

6-巯鸟嘌呤与 6-巯嘌呤治疗儿童急性淋巴细胞白血病的进展

厚玉姣¹, 赵丽^{2*}, 刘祥鑫¹, 马云云¹

兰州大学第一医院¹血液科,²中心实验室, 甘肃兰州 730000

摘要 急性淋巴细胞性白血病(ALL) 是儿童最常见的恶性肿瘤, 现如今已取得较好的治愈率, 然而患儿仍面临很大的复发风险。研究发现, 巯嘌呤类药物作为持续治疗的一部分是防止复发的关键。通常 6-巯嘌呤(6-MP) 用于长期维持治疗, 而 6-巯鸟嘌呤(6-TG) 仅用于强化治疗部分, 在治疗过程中并没有一个最佳的选药方案。为探究 6-TG 是否比 6-MP 更适用于儿童 ALL 治疗, 本文就其相关临床治疗研究进展作一综述。

关键词 急性淋巴细胞性白血病; 6-巯嘌呤; 6-巯鸟嘌呤; 巯鸟嘌呤核苷酸; 巯嘌呤甲基转移酶

中图分类号 R733.71

文献标识码 A

doi: 10.7534/j.issn.1009-2137.2016.02.059

Progress of Research on 6-Thioguanine versus 6-Mercaptopurine in childhood ALL—Review

HOU Yu-Jiao¹, ZHAO Li^{2*}, LIU Xiang-Xing¹, MA Yun-Yun¹

¹Department of Hematology, ²Central Laboratory, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

* Corresponding Author: ZHAO Li, Senior Physician, Tutor of Doctorial Postgraduate. E-mail: zhaoli@lzu.edu.cn

Abstract Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common type of cancer in children. Despite good remission rate has achieved nowadays, the patients still face a substantial risk of relapse. It has long been recognized that thiopurines are critical components in the treatment for prevention of recurrence in childhood ALL, the 6-mercaptopurine (6-MP) has usually been used in daily long-term maintenance therapy, and 6-thioguanine (6-TG) limited to the reinforcement of therapy. However, there is no optimal regimen for 6-TG or 6-MP. The related research advances on the clinical effectiveness of the two thiopurines are reviewed.

Key words Acute lymphoblastic leukemia; 6-thioguanine; 6-mercaptopurine; thioguanine nucleotides; thiopurine methyltransferase

J Exp Hematol 2016; (2) : 622–626

急性淋巴细胞性白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL) 是儿童最常见的恶性血液肿瘤, 其治疗关键在于能有效杀伤肿瘤细胞, 并使患儿始终维持在缓解状态。尽管如今儿童 ALL 治愈率已高达 90% 以上, 但患儿预后并不理想, 甚至面临高达 20% 的复发风险^[1]。长期以来巯嘌呤类药物作为持续治疗 ALL 的一部分是防止其复发的关键, 其中 6-巯嘌呤(6-mercaptopurine, 6-MP) 用于维持治疗阶段, 而 6-巯鸟嘌呤(6-thioguanine, 6-TG) 仅用于强化治疗阶段, 但在治疗过程中并没有一个最佳的用药方案^[2]。6-MP 用于临床治疗儿童 ALL 已有 60 余年, 其作用机制尚未完全阐明, 与治疗相关的肝毒性及骨髓抑制仍是临床医生面临的巨大挑战。由于缺乏直接的参数监测患者疗效, 因此治疗强度较难把握, 仍需临床医生进一步调整治疗方案以期降低巯嘌呤类药物耐药性^[3]。1980 年以来, 药代动力学

研究发现 6-TG 比 6-MP 具有更直接的细胞内激活途径, 更短的药物细胞毒性时间及更强的作用效力, 从理论上阐述了 6-TG 可能更有效的原因^[4]。自 1990 年起开始有临床研究比较两种药物的疗效。一些动物试验数据也初步表明, 6-TG 可能比 6-MP 更有效^[5]。

