

放射损伤后骨髓移植所致的GVHD预防

第二军医大学放射医学研究室 陈金国 麦智广

丁振海综述

北京北太平路医院 叶根耀审

提要:骨髓移植是治疗极重度急性放射病的主要手段,组织相容性不合的骨髓移植会导致致命性移植物抗宿主病。本文重点介绍免疫抑制剂及体外去除骨髓中的T淋巴细胞等各种临床预防措施。

骨髓移植(BMT)是治疗极重度急性放射病的主要手段。七十年代以来,随着移植生物学的迅速发展,其适应症扩展到以照射为治疗手段的许多疾病,如重症再障、白血病、重症联合免疫缺陷等。但由于组织相容性不合的骨髓移植会导致致命性移植物抗宿主病(GVHD),从而大大限制了BMT的骨髓来源。1986年,国际骨髓移植登记处(IBMTR)对2 036名行BMT的患者回顾研究发现,尽管供受者HLA相合,并行免疫抑制,GVHD发病率仍高达45%,其中致命性占25%〔1〕。并且,一旦发生GVHD,现行治疗手段有限,预后差。因此GVHD的预防是骨髓移植中亟待解决的问题。

目前认为, GVHD发病机理是供体成熟T细胞识别受体的组织相容性抗原,进而攻击受体。因而临床预防措施除配型外,主要是针对T淋巴细胞:一是移植后使用免疫抑制剂,二是移植前体外去除骨髓中T细胞。本文就近年有关急性GVHD预防方面的进展作一综述。

一、移植后免疫抑制剂的使用

氮甲喋呤(MTX)是早期众多免疫抑制剂中最常用的一个。Storb等根据MTX可有效预防狗的GVHD的结果,推荐在人类BMT后应用MTX 102天的方案。其后,这

一方案被许多移植中心当作标准方案,盛行多年。但关于MTX对GVHD的确切预防效果仍有争议,关键是缺少大量前瞻性随机研究。在一组非随机研究中〔2〕,用与不用MTX, GVHD的发生率相差不显著。但多数研究表明, MTX有一定的预防作用。Sullivan等〔3〕比较了44名用MTX预防与15名术后不行免疫抑制的对照组患者,对照组GVHD(\geq II级,下同)发生率为15/15,而标准MTX方案组仅10/44。IBMTR的统计资料也得出同样的结论〔1〕。1983年, Storb在总结西雅图骨髓移植中心经验时指出,尽管HLA配型和MTX抑制剂的使用,临床上仍有34%左右再障患者、40~50%白血病患者发生急性GVHD,其中并有50%死亡。MTX除预防效果不完全外,长期使用还可抑制免疫功能,增加感染机会。故Vowel〔4〕及Lazarus〔2〕等分别采用8个和4个剂量的MTX短疗程,结果与标准方案长疗程(17个剂量)预防效果相近,并认为BMT 28天后继续应用MTX,似乎无预防作用。

近年,骨髓移植的迅速发展与环孢霉素A(CsA)的发现和应用是分不开的。CsA选择性作用于T细胞的某些亚群,影响淋巴因子的合成〔5〕,作用较硫唑嘌呤强3倍,并且能诱导免疫耐受,因而受到广泛重视。起

初,人们发现CsA较以往MTX预防效果好。Bacigalupor等^[6]用CsA进行预防, GVHD发病率为3/24,而过去MTX的预防效果为8/21。有人^[6]甚至在HLA单倍型不合的骨髓移植术后应用CsA,结果约1/3的患者能长期存活。但后来随机研究表明二者预防效果并无显著差异。在一组前瞻性随机研究中^[7], MTX预防组GVHD的发病率为3/16,而CsA预防组为9/20,两组存活率也类似。IBMTR的资料也表明MTX预防效果(GVHD发病率为44%, 1235名患者)与CsA(GVHD发病率为46%, 710例患者)相仿^[1]。但CsA较MTX处理有骨髓植入快、口腔粘膜炎症发生少及住院时间缩短等优点。如同其它免疫抑制剂一样, CsA也有毒性,以肾损伤最常见且最为严重,其次如肝损伤、舒张期高血压等也不少见^[6]。CsA与大剂量庆大霉素、速尿、红霉素等药伍用时,可能加重肾损伤。如何安全使用CsA以及如何减轻其毒性是目前研究CsA的中心课题。另外, CsA价格昂贵、用药时间长,在单个患者的用药经验显示:在BMT后一年以上停用CsA,仍可出现排斥反应及迟发性急性GVHD^[6],因此CsA远非理想的抑制剂, Galne预言CsA将成为移植史上的遗迹。但CsA仍不失为免疫抑制剂史上的一个“里程碑”,因为它不仅可以抑制GVHD、排斥反应,而且为探索免疫耐受提供了重要线索。

