

去甲基化治疗在恶性血液病中的进展

郭婷婷 杨明珍

目前恶性血液病治疗以化疗为主,化疗药物的耐药导致疾病复发仍为治疗中的最大难题,并且化疗对骨髓及其他脏具有严重的毒副作用,限制了临床治疗效果及影响患者的生活质量。DNA高甲基化在恶性血液病中广泛存在,且具有潜在的可逆性,人们以此作为治疗的靶点,研究去甲基化药物治疗恶性血液病,并有望成为一种新的治疗途径。

一、DNA 甲基化概念

表观遗传学主要研究在 DNA 序列不变的情况下,转录前基因在染色质水平的结构修饰对基因功能产生影响,这种修饰可通过细胞分裂和增殖周期进行传递。DNA 甲基化异常是人类肿瘤中最常见的表观遗传学改变,在基因失活、基因印记、X 染色体失活、基因组内寄生序列的转录抑制等多个生物学过程中发挥重要功能^[1]。所谓基因的高甲基化,是指在 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMT)作用下,以 S-腺苷蛋氨酸作为甲基供体,将甲基转移到胞嘧啶的 5 位置上,形成 5-甲基胞嘧啶。人类基因组中,70%~90%散在于 DNA 中的 CpG 位点被甲基化修饰,而多数表达基因启动子内的 CpG 岛不发生甲基化,当肿瘤抑癌基因启动子区 CpG 岛发生异常高甲基化可以导致该基因表达沉默^[2]。

二、去甲基化治疗的作用机理

DNA 甲基化是 DNA 的生物修饰方式,与基因突变不同,它不会引起核酸的变化,是可以逆转的。所谓去甲基化治疗是利用药物清除启动子 CpG 岛区域的异常甲基化,使因高甲基化而沉默的抑癌基因重新表达,达到治疗肿瘤的目的。目前用于治疗或研究去甲基化药物主要分以下几类。

1. 胞苷类似物:如 5-氮杂胞苷(5-azacytidine)、地西他滨(5-aza-2 deoxycytidine, DAC)、5-氟-2'-脱氧胞嘧啶(5-fluoro-2'-deoxycytidine)及 Zebularine 等,其中以地西他滨为代表,大剂量具有细胞毒作用,小剂量诱导去甲基化作用,主要通过抑制 DNA 甲基转移酶,在 DNA 复制过程中,使甲基不能转移到胞嘧啶上,达到去甲基化作用。Flotho 等^[3]对三种去甲基化药物的对比研究发现:500 nmol/L 5-氮杂胞苷、50 nmol/L 地西他滨和 50 μmol/L Zebularine 分别体外作用于急性髓细胞白血病 Kasumi-1 细胞株,可产生与 10 nmol/L 阿糖胞苷等效的低毒性,细胞增殖能力均下降约 25%。进一步研究发现阿糖胞苷处理后细胞停滞在 S 期,而三种 DNMT 抑制剂均未引起细胞周期明显改变。药物对细胞凋亡的影响结果与细胞毒性程度高度一致,

细胞凋亡比例在此低浓度实验中不明显,且均未明显诱导粒细胞、单核细胞分化。药物对 DNA 甲基化程度和基因转录表达的影响:地西他滨具有明显的去甲基化作用,5-氮杂胞苷相对弱些,而等效细胞毒性浓度的 Zebularine 对实验所检测的基因甲基化程度均无影响,同时三种去甲基化药物对实验所检测的不同基因表达的调控不一致,且药物对基因表达调控的差异一定程度上与对 DNA 去甲基化作用的差异无相关性,例如某些基因发生了去甲基化,但基因表达未上调,相反某些基因表达上调,却未发生去甲基化。可见胞苷类似物的抗肿瘤机制仍需进一步深入研究。

