

异基因外周血干细胞移植后早期供者嵌合状态对预后的预测意义

翟卫华 刘庆珍 施圆圆 李刚 孙佳丽 陈欣 姚剑峰 苏秀华 马巧玲
 庞爱明 何祎 杨栋林 张荣莉 黄勇 魏嘉璘 冯四洲 韩明哲 姜尔烈

【摘要】 目的 评价清髓性异基因外周血干细胞移植(allo-PBSCT)后早期完全供者嵌合状态(FDC)对患者预后的预测意义。方法 回顾性分析2016年2月至2017年7月行清髓性allo-PBSCT治疗的72例血液病患者临床资料。男44例,女28例,中位年龄36.5(4~59)岁。其中同胞全合供者35例、亲缘单倍型相合供者27例、无关供者10例。采用聚合酶链反应扩增短串联重复序列(PCR-STR)检测移植后1、2、3个月受者骨髓的供者细胞嵌合(DC)率。结果 全部72例患者中位随访462(47~805)d,其中55例存活,2年总体生存(OS)率为(68.9±7.7)%;45例无病存活,2年无病生存(DFS)率为(59.5±6.3)%;16例复发,中位复发时间为移植后157(32~374)d,2年复发率(RR)为(24.1±5.3)%。40例(55.6%)患者发生急性移植物抗宿主病(aGVHD),中位发生时间为移植后35.5(13~90)d;23例(31.9%)发生慢性GVHD(cGVHD),中位发生时间为移植后169(94~475)d。单因素分析显示患者年龄、性别、供受者血型、供受者性别、是否发生aGVHD和cGVHD均不影响OS、DFS率及RR。移植后2个月达到FDC组患者OS、DFS率均高于未达FDC组[OS:(85.2±6.9)%对(66.1±7.7)%, $P=0.051$;DFS:(76.7±7.7)%对(48.9±8.1)%, $P=0.021$],RR低于未达FDC组[(16.6±6.8)%对(30.4±7.8)%, $P=0.187$]。结论 清髓性allo-PBSCT后早期患者是否达到FDC对移植预后具有重要预测价值,移植后2个月达FDC患者OS及DFS率明显高于未达FDC患者。

【关键词】 造血干细胞移植,异基因; 嵌合状态; 预测因子

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81670171)

Prognostic significance of early phase donor chimerism after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation Zhai Weihua, Liu Qingzhen, Shi Yuanyuan, Li Gang, Sun Jiali, Chen Xin, Yao Jianfeng, Su Xiuhua, Ma Qiaoling, Pang Aiming, He Yi, Yang Donglin, Zhang Rongli, Huang Yong, Wei Jialin, Feng Sizhou, Han Mingzhe, Jiang Erlie. Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China

Corresponding author: Jiang Erlie, Email:jiangerlie@ihcams.ac.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the prognostic significance of early phase full donor chimerism (FDC) after myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation (allo-PBSCT). **Methods** The clinical data of 72 hematological patients received myeloablative allo-PBSCT from Feb. 2016 to Jul. 2017 were analyzed retrospectively. The median age was 36.5 years (range 4–59), 44 were males and 28 females. Of the donors, there were 35 HLA matched sibling donors, 27 haploidentical donors and 10 unrelated donors. Polymerase chain reaction amplification of short tandem repeat sequence (PCR-STR) was used to detect donor cell chimerism (DC) rate of recipient bone marrow at one, two and three months after transplantation. **Results** The median follow-up was 462 d (range: 47–805 d), 55 cases were still alive, and 45 cases were disease-free survival (DFS) at the end of follow-up. The 2-year overall survival (OS) and DFS were (68.9±7.7)% and (59.5±6.3)%, respectively. A number of 16 cases underwent relapses, with 2-year cumulative incidence of (24.1±5.3)%. The median time of recurrence was 157(32–374) d. Forty cases (55.6%) developed acute graft-versus-host diseases (aGVHD), with median time of 35.5 (13–90) d. Chronic

