

格列卫治疗慢性粒细胞白血病 Ph 染色体转阴后进行自体外周血干细胞移植的结果

孟凡义, 孙 竞, 刘启发, 徐 丹, 杨龙江, 宋兰林, 刘晓力, 徐 兵, 周淑芸 (第一军医大学南方医院血液科, 广东广州 510515)

摘要:目的 探讨格列卫治疗慢性粒细胞白血病 Ph 染色体阴性后自体外周血干细胞移植的可行性。方法 对 2 例成人慢性粒细胞白血病 (CML) 慢性期患者采用 Ph 染色体阳性细胞和间期荧光原位杂交 (I-FISH) 检查 *bcr/abl* 融合基因阳性细胞均 $\geq 90\%$, IFN- α 治疗半年耐药, 改用格列卫 0.3~0.4 g/d 分别治疗 130 和 168 d, 期间 3 次复查 Ph 染色体和 FISH 检测 *bcr/abl* 融合基因均示阴性, 此后应用阿糖胞苷 2.0 g/d 和足叶乙甙 0.2 g/d 分别静脉注射 3 d, 环磷酰胺 1.0 g 静脉注射 1 次。当白细胞 $< 1.0 \times 10^9/L$ 时, 应用 G-CSF 300 $\mu g/d$, 至白细胞 $> 10 \times 10^9/L$ 时应用 CS 3000 Plus 分离外周血单个核细胞并用液氮保存待用。应用 MiniMAC 富集的 CD34⁺ 细胞 (纯度分别为 83% 和 93%) 的 *bcr/abl* 阳性率分别为 11% 和 14%。动员完成后 3~4 周给予全身照射 9 Gy, 分 2 次照射, 每天以环磷酰胺 60 mg/kg·b.w. 和足叶乙甙 300 mg 分别静脉注射 2 d, 静脉输注液氮保存的外周血干细胞, 单个核细胞分别为 4.17 和 $3.9 \times 10^8/kg \cdot b.w.$, CD34⁺ 细胞为 4.89 和 $4.8 \times 10^6/kg \cdot b.w.$, 移植-1~14 d 应用 CsA 联合 IL-2 诱导移植物抗宿主病 (GVHD)。结果 移植后中性粒细胞绝对值 $> 0.5 \times 10^9/L$ 平均需要 11 d, 血小板 $> 20 \times 10^9/L$ 平均需要 20 d, 无 GVHD 样表现。随访观察 120 d 和 300 d, 患者血液学持续缓解, 但 I-FISH 检测骨髓细胞 *bcr/abl* 融合基因阳性率分别为 20% 和 40%。结论 格列卫治疗 CML 获细胞遗传学完全缓解后进行自体外周血干细胞移植, 白血病还可以复发。

关键词: 慢性粒细胞白血病 / 药物治疗; 格列卫; 造血干细胞移植; Ph 染色体

中图分类号: R733.72 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2003)12-1301-02

Autogeneic peripheral blood hemopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate-induced negavitation of Philadelphia chromosome

MENG Fan-yi, SUN Jin, LIU Qi-fa, XU Dan, YANG Long-jiang, SONG Lan-lin, LIU Xiao-li, XU Bing, ZHOU Shu-yun
Department of Hematology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To study the possibility of curing chronic myeloid leukemia with autogeneic hemopoietic stem cell transplantation in patients with negative Philadelphia (Ph) chromosome induced by imatinib mesylate (STI 571) treatment. **Methods** Two patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase, who had 90% Ph chromosome-positive cells and *bcr/abl* fusion gene-positive cells as shown by interphase fluorescence *in situ* hybridization (I-FISH), failed to respond favorably to interferon- α therapy in the treatment courses of 7 and 8 months, respectively. Treatment with STI 571 at a daily dose of 300 to 400 mg for 5 months to 8 months was subsequently implemented, after which the Ph chromosome and *bcr/abl* fusion genes became normal in detection for 3 times. Peripheral blood haemopoietic stem cell mobilization was then initiated by intravenous injection of cytarabine (2.0 g/d) for 3 days, etoposide (0.2 g/d) for 3 d and cyclophosphamide (1.0 g/d) for one day. When the white blood cell was below $1.0 \times 10^9/L$, the G-CSF (300 $\mu g/d$) was administered subcutaneously for 5 or 6 d, and the peripheral blood mononuclear cells were collected by CS3000 Plus blood cell separator. The percentage of *bcr/abl* fusion gene-positive cells among CD34⁺ cells enriched by MiniMAC ranged from 11% to 14%. After 3 or 4 weeks, the patients received total body irradiation at 9 Gy given in 2 fractions, with intravenous injection of cyclophosphamide (60 mg/kg daily) and etoposide (300 mg/d) for 2 d. On the day of transplantation, the collected mononuclear cells were $4.17 \times 10^8/kg$ and $3.9 \times 10^8/kg$, with CD34⁺ cells reaching $4.89 \times 10^6/kg \cdot b.w$ and $4.89 \times 10^6/kg$. CsA was also used since day -1 to day +13 of the transplantation for prevention of graft-versus-host-disease. G-CSF was administrated daily at the dose of 300 μg subcutaneously from day +3 to +12. **Results** After the transplantation, the absolute neutrophil count (ANC) took a mean of 11 d to exceed $0.5 \times 10^9/L$ in these two patients, and 19 and 21 d, respectively, were needed for the platelet count to exceed $20 \times 10^9/L$. The two patients showed cytogenetic relapse at 120 and 300 d after the transplantation, respectively. **Conclusion** Autogeneic peripheral blood stem cells transplantation after Ph chromosome is negative in patients with chronic myeloid leukemia, who receive STI 571 treatment, may also relapse, and more radical elimination of Ph chromosome-positive cells is needed.

