

单份非血缘脐血移植后血清生物标志物 对移植后早期并发症的预测作用探究

江慧敏¹ 宋闯迪² 皖湘² 姚雯² 耿良权² 孙光宇² 范倩² 周紫微² 朱小玉² 汤宝林² 孙自敏² 刘会兰^{1,2}

摘要 目的 探究单份非血缘脐带血移植(UCBT)术后血清生物标志物水平与移植后早期并发症的关系。方法 UCBT术后第0、7、14、21、28天(D0、D7、D14、D21、D28)动态监测血液病患者生物标志物可溶性肿瘤抑制素2(sST2)、再生胰岛衍生蛋白3 α (REG3 α)、白细胞介素(IL)-6、IL-8和肿瘤坏死因子受体1(TNFR1)的浓度,分析评估植入前综合征(PES)、急性移植物抗宿主病(aGvHD)和感染与5种生物标志物浓度的关系。结果 PES-/PES+患者在各个检测时间点生物标志物水平均无差异。相较于aGvHD-组,aGvHD+组患者的D28 sST2升高($Z=2.236, P=0.036$)。以D28前是否发生感染分组,两组间各时间点上血清生物标志物水平差异无统计学意义。sST2与TNFR1在移植后D21和D28均表现为中高度正相关($r_s=0.633, r_s=0.821; P=0.005, P=0.023$)。结论 单份脐血移植后D28 sST2的升高与aGvHD的发生密切相关。

关键词 非血缘脐带血移植; 早期并发症; 急性移植物抗宿主病; 血清生物标志物

中图分类号 R 457.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1627-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.023

造血干细胞移植是治疗血液系统恶性疾病成熟有效的手段,非血缘脐带血移植(umbilical cord blood transplantation, UCBT)作为替代供体之一,为缺乏合适的骨髓或外周血供体的血液病患者带来了转机。UCBT后独特的早期免疫反应——植入前综合征(pre-engraftment syndrome, PES)及急性移植物抗宿主病(acute graft-versus-host disease, aGvHD)、感染等严重早期并发症是构成UCBT术后早期发病率和病死率的重要原因^[1-2]。

近年来,转录组学和蛋白质组学的应用使造血干细胞移植后血清生物标志物的发现和验证取得了

重大进展。多个研究中心陆续发现可溶性肿瘤抑制素2(soluble suppressor of tumorigenicity 2, sST2)、再生胰岛衍生蛋白3 α (regenerating islet-derived protein 3-alpha, REG3 α)和细胞因子肿瘤坏死因子受体1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)对aGvHD具有可靠的诊断、预测或预后价值^[3-6]。但是,目前各中心的检测试剂、标本来源不同,能够最大化体现预测价值的监测时间窗也尚未得到统一。鉴于aGvHD的中位发病时间大约在移植后1个月^[7],该研究前瞻性检测本中心行单份脐血移植后1个月内固定时间点的患者血清sST2、REG3 α 、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-8和TNFR1浓度,评估血清生物标志物水平与以aGvHD为主的移植后早期并发症之间的关系,为对其进行早期识别和预防提供参考。

1 材料与方法

1.1 患者和移植物特征 纳入2019年7—10月于安徽省立医院血液科接受单份UCBT的血液病患者共31例,脐血干细胞来自全国公共脐血库,供-受者间人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)高分辨配型 $\geq 5/8$ (A、B、Cw、DR)个位点相合。本研究经安徽省立医院伦理审查委员会批准,所有患者均签署单份UCBT和血清标本采集书面知情同意书。

1.2 预处理方案 31例患者均采用清髓性预处理方案。①氟达拉滨(fludarabine, Flu) + 白消安(busulfan, Bu) + 环磷酰胺(cyclophosphamide, Cy) 23例: Flu 30 mg/m² × 4 d + Bu 3.2 mg/kg × 4 d(儿童Bu剂量按欧洲标准^[8]) + Cy 60 mg/kg × 2 d。②全身照射(total body irradiation, TBI) + Bu + Cy 8例用于再生障碍性贫血/睡眠性阵发性血红蛋白尿(aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, AA/PNH)患者: Flu 40 mg/m² × 5 d + Cy 60 mg/kg × 2 d + TBI 4 Gy。

