

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00136

## 去甲基化药物治疗骨髓增生异常综合征的研究进展

吕筱筠<sup>1</sup>, 杜云霞<sup>1</sup>, 戴志红<sup>1</sup>, 刘铭<sup>2</sup>, 刘晓宇<sup>2</sup>, 张开立<sup>2</sup>

1. 大连医科大学基础医学院, 大连 116044;
2. 大连医科大学基础医学院生物学教研室, 大连 116044

**摘要:** 近年来表观遗传学研究在恶性肿瘤分型以及临床治疗方面发挥了重要作用。表观遗传是一种不涉及 DNA 序列变化的、可以在细胞分裂中传递的基因表达调控机制, 主要包括 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化。其中 DNA 甲基化是目前人们研究最为深入的一种表观遗传学修饰方式, 主要发生在 CpG 二核苷酸序列的胞嘧啶上, 已经证实其与多种肿瘤发生密切相关。DNA 甲基化的可诱导性和可逆性特点也为肿瘤发生机制的探讨和肿瘤治疗提供了新的途径。大量证据表明 DNA 甲基化在骨髓增生异常综合征(Myelodysplastic syndrome, MDS)的形成与发展中发挥作用。两个去甲基化药物(阿扎胞苷和地西他滨)在临床上应用治疗高危和中高危的 MDS 病人取得的成功, 为 MDS 的病因研究和临床治疗带来了新的思路。文章主要就这两种药物对 MDS 的作用机制、应用效果和新的临床问题等方面进行综述, 增加对药物作用的理解, 为临床治疗提供更好的手段。

**关键词:** 骨髓增生异常综合征; 去甲基化; 治疗

## Application of DNA methyltransferase inhibitors for myelodysplastic syndrome

LÜ Xiao-Yun<sup>1</sup>, DU Yun-Xia<sup>1</sup>, DAI Zhi-Hong<sup>1</sup>, LIU Ming<sup>2</sup>, LIU Xiao-Yu<sup>2</sup>, ZHANG Kai-Li<sup>2</sup>

1. College of Preclinical Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116044, China;
2. Department of Cell Biology, College of Preclinical Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

**Abstract:** Epigenetic research plays an important role in the malignant tumor genotyping and tumor clinical treatment recently. Epigenetics is the study of changes in gene function that are mitotically and/or meiotically heritable and that do not entail a change in DNA sequence, including DNA methylation and histone modifications. DNA methylation is one of the most important epigenetic modifications often occurring on the cytosine of CpG islands located in gene promoter regions, which is thought to be closely correlated with tumorigenesis. The inducibility and reversibility of DNA methylation provide us an insight into tumor development and treatment. Aberrant DNA hypermethylation is associated with the progress of myelodysplastic syndrome (MDS). The DNA methyltransferase inhibitors (azacytidine and decitabine) have achieved success in treating high- and intermediate-risk MDS. This will bring new ideas to understand the cause and develop the treatment of MDS. This review mainly introduces the latest progress of the action mechanism of those two medicines, the clinical

收稿日期: 2012-08-30; 修回日期: 2012-10-22

基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科研计划项目(编号: 2009A198)资助

作者简介: 吕筱筠, 本科, 专业方向: 肿瘤遗传学。Tel: 13654986059; E-mail: shine7156@sina.com

通讯作者: 张开立, 博士, 副教授, 研究方向: 肿瘤遗传学。E-mail: zklnxsong@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2012-11-21 9:34:37

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121121.0934.003.html>

cal effect and new problems during the clinical application on MDS.

**Keywords:** myelodysplastic syndrome(MDS); DNA demethylation; treatment

骨髓增生异常综合征(Myelodysplastic syndrome, MDS)是一种以骨髓造血细胞发育异常、无效造血和外周血细胞减少为特征的原发性或获得性克隆性造血干细胞疾病。临床上常表现为单系或多系血细胞减少,出血和感染的风险增高,晚期多进展为造血功能衰竭或白血病<sup>[1]</sup>。MDS的传统治疗主要有支持治疗,包括成分输血和促血细胞生成因子的应用,化疗及造血干细胞移植等,但结果多不尽人意。近年来,去甲基化药物应用于临床,使得MDS患者的生存质量有了一定提高<sup>[2]</sup>。

