

网络出版时间: 2017-1-20 11:13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170120.1113.030.html>

## 异基因造血干细胞移植术后患者免疫状态评估与治疗调整

阮燕洁 张家奎 王会平 翟志敏 陶千山

**摘要** 选取1例异基因造血干细胞移植术(Allo-HSCT)后患者,该患者移植后出现反复腹痛、腹泻及皮疹等症状,起初考虑为重度移植物抗宿主病(GVHD),并给予强免疫抑制治疗。后患者症状一直无明显改善,且出现严重肺部真菌感染。后来检查发现该患者调节性T细胞(Treg细胞)比例明显升高,故针对性的对免疫抑制药物进行减量直至停用,最终患者症状缓解,Treg细胞恢复至基本正常水平。因此,对于Allo-HSCT后患者出现类GVHD症状时不能盲目加量应用免疫抑制剂,而应综合患者临床表现、实验室检查,尤其是Treg细胞情况判断患者是否存在过度免疫抑制可能,并根据结果调整治疗方案。

**关键词** 造血干细胞移植;移植物抗宿主病;免疫抑制;调节性T细胞

中图分类号 R 559

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0139-04  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.030

移植物抗宿主病(graft-versus-host disease, GVHD)是异基因造血干细胞移植(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Allo-HSCT)术后的一种常见并发症,表现为全身各器官组织自身免疫性炎症反应,需长期应用免疫抑制药物治疗。然而GVHD症状常与过度免疫抑制合并感染时症状类似,但治疗方式却截然相反。因此,临床上Allo-HSCT后患者在出现类GVHD症状时应及时准确判断病因,避免延误甚至加重病情。该研究选取1例Allo-HSCT后患者,术后出现严重的皮疹、腹痛及腹泻等类GVHD症状;通过监测免疫状态,结合患者临床表现及实验室检查,成功使患者病情获得缓解,现报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 病例资料

2016-07-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81401293);安徽高校省级自然科学基金研究重大项目(编号:KJ2014Z017)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院血液科、生物医疗研究中心,安徽医科大学血液病研究中心,合肥 230601

作者简介:阮燕洁,女,硕士研究生;

翟志敏,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: zzzm889@163.com

**1.1.1 病史回顾** 患者女,39岁,因“系慢性粒细胞白血病(chronic myelocytic leukemia, CML)同胞移植术后3个月余,腹痛腹泻50余日”就诊我院。5个月前因“左上腹胀半月余”首次就诊我科,门诊血常规示白细胞明显升高(white blood cell, WBC),入院后行免疫分型、骨髓细胞学、染色体、融合基因等检查确诊CML。予甲磺酸伊马替尼治疗但因多次复查WBC均偏低,需间断减量或停药。考虑患者与其哥哥为HLA配型全相合,故3个月前就诊苏州市某医院行同胞全相合骨髓移植术。术后口服环孢素预防GVHD。术后45d出现腹泻伴腹痛,服用止泻药物后无明显缓解,次日起出现血便,大便常规检出多个红细胞和脓细胞,培养无特殊发现,考虑为IV度肠道GVHD,予加用静脉激素治疗,症状无改善。术后第48天调整环孢素为FK506,第55天起加用巴利昔单抗20mg/d×3次(d1、4、8)、第63天起加用脐带间充质造血干细胞输注(至第83天共输12U)、第75天加用雷帕霉素、第81天加用吗替麦考酚酯(1.0g/d,每天1次)、第84天应用抗肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )单抗5mg/kg、第91天应用抗TNF- $\alpha$ 单抗10mg/kg,但患者腹痛腹泻症状一直无明显改善,每日大便2~6次不等,间断带血。约第50天患者出现明显咳嗽、咳痰,伴发热,予抗感染治疗后好转。现患者转入我科,转入时为术后第94天。