2. 组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂:主要包括 TSA(trichostatin A)、depsipeptide、SAHA(suberoylanilide hydroxamic acid)、TPX(trapoxin)及丙戊酸钠(VPA)等。DNA 甲基化和组蛋白的去乙酰化这两种机制可能通过中介物甲基化 CpG 结合蛋白联系,共同调控基因的表达。使用 HDAC 抑制剂不仅可发挥与 DNMT 抑制剂类似的去甲基化作用,而且能促进组蛋白乙酰化,使染色质结构疏松利于转录,对沉默基因的再表达有协同作用。

3. 三氧化二砷(As₂O₃):Mass 等^[4]报道,砷剂能改变人类肺癌细胞株 p53 基因的高甲基化状态,并提出了砷剂扰乱甲基化模式致癌的模式:(1)砷剂作为酶抑制剂,部分或选择性地抑制腺苷甲硫氨酸的甲基转移酶,从而降低甲硫氨酸的利用率。(2)砷剂消耗腺苷甲硫氨酸的甲基而被解毒,引起细胞内缺甲基状态,致使甲基化模式不稳定,导致去甲基化。同时研究发现在人类多发性骨髓瘤细胞株和淋巴瘤细胞株中,As₂O₃可以逆转 p16、Id4 及 SHP-1 基因高甲基化状态和诱导其重新表达^[5-7],为我们提供了去甲基化药物治疗恶性血液病的新思路。

4. 雷公藤:国内外的研究证实雷公藤内酯醇具有抗肿瘤作用,它在体外通过降低 DNA 甲基转移酶表达去除抑癌基因的甲基化状态,恢复基因转录和蛋白表达,抑制肿瘤细胞增殖。同时雷公藤能诱导多种肿瘤细胞的凋亡,例如小剂量雷公藤作用于人类 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞株,可使 DNMT3A、DNMT3B 表达明显下降,诱导抑癌基因 APC 去甲基化,恢复该基因正常表达,进一步调节 Wnt 信号转导,诱导细胞凋亡^[8]。

5. 设计适当的反义核苷酸探针也可以通过抑制甲基转移酶活性起到去甲基化作用。还有一些作用机制尚未明确的药物如抗高血压药苯吡啶、抗心律失常药普鲁卡因胺、局部麻醉药普鲁卡因及天然植物碱苯乙基异硫氰酸盐等均可用于 DNA 去甲基化抗肿瘤的治疗。

三、恶性血液病的去甲基化治疗

1. 急性髓细胞白血病(AML):DNA 高甲基化在 AML

中广泛存在, Melki 等^[9]发现 AML 中常见的甲基化基因有 8 种, 约 95% AML 患者至少有一种基因高度甲基化, 75% 至少两种高度甲基化。目前 DAC 为研究较明确的去甲基化药物, 由于其相对低的非血液学毒性, DAC 成为老年及不适宜大剂量化疗的 AML 患者最具潜力的药物, 常用的治疗方案为 $20 \text{ mg/m}^2 \times 5 \text{ d}$ 。II 期临床实验表明: 55 位初治的老年 AML 患者接受 DAC ($20 \text{ mg/m}^2 \times 5 \text{ d}$, 每 4 周一疗程) 治疗, 完全缓解 (CR) 率为 24%, 中位生存期为 7.7 个月^[10]。另一项研究示: 当老年患者初次治疗方案为 DAC $20 \text{ mg/m}^2 \times 10 \text{ d}$, 之后巩固治疗方案仍为 4~5 d, 结果 CR 率升至 47%, 中位生存期升至 12.7 个月^[11]。一项 III 期临床试验示: 65 岁以上的初治老年 AML 患者中, 实验组接受 DAC ($20 \text{ mg/m}^2 \times 5 \text{ d}$, 每 4 周一疗程) 治疗, 对照组接受支持治疗或低剂量阿糖胞苷 ($20 \text{ mg/m}^2 \times 10 \text{ d}$, 每 4 周一疗程) 治疗, 其中位生存期分别为 7.7 个月和 5 个月 ($P=0.108$), CR 率分别为 17.8% 和 7.8% ($P=0.001$)^[12]。就生存期而言, 目前临床 II、III 试验均未明确证实 DAC 常用的方案 ($20 \text{ mg/m}^2 \times 5 \text{ d}$, 每 4 周一疗程) 治疗老年 AML 患者明显优于支持治疗或小剂量阿糖胞苷疗法, 而 CR 率相对升高^[13]。

