

· 论 著 ·

自体纯化 CD34⁺ 细胞移植治疗特发性嗜酸性粒细胞增多症的临床研究

汤 亚, 张 曦*, 陈幸华[△], 彭贤贵, 孙爱华, 孔佩艳, 王庆余
(第三军医大学新桥医院血液科, 重庆 400037)

摘要:目的 总结国内首例自体纯化 CD34⁺ 细胞移植治疗特发性嗜酸性粒细胞增多症的经验。方法 对 1 例 36 岁特发性嗜酸性粒细胞增多症男性患者实施自体纯化 CD34⁺ 细胞移植, 观察造血重建及移植相关并发症, 探索该治疗手段的可行性。结果 移植后患者症状体征消失, 外周血嗜酸性粒细胞计数恢复正常; 中性粒细胞大于 $0.5 \times 10^9/L$, 血小板大于 $20 \times 10^9/L$ 的时间都为 +12d; +45d 内未观察到肝静脉闭塞病、肝肾功能损伤等移植并发症。结论 自体纯化 CD34⁺ 细胞移植为治疗特发性嗜酸性粒细胞增多症的有效手段。

关键词: 自体纯化 CD34⁺ 细胞; 特发性嗜酸性粒细胞增多; 造血干细胞移植

中图分类号: R557.3; R457.7

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)24-3125-02

Transplantation of highly purified autologous CD34⁺ cells from peripheral blood for treatment of HES

TANG Ya, ZHANG Xi*, CHEN Xing-hua[△], et al.

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

Abstract: Objective To explore the clinical effect and the safety for treatment of hypereosinophilia syndrome(HES) by transplantation of highly purified autologous peripheral blood CD34⁺ cells. **Methods** A 36 years male patient, with HSE, was treated with transplantation of highly purified autologous peripheral blood CD34⁺ cells in Xinqiao Hospital. Peripheral blood stem cells (PBSCs) were mobilized with G-CSF alone, CD34⁺ cells were enriched by CliniMACS. The high dose regimen was FAM conditioning regimen (fludarabine, mitoxantrone, cytosine arabinoside) and we observed the hematopoietic reconstitution and complications correlated with AHSCT. **Results** The purity and recovery of the CD34⁺ cell product were 99%, the mediumterm for neutrophil recovering to $\geq 0.5 \times 10^9/L$ and platelet $\geq 20 \times 10^9/L$ existed in 12d and 14d post transplant, without serious toxic reaction and complication found. **Conclusion** The transplantation of highly purified autologous CD34⁺ cells from peripheral blood is effective and safe for HES.

Key words: PBSCT; HES; hematopoietic stem cell transplantation

特发性嗜酸性粒细胞增多症在使用肾上腺皮质激素、免疫抑制剂等治疗效果欠佳者, 可考虑进行自体纯化 CD34⁺ 细胞移植。本科室对近期收治的 1 例特发性嗜酸性粒细胞增多症患者进行自体纯化 CD34⁺ 细胞移植取得成功, 现报道如下。

1 临床资料

1.1 病例介绍 患者, 男, 36 岁, 已婚。从事水泥厂工作 8 年。因眼睑、双下肢水肿 1 年, 嗜酸性粒细胞增多 8 月余, 于 2008 年 11 月 21 日到本院诊疗。2008 年 5 月患者出现发热、咳嗽、皮疹、颌下淋巴结肿大等症状, 查血常规: WBC $13.3 \times 10^9/L$, 嗜酸性粒细胞 0.45。骨髓象示: 嗜酸性粒细胞增多(占 40%)、浆细胞增多。颌下淋巴结活检: 反应性增生。激素(强的松大于 30mg/d po)治疗有效(但嗜酸性粒细胞计数不能恢复正常)。院外予以 α -干扰素、环磷酰胺、伊马替尼治疗病情反复。于 2008 年 11 月 21 日到本院查 WBC $12.9 \times 10^9/L$, Hb 119g/L, PLT $157 \times 10^9/L$; 嗜酸性粒细胞 0.433; 骨髓象示: 增生性骨髓象, 嗜酸性粒细胞比例增高(占 25%)。荧光免疫原位杂交 BCR/ABL 融合基因阴性。

