

严重不耐受巯嘌呤的急性淋巴细胞白血病 患儿 *TPMT* 基因序列分析

马晓莉, 李伟京, 郑杰, 王彬, 金眉, 张大伟, 李志刚, 张玉祥¹

首都医科大学附属北京儿童医院血液病中心, 北京 100045;

¹ 首都医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 北京 100054

摘要 本研究分析严重不耐受巯嘌呤(6-MP)的急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿巯嘌呤甲基转移酶(*TPMT*)基因序列,以探讨 ALL 儿童 6-MP 耐受性差异的原因,为更安全合理地应用 6-MP 提供依据。对 2004-10-1–2007-9-30 在我院规范应用 BCH-2003-ALL 化疗方案的 ALL 儿童,按 NCI-CTC V2.0 评价药物不良反应。分析处于 6-MP 维持化疗期,出现 3–4 度不良反应(即严重不耐受)ALL 患儿的 *TPMT* 基因序列。为保证测序的准确性,将 *TPMT* 基因(NM_000367)编码区的 738 bp 片段分 3 段分别进行双向测序。结果表明:在调查的 133 例 ALL 患儿中,61 例为严重不耐受 6-MP,剔除其中 2 例无标本患儿,对 59 例进行了 *TPMT* 基因测序。其中单纯骨髓不良反应 37 例,肝脏和骨髓不良反应 9 例,单纯肝脏不良反应 12 例,皮肤不良反应 1 例。59 例中男 39 例,女 20 例,中位年龄 67 个月(17–183 个月)。在 59 例患儿中,57 例发现 C474T 变异,变异率为 96.6%,其中杂合突变 21 例,纯合突变 36 例。又对 10 例 6-MP 耐受性好的 ALL 患儿进行 *TPMT* 基因测序。结果显示 8 例也出现 C474T 变异,均为纯合突变,变异率为 80%,说明 *TPMT* 基因 C474T 变异与 6-MP 严重不耐受无关。结论: *TPMT* 基因(NM_000367)编码区的 738 bp 片段中 C474T 变异率极高,但与 6-MP 耐受性无关,提示 ALL 患儿 6-MP 的严重不耐受可能与 *TPMT* 编码区基因的变异无关。

关键词 ALL; 儿童; 6-MP; *TPMT* 基因

中图分类号 R733.71

文献标识码 A

Thiopurine S-Methyltransferase Gene Sequence Analysis of ALL Children Severely Intolerant to 6-Mercaptopurine

MA Xiao-Li, LI Wei-Jing, ZHENG Jie, WANG Bin, JIN Mei, ZHANG Da-Wei, LI Zhi-Gang, ZHANG Yu-Xiang¹

Center of Hematology, Beijing Children's Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100045, China; ¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100054, China

* Corresponding Author: MA Xiao-Li, Senior Physician. Tel: (010) 59612612. E-mail: xiaolima1123@yahoo.com.cn

Abstract This study was aimed to analyze the thiopurine S-methyltransferase (*TPMT*) gene sequence in acute lymphoblastic leukemia (ALL) children severely intolerant to 6-mercaptopurine (6-MP) and to investigate the causes resulting in tolerance difference to 6-MP in ALL children so as to provide evidence for safe and rational use of 6-MP. The adverse reactions of drug was evaluated in ALL children treated with BCH-2003-ALL chemotherapeutic protocol during 2004-10-1 to 2007-9-30 according to NCI-CTC V2.0. The *TPMT* gene sequences of ALL children with 3–4 grade of severe toxicity during the maintenance therapy were analyzed by PCR and direct DNA sequencing. To assure the accuracy of sequencing, the 738 bp fragment of coding region in *TPMT* gene (NM_000367) was divided into 3 subfragments and bidirectionally sequenced. The results indicated that among 133 ALL children, 61 were severely intolerant to 6-MP. The direct DNA sequencing showed that among 59 patients (excluding 2 cases without RNA samples), the simple myelotoxicity was found in 37 cases, hepato-myelotoxicity was observed in 9 cases, hepatotoxicity along appeared in 12 cases, 1 case showed skin rash. Out of 59 ALL children, the C474T mutation was found in 57 cases, with mutation rate 96.6%, including 21 cases with heterozygous mutation and 36 cases with homozygous mutation. The *TPMT* gene sequencing of 10 cases tolerant to 6-MP indicated that C474T mutation was detected in 8 cases which was homozygous mutation. It is concluded that the C474T mutation in 738 bp fragment of coding region in *TPMT* gene is very frequent, but it is not related with tolerance to 6-MP, suggesting that severe intolerance to 6-MP in ALL

