

六例血液系统疾病患者嵌合抗原受体T细胞治疗后并发弥散性血管内凝血临床分析

齐昆明 曹江 程海 徐鸣璐 陈伟 乔建林 付春玲 潘秀英 曾令宇
李振宇 徐开林

徐州医科大学附属医院血液科,江苏省骨髓干细胞重点实验室 221002

通信作者:曹江,Email:zimu05067@163.com

基金项目:国家自然科学基金(81641151);江苏省社会发展重点项目(BE2017639)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.05.014

Clinical analysis of disseminated intravascular coagulation in 6 patients with hematological diseases after CAR-T treatment

Qi Kunming, Cao Jiang, Cheng Hai, Chen Wei, Xu Minglu, Qiao Jianlin, Fu Chunling, Pan Xiuying, Zeng Lingyu, Li Zhenyu, Xu Kailin

Department of Hematology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Key Laboratory of Bone Marrow Stem Cells in Jiangsu Province, Xuzhou 221002, China

Corresponding author: Cao Jiang, Email: zimu05067@163.com

嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)免疫疗法是近年来迅速发展的肿瘤过继性免疫治疗新手段^[1-3]。目前CAR-T对复发/难治性急性B淋巴细胞白血病(R/R B-ALL)的完全缓解(CR)率已经达到70%~90%^[1,4],对复发/难治B细胞非霍奇金淋巴瘤(R/R B-NHL)和复发/难治的多发性骨髓瘤(R/R MM)也有较好的疗效^[5-7]。然而CAR-T治疗后出现的不良反应也不容忽视。细胞因子释放综合征(CRS)为最常见的不良反应之一^[8],而CAR-T治疗后并发弥散性血管内凝血(DIC)并不常见。本文我们对我院6例CAR-T治疗后并发DIC患者的临床特征及转归进行分析,现报道如下。

病例与方法

1. 病例资料:回顾性分析2016年6月至2018年6月于徐州医科大学附属医院血液科进行CAR-T治疗后出现DIC的6例患者,CAR-T后DIC诊断依据中国弥散性血管内凝血诊断积分系统(CDSS)^[9]。记录CAR-T治疗后患者的出血情况、微循环障碍和脏器功能衰竭情况、CRS情况、凝血功能指标[包括凝血酶原时间(PT)(正常参考范围:11~14 s)、活化部分凝血活酶时间(APTT)(正常参考范围:20~40 s)、纤维蛋白原(FIB)(正常参考范围:2~4 g/L)、D-二聚体(正常参考范围:0~0.5 mg/L)等]、其他血液学指标[包括血常规、铁蛋白、IL-6、C反应蛋白(CRP)]以及外周血CAR-T的扩增情况等。

2. 治疗方案及疗效评估:患者在CAR-T输注前均给予FC方案(氟达拉滨 30 mg·m⁻²·d⁻¹, -5~-3 d;环磷酰胺 750 mg/m², -5 d)预处理,R/R B-ALL患者给予输注1×10⁶/kg CD19 CAR-T,R/R B-NHL患者给予输注1×10⁶/kg CD19

CAR-T和1×10⁶/kg CD20 CAR-T,输注当天计为第0天。密切观察病情并检查相关血液学指标。出现凝血功能障碍时给予输注凝血酶原复合物、冷沉淀等;根据血常规情况及时补充血小板。患者出现发热、恶心等,给予退热等对症处理;反复高热,胸闷以及铁蛋白、IL-6等明显升高考虑严重的CRS时给予糖皮质激素、托珠单抗治疗。B-ALL的疗效评估按照美国NCCN指南(2016年版);B-NHL疗效评估按照2014年Lugano标准。采用Lee等提出的分级标准进行CRS分级,其中脏器损害参见《常见不良反应事件评价标准》(CTCAE)4.0版。

3. 统计学处理:采用SPSS 22.0软件进行统计学分析。研究中连续变量以均数±标准差表示,分类变量以率(构成比)表示,相关性分析采用Pearson相关性分析,双侧P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般资料及转归:6例患者中,男3例,女3例,中位年龄43.5(17~67)岁,R/R B-ALL 3例,其中普通B细胞型2例,前B细胞型1例;R/R B-NHL 3例,包括弥漫大B细胞淋巴瘤2例,Burkitt淋巴瘤1例。6例患者均符合中国DIC诊断标准,CDSS积分均≥7分。6例患者中,4例(例1、2、3、6)达到CR。4例患者(例1、2、3、6)在CAR-T后(2~6)d开始出现凝血指标异常(PT、APTT延长,D-二聚体升高、低纤维蛋白原血症),同时伴有反复高热,低氧血症、低血压等CRS表现,积极治疗后CRS得到控制,凝血功能纠正。例5在CAR-T治疗后出现反复高热,第2天PT、APTT开始延长,D-二聚体升高,第6天病情加重,第7天死于DIC和多器官功能衰竭

