

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.01.003

论著·临床研究

## 胸苷酸合成酶基因多态性对甲氨蝶呤治疗急性淋巴细胞白血病患者不良反应的影响

朱秀娟<sup>1</sup> 贺湘玲<sup>1</sup> 伍艳鹏<sup>1</sup> 邹润英<sup>1</sup> 李婉丽<sup>2</sup> 邹惠<sup>1</sup> 游亚兰<sup>1</sup> 刘华<sup>1</sup> 田鑫<sup>1</sup>

(1. 湖南师范大学第一附属医院 / 湖南省人民医院儿科, 湖南长沙 410005;  
2. 湖南省儿童医院血液内科, 湖南长沙 410005)

**[摘要]** **目的** 探讨不同胸苷酸合成酶(TS)基因型对急性淋巴细胞白血病(ALL)患儿经大剂量甲氨蝶呤(HD-MTX)治疗后不良反应的影响。**方法** 选取2011年3月至2013年3月确诊的ALL患儿73例,提取其基因组DNA,PCR扩增后测序鉴定TS基因型。观察并记录所有ALL患儿经HD-MTX化疗后的不良反应,并监测化疗后42~48h MTX血药浓度。**结果** 73例ALL患儿接受HD-MTX治疗后,其不良反应主要包括中性粒细胞减少、血红蛋白降低、血小板减少、肝脏毒性、黏膜损害和胃肠道反应,不同TS基因型患儿化疗后不良反应发生率比较差异均无统计学意义,各基因型与ALL患儿化疗后42~48h MTX血药浓度的变化无关联。**结论** TS基因多态性对ALL患儿HD-MTX化疗后不良反应的发生无影响。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(1): 11-14]

**[关键词]** 胸苷酸合成酶; 基因多态性; 甲氨蝶呤; 不良反应; 儿童

## Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on high-dose methotrexate-related toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia

ZHU Xiu-Juan, HE Xiang-Ling, WU Yan-Peng, ZOU Run-Ying, LI Wan-Li, ZOU Hui, YOU Ya-Lan, LIU Hua, TIAN Xin. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Hunan Normal University/Hunan Province People's Hospital, Changsha 410005, China (He X-L, Email: hexiangl021@163.com)

**Abstract: Objective** To investigate the influence of thymidylate synthase (TS) gene polymorphisms on high-dose methotrexate (HD-MTX)-related toxicities in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Methods** A total of 73 children who were diagnosed with ALL between March 2011 and March 2013 were included into this study. Genomic DNAs were extracted from their peripheral blood. And then the genotypes of TS 5'-UTR were determined by direct DNA sequencing after PCR. The toxicity response of 73 patients receiving HD-MTX chemotherapy were observed and recorded, and plasma MTX concentrations at 42-48 hours after chemotherapy were measured. **Results** The main HD-MTX-related toxicities of 73 patients receiving HD-MTX chemotherapy were neutropenia, decreased hemoglobin level, thrombocytopenia, liver toxicity, mucosal damage, and gastrointestinal reactions. There were no significant differences in the incidence rate of HD-MTX-related toxicities between children with different TS 5'-UTR genotypes after chemotherapy ( $P>0.05$ ). TS 5'-UTR genotype was not significantly correlated with plasma MTX concentrations at 42-48 hours after chemotherapy ( $P>0.05$ ). **Conclusions** TS gene polymorphisms have no influence on the incidence of HD-MTX-related toxicities in childhood ALL.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(1): 11-14]

**Key words:** Thymidylate synthase; Gene polymorphism; Methotrexate; Toxicity; Child

急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)在儿童恶性肿瘤中最常见,约占淋巴细胞白血病的70%~80%。甲氨蝶呤(methotrexate,

MTX)用于肿瘤治疗已逾50年,目前仍是治疗ALL最重要的药物之一,MTX为叶酸类似物,主要借助于还原叶酸载体的转运进入细胞,大剂量

[收稿日期] 2014-06-19; [接受日期] 2014-08-23

[作者简介] 朱秀娟,女,硕士研究生。

[通信作者] 贺湘玲,女,主任医师。

MTX (HD-MTX) 是 ALL 髓外白血病防治的重要措施, 胸苷酸合成酶 (TS) 是叶酸代谢的重要相关酶, TS 的多态性可导致叶酸代谢相关酶活性的下降, 影响叶酸的正常代谢, TS 常见的 3 种基因型为 2R/2R、2R/3R、3R/3R。在临床应用时, HD-MTX 可导致严重的骨髓抑制、肝脏毒性、肾脏毒性、胃肠道反应、黏膜损害 (口腔炎) 等不良反应, MTX 因严重的不良反应被迫中断, 常常是导致 ALL 复发和患者治疗相关死亡的原因之一。临床实践中不难发现: 不同患者经 HD-MTX 治疗后疗效及相关不良反应亦不同, 尤其是不良反应存在明显的个体差异。因此, 研究一个对 HD-MTX 化疗相关毒副反应的预测指标对 ALL 患儿 MTX 的合理用药是非常有益的, 以期为实现个体化治疗指明方向。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

