

MTHFR基因多态性对骨肉瘤患者首次应用大剂量甲氨蝶呤后不良反应的影响^Δ

初亚男*,张婕妤,封利颖,张晏洁,刘雪姣[#](东部战区总医院临床药学科,南京 210002)

中图分类号 R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)01-0080-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.01.14



摘要 **目的** 探讨MTHFR基因多态性对骨肉瘤患者首次应用大剂量甲氨蝶呤(HD-MTX)后不良反应的影响。**方法** 采用前瞻性研究方法。选择东部战区总医院53例首次入院进行HD-MTX治疗的骨肉瘤患者,根据其人口学因素及MTHFR基因中rs1801133位点的基因多态性确定HD-MTX给药剂量并进行全程化药学监护,收集第1个化疗周期后该药的肝、肾、血液毒性和胃肠道反应数据。采用单因素分析和二元Logistic回归分析对MTX给药剂量、24 h血药浓度、rs1801133位点基因型与上述4种不良反应之间的相关性进行分析。**结果** CC野生型患者的MTX给药剂量显著高于TT突变型患者(7.97 g/m² vs. 6.98 g/m², $P=0.030$),但这种差异不影响MTX的0 h和24 h血药浓度。上述4种不良反应与MTX的给药剂量无相关性。二元Logistic回归分析结果显示,每携带一个T等位基因,患者发生血液学毒性的风险会升高4.13倍(95%置信区间为1.35~12.62, $P=0.013$)。当MTX 24 h血药浓度阈值设定为2.65 μmol/L时,肝功能损害预测的灵敏度为53.33%,特异性为86.96%;当该阈值设定为7.28 μmol/L时,肾功能损害预测的灵敏度为100%,特异性为81.63%。**结论** MTHFR基因中rs1801133位点的基因多态性与MTX的血液学毒性相关;首次应用HD-MTX并且携带T等位基因的患者,其血液学毒性风险较高。MTX 24 h血药浓度与该药的肝、肾毒性相关,监测患者的MTX 24 h血药浓度可以预测肝、肾毒性并及早采取干预措施。

关键词 甲氨蝶呤;大剂量;亚氨基四氢叶酸还原酶;rs1801133位点;不良反应;基因多态性

Effects of MTHFR gene polymorphism on the adverse reactions in osteosarcoma patients after the first high-dose methotrexate treatment

CHU Yanan, ZHANG Jieyu, FENG Liying, ZHANG Yanjie, LIU Xuejiao (Dept. of Clinical Pharmacy, General Hospital of Eastern Theater Command, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effects of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphism on the adverse reactions in patients with osteosarcoma after the first high-dose methotrexate (HD-MTX) treatment. **METHODS** A prospective study was conducted to include 53 patients with osteosarcoma treated with HD-MTX at the first admission in General Hospital of Eastern Theater Command. The dose of MTX was evaluated according to the polymorphism of rs1801133 in the MTHFR gene and demographic factors, then whole pharmaceutical monitoring was conducted. The data on liver toxicity, renal toxicity, hematological toxicity, and gastrointestinal reaction were collected after the first chemotherapy cycle. Single factor analysis and binary Logistic regression analysis were used to analyze the correlation between MTX dose, 24 h blood drug concentration, and rs1801133 locus genotype with four adverse reactions. **RESULTS** The MTX dosage in patients with CC wild type was significantly higher than that in TT mutant type (7.97 g/m² vs. 6.98 g/m², $P=0.030$), but this difference did not affect the 0 h and 24 h blood drug concentrations of MTX. The above four adverse reactions were not related to the dose of MTX. The results of binary Logistic regression analysis showed that carrying one T allele increased the risk of developing hematological toxicity by 4.13 times (95% confidence interval: 1.35-12.62, $P=0.013$). When 24 h plasma concentration threshold of MTX was set to 2.65 μmol/L, the sensitivity and specificity of predicting liver function damage were 53.33% and 86.96%, respectively; when the threshold was set to 7.28 μmol/L, the sensitivity and specificity of predicting renal damage were 100% and 81.63%. **CONCLUSIONS** The polymorphism of the rs1801133 in the MTHFR gene is associated with hematological toxicity of MTX. Patients who take HD-MTX for the first time and carry the T allele have a high risk of hematological toxicity. The 24 h plasma concentration of MTX is related to liver toxicity and renal toxicity. In addition, monitoring the 24 h blood drug concentration can predict liver and renal toxicity, and take early intervention measures.

