

论著·临床研究

# CYP3A5 基因在急性白血病儿童中的表达及临床意义

黄珍<sup>1</sup>, 柴忆欢<sup>2</sup>, 岑建农<sup>3</sup>, 何海龙<sup>2</sup>, 李捷<sup>2</sup>

(1. 温州医学院附属育英儿童血液科, 浙江 温州 325027; 2. 苏州大学附属儿童医院血液科, 江苏 苏州 215003; 3. 江苏省血液研究所白血病研究室, 江苏 苏州 215000)

**[摘要]** 目的 CYP3A5 参与多种常用化疗药物的代谢反应。目前对于 CYP3A5 基因参与急性白血病的研究主要限于细胞系的体外研究。该文通过检测急性白血病患者 CYP3A5-6986 位点的基因型分布特点和基因表达水平, 探讨其基因表达水平对白血病患者治疗、预后评价的意义。方法 ①应用聚合酶链-限制性片段长度多态性方法(PCR-RFLP)及 PCR 产物序列测定, 检测 66 例初治急性白血病患者和 20 例对照儿童的 CYP3A5-6986 位点基因型分布; ②实时定量 PCR 法检测病例组及对照组儿童骨髓单核细胞内 wt-CYP3A5 和 SV1-CYP3A5 mRNA 的表达水平。结果 ①对照组和急性白血病患者 CYP3A5-6986 多态性位点存在野生型(CYP3A5 \* 1/\* 1)、杂合突变型(CYP3A5 \* 1/\* 3)、纯合突变型(CYP3A5 \* 3/\* 3) 3 种基因型; ②66 例初治急性白血病患者按基因型分组后对其 mRNA 表达水平进行检测, 3 组间的 wt-CYP3A5 mRNA 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); ③ALL 组 wt-CYP3A5 mRNA 低表达者第 1 次化疗后的缓解率高于 wt-CYP3A5 mRNA 高表达者, 两者比较差异有显著性意义( $P < 0.05$ ); ④对两例急性淋巴细胞性白血病患者 CYP3A5 mRNA 表达水平动态监测显示, 1 例复发前 wt-CYP3A5 mRNA 表达水平较缓解时升高。另 1 例 wt-CYP3A5 mRNA 表达一直处于较低水平, 患儿目前仍处于缓解状态。结论 wt-CYP3A5 mRNA 表达与白血病患者化疗疗效及预后密切相关, 动态监测 wt-CYP3A5 mRNA 表达水平变化有助于判断病情变化。  
[中国当代儿科杂志, 2009, 11(7): 549-554]

**[关键词]** 白血病; CYP3A5; 儿童

**[中图分类号]** R733.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)07-0549-06

## Expression of CYP3A5 mRNA in children with acute leukemia

HUANG Zhen, CHAI Yi-Huan, CEN Jian-Nong, HE Hai-Long, LI Jie. Department of Hematology, Yuying Children's Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325027, China (Chai Y-H, Email: icecream2019@sina.com)

**Abstract: Objective** The cytochrome P450 subfamily IIIA5 (CYP3A5) gene is responsible for the metabolism of many clinically used anticancer agents. So far the studies on CYP3A5 gene has only been focused on the leukemia cell lines. This study examined the polymorphism of CYP3A5 and tried to find the possible relationship between CYP3A5 gene expression and treatment outcome or prognosis in children with acute leukemia. **Methods** The genotype distribution of CYP3A5-6986A/G gene polymorphism was detected with the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method in 66 children with newly diagnosed acute leukemia (AL) and 22 control individuals. Quantitative real-time RT-PCR was used to examine wt-CYP3A5 and SV1-CYP3A5 mRNA levels in the bone marrow. **Results** Three genotypes of CYP3A5-6986A/G polymorphisms were found: CYP3A5 \* 1/\* 1, CYP3A5 \* 1/\* 3 and CYP3A5 \* 3/\* 3. There were significant differences in the wt-CYP3A5 mRNA expression among the AL patients with different genotypes ( $P < 0.05$ ). In patients with acute lymphocytic leukaemia (ALL), the complete remission (CR) rate in the group with a low expression of wt-CYP3A5 mRNA was significantly higher than that in the group with a high expression ( $P < 0.05$ ). A dynamic monitoring for wt-CYP3A5 mRNA expression was performed in two cases of ALL. The expression increased before ALL relapse compared with that in CR in a patient, while in the other patient, the expression was kept in a low level and the patient remained in CR. **Conclusions** wt-CYP3A5 mRNA expression was associated with the treatment outcome and prognosis in children with AL. Dynamic monitoring for wt-CYP3A5 mRNA expression in the bone marrow may be useful in the evaluation of the disease severity in childhood acute leukemia.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(7): 549-554]

