DOI:10.16016/j.1000-5404.201601162

供者型 CIK 细胞输注对清除异基因造血干细胞移植后微小残留病灶的疗效

肖 方,刘 强,郭欢绪,严学倩,赵 辉,刘 利 (710038 西安,第四军医大学唐都医院血液内科)

[摘要] **目的** 观察供者型细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine induced killer,CIK)细胞免疫治疗对异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation,allo-HSCT)后微小残留病灶(minimal residual disease,MRD)清除的疗效。**方法** 回顾性分析我科 2012 年 11 月至 2015 年 11 月间的 10 例恶性血液病患者,其中急性淋巴细胞白血病 5 例,急性髓性白血病 4 例,慢性粒单细胞白血病 1 例。在 allo-HSCT 后出现分子生物学复发(7 例)以及形态学复发(3 例)后经减停免疫抑制剂、化疗、供者淋巴细胞输注等治疗后形态学缓解,但 MRD 仍阳性的患者,给予供者型 CIK 细胞输注治疗,分析其疗效。**结果** 输注供者型 CIK 中位次数 3(2~8)次。1 例输注 2 次无效,最终血液学复发死亡;9 例患者 MRD 转阴,其中 1 例输注 10 个月后再次复发死亡,1 例因减停免疫抑制剂出现重度移植物抗宿主病死亡,另 7 例患者无病存活。输注 CIK 后中位随访时间为 10(3~14)个月,中位生存时间 8(3~14)个月,中位无病生存时间 8(0~14)个月,其中 5 例患者输注 CIK 后无病生存时间长于移植后无病生存时间。**结论** 供者型 CIK 细胞输注治疗对 allo-HSCT 后复发的患者可使其再次达到分子生物学缓解,减少血液学复发,提高造血干细胞移植疗效,且不良反应小。

[关键词] 造血干细胞移植;细胞因子诱导的杀伤细胞;微小残留病灶

[中图法分类号] R617; R730.51; R733.7 [文献标志码] A

Efficacy of donor-derived cytokine induced killer cells infusion for minimal residual diseases in patients after allogeneic stem cell transplantation

Xiao Fang, Liu Qiang, Guo Huanxu, Yan Xueqian, Zhao Hui, Liu Li (Department of Hematology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the clinica1 efficacy of infusions of donor-derived cytokine induced killer (CIK) cells in the patients having minimal residual disease (MRD) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). **Methods** Ten refractory/relapsed patients, including acute lymphoblastic leukemia (ALL, $n=5$), acute myelogenous leukemia (AML, $n=4$), and chronic myelomonocytic leukemia (CMML, $n=1$) admitted in our department from November 2012 to November 2015 were enrolled in this retrospective analysis. All the patients were achieved molecular remission, then relapsed again after allo-HSCT, and 7 of them achieved MRD positive status and 3 relapsed. They had received salvage treatments including stopping immunosuppressive, chemotherapy and donor lymphocytes infusion. All patients were achieved remission but had MRD positive before CIK infusion. **Results** The median number of CIK infusions was 3 (ranged from 2 to 8) times. However, 1 case was no response to the twice infusions of CIK and died finally due to relapse. Nine patients of them achieved molecular responses after accepting the infusions of CIK. One of the 9 patients relapsed again and died 10 months after the infusions, one died of grade Ⅳ graft versus host disease after stopping immunosuppressive therapy, and the left 7 patients had stayed continuous complete remission (CCR). The median time of follow-up after CIK infusion was 10 (ranging from 3 to 14) months. The median time of overall survival (OS) was 8 months (ranging from 3 to 14), and that of

[通信作者] 刘 利,E-mail:liuli1@medmail.com.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160425.1427.002.html(2016-04-25)

event-free survival (EFS) was 8 months (ranging from 0 to 14). Five patients had longer remissions after infusion of CIK cells than after allo-HSCT. **Conclusion** Infusion of donor-derived CIK cells is an effective therapy for the MRD-positive patients after allo-HSCT, with well tolerance, achieving molecular remission, reducing relapse, and improving efficiency of hematopoietic stem cell transplantation.