已有研究报道 DAC 结合其他药物治疗 AML 患者有效, 但由于样本量较少及异质性, 尚未得出一致的结论, 可以总结以下几点: I 期临床试验证实 DAC ($20 \text{ mg/m}^2 \times 5 \text{ d}$) 结合 HDAC 抑制剂 vorinostat ($400 \text{ mg/d} \times 7 \sim 14 \text{ d}$), 口服治疗初治和复发或难治的 AML 患者有效率分别为 36% 和 8%^[14]。Almstedt 等^[15]发现编码免疫原性蛋白 CTAs 基因 (NY-ESO-1, MAGEA1, MAGEA3 和 MAGEB2) 在许多 AML 细胞株中低表达或缺失, 利用 DAC 处理后, 4 种基因表达均出现一致的再活化, 并呈时间和剂量依赖, 其中 DAC 处理诱导表达的 NY-ESO-1 蛋白被处理及提呈, 使细胞株易受 CD8^+ T 细胞对特异抗原的识别影响, 启发了对 DAC 结合特定的免疫疗法的研究。已有研究表明: DAC 结合抗 CD33 的吉妥珠单抗奥唑米星 (Gemtuzumab ozogamicin) 治疗 12 位复发或难治的 AML 患者, 给药方案为: DCA $20 \text{ mg/m}^2 \times 5 \text{ d}$, 吉妥珠单抗奥唑米星 3 mg/m^2 , d_6 、 d_9 、 d_{12} , 患者 CR 率为 42%, 其中四位患者治疗后的 7~16 个月仍然存活^[16]。

研究证实某些分子学、细胞遗传学指标与患者对 DAC 的反应有关。Blum 等^[11]发现对 DAC 具有反应患者的 miR-29b 水平明显高于对 DAC 无反应的患者, 且差异有统计学意义。一项回顾性分析显示: 伴有 5 和 7 号染色体异常 (排除 5q 异常) 的患者对 5-氮杂胞苷或 DAC 的反应与大剂量化疗相似, 并且持续缓解时间 (45 周 vs. 23 周) 和中位生存期 (9 个月 vs. 5 个月) 优于大剂量化疗^[17]。DNMT3A 基因突变为 AML 独立的预后不良指标, 不受患者年龄、白细胞数、染色体组型和其他遗传学标记的影响^[18]。Metzeler 等^[19]发现 DNMT3A 突变型患者的 CR 率为 75%, DNMT3A 野生型患者 CR 率为 34% ($P=0.05$), DNMT3A 突变型和野生型患者的中位生存期分别为 15.2 个月和 11 个月, 但差异无显著意义。可见, 利用细胞遗传学及分子学指标来预测患者对去甲基化药物的反应, 有利于实现特定患者的特异性靶向治疗。