* 通讯作者: 赵丽, 主任医师, 博士研究生导师。E-mail: zhaoli@lzu.edu.cn

2015–11–23 收稿; 2016–01–18 接受

监测方案

红细胞硫鸟嘌呤核苷酸与甲基化硫嘌呤代谢物硫嘌呤类药物呈现经典抗代谢细胞毒性作用。6-TG与6-MP是两种无活性前体药物,经肝脏黄嘌呤氧化酶首过代谢后,转化而成的两种主要细胞内代谢物——硫鸟嘌呤核苷酸(thioguanine nucleotides, TGN)和甲基化硫嘌呤代谢物(包括甲基化硫嘌呤核苷酸)——具有细胞毒活性,TGN继而渗入DNA发挥抗肿瘤作用^[2]。研究认为红细胞TGN浓度应独立于其他ALL预后变量,如年龄、白血病免疫表型、确诊时体内白细胞计数、试验方案和性别等^[6]。血浆半衰期与S-期依赖的药物动力学表明TGN生物活性浓度和暴露时间对肿瘤细胞杀伤性至关重要,监控该代谢物有重要的临床意义^[7]。

大量临床随机对照试验结果证实6-TG组ALL患儿红细胞TGN积累浓度显著高于6-MP组,两组白细胞TGN浓度范围没有差异^[8-10]。另有研究认为6-MP的细胞毒性效应并不完全基于TGN的形成,当6-MP剂量增加时,其代谢模式由TGN转向甲基化硫肌酐核苷酸(TIN)^[11]。因此,药物剂量强度也是影响代谢的一个重要因素,TGN浓度可能单纯反映红细胞直接代谢6-TG的能力。甲基化硫嘌呤代谢物与TGN的关系将作为阐明6-MP临床结果的成熟部分。

骨髓抑制

骨髓抑制是硫嘌呤类药物最主要的近期毒性反应,Lennard等^[4]基于血液毒性对6-TG治疗儿童ALL这一替代方案进行了研究,虽然ALL患儿对6-TG显示出良好的耐受性,但多数患儿发生不同程度的骨髓抑制。在临床上ALL患儿使用6-TG较6-MP更易引发不相称的血小板减少症(disproportionate thrombocytopenia, DT),主要表现为血小板计数低于 $100 \times 10^9/L$ 且不伴白细胞减少症^[7-9]。6-TG可能对血小板有选择性影响。最新研究表明,白细胞减少症、嗜中性粒细胞减少症、血小板减少症以及转氨酶升高均与硫嘌呤类药物剂量显著相关($P < 0.001$),但没有证据表明TGN浓度和血小板减少症之间存在相关性^[12]。

肝静脉闭塞病

大剂量长时程使用6-TG治疗将导致ALL患儿发生慢性肝毒性和门静脉高压。Vora等^[7]研究的随机对照试验对此进行了最早的描述,6-TG组中11%

的ALL患儿发生非致命性肝静脉闭塞病(hepatic vein occlusive disease, HVOD)。临床上6-TG诱导的HVOD的诊断遵照Seattle标准和Baltimore标准,主要表现为:①肝肿大和右上腹痛;②黄疸(胆红素 $\geq 35 \text{ mmol/L}$);③腹水或肝脏组织病理诊断。该标准具有较好的诊断特异性和阴性预测值,但其灵敏度相对较低,其中肝脏组织活检是诊断HVOD的金标准。其他表现包括血小板减少、血小板输注无效和纤溶参数的增加,尤其是纤溶酶原激活物抑制剂-1伴血清胆红素显著升高^[13]。研究发现,中药丹红注射液可有效控制门脉高压症状,降低肝酶,其温和抗凝及抗血栓作用有助于HOVD的治疗。经促进微循环、抑制肝纤维化和保护肝功能等对症支持治疗可改善ALL患儿预后^[14]。

