

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.06.011

MTHFR 与 ABCB1 基因多态性对血液系统恶性肿瘤患者大剂量甲氨蝶呤排泄延迟和肝肾毒性的影响*

马 乐¹, 韩 佳², 吕冬梅^{2△}

(1. 徐州医科大学, 江苏 徐州 221009; 2. 徐州医科大学附属医院药学部, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 研究亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)和三磷酸腺苷(ATP)结合盒 B 亚家族成员 1 转运蛋白(ABCB1)基因多态性对血液系统恶性肿瘤患者大剂量甲氨蝶呤(HD-MTX)化学治疗后排泄延迟和肝肾毒性的影响。方法 选取徐州医科大学附属医院 2019 年 4 月至 2020 年 5 月收治行 HD-MTX 治疗的血液系统恶性肿瘤成年患者 131 例, 监测甲氨蝶呤(MTX)血药浓度, 并检测 MTHFR 与 ABCB1 基因分型, 统计并分析患者用药前后肝肾功能。结果 131 例患者中, MTHFR 677 位点和 ABCB1 3435 位点(CC+TT)型携带者 MTX 排泄延迟发生率与 CC 型携带者相当($P>0.05$); ABCB1 3435 位点(CC+TT)型携带者肝功能损伤的发生率明显高于 CC 型携带者($P<0.05$)。结论 ABCB1 3435 位点(CC+TT)型基因多态性与血液系统恶性肿瘤成年患者使用 HD-MTX 后肝功能损伤相关。

关键词:大剂量; 甲氨蝶呤; 血液系统恶性肿瘤; 排泄延迟; 基因多态性; 肝肾毒性

中图分类号: R965; R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)06-0040-04

Effect of MTHFR and ABCB1 Genetic Polymorphism on the Elimination Delay of High-Dose Methotrexate and Hepatorenal Toxicity in Patients with Hematologic Malignancies

MA Le¹, HAN Jia², LYU Dongmei²

(1. Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, China 221009; 2. Department of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, China 221002)

Abstract: **Objective** To study the effect of MTHFR and ABCB1 genetic polymorphism on the elimination delay of high-dose methotrexate(HD-MTX) and the hepatorenal toxicity of patients with hematologic malignancies. **Methods** Totally 131 adult patients with hematologic malignancies treated with HD-MTX in the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University from April 2019 to May 2020 were selected. The blood concentration of MTX was monitored, the genotypes of MTHFR and ABCB1 were detected, and the hepatorenal function before and after treatment was analyzed. **Results** Among 131 patients, the incidence of MTX-elimination delay in MTHFR 677 and ABCB1 3435(CC+TT) genotype carriers was similar to that in CC genotype carriers($P>0.05$), the incidence of liver function injury in ABCB1 3435(CC+TT) genotype carriers was significantly higher than that in CC genotype carriers($P<0.05$). **Conclusion** ABCB1 3435(CC+TT) genetic polymorphism is associated with HD-MTX-liver injury in adult patients with hematological malignancies.

Key words: high-dose; methotrexate; hematologic malignancies; elimination delay; genetic polymorphisms; hepatorenal toxicity

甲氨蝶呤(MTX)属叶酸拮抗剂, 大剂量甲氨蝶呤(HD-MTX)能显著提高肿瘤患者的长期生存率^[1-2], 目前广泛用于多种血液系统恶性肿瘤[如急性淋巴细胞白血病(ALL)和骨肉瘤]的治疗。患者行 HD-MTX 治疗后常会出现 MTX 排泄延迟现象, 并引发肝肾功能损伤等毒副作用, 且个体差异较大。亚甲基四氢叶酸还原酶

(MTHFR)和三磷酸腺苷(ATP)结合盒 B 亚家族成员 1 转运蛋白(ABCB1)的基因多态性与 MTX 排泄延迟及肝肾毒性可能相关, 但已有研究的结果不一致^[3-5]。本研究选取徐州医科大学附属医院收治的使用 HD-MTX 化学治疗(简称化疗)的血液系统恶性肿瘤成年患者 131 例, 通过监测用药后 48 h 体内 MTX 的血药浓度及