1.3 aGvHD的预防 使用环孢菌素A(cyclosporine A, CsA)联合霉酚酸酯(mycophenolate mofetil,

2021-03-02 接收

基金项目: 安徽省科技攻关计划项目(编号: 1704a0802149)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院血液科, 合肥 230001

² 中国科学技术大学附属第一医院血液科, 合肥 230001

作者简介: 江慧敏, 女, 硕士研究生;

刘会兰, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: huilan@ustc.edu.cn

MMF) 用于 aGvHD 的预防。CsA: 3 mg/(kg · d) 24 h 持续静脉输注 ,回输前 1 d 开始 ,血清 CsA 平均浓度维持在 250 ~ 350 mg/L ,至胃肠道功能恢复后 ,按照静脉剂量的 2 倍改口服 ,根据移植受者是否有 aGvHD、血流感染、药物毒性以及血细胞恢复情况等调整免疫抑制剂剂量。无 aGvHD 发生及无 CsA 毒副作用的患者 ,维持谷浓度 100 mg/L 至 40 d 左右 ,以后递减 6 ~ 9 个月左右停药。MMF: 30 mg/(kg · d) 分 3 次静脉滴注或口服 ,D1 至 D30 ,无 aGvHD 者逐渐减量至停用。

1.4 临床指标的定义 以回输脐血日为 D0 ,中性粒细胞植入是指移植后持续 3 d 外周血中性粒细胞绝对值(absolute neutrophil count , ANC) $\geq 0.5 \times 10^9 /L$; 血小板植入是指移植后不依赖血小板输注连续 7 d 后 ,持续 3 d 外周血血小板绝对值 $\geq 20 \times 10^9 /L$ 。原发植入失败是指存活时间超过 28 d 中性粒细胞仍未达到植入标准且供者嵌合度进行性下降; 继发植入失败是指供者细胞植入后 ANC 再次持续降低 $< 0.5 \times 10^9 /L$ 并且供者细胞比例进行性减少从而最终丧失供者植入。aGvHD 的诊断和分级依据国际标准^[9]。

1.5 血清生物标志物的监测 于移植后第 0、7、14、21、28 天(D0、D7、D14、D21、D28) 采集患者外周血标本 ,室温自然凝固 10 ~ 20 min ,以 2 000 ~ 3 000 r/min 离心 20 min 左右 ,收集上清液于 - 20 °C 保存。检测时试剂盒及标本应室温平衡至少 60 min。采用高度特异的 ELISA 定量检测血清 sST2、REG3 α 、IL-6、IL-8 和 TNFR1 浓度 ,检测由广州博富瑞医学检验实验室有限公司提供技术支持。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8 分析 ,分类资料用率和百分数表示 ,正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,偏态分布资料以中位数(median *M*) 和四分位数间距(interquartile range , *IQR*) 表示。使用 Mann-Whitney *U* 检验比较不同组间生物标志物水平的差异 ,Spearman 相关系数检验用于分析生物标志物之间的相关性。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本特征和移植结果 如表 1 所示 ,31 例接受脐血移植患者以儿童为主(中位年龄为 12 岁) ,中位体质量为 37.9(27.7 ~ 53.8) kg ,男性和女性分别有 19 例(61.29%) 和 12 例(38.71%)。8 例为 AA/PNH ,10 例为急性髓系白血病 ,10 例为急性淋巴细胞白血病 ,3 例为骨髓增生异常综合征。供

受者 HLA 等位基因以(5 ~ 7) /8 相合最常见 ,回输的总有核细胞数和 CD34⁺ 细胞数的中位数分别为 3.50(2.50 ~ 4.70) $\times 10^7 /kg$ 和 2.01(1.39 ~ 2.76) $\times 10^5 /kg$ 。中性粒细胞和血小板植入的中位时间分别为 18(14 ~ 22) d 和 32(29 ~ 39) d ,观察期内未发生植入失败或复发。