**Key words:** Leukemia; CYP3A5; Child

[收稿日期] 2008-09-12; [修回日期] 2008-10-24

[作者简介] 黄珍, 女, 硕士研究生, 医师。主攻方向: 儿童血液疾病。

[通讯作者] 柴忆欢, 女, 主任医师, 苏州大学附属儿童医院血液科, 邮编: 215003。

上世纪90年代中后期,药物遗传学概念的提出,使人们认识到药物代谢酶的遗传多态性可导致患者对药物出现不同的治疗效应。前期的实验结果表明 *CYP3A5-6986* 位点的基因多态性可能与儿童急性白血病的易感性相关<sup>[1]</sup>。现进一步探讨 *CYP3A5* 基因在急性白血病患者中的表达及其与预后的关系,并对初治病人在治疗过程中进行野生型 mRNA (wt-*CYP3A5* mRNA) 表达水平的动态检测,了解其在疾病初治、未缓解、缓解不同阶段的表达水平,为白血病的预后判断、治疗方案的选择、可能的靶向治疗提供新的思路。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

以2005年11月到2006年12月苏州大学附属儿童医院血液科收治的66例初治的急性白血病患者为研究对象。66例初治患儿中急性淋巴细胞性白血病(ALL)34例,均用DOLP(柔红霉素/去甲氧柔红霉素+长春新碱+门冬酰胺酶+泼尼松/地塞米松)方案诱导治疗。急性髓细胞性白血病(AML)32例,除M3用全反式维甲酸(ATRA)诱导外,均用DA(柔红霉素+阿糖胞苷)方案诱导治疗。随机抽取与病例同期住院的20例非白血病患者作为对照组,包括感染性疾病及特发性血小板减少性紫癜患儿。

### 1.2 *CYP3A5-6986* 位点的基因型检测

应用聚合酶链-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法及PCR产物序列测定,具体操作参照文献<sup>[1]</sup>。

### 1.3 骨髓单核细胞内 wt-*CYP3A5* 和 SV1-*CYP3A5* mRNA 的表达水平检测

应用实时定量 RT-PCR 法检测。

1.3.1 RNA 提取 骨髓标本用 EDTA 抗凝,应用淋巴细胞分离液分离单个核细胞,采用 TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司),按试剂盒说明提取细胞总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 的量和纯度。

1.3.2 cDNA 合成 应用美国 ABI 公司 9600 型

普通 PCR 扩增仪合成。①管 1: 取 200  $\mu$ L 反应管加入 6-随机引物 2  $\mu$ L;RNA 4  $\mu$ L,DEPC 水 9  $\mu$ L;总体积 15  $\mu$ L。循环条件:70 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。②管 2:5  $\times$  Buffer 8  $\mu$ L;10 mM dNTP 1.25  $\mu$ L;200 U/ $\mu$ L MMLV 1  $\mu$ L;RNasin 0.5  $\mu$ L;DEPC 水 14.25  $\mu$ L,总体积 25  $\mu$ L。③将管 2 加入管 1,共 40  $\mu$ L 体系。按如下条件进行逆转录合成:37 $^{\circ}$ C 1 h,95 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。测定浓度后,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.3 引物及探针 根据 GenBank 的 *CYP3A5* mRNA 序列使用 Primer Express Software 2.0 设计引物。目的基因 *CYP3A5*, wt-*CYP3A5*, SV1-*CYP3A5*, GAPDH 的引物和探针由上海生物工程技术有限公司合成,各引物和探针的碱基序列见表 1。

1.3.4 荧光定量 PCR 标准模板的构建 从 K562 细胞提取的 RNA 用引物按 RT-PCR 法分别扩增 wt-*CYP3A5*、SV1-*CYP3A5* 和 GAPDH 基因,产物经纯化试剂盒(广州备泰公司)纯化后与 Pmd18-TVector(上海生物工程有限公司)连接、转化到大肠杆菌 DH5a,培养阳性克隆并提取质粒,纯化后 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.5 优化后的定量 PCR 反应体系 包括 5  $\times$  Buffer 5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> 0.25  $\mu$ L, dNTP 0.75  $\mu$ L, Taq 酶 0.25  $\mu$ L, 正向引物 0.5  $\mu$ L, 反向引物 0.5  $\mu$ L, 模板 2  $\mu$ L, 探针 0.3  $\mu$ L, dd H<sub>2</sub>O 15.45  $\mu$ L。反应总体积为 25  $\mu$ L, 扩增反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火延伸 1 min, 共 50 个循环, 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存扩增产物。

1.3.6 实时定量 PCR 方法检测 *CYP3A5* 的临床应用 应用已经建立的实时定量 PCR 方法,对所收集的 66 例初治急性白血病患者和 20 例对照儿童进行 wt-*CYP3A5* mRNA 和 SV1-*CYP3A5* mRNA 表达水平的检测。

### 1.4 统计学方法

采用两个独立样本的 *t* 检验分析 *CYP3A5* mRNA 在不同基因型的白血病患者中差异有无显著性;采用卡方检验对比 *CYP3A5* mRNA 高表达及低表达组的化疗缓解率差异是否有显著性;运用单因素方差分析

表 1 引物和探针的碱基序列

|                    | 正向引物                           | 反向引物                          | 探针   |
|--------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|
| wt- <i>CYP3A5</i>  | 5-GGGTCTCTGGAAATTTGACACAGAG-3; | 5-CTGTTCTGATCACGTCGGGATCT-3;  | 5-6FAM-ATGTGGGAACGTATGAAGT-CAACTCCCT-3       |
| SV1- <i>CYP3A5</i> | 5-TCTCTGGAAATTTGACACAGACTGC-3; | 5-CAGCAAGACTTCTCACACAGGAGC-3; | 5-6FAM-AATGTGGGCTATCTCTCCCT-GTTTGACCA-3      |
| GAPDH              | 5-TCCTGCACCACCAACTGCTT-3;      | 5-GAGGGCCATCCACAGTCTT-3;      | 5-6FAM-CACTCATGACCACAGTCCAT-GCCATCAC-TAMRA-3 |

比较 *CYP3A5* 基因表达在 AML 的各亚型间(按 FAB 分型)是否有差异。所有数据用 SPSS 13.0 统计软件分析处理。 $P < 0.05$  被认为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 *CYP3A5* 位点的基因型分型

*CYP3A5* 基因-6986A/G 位点的 PCR 扩增产物片段为 293 bp, 酶切扩增产物后电泳获得 3 种基因型。①野生型 (*CYP3A5* \* 1/\* 1): 酶切后出现 148 bp, 125 bp 和 20 bp 3 个片段; ②纯合突变型 (*CYP3A5* \* 3/\* 3): 酶切后可见 168 bp 和 125 bp 两个片段; ③杂合突变型 (*CYP3A5* \* 1/\* 3): 酶切后出现 168 bp, 148 bp 和 125 bp 3 个片段。

### 2.2 3 种基因型测序分析

出现了 A-G 突变者为变异型(图 1~3)。

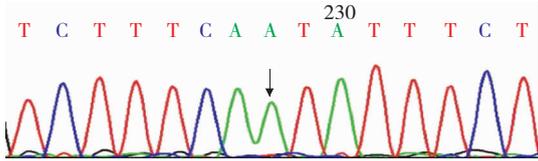


图 1 *CYP3A5*-6986 \* 1/\* 1 基因型测序图 箭头处 6986 位点只有 A 一个峰。

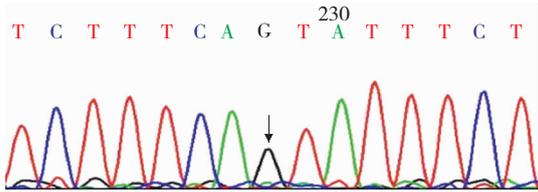


图 2 *CYP3A5* \* 3/\* 3 基因型测序图 箭头处 6986 位点只有 G 一个峰。

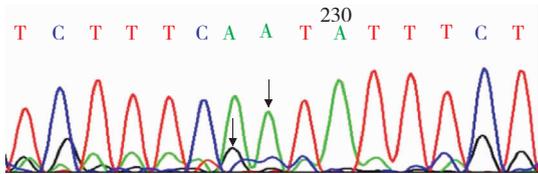


图 3 *CYP3A5*-6986 \* 1/\* 3 基因型测序图 箭头处 6986 位点同时出现二个峰。

### 2.3 3 种基因型的分布

66 例白血病患者中有 15 例表现为 *CYP3A5* \* 1/\* 1, 16 例为 *CYP3A5* \* 1/\* 3, 35 例为 *CYP3A5* \* 3/\* 3。20 例对照组儿童中 1 例表现为 *CYP3A5* \* 1/\* 1, 9 例 *CYP3A5* \* 1/\* 3, 10 例 *CYP3A5* \* 3/\* 3。

### 2.4 实时定量 PCR 方法反应条件的建立和优化

取冻存的 *CYP3A5* 重组质粒 2  $\mu$ L(浓度为 1  $\times$

$10^8$  copies/ $\mu$ L), 10 倍稀释成浓度为  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$  copies/ $\mu$ gRNA 之间, 分别进行定量 PCR 扩增, 结果显示敏感度达  $1 \times 10^2$  copies/ $\mu$ gRNA, 其线性检测范围为 5 个数量级别, 其对数与相应的 Ct 值有很好的线性相关性, 相关系数  $r = 0.997$ (图 4, 5)。

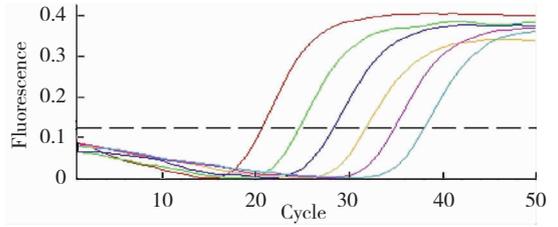


图 4 优化后的 *CYP3A5* 的实时荧光定量分析图 *CYP3A5* 质粒由  $10^2 \sim 10^6$  倍稀释扩增图, 显示了随着 PCR 扩增, 荧光信号强度增加, Ct 值与起始循环靶分子数成反比。

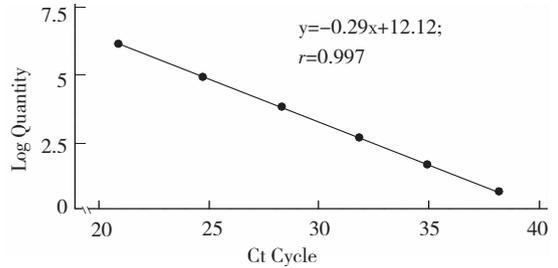


图 5 wt-*CYP3A5* 基因标准曲线 显示了 Ct 值与起始循环靶分子数的对数呈线性相关, 可以用来计算待测样本中 wt-*CYP3A5* 表达水平, 曲线斜率为 -0.29, 相关系数为 0.997。

### 2.5 wt-*CYP3A5* mRNA 的表达

2.5.1 不同基因型患儿的 wt-*CYP3A5* mRNA 表达水平比较 *CYP3A5* \* 1/\* 1 基因型内只产生野生型 mRNA (wt-*CYP3A5* mRNA), *CYP3A5* \* 1/\* 3 和 \* 3/\* 3 基因型内存在野生型和变异型两种 mRNA。无论是 *CYP3A5* \* 1/\* 3 还是 \* 3/\* 3 基因型, wt-*CYP3A5* mRNA 和 SV1-*CYP3A5* mRNA 均明显相关,  $r$  分别为 0.790 和 0.847。考虑到 wt-*CYP3A5* mRNA 在 3 种基因型内均能检测到, 且 wt-*CYP3A5* mRNA 与 SV1-*CYP3A5* mRNA 明显相关, 并且如前所述, 决定 *CYP3A5* 功能的主要是 wt-*CYP3A5* mRNA, 因此将初治急性白血病患者按基因型分组后对其 wt-*CYP3A5* mRNA 表达水平进行统计分析。3 组间的 wt-*CYP3A5* mRNA 表达差异有显著性(表 2)。66 例初治白血病患者患儿的 wt-*CYP3A5* mRNA 平均水平为  $16.15 \pm 19.64$ , 与对照组  $14.11 \pm 4.02$  比较, 差异无显著性,  $P > 0.05$ 。

2.5.2 wt-*CYP3A5* mRNA 表达水平与 FAB 分型各亚型的关系 由于 ALL 患儿的 FAB 分型( $L_1, L_2, L_3$ )资料缺失较多, 仅对 AML 患儿的 wt-*CYP3A5*

mRNA 表达水平与 FAB 分型各亚型的关系进行了研究。32 例初治的 AML 患儿具体分型为 FAB -M<sub>1</sub> 2 例、M<sub>2</sub> 11 例、M<sub>3</sub> 8 例、M<sub>4</sub> 6 例、M<sub>5</sub> 4 例,难以区分表型 1 例。由于 M<sub>1</sub> 型例数太少,未列入统计比较。从表 3 可以看出, M<sub>5</sub> 的表达水平最高, M<sub>3</sub> 最低, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。其他各型间 wt-mRNA 表达水平差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

表 2 不同基因型患儿的 wt-CYP3A5 mRNA 比较

( $\bar{x} \pm s$ )

| 分型               | 例数 | wt-CYP3A5 mRNA             |
|------------------|----|----------------------------|
| CYP3A5 * 1 / * 1 | 15 | 27.78 ± 13.25              |
| CYP3A5 * 1 / * 3 | 16 | 8.41 ± 11.23 <sup>a</sup>  |
| CYP3A5 * 3 / * 3 | 35 | 0.85 ± 1.73 <sup>a,b</sup> |

a: 与 CYP3A5 \* 1 / \* 1 组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与 CYP3A5 \* 1 / \* 3 组比较,  $P < 0.05$

表 3 wt-CYP3A5 mRNA 表达水平与 FAB 分型各亚型的关系

( $\bar{x} \pm s$ )

| 分型             | 例数 | wt-CYP3A5 mRNA            |
|----------------|----|---------------------------|
| M <sub>2</sub> | 11 | 26.53 ± 6.11              |
| M <sub>3</sub> | 8  | 13.96 ± 15.51             |
| M <sub>4</sub> | 6  | 28.02 ± 11.28             |
| M <sub>5</sub> | 4  | 32.01 ± 4.30 <sup>a</sup> |

a: 与 M<sub>3</sub> 型组比较,  $P < 0.05$

2.5.3 不同染色体数量或核型白血病患者 wt-CYP3A5 mRNA 表达水平的比较 34 例初治 ALL 中染色体数目为二倍体组的 13 例,低二倍体组 6 例,超二倍体组 11 例,无分裂相 4 例。3 组之间的 wt-CYP3A5 mRNA 表达水平差异无显著性。伴有  $t(1;19)$ 、 $t(9;22)$  或  $t(4;11)$  异常核型的初治 ALL 患儿 wt-CYP3A5 mRNA 与正常核型初治患儿相比差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。32 例初治 AML 患儿中染色体数目为二倍体组的有 9 例,低二倍体组 2 例,超二倍体组 18 例,无分裂相 3 例。染色体数量为二倍体的 AML 儿童 wt-CYP3A5 mRNA 表达平均水平高于超二倍体组,但差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。低二倍体组仅两例,未列入统计学分析。核型正常与异常的 AML 患儿 wt-CYP3A5 mRNA 差异无显著性,  $P > 0.05$  (表 4, 表 5)。

表 4 染色体数目不同的患儿的 wt-CYP3A5 mRNA 比较

( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | ALL |                | AML |                |
|------|-----|----------------|-----|----------------|
|      | 例数  | wt-CYP3A5 mRNA | 例数  | wt-CYP3A5 mRNA |
| 低二倍体 | 6   | 13.71 ± 4.83   | 2   | -              |
| 二倍体  | 13  | 17.42 ± 7.97   | 9   | 26.14 ± 3.35   |
| 超二倍体 | 11  | 12.60 ± 2.51   | 18  | 17.56 ± 3.06   |

表 5 不同染色体核型患儿 wt-CYP3A5 mRNA 比较

( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | ALL |                           | AML |               |
|------|-----|---------------------------|-----|---------------|
|      | 例数  | wt-mRNA                   | 例数  | wt-mRNA       |
| 正常核型 | 13  | 16.24 ± 9.74              | 9   | 11.63 ± 23.77 |
| 异常核型 | 6   | 27.59 ± 1.32 <sup>a</sup> | 11  | 17.21 ± 3.06  |

a: 与正常核型组比较,  $P < 0.05$

## 2.6 wt-CYP3A5 mRNA 表达与临床疗效的关系

2.6.1 初治白血病患者 wt-CYP3A5 mRNA 表达与缓解率的关系 依据 wt-CYP3A5 mRNA 表达水平, 将初治白血病患者分为高表达组及低表达组, 对两者一个疗程结束后的缓解率进行比较。28 例可进行疗效评估的 ALL 中, wt-CYP3A5 高表达者完全缓解 (CR) 率为 33.3% (3/9), wt-CYP3A5 低表达者 CR 率为 89.5% (17/19), 差异有显著性 ( $\chi^2 = 4.481, P < 0.05$ )。23 例可进行疗效评估的 AML 患儿中, wt-CYP3A5 高表达者 7 例, 一个疗程后缓解的有 2 例, CR 率为 28.6%; wt-CYP3A5 低表达者 CR 率为 68.8% (11/16), 差异无显著性 ( $\chi^2 = 3.522, P > 0.05$ )。

2.6.2 治疗过程中 wt-CYP3A5 mRNA 表达水平的变化 对两例初治的高危 ALL 患儿 wt-CYP3A5 表达水平进行动态监测。两例患儿均为 CYP3A5 \* 1 / \* 3 基因型, 都为男性, 年龄分别为 10 岁和 11 岁。两例患儿化疗前 wt-CYP3A5 mRNA 表达水平分别为 48.92 和 39.87。经 DOLP 方案化疗获 CR 后其 wt-CYP3A5 表达量均较前降低, 分别下降至 22.17 和 19.11。有 1 例缓解 5 个月时检测 wt-CYP3A5 mRNA 表达量, 由 CR 时的 22.17 上升至 38.68, 其表达有上升趋势, 6 个月后又出现了复发。另外 1 例 wt-CYP3A5 mRNA 一直处于较低水平, 目前仍处于缓解状态。

## 3 讨论

化疗个体化是近年来肿瘤治疗研究的一个热点和重点。阐明不同化疗药物代谢关键酶的表达水平及其调控因素, 将减少临床化疗方案的经验性和剂量的盲目性, 并有助于揭示不同个体对药物敏感性存在差异的内在本质, 真正实现肿瘤化疗的个体化。目前的研究已经明确人体内 I 相反应所涉及的药物代谢酶主要是细胞色素 P450 (CYP450)。在肿瘤治疗中的许多细胞毒药物需要通过 CYP450 活化产生活性代谢产物而发挥作用。对于 CYP450 超家族里重要的 CYP3A5 亚族, 主要在骨肉瘤、小细胞性肺

癌、乳腺癌<sup>[2]</sup>等疾病以及肝脏、肾脏疾病患者移植后免疫抑制剂的使用方面研究相对较多。而对于 *CYP3A5* 参与急性白血病的研​​究目前主要限于细胞系的体外研究,在临床方面的研究目前刚刚起步。因此深入开展对 *CYP3A5* 基因的研究,旨在对临床上指导治疗、判断预后有所帮助,在对白血病患者进行个体化治疗时以制定出更有效的判定临床疗效和预后的指标。

目前对于 *CYP3A5* 在造血系统的表达,各方面的报道并不一致。Janardan 等<sup>[3]</sup> 和 Asghar 等<sup>[4]</sup> 认为在人类外周血单核细胞中能够检测到 *CYP3A5* 的转录,但 Furukawa 等<sup>[5]</sup> 研究报道外周血单核细胞仅检测到 *CYP1A1*、*1A2*、*1B1*、*2A6*、*2B6*、*2E1*、*2F1*、*4B1*, 而无 *CYP3A* 的表达。本研究利用荧光定量 PCR 的方法在初治的白血病患者骨髓单核细胞中检测到 *CYP3A5* mRNA 的表达。Nagai 等<sup>[6]</sup> 研究发现 *CYP3A5* 在白血病 MOLT-4 和 K562 细胞系中有特异性表达,与本实验研究结果一致。同时相对于各种蛋白表达水平的检测方法,荧光定量 PCR 更为快速简单,重复性好,稳定性高。

本实验发现在 *CYP3A5* \*1/\*1 基因型内只检测到野生型 mRNA (wt-*CYP3A5* mRNA), 而 *CYP3A5* \*1/\*3 和 *CYP3A5* \*3/\*3 基因型内存在野生型和变异型两种 mRNA。不同基因型所表达的 wt-*CYP3A5* mRNA 差异有显著性, *CYP3A5* \*1/\*3 的 wt-*CYP3A5* mRNA 表达高于 *CYP3A5* \*3/\*3 近 4 倍。Lin 等<sup>[7]</sup> 用实时定量 PCR 的方法对 24 例志愿者肝脏的 wt-*CYP3A5* 和 SV1-*CYP3A5* mRNA 进行检测,结果与本实验一致。前期的实验结果发现白血病患者中 *CYP3A5*-6986 位点大部分表现为 \*3/\*3 基因型,但即使是同样表现为 *CYP3A5* \*3/\*3 基因型的儿童, wt-*CYP3A5* mRNA 转录水平也存在很大的变异范围(0.032 ~ 156.886)。同样基因型的患儿 *CYP3A5* mRNA 变异范围较大,考虑和下列因素有关: *CYP3A5* 的表达除主要受 *CYP3A5* 基因单核苷酸多态性的影响外,体内、外环境中的许多因素(如饮食、药物、激素、细胞因子等)也参与其表达水平的调节<sup>[8,9]</sup>。

本研究将 66 例初治的白血病患者与对照组儿童的 wt-*CYP3A5* mRNA 表达水平进行比较,白血病患儿的 wt-*CYP3A5* mRNA 平均水平与对照组比较差异无显著性。试验的预期结果是白血病患儿的 wt-*CYP3A5* mRNA 水平要低于对照组,从而使 *CYP3A5* 酶活性降低,导致对外界环境毒性物质的解毒能力下降,以进一步证实 *CYP3A5*-6986 位点

*CYP3A5* \*3/\*3 基因型与儿童急性白血病的易感性<sup>[1,10]</sup>。但实验结果未发现有明显差异。其原因考虑可能与下列因素有关:20 例对照组儿童中仅 1 例表现为 *CYP3A5* \*1/\*1, 9 例 *CYP3A5* \*1/\*3, 10 例 *CYP3A5* \*3/\*3。因样本例数较少,其基因型分布频率不具有群体代表性,进而会对转录水平的分析产生一定影响;另外如前所述,体内、外环境中的许多因素也参与 *CYP3A5* 表达水平的调节。因此在基因型基础上要想进一步研究基因表达水平与白血病的易感性,需要扩大样本量。

结合患者临床资料分析,AML 病人中 FAB 分型临床预后相对较好的 M3 组 wt-*CYP3A5* mRNA 表达明显低于 M5 组,差异有显著性。但有 1 例 M3 患儿染色体有 t(15;17) 易位,亦检测到 PML/RAR $\alpha$  融合基因。而该患儿从开始使用维甲酸及 DA 方案化疗,骨髓一直未缓解,属于原发性耐药,其 wt-*CYP3A5* mRNA 表达水平亦一直处于较高水平。ATRA 耐药的机制目前仍不十分清楚,但已知的可能机制包括 ATRA 分解代谢的加快、维甲酸结合蛋白的增高, PLZF-RAR 融合基因 RAR 配体结合域的突变。上海血液研究所应用微阵列技术研究发现, ATRA 诱导 NB4 细胞及急性早幼粒细胞性白血病转基因小鼠造血干细胞后发生上调的基因中均包括 CYPs 家族<sup>[11]</sup>。Ikezoe 等<sup>[12]</sup> 发现 *CYP3A5* 的抑制剂利托那韦能够阻止对 ARTA 耐药的 UF-1 细胞增殖,诱导其分化。上述研究结果均提示 ATRA 可能通过调控 *CYP3A5* 基因而增强其自身的代谢。因此考虑该患儿的 wt-*CYP3A5* mRNA 表达水平高,对 ATRA 的代谢清除能力加强,血药浓度相应较低从而影响了化疗疗效。对于 M<sub>3</sub> 的病人,除了常规进行染色体和融合基因的检测,是否可将 *CYP3A5* 的表达也作为一项检测项目,以便对 M<sub>3</sub> 患儿的化疗反应进行预测。

细胞遗传学方面,本研究未发现染色体数量可影响 wt-*CYP3A5* 表达水平的依据。但染色体核型改变与 wt-*CYP3A5* mRNA 表达有关。伴有 (9;22)、(1;19) 或 t(4;11) 异常核型的 6 例初治 ALL 患儿 wt-*CYP3A5* mRNA 表达水平较正常核型 ALL 患儿明显升高。上述几种核型异常在 ALL 中均被列为高危因素,而 wt-*CYP3A5* mRNA 表达水平增高与染色体核型异常具有密切的相关性,这也从另外一个角度说明了 wt-*CYP3A5* mRNA 表达水平与患儿的危险度即预后相关。

将可进行疗效分析的初治白血病患者分成 wt-*CYP3A5* 高表达及 wt-*CYP3A5* 低表达组, ALL 组

中 wt-CYP3A5 高表达者一个疗程后缓解率低, wt-CYP3A5 低表达者缓解率高, 两者比较差异有显著性。我们推测初治 ALL 患儿白血病细胞 wt-CYP3A5 mRNA 表达的差异是导致诱导化疗疗效存在个体间差异的原因之一。初治时 CYP3A5 即高表达的 ALL 患儿具有一定的遗传背景(酶基因及其转录因子的遗传突变)和/或环境因素(如饮食、药物、激素等)。其高表达 CYP3A5 的白血病细胞可能对 ALL 化疗中各种常见的化疗药物如柔红霉素<sup>[13]</sup>、长春新碱、VP16 等局部代谢清除能力加强, 从而影响化疗疗效。Goh 等<sup>[14]</sup>进行紫杉醇药代动力学与 CYP3A5 基因型研究以及 Kishi 等<sup>[15]</sup>研究发现 ALL 患儿不同的 CYP3A5 基因型和 VP16 血药浓度的高低明显相关( $P < 0.05$ )。上述实验结果亦支持我们的推测。但在 AML 患儿中未发现 wt-CYP3A5 mRNA 表达水平的高低对缓解率的影响。分析其原因考虑可能与下列因素有关: 相对于 AML, CYP3A5 参与代谢的化疗药物在 ALL 或各种实体瘤中更常使用, 同时另外有一些在 AML 治疗中起重要作用的药物如阿糖胞苷并不经过 CYP3A5 代谢。但此次研究的统计分析结果  $P = 0.061$ , 接近于临界值, 因此对于 wt-CYP3A5 mRNA 表达水平高低与急性白血病化疗缓解率的关系需要扩大样本量进一步深入研究。

对两例均为高危型的 ALL 患儿 wt-CYP3A5 表达水平进行动态监测, 两例患儿经 DOLP 方案化疗后其 wt-CYP3A5 表达量均较前降低。有一例缓解 5 个月时外周血检测 wt-CYP3A5 mRNA 表达量, 发现其表达有上升趋势, 6 个月后出现了复发。考虑继发性耐药患者残留的白血病细胞在反复化疗药物的刺激下逐步诱导 CYP3A5 转录增强, 诱导其活性上调, 导致 ALL 细胞对化疗药的局部代谢清除增强, 使之逃避化疗药物的杀伤作用, 从而最终导致复发, 且复发后疗效差。因此对于 CYP3A5 mRNA 表达进行动态监测, 对于判断疗效和指导治疗有一定的意义。

#### [参 考 文 献]

[1] 黄珍, 柴忆欢, 岑建农, 何海龙, 李捷, 卢俊. CYP3A5 基因多态性与儿童急性白血病的相关性研究[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(7): 546-548.

[2] Mitra R, Srirangam A, Capdevila J, Potter DA. Cytochrome P450 promotes breast cancer cell proliferation [J]. Proc Amer Assoc Cancer Res, 2006, 47(4): 1220-1221.

[3] Janardan SK, Lown KS, Schmiedli-Ren P, Thummel KE, Watkins PB. Selective expression of CYP3A5 and not CYP3A4 in human blood [J]. Pharmacogenetics, 1996, 6(5): 379-385.

[4] Asghar A, Gorski JC, Haehner-Daniels B, Hall SD. Induction of multidrug resistance-1 and cytochrome P450 mRNAs in human mononuclear cells by rifampin [J]. Drug Metabolism Disposition, 2002, 30(1): 20-26.

[5] Furukawa M, Nishimura M, Ogino D, Chiba R, Ikai I, Ueda N. Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver [J]. Cancer Sci, 2004, 95(6): 520-529.

[6] Nagai F, Hiyoshi Y, Sugimachi K, Tamura HO. Cytochrome P450 (CYP450) expression in human myeloblastic and lymphoid cell lines [J]. Bio Pharm Bull, 2002, 25(3): 383-385.

[7] Lin YS, Dowling AL, Quigley SD, Farin FM, Zhang J, Lamba J, et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism [J]. Mol Pharmacol, 2002, 62(1): 162-172.

[8] Lee SJ, Jusko WJ, Salaita CG, Calis KA, Jann MW, Spratlin VE, et al. Reduced methylprednisolone clearance causing prolonged pharmacodynamics in a healthy subject was not associated with CYP3A5 \*3 allele or a change in diet composition [J]. J Clin Pharmacol, 2006, 46(5): 515-526.

[9] Smith NF, Figg WD, Sparreboom A. Recent advances in pharmacogenetic approaches to anticancer drug development [J]. Drug Devel Res, 2004, 62(3): 233-253.

[10] Pakakasama S, Mukda E, Sasanakul W, Kadegasem P, Udomsubpayakul, Thithapandha A, Hongeng S. Polymorphisms of drug metabolizing enzymes and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Am J Hematol, 2005, 79(3): 202-205.

[11] Liu TX, Zhang JW, Tao J, Zhang RB, Zhang QH, Zhao CJ, et al. Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells [J]. Blood, 2000, 96(4): 1496-1504.

[12] Ikezoe T, Daar ES, Hisatake J, Taguchi H, Koeffler HP. HIV-1 protease inhibitors decrease proliferation and induce differentiation of human myelocytic leukemia cells [J]. Blood, 2000, 96(10): 3553-3559.

[13] Lu H, Waxman DJ. Antitumor activity of methoxymorpholinyl doxorubicin: potentiation by cytochrome P450 3A metabolism [J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(1): 212-219.

[14] Goh BC, Lee SC, Wang LZ, Fan L, Guo JY, Lamba J, et al. Explaining interindividual variability of docetaxel pharmacokinetics and pharmacodynamics in Asians through phenotyping and genotyping strategies [J]. J Clin Oncol, 2002, 20(1): 3683-3690.

[15] Kishi S, Yang W, Boureau B, Morand S, Das S, Chen P, et al. Effects of prednisone and genetic polymorphisms on etoposide disposition in children with acute lymphoblastic leukemia [J]. Blood, 2004, 103(1): 67-72.

( 本文编辑: 邓芳明 )