



巯嘌呤甲基转移酶基因 单核苷酸多态性与 急性白血病

◀ 巯嘌呤耐受性关系研究 ▶ — 马晓莉 著



黄河出版传媒集团
阳光出版社

QIUPIAOLING JIAJI ZHUANYIMEI JIYIN
DAN HEGANSUAN DUOTAIXING YU JIXING BAIXUEBING
QIUPIAOLING NAISHOUXING GUANXI YANJIU



淘宝书店

责任编辑

申 佳

装帧设计



舞文·弄墨 / 赵 倩

ISBN 978-7-5525-7170-7



9 787552 571707 >

定价：68.00元

巯嘌呤甲基转移酶基因单核苷酸多态性与 急性白血病巯嘌呤耐受性关系研究

马晓莉 ● 著



黄河出版传媒集团
阳光出版社

图书在版编目(CIP)数据

巯嘌呤甲基转移酶基因单核苷酸多态性与急性白血病
巯嘌呤耐受性关系研究 / 马晓莉著. — 银川: 阳光出
版社, 2023.11

ISBN 978-7-5525-7170-7

I. ①硫… II. ①马… III. ①小儿疾病-血液病-文
集②小儿疾病-肿瘤-文集 IV. ①R725.5-53②R73-53

中国国家版本馆 CIP 数据核字(2023)第 242010 号

巯嘌呤甲基转移酶基因单核苷酸多态性 与急性白血病巯嘌呤耐受性关系研究

马晓莉 著

责任编辑 申 佳

特邀编辑 贺思豆 郑晓敏

封面设计 赵 倩

责任印制 岳建宁



黄河出版传媒集团 出版发行
阳光出版社

出 版 人 薛文斌

地 址 宁夏银川市北京东路 139 号出版大厦 (750001)

网 址 <http://www.ygchbs.com>

网上书店 <http://shop129132959.taobao.com>

电子信箱 yangguangchubanshe@163.com

邮购电话 0951-5047283

经 销 全国新华书店

印刷装订 宁夏凤鸣彩印广告有限公司

印刷委托书号 (宁)0027958

开 本 720 mm × 980 mm 1/16

印 张 20.25

字 数 300 千字

版 次 2023 年 11 月第 1 版

印 次 2023 年 12 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-5525-7170-7

定 价 68.00 元

版权所有 翻印必究



作者简介

马晓莉，主任医师，教授，博士生导师，曾任中华医学会儿科学分会肿瘤学组组长、国家卫生健康委儿童恶性肿瘤（实体肿瘤）专家委员会副主任委员、中国抗癌协会小儿肿瘤专业委员会常务委员、中国研究型医院学会儿童肿瘤专业委员会常务副主任委员等。1985年大学毕业，之后师从我国儿童血液肿瘤学开创者、中国工程院院士胡亚美教授攻读硕士及博士。2002年7月博士毕业，从事儿童血液肿瘤临床、科研及教学工作。2006年创建北京儿童医院血液肿瘤中心实体瘤专业组，担任组长。2012年任国家儿童医学中心、北京儿童医院血液肿瘤中心副主任。2021年任肿瘤内科主任。

晓风长清远 茉莉永存香

——纪念全体儿童医学工作者的亲密战友马晓莉教授



大医晓莉，仁者童行。我亲密的战友、原国家儿童医学中心、北京儿童医院肿瘤内科主任医师、教授、博士生导师马晓莉同志永远地离开我们已有一年多了。她的家人收集了她生前的部分著述，整理成集，是对这位毕生热爱儿童医学事业的专家学者很好的纪念。她的爱人请我为该书作序，这之于我，是一项荣幸而沉重的任务，让我重新打开记忆的瀚海，追思和缅怀这位可钦可敬的昔日战友……

十年医海路，一生战友情。和晓莉教授结缘，始于2012年我到北京儿童医院任职，从此我们并肩工作，致力于儿童肿瘤医学事业发展进步。她的专业品格和敬业精神、她对儿童肿瘤医学的热爱以及她对广大患儿慈母般的关爱呵护，让我对她格外敬重。在一起耕耘奋斗的医学路上，我们建立了

