

消化道肿瘤患者 MTHFR 基因多态性与 5- 氟尿嘧啶化疗不良反应的相关性研究

周 琰¹, 王蓓丽^{1,2}, 张春燕^{1,2}, 潘柏申^{1,2}, 郭 玮^{1,2}

(1. 复旦大学附属中山医院检验科, 上海 200032; 2. 复旦大学附属中山医院厦门医院检验科, 福建厦门 361015)

摘要: 目的 在消化道肿瘤患者中, 探讨 MTHFR 1298A>C 和 MTHFR 677C>T 基因多态性与 5- 氟尿嘧啶 (5-FU) 化疗出现不良反应的关系。方法 2016 年 2~6 月, 入组复旦大学附属中山医院肿瘤内科收治的 123 例消化道肿瘤患者。提取外周血中的基因组 DNA, 通过 Sanger 测序检测 MTHFR 1298A>C 和 MTHFR 677C>T 的基因型。随访其中 98 例含 5-FU 治疗方案的患者, 分析了不同基因型的患者发生毒副作用的类型及严重程度。结果 123 例消化道肿瘤患者中, MTHFR 1298A>C 野生型 76 例 (61.79%), 杂合型 AC 40 例 (32.52%), 纯合型 CC 7 例 (5.69%)。MTHFR 677C>T 野生型 CC 50 例 (40.65%), 杂合型 CT 61 例 (49.59%), 纯合型 TT 12 例 (9.76%)。98 例化疗方案中含 5-FU 的患者中, MTHFR 677C>T 突变型 (CT 和 TT) 显著增加化疗后发生不良反应的风险 ($\chi^2=4.188$, $P<0.05$); MTHFR 1298A>C 突变型 (AC 和 AA)、性别、年龄、治疗方案与使用 5-FU 产生的相关毒副作用无显著关联性。结论 在接受 5-FU 治疗的消化道肿瘤患者中, MTHFR 677C>T 多态性显著增加化疗相关毒副作用的发生风险, 该基因可能成为预测氟尿嘧啶类化疗药物发生临床不良事件的风险因素, 能够为临床选择合适的治疗方案提供更多的信息。

关键词: 5- 氟尿嘧啶; 亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR); 基因多态性; 不良反应

中图分类号: R735; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2020) 03-001-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.03.001

Relationship between MTHFR Gene Polymorphisms and Adverse Events by 5-FU in Gastrointestinal Cancer

ZHOU Yan¹, WANG Bei-li^{1,2}, ZHANG Chun-yan^{1,2}, PAN Bai-shen^{1,2}, GUO Wei^{1,2}

(1. Department of Laboratory Medicine, Zhongshan Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China;

2. Department of Laboratory Medicine, Xiamen Branch, Zhongshan Hospital of Fudan University, Fujian Xiamen. 361015, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship of MTHFR 677C>T and MTHFR 1298A>C gene polymorphisms in 5-fluorouracil (5-FU)-based chemotherapy in gastrointestinal cancer. **Methods** From February 2016 to June 2016, 123 gastrointestinal cancer patients were admitted to Zhongshan Hospital of Fudan University. Genomic DNA in peripheral blood was extracted, and MTHFR 1298A>C, MTHFR 677C>T gene polymorphisms were detected by Sanger sequencing. A total of 98 patients treated with 5-FU were chosen to observe the adverse events during chemotherapy, and the differences between the adverse event and grades in patients with different genotypes was analyzed. **Results** Of the 123 patients, MTHFR 1298A>C wild type AA was 76 (61.79%), heterozygous AC was 40 (32.52%) and homozygous CC was 7 (5.69%). MTHFR 677C>T wild type CC was 50 cases (40.65%), heterozygous type CT was 61 cases (49.59%) and homozygous type TT 12 cases (9.76%). In the 98 gastrointestinal Cancer cases, the incidence of total the incidence of adverse events in the patients carrying the MTHFR 677C>T (CT+TT) genotype was higher than in the WT genotype (CC) ($P<0.05$). The MTHFR 1298A>C genotype, sex, age and chemotherapy strategy were not associated with the adverse events inducing by 5-FU. **Conclusion** The MTHFR 677C>T polymorphism significantly increases the risk of chemotherapy-related adverse reactions in gastrointestinal cancer patients treated with 5-FU. The applying of MTHFR polymorphism may be used as a risk factor for predicting clinical adverse events in fluorouracil-based chemotherapy and assist the individualized treatment in gastrointestinal cancer.

