

三氧化二砷治疗慢性粒细胞性白血病的实验与临床研究*

石茵¹ 向谱² 黄昊² 林全德² 房佰俊²

[摘要] **目的:**观察三氧化二砷(As_2O_3)对免疫表型 $FIK1^+ CD34^-$ 的慢性粒细胞白血病(CML)干细胞增殖的影响,并初步探讨 As_2O_3 使 CML 患者能中断酪氨酸激酶抑制剂治疗的可行性。**方法:**分离 CML 患者骨髓细胞中 $FIK1^+ CD34^-$ CML 干细胞,检测 As_2O_3 对其细胞周期、凋亡及 P53 基因表达的影响,并观察应用伊马替尼后已获得完全细胞遗传学缓解的 CML 患者,单用 As_2O_3 注射液 6 周期后,其疗效及不良反应。**结果:** As_2O_3 能抑制免疫表型为 $FIK1^+ CD34^-$ 的 CML 干细胞增殖($P < 0.05$),可使其 G0/G1 期增加,S 期降低,并可诱导凋亡。 $FIK1^+ CD34^-$ CML 干细胞经适当浓度的 As_2O_3 处理后,P53 基因表达可显著提高。6 例患者单用 As_2O_3 仍保持完全细胞遗传学缓解,且不良反应轻微,经对症处理后均可缓解。**结论:** As_2O_3 对 CML 患者的治疗有一定效果,且无明显毒副作用,为使 CML 患者能中断酪氨酸激酶抑制剂的治疗提供了新的研究方向。

[关键词] 白血病,粒细胞,慢性;三氧化二砷;化疗;初步研究

doi:10.13201/j.issn.1004-2806.2017.01.007

[中图分类号] R733.72 **[文献标志码]** A

Clinical and experimental studies on arsenic trioxide in the treatment of chronic myeloid leukemia

SHI Yin¹ XIANG Pu² HUANG Hao² LIN Quande² FANG Baijun²

(¹Institute of Hematology & Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin, 300020, China; ²Department of Hematology, Affiliated Tumor Hospital of Zhengzhou University, Henan Tumor Hospital)

Corresponding author: FANG Baijun, E-mail: fdation@126.com

Abstract Objective: To observe the effect of ATO on the proliferation of $FIK1^+ CD34^-$ chronic myeloid leukemia (CML) stem cells, and determine whether ATO alone could maintain remissions achieved by a prior therapy with tyrosine kinase inhibitor. **Method:** We isolated $FIK1^+ CD34^-$ CML stem cells from the bone marrow of newly diagnosed CML and analyzed the effect of ATO on cell cycle, apoptosis and the gene expression of P53 in $FIK1^+ CD34^-$ CML stem cells. We observed remission status and adverse events of ATO used alone in 6 patients who had been pretreated with imatinib and got complete cytogenetic response. **Result:** ATO could inhibit the proliferation of $FIK1^+ CD34^-$ CML stem cells. After treatment with ATO, the cells in G0/G1 phase increased and those in S phase decreased. Furthermore, ATO could induce apoptosis of $FIK1^+ CD34^-$ CML stem cells and increase remarkably the expression of P53 gene. After the application of ATO for 6 cycles, all the 6 patients remained complete cytogenetic remission. Furthermore, all the adverse events were modest and responded to symptomatic treatment. **Conclusion:** Treatment with ATO in patients with CML may have a good result without obvious ATO-related toxicities, and it gives a new way to cure CML without tyrosine kinase inhibitor.