^Δ 基金项目 东部战区总医院临床诊疗新技术项目 (No. 22LCZLXJS56)

* 第一作者 主管药师,硕士。研究方向:个体化基因给药。
E-mail: cyncpu@163.com

[#] 通信作者 主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:025-80860196。E-mail: liuxuejiao0615@163.com

KEYWORDS methotrexate; high-dose; 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase; rs1801133 locus; adverse reactions; genetic polymorphism

骨肉瘤是最常见的原发性肿瘤之一,每年全世界的发病率约为3/1 000 000,男性发病率高于女性^[1-2]。甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)是一种通过干扰叶酸代谢来抑制肿瘤生长的药物,其中大剂量MTX[high-dose methotrexate (HD-MTX),即剂量大于500 mg/m²的MTX]对提高骨肉瘤患者总体生存率发挥了重要的作用^[3]。但是,不同患者使用HD-MTX后发生的不良反应呈现出比较大的个体差异,大部分患者仅会发生胃肠道反应,但有小部分患者会发生严重的血液学毒性、肝功能损害和肾功能损害^[4]。

亚甲基四氢叶酸还原酶(5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)rs1801133位点的多态性可使该酶的活性发生改变,导致作为体内甲基供体的5, 10-亚甲基四氢叶酸合成减少,影响DNA的甲基化和合成过程,从而影响细胞的分裂、分化^[5]。当MTHFR基因多态性导致酶活性降低,协同MTX竞争性抑制四氢叶酸合成时,就增强了对细胞分裂、分化抑制的效果,从而引起毒性反应。rs1801133位点是MTHFR基因与HD-MTX不良反应相关性研究较多的一个位点,其相关的不良反应主要集中于肝功能损害^[4-6]、血液学毒性^[7]、口腔黏膜炎^[4,6]3个方面,但是不同的疾病种类、用药剂量、亚叶酸钙解救方案以及不同研究机构之间得到的结果并不完全一致^[8-10]。

基于以上研究结果,本研究针对首次入院治疗的骨肉瘤患者,在制定给药方案时引入rs1801133位点的药物基因组学信息;同时,对每位使用HD-MTX的患者进行全程化药学监护,分析调整后的药物剂量、24 h血药浓度和rs1801133位点与肝毒性、肾毒性、血液学毒性、胃肠道不良反应之间的相关性,旨在为临床合理使用HD-MTX、及时规避严重不良反应提供依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本研究采用前瞻性研究方法,将东部战区总医院(以下简称“我院”)骨科2020年6月至2022年10月收治的骨肉瘤患者纳入研究。在所纳入患者第1个化疗周期结束后,观察其肝、肾、血液、胃肠道的不良反应发生情况,使用美国国家癌症研究所的常见不良反应事件评价标准(CTCAE 4.0)进行HD-MTX不良反应评估。本研究方案经我院临床伦理委员会审查批准(批件号为2020DZGZR-088),患者或其监护人均签署知情同意书。