[**Key words**] allogeneic stem cell transplantation; cytokine induced killer cells; minimal residual diseases

Corresponding author: Liu Li, E-mail: liuli1@medmail.com.cn

异基因造血干细胞移植(allogeneic stem cell transplantation,allo-HSCT)是可治愈血液系统恶性肿瘤的手段。然而,复发仍是导致移植失败的主要原因。且复发难治病例疗效差,病死率高,仍是临床面临的难题。移植后密切监测微小残留病灶(minimal residual diseases,MRD)可早期发现疾病复发,通过减停免疫抑制剂或供者淋巴细胞输注等处理,常可使患者再次达分子生物学缓解。但是,治疗后反应率低及急性移植物抗宿主病(acute graft-versus-host disease,aGVHD)是导致治疗失败的主要原因。细胞因子诱导的杀伤(cytokine induced killer,CIK)细胞是一组以 $CD3^+$ $CD56^+$ T 细胞为主要效应细胞的异质细胞群,可通过非特异性免疫杀伤作用清除肿瘤患者体内微小残留病灶[1]。传统的 DLI 效果并不理想,allo-HSCT 后联合供者型 CIK 细胞治疗复发难治血液肿瘤国内外已有报道[2-3]。本研究就 10 例在 allo-HSCT 后出现分子生物学复发(7 例)以及形态学复发(3 例)后经减停免疫抑制剂、化疗、供者淋巴细胞输注等治疗后形态学缓解,但 MRD 仍阳性的患者,输注供者型 CIK 细胞,并对其进行安全性及有效性的研究。

1 资料与方法

1.1 病例资料

收集我科 2012 年 11 月至 2015 年 11 月共 10 例患者,其中男性 9 例,女性 1 例,中位年龄 24.5(10~41)岁。急性淋巴细胞白血病 5 例,急性髓系白血病 4 例,慢性粒单细胞白血病 1 例。移植前复发或未达完全缓解(complete remission,CR)6 例,CR4 例(其中 2 例 CR1、2 例 CR2)。具体患者特征见表 1。

1.2 移植方式

9 例均为清髓性骨髓+外周血 allo-HSCT,1 例为清髓性非血缘脐血移植。单倍体移植 6 例,同胞全相合移植 2 例,同胞 7/10 相合 1 例,非血缘脐血全相合 1 例。急性淋巴细胞白血病患者预处理方案为 TBI/Cy:TBI+CTX+ATG,急性髓系白血病及慢性粒单细胞白血病患者预处理方案为改良的 Bu/Cy:Bu+CTX+Ara-C+ATG。

1.3 移植后复发及治疗

移植后每月行骨髓形态、活检,并通过流式细胞仪或 PCR 监测 MRD。分子生物学复发经减停免疫抑制剂或供者淋巴细胞回输(donor lymphocytes infusion,DLI)治疗,骨髓形态学复发患者行减停免疫抑制剂、化疗、化疗+DLI 治疗,治疗后评估疗效,形态学缓解但仍 MRD 阳性患者行 CIK 治疗。

1.4 CIK 细胞采集、扩增及检测

采集供者外周血单个核细胞悬液 80~120 mL,脐带血移植患者采集的是移植后患者的外周血(完全植入,供者型)。分离并洗涤后,调整细胞密度至 1×10^6/L,转移至培养瓶中,加入适量 RPMI1640 培养液、自体血浆和细胞因子IL-2、IFN-γ、OKT3成为细胞悬

表 1 10 例 allo-HSCT 后 MRD 阳性患者的一般情况、治疗方案和治疗后反应

编号	年龄	性别	移植前诊断	干细胞来源	HLA 配型	预处理方案	移植至复发时间(月)	复发时状态	复发后治疗	治疗后反应
1	26	男	M2,NR	骨髓+外周血	单倍体	Bu/Cy+ARA-C	4	原始粒细胞 10.5%	减停免疫抑制剂	原始粒细胞4% MRD(+)
2	12	男	M2(MDS 转化)复发	骨髓+外周血	单倍体	Bu/Cy+ARA-C	19	MRD(+)	减停免疫抑制剂	MRD(+)
3	40	男	M4,PR	骨髓+外周血	单倍体	Bu/Cy+ARA-C	4	原始+幼稚单核细胞 9%	HAA 化疗	CR,MRD(+)
4	41	男	CMML,NR	骨髓+外周血	同胞全合	Bu/Cy+ARA-C	19	形态学复发	HA+DLI	CR,MRD(+)
5	41	男	T-ALL,CR1	骨髓+外周血	同胞全合	TBI/CY	8	MRD(+)	减停免疫抑制剂	MRD(+)
6	18	男	ALL,CR2	骨髓+外周血	单倍体	TBI/CY	7	MRD(+)	减停免疫抑制剂	MRD(+)
7	22	男	ALL,CR2	骨髓+外周血	单倍体	TBI/CY	11	MRD(+)	减停免疫抑制剂	MRD(+)
8	30	男	ALL(T 淋母),CR1	骨髓+外周血	同胞 7/10 相合	TBI/CY	7	MRD(+)	减停免疫抑制剂	MRD(+)
9	10	女	T-ALL,复发	骨髓+外周血	单倍体	TBI/CY	20	MRD(+)	DLI	MRD 阴性,后再次阳性
10	23	男	M2,CR1 难治性	脐血	非血缘全合	Bu/Cy+ARA-C	18	MRD(+)	减停免疫抑制剂	MRD(+)

