

猪源抗人淋巴细胞球蛋白治疗再生障碍性贫血的研究进展

张会勤 王化泉 邵宗鸿

Progress in the treatment of severe aplastic anemia with porcine anti-human lymphocyte globulin Zhang Huiqin, Wang Huaquan, Shao Zonghong

Corresponding author: Shao Zonghong, Department of Hematology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China. Email: shaozonghong@sina.com

再生障碍性贫血(AA)是一种获得性骨髓造血功能衰竭综合征,主要表现为骨髓造血功能低下、全血细胞减少和由此导致的贫血、出血、感染症状。近年来的研究证实,细胞毒性T淋巴细胞(CTL)及其分泌细胞因子功能亢进,导致造血干/祖细胞免疫损伤是AA发病的主要机制^[1-2]。根据疾病严重程度,AA可分为极重型AA(VSAA)、重型AA(SAA)、非重型AA(NSAA)。免疫抑制治疗(IST)和同胞HLA相合骨髓造血干细胞移植(HSCT)是目前治疗AA的两种主要方法^[3-4]。抗人胸腺/淋巴细胞球蛋白(ATG/ALG)和环孢素A(CsA)是IST的主要药物;同时,ATG/ALG也是SAA患者HSCT预处理方案中的重要药物。ATG/ALG分为马源、兔源和猪源。马源ATG在美国外的大部分国家无供应。

猪源ALG(p-ALG)是我国自主研发的药物,广泛应用于临床多年,治疗SAA取得了较理想疗效,费用相对低廉,使用安全。现我们现对p-ALG治疗AA的作用机制、疗效和安全性作一综述。

一、p-ALG的研发和制备

p-ALG由武汉生物制品研究所于20世纪70年代开始研制,1983年获得生产批号进行生产。开始主要采取硫酸铵盐析法,因为产量低、损失大、高污染、成本高、过程复杂和周期长等缺点,后改为低温乙醇法,具有工艺稳定、安全无毒、产量高、低污染等优势。制备的流程^[5-6]:人外周血T淋巴细胞或人胸腺细胞免疫健康猪,猪血采集、分离血浆,应用低温乙醇法制备免疫球蛋白,然后进行免疫球蛋白的精制,健康人红细胞吸收红细胞抗体,健康人胎盘渣吸收抗血小板抗体,健康人混合血浆吸收抗人血浆蛋白抗体,免疫球蛋白的病毒灭活,半成品的检定,分装及成品的检定。由于历史原因,2004年该药重新获中国食品和药品管理局批准。

余建等^[5]研究低温乙醇法工艺生产p-ALG,通过E玫瑰花环形成抑制试验及淋巴细胞毒试验效价测定ALG制品,

经生化检测,该制品纯度不低于蛋白质总量的90.0%。IgG单体与二聚体含量之和不低于90.0%,多聚体含量低于5.0%。E玫瑰花环形成抑制试验效价不低于1:4 000。淋巴细胞毒试验效价不低于1:1 000。人红细胞抗体效价低于1:64。血小板抗体效价低于1:4。人血浆蛋白抗体试验为阴性。

张颂等^[7]研究低温乙醇法工艺生产的p-ALG的有效期。p-ALG置(6±2)℃贮存,分别于0、3、6、9、12、18、24、30、36个月取样,对制品外观、pH、纯度、蛋白含量、分子大小分布以及效价进行检定。E玫瑰花环形成抑制试验及淋巴细胞毒试验计算获得有效期。结果根据E玫瑰花环形成抑制试验效价测定结果,理论推算在(6±2)℃条件下保存时,有效期可达41~100个月;根据淋巴细胞毒试验效价测定结果,理论推算在(6±2)℃条件下保存时,有效期可达47.9~64.3个月。结论初步确定p-ALG制品有效期为30个月。

夏南等^[8]应用高效液相色谱测定p-ALG中戊二醛残留量,2批供试品中戊二醛的含量分别为9.8和7.5 μg/ml,检测5、10、15 μg/ml戊二醛的回收率分别为102.3%、101.6%和99.2%。回收后样本中戊二醛无残留。