本研究的纳入标准为:(1)经病理组织检查确诊为骨肉瘤,且Enneking分期小于Ⅲ期;(2)患者首次因骨肉瘤入院;(3)行HD-MTX单药治疗。

本研究的排除标准为:(1)肝肾功能异常者;(2)严重心功能不全者;(3)低蛋白血症患者;(4)腹水或胸腔积液患者。

1.2 HD-MTX治疗方案

每位入组患者的水化及碱化治疗率为100%,其中首日静脉总液体入量应为1.5~2.0 L/m²;根据患者个体

情况选择胃肠道内或胃肠道外碱化治疗,控制其尿液pH达到7以上,24 h尿量大于2.0~2.5 L/m²。每位患者入院后由临床药师启动药学监护,详细记录患者的基本资料、预处理和合并用药情况、肝/肾功能、血常规、电解质等信息。患者在进行HD-MTX治疗前,需使用药物干预至肝功能指标达到正常水平后再开始治疗。HD-MTX的给药剂量根据患者的身高、体重、年龄、性别和MTHFR基因的rs1801133位点分型综合评定,最终的给药方案由主治医师决定。HD-MTX的给药方式为持续静脉滴注4~6 h,待滴注结束4 h后给予亚叶酸钙(calcium folinate, CF)解救。CF的起始剂量为25 mg, q6 h,后续给药剂量根据24 h MTX血药浓度调整。在MTX开始静脉滴注后的0、24、48、72 h,采用甲氨蝶呤测定试剂盒(美国Abbott Laboratories公司)检测其血药浓度,直至其血药浓度低于0.1 μmol/L时停止CF解救。MTX 24 h血药浓度>10 μmol/L,或48 h血药浓度>1 μmol/L,或72 h血药浓度>0.1 μmol/L均表示MTX发生了排泄延迟,应根据其血药浓度调整患者的水化、碱化及CF解救方案^[9]。上述治疗方案中的主要药物及来源分别为:甲氨蝶呤注射液(Hospira Australia Pty Ltd,注册证号H20090597,规格为10 mL:1 g)、亚叶酸钙氯化钠注射液(酒泉大得利制药股份有限公司,国药准字H20050076,规格为50 mL:亚叶酸钙50 mg与氯化钠0.45 g)。

1.3 不良反应相关数据收集

在HD-MTX治疗后48 h检测患者的肌酐水平,以评估MTX对患者肾功能的影响。治疗后第5~9天,检测患者的血红蛋白水平,白细胞、血小板、中性粒细胞计数,血浆丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)和天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)水平等,并根据CTCAE 4.0进行不良反应分级。

1.4 MTHFR基因的rs1801133位点分型

在患者静脉滴注HD-MTX前,采用焦磷酸测序技术对MTHFR基因的rs1801133位点进行分型。使用Wizard[®]基因组DNA纯化试剂盒(美国Promega公司)提取患者外周血DNA作为基因检测的模板,使用微量紫外分光光度计对DNA纯度和浓度进行考察。以260 nm和280 nm波长处的吸光度的比值作为DNA纯度的评价指标,其范围应在1.6~2.2之间;DNA浓度应大于0.4 ng/μL^[10]。

1.5 统计学方法

采用Excel 2010软件对数据进行整理,以SPSS 25软件进行统计分析。连续变量采用Shapiro-Wilk检验, $P>0.05$ 表示其服从正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,两组以上变量比较采用单因素方差分析。非正态分布的连续变量采用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示,两组间比较采用Mann-Whitney U 检验。分类变量以频数或百分比表示,采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

同时,对基因型进行Hardy-Weinberg平衡分析。采用单因素分析和二元Logistic回归分析对不良反应的影响因素进行相关性分析;使用受试者工作特征曲线(re-

ceiver operating characteristic curve, ROC)中的约登指数预测不良反应影响因素的阈值。

2 结果

2.1 临床资料

我院骨科2020年6月至2022年10月共收治了53例首次入院进行HD-MTX单药治疗的骨肉瘤患者,其中男性37例、女性16例;平均年龄(15.13 ± 6.51)岁;平均身高(161.57 ± 17.79) cm;平均体重(52.03 ± 18.23) kg;平均用药剂量(7.51 ± 1.04) g/m²。

