随访截止,12例患者中8例存活,4例死亡,死亡原因:复发1例,感染2例,慢性GVHD 1例,死亡时间分别为回输后的3(例1)、6(例3)、4(例5)和2个月(例8)。1年OS率为 $(62.9 \pm 14.9)\%$ 。详见表3。

讨 论

allo-HSCT后合并移植物功能不良可导致感染和出血性并发症发生率增高,严重影响患者的生存。本研究12例患者均为继发性移植物功能不良,嵌合率为100%供者型,进行纯化供者CD34⁺细胞回输前患者均未进行预处理,给予常规免疫抑制剂预防,10例患者获得完全缓解,1例患者部分缓解,1例患者无效。我们认为患者获得缓解主要与所有患者均是100%供者嵌合有关,而且回输的CD3⁺细胞数量极低,均在 $2 \times 10^4/\text{kg}$ 以下。因此患者回输纯化CD34⁺细胞均能耐受,轻松实现T细胞的体外去除,无治疗相关死亡,而且未发生Ⅲ/Ⅳ度急性GVHD。

国际上报道纯化CD34⁺细胞治疗移植物功能不良的疗效的文献比较多。近期Haen等^[12]报道20例患者中,纯化CD34⁺细胞输注治疗移植物功能不良可达到80%的有效率,急性、慢性GVHD的发生率分别为18%、14%。和文献报道相似,本组病例的有

表2 12例单倍型造血干细胞移植后移植物功能不良患者纯化供者CD34⁺细胞输注情况

例号	分选前CD34 ⁺ 细胞 ($\times 10^6/\text{kg}$)	分选后CD34 ⁺ 细胞 ($\times 10^6/\text{kg}$)	CD34 ⁺ 细胞纯度 (%)	CD34 ⁺ 细胞回收率 (%)	分选后CD3 ⁺ 细胞 ($\times 10^4/\text{kg}$)
1	3.2	2.9	90.0	90.6	1.0
2	3.4	2.7	85.0	80.0	0.4
3	2.4	1.4	93.8	58.3	1.2
4	3.9	2.1	97.0	54.1	0.2
5	4.5	4.4	95.0	96.7	0.6
6	2.8	1.3	93.0	45.8	1.0
7	3.3	1.5	95.0	45.0	1.1
8	3.4	1.7	96.0	50.0	0.3
9	1.3	0.9	92.0	76.0	0.5
10	5.8	3.2	89.0	55.0	0.3
11	6.0	3.3	77.0	55.0	0.4
12	1.5	1.1	44.0	73.0	2.0

表 3 纯化供者 CD34⁺细胞输注治疗 12 例单倍型造血干细胞移植后移植物功能不良患者的疗效、GVHD 发生情况及转归

例号	疗效	中性粒细胞恢复时间 (d)	血小板恢复时间 (d)	红细胞恢复时间 (d)	急性 GVHD	慢性 GVHD	OS 时间 (月)
1	CR	/	22	60	无	无	3
2	CR	9	16	11	无	无	15
3	CR	39	26	47	无	无	6
4	CR	18	24	90	无	无	11
5	CR	23	54	16	无	广泛型	4
6	CR	/	68	60	无	无	22
7	CR	27	30	124	无	局限型	21
8	NR	/	/	/	无	局限型	2
9	CR	10	73	117	无	无	33
10	CR	14	14	88	无	无	8
11	PR	13	153	-	Ⅱ度	无	4
12	CR	20	7	9	无	无	2

