

# 急性白血病药物基因组学研究现状

李 肖志坚

中国医学科学院血液学研究所血液病医院;实验血液学国家重点实验室,天津 300020

**摘要** 药物基因组学是一门旨在阐明药物疗效个体差异遗传学基础的新学科,根据这些遗传学信息来预测个体对某一药物的用药安全性和疗效,指导临床个体化治疗,从遗传学的角度为急性白血病的合理用药开辟了新的途径。本文对急性白血病治疗药物代谢、转运及作用靶点相关酶系编码基因的多态性与治疗不良反应及疾病预后之间关系的研究现状作一综述。

**关键词** 药物基因组学;基因多态性;白血病

**中图分类号** R733.71

**文献标识码** A

## Research Update on Pharmacogenomics in Acute Leukemia ——Review

LILin, XIAO Zhi-Jian

The State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China

**Abstract** Pharmacogenomics, a new subject aiming to elucidate genetic basis for inter individual differences in response on a drug and to predict the safety and efficacy of drugs by the genetic information, which guides to clinical individual therapy, breaks a new way to apply drugs rationally to acute leukemia. This article reviewed the enzymes related to metabolism, transport and acting point of the drugs used in the treatment of acute leukemia and discussed the influence of their coding genes polymorphism on drug adverse effects and disease prognosis.

**Key words** pharmacogenomics; genetic polymorphism; leukemia

*J Exp Hematol* 2008; 16(3): 704 - 711

药物基因组学 (Pharmacogenomics) 是一门旨在阐明药物疗效个体差异遗传学基础的新学科,根据遗传学信息来预测个体或患者对某一药物的用药安全性、不良反应和疗效,通过分子诊断(基因分型)指导临床对某个患者选择最佳的药物联合和用药剂量。目前,急性白血病(AL)药物基因组学的研究基因可分为: 编码药物代谢酶的基因:如巯基嘌呤-S甲基转移酶(TPMT)、N5,N10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)、细胞色素P450(CYP)酶、谷胱甘肽S转移酶(GST)、胞嘧啶核苷脱氨酶(CDA)、葡萄糖苷酸(基)转移酶(UGT)等药物代谢酶编码基因; 编码药物转运蛋白的基因:如还原叶酸载体(SLC19A1)、核苷转运体编码基因,多药耐药基因(MDR1, ABCB1)等; 编码药物作用靶点的基因:如糖皮质激素受体基因(NR3C1)、胸腺嘧啶脱氧核苷酸合成酶(TYMS)编码基因等。2000年国际上首次报道按TPMT基因型指导儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)个体化治疗获得成功,其他白血病化疗药物,如甲氨喋呤(MTX)、泼尼松(Pred)、阿糖胞苷(Ara C)等近年也陆续有临床前研究报道。本文对

急性白血病(AL)的药物基因组学研究现状作一综述。

## 药物代谢酶编码基因

### TPMT编码基因

TPMT是巯基嘌呤-S甲基转移酶,在胞浆中催化巯基嘌呤类药物(如6-巯基嘌呤(6-MP)或6-硫代鸟嘌呤(6-TG))的甲基化,TPMT基因多态性影响TPMT的活性。TPMT基因在人群中约有90% - 95%为野生型,所表达的酶具有正常活性;约5% - 10%为杂合子,所表达的酶具有中等活性;另有1/300的人携带2个变异型TPMT等位基因,不表达有功能的TPMT。TPMT等位基因的变异类型存在着种族差异。TPMT\*3A在白种人中最常见,频率4.4%,另

基金项目:新世纪优秀人才资助计划(编号NCET-05-0173),863计划(编号2006AA02A405)资助

通讯作者:肖志坚,主任、教授、博士生导师,电话:(022)23909184

传真:(022)27219070, E-mail: zjxiao@hotmail.com

2007 - 07 - 09收稿;2007 - 09 - 04接受

外两种 TPMT\*2 和 TPMT\*3C 频率分别 0.4% 及 0.2%; TPMT 基因变异后所表达的 TPMT 易被降解, 导致催化活性降低, 三者共占低活性表型的 95%。东南亚和非洲人的 TPMT 等位基因变异以 TPMT\*3C 最常见, 其频率分别为 2.3% - 1% 和 2.4%。TPMT 途径是造血组织中造成 6-MP 或 6-TG 胞内失活的主要机制, 影响其抗白血病细胞的效应及对正常造血细胞的毒性。

**与 AL 治疗不良反应的关系** 将 TPMT 基因多态性与 6-MP (或 6-TG) 不良反应的联系用于指导儿童 ALL 个体化治疗是 AL 药物基因组学研究中的最佳范例之一。所有 TPMT 缺陷型 (包括低活性变异型纯合子及杂合子) 患者, 如果以常规剂量 6-MP (或 6-TG) 治疗会发生严重的剂量限制性血液系统不良反应, 并且 TPMT 活性不足的患者发生继发性白血病及脑瘤的风险增加<sup>[1]</sup>。为了减少不良反应, BM 方案治疗 ALL 的临床试验中对 TPMT 缺陷型患者予以小于常规剂量 [ $60 \text{ mg}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$ ] 的 6-MP 治疗, 2 周后检测微小残留病 (MRD), 发现 MRD 水平低于同期治疗的 TPMT 基因野生型患者。因此, 6-MP 前瞻性的剂量调节能够降低毒性且不影响疗效<sup>[2]</sup>。