詹合琴等^[9]观察p-ALG对小鼠的急性毒性作用。分别采用腹腔注射限度试验和尾静脉注射最大受试药量试验法,连续观察14 d后处死、解剖小鼠,肉眼观察发现异常的组织或器官进行病理切片检查。所有试验动物存活,供试品的半数致死剂量(LD₅₀)>5 g/kg,但尾静脉注射最大给药量试验时发现给药2 d内动物的一般情况较差,处死并解剖后发现用药组有少数小鼠出现肝、肾的感染性侵害。p-ALG的LD₅₀>5 g/kg(相当于临床用量的250~333倍),提示该药物比较安全,但在过量静脉注射后短期内对小鼠仍有一定毒性。詹合琴等^[10]进一步应用p-ALG治疗AA小鼠的结果显示,p-ALG能明显改善AA小鼠骨髓造血功能,有核造血细胞数量明显增多。

二、p-ALG治疗AA的作用机制

AA发病机制包括造血干细胞内在增殖缺陷、造血微环境支持功能缺陷、免疫调节功能紊乱及遗传倾向等。越来越多的证据显示,CTL及其分泌细胞因子IFN-γ和TNF-α功能亢进和调节T细胞不足,导致造血干/祖细胞免疫损伤和骨髓微环境异常是AA发病机制的主要环节^[11-12]。目前国内、国外关于ATG/ALG作用机制的报道多为马源和兔源制剂,p-ALG的作用机制尚未阐明。

三、p-ALG联合CsA治疗SAA的研究现状

1. 剂量和用法:p-ALG为每支250 mg,一般使用剂量为20~30 mg·kg⁻¹·d⁻¹,稀释于250~500 ml 0.9%氯化钠注射液

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.10.024

基金项目:国家自然科学基金(81370607、81400085、81400088、81170472)

作者单位:300052 天津医科大学总医院血液科

通信作者:邵宗鸿,Email:shaozonghong@sina.com

静脉滴注,开始速度5~10滴/min,若10 min后无反应,再逐渐加速,全量在1~2 h内输注完,连用5 d。使用前需进行皮试,皮试阴性者方可使用。输注时,同时建立另一条静脉通路滴注肾上腺糖皮质激素(等效于泼尼松 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}\times 5\text{ d}$)预防过敏反应及血清病,后序贯改用口服泼尼松 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,逐渐减量,第30天停用,根据有无血清病调整剂量。

2. 疗效:p-ALG治疗SAA的总有效率(ORR)为65%~80%^[13-21]。北京协和医院韩冰教授团队首先报道了p-ALG治疗大样本SAA的疗效。回顾性分析了从1999年至2009年48例联合应用p-ALG($20\sim 30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,第1~5天)和CsA($3\sim 5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)治疗SAA患者。48例患者ORR为83.3%,54.2%基本治愈,29.2%缓解,6.3%无效。治疗起效的中位时间为90(23~380)d。基本治愈组患者脱离输血的中位时间为70(23~280)d,明显短于缓解组患者的180(95~380)d($P=0.002$)。治疗至脱离输血时间的中位数为99 d,上下四分位数分别为55及275 d。治疗后1.5年完全脱离输血的患者占96%,1.5年的总生存(OS)率为87.5%^[13-14]。随后进一步扩大样本,共纳入102例SAA患者,验证p-ALG联合CsA治疗SAA的远期疗效:中位随访59.6(0.2~176.8)个月,IST治疗3个月后,ORR为71.6%;6个月后,ORR为79.4%,5年OS率为81.8%(95%CI 75.5%~93.2%)^[15]。

Wei等^[16]报道了应用p-ALG联合CsA治疗69例SAA的结果,中位随访时间为24(4~44)个月,ORR为76.8%,完全血液学反应率达56.5%,部分血液学反应率为20.3%。中位起效时间90 d。3、6、12、18和24个月ORR分别为63.8%、73.9%、76.8%、75.4%和75.4%。2年OS率为88.4%。2年无病生存率为85.5%。

