

• 临床检验研究 •

自体纯化 CD34⁺ 细胞移植治疗自身免疫性疾病 14 例的临床观察*

文 钦, 张 诚[#], 陈幸华, 刘 耀, 高 蕾, 高 力, 孔佩艳, 张 曦[△]
(第三军医大学新桥医院血液科/重庆市医学重点学科, 重庆 400037)

摘 要:目的 探讨自体纯化 CD34⁺ 细胞移植治疗自身免疫性疾病(AID)的疗效。方法 对 14 例自身免疫性疾病患者进行自体纯化 CD34⁺ 细胞移植。采用环磷酰胺(CTX)+G-CSF 动员外周血干细胞,通过 CliniMACS 细胞分选仪分选 CD34⁺ 细胞并冻存。预处理方案:8 例采用氟达拉滨(FDB)+抗胸腺细胞球蛋白(ATG)+CTX 方案,3 例采用 ATG+CTX 方案,1 例采用 FDB+CTX 方案,1 例采用利妥昔单抗+ATG+CTX 方案,1 例采用利妥昔单抗+FDB+CTX 方案。观察造血重建、免疫恢复,以及症状、体征、实验室检查变化情况。结果 动员及分选后获得的 CD34⁺ 细胞数均达到移植要求。14 例患者均成功造血重建。4 例系统性红斑狼疮(SLE)患者移植后,临床症状、实验室检查、SLEDAI 评分均较移植前明显改善。5 例特发性血小板减少性紫癜(ITP)患者中,4 例血小板水平升至正常,1 例患者升至大于 $50 \times 10^9/L$ 。2 例白塞病患者临床症状减轻,溃疡数目减少,红细胞沉降率明显下降,针刺反应不明显,2 例克罗恩病患者临床症状减轻,CDAI 评分均小于 100 分。1 例红斑型天疱疮患者皮疹完全消失,直接免疫荧光实验及间接免疫荧光实验均阴性,无移植相关死亡发生。结论 自体纯化 CD34⁺ 细胞移植是治疗难治性 AID 可供选择的有效手段。

关键词: 自身免疫疾病; 外周血干细胞移植; CD34⁺ 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.11.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)11-1160-03

Transplantation of purified autologous peripheral blood CD34⁺ cells in the treatment of 14 cases with autoimmune diseases*

Wen Qin, Zhang Cheng[#], Chen Xinghua, Liu Yao, Gao Lei, Gao Li, Kong Peiyan, Zhang Xi[△]

(Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To explore the therapeutic effect of transplantation of purified autologous peripheral blood CD34⁺ cells in the treatment of autoimmune diseases. **Methods** 14 cases of patients with various autoimmune diseases were treated with autologous transplantation of purified peripheral blood CD34⁺ cells. Autologous peripheral blood cells were mobilized with the regimen of cyclophosphamide plus rhG-CSF, and then the CD34⁺ cells were selected by CliniMACS. Before treated with CD34⁺ cells transplantation, 8 cases were treated with fludarabine(FDB), anti thymocyte globulin(ATG) and cyclophosphamide(CTX), 3 cases with ATG and CTX, 1 case with FDB and CTX, 1 case with Rituximab, ATG and CTX and 1 case with Rituximab, FDB and CTX. Then reconstruction of hematopoiesis, recovery of immune system and the changes of symptoms, signs and laboratory results were observed. **Results** After mobilization and purification, sufficient CD34⁺ cells were acquired. All of the 14 patients exhibited reconstruction of hematopoiesis. Improvement of symptoms, laboratory results and systemic lupus erythematosus disease activity index(SLEDAI) score were acquired in 4 cases with systemic lupus erythematosus. The platelet level of 4 in 5 cases with idiopathic thrombocytopenic purpura(ITP) became normal, and that of 1 in 5 cases with ITP became more than $50 \times 10^9/L$. 2 cases with Behcet's disease and 2 cases with Crohn disease showed improvement of clinical symptoms. Erythema of 1 case with pemphigus erythematosus was completely cured, and was negative with both direct and indirect immunofluorescence tests. No transplantation-related death occurred. **Conclusion** The transplantation of purified autologous peripheral blood CD34⁺ cell can be an alternative choice for the treatment of various autoimmune diseases.

