

慢性粒细胞白血病与格列卫耐药关系的研究

王方方(综述),何明生(审校)

(云南省第一人民医院,昆明 650032)

关键词: 慢性粒细胞白血病;格列卫;耐药;分子靶向治疗

中图分类号: R733.72

文献标识码: A

文章编号: 1006-2084(2005)01-0046-03

慢性粒细胞白血病(CML)是一种获得性造血干细胞恶性克隆性疾病,其病程一般分三期:慢性期、加速期和急变期。90%以上 CML 患者的骨髓细胞中可检测到特征性的费城染色体[Ph(+)]或 BCR-ABL 融合基因。CML 治疗目的是消除症状、控制血液和遗传学异常,最大限度地延长生存期。然而,药物治疗 CML 的治愈率很低,疗效较好的治疗仅达到延长其病程。近年来,小分子酪氨酸激酶抑制剂格列卫(glivec)的研制成功,将 CML 治疗带入新的分子靶向(molecular target)治疗时代。它能选择性地阻断 ATP 与激酶催化中心的结合位点,抑制酪氨酸激酶磷酸化,进而阻止 CML 细胞的信号传导。但格列卫耐药(resistance to glivec)影响了其治疗 CML 的疗效,现将 CML 与格列卫耐药关系的研究进展综述如下。

1 CML 治疗现状与存在的问题

1.1 造血干细胞移植治疗 目前治疗 CML 的方法主要是造血干细胞移植(HSCT)和非移植治疗。异基因干细胞移植(allo-SCT)一直被认为是唯一能治愈 CML 的方法,但是供体的可利用率及移植相关的病死率限制了 allo-SCT 的应用。Okamoto 等^[1]提出,尽管 allo-SCT 是治疗 CML 的有效措施,但存在移植物抗宿主病(GVHD)引起死亡的问题;另外,找相同 HLA 配型的供体困难,因而限制了干细胞移植的广泛应用。自体干细胞移植(auto-SCT)虽能降低与治疗相关的病死率,但是很容易复发,使移植后总的存活率(overall survival, OS)降低^[2]。

1.2 药物治疗 目前临床上以干扰素 α (IFN- α)和羟基脲(HU)治疗 CML 为多。IFN- α 可使 5%~20% 的 CML 患者获得完全细胞遗传学缓解(complete cytogenetic remission, CCR)及延长存活期,但它有严重的毒性作用^[3]。已有报道证明,单独使用 IFN- α 治疗 CML 的疗效低于联合 HU 或阿糖胞苷(Ara-C)的疗效。HU 治疗 CML 患者的血液学缓解率约 50%,但细胞遗传学缓解较少,且长期应用也有毒性作用。Tripathi 等^[3]报道 1 例非糖尿病 CML 患者长期使用 HU 后引起小腿溃疡,并指出溃疡是直接由 HU 的毒性作用所致。Janssen^[4]也报道了类似的病例。

在格列卫之前的所有治疗手段中,只有 allo-SCT 能“根治”CML。然而,由于存在各种条件的限制,适合移植的患者不足 20%,而且这一治疗方法伴有一定的风险性。因此,通过信号传导抑制剂抑制 BCR-ABL 酪氨酸激酶活性,从而阻止一系列信号传导来治疗 CML 是一个比较好的治疗方法。酪氨酸激酶抑制剂格列卫为分子靶向治疗 CML 奠定了基础。

2 格列卫治疗 CML 的疗效

临床研究证明,格列卫是治疗 CML 非常有效的药物,可使 CML 患者得到完全或部分血液学和细胞遗传学缓解。

Kantarjian 等^[5]给予 IFN- α 治疗失败的 454 例 CML 慢性期患者用格列卫治疗(400mg/d)后,获得完全血液学缓解(complete hematopoietic remission, CHR)达 95%;主要细胞遗传学缓解(major cytogenetic remission, MCR)和 CCR 分别达 60%和 41%,高于 IFN- α 治疗 CML 患者的疗效(分别为 15%和 5%~7%);18 个月无病存活率 89%。在格列卫 II 期临床试验中,181 例 CML 加速期患者用格列卫治疗后,82%患者获血液学缓解,其中 34%患者达 CHR;MCR 和 CCR 分别达 24%和 17%。格列卫治疗 229 例 CML 急变期患者 CHR、MCR 分别达 15.3%、16.2%^[6,7]。Lou 等^[8]给予 54 例 CML 患者格列卫治疗,其中 17 例慢性期患者予格列卫 400mg/d,13 例加速期患者及 24 例急变期患者给予格列卫 600mg/d。治疗 5 个月后,17 例慢性期患者获 CHR,13 例加速期患者中 8 例(61.5%)和 24 例急变期患者中 9 例(37.5%)转为慢性期。研究表明,格列卫治疗 CML 各期患者均能获一定的血液学和(或)细胞遗传学缓解,尤以 CML 慢性期疗效显著。