*基金项目: 江苏省徐州市卫生健康委 2020 年青年医学科技创新项目[XWKYHT20200061]。

第一作者: 马乐, 女, 硕士研究生, 研究方向为个体化用药, (电子信箱)valentina_214@163.com。

△通信作者: 吕冬梅, 女, 主任药师, 研究方向为临床药学, (电子信箱)dongmeilv@163.com。

- [11] 顾海. 山茱萸活性成分 5-羟甲基糠醛对 H₂O₂ 诱导损伤的大鼠海马神经元保护作用的研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [12] 李恩灿, 贺玖明, 靳洪涛, 等. 4,5-羟甲基糠醛的药理和毒理研究进展[J]. 中国药物警戒, 2018, 15(4): 210-216.
- [13] 雷小小, 苏艳莹, 李美云, 等. 山茱萸环烯醚萜苷中马钱苷和莫

- 诺昔的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(1): 104-108.
- [14] 张嘉妮, 戴冰, 李玉星, 等. 酒制山茱萸炮制研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(12): 1604-1608.
- [15] 鲁静, 陈天朝, 马彦江, 等. 炮制对山茱萸有效成分含量的影响[J]. 中医药信息, 2020, 37(2): 43-46.

(收稿日期: 2020-07-13)

用药前后的肝肾功能,研究 MTHFR C677T(rs1801133) 和 ABCB1 C3435T(rs1045642) 2 个位点基因多态性对 MTX 排泄延迟及肝肾毒性的影响,为 HD-MTX 个体化用药提供更多依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集徐州医科大学附属医院 2019 年 4 月至 2020 年 5 月收治的 131 例血液系统恶性肿瘤成年患者的基本信息、给药剂量、合并用药情况等。其中男 67 例,女 64 例;平均年龄(54.31 ± 14.01)岁。纳入标准:入院后确诊为 ALL、中枢神经系统淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤等血液系统恶性肿瘤;采用大剂量($>500 \text{ mg/m}^2$)甲氨蝶呤注射液(辉瑞制药有限公司,进口药品注册证号 H20140205,规格为每支 10 mL:1 g)治疗,且化疗过程中未出现严重过敏反应;用药过程中及用药后 24 h 内未使用非甾体类抗炎药、复方磺胺甲噁唑及质子泵抑制剂等影响 MTX 血药浓度的药物;使用 HD-MTX 前 12 h 及用药后给予充分水化及碱化尿液;化疗前查血常规、肝肾功能等实验室指标均正常。

1.2 方法

1.2.1 血药浓度测定

采集患者给予 MTX 后 48 h 时的外周静脉血,加入乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管,离心,取上清液,使用 Viva-E 型快速血药浓度监测仪(德国 Siemens 公司)测定血药浓度并记录,以超过 $1 \mu\text{mol/L}$ 为排泄延迟^[6-7]。

1.2.2 基因型检测

使用核酸提取及纯化试剂(上海百傲科技有限公司)提取 DNA,置 -20°C 冰箱内贮存。使用聚合酶链反应(PCR)扩增试剂盒(上海生工生物工程有限公司),配制 50 μL 扩增体系,置 PCR 仪(美国 ABI 公司)内完成扩增。

引物(由上海生工合成)序列:MTHFR C677T(rs1801133),上游 5'-GGTCAGAAGCATATCAGTCATG-3',下游:5'-AGCGAACTCAGCACTCCAC-3'。

ABCB1 C3435T(rs1045642):上游 5'-TTCAGCT-GCTTGATGGCAA-3',下游 5'-AGGCACTGACTC-GATGAAGG-3'。

PCR 扩增程序:MTHFR C677T,95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min。95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s;58 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 40 s;共 30 个循环。72 $^\circ\text{C}$ 延伸 7 min 结束,4 $^\circ\text{C}$ 保存。ABCB1 C3435T,95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min。95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s;57.1 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s;共 30 个循环。72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min 结束,4 $^\circ\text{C}$ 保存。

检测:扩增结束后用 2% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行特异性验证。剩余 PCR 产物原液送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果以 CHOMAS 软件与 MTHFR 和 ABCB1 基因 SNP 位点的标准序列对照,以确定基因型。