Key words chronic myeloid leukemia; arsenic trioxide; chemotherapy; preliminary study

慢性粒细胞白血病(chronic myeloid leukemia, CML)是一种造血干细胞克隆性骨髓增殖性肿瘤,其特征为 9 号染色体和 22 号染色体易位形成费城染色体(Ph),从而导致产生 BCR-ABL 融合基因。分子靶向治疗药物酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitor, TKI)能选择性抑制

BCR-ABL 酪氨酸激酶,作为一线治疗用药,疗效确切且安全性高。然而,在绝大多数接受 TKI 治疗的 CML 患者体内,存在着持续的、仅在分子水平可检测到的白血病干细胞,是疾病复发及产生继发耐药的潜在根源。而 TKI 需要长期服药,且存在继发耐药、安全性与耐受性、依从性及患者的经济负担重等多种问题。故仍需血液学工作者寻找一种可有效清除天然耐药的 CML 干细胞,从而使绝大多数 CML 患者能适时中断 TKI 治疗并长期无病生存的药物。砷剂的应用,最早可追溯至《本草纲

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81370661)

¹ 中国医学科学院北京协和医学院血液学研究所血液病医院(天津,300020)

² 郑州大学附属肿瘤医院、河南省肿瘤医院血液科
通信作者:房佰俊, E-mail: fdation@126.com

目》,且在治疗急性早幼粒细胞白血中取得显著疗效,显示出其广阔的抗癌前景。已有研究报道,As₂O₃治疗CML获得了令人满意的疗效,且不良反应小,耐受性好^[1]。目前人们对BCR/ABL⁺CD34⁻干细胞的生物学特性和消除方法研究很少,本实验旨在通过从实验和临床的角度,观察As₂O₃对CML干细胞(FIK1⁺CD34⁻细胞)的增殖、P53基因表达的影响以及对CML患者的治疗作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 基础实验

1.1.1 研究对象及CML干细胞制备 选择2011-07-2012-06在我院门诊就诊的应用伊马替尼反应欠佳的CML患者15例,均为男性,中位年龄42(18~61)岁,病程4个月~3年。无菌操作下取CML患者的骨髓液5ml,以2500 r/min,15 min使用淋巴细胞分离液分离出单个核细胞,于DF12培养基中培养。6 d后用磁珠分选的方法去除GlyA⁺、CD45⁺和CD34⁺贴壁生长的细胞。将经过磁珠分选后的剩余细胞,按照每孔1个细胞的密度,接种在以纤维连接蛋白和适量的Matrigel凝胶包被的96孔的培养板中。利用克隆环提取单个克隆细胞,进行扩增培养及传代。

1.1.2 实验方法及检测内容 0.4%的台盼蓝计数活的细胞数,并绘制出生长曲线。通过流式细胞仪测定免疫表型。用荧光原位杂交法(FISH)检测CD34⁻细胞BCR/ABL阳性率。采用CCK-8法检测As₂O₃对CML干细胞的增殖抑制作用,同时用流式细胞术检测As₂O₃对CML干细胞细胞周期及凋亡的影响,并在荧光显微镜下观察细胞的形态。用实时定量PCR检测As₂O₃对CML干细胞P53基因表达的影响,P53上游引物序列:CCCTC-CTCAGCATCTTATCCG,下游引物序列:GGCA-CAAACACGCACCTCAA;GAPDH上游引物:GGATTTGGTCGTATTGGG,下游引物:GGAAGATGGTGATGGGATT。

1.1.3 统计学处理 实验数据应用SPSS17.0软件进行分析。数据描述为 $\bar{x} \pm s$,2个样本均数间比较采用配对样本 t 检验,多个样本均数间比较采用One-Way ANOVA单因素方差分析。检验标准: $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。Real-time PCR结果分析基因相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.2 临床病例疗效观察

1.2.1 一般资料及入选标准 6例初诊CML患者均为2008-01-2011-03郑州大学附属肿瘤医院血液科的住院患者,其中男4例,女2例,中位年龄46(27~63)岁。诊断均符合《血液病诊断及疗效标准(第3版)》标准^[2]。告知患者应用As₂O₃的疗效

和潜在的毒副作用,所有患者均签署知情同意书。入选标准:CML慢性期需符合以下标准:①白细胞数明显增多,为 $(20\sim 100)\times 10^9/L$,一般 $>50\times 10^9/L$;②外周血可见较多的碱性粒细胞;③外周血及骨髓中原始细胞所占比例 $<5\%$,且可见大量的中晚幼粒细胞。所有患者行血常规、骨穿、活检、染色体、融合基因等检查,符合CML慢性期,且此前口服甲磺酸伊马替尼(IM,商品名格列卫)治疗均达到完全细胞遗传学缓解(CCyR)。