液,在37 ℃、5% CO_2条件下悬浮培养,于培养第4、7、10、13天分别调整细胞密度,补充IL-2,同时进行细胞表型分析。培养结束后,流式细胞仪通过检测细胞的表面标志物鉴定CIK细胞的表型;并于细胞回输前计数CIK细胞;同时进行细菌、真菌学检测。

1.5 CIK细胞回输

CIK细胞自培养基收集后制成细胞悬液,6 h内回输,输注时间30 min左右。回输时行CIK细胞表型鉴定、细胞活力检测及细胞计数。于培养第10~14天通过静脉途径回输。

1.6 不良反应及疗效观察

所有患者治疗前常规检查血常规、肝肾功能及心电图,治疗过程中严密监测患者心率、血压及血氧饱和度监测,发热时给予物理降温。治疗每个月随访血常规、肝肾功及微小残留病灶和骨髓形态、活检。

2 结果

2.1 移植后复发及治疗

10例患者大部分原发病为复发难治性,移植后均达血液学和分子生物学缓解,规律监测MRD。7例出现分子生物学复发,经DLI或减停免疫抑制剂治疗后MRD仍为阳性。3例患者形态学复发,其中1例因复发时仍有明显胃肠道GVHD,减停免疫抑制剂后原始粒细胞自10.5%下降至4%,达形态学缓解,未进一步化疗及DLI等治疗;另2例分别给予化疗、化疗+DLI后达完全缓解,但3例患者MRD阳性。CIK细胞治疗前所有患者均为形态学完全缓解,但MRD阳性。

2.2 细胞表型检测和细胞计数CIK

输注前的CIK细胞经过流式细胞仪检测,其表面标志物分别为(90.4±7.0)% $CD3^+$、(71.2±6.6)% $CD3^+CD8^+$、(18.1±5.8)% $CD3^+CD56^+$、(72.3±7.2)% $CD3^+CD56^-$、(5.5±4.4)% $CD3^-CD56^+$(10位供者的均值)。10例患者输注2~8次不等供者CIK细胞,平均每月输注1次。CIK细胞的回输数量为(1.35~7.23)×10^9/kg,中位回输数量为(4.32±1.73)×10^9/kg。

2.3 CIK输注不良反应

2例患者出现输注热,发生于输注后3 h及4 h,体温分别为38.7 ℃及39.3 ℃,持续4 h左右,经物理降温并使用解热药后热退,观察3 d,无反复。4例患者出现Ⅰ度皮肤及黏膜aGVHD,均出现于第2次输注之后,经常规抗GVHD处理后得到控制。1例患者输注4次后出现Ⅰ度皮肤aGVHD,加用免疫抑制剂后控制,随后出现MRD阳性,再次减停免疫抑制剂后MRD转阴,但出现Ⅳ度皮肤、肝脏及消化道GVHD,最终死亡。

2.4 CIK细胞治疗反应

截至2015年11月,移植后中位随访时间21(9~34)个月,中位生存时间18(9~31)个月,中位无病生存时间10.5(4~20)个月。输注CIK中位次数3(2~8)次,直至MRD转阴或形态学复发后停止输注。1例输注2次无效,MRD持续阳性,最终形态学复发死亡。9例患者MRD转阴,评价为有效。其中1例10个月后再次复发死亡,1例因MRD再次阳性减停免疫抑制剂后出现重度GVHD死亡,另7例患者无病存活。输注CIK后中位随访时间为10(3~14)个月,中位生存时间8(3~14)个月,中位无病生存时间8(0~14)个月,其中5例患者输注CIK后的无病生存期长于移植后的无病生存期。见表2。