肝窦阻塞综合征

门脉高压症主要由于肝窦内皮细胞损伤使门脉周围肝组织纤维化或结节状再生、增生,最终导致肝窦流出道阻塞,临床上称之为肝窦阻塞综合征(hepatic sinusoidal occlusion syndrome, HSOS)。HSOS为自体 and 异体造血干细胞移植(HSCT)的常见并发症,也见于接受化疗的肾母细胞瘤和横纹肌肉瘤患者,但在其他儿童恶性肿瘤的常规化疗中则较为罕见^[15]。多普勒超声也有助于HSOS诊断,包括肝、脾肿大,腹水,胆囊壁增厚,肝动脉阻力指数升高和门静脉逆流信号等。近年来,临床上使用多层螺旋CT结合MPR检查及肝脏CTA成像用于HSOS鉴别诊断和临床疗效的评价^[13]。

一种新的HSOS小鼠模型为6-TG诱导的肝毒性提供防治策略。研究发现6-TG可引起C57BL/6小鼠发展为HSOS,且与药物剂量及TGN浓度水平呈正相关^[16]。对于血管内皮细胞表面缺乏P-选择素和E-选择素的C57BL/6小鼠,其HSOS发病率显著降低。P-选择素和E-选择素为选择素家族中的一员,主要介导白细胞与内皮细胞黏附,炎症发生以及淋巴细胞的归巢^[17],因此血液中白细胞可能参与了HSOS的肝脏炎症过程。这些数据反映HSOS的自然病史,同时也强调了长期监测患儿至成年的必要性。也许临床上可通过内皮细胞的激活以及6-TG给药方案的简单改变,避免或抑制6-TG相关性HSOS。

症状性空腹低血糖

症状性空腹低血糖为ALL患儿临床使用6-MP维持治疗中并不常见的副作用。高浓度6-MP红细胞代谢物6-甲基-巯嘌呤(6-methyl-mercaptopurine, 6-

MMP) 与症状性低血糖相关。研究发现 6-MP 的给药时间由晚上给药改为上午给药时红细胞 6-MMP 水平降低,低血糖事件发生率下降,但细胞中仍保持较高的活性代谢物 TGN 水平。改为每日两次给药的 ALL 患儿 6-MMP 水平降低,低血糖症状减轻^[18]。目前尚无 6-TG 诱导症状性空腹低血糖的相关研究报道。

无事件生存率和总体生存率

德国 COALL-05-92 研究中^[9] 521 名 ALL 患儿在维持治疗期间随机分配为 6-MP 组与 6-TG 组。随访 6 年后两组无事件生存率(event free survival, EFS) 没有统计意义差别。相比之下,CCG-1952 试验中 6-TG 组 5-EFS 明显更好,6-TG 组有较低的骨髓及孤立性中枢神经系(isolated central nervous system, iCNS) 复发风险。二次肿瘤是巯嘌呤类药物治疗的一个远期毒副作用,没有证据表明 6-TG 组患儿二次肿瘤事件率高于 6-MP 组患儿^[8]。治疗中 6-TG 导致 HVD,迫使 6-TG 每日剂量从 60 mg/m²减少至 50 mg/m²,部分患儿停用 6-TG 改为 6-MP。初始剂量未变更时,两组男孩患者 5-EFS 有明显差异,虽然男性患儿比女性患儿维持治疗期多 1 年,男性患儿总体 7-EFS 估计值明显较女性患儿差,分别为 78.9% ± 1.9% 和 84.9% ± 1.9%; (RHR = 1.5; $P=0.002$ log rank),但两组总体生存率(overall survival, OS) 无性别差异。

骨髓和 iCNS 复发率的减少,并没有增加患儿 OS。治疗期间发生严重感染导致缓解死亡风险增加。同时产生严重的骨髓抑制与 HVD,抵消了它的好处。值得注意的是,英国 MRC 研究中缓解期 6-TG 组感染死亡率是 6-MP 组的 5 倍($P=0.01$),其中主要是 6-TG 和地塞米松治疗组的患儿。Nielsen 等^[3] 提出在维持治疗期使用 6-MP 治疗基础上加用 6-TG 可以加速巯嘌呤药物的代谢,也许可提高 TPMT 酶低活性 ALL 患儿巯嘌呤代谢率。综上所述,研究强调了若能有效监测患儿疗效同时避免毒性的负面影响,可以考虑长期使用 6-TG。