1.2.2 研究方法 患者均停用IM治疗,使用As₂O₃单药治疗。As₂O₃按照7 mg/m²的剂量,溶于5%葡萄糖注射液或生理盐水500 ml,避光输注大于4 h,每天1次,每周连用5 d,3周为1个疗程。使用As₂O₃前半小时给予3.0 g维生素C输注,并给予止吐、保肝、护胃等对症支持治疗。每个月用药1个疗程,应用6个疗程后观察疗效及安全性。

1.2.3 临床实验室检查及不良反应评定 治疗过程中每周查血常规2次,检测肝肾功能、电解质、血糖1次,并记录脾脏大小等。3个月客观评价1次,若处于CCyR状态,继续应用As₂O₃治疗,进展者退出。治疗1个疗程后,参照美国国立癌症研究院不良事件通用命名标准(NCI-CTCAE)3.0版进行不良反应评估^[3]。

1.2.4 随访 所有患者均随访至2015年12月31日。随访时间为28~65个月,中位随访时间48个月。治疗结束后每6个月随访1次。

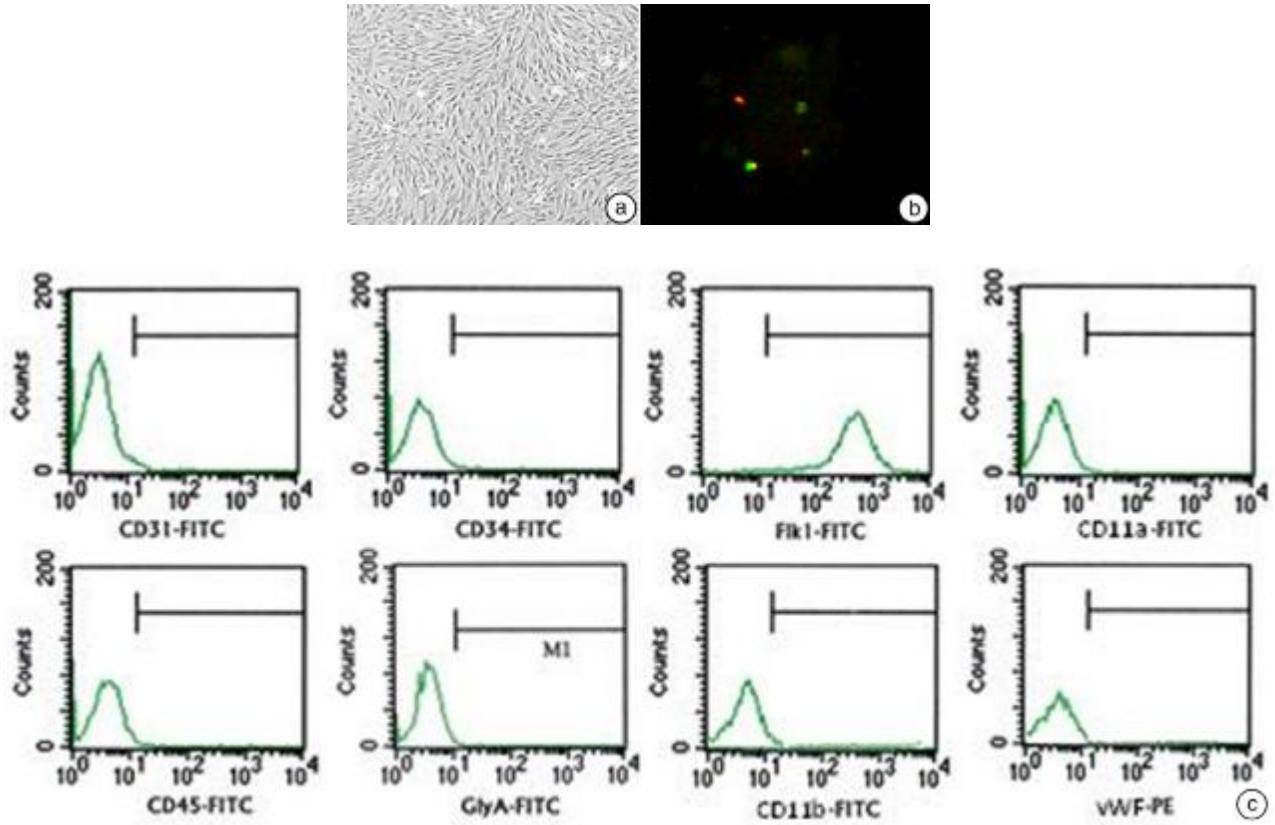
2 结果

2.1 基础实验

2.1.1 来源CML患者骨髓的CML干细胞的形态免疫、FISH检测CD34⁻细胞BCR/ABL阳性率和表型分析 实验结果提示在96孔板中所种的经过免疫磁珠分选去除了CD34⁺、CD45⁺和GlyA⁺细胞的CML患者的骨髓源单个核细胞,每个孔种10个细胞的板中可发现单克隆形成,而每个孔种1、3或5个细胞的板中无克隆形成,并且在所有孔中均没有发现2个克隆形成的现象。在体外培养过程中发现,24 h后即可见到圆形或椭圆形贴壁细胞,48~72 h后可见大部分贴壁细胞成纤维样形态,平行排列生长或呈漩涡状生长。免疫表型分析结果提示:在诱导前,来自骨髓的单克隆扩增细胞均为FIK1⁺,而CD45、CD34、CD11a及CD11b等造血细胞的表型和CD31、vWF等内皮细胞的特征性表型均为阴性。在Nikon E600荧光显微镜下隔着三色滤光块(DAPFRITC/FITC)观察杂交信号,采用COHU高分辨率的CCD摄取图像,用Macprobe 4.0系统进行荧光图像处理和分析。根据视野中绿色信号(G)代表BCR,橙色(O)信号代表ABL,黄色融合信号(F)代表BCR/ABL融合基因,蓝色代表的是背景染色质,2个橙色(2O)和2个

