

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.05.011

论著·临床研究

6-巯基嘌呤致急性淋巴细胞白血病患者不良反应及其与 TPMT 基因多态性的关系

谢偲 岳丽杰 丁慧 任艳飞 杨春兰 郑苗苗

(遵义医学院附属深圳市儿童医院儿科研究所, 广东 深圳 518026)

[摘要] **目的** 分析6-巯基嘌呤(6-MP)维持治疗急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿不良反应的发生情况,探讨巯嘌呤甲基转移酶(TPMT)基因多态性与6-MP毒副作用的关系。**方法** 提取46例ALL患儿骨髓细胞总RNA并逆转录成cDNA。应用变性梯度凝胶电泳(DGGE)结合DNA测序,对ALL患儿TPMT*1S和*3C基因型进行检测。采用美国国立癌症研究所第3版常规毒性判定标准(NCI CTC 3.0)行药物毒性分级,分析TPMT基因多态性与6-MP不良反应发生的关系。**结果** 在维持治疗阶段,22%(10/46)患儿因6-MP所致严重不良反应停药,不良反应主要表现为骨髓抑制、肝脏毒性和胃肠道反应。2例TPMT*3C突变基因型(AG+GG)患儿均出现重度不良反应,其中1例纯和突变患儿出现与6-MP剂量相关的骨髓抑制和肝脏毒性。TPMT*1S各基因型与6-MP所致的重度骨髓抑制及肝脏毒性无明显相关性($P>0.05$)。**结论** TPMT*3C多态性可能与6-MP所致严重不良反应发生有关。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(5): 499-503]

[关键词] 6-巯基嘌呤; 不良反应; 巯嘌呤甲基转移酶; 基因多态性; 急性淋巴细胞白血病; 儿童

Correlations between 6-mercaptopurine treatment-related adverse reactions in children with acute lymphoblastic leukemia and polymorphisms of thiopurine methyltransferase gene

XIE Cai, YUE Li-Jie, DING Hui, REN Yan-Fei, YANG Chun-Lan, ZHENG Miao-Miao. Institute of Pediatric Research, Shenzhen Children's Hospital of Zunyi Medical College, Shenzhen, Guangdong 518026, China (Yue L-J, E-mail: 2376028869@qq.com)

Abstract: Objective To explore 6-mercaptopurine (6-MP) treatment-related adverse reactions in children with acute lymphoblastic leukemia (ALL), and to assess the association between the polymorphisms of thiopurine methyltransferase (TPMT) gene and these 6-MP related toxicities. **Methods** Total RNA was extracted from bone marrow samples of 46 children with ALL and was then reversed to cDNA. TPMT*1S and *3C were screened by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) combining with DNA sequencing. Drug toxicities were classified according to national cancer institute-common toxicity criteria version 3.0 (NCI CTC 3.0). The relationship between TPMT gene polymorphisms and the adverse reactions of 6-MP treatment was analyzed. **Results** During the maintenance treatment period, 22% (10/46) of children discontinued 6-MP treatment because of serious adverse reactions. Two children with TPMT*3C genotypes presented severe adverse reactions, including 1 child with homozygotic mutation who had 6-MP dose-related myelosuppression and hepatotoxicity. The main side effects of 6-MP were myelosuppression, hepatotoxicity and gastrointestinal reaction. And there were no significant differences between TPMT*1S genotypes and severe myelosuppression or hepatotoxicity caused by 6-MP ($P>0.05$). **Conclusions** TPMT*3C may correlate with severe adverse reactions caused by 6-MP.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(5): 499-503]

Key words: 6-mercaptopurine; Adverse reaction; Thiopurine methyltransferase; Gene polymorphism; Acute lymphoblastic leukemia; Child

[收稿日期] 2013-10-06; [接受日期] 2014-01-14

[基金项目] 深圳市科技计划重点项目(20110101); 国家自然科学基金资助项目(30471830)。

[作者简介] 谢偲, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 岳丽杰, 女, 主任医师, 教授。