2. 慢性髓细胞白血病 (CML): 伊马替尼是一种酪氨酸激酶抑制剂, 为治疗 CML 的临床一线用药, 然而, 越来越多的病例出现对伊马替尼耐药, 主要由于 BCR-ABL 融合蛋白的某个或多个氨基酸突变, 导致伊马替尼不能与三磷酸腺苷 (ATP) 结合位点结合。随着 CML 的疾病进展, 肿瘤高甲基化基因 1 (HIC1)、雌激素受体 (ER) 基因和酪氨酸蛋白激酶 (ABL1) 基因等甲基化水平也随之上升, 逆转 DNA 甲基化水平已成为一项新的靶向治疗。Kantarjian 等^[20]利用 DAC 50、75、100 mg/m^2 三种剂量治疗 CML 患者, 结果急变期 64 例中有 18 例获得疗效, 有效率为 28%, 加速期的 51 例中有 28 例获得疗效, 有效率为 55%, 慢性期的 8 例中有 5 例获得疗效, 7 例 Ph 阴性患者中 4 例获得疗效。Issa 等^[21]对格列卫耐药或不能耐受的 CML 患者 (12 例 CP, 17 例 AP, 6 例 BP) 用 DAC $15 \text{ mg/m}^2 \times 5$ 次/周, 共 2 周, 结果总血液学疗效 65% (CP 83%, AP 59%, BP 50%), 其中完全血液学反应率 34%, 部分血液学反应率 20%, 血液学改善率 11%, 总体细胞遗传学反应率 46%, 中位数有效时间为 3~5 个月。Oki 等^[22]对格列卫耐药的 CML AP 及 BP 患者联合 DAC 治疗, 方法是格列卫 600 mg/d , DAC $15 \text{ mg/m}^2 \times 5 \text{ d/周}$, 连用 2 周, 每 6 周为一疗程, 结果 BCR-ABL 激酶区突变阴性的患者血液学反应率高于阳性患者 (53% vs. 14%), 血液学反应中位持续时间为 18 周。同时对 DNA 甲基化分析显示: 治疗第 5 天甲基化水平由 $71.6\% \pm 0.9\%$ 降至 $60.4\% \pm 2.0\%$, 治疗第 12 天降至 $60.5\% \pm 1.8\%$, 外周血恢复时又回至 $68.8\% \pm 1.4\%$ 。故 DAC 可作为不能选择 Allo-HSCT 或其他酪氨酸激酶抑制剂治疗 CML 的一种选择。

3. 骨髓增生异常综合征 (MDS): 目前 MDS 的主要治疗手段仍为对症支持疗法, 一旦进展为急性白血病, 则预后很差。许多研究均表明约 50% 的 MDS 患者存在抑癌基因 p15、Dab2、ID4 等甲基化^[23-24], 且中危组-2/高危组患者基因甲基化频率明显高于中危组-1/低危组, 为 MDS 患者的独立预后因素, 具有向白血病转化的风险增高。由于 DNA 甲基化与 MDS 进展及预后密切相关, 去甲基化疗法被认为可能是一种极有前途的治疗手段。

5-氮杂胞苷治疗 MDS 患者在延长生存时间上有其明显的优势, 可作为中高危组 MDS 患者的重要治疗选择, 尤其是不能耐受化疗方案的老年患者。目前美国 FDA 推荐的 5-氮杂胞苷治疗方案: $75 \text{ mg/m}^2 \times 7 \text{ d}$, 每 28 d 为 1 个疗程, 至少连续用 4 个疗程^[25]。DAC 与 5-氮杂胞苷在作用机制和生化特点上比较类似, 但在体外去甲基化作用上 DAC 优于 5-氮杂胞苷 30 倍以上, 因此 DAC 在治疗 MDS 上可能体现出毒性低和应用剂量低的优势。国内研究^[26-27]认为 DAC 治疗中、高危 MDS 患者的临床疗效的评判至少应在两个疗程以上, 15 例中、高危 MDS 患者中达到 CR 2 例 (13%), PR 5 例 (33%), 虽然 8 例患者未到达骨髓缓解, 第 2 疗程后有部分患者转为白血病, 但从临床上可以看出几乎所有患者输血次数减少, 生活质量明显提高, 并且随着疗程增加 CR 率也增加。同时患者治疗前 DNA 甲基化水平均较高, 1 个疗程后仅有 2 例患者甲基化水平下降, 2 个疗程后 13 例患者甲基化水平明显下降, 3 个疗程后部分患者的甲基化