* 通讯作者: 马晓莉, 主任医师。电话: (010) 59612612。E-mail: xiaolima1123@yahoo.com.cn

2012–01–20 收稿; 2012–03–02 接受

children may be not related with the mutation of coding region in *TPMT* gene.

Kew words ALL; children; 6-MP; *TPMT* gene

J Exp Hematol 2012; 20(4): 876–879

巯嘌呤(6-mercaptopurine, 6-MP) 是治疗儿童急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL) 的骨架药物,贯穿整个疗程的始终。我们前期的临床研究表明,ALL 患儿个体间 6-MP 的耐受性差异很大,很多患儿对 6-MP 的标准治疗剂量表现为骨髓抑制和肝功能异常等不良反应,且明显高于西方人,但耐受性差异的原因未明确。本研究调查同一化疗方案治疗的 ALL 患儿 6-MP 的耐受性,重点分析严重不耐受 6-MP 患儿巯嘌呤甲基转移酶(thiopurine methyltransferase, *TPMT*) 基因序列,为进一步研究个体间 6-MP 的耐受性差异的原因和遗传学基础提供临床依据。

材料和方法

对象

2004 年 10 月 1 日–2007 年 9 月 30 日连续 3 年中在我院血液肿瘤病房诊治的所有 ALL 患儿; ALL 患儿的诊断标准,化疗方案为 BCH-ALL-2003 标准^[1]。化疗前签署诊治协议书和化疗协议书。所有患儿均进入 6-MP + MTX 维持化疗阶段。维持化疗方案为 6-MP 50 mg/(m² · d) + MTX 20 mg/(m² · 周)。患儿姓名、住址、疾病等均属个人隐私,不得向外界泄露。留取所有患儿的骨髓 2 ml 以备提取 DNA 标本。

治疗及不良反应评价

患儿符合以上标准,且均处于维持化疗阶段,规范应用维持化疗方案。患儿按照治疗要求,坚持在门诊随诊,定期返院复诊。按 NCI-CTC V2.0 标准评价 6-MP 不良反应^[2],以 3–4 度不良为 6-MP 的严重不耐受。应用 SPSS 13.0 进行统计分析。

基因序列分析

对 6-MP 维持化疗期出现 3–4 度不良反应(即严重

不耐受) ALL 患儿的 *TPMT* 基因序列进行分析。取肝素抗凝的骨髓 2 ml,提取单个核细胞,置–70℃保存。为保证测序的准确性,将 *TPMT* 基因(NM_000367) 编码区的 738 bp 片段,分 3 段分别进行双向测序,*TPMT* 基因引物的设计如表 1。提取总 RNA 后对 *TPMT* PCR 产物的测序。50 μl PCR 扩增体系中包括 ABI 缓冲液 II, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L,引物 10 pmol, cDNA 0.2 μg, Taq DNA 多聚酶 1 U,条件为 94℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 68℃ 3 min, 共 35 个循环。

结 果

一般资料

在调查的 133 例 ALL 患儿中,61 例 ALL 患儿于服用标准剂量 6-MP 2–4 周出现对 6-MP 严重不耐受。61 例中有 2 例无骨髓单个核细胞标本,无法进行 *TPMT* 基因研究,故剔除。59 例中男 39 例,女 20 例,中位年龄 68 个月(18–188 个月)。骨髓免疫学分型 T 细胞来源 9 例, T-B 混合型 2 例,其余为 B 细胞来源。SR 20 例, MR2 13 例, HR 2 例(1 例为 T-ALL)。MR1 22 例(其中 T-ALL 11 例)。59 例患儿中骨髓不良反应 46 例,其中单纯骨髓不良反应 37 例,同时伴有肝脏不良反应 9 例,单纯肝脏不良反应 12 例,皮肤不良反应 1 例。

