

中图分类号: R969.4 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)08-0046-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.08.011



单核苷酸多态性对原发性中枢神经系统淋巴瘤患者 甲氨蝶呤疗效的影响*

武卓¹, 吴晗^{1,2}, 邱晓燕¹, 王斌¹, 丁天凌^{1△}

(1. 复旦大学附属华山医院, 上海 200040; 2. 上海健康医学院, 上海 201318)

摘要:目的 探讨甲氨蝶呤(MTX)作用通路上6个基因 *SLCO1B1*、*SLC19A1*、*ABCC2*、*ABCB1*、*FPGS*、*GGH* 的13个相关位点的单核苷酸多态性(SNPs)对原发性中枢神经系统淋巴瘤(PCNSL)患者使用MTX化学治疗4周期疗效的影响。方法 选取复旦大学附属华山医院2017年1月至2021年7月初诊为PCNSL且经4周期疗效评估的患者86例。调取其一般资料、疾病治疗资料、实验室检查结果。采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法对患者DNA样本进行分型。采用 χ^2 检验及多因素Logistic回归分析法分析SNPs对MTX疗效的影响。结果 单因素分析结果显示,rs1045642、rs2032582、rs2305558位点的SNPs对PCNSL患者MTX的疗效有影响($P < 0.05$)。多元回归分析结果显示,纳入MTX总剂量、性别、年龄、身高等混杂因素后,rs1045642位点SNPs仍对MTX疗效有影响($P < 0.05$)。结论 *ABCB1* rs1045642基因型可作为MTX疗效的独立影响因素,该研究为MTX的临床个体化给药提供了一定依据。

关键词:甲氨蝶呤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;单核苷酸多态性;个体化给药

Effect of Single Nucleotide Polymorphism on the Efficacy of Methotrexate in Patients with Primary Central Nervous System Lymphoma

WU Zhuo¹, WU Han^{1,2}, QIU Xiaoyan¹, WANG Bin¹, DING Tianling¹

(1. Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai, China 200040; 2. Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai, China 201318)

Abstract: Objective To investigate the effect of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of 13 loci of 6 genes *SLCO1B1*, *SLC19A1*, *ABCC2*, *ABCB1*, *FPGS* and *GGH* on the efficacy of four cycles of MTX chemotherapy in patients with primary central nervous system lymphoma (PCNSL). **Methods** Patients who were newly diagnosed with PCNSL and evaluated by four cycles of efficacy in Huashan Hospital, Fudan University were selected as the research subjects from January 2017 to July 2021, and the general data, disease treatment data and laboratory test results were collected. The demographic data and clinical data of 86 patients with PCNSL were obtained from the clinical electronic medical record system. The patient's DNA samples were typed by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. The effect of SNPs on the efficacy of MTX was analyzed by χ^2 test and multivariate Logistic regression. **Results** Univariate analysis showed that the SNPs of rs1045642, rs2032582 and rs2305558 had an effect on the efficacy of MTX in patients with PCNSL ($P < 0.05$). Multiple regression analysis showed that rs1045642 still had an effect on the efficacy of MTX ($P < 0.05$) after including confounding factors such as total dose of MTX, gender, age, height. **Conclusion** *ABCB1* rs1045642 genotype can be used as an independent influencing factor of MTX efficacy. This study provides a basis for clinical individualized dosing of MTX.

Key words: methotrexate; primary central nervous system lymphoma; single nucleotide polymorphisms; individualized dosing

原发性中枢神经系统淋巴瘤(PCNSL)属大B细胞淋巴瘤的独特亚型,为罕见的淋巴结外侵袭性非霍奇金淋巴瘤,主要累及脑、脊髓或视网膜^[1]。其在美国的年发病率为0.47/10万,占有淋巴瘤的1%及所有中枢神经系统肿瘤的2%~3%^[2-3]。大剂量(>500 mg/m²)甲氨蝶呤(MTX)的治疗方案使15%~20%的患者获得了长期生存。然而即便如此,PCNSL的5年生存率仅为

30%^[4]。MTX在体内通过溶质载体转运体19家族1(SLC19A1)或溶质载体有机阴离子转运体家族成员1B1(SLCO1B1)转运进入细胞^[5]。在细胞内,叶酸聚谷氨酸合成酶(*FPGS*)和谷氨酰水解酶基因(*GGH*)可分别通过调节MTX与谷氨酸残基的结合及解离,影响其在胞浆的滞留及排泄^[6],最终MTX在多药耐药蛋白(*ABCB1*基因编码)及多药耐药相关蛋白2(*ABCC2*基因编