基金项目: 上海青年临床医技人才 (临床检验专业) 培养资助计划 (沪卫卫基 [2016]05 号); 国家自然科学基金面上项目 (81572064, 81772263); 中山医院管理院内基金 (2019ZSGL09); 2017 年上海市“上海青年临床医技人才 (临床检验专业) 培养资助计划; 国家自然科学基金青年基金 (81902139); 上海市临床重点专科建设项目 (医学检验科)。

作者简介: 周琰 (1981-), 女, 学士, 副主任技师, 研究方向: 分子诊断学, E-mail: zhou.yan3@zs-hospital.sh.cn。

通信作者: 郭玮, 主任技师, E-mail: guo.wei@zs-hospital.sh.cn。

Keywords: 5-fluorouracil; MTHFR; gene polymorphism; adverse reactions

二十世纪中期, DUSCHINSKY 等首次报道合成 5- 氟尿嘧啶 (Fluorouracil, 5-FU, 它作为氟嘧啶类抗肿瘤药物的关键中间体, 通过进一步代谢和转化为活性代谢产物, 抑制 RNA 和 DNA 合成, 发挥抗肿瘤作用^[1-2]。5-FU 常与奥沙利铂、靶向药物等抗肿瘤药物联合使用, 是治疗消化道实体肿瘤如结肠直肠癌、胃癌等最常用的化疗方案^[3-4]。

在肿瘤晚期患者中, 使用含氟尿嘧啶作为基础治疗方案的化疗敏感性只有 22%, 使用相同剂量的患者对药物的敏感性差异很大, 影响了治疗效果。随着对人类基因组计划的深入了解, 学者们开始尝试从药物基因组学、药物遗传学的角度研究 5-FU 相关药物基因对化疗效果和不良反应的影响^[5]。本文旨在研究亚甲基四氢叶酸还原酶 (5,10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 基因和毒性预测的相关性, 为个体化治疗提供依据^[6]。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2016 年 2~6 月, 复旦大学附属中山医院就诊的 123 例消化道恶性肿瘤患者, 其中, 男性 67 例, 女性 56 例; 年龄 32~83 岁, 中位年龄 61 岁。从外周血样品中提取基因组 DNA 用于检测 MTHFR 1298A>C 和 MTHFR677C>T 基因多态性。统计 98 例治疗方案中含 5-FU 的患者, 比较基因型不同的患者之间发生不良反应类别和程度的差异。98 例患者接受 5-FU 联合奥沙利铂的化疗方案, 根据体表面积计算药物剂量。随访期间未发生黄疸和消化道梗阻、造血功能障碍和不伴急性感染。

1.2 仪器和试剂 Applied Biosystems 7500 Fast Realtime PCR System[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; AB 3130 型测序仪(美国 ABI 公司)。Lab-Aid 820 核酸抽提 Midi 试剂(厦门致善生物科技股份有限公司); Premix Taq@Hot Start Version[宝生物工程(大连)有限公司]; 测序试剂[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及 DNA 提取: 收集患者治疗期间的 EDTA-K₂ 抗凝血 2ml。使用 Lab-Aid 820 核酸抽提 Midi 试剂, 严格按照说明书要求抽提基因组 DNA, 并保存于 -20℃ 直至检测。

1.3.2 引物设计及合成: MTHFR 1298A>C 和 MTHFR 677C>T 基因型测定, 采用 Oligo7 软件设计 PCR 引物: MTHFR (1298A>C) F: AGCTGAAGGACTACTACCTCT; MTHFR (1298A>C) R: CCCACTCCAGCATCACTCAC; MTHFR (677C>T) F: CCTATTGGCAGGTTACCCCA; MTHFR (677C>T)

R: CATGCCTTCACAAAGCGGAA。

1.3.3 PCR 扩增: 将 Premix Taq@Hot Start Version 反应液、正向/反向引物和去离子水, 按表 1 依次加入 0.2 ml PCR 反应管中, PCR 反应总体积为 20 μ l, 震荡混匀后瞬时离心备用。