**1.1.2 体格及实验室检查** 患者既往身体健康,无任何家族遗传病病史或传染性病史可询。入院体检:体温38.2℃,脉搏98次/min,呼吸20次/min,血压18.7/10.7kPa,慢性病容,精神较差,面部、颈、躯干部及四肢皮肤可见多处红色皮疹,右侧颈部可见深静脉置管,左上肢前臂见PICC置管,两下肺可闻及少许湿罗音,腹软,脐周有压痛,余无阳性体征。血常规:WBC  $4.5 \times 10^9/L$ ,中性粒细胞占65.7%,淋巴细胞占6.3%,血红蛋白(hemoglobin, Hb)96g/L,血小板(platelet, PLT)  $109 \times 10^9/L$ ;尿常规:蛋白1+, WBC+;大便常规及隐血:隐血3+;肝功能:总蛋白(total protein, TP)52.7g/L,白蛋白(albumin, ALB)30.9g/L,球蛋白(globulin, GLB)21.8g/L,谷

丙转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)70 U/L,谷草转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)61 U/L,胆红素正常;肾功能正常;血栓与止血示:纤维蛋白原0.94 g/L,余正常;床边摄片示双肺未见明显实质性病变。

**1.1.3 诊断** 结合患者病史及实验室检查,诊断为:CML、同胞全相合骨髓移植术后、难治性重度GVHD(IV度肠道、皮肤)、肺部感染。

## 1.2 方法

**1.2.1 试剂和仪器** 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人CD4(克隆号:13B8.2)、CD25单抗(克隆号:B1.49.9)、藻红蛋白(PE)标记的CD8(克隆号:B9.11)、CD127单抗(克隆号:R34.34)、叶绿素蛋白偶联物(PC5)标记的CD3(克隆号:UCHT1)、CD4单抗(克隆号:13B8.2)及各自对应的同型阴性对照试剂购自美国Beckman-Coulter公司。溶血剂为本实验室用去离子蒸馏水自行配制的0.83%的氯化铵溶液。流式细胞仪为美国Beckman-Coulter公司FC500-MCL,荧光激发光波长为488 nm和633 nm,分析系统软件为CXP系统。

**1.2.2 流式细胞术检测细胞免疫功能** 分4步进行:①取肝素抗凝静脉血2~3 ml,室温下放置待用(4 h内检测)。②取2个12×75 mm流式上样管,各加抗凝全血100 μl,然后1管中加入CD25-FITC、CD127-PE及CD4-PC5单抗各10 μl(用于检测CD4+CD25+CD127low调节性T细胞(regulatory T cells,Treg细胞),另一管中加入CD4-FITC、CD8-PE及CD3-PC5单抗各10 μl(用于检测T细胞亚群)。③充分混匀后室温下避光反应15 min,各加入1 ml溶血剂,37℃水浴箱内放置约10 min,待完全溶血时立刻上流式细胞仪检测。检测前常规对流式细胞仪进行光流路质量调控和荧光补偿,使仪器各项指标在质量控制允许值范围。检测时首先根据前向(FSC)和侧向(SSC)散射光信号对淋巴细胞群进行设门,每份标本获取设门内细胞在10 000个以上,检测后数据以Listmode文件形式保存。

## 2 结果

**2.1 治疗过程** 入院时考虑患者为重度GVHD(IV度肠道、皮肤)合并肺部感染,治疗上继续予吗替麦考酚酯(0.5 g/d,每天2次)、泼尼松(40 mg/d,每天1次)、雷帕霉素(2 mg/d,每天1次)抑制排斥反应,同时予比阿培南、利奈唑胺、磺胺甲恶唑(SMZ)抗感染,氟康唑预防性抗真菌及减轻肠壁炎症、止血、预