* 基金项目:国家自然科学基金[82003863];上海市卫生健康委员会科研课题[201740058,202040424];上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划项目[沪卫人事[2021]99号]。

第一作者:武卓,女,博士,副主任药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)zwu14@fudan.du.cn。

△通信作者:丁天凌,男,博士,副主任医师,研究方向为血液肿瘤,(电子信箱)dlt_953105@163.com。

码)的作用下转运出细胞^[7-8]。然而在MTX治疗过程中,不同患者的疗效却存在较大差异^[9-10]。有研究发现,年龄、是否进行手术切除、脑脊液蛋白浓度、大脑深层结构是否受累等均可能与PCNSL患者预后相关^[11]。同时,单核苷酸多态性(SNPs)等遗传因素亦会影响MTX的疗效,进而导致个体差异。关于MTX临床结局与基因多态性的相关性,SANDHU等^[9]及LIU等^[12]研究发现,*GGH* rs11545078与*FPGS* rs1544105分别与MTX治疗风湿性关节炎和儿童B细胞前体急性淋巴细胞白血病的疗效相关。本课题组既往研究发现*ABCB1* rs1045642 GG基因型患者及rs2032582 G等位基因携带者疾病进展风险较高,两者可共同作为PCNSL患者无进展生存期(PFS)的独立预测因子^[13]。目前,尚未有研究报道上述基因多态性与PCNSL患者使用MTX为基础的化疗方案短期疗效的相关性。为此,本研究中通过对MTX作用通路的关键基因*SLCO1B1*、*SLC19A1*、*ABCC2*、*ABCB1*、*FPGS*、*GGH*的13个相关位点进行基因多态性检测,分析SNPs与PCNSL患者4周期化疗后疗效的相关性,以期找出预测MTX疗效的生物标记物,为PCNSL的临床治疗提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入标准:符合2016年世界卫生组织淋巴瘤分类标准^[14]中PCNSL相关标准;年龄>18岁;接受MTX单药或联合阿糖胞苷、多柔比星脂质体、依托泊苷、长春地辛、利妥昔单抗等药物的化学治疗(简称化疗)方案。本研究符合“赫尔辛基宣言”,本方案获得医院医学伦理委员会批准(批件号2021-974),患者签署知情同意书。

排除标准:不符合标准给药方案;人类免疫缺陷病毒阳性和免疫抑制相关PCNSL;无法进行疗效评估。

病例选择:选取复旦大学附属华山医院2017年1月至2021年7月初诊为PCNSL且经4周期疗效评估的患者86例。患者人口学资料与临床特征见表1。

1.2 数据收集

从电子病历系统中获取以下数据:1)一般资料,包括患者的姓名、性别、身高、体质量、年龄等;2)疾病治疗资料,包括MTX剂量、化疗时间及方案、是否经手术切除、初始症状、是否存在深部累及、疗效评估结果等;3)实验室检查结果,包括脑脊液蛋白、氯、糖、乳酸脱氢酶(LDH)、 β_2 微球蛋白水平等。

1.3 位点选择及基因型分析

选择*SLCO1B1*、*SLC19A1*、*ABCC2*、*ABCB1*等MTX转运相关基因中的6个有临床意义的阳性位点,以及与MTX胞内作用相关的*FPGS*及*GGH*基因的7个Tag SNPs位点。取2 mL患者血样,提取DNA。使用基

表1 患者人口学资料与临床特征(n=86)

Tab.1 Demographic data and clinical characteristics of patients (n = 86)

特征	数值
性别[例(%)]	
男	57(66.28)
女	29(33.72)
年龄($\bar{X} \pm s$,岁)	57.1 \pm 15.9
初始症状	
[例(%)]	
头痛、恶心、呕吐	44(51.16)
运动障碍	42(48.84)
言语障碍	10(11.63)
视力障碍	13(15.12)
认知缺陷	26(30.23)
LDH[M(P_{25}, P_{75}),U/L]	175(129.0,408.0)
血 β_2 微球蛋白[M(P_{25}, P_{75}),mg/L]	1.71(0.86,3.51)
脑脊液蛋白[M(P_{25}, P_{75}),mg/L]	481(288,15000)
脑脊液氯[M(P_{25}, P_{75}),mmol/L]	121(100,216)
脑脊液糖[M(P_{25}, P_{75}),mmol/L]	3.40(1.10,6.70)
MRI存在深部累及[例(%)]	69(80.23)
手术切除[例(%)]	37(43.02)