药物遗传学

单核苷酸多态性

高通量单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNP) 测定技术广泛应用于实验室和临床研究,为白血病的发生和治疗提供了有力的工

具^[19]。Matimba A 等^[20] 研究巯嘌呤类药物代谢和儿童 ALL 临床反应相关的候选基因,使用 siRNA 敲除肿瘤细胞株进行基因功能验证研究。巯嘌呤途径基因 SNP 包括: ABCC4、ABCC5、IMPDH1、ITPA、SLC28A3 和 XDH,及调节途径之外基因 SNP 包括: ATP6AP2、FRMD4B、GNG2、KCNMA1 和 NME1 均与巯嘌呤类药物临床反应和代谢相关。其中编码 ABCC4 药物转运体以及肌苷三磷酸酶(Inosine Triphosphatase, ITPA) 的基因多态性与 6-MP 治疗期间中性粒细胞减少和血小板减少有关,其功能影响药物的吸收、分布、排泄等过程,进而影响巯嘌呤类药物的临床疗效。巯嘌呤类药物的临床反应可由已知嘌呤途径基因和调节嘌呤途径之外的新基因变异预测。

巯嘌呤甲基转移酶基因多态性

巯嘌呤甲基转移酶(thiopurine methyltransferase, TPMT) 是一种催化芳香类和杂环类巯基化合物的胞浆酶,可激发巯嘌呤类化合物巯基甲基化,是巯嘌呤类药物分解代谢的关键酶之一。TPMT 酶活性具有遗传多态性,约 1/300 的人携带 TPMT 酶缺乏的隐性基因,约 11% 的人为中间活性,其余 89% 为高活性。TPMT 基因型影响巯嘌呤类药物化疗剂量强度,患者骨髓抑制程度及预后,并与 6-TG 导致的 HVD 相关^[21]。也有研究发现,TPMT 基因的遗传变异并未显著改变患者 6-TG 相关性 HVD 的风险^[22]。ALL 患儿 TPMT 基因多态性的频率约 4.2%,杂合型患者更常见于 TPMT*1/*3A 等位基因变体,野生型则主要为 TPMT*1/*1 和 TPMT*1/*3C 等位基因变体,研究中杂合子变异率为 33% (2A 3A 3C)^[23]。TPMT 基因突变具有种族和地域的差异性,中国汉族人仅发现 TPMT*3C 等位基因变异。杂合子和纯合子变异时酶活性较低,导致毒性反应的发生率更高。TPMT 基因(NM_000367) 位于编码区 738 bp 片段中的 C474T 变异率极高,没有证据表明与 6-MP 耐受性相关,TPMT 编码区基因的变异可能与 ALL 患儿对 6-MP 严重不耐受无关^[24]。

使用小干扰 RNA(siRNA) 敲除人类白血病细胞系 MOLT4 细胞编码表达 TPMT 酶的基因。结果显示 TPMT 靶向 siRNA 治疗后,相比非靶向转染 siRNA 的细胞,MOLT4 细胞对 6-TG 的敏感性增加了 34%,而细胞对 6-MP 的敏感度未受 TPMT 基因下调显著影响^[11]。这种差异可能由于该酶促使 6-MP 生成细胞毒代谢物甲基硫次黄嘌呤核苷一磷酸