Key words: autoimmune diseases; peripheral blood stem cell transplantation; CD34⁺ cell

自身免疫性疾病(AID)是机体对自身抗原产生免疫应答,形成自身抗体或自身致敏淋巴细胞,造成组织器官病理损伤和功能障碍的一组疾病。目前,临床上常采用非特异性的免疫抑制剂作为其常规治疗手段,但部分患者经常规治疗效果不理想,需要寻求新的治疗途径以提高其生存质量及长期生存时间。随着造血干细胞移植技术的逐渐成熟,造血干细胞移植除治疗恶性血液病、实体肿瘤外,也成为治疗 AID 的新手段。本科 2007~2010 年对 14 例难治性 AID 患者行自体纯化 CD34⁺ 细胞移植治疗,取得较好的疗效,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 14 例患者中,男 3 例,女 11 例,中位年龄 29 岁(6~48 岁)。系统性红斑狼疮(SLE)4 例,其中 2 例合并肾

脏损害;特发性血小板减少性紫癜(ITP)5 例,白塞病 2 例,克罗恩病 2 例,红斑型天疱疮 1 例。14 例患者均接受过正规的糖皮质激素或免疫抑制剂治疗,但病情不能控制或者药物不能减量。

1.2 方法

1.2.1 自体外周血干细胞的动员、采集、纯化、冻存 动员方案采用环磷酰胺(CTX)+重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF):CTX 3~4 g/m²,分 2 d 输注;在外周血白细胞降至低谷并开始回升时予以 G-CSF 5~10 μg/kg·d 皮下注射,当单个核细胞大于 $5 \times 10^9/L$ 时开始采集。血细胞分离机为 Baxter CS3000 plus,循环血量为 2~3 倍体循环量,采集 1~2 次,将采集到的干细胞通过 CliniMACS CD34⁺ 细胞分选仪纯化,获得

足够数量的 CD34⁺ 细胞(CD34⁺ 细胞大于 2×10⁶/kg), 然后将其用保养液配置, 冻存于-80℃ 冰箱中。

1.2.2 预处理方案 8 例患者选择了氟达拉滨(FDB)+抗胸腺细胞球蛋白(ATG)+CTX 方案:FDB 30 mg/m², 使用 5 d; ATG 5 mg/kg, 使用 4 d; CTX 50~60 mg/kg, 使用 2 d。3 例患者选择了 ATG+CTX 方案:ATG 5 mg/kg, 使用 4 d; CTX 50~60 mg/kg, 使用 2 d。1 例患者本拟采用 ATG+CTX 方案, 但由于输注 ATG 过程中出现心律失常、血压下降, 故更换为 FDB+CTX 方案:FDB 30 mg/m², 使用 5 d; CTX 50~60 mg/kg, 使用 2 d。1 例患者选择了利妥昔单抗+ATG+CTX 方案:利妥昔单抗 375 mg/m², 使用 1 d; ATG 5 mg/kg, 使用 4 d; CTX 50~60 mg/kg, 使用 2 d。1 例患者选择了利妥昔单抗+FDB+CTX 方案:利妥昔单抗 375 mg/m², 使用 1 d; FDB 30 mg/m², 使用 5 d; CTX 50~60 mg/kg, 使用 2 d。

1.2.3 支持治疗及并发症的预防 患者于入层流病房前 1 周开始口服肠道净化药物(氟康唑、复方磺胺甲噁唑、诺氟沙星, 小儿将诺氟沙星换为阿莫西林), 予以 1:2 000 醋酸洗必泰药浴后入层流病房, 行颈内静脉或肘静脉插管。大剂量 CTX 后予以美司钠预防出血性膀胱炎。血红蛋白小于 60 g/L 或贫血症状严重时予以红细胞悬液输注。血小板小于 20×10⁹/L 或有活动性出血时予以血小板输注。回输自体造血干细胞后 2 d 即开始予以 G-CSF 促进造血重建。

1.2.4 疗效判定 观察患者移植后造血重建情况、细胞免疫及体液免疫功能恢复情况, 将患者移植前后的临床症状、体征, 实验室检查进行对照。对于 SLE 患者移植前后均采用系统性红斑狼疮疾病活动指数(SLEDAI)评分^[1]。对于克罗恩病患者采用克罗恩病活动指数(CDAI)评分。

