

• 短篇论著 •

HLA联合KIR配型选择供者成功移植治疗复发难治急性白血病并文献复习

罗荣牡 杜振兰 刘全华 张晓妹 王娅 达万明

【摘要】 目的 探求杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)基因配型在选择亲缘单倍体供者中的作用及进展期急性白血病挽救性移植的个性化预处理方案的选择。方法 回顾性分析我科室1例进展期急性髓性白血病行单倍体造血干细胞移植的病例,对其单倍体供者的选择、个性化预处理方案、移植后预防复发及移植预处理毒性、急性移植物抗宿主病(GVHD)及白血病等情况,并对KIR基因在供者选择中的作用及挽救性移植病例的个性化预处理方案选择的依据进行文献复习。结果 随访1年,该患者获得完全植入,端串联重复序列(STR)-PCR验证为完全供者型,+19 d白血病植活,+38 d血小板脱离输注。无II~IV度GVHD及广泛型慢性GVHD发生,白血病持续缓解,白血病残留MLL-PCR基因持续为0。结论 对于进展期白血病接受单倍体造血干细胞移植作为挽救性移植,清肿瘤性个性化方案及选择KIR配型不合的单倍体供者值得探讨。

【关键词】 受体, KIR; 造血干细胞移植; 白血病, 髓样, 急性; 复发; 单倍体

对化疗无效的白血病患者来说,未缓解状态强行进行移植,复发是其主要的死亡原因。如何减少移植后复发率成为目前研究的热点问题。本文报道1例以复发耐药的进展期急性白血病行挽救性单倍体造血干细胞移植的病例,并对相关问题进行文献复习。

一、病例资料

患者女,27岁,因面色苍白、乏力、月经量增多1个月入院。2012年6月患者无明显诱因出现面色苍白,四肢乏力,月经量增多,查全血细胞分析提示:血红蛋白66 g/L,白细胞 $3.5 \times 10^9/L$,血小板 $30 \times 10^9/L$,行骨穿查骨髓细胞形态学:骨髓增生明显活跃,粒红比为34:1,粒系占85%,粒系原始细胞占32%,免疫组化提示过氧化物酶染色阳性,非特异性酯酶(NSE)(-)氟化钠抑制试验为(-),骨髓活检:骨小梁前体细胞弥散浸润,Gomori(+)(~)(++),免疫分型:髓系细胞占69.55%, $CD10^+$ 成熟粒细胞比例减低, $CD15$ 表达减弱,17%细胞表达 $CD123$ 、 $CD117$ 、HLA-DR表型偏幼稚,单核细胞占0.68%,有核红细胞占2.13%,比例减少, $CD105^+$ 细胞比例减低, $CD34^+CD117^+$ 幼稚细胞7.87%, $CD34$ 表达减弱,部分细胞表达 $CD2$,表型异常,比例偏高。融合基因检查:MLL/

ELL=12.4%,WT1=40.3%。BCR/ABL、CBF β /MYH11、FLT3-ITD、AML1/ETO、AML1/MDS1、TLS/ERG、DEK/CAN、SET/NUP214、TEL/PDGFB、NPM1-A、NPM1-B、NPM1-D均为阴性;染色体:46,XX[19]/45,X,-X,del(17)t(X;17)(p10;q10)^[1]。诊断为急性髓性白血病M2。给予MA(米托蒽醌2 mg d1~9,阿糖胞苷100 mg d1~9)方案化疗,化疗后复查骨髓提示形态学:原、早幼粒细胞占21%,免疫残留:幼稚细胞占18.66%(表型为: $CD34st^+CD117^+CD33^+CD13dim^+CD2part^+HLA^-DR^-$),融合基因MLL/ELL=1.3%,未缓解。继续给予MA(米托蒽醌10 mg d1~4,阿糖胞苷500 mg d1~4)后骨髓细胞形态学提示骨髓增生活跃,原始细胞占2%,免疫残留:幼稚细胞占22.51%表型为: $CD34st^+CD117^+CD33^+CD13dim^+CD2part^+HLA^-DR^-$),融合基因MLL/ELL=0.75%。提示细胞形态学达到缓解,但是免疫残留仍未缓解。第三个化疗给予AA方案(阿柔吡星20 mg d1~8,阿糖胞苷80 mg q12 h d1~8)血象恢复后复查骨髓提示骨髓细胞形态学:骨髓增生活跃,原始细胞占4%,免疫残留幼稚细胞占9.6%表型为: $CD34st^+CD117^+CD33^+CD13dim^+CD2part^+HLA^-DR^-$)融合基因检查:MLL/ELL=0.67%,WT1=15%,仍为骨髓形态学缓解,但是流式细胞学分析仍未缓解,第四个化疗给予HAA方案化疗(高三尖杉2 mg d1~5,阿糖胞苷70 mg q12 h d1~5,阿柔吡星20 mg d1~5),骨髓回复后复查骨髓:骨髓细胞心