Key words: chronic myeloid leukemia/drug therapy; imatinib mesylate; hemopoietic stem cells transplantation; Philadelphia chromosome

作者报告 2 例应用格列卫 (STI 571) 治疗慢性粒细胞白血病 (CML) Ph 染色体转阴后自体外周血造血干细胞移植的初步结果。

收稿日期: 2003-08-16

基金项目: 广东省科技重大专项课题 (B30202)

Supported by Key Sci-tech Research Project of Guangdong Province (B30202)

作者简介: 孟凡义 (1955-), 男, 安徽肖县人, 1993 年毕业于解放军军医进修学院, 硕士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 电话: 020-61641611

资料与方法 <http://www.cnki.net>

1.1 病例

2 例患者均为男性,年龄分别为 33 岁和 46 岁。初诊时脾大平脐,外周血 WBC $150\sim 210\times 10^9/L$ 、Hb $120\text{ g}\sim 100\text{ g/L}$ 、Plt $500\sim 603\times 10^9/L$ 。中、晚幼粒细胞 $15\%\sim 36\%$,中性粒细胞碱性磷酸酶阴性,骨髓增生极度活跃,中、晚幼粒细胞增生为主,诊断为 CML 慢性期(CML-CP)。

应用羟基脲治疗 WBC 达到正常水平后,以 IFN- α 300 万~500 万单位皮下注射,隔日 1 次,间断加用羟基脲 0.5 g,1 次/d,治疗疗程至第 7 和 8 个月期间血液学持续缓解,中性粒细胞碱性磷酸酶正常,细胞培养法检查染色体(观察分裂像细胞 20~40 个)和荧光原位杂交技术检测间期细胞(I-FISH)*bcr/abl* 融合基因^[1](*bcr/abl* 融合基因探针为双色双融合,购于 vysis 公司,每次观测间期细胞 500 个),Ph 染色体阳性细胞和 *bcr/abl* 融合基因阳性细胞分别为 90%和 96%,此后停用 IFN- α 和羟基脲,改用格列卫 0.3~0.4 g 口服,1 次/d,疗程满 3 个月时复查染色体和 I-FISH,Ph 染色体和 *bcr/abl* 融合基因均为阴性,继续以格列卫分别治疗 2 和 3 个月,复查 Ph 染色体和 I-FISH 2 次仍然全部阴性。

1.2 外周血造血干细胞动员和骨髓细胞激活

1.2.1 动员方案 2 例患者分别在格列卫治疗第 168 天和 130 天时停用格列卫并开始动员外周血干细胞。动员方案为: d_1 应用环磷酰胺(CTX)1.0 g, d_{1-3} 应用阿糖胞苷 2.0 g/d 和足叶乙甙(VP16)0.2 g/d,均静脉输注,2 例分别在化疗后第 7 和第 8 天 WBC $<1.0\times 10^9/L$ 时开始应用惠尔血(G-CSF)300 $\mu\text{g/d}$,皮下注射 5 d 和 6 d,当 WBC 达到 $(11.6\sim 14.9)\times 10^9/L$ 时应用 CS3000 Pluse 采集外周血单个核细胞 1 次(循环血量 10 和 12 L),液氮保存待用。