表 1 患者及移植基本特征[*M*(*IQR*)]

特征	人数(<i>n</i> = 31)
年龄(岁)	12(8 ~ 19)
体质量(kg)	37.9(27.7 ~ 53.8)
性别[<i>n</i> (%)]	
男	19(61.29)
女	12(38.71)
疾病[<i>n</i> (%)]	
AA/PNH	8(25.80)
急性髓系白血病	10(32.26)
急性淋巴细胞白血病	10(32.26)
骨髓增生异常综合征	3(9.68)
HLA[<i>n</i> (%)]	
5/8	8(25.80)
6/8	10(32.26)
7/8	10(32.26)
8/8	3(9.68)
回输总有核细胞数($\times 10^7 /kg$)	3.50(2.50 ~ 4.70)
回输 CD34 ⁺ 细胞数($\times 10^5 /kg$)	2.01(1.39 ~ 2.76)
中性粒细胞植入时间(d)	18(14 ~ 22)
血小板植入时间(d)	32(29 ~ 39)
PES[<i>n</i> (%)]	
无	7(22.58)
有	24(77.42)
PES 发生时间(d)	9(8 ~ 13)
aGvHD[<i>n</i> (%)]	
无	20(64.52)
有	11(35.48)
aGvHD 发生时间(d)	25(16 ~ 63)
D28 前感染[<i>n</i> (%)]	
无	12(38.71)
有	19(61.29)

2.2 脐血移植后并发症 31 例患者中 ,24 (77.42%) 例发生 PES ,中位时间为 9(8 ~ 13) d ,累积发生率为 81.85% (95% *CI*: 57.10% ~ 92.30%)。11 例出现 aGvHD ,5 例为 I 度 ,4 例为 III 度 ,2 例为 IV 度; 其中 5 例仅有皮肤侵犯 ,3 例仅胃肠道侵犯 ,3 例为皮肤、胃肠道均有侵犯 ,未观察到肝脏受累 ,中位发生时间为 25(16 ~ 63) d ,累积发生率为 35.48% (95% *CI*: 16.24% ~ 50.31%)。2 例发生 aGvHD 的 AA/PNH 患者中 ,1 例为皮肤 I 度 ,1 例为皮肤、胃肠道 IV 度。无肝室阻塞综合征发生。移植后 D28 内被发现细菌、真菌、病毒等感染证据的患

者共有 19 例,其中 16 例检测出巨细胞病毒核酸阳性,粒缺期发生血流感染 7 例,其中 4 例分离培养出缓症链球菌、1 例大肠埃希菌、1 例阴沟肠杆菌、1 例多动物链球菌。

2.3 移植后血清生物标志物水平变化 在 31 名患者中纵向评估了 5 种血清生物标志物水平的动态变化,观察到脐血移植后患者 IL-6、IL-8 水平随时间进展逐渐升高,sST2 与 TNFR1 在 D7 稍有减低,随后逐渐升高,于 D21 达到高峰后再次减低(图 1A)。在各个检测时间点上,PES- 和 PES+ 组的血清生物标志物水平差异无统计学意义。按是否发生 aGvHD 分组,aGvHD+ 患者的 sST2 和 TNFR1 水平在 5 个时间点上均高于 aGvHD- 患者(表 2),仅

D28 sST2 水平表现出统计学差异($Z = 2.236, P = 0.036$)(图 1B)。按是否发生皮肤 aGvHD 分组,皮肤 aGvHD+ 患者较皮肤 aGvHD- 患者的 D28 sST2 升高($Z = 2.236, P = 0.036$)(图 1C)。进一步对 sST2 与 TNFR1 的相关性进行分析,二者在 D0、D21 和 D28 分别表现为低度相关($r_s = 0.458, P = 0.019$)、中度相关($r_s = 0.633, P = 0.005$)和高度相关($r_s = 0.821, P = 0.023$)均呈现正相关。

