

论著

联合免疫抑制治疗儿童重型和 难治型再生障碍性贫血

谢晓恬¹, 王耀平², 石菁¹

(11 同济大学附属同济医院小儿血液肿瘤专科, 上海 200065; 21 上海第二医科大学附属新华医院/上海儿童医学中心, 上海 200127)

[摘要] 目的 本研究旨在探索联合免疫抑制(CIS)治疗儿童重型再障(SAA)和难治型再障(RAA)的疗效, 并进行有关疗效预测和临床方法学等方面的研究。方法 应用抗胸腺细胞球蛋白/抗淋巴细胞球蛋白、环孢菌素A和大剂量免疫球蛋白(HDIG)等对36例儿童SAA($n=33$)和RAA($n=3$)进行CIS治疗, 随访观察疗效, 并将以往接受单一药物免疫抑制(SIS)治疗的43例患儿(42例SAA, 1例RAA)作为疗效对照组。同时进行外周血淋巴细胞亚群和血清细胞因子等免疫功能指标检测, 探索儿童再障的免疫介导致病机制及其与IS疗效的关系, 并总结临床治疗方法与经验。结果 CIS治疗儿童再障, 总有效率为80.6%(29/36), 其中SAA有效率和显效率分别达到78.8%(26/33)和60.6%(20/33), 均明显高于以往SIS治疗对照组[57.1%(24/42), 28.6%(12/42)]。CIS治疗3例RAA均有效, 而SIS治疗1例RAA无效。儿童再障的主要异常指标为CD4/CD8比例下降, IL22R、IL28和TNF表达增高, 所有病例均存在2项以上指标的明显异常。疗效预测研究显示, 治疗前, 病程短于6个月或网织红细胞绝对计数高于 $10 \times 10^9/L$ 者, SIS治疗有效率显著增高, 但上述因素与CIS疗效无关。由于采用较为合理的治疗方法和副反应防治措施, 两组未出现明显的重要脏器损害和治疗相关死亡。结论 CIS为治疗儿童SAA和RAA的有效和安全的疗法, 疗效明显高于以往SIS的治疗。儿童再障存在免疫介导致病机制, 是IS治疗儿童SAA和RAA的理论依据。在进行单一药物免疫抑制(IS)治疗之前, 有必要进行疗效预测分析, 合理选择病例和药物, 以提高疗效。 [中国当代儿科杂志, 2004, 6(6): 492-496]

[关键词] 再生障碍性贫血; 免疫抑制治疗; 儿童

[中图分类号] R725.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2004)06-0492-05

Effects of combined immunosuppressive therapy on severe aplastic anemia and refractory aplastic anemia in children

Xiao2Tian XIE, Yao2Ping WANG, Wei SHI. Department of Pediatric Hematology and Oncology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China (Email: xtxie@163.com)

Abstract : Objective The purpose of this study is to evaluate the therapeutic effects of combined immunosuppressive (CIS) therapy on severe aplastic anemia (SAA) and refractory aplastic anemia (RAA) in children and to study the relationship between the effectiveness of IS therapy and the immune mediated pathological mechanism. **Methods** Thirty2 six children with SAA ($n=33$) and RAA ($n=3$) were given CIS therapy (CIS group, a combination of antithymocyte globulin, cyclosporin A and high2dose immunoglobulin). The therapeutic effects were evaluated and compared with those of 43 children with SAA ($n=42$) and RAA ($n=1$) who received the treatment of single IS agent (Control group). Peripheral blood lymphocyte subsets levels were measured with a flow cytometer. Serum interleukin and TNF levels were examined with radioimmunoassay in the two groups. **Results** The total response rate [80.6%(29/36)] in the CIS group was significantly higher than that in the Control group [55.8%(24/43)] ($P<0.05$). Among the CIS group, 78.8%(26/33) of SAA patients had responses to CIS therapy, which was more than that of the Control group [57.1%(24/42)]. All of RAA patients (3/3) were responsive to CIS therapy. The results of immunological