辅助激光解吸电离飞行时间质谱法对MTX作用通路上6个基因的13个位点进行基因分型。

1.4 预后评估标准

可分为完全缓解、部分缓解、疾病稳定和疾病进展^[15]。本研究主要临床终点为患者的客观缓解率。客观缓解=完全缓解+部分缓解。

1.5 统计学处理

采用Excel 2020软件录入数据,SPSS 22.0统计软件分析人口学资料和临床特征。连续变量采用Kolmogorov-Smirnov检验,符合正态分布时以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行独立样本t检验;非正态分布时以M(P_{25}, P_{75})表示,分类变量采用率描述,行 χ^2 检验。非正态分布的连续变量均值行Mann-Whitney U检验。等位基因及基因型频率采用SHEsis在线软件(<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)进行计算;Hardy-Weinberg平衡行 χ^2 检验。将上述统计结果中P<0.05的变量纳入Logistic回归模型,考察引入混杂因素后SNPs对MTX疗效的影响。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因型与位点频率分布

13个SNPs位点在染色体的分布及等位基因频率见表2。所有位点的分布均符合Hardy-Weinberg平衡。

2.2 SNPs对MTX化疗疗效的影响

考虑到样本量的因素,本研究中将基因型分为2类,即纯合子次要等位基因型和杂合子等位基因型,以及纯合子主要等位基因型。结果提示rs1045642、rs2032582、*GGH* rs2305558位点的单核苷酸多态性与患

表2 13个SNPs位点在染色体的分布及其等位基因频率

Tab.2 Distribution and allele frequency of 13 SNPs loci on chromosomes

序号	基因	Rs 编号	位点	等位基因	P 值	功能
1	GGH	rs2305558	Chr 8	T / C	0.969	内含子
2	GGH	rs13248452	Chr 8	G / A	0.699	内含子
3	GGH	rs13268472	Chr 8	A / G	0.534	内含子
4	GGH	rs2736683	Chr 8	A / T	0.275	内含子
5	FPGS	rs1544105	Chr 9	C / T	0.777	基因上游
6	FPGS	rs10987742	Chr 9	T / C	0.990	内含子
7	FPGS	rs10106	Chr 9	T / C	0.922	3' UTR
8	ABCB1	rs2032582	Chr 7	T / C / A	0.590	外显子错义突变
9	ABCB1	rs1045642	Chr 7	A / G	0.811	外显子同义突变
10	ABCC2	rs717620	Chr 10	T / C	0.879	5' UTR
11	SLC19A1	rs1051266	Chr 21	T / C	0.790	外显子错义突变
12	SLCO1B1	rs4149056	Chr 12	C / T	0.725	外显子错义突变
13	SLCO1B2	rs2306283	Chr 12	A / G	0.068	外显子错义突变

表3 13个SNPs对PCNSL患者疗效影响的单因素分析[例(%)]

Tab.3 Univariate analysis of the effect of 13 SNPs on the efficacy of PCNSL patients [case (%)]

SNPs	等位基因	客观缓解(n=36)		未缓解(n=50)		P 值
		12+11 [†]	22	12+11	22	
GGH	rs2305558 T/C	23(63.89)	13(36.11)	19(38.00)	31(62.00)	0.018
	rs13248452 G/A	20(55.56)	16(44.44)	34(68.00)	16(32.00)	0.239
	rs13268472 A/G	12(33.33)	24(66.67)	17(34.00)	33(66.00)	0.949
	rs2736683 A/T	9(25.00)	27(75.00)	8(16.00)	42(84.00)	0.301
FPGS	rs1544105 C/T	20(55.56)	16(44.44)	33(66.00)	17(34.00)	0.326
	rs10987742 T/C	19(52.78)	17(47.22)	27(54.00)	23(46.00)	0.911
	rs10106 T/C	20(55.56)	16(44.44)	32(64.00)	18(36.00)	0.429
ABCB1	rs2032582 G/T/A	7(19.44)	29(80.56)	21(42.00)	29(58.00)	0.028
	rs1045642 A/G	32(88.89)	4(11.11)	28(56.00)	22(44.00)	0.001
ABCC2	rs717620 T/C	15(41.67)	21(58.33)	20(40.00)	30(60.00)	0.877
SLC19A1	rs1051266 T/C	29(80.56)	7(19.44)	36(72.00)	14(28.00)	0.362
SLCO1B1	rs4149056 C/T	6(16.67)	30(83.33)	9(18.00)	41(82.00)	0.872
	rs2306283 A/G	14(38.89)	22(61.11)	23(46.00)	27(54.00)	0.511