2 结 果

2.1 外周血干细胞动员、采集及分选 14 例患者于化疗后 10~15 d 予以 G-CSF 动员, 13 例采集 2 次, 1 例采集 1 次, 采集外周血单个核细胞中位数为 9.9×10⁸/kg[(5.4~15.5)×10⁸/kg], CD34⁺ 细胞中位数 6.27×10⁶/kg[(4.3~9.8)×10⁶/kg]。经 CliniMACS CD34⁺ 分选仪分选后, 得到 CD34⁺ 细胞中位数 3.1×10⁶/kg[(2.0~6.3)×10⁶/kg], CD34⁺ 细胞的纯度为 96.5%(93%~99.1%), CD34⁺ 细胞回收率为 80%(64%~89%)。

2.2 造血重建情况 14 例患者均成功造血重建。白细胞于(4±2)d 降至低谷, 持续 3~8 d 血象开始回升。中性粒细胞绝对计数(ANC)>0.5×10⁹/L 的时间为(10±3)d。血小板大于 20×10⁹/L 的时间为(25±18)d。

2.3 并发症及治疗 14 例患者均有轻重不一的恶心、呕吐症状, 予以对症处理后好转, 其中有 9 例出现发热(38~40℃)。8 例考虑感染所致, 其中 7 例无明确感染灶, 1 例为肛周感染, 予以广谱抗菌剂抗感染治疗好转。另 1 例发热系预处理输注 ATG 所致, 予以对症处理后体温降至正常。1 例患者出现肝功能损害, 予以保肝治疗痊愈。1 例患者出现皮肤黏膜出血, 予以输注血小板、止血治疗后逐渐好转。未出现间质性肺炎、巨细胞病毒感染、肝静脉闭塞综合征、出血性膀胱炎。无移植相关死亡发生。

2.4 疗效观察 全部病例随访至 2011 年 3 月, 随访时间 6~40 个月。4 例 SLE 患者, 移植后临床症状、实验室检查、SLE-DAI 评分均较前明显改善, 见表 1。5 例 ITP 患者, 4 例血小板于移植后 10~60 d 升至正常, 1 例患者大于 50×10⁹/L, 但未升至正常范围[(100~300)×10⁹/L]。2 例白塞病患者治愈, 临床症状减轻, 溃疡数目减少, 红细胞沉降率明显下降, 针刺反应不明显; 2 例克罗恩病患者腹痛、腹泻、贫血症状明显缓解,

体质量较移植前分别增加 20%、30%, CDAI 评分均小于 10 分, 定期复查, 无复发症状。1 例红斑型天疱疮患者, 移植后皮疹完全消失, 定期复查直接免疫荧光实验及间接免疫荧光实验均阴性。

表 1 SLE 患者移植前后各项指标的变化情况

组别	病例 1		病例 2		病例 3		病例 4	
	移植前	移植后	移植前	移植后	移植前	移植后	移植前	移植后
24 h 尿蛋白	3.0	0.12	2.5	0.1	0	0	0	0
ANA	1:320	阴性	1:320	阴性	1:320	阴性	1:320	1:160
dsDNA 抗体	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
Sm 抗体	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
核小体抗体	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
C3(g/L)	0.64	1.25	0.62	1.34	0.65	0.93	0.7	1.3
C4(g/L)	0.12	0.25	0.28	0.4	0.11	0.37	0.09	0.17
SLEDAI 评分	20	0	19	0	22	3	24	4

3 讨 论

自身免疫性疾病可累及全身各个系统, 引起多器官、多系统功能障碍, 严重威胁患者生命, 有较高的病死率及致残率。AID 据统计约累及 5% 的人群^[2], 目前临床上常采取非特异性免疫抑制剂作为主要治疗手段, 但该治疗方法仅能缓解临床症状, 不能根治疾病, 对于重症及复发难治性 AID, 目前仍缺乏理想的治疗方法, 且预后差。造血干细胞移植最初用于治疗恶性血液病及实体瘤, 但学者们发现, 在造血干细胞移植治疗血液病合并自身免疫性疾病时, 血液病在完全缓解的同时 AID 也明显好转或缓解^[3]。由此推测, 造血干细胞移植具有免疫摧毁和免疫重建的作用^[4-5], 为治疗 AID 提供了新的途径。