1.2.2 产品分析 单个核细胞占 98%~99%,流式细胞术分析 CD34⁺ 细胞分别占 0.91%和 1.04%,比分离前增加 1.0 和 2.5 倍,CD34⁺/CD38⁺ 细胞分别占 CD34⁺ 细胞的 20.66%和 30.7%。粒单系集落形成单位(CFU-GM)平均为 $144\pm 20/2\times 10^5$ 个细胞。产品经 miniMAC 分选富集 CD34⁺ 细胞^[2],获得 CD34⁺ 细胞纯度分别为 83%和 93%,将动员后的产品和富集的 CD34⁺ 细胞分别应用 I-FISH 技术检测 *bcr/abl* 融合基因,纯化前 *bcr/abl* 融合基因阳性细胞分别为 3%和 4%,纯化后阳性率分别上升为 14%和 11%。

1.2.3 骨髓细胞激活 预处理前在局部麻醉下抽取患者骨髓血 500 ml,分离单个核细胞后按以往常用的方法与 IL-2 混合,置于 37℃、含 5%二氧化碳的孵箱中培养 72 h^[3],最终所得骨髓单个核细胞分别为 $0.54\times 10^8/\text{kg}\cdot\text{b.w.}$ 和 $1.39\times 10^8/\text{kg}\cdot\text{b.w.}$ 。

1.3 移植方案

1.3.1 预处理方案 动员后分别于第 3 和第 4 周开始预处理,期间停用格列卫。-3 d 全身照射(TBI)9 Gy,分 2 次照射,于-3、-2 d 每天静脉滴注 CTX 60 mg/kg·b.w.和 VP16 300 mg,0 d 回输液氮冻存的外周血干细胞和 IL-2 激活的骨髓细胞,输注的单个核细胞(MNC)分别为 $4.17\times 10^8/\text{kg}\cdot\text{b.w.}$ 和 $3.9\times 10^8/\text{kg}\cdot\text{b.w.}$,CD34⁺ 细胞分别为 4.89 和 $4.8\times 10^6/\text{kg}\cdot\text{b.w.}$ 。

1.3.2 移植后治疗 2 例患者均在-1 d~+14 d 每天应用 CsA 2 mg/kg·b.w. 联合皮下注射 IL-2 100 万 U/d 诱导移植物抗宿主病,+3 d~+12 d 皮下注射 G-CSF 300 $\mu\text{g/d}$,血小板严重减少者输注血小板悬液。造血恢复后口服百仕欣 30 mg/d 治疗,其中 1 例在移植后 5 个月加用格列卫 400 mg/d 治疗 3 个月。

1.3.3 移植后监测 定期检测血常规、肝、肾功能,每 3 个月复查骨髓细胞分类和染色体及 I-FISH 检测 *bcr/abl* 融合基因,并记录不良反应。

2 结果

2.1 造血重建

移植后中性粒细胞绝对值(ANC) $>0.5\times 10^9/L$ 分别需要 12 和 10 d,血小板 $>20\times 10^9/L$ 分别需要 21 和 19 d,其中 1 例在移植后第 5 个月血小板才恢复至 $60\times 10^9/L$,未见有移植物抗宿主病(GVHD)样表现,1 例发生细菌感染被抗生素治愈,肝肾功能均正常。

2.2 随访

造血重建后每 1~2 周检查血常规 1 次,每 3 个月复查染色体和 I-FISH 检测 *bcr/abl* 融合基因,2 例在移植后 300 d 和 120 d *bcr/abl* 阳性细胞分别为 40%和 20%,其中 1 例 WBC $10\times 10^9/L$,无自觉症状,肝脾不大。应用 IFN- α 治疗;另 1 例每日口服格列卫 0.5~0.6 g 治疗 2 月余。目前 2 例患者血液学仍然持续缓解。

3 讨论

应用化学药物治疗 CML 容易取得血液学缓解,在其后进行自体外周血造血干细胞移植的白血病复发率很高,其主要原因是移植物中残留较多的 Ph 阳性克隆细胞没能清除。格列卫是 2001 年 5 月研发上市的基因靶向药物,临床治疗 3 个月能使 CML-CP 患者的 Ph 染色体转阴率高达 68%^[4,5],明显优于目前应用的其他药物,但长期应用易产生耐药,停药后又会有白血病复发的危险。因此我们设想在 Ph 染色体转阴后进行移植治疗,有可能进一步消灭残留白血病细胞,解决格列卫长期治疗带来的问题,类似的研究目前尚未见报告。

(下转 1306 页)

遗传背景知识,有的还需使用特殊探针^[9]。诸多因素限制了这些技术在真菌常规鉴定和大规模流行病学研究中的应用。

PCR 指纹技术能迅速扩增未知序列靶细胞基因组片段,获得大量多态性信息,目前被广泛用于生物分类鉴定、临床标本诊断、基因定位、谱系分析、多态性分析和流行病学调查等多个领域。作者应用 PCR 指纹技术研究假丝酵母菌耐药性与基因型关系,仅系初步尝试,其优缺点尚待大量流行病学调查数据的积累和更为详尽的分析。