绿色(2G)的荧光信号代表正常的间期细胞。细胞形态学表现见图 1a, FISH 结果见图 1b, 免疫表型

见图 1c。



a:形态学表现(×10); b:FISH 结果; c:免疫表型。

图 1 CML 干细胞的形态学表现、FISH 检查及免疫表型

2.1.2 As₂O₃ 对 FIK1⁺CD34⁻ 细胞增殖的影响
与阴性对照组比较, 1.5 μmol/L、3.0 μmol/L As₂O₃ 对 FIK1⁺CD34⁻ 细胞增殖有抑制作用(P<0.05, 图 2)。

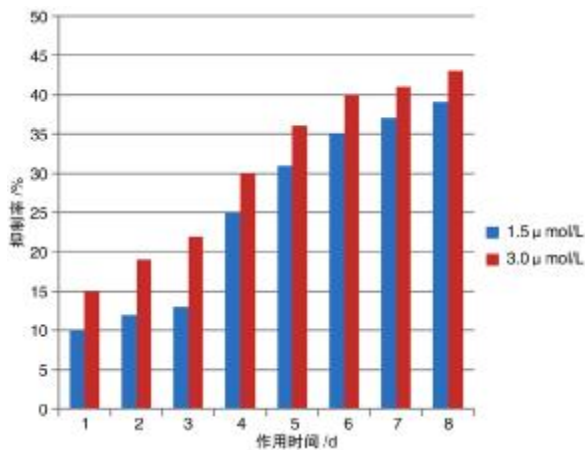


图 2 As₂O₃ 对 FIK1⁺CD34⁻ 细胞增殖的影响

2.1.3 As₂O₃ 对 FIK1⁺CD34⁻ 细胞周期的影响
与对照组相比, 细胞经 1.5 μmol/L、3.0 μmol/L

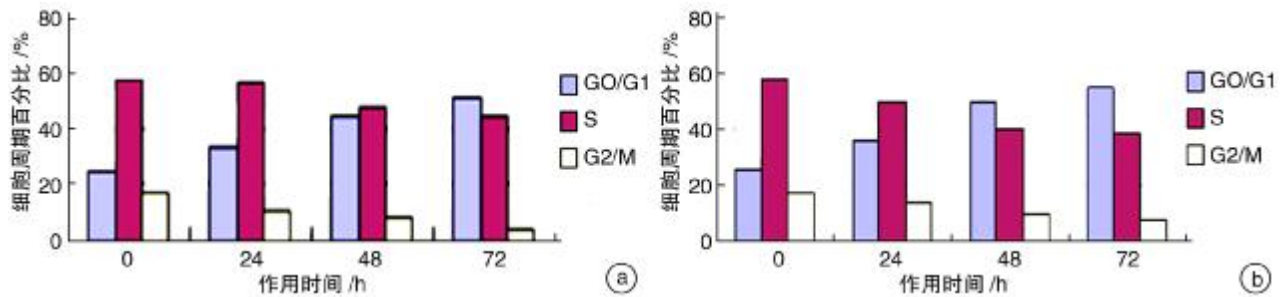
As₂O₃ 诱导 72 h 后, G₀/G₁ 期细胞百分比升高, S、G₂/M 期细胞百分比下降(P<0.05, 图 3), 与上述增殖抑制结果相符。说明 As₂O₃ 能引起 FIK1⁺CD34⁻ 细胞的 G₀/G₁ 期停滞, 从而抑制细胞增殖(P<0.01)。

2.1.4 As₂O₃ 对 FIK1⁺CD34⁻ 细胞凋亡的影响
与对照组相比, 1.5 μmol/L、3.0 μmol/L As₂O₃ 诱导细胞 72 h 后, 细胞凋亡明显增加, 与上述增殖抑制结果相符。说明 As₂O₃ 能引起 FIK1⁺CD34⁻ 细胞凋亡(P<0.05, 图 4)。