(multiple organ failure, MOF); 例4 CAR-T后出现反复高热、憋喘,第4天凝血指标开始出现异常伴有低氧血症、低血压等,第11天因MOF抢救无效死亡(表1)。

2. CAR-T治疗后血常规变化:CAR-T治疗后15 d内6例患者WBC、HGB及PLT较前均有不同程度的降低,WBC最低点中位时间为9(2~12)d,PLT最低点中位时间为8(2~14)d,HGB最低点中位时间11(2~19)d,之后血常规各项指标逐步回升(图1)。

3. CAR-T治疗前后凝血功能动态变化:6例患者在FC方案预处理前至CAR-T输注当天(0 d)PT、APTT、FIB、D-二聚体基本在正常范围,CAR-T治疗后出现DIC表现时PT、

APTT、D-二聚体峰值均较CAR-T治疗前明显升高,FIB明显降低。PT、APTT峰值中位时间分别为9(4~14)d、7(4~14)d;D-二聚体峰值>9 mg/L,平均持续时间约3.3 d;FIB最低值中位时间10(6~16)d。在CAR-T输注后30 d内经积极治疗DIC,除例4、例5死亡外,其余病例的凝血指标均好转(图2)。

4. CAR-T治疗后DIC与CRS临床表现相关性:6例患者中全部并发CRS,CRS分级均≥3级,其中3级1例,4级3例,5级2例。在输注CAR-T后6例患者全部出现反复高热以及不同程度的脏器损害,其外周血中均检测到CAR-T的明显扩增,高峰中位时间出现在第9(4~10)天,第30天时仍能检

表1 6例CAR-T治疗后并发DIC患者的一般资料及转归

例号	性别	年龄(岁)	诊断	输注CAR-T类型	CDSS积分	CRS分级	疗效/转归
1	女	50	B-ALL	CD19	9	4	完全缓解
2	男	20	B-ALL	CD19	8	4	完全缓解
3	女	47	DLBCL	CD19+CD20	9	4	完全缓解
4	男	67	DLBCL	CD19+CD20	9	5	死于DIC、MOF
5	男	17	Burkitt淋巴瘤	CD19+CD20	10	5	死于DIC、MOF
6	女	40	B-ALL	CD19	7	3	完全缓解

注:DIC:弥散性血管内凝血;B-ALL:急性B淋巴细胞白血病;DLBCL:弥漫大B细胞淋巴瘤;CDSS:中国弥散性血管内凝血诊断积分系统;CRS:细胞因子释放综合征;MOF:多器官功能衰竭

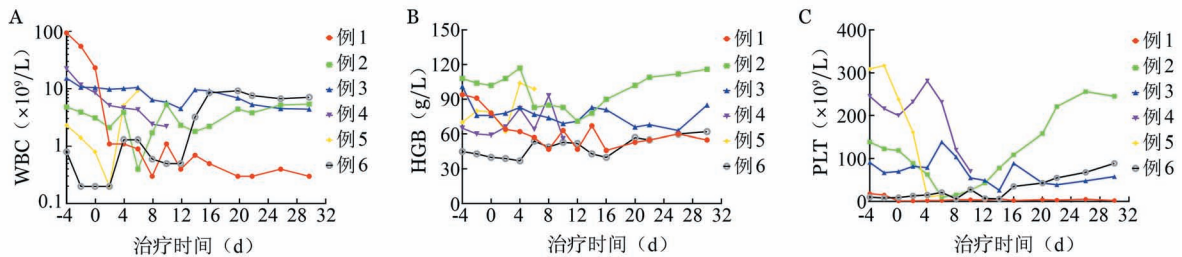
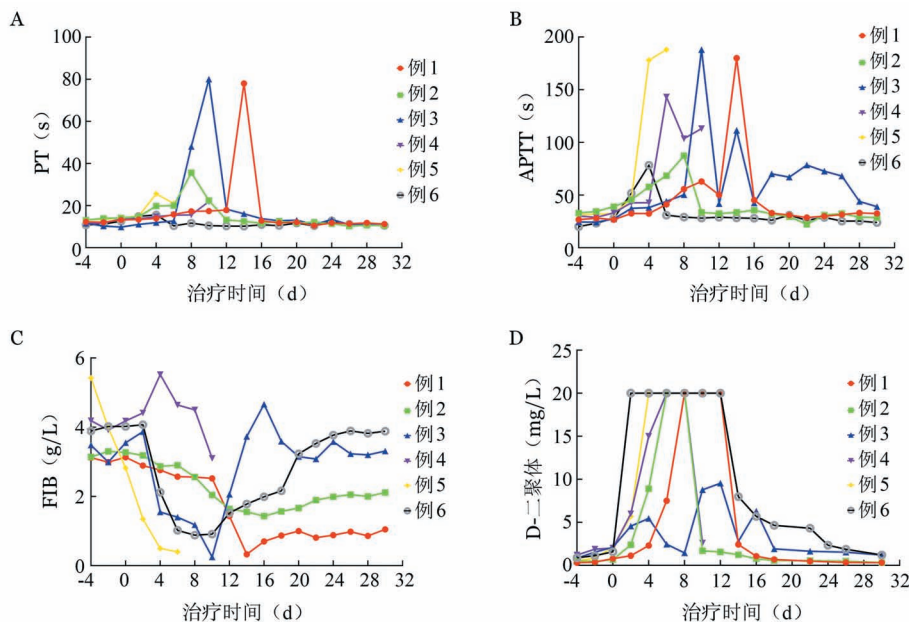