(methylthioinosine monophosphate, MeTIMP), 而 TPMT 酶在催化 6-TG 甲基化的过程中使 6-TG 的活性降低。

近年来, 生理药动学模型(PBPK) 探究了 TPMT 酶基因多态性对 6-MP 的药代动力学作用。该模型采用经典的房室模型, 将巯嘌呤类药物体内分布与消除速率相似的器官或实实用隔室来表征, 把复杂的机体模拟为室的组合, 把药物在体内代谢过程描述为各室间药量变化的过程。PBPK 模型对不同 TPMT 基因表型的细胞内 6-TGN 水平显示结果与观测值一致, 并报道血液毒性发生率^[25]。参数估计和模型预测结果满意, 有助于指导 6-MP 临床用药以取得更好的临床疗效并降低毒副作用。由于初诊时 ALL 患儿 TPMT 基因型与表型并不整合, 根据 TPMT 酶活性预测杂合性尚具争议, 基因型能更好的预测化疗期间 TGN 的积累量^[26]。

结语

综上所述, 对于预防儿童 ALL 的复发 6-TG 可能比 6-MP 更有效, 但 6-TG 导致严重的肝脏毒性且未能改善患儿总体生存率, 应避免长期使用。正在进行的药理遗传学研究可建立模型探究是否有特定类型患儿受益于 6-TG。目前巯嘌呤仍然是维持治疗期的标准选择。作为新一代的分子标志, SNP 通过基因连锁分析等技术获得新的白血病生物标记物和基因表达标签, 从中发现诊断和预后评估的可靠标志及特异性治疗靶点。国内外关于巯嘌呤类药物 TPMT 酶基因多态性的研究及相关检测已用于指导临床用药。总之, 这些药理工具可用于监测 ALL 患儿的治疗, 为患儿提供个体化化疗方案, 延长患儿总生存期。

参考文献

- 1 Wojtuszkiewicz A, Barcelos A, Dubbelman B, *et al.* Assessment of mercaptopurine (6MP) metabolites and 6MP metabolic key - enzymes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2014; 33(4-6): 422-433.
- 2 Bell BA, Brockway GN, Shuster JJ, *et al.* A comparison of red blood cell thiopurine metabolites in children with acute lymphoblastic leukemia who received oral mercaptopurine twice daily or once daily: a Pediatric Oncology Group study (now The Children's Oncology Group). *Pediatr Blood Cancer*, 2004; 43(2): 105-109.
- 3 Nielsen SN, Frandsen TL, Nersting J, *et al.* Pharmacokinetics of 6 - thioguanine and 6 - mercaptopurine combination maintenance therapy of childhood ALL: hypothesis and case report. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2015; 37(3): e206-209.
- 4 Lennard L, Davies HA, Lilleyman JS. Is 6 - thioguanine more appropriate than 6 - mercaptopurine for children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*, 1993; 68(1): 186-190.
- 5 Escherich G, Richards S, Stork LC, *et al.* Meta - analysis of randomised trials comparing thiopurines in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 2011; 25(6): 953-959.
- 6 Lennard L, Welch J, Lilleyman JS. Mercaptopurine in childhood leukaemia: the effects of dose escalation on thioguanine nucleotide metabolites. *Br J Clin Pharmacol*, 1996; 42(4): 525-527.
- 7 Hanff LM, Mathot RA, Smeets O, *et al.* A novel 6 - mercaptopurine oral liquid formulation for pediatric acute lymphoblastic leukemia patients - results of a randomized clinical trial. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2014; 52(8): 653-662.
- 8 Vora A, Mitchell CD, Lennard L, *et al.* Toxicity and efficacy of 6 - thioguanine versus 6 - mercaptopurine in childhood lymphoblastic leukaemia: a randomised trial. *Lancet*, 2006; 368(9544): 1339-1348.
- 9 Stork LC, Matloub Y, Broxson E, *et al.* Oral 6 - mercaptopurine versus oral 6 - thioguanine and veno - occlusive disease in children with standard - risk acute lymphoblastic leukemia: report of the Children's Oncology Group CCG - 1952 clinical trial. *Blood*, 2010; 115(14): 2740-2748.
- 10 Escherich G, Horstmann MA, Zimmermann M, *et al.* Cooperative study group for childhood acute lymphoblastic leukaemia (COALL): long - term results of trials 82, 85, 89, 92 and 97. *Leukemia*, 2010; 24(2): 298-308.
- 11 Lennard L, Cartwright CS, Wade R, *et al.* Thiopurine dose intensity and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: the influence of thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. *Br J Haematol*, 2015; 169(2): 228-240.
- 12 Levinsen M, Rosthøj S, Nygaard U, *et al.* Myelotoxicity after high - dose methotrexate in childhood acute leukemia is influenced by 6 - mercaptopurine dosing but not by intermediate thiopurine methyltransferase activity. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015; 75(1): 59-66.
- 13 Kotecha RS, Buckland A, Phillips MB, *et al.* Hepatic sinusoidal obstruction syndrome during chemotherapy for childhood medulloblastoma: report of a case and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2014; 36(1): 76-80.
- 14 Yao JY, Zhi M, Cao WT, *et al.* Successful treatment with danhong injection for hepatic veno - occlusive disease. *Hepatogastroenterology*, 2011; 58(107-108): 992-995.
- 15 Maksoud - Filho JG, Goncalves MEP, Cardoso SR, *et al.* Long - term follow - up of children with extrahepatic portal vein obstruction: impact of an endoscopic sclerotherapy program on bleeding episodes, hepatic function, hypersplenism, and mortality. *J Pediatr Surg*, 2009; 44(10): 1877-1883.
- 16 Boula AM, Mantadakis E, Xilouri IM, *et al.* Veno - occlusive disease of the liver associated with chronic myelomonocytic leukemia treated with vincristine and standard doses of cytarabine. *Am J Hematol*, 2005; 79(3): 216-219.
- 17 Oancea I, Png CW, Das I, *et al.* A novel mouse model of veno - occlusive disease provides strategies to prevent thioguanine - induced