2.1.5 As₂O₃ 对 FIK1⁺CD34⁻ 细胞 P53 蛋白 mRNA 水平表达的变化
1.5 μmol/L、3.0 μmol/L As₂O₃ 处理 FIK1⁺CD34⁻ 细胞 24 h 后, P53 蛋白 mRNA 表达分别是未加药组的 1.3905 和 2.0871 倍; 48 h 后, 分别为 3.0933 及 5.4556 倍; 72 h 后, 分别为 5.6551 及 9.3323 倍。

2.2 临床结果

2.2.1 临床疗效及随访 截止到 2015 年 12 月 31 日, 应用 As₂O₃ 的中位时间为 28(24~38)个月。应用 As₂O₃ 期间, 每 3 个月左右查骨穿、染色体、融合基因 1 次, 结果提示 6 例患者均持续为 CCyR 状态。



a: 1.5 μmol/L; b: 3.0 μmol/L.

图 3 细胞经 1.5、3.0 μmol/L As₂O₃ 诱导 72 h 后

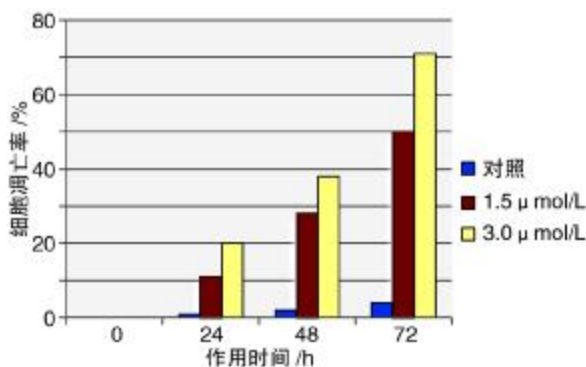


图 4 As₂O₃ 对 FIK1⁺CD34⁻ 细胞凋亡的影响

2.2.2 不良反应 As₂O₃ 维持治疗期间,共 5 例患者出现胃肠道反应,主要表现为恶心、纳差、便秘、腹胀等。3 例患者出现皮肤软组织水肿,以双下肢和颜面部为主。出现浆膜腔积液 1 例,色素沉着 2 例,血清转氨酶升高 3 例,指尖麻木 2 例,皮疹 1 例。化疗相关的不良反应经积极对症处理后均缓解。其中 1 例血清转氨酶升高明显者,停药 1 周后指标即降至正常,后继续 As₂O₃ 维持治疗。临床观察期间未发现肾脏和心脏毒副反应。