深厚的友谊，也因此成为无比真挚的同事、伙伴、战友和知己。

在我和同道心中，她是儿童健康和儿童医学事业忠诚的追随者。1985年参加工作即投身儿科事业，一直沿着我国儿童血液肿瘤学开创者、中国工程院院士胡亚美教授的方向，致力于儿童实体肿瘤疾病的医疗、教学、科研和国际交流工作，毕生奋斗求索、救死扶伤、教书育人、笔耕不辍，有生之年从未停歇。

在我和同道心中，她是我国儿童实体肿瘤疾病诊治领域的先行者和引领者。她曾担任中华医学会儿科学分会肿瘤学组组长、国家卫生健康委儿童恶性肿瘤（实体肿瘤）专家委员会副主任委员、中国抗癌协会小儿肿瘤专业委员会常务委员、中国研究型医院学会儿童肿瘤专业委员会常务副主任委员等学术要职，主持国家和省部级科研项目，以及儿童实体肿瘤多中心临床研究与临床试验项目数十项，发表高水平学术论著百余篇，参与编写《诸福棠实用儿科学》《胡亚美实用儿童血液与肿瘤学》等著作重要章节，让先进的儿童医学技术发展、传播，为亿万儿童健康带来福音。

在我和同道心中，她是儿童实体肿瘤疾病规范化诊治模式的探索者和实证者。她20年如一日，坚持坚毅，勤求博采，耕耘开拓，让我国儿童恶性肿瘤研究诊治水平快速提升；她有效利用MDT诊疗模式，整合优势资源，实现儿童实体肿瘤多学科联合高质量精准诊疗，在国内率先开展细胞靶向和

免疫等新疗法；她开创的以多分子病理综合诊断技术为模式的微小残留病监测评价体系，极大地提高了神经母细胞瘤患儿的生存率，让我国儿童恶性肿瘤医疗和研究水平迈进国际前列；她主持的《中国儿童及青少年横纹肌肉瘤诊疗建议（CCCG-RMS-2016）》《中国抗癌协会肿瘤整合诊治系列指南——儿童及青少年横纹肌肉瘤》《疑似神经母细胞瘤识别及转诊指南》《中国儿童胸膜肺母细胞瘤诊疗建议》以及参与编写的国家卫生健康委儿童恶性肿瘤 14 个病种诊疗规范，为我国儿童肿瘤规范化诊治的全国性推广奠定了坚实基础。

在我和同道心中，她是儿童医学教育事业的躬行者和推动者。她言传身教、立行立德，培养优秀博士研究生、硕士研究生、本科生以及临床骨干和青年医生百余人，桃李芬芳，誉满杏林；她在教学实践中不断总结传承、创新发展，始终坚持狠抓教学质量、改进教学模式、升华教学艺术、提高教学成效，让枯燥的医学课堂更加引人入胜，学生们为之津津乐道，青年们因而逐梦前行。

在我和同道心中，她是同事最亲密的战友，是患者最信赖的倚靠，是学界最敬业的园丁，是业内最仁爱的天使……

晓莉教授离开了我们，她是值得我们永远纪念的。她不曾从这个世界带走什么，却留给这个世界许多——摆脱疾病重返健康的儿童，启迪临床发展的专业论著，指导我们业务的医疗指南，还有这部经她的家人收集整理而成，倾注和凝聚了她重要思想智慧与情怀心血的科学著述。

晓莉教授离开了我们，她是值得我们永远尊敬的。她是我国医疗界的一汪清泉，是学术界的一溪清流，是卫生战线的一缕清风，是儿童医学的一韵清香，她是我国医疗卫生领域的正能量。

塞上有骄子，医界存仁心。我们永远怀念晓莉教授！我想，最好的怀念，莫过于我们儿童医学全体同仁秉承她之精神，赓续她之夙愿，众志成城，守护童心，不断把祖国儿童医学事业和儿童健康工程推向前进，让医疗卫生精神在建设健康中国、以中国式现代化实现中华民族伟大复兴进程中贡献磅礴力量。