选取 2011 年 3 月至 2013 年 3 月在湖南省人民医院儿科和湖南省儿童医院住院的 ALL 患儿 73 例为研究对象, 所有患儿确诊均参照儿童 ALL 诊疗建议<sup>[1]</sup>, 且目前均处于缓解期。其中男 34 例, 女 39 例, 年龄范围 1 岁 8 个月至 11 岁 11 个月; 标危 37 例, 中危及高危共 36 例。分别记录患儿化疗前后的血常规 (中性粒细胞计数、血红蛋白、血小板)、肝功能、肾功能, 以及临床症状, 包括有无胃肠道反应、口腔炎等。该研究获得患儿监护人同意并签署知情同意书。

### 1.2 化疗方案

参照 CCLG-ALL 2008 方案, 所有 ALL 患儿均行 HD-MTX+ 亚叶酸钙 (CF)+6- 巯基嘌呤 (6-MP) 方案化疗, MTX 使用剂量: 标危  $3 \text{ g/m}^2$ , 中危及高危  $5 \text{ g/m}^2$ 。MTX 采用 24 h 静脉滴注, 10% 剂量作为突击量在 0.5 h 内快速静脉均匀滴入, 余量于 23.5 h 内均匀滴入, 在行突击量 MTX 静脉滴注后 2 h 内, 行三联 (MTX+ 阿糖胞苷 + 地塞米松) 鞘注 1 次。静脉滴注 MTX 后 36~42 h 用 CF 解救, 剂量为  $15 \text{ mg/m}^2$ , 每 6 h 给药 1 次, 共 6~8 次。行化疗方案当天及后 2 d 需大剂量水化碱化 (每日液体总量:  $3000 \text{ mL/m}^2$ , 每日总碱量: 5% 碳酸氢钠  $130 \text{ mL/m}^2$ )。给药期间, 监测 24 h 出入水量, 保持尿 pH  $\geq 7.0$ ; 同时, 每晚睡前顿服 6-MP

( $25 \text{ mg/m}^2$ ) ; 化疗过程中常规对口腔黏膜、胃肠道及重要脏器进行保护。

### 1.3 Real-Time PCR 检测 TS 基因多态性

清晨空腹采集 ALL 患儿外周静脉血 2 mL, 置于 EDTA 抗凝试管中  $4^\circ\text{C}$  保存, 48~72 h 内, 使用天根试剂公司的血药基因组 DNA 试剂盒 (离心柱型 DP318), 按照试剂盒说明书提取 DNA。将提取的 DNA 进行 Real-Time PCR 扩增。根据 Genbank 检索到的 TS 核苷酸序列, 并参考文献<sup>[2]</sup>设计 TS 基因引物, 由华大基因科技股份有限公司合成。TS 上游引物: 5'-GTGGCTCCTGCGTTTCCCC-3', 下游引物: 5'-CCAAGCTTGGCTCCGAGCCGCCA-CAGGCATGGCGCGG-3', 片段长度: 251 bp。PCR 反应体系 (30  $\mu\text{L}$ ), 包括 Mix 15  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 1.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 10  $\mu\text{L}$ , 去离子水 2  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:  $95^\circ\text{C}$  预变性 2 min;  $94^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $62^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 共 36 个循环;  $72^\circ\text{C}$  再延伸 7 min。取扩增产物 5  $\mu\text{L}$  与 Marker 7.5  $\mu\text{L}$  混合, 于 3% 琼脂糖凝胶中, 以 100 mV 电压电泳 45 min, 并在凝胶成像系统中拍照分析。将剩余的 PCR 产物原液送华大基因, 纯化后进行直接测序。

### 1.4 化疗后不良反应指标检测

HD-MTX 化疗前后及化疗过程中监测患儿生命体征及实验室检查结果 (每 2~3 d 测一次血常规、肝功能、电解质和肾功能), 观察记录临床症状。HD-MTX 化疗开始后 42~48 h 采集患儿外周静脉血 2 mL, 立即送本院临床药学研究所, 行 MTX 血药浓度监测。

记录患儿行 HD-MTX 化疗过程中出现的不良反应, 根据美国国立癌症研究所常规毒性判定标准 (NCI-CTC) 评价不良反应<sup>[3]</sup>。评价观察的指标有: 骨髓抑制 (表现为外周血中性粒细胞减少、血红蛋白和血小板降低); 肝脏毒性 (表现为谷丙转氨酶升高); 肾脏毒性 (表现为尿素氮升高); 胃肠道反应 (表现为呕吐、腹泻); 黏膜损害 (表现为口腔炎)。分级  $\geq \text{II}$  级被认为是临床相关的化疗毒副反应。见表 1。