## 1 DNA 甲基化与 MDS

DNA甲基化是表观遗传学中最重要的一种修饰方式,是由DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化,将甲基转移至胞嘧啶的5位碳原子上,形成5-甲基胞嘧啶的化学修饰过程。在人类基因组中,70%~80%的CpG双核苷酸处于DNA甲基化状态。非甲基化的CpG分布不均匀,呈现局部聚集倾向,形成一些GC含量较高、CpG双核苷酸相对聚集的区域,即CpG岛。基因表达水平的变化与CpG岛甲基化密切相关,某些低表达或不表达基因常存在启动子区域CpG岛的DNA高甲基化;当发生去甲基化时,基因表达被激活。甲基化在基因失活、基因印记、X染色体失活等多方面发挥重要功能<sup>[3]</sup>。

肿瘤细胞中的DNA甲基化变化复杂,包括整体基因组水平广泛的去甲基化, DNMTs 表达增加,以及特定位点的异常高甲基化。证据证明特定基因的高甲基化可导致许多基因的表达异常增高,与肿瘤发生有关。DNMT 酶活动增加几乎出现在所有的转化的细胞中。DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b 基因的 mRNA 水平增高也可能出现在一些包括白血病在内的肿瘤的细胞内。多种 DNMTs 抑制剂的作用,确实抑制了肿瘤细胞的生长,使他们成为潜在的治疗靶点。

全基因组的DNA甲基化检测结果显示了MDS这个疾病表观遗传学方面的复杂性,在全基因组水

平低甲基化基础上,多个位点在MDS病程中频繁的高甲基化<sup>[4,5]</sup>。研究中发现,多对基因在转录时沉默是通过启动子的甲基化产生的作用。这些基因包括参与细胞周期调节的CDKN2A,与凋亡有关的DAP-kinase 1<sup>[6]</sup>和BCL2L10<sup>[7]</sup>,与粘附以及自动力有关的CDH1和CDH13等等。CDKN2B(P15<sup>INK4B</sup>)基因是最被广泛研究的基因<sup>[8,9]</sup>。报道称CDKN2B在病例中30%~80%甲基化。在老鼠模型中,敲去CDKN2B基因后骨髓原始细胞数量增加,提示它的沉默在MDS成因中起功能性作用。

已知在MDS中甲基化的程度越高则发展为急性髓细胞白血病(Acute myelocytic leukemia, AML)的可能性越大,且同时伴随一个更短的生存期。Shen等<sup>[10]</sup>建立了一个10个基因的启动子甲基化定量分析组合来预测MDS病人总体生存时间(Overall survival time, OS)与演变为白血病的时间,包括CDH、CDH13、ERa、NOR1、NPM2、OLIG2、p15<sup>INK4B</sup>、PGRa、PGRB和RIL。此项工作可能对临床工作者对预期病人的生存时间以及指导治疗方法有帮助。

## 2 去甲基化药物

5-氮杂胞苷(阿扎胞苷, AZA, 5-azacytidine)和地西他滨(DCA, decitabine)是两个胞核苷酸类似物,在白血病人细胞内皆有活性。这两种药物都是60年代合成的,直到80年代早期才被发现有体内DNA甲基化的抑制剂并且是体外血细胞分化的促进剂。DCA是一种可以特异性整合到DNA上的脱氧核糖核苷,通过染色体5'端的胞嘧啶被相似的结构替代,阻碍了DNA甲基转移酶的作用。AZA则是一种可以大量整合到RNA上的核糖核苷,可以抑制蛋白合成。AZA同样也可以整合到DNA上,可能是通过核糖核苷酸还原酶的作用转化成5-aza-2'-deoxycytidine的形式。这两种药物作用同时也产生细胞毒性作用,类似传统的细胞毒性药物阿糖胞苷(同样也是胞嘧啶核苷类似物)。两种药物都被FDA(美国食品药品监督管理局)批准成为MDS的治疗药物,这两种药物在治

疗MDS时有共同的特点:小剂量使用,延长了原始造血细胞的消失时间,延缓骨髓造血抑制,起效缓慢(最佳作用效果的中位反应时间>3个月)并且最终导致细胞基因表达改变<sup>[11]</sup>。

### 3 去甲基化药物作用机制

对于去甲基化药物的作用机制一直是研究者们不懈研究的重点,但是还有相当多的问题没有得到解决,且研究过程中不断有新的问题产生。已经可以肯定的是去甲基化药物对有些抑癌基因的作用,但是药物的作用规律和对其他位点的作用还有很多值得研究的地方。

Hagemann等<sup>[12]</sup>研究了27 000多个CpG双核苷酸位点在HCT116结肠癌细胞与HL-60白血病细胞中的甲基化程度。有趣的是AZA和DCA的去甲基化作用的基因区域不同,只有小部分的交叠,证明两者的作用位点是不同的。更有趣的发现,AZA与DCA的治疗后的表观基因改变在HCT116和HL-60细胞中并非是随机的,而是特异性的。药物导致的去甲基化模式是高度特异性的,并且是可重复的,重复实验有高度的相似性。这让每一次的去甲基化作用可以使下一周期的细胞复制时,高甲基化的细胞减少一半。并且固定位点的甲基化程度不会随意改变。并非所有的CG位点都会因AZA和DCA的作用低甲基化,有许多位点在强去甲基化的作用下,仍然不改变。