晓风长清远，茉莉永存香。愿民无疾苦，幸福享安康。

让我们永远记住这位儿童医学专家，我们敬爱的战友——马晓莉教授。大医精诚，仁心永存！

（倪鑫，国家儿童医学中心主任，首都医科大学附属北京儿童医院院长）

目 录

CONTENTS

巯嘌呤甲基转移酶基因单核苷酸多态性与急性白血病巯嘌呤耐
受性关系研究 / 001

6-MP 细胞药理学研究对儿童急淋白血病个体化治疗的指导
作用 / 100

儿童横纹肌肉瘤的精准治疗：从简单的基因检测到复杂的个体
化治疗 / 145

6-巯基嘌呤治疗儿童急性淋巴细胞白血病研究进展 / 153

巯嘌呤甲基转移酶基因多态性位点与白血病巯嘌呤耐受性
关系 / 160

巯嘌呤甲基转移酶基因的单核苷酸多态性与儿童急淋白血病
/ 169

6-巯基嘌呤细胞药理学研究对急性淋巴细胞白血病治疗的指导
作用 / 175

表观遗传学与儿童神经母细胞瘤关系的研究进展 / 183
DICER1 综合征与儿童恶性实体瘤关系的研究进展 / 193
儿童胸膜肺母细胞瘤的诊治研究进展 / 203
儿童及青少年胸部软组织肉瘤的临床特征及预后分析 / 213
C-PEB 方案联合手术治疗儿童恶性生殖细胞瘤 3 例并文献 复习 / 222
单中心 458 例高危神经母细胞瘤患儿临床特征及预后分析 / 226
Ⅳ期高危神经母细胞瘤患儿局部放疗疗效分析 / 236
伴骨髓转移的高危神经母细胞瘤患儿临床特征及预后分析 / 244
伴头面部软组织转移神经母细胞瘤患儿临床特征及近期疗效分析 ——单中心 10 年诊治总结 / 257
单中心 116 例婴幼儿神经母细胞瘤临床特征及预后分析 / 269
神经母细胞瘤高危儿童筛查及其方案研究进展 / 283
神经母细胞瘤患儿初诊时细胞因子水平与骨转移关系研究 / 290
神经母细胞瘤患儿应用铂类药物毒性反应监测及其与药物基因 多态性关联性研究 / 303
后记 / 314

巯嘌呤甲基转移酶基因单核苷酸多态性与急性白血病 巯嘌呤耐受性关系研究

马晓莉

英文缩略语表

ALL(acute lymphoblastic leukemia)	急性淋巴细胞白血病
Allele specific PCR	位点特异性 PCR
AML(acute myeloblastic leukemia)	急性髓系白血病
AZA(azathioprine)	巯唑嘌呤
DHPLC(denaturing high-performance liquid chromatography)	变性高效液相色谱分析
DMSO	二甲基亚砷
HGPRT(hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase)	次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶
HPLC(high-performance liquid chromatography)	高效液相色谱分析
6-MeMP(6-methylmercaptopurine)	6-甲基巯嘌呤
6-MP(6-mercaptopurine)	6-巯基嘌呤
SAM(S-adenol-L-methionine)	S-腺苷蛋氨酸
SNP(single nucleotide polymorphisms)	单核苷酸多态性
SSCP(single-strand conformational polymorphism)	单链构象多态性
6-TGN(6-thioguanine nucleotide)	6-巯嘌呤核苷酸

6-TG(6-thioguanine)

6-硫鸟嘌呤

6-TIMP(6-thioinosine monophosphate)

6-硫嘌呤单核苷酸

TPMT(thiopurine methytransferase)

硫嘌呤甲基转移酶

XO(xanthine oxidase)

黄嘌呤氧化酶

中文摘要

研究背景

联合化疗的应用使得急性白血病患者无病生存率有了明显的提高,但个体间化疗药物的效应差异很大。许多证据表明,一些基因的单核苷酸多态性(SNP)显著影响化疗药物的代谢过程及其清除率,使个体间药物的代谢有一定差异,从而影响药物的治疗效应。6-巯基嘌呤(6-MP)是急性白血病患者维持治疗的核心药物之一,与其他硫嘌呤类药物6-硫鸟嘌呤(6-TG)和硫唑嘌呤(AZA)均为无活性的药物前体,在体内需要代谢为具有细胞毒活性的硫嘌呤核苷酸(6-TGN)才能发挥抗白血病作用。硫嘌呤甲基转移酶(TPMT)是其代谢过程的关键酶之一,能特异地将6-MP甲基化为甲基硫嘌呤(6-MeMP),从而影响6-TGN的形成。TPMT具有遗传多态性,TPMT缺乏的急性白血病患者,用标准剂量的6-MP可能会导致严重的毒副作用,而过高的TPMT活性会减少6-TGN的形成,对6-MP的标准剂量的疗效不好。