[收稿日期] 2004-02-12; [修回日期] 2004-06-18

[作者简介] 谢晓恬(1954-), 男, 硕士, 教授。主攻方向: 小儿血液/肿瘤。

[通讯作者] 谢晓恬, 上海市新村路359号上海同济大学附属同济医院儿科, 邮编: 200065。

function testing showed that the CD4/CD8 ratio decreased and IL22R, IL28 and TNF levels increased in the two groups. In the Control group, the children whose disease duration was less than 6 months or the absolute reticulocyte counting was greater than $10 \times 10^9/L$ demonstrated a higher response rate to single IS therapy. The therapeutic effects in the CIS group were not associated with the disease duration and the absolute reticulocyte counts. No severe side effects and treatment-related death were found in both groups. **Conclusions** CIS therapy is effective and safe for childhood SAA and RAA, and the therapeutic effect of CIS is better than single IS agent. Abnormal immune mediated pathological mechanism of AA might be the base of IS therapy. In order to improve the therapeutic effects, it is necessary to make a therapeutic effect prediction for choosing cases and the treatment protocol before treatment of AA with single IS agent.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(6): 492 - 496]

Key words: Aplastic anemia; Immunosuppressive therapy; Child

自从免疫抑制疗法 (immunosuppressive therapy, IS) 问世之后,再生障碍性贫血 (再障, aplastic anemia, AA), 尤其是重型再障 (SAA) 和难治型再障 (RAA) 的临床疗效有了一定的提高^[1~3]。抗胸腺细胞球蛋白/抗淋巴细胞球蛋白 (ATG/ALG)、环孢菌素 A (CSA)、大剂量免疫球蛋白 (HDIG) 和大剂量甲基泼尼松龙 (HDMP) 等免疫抑制剂治疗再障的疗效已经得到了充分肯定^[3~6]。国外文献报道,同时应用上述几种免疫抑制剂对 SAA 和 RAA 进行联合免疫抑制治疗 (Combined IS, CIS), 可能进一步提高远期疗效和生存质量^[7,8]。我科在 20 世纪 90 年代中期开始的临床研究的阶段性初步结果均提示, CIS 治疗儿童 SAA 的疗效优于以往单一免疫抑制剂治疗 (SIS)^[9,10]。但是,由于 CIS 的治疗难度、医药费用和临床风险均明显高于 SIS。此外,免疫介导的再障发病机制也需要继续进行深入探索,为 CIS 治疗提供充分的理论依据。因此,我们进行了相关的基础与临床研究,以更多的病例数观察 CIS 的确切疗效,并与以往 SIS 的疗效进行统计对比,验证 CIS 治疗的疗效优越性。同时,进行 IS 治疗的疗效相关因素分析;并通过多项免疫功能检测,较全面地揭示儿童再障的主要免疫异常指标等,为今后进一步开展此项较有发展前途的有效疗法研究提供理论依据和积累临床经验。

1 资料与方法

1.1 研究对象

儿童 SAA 和 RAA 共 79 例,男 51 例,女 28 例,年龄 1~15 岁 (中位年龄 8.5 岁)。其中急性再障 (重型再障 2I 型, SAA2I) 31 例,慢性重型再障 (重型再障 2II 型, SAA2II) 44 例,难治性慢性再障 (RAA) 4 例。诊断和分型按照中华医学会制定的再障诊断和分型标准,本文将经过以雄性激素为主的药物治疗 6 个月以上无效的慢性再障 (CAA), 归类于 RAA^[11]。

CIS 组:共 36 例,接受联合免疫抑制 (CIS) 治疗。其中 13 例 SAA2I, 20 例 SAA2II (其中 1 例范可尼贫血), 3 例 RAA (其中 1 例为纯红细胞再障, RCAA)。

SIS 组:共 43 例,为以往接受单一药物 IS 治疗的病例,作为 CIS 治疗的疗效对照组。其中 18 例 SAA2I, 24 例 SAA2II, 1 例 RAA。上述 43 例患儿中,30 例为单用 ATG/ALG 治疗,13 例为单用 CSA 治疗,其它辅助治疗与治疗观察组相同。

CIS 组和部分 SIS 组为 1995~2003 年在上海同济大学附属同济医院小儿血液肿瘤专科收治的病例,其余 SIS 组为 1988~1994 年在上海第二医科大学附属新华医院儿内科收治的病例。