Giachelia等<sup>[13]</sup>研究了BMCD34+HSCs(造血干细胞)的基因表达谱在高危MDS病人以及使用DCA治疗后的情况。通过比较CD34+的MDS造血祖细胞和普通人的CD34+细胞,发现了多种基因表达有明显差异,并且这些基因表达与关键的生理过程有关,包括血细胞分化、血小板激活、细胞内信号传导、血管生成、 $\gamma$ 干扰素的合成等。在AML细胞系中,DCA促进22 000个基因中的81个基因表达至少增加一倍,但是其中有一半基因的5'端没有CpG岛,提示药物不完全依赖甲基化途径产生作用。

在MDS的相关研究中也相似地发现,Desmond等<sup>[14]</sup>鉴定了39个受DCA诱导表达上调的基因,其中 $CDKN1A(p21)$ ,不是通过甲基化机制但是可以通过地西他滨作用促进其表达。Zhou等<sup>[5]</sup>对MDS各型病人全基因组的甲基化情况与对照组作了对比,

也发现有明显差异的高甲基化CCGG(HpaII)位点只有28%位于CpG岛。进一步的研究应该着眼于非CpG岛的胞嘧啶甲基化与基因转录调控和肿瘤形成的关系。

### 4 去甲基化药物的临床应用情况

由于AML和MDS是需终身治疗的血液系统恶性疾病,对于老年人采取的高强度化疗措施常伴随着高的死亡率。有研究证实阿扎胞苷的应用使得AML病人总体生存时间(OS)比较对照组(常规护理组)延长了9个月之久<sup>[15]</sup>。因此小剂量的阿扎胞苷(5-氮杂胞苷; 5-AZA; 5-azacytidine)和地西他滨(decitabine DCA),是目前被广泛认可的对中高危及MDS病人的标准治疗方案,已经广泛被临床认识和接受。

德国MDS治疗组针对AZA的临床应用和不良反应控制进行了研究,结果显示阿扎胞苷最常见的不良反应为骨髓抑制,但是鉴于MDS病人本身就有血细胞减少的症状,很难区分是治疗引起的还是疾病的自然病程<sup>[16]</sup>。不良反应常见于前两个治疗周期,随后的几个周期渐减少,总体由于不良反应导致的死亡率非常低,但是仍需要临床密切关注。应对血细胞减少症状,只有14%的病人需要调整AZA剂量。暂时的血细胞减少不影响总体药物的作用,且不增加感染或出血的风险。还有报道反应病人出现胃肠道不适,注射部位的皮疹,头疼,头晕,虚弱和关节疼痛等不良反应。

有研究报道,DCA治疗后的中位生存时间为161 d,AZA的中期生存时间为188 d<sup>[17]</sup>。大部分病人DCA治疗周期大约在4个左右,AZA为5个,但是也有长达10多个周期才起效的,因此推荐治疗6个周期后进行评估。在最后一个疗程,27.4%病人经过DCA治疗和18.9%病人经过AZA治疗,达到了血红蛋白改善>11 g/dL,并且不需要输血和ESA治疗。同时白细胞数也得到改善。DCA和AZA之间没有明显的血液学改变作用差异。细胞因子的应用与血液细胞反应没有直接关系。提示在治疗后期仍然需要持续的输血支持治疗。研究也发现,更长的疗程往往倾向于更好的血液学改变。临床需要考虑经济情况制定治疗方案,控制感染,以及持续的支持治疗。

在临床试验中临床工作者把起初就对DCA治疗没有效果的称为原发抗药,还有很多病人起初对药

物反应,但是最终复发(继发抗药)。抗药是临床上一个严重的问题,复发后的生存几率很低<sup>[18]</sup>。Qin等<sup>[19]</sup>认为原发的对胞嘧啶类似物的抵抗是基于代谢途径的异常,细胞内胞嘧啶类似物的三磷酸盐浓度不足。原因可能是脱氧胞嘧啶激酶(DCK)的不足,胞嘧啶脱氨基酶(CDA)的脱氨基作用增加,或者dNTP的含量高。原发的细胞内缺少三磷酸盐,可能基于DCK的突变或者异常的基因表达。研究表明,原发DCA抗药可能与人群中有些病人较高的CDA/DCK比值有关。这表示DCA在DCK单一磷酸化的作用下不活跃,而在CDA脱氨基作用下更不活跃。现阶段的体外实验发现,获得性的DCK抗药性在HL60细胞系中和DCK基因突变有关,这个同时使得其他NAs类的药物也失去作用,例如,阿糖胞苷,氟达拉滨(抗肿瘤药)等。但是DCK突变在复发病人中并没有被检测出来。在临床中,继发性抗药的病人的细胞甲基化程度比用药之前要低,CDA与DCK的比值也没有明显变化。继发性抗药的机制还有待进一步研究。