目前,已经克隆的TPMT基因全长34 KB,约含30个SNP。其中TPMT基因第5外显子G238C、第7外显子G460C和第10外显子A719G为3个SNP的热点。已发现的等位基因有8种,其中TPMT*1为野生型。变异的等位基因均为序列上单个核苷酸的不同,即SNP。80%~95%变异的等位基因是TPMT*2(G238C)、TPMT*3A(G238C、A719G)和TPMT*3C(A719G)。不同种族TPMT等位基因的频率不同,而且类型也有差异。TPMT*2、TPMT*3A和TPMT*3C等与其产物的活性(酶活性)有关,可使TPMT活性降低100~200倍。另外,TPMT基因启动子区的序列变异也可能影响基因产物的活性。

我们的前期临床研究表明,在急性白血病患者中,个体间口服 6-MP 的耐受性差异很大。一些患者口服 6-MP 标准剂量、全疗程对 6-MP 耐受性好,一般不出现粒细胞减少;另一些患者对 6-MP 治疗敏感,短期内出现粒细胞减少,需要多次调整 6-MP 剂量以避免严重的毒性反应。因此 6-MP 的标准剂量不一定是患者的最大耐受量,一些患者治疗失败的原因可能为剂量不当所致。个体间药物代谢的差异会显著影响其治疗效应以及毒性反应发生的危险性。

目的

本课题根据以上资料和我院前期研究结果,确定 TPMT 基因的 SNP 与急性白血病患者巯嘌呤耐受性的关系作为主要研究内容。通过对 TPMT 基因 SNP 的检测,明确中国汉族人群 TPMT 基因多态性的分布规律;研究 TPMT 基因型与其产物活性的关系;分析 TPMT 基因型对急性白血病患者 6-MP 治疗效应和毒性反应的影响,为根据不同基因型群体对药物的反应来改进治疗方案提供依据,以提高急性白血病患者巯嘌呤类药物治疗的有效性和安全性。并以此为基点逐步进行多种药物药理遗传学研究,完善急性白血病联合化疗的个体化用药。在实验过程中,探讨 SNP 检测的方法学,比较几种方法的可信度、可行性及其优劣,希望能找到相对灵敏、快捷、经济并适于临床的 SNP 检测方法。

方法

① 应用以 PCR 为基础的位点特异性 PCR、限制性内切酶消化、变性高效液相色谱分析(DHPLC)和 SNaPshot 定点的序列分析 4 种方法并结合 DNA 直接测序,检测 250 例健康成人、100 例脐血和 280 例急性白血病患者 TPMT 基因第 5 外显子 G238C、第 7 外显子 G469A 和第 10 外显子 A719G 的 3 个 SNP 位点以及 TPMT 启动子 A-91G 和 T-168G 的 2 个 SNP 位点。

② 应用高效液相色谱分析技术(HPLC)测定所研究的健康成人、脐血和急性白血病患者红细胞内 TPMT 活性,其检测的基础是 6-MP 在非放射性 S-腺苷蛋氨酸(SAM)作为甲基供体的情况下,经 TPMT 甲基化为 6-MeMP。

③ 根据 160 例急性白血病患者 TPMT 基因型及其产物活性的检测结果,分

析 TPMT 基因型与急性白血病患者 6-MP 耐受性的关系。

结果与讨论

① 中国汉族人群 TPMT 基因外显子区的多态性频率低。通过对所研究人群的 DNA 标本应用上述 4 种方法检测 TPMT 基因的 5 个 SNP 位点,并经 DNA 直接测序证实。结果表明,以北京地区健康成人和脐血为代表的中国汉族人群上述 TPMT 基因外显子区的 3 个位点的多态性频率为 3.4%(12/350 例),远低于白种人(7.4%~13.6%)和黑种人(10.9%~14.4%)。变异的位点为第 10 外显子 719AG,即变异的等位基因为 TPMT*3C,且均为杂合变异,未发现纯合变异。未检测到变异的等位基因 TPMT*2 和 TPMT*3A。TPMT 基因启动子区也未发现多态现象,与国外报道的在此区-168 和-91 处野生型为 T 和 A 不同,85/85 例 TPMT 启动子区-168 和-91 均为 G,即 TPMT 启动子区-168G 和-91G 为中国人的野生型。