1.2 治疗方法

1.2.1 联合免疫抑制治疗 (CIS) 选择免疫抑制剂 (ATG/ALG、CSA、HDIG 和 HDMP) 2~4 种进行 CIS 治疗,具体药物治疗方法如下:

ATG/ALG:不同制剂的每日剂量为,猪 2ATG (P2ATG, 国产武汉生物制品研究所):20~25 mg/kg;兔 2ATG (法国 Merieux, 德国 Fresenius 公司):2.5~5 mg/kg;马 2ALG (法国 Merieux 公司):10~20 mg/kg。上述剂量 ATG/ALG 溶于生理盐水后,行缓慢静脉点滴,连用 5 d。用药之前,先行过敏试验:国产 ATG 为皮内试验,进口 ATG/ALG 为静脉试验。治疗期间同时应用足量皮质激素预防变态反应和及时治疗血清病,血小板计数低于 $20 \times 10^9/L$ 或有明显出血倾向者,预防性输注血小板悬液,以防严重出血。

CSA:应用 CSA 口服胶囊 (瑞士山德士公司, 国产诺华公司), 治疗剂量为每天 5~8 mg/kg, 分两次 (Q12h) 口服。定期检测血药浓度,使之达到并维持于:血清峰浓度 200~400 ng/ml,或全血峰浓度 300~500 ng/ml。根据血药浓度和副反应酌情调整剂量,疗程 6 个月以上。明显起效者,以原剂量巩固 3~6 个月,再缓慢减少到维持量 (每天 0.5~2 mg/

kg)再治疗 3~6 个月以上。

HDIG:免疫球蛋白(上海莱士公司)制剂,治疗剂量为每次 1 g/kg,静脉滴注每月一次(可在 1~2 d 内完成),共 4~6 次。用药之前,静脉输注小剂量地塞米松(2 mg)预防过敏反应。

HDMP:首剂每天 30 mg/kg,静脉输注,每连用 3 d 减量一半,直至每日总剂量为 5 mg 时,再维持一周后停药。治疗期间监测血压和血电解质水平,积极预防感染、保护消化道和应用钙剂等防治各种可能出现的不良反应。

1.2.2 辅助治疗 雄性激素:选用美雄酮(大力补)、吡唑甲氢龙(康力龙)和达纳唑等,以小剂量开始,同时服用护肝药物,定期检测肝脏功能生化指标。药物种类和剂量择尽量作到个体化。

支持治疗:积极预防与控制感染和出血,酌情成分输血,必要时使用粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。尽量改善全身状态,等待药物显效,使造血功能尽早、尽可能地达到最理想程度的恢复。

1.3 疗效评价

参照中华医学会制定的再障疗效标准,根据外周血象恢复的程度,将疗效分为基本治愈、缓解、明显进步和无效,前三项纳入有效率统计^[12]。将达到基本治愈和缓解的病例,作为显效。评价疗效时,严格按照疗效标准,符合 3 个月未输血的评价条件,并且至少 2 个月内未用 G-CSF 或 GM-CSF。

1.4 免疫指标检测

1.4.1 淋巴细胞亚群 应用流式细胞仪检测再障患儿外周血 CD3、CD4、CD8、CD4/CD8、CD19 和 CD16⁺CD56⁺(NK 细胞)等淋巴细胞亚群。

1.4.2 细胞因子 采用放免法检测血清白细胞介素(IL21、IL22、IL22R、IL26、IL28)和肿瘤坏死因素(TNF)水平。

1.5 统计学分析

率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 临床疗效比较

2.1.1 总有效率 36 例患儿接受 CIS 治疗,29 例有效,总有效率达到 80.6%(表 1);总有效率与显效率均明显高于 SIS 组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其中 SAA 33 例,有效率为 78.8%(26/33),3 例 RAA 均有效。7 例无效(2 例 SAA2I,5 例 SAA2II),其中 3 例于 2~3 年后死于严重感染。有效病例的血象恢复符合再障疗效出现的一般规律,起效时间至少发生于治疗后 2~3 个月,先有红系的好转(部分病例可先有网织红细胞绝对计数的回升)和输血频度的降低并最终停止依赖输血,其次为粒细胞计数缓慢上升,而血小板的恢复最迟也最为困难,一般需要红系达到缓解水平之后才可能有血小板的明显和稳定的回升。(见表 1)