3 讨论

CML 是造血干细胞的恶性克隆、骨髓增殖性疾病。CML 在全世界的年发病率为(1.0~1.5)/10 万,占有白血病类型的 15%~20%^[4]。CML 中男性发病率高于女性,可于任何年龄发病,40~50 岁为高发年龄段。CML 起病缓慢,且病程较其他类型白血病长,易发生急变及骨髓纤维化,Ph 染色体和 BCR-ABL 融合基因是 CML 发生、发展中的关键环节。目前治疗 CML 的方法包括异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)和药物治疗。Allo-HSCT 可以治愈 CML,但价格昂贵、风险高,且受供体限制,故不易普遍开展。TKI 为治疗 CML 的首选药物,是 2-苯胺嘧啶的衍生物,它能竞争性的抑制底物或 ATP 与酪氨酸激酶的催化中心结合,抑制酪氨酸激酶的活化从而发挥靶向治疗的作用^[5]。TKI 对 CML 各期均有效,可以取得遗传学

缓解甚至分子生物学缓解。但 TKI 需长期服药,价格昂贵,慢性不良反应不可避免,且长期应用有导致继发耐药的可能。相关研究表明,ABL 受体结合区的基因突变导致 IM 不能与 ABL 受体相结合,是产生继发耐药的主要原因^[6]。另外, van Rhee 等^[7]的研究发现,CML 干/祖细胞对 IM 天然不敏感,为原发性耐药的产生原因。

As₂O₃ 为中药砒霜提取物,其生物学活性非常广泛。砷剂在我国的用药历史可追溯到百年以前,近年来随着人们对砷剂研究的不断深入,发现它有非常广的抗癌谱,并且不良反应少。1971 年,哈尔滨医科大学率先使用 As₂O₃ 治疗急性早幼粒细胞白血病获得成功,为血液肿瘤的治疗开辟了一条新的途径。有研究显示,As₂O₃ 可诱导多种肿瘤细胞发生自噬性死亡^[8-9],提示自噬可能在 As₂O₃ 杀灭肿瘤细胞的生物学效应中发挥重要作用。最近, Fialkow^[10]通过研究证明 As₂O₃ 可通过诱导自噬靶向降解 BCR-ABL 癌蛋白并进而杀灭 CML 祖细胞。Ito 等^[11]提出 As₂O₃ 可能通过降低 PML 基因而靶向清除 CML 患者体内的白血病干细胞。另有国内研究发现,As₂O₃ 可通过下调白血病细胞株 KG1a 表面黏附分子 CD44、CD49d 的表达,影响其与造血龛之间的相互作用^[12]。

房佰俊等^[13]在对 BCR/ABL⁺FIK1⁺CD34⁻ 细胞的研究中发现,分化成熟或相对成熟的 CML 细胞在应用 IM 治疗的过程中,生长受到明显抑制,但原始的 CML 干细胞对 IM 则可能是部分、甚至是完全耐药的。因此,我们研究组采用分离纯化等方法,在改进固有培养体系的基础上,从应用伊马替尼反应欠佳的 CML 患者的骨髓细胞中培养出了一类高表达 FIK1 等黏附分子,而不表达 CD45、CD34 等造血细胞的特异性标志的细胞。体外实验证实, FIK1⁺CD34⁻ 细胞具有血液血管干细胞的特点,是 CML 发生、发展的始动细胞。应用 As₂O₃ 作用于该细胞后,其增殖抑制作用与 P53 基因表达水平上调一致。我们分析 As₂O₃ 可能是通过影响该种细胞的特定基因的表达而对 CML 的治疗起作用。在