态学提示:增生活跃,原始细胞占2%,免疫残留3.1% CD34⁺CD117⁺CD33⁺CD13⁻CD45dim⁺HLA⁻DR⁺)融合基因 MLL/ELL=5.2%提示达到形态及流式的完全缓解。给予腰穿联合鞘注2次未见异常。后再次给予MA(米托蒽醌10 mg d1~4,阿糖胞苷500 mg d1~4)方案化疗并且准备造血干细胞移植前查体,复查骨髓提示原始细胞占28%,免疫残留提示43.23%的白血病细胞,提示白血病复发,再次给予DAE(柔红霉素6 mg d1~3,阿糖胞苷70 mg d1~5,依托泊苷100 mg d1~5),化疗后复查骨髓提示原始细胞占56%,提示再次诱导无效,上述化疗过程中出现过急性阑尾炎及念珠菌性肠炎,经过治疗均好转。为进一步治疗于2013年4月转入我科室后,再次进行MICM的诊断,确诊为急性髓系白血病M2,当时骨髓细胞形态学结果:原始粒细胞占60%,我科在洁净室给予再次化疗:HAA方案,(Har4 mg d1~5, Acla 20 mg d1~5, Arac-c 2.0 g/m², q12 h, d6~7)化疗粒缺时期患者出现皮肤软组织感染,复查骨髓提示骨髓原始细胞55%,提示化疗无效,为争取生存机会,经过患者家属同意,决定强行进行单倍体移植移植。患者无非血缘供者,其父母KIR基因配型情况见表1,HLA配型见表2。

预处理方案:全身放疗(TBI)200 cGy bid×3 d,共1200 cGy,前13 d~前11 d;去甲氧柔红霉素(IDA)10 mg,前13 d~前12 d;重组人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)5 μg/kg,前10 d~前6 d;磷

酸氟达拉滨(Flu)30 mg/m²,前10 d~前6 d;环磷酰胺(CTX)1.0 mg/m²,前5 d~前4 d;美法仑(Mel)140 mg/m²,前3 d;抗人T淋巴细胞免疫球蛋白(ATG-F)5 mg·kg⁻¹·d⁻¹,前5 d~前2 d。

移植方式:骨髓联合外周血干细胞。移植抗宿主病(GVHD)预防:非血缘脐带血HLA3/6相合输注(第1天,骨髓干细胞输注前4 h),短程甲氨蝶呤+吗替麦考酚酯+他克莫司。

供者动员:重组人粒细胞集落刺激因子(格拉洛赛特)7 μg·kg⁻¹·d⁻¹,第4天采集骨髓血干细胞,第5~6天采集外周血干细胞。输注细胞数量:单个核细胞(MNC)10.64×10⁸/kg, CD34⁺:1.64×10⁶/kg。