造血干细胞移植依据干细胞来源分为自体造血干细胞移植及异基因造血干细胞移植。异基因造血干细胞移植是有望治愈 AID 的理想方式, 但由于其来源受限, 易发生移植物抗宿主病, 高龄患者不能耐受, 移植死亡率高达 15%~40%, 而自体造血干细胞移植相关死亡率仅为 1%~5%, 故自体造血干细胞移植目前仍为治疗 AID 的优先选择^[6]。自体外周血干细胞移植与自体骨髓移植相比具有采集方便、患者无需麻醉、痛苦小、移植后造血及免疫功能恢复快等优点, 成为目前最常用的移植手段。

造血干细胞移植治疗 AID 近期疗效较好, 但由于具有一定的复发率, 影响了其远期疗效^[7-8]。研究显示, 移植中 T 淋巴细胞与移植后疾病复发有关, 去除 T 细胞可降低移植后复发率, 但去除 T 细胞越彻底, 后期引起真菌、病毒感染及淋巴细胞增殖性疾病发生率越高^[9]。作者通过 CliniMACS 对外周血干细胞进行 CD34⁺ 细胞纯化, 并在预处理方案中加用 ATG 以去除大部分 T 细胞, 以期降低复发, 提高移植的远期疗效。14 例患者在移植后并未出现免疫重建延迟、严重感染等情况, 安全性得到初步肯定, 但其远期疗效的肯定需继续随访及进一步前瞻性研究进行证实。

利妥昔单抗是一种 CD20 单克隆抗体, CD20 在各型 B 细胞上均有表达, 利妥昔单抗通过与 CD20 抗原结合, 可抑制 B 细胞增生, 促进 B 细胞凋亡。目前利妥昔单抗已被用于治疗某些 AID(如 ITP、天疱疮), 并取得了较好的疗效^[10-12]。故作者在 1 例 ITP 及 1 例红斑天疱疮患者预处理方案中加用了利妥昔单抗以加强移植疗效。2 例患者均获得了完全缓解, 并未发生重症感染、淋巴细胞亚群倒置、免疫重建缓慢等情况, 提示加用利妥昔单抗的预处理方案安全有效, 可进一步扩大运用。

14 例患者造血均顺利重建, 移植相关死亡率 0%, 所有患

者在移植后病情均得到控制,部分甚至得到治愈,在随访期间未见复发,取得了较好的总体疗效。由此可见,自体 CD34⁺ 细胞移植不失为治疗难治性 AID 安全有效的手段。但由于目前尚未确定可获得长期安全、稳定临床效应的最佳移植方案,故还需进行多中心、多病例的临床研究与观察以进一步探讨。

参考文献

[1] Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, et al. Derivation of the SLEDAI, a disease activity index for lupus patients, the committee on prognosis studies in SLE[J]. Arthritis Rheum, 1992, 35(6): 630-640.

[2] Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases[J]. N Engl J Med, 2001, 345(5): 340-350.

[3] Baldwin JL, Storb R, Thomas ED, et al. Bone marrow transplantation in patients with gold-induced marrow aplasia[J]. Arthritis Rheum, 1977, 20(5): 1043-1048.

[4] Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation; an evolving target[J]. Bone Marrow Transplant, 2005, 35(9): 835-838.

[5] Tyndall A, Fassas A, Passweg J, et al. Autologous haemopoietic stem cell transplants for autoimmune diseases feasibility and transplant related mortality[J]. Bone Marrow transplantation, 1999, 24(7): 729-734.

[6] Burt RK, Patel D, Thomas J, et al. The rationale behind autologous autoimmune hematopoietic stem cell transplant conditioning regimens: concerns over the use of total-body irradiation in sys-

temic sclerosis[J]. Bone Marrow Transplant, 2004, 34(9): 745-751.

[7] Tyndall A, Koike T. High dose immunoablative therapy with hematopoietic stem cell support in the treatment of severe autoimmune disease: current status and future direction[J]. Intern Med, 2002, 41(8): 608-612.

[8] Jayne D, Passweg J, Marmont A, et al. Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2004, 13(3): 168-176.