1.2 移植前准备

1.2.1 常规检查 血型 A(D)。血常规: WBC $10.7 \times 10^9/L$, Hb 118g/L, PLT $274 \times 10^9/L$ 。白细胞分类: 嗜中性分叶粒细胞 0.50, 嗜酸性分叶粒细胞 0.22, 未见嗜酸性粒细胞, 多次直接抗人球蛋白试验(+++)。血清蛋白电泳: γ 球蛋白 64.2%, 免疫球蛋白 IgG 65 Iu/mL, IgE 510 Iu/mL。风湿系

列: 类风湿因子 225 Iu/mL; C 反应蛋白 107mg/L, T₃ 5.4 pmol/L, T₄ 23 Iu/mL, TSH 正常。尿常规: 蛋白质(+++), 肝功: 清蛋白 22.8g/L, 球蛋白 67.3 g/L; HBV DNA < 500copy/mL, CMV DNA < 1×10^3 copies/mL, TORCH; 巨细胞病毒抗体 IgG 弱阳性, 单纯疱疹病毒抗体 IgG 弱阳性。多次查大便常规及寄生虫、肾功、电解质、血糖、心肌酶谱、血沉均示正常。肿瘤标志物、抗核抗体谱、细胞核细胞质抗体谱、结核抗体、抗酸染色(痰)、其他病毒检测、梅毒、艾滋病检测、肝炎 10 项、PPD 皮试均示阴性。骨髓象示: 增生性骨髓象, 嗜酸性粒细胞比例增高(占 25%)。荧光免疫原位杂交 BCR/ABL 融合基因阴性。流式细胞术检测: 淋巴细胞占有核细胞 11.99%, CD3⁺ 细胞占淋巴细胞 87.94%, CD4⁺ 占淋巴细胞 8.17% CD8⁺ 占淋巴细胞 76.08%。

1.2.2 其他检查 心电图正常。腹部 B 超: 肝脏断面增大, 实质回声增多、增粗; 脾大; 双肾实质回声增多; 腹水。淋巴结 B 超: 双侧颈部、腋下、腹股沟区多发性淋巴结肿大。淋巴结活检: 反应性增生。胸部 CT: 纵隔及双侧腋窝淋巴结肿大, 双侧胸腔少许积液。

1.2.3 相关检查 眼科、耳鼻喉科、口腔科、肛肠科专科会诊无异常, 未发现慢性感染灶。

1.2.4 移植签字 多次与患者家属谈话交代移植的疗效与风险, 并于 2009 年 2 月 4 日签署《知情同意书》。

1.2.5 动员方案 2008 年 12 月 4 日拟行自体纯化 CD34⁺ 细

* 共同第一作者; [△] 通讯作者。

胞移植动员方案为环磷酰胺 3g 1~2d,患者血象最低降至 WBC $3.87 \times 10^9/L$, Hb 97g/L, PLT $85 \times 10^9/L$, 动员失败。化疗后 13d, 再次予以 MOED 方案(米托蒽醌 10mg 1d, 8mg 2~3d; 依托泊苷 0.1g 1~3d; 长春新碱 2mg 1d; 地塞米松 10mg 1~3d)动员。白细胞分类嗜酸性粒细胞计数正常。

1.2.6 采集情况 2009 年 1 月 12、13 日分别行外周血造血干细胞采集术,采集过程顺利。按照患者体重计算共采集 MNC: $19.73 \times 10^8/kg$, 经过 ClinMACS 分选后 CD34⁺ 细胞达 $2.7 \times 10^6/kg$ 。

1.3 移植实施

1.3.1 预处理方案 FMA(氟达拉滨 30mg/m², 米托蒽醌 10mg, 阿糖胞苷 1.5g/m²), 具体如下:(患者体质量 56kg, 身高 164cm, 体表面积 1.6m²)。-7d, 药浴入层流室, 行颈静脉插管术; -6d, 氟达拉滨 30mg/m² + 米托蒽醌 10mg + 阿糖胞苷 1.5g/m²; -5d, 氟达拉滨 30mg/m² + 米托蒽醌 10mg + 阿糖胞苷 1.5g/m²; -4d, 氟达拉滨 30mg/m² + 米托蒽醌 10mg + 阿糖胞苷 1.5g/m²; -3d, 氟达拉滨 30mg/m² + 阿糖胞苷 1.5g/m² + 抗胸腺细胞球蛋白 5mg/kg; -2d, 氟达拉滨 30mg/m² + 抗胸腺细胞球蛋白 5mg/kg; -1d, 休息; 01d, 自体纯化 CD34⁺ 细胞回输。