GVHD (cGVHD) occurred in 23 patients (31.9%), with median time of 169 (94–475) d. Univariate analysis found the following factors were not related to OS, DFS or relapse rate (RR), including age, sex, blood type and sex of donor-recipient, occurrence of aGVHD and cGVHD. The OS and DFS in cases reached FDC and no FDC at two months after transplantation were (85.2±6.9)% vs (66.1±7.7)% ($P=0.051$) and (76.7±7.7)% vs (48.9±8.1)% ($P=0.021$), respectively. The RR rate in FDC group was lower than that in no FDC group [(16.6±6.8)% vs (30.4±7.8)%], $P=0.187$, respectively]. **Conclusion** The present study confirmed the important value for predicting the prognosis with whether or not the patients reached FDC at the early phase after allo-PBSCT. The OS and DFS in cases with FDC at two months after transplantation were significantly higher than those of no FDC patients.

【Key words】 Hematopoietic stem cell transplantation; Chimerism; Prediction factors

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81670171)

异基因外周血干细胞移植(allo-PBSCT)目前广泛应用于血液病患者的治疗,移植疗效与供受者造血及免疫系统的嵌合状态密切相关。嵌合状态是指在异基因移植后供者细胞植入受者体内,供受者双方造血细胞达到共存的现象^[1]。移植后受者体内供者细胞所占百分比即为供者细胞嵌合(donor chimerism, DC)率;完全供者嵌合(full donor chimerism, FDC)状态是指在异基因移植后的受者标本中供者细胞占受者的骨髓或外周血细胞比例≥99%^[2]。为评价移植后早期FDC对预测血液病患者清髓性allo-PBSCT预后的意义,我们回顾性分析了行清髓性allo-PBSCT治疗的72例血液病患者临床资料,现报道如下。

病例与方法

1. 病例:以2016年2月至2017年7月在我院造血干细胞移植中心行清髓性allo-PBSCT治疗的72例血液病患者为研究对象,男44例,女28例,中位年龄36.5(4~59)岁。其中重型再生障碍性贫血(SAA)15例、骨髓增生异常综合征(MDS)14例、慢性粒-单核细胞白血病(CMML)2例、急性髓系白血病(AML)24例、急性淋巴细胞白血病(ALL)13例、多发性骨髓瘤(MM)1例、淋巴瘤2例、原发性骨髓纤维化(MF)1例。

2. 供者:HLA配型高分辨10/10位点相合同胞供者35例、亲缘单倍型相合供者27例、HLA配型高分辨10/10位点相合无关供者9例、9/10位点相合无关供者1例。其中,男供男27例,女供女13例,男供女15例,女供男17例;供者、受者ABO血型相合46例,次要不合8例,主要不合15例,主次均不合3例。

3. 造血干细胞采集与回输:均为PBSCT。采用重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)10 μg·kg⁻¹·d⁻¹动员供者干细胞,连用5~6 d,第5天起以COBE

Spectra或CS3000血细胞分离机连续采集外周血造血干细胞1~2 d,回输外周血单个核细胞(PBMNC)中位数为8.00(2.61~15.15)×10⁸/kg,回输CD34⁺细胞中位数为2.98(1.51~9.52)×10⁶/kg。

4. 预处理方案:均为清髓性。①15例SAA患者接受氟达拉滨(Flu)+环磷酰胺(Cy)+兔抗人胸腺细胞球蛋白(ATG)±白消安(Bu)方案。②AML、MDS、CMML、MF患者41例,接受Bu+Cy+Flu+阿糖胞苷(Ara-C)或去甲氧柔红霉素方案,MDS患者在此基础上合用地西他滨。③ALL、淋巴瘤、MM患者16例:14例接受全身照射(TBI)+Cy+Flu+Ara-C方案,2例接受TBI+美法仑方案。

5. 移植抗宿主病(GVHD)预防:①14例予环孢素A(CsA)+短疗程甲氨蝶呤(MTX);②58例予他克莫司+MTX;③单倍型相合供者移植及无关供者移植患者,在①或②基础上合用ATG及霉酚酸酯。

6. 标本采集及移植后DC检测:移植前采集72例受者及62例亲缘供者骨髓2~3 ml、无关供者采集物0.5~1 ml。移植后1、2、3个月定期采集受者骨髓2~3 ml。采用PCR扩增短串联重复序列(STR)定量检测供者细胞百分比,计算DC率。FDC定义为供者细胞占受者的骨髓或外周血细胞比例≥99%^[2]。