表2 10例allo-HSCT后MRD阳性患者CIK细胞输注治疗反应

编号	移植后无病生存时间(月)	输注次数	输注CIK后反应	GVHD	CIK治疗后无病生存时间(月)	转归	治疗评价
1	4	4	MRD阴性	皮肤Ⅰ度,加用免疫抑制剂	6	MRD阳性,减量免疫抑制剂,后死于重度GVHD	有效
2	19	4	MRD阴性	无	10	MRD阴性	有效
3	4	2	MRD阴性	黏膜Ⅰ度	5	MRD阴性	有效
4	19	2	MRD阴性	皮肤Ⅰ度	8	形态学复发死亡	有效
5	8	3	第1次输注后MRD阴性,5个月后再次阳性,再次输注2次后转阴	口腔Ⅰ度	10	MRD阴性	有效
6	7	2	MRD持续阳性	无	0	形态学复发死亡	无效
7	11	2	MRD阴性	无	12	MRD阴性	有效
8	7	2	MRD阴性	口腔Ⅰ度	8	MRD阴性	有效
9	20	2	MRD阴性	无	3	MRD阴性	有效
10	20	8	MRD定量持续下降,第5次输注后转阴	无	14	MRD阴性	有效

3 讨论

异基因造血干细胞移植后复发是治疗失败的主要原因,预后极差。移植后出现 MRD 的患者形态学复发风险大。Kroger 等[4]研究表明急性白血病患者在异基因造血干细胞移植后 MRD 阳性,其复发率是 25% ~ 90%。因此,在 allo-HSCT 后规律监测 MRD 至关重要[5],可及早通过减停免疫抑制剂、DLI 等提高移植物抗白血病效应来中止复发进展。但是,AML、ALL 患者在 allo-HSCT 后复发时撤停免疫抑制剂,再次缓解率低,且有增加 GVHD 的风险。DLI 是一种主要的治疗策略,已被证明对移植后复发的恶性血液病患者有效,其中对 CML 复发患者的疗效最好,其次为 AML,但是对淋巴系统恶性肿瘤如 ALL 患者的疗效较弱[6]。且这种形式的被动性免疫治疗可以产生显著的毒性,急性 GVHD 和骨髓发育不全是治疗后死亡率高的主要原因,这一定程度限制了 DLI 的临床应用。

CIK 细胞是一组体外扩增的 $CD3^+$ T 细胞,但同时有 NK 细胞标记如 $CD56^+$ 和 NKG2D,因此兼具 T 淋巴细胞强大的抗肿瘤活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤特性[1]。有研究证实,CIK 细胞可通过多种途径杀伤肿瘤细胞[7-8],且可能不会产生类似供体淋巴细胞输注所导致的严重 GVHD[9]。近年来,有学者研究 CIK 细胞在动物骨髓移植模型中的作用,结果显示,CIK 细胞在体内具有明确的抗肿瘤活性,且移植物抗宿主病(GVHD)更轻,提示在移植术后维持治疗方面有较好的应用前景[10-11]。陈林等[2]分析了 11 例接受 allo-HSCT 以及 CIK 细胞输注的恶性血液病患者,治疗后其原发肿瘤均获完全缓解,4 例患者移植后 2 ~ 4 个月再次复发,其中 3 例经供者 CIK 输注、停用免疫抑制剂后重获完全缓解,治疗后中位生存时间 9(2 ~ 53)个月。Laport 等[3]对 18 例移植后复发患者输注 CIK 细胞治疗,仅 2 例患者出现Ⅰ ~ Ⅱ度 aGVHD,1 例患者出现局限性 cGVHD。5 例患者输注 CIK 后的缓解期比异基因造血干细胞移植后更长。说明 CIK 细胞治疗耐受性良好,诱发 GVHD 风险小,且对高危患者有增强移植物抗白血病(graft versus leukemia,GVL)的作用。

目前,大部分中心在移植后 MRD 阳性时通过迅速减停免疫抑制剂或预防性 DLI,可使患者再次达到分子生物学缓解。本研究 10 例患者中,大部分患者原发病为复发难治性,移植后均达分子生物学缓解。但预计移植后复发风险高,规律监测 MRD,在分子生物学及形态学复发后,采用减停免疫抑制剂、DLI、化疗或化疗 + DLI 等处理后,形态学完全缓解,MRD 阳性。考虑继续 DLI 治疗可能会导致严重的 GVHD,尤其是在单倍体移植患者中,发生重度 GVHD 的概率更高,故尝试进行了供者型 CIK 细胞治疗。治疗后大部分患者无病生存期长,复发率明显低于文献[12]报道。1 例患者系异基因干细胞移植后形态学复发,该情况在国内外报道中均属难治病例,减停免疫抑制剂后虽达完全缓解,但原始粒细胞比例仍高,仅通过单纯供者 CIK 细胞输注再次得到分子生物学缓解,在减停免疫抑制剂前未出现明显并发症,可见 CIK 治疗疗效确切,安全性高。但 3 个月后 MRD 再次阳性,说明 CIK 细胞作用持续时间短,需反复输注。本组研究病例也提示,供者 CIK 细胞输注有助于延长异基因干细胞移植术后无病生存时间,减少血液学复发率,但病例数偏少,其疗效仍需进一步验证;而另 1 例患者治疗无效,估计与肿瘤细胞负荷过大有关。本研究中 2 例患者在初次输注 CIK 细胞后 3 ~ 4 h 出现寒战、发热症状,可能与细胞液中含有 IL-2 等细胞因子有关,经对症处理后均好转。