**与 AL 预后的关系** TPMT 等位基因至少有 1 个发生低活性变异的患者较野生型患者对巯嘌呤治疗反应更好且白血病更易得到控制。Stanulla 等<sup>[3]</sup>对 BM-2000 治疗试验中 810 例 ALL 儿童患者的 TPMT 基因多态性与 6-MP 的早期疗效关系进行了研究, 发现在治疗第 78 天即应用 4 个疗程含 6-MP 的方案巩固治疗后, 55 例 TPMT 等位基因变异型杂合子患者 MRD 阳性率较 750 例野生型患者显著降低 (9.1% vs 22.8%,  $p=0.02$ ), 复发风险降低 2.9 倍 (相对危险度 (RR) = 0.34; 95% 可信区间 (CI) 0.13 ~ 0.86)。但是, 另一研究<sup>[2]</sup>依据 TPMT 活性调整 6-MP 给药剂量, 结果发现 TPMT 活性正常的患者与低活性患者比较, 其 5 年累积复发率分别为 (13.2 ± 3)% 和 (6.7 ± 6.7)% ( $p=0.46$ ), 表明在根据 TPMT 基因多态性进行剂量个体化治疗的情况下, 长期结局将不受其多态性的影响。TPMT 等位基因变异型杂合子患者的 TPMT 活性较低, 对 6-MP 的灭活作用较小, 在相同给药剂量下此类患者的白血病细胞暴露于更多的 6-MP 活性中间产物, 相对药效较强, 因而 TPMT 基因多态性可能是通过调节 6-MP 的剂量强度从而影响患者预后。

显然, TPMT 活性测定有助于个体化剂量调整, 在 TPMT 活性正常的野生型患者中适当增加 6-MP

(或 6-TG) 剂量以降低复发率, 提高长期生存率; 在 TPMT 活性明显减低的患者中减小剂量以减少不良反应, 提高总体生存 (OS) 率。但是, 检测红细胞 TPMT 活性的传统方法具有一些局限性, 例如在输血后 60 天内检测结果不可靠、检测费时较长以及应用巯嘌呤类药物可使酶活性增强约 20% (这种用药后的活性变化在杂合子患者中尤其显著) 等。大系列研究<sup>[4]</sup>表明, TPMT 基因型 - 表现型具高度一致性 (98.4%), 据 TPMT 基因多态性推测其活性的敏感性和特异性分别为 90%、99%; 阳性及阴性预测值分别为 94%、99%。因此, 有望采用基因型测定的方法预测 TPMT 表现型, 克服传统检测方法的局限性。然而, TPMT 基因多态性存在种族差异, 故临床试验应对不同人群进行分层分析以总结可靠的 "基因型 - 表现型 - 药物剂量" 关系, 提高分子诊断的准确性和实用性。

#### N5, N10 亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 编码基因

MTHFR 催化 N5, N10 亚甲基四氢叶酸还原为 N5-甲基四氢叶酸, 调节细胞内叶酸 / 一碳单位代谢。MTHFR 常见多态性位点为 C677T, 变异型纯合子及杂合子产生的 MTHFR 活性降低, 仅为野生型产物酶的 30% 及 60%。C677T 等位基因变异频率在欧洲人、东亚人、墨西哥人及美国黑人中分别为 24% - 46%, 26% - 44%, 57% 及 11%。另外一个与产物酶活性相关的多态性位点为 A1298C, 其单独存在时不影响表现型, 但当 A1298C 杂合子与 C677T 杂合子同时存在时, 其表现型与 C677TT 纯合子相同, MTHFR 活性显著降低。

常用化疗药物 MTX 属叶酸类似物, 进入细胞内的 MTX 在叶酰聚谷氨酸合成酶 (FPGS) 的作用下, 其谷氨酸残基再逐个连接上谷氨酸 (达到 2 - 6 个), 形成 MTX 聚谷氨酸盐 (MTXPG)。MTX 及其活性代谢产物 MTXPG 通过作用于胞内叶酸代谢途径中的酶, 阻断 DNA 合成及嘌呤从头合成途径, 产生对正常细胞的细胞毒作用及发挥抗白血病作用。

**与 AL 治疗不良反应的关系** MTX 通过影响叶酸的生理功能起效, 胞内叶酸储备减少可使 MTX 毒性增加。故 MTHFR 基因变异导致产物酶活性不足, 使细胞内还原型叶酸减少, MTX 毒性增加。Chiusolo 等<sup>[5]</sup>对 61 例以 MTX 维持治疗的 ALL (58 例) 或急性早幼粒细胞白血病 (APL, 3 例) 意大利成人患者进行 MTHFR C677T 多态性位点基因型测定及 MTX 不良反应评价, 发现 3 种基因型对 MTX 不能

耐受的患者比例分别为 33.3% (CC)、24% (CT)及 60% (TT),经 Fisher精确概率检验 TT基因型患者与 CC、CT基因型患者对 MTX的耐受性存在差别 ( $p = 0.03$ ),而后两者之间没有统计学差异。TT基因型患者在 MTX延长治疗(至少大于 2年)中应相应地减小剂量。在人群中 TT基因型患者并不少见,因此 MTX治疗前有必要进行 MTHFR C677T多态性位点基因型检测并据此调整 MTX剂量以避免严重不良反应。Costea等<sup>[6]</sup>对 186例美国儿童 ALL患者的研究发现,携带至少 1个 MTHFR T677 变异型在 MTX巩固及维持治疗中严重血液系统不良反应的发生率较低,且此类患者无事件生存(EFS)率降低,提出此类患者对 MTX敏感性降低,增加药物剂量可能使之受益的假设。上述两个研究结论不一致可能是白血病异质性在不同年龄患者治疗反应中的体现。