7. 疗效评定及随访:植入指标同文献[3],复发定义参照文献[4]标准。随访截止日期为2018年4月30日,中位随访462(47~805)d,无一例失访。观察患者GVHD发生情况、总体生存(OS)、无病生存(DFS)及复发率(RR);评价移植后早期达FDC对OS、DFS及RR的影响。OS时间:从造血干细胞回输至患者死亡或随访截止日期。DFS时间:从造血干细胞回输至复发、死亡或随访截止日期。

8. 统计学处理:采用SPSS 21.0软件进行统计

分析。DC率采用中位数(P_{25}, P_{75})进行描述,采用Mann-Whitney U 检验比较发生与未发生aGVHD组DC率的差异。以Kaplan-Meier曲线进行生存分析,率的组间比较采用Log-rank或Breslow检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

1. 造血重建:72例患者移植后均获得粒系造血重建,ANC $\geq 0.5 \times 10^9/L$ 的中位时间为移植后13(10~28)d;66例脱离血小板输注,PLT $\geq 20 \times 10^9/L$ 的中位时间为移植后15(10~44)d。移植后1、2、3个月中位DC率分别为99.215%(96.85%, 99.80%)、98.66%(95.77%, 99.70%)、99.31%(97.14%, 99.75%)。

2. GVHD发生及与DC的关系:40例(55.6%)患者发生急性GVHD(aGVHD),中位发生时间为移植

后35.5(13~90)d。发生与未发生aGVHD组移植后1、2、3个月的DC率分别为98.89%(96.85%, 99.83%)对99.26%(96.46%, 99.79%)($z < 0.001, P = 1.000$)、98.82%(96.39%, 99.57%)对98.58%(94.95%, 99.78%)($z = -0.238, P = 0.812$)、99.32%(97.21%, 99.69%)对99.25%(96.77%, 99.78%)($z = -0.136, P = 0.892$),两组移植后不同时间DC率差异均无统计学意义。23例(31.9%)患者发生慢性GVHD(cGVHD),中位发生时间为移植后169(94~475)d。

3. 影响生存的危险因素分析:55例患者存活,2年OS率为(68.9 \pm 7.7)%;45例无病存活,2年DFS率为(59.5 \pm 6.3)%。单因素分析显示患者性别、年龄(≥ 36.5 岁/ < 36.5 岁)、供者来源、供受者血型、供受者性别、是否发生aGVHD和cGVHD、移植后3个月是否达FDC均不是OS与DFS的影响因素(表1)。

