

GSTP1(rs1695)基因多态性与自体造血干细胞移植患者血液学毒性的关系研究

张关敏^{1*},刘卫平²,马旭¹,朱军²,王小沛²,张艳华^{1#}(1.北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所药剂科/恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室,北京 100142;2.北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所淋巴瘤内科/恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室,北京 100142)

中图分类号 Q786;R446.11 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)07-0980-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.07.28

摘要 目的:研究*GSTP1*(rs1695)(简称*GSTP1*)基因多态性与自体造血干细胞移植患者使用CBV方案(环磷酰胺、卡莫司汀、依托泊苷)预处理后血液学毒性之间的关系。方法:对2015年4月—2017年6月到我院治疗的83例使用CBV方案预处理的自体造血干细胞移植患者进行回顾性分析,采用荧光染色原位杂交检测法测定*GSTP1*A313G的多态性,统计血液学毒性和粒细胞缺乏性发热发生率以及白细胞、中性粒细胞、血小板植入时间,分析*GSTP1*基因与上述指标之间的关系。结果:83例患者中28例(33.73%)存在有至少1个基因位点的变异,A等位基因频率为81.3%,G等位基因频率为18.7%。*GSTP1*AA基因型患者发生Ⅳ度白细胞、Ⅳ度中性粒细胞、Ⅳ度血小板减少的时间分别为化疗后(8.91±1.25)、(9.02±1.19)、(11.56±1.58)d,携带*GSTP1*313等位基因G(AG/GG基因型)的患者减少的时间分别为化疗后(8.61±1.17)、(8.68±1.19)、(11.44±1.34)d。*GSTP1*AA基因型患者白细胞、中性粒细胞、血小板的植入时间分别为自体造血干细胞回输后(11.98±1.99)、(10.44±1.35)、(15.55±2.18)d;携带*GSTP1*313等位基因G(AG/GG基因型)的患者植入时间分别为自体造血干细胞回输后(12.41±2.44)、(10.36±1.62)、(16.29±3.15)d。*GSTP1*AA基因型及携带*GSTP1*313等位基因G(AG/GG基因型)的患者移植期间发生Ⅲ~Ⅳ度贫血的患者分别为24、11例,分别占对应基因型患者的43.64%、39.29%;发生粒细胞缺乏性发热的分别为21、11例,分别占对应基因型患者的38.18%、39.29%,但上述差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:*GSTP1*基因多态性与自体造血干细胞移植患者使用CBV方案预处理后的血液学毒性未见相关性,亦不影响干细胞植入时间。

关键词 *GSTP1*(rs1695);基因多态性;CBV方案;自体造血干细胞移植;血液学毒性

Study on the Relationship of *GSTP1* (rs1695) Genetic Polymorphism with Hematological Toxicity of Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation Patients

ZHANG Guanmin¹, LIU Weiping², MA Xu¹, ZHU Jun², WANG Xiaopei², ZHANG Yanhua¹(1.Dept. of Pharmacy, Peking University Cancer Hospital & Beijing Institute of Cancer Prevention and Control/Key Lab of Malignant Tumor Carcinogenesis and Translational Research, Ministry of Education, Beijing 100142, China; 2.Dept. of Lymphatic Tumor Internal Medicine, Peking University Cancer Hospital & Beijing Institute for Tumor Prevention and Treatment/Key Lab of Malignant Tumor Carcinogenesis and Translational Research, Ministry of Education, Beijing 100142, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the relationship of *GSTP1* (rs1695) (simply as *GSTP1*) gene polymorphism with the hematological toxicity in autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) patients who used CBV regimen (cyclophosphamide, carmustine, etoposide). METHODS: A total of 83 AHSCT patients receiving CBV regimen were retrospective analyzed in our hospital during Apr. 2015-Jun. 2017. The gene polymorphism of *GSTP1* A313G was detected by fluorescence staining in situ hybridization. The hematological toxicity and the incidence of agranulocytosis fever, the implantation time of leukocyte, neutrophils and platelet were analyzed statistically. The relationship of *GSTP1* with above indexes were analyzed. RESULTS: Among 83 patients, gene variation was observed in one gene loci at least of 28 patients (33.73%). The gene frequency of A allele was 81.3%, while that of G allele was 18.7%. The reduce time of Ⅳ grade leukopenia, Ⅳ grade neutropenia and Ⅳ grade thrombocytopenia in *GSTP1* AA genotype patients were (8.91±1.25), (9.02±1.19), (11.56±1.58) d after chemotherapy;