防出血等对症支持治疗。后患者仍有腹泻,平均每日5~8次,大便带血、不成形,伴腹痛。入院第7天查大便找真菌(-),隐血(2+);大便培养检出嗜麦芽寡养单胞菌,对SMZ敏感,遂将SMZ加量;痰培养出嗜麦芽寡养单胞菌。第9天起患者大便次数有所减少,稍成形,但考虑患者大便一直带血,予加用他克莫司加强免疫抑制。第10天痰涂片未检出孢子及菌丝,检出少量革兰阳性球菌。第15天痰培养检出曲霉菌。考虑长时间使用广谱抗生素已引起真菌感染,且患者腹泻以及皮肤情况总体较入院时好转,予停用氟康唑以及比阿培南、利奈唑胺,改为阿莫西林克拉维酸钾抗细菌、伏立康唑抗曲霉菌治疗。第17天将泼尼松减量为30 mg/d,第23天将泼尼松改为20 mg/d,第24天起患者大便次数再次增多至6~10次/d,查血常规:WBC  $1.58 \times 10^9/L$ ,Hb 70 g/L,PLT  $109 \times 10^9/L$ ,予加用粒细胞刺激因子升白治疗。第29天查T细胞亚群提示CD4/CD8正常,Treg细胞比例升高,胸部CT示左下肺斑片影,治疗上将他克莫司减量,加用哌拉西林他巴坦抗细菌,并将伏立康唑加量。第31日痰培养检出肺炎克雷伯杆菌,根据药敏加用阿米卡星抗感染。第35天将激素泼尼松减量为10 mg/d,第37天血常规示:WBC  $10.8 \times 10^9/L$ ,Hb 73 g/L,PLT  $38 \times 10^9/L$ ;大便常规示:隐血(3+);复查Treg细胞比例仍高,故停用他克莫司,将吗替麦考酚酯减量,激素调整为7.5 mg/d并加用两性霉素B。第42天血常规示WBC  $1.1 \times 10^9/L$ ,Hb 71 g/L,PLT  $35 \times 10^9/L$ ,此时患者肺部感染症状仍明显,同时合并粒细胞减少,故停用吗替麦考酚酯以及激素。后患者咳嗽、咳痰症状逐渐好转,大便次数逐渐减少,第46天查WBC  $3.6 \times 10^9/L$ ,Hb 72 g/L,PLT  $50 \times 10^9/L$ 。第53天患者出院。复查Treg正常,CD4/CD8倒置。出院时患者体温正常,咳嗽、咳痰症状较前明显好转,无腹痛,大便基本成形,皮肤颜色变淡,余未见明显阳性体征。

**2.2 免疫状态与治疗调整** 为了了解患者病情好转前后免疫状态,病程中多次采用流式细胞术对患者免疫状态进行动态监测。结果显示:①患者行Allo-HSCT后因过度应用免疫抑制剂,Treg细胞比例明显升高,处于严重免疫抑制状态,因此出现严重腹泻、便血症状,同时合并严重肺部感染;②患者逐渐停用免疫抑制剂后,并没有加重肠道、皮肤、肺部等部位症状,反而均逐渐好转,出院时复查Treg比例恢复正常。提示患者术后早期症状可能并非重度GVHD症状,而是由过度免疫抑制合并感染引起

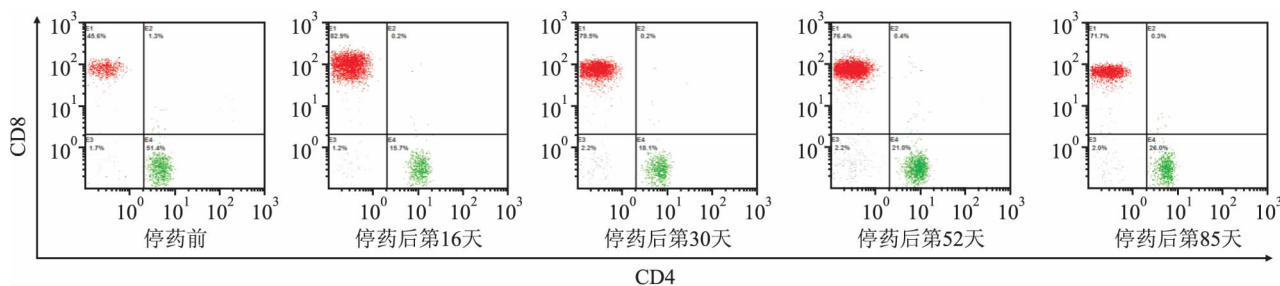


图1 患者治疗过程中 CD4、CD8 变化情况 (占 CD3 + 细胞群)

患者停药前 CD4/CD8 比值基本正常 (1.13), 停药后第 16 天比值倒置 (0.19), 停药后 CD4/CD8 比值处于缓慢恢复中 (停药后第 30、第 52、第 85 天分别为 0.23、0.27、0.36)