环境保护:预处理开始至白细胞植活全部在百级洁净仓内进行。

二、结果

1. 移植预处理毒性:移植后1 d开始出现消化道黏膜溃疡,表现为口腔大面积溃疡,疼痛伴阴沟肠杆菌口腔感染,剧烈腹泻、伴有轻度腹痛,不能进食。给予肠外营养28 d,并给予敏感抗生素抗感染治疗,患者消化道黏膜溃疡好转。预处理过程中无其他脏器不良反应发生。

2. 造血重建:患者于移植后19 d中性粒细胞>0.5×10⁹/L,提示造血重建,38 d脱离输注血小板,提示血小板植活。28 d复查骨髓:骨髓增生活跃,未见白血病细胞。流式细胞学检查未见异常白细胞。MLL基因RT-PCR检查为STR-PCR检测提示:

表1 供受者KIR配型结果

病例	性别/年龄	KIR ligands	KIR Haplotype	KIR-Ligands 供受者相合状态	KIR 分型结果
患者	女/26岁	Bw6/Bw6 C1/C1	A/A,1a KIR	3DL1-Bw4 missing	2DL1,2DL3,2DL4,2DP1,2DS4*all full length, 2DS4*deletion Ex.5, 2DS4 full length Ex.5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DP1
患者父亲	男/52岁	Bw6/Bw4-80I C1/C1	A/B,4a KIR	2DL1-C2 missing	2DL1,2DL3,2DL4,2DL5,2DP1,2DS1,2DS3,2DS4*all full length, 2DS4*deletion Ex.5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DP1,3DS1
患者母亲	女/49岁	Bw6/Bw6 C1/C1	A/A,1a KIR	2DL1-C2 missing	2DL1,2DL3,2DL4,2DP1,2DS4*all full length, 2DS4 full length Ex.5, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DP1

表2 供受者HLA配型

病例	性别/年龄	A-allele 1&2	B-allele 1&2	C-allele 1&2	DRB1-allele 1&2	相合位点
患者	女/26岁	02:01 33:03	40:01 40:01	03:04 07:02	04:05 12:01/10	
患者父亲	男/52岁	02:01 02:01	40:01 51:01	03:04 14:02	09:01 12:01/10	4/8
患者母亲	女/49岁	11:01 33:03	40:01 40:01	07:02 07:02	04:05 09:01	5/8

完全供者型。提示植入成功,造血重建,白血病得到初步控制。

3. 移植并发症:移植后无病毒激活,无GVHD表现,无合并其他严重的移植相关并发症,生活质量良好。

4. 移植后预防复发措施:移植后50 d开始免疫抑制剂减量,至100 d,患者环孢素浓度维持在20~50 ng/ml,但是未见明显GVHD表现。

移植后3个月输注供者外周血静态淋巴细胞 1×10^6 /kg,观察1个月无GVHD表现。移植后5个月再次输注供者外周血静态淋巴细胞 1×10^7 /kg,观察1个月,无GVHD表现。

5. 移植后白血病情况:移植后每月行骨髓穿刺,骨髓细胞形态学缓解,流式细胞学检查微小残留为0,RT-PCR检查MLL基因为0。目前移植后1年,患者病情稳定,血象正常,骨髓完全缓解,开始轻体力工作。

三、讨论

近几十年来,虽然化疗在治疗白血病中取得很大进展,约70%的急性髓细胞白血病(AML)和80%的急性淋巴细胞白血病(ALL)能达到完全缓解(CR),但仍有20%~30%初治病例不能达到CR(难治性白血病),而且相当一部分达CR的患者最终复发。这一部分患者在各种化疗药物不能达到缓解的情况下,为了挽救生命,一部分人接受了强行挽救性异基因造血干细胞移植。但是疗效均不理想,长期生存率大部分均在30%以下,最终仍死于疾病的复发。对于难治/复发白血病的治疗,挽救性化疗虽然能使部分患者达到CR,但缓解率仅10%~20%,中位生存期4个月,1年总体生存率<10%,根治机会很小。周倩兰等^[1]回顾性分析了17例未缓解的难治/复发白血病病例异基因造血干细胞移植术后的2年无病生存率(DFS)仅为35%,复发仍是死亡的主要原因。这说明对于无法达到再次缓解的难治/复发白血病病例来说,异基因造血干细胞移植仍为有望达到治愈的手段,但是如何降低这种患者移植后复发仍为目前的难点和热点问题之一。因此,降低移植后复发率是提高移植后DFS的关键,降低移植后的复发可以通过两个方面的手段来加强。