* 主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:010-8196338。
E-mail:guanmin.zh@foxmail.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。电话:010-88196206。E-mail:zyh8812@163.com

those of patients with *GSTP1* 313 allele G (AG/GG genotype) were (8.61±1.17), (8.68±1.19), (11.44±1.34) d after chemotherapy. The implantation time of leukocyte, neutrophils and platelet in patients with *GSTP1* AA genotype were

(11.98 ± 1.99), (10.44 ± 1.35), (15.55 ± 2.18) d after autologous peripheral blood stem cell reinfusion; those of patients with *GSTP1* 313 allele G (AG/GG genotype) were (12.41 ± 2.44), (10.36 ± 1.62), (16.29 ± 3.15) d after autologous peripheral blood stem cell reinfusion. The case number of grade III-IV anemia were 24 and 11, accounting for 43.64% and 39.29% of corresponding genotype patients. The case number of agranulocytosis fever in patients with *GSTP1* AA genotype or *GSTP1* 313 allele G (AG/GG genotype) were 21 and 11 during transplantation, accounting for 38.18% and 39.29% of corresponding genotype patients, respectively, without statistical significantly ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: There is no relationship between *GSTP1* gene polymorphism and hematological toxicity of AHSCT patients receiving CBV regimen.

KEYWORDS *GSTP1*; Gene polymorphism; CBV regimen; Autologous hematopoietic stem cell transplantation; Hematological toxicity

大剂量化疗联合自体造血干细胞移植是晚期淋巴瘤的巩固治疗手段,也是复发难治淋巴瘤的挽救治疗方法,能够延长患者的生存期、提高患者的生活质量^[1]。含有环磷酰胺的预处理方案,如BuCy方案(白消安、环磷酰胺)及CBV方案(环磷酰胺、卡莫司汀、依托泊苷)等是造血干细胞移植前常用的预处理化疗方案^[2-3],常见的不良反应有骨髓抑制、消化道反应、感染等。

环磷酰胺是一种无活性的前药,在体内首先经细胞色素 P₄₅₀ 酶(CYP)系代谢活化,生成4-羟基环磷酰胺(4-OHCPA)而发挥细胞毒作用,4-OHCPA可进一步转化为磷酰胺氮芥和丙烯醛,4-OHCPA及磷酰胺氮芥在谷胱甘肽S-转移酶(GSTs)的催化下,与谷胱甘肽形成水溶性复合物从尿液或胆汁中排出体外^[4]。已有研究表明,*GSTP1*(rs1695)(下文简称*GSTP1*)313位点由A突变为G可影响GSTs的表达及活性,使环磷酰胺及其代谢产物的排泄减少,在体内蓄积增加,导致患者疗效及不良反应之间出现差异^[5-6]。本研究以接受CBV方案预处理化疗的自体造血干细胞移植患者为研究对象,探讨*GSTP1*A313G基因多态性与患者血液学毒性之间的关系,旨在为临床应用提供参考。

1 资料来源与方法

1.1 病例资料

对2015年4月—2017年6月在北京大学肿瘤医院接受自体造血干细胞移植的淋巴瘤患者进行回顾性分析,所有患者根据2008年世界卫生组织(WHO)淋巴瘤诊断标准^[7],经病理活检确诊为淋巴瘤。按照Ann-Arbor淋巴瘤分期标准^[8],将患者分为I、II、III、IV期。

1.2 治疗方法

所有患者均给予大剂量预处理化疗联合自体造血干细胞移植治疗。将患者自体造血干细胞回输的时间定义为第0天。预处理采用CBV方案:环磷酰胺 1.25 g/m²(-5~-2 d),卡莫司汀 300 mg/m²(-6 d),依托泊苷 200 mg/m²(-5~-2 d)。