抗胸腺球蛋白(ATG)及抗淋巴细胞球蛋白(ALG)能选择性破坏T淋巴细胞。体外ATG可完全抑制骨髓中E玫瑰花形成细胞(E-RFC)的活性。Rodt等^[8]用ATG处理14例患者,12人证明有植入,仅2人发生I级GVHD。但Weiden未能证明ATG的这种作用。ATG为粗制品,对造血细胞也有毒性,长期应用还可引起血清病,需经吸收才能安全使用。单克隆抗体(McAb)的出现解决了此矛盾, Filipovich等^[9]用OK-

T3处理20名骨髓移植患者,其GVHD发生率、存活率与ATG处理组相仿,但副反应少。

近来,人们发掘了一些新的免疫抑制剂。反应停(thalidomide)是较引人注目者之一。初步研究表明:反应停与CsA作用机制十分相似,能促进抗原特异性Ts的产生,从而有效地预防GVHD。Vogelsang等^[10]对42只大鼠用反应停作预防,仅8只发生轻度GVHD,且对反应停继续治疗有效。最近已有人^[11]将反应停用于治疗白血病患者,疗效满意。反应停无肾脏毒性,停用后也无GVHD复发。

由于许多免疫抑制剂有剂量依赖性毒性,且预防作用不完全,现在,不少移植中心采用联合用药方案。常见组合如:MTX + ATG + 考的松、CsA + 强的松(P)、CsA + MTX。Forman等^[12]的前瞻性研究中, CsA + P预防组,急性GVHD发病率仅为15/54,并且临床败血症、肾损伤发生率极低。Storb等^[13]研究认为, CsA + MTX联合用药的预防效果较单用CsA时佳。目前尚未有人提出一种公认的最佳组合方案。并且有人^[14]比较单用CsA与三药(CsA + Cy + MTX)合用的效果,尽管三药合用后GVHD发病率确实下降,但二种方案组最终存活率并无显著差异。因此,有关提高存活率的问题至今没有什么进展。

二、体外去除骨髓中的T淋巴细胞

鉴于T细胞中的哪些亚群参与GVHD尚无定论,目前体外处理方法多为去除所有的T淋巴细胞。归纳起来方法有如下几种。

(一)体外单克隆抗体(McAb)去除法

体外去除T细胞的设想早在六十年代就有人提出,但只有在抗T细胞的McAb出现后,才使得高度选择性地去除骨髓中T细胞成为可能。McAb去除法也成为目前最常用的方法。Prentice等^[15]观察了17例白血病

患者,接受OKT3预处理过的骨髓,仅3例发生了GVHD,与以往体外处理方法相比,急性GVHD发病率由79%降至18%,作者认为,OKT3包裹的T细胞进入体内后由网状内皮系统清除。但Hayward等未能证实单用OKT3的这种预防作用。Martin等^[16]用自制的8种McAb处理供髓,也未能观察到预防作用。因而单独使用McAb的预防效果尚待进一步证实。

有些McAb能结合补体从而杀伤靶细胞,有效地清除T细胞。Granger等用一组抗泛T细胞McAb-OKT3,OKT11a和MB-G6同时加兔补体联合处理骨髓,使T细胞达到99%以上的有效溶解。Herve等^[17]对32例BMT患者的供髓,用抗泛T细胞McAb结合兔补体处理,在27例植入者中,仅3例发生急性GVHD。Henslee等^[18]报道HLA相合的BMT中,体外McAb处理组36例患者,33例长期植活,急性GVHD3例,总存活率30.5%,白血病复发15例;而非体外处理组19例全部植活,急性GVHD14例,总存活率31.5%,无复发。免疫抑制剂对MHC不匹配组合的预防效果很差,但McAb体外去除法的初步结果令人鼓舞。Cobbld等^[19]用针对L3/T4及Lyt-2的McAb体外处理骨髓,在大鼠可跨越一个或二个单倍型障碍进行骨髓移植而不发生急性GVHD。由于与McAb结合的补体系异源性,关于其毒性尚有争议,因为含补体的血清成分较复杂,可能含对造血细胞有毒性的因子,但一般认为兔补体的这种非特异性毒性较低。另外有些McAb不能结合补体,有些结合补体后并不能有效地溶解细胞,结合补体可引起细胞的聚集和抗原调变以及补体、抗体和骨髓三者的作用需摸索最适条件等问题,给临床应用带来诸多不便和限制。