1. 通过移植物抗白血病效应(GVL)清除白血病细胞。GVL效应是HSCT根治白血病最主要的机制,然而由于GVL与GVHD有一些共同的病理机

制,二者常联系在一起。必须在增强GVL效应同时减轻GVHD,才有可能降低移植后复发率,提高DFS。对于增强GVL效应的手段主要有供者淋巴细胞输注(DLI)和移植后同种反应性NK细胞效应。

(1) DLI: DLI的疗效随原发病及其疾病状态的不同有显著差异。移植后复发的DLI治疗疗效在AML为20%~30%,在ALL不足20%,但预防性DLI可能增加其疗效,来自北京大学人民医院血研所的单倍体造血干细胞移植治疗96例难治/复发急性白血病患者资料分析^[2],预防性DLI与否,患者HSCT后预期3年OS率分别为38.0%和11.8%($P=0.001$),提示预防性DLI可降低复发、提高生存。来自一项123例病例的多中心的研究^[3],亦证实对于进展期的急性髓性白血病行异基因造血干细胞移植后,接受移植后预防性DLI可以显著提高生存率。在本例病例中,患者移植后3个月和5个月分别接受了低剂量的供者淋巴细胞输注作为预防性DLI,并且未见明显的GVHD被诱发。

(2) 同种反应性NK细胞效应:可有效清除AML白血病细胞发挥GVL,同时还可以清除受者来源的T淋巴细胞和DC,促进植入和减少GVHD;单倍体相合去T细胞造血干细胞移植后存在同种反应性NK细胞的高危AML的复发率(17%)远低于无同种反应性NK细胞组(79%),无事件生存率(52%)远高于后者(7%)^[4]。KIR是主要分布在NK细胞及部分活化T细胞表面的一类受体,分为激活性和抑制性两类受体,通过识别靶细胞表面的MHC-I类分子,传递活化和抑制信号,调节NK细胞的功能,当NK细胞与靶细胞之间KIR-MHC分子相合时,主要是抑制性KIR传递抑制信号从而抑制NK细胞对靶细胞的破坏和杀伤;而当两者之间存在KIR-MHC分子的不相合时,则KIR的信号传递活化NK细胞功能,溶解靶细胞^[5]。

患者的HLA-C位点根据KIR的抑制性受体分为C1组及C2组,C1组由Cw1、3、7、8组成,c2组由Cw2、4、5、6组成,根据HLA-c分子的表达情况可分为3种可能,即C1与C2均出现的杂合型C1C2,只出现一种的为纯合型C1C1和(或)C2C2,HLA-B可分为两组Bw4与Bw6,抑制性KIR3DL1的配体为Bw4,按Bw4出现与否分为Bw4+与Bw4-^[6]在异基因HSCT时宿主源性APC可提呈主要和次要组织相容性抗原给供者T细胞启动GvHD,而供者NK细胞可通过KIR一配体不相合