表 1 两组治疗儿童 SAA 和 RAA 的疗效

	SIS 组				CIS 组			
	SAA2	SAA2	RRA	合计	SAA2	SAA2	RRA	合计
疗效(例)								
治愈	2	2	0	4	4	2	0	6
缓解	3	5	0	8	6	8	1	15
进步	5	7	0	12	1	5	2	8
无效	4	3	1	8	1	3	0	4
死亡	4	7	0	11	1	2	0	3
合计(例)	18	24	1	43	13	20	3	36
有效率(%)	55.6	58.3	-	55.8	84.6	75.0	-	80.6 ^a
显效率(%)	27.8	29.2	-	27.9	76.9	50.0	-	58.3 ^b

注: a 与 SIS 组比较, $\chi^2 = 5.32$, $P < 0.05$; b $\chi^2 = 7.45$, $P < 0.01$

2.1.2 治疗 SAA 疗效比较 CIS 组治疗 SAA 的有效率和显效率均高于 SIS 组(78.8% vs 57.1%, 60.6% vs 28.6%),差异有显著性($\chi^2 = 3.89$, $P < 0.05$; $\chi^2 = 7.06$, $P < 0.01$)。(见表 1)

2.2 药物不良反应

2.2.1 ATG/ALG 几乎所有接受 ATG/ALG 治疗的患儿均于治疗第一天出现发热和风团样皮疹等轻度变态反应。但可在暂停输注 ATG/ALG,给予对症治疗后 2~4 h 内消失。症状消失后即可继续输注,不影响治疗。由于在治疗前均经过严密的过敏试验,故未发生休克或喉痉挛等严重变态反应。部分病例于治疗后 1~3 周内发生血清病,及时应用足量皮质激素均很快得以控制。经预防性输注单采血小板后,未发生严重出血。

2.2.2 其它药物不良反应 在上述药物血浓度范围内,未见 CSA 所致的高血压或肾功能损害。部分病例应用 HDIG 时发生中轻度发热或少量荨麻疹,及时抗过敏治疗后可控制,不影响治疗。HDMP 只治疗

了 1 例,未见明显不良反应。部分病例出现雄性激素(美雄酮或康力龙)所致肝功能损害,在继续使用护肝药物的同时,改用达纳唑,或美雄酮与达纳唑交替应用,则肝功能可以保持在基本正常水平。未见其它严重不良反应或重要脏器损伤,CIS 治疗期间未见感染倾向加重。CIS 组无 1 例发生治疗相关死亡。

2.3 多项免疫指标检测

2.3.1 淋巴细胞亚群 应用流式细胞仪检测 26 例患儿治疗前外周血 T 淋巴细胞亚群百分比,结果显示,有 73.1%(19/26)的病儿的 CD4/CD8 比值低于正常范围。共检测 15 例病儿的 NK 细胞(CD26⁺CD56⁺)和 CD19 百分比,其中 12 例患儿(80.0%)的 NK 细胞比例降低,仅 4 例患儿(26.7%)的 CD19 比例下降。

表 2 IS 治疗前网织红细胞绝对计数或病程与疗效的关系

Table 2 Relationship between the therapeutic effects and the patients' reticulocyte counting or the disease duration prior to IS

分组		有效例数(%)		
		ATG/ALG	CSA	CIS
绝对计数	Ret ≥10 ×10 ⁹ /L	12/16(75.0%)	4/7(57.1%)	16/20(80.0%)
	<10 ×10 ⁹ /L	5/14(35.7%)	3/6(50.0%)	13/16(81.2%)
χ ²		4.58	0.06	0.03
P		<0.05	>0.05	>0.05
病程	≥6 个月	6/16(37.5%)	2/7(28.6%)	15/20(75.0%)
	<6 月	11/14(78.6%)	5/6(83.3%)	14/16(87.5%)
χ ²		5.24	4.03	0.01
P		<0.05	<0.05	>0.05