### 1.5 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件包对数据进行统计学分析。计数资料以百分率 (%) 表示, 组间比较采用校正  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表1 美国国立癌症研究所常规毒性判定标准

毒副反应类型	I级	II级	III级	IV级
中性粒细胞计数 ( $\times 10^9/L$ )	1.5~1.9	1.0~1.5	0.5~1.0	<0.5
血红蛋白 (g/L)	100~110	80~100	65~80	<65
血小板 ( $\times 10^9/L$ )	75~100	50~75	25~50	<25
呕吐	恶心	暂时性呕吐	呕吐、需治疗	难控制的呕吐
腹泻	暂时性 <2	能耐受 >2	不能耐受, 需治疗	血性腹泻
口腔炎	红斑、疼痛	红斑、溃疡、可进食	溃疡、只进流食	不能进食
肝功能(谷丙转氨酶, $\times 50 U/L$ )	1.26~2.5	2.6~5	5.1~10	>10
肾功能(尿素氮, $\times 8.3 mmol/L$ )	1.26~2.5	2.6~5	5.1~10	>10

## 2 结果

### 2.1 不同危险度分型患儿 TS 基因型分布

TS 基因检测结果显示, 73 例患儿中, 2R/2R 型 3 例 (4%), 2R/3R 型 12 例 (16%), 3R/3R 型 58 例 (79%)。不同危险度分型 ALL 患儿基因型分布频率比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 见表 2。

### 2.2 MTX 不良反应

73 例 ALL 患儿接受 HD-MTX 化疗后, 发生中性粒细胞减少、血红蛋白降低和血小板减少分别为 51 例 (70%)、40 例 (55%) 和 6 例 (8%); 发生肝脏毒性、黏膜损害和胃肠道反应者分别为 8 例 (11%)、9 例 (12%) 和 9 例 (12%); 无 1 例发生肾脏毒性。见表 3。

### 2.3 不同 TS 基因型患儿化疗后不良反应分析

结果显示, 不同 TS 基因型 ALL 患儿化疗后不良反应发生率比较差异均无统计学意义 (均  $P>0.05$ ), 见表 4。

### 2.4 不同 TS 基因型患儿 MTX 血药浓度监测结果分析

ALL 患儿化疗后 42~48 h MTX 血药浓度监测结果提示: 2R/2R 型、2R/3R 和 3R/3R 型 ALL 患儿化疗后 42~48 h MTX>0.5  $\mu\text{mol/L}$  分别有 0 例、3 例和 3 例, 说明 TS 基因多态性与 MTX 化疗后血药浓度的变化无关联 ( $P>0.05$ ), 见表 5。

表2 不同危险度分型 ALL 患儿 TS 基因型分布比较

[例 (%)]

分度	例数	2R/2R	2R/3R	3R/3R
标危	37	2(5)	5(14)	30(81)
中高危	36	1(3)	7(19)	28(78)
$\chi^2$ 值			0.722	
P 值			0.697	

表3 73 例 ALL 患儿化疗后不良反应发生情况 [例 (%)]

不良反应	I级	II级	III级	IV级	II~IV级
中性粒细胞减少	8(11)	18(25)	19(26)	14(19)	51(70)
血红蛋白降低	26(36)	26(36)	9(12)	5(7)	40(55)
血小板减少	1(1)	4(5)	1(1)	1(1)	6(8)
肝脏损害	6(8)	3(4)	5(7)	0(0)	8(11)
黏膜损害	0(0)	4(5)	4(5)	1(1)	9(12)
呕吐	8(11)	1(1)	5(7)	0(0)	6(8)
腹泻	0(0)	2(3)	0(0)	1(1)	3(4)

表4 不同 TS 基因型 ALL 患儿化疗后不良反应发生率比较 [例 (%)]

不良反应	例数	2R/2R	2R/3R	3R/3R	P 值
中性粒细胞减少	51	2(4)	8(16)	41(80)	0.798
血红蛋白降低	40	2(5)	7(18)	31(78)	0.304
血小板减少	6	0(0)	1(17)	5(83)	0.936
胃肠道反应	9	1(11)	1(11)	7(78)	0.102
黏膜损害	9	1(11)	2(22)	6(67)	0.367
肝脏毒性	8	1(12)	0(0)	7(88)	0.140

表5 TS 基因型与 MTX 血药浓度之间的关系 [例 (%)]

基因型	例数	MTX 血药浓度		P 值
		$\leq 0.5 \mu\text{mol/L}$	$>0.5 \mu\text{mol/L}$	
2R/2R	3	3(100)	0(0)	
2R/3R	12	9(75)	3(25)	0.099
3R/3R	58	55(95)	3(5)	