性促发供者NK细胞产生异源反应活性,清除宿主APC降低GvHD。同样激活的NK细胞对受者残留肿瘤细胞产生较强的GVL效应,这样有助于提高移植效果,降低移植后的复发率,对移植的影响是有利的。Ruggeri等^[7]2002年分析了112例高危的AML,结果发现KTR一配体相合的受者中,5年复发率为75%,植入失败率为5%,GvHD>II度的发生率为13.7%,而KIR一配体不相合的AML患者中,其复发率、植入失败率及GvHD>II度发生率均为0,而且两组5年生存率分别为5%和60%,Ruggeri等^[8]2007年又报道了112例高危的AML,在半相合BMT中,异源激活的NK细胞可以控制白血病复发、促进移植存活、改善生存。对行单倍体相合移植的AML患者的回顾性分析表明,大约90%的具有供者NK细胞异源反应性的移植比无供者NK细胞异源反应性的移植具有明显的移植优势。Velardi等^[9]对85例于1993至2003年间接接受单倍体相合HSCT的进展期AML患者分析发现,接受NK异源反应性供者移植可提高移植疗效且不增加发生GVHD的危险性,并能较好地控制AML的复发。本例造血干细胞移植中,患者的父母均为半相合亲缘供者,KIR-Ligands供患者相合状态的分析中,患者缺乏父亲的两个抑制性KIR的配体,即3DL1-Bw4 missing和2DL1-C2 missing,而患者缺乏母亲的一个抑制性KIR配体2DL1-C2 missing。提示在移植后的同种异体NK细胞反应中,父亲作为供者比母亲要强。在HLA配型均为单倍型的情况下,故我们选择了父亲作为单倍型供者。

2. 在造血干细胞的预处理阶段尽可能去除白血病细胞、降低肿瘤负荷:即在预处理阶段,不但要做到清髓,而且要尽可能做到清肿瘤。在异基因造血干细胞移植中,常规的预处理方案为两大类:TBI/Cy和BU/Cy,但是常规的预处理方案重点在于清髓,促进植入,对清除肿瘤细胞针对性较小,预处理方案的个体化选择,原则是选择该患者既往化疗中证实为敏感的或者尚未使用过的一线或者二线药物,并且加大剂量,增加针对肿瘤清除的力量,针对这些情况,达万明等^[10]提出并实施了清肿瘤性异基因造血干细胞移植(tumorablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, TAHSCT)的新策略,其内容贯穿于移植技术全过程的各个环节,但主要为应用个体化清肿瘤性预处理方案和加强移植后免疫治疗。临床实践证实移植后复发的白

血病细胞几乎全系源自患者移植前本身的白血病细胞,其中半数患者以髓外部位复发开始,特别是那些对化疗不敏感或栖居在髓外“庇护所”中的白血病干细胞。对本例患者,移植前大部分适用于髓系白血病的化疗药物均提示为耐药,且在化疗过程中出现心肌缺血表现,在预处理方案的设计中面临严重的挑战。首先,我们剔除患者无效的化疗药物后建立预处理的基本框架为TBI/CY,但是患者多次出现心肌缺血的变化,恐难以承受大剂量CTX对心脏的打击,我们将其减量至1.0 g/d,前5 d~前4 d,TBI对白血病无耐药表现,考虑使用12 Gy,为减少不良反应,分成6次照射,另外,考虑大剂量阿糖胞苷对患者无效,决定不使用;福达拉滨毒副作用较小,且有促进植入等作用,决定纳入预处理方案 $30\text{ mg/m}^2 \times 5\text{ d}$;患者柔红霉素耐药,但是去甲氧柔红霉素尚未使用过,且两者的耐药谱并非完全一致,且去甲氧柔红霉素心脏毒副作用较小,所以加入去甲氧柔红霉素 $10\text{ mg} \times 2\text{ d}$,加入G-CSF $5\text{ }\mu\text{g/kg} \times 5\text{ d}$,用来动员白血病干细胞进入循环,加强化疗药物对白血病细胞的敏感性,类似白血病预激方案在难治性白血病的化疗方案中,预激方案获得的优秀的疗效,李玲等^[11]采用改良预激方案CHAG治疗7例难治复发白血病,6例获得了完全缓解。考虑到患者耐药情况,文献报道^[12]湘雅医院曾经使用美法仑加环磷酰胺治疗难治性急性白血病,总有效率45.4%。决定移植前第3天加入对髓系白血病细胞有一定作用的美法仑 $140\text{ mg/m}^2 \times 1\text{ d}$,ATG-F的用量采用 $5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 4\text{ d}$ 。纵观这个预处理方案,心脏毒性药物减少,加大了抗白血病药物,黏膜毒性将体现在TBI和美法仑联合上,是本方案的重点风险所在。这在以后的预处理过程中得到了验证,患者出现了严重的消化道黏膜溃疡。