[9] Adkins DR, Abidi MH, Brown RA, et al. Resolution of psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia; late complications of therapy[J]. Bone Marrow Transplant, 2000, 26(11): 1239-1241.

[10] Shanafelt TD, Madueme HL, Wolf RC, et al. Rituximab for immune cytopenia in adults; idiopathic thrombocytopenic purpura, autoimmune hemolytic anemia and Evans syndrome[J]. Mayo Clin Proc, 2003, 78(11): 1340.

[11] Arnold DM, Dentali F, Crowther MA, et al. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Ann Intern Med, 2007, 146(1): 25-33.

[12] Musette P, Mouquet H, Jacquot S, et al. Study of the B and T lymphocyte responses in pemphigus patients treated by anti CD20 immunotherapy (Rituximab) [J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(3): S23.

(收稿日期: 2011-03-07)

(上接第 1159 页)

者 23 例, 其中双次自体造血干细胞移植无病生存 13 例(占 65%), 复发 7 例(占 35%)。单次自体移植无病生存 10 例(占 45.5%), 复发 12 例(54.5%)。

3 讨论

异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)是目前急性髓细胞白血病治疗的最有效方法, 它的预处理能将肿瘤细胞负荷降至尽可能低的程度, 移植后的移植物抗白血病效应可进一步清除患者体内的恶性细胞, 提高移植的疗效。但 allo-HSCT 存在植入失败率高、移植并发症发生高及致死性感染率高、移植相关死亡率高等风险^[1-2]。仅仅通过常规化疗无法彻底清除体内的恶性细胞, 在长期维持化疗后可能诱导产生耐药细胞。双次自体造血干细胞移植具有体内净化作用, 在恶性血液病治疗上疗效显著优于长期大剂量化疗和单次自体造血干细胞移植, 且自体造血干细胞移植具有移植后并发症少、安全性高、移植相关费用低等优点。但自体造血干细胞移植不能彻底地清髓, 具有复发率较异基因造血干细胞移植高等缺点。故移植前预处理是自体造血干细胞移植的重要环节之一, 有效的预处理方案对于降低移植相关死亡率及复发率, 提高患者的无病生存率十分关键^[3-8]。

FBA 方案(氟达拉滨、白消安、阿糖胞苷)是一种减低剂量的预处理方案, 清髓作用较差, 不能更彻底地清除白血病细胞。本科在 FBA 预处理方案的基础上加用了伊达比星。伊达比星能加强清髓作用, 减少移植后复发。从本科目前的 42 例急性髓细胞白血病来看, 共死亡 18 例, 均为移植后复发死亡, 减低移植后复发仍然是自体移植需要解决的关键问题。从研究结

果来看, 双次自体移植的复发率明显低于单次移植, 因此, 双次自体造血干细胞移植可以作为没有找到合适供者或者经费困难患者的选择。

参考文献

[1] Chen XH, Zhang C, Zhang X, et al. Role of antithymocyte globulin and granulocyte-colony stimulating factor-mobilized bone marrow in allogeneic transplantation for patients with hematologic malignancies[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2009, 15(2): 266-273.

[2] Chen XH, Gao L, Zhang X, et al. HLA-haploidentical blood and bone marrow transplantation with anti-thymocyte globulin; long-term comparison with HLA-identical sibling transplantation[J]. Blood cell Mol Dis, 2009, 43(1): 98-104.

[3] 李天舒, 徐建民. 自体造血干细胞的体外净化进展[J]. 中国临床医学, 2002, 9(1): 93-94.

[4] 张之南, 单渊东. 协和血液病学[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 159-176, 349-366.

[5] 张伯龙, 黄文荣, 达万明, 等. 双次自体造血干细胞移植治疗恶性血液病的临床分析[J]. 中华医学杂志, 2002, 8(2): 123-126.

[6] 张之南, 沈悌. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 106-116.

[7] 郑冬, 张国材, 谭恩勋, 等. 双次自体造血干细胞移植治疗恶性血液病的临床分析[J]. 癌症, 2001, 20(6): 644-646.

[8] 张晋琳. 急性髓系白血病治疗进展[J]. 实用医院临床杂志, 2010, 7(22): 46-50.

(收稿日期: 2011-03-07)