急性淋巴细胞白血病 (acute lymphocytic leukemia, ALL) 是儿童最常见的肿瘤性疾病, 其治疗的关键在于杀伤肿瘤细胞并使患儿始终处于缓解状态。6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine, 6-MP) 作为维持治疗阶段的主要化疗药物, 对 ALL 治疗至关重要。巯嘌呤甲基转移酶 (thiopurine methyltransferase, TPMT) 是 6-MP 等巯嘌呤类药物的主要分解代谢酶, 其单核苷酸基因多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 可能使该酶活性降低, 继而造成活性代谢产物 6-硫鸟嘌呤核苷酸 (6-thioguanine nucleotides, 6-TGNs) 浓度升高, 药物毒性增加, 最终导致 6-MP 用药存在明显的个体差异^[1]。就遗传药理学观点而言, ALL 患儿使用 6-MP 前检测 TPMT 基因型可能有利于调整用药剂量, 实现个体化治疗, 但临床上关于 TPMT 基因多态性是否影响个体 6-MP 耐受性尚存争议。本研究旨在关注 ALL 患儿维持治疗阶段服用 6-MP 后的不良反应发生情况, 探讨中国汉族人群常见的两个多态性位点 (TPMT*3C、*1S) 基因型^[2]与患儿 6-MP 耐受性的关系, 以进一步提高 ALL 患儿 6-MP 治疗的安全性。

1 资料与方法

1.1 研究对象及维持治疗方案

选取 2006 年 1 月至 2012 年 12 月在我院血液科确诊的 ALL 汉族患儿 46 例为研究对象, 其中男 30 例, 女 16 例, 确诊年龄 5.0 ± 2.8 岁, 均严格按照全国协作组方案^[3]或广州地区儿童 ALL 2002 化疗协作网方案 (改良 ALLIC-BFM-2002 方案)^[4]进行治疗并达到以下要求: (1) 病历中至少有 3 次有效临床资料; (2) 患儿连续口服 6-MP 一个月以上。全国协作组治疗方案具体为: 每晚睡前以 75 mg/m^2 剂量顿服 6-MP, 每周以 20 mg/m^2 剂量肌肉注射甲氨蝶呤, 以上连用 3 次后改为长春新碱 + 地塞米松用 1 周, 反复序贯用药至加强治疗及髓外白血病预防性治疗时停止; 改良 ALLIC-BFM-2002 方案具体为: 每晚以 50 mg/m^2 剂量空腹口服 6-MP, 每周以 20 mg/m^2 剂量口服甲氨蝶呤。根据患儿临床危险度分型, 以上两种方案中如有需进行鞘内注射的药物 (甲氨蝶呤、地塞米松), 则给药剂量及次数有所差异, 化疗总疗程需 2~3 年。

1.2 观察指标及评价标准

采用回顾性分析, 遇维持治疗结束、复发或失访时停止。详细记录每位患儿的一般资料 (姓名、性别、出生日期、ALL 临床危险度分型^[3-4]) 及每次入院治疗前的体重、临床症状或体征、实验室检查结果、6-MP 停用天数及剂量增减情况等作为不良反应评估的依据。所有患儿均需除外输注血制品 2 个月内的血常规检查记录; 药物不良反应分级采用美国国立癌症研究所第 3 版常规毒性判定标准 (NCI CTC 3.0): 0 级为未出现药物不良反应, 1~2 级为轻度, 3~4 级为重度^[5-6]。对最高级别毒副反应及评价指标进行统计。

1.3 TPMT cDNA 制备

经监护人知情同意, 于初治及输血前抽取患儿骨髓液 1.5 mL, EDTA 抗凝并低温保存。按 QIAamp® RNA Blood Mini Kit 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司) 说明书操作步骤提取总 RNA 30 μL , -80°C 冰箱保存。取 10 μL 总 RNA, 采用 Reverse Transcriptase XL 逆转录试剂盒 (大连 TaKaRa 公司) 获取 cDNA, 分光光度计检测浓度。

1.4 PCR 扩增

PCR 扩增使用的引物沿用本课题组以往实验所设计的引物序列^[2], TPMT 扩增分两步进行, 第一轮为 PCR 扩增 (PCR-1): 上游 5'-GAGAAGTGGCGGAGGTGGAA-3', 下游 5'-GGAGGCTGAGGCAGGAGAATC-3', 片段长度为 1362 bp。第二轮为巢式 PCR 扩增 (PCR-2), 2 段扩增片段分别涵盖 TPMT*1S、*3C 突变位点, 每对引物中的 1 条 5' 端加入 GC 夹, 使用 WinMelt TM 2.0 软件行溶解曲线分析以提高突变检测分辨率; TPMT*3C (A719G): 上游 5'-TGTTCCTTTCTTATGATCCAA-3', 下游 5'-GC 夹 -ATTACATTTTCAGGCTTTAG-3', 片段长度 308 bp; TPMT*1S: 上游 5'-GC 夹 -AGGACAAATAT-TGGCAAA-3', 下游 5'-GGAACATAAAATGGTGA-3', 片段长度 222 bp。PCR-1 和 2 分别选用 Ex taq 和 taq (大连 TaKaRa 公司), 反应体系按说明书配置, 扩增在梯度 PCR 仪 (德国 Biometra 公司) 上进行。