水平又恢复至治疗前水平。目前对 5-氮杂胞苷和 DAC 治疗效果比较尚无定论,但对 5-氮杂胞苷治疗无效或失败的患者改用 DAC 治疗,其中 36% 获得了反应(CR 率 21%),但甲基化分析显示 DAC 治疗后反应和无反应患者中低甲基化状况没有差别。这一方面说明了 DAC 去甲基化作用可能优于 5-氮杂胞苷,另一方面提示了 DAC 发挥作用不仅仅局限于去甲基化,可能会有更复杂的分子机制^[28]。

针对去甲基化药物的安全性,有研究^[29]显示:在初次接受 DCA 治疗时具有正常核型的患者中进行连续的染色体核型分析,结果显示 20% 患者在随访期间出现染色体异常,其中主要为整条染色体的增加或缺失。染色体演变的发生率和模式并没有高于未接受特殊治疗的 MDS 患者,与疾病自然病程相比,研究并未证明给予小剂量 DCA 治疗增加了染色体损害。可见缺乏证据证明 DNA 去甲基化药物诱导 MDS 患者染色体不稳定。Garcia-Manero^[30]回顾数百例 5-氮杂胞苷和 DAC 治疗的 MDS 和 AML 患者,也未发现增加了细胞遗传学异常和继发性肿瘤,但仍需要长时间的随访来关注这个问题。

综上所述,随着 DNA 甲基化异常在肿瘤中的深入研究,去甲基化药物为恶性血液病的治疗提供了新希望。目前药物去甲基化的机制及去甲基化以外的抗肿瘤作用仍需要进一步探索,同时就给药方式、剂量、单一或联合用药等需要更多临床验证去验证,力求寻找最佳治疗方案。研究中人们主要集中在抑癌基因高甲基化导致的基因沉默上,但不能忽视全基因组的低甲基化及基因的选择性问题,已有研究发现去甲基化药物在抗肿瘤同时能增加实体肿瘤浸润、转移的危险性,在恶性血液病中暂未发现继发第二肿瘤及引起染色体不稳定等证据,但仍需要继续开展大规模的临床试验来验证药物安全性和有效性。同时发现某些分子学、细胞遗传学等指标与患者对去甲基化药物的反应有关,如何使去甲基化治疗更具特异性和靶向性,尽可能降低对其他方面的负面影响是今后去甲基化治疗研究的目标,并将进一步指导临床抗肿瘤靶向治疗。