在本例患者的处理中,首先利用KIR-HLA配体的差异选择移植后可能GVL效应较强的供者,对患者的预处理方案进行个体化处理,考虑到患者的心脏缺血及耐受性较差的表现,精简对患者无效或者心脏毒性大的化疗药物,选择安全有效的化疗药物进入预处理,用足对患者可能有效的TBI,整个过程中无心肝肾功能受损,虽然出现严重的消化道并发症,但是经过肠外营养及抗生素治疗有完全治愈。患者移植后得到两次预防性供者淋巴细胞输注来预防复发,并且早期减低免疫抑制剂的剂量,

诱导 GVL 效应, 患者移植后达到既没有复发, 也没有严重的 GVHD 表现的理想状态。患者目前为移植后 1 年, 无病生存, 生活质量良好。

本文成功完成 1 例复发难治急性髓性白血病的单倍体异基因造血干细胞移植, 并尝试 HLA 联合 KIR 选择供者, 个体化设计预处理方案并给予移植后行预防性 DLI, 获得了成功, 为探索难治/复发白血病异基因移植造血干细胞移植的更好疗效提供了一个案例, 进一步探索还有待更大样本的研究。

参 考 文 献

- [1] 周倩兰, 唐晓文, 孙爱宁, 等. 异基因造血干细胞移植治疗进展期难治性急性髓系白血病 17 例分析[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(4): 297-299.
- [2] 王昱, 刘代红, 刘开彦, 等. 单倍体异基因造血干细胞移植治疗难治/复发急性白血病患者疗效观察[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(11): 917-921.
- [3] Wang Y, Liu DH, Fan ZP, et al. Prevention of relapse using DLI can increase survival following HLA-identical transplantation in patients with advanced-stage acute leukemia: a multi-center study[J]. Clin Transplant, 2012, 26(4): 635-643.
- [4] Velardi A, Ruggeri L, Capanni M, et al. Impact of NK cell alloreactivity on mismatched haematopoietic transplantation: an update on donor selection criteria and on transplantation outcomes[J]. Blood, 2003, 102(11): 153A.
- [5] Ljunggren HG, Karre K. In search of the missing self: MHC molecules and NK cell recognition[J]. Immunol Today, 1990, 11(7): 237-244.
- [6] Thielens A, Vivier E, Romagné F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention[J]. Curr Opin Immunol, 2012, 24(2): 239-245.
- [7] Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants[J]. Science, 2002, 295(5562): 2097-2100.
- [8] Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value[J]. Blood, 2007, 110(1): 433-440.
- [9] Velardi A, Ruggeri L, Capanni M, et al. Immunotherapy with alloreactive natural killer cells in haploidentical haematopoietic transplantation[J]. Hematol J, 2004, 5 Suppl 3: S87-90.
- [10] Da Wanming, Da Yong. Tumorablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in the Treatment of High-risk and Refractory Leukemia-New Concepts and Clinical Practice[M]// Taner Demirer. In Innovation of Stem Cell Transplantation. In Tech, 2013: 257-271.
- [11] 李玲, 魏旭东, 陈琳, 等. 改良预激方案治疗难治性白血病疗效观察[J]. 白血病·淋巴瘤, 2013, 22(5): 308-310.
- [12] 申建凯, 卢汉波, 张广森, 聂惠. 用马法兰加环磷酰胺治疗难治性急性白血病[J]. 中华血液学杂志, 1996, 7(1): 39-40.

(收稿日期: 2013-12-30)

(本文编辑: 梁雷)

罗荣壮, 杜振兰, 刘全华, 等. HLA 联合 KIR 配型选择供者成功移植治疗复发难治急性白血病并文献复习 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8(5): 979-983.

中华医学会