3 格列卫耐药的机制

3.1 格列卫耐药现象 格列卫治疗 CML 患者虽然能获得较高的血液学和细胞遗传学缓解率,但是其耐药的出现降低了 CML 的远期治疗效果。

由于病期不同及耐药的确认标准不尽相同,耐药的发生频率各家报道不一。181 例加速期患者中 16 例出现格列卫耐药,耐药率为 8%;69%急变期患者未获得血液学缓解,43/70(61%)患者复发;而仅有不到 10%的慢性期患者缓解持续 18 个月(中位期)后复发^[4,6,7]。Kreil 等^[9]报道 291 例 CML 患者中 42 例出现耐药,耐药率为 14.4%,其中慢性期患者耐药者占 4/137,明显少于加速期(9/80)及急变期(28/73)。

3.2 格列卫耐药机制

3.2.1 BCR-ABL 基因突变 目前认为,BCR-ABL 基因突变是格列卫产生耐药的常见机制。在 ATP 结合位点或酪氨酸激酶催化中心以外的区域至少发现 13 种点突变。首先发现了 BCR-ABL 融合蛋白的 ABL 结构域第 315 位苏氨酸突变为异亮氨酸(T315I),研究证明在格列卫耐药的 CML 细胞中 T315I 突变率较高^[10]。Hochhaus 等^[11]研究格列卫治疗后的 66 例 CML 患者,发现其中 6 例出现 T315I,4 例 M351T,4 例 Y253H 和 3 例 E255V。另外还发现 M244V、G252H、G355G、H396A。Hofman 等^[12]将格列卫用于 CML 和 Ph(+)急性淋巴细胞白血病(ALL)细胞,发现一段时间后耐药的白血病细胞内出现 E255V。这些突变能阻止格列卫与 BCR-ABL 结合,从而阻碍格列卫抑制酪氨酸激酶活性的作用。Nardi 等^[13]指出酪氨酸激酶催化中心以外的突变能增强激酶自体磷酸化,从而阻止格列卫与 BCR-ABL 结合。Von Bubnoff 等^[14]指出,在对格列卫耐药的 Ph(+)白血病细胞中通常能检测出突变的 BCR-ABL。

但是,在难治的 CML 患者体内较少见到 BCR-ABL 突变。有研究发现,10 例难治的 CML 患者中仅有 1 例对格列卫耐药

(有 BCR-ABL 突变),说明还存在其他耐药机制^[15]。

3.2.2 BCR-ABL 基因扩增 对格列卫耐药的 CML 患者体内 BCR-ABL 增多与 BCR-ABL 基因扩增及其表达增强有关。Hochhaus 等^[11]研究了 66 例用格列卫 148d(中位期)后产生耐药的 CML 患者,RT-PCR 检测 55 例患者,发现其中 7 例 BCR-ABL 增多 10 倍以上;原位荧光杂交法(FISH)检测 32 例 CML 患者,发现其中 2 例 BCR-ABL 成倍复制。Donato 等^[16]亦指出对格列卫耐药的 CML 患者 BCR-ABL 基因持续表达。

3.2.3 细胞内格列卫浓度降低 Petzer 等^[17]用格列卫 600mg/d 治疗 1 例 CML 急变期患者 3 个月后,患者获得 CCR,但中枢神经系统症状复发,经研究发现脑脊液中格列卫浓度较血浆中浓度降低。认为格列卫浓度降低可能是残留病灶复发的原因。

另外,非 BCR-ABL 激酶依赖性机制也是格列卫耐药机制之一,如其他细胞遗传学变异 t(18;22)、t(6;22)、t(1;16)、t(1;8)、t(2;12)、t(4;18)^[11]。近年来有关格列卫耐药机制的研究很多,但一般认为,在产生格列卫耐药的分子机制中,最重要的是 BCR-ABL 基因突变和 BCR-ABL 基因扩增。

4 解决格列卫耐药问题

针对格列卫耐药机制,人们提出了很多解决格列卫耐药的方法,包括增加格列卫剂量、使用其他可抑制 BCR-ABL 的药物、联合用药等方法,但很多仍处于研究当中。其中增加格列卫剂量的方法简便易行,已经取得了良好的效果。