胃肠道受累的皮肤 aGvHD 患者数据较少,无法得出准确结果。为避免血流感染对结果造成影响,以 D28 内是否发生感染分组,各时间点上两组间血清生物标志物水平差异无统计学意义(图 1D)。

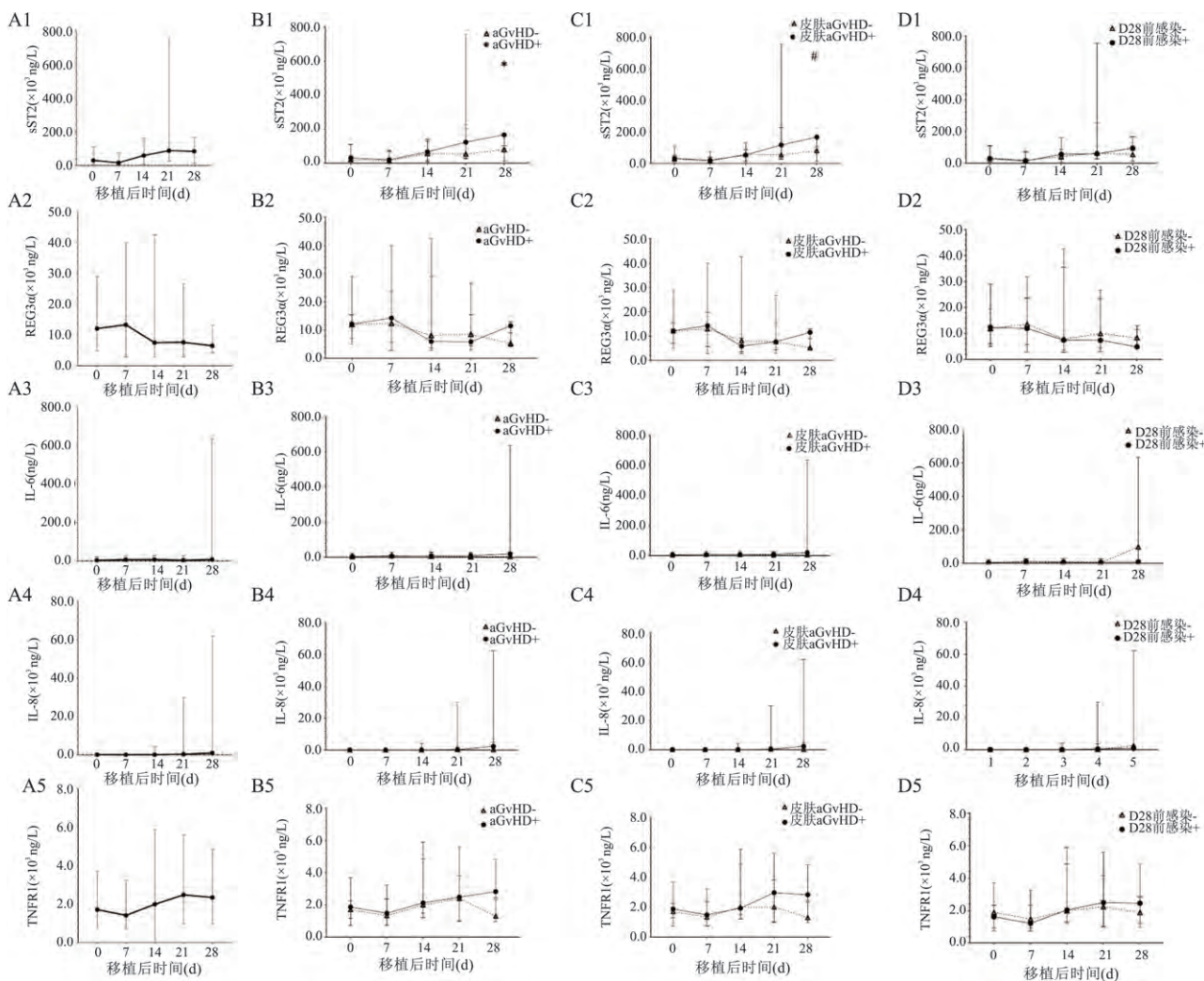


图 1 血清生物标志物的动态变化及各列分组比较

A: UCBT 术后血清生物标志物水平动态变化; B: 按有无 aGvHD 分组,aGvHD+ 和 aGvHD- 患者血清生物标志物水平; C: 按有无皮肤 aGvHD 分组,皮肤 aGvHD+ 和皮肤 aGvHD- 患者血清生物标志物水平; D: 按 D28 前是否存在感染分组,D28 前感染- 和 D28 前感染+ 患者组血清生物标志物浓度; 1: sST2; 2: REG3α; 3: IL-6; 4: IL-8; 5: TNFR1; 与 aGvHD- 组比较: * $P < 0.05$; 与皮肤 aGvHD- 组比较: # $P < 0.05$

表2 aGvHD - 和 aGvHD + 组血清生物标志物动态变化(ng/L)

组别	sST2	REG3α	IL-6	IL-8	TNFR1
aGvHD -					
D0	20 739.2(11 262.7 ~ 56 921.1)	12 012.6(8 850.0 ~ 16 526.2)	3.7(3.0 ~ 4.2)	31.1(23.5 ~ 62.9)	1 702.0(1 082.2 ~ 1 965.8)
D7	15 495.2(11 118.6 ~ 19 054.1)	12 445.4(7 608.7 ~ 17 589.6)	10.2(4.3 ~ 13.5)	24.4(14.9 ~ 33.5)	1 331.8(1 057.2 ~ 1 909.9)
D14	59 465.0(48 476.4 ~ 77 182.7)	8 090.9(6 451.0 ~ 14 892.8)	6.4(4.4 ~ 9.0)	56.8(41.1 ~ 76.2)	1 991.3(1 777.3 ~ 2 726.3)