**与 AL 预后的关系** Aplenc 等<sup>[7]</sup>对 520 例以 CCG1891 方案治疗的儿童 ALL 患者进行了研究,发现 MTHFR C677T 变异型患者的 MTHFR 活性降低,复发风险显著增高 ( $\chi^2 = 4.38, p = 0.036$ ; 危害比 (HR) = 1.82,  $P = 0.008$ )。Krajinovic 等<sup>[8]</sup>对 201 例以 MTX 治疗的 ALL 儿童患者的研究发现具 MTHFR T677A1298 单倍体型或 MTHFD1 A1958 变异型者 EFS 率降低,单变量分析结果分别为 HR = 2.2, 95% CI 1.0 - 4.7 及 HR = 2.8, 95% CI 1.1 - 7.3; 但多变量分析仅支持 MTHFD1 变异型的结论 (HR = 2.2, 95% CI 0.9 - 5.6)。MTHFR 基因多态性影响 MTX 药效的机制可能在于: MTX 为二氢叶酸还原酶 (DHFR) 抑制剂, 阻断二氢叶酸 (DHF) 还原为四氢叶酸 (THF), 使 THF 下游的 5, 10-亚甲基四氢叶酸供给不足, 从而抑制脱氧胸苷酸 (dTMP) 的合成, 干扰 DNA 复制, 发挥抗白血病细胞作用。MTHFR 为 5, 10-亚甲基四氢叶酸向 5-甲基四氢叶酸的转化的关键酶, 其基因变异导致酶活性降低或消失, 5, 10-亚甲基四氢叶酸积聚, 白血病细胞仍能合成 dTMP, 降低了机体对 MTX 的敏感性<sup>[6]</sup>。有体外研究证明, MTHFR A1298C 变异型经 MTX 短时间作用 (3 小时) 或较长时间作用 (21 小时) 后敏感性均降低<sup>[9]</sup>。

**细胞色素 P450 (CYP) 酶编码基因**

CYP 基因家族编码的产物是药物体内代谢 I 相反应中的关键酶系。这个家族包含许多成员, 具有很多不同的基因多态性位点, 以下重点阐述与 AL 治疗有关的常见多态性位点及由此所致的药物反应个体

差异。

**与 AL 治疗药物剂量的关系** 很多抗白血病药物都是 CYP 酶的底物, CYP 基因多态性直接影响药物代谢, 导致血药浓度的个体差异。环孢菌素 A (CsA) 是 AL 造血干细胞移植免疫抑制治疗中的常用药物, 其有效剂量与最低中毒剂量接近, 因而确定 CYP 基因多态性所致 CsA 血药浓度的个体差异具有重要意义。对造血干细胞移植患者的研究表明, CYP3A5 基因多态性与血中 CsA 浓度紧密关联, CYP3A5 · 1 / · 1 基因型患者比 CYP3A5 · 1 / · 3 基因型患者需要更大剂量的 CsA 以维持相同的血药浓度<sup>[10]</sup>。中国人 CYP3A5 · 1 / · 1 分布频率约 6%, 因此对患者预先进行 CYP3A5 基因型检测, 有助于调整 CsA 给药达最佳剂量, 使临床应用 CsA 更加安全有效和个体化。

**与 AL 预后的关系** 在 ALL 中, Krajinovic 等<sup>[12]</sup>对 320 例儿童患者进行了研究, 随访 2 - 84 月 (中位随访时间 5 年) 后有 68 例复发或死亡, 发现 CYP1A1 \* 2A 变异型患者 EFS 率低于无变异者, 经 Kaplan-Meier 生存曲线比较的假设检验两者 EFS 率有显著差异 ( $p = 0.003$ ), Cox 回归模型因子筛选 HR (95% CI) 2.3 (1.1 - 4.9) ( $p = 0.03$ ); 同一研究还发现 DNA 修复基因 hMLH1 Ile219 与 CYP1A1 \* 2A 变异型同时存在可增加复发风险, 表明相关基因间相互作用的综合效应可产生协同作用。在 AML 中, Vosso 等<sup>[13]</sup>的研究同样发现 CYP1A1 \* 2A 变异型也是独立的预后因素, 此类患者无失败生存 (FFS) 及总体生存 (OS) 率均低于野生型患者; 而 CYP1A1 \* 2B 及 CYP1A1 \* 4 位点的多态性与 AML 的预后无相关关系。但样本量较大的另一研究<sup>[14]</sup>发现, CYP1A1 \* 2B (Val) 变异型在具 NRAS 突变的 AML 中较无突变者常见 (8/53 vs 26/371, OR = 2.36; 95% CI = 1.01 - 5.53); 在预后不良的细胞遗传学分组 (包括 5 号、7 号染色体缺失或部分缺失, 3 号染色体异常患者) 中也更常见 (6/14 vs 4/89; OR = 15.94; 95% CI 3.71 - 68.52), 提示 CYP1A1 \* 2B 变异型所表达的产物酶可能增强了 I 相代谢反应, 使 CYP1A1 底物经反应产生大量有害的中间产物或通过氧化应激损伤, 导致不良遗传学标记的产生, 对 AML 有一定预后意义。对于 CYP3A, 儿童癌症协作组 (CCG) 的大系列 (1204 例) 临床资料分析<sup>[15]</sup>及后来 Rocha 等<sup>[16]</sup>的研究均未发现该位点多态性与儿童 ALL 复发的相关关系。由上述研究可见, CYP 基因部分位点的多态性对 AL 治疗结局有影响, 但其具体机制尚未明确, 有待进一步研究确定其作用途径从而指