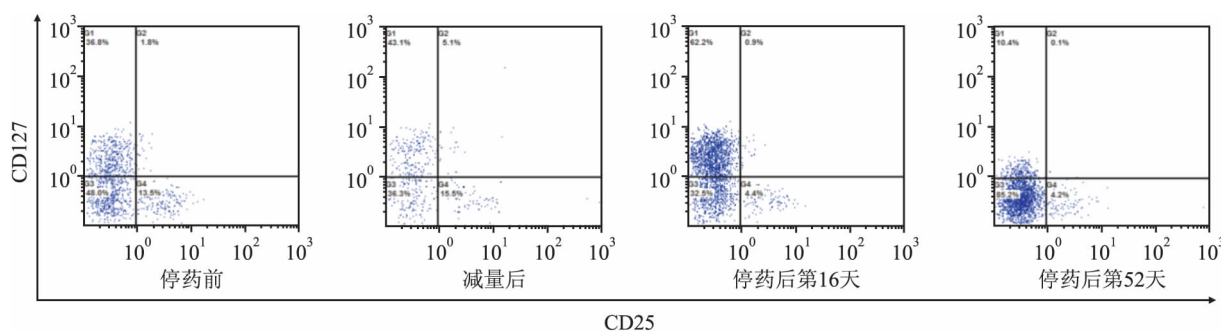


图2 患者治疗过程中 CD25、CD127 变化情况 (占 CD4 + 细胞群)

患者停免疫抑制剂前 Treg 明显升高 (13.5%), 减量仍处于升高趋势 (15.5%), 停药后 Treg 维持正常水平 (停药后第 16、第 52 天分别为 4.4%、4.2%)

(图 1)。③ 患者病程中虽然 CD4/CD8 比值由正常变成倒置, 但与患者实际免疫状况不符, 故不能作为评判 Allo-HSCT 术后患者免疫功能的依据 (图 2)。

### 3 讨论

Allo-HSCT 术后患者在出现类 GVHD 症状时, 不能盲目加量应用免疫抑制剂, 而应综合患者临床表现、实验室检查, 尤其是 Treg 变化情况判断患者是否存在过度免疫抑制可能, 并根据结果调整治疗方案。

Allo-HSCT 术后的主要并发症是 GVHD, 它由受者体内植活的供者淋巴细胞对受者器官及组织产生免疫性损伤引起。然而, 由于患者自身免疫功能并不完善, 也很容易受外界病原菌入侵引起全身感染症状。因此, 临床上对于 Allo-HSCT 术后患者出现类 GVHD 症状时的合理化治疗仍然是目前面临的难题之一, 此时对患者的免疫状态评估则显得尤为重要<sup>[1]</sup>。目前临床上对免疫功能的监测主要针对常规 T 细胞亚群和 Treg。常规 T 细胞亚群主要根据 CD4/CD8 细胞比值判断免疫功能状态。然而 Schwinger et al<sup>[2]</sup> 发现, 常规的 T 淋巴细胞亚群监测对 Allo-HSCT 术后患者意义不大。虽然移植后患者

T 淋巴细胞数会逐渐增加, 至 90 ~ 100 d 时达到较高水平, 但 CD4/CD8 细胞比值却持续倒置。常规 T 淋巴细胞亚群的检测只能反映 T 细胞亚群构成比例的变化, 不能有效监测 Allo-HSCT 术后患者细胞免疫功能状态。这也与本研究结果相符。

研究<sup>[3-5]</sup> 显示, Allo-HSCT 后 Treg 的数量减少及功能受损与 GVHD 的发生、发展及病情严重程度密切相关。Treg 细胞是一类有免疫无能和免疫抑制功能的免疫细胞亚群, 是调节免疫系统功能最重要的细胞群之一。正常人体内 Treg 数量减少、功能缺陷会打破体内的免疫平衡, 导致效应性 T 细胞对自身抗原不能耐受, 过度活化、增殖, 攻击自身组织和器官, 最终引起多器官、多系统的自身免疫性疾病<sup>[6-8]</sup>。目前 CD4 + CD25 + Foxp3 + 被公认为 Treg 的免疫表型, 但 CD4 + CD25 + CD127<sup>low</sup> 同样可以用于识别体内 Treg<sup>[9]</sup>, 且方法学更为简单。因此, 本研究中利用 CD4 + CD25 + CD127<sup>low</sup> 对患者的 Treg 细胞进行检测。该患者 Allo-HSCT 后出现反复腹痛、腹泻及皮疹等症状, 起初考虑为重度 GVHD, 并给与强免疫抑制治疗。但患者症状一直未见明显改善, 反而在后期合并严重肺部真菌感染。此时即考虑患者是否存在过度免疫抑制的可能性。后来的