4.1 加大格列卫剂量 有研究认为格列卫耐药是相对的,加大剂量可克服耐药,可使获得血液学疗效的患者克服遗传学耐药,获得细胞遗传学疗效。Hochhaus 等^[11]指出,为防止出现格列卫耐药,应避免低于 300mg/d 的用量,将剂量增加到 800mg/d。Kantarjian 等^[18]研究经 IFN 治疗失败的 CML 慢性期患者接受标准剂量(400mg/d)的格列卫治疗,其中 7 例患者由 300mg/d 的用量上升到 600mg/d,47 例患者由 400mg/d 上升到 800mg/d。发现 20 例因血液学耐药或复发而接受大剂量格列卫治疗的患者中,13 例(65%)再次获血液学缓解,其中 9 例获 CHR;34 例因细胞遗传学耐药或复发而接受大剂量格列卫治疗的患者中,19 例(56%)患者再次获得细胞遗传学缓解,其中 6 例为 CCR,7 例为部分细胞遗传学缓解(PCR)。

4.2 联合用药 Mohi 等^[19]将格列卫联合免疫抑制剂雷帕霉素(rapamycin)用于 CML 鼠,发现能抑制 BCR-ABL 突变。Gorre 等^[20]用鼠 Ba/F3 细胞株作体外实验,予热休克蛋白 90(hsp90)抑制剂格尔德霉素(geldanamycin,GA)及其衍生物(17-AAG)0.5~1.0μmol,24h 后,发现 T315I 和 E255K 突变的格列卫耐药细胞中 BCR/ABL 减少,指出 hsp90 抑制剂 GA 及 17-AAG 能抑制 CML 细胞增殖,诱导对格列卫耐药的 CML 细胞株凋亡(apoptosis)。因此,认为格列卫联合 hsp90 抑制剂克服其耐药有重大意义。此外,格列卫联合 IFN-α 或 Ara-C 治疗新诊断 CML 慢性期患者的试验正在进行中,这种方法能否降低格列卫的耐药率还有待证实。

4.3 其他 使用 BCR-ABL 下游通路抑制剂及针对特异性耐药机制的药物(多重耐药抑制剂)等,目前仍在研究中。

5 结 语

格列卫为 CML 治疗开辟了分子靶向治疗的新天地,无论是慢性期、加速期还是急变期,都可达到一定的血液学及细胞

遗传学缓解,其疗效优于已有的各种非移植治疗手段。但是,耐药的出現影响了 CML 的远期治疗效果,因此,如何阻止或延缓耐药的发生就显得至关重要,值得深入研究。

格列卫治疗 CML 的疗效与格列卫作用机制和耐药机制有关,对其耐药机制的了解将有助于提高其长期使用的安全性、延长血液学及细胞遗传学缓解持续的时间、延长患者存活时间和提高患者的生活质量。

参考文献:

- [1] Okamoto S, Watanabe R, Takahashi S, *et al*. Long-term follow-up of allogeneic bone marrow transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with chronic myelogenous leukemia in the chronic phase [J]. *Int J Hematol*, 2002, 75(5): 493-498.
- [2] Talmadge JE. Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy [J]. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3(8): 1121-1143.
- [3] Tripathi AK, Ahmad R, Sawlani KK. Reversible leg ulcer due to hydroxyurea in a case of chronic myeloid leukemia [J]. *J Assoc Physicians India*, 2003, 51(10): 1014-1015.
- [4] Janssen JJ, Ossenkoppele GJ. Ulcers on the legs and feet: a seldom recognised side effect of hydroxyurea [J]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2003, 147(31): 1517-1520.
- [5] Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, *et al*. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(9): 645-652.
- [6] Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, *et al*. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study [J]. *Blood*, 2002, 99(6): 1928-1937.
- [7] Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, *et al*. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study [J]. *Blood*, 2002, 99(10): 3530-3539.
- [8] Lou FD, Lu XC. The early efficacy of imatinib in the treatment of 54 cases of chronic myeloid leukemia [J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2003, 42(8): 571-573.
- [9] Kreil S, Muller MC, Lahaye T, *et al*. Molecular and chromosomal mechanism of resistance in CML patients after STI571 (Gleevec) therapy [J]. *Blood*, 2001, 98(11): 435-435.
- [10] Gorre ME, Ellwood-Yen K, Chiosis G, *et al*. BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90 [J]. *Blood*, 2002, 100(8): 3041-3044.
- [11] Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, *et al*. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy [J]. *Leukemia*, 2002, 16(11): 2190-2196.
- [12] Hofmann WK, Komor M, Wassmann B, *et al*. Presence of the BCR-ABL mutation Glu255Lys prior to STI571 (imatinib) treatment in patients with Ph+ acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2003, 102(2): 659-661.
- [13] Nardi V, Azam M, Daley GQ. Mechanisms and implications of imatinib resistance mutations in BCR-ABL [J]. *Curr Opin Hematol*, 2004, 11(1): 35-43.
- [14] von Bubnoff N, Peschel C, Druyster J. Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Gleevec): a targeted oncoprotein strikes back [J]. *Leukemia*, 2003, 17(5): 829-838.
- [15] Branford S, Rudzki Z, Walsh S, *et al*. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph+ positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance [J]. *Blood*, 2002, 99(9): 3472-3475.
- [16] Donato NJ, Wu JY, Stapley J, *et al*. Imatinib mesylate resistance through BCR-ABL independence in chronic myelogenous leukemia [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 672-677.
- [17] Petzer AL, Gonsilious E, Hayes M, *et al*. Low concentrations of STI571 in the cerebrospinal fluid: a case report [J]. *Br J Haematol*, 2002, 117(3): 623-625.
- [18] Kantarjian HM, Talpaz M, O'Brien S, *et al*. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 2003, 101(2): 473-475.
- [19] Mohi MG, Boulton G, Gu TL, *et al*. Combination of rapamycin and pro

N-乙酰半胱氨酸治疗急性胰腺炎的研究进展

蔡笃雄(综述), 陈卫昌(审校)

(苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006)

关键词: 急性胰腺炎; N-乙酰半胱氨酸(NAC); 氧自由基; 细胞凋亡

中图分类号: R576

文献标识码: A

文章编号: 1006-2084(2005)01-0048-02

N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)作为谷胱甘肽的前体, 是一种含有巯基的抗氧化剂, 具有清除氧自由基、调节细胞的代谢活性, 预防 DNA 损伤、调整基因的表达和信号转导系统、抗细胞凋亡、抗血管生成、抑制恶性肿瘤发展等作用, 已较多用于呼吸、心血管、神经系统和抗 AIDS 的临床和实验中^[1]。近年, NAC 在急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的实验研究日益增多, 现将近年有关 NAC 治疗急性胰腺炎的实验研究进展综述如下。

1 NAC 治疗 AP 作用的机制

1.1 NAC 对氧自由基的清除作用 急性胰腺炎时胰腺微循环障碍, 由于胰腺缺血再灌注过程中中性粒细胞内的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶激活, 致使中性粒细胞“呼吸暴发”而产生大量的氧自由基(oxygen free radicals, OFR), 各种炎症介质趋化大量中性粒细胞, 同样通过“呼吸暴发”产生大量的氧自由基, 组织缺血、缺氧时从线粒体呼吸链中释放的氧自由基增多, 以及胰蛋白酶等激活黄嘌呤氧化酶, 进一步激活次黄嘌呤而产生大量氧自由基, 超过机体的清除能力, 导致氧自由基在体内的大量堆积。氧自由基与细胞膜内多价不饱和脂肪酸结合, 形成多种脂质过氧化物(LPO), 使细胞膜通透性增加, 并使 Ca^{2+} 大量内流, 线粒体和溶酶体被破坏, 最后导致细胞的死亡。另外, 氧自由基作用于含巯基的氨基酸, 还可以使蛋白质变性和失活。

NAC 进入体内迅速脱去乙酰基变为左旋半胱氨酸, 捕捉未配对电子, 阻止再灌注时中性粒细胞氧自由基的瞬间暴发。同时 NAC 可直接作用于过氧化氢(H_2O_2)生成 H_2O 和 O_2 , 还可清除超氧阴离子、羟自由基。

Urunuela 等^[2]通过结扎胰管(PDO)诱导急性大鼠胰腺炎模型, 并用二氢若丹明(dihydrorhodamine-123)荧光染色检测胰腺细胞内氧自由基, 发现大鼠急性胰腺炎在 6、12h OFR 显著升高, 表明急性胰腺炎早期即产生大量氧自由基。