导针对性治疗策略的制定,提高 AL 的长期生存率。

### 谷胱甘肽硫 转移酶家族 (GST) 编码基因

与 CYP 酶不同, GST 是一个多功能的二相代谢酶家族,主要催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 与亲电子化合物间的结合反应,使后者失去结合机体 DNA 的活性,是细胞抗损伤的主要解毒系统,其底物包括多种环境致癌物质、化疗药物 (环磷酰胺、葱环类药物、拓扑异构酶 抑制剂) 及其氧化代谢产物。人类编码 GSTs 的基因呈高度多态性且 GSTM1 或 GSTT1 纯合子缺失型在多数人群中较为多见,出现频率分别约 50% 或 25%。

与 AL 治疗不良反应的关系 Naoe 等<sup>[17]</sup>对 193 例原发 AML 患者的研究发现 GSTT1 缺失者早期死亡率升高 (起始化疗 45 天内  $p = 0.073$ ; 起始化疗 120 天内  $p = 0.028$ ), 但与非缺失型患者相比,完全缓解 (CR) 率及复发率均无明显差异。因此 GSTT1 缺失致早期死亡主要为正常细胞抗损伤能力受损,化疗相关毒性增加所致。

与 AL 治疗耐药的关系 一方面正常细胞通过 GSTs 抗氧化损伤,使外源性有害物质得以解毒;另一方面,肿瘤细胞通过表达 GSTs 来保护自身不受化疗药物的伤害,因此 GSTs 是除多药耐药相关蛋白、肺耐药蛋白等经典耐药途径外引起白血病多药耐药的又一重要因素。有研究<sup>[18]</sup>证实, GSTM1 无效型和 / 或 GSTT1 无效型与 AML 的白血病细胞对化疗药物敏感性降低有关,并提出 GST 无功能导致 GSH 积聚,细胞内 GSH 水平升高,引起白血病细胞增殖加速及凋亡受阻,因此有望通过深入研究设计新的耐药逆转剂阻断 GST 耐药途径,进一步提高 AL 的缓解率。

与 AL 预后的关系 Barragan 等<sup>[19]</sup>对西班牙 153 例原发 AML 的研究表明 GST 缺失型患者无病生存 (DFS) 率降低,该相关关系在男性患者中更为显著。GSTM1 缺失型男性患者与未缺失型比较, DFS 率分别为 28% 和 57% ( $p = 0.04$ )。GSTM1 及 GSTT1 均无缺失的患者与其中至少有 1 种缺失的男性患者比较, DFS 率分别为 64% 和 34% ( $p = 0.05$ )。该研究提示, GST 缺失对 AML 患者的预后有影响,尤其对于男性患者预后不佳。我们的研究<sup>[20]</sup>对 GST 缺失在 AML 中的预后意义得出了同样结论。

在 ALL 中, Meissner 等<sup>[21]</sup>对 420 例儿童 ALL 患者进行了 GSTT1 基因型检测, 分层分析发现 GSTT1 双缺失型患者 Pred 治疗早期反应较好, 但生存率是否也相应提高, 随访的结果尚未见报道。与之相反,

Takanashi 等<sup>[18]</sup>对 82 例日本 pre-B ALL 儿童患者进行研究, 单变量分析提示早期复发 (治疗起始 30 个月内复发, 中位随访时间 89.5 月) 的相关因素有 t (9; 22) (q34; q11) 细胞遗传学异常 ( $p = 0.0003$ ), 高白细胞计数 ( $p = 0.015$ ) 及 GSTM1、GSTT1 双缺失 ( $p = 0.027$ ); 多变量分析提示仅 GSTM1、GSTT1 双缺失为早期复发的独立预后因素 ( $p = 0.018$ )。该研究支持 GSTM1、GSTT1 双缺失基因型为日本儿童 pre-B ALL 早期复发的预后因素, 但样本量较小。另有美国大系列 (616 例白人及 35 例黑人儿童 ALL 患者, 和 532 例白人及 201 例黑人儿童对照) 的病例对照研究<sup>[22]</sup>, 结果发现 GSTM1、GSTT1 均与儿童 ALL 的治疗结局无关。上述研究结论相反, 可能是种族差异导致具有相同基因型的患者对药物反应不相同, 也可能是前一研究的样本量较小所致。化疗药物进入体内后在发挥杀灭白血病细胞作用的同时受 GSTs 解毒作用的影响, GST 基因多态性是否与白血病的治疗结局直接相关, 能否依据 GST 基因型决定个体化的治疗强度以改善预后有待于更大系列的亚洲儿童 ALL 研究进一步证实。

### 胞嘧啶核苷脱氨酶 (CDA) 编码基因

Ara-C 是抗代谢类抗白血病药物, 属脱氧胞苷类似物。CDA 通过水解脱氨基作用使 Ara-C 不可逆性失活。目前有体外实验证明 CDA 保守的催化结构域内 A70T 变异后产物酶活性降低<sup>[23]</sup>。该实验将人类 CDA 基因导入 CDA-null 酵母后, 发现 CDA-70T 型产物酶对 Ara-C 的脱氨基活性仅为原型产物酶的 32%, 相应的 Ara-C IC<sub>50</sub> 值降低 ( $757 \pm 33$  mmol vs  $941 \pm 58$  mmol,  $p < 0.01$ )。另有研究证明 CDA 启动子区 3 个单核苷酸多态性位点 (-92A > G, -451C > T and -897C > A) 的单倍体变异型杂合子 (ACC/ATC) 表达的酶活性较 (ACC/ACC) 型低<sup>[24]</sup>。最近有研究建立了对 Ara-C 耐药的白血病细胞系, 发现胞内 CDA 表达升高, 证明 CDA 影响白血病细胞在体外对 Ara-C 的敏感性<sup>[25]</sup>。由此初步推测 CDA 基因多态性影响 CDA 活性, 与白血病细胞对 Ara-C 的敏感性有关, 至于在体内上述因素是否直接相关, CDA 基因相关位点的基因型测定是否具有临床预后意义, 尚待进一步研究明确。