## 3 讨论

尽管目前对 ALL 的治疗已取得了很大进展, 但 MTX 目前仍是治疗 ALL 最重要的药物之一。MTX 为叶酸类似物, 主要借助于还原叶酸载体的转运进入细胞, MTX 和二氢叶酸竞争, 与二氢叶酸还原酶 (DHFR) 结合, 从而使二氢叶酸不能

被还原成四氢叶酸，同时进入细胞的 MTX 在甲氨蝶呤聚谷氨酸合成酶 (FPGS) 的催化作用下，在 MTX 的  $\gamma$ -羧基位上加上约 7~10 个谷氨酸残基，形成 MTX 多聚谷氨酸 (MTXPG)，多聚谷氨酸化可增强 MTX 的作用，抑制 TS 和甲酰基转移酶 (GARTFase)，并由于快速出胞被阻断使 MTX 胞内滞留时间延长。因缺乏四氢叶酸，一碳单位形成减少，DNA、RNA 合成受限，快速增生的肿瘤细胞如淋巴瘤细胞因缺乏复制所需的原料而逐渐死亡。HD-MTX 是 ALL 髓外白血病防治的重要措施，其机制是在 HD-MTX 治疗时，MTX 血药浓度很高，可顺利通过血脑屏障进入中枢神经系统 (CNS)，同时三联鞘注，从而有效地杀灭隐藏在 CNS 的白血病细胞，减少复发<sup>[4]</sup>。

TS 是胸腺嘧啶脱氧核苷 (dTMP) 合成过程中的限速酶，其功能是以 5,10-亚甲基四氢叶酸为原料，催化尿嘧啶脱氧核苷 (dUMP) 甲基化为胸腺嘧啶脱氧核苷 (dTMP)，而 dTMP 又是 DNA 生物合成所必需的。因此，通过对 TS 进行抑制就能达到抑制 DNA 的生物合成进而抑制细胞生长或增殖的作用。TS 在 DNA 合成与修复、细胞增殖与分化中有十分重要的作用，是肿瘤化疗药 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 和 MTX 等的重要靶酶。

本研究发现 TS 各基因型与 HD-MTX 化疗后不良反应的发生无明显相关，与 Kishi 等<sup>[5]</sup>的研究结果一致。然而，Faganel 等<sup>[6]</sup>研究显示，ALL 患儿进行 HD-MTX 化疗后，TS 2R/3R 基因型携带者的血小板减少和黏膜炎发生风险明显下降。同时一项成人研究表明，TS 3R/3R 基因型可增加 ALL 化疗后贫血的危险性<sup>[7]</sup>。

本研究未发现 TS 基因多态性与 MTX 血药浓度之间存在关联。此外，HD-MTX 化疗相关不良反应还可能与其他叶酸代谢途径相关基因多态性

存在相关性<sup>[6,8]</sup>。

综上所述，TS 基因多态性与 ALL 患儿 HD-MTX 化疗后不良反应的发生风险无关，并未达到预期研究目的，需要综合其他叶酸代谢相关酶的基因多态性以及协同作用、体内叶酸水平、同时服用的化疗药物及扩大样本量来进一步求证。

#### [参 考 文 献]

- [1] 中华医学会儿科学分会血液学组，中华儿科杂志编辑委员会. 儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议 (第三次修订草案) [J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(5): 392-395.
- [2] Horie N, Aiba H, Oguro K, et al. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase[J]. Cell Struct Funct, 1995, 20(3): 191-197.
- [3] Basch E, Iasonos A, McDonough T, et al. Patient versus clinician symptom reporting using the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events: results of a questionnaire-based study[J]. Lancet Oncol, 2006, 7(11): 903-909.
- [4] 万伍卿. 儿童急性淋巴细胞白血病髓外白血病预防研究进展 [J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(15): 1158-1160.
- [5] Kishi S, Cheng C, French D, et al. Ancestry and pharmacogenetics of antileukemic drug toxicity[J]. Blood, 2007, 109(10): 4151-4157.
- [6] Faganel Kotnik B, Grabnar I, Bohanec Grabar P, et al. Association of genetic polymorphism in the folate metabolic pathway with methotrexate pharmacokinetics and toxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia and malignant lymphoma[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2011, 67(10): 993-1006.
- [7] Alessia O, Monica De M, Matteo Giovanni Della P, et al. Gene polymorphisms in folate metabolizing enzymes in adult acute lymphoblastic leukemia: effects on methotrexate-related toxicity and survival[J]. Haematologica, 2009, 94(10): 1391-1398.
- [8] Chen X, Wen F, Yue L, et al. Genetic polymorphism of  $\gamma$ -glutamyl hydrolase in Chinese acute leukemia children and identification of a novel double nonsynonymous mutation[J]. Pediatr Hematol Oncol, 2012, 29(4): 303-312.

(本文编辑: 万静)