1.5 DGGE 筛查及 DNA 测序

采用 DCode™ 突变检测电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司) 对巢式 DNA 片段行变性梯度凝胶电泳

(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)分离, 变性梯度范围 30%~60%。上样液为巢式 PCR 产物及载样液(二甲苯青 FF+ 溴酚蓝, 意大利 BBI 公司)各 25 μ L, 缓冲液为 1 \times TAE, 60 V 电压下电泳 6 h 后染色拍照并使用 Image Lab™ 3.0 软件分析图像, 筛选异常电泳条带样本送 Invitrogen 公司测序。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行统计学分析, 基因频率采用百分率(%)表示, TPMT*1S 各基因型与 6-MP 不良反应发生率比较及在各临床危险度分型中的分布比较均采用行 \times 列表资料 χ^2 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床治疗情况

46 例患儿中, 至 2012 年 6 月共完成全疗程化疗 37 例(80%), 包括标危 20 例, 中危 13 例, 高危 4 例; 复发 7 例(15%), 包括标危 2 例, 高危 5 例; 失访 2 例(4%), 分别发生在维持治疗的第 183 天和第 247 天。ALL 维持治疗阶段, 平均每例患儿 6-MP 累计治疗时间为 747.2 d (163 ~ 985 d), 其中 10 例(22%)因 6-MP 所致的严重不良反应暂时停药, 平均停药总天数为 7.9 d (2~22 d), 每次停药后经 5.3 d (2~14 d) 行升白细胞、抗感染及保肝等治疗后可继续使用 6-MP 化疗。

2.2 6-MP 所致不良反应发生情况

仅 3 例患儿(7%)对 6-MP 完全耐受, 余 43 例患儿(93%)出现的不良反应主要包括: 骨髓抑制(中性粒细胞减少、血小板减少、血红蛋白降低)、肝脏毒性(转氨酶升高、直接胆红素升高)及胃肠道反应(黏膜炎/口腔炎、呕吐)。结果发

现中性粒细胞减少(93%)、血红蛋白降低(70%)、血小板减少(50%)、谷丙转氨酶和谷草转氨酶升高(分别为 83% 和 80%)是较为常见的不良反应, 其中, 中性粒细胞减少(61%)在重度不良反应中多见, 余均以轻度不良反应为主, 见表 1。

2.3 TPMT 基因型检测情况

经巢式 PCR 扩增后的特异性 DNA 片段经 DGGE 电泳后均成功检测到异常条带, 结合测序结果, TPMT*3C (A719G, Try240Cys) 各基因型在 ALL 患儿中的分布频率为: AA 型 44 例(96%), AG 型 1 例(2%), GG 型 1 例(2%), G 位点等位基因频率为 3%; TPMT*1S (T474C, Ile158Ile) 各基因型在 ALL 患儿中的分布频率为: TT 型 37 例(80%), TC 型 7 例(15%), CC 型 2 例(4%), C 位点等位基因频率为 12% (图 1~2)。与标危组相比, TPMT*1S 各基因型在中、高危组中的分布差异均无统计学意义(分别 $\chi^2=1.317$ 、2.890, 均 P>0.05)。

2.4 TPMT 基因型与 6-MP 不良反应发生的关系

ALL 维持治疗期间, 2 例(100%) TPMT*3C 突变基因型(AG+GG)患儿在化疗过程中均发生以中性粒细胞减少为主的重度骨髓抑制, 其中 1 例纯合突变者还出现重度肝脏毒性, 经多次中断化疗后调整 6-MP 用量至原剂量 1/3, 维持化疗, 所有不良反应转为轻度。对最高级别评价指标进行统计, 无 TPMT*3C 突变患儿中, 分别有 27 例(61%)和 15 例(34%)出现重度骨髓抑制和肝脏毒性, 且不良反应在维持治疗期间均可发生, 与 6-MP 使用无剂量相关性。此外, TPMT*1S 各基因型与 6-MP 所致的重度骨髓抑制及肝脏毒性无明显相关性(均 P>0.05)(表 2)。出现胃肠道反应的患儿例数较少且大部分为轻度, 故未作分析。