者使用MTX后疗效相关($P < 0.05$)。详见表3(表中,等位基因以低频率者在前;“11、12、22”中的1、2是指每个SNP的低频率等位基因和高频率等位基因;对于有3个SNPs的rs2032582,11+12为含有G等位基因的单倍型,22为仅含有A或T等位基因的单倍型)。

单因素分析结果显示,13个SNPs中,ABCB1 rs1045642、rs2032582及GGH rs2305558基因型对MTX疗效有影响。此外,MTX总剂量、身高、年龄、性别等因素对MTX疗效亦有影响。将上述阳性结果纳入多因素Logistic回归模型,研究发现ABCB1 rs1045642基因型可影响PCNSL患者MTX疗效(见表4),A等位基因非携带者客观缓解率仅为携带者的0.791倍。因此,推测AB-

表4 86例PCNSL患者中SNPs对MTX疗效影响的多因素分析(n=86)

Tab.4 Multivariate analysis of the effect of SNPs on the efficacy of MTX in 86 PCNSL patients (n = 86)

项目	B	P	Exp(95%CI)
性别	-0.012	0.991	0.989(0.142, 6.863)
身高	0.131	0.043	1.140(1.004, 1.294)
年龄	-1.198	0.147	0.302(0.060, 1.524)
MTX总剂量	0.036	0.731	1.036(0.845, 1.271)
rs1045642 GG	-0.234	0.008	0.791(0.666, 0.940)
AA + AG			/
rs2032582	0.099	0.229	1.104(0.940, 1.296)
rs2305558	-0.12	0.135	0.887(0.758, 1.038)

CBI rs1045642基因型可作为PCNSL患者MTX疗效的独立影响因素。此外,身高对患者MTX疗效有影响。

3 讨论

本研究中共纳入了MTX作用通路的13个SNPs,结果显示,ABCB1 rs1045642基因型可作为判断MTX化疗后影响疗效的独立标志物,A等位基因携带者的客观缓解率更高,疗效较好。

P-糖蛋白由ABCB1基因编码,位于包括淋巴细胞和血脑屏障毛细血管内皮细胞在内的多种细胞外膜上,由于可将药物外排转运至胞外,在肿瘤的多药耐药性中发挥了重要作用^[16-17]。rs1045642(G3435A)是ABCB1中广泛研究的SNP之一,既往研究发现,rs1045642 AA基因型患者可能药物浓度更高。如在肝或肾脏移植患者中,ABCB1 rs1045642 AA基因型携带者的他克莫司校正谷浓度高于CC野生型携带者^[18-19]。XIE等^[20]在服用新型口服抗凝剂的患者中也得出了相同的结论。对于血液肿瘤成年患者,rs1045642 AA基因型在MTX 48 h血药浓度超过1 μmol/L的患者中更多见^[21]。AVIVI等^[22]在发现经MTX治疗后,在24和48 h MTX血药浓度(C) > 0.2 μmol/L的成人非霍奇金淋巴瘤患者中,ABCB1 rs1045642 AA基因型的频率更高。ABCB1 rs1045642是同义SNP,不会造成编码蛋白质的氨基酸序列发生改变,推测ABCB1 3435 G > A点突变通过降低ABCB1 mRNA的稳定性,降低mRNA及P-糖蛋白表达水平;同时,该位点突变可能影响P-糖蛋白折叠及插入细胞膜的时间,进而导致底物特异性降低,药物泵出减少,从而升高药物浓度或暴露量^[23]。

此外,在接受大剂量MTX治疗的儿童急性淋巴细胞白血病患者中,ABCB1 rs1045642 A等位基因携带者复发风险更低,预后更好^[24]。考虑血液和脑脊液MTX水平之间的直接关联^[22],推测ABCB1 rs1045642对MTX的AUC_{0-48h}和C_{max}的影响导致了PCNSL患者的疗

效差异性。

本研究中发现, *ABCB1* rs1045642 位点 SNP 对 PCNSL 患者的 MTX 短期疗效有意义, 与课题组既往研究中 rs1045642 A 等位基因携带者的 PD 风险较低, PFS 较高的结论相一致, 提示了 rs1045642 位点在 PCNSL 患者疗效预测中的意义^[13,25]。未来这一结果是否可应用到临床, 尚需在后续研究中进一步验证, 以期对 PCNSL 的个体化治疗提供更有效、更充分的依据。