1.2.3 肝肾功能评价

记录患者使用 HD-MTX 治疗前后的肝肾功能,肝脏毒性反应评价参照美国国立研究所常规毒性判定标准,其中肝功能损害主要表现为丙氨酸氨基转移酶水平升高;肾功能损害的判定为血肌酐值超过基础值的 1.5 倍。

1.3 统计学处理

采用 Excel 2019 和 SPSS 25.0 统计学软件分析。计数资料以率(%)表示,计数资料比较及基因型分布与 Hardy-Weinberg 平衡定律相符情况分析采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因型分布

采用 PCR-直接测序法测定 MTHFR 677 与 ABCB1 3435 位点基因型,结果见图 1 和图 2(箭头所指为变异碱基)。131 例患者中,MTHFR 677 CC 型 52 例(39.69%),CT 型 53 例(40.46%),TT 型 26 例(19.85%),C 和 T 的等位基因分布频率分别为 59.92% 和 40.08%。ABCB1 3435 CC 型 53 例(40.46%),CT 型 45 例(34.35%),TT 型 33 例(25.19%),C 和 T 的等位基因分布频率分别为 57.63% 和 42.37%。且 2 个位点均以 CC 型为野生纯合型,CT 型为突变杂合型,TT 型为突变纯合型。经 χ^2 检验,各基因多态位点基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 定律($P > 0.05$),入选样本具有群体代表性。

2.2 基因多态性与 MTX 排泄延迟的关系

131 例患者中,出现 MTX 排泄延迟 70 例(53.44%)。

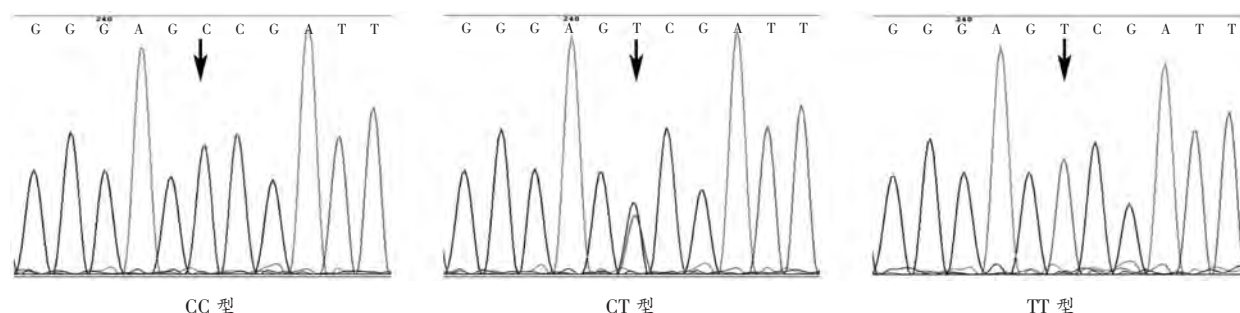


图 1 MTHFR 677 位点基因分型波形图

Fig. 1 Genotyping waveform figure of MTHFR 677 site

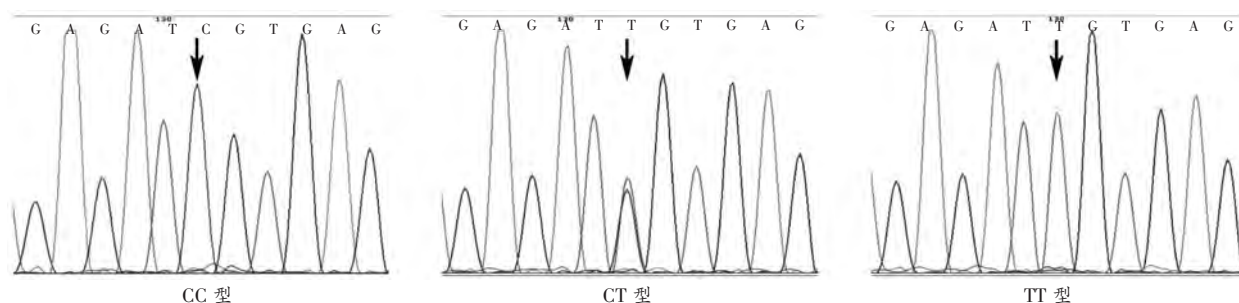


图2 ABCB1 3435 位点分型波形图

Fig. 2 Genotyping waveform figure of ABCB1 3435 site

MTHFR 677 位点及 ABCB1 3435 位点 CT 型携带者和 TT 型携带者发生排泄延迟的比例均高于 CC 型携带者,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 基因多态性与甲氨蝶呤排泄延迟的相关性[例(%)]