表 1 46 例 ALL 患儿使用 6-MP 致不良反应分级情况 [n=46, 例(%)]

不良反应	1 级	2 级	轻度(1~2 级)	3 级	4 级	重度(3~4 级)	合计
骨髓抑制							
中性粒细胞减少	3(7)	12(26)	15(33)	16(35)	12(26)	28(61)	43(93)
血红蛋白下降	18(39)	10(22)	28(61)	2(4)	2(4)	4(9)	32(70)
血小板减少	15(33)	5(11)	20(43)	2(4)	1(2)	3(7)	23(50)
肝脏毒性							
谷丙转氨酶升高	14(30)	8(17)	22(48)	16(35)	0(0)	16(35)	38(83)
谷草转氨酶升高	21(46)	7(15)	28(61)	9(20)	0(0)	9(20)	37(80)
直接胆红素升高	1(2)	2(4)	3(7)	2(4)	0(0)	2(4)	5(11)
胃肠道反应							
黏膜炎/口腔炎	1(2)	3(7)	4(9)	1(2)	0(0)	1(2)	5(11)
呕吐	1(2)	2(4)	3(7)	0(0)	0(0)	0(0)	3(7)

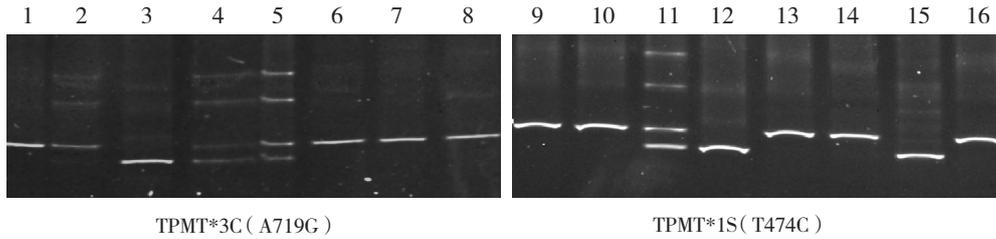


图1 TPMT*3C (A719G) 与 TPMT*1S (T474C) DGGE 电泳图 1~2、6~8: AA 基因型; 3: GG 基因型; 4~5: AG 基因型; 9~10、13~14、16: TT 基因型; 11: TC 基因型; 12、15: CC 基因型。

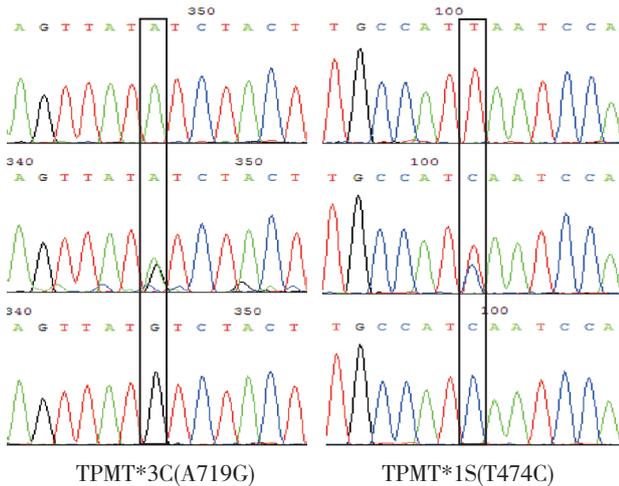


图2 TPMT*3C (A719G) 与 TPMT*1S (T474C) 测序结果图 左图从上到下依次为: AA 基因型、AG 基因型和 GG 基因型; 右图从上到下依次为: TT 基因型、TC 基因型和 CC 基因型。方框代表突变型等位基因。

表2 ALL 患儿 TPMT*1S 基因型与 6-MP 所致不良反应的关系 [n=46, 例 (%)]