1.3.1 移植后主要并发症的防治

1.3.1.1 肝静脉闭塞病(VOD) 输注低分子右旋糖苷和复方丹参注射液。每周查 2 次肝功, 注意胆红素及转氨酶变化。

1.3.1.2 感染 CMV DNA 检测每周 1 次。预防 CMV 感染措施: 阿昔洛韦 0.25g/12h, 静滴, 至 +100d, 根据血象调整用量; 患者体温超过 38.5℃ 经验性使用广谱抗生素, 同时积极行血培养检查寻找病原菌。

1.3.1.3 其他移植并发症的处理 患者移植期间均常规使用还原谷胱甘肽、维生素 K₁、肌苷等药物保肝治疗; 昂单司琼镇吐; 质子泵抑制剂制酸; PLT $< 20 \times 10^9/L$ 时输注新鲜 PLT 共 400mL。

2 结果

2.1 血常规 移植+4d 白细胞降至 $0.14 \times 10^9/L$; 移植+12d 造血功能重建, 中性粒细胞大于 $0.5 \times 10^9/L$; PLT $> 20 \times 10^9/L$; 白细胞分类: 嗜中性幼稚粒细胞 0.16; 幼稚粒细胞 0.06; 嗜酸性粒细胞 0。

2.2 骨髓象 +38d 复查骨髓象提示增生明显活跃。

2.3 移植后并发症

2.3.1 感染 移植+3d 出现寒颤、高热, 体温 39℃, 立即给予头孢哌酮他唑巴坦钠抗感染 3d 后体温高峰逐渐下降, 亚胺培南抗感染持续使用 3d 后停药。

2.3.2 VOD 观察至移植+30d 未发生 VOD 临床症状。

2.3.3 其他并发症 移植过程中未出现肝、肾、心脏功能损害, 出血性膀胱炎等。

2.3.4 症状体征 患者+30d, 病情稳定。既往出现的畏寒发热、咳嗽咳痰、腹痛腹泻、皮疹、皮肤肿块、眼睑及双下肢水肿, 颌下淋巴结肿大等症状均消失。血清蛋白电泳: γ 球蛋白由 64.2% 下降至 24%; IgG 由 65 Iu/mL 下降至 20 Iu/mL; IgE 由 510 Iu/mL 下降至 400 Iu/mL; 直接抗人球蛋白实验(-), 复查胸部 CT、腹部 B 超、浅表淋巴结彩超均未见异常, 目前正在进一步临床观察中。

2.3.5 随访 目前为移植+90d 后, 复查血常规: WBC $5.4 \times 10^9/L$, Hb 119g/L, PLT $157 \times 10^9/L$; 嗜酸性粒细胞 2.5%; 骨髓象示: 增生性骨髓象。

3 讨论

嗜酸性粒细胞增多症分为反应性嗜酸性粒细胞增多、特发性嗜酸性粒细胞增多(HES)、慢性嗜酸性粒细胞白血病(CEL)。嗜酸性粒细胞(EOS)的持续增加、广泛浸润以及 EOS 释放的大量过氧化物酶、碱性蛋白、嗜酸性粒细胞阳离子蛋白及乙二醇二硝酸酯等均有毒性, 通过直接浸润和间接的作用, 对组织器官的毒害作用很大。