1.2 NAC 对细胞的保护作用 AP 时由于氧自由基的消耗, 使 GSH 降低, NAC 能够提供巯基, 利用巯基灭活活性氧。GSH 在细胞内由甘氨酸、谷氨酸盐和硫醇提供的半胱氨酸合成。肝脏内能合成大量的 GSH, 但其他器官如肺和肾也有潜在的合成能力。外源性给予 NAC 后, NAC 能够进入细胞内部脱去乙酰基而形成 L-半胱氨酸, 从而以此方式促进体内 GSH 的合成, 发挥抗氧化作用。GSH 对稳定细胞膜及细胞器、稳定细胞

内重要生命大分子如酶和蛋白质具有重要作用。Demols 等^[3]用雨蛙素诱导小鼠 AP 模型, 发现胰腺炎 3h 后胰腺及肝脏 GSH 显著降低, NAC 预处理及治疗组均能增加胰腺 GSH 水平, NAC 预处理组还能提高肝脏 GSH 水平。

1.3 NAC 抑制 NF- κ B 的激活 核因子- κ B(NF- κ B)是 kel 转录调节蛋白家族成员之一, 是由包括 p50、p52、p65、C-rel、Rel β 五种亚单位组成的同源或异源二聚体, NF- κ B 调控多种与炎症有关细胞因子的转录, 并与机体免疫、炎症和细胞再生、凋亡等过程密切相关。研究表明, 在重症急性胰腺炎(SAP)时, NF- κ B 活化激活 IL-1、IL-6、TNF- α 等细胞因子的转录、合成, 促进细胞因子的大量生成。另外, NF- κ B 的过度活化致内皮细胞 E 选择素(E-selectin)、P 选择素(P-selectin)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)表达增加, 促使颗粒细胞在胰腺组织中积聚, 在组织中释放大量的细胞因子, 如 IL-1、IL-6、TNF- α 、IL-8、IL-10, 从而导致局部及全身的炎症反应。

NAC 能阻断 NF- κ B 的激活, 从转录水平上阻断细胞因子的合成, 减少大量细胞因子导致的全身炎症反应综合征(SIRS)及多器官功能衰竭(MOF), 从而改善 AP 的病情及预后。Hyeyoung 等^[4]用 PMA(4β -phorbol 12β -myristate 13α -acetate)预处理使中性粒细胞产生大量 H_2O_2 和脂质过氧化物(LPO), 发现胰腺组织 NF- κ B 的表达增加, 胰腺细胞内 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的 mRNA 表达显著增加, 运用抗氧化剂 NAC 及超氧化物歧化酶(SOD)能降低 LPO 水平, 抑制 NF- κ B 的激活, 使胰腺细胞内上述细胞因子的表达显著降低。Vaquero 等^[5]用牛磺胆酸逆行胰胆管注射制成 SAP 模型, 发现 SAP 时胰腺 NF- κ B 表达增加, 胰腺 IL-6、TNF- α 、KC(一种与 IL-8 相似的强效中性粒细胞趋化剂)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1) mRNA 表达显著增加, NAC 能显著降低 IL-6、TNF- α 、KC、MCP-1 mRNA 的表达, 改善胰腺局部的炎症反应。Gukovsky 等^[6]用雨蛙素诱导大鼠急性胰腺炎, 发现注入雨蛙素后 30min 内胰腺细胞内 NF- κ B 强烈表达, 在 3~6h NF- κ B 的激活达到第二高峰, IL-6 和 KC mRNA 的表达明显上调, NAC 通过阻断 NF- κ B 的激活, 使 IL-6、KC 的 mRNA 表达随之下调, 从而减轻胰腺的坏死程度, 改善 AP 的病情。大量实验表明, AP 时大量的氧自由基激活 NF- κ B, 而 NAC 通过抗氧化作用抑制 NF- κ B 的激活, 从而发挥抗炎效应。

1.4 NAC 减少钙超载 氧自由基(OFR)的释放可导致细胞内游离的钙突然升高, 促使黄嘌呤脱氢酶向氧化酶型转变, 增加超氧化物的来源。目前认为, OFR 对机体的损害可能起着一种扳机样作用, 钙超负荷是细胞损害的一条最终的共同途

tein tyrosine kinase (PTK) inhibitors for the treatment of leukemias caused by oncogenic PTKs [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101 (9): 3130-3135.

[20] Gorre ME, Ellwood-Yen K, Chiosis G, et al. BCR-ABL point mutants

isolated from patients with imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90 [J]. Blood, 2002, 100(8): 3041-3044.

收稿日期: 2004-06-01 修回日期: 2005-01-04