图1 6例血液系统疾病患者CAR-T治疗前后WBC(A)、HGB(B)、PLT(C)变化



A:PT;B:APTT;C:纤维蛋白原(FIB);D:D-二聚体
图2 6例血液系统疾病患者CAR-T治疗前后凝血功能变化

测到CAR-T的扩增(图3)。同时炎症因子在CAR-T治疗后均出现高峰,IL-6高峰中位时间出现在第9(4~10)天,铁蛋白高峰中位时间出现在第10(4~14)天,而CRP高峰中位时间出现在第7(2~12)天。CAR-T扩增高峰时间与炎症因子高峰出现时间基本一致(图4)。

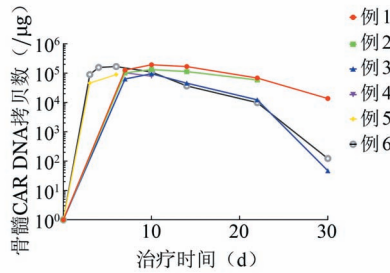


图3 6例血液系统疾病患者CAR-T治疗后CAR-T扩增情况

6例DIC患者中有5例(例1、3、4、5、6)出现非感染性休克表现,3例患者(例3、4、5)出现多脏器功能不全,6例患者CDSS积分均 ≥ 7 分,平均为8.7分。患者CRS分级与CDSS积分呈正相关($r=0.857, P=0.029$),考虑CAR-T治疗后CRS分级越重,越容易并发DIC,但需要扩大样本量以进一步证实。

5. CAR-T治疗后DIC指标与CRS炎症因子指标相关性:分析6例DIC患者凝血指标与炎症因子相关性,结果显示IL-6与PT($r=0.535, P=0.040$)、APTT($r=0.572, P=0.026$)、D-二聚体($r=0.726, P=0.002$)呈正相关,与FIB无明显相关性($r=-0.293, P=0.289$);铁蛋白与PT($r=0.904, P<0.001$)、APTT($r=0.841, P<0.001$)呈正相关,与FIB呈负相关($r=-0.558, P=0.031$),与D-二聚体无明显相关性($r=0.395, P=0.145$);CRP与D-二聚体呈正相关($r=0.799, P=0.004$),与PT($r=0.289, P=0.296$)、APTT($r=0.464, P=0.082$)、FIB($r=0.063, P=0.825$)均无明显相关性。

讨论

CAR-T细胞免疫疗法取得了显著疗效的同时也引起了许多不良反应^[10]。Teachey等^[11]报道了CAR-T治疗51例ALL患者,其中48例出现CRS,发生率高达94.1%。严重凝血功能异常较少见,患者输注CAR-T后并发凝血功能异常是由CRS后释放大量的细胞因子继发引起还是其他原因所致,目前尚不明确。