表 1 PCR 扩增体系配置表

组分	体积 (μ l)
ddH ₂ O	4
DNA Template	4
Premix Taq@Hot Start Version	10
Primer F/R	1/1
Total	20

反应条件: 94℃, 5min; 45 次循环(94℃ 30s; 61℃ 30s; 72℃, 30s); 72℃ 5min; 4℃, 保温。PCR 扩增产物纯化后在 ABI3730 测序仪上双链测序, 使用 Chromas 软件分析测序结果。

1.4 统计学分析

1.4.1 数据收集: 每 4 周为一个化疗周期, 接受 2~6 次化疗。通过整理病史, 结合影像学 and 实验室结果评估不良反应和严重程度。

1.4.2 药物毒性评价标准: 依据美国国立癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)提出的常见不良反应事件评价标准(CTCAE Version 4.0)对胃肠道不良反应和血液系统不良反应进行评价和分级, 主要包括白细胞减少、腹泻、呕吐和脱发等。

1.4.3 研究终点事件和数据分析: 主要终点事件为 5-FU 相关的不良事件。使用 SPSS19.0 进行统计分析, 采用 χ^2 检验或 Fisher's 精确概率法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTHFR A1298C 和 C677T 基因多态性分布情况 123 例消化道肿瘤患者的 MTHFR A1298C 和 C677T 基因多态性分布见表 2。其中, 接受 5-FU 联合铂类化疗的 98 例患者各基因型分布情况与入组的总体情况相似, 见表 3 ($P > 0.05$)。

表 2 123 例消化道肿瘤患者 MTHFR A1298C 和 C677T 基因多态性分布情况

MTHFR 基因型	n	百分比 (%)
MTHFR A1298C	AA	76
	AC	40
	CC	7
MTHFR C677T	CC	50
	CT	61
	TT	12

2.2 123例消化道恶性肿瘤患者 MTHFR 基因的等位基因频率和 Hardy-Weinberg 平衡检验 在入组患者中分析了 MTHFR A1298C 和 C677T 等位基因频率的遗传平衡。结果显示, MTHFR A1298C 基因型中, A 和 C 等位基因频率分别为 78.05% 和 21.95% ($P=0.87$); MTHFR C677T 基因型中, C 和 T 等位基因频率分别为 65.45% 和 34.55% ($P=0.29$)。抽样样本符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 具有群体代表性。