参考文献

- [1] DECKERT M, ENGERT A, BRUCK W, et al. Modern concepts in the biology, diagnosis, differential diagnosis and treatment of primary central nervous system lymphoma[J]. *Leukemia*, 2011, 25(12): 1797 – 1807.
- [2] DOLECEK TA, PROPP JM, STROUP NE, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005 – 2009 [J]. *Neuro – oncology*, 2012, 14(Suppl 5): v1 – v49.
- [3] VILLANO JL, KOSHY M, SHAIKH H, et al. Age, gender, and racial differences in incidence and survival in primary CNS lymphoma[J]. *British Journal of Cancer*, 2011, 105(9): 1414 – 1418.
- [4] SHIELS MS, PFEIFFER RM, BESSON C, et al. Trends in primary central nervous system lymphoma incidence and survival in the US [J]. *British Journal of Haematology*, 2016, 174(3): 417 – 424.
- [5] RADTKE S, ZOLK O, RENNER B, et al. Germline genetic variations in methotrexate candidate genes are associated with pharmacokinetics, toxicity, and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 2013, 121(26): 5145 – 5153.
- [6] DE BEAUMAIS TA, JACQZ – AIGRAIN E. Intracellular disposition of methotrexate in acute lymphoblastic leukemia in children[J]. *Current Drug Metabolism*, 2012, 13(6): 822 – 834.
- [7] KONIG J, NIES AT, CUI Y, et al. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2 – mediated drug resistance[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1461(2): 377 – 394.
- [8] LUI G, TRELUYER JM, FRESNEAU B, et al. A Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Analysis of Osteosarcoma Patients Treated With High – Dose Methotrexate: Data From the OS2006/ Sarcoma – 09 Trial [J]. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2018, 58(12): 1541 – 1549.
- [9] SANDHU A, AHMAD S, KAUR J, et al. Do SNPs in folate pharmacokinetic pathway alter levels of intracellular methotrexate polyglutamates and affect response? A prospective study in Indian patients [J]. *Clinical Rheumatology*, 2018, 37(12): 3221 – 3228.
- [10] SANDHU A, DHIR V, BHATNAGAR A, et al. High Methotrexate Triglutamate Level Is an Independent Predictor of Adverse Effects in Asian Indian Rheumatoid Arthritis Patients – A Preliminary Study[J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2017, 39(2): 157 – 163.
- [11] FERRERI AJ, BLAY JY, RENI M, et al. Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21(2): 266 – 272.
- [12] LIU SG, GAO C, ZHANG RD, et al. FPGS rs1544105 polymorphism is associated with treatment outcome in pediatric B – cell precursor acute lymphoblastic leukemia [J]. *Cancer Cell International*, 2013, 13(1): 107.
- [13] WU Z, LI Z, QIU X, et al. Germline genetic variations in methotrexate pathway are associated with pharmacokinetics, outcome, and toxicity in patients with primary central nervous system lymphoma [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2023, 16(4): 371 – 381.
- [14] SWERDLOW SH, CAMPO E, PILERI SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms [J]. *Blood*, 2016, 127(20): 2375 – 2390.
- [15] ABREY LE, BATCHELOR TT, FERRERI AJ, et al. Report of an international workshop to standardize baseline evaluation and response criteria for primary CNS lymphoma [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23(22): 5034 – 5043.
- [16] PAULI – MAGNUS C, KROETZ DL. Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (*ABCB1*) [J]. *Pharmaceutical Research*, 2004, 21(6): 904 – 913.
- [17] ROBEY RW, PLUCHINO KM, HALL MD, et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug – resistant cancer [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2018, 18(7): 452 – 464.
- [18] WANG WL, JIN J, ZHENG SS, et al. Tacrolimus dose requirement in relation to donor and recipient *ABCB1* and *CYP3A5* gene polymorphisms in Chinese liver transplant patients [J]. *Liver Transplantation*, 2006, 12(5): 775 – 780.
- [19] LOH PT, LOU HX, ZHAO Y, et al. Significant impact of gene polymorphisms on tacrolimus but not cyclosporine dosing in Asian renal transplant recipients [J]. *Transplantation Proceedings*, 2008, 40(5): 1690 – 1695.
- [20] XIE QF, XIANG Q, MU GY, et al. Effect of *ABCB1* Genotypes on the Pharmacokinetics and Clinical Outcomes of New Oral Anticoagulants: A Systematic Review and Meta – analysis [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24(30): 3558 – 3565.
- [21] 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.
- [22] AVIVI I, ZUCKERMAN T, KRIVOY N, et al. Genetic polymorphisms predicting methotrexate blood levels and toxicity in adult non – Hodgkin lymphoma [J]. *Leukemia & Lymphoma*, 2014, 55(3): 565 – 570.
- [23] STAATZ CE, GOODMAN LK, TETT SE. Effect of *CYP3A* and *ABCB1* Single Nucleotide Polymorphisms on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Calcineurin