Tab. 1 The correlation between gene polymorphisms and MTX-elimination delay[case(%)]

基因型	排泄延迟	排泄正常	OR(95% CI)	χ^2 值	P 值
MTHFR 677					
CC 型(n=52)	26(50.00)	26(50.00)			
CT 型(n=53)	30(56.60)	23(43.40)	1.304(0.605,2.813)	0.460	0.498
TT 型(n=26)	14(53.85)	12(46.15)	1.167(0.454,2.997)	0.103	0.749
ABCB1 3435					
CC 型(n=53)	25(47.17)	28(52.83)			
CT 型(n=45)	25(55.56)	20(44.44)	1.400(0.630,3.190)	0.685	0.408
TT 型(n=33)	20(60.61)	13(39.39)	1.723(0.713,4.164)	1.472	0.225

2.3 基因多态性与 MTX 肝肾毒性的关系

131 例患者中,发生肝功能异常 23 例(17.56%),肾功能异常 10 例(7.63%)。由于发生肝肾损伤的人数较少,将患者按是否携带 T 等位基因分为 CC 型(野生型)组和 (CT+TT) 型(突变型)组进行分析。本研究中, MTHFR 677 位点 (CT+TT) 型携带者肝肾功能损伤发生率均较 CC 型高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见表 2; ABCB1 3435 位点 (CT+TT) 型携带者肝肾功能损伤发生率明显高于 CC 型($P < 0.05$),两者肾功能损伤发生率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 2 和表 3。

表 2 MTHFR 677 基因多态性与甲氨蝶呤肝肾损伤的相关性[例(%)]

Tab. 2 The correlation between gene polymorphism of MTHFR 677 and MTX-induced liver and kidney injury[case(%)]

损伤类型	CC 型(n=52)	(CT+TT) 型(n=79)	OR(95% CI)	χ^2 值	P 值
肝功能损伤	10(19.23)	13(16.45)	0.827(0.333,2.057)	0.167	0.683
肾功能损伤	3(5.77)	7(8.86)	1.588(0.391,6.442)	0.100	0.752

表 3 ABCB1 3435 基因多态性与甲氨蝶呤肝肾损伤的相关性[例(%)]

Tab. 3 The correlation between ABCB1 3435 gene polymorphism and MTX-induced liver and kidney injury[case(%)]

损伤类型	CC 型(n=53)	(CT+TT) 型(n=78)	OR(95% CI)	χ^2 值	P 值
肝功能损伤	3(5.66)	20(25.64)	5.747(1.612,20.487)	7.378	0.007
肾功能损伤	2(3.77)	8(10.26)	2.914(0.594,14.304)	1.074	0.300

3 讨论

MTHFR 是参与 DNA 合成和甲基化的重要限速酶,催化体内的 5,10-亚甲基四氢叶酸还原为 5-甲基四氢叶酸,影响核酸代谢过程。MTX 主要通过影响核酸代谢发挥细胞毒作用,药效与 5,10-亚甲基四氢叶酸的浓度呈正相关。ABCB1 主要位于细胞膜上,可以通过机体内 ATP 水解释放的能量以主动转运形式将药物泵出细胞,由它编码的 P-糖蛋白能影响药物在机体内的吸收、分布和排泄。