② TPMT 基因的 SNP 检测需要几种方法相互引证。为了增加 TPMT 基因 SNP 检测的可靠性,我们采用了以 PCR 为基础的 4 种方法。其中位点特异性 PCR 不能很好地区分 TPMT 基因外显子区的变异位点,不能用于此区 SNP 的检测。上述 TPMT 外显子区 3 个 SNP 位点均有限制性内切酶谱的变化,应用 BsiYI、MwoI 和 AclI 分别消化 TPMT 第 5、7 和 10 外显子区的 PCR 产物,并且 3 个位点各 10 例经 DNA 直接测序印证,符合率均为 100%。TPMT 启动子区的 2 个 SNP 无限制性内切酶谱的变化,需采用其他方法检测。DHPLC 能准确而迅速地检测 TPMT 基因第 5 和 10 外显子区的 SNP,结果与酶切和 DNA 测序的一致率均为 100%。但 DHPLC 在检测 TPMT 第 7 外显子区的 SNP 时,杂合峰出现率限高(34%),DNA 直接测序证明为假阳性,即 DHPLC 不适于这一位点的检测,可能与此区 DNA 的空间构象有关。应用 SNaPshot 定点的序列分析方法检测 TPMT 基因的 SNP,85/85 例与酶切的一致率为 100%,与 DNA 直接序列分析的符合率也为 100%,可靠性好。比较几种 SNP 的检测方法结果表明,一种检测方法不能满足所有上述 TPMT 基因 5 个 SNP 位点的检测,须根据标本量和检测条件选择合适的方法。

③ TPMT 基因多态性影响其产物的活性。在所研究的人群红细胞内 TPMT

活性波动范围为 6~32 U。95.1%(599 例)TPMT > 12 U,4.9%(31 例) 为 6~12 U。TPMT 12 U 可能为正常活性和低活性的界线。未发现 TPMT 活性缺乏者。健康成人、脐血和急性白血病患者 3 组人群中,不同 TPMT 基因型者红细胞内 TPMT 活性比较后发现,TPMT 杂合变异的健康成人和脐血中红细胞内平均 TPMT 活性分别为 9.1 U 和 9.3 U,急性白血病患者红细胞内平均 TPMT 活性为 9.07 U,均明显低于同组 TPMT 野生型者,分别为 17.6 U、17.67 U、18.6 U(p 均 < 0.01)。即 TPMT 杂合变异者,TPMT 活性降低。

在 6/15 例红细胞内 TPMT 低活性的急性白血病患者以及 4/16 例红细胞内 TPMT 低活性的健康成人和脐血人群中,均未发现所检测的 TPMT 外显子和启动子区的 5 个 SNP 位点的变化,提示红细胞内 TPMT 活性还受其他因素的影响。

④ TPMT 基因型与急性白血病患者 6-MP 的耐受性有关:160/160 例急性白血病患者检测了 TPMT 外显子区的 3 个 SNP。其中 10 例为 A719G 杂合变异,未发现纯合变异者,变异率为 3.6%,变异的等位基因均为 TPMT*3C,未发现 TPMT*2 和 TPMT*3A。急性白血病患者 TPMT 基因变异的频率和类型与健康成人组均无差异。45/160 例患者检测了 TPMT 启动子区 2 个 SNP 位点,45/45 例 TPMT 启动子区 168 和 -91 均为 G,未发现 T 和 A。160 例急性白血病患者中,红细胞内 TPMT 活性平均为 17.13 ± 4.52 U(6.07~31.14 U),与健康成人 TPMT 活性无差异 ($P < 0.01$)。

160 例急性白血病患者中,接受 6-MP 标准剂量、全疗程治疗者 115 例(72%),45 例(28%)患者由于血液毒性和肝毒性未接受全程治疗,其中 TPMT 野生型者 39 例,占野生型患者的 26%,杂合型者 6 例,占杂合型患者的 60% ($P = 0.03$)。而且,6/10 例 TPMT 杂合型者和 30/150 例野生型者由于血液毒性和肝毒性使 6-MP 剂量减少 ($P = 0.009$),调整后平均用量分别为标准剂量的 1/3 和 1/2。表明 TPMT 杂合变异者,应用 6-MP 治疗时发生血液毒性和肝毒性较高,对 6-MP 的耐受性差,必须中断治疗或剂量减少以避免较大毒性反应的发生。

6/10 例 TPMT 杂合变异患者,经过不断的剂量调整后粒细胞数维持在 $3 \times 10^9/L$,对 6-MP 治疗耐受,未再出现急性毒性反应。同时,39/150 例因血液毒