MDS的病人同时存在许多表观遗传控制基因的突变,如*ASXL1*、*DNMT3A*、*EZH2*、*IDH1*、*IDH2*和*TET2*等<sup>[20]</sup>。进一步研究应着眼于存在这些基因突变的病人是否会对去甲基化药物发生反应。Itzykson等<sup>[21]</sup>研究显示在高危组MDS和AML病人中,*TET2*突变状态可能是一个AZA反应率的预测因素,存在*TET2*基因突变往往提示更好的AZA治疗反应率,但是在反应时间和最终生存率上没有优势,有待进一步研究证实。Itzykson等总结影响AZA反应率的因素还有:核型、骨髓原始细胞的数量、前期是否用过阿糖胞苷化疗药物。其中只有核型是独立的影响因素。

因为MDS的复杂性,临床上不能只用一种疗法应用于所有的病人,虽然AZA和DCA的发现是MDS和AML治疗史上的重大发现,比化疗提高了生存率和生存质量,但是还应探讨药物是否还有更好的应用,比如与其他药物合用的情况,以及应用于其他治疗失败后的情况。有研究认为AZA是对骨髓移植失败的病人一个有效的挽救措施<sup>[22]</sup>,可以使骨髓移植后复发的病人有更好的生存可能。还有研究认为合用HDAC(Histone deacetylase,组蛋白乙酰化酶)抑制剂可以提高AZA的反应率<sup>[23]</sup>,将AZA与来那度胺合用的一期试验也有很好的效果。

## 5 展望

DNA异常甲基化在MDS的发生、发展中起着重要的作用。更多地了解MDS甲基化状况有利于早期诊断、预后判断及预测治疗反应。去甲基化药物氮杂胞苷、地西他滨在临床应用中取得了一定疗效,但疗效尚不够令人满意,其作用机制尚不明确,尤其是这些药物调控的靶基因还不清楚,难以获得比较客观、易于检测的指标来评估这两种药物的疗效。临床上并非药物对所有患者都起效,应对无效的患者没有统一的方法。还有很多问题尚待进一步的基础研究。

## 参考文献(References):

- [1] Steensma DP, Tefferi A. The myelodysplastic syndrome(s): a perspective and review highlighting current controversies. *Leuk Res*, 2003, 27(2): 95–120. DOI
- [2] 陈其文, 田丹杏, 周永明. 骨髓增生异常综合征治疗进展. *医学研究杂志*, 2010, 39(8): 119–123. DOI
- [3] Matarazzo MR, De Bonis ML, Strazzullo M, Cerase A, Ferraro M, Vastarelli P, Ballestar E, Esteller M, Kudo S, D'Esposito M. Multiple binding of methyl-CpG and polycomb proteins in long-term gene silencing events. *J Cell Physiol*, 2007, 210(3): 711–719. DOI
- [4] Issa JP. Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2010, 24(2): 317–330. DOI
- [5] Zhou L, Opalinska J, Sohal D, Yu YT, Mo YK, Bhagat T, Abdel-Wahab O, Fazzari M, Figueroa M, Alencar C, Zhang JH, Kambhampati S, Parmar S, Nischal S, Hueck C, Suzuki M, Freidman E, Pellagatti A, Boulwood J, Steidl U, Sautharajah Y, Yajnik V, McMahon C, Gore SD, Platanias LC, Levine R, Melnick A, Wickrema A, Greal JM, Verma A. Aberrant epigenetic and genetic marks are seen in myelodysplastic leukocytes and reveal *Dock4* as a candidate pathogenic gene on chromosome 7q. *J Biol Chem*, 2011, 286(28): 25211–25223. DOI
- [6] Wu XQ, Liu WL, Tian Y, Xiao M, Wu Y, Li CR. Aberrant Methylation of Death-Associated Protein Kinase 1 CpG Islands in Myelodysplastic Syndromes. *Acta Haematol*, 2011, 125(4): 179–185. DOI
- [7] Fabiani E, Leone G, Giachelia M, D'alo' F, Greco M, Criscuolo M, Guidi F, Rutella S, Hohaus S, Voso MT. Analysis of genome-wide methylation and gene expression induced by 5-aza-2'-deoxycytidine identifies BCL2L10 as a frequent methylation target in acute myeloid leukemia.