D21	54 230.1(41 213.2 ~ 144 782.5)	8 559.4(5 893.7 ~ 21 018.7)	2.7(2.2 ~ 9.0)	323.1(39.9 ~ 1 352.4)	2 398.3(1 380.6 ~ 3 874.2)
D28	80 312.0(20 534.3 ~ 83 896.3)	5 265.0(4 479.7 ~ 8 358.6)	4.4(2.1 ~ 6.5)	150.2(30.1 ~ 577.7)	1 303.9(1 036.6 ~ 1 367.4)
aGvHD +					
D0	31 131.5(26 673.7 ~ 43 573.8)	12 181.4(8 710.2 ~ 14 202.0)	4.8(3.7 ~ 7.6)	63.0(43.9 ~ 151.6)	1 876.7(1 433.2 ~ 2 041.8)
D7	20 844.9(12 399.6 ~ 36 260.5)	14 292.1(8 234.9 ~ 19 097.1)	6.7(4.7 ~ 7.7)	32.5(16.3 ~ 41.6)	1 488.2(969.2 ~ 1 768.8)
D14	67 118.1(32 172.9 ~ 91 036.2)	5 998.7(5 200.6 ~ 8 756.6)	8.3(5.3 ~ 10.3)	76.0(43.7 ~ 106.5)	2 127.9(1 405.0 ~ 3 957.1)
D21	123 983.7(66 513.1 ~ 218 207.0)	5 852.8(5 073.8 ~ 13 336.5)	8.7(3.7 ~ 17.1)	308.8(72.7 ~ 3 699.7)	2 484.4(1 374.0 ~ 3 703.8)
D28	166 855.6(103 201.3 ~ 168 112.6)	11 538.7(4 990.7 ~ 12 952.2)	19.7(6.8 ~ 634.6)	2 417.3(875.2 ~ 6 2017.4)	2 829.4(2 442.0 ~ 4 832.9)