对 MTHFR A1298C 多态性进行测序, 结果见图 1。对 MTHFR C677T 多态性进行测序, 结果见图 2。

图 2。

表 3 98 例接受 5-FU 治疗患者 MTHFR A1298C 和 C677T 基因多态性分布情况

MTHFR 基因型		n	百分比 (%)
MTHFR A1298C	AA	65	66.33
	AC	31	31.63
	CC	2	2.04
MTHFR C677T	CC	35	35.71
	CT	53	54.08
	TT	10	10.20

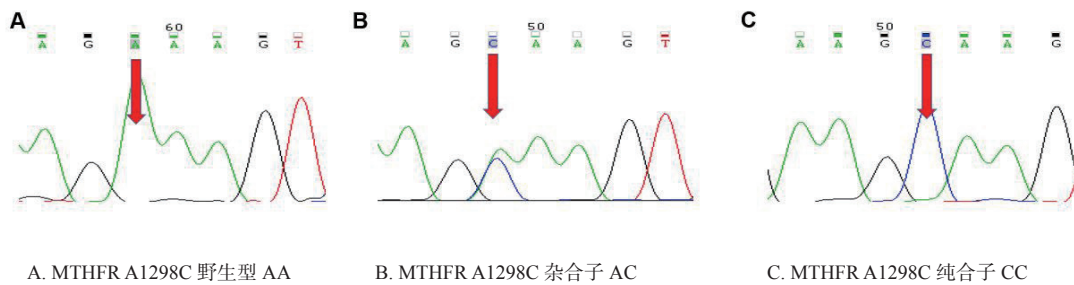


图 1 MTHFR A1298C 三种基因型 AA, AC, CC 的 Sanger 测序结果图

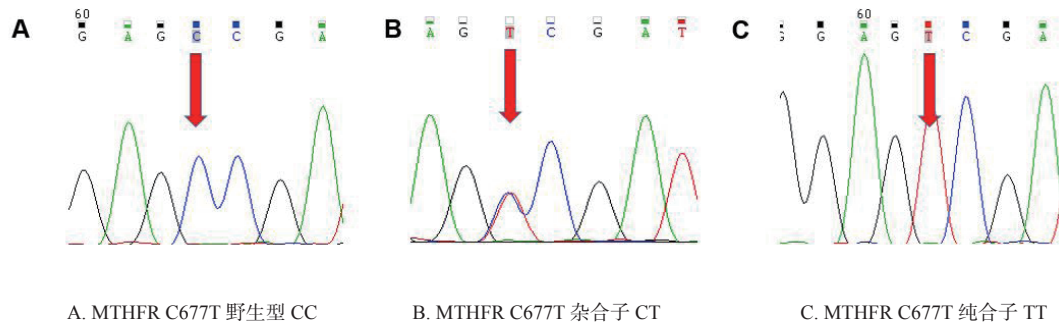


图 2 MTHFR C677T 三种基因型 CC, CT, TT 的 Sanger 测序结果图

2.3 消化道肿瘤患者年龄、性别、化疗方案和 MTHFR 基因型与不良反应的关系 见表 4。根据单因素 χ^2 检验模型分析结果, 5-FU 相关不良反应的发生率与年龄、性别、化疗方案、MTHFR A1298C 多态性之间无显著相关 ($P>0.05$), 但与 MTHFR C677T 多态性存在相关性 ($P<0.001$)。

2.4 消化道肿瘤患者中 MTHFR 基因型和药物不良反应情况及程度 见表 5。98 例消化道肿瘤患者中, 35 例 MTHFR C666T 野生型 (CC) 患者中发生 3~4 级消化道不良反应 0 例; 3~4 级中性粒细胞减少 1 例。在 63 例 MTHFR C666T 突变型 (CT+TT) 患者, 发现 11 例 3~4 级消化道不良反应; 3 例 3~4 级中性粒细胞减少症。65 例 MTHFR A1298C 野生型 (AA) 患者, 发现 2 例 3~4 级消化道不良反应; 3~4 级中性粒细胞减少症 0 例。33 例 MTHFR A1298C 突变型 (AC+CC) 患者, 发现 4 例 3~4 级消化道不良反应;

3~4 级中性粒细胞减少症 1 例。MTHFR C677T 突变基因型 (CT+TT) 可以增加 3 级以上不良反应和消化道不良反应的发生风险, 不增加中性粒细胞减少症的风险。MTHFR A1298C 基因型不增加患者 3 级以上不良反应的发生风险。

3 讨论

5-FU 通过抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶抑制 DNA 合成, 是一类具有广谱抗肿瘤作用的抗嘧啶类药物。它被单独或联合应用于各种实体肿瘤治疗方案。5-FU 的标准计量通常是根患者体表面积计算而得, 但在实际临床应用中, 使用相同校准剂量的患者药物疗效和不良反应发生程度存在显著差异, 甚至发生药物不敏感和严重致死性不良反应^[7-8]。据报道, 多个基因多态性在抗嘧啶类药物代谢过程中起着重要作用, 例如二氢嘧啶脱氢酶 (dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD)、胸腺

嘧啶核苷酸合成酶 (thymidylate synthase, TS)、胸腺嘧啶磷酸化酶 (thymidine phosphorylase, TP) 和 MTHFR 等基因的多态性。在本文中, 我们研究通过叶酸代谢途径, 由 MTHFR 基因 C677T 和 A1298C 多态性引起的药物毒副作用, 协助临床选择合适的化疗药物, 推进个体化精准医疗^[9-12]。

本研究中 MTHFR C677T 和 A1298C 等位基因频率遗传平衡 $P>0.05$, 说明抽样样本代表了一个处于随机婚配平衡状态的大规模群体, 符合吻合度检验要求。

我们的研究中, 汉族人群 MTHFR C677T 突变基因型 (CT+TT) 的频率 (59.3%) 高于 MTHFR A1298C 突变基因型 (AC+CC) 的频率 (38.2%), 更为常见。其中, MTHFR C677T 基因型检测结果, 野生型 CC 50 例 (40.65%), 杂合子 CT 61 例 (49.59%) 和纯合子 TT 12 例 (9.76%), 与文献报道 (野生型 48.6%, 杂合突变型 45.8%, 纯合突变型 5.6%) 相一致; A1298C 基因多态性频率和 Pubmed 索引的结果基本一致 (野生型 59.0%, 杂合突变型 34.9%, 纯合突变型 6.1%)^[10,13-14]。