2.2 基因分型结果

53例患者中,共检出CC野生型16例、CT杂合型27例、TT突变型10例,C等位基因占比为55.66%,T等位基因占比为44.34%,接近美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1801133>)中统计的3 984例亚洲人的数据(C等位基因占比66.14%、T等位基因占比33.86%)。rs1801133位点Hardy-Weinberg平衡分析的P值为0.815(>0.05),说明调查群体满足遗传平衡,且基因分型方法未出现误差。

2.3 MTX给药剂量及其24 h血药浓度与rs1801133位点的相关性分析

临床医生综合评估患者的身高、体重、年龄、性别、临床表现及rs1801133位点基因型等情况后给出MTX的给药剂量,53例患者MTX的平均给药剂量为(7.51 ± 1.04) g/m²。根据基因型分组后,CC野生型组患者的平均给药剂量为(7.97 ± 0.29) g/m²,CT杂合型组患者的平均给药剂量为(7.44 ± 0.19) g/m²,TT突变型组患者的平均给药剂量为(6.98 ± 0.25) g/m²,3组间比较差异无统计学意义($F=3.144, P=0.052$);两两比较的结果显示,CC野生型组与TT突变型组患者的给药剂量差异有统计学意义($P=0.030$),而CC野生型组与CT杂合型组、CT杂合型组与TT突变型组患者的给药剂量比较,差异均无统计学意义(P 分别为0.080、0.276)。MTX 24 h血药浓度根据患者基因型分组后,CC野生型组为2.75(1.81, 7.32) μmol/L,CT杂合型组为2.11(1.24, 3.92) μmol/L,TT突变型组为2.56(1.37, 12.01) μmol/L,3组间和两两比较的差异均无统计学意义($P>0.05$)。以上结果提示,仅CC野生型组和TT突变型组患者存在给药剂量差异,但这种差异不会影响MTX 24 h血药浓度。

2.4 rs1801133位点基因型、MTX给药剂量及其24 h血药浓度与不良反应的相关性分析

rs1801133位点基因型、MTX给药剂量及其24 h血药浓度与不良反应的单因素分析结果见表1。由表1可知,rs1801133位点基因型与血液学毒性有相关性($P=0.009$);MTX 24 h血药浓度与肝功能损害、肾功能损害有相关性(P 分别为0.001、0.000 03);MTX给药剂量与4种不良反应均无相关性($P>0.05$)。

表1 rs1801133位点基因型、MTX给药剂量及其24 h血药浓度与不良反应的单因素分析结果

不良反应	rs1801133位点基因型		P	MTX给药剂量		MTX 24 h血药浓度	
	C等位基因 占比/%	T等位基因 占比/%		($\bar{x} \pm s$)/(g/m ²)	P	[M(Q ₁ , Q ₃)]/(μmol/L)	P
肝功能损害	57.6	55.3	0.812	7.51 ± 1.03	0.974	3.73(1.81, 7.76)	0.001
肾功能损害	3.4	12.8	0.148	7.81 ± 0.63	0.561	40.00(11.74, 70.32)	0.000 03
血液学毒性	8.5	27.7	0.009	7.57 ± 1.19	0.858	3.66(1.425, 13.65)	0.346
胃肠道反应	96.6	91.5	0.477	7.51 ± 1.07	0.824	2.55(1.5, 7.28)	0.229

2.5 HD-MTX致不良反应的相关因素分析

根据上述单因素分析结果,对rs1801133位点基因型与血液学毒性的不良反应进行二元Logistic回归分析,并绘制MTX 24 h血药浓度与肝、肾功能损害的ROC曲线图(图1)。结果显示,与rs1801133位点携带C等位基因的患者相比,每携带一个T等位基因,患者发生血液学毒性的风险提高了4.13倍(95%置信区间为1.35~12.62, $P=0.013$)。根据约登指数分析,当MTX 24 h血药浓度阈值设定为2.65 μmol/L时,肝功能损害预测模型的灵敏度为53.33%,特异性为86.96%,ROC曲线下面积为0.69;当MTX 24 h血药浓度阈值设定为7.28 μmol/L时,肾功能损害预测模型的灵敏度为100%,特异性为81.63%,ROC曲线下面积为0.95。