注: CR:完全缓解;PR:部分缓解;NR:治疗无效;/:不适用;OS:总生存

效率为 91.7%(11/12),急性、慢性 GVHD 的发生率分别为 8.3%(1/12)、25.0%(3/12)。为避免冻存的造血干细胞数量不足,本组病例均采用 G-CSF 动员的外周血造血干细胞,采集的有核细胞中位数为 $9.3(7.0 \sim 13.5) \times 10^8/\text{kg}$, CD34⁺细胞中位数为 $3.4(1.3 \sim 6.0) \times 10^6/\text{kg}$ 。本组 12 例患者中性粒细胞细胞恢复的中位时间为 18(14~39)d,血小板恢复中位时间为 29(16~153)d,红细胞恢复中位时间为 60(9~124)d,与文献[13]结果相似。回输纯化 CD34⁺细胞的中位数为 $1.9(0.9 \sim 4.4) \times 10^6/\text{kg}$,纯度为 92.0%(44.0%~97.0%),其中 1 例患者(例 12)分选前 CD34⁺细胞计数只有 $1.5 \times 10^6/\text{kg}$,分选后的纯度仅为 44%,担心纯度不够影响患者的疗效,我们对分选产物的细胞成分进行分析,计算 CD3⁺细胞的计数为 $2 \times 10^4/\text{kg}$,考虑该患者移植前未缓解,仍按计划回输,结果在回输后第 20 天白细胞和血小板计数明显升高,而且无 GVHD 发生。

Ghobadi 等^[5]报道在造血干细胞动员时加入普乐沙福(Plerixafor)可明显提高 CD34⁺细胞的数量,降低移植物功能不良的发生率。但亦有研究显示纯化 CD34⁺细胞数量与治疗移植物功能不良的疗效无直接关系^[13-14],需要在以后的研究中进一步证实。

Liu 等^[15]报道间充质干细胞输注也可治疗移植后原发和继发移植物功能不良,而且与输注纯化 CD34⁺细胞相比,不需要采集供者的造血干细胞。该研究报道 20 例移植物功能不良患者,采用第三方间充质干细胞回输,17 例患者获得造血恢复,但 13 例患者发生感染,其中 7 例患者为 EB 病毒感染,有 3 例患

者发生 EB 病毒相关移植后淋巴细胞增殖性疾病。

本研究结果初步表明,供者纯化 CD34⁺细胞输注是治疗单倍型造血干细胞移植后移植物功能不良的一种有效办法。

参考文献

- [1] Kong Y, Chang YJ, Wang YZ, et al. Association of an impaired bone marrow microenvironment with secondary poor graft function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2013, 19(10):1465-1473. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.07.014.
- [2] Olsson R, Remberger M, Schaffer M, et al. Graft failure in the modern era of allogeneic hematopoietic SCT [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2013, 48(4):537-543. DOI: 10.1038/bmt.2012.239.
- [3] Dominiotto A, Raiola AM, van Lint MT, et al. Factors influencing haematological recovery after allogeneic haemopoietic stem cell transplants: graft-versus-host disease, donor type, cytomegalovirus infections and cell dose [J]. *Br J Haematol*, 2001, 112(1):219-227. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2001.02468.x.
- [4] Remberger M, Watz E, Ringdén O, et al. Major ABO blood group mismatch increases the risk for graft failure after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007, 13(6): 675-682. DOI:10.1016/j.bbmt.2007.01.084.
- [5] Ghobadi A, Fiala MA, Ramsingh G, et al. Fresh or cryopreserved CD34⁺-selected mobilized peripheral blood stem and progenitor cells for the treatment of poor graft function after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J] *Biol Blood Marrow Transplant*, 2017, 23(7): 1072-1077. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.03.019.
- [6] Guardiola P, Kuentz M, Garban F, et al. Second early allogeneic stem cell transplantations for graft failure in acute leukaemia, chronic myeloid leukaemia and aplastic anaemia. *French*

Society of Bone Marrow Transplantation [J]. Br J Haematol, 2000, 111(1):292-302. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2000.02306.x.

[7] Jabbour E, Rondon G, Anderlini P, et al. Treatment of donor graft failure with nonmyeloablative conditioning of fludarabine, antithymocyte globulin and a second allogeneic hematopoietic transplantation [J]. Bone Marrow Transplant, 2007, 40(5):431-435. DOI:10.1038/sj.bmt.1705760.