此基础上,我们收集了 6 例应用 IM 达到 CCyR 的 CML 患者,单用 As_2O_3 治疗 6 个周期,期间间断复查血常规、骨髓像、染色体、融合基因等指标,提示患者保持 CCyR,且其不良反应较小,对症治疗或停药 1 周左右即可消失,未有远期毒副作用。

根据体外实验及临床观察,我们认为 As_2O_3 对 CML 患者的治疗有一定效果,且无明显毒副作用,为使 CML 患者能中断 TKI 的治疗提供了新的研究方向,从而为经济困难而无力承担伊马替尼高昂费用或对此药耐药的 CML 患者提供新的希望。但由于本组病例数较少,随访时间短,仍需要扩大患者的例数,做更大规模、更为长期的随机对照临床观察。

参考文献

- [1] 张日,支雅军,陶瑞芳,等. 亚砷酸钠治疗加速期慢性粒细胞性白血病的疗效观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2000,5(4):263—265.
 - [2] Quintas-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia[J]. Blood, 2009,113:1619—1630.
 - [3] Trotti A, Colevas AD, Setser A, et al. CTCAE v3. 0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment[J]. Semin Radiat Oncol, 2003,13:176—181.
 - [4] Khunger JM, Arulselvi S, Sharma U, et al. Pancytopenia—a clinico haematological study of 200 cases[J]. India J Pathol Microbiol, 2002,45:375—379.
 - [5] Reya T, Morrison SJ, Clarke ME, et al. Stem cells, cancer and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414: 105—111.
 - [6] Savage DG, Antman KH. Imatinib mesylate—a new oral targeted therapy[J]. N Engl J Med, 2002, 346: 683—693.
 - [7] van Rhee F, Szydlo RM, Hermans J, et al. Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation[J]. Bone Marrow Transplant, 1997, 20: 553—560.
 - [8] 李少梅,肖鹏,王留兴. 三氧化二砷对人乳腺癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. 中国实用医刊, 2009,36(6):3—5.
 - [9] Goussetis DJ, Gounaris E, Wu EJ, et al. Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of antileukemic responses by arsenic trioxide[J]. Blood, 2012,120:3555—3562.
 - [10] Fialkow PJ. Clonal origin of human tumors[J]. Biochim Biophys Acta, 1976,458:283—321.
 - [11] Ito K, Bernardi R, Morotti A, et al. PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells[J]. Nature, 2008,453:1072—1078.
 - [12] 段永涛,吴秉毅,宋朝阳,等. As_2O_3 下调 KG1a 细胞粘附分子 CD44、CD49d 表达[J]. 中国热带医学, 2012, 12(4):423—426.
 - [13] 房佰俊,宋永平,林全德,等. 慢性粒细胞性白血病干细胞抗伊马替尼机制的初步分析[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007,11(46):9263—9267.
(收稿日期:2016-10-14)
-
- (上接第 25 页)
- [18] Elsayh KI, Zahran AM, El-Abaseri TB, et al. Hypoxia biomarkers, oxidative stress, and circulating microparticles in pediatric patients with thalassemia in Upper Egypt[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2014,20:536—545.
 - [19] Cakmak A, Soker M, Koc A, et al. Prolidase activity and oxidative status in patients with thalassemia major[J]. J Clin Lab Anal, 2010,24:6—11.
 - [20] Zhao B, Mei Y, Yang J, et al. Erythropoietin-regulated oxidative stress negatively affects enucleation during terminal erythropoiesis[J]. Exp Hematol, 2016, 44: 975—981.
 - [21] Unsicker K, Spittau B, Kriegelstein K. The multiple facets of the TGF-beta family cytokine growth/differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2013, 24: 373—384.
 - [22] Morry J, Ngamcherdtrakul W, Yantasee W. Oxidative stress in cancer and fibrosis: opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes, and nanoparticles[J]. Redox Biol, 2016,11:240—253.
(收稿日期:2016-12-02)