多个研究^[17-20]均回顾性分析比较了p-ALG和兔源ATG(r-ATG)治疗初治SAA的疗效,结果显示p-ALG和r-ATG组中性粒细胞绝对计数(ANC) $\geq 1\times 10^9/\text{L}$ 、脱离红细胞输注时间、脱离血小板输注时间无明显不同;且p-ALG联合应用CsA、G-CSF等后较单用药物治疗获得更好的疗效,r-ATG组也是这个规律;p-ALG治疗SAA和VSAA的ORR组间差异无统计学意义,与r-ATG组一致。

此外,有相关研究报道p-ALG和r-ATG作为移植前预处理药物之一的疗效比较。陈育红等^[22]分析比较p-ALG与r-ATG分别在非血缘关系骨髓移植与非血缘关系外周造血干细胞移植的预处理的疗效,OS率分别为47.22%和62.45%($P=0.114$)。对两组ATG的来源进行分层分析后,两组急性、慢性移植物抗宿主病(GVHD)的发生率和严重程度差异均无统计学意义。Ye等^[23]报道异基因HSCT联合中药治疗11例SAA患者,以p-ALG作为移植前预处理药物,5年的OS率为81.8%。I~II度、III~IV度急性GVHD发生率分别为18.2%、9.1%;慢性GVHD发生率为27.3%。

Tang等^[24]报道ALG/ATG联合中药治疗27例VSAA患者,16例使用p-ALG,5例使用马源ATG,6例使用r-ATG,27例患者1年的ORR为80%,36.0%基本治愈,20%缓解,24%

明显改善,20%无效。

3. 疗效预测因素:Han等^[13]报道了年龄、性别、病情危重程度、诊断至治疗间隔时间、治疗前合并感染对ORR没有影响。而Wei等^[16]报道高龄、VSAA和淋巴细胞数低是预后差的指标。Ma等^[19]对比后发现只有VSAA、诊断至治疗间隔时间 $\geq 30\text{ d}$ 、治疗6个月无反应为预后不良指标。VSAA组5年内死亡风险高于SAA组1.5倍($P=0.04$,95%CI 1.03~5.68),诊断至治疗间隔时间 $\geq 30\text{ d}$ 患者死亡风险比诊断至治疗间隔时间 $< 30\text{ d}$ 患者高2.6倍($P=0.01$,95%CI 1.50~10.10),治疗6个月无反应患者死亡风险比有反应患者高2.75倍($P=0.01$,95%CI 1.03~6.04),该结果与Liu等^[17]的报道相似。杨云等^[20]报道示病程 ≥ 3 个月及外周血ANC $< 0.2\times 10^9/\text{L}$ 患者的疗效明显低于病程 < 3 个月及外周血ANC $\geq 0.2\times 10^9/\text{L}$ 的患者。

4. 早期病死率:Han等^[13]报道了48例患者30 d内的早期病死率为10.4%;扩大样本纳入102例SAA患者报道早期病死率为16.7%,中位死亡时间2.3(0.2~36)个月^[15]。Wei等^[16]报道60 d内总体病死率为10.1%(7/69)。Ma等^[19]对比p-ALG组和r-ATG组早期病死率差异无统计学意义,而治疗5年内病死率分别为15.56%与25%($P=0.302$)。由此可知p-ALG治疗SAA早期病死率一般在10%~20%。杨云等^[20]报告的早期病死率为11.1%(4/36)。患者死亡原因包括感染、脑出血、缺血性心脏病和进展为其他血液病,最常见的死亡原因为感染。所以在治疗的过程中应当注意预防感染等并发症,以提高有效率、改善预后。