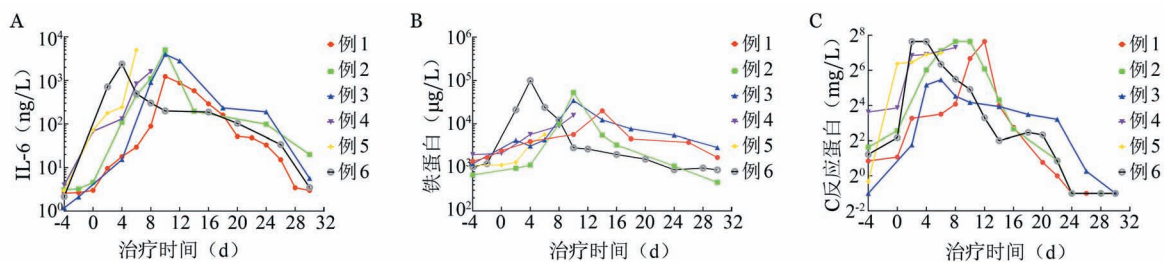
2017年Mei等^[12]报道1例CAR-T治疗后出现神经毒性并凝血功能异常的病例,在输注CAR-T后第4天患者的FDP、D-二聚体、APTT开始升高,+8~+9 d达到高峰,+20 d以上指标恢复正常,与CRS严重程度、IL-6、CRP、IL-10等炎症因子变化相一致。

引起DIC常见的因素有感染、肿瘤等。有研究表明在血流感染期间,脂多糖可降低GATA-2和SPI转录因子的蛋白水平,通过组织因子依赖的凝血途径触发DIC的发展^[13]。而实体瘤继发的DIC,考虑与实体瘤释放的黏蛋白有关,L-选择素和P-选择素配体在黏液蛋白表面表达升高,促进血小板聚集,同时与周围细胞表达的组织因子相互作用,导致血栓形成^[14]。我们报道的6例患者输注CAR-T后出现发热,但无感染相关症状,多次血培养均阴性,因此感染所致DIC的可能性较小。而根据患者既往治疗情况及动态监测原发病情况,由原发病进展引起DIC的可能性也不大。我们考虑DIC由CAR-T治疗引起理由如下:①均在输注CAR-T后出现凝血指标异常,在2~5 d凝血指标开始异常;②CAR-T扩增高峰与凝血指标异常高峰基本吻合;③CRS症状经积极治疗好转后凝血指标也恢复正常。

我们发现的这6例CAR-T后并发DIC患者,全部并发CRS,提示CRS与凝血功能障碍存在内在联系,这一点与Mei等^[12]报道的CAR-T治疗后出现神经毒性并凝血功能异常的病例一致;6例DIC患者CRS分级与CDSS积分呈正相关,考虑CAR-T治疗后CRS分级越重,越容易诱发DIC。通过分析凝血指标与炎症因子相关性发现IL-6与凝血指标中PT、APTT、D-二聚体呈正相关,铁蛋白与PT、APTT呈正相关,CRP与D-二聚体呈正相关,同时我们还发现CAR-T扩增高峰时间,PT、APTT等凝血指标高峰出现时间以及炎症因子高峰出现时间基本一致,综上我们考虑CRS时释放的大量细胞因子参与了DIC的发生发展过程。

既往研究已经证明CAR-T后出现发热及CRP升高预示有较重的毒副作用的风险,且血清MCP-1升高以及输注CAR-T后36 h内出现发热(体温 $> 38.9\text{ }^{\circ}\text{C}$)是预示毒性风险最敏感和特异的指标,同时反应内皮损伤的IL-6、IFN- γ 等指标明显升高往往与严重的CRS有关,内皮损伤、毛细血管渗漏、消耗性凝血功能障碍往往与严重的CRS同时发生^[15-16],这一点也可以解释本组6例患者发生DIC的同时出现严重CRS。

血栓调节蛋白是一种膜糖蛋白,在血管内皮细胞上表



A:IL-6;B:铁蛋白;C:C反应蛋白
图4 6例血液系统疾病患者CAR-T治疗前后炎症因子变化

达,有研究表明DIC时血栓调节蛋白明显升高,提示内皮细胞严重损伤^[17]。2017年Gust等^[18]纳入133例包括ALL、多发性骨髓瘤、NHL等血液系统恶性疾病患者,CAR-T治疗后约40%的患者出现不同程度的神经毒性,发生 ≥ 3 级CTCAE神经毒性的患者中有一部分并发凝血功能障碍,发生 ≥ 3 级CTCAE神经毒性的患者中血管生成素(Ang)-1、Ang-2表达量增加,提示内皮细胞激活、血管破坏,可导致血脑屏障通透性增加,利于炎症因子进入中枢神经系统,导致神经毒性的发生,内皮破坏可启动凝血过程,消耗大量凝血因子。因此我们考虑CAR-T后发生DIC与重度CRS引起的大量细胞因子释放、内皮损伤等继发了凝血功能异常有关,在后续的研究中需要检测血栓调节蛋白、P-选择素等指标进一步明确其机制。本组6例患者在CAR-T后出现凝血指标异常时,我们给予凝血酶原复合物、冷沉淀,补充FIB,给予酚磺乙胺、氨甲苯酸等积极纠正凝血功能异常,同时给予糖皮质激素、托珠单抗等积极控制CRS。4例患者的PT、APTT、FIB等凝血指标在短时间内即恢复正常水平,未发生因凝血功能障碍导致的严重出血事件。提示及时控制CRS的发生发展可能会降低CAR-T后DIC的发生。