- hepatotoxicity. *Gut*, 2013; 62(4): 594 – 605.
- 18 Melachuri S, Gandrud L, Bostrom B. The association between fasting hypoglycemia and methylated mercaptopurine metabolites in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 2014; 61(6): 1003 – 1006.
- 19 许佩佩, 陈宝安, 程澍. 单核苷酸多态性与血液学肿瘤的研究进展. *中国实验血液学杂志*, 2010; 18(1): 250 – 254.
- 20 Matimba A, Li F, Livshits A, Cartwright CS, *et al.* Thiopurine pharmacogenomics: association of SNPs with clinical response and functional validation of candidate genes. *Pharmacogenomics*, 2014; 15(4): 433 – 447.
- 21 Wray LI, Vujkovic M, McWilliams T, *et al.* TPMT and MTHFR genotype is not associated with altered risk of thioguanine – related sinusoidal obstruction syndrome in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*, 2014; 61(11): 2086 – 2088.
- 22 Karim H, Ghalali A, Lafolie P, *et al.* Role of thiopurine methyltransferase Differential in the cytotoxic effects of 6 – mercaptopurine and 6 – thioguanine on human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013; 437(2): 280 – 286.
- 23 Linga VG, Patchva DB, Mallavarapu KM, *et al.* Thiopurine methyltransferase polymorphisms in children with acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Med Paediatr Oncol*, 2014; 35(4): 276 – 280.
- 24 马晓莉, 李伟京, 郑杰, 等. 严重不耐受巯嘌呤的急性淋巴细胞白血病患者 TPMT 基因序列分析. *中国实验血液学杂志*, 2012; 20(4): 876 – 879.
- 25 Ogunbenro K, Aarons L. Physiologically based pharmacokinetic model for 6 – mercaptopurine: exploring the role of genetic polymorphism in TPMT enzyme activity. *Br J Clin Pharmacol*, 2015; 80(1): 86 – 100.
- 26 Lennard L, Cartwright CS, Wade R, *et al.* Thiopurine methyltransferase genotype – phenotype discordance and thiopurine active metabolite formation in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Clin Pharmacol*, 2013; 76(1): 125 – 136.