- Leuk Lymphoma*, 2010, 51(12): 2275–2284. DOI
- [8] 叶雪石, 刘霆. P15<sup>NK4B</sup>基因甲基化与骨髓增生异常综合征. 国外医学: 输血及血液学分册, 2004, 27(1): 63–67. DOI
- [9] Christiansen DH, Andersen MK, Pedersen-Bjergaard J. Methylation of p15<sup>NK4B</sup> is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2003, 17(9): 1813–1819. DOI
- [10] Shen LL, Kantarjian H, Guo Y, Lin E, Shan JQ, Huang XL, Berry D, Ahmed S, Zhu W, Pierce S, Kondo Y, Oki Y, Jelinek J, Saba H, Estey E, Issa JPJ. DNA Methylation Predicts Survival and Response to Therapy in Patients With Myelodysplastic Syndromes. *J Clinical Oncol*, 2010, 28(4): 605–613. DOI
- [11] Bryan J, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Jabbour E. Pharmacokinetic evaluation of decitabine for the treatment of leukemia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2011, 7(5): 661–672. DOI
- [12] Hagemann S, Heil O, Lyko F, Brueckner B. Azacitidine and decitabine induce gene-specific and non-random DNA demethylation in human cancer cell lines. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17388. DOI
- [13] Giachelia M, D'Alò F, Fabiani E, Saulnier N, Di Ruscio A, Guidi F, Hohaus S, Voso MT, Leone G. Gene expression profiling of myelodysplastic CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells treated *in vitro* with decitabine. *Leukemia Res*, 2011, 35(4): 465–471. DOI
- [14] Desmond JC, Raynaud S, Tung E, Hofmann WK, Haferlach T, Koefler HP. Discovery of epigenetically silenced genes in acute myeloid leukemias. *Leukemia*, 2007, 21(5): 1026–1034. DOI
- [15] Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Sanz G, List AF, Gore SD, Seymour JF, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach CL, Silverman LB. Azacitidine prolongs overall survival and reduces infections and hospitalizations in patients with WHO-defined acute myeloid leukaemia compared with conventional care regimens: an update. *Ecancermedical-science*, 2008, 2: 121. DOI
- [16] Götze K, Platzbecker U, Giagounidis A, Haase D, Lübbert M, Aul C, Ganser A, Germing U, Hofmann WK. Azacitidine for treatment of patients with myelodysplastic syndromes (MDS): practical recommendations of the German MDS Study Group. *Ann Hematol*, 2010, 89(9): 841–850. DOI
- [17] Bordoni RE, Feinberg BA, Gilmore JW, Haislip S, Jackson JH, Farrelly E, Kim E, Buchner D. Hematologic outcomes of myelodysplastic syndromes treatment with hypomethylating agents in community practice. *Cl Lymph Myelom Leuk*, 2011, 11(4): 350–354. DOI
- [18] Jabbour E, Garcia-Manero G, Batty N, Shan J, O'Brien S, Cortes J, Ravandi F, Issa JP, Kantarjian H. Outcome of patients with myelodysplastic syndrome after failure of decitabine therapy. *Cancer*, 2010, 116(16): 3830–3834. DOI
- [19] Qin TC, Castoro R, Ahdab SE, Jelinek J, Wang XD, Si JL, Shu JM, He R, Zhang NX, Chung W, Kantarjian HM, Issa JPJ. Mechanisms of resistance to decitabine in the myelodysplastic syndrome. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23372. DOI
- [20] Nikoloski G, Bert A. van der Reijden, Jansen JH. Mutations in epigenetic regulators in myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol*, 2012, 95(1): 8–16. DOI
- [21] Itzykson R, Kosmider O, Cluzeau T, Mansat-De Mas V, Dreyfus F, Beyne-Rauzy O, Quesnel B, Vey N, Gelsi-Boyer V, Raynaud S, Preudhomme C, Adès L, Fenaux P, Fontenay M, Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM). Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*, 2011, 25(7): 1147–1152. DOI
- [22] Bolaños-Meade J, Smith BD, Gore SD, McDevitt MA, Luznik L, Fuchs EJ, Jones RJ. 5-azacytidine as salvage treatment in relapsed myeloid tumors after allogeneic bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2011, 17(5): 754–748. DOI
- [23] Gore SD. New ways to use DNA methyltransferase inhibitors for the treatment of myelodysplastic syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, 2011(1): 550–555. DOI