参 考 文 献

- [1] Matarazzo MR, De Bonis ML, Strazzullo M, et al. Multiple binding of methyl-CpG and polycomb proteins in long-term gene silencing events. *J Cell Physiol*, 2007, 210: 711-719.
- [2] Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine*, 2003, 349: 2042-2054.
- [3] Flotho C, Claus R, Batz C, et al. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 2009, 23: 1019-1028.
- [4] Mass MJ, wang L. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutation Research*, 1997, 368: 263-277.
- [5] 傅海英, 沈建箴, 沈松菲, 等. 巢式 MSP 检测神剂诱导人多发性骨髓瘤 U266 细胞系 p16 基因去甲基化及转录. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15: 79-85.
- [6] Yang L, Luo JM, Wen SP, et al. Effect of As2O3 on demethylation of SHP-1 gene in human lymphoma cell line T2. *Chinese Journal of Cancer*, 2009, 28: 209-213.
- [7] 曲凡, 赵春华. Raji 细胞 Id4 基因甲基化检测及 As3O2 对其甲基化影响的研究. *中华血液学杂志*, 2010, 31: 821-825.
- [8] 吴雪梅, 沈建箴, 喻爱芳, 等. 雷公藤内酯醇对急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞系 APC 基因去甲基化诱导表达机制的研究. *白血病·淋巴瘤*, 2009, 18: 327-330.
- [9] Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. *Cancer research*, 1999, 59: 3730-3740.
- [10] Cashen AF, Schiller GJ, O'Donnell MR, et al. Multicenter, phase II study of decitabine for the first-line treatment of older patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, 28: 556-561.
- [11] Blum W, Garzon R, Klisovic RB, et al. Clinical response and miR-29b predictive significance in older patients treated with a 10-day schedule of decitabine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 7473-7478.
- [12] Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, et al. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2012, 30: 2670-2677.
- [13] Marks PW. Decitabine for acute myeloid leukemia. *Expert review of anticancer therapy*, 2012, 12: 299-305.
- [14] Kirshbaum M, Gojo I. Vorinostat in combination with decitabine for the treatment of relapsed or newly diagnosed acute myelogenous leukemia(AML) or myelodysplastic syndrome(MDS): a Phase I dose-escalation study. *Blood*, 2009, 114: 824-825.
- [15] Almstedt M, Blagitko-Dorfs N, Duque-Afonso J, et al. The DNA demethylating agent 5-aza-2-deoxycytidine induces expression of Y-ESO-1 and other cancer/testis antigens in myeloid leukemia cells. *Leukemia Research*, 2010, 34: 899-905.
- [16] Chowdhury S, Seropian S, Marks PW. Decitabine combined with fractionated gemtuzumab ozogamicin therapy in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*, 2009, 84: 599-600.
- [17] Ravandi F, Issa JP, Garcia-Manero G, et al. Superior outcome with hypomethylating therapy in patients with acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome and chromosome 5 and 7 abnormalities. *Cancer*, 2009, 115: 5746-5751.
- [18] Hou HA, Kuo YY, Liu CY, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*, 2012, 119: 559-568.
- [19] Metzeler KH, Walker A, Geyer S, et al. DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2011, 26: 1106-1107.
- [20] Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, et al. Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 2003, 98: 522-528.
- [21] Issa JP, Byrd JC. Decitabine in chronic leukemias. *Semin Hematol*, 2005, 42: S43-S49.
- [22] Oki Y, Kantarjian HM, Gharibyan V, et al. Phase II study of low-dose decitabine in combination with imatinib mesylate in patients with accelerated or myeloid blastic phase of chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 2007, 109: 899-906.
- [23] Yang Y, Zhang Q, Xu F, et al. Aberrant promoter methylation of Dab2 gene in myelodysplastic syndrome. *European Journal of Haematology*, 2012, 89: 469-477.
- [24] 王虹, 杨永臣, 王小钦, 等. ID4 基因甲基化检测在判断骨髓增生异常综合征患者临床预后中的价值. *中华血液学杂志*, 2010, 31: 344-346.
- [25] 许峰, 李晓. 骨髓增生异常综合征表观遗传学治疗进展. *白血病·淋巴瘤*, 2009, 18: 690-693.
- [26] 邵秀茹, 梁红, 关晓军, 等. 地西他滨治疗中高危骨髓增生异常综合征患者的临床研究. *中华血液学杂志*, 2011, 32: 789-791.

- [27] 刘真真, 何广胜. 地西他滨治疗骨髓增生异常综合征的临床现状. 国际输血及血液学杂志, 2011(5):319-322.
- [28] Borthakur G, Ahdab SE, Ravandi F, et al. Activity of decitabine in patients with myelodys-plastic syndrome previously treated with azacitidine. Leuk Lymphoma, 2008, 49: 690-695.
- [29] Haas PS, Wijermans P, Verhoef G, et al. Treatment of myelodysplastic syndrome with a DNA methyltransferase inhibitor: lack of evidence for induction of chromosomal instability. Leukemia research, 2006, 30: 338-342.
- [30] Garcia-Manero G. Modifying the epigenome as a therapeutic strategy in myelodysplasia. ASH Education Program Book, 2007, 2007: 405-411.
- (收稿日期: 2013-06-20)
(本文编辑: 梁雷)
- 郭婷婷, 杨明珍. 去甲基化治疗在恶性血液病中的进展 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013,7 (15): 7176-7179.