### 葡萄糖苷酸 (基) 转移酶 (UGT) 编码基因

UGT 为催化多种脂溶性外源有害物质及内源性底物葡萄糖苷酸化的超家族酶系, 使疏水性化合物从核糖核苷酸得到一个糖基基团后易溶于胆汁及尿液从而被清除。UGT1 基因位于染色体 2q37, 至少有

12个不同的外显子 1,外显子 2 - 5则是共同的, UGT1基因通过改变剪接方式表达 9种功能性 UGT1A蛋白。伊立替康为拓扑异构酶 I抑制剂,过去常用于实体瘤的治疗,近来被用作抗白血病药物。UGT1A1是伊立替康的活性代谢产物 SN-38葡萄糖苷酸化的主要葡萄糖苷酸(基)转移酶,其活性降低导致 SN-38葡萄糖苷酸化不足,治疗不良反应(腹泻、中性粒细胞减少)增加。据报道,与 UGT1A1活性相关的 UGT1A1变异有启动子区(TA)7TAA(在 UGT1A1启动子 TATA序列中增加了一个额外的TA)、-3156G>A、-3279G>T、211G>A、686C>A、3279T>G、211G>A、G71R、686C>A、P229Q、1456T>G、Y486D<sup>[26-29]</sup>。目前对(TA)7TAA研究较多<sup>[26-28]</sup>,认为(TA)7TAA的肿瘤患者 UGT1A1活性降低,药物清除率减低,伊立替康治疗不良反应的发生率较高,提出可测定该基因型推测患者对胃肠道及造血系统毒性的易感性。另一研究提出-3156G>A有望更好的预示伊立替康的不良反<sup>[27]</sup>。另外,由于伊立替康用于抗白血病治疗的时间不长,以上均为实体瘤患者中的研究结果,在急性白血病患者中的可推广性有待进一步证实。

## 药物转运体编码基因

### 还原叶酸载体(RFC)编码基因

MTX及天然叶酸进入细胞内主要通过 RFC(SLC19A1)的转运。SLC19A1编码基因位于染色体 21q22.3,常见多态性位点为 G80A(Arg>His),等位基因变异频率约 50%,该变异导致 SLC19A1第一个跨膜结构域(TMD1)中的氨基酸发生变化,改变了 SLC19A1的特性,影响底物的转运。Laverdiere等<sup>[30]</sup>对大剂量 MTX治疗的儿童 ALL患者的研究表明 AA及 GA型较 GG型者 EFS率降低( $p = 0.04$ ) (中位随访时间 49.5月),且 AA型患者的 MTX血浆浓度较 GG、GA型高( $p = 0.004$ ),但据此仅能间接推测 MTX的胞内浓度不足导致疗效不佳。St Jude儿童研究医院<sup>[31]</sup>对大剂量 MTX(HDMTX)输注后 197例儿童 ALL患者体内白血病细胞中 MTX的有效成分 MTXPG积聚水平进行评估,并分析了这些患者的 32个叶酸代谢途径相关基因的表达情况,发现 SLC19A1在 E2A-PBX1阳性 ALL中的表达显著降低,MTXPG积聚水平也降低。这为识别 ALL各亚型中导致 MTXPG积聚差异的基因决定簇,阐明不同亚型疗效差异及发生 MTX耐药的原因,提供亚型特异性治疗策略提供了新的认识。另外一个前

瞻性研究同样证明初诊时白血病细胞低表达 SLC19A1的儿童 ALL患者 EFS率显著降低<sup>[32]</sup>。

另有研究表明,在 ALL细胞中 SLC19A1的表达与染色体 21的拷贝数显著相关( $p = 0.0013$ ),超二倍体 ALL细胞(有 4条染色体 21) SLC19A1的表达最高<sup>[33]</sup>。因 SLC19A1编码基因位于染色体 21q,且白血病细胞常出现非二倍体的染色体数目改变,故据基因型推测表现型时还应考虑染色体核型的影响。该研究还分别分析了 60例小剂量 MTX(LD-MTX)治疗及 61例 HDMTX治疗患者的 ALL白血病细胞中 MTXPG的积聚水平,结果显示 LD-MTX治疗后超二倍体 ALL细胞中 MTXPG最高( $p = 0.011$ ),但 HDMTX治疗者的 MTXPG积聚水平与染色体 21的拷贝数无显著相关关系( $p = 0.24$ ),这与 LD-MTX(20 - 180 mg/m<sup>2</sup>)的胞内摄取更依赖于 SLC19A1有关,对揭示不同剂量药物的转运方式及 HDMTX克服耐药的机理有提示作用。