1.3 DNA序列测定方法

采用荧光染色原位杂交检测法进行检测。具体方法:抽取患者外周静脉血2 mL,置于乙二胺四乙酸抗凝

管中,取150 μL血加入1 mL红细胞裂解液,静置5 min;使用Scilogex D2012型离心机离心5 min,弃上清,加入核酸纯化试剂(北京华夏时代基因科技发展有限公司),混匀后加入相应位点的测序反应通用试剂(北京华夏时代基因科技发展有限公司),采用TL988A型双通道实时荧光定量检测仪(西安天隆科技有限公司)检测*GSTP1*A313G位点基因多态性。

1.4 观察指标

查阅病例资料,统计患者IV度白细胞减少、IV度中性粒细胞减少、IV度血小板减少的发生率、发生时间以及白细胞、中性粒细胞和血小板的植入时间。记录患者贫血分级,以及是否发生粒细胞缺乏性发热,并计算III~IV度贫血的发生率。

根据2009年美国国立癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)制定的不良事件通用术语标准(CTCAE, 4.0版)^[9],IV度白细胞减少定义为:白细胞计数 $< 1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$;IV度中性粒细胞减少的定义为:中性粒细胞计数 $< 0.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$;IV度血小板减少定义为血小板计数 $< 25 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 。白细胞、中性粒细胞、血小板植入时间的定义为:从自体造血干细胞回输开始白细胞计数连续3 d $> 4 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的第1天、中性粒细胞计数连续3 d $> 0.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的第1天;从自体造血干细胞回输开始血小板计数连续3 d $> 20.0 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 的第1天(在此前1周内未输注血小板的前提下)。贫血判断标准:I度为血红蛋白低于正常参考值下限且 $\geq 100 \text{ g/L}$,II度为血红蛋白 < 100 且 $\geq 80 \text{ g/L}$,III度血红蛋白 < 80 且 $\geq 65 \text{ g/L}$,IV度为血红蛋白 $< 65 \text{ g/L}$ 。粒细胞缺乏性发热的定义为:中性粒细胞计数 $< 0.5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$,同时单次口温超过38.3 °C或超过38.0 °C高于1 h。

1.5 统计学方法

使用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析,对*GSTP1*A313G基因型及等位基因频率进行 χ^2 检验,判断等位基因频率分布是否符合Hardy-Weinberg平衡定律,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P > 0.05$ 表示所研究群体符合Hardy-Weinberg平衡定律。其余计量资料采用 t 检验和Mann-Whitney检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ (双侧)为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料

共有83例患者纳入研究,其中男性59例、女性24例;中位年龄37岁(14~63岁);诊断为霍奇金淋巴瘤24例、非霍奇金淋巴瘤59例(其中B细胞淋巴瘤48例、T细胞淋巴瘤11例)。确诊时Ann-Arbor分期患者:I期4例、II期11例、III期17例、IV期51例。35例(42.2%)存在盗汗、发热和体质量减轻的症状。患者基线资料见表1。

表1 患者基线资料

Tab 1 Baseline date of patients

项目	患者例数	构成比,%
性别		
男性	59	71.08
女性	24	28.92
病理类型		
霍奇金淋巴瘤	24	28.92
非霍奇金淋巴瘤	59	71.08
Ann-Arbor分期		
I期	4	4.82
II期	11	13.25
III期	17	20.48
IV期	51	61.45

2.2 *GSTP1* 基因多态性

83例患者*GSTP1*基因的313位碱基,A等位基因频率为81.3%,G等位基因频率为18.7%。28例(33.73%)患者至少存在1个位点变异。检测结果经Hardy-Weinberg检验, $P>0.05$,说明各基因型频率达到遗传平衡,研究资料具有群体代表性,患者*GSTP1*基因型分布详见表2。

表2 患者*GSTP1*基因型分布

Tab 2 Distribution of *GSTP1* genotype

基因型	患者例数	构成比,%	Hardy-Weinberg检验	
			χ^2	P
<i>GSTP1</i> (rs1695)			0.006	0.94
AA	55	66.27		
AG	25	30.12		
GG	3	3.61		