5. 克隆性演变:Han等^[13]未报道48例患者演变为克隆性疾病。而该研究扩大样本、中位随访时间延长至59.6(0.2~176.8)个月后发现7.8%出现克隆演变,其中阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)5例,骨髓增生异常综合征(MDS)2例^[15]。Wei等^[16]、杨云等^[20]各报道1例患者出现克隆进展,分别进展为MDS与MDS-难治性贫血伴有原始细胞过多(RAEB)。因此,在p-ALG治疗SAA的过程中,有发生克隆演变为PNH、MDS、MDS-RAEB等其他血液学疾病,应定期检测。

6. 复发:Han等^[13]、Wei等^[16]报道在随访期内均有1例患者出现复发;随后Chen等^[15]扩大样本后的复发率为9.9%。Liu等^[17]报道p-ALG组和r-ATG组复发率为4.65%和6.25%,而Ma等^[19]报道p-ALG组复发率为6.67%,r-ATG组无复发病例。总体来说,应用p-ALG治疗复发率低。

7. 不良反应:Han等^[13]报道p-ALG治疗48例SAA患者出现发热25例(52.1%),伴皮疹,应用激素及对症治疗后可恢复正常;血清病8例(16.7%);肝功能损伤29例(60.4%);出血1例(2.1%);未出现肌酐升高、过敏性休克及因p-ALG并发症死亡病例。随着样本量的扩大及随访时间的延长,常见不良反应仍是输注过敏反应和血清病反应[22.5%(23/102)],包括发热、皮疹、关节疼痛,2例出现自身免疫性溶血性贫血,其中1例经糖皮质激素治疗后好转,1例治疗后出现肺部感染死亡^[15]。中性粒细胞缺乏常导致感染,血小板

减少可以出现严重出血。而Wei等^[16]报道p-ALG治疗SAA患者33.3%出现过敏反应,21.7%出现血清病反应,27.5%出现肝功能异常。Liu等^[17]、Ma等^[19]对比后报道p-ALG和r-ATG两组的不良反应相似,上述不良反应经过合理的对症处理后可得到控制,且患者多能耐受。