TPMT 基因序列

不耐受 59 人中 C474T-异亮(I) 158 异亮(I) 变异 57 人,变异率为 96.6% (57/59),包括杂合变异 21 人(附图 B),纯合变异 36 人(附图 C)。为了研究结果的可靠性,又选择了对 6-MP 耐受性较好的 10 例患儿进行 *TPMT* 基因测序。结果显示, C474T-异亮(I) 158 异亮(I) 变异 8 人,均为纯合变异,变异率为 80% (表 2,附图)。

Table 1. Thiopurine S-methyltransferase(*TPMT*) primer

Coding region sequence	Forward primer (5′–3′)	Reverse primer (5′–3′)	Molecular weight(bp)
First fragment	CTAAGCGAGGCACGGAAGAC	CCCAAGTTCATCGATTCCA	341
Second fragment	GCGGTGAGATGAAATGGTT	AAACTCTTTCCAGGAGGG	318
Third fragment	AGTTGCCATCAATCCAGGTG	CCTCAAAAACATGTCAGTGTGA	319

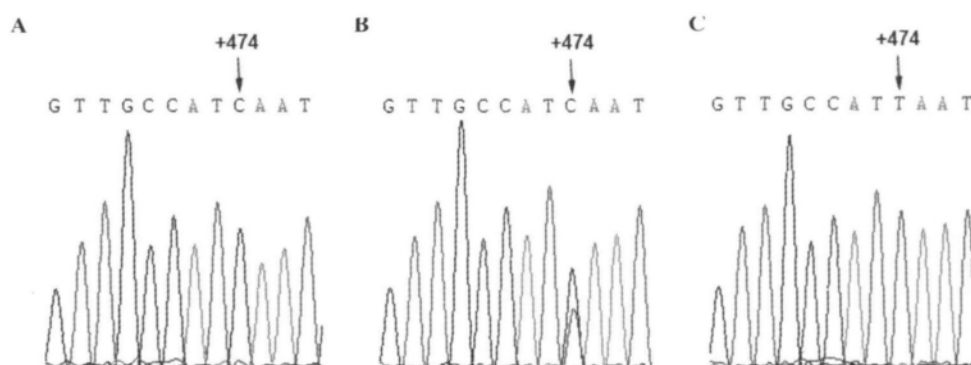


Figure. *TPMT* sequencing of ALL patients intolerant to 6-MP. There were 57 patients with C474T mutation in sequence, the mutation rate was 96.6% (57/59), including heterozygous mutation (B), homozygous mutation (C) and wild type (A).

Table 2. Results of *TPMT* Gene Sequencing

Group	Patient (n)	Homozygous mutation (n)	Heterozygous mutation (n)	No mutation (n)	Mutation rate (%)
Intolerant to 6-MP	59	36	21	2	96.6
Tolerant to 6-MP	10	8	0	2	80

讨 论

我们前期的临床研究表明, ALL 患儿个体间 6-MP 的耐受性差异很大。61/133 例 (46%) 患儿对 6-MP 治疗敏感, 即对 6-MP 的耐受性差, 短期内出现严重的血液和肝不良反应, 必须中断治疗或需要多次调整 6-MP 剂量以避免较大不良反应的发生。由于 6-MP 耐受性差异的原因未明确, 可供临床医生进行 ALL 患儿 6-MP 剂量调整的方法仅仅是血细胞数, 很难掌握准确的剂量强度。而且 6-MP 不良反应类型不同, 产生机制也是完全不同的。

美国 St. Jude 儿童研究院研究发现^[3-6]: *TPMT* 基因的遗传学变异可能影响 6-MP 的耐受性, 从而影响 ALL 疗效。*TPMT* 绝大多数等位基因的变异归因于序列上的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNP) 的不同。西方人 *TPMT* 基因的多态性热点集中于 *TPMT* 第 5、7、10 外显子的 3 个位点, 80% - 95% 变异的等位基因是 *TPMT** 2 (G238C)、*TPMT** 3A (G238C/A719G) 和 *TPMT** 3C (A719G)。我们在前期进行了以上几个位点的研究, 结果显示中国人群 *TPMT* 这几个多态性位点的发生率并不高, 远低于西方人^[7]。前期研究还提示, 一些野生型 *TPMT* 基因患儿对 6-MP 的耐受性很