虽然CAR-T后并发DIC少见,但是鉴于DIC一般出现在CAR-T治疗后骨髓抑制期,患者血小板水平较低,一旦继发出血控制难度大,同时可诱发感染等严重并发症,应给予高度重视。建议CAR-T治疗后定期复查凝血功能,若有异常尽早给予相应的治疗措施。

参考文献

- [1] Cao J, Wang G, Cheng H, et al. Potent anti-leukemia activities of humanized CD19-targeted Chimeric antigen receptor T (CAR-T) cells in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia [J]. *Am J Hematol*, 2018, 93 (7):851- 858. DOI: 10.1002/ajh.25108.
- [2] Berahovich R, Zhou H, Xu S, et al. CAR-T Cells Based on Novel BCMA Monoclonal Antibody Block Multiple Myeloma Cell Growth [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(9) pii: E323. DOI: 10.3390/cancers10090323.
- [3] Wei G, Wang J, Huang H, et al. Novel immunotherapies for adult patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1):150. DOI: 10.1186/s13045-017-0516-x.
- [4] Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial [J]. *Lancet*, 2015, 385 (9967): 517- 528. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61403-3.
- [5] Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(6):540-549. DOI: 10.1200/JCO.2014.56.2025.
- [6] Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, et al. Immunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma with a defined ratio of CD8+ and CD4+ CD19-specific chimeric antigen receptor-modified T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(355):355ra116. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf8621.
- [7] Bluhm J, Kieback E, Marino SF, et al. CAR T cells with enhanced sensitivity to B cell maturation antigen for the targeting of B cell Non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma [J]. *Mol Ther*, 2018, 26(8):1906-1920. DOI: 10.1016/j.yymthe.2018.06.012.
- [8] Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in children and young adults with B-cell lymphoblastic leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(5):439-448. DOI: 10.1056/NEJMoa1709866.
- [9] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组. 弥散性血管内凝血诊断中国专家共识(2017年版) [J]. *中华血液学杂志*, 2017, 38(5):361-363. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.05.001.
- [10] Zhao Z, Chen Y, Francisco NM, et al. The application of CAR-T cell therapy in hematological malignancies: advantages and challenges [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(4):539-551. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.03.001.
- [11] Teachey DT, Lacey SF, Shaw PA, et al. Identification of predictive biomarkers for cytokine release syndrome after chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(6):664-679. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0040.
- [12] Mei H, Jiang H, Wu Y, et al. Neurological toxicities and coagulation disorders in the cytokine release syndrome during CAR-T therapy [J]. *Br J Haematol*, 2018, 181(5):689-692. DOI: 10.1111/bjh.14680.
- [13] Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra25. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008226.
- [14] Hay KA, Hanafi LA, Li D, et al. Kinetics and biomarkers of severe cytokine release syndrome after CD19 chimeric antigen receptor-modified T-cell therapy [J]. *Blood*, 2017, 130(21): 2295-2306. DOI: 10.1182/blood-2017-06-793141.
- [15] Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, et al. Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112:853-862.
- [16] Van Dreden P, Elalamy I, Gerotziafas GT. The role of tissue factor in cancer-related hypercoagulability, tumor growth, angiogenesis and metastasis and future therapeutic strategies [J]. *Crit Rev Oncog*, 2017, 22(3-4):219-248. DOI: 10.1615/CritRevOncog.2018024859.
- [17] Seki Y, Wakaki K. Pathological findings in a case of bone marrow carcinosis due to gastric cancer complicated by disseminated intravascular coagulation and thrombotic microangiopathy [J]. *Int J Hematol*, 2016, 104(4):506-511. DOI: 10.1007/s12185-016-2051-x.
- [18] Gust J, Hay KA, Hanafi LA, et al. Endothelial activation and blood-brain barrier disruption in neurotoxicity after adoptive immunotherapy with CD19 CAR-T cells [J]. *Cancer Discov*, 2017, 7(12):1404-1419. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0698.

(收稿日期:2019-02-22)

(本文编辑:刘爽)