李静等^[8]研究发现,携带 MTHFR 677 位点 (CT+TT) 型 ALL 患者用药后 48 h 时的血药浓度明显高于 CC 型 ($P < 0.05$)。杨丽华等^[9]研究 40 例 ALL 患儿的结果显示,携带 (CT+TT) 型患儿接受 HD-MTX 治疗后 48 h 时的 MTX 血药浓度明显高于 CC 型 ($P = 0.006$)。但以上研究并未对患者 (儿) MTHFR 677 基因多态性与 MTX 用药后 48 h 排泄延迟的相关性进行讨论。李菲等^[10]的研究结果表明,携带 MTHFR 677 位点 (CT+TT) 型不同患儿的 MTX 排泄延迟发生率相当 ($P > 0.05$),本研究结果与之一致。近年来,对 ABCB1 3435 位点 (CT+TT) 型与 MTX 在体内代谢排泄相关性的研究结果也不尽相同。KIM 等^[11]研究 ABCB1 3435 (CT+CC) 型与 MTX 清除率的关联性时发现,CC 型和 CT 型携带者清除率明显大于 TT 型 ($P < 0.05$)。SUTHANDIRAM 等^[12]测定了亚洲成人 ALL 与非霍奇金淋巴瘤患者使用 HD-MTX 化疗后 48 h 的血药浓度与 ABCB1 3435 位点 (CT+TT) 型基因多态性。两者结果均与本研究一致。GREGERS 等^[13]对丹麦急性白血病患儿的显示,ABCB1 3435 位点 (CT+TT 型) 基因多态性对 MTX 的药物代谢动力学无明显影响,本研究中亦未发现该位点多态性与 MTX 排泄延迟有关。

郑苗苗等^[14]对 52 例 ALL 患儿进行了 MTHFR 677 位点 (CT+TT) 型基因型检测,按国立癌症研究所常规毒性判定标准对患者化疗后不良反应进行统一评价,结果显示,各基因型发生 HD-MTX 相关毒副反应的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。伍艳鹏等^[15]筛选了 ALL 患儿 73 例,PCR 扩增后测序鉴定 MTHFR 677 位点 (CT+

TT)基因型,显示该位点与MTX引发的不良反应无显著相关性。陈先睿等^[16]研究发现,闽南地区ALL患儿MTHFR 677位点(CT+TT)型不同基因组的MTX化疗肝肾功能损害发生率相当($P > 0.05$)。朱忱等^[17]纳入9篇文献进行Meta分析,结果与上述研究结果相同。本研究结果显示,MTHFR C677位点(CT+TT)型基因与肝肾功能损伤的发生率无明显相关性,ABCB1 3435位点(CT+TT)型携带者肝功能损伤的发生率明显较CC型高($P < 0.05$)。CORNET等^[18]的研究显示,当ABCB1 3435位点发生C>T突变后可产生不耐热的酶变体,导致用药后体内同型半胱氨酸水平迅速上升,造成肝功能损伤。陆爱东等^[19]报道,ALL患儿的ABCB1 3435位点(CT+TT)型在使用HD-MTX后肝功能损伤发生率高于CC型。朱影等^[20]研究发现,ABCB1 3435位点TT型携带者发生肝功能损伤的风险较高。刘爽等^[21]纳入12篇相关文献的Meta分析结论与上述资料相同。本研究结果与陆爱东等^[19]的研究结果一致。

综上所述,ABCB1 3435位点(CT+TT)型基因多态性与血液系统肿瘤患者使用HD-MTX后的肝功能损伤相关,后续将进一步研究MTX代谢排泄相关酶基因多态性与MTX排泄延迟、毒副作用相关性的机制,为HD-MTX个体化用药提供更多依据。