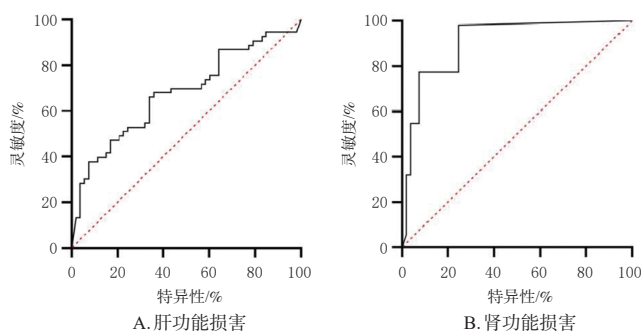


图1 MTX 24 h血药浓度与肝、肾功能损害相关性的ROC曲线

3 讨论

HD-MTX相关不良反应的严重程度与MTX暴露的持续时间成正比^[11],较低剂量的MTX和较短的持续时间通常可使患者具有良好的耐受性^[12];但是,HD-MTX显示出了对骨肉瘤患者更好的预后^[13-14]。因此,找到疗效和安全性之间的平衡点是MTX临床使用的主要挑战。

MTHFR由于rs1801133位点C到T的转变,导致丙氨酸取代了缬氨酸,使酶活性降低了65%,并提高了血浆总同型半胱氨酸水平^[15]。rs1801133位点发生突变会使患者体内MTHFR参与下的DNA合成和甲基化动态平衡受到影响,再加上MTX的干预,会导致突变基因携带者在MTX治疗中发生不良反应的风险升高。本研究基于rs1801133位点基因型对MTX剂量进行调整,使得CC野生型组患者的给药剂量显著高于TT突变型组,而升高的给药剂量没有造成MTX 24 h血药浓度的差异;不良反应分析结果显示,T等位基因携带者的血液毒性

风险高于C等位基因组,这更加肯定了本研究以rs1801133位点预测该不良反应的重要性,同时也提示仅依靠降低给药剂量不能完全避免不良反应的发生,需要提前预警并结合其他治疗手段进行干预^[6]。此外,大部分的研究认为MTX的24 h血药浓度 $>10 \mu\text{mol/L}$ 代表该药发生了排泄延迟,可能导致更高的毒副作用风险^[9];而本研究结果显示,当MTX的24 h血药浓度在 $10 \mu\text{mol/L}$ 以下时可能就已经发生了不良反应,根据“2.5”项下所得阈值可以提前预警、及早干预,以避免不良反应发生。一般而言,含MTX的化疗方案需进行多个周期,而不同化疗周期中的不良反应发生率存在差异^[17],患者首次接触化疗药物时的反应更能体现不良反应的影响因素,因此本研究选择了首次化疗后的不良反应作为评价依据。

本研究也有一定的局限性:首先,纳入的骨肉瘤患者样本量有限,下一步可以继续收集更多的临床研究样本进行统计分析;其次,由于与MTX不良反应相关的基因多态性位点存在争议,本研究纳入的基因多态性位点较少,下一步可以根据最新的研究成果纳入更多的基因多态性指标。

综上所述,首次应用HD-MTX并且携带T等位基因的患者,其血液学毒性风险较高;适当地调整HD-MTX首次给药剂量不会影响该药0 h和24 h的血药浓度;rs1801133位点的基因多态性与该药的血液学毒性相关,24 h血药浓度与该药的肝、肾毒性相关。本研究提供了一个骨肉瘤患者首次应用HD-MTX时可预测及减少不良反应的解决方案:首先,结合rs1801133位点基因型和患者的身高、体重、年龄、性别、临床表现制定给药方案;其次,通过rs1801133位点基因型可提前预测患者发生血液学毒性的风险,在T等位基因携带者服药前及早进行剂量调整,用药后及时进行血象监测和解救干预;最后,由于MTX 24 h的血药浓度大于 $2.65 \mu\text{mol/L}$ 时肝功能损害风险增大,其24 h血药浓度大于 $7.28 \mu\text{mol/L}$ 时肾功能损害风险增大,因此可采用24 h血药浓度监测数据预测MTX的肝、肾功能损害发生风险。

参考文献

[1] JO V Y, FLETCHER C D M. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition [J]. *Pathology*, 2014, 46(2):95-104.