表 5 MTHFR 基因型和不良反应分级之间的关系

药物不良反应		MTHFR C677T				MTHFR A1298C			
		CT+TT	CC	χ^2	P	AC+CC	AA	χ^2	P
总体	G0-G2	48	34	5.778	0.016	60	31	0.014	0.905
	G3-G4	15	1			5	2		
胃肠道不良反应	G0-G2	33	20	4.409	0.035				
	G3-G4	11	0						
中性粒细胞减少	G0-G2	15	14	0.773	0.116				
	G3-G4	3	1						

5-FU 相关不良反应呈剂量限制性^[15-17], 同时体内代谢过程为非线性方式, 进一步加剧了个体间的疗效差异。98 例采用 5-FU 联合铂类化疗方案的患者均使用小剂量 44h 连续静脉滴注的给药方式, 排除剂量差异对毒副作用分析的影响。

根据 χ^2 检验结果, 5-FU 相关不良反应的发生与年龄、性别、化疗方案、MTHFR A1298C 多态性无显著相关性 ($P>0.05$)。然而, 它与 MTHFR C677T 基因多态性存在相关 ($P<0.05$), 这与文献报道一致^[10]。

5-FU 作为广谱的实体肿瘤化疗药物, 使用过程中常见的不良反应一直受到临床普遍关注, 主要包括胃肠道反应, 尤其是致死性出血性腹泻。在严重的情况下, 骨髓抑制可诱发三系下降, 全血细胞减少, 以及脱发、共济失调等^[18]。多年来,

表 4 临床特征和 MTHFR 基因相关的不良反应情况的关系

临床特征	药物不良反应		χ^2	P
年龄 (岁)	发生	未发生		
<60 岁	11	32	0.035	0.851
≥ 60 岁	15	40		
性别				
男	17	27	0.124	0.724
女	19	35		
化疗方案				
5-FU+伊立替康	14	36	0.010	0.919
5-FU+铂类	13	35		
MTHFR C677T				
总体不良反应	CC	CT+TT		
G0	30	42	4.188	0.041
G1-G4	5	21		
MTHFR A1298C				
总体不良反应	AA	AC+CC		
G0	49	23	0.363	0.547
G1-G4	16	10		

持续有研究报道了 5-FU 相关不良反应。2000 年后, 学者们开始从药物基因组学角度来研究上述不良反应发生的原因。MTHFR 是叶酸代谢过程中的关键酶, 可将还原型叶酸转变为 5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF), 使一磷酸脱氧核糖氟尿嘧啶核苷 (fluorodeoxyuridylate, FdUMP)、TS 和还原型叶酸组成的复合物减少, 从而减弱 5-FU 的肿瘤抑制作用^[19]。

最常见的 MTHFR 基因多态性是第 677 位密码子发生 T 到 C 的突变。SOHN 等^[20]在结肠癌细胞研究中发现, 携带变异型的癌细胞 MTHFR 活性降低, 细胞增殖速度加快, 相对 5-FU 的敏感性也增高。MTHFR 基因型对细胞内叶酸浓度和分布也有影响, 进而改变肿瘤细胞生长速度和药物敏感性。

本研究中, MTHFR C677T 基因突变型 (CT+TT)

患者中,共发生不良反应21例,其中3~4级严重胃肠道不良反应11例,3~4级中性粒细胞减少3例。MTHFR C677T突变型显著增加了3~4级不良反应的发生率和3~4级胃肠道不良反应发生的风险($P<0.05$),这和国内外研究数据是一致的^[10,19]。MTHFR基因多态性对酶活性有明显影响,携带MTHFR 677C>T等位基因的患者在化疗过程中发生消化系统和血液系统不良反应的概率及疗效有统计学意义。有报道携带MTHFR 677C>T基因突变型(CT+TT)的患者,在使用MTX后发生腹泻的风险高于野生型患者,差异有统计学意义。

有文献报道