2.3.2 细胞因子活性 应用放免法测定 20 例患儿治疗前的各类细胞因子水平发现,多数病例呈现 IL22、IL22R、IL28 和 TNF 等造血负调控因子表达增强,病例数分别为 15 例(75.0%)、16 例(80.0%)、17 例(85.0%)和 15 例(75.0%)。所有具有 IL22R 上升者均同时伴有 IL28 的增高。仅少数病例的 IL26 水平降低(7 例,占 35.0%)或 IL21 表达增高(7 例,占 35.0%)。

2.4 疗效预测研究

2.4.1 常规指标 初步统计分析儿童 SAA 和 RAA 在应用免疫抑制治疗之前的各项临床指标与疗效的关系后发现,单独应用 ATG/ALG 治疗,则治疗前网织红细胞绝对计数较高或病程较短者,有效率可明显提高;单独应用 CSA 治疗时,治疗前病程较短者可望获得明显疗效;而联合免疫抑制治疗不受上述因素影响(表 2)。其它因素如病儿的年龄和性别、以及治疗前外周血粒细胞和血小板计数的高低等与 IS 治疗疗效无明显关系。

2.4.2 免疫指标 多项免疫指标检测发现,儿童再障的主要免疫异常指标为 CD4/CD8 比例下降,以及 IL22R、IL28 和 TNF 水平明显增高。目前,根据有限病例资料尚难以进行疗效相关性统计。但是因为上述各项指标的异常率均在 70%以上,故几乎所有病例均存在二项或更多细胞免疫相关的指标的异常。所以,在患儿接受 IS 治疗之前,并非一定要检测免疫指标以作为 IS 治疗的指征。

3 讨论

再障是儿童期较为严重和难治的血液病之一,尤其是对于 SAA 和 RAA 的临床治疗甚为棘手。我国是再障高发地区,平均发病年龄又低于西方国家^[13],故儿童再障患者和年发病人数均很可观,应当引起临床的高度重视。但是,目前国内儿童再障领域的研究,无论在基础或者临床,还是规模或重视程度均远滞后于儿童白血病。因此,必须积极开展

和推进有关儿童再障的研究,以尽快缩短与国际间的差距,不断提高儿童再障的临床疗效和生存质量。

虽然,IS是目前治疗SAA和RAA的有效途径之一。但是,以往均为单药免疫抑制剂治疗,其总有效率和显效质量仍有待提高。常用的免疫抑制剂如ATG/ALG或CSA等治疗的总有效率为50%~60%;有效病例中能够获得基本治愈或缓解的显效者病例较低^[1~6]。CIS是近年来国际上开展不久的先进疗法^[7],其优越性在于发挥其协同作用。此项研究在国内尚未正式开展,也未见CIS治疗儿童再障的国外专题报道。

由于IS治疗儿童再障仍存在一定的风险,药物价格也偏高,因此,必须探索简便可靠的疗效预测指标,以避免不必要的治疗风险和丧失有利的治疗时机。此外,还需不断探索和总结IS的合理使用方法,提高治疗的安全性。

本研究应用CIS治疗儿童SAA和RAA,疗效与国外报道一致^[7,8]。在我国难以广泛开展异基因造血干细胞移植的情况下,CIS可作为儿童SAA和RAA的首选疗法。

研究发现,病程的长短和治疗前外周血网织红细胞绝对计数的高低与单药IS治疗的疗效密切相关,为今后因某些客观原因仍拟采用单药IS治疗儿时合理选择药物和争取治疗时机提供参考依据。此外,因CIS治疗不受上述因素的影响,为单药治疗无效或预期疗效不佳者,提供有效治疗途径。

免疫功能检测结果显示,绝大多数再障患儿存在多项免疫指标异常,其中尤以CD4/CD8比例下降,IL22R、IL28和TNF表达增高为显著,说明儿童SAA和RAA的发病确实存在“免疫介导”致病机制的参与,而且以细胞免疫异常为主。目前有效的免疫抑制剂也主要作用于细胞免疫环节,为IS治疗儿童再障提供理论依据。由于几乎所有患者均存在不同程度的免疫指标异常,因此不必以患儿是否具有免疫指标异常作为IS治疗的依据。