[2] SMRKE A, ANDERSON P M, GULIA A, et al. Future directions in the treatment of osteosarcoma[J]. *Cells*, 2021, 10(1):172.

[3] ZHANG Y, YANG J Q, ZHAO N, et al. Progress in the chemotherapeutic treatment of osteosarcoma[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5):6228-6237.

[4] ZHANG W C, LIU Z Y, YANG Z M, et al. MTHFR polymorphism is associated with severe methotrexate-induced toxicity in osteosarcoma treatment[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:781386.

[5] ROBINSON A D, EICH M L, VARAMBALLY S. Dys-

regulation of de novo nucleotide biosynthetic pathway enzymes in cancer and targeting opportunities[J]. *Cancer Lett*, 2020, 470:134-140.

[6] HURKMANS E G E, BRAND A C A M, VERDONSCHOT J A J, et al. Pharmacogenetics of chemotherapy treatment response and-toxicities in patients with osteosarcoma: a systematic review[J]. *BMC Cancer*, 2022, 22(1):1326.

[7] XIE L, GUO W, YANG Y, et al. More severe toxicity of genetic polymorphisms on MTHFR activity in osteosarcoma patients treated with high-dose methotrexate[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(14):11465-11476.

[8] NAKARMI S, PUDASAINI K, ADHIKARI B, et al. Adverse events profile of low-dose methotrexate in Nepalese patients with rheumatoid arthritis: an observational study [J]. *J Nepal Health Res Counc*, 2020, 18(3):360-365.

[9] RAMSEY L B, BALIS F M, O'BRIEN M M, et al. Consensus guideline for use of glucarpidase in patients with high-dose methotrexate induced acute kidney injury and delayed methotrexate clearance[J]. *Oncologist*, 2018, 23(1):52-61.

[10] XIANG Z, LIU Y L, XING X Q, et al. Genotyping of alcohol dehydrogenase gene by pyrosequencing coupled with improved LATE-PCR using human whole blood as starting material: advances and clinical practice in pyrosequencing[M]. New York: Humana Press, 2016:381-389.

[11] XU M, WU S S, WANG Y, et al. Association between high-dose methotrexate-induced toxicity and polymorphisms within methotrexate pathway genes in acute lymphoblastic leukemia[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:1003812.

[12] SOLOMON D H, GLYNN R J, KARLSON E W, et al. Adverse effects of low-dose methotrexate: a randomized trial[J]. *Ann Intern Med*, 2020, 172(6):369-380.

[13] GILL J, GORLICK R. Advancing therapy for osteosarcoma[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(10):609-624.

[14] LILIENTHAL I, HEROLD N. Targeting molecular mechanisms underlying treatment efficacy and resistance in osteosarcoma: a review of current and future strategies[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18):6885.

[15] RAGHUBEER S, MATSHA T E. Methylene tetrahydrofolate (MTHFR), the one-carbon cycle, and cardiovascular risks[J]. *Nutrients*, 2021, 13(12):4562.

[16] ALSDORF W H, KARAGIANNIS P, LANGEBRAKE C, et al. Standardized supportive care documentation improves safety of high-dose methotrexate treatment[J]. *Oncologist*, 2021, 26(2):e327-e332.

[17] BERNARD S, HACHON L, DIASONAMA J F, et al. Ambulatory high-dose methotrexate administration as central nervous system prophylaxis in patients with aggressive lymphoma[J]. *Ann Hematol*, 2021, 100(4):979-986.

(收稿日期:2023-06-08 修回日期:2023-12-08)
(编辑:胡晓霖)