CEL 和 HES 作为同一性质疾病归为慢性骨髓增殖性疾病, 并且同为血液系统的造血干细胞恶性克隆性疾病, 当发现克隆性证据, 或者外周血原始细胞大于 2% 或者骨髓中原始细胞在 5%~19%, CEL 即可诊断。没有细胞遗传学异常, 并且幼稚细胞比例小于 20%, 诊断为 HES, 或者 T 细胞相关的 HES。在临床上, HES 表现在发热、皮疹、咳嗽、浆膜腔积液、肝脾肿大、口腔溃疡、关节肿痛、腹痛腹泻、下肢静脉血栓等, 该患者初诊时血象和骨髓象均发现异常, 外周血 EOS 绝对计数一直波动在 $2.5 \sim 5.4 \times 10^9/L$, 骨髓象未发现原始细胞。淋巴结活检为反应性增生。患病 8 个月来其组织器官浸润症状明显, 表现在甲状腺、肝、肾、肺、脾、淋巴结、皮肤黏膜、结肠等部位, 均有检验和检查结果支持, 且都先后发生在同一短时间内。需要特别指出的是, 从该患者身上具有特异表型 T 细胞的 EOS 显示出具有嗜酸祖细胞克隆性扩增的活性, 提示 T 细胞在 HES 发病机制中可能具有比较重要的作用。大约 4% 的 HES 患者体内可检测到这些特异表型 T 细胞, 最常见的表型为 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁻, 它们均能刺激 EOS 的产生, 促进 IgE 的合成, 促进 B 细胞的活性。同时还具有高 γ 球蛋白血症。作者所做的一系列检查均证实了这一切。该患者临床表现有反复发热, 激素治疗有效, 甲状腺功能减退和多次复查直接抗人球蛋白试验(+++); 类风湿因子 225 Iu/mL; C 反应蛋白 107mg/L。考虑发病原因有免疫相关因素存在, 所以具备实施 CD34⁺ 细胞移植条件。

HES 的一般治疗有肾上腺皮质激素、干扰素、伊马替尼、免疫抑制剂等。激素可以减轻 EOS 的细胞毒作用; 干扰素也可降低 EOS 水平; 表达 Rhe/PDGR 融合基因或 BCL/ABL 融合基因的 EOS 的生长和增殖能力可以被酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼所消灭。该患者在院外使用过上述方法, 效果均不好, 病情反复, 而且伊马替尼还存在最小有效剂量是多少、疗效的维持时间、逆转脏器损害等具体问题。目前患者多器官功能损害刚开始, 考虑为具有特异表型 T 细胞的 EOS 显示出具有嗜酸祖细胞克隆性扩增, 故归为难治性疾病, 有移植适应证。移植可有效提高患者长期无病生存率(free disease survival FDS)。据国外报道, 骨髓性自体外周血造血干细胞移植是治疗复发难治病例的有效手段, 平均生存期为 5.3 年, 且 BCL/ABL 融合基因(-)的 HES 患者对酪氨酸激酶抑制剂无效。采用 ClinMACS(magnetically activated cell selection)免疫磁珠分离系统纯化富集 CD34⁺ 细胞能有效除去体内的 T 细胞。移植时先通过预处理清除体内异常克隆细胞, 然后将纯化的 CD34⁺ 细胞植入患者体内, 促进造血重建及免疫重建。我们纯化后的 CD34⁺ 细胞数量达到 $2.7 \times 10^6/kg$, 为保证植入奠定了基础。为了达到提高生存率和延长生存期的目的, 作者在方案的选择上考虑既往大剂量环磷酰胺(6g)动员失败, 复发难治的疾病合并自身免疫因素参与发病, 需加大预处理的免疫及骨髓抑制强度, 故选用了在减低剂量异基因移植的预处理方案 FBA(氟达拉滨+白舒非+阿糖胞苷)的基础上, 将白舒非替换为蒽环类的米托蒽醌, 最终选择 FMA 方案(下转第 3129 页)

描述的内皮剥离血管片段对乙酰胆碱的反应相一致,提示 SAH 后痉挛血管内膜的 eNOS 功能障碍,而此前已有研究证实,在 SAH 后灵长目痉挛血管对颈内动脉注射 NO 或者 NO 供体仍能维持舒张能力^[14]。以上研究均支持 SAH 后存在 eNOS 为主的内皮功能障碍的设想,也提示 ADMA 对 eNOS 活性抑制可能是促成 SAH 后迟发 CVS 的原因之一。本实验发现,SAH 后 4d 蛛网膜下腔里 ADMA 水平较假手术组和对照组明显增加且达到峰值,而此时基底动脉流速亦处于最高峰,ADMA 在水平及时相表达上与基底动脉血流速度的高度相关性强烈表明 ADMA 可能参与迟发性 CVS 全过程,ADMA 发挥最大抑制 NO 生成作用与血管痉挛时相一致,提示 ADMA 对 eNOS 活性的抑制极有可能促进 SAH 后迟发血管痉挛的形成,可能为重要的致痉挛因素。有望成为脑血管痉挛监测的有效指标。作为致内皮功能失调的危险因子,ADMA 已成为内皮功能障碍的一个重要预测指标。但目前的研究方向主要集中在心血管疾病、糖尿病等领域。在中枢神经系统方面则鲜有报道。鉴于组织中 ADMA 水平在局部血管病理生理中较血浆内水平更为关键,本研究着眼于 SAH 后脑脊液循环系统的微环境,关注其对于脑血流的影响。进一步明确脑血管痉挛的发生机制,旨在为临床脑血管痉挛监测提供一个简单、便利、安全的指标。