2.3 基因多态性对血液学毒性的影响

83例患者均出现IV度白细胞减少及IV度中性粒细胞减少,79例患者(AA基因型52例、AG基因型24例、GG基因型3例)出现IV度血小板减少;48例患者(AA基因型31例、AG基因型15例、GG基因型2例)出现I~II度贫血,35例患者(AA基因型24例、AG基因型10例、GG基因型1例)出现III~IV度贫血;32例患者(AA基因型21例、AG基因型11例)出现粒细胞缺乏性发热;AA基因型患者与携带*GSTP1* 313等位基因G(AG/GG基因型)患者比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。患者使用CBV方案预处理后血液学毒性与*GSTP1*基因多态性的关系见表3。

表3 患者使用CBV方案预处理后血液学毒性发生与*GSTP1*基因多态性的关系

Tab 3 Relationship between *GSTP1* gene polymorphism and hematological toxicity of patients receiving CBV pretreatment

基因型	n	IV度白细胞减少例数(%)	IV度中性粒细胞减少例数(%)	IV度血小板减少例数(%)	III~IV度贫血例数(%)	粒细胞缺乏性发热例数(%)
AA	55	55(100)	55(100)	52(94.55)	24(43.64)	21(38.18)
AG/GG	28	28(100)	28(100)	27(96.43)	11(39.29)	11(39.29)
总计	83	83(100)	83(100)	79(95.18)	35(42.17)	32(38.55)
P				1.000	0.704	0.922

AA基因型患者发生IV度白细胞、IV度中性粒细胞、IV度血小板减少的时间与携带*GSTP1* 313等位基因G(AG/GG基因型)患者比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。患者使用CBV方案预处理后血液学毒性发生时间与*GSTP1*基因多态性的关系见表4。

表4 患者使用CBV方案预处理后血液学毒性发生时间与*GSTP1*基因多态性的关系($\bar{x} \pm s, d$)

Tab 4 Relationship between *GSTP1* gene polymorphism and occurrence time of hematological toxicity of patients receiving CBV pretreatment ($\bar{x} \pm s, day$)

基因型	IV度白细胞减少发生时间(n)	IV度中性粒细胞减少发生时间(n)	IV度血小板减少发生时间(n)
AA	8.91 ± 1.25(55)	9.02 ± 1.19(55)	11.56 ± 1.58(52)
AG/GG	8.61 ± 1.17(28)	8.68 ± 1.19(28)	11.44 ± 1.34(27)
P	0.291	0.223	0.751

可获得白细胞植入时间、中性粒细胞植入时间、血小板植入时间资料的患者分别为80、83、30例。对上述数据进行统计分析,AA基因型患者白细胞植入时间、中性粒细胞植入时间、血小板植入时间与携带*GSTP1* 313等位基因G(AG/GG基因型)患者比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。患者使用CBV方案预处理后干细胞植入时间与*GSTP1*基因多态性的关系见表5。

表5 患者使用CBV方案预处理后干细胞植入时间与*GSTP1*基因多态性的关系($\bar{x} \pm s, d$)

Tab 5 Relationship between *GSTP1* gene polymorphism and the time of stem cell implantation in patients receiving CBV pretreatment ($\bar{x} \pm s, day$)

基因型	白细胞植入时间(n)	中性粒细胞植入时间(n)	血小板植入时间(n)
AA	11.98 ± 1.99(53)	10.44 ± 1.345(55)	15.55 ± 2.18(22)
AG/GG	12.41 ± 2.44(27)	10.36 ± 1.62(28)	16.29 ± 3.15(8)
P	0.404	0.813	0.488

3 讨论

GSTP1 A313G(Ile>Val)是目前研究较为广泛的单核苷酸多态性之一,该突变与环磷酰胺疗效及不良反应之间的关系目前尚未得出一致结论。有研究认为携带*GSTP1* 313等位基因G的患者,由于*GSTP1*酶活性下

降,对环磷酰胺及其活性代谢产物的清除变慢,在导致临床疗效提高的同时,也显著升高了骨髓抑制等不良反应的发生率^[10-11]。Islam MS等^[12]研究发现,在使用环磷酰胺+表柔比星+氟尿嘧啶方案化疗的乳腺癌患者中,携带 *GSTP1* 313 等位基因 G(AG/GG 基因型)的患者的生存率高于 AA 基因型患者,但不同基因型患者之间的不良反应差异并无统计学意义。Sugishita M等^[13]在一项单中心回顾性研究中得出了相反的结论:在使用含环磷酰胺化疗方案的乳腺癌患者中,*GSTP1* AA 基因型患者发生粒细胞缺乏性发热的风险高于 AG、GG 基因型患者。Jamieson D等^[14]的研究则表明,*GSTP1* 基因多态性对环磷酰胺的药动力学参数无显著影响。