### 核苷转运体编码基因

SLC29A1 非口服给药的巯嘌呤类药物部分通过核苷转运体(如 SLC23A和 SLC29A)摄入细胞内。初诊时 ALL细胞 SLC29A1的表达水平与 6-MP治疗后巯嘌呤的积聚负相关,并且将该转运体抑制后 ALL白血病细胞内巯嘌呤水平减少 40%<sup>[34]</sup>。人类平衡核苷转运体-1(hENT-1) hENT-1负责 Ara-C的跨膜转运,其表达水平与体外白血病细胞中 Ara-C的活性形式 Ara-CTP积聚正相关,已有研究表明白血病细胞系 NALM-6<sup>[25]</sup>、儿童 AML<sup>[35]</sup>对 Ara-C的耐药,以及 MLL基因重排阳性的婴儿 ALL对 Ara-C治疗敏感均与 hENT-1的表达水平有关<sup>[36]</sup>。

蛋白表达水平的个体差异可能涉及了基因型的差异,对上述核苷转运体编码基因的进一步研究有望预示不同个体对相关药物的治疗反应。

### 多药耐药基因(MDR1, ABCB1)

MDR1(近来改称 ABCB1)表达产物 P-糖蛋白(Pgp)是 ATP结合盒(ABC)转运体超家族成员,介导药物外排相关的化疗耐药机制。MDR1 Ex29-193C>T多态性影响细胞 Pgp对外源性物质的泵出作用,在白种人中分布频率为 TT 74%、CT 24.04%、CC 1.96%。Monzo等<sup>[37]</sup>的研究发现,CT及 CC型的中危组 AML患者复发风险增高(RR = 2.4;  $p = 0.02$ ),OS率降低(RR = 2.1;  $p = 0.02$ )。此类患者的 Pgp对化疗药物的外排作用较强,耐药风险增加。对中危组患者进行 MDR1多态性位点基因型测定,

有助于进一步进行危险度分组,采取个体化治疗。

## 药物作用靶点编码基因

### 糖皮质激素受体基因 (NR3C1)

糖皮质激素 (GS,如 Pred)广泛应用于白血病的治疗,通过糖皮质激素受体 (GR)发挥作用,但 GS治疗的敏感性具有很大的个体差异。编码 GR的基因是 NR3C1,定位于染色体 5q31,其 BclI限制性内切酶多型性 (RFLP)位点的多态性影响 Pred的效应。Fleury等<sup>[38]</sup>分析了 222例儿童 ALL患者的疗效与 NR3C1多态性位点 200G/A, 1220A/G及 BclIRFLP位点基因型的关系,发现仅 NR3C1 BclIRFLP位点的多态性与 OS相关,GG型患者生存率降低。可能是该位点多态性影响了 GR的信号传导,降低了机体对 GS的敏感性导致疗效不佳,但具体机制有待进一步研究。

### 胸腺嘧啶脱氧核苷酸合成酶 (TYMS)编码基因

TYMS催化细胞内脱氧尿苷酸 (dUMP)转化为 DNA复制及修复所需的 dTMP,是细胞增殖过程中的关键酶,也是很多化疗药物的作用靶点。TYMS基因变异影响 TYMS的表达水平,常见变异有增强子区串联重复元件数目 (2R/3R),3R第 2个重复元件中的第 12位核苷酸的碱基 G被 C替换 (3RC),以及 3'非翻译区 (UTR)6bp的缺失 (6 bp-)。在 AL中对增强子区串联重复元件多态性的研究较多,白种人中其具体分布频率为 2R/2R 16%, 2R/3R 51% - 55%, 3R/3R 29% - 32%,其它变异小于 1%,3R可增强翻译效率,增加 TYMS的表达。3RC在 3R/3R的白种人、美国黑人及中国人中的频率分别为 56%, 28% 及 37%,它可降低 TYMS表达。3UTR 6bp的缺失同样与 mRNA稳定性降低及胞内 TYMS水平降低有关。化疗药物 MTX进入细胞后的活性代谢产物 MTXPG对 TYMS的抑制作用为其抗白血病机制之一,故 TYMS的表达水平影响 MTX的疗效。

Krajinovic等<sup>[39]</sup>对 205例以 4 g/m<sup>2</sup> MTX单剂给药治疗的 ALL儿童患者进行 TYMS基因增强子区串联重复元件多态性的检测,发现 3R纯合子与复发及死亡有关 (OR = 4.1, 95% CI 1.9 - 9.0,  $p = 0.001$ ),提示 TYMS基因增强子区串联重复元件 (3R/3R)增加 TYMS的表达,可降低 TYMS抑制剂的药效。后来的研究<sup>[40]</sup>结果与此一致,并且发现单独分析 3UTR 6bp多态性不影响患者 EFS,但 2R/6bp基

因型则表现为 ALL的预后良好因素 ( $p = 0.04$ ),且 3RC/6 bp +单倍体出现频率较高 ( $p = 0.04$ ),据此推测 3UTR中 6bp变异似乎可弱化 3RC的事件素因性效应。另外,一个配对的小系列病例对照研究<sup>[42]</sup>发现,采用 MTX (5 g/m<sup>2</sup> 给药 4次)治疗的儿童 B-ALL患者预后与 TYMS启动子区串联重复元件多态性 (2R/3R)无关,提出大剂量 MTX可克服 TYMS高表达对疗效的影响,但 TYMS多态性与 MTX治疗及儿童 ALL治疗结局间的复杂关系有待进一步研究阐明。