参考文献:

[1] Pluta RM. Dysfunction of nitric oxide synthases as a cause and therapeutic target in delayed cerebral vasospasm after SAH[J]. *Neurol Res*, 2006, 28: 730.
 [2] 陈果,马颖,程远. 蛛网膜下腔出血后脑脊液检测对脑血管痉挛的预测性研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(10): 969.
 [3] Hino A, Tokuyama Y, Weir B, et al. Changes in endothelial nitric oxide synthase mRNA during vasospasm after subarachnoid hemorrhage in monkeys[J]. *Neurosurgery*, 1996, 39(3): 562.
 [4] 鲁向辉,迟路湘,刘恺鸣. 大鼠脑微血管内皮细胞体外缺血再灌注模型的建立及他汀的保护作用[J]. *重庆医学*, 2008, 37(3): 293.
 [5] Park KW, Metais C, Dai HB, et al. Microvascular endothelial dysfunction and its mechanism in a rat model of subarachnoid hemorrhage [J]. *Anesth Analg*, 2001, 92:

990.
 [6] Kasuya H, Weir BK, Nakane M, et al. Nitric oxide synthase and guanylate cyclase levels in canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurosurg*, 1995, 82: 250.
 [7] McGirt MJ, Lynch JR, Parra A. Simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase and ameliorates cerebral vasospasm resulting from subarachnoid hemorrhage[J]. *Stroke*, 2002, 33: 2950.
 [8] Jung CS, Iuliano BA, Harvey-White J, et al. Association between cerebrospinal fluid levels of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, and cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurosurg*, 2004, 101: 836.
 [9] Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 59(4): 824.
 [10] Maxwell AJ. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases[J]. *Nitric Oxide*, 2002, 6(2): 101.
 [11] Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM, et al. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease [J]. *Circulation*, 2000, 101(16): 1899.
 [12] Segarra G, Medina P, Ballester RM, et al. Effects of guanidine compounds on human cerebral arteries[J]. *Stroke*, 1999, 30: 2206.
 [13] Furchgott R, Zawadzki J. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine[J]. *Nature*, 1980, 288: 373.
 [14] Pluta RM, Oldfield EH, Boock RJ, et al. Reversal and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurosurg*, 1997, 87: 746.

(收稿日期: 2009-05-27 修回日期: 2009-06-20)

(上接第 3126 页)

行预处理(氟达拉滨 30mg/m²、米托蒽醌 10mg、阿糖胞苷 1.5g/m²)并加上了抗胸腺球蛋白免疫抑制剂: ATG 5mg/kg 共 2d。

目前,此例自体纯化 CD34⁺ 细胞移植治疗特发性嗜酸性粒细胞增多症在国内尚未见报道,该例患者随访 3 个月余,病情稳定,证明自体纯化 CD34⁺ 细胞移植是治疗 HES 的有效手段,尚须进一步积累病例和临床经验,对于提高治疗效果是有益的探索。

参考文献:

[1] Wardlaw AJ, Kay AB. 威廉姆斯血液病学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2001: 785.
 [2] 达万明. 外周血干细胞移植[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000: 163.

[3] 刘欣,邢莉民. 特发性嗜酸细胞增多症与慢性嗜酸细胞白血病研究进展[J]. *国外医学输血及血液学分册*, 2005, 28(2): 231.
 [4] 王萍,李尊昌. 慢性嗜酸细胞白血病和高嗜酸细胞综合征[J]. *现代实用医学*, 2004, 10: 599.
 [5] Richel DJ, Johnsen HE, Canon J, et al. Highly purified CD34⁺ cell isolated using magnetically activated cell selection provide rapid engraftment following high dose chemotherapy in breast cancer patients[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2000, 25: 243.
 [6] Roufosse F, Schandene L, Sibille C, et al. T-cell receptor-independent activation of clonal Th2 cells associated with chronic hypereosinophilia[J]. *Blood*, 1999, 94: 994.

(收稿日期: 2009-04-13 修回日期: 2009-06-13)