抗体与毒素交联的“导弹”疗法是近年肿瘤治疗方法在去除T细胞方面的应用。常用的毒素有蓖麻毒素(Ricin)和白喉毒素。

1983年,明尼苏达骨髓移植中心的Filipovich等报告用三种McAbT 101,UCHT-1,TA-1与Ricin相连,能清除骨髓中95~98%的T细胞,且骨髓细胞回收率高。1984年,他们在临床试用,迄1987年止^[20],他们共用此法处理17例患者的供髓,13例长期植入,4例发生II级GVHD,无一例II级以上GVHD,并发现其造血及淋巴系功能恢复较用免疫抑制剂为快。免疫毒素的最大优点是保存时间长,在-20℃可贮存18个月。Ricin系由A、B两链组成,A链为毒性部位,而B链系结合部位,完整的Ricin与McAb结合可非特异性地吸附于造血细胞,增加其损伤。而McAb与游离A链结合,特异性虽强,但活性降低。免疫毒素制备复杂,需要较长作用时间,这些都给临床普及应用带来困难。免疫毒素用于临床尚属刚刚起步,确切疗效还有待进一步观察。

(二)物理去除法

这是早期使用的方法,包括密度梯度离心法、细胞电泳、对流离心洗脱法(Counterflow Centrifugal Elutriation, CCE)等,后一种方法至今一些移植中心还在采用^[21]。但总体说来,其去除T细胞效果差,骨髓细胞回收率低。

近来,用McAb结合磁性微粒去除T细胞取得良好的效果。Vartdal等^[22]体外研究表明,经过此处理,用有限稀释法测定仅残留0.02%的T淋巴细胞,与其它方法相比,该处理耗时少(仅需约40分钟)、步骤简单、效果好,而且避免了补体、免疫毒素对造血细胞的可能毒性,临床应用疗效满意^[23],但还需大量资料证实。

(三)生物学去除法

最常用的是黄豆凝集素(SBA)加E玫瑰花结(E-RFC)去除法。Reisner等^[24]1981报告经SBA、E-RFC及神经氨酸酶(E_N)处理的骨髓,得到SBA⁻/E⁻/E_N⁻组分,细胞回收率为5%,CFU-C回收率为

80%，基本不含T淋巴细胞。O'Reilly等^[25]对86例白血病患者的骨髓行SBA+E-RFC处理，结果8例发生排斥，GVHD发病率为4/76，与McAb处理效果相近。生物学方法突出优点是条件要求较低，但操作烦琐，时间长达7~8小时污染机会多，细胞损伤量大。

(四)药理学方法

最近，Uckum^[26]用4-过氧化环磷酰胺处理骨髓进行临床前期研究，结果3/9的病例不能检测到残留原始T细胞克隆，如果将其与免疫毒素合用，则8/8的病例检测不到T细胞。因此，可利用某些药物体外破坏T淋巴细胞而不损伤造血细胞。

体外去除T淋巴细胞，急性GVHD的发病率及严重程度大大降低，但移植失败和白血病复发机会增加^[18, 21, 27]，因而，总体存活率并未改善。鉴于T细胞对造血有辅助作用，有人认为移植失败率上升和复发机会增多可能系去除T细胞所致。但Gerritsen等^[28]研究表明，去除骨髓中T细胞并不影响体内的造血重建和造血细胞的发生。有人用5-氟尿嘧啶、McAb、加大剂量全身照射或短寿命同位素强化预处理受者，移植失败和白血病复发机会下降，从而推论可能系宿主残存T细胞引起。目前，关于GVHD、排斥及移植物抗白血病（GVL）三者之间的关系还很不清楚。去除所有T淋巴细胞还加重移植后的免疫功能抑制，从而增加巨细胞病毒等的感染机会。最近，还发现去除T淋巴细胞可诱发B淋巴细胞增生综合征（B cell lymphoproliferative syndrome），而此病的死亡率高达67%^[29]。由于供体T细胞对免疫重建、消灭宿主残存免疫活性细胞以及可能的GVL有一定的作用，选择性地去除参与GVHD的T淋巴细胞才是一条合理的途径。目前，在小鼠不同组合的骨髓移植中，已发现参与GVHD的T淋巴细胞主要受H-2 I类或II抗原的影响^[30]。但在人类，尚无

肯定性结论。

三、其它方法

上述单克隆体外去除法主要是针对某一特定标志的T淋巴细胞，而不管它是否参与GVHD。Charley等^[31]用Leu-Leu-OMe [L-Leucyl-L-Leucine Methyl Ester，它主要去除有细胞毒作用的细胞如自然杀伤（NE）、CTL、pre-CTL以及单核细胞^[32]]预防GVHD，结果GVHD发病率明显下降，而造血细胞功能不受损伤。由于Leu-Leu-OMe系根据细胞功能而非表面标记体外去除某些细胞，从而为人类预防GVHD提供了新的思路。