## 基因组方法 (Genome-wide approaches)

人类基因组计划带来了基因测序方法的改进。全基因组方法较上述的候选基因分析法更为高效,已被用于建立药物基因组学的研究模型。

### 在治疗不良反应研究中的应用

Edick等<sup>[42]</sup>采用系列探针组合法检测及比较儿童 ALL患者中继发放疗、化疗相关脑瘤者与未发生继发性肿瘤者的 ALL白血病细胞基因表达谱,发现两者的神经生长及传导相关基因具有差别。对这些基因进行更深入的研究有望揭示白血病治疗不良反应的易感基因,并据此对不同个体有预见性地调整治疗策略。

### 在耐药机制研究中的应用

Hollenan等<sup>[43]</sup>采用 14 500个探针组合 (probe sets)对 173例儿童 ALL患者进行了药物敏感及耐药相关基因检测,并结合临床资料发现 B-ALL中与泼尼松龙、VCR、门冬酰胺酶及 DNR敏感及耐药有关的基因分别有 33个、40个、35个和 20个,其中 121个基因的这种药敏及耐药相关性为首次发现。经过结合临床资料的多变量分析,提示这些基因在患者中的表达情况与临床结局有显著相关关系,并且是治疗结局的独立预后因素 (复发的 HR = 3.0;  $p = 0.027$ )。该研究提示,促进这些药物敏感相关基因表达,或抑制耐药相关基因表达或采用其表达产物的拮抗剂均有望克服耐药,为逆转儿童 ALL耐药的研究范围指示了方向。另外,与这 4种药物耐药有关的基因大多数互不相同,提示多药联合化疗有助于克服耐药。

### 在预后判断中的应用

酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼 (ST571)是 Ph<sup>+</sup> ALL

患者的靶向治疗药物,但有部分患者用 ST571 治疗无效。Hofmann 等<sup>[44]</sup>比较了对 ST571 敏感、原发耐药及继发耐药 Ph<sup>+</sup> ALL 患者的基因表达谱,发现预示白血病细胞对 ST571 敏感的 95 个基因及预示继发耐药的 56 个基因,尚需进行相关临床试验以进一步证明预后判断准确性,避免原发耐药的患者不必要的经济损失。

## 总结及展望

虽然有较多的研究表明,药物代谢、转运及作用靶点的相关酶系与药物效应及不良反应之间存在一定的相关性,但将这些酶的相关编码基因的多态性位点的基因型作为临床治疗决策的依据尚有一定距离。将上述研究结果结合于临床真正实现治疗策略个体化、同一治疗策略中治疗药物个体化及同一药物的剂量个体化,实现最佳疗效及最轻不良反应的治疗,还有待于多药联合、多基因联合分析。全基因组分析方法为此提供了方便,但检测效能还需进一步提高以便更低拷贝数的改变得以识别。

白血病细胞常出现非二倍体的染色体数目改变,许多药物代谢相关基因位于这些发生拷贝数改变的染色体上(如 SCL19A1 位于染色体 21, TM1T 位于染色体 6, NR3C1 位于染色体 5),因此在分子诊断时除了进行基因多态性分析,还应进行相应的等位基因定量,综合考虑染色体拷贝数改变对表现型的影响。

另外,药物效应的差异还受到很多非基因因素的影响,诸如药物间相互作用、环境因素、疾病所处不同阶段以及患者种族、年龄、性别、器官功能差异等。将药物基因组学用于指导治疗必须建立于各个因素间的交互作用得到更加明晰阐释的基础上,排除混杂因素,确保基因型与药物效应之间联系的准确性。

## 参考文献

- 1 Evans WE Thiopurine S-methyltransferase: a genetic polymorphism that affects a small number of drugs in a big way *Pharmacogenetics*, 2002; 12: 421 - 423
- 2 Relling MV, Pui CH, Cheng C, *et al* Thiopurine methyltransferase in acute lymphoblastic leukemia *Blood*, 2006; 107: 843 - 844
- 3 Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, *et al* Thiopurine methyltransferase (TM1T) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia *JAMA*, 2005; 293: 1485 - 1489
- 4 Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, *et al* Comprehensive ana-

lysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TM1T variants *Pharmacogenetics*, 2004; 14: 407 - 417

- 5 Chiuseo P, Reddicono G, Casorelli I, *et al* Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate *Ann Oncol*, 2002; 13: 1915 - 1918
- 6 Costea I, Moghrabi A, Laverdiere C, *et al* Folate cycle gene variants and chemotherapy toxicity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia *Haematologica*, 2006; 91: 1113 - 1116
- 7 Aplenc R, Thompson J, Han P, *et al* Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and therapy response in pediatric acute lymphoblastic leukemia *Cancer Res*, 2005; 65: 2482 - 2487
- 8 Krajcinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S, *et al* Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukaemia *Pharmacogenomics J*, 2004; 4: 66 - 72
- 9 de-Jonge R, Hooijberg JH, van-Zelst BD, *et al* Effect of polymorphisms in folate-related genes on *in vitro* methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia *Blood*, 2005; 106: 717 - 720
- 10 王汉平, 谢健晋, 张泽云等. CYP3A5 基因的多态性及其临床意义的研究. *中华医学遗传学杂志*, 2005; 22: 423 - 426
- 11 王婷, 陈芳源, 韩洁英等. CYP3A5 参与急性白血病耐药机制的研究. *中华血液学杂志*, 2003; 24: 286 - 289
- 12 Krajcinovic M, Labuda D, Mathonnet G, *et al* Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia *Clin Cancer Res*, 2002; 8: 802 - 810
- 13 Vos MT, DalóF, Gumiero D, *et al* The CYP1A1 \* 2a allele is an independent prognostic factor for acute myeloid leukemia *Haematologica*, 2005; 90: 982 - 984
- 14 Bowen DT, Frew ME, Rollinson S, *et al* CYP1A1 \* 2B (Val) allele is overrepresented in a subgroup of acute myeloid leukemia patients with poor-risk karyotype associated with NRAS mutation, but not associated with FLT3 internal tandem duplication *Blood*, 2003; 101: 2770 - 2774
- 15 Aplenc R, Glatfelter W, Han P, *et al* CYP3A genotypes and treatment response in paediatric acute lymphoblastic leukaemia *Br J Haematol*, 2003; 122: 240 - 244
- 16 Rocha JC, Cheng C, Liu W, *et al* Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia *Blood*, 2005; 105: 4752 - 4758
- 17 Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, *et al* Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy *Leukemia*, 2002; 16: 203 - 208
- 18 Takashi M, Morimoto A, Yagi T, *et al* Impact of glutathione S-transferase gene deletion on early relapse in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia *Haematologica*, 2003; 88: 1238 - 1244
- 19 Barragan E, Collado M, Cervera J, *et al* The GST deletions and NQO1 \* 2 polymorphism confers interindividual variability of response to treatment in patients with acute myeloid leukemia *Leuk Res*, 2007; 31: 947 - 953
- 20 张悦, 杨琳, 李睿等. GSTT1 及 GSTM1 与急性髓系白血病疗效及