四、小结

国产p-ALG具有自主知识产权,临床疗效良好,不良反应低。但p-ALG治疗SAA多为单中心、非随机临床试验,如果要将该药推广至国外,纳入SAA的标准治疗方案,仍需要进行多中心、随机对照临床研究。最佳治疗方案也有待于进一步探讨。p-ALG治疗SAA的机制也有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 杨丽艳,王化泉,邵宗鸿. 重型再生障碍性贫血的治疗进展[J]. 中华血液学杂志, 2015, 36(8):711-715. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.08.021.
- [2] Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, et al. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia [J]. N Engl J Med, 2015, 373(1):35-47. doi: 10.1056/NEJMoa1414799.
- [3] Killick SB, Bown N, Cavenagh J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia [J]. Br J Haematol, 2016, 172(2):187-207. doi: 10.1111/bjh.13853.
- [4] 中华医学会血液学分会红细胞疾病(贫血)学组. 再生障碍性贫血诊断治疗专家共识[J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(11):790-792. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2010.11.022.
- [5] 余健,吴笛,宰家敏,等. 低温乙醇法纯化抗人T细胞猪免疫球蛋白的研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2008, 36(3):42-44. doi: 10.3969/j.issn.1005-5673.2008.03.010.
- [6] 徐江峰,张颂. 盐析法与低温乙醇法制备抗人T细胞猪免疫球蛋白工艺的对比[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(5):691-694.
- [7] 张颂,徐江峰,翁雅倩. 抗人T细胞猪免疫球蛋白的有效期研究[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(5):622-625,631.
- [8] 夏南,王青青,赖俊,等. 抗人T淋巴细胞猪免疫球蛋白中戊二醛残留量的检测[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(8):980-982.
- [9] 詹合琴,海广范,潘若文,等. 抗人T淋巴细胞猪免疫球蛋白急性毒性实验研究[J]. 苏州大学学报(医学版), 2010, 30(2):240-241, 283, 封2.
- [10] 詹合琴,海广范,潘若文,等. 抗人T淋巴细胞猪免疫球蛋白对小鼠再生障碍性贫血的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(9):670-672.
- [11] Flynn J, Cox CV, Rizzo S, et al. Direct binding of antithymocyte globulin to haemopoietic progenitor cells in aplastic anaemia [J]. Br J Haematol, 2003, 122(2):289-297.
- [12] Dubey S, Nityanand S. Involvement of Fas and TNF pathways in the induction of apoptosis of T cells by antithymocyte globulin [J]. Ann Hematol, 2003, 82(8):496-499. doi: 10.1007/s00277-003-0645-x.
- [13] Bing H, Siyi Y, Wei Z, et al. The use of anti-human T lymphocyte porcine immunoglobulin and cyclosporine a to treat patients with acquired severe aplastic anemia [J]. Acta Haematol, 2010, 124(4):245-250. doi: 10.1159/000321790.
- [14] 韩冰,严思益,邹农,等. 抗淋巴细胞免疫球蛋白(猪)联合环孢素治疗重型再生障碍性贫血[J]. 中华血液学杂志, 2011, 32(4):241-244. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2011.04.007.
- [15] Chen M, Liu C, Zhuang J, et al. Long-term follow-up study of porcine anti-human thymocyte immunoglobulin therapy combined with cyclosporine for severe aplastic anemia [J]. Eur J Haematol, 2016, 96(3):291-296. doi: 10.1111/ejh.12590.
- [16] Wei J, Huang Z, Guo J, et al. Porcine antilymphocyte globulin (p-ALG) plus cyclosporine A (CsA) treatment in acquired severe aplastic anemia: a retrospective multicenter analysis [J]. Ann Hematol, 2015, 94(6):955-962. doi: 10.1007/s00277-015-2308-0.
- [17] Liu L, Ding L, Hao L, et al. Efficacy of porcine antihuman lymphocyte immunoglobulin compared to rabbit antithymocyte immunoglobulin as a first-line treatment against acquired severe aplastic anemia [J]. Ann Hematol, 2015, 94(5):729-737. doi: 10.1007/s00277-014-2279-6.
- [18] 张兴霞,刘立民,赵广圣,等. 猪抗人淋巴细胞球蛋白联合环孢素治疗重型再生障碍性贫血患者22例[J]. 中华血液学杂志, 2014, 35(5):451-453. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2014.05.016.
- [19] Ma X, Wang J, Zhang W, et al. Comparison of porcine anti-human lymphocyte globulin and rabbit anti-human thymocyte globulin in the treatment of severe aplastic anemia: a retrospective single-center study [J]. Eur J Haematol, 2016, 96(3):260-268. doi: 10.1111/ejh.12584.
- [20] 杨云,张王刚,曹星梅,等. 猪抗人淋巴细胞球蛋白治疗重型再生障碍性贫血的临床研究[J]. 临床内科杂志, 2015, 32(4):249-251. doi: 10.3969/j.issn.1001-9057.2015.04.13.
- [21] 井丽萍,史丽慧,张凤奎,等. 猪与兔抗人胸腺细胞球蛋白治疗获得性重型再生障碍性贫血的近期疗效比较[C]. 中华医学会第十二次全国血液学学术会议论文集, 2012:275-275.
- [22] 陈育红,黄晓军,许兰平,等. 非血缘关系骨髓及外周造血干细胞移植的比较[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(8):624-627. doi: 10.3760/j.issn.0578-1426.2006.08.005.
- [23] Ye BD, Zhang X, Shao KD, et al. Combined use of Chinese medicine with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for severe aplastic anemia patients [J]. Chin J Integr Med, 2014, 20(12):903-909. doi: 10.1007/s11655-014-2026-9.
- [24] Tang XD, Liu F, Li L, et al. Analysis of the prognostic factors of very severe aplastic anemia treated with Chinese Kidney-invigorating drugs in combination with anti-lymphocyte globulin or anti-thymocyte globulin [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(1):40-45. doi: 10.1007/s11655-011-0874-0.

(收稿日期:2016-03-16)

(本文编辑:刘爽)