差, 推测中国人群可能也存在特征性的基因变异。根据前期的 *TPMT* 研究结果, 结合 61 例严重不耐受 6-MP 患儿资料, 本研究进一步研究了其中 59 例患儿的 *TPMT* 基因序列。结果表明, C474T 变异率非常高, 达 96.6%, 未发现其他位点的变异。为进一步研究 *TPMT* 基因 C474T 与 6-MP 耐受性的关系, 又对 10 例 6-MP 耐受性好的 ALL 患儿进行了 *TPMT* 基因测序。结果显示, C474T 变异率 80%, 均为纯合突变, 提示 *TPMT* 基因 (NM_000367) 编码区的 738 bp 片段中没有与 6-MP 严重不耐受相关的变异, 那么是否存在 *TPMT* 基因非编码区的变异或 6-MP 其他关键代谢酶的基因变异, 从而影响了 6-MP 的体内代谢, 导致严重不耐受反应?

基于前期研究基础, 结合我院在急性白血病方面所具有的资料和标本积累, 我们下一步拟以 6-MP 代谢关键酶 *TPMT* 和三磷酸肌苷焦磷酸酶 (*ITPA*) 为靶点^[8-11], 进一步研究 *TPMT* 和 *ITPA* 的药理遗传学。分析中国人群 *TPMT* 和 *ITPA* 基因多态性位点存在部位和发生频率, 对 *TPMT* 和 *ITPA* 的基因多态性进行关联分析, 寻找其组合规律, 并结合 ALL 患儿临床资料, 分析 *TPMT* 和 *ITPA* 基因多态性、活性改变与 6-MP 不良反应的关系。从而解释 ALL 患儿个体间治疗效应差异的分子遗传机理, 为更合理

地个体化治疗 ALL 提供依据。

参 考 文 献

- 1 中华医学会儿科学分会血液学组, 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). 中华儿科杂志, 2006; 44(5): 392-395
- 2 National Cancer Institute. Cancer Therapy Evaluation Program: Common Toxicity Criteria. Available from: <http://ctep.cancer.gov/reporting/ctc.html>. [Last accessed: June 1, 1999].
- 3 Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med, 2006; 354(2): 166-178
- 4 Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, *et al.* Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. Clin Pharmacol Ther, 2011; 89(3): 387-391
- 5 Marsh S, Van Booven DJ. The increasing complexity of mercaptopurine pharmacogenomics. Clin Pharmacol Ther. 2009; 85(2): 139-141
- 6 Schmiegelow K, Forestier E, Kristinsson J *et al.* Thiopurine methyltransferase activity is related to the risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study. Leukemia, 2009; 23(3): 557-564
- 7 马晓莉, 朱平, 胡亚美, 等. 变性高效液相色谱分析技术检测巯嘌呤甲基转移酶基因多态性位点. 中国药理学杂志, 2006; 41(18): 1428-1430
- 8 Hagaman JT, Kinder BW, Eckman MH. Thiopurine S-methyltransferase testing in idiopathic pulmonary fibrosis: a pharmacogenetic cost-effectiveness analysis. Lung, 2010; 188(2): 125-132
- 9 Higgs JE, Payne K, Roberts C, *et al.* Are patients with intermediate *TPMT* 和 *ITPA* activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? Pharmacogenomics, 2010; 11(2): 177-188
- 10 Stocco G, Crews KR, Evans WE. Genetic polymorphism of inosine triphosphate-pyrophosphatase influences mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment of acute lymphoblastic leukemia individualized for thiopurine-S-methyl-transferase status. Expert Opin Drug Saf, 2010; 9(1): 23-37
- 11 Stocco G, Cheok M, Crews K, *et al.* Genetic polymorphism of inosine triphosphate pyrophosphatase is a determinant of mercaptopurine metabolism and toxicity during treatment for acute lymphoblastic leukemia. Clin Pharmacol Ther, 2009; 85(2): 164-172