- 预后的研究. 中华内科杂志, 2006; 45: 213 - 216
- 21 Meissner B, Stanulla M, Ludwig WD, *et al* The GSTT1 deletion polymorphism is associated with initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2004; 18: 1920 - 1923
- 22 Davies SM, Bhatia S, Ross JA, *et al* Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2002; 100: 67 - 71
- 23 Yue L, Saikawa Y, Ota K, *et al* A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity. *Pharmacogenetics*, 2003; 13: 29 - 38
- 24 Fitzgerald SM, Goyal RK, Osborne WR, *et al* Identification of functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the cytidine deaminase promoter. *Hum Genet*, 2006; 119: 276 - 283
- 25 Kanno S, Hiura T, Ohtake T, *et al* Characterization of resistance to cytosine arabinoside (Ara-C) in NALM-6 human B leukemia cells. *Clin Chim Acta*, 2007; 377: 144 - 149
- 26 Iyer L, Das S, Janisch L, *et al* UGT1A1 \* 28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J*, 2002; 2: 43 - 47
- 27 Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, *et al* Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol*, 2004; 22: 1382 - 1388
- 28 Marcuello E, Ales A, Menoyo A, *et al* UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2004; 91: 678 - 682
- 29 Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Hanioka N, *et al* Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), an active metabolite of irinotecan (CPT-11), by human UGT1A1 variants, G71R, P229Q, and Y486D. *Drug Metab Dispos*, 2003; 31: 108 - 113
- 30 Laverdiere C, Chiasson S, Costea I, *et al* Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2002; 100: 3832 - 3834
- 31 Kager L, Cheok M, Yang W, *et al* Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. *J Clin Invest*, 2005; 115: 110 - 117
- 32 Levy AS, Sather HN, Steinherz PG, *et al* Reduced folate carrier and dihydrofolate reductase expression in acute lymphocytic leukemia may predict outcome: a Children's Cancer Group Study. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2003; 25: 688 - 695
- 33 Belkov VM, Krynetski EY, Schuetz JD, *et al* Reduced folate carrier expression in acute lymphoblastic leukemia: a mechanism for ploidy but not lineage differences in methotrexate accumulation. *Blood*, 1999; 93: 1643 - 1650
- 34 Zaza G, Cheok M, Yang W, *et al* Gene expression and thioguanine nucleotide disposition in acute lymphoblastic leukemia after *in vivo* mercaptopurine treatment. *Blood*, 2005; 106: 1778 - 1785
- 35 Hubeek I, Stam RW, Peters GJ, *et al* The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates *in vitro* cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer*, 2005; 93: 1388 - 1394
- 36 Stam RW, den-Boer ML, Meijerink JP, *et al* Differential mRNA expression of Ara-C-metabolizing enzymes explains Ara-C sensitivity in MLL gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2003; 101: 1270 - 1276
- 37 Monzo M, Brunet S, Urbano-Ispizua A, *et al* Genomic polymorphisms provide prognostic information in intermediate-risk acute myeloblastic leukemia. *Blood*, 2006; 107: 4871 - 4879
- 38 Fleury I, Primeau M, Doreau A, *et al* Polymorphisms in genes involved in the corticosteroid response and the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pharmacogenomics*, 2004; 4: 331 - 341
- 39 Krajcinovic M, Costea I, Chiasson S. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 2002; 359: 1033 - 1034
- 40 Krajcinovic M, Costea I, Primeau M, *et al* Combining several polymorphisms of thymidylate synthase gene for pharmacogenetic analysis. *Pharmacogenomics J*, 2005; 5: 374 - 380
- 41 Lauten M, Asgedom G, Welte K, *et al* Thymidylate synthase gene polymorphism and its association with relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 2003; 88: 353 - 354
- 42 Edick MJ, Cheng C, Yang W, *et al* Lymphoid gene expression as a predictor of risk of secondary brain tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005; 42: 107 - 116
- 43 Holleman A, Cheok MH, den-Boer ML, *et al* Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *N Engl J Med*, 2004; 351: 533 - 542
- 44 Hofmann WK, de-Vos S, Elashoff D, *et al* Relation between resistance of Philadelphia- chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor ST571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet*, 2002; 359 (9305): 481 - 486