目前尚无造血干细胞移植患者中的 *GSTP1* 基因多态性与环磷酰胺不良反应相关性之间的文献报道。本研究中,*GSTP1* 313 位携带等位基因 G 的患者 IV 度骨髓抑制的发生时间早于 AA 基因型患者,白细胞、血小板植入时间均长于 AA 基因型患者,未观察到上述差异的统计学意义。分析可能的原因有以下几点:环磷酰胺体内代谢过程受 CYP、GSTs 等酶的影响,*GSTP1* 仅为影响其体内过程的多种酶之一;移植预处理方案除环磷酰胺外,还有卡莫司汀、依托泊苷两个药物对血液学毒性也会产生影响;自体造血干细胞移植患者所使用的预处理方案剂量强度较高,血液学毒性发生率高于普通化疗方案,无法判断 *GSTP1* 基因型与血液学毒性发生率之间的相关性。

本研究样本量较小,下一步可设计前瞻性随机对照研究,增加样本量,考察可能影响环磷酰胺体内代谢及排泄的其他基因位点数据,排除混杂因素的影响,以期得出明确结论。

参考文献

[1] 刘卫平,王小沛,郑文,等.自体造血干细胞移植相关肝损伤的临床研究[J].肿瘤防治研究,2013,40(4):359-361.

[2] TUTSCHKA PJ, COPELAN EA, KLEIN JP. Bone marrow transplantation for leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen[J]. *Blood*, 1987, 70(5):1382-1388.

[3] 徐亚琦,张诚,张曦.马法兰用于多发性骨髓瘤造血干细胞移植预处理的研究进展[J].中国药房,2015,26(14):1873-1876.

[4] DE JONGE ME, HUITEMA AD, RODENHUIS S, et al. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2005, 44(11):1135-1164.

[5] KIM IW, YUN HY, CHOI B, et al. Population pharma-

cokinetics analysis of cyclophosphamide with genetic effects in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2013, 69(8):1543-1551.

[6] BALASUBRAMANIAN P, DESIRE S, PANETTA JC, et al. Population pharmacokinetics of cyclophosphamide in patients with thalassemia major undergoing HSCT[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2012, 47(9):1178-1185.

[7] SABATTINI E, BACCI F, SAGRAMOSO C, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview[J]. *Pathologica*, 2010, 102(3):83-87.

[8] RUPNIEWSKA ZM. Role of the Ann Arbor classification in the staging of non-Hodgkin's lymphomas[J]. *Pol Arch Med Wewn*, 1979, 61(4):317-321.

[9] ANN SETSER, CBIIT, NCI. Common terminology criteria for adverse events[EB/OL].[2011-09-01].http://www.calgb.org/Public/meetings/presentations/2009/summer_group/cra_cont_ed/06a_CTCAE-Setser_062009.pdf.

[10] DASGUPTA RK, ADAMSON PJ, DAVIES FE, et al. Polymorphic variation in *GSTP1* modulates outcome following therapy for multiple myeloma[J]. *Blood*, 2003, 102(7):2345-2350.

[11] ZHONG S, HUANG M, YANG X, et al. Relationship of glutathione-S-transferase genotypes with side effects of pulsed cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2006, 62(4):457-472.

[12] ISLAM MS, ISLAM MS, PARVIN S, et al. Effect of *GSTP1* and *ABCC4* gene polymorphisms on response and toxicity of cyclophosphamide-epirubicin-5-fluorouracil-based chemotherapy in Bangladeshi breast cancer patients[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(7):1-7.

[13] SUGISHITA M, IMAI T, KIKUMORI T, et al. Pharmacogenetic association between *GSTP1* genetic polymorphism and febrile neutropenia in Japanese patients with early breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2016, 23(2):195-201.

[14] JAMIESON D, LEE J, CRESTI N, et al. Pharmacogenetics of adjuvant breast cancer treatment with cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 74(4):667-674.

(收稿日期:2017-11-07 修回日期:2018-02-01)

(编辑:邹丽娟)