3 讨论

本研究为一项前瞻性的单中心研究 结果显示 , 单份脐血移植后 D28 sST2 水平在发生 aGvHD 和皮肤 aGvHD 患者中均升高 ,sST2 与 TNFR1 之间呈现高度正相关 未发现细菌和病毒血流感染对此 5 种血清标志物水平产生影响。

sST2 是可溶性 IL-33 受体 ,IL-33 与膜结合受体、IL-1 受体附件蛋白结合形成异三聚体复合物 ,诱导 2 型炎症细胞因子和炎症反应的发生 ,与 aGvHD 的病理机制有关。sST2 作为 IL-33 的诱饵受体结合并抑制其活性 ,起负调控作用^[10]。本研究表明单份脐带血移植后发生 aGvHD 的患者在 D28 sST2 水平增高。多个大样本的研究^[3-4,11] 中均验证了 sST2 水平是 aGvHD 的独立预测因子 ,移植后第 28 天是最常见的标本采集时间点 ,与本研究观点一致。针对皮肤 aGvHD 中 sST2 升高的表现 ,尽管 IL-33 /ST2 通路在皮肤炎症性疾病中发挥了一定作用^[12] ,但 Paczesny et al^[13] 在 2010 年的研究中从 66 个候选生物标志物蛋白中排除了 sST2 作为皮肤 aGvHD 的潜在预测因子的可能 ,sST2 在皮肤 aGvHD 中的确切作用需要进一步探究。

本研究表明 sST2 与 TNFR1 水平在 D21 和 D28 均表现出了中高度的正相关性 ,D28 TNFR1 在 aGvHD 患者血清中的升高并无统计学意义。关于 TNFR1 本身是否可以作为生物标志物仍存在争议^[6,14] ,而包含有 TNFR1 的几个预测模型均得到了临床的有效验证^[4,11] ,这可能因为单独的 TNFR1 并不适合作为 aGvHD 的预测因子。

REG3α 是区分 aGvHD 性和非 aGvHD 性肠炎最有价值的预测因子之一^[5] ,本研究中 REG3α 水平在系统性或胃肠道 aGvHD 中均未呈现出升高趋势 ,

这可能与本研究中 aGvHD 患者数量较少有关。血清生物标志物浓度变化与细菌、病毒感染无关 ,但排除感染之后的宿主血清细胞因子和炎症产物水平将会使结果更具有说服力。

本研究结果表明移植后 D28sST2 水平增高提示 aGvHD 的发生 ,与几项大样本的观察结果基本一致 ,Hartwell et al^[11] 和 Vander Lugt et al^[3] 的研究也发现了移植后 D7 和 D28 sST2 水平升高对 aGvHD 的预测价值。

单中心、小样本和未能在预处理前测定基线生物标志物浓度作为参考是该研究的不足之处 ,前瞻性、多中心、大样本的随机对照研究将有助于进一步了解血清生物标志物在预测、诊断和判断移植后早期并发症预后方面的具体机制。此外 ,排除细菌、真菌、病毒等感染引起的免疫反应可能会使结果更加准确。

该研究通过前瞻性动态监测脐血移植后血清生物标志物浓度 ,结果显示 aGvHD 患者的 D28 sST2 水平升高 ,与先前的多个中心的观察结果基本一致^[3-4,11] 。进一步找到适用于临床的标本采集时间点、规范化检测方法、试剂来源和标本保存方式将会对临床预防和治疗移植后早期并发症起到指导性作用。

参考文献

[1] 阮燕洁,张家奎,王会平等. 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[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(1): 139-42.

[2] 叶倩龄,宋明珠,王会平等. 继发性白血病患者T细胞亚群检测[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(9): 1469-71.

[3] Vander Lugt M T, Braun T M, Hanash S, et al. ST2 as a marker for risk of therapy-resistant graft-versus-host disease and death [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(6): 529-39.