参考文献:

- [1] Bossche HV, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi[J]. Trends Microbiol, 1994, 2: 393-400.
- [2] Bossche HV. Mechanisms of antifungal resistance[J]. Rev Iberoam Micol, 1997, 14(1): 44-9.
- [3] Pfäler MA, Lockhart SR, Pujol C, et al. Hospital specificity, region specificity, and fluconazole resistance of *candida albicans* bloodstream isolates[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(6): 1518-29.
- [4] Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, et al. Molecular characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: analysis reveals a new genotype of *C. albicans* with group iintron[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39: 4309-15.
- [5] McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea* [J]. J Clin Microbiol, 1997, 37: 417-21.
- [6] National committee for clinical laboratory standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. National committee for clinical laboratory standards, Wayne, Pa.
- [7] Imai T, Watanabe K, Tamura YM, et al. Geographic grouping of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplified polymorphic DNA fingerprint patterns and its sequence divergence[J]. Clin Lab, 2000, 46(7-8): 345-54.
- [8] Franz R, Kelly SL, Lamb DC, et al. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *candida albicans* strains[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42: 3065-72.
- [9] 彭敬红, 赵均秀, 周有利, 等. 136 株念珠菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2002, 12(11): 863-4.
- Peng J, Zhao J, Zhou Y, et al. Clinical distribution and drug resistance of 136 strains[J]. Chin Hosp Infect J, 2002, 12(11): 863-4.

(上接 1302 页)

本组 2 例研究的初步结果显示,尽管在外周干细胞动员前多次检查染色体和 I-FISH 检测 *bcr/abl* 融合基因阴性,但在移植后仍有复发,分析其主要原因仍然是残留白血病细胞所致。本研究 CD34⁺ 细胞纯化前后的结果显示,纯化后的 CD34⁺ 细胞 I-FISH 检测 *bcr/abl* 融合基因平均阳性率比纯化前和动员前明显增高(12.5%:3.5%:0),进一步证明 CD34⁺ 造血干细胞含有 Ph 阳性克隆的成份,是慢性粒细胞白血病多系受累的关键机制。此类细胞处于非增殖期,对放化疗不敏感,难以清除,常常是白血病复发的根源。又因 Ph 阳性细胞含量少,用染色体和 I-FISH 技术检测不敏感,通过动员富集 CD34⁺ 细胞能够提高其检出率,但技术过程复杂,用于前瞻性诊断还不实际。应用定量 PCR 技术检测 *bcr/abl* 融合基因能够提高敏感性,有助于指导选择进行自体干细胞移植的最佳时机。格列卫对造血干细胞生物学行为的影响还在研究中,尤其对干细胞移植后造血重建的影响研究报告较少。本研究的初步结果显示,用格列卫治疗半年左右时进行外周血干细胞动员的效率及其在移植后造血重建时间均无影响,用格列卫治疗后的患者可以按常规方法进行干细胞移植治疗。

- [1] 杜庆锋, 周淑芸, 刘晓力, 等. 应用间期荧光原位杂交技术检测慢性髓系白血病患者肿瘤负荷[J]. 癌症, 2003, 22(6): 612-5.
- Du QF, Zhou SY, Liu XL, et al. Application of interphase fluorescence *in situ* hybridization for determination of the tumor load in chronic myeloid leukemia[J]. Chin J Cancer, 2003, 22(6): 612-5.
- [2] 林芸, 孟凡义, 杨艺, 等. 免疫磁珠纯化小鼠 CD34⁺ 造血干细胞[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(12): 908-11.
- Lin Y, Meng FY, Yang Yi, et al. Purification of murine CD34⁺ hematopoietic stem cells using immunomagnetic beads [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(12): 908-11.
- [3] 刘启发, 周淑芸, 伍柏松, 等. 激活骨髓自体移植治疗白血病和淋巴瘤的疗效分析[J]. 中华内科杂志, 2000, 39(8): 524.
- Liu QF, Zhou SY, Wu BS, et al. Autologous transplantation with recombinant interleukin-2 activated bone marrow for leukemia and lymphoma: an analysis of factors influencing the effect[J]. Chin J Intern Med, 2003, 39(8): 524.
- [4] Kantarjian HM, Cortes JEO, Brien S, et al. Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic response[J]. Blood, 2003, 101(1): 97-100.
- 孟凡义, 郑维扬, 刘晓力, 等. ST1 571 治疗慢性粒细胞白血病的初步观察[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(12): 908-11.
- Meng FY, Zheng WY, Liu XL, et al. ST1 571 for treating 19 patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(12): 908-11.

(责任编辑:段咏慧)