表1 72例患者行清髓性allo-PBSCT后影响2年生存及复发的单因素分析

影响因素	例数	总生存			无病生存			复发		
		率(%)	χ^2 值	P值	率(%)	χ^2 值	P值	率(%)	χ^2 值	P值
性别			1.277	0.258		0.001	0.995		1.339	0.247
男	44	80.4 \pm 6.3			62.3 \pm 7.5			29.5 \pm 7.3		
女	28	56.4 \pm 13.1			58.8 \pm 9.6			15.3 \pm 7.1		
年龄			0.099	0.753		2.872	0.090		3.025	0.082
≥ 36.5 岁	36	58.5 \pm 13.0			50.6 \pm 8.6			33.4 \pm 8.4		
< 36.5 岁	36	79.7 \pm 6.9			71.4 \pm 7.6			14.7 \pm 6.1		
供者来源			1.756	0.185		0.175	0.676		2.791	0.095
同胞及无关	45	70.9 \pm 12.1			60.1 \pm 7.6			31.4 \pm 7.3		
亲缘单倍型	27	62.4 \pm 10.8			62.2 \pm 9.5			11.7 \pm 6.4		
供受者血型			0.003	0.955		0.295	0.587		1.167	0.280
血型不合	26	75.8 \pm 8.6			63.2 \pm 9.8			18.2 \pm 8.5		
血型相合	46	73.6 \pm 6.9			59.6 \pm 7.4			27.7 \pm 6.8		
供受者性别			4.133	0.247		1.546	0.672		5.235	0.155
男供男	27	76.6 \pm 8.4			68.6 \pm 9.3			21.0 \pm 8.5		
男供女	15	54.4 \pm 14.0			55.4 \pm 13.6			6.7 \pm 6.4		
女供男	17	86.3 \pm 9.2			52.9 \pm 12.1			41.2 \pm 11.9		
女供女	13	76.2 \pm 12.1			61.5 \pm 13.5			23.1 \pm 11.7		
是否发生急性GVHD			0.263	0.608		2.178	0.140		2.857	0.091
是	40	79.1 \pm 6.6			69.3 \pm 7.4			15.3 \pm 5.8		
否	32	68.4 \pm 8.9			49.9 \pm 9.3			35.6 \pm 9.3		
是否发生慢性GVHD			2.398	0.121		1.870	0.171		0.582	0.446
是	23	86.5 \pm 7.3			73.9 \pm 9.2			17.4 \pm 7.9		
否	49	68.2 \pm 7.1			54.5 \pm 7.4			27.7 \pm 6.9		
1个月达到FDC			2.034	0.154		3.944	0.047		1.685	0.194
是	32	67.5 \pm 7.8			49.7 \pm 8.2			31.6 \pm 8.1		
否	40	82.7 \pm 7.1			74.2 \pm 7.9			15.8 \pm 6.5		
2个月达到FDC			3.816	0.051		5.331	0.021		1.740	0.187
是	40	85.2 \pm 6.9			76.7 \pm 7.7			16.6 \pm 6.8		
否	32	66.1 \pm 7.7			48.9 \pm 8.1			30.4 \pm 7.8		
3个月达到FDC			1.075	0.300		1.151	0.283		0.800	0.371
是	42	78.8 \pm 6.2			65.0 \pm 7.6			23.8 \pm 7.1		
否	20	68.1 \pm 8.8			55.3 \pm 9.3			24.8 \pm 8.1		

注:allo-PBSCT:异基因外周血干细胞移植;FDC:完全供者嵌合

移植后2个月达FDC组和未达FDC组OS率分别为(85.2±6.9)%、(66.1±7.7)%($\chi^2=3.816, P=0.051$)(图1),DFS率分别为(76.7±7.7)%、(48.9±8.1)%($\chi^2=5.331, P=0.021$)(图2),达FDC患者生存率均高于未达FDC组。移植后1个月达FDC与未达FDC组DFS率分别为(49.7±8.2)%、(74.2±7.9)%($\chi^2=3.944, P=0.047$),达FDC组患者低于未达FDC组。

4. 影响复发的危险因素分析:72例患者中16例于移植后157(32~374)d复发,2年RR为(24.1±5.3)%。单因素分析显示患者性别、年龄、供者来源、供受者血型、供受者性别、是否发生aGVHD、是否发生cGVHD,以及移植后1、2、3个月是否达FDC均不是RR的影响因素(表1)。

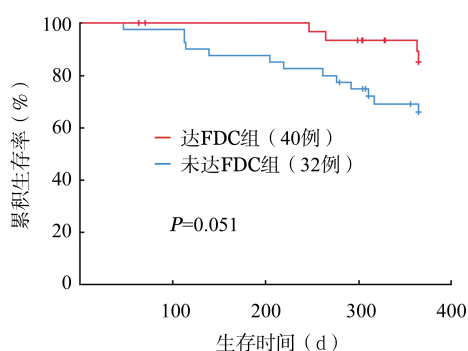


图1 移植后2个月是否达到完全供者嵌合(FDC)对患者异基因外周血干细胞移植后总生存的影响

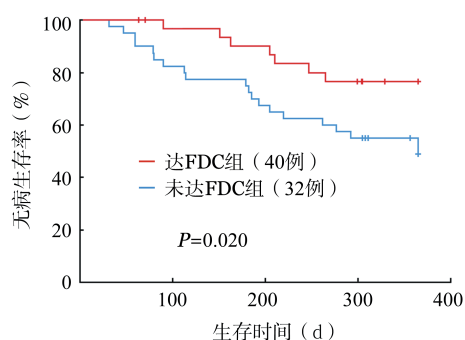


图2 移植后2个月是否达到完全供者嵌合(FDC)对患者异基因外周血干细胞移植后无病生存的影响

讨 论

allo-HSCT后DC的检测方法早期主要为免疫生化分析,耗时长,敏感性及特异性均较差。近年来,DC的检测方法发展迅速,目前临床常用的包括荧光原位杂交(FISH)技术、可变串联重复序列(VNTR)及STR。FISH技术敏感性高、快速、安全、可定量,但只能应用于异性别移植后DC监测。