骨髓体外长期培养后，不论是表型还是功能都不能发现T、B细胞的存在，移植这类骨髓能在90%的动物模型上重建造血而不发生GVHD^[33]，体外长期培养还为骨髓的保存提供了新的途径。但这方面研究有待深入。

目前，不少学者研究发现，NK细胞在诱导期或效应期也参与了GVHD的发生。Ghayur等^[34]用抗asialo GM1抗体处理供体内源性及诱导的NK细胞，能防止GVHD引起的脾肿大、免疫功能抑制及病理病灶。但目前关于NK的来源尚有争议，并且单纯去除NK细胞尚不能完全防止GVHD的发生。

目前，各种预防措施无论是体外处理供体细胞还是体内处理受体都各有利弊，因此，考虑能否有选择性地预防，即有无预防的指征。迄今尚未找到一个预测GVHD的体外系统，但已发现许多因素影响着GVHD的发生^[1]。其中最重要的影响因素是组织相容性抗原，尽管近来发现同基因甚至自体骨髓移植也会发生GVHD^[35]，但只有组织相容性抗原不合时，GVHD发病率才高，程度也才严重。不同的组织相容性基因位点对GVHD的影响也不同，例如携带HLA-B18⁺患者，GVHD发生率几乎是

HLA-B18⁻患者的三倍, 携带 HLA-B8⁺、HLA-B35⁺、MIs 及与 Pgm-1 位点连锁的基因^[36]的患者, GVHD 发病率相对较低。在小鼠及人都发现输注的 T 淋巴细胞量与 GVHD 可能存在着剂量效应关系^[37]。此外, 患者年龄、性别、术前状态、有无感染等都可能与 GVHD 的发生有关。因此, 对患者进行多因素分析, 可以预测 GVHD 发生的概率。这方面的研究极有理论意义和实用价值。

参 考 文 献

1. Gale RP, et al; Br J Haematol 1987, 67 (4): 397
2. Lazarus HM, et al; Blood 1984, 64: 215
3. Sullivan KM, et al; Blood 1986, 97: 1172
4. Vowels M, et al; Transplant Proc 1986, 18: 276
5. Thomsen AW & Webster LM; Clin Exp Immunol 1988, 71(3): 369
6. Ringden O; Transplantation 1986, 42(5): 445
7. Biggs JC, et al; Transplant Proc 1986, 18: 253
8. Rodt H, et al; Transplant Proc 1981, 13: 257
9. Filipovich AH, et al; Br J Haematol 1985, 60: 143
10. Vogelsang GB, et al; Transplant Proc 1987, 19: 2658
11. Lim SH, et al; Lancet 1988, i(8577): 117
12. Forman SJ, et al; Transplant Proc 1987, 19: 2605
13. Storb R, et al; N Engl J Med 1986, 314: 729
14. Gallimberti M, et al; Transplantation 1988, 45(3): 566
15. Prentice HG, et al; Lancet 1982, i: 700
16. Martin PJ, et al; J Cell Biochem 1983; (suppl 7A): 59
17. Herve P, et al; Blood 1987, 69: 388
18. Henslee PJ, et al; Transplant Proc 1987, 19: 2701
19. Cobbold S, et al; Transplantation 1986, 42: 239
20. Filipovich AH, et al; Transplantation 1987, 44: 62
21. Gale RP; Ann Intern Med 1987, 106: 263
22. Vartdal F, et al; Transplantation 1987, 43: 366
23. Christopher L, et al; Biochim Biophys Acta; Rev Cancer 1986, 865: 141
24. Reisner Y, et al; Blood 1983, 61: 341
25. O'Reilly RJ, et al; Blood 1986, 68(suppl 1): 219a (abstract)
26. Uckum FM, et al; Blood 1987, 69: 361
27. Champlin RE, et al; Semin Hematol 1988, 25: 74
28. Gerritsen WR, et al; Transplantation 1988, 45(2): 301
29. Blanche S, et al; Ann Intern Med 1988: 108(2): 199
30. Korngold R & Sprent J; Transplantation 1987, 44(3): 335
31. Charley M, et al; J Clin Invest 1986, 78: 1415
32. Thiele DL, et al; J Immunol 1986, 136: 1038
33. Spooncer E & Dexter TM; Transplantation 1983, 35: 624
34. Ghayur T, et al; Transplantation 1988, 45(3): 586
35. Hood AF, et al; Arch Dermatol 1987, 123: 745
36. Halle-Pannenko O, et al; J Immunogenet 1981, 8: 443
37. Farrelly H, et al; Transplant Proc 1987, 19: 2855