本研究表明,虽然部分患者输注 CIK 细胞后出现了 GVHD,但程度轻,治疗后迅速缓解。因此,异基因造血干细胞移植后出现复发的患者经治疗后 MRD 仍阳性,输注体外培养的供者 CIK 细胞防治高危组血液肿瘤移植后复发的这种新方法有一定可行性。

综上所述,CIK 细胞治疗不良反应小、安全、患者耐受性好,因此被广泛应用于肿瘤化疗后进一步清除 MRD,减少血液学复发率,成为造血干细胞移植后维持治疗较为理想的选择。但本研究由于病例数较少,未进行肿瘤病种分类、危险分层、移植后形态学复发与分子生物学复发之间 CIK 治疗的疗效差异等分析,但经过长期随访观察到疗效较好,可进一步扩大病例数及延长随访时间来观察疗效。

参考文献:

[1] Sun J C, Pan K, Chen M S, *et al*. Dendritic cells-mediated CTLs targeting hepatocellular carcinoma stem cells[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(4): 368 - 375.

[2] 陈林, 史丽君, 陈姝, 等. 异基因造血干细胞移植联合供者 CIK 细胞过继免疫治疗复发难治血液肿瘤 11 例临床分析[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(24): 2449 - 2452.

[3] Laport G G, Sheehan K, Baker J, *et al*. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2011, 17(11): 1679-1687. DOI: 10.1016/j.bbmt.2011.05.012

[4] Kroger N, Zabelina T, van-Biezen A, *et al*. Allogeneic stem cell transplantation for myelodysplastic syndromes with bone marrow fibrosis[J]. Haematologica, 2011, 96(2): 291-297. DOI: 10.3324/haematol.2010.031229

[5] Lankester A C, Bierings M B, van-Wering E R, *et al*. Preemptive alloimmune intervention in high-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia patients guided by minimal residual disease level before stem cell transplantation[J]. Leukemia, 2010, 24(8): 1462-1469. DOI: 10.1038/leu.2010.133

[6] Deol A, Lum L G. Role of donor lymphocyte infusions in relapsed hematological malignancies after stem cell transplantation revisited[J]. Cancer Treat Rev, 2010, 36(7): 528-538. DOI: 10.1016/j.ctrv.2010.03.004

[7] Yang B, Wang J, Cai L L, *et al*. Treatment of multiple solitary plasmacytomas with cytokine-induced killer cells[J]. Cytotherapy, 2014, 16(2): 278-284. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.11.001

[8] Kuci S, Rettinger E, Voss B, *et al*. Efficient lysis of rhabdomyosarcoma cells by cytokine-induced killer cells: implications for adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation[J]. Haematologica, 2010, 95(9): 1579-1586. DOI: 10.3324/haematol.2009.019885

[9] Linn Y C, Niam M, Chu S, *et al*. The anti-tumour activity of allogeneic cytokine-induced killer cells in patients who relapse after allogeneic transplant for haematological malignancies [J]. Bone Marrow Transplant, 2012, 47(7): 957-966. DOI: 10.1038/bmt.2011.202

[10] Zhang Y, Wang J, Wang Y, *et al*. Autologous CIK cell immunotherapy in patients with renal cell carcinoma after radical nephrectomy [J]. Clin Dev Immunol, 2013, 2013: 195691. DOI: 10.1155/2013/195691

[11] Yu X, Zhao H, Liu L, *et al*. A randomized phase Ⅱ study of autologous cytokine-induced killer cells in treatment of hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Immunol, 2014, 34(2): 194-203. DOI: 10.1007/s10875-013-9976-0

[12] Nishimura R, Baker J, Beilhack A, *et al*. *In vivo* trafficking and survival of cytokine-induced killer cells resulting in minimal GVHD with retention of antitumor activity[J]. Blood, 2008, 112(6): 2563-2574. DOI: 10.1182/blood-2007-06-092817

(**收稿**:2016-01-28;**修回**:2016-04-15)

(编辑 郭建秀)