- [4] Paczesny S , Krijanovski O I , Braun T M , et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease [J]. *Blood* , 2009 , 113(2) : 273 - 8.
- [5] Ferrara J L , Harris A C , Greenson J K , et al. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease [J]. *Blood* , 2011 , 118(25) : 6702 - 8.
- [6] Choi S W , Kitko C L , Braun T , et al. Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of GVHD and survival [J]. *Blood* , 2008 , 112(4) : 1539 - 42.
- [7] Kanakry C G , O'Donnell P V , Furlong T , et al. Multi-institutional study of post-transplantation cyclophosphamide as single-agent graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic bone marrow transplantation using myeloablative busulfan and fludarabine conditioning [J]. *J Clin Oncol* , 2014 , 32(31) : 3497 - 505.
- [8] Zao J H , Schechter T , Liu W J , et al. Performance of busulfan dosing guidelines for pediatric hematopoietic stem cell transplant conditioning [J]. *Biol Blood Marrow Transplant* , 2015 , 21(8) : 1471 - 8.
- [9] Harris A C , Young R , Devine S , et al. International , multicenter standardization of acute graft-versus-host disease clinical data collection: a report from the mount sinai acute GVHD international consortium [J]. *Biol Blood Marrow Transplant* , 2016 , 22(1) : 4 - 10.
- [10] Garlanda C , Dinarello C A , Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future [J]. *Immunity* , 2013 , 39(6) : 1003 - 18.
- [11] Hartwell M J , Özbek U , Holler E , et al. An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival [J]. *JCI Insight* , 2017 , 2(3) : e89798.
- [12] Balato A , Raimondo A , Balato N , et al. Interleukin-33: increasing role in dermatological conditions [J]. *Arch Dermatol Res* , 2016 , 308(5) : 287 - 96.
- [13] Paczesny S , Braun T M , Levine J E , et al. Elafin is a biomarker of graft-versus-host disease of the skin [J]. *Sci Transl Med* , 2010 , 2(13) : 13ra2.
- [14] Sakata N , Yasui M , Okamura T , et al. Kinetics of plasma cytokines after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: the ratio of plasma IL-10/sTNFR level as a potential prognostic marker in severe acute graft-versus-host disease [J]. *Bone Marrow Transplant* , 2001 , 27(11) : 1153 - 61.

Exploration of the predictive role of serum biomarkers for early complications after single umbilical cord blood transplantation

Jiang Huimin¹ , Song Kaidi² , Wan Xiang² , et al

(¹Dept of Hematology , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001;

²Dept of Hematology , The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China , Hefei 230001)

Abstract Objective To explore the relationship between serum biomarker's concentrations and early complications after single umbilical cord blood transplantation (UCBT). **Methods** Concentrations of soluble suppressor of tumorigenicity 2 (sST2) , regenerating islet-derived protein 3-alpha (REG3 α) , interleukin (IL) -6 , IL-8 and tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) in patients with hematological diseases were dynamically monitored on days 0 , 7 , 14 , 21 , 28 after UCBT (D0 , D7 , D14 , D21 , D28) to analyze the relationship between pre-engraftment syndrome (PES) , acute graft versus host disease (aGvHD) and infection and the concentrations of five biomarkers. **Results**

There were no significant differences in biomarker concentrations between PES - /PES + patients at each time point. D28 sST2 was significantly higher in the aGvHD + group compared with the aGvHD - group ($Z = 2.236$, $P = 0.036$) . There was no statistically significant difference in serum biomarker levels between the two groups at each time point according to whether infection occurred before D28. sST2 showed a moderate or high positive correlation with TNFR1 on D21 and D28 ($r_s = 0.633$, $r_s = 0.821$; $P = 0.005$, $P = 0.023$) . **Conclusion** The elevated serum concentration of sST2 on D28 after single UCBT is closely related to the development of aGvHD.

Key words umbilical cord blood transplantation; early complications; acute graft versus host disease; serum biomarkers