[8] Gaya A, Urbano-Ispizua A, Fernández-Avilés F, et al. Anemia associated with impaired erythropoietin secretion after allogeneic stem cell transplantation: incidence, risk factors, and response to treatment [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2008, 14(8):880-887. DOI: 10.1016/j.bbmt.2008.05.008.

[9] Tanaka T, Inamoto Y, Yamashita T, et al. Eltrombopag for Treatment of Thrombocytopenia after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2016, 22(5):919-924. DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.01.018.

[10] Glucksberg H, Storb R, Fefer A, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors [J]. Transplantation, 1974, 18(4): 295-304.

[11] Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, et al. Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression [J]. Blood, 1981, 57(2):267-276.

[12] Haen SP, Schumm M, Faul C, et al. Poor graft function can be durably and safely improved by CD34+ selected stem cell boosts after allogeneic unrelated matched or mismatched hematopoietic cell transplantation [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(12):2241-2251. DOI: 10.1007/s00432-015-2027-x.

[13] Klyuchnikov E, El-Cheikh J, Sputtek A, et al. CD34(+)-selected stem cell boost without further conditioning for poor graft function after allogeneic stem cell transplantation in patients with hematological malignancies [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2014, 20(3):382-386. DOI: 10.1016/j.bbmt.2013.11.034.

[14] Stasia A, Ghiso A, Galaverna F, et al. CD34 selected cells for the treatment of poor graft function after allogeneic stem cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2014, 20(9): 1440-1443. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.05.01

[15] Liu X, Wu M, Peng Y, et al. Improvement in poor graft function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation upon administration of mesenchymal stem cells from third-party donors: a pilot prospective study [J]. Cell Transplant, 2014, 23(9):1087-1098. DOI: 10.3727/096368912X661319.

(收稿日期:2018-04-22)

(本文编辑:徐茂强)

·读者·作者·编者·

2018年本刊可直接用英文缩写的常用词汇

血红蛋白 HGB	辅助性T淋巴细胞 Th细胞	半乳甘露聚糖检测 GM试验
红细胞计数 RBC	调节性T淋巴细胞 Treg细胞	酶联免疫吸附实验 ELISA
白细胞计数 WBC	细胞毒性T淋巴细胞 CTL细胞	噻唑蓝实验 MTT实验
血小板计数 PLT	自然杀伤细胞 NK细胞	磷酸盐缓冲液 PBS
中性粒细胞绝对计数 ANC	白细胞介素 IL	胎牛血清 FBS
丙氨酸转氨酶 ALT	嵌合抗原受体T细胞 CAR-T细胞	乙二胺四乙酸 EDTA
天冬氨酸转氨酶 AST	肿瘤坏死因子 TNF	二甲基亚砷 DMSO
谷氨酰转氨酶 GGT	干细胞生长因子 SCF	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE
碱性磷酸酶 ALP	粒细胞集落刺激因子 G-CSF	美国国家综合癌症网络 NCCN
乳酸脱氢酶 LDH	粒-巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF	国际预后积分系统 IPSS
凝血酶原时间 PT	巨噬细胞集落刺激因子 M-CSF	国际预后指数 IPI
部分激活的凝血活酶时间 APTT	粒-巨噬细胞集落形成单位 CFU-GM	异基因造血干细胞移植 allo-HSCT
红细胞生成素 EPO	弥散性血管内凝血 DIC	自体造血干细胞移植 auto-HSCT
血小板生成素 TPO	实时荧光定量PCR RQ-PCR	移植植物抗宿主病 GVHD
乙型肝炎病毒 HBV	磁共振成像 MRI	人类白细胞抗原 HLA
丙型肝炎病毒 HCV	正电子发射断层扫描 PET	受试者工作特征曲线 ROC曲线
人类免疫缺陷病毒 HIV	荧光原位杂交 FISH	常见不良反应事件评价标准 CTCAE
核因子-κB NF-κB	(1,3)-β-D葡聚糖检测 G试验	

本刊编辑部