VNTR与STR的敏感性及特异性均较高,检测所需要的细胞量较少,可适用于几乎全部供受者。VNTR由长度为8~50 bp的重复序列组成;STR则为长度3~7 bp的重复序列,可以显示出高度的杂合性、多态性及个体化^[5],较VNTR敏感性更高。因此,本研究中我们选择目前临床最佳方法PCR-STR作为DC检测手段。

关于PCR-STR技术及标本来源近几年也有相关研究^[6-7],骨髓或外周血均可用于移植后DC的分析。Qin等^[8]分析了21例复发白血病患者接受allo-HSCT后骨髓及外周血的DC。该研究结果显示采用骨髓标本的DC检测敏感性优于外周血标本,差异有统计学意义($P=0.001$),这可能与受者细胞较早出现在骨髓中相关。本研究我们选择移植后1、2、3个月受者骨髓标本进行PCR-STR检测DC情况,可以更早反映DC变化趋势,指导临床治疗。

FDC常见于清髓性移植后,供受者混合嵌合(mixed chimerism, MC)状态多出现于减低强度(reduced-intensity conditioning, RIC)预处理或去T淋巴细胞移植后^[9]。此外,PBSCT输入的造血干细胞及淋巴细胞数量多,有利于供者细胞植入与DC率的提高。本研究中72例血液病患者均接受清髓性allo-PBSCT,移植后获得粒系造血重建,移植后1、2、3个月中位DC率分别为99.215%(96.85%, 99.80%)、98.66%(95.77%, 99.70%)、99.31%(97.14%, 99.75%),多数患者达到FDC标准,可能与患者接受的是清髓性预处理及干细胞来源于外周血有关。

文献报道移植后出现的移植物排斥(graft rejection, GR)、复发及GVHD发生等与DC相关。Gabr等^[10]研究发现早期(+28 d)FDC与allo-HSCT预后相关,可以提高DFS率;Faraci等^[11]研究发现FDC增加aGVHD及cGVHD发生率。本研究中单因素分析结果显示移植后2个月达FDC组和未达FDC组OS率分别为(85.2±6.9)%、(66.1±7.7)%($\chi^2=3.816, P=0.051$),DFS率分别为(76.7±7.7)%、(48.9±8.1)%($\chi^2=5.331, P=0.021$),移植后1个月达FDC与未达FDC组DFS率分别为(49.7±8.2)%、(74.2±7.9)%($\chi^2=3.944, P=0.047$)。移植后2个月达到FDC组患者预后好,分析其原因可能与达FDC组RR低于未达FDC组有关[(16.6±6.8)%对(30.4±7.8)%, $\chi^2=1.740, P=0.187$]。移植后1个月达FDC患者可能其GVHD发生风险高、移植相关死亡率高,所以移植后1个月时达FDC者DFS率低于未达

FDC者。移植后3个月是否达到FDC对OS、DFS、复发的影响和移植后2个月结果一致,达到FDC组患者预后好,但3个月时的数据差异无统计学意义($P>0.05$),可能因为2个月时,对于DC率稍低、高危复发趋势的患者采用了减少免疫抑制剂用量、供者淋巴细胞输注等手段来干预,从而导致3个月时的数据虽然仍有类似趋势,但差异无统计学意义。关于这一现象尚需扩大临床病例观察以验证。