如用药谨慎,副作用防治积极,CIS治疗还是比较安全的。而且由于药理协同作用,有可能增加患儿的治疗耐受性,例如CSA可能降低ATG的血清病发生率或严重程度,HDIG能同时提供免疫防护。

雄性激素有助于提高IS治疗的疗效,本文也以雄性激素为主要辅助治疗^[14]。但是,剂型和剂量选择应尽量做到个体化。

由于受到药源供应、经济情况和对于治疗的认识程度,以及病情的限制等因素的影响,本组病例的CIS方案不尽相同。有必要今后进一步扩大观察例

数,以判定各种不同元素之优劣。

[参 考 文 献]

- [1] Marsh JC. Results of immunosuppression in aplastic anaemia [J]. *Acta Haematol*, 2000, 103(1): 26 - 32.
- [2] Flynn J, Cox CV, Rizzo S, Foukaneli T, Rice K, Murphy M, et al. Direct binding of antithymocyte globulin to haemopoietic progenitor cells in aplastic anaemia [J]. *Br J Haematol*, 2003, 122(2): 289 - 297.
- [3] Bodenstein H. Successful treatment of aplastic anemia with high dose immunoglobulin [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(19): 1368 - 1369.
- [4] 谢晓恬,姚慧玉,顾梅榆,顾龙君,王耀平,赵惠君,等1抗胸腺细胞球蛋白治疗再生障碍性贫血疗效分析 [J] 1 中华儿科杂志, 1994, 32(2): 96 - 98.
- [5] 谢晓恬,王耀平,姚慧玉,应大明1 静脉注射大剂量丙种球蛋白治疗儿童急性再生障碍性贫血 [J] 1 中华血液学杂志, 1994, 15(4): 174 - 175.
- [6] 谢晓恬,应大明,王耀平,林梓,顾梅榆,顾龙君,等1 环孢菌素A治疗小儿再生障碍性贫血 [J] 1 中华血液学杂志, 1991, 12(6): 288 - 290.
- [7] Marsh J, Schrezenmeier H, Marin P, Ilhan O, Ljungman P, McCann S, et al. Prospective randomized multicenter study comparing cyclosporin alone versus the combination of antithymocyte globulin and cyclosporin for treatment of patients with nonsevere aplastic anemia: a report from the European Blood and Marrow Transplant (EBMT) Severe Aplastic Anaemia working party [J]. *Blood*, 1999, 93(7): 2191 - 2195.
- [8] Kojima S, Hibi S, Kosaka Y, Yamamoto M, Tsuchida M, Mugishima H, et al. Immunosuppressive therapy using antithymocyte globulin, cyclosporine, and danazol with or without human granulocyte colony-stimulating factor in children with acquired aplastic anemia [J]. *Blood*, 2000, 96(6): 2049 - 2054.
- [9] 谢晓恬,王耀平,石苇,刘兴元,梅竹,邵越霞,等1 免疫抑制疗法治疗儿童再生障碍性贫血研究 [J] 1 中华儿科杂志, 2001, 39(8): 484 - 487.
- [10] 谢晓恬,王耀平,刘振荣,石苇,刘兴元1 联合免疫抑制治疗儿童重型再生障碍性贫血 [J] 1 中华血液学杂志, 1998, 19(4): 214 - 215.
- [11] 全国第五届再障年会(宝鸡)1 再生障碍性贫血诊断标准 [J] 1 中华血液学杂志, 1987, 8(8): 封4.
- [12] 全国第五届再障年会(宝鸡)1 再生障碍性贫血疗效标准 [J] 1 中华血液学杂志, 1987, 8(8): 382.
- [13] 廖清奎1 小儿血液病基础与临床 [M] 1 第1版1 北京:人民卫生出版社, 2001, 156 - 175.
- [14] Bacigalupo A, Chaple M, Hovs J, van Lint MT, McCann S, Milligan D, et al. Treatment of aplastic anemia (AA) with anti-thymocyte globulin (ALG) and methylprednisolone (MPred) with or without androgens: a randomized trial from the EBMT SAA working party [J]. *Br J Haematol*, 1993, 83(1): 145 - 151.

(本文编辑:钟乐)