参考文献

- [1] 谈志远,陈 恩,刘 维,等. 大剂量甲氨蝶呤治疗血液肿瘤的临床现状分析[J]. 中国医院用药评价与分析,2019,19(6): 738-741.
- [2] HUI KH, CHU HM, FONG PS, et al. Population Pharmacokinetic Study and Individual Dose Adjustments of High-Dose Methotrexate in Chinese Pediatric Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia or Osteosarcoma[J]. Clin Pharmacol, 2019, 59(4): 566-577.
- [3] 孟 岑,卢雨昕,徐 刚,等. 在儿童急性淋巴细胞白血病中大剂量甲氨蝶呤药物毒性与基因多态性的相关性研究进展[J]. 实用药物与临床,2020,23(6):561-566.
- [4] 张春燕,任晓蕾,冯婉玉,等. MTHFR和ABCB1基因多态性对大剂量甲氨蝶呤毒性反应及排泄延迟的影响[J]. 中国新药杂志,2019,28(1):117-120.
- [5] 胡 川,徐 刚. 甲氨蝶呤代谢相关酶基因多态性与大剂量甲氨蝶呤治疗儿童急性淋巴细胞白血病中不良反应的相关性研究[J]. 实用药物与临床,2017,20(7):840-844.
- [6] 张 艾,胡 群,张柳清,等. ATIC和GSTP1基因多态性与大剂量甲氨蝶呤排泄延迟的相关性研究[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志,2018,23(2):85-88.
- [7] TSURUSAWA M, GOSHIO M, MORI T, et al. Statistical analysis of relation between plasma methotrexate concentration and toxicity in high-dose methotrexate therapy of childhood nonHodgkin lymphoma[J]. Pediatr Blood Cancer, 2015, 62(2):279-284.
- [8] 李 静,王 捷,郁长治,等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与急性淋巴细胞白血病患者甲氨蝶呤化疗药物不良反应的相关性研究[J]. 中国临床药理学杂志,2017,33(17): 1634-1650.
- [9] 杨丽华,刘 茹,曾其毅. 急性淋巴细胞白血病患者亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与大剂量甲氨蝶呤不良反应的相关性[J]. 实用儿科临床杂志,2012,27(6):440-442.
- [10] 李 菲,尹郭丹,周小兰,等. 急性淋巴细胞白血病患者GSTP1及MTHFR基因多态性对大剂量甲氨蝶呤不良反应的影响[J]. 中国实验血液学杂志,2017,25(3):723-728.
- [11] KIM IW, YUN HY, CHOI B, et al. ABCB1 C3435T genetic polymorphism on population pharmacokinetics of methotrexate after hematopoietic stem cell transplantation in Korean patients: a prospective analysis[J]. Clin Ther, 2012, 34(8):1816-1826.
- [12] SUTHANDIRAM S, GAN GG, ZAIN SM, et al. Effect of polymorphisms within methotrexate pathway genes on methotrexate toxicity and plasma levels in adults with hematological malignancies[J]. Pharmacogenomics, 2014, 15(11):1479-1494.
- [13] GREGER J, GREEN H, CHRISTENSEN IJ, et al. Polymorphisms in the ABCB1 gene and effect on outcome and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. The Pharmacogenomics Journal, 2015, 15(4):372-379.
- [14] 郑苗苗,岳丽杰,陈小文,等. 急性淋巴细胞白血病患者MTHFR基因多态性与大剂量甲氨蝶呤毒副反应的关系[J]. 中国当代儿科杂志,2013,15(3):201-206.
- [15] 伍艳鹏,贺湘玲,邹润英,等. 急性淋巴细胞白血病患者MTHFR基因多态性与大剂量甲氨蝶呤化疗后不良反应的关系[J]. 广东医学,2015,36(3):413-416.
- [16] 陈先睿,温 红,郭碧赞,等. 闽南地区急性淋巴细胞白血病患者亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与甲氨蝶呤的相关性[J]. 中华实用儿科临床杂志,2019,34(14):1068-1071.
- [17] 朱 忱,王晓玲,李晓玲. 急性淋巴细胞白血病患者亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)C677T多态性与甲氨蝶呤毒性相关性的Meta分析[J]. 实用药物与临床,2017,20(9): 1009-1014.
- [18] CORNET D, COHEN M, CLEMENT A, et al. Association between the MTHFR-C677T isoform and structure of sperm DNA[J]. Assist Reprod Genet, 2017, 34(10):1283-1288.
- [19] 陆爱东,张乐萍,王 彬,等. 转运蛋白基因多态性对儿童急性淋巴细胞白血病大剂量甲氨蝶呤治疗的影响[J]. 临床儿科杂志,2013,31(8):733-736.
- [20] 朱 影,楼一层,刘萌萌,等. ABCB1 3435 C>T基因多态性对急性淋巴细胞白血病患者大剂量甲氨蝶呤血药浓度及不良反应的影响[J]. 中国药师,2017,20(6):1058-1061.
- [21] 刘 爽,宋再伟,易湛苗,等. 血液肿瘤患者中多药耐药基因多态性对大剂量甲氨蝶呤不良事件影响的分析[J]. 中国临床药理学杂志,2019,35(19):2421-2425.

(收稿日期:2020-08-14)