此外,应强调的是移植后受者DC呈动态变化过程,早期形成的FDC可能继续保持稳定的FDC,亦可能随受者细胞比例增多转变为MC;而在早期检测到的MC可能维持稳定的MC,或者因供者细胞增多而形成FDC,亦可能随着供者细胞逐渐减少而导致GR。目前,DC检测的临床意义尚存争议,这主要与不同研究中所采用预处理方案、移植来源、DC率的测定时间不同等诸多因素相关。因此,动态监测嵌合状态的变化过程对GR、复发及GVHD更具有判断意义。蒋瑛等^[12]研究结果表明不同淋巴细胞亚群嵌合水平会影响异基因移植受者预后。我们取部分患者外周血标本分选T、B、NK淋巴细胞进行DC检测,观察到受者T淋巴细胞DC与移植排斥及疾病复发有一定相关性。

综上,清髓性allo-PBSCT后患者是否早期达FDC对移植预后具有重要预测价值,移植后2个月达FDC患者OS及DFS明显优于未达FDC患者,提示对未达FDC患者进行干预对于减少RR、提高OS及DFS具有重要意义。DC在预测aGVHD发生方面尚存在缺陷,需要进一步行DC动态监测及完善不同淋巴细胞亚群嵌合水平等研究,以寻找DC与预测临床预后最佳的契合点。

参考文献

- [1] Merzoni J, Ewald GM, Paz AA, et al. Quantification of mixed chimerism allows early therapeutic interventions [J]. *Rev Bras Hematol Hemoter*, 2014, 36(5): 369-372. DOI: 10.1016/j.bjhh.2014.07.004.
- [2] Breuer S, Preuner S, Fritsch G, et al. Early recipient chimerism testing in the T- and NK-cell lineages for risk assessment of graft rejection in pediatric patients undergoing allogeneic stem cell transplantation [J]. *Leukemia*, 2012, 26(3):509-519. DOI: 10.1038/leu.2011.244.
- [3] 翟卫华, 王玫, 周征, 等. 异基因造血干细胞移植治疗再生障碍性贫血16例临床观察 [J]. *中华血液学杂志*, 2007, 28(2):78-82. DOI: 10.3760/j.issn:0253-2727.2007.02.002.
- [4] 中华医学会血液学分会干细胞应用学组. 中国异基因造血干细胞移植治疗血液系统疾病专家共识(II)——移植后白血病复发(2016年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37(10): 846-851. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.10.004.
- [5] Clark JR, Scott SD, Jack AL, et al. Monitoring of chimerism following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT): technical recommendations for the use of short tandem repeat (STR) based techniques, on behalf of the United Kingdom National External Quality Assessment Service for Leucocyte Immunophenotyping Chimerism Working Group [J]. *Br J Hematol*, 2015, 168(1): 26-37. DOI: 10.1111/bjh.13073.
- [6] Han E, Kim M, Kim Y, et al. Practical informativeness of short tandem repeat loci for chimerism analysis in hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 468:51-59. DOI: 10.1016/j.cca.2017.02.004.
- [7] Kricke S, Mhaldien L, Fernandes R, et al. Chimerism Analysis in the Pediatric Setting: Direct PCR from Bone Marrow, Whole Blood, and Cell Fractions [J]. *J Mol Diagn*, 2018, 20(3):381-388. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2018.02.003.
- [8] Qin XY, Li GX, Qin YZ, et al. Quantitative chimerism kinetics in relapsed leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(11):1952-1959.
- [9] Peterlin P, Delaunay J, Guillaume T, et al. Complete donor T cell chimerism predicts lower relapse incidence after standard double umbilical cord blood reduced-intensity conditioning regimen allogeneic transplantation in adults [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015, 21(1): 180-184. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.08.018.
- [10] Gabr H, Youssry I, El-Ansary Y, et al. Chimerism in pediatric hematopoietic stem cell transplantation and its correlation with the clinical outcome [J]. *Transpl Immunol*, 2017, 45:53-58. DOI: 10.1016/j.trim.2017.09.004.
- [11] Faraci M, Bagnasco F, Leoni M, et al. Evaluation of Chimerism Dynamics after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children with Nonmalignant Diseases [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018, 24(5):1088-1093. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.12.801.
- [12] 蒋瑛, 万理萍, 王椿, 等. 异基因造血干细胞移植后细胞嵌合状态动态监测的临床意义 [J]. *中华血液学杂志*, 2008, 29(10): 667-671. DOI: 10.3321/j.issn:0253-2727.2008.10.005.

(收稿日期:2018-05-15)

(本文编辑:刘爽)