检查证实了这个猜测,患者 Treg 细胞比例明显升高,存在严重免疫抑制,故针对性的对免疫抑制药物进行减量直至停用,最终患者腹痛、皮疹症状逐渐好转,2 周后复查 Treg 恢复至基本正常水平。因此,在 Allo-HSCT 术后患者症状加重时不能盲目加量应用免疫抑制剂,而应综合患者临床表现、实验室检查,尤其是 Treg 细胞情况判断患者是否存在过度免疫抑制可能,并根据结果调整治疗方案。

综上所述,动态监测患者 Treg 细胞水平对 Allo-HSCT 后患者免疫状态评估与治疗调整有重要价值。

### 参考文献

- [1] Ratanatharathorn V, Ayash L, Lazarus H M, et al. Chronic graft-versus-host disease: clinical manifestation and therapy [J]. *Bone Marrow Transplant* 2001, 28(2):121-9.
- [2] Schwinger W, Weber-Mzell D, Zois B, et al. Immune reconstitution after purified autologous and allogeneic blood stem cell transplantation compared with unmanipulated bone marrow transplantation in children [J]. *Br J Haematol* 2006, 135(1):76-84.
- [3] Chen X, Vodanovic-Jankovic S, Johnson B, et al. Absence of regulatory T-cell control of TH1 and TH17 cells is responsible for the autoimmune-mediated pathology in chronic graft-versus-host disease [J]. *Blood* 2007, 110(10):3804-13.
- [4] Zorn E, Kim H T, Lee S J, et al. Reduced frequency of FOXP3 + CD4 + CD25 + regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease [J]. *Blood* 2005, 106(8):2903-11.
- [5] Brunstein C G, Miller J S, McKenna D H. Umbilical cord blood-derived T regulatory cells to prevent GVHD: kinetics, toxicity profile, and clinical effect [J]. *Blood* 2016, 127(8):1044-51.
- [6] 张家奎, 熊术道, 翟志敏, 等. 小剂量 IL-2 对获得性噬血细胞综合征的治疗 [J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(4):443-6.
- [7] Koreth J, Matsuoka K, Kim H T, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease [J]. *N Engl J Med* 2011, 365(22):2055-66.
- [8] Huynh A, Zhang R, Turka L A. Signals and pathways controlling regulatory T cells [J]. *Immunol Rev* 2014, 258(1):117-31.
- [9] Thiant S, Labalette M, Trauet J, et al. Plasma levels of IL-7 and IL-15 after reduced intensity conditioned allo-SCT and relationship to acute GVHD [J]. *Bone Marrow Transplant* 2011, 46(10):1374-81.

## Evaluation of immune status and treatment adjustment in patients after allo-HSCT

Ruan Yanjie, Zhang Jiakui, Wang Huiping, et al.

(Dept of Hematology and Bio-medical Research Center, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hematologic Diseases Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract** Graft-versus-host disease (GVHD) is a common complication following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (Allo-HSCT), which is characterized by autoimmune like inflammatory responses. But its symptoms are similar to the symptoms of infection caused by excessive immune suppression, and the treatment is opposite. Therefore, the immune status of patients after Allo-HSCT should be closely monitored to guide the clinical medication. We selected a patient after Allo-HSCT. The patient presented obvious GVHD symptoms like abdominal pain, diarrhea and skin rash after transplanting, and was diagnosed with severe GVHD at first, treated with immunosuppressive therapy. But these symptoms not only were not improved, but also were followed with severe pulmonary fungal infection. Later we found that the proportion of regulatory T cells (Treg) was significantly increased in the patient. So we reduced the dose of immune suppression drugs and finally stopped, and then the patient after Allo-HSCT symptoms was relieved, Treg level returned to normal. In general, while the patient had appears symptoms like GVHD, the dose of immune suppression drugs should not be increased blindly. The clinical manifestation and laboratory examination, especially Treg level of the patients should be analyzed to estimate the presence of excessive immune suppression, then adjust the treatment based on the results.

**Key words** hematopoietic stem cell transplantation; graft-versus-host disease; immuno suppression; regulatory T cells