基因型	例数	骨髓抑制		肝脏毒性	
		<3 级	≥ 3 级	<3 级	≥ 3 级
TT	37	16(43)	21(57)	23(62)	14(38)
CT	7	2(29)	5(71)	5(71)	2(29)
CC	2	0(0)	2(100)	2(100)	0(0)
χ^2 值		1.876		1.338	
P 值		0.391		0.521	

3 讨论

6-MP 是最早用于抗肿瘤治疗的嘌呤核苷类似物, 广泛用于儿童 ALL 在内的各种肿瘤疾病治疗。该药治疗窗狭窄, 治疗浓度和中毒浓度接近, 对靶细胞的选择性杀伤能力较弱, 因此极易发生患儿的不耐受现象。本研究回顾性分析了 46 例 ALL 患儿维持治疗期间的不良反应发生情况, 结果显示, 除 2 例 ALL 患儿失访外, 完成全程化疗及

复发者分别为 37 例和 7 例, 6-MP 所致不良反应主要表现为骨髓抑制、肝脏毒性以及胃肠道反应, 仅极少部分患儿(7%)对 6-MP 完全耐受。国外报道, ALL 维持治疗期间 85% 患儿至少曾经发生一次肝脏毒性, 这与本研究结果一致^[6]。

回顾性分析发现, ALL 维持治疗阶段平均每例患儿 6-MP 累计治疗时间 747.2 d (163~985 d), 此期间不良反应常见, 但仅 22% 患儿中断 6-MP 化疗。国外报道 ALL 维持化疗 10 周以内有 24.2% 患儿中断 6-MP 化疗, 但停药总时间 (24.5 d) 明显长于本研究结果 (7.9 d)^[6], 分析推测这种差异可能因为化疗方案及人群体质特征不同而造成, 同时也和临床用药习惯有关。NCI CTC 3.0 作为化疗药物不良反应常用的评价标准, 广泛用于临床肿瘤药物治疗的安全性监测^[5-6]。本研究中, 中性粒细胞减少 (61%) 以重度不良反应为主, 可能导致用药后的严重不良后果, 或对生命构成潜在威胁, 故必要时应注意调整药物的使用剂量, 积极干预治疗甚至于中断化疗。

代谢酶基因多态性与药物安全性和疗效有关, 课题组前期已对部分 ALL 化疗药物毒副作用与基因多态性的关系进行探讨并取得了一定成果^[7]。TPMT 不仅是巯嘌呤类药物的代谢关键酶, 也是已被确定具有基因多态性的最具特征性酶之一, 其基因型及等位基因频率分布具有种族差异性^[8]。目前已被命名的 TPMT 突变基因型共 30 多种 (TPMT *1S ~ *34)^[9], 本课题组在前期研究中发现中国汉族儿童 TPMT 基因编码区仅存在 TPMT*3C 和 *1S 两个 SNPs, 其在健康儿童中的等位基因频率分别为 1.4% (3/222) 和 22.5% (50/222)^[2]。研究发现, 巯嘌呤类药物的活性代谢产物 6-TGNs 不仅是其发挥治疗作用的重要因素, 也可能是引起药物不良反应而造成治疗中断或失败的主要原因^[10]。TPMT SNPs 是个体对巯嘌呤类药物耐受程度差异性的遗

传基础,与6-TGNs浓度有关,可能成为研究该类药物治疗个体化的关键。

有研究指出,TPMT低活性患者服用常规剂量的6-MP后,不良反应发生率及治疗中断可能性升高^[11,10]。另一些研究却认为,TPMT野生型不能减少不良反应的发生^[11],同时,出现不良反应的患者中,仅极少部分存在TPMT基因突变^[12],即对部分患者而言,6-MP不耐受与TPMT基因型或酶活性可能无关。这种情况可能与个体合并感染、同时服用多种药物及肝肾功能差异等影响药物代谢的因素有关,因此在实际用药过程中还需综合肝功能、白细胞或中性粒细胞计数等检查结果及时调整6-MP的用药剂量。

本研究已筛查到的2例TPMT*3C基因型患儿均出现严重不良反应,其中1例纯和突变患儿出现明显的6-MP剂量相关性不耐受,考虑与该基因型有关。本研究与国内谢茜等^[13]研究结果不同,其原因可能与不良反应的观察时间长短有关,由于TPMT*3C等位基因频率较低(3%),尚需要扩大样本量进一步研究。TPMT*1S为同义突变,近年来认为编码区内的同义突变可导致密码子翻译效率改变而影响蛋白质表达,因此也具有一定的研究意义。马晓莉等^[14]认为,该基因型在人群中的分布极高,但与6-MP的耐受性无关。本研究结果未显示TPMT*1S各基因型与6-MP不良反应发生有相关性,但鉴于SNP对药物代谢的影响可能同时与等位基因的表达丰度有关,有关该基因型对硫嘌呤药物的作用还有待进一步研究证实。

6-MP药代动力学及药效动力学存在个体差异,尽管许多化疗方案均提及需要根据外周血WBC计数及分类调整6-MP剂量,但这显然不是确定药物用量的最佳方式。目前与TPMT基因多态性相关的白血病药物治疗个体化研究一直受到高度关注,而在用药前是否应该进行基因型或酶活性的检测仍存在争议。最近研究发现,6-MP等硫嘌呤类药物在体内的代谢过程复杂,TPMT野生基因型患儿服用6-MP后出现的不良反应可能还受硫嘌呤类药物代谢及叶酸代谢过程中的多个关键酶影响^[15],故TPMT基因多态性与ALL患儿6-MP耐受性的关系还有待多中心的协同研究,为6-MP的临床个体化用药提供可靠的实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Hedeland RL, Hvidt K, Nersting J, et al. DNA incorporation of 6-thioguanine nucleotides during maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 66(3): 485-491.
- [2] 谢恩,岳丽杰,陈小文,等.汉族TPMT基因全蛋白编码区SNP检测与分析[J]. *临床检验杂志*, 2013, 31(9): 683-686.
- [3] 中华医学会儿科学会血液组,中华儿科杂志编辑委员会.儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第三次修订草案)[J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44(5): 392-395.
- [4] Luo XO, Ke ZY, Guan XQ, et al. The comparison of outcome and cost of three protocols for childhood non-high risk acute lymphoblastic leukemia in China[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2008, 51(2): 204-209.
- [5] Dorababu P, Nagesh N, Linga VG, et al. Epistatic interactions between thiopurine methyltransferase(TPMT) and inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA)[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2012, 68(4): 379-387.
- [6] Adam de Beaumais T, Fakhoury M, Medard Y, et al. Determinants of mercaptopurine toxicity in paediatric acute lymphoblastic leukemia maintenance therapy[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2011, 71(4): 575-584.
- [7] 郑苗苗,岳丽杰,陈小文,等.急性淋巴细胞白血病患者MTHFR基因多态性与大剂量甲氨蝶呤毒副反应的关系[J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(3): 201-206.
- [8] Umamaheswaran G, Krishna Kumar D, Kayathiri D, et al. Inter and intra-ethnic differences in the distribution of the molecular variants of TPMT, UGT1A1 and MDR1 genes in the South Indian population[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 6343-6351.
- [9] Appell ML, Berg J, Duley J, et al. Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2013, 23(4): 242-248.
- [10] Hanai H, Iida T, Takeuchi K, et al. Thiopurine maintenance therapy for ulcerative colitis: the clinical significance of monitoring 6-thioguanine nucleotide[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010, 16(8): 1376-1381.
- [11] Chisick L, Oleschuk C, Bernstein CN. The utility of thiopurine methyltransferase enzyme testing in inflammatory bowel disease[J]. *Can J Gastroenterol*, 2013, 27(1): 39-43.
- [12] Takatsu N, Matsui T, Murakami Y, et al. Adverse reactions to azathioprine cannot be predicted by thiopurine S-methyltransferase genotype in Japanese patients with inflammatory bowel disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(7): 1258-1264.
- [13] 谢茜,肖剑文,宪莹,等.硫嘌呤治疗儿童急性淋巴细胞白血病相关毒副作用及其与TPMT基因多态性关系的研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(7): 777-781.
- [14] 马晓莉,李伟京,郑杰,等.严重不耐受硫嘌呤的急性淋巴细胞白血病患者TPMT基因序列分析[J]. *中国实验血液学杂志*, 2012, 20(4): 876-880.
- [15] Dorababu P, Naushad SM, Linga VG, et al. Genetic variants of thiopurine and folate metabolic pathways determine 6-MP-mediated hematological toxicity in childhood ALL[J]. *Pharmacogenomics*, 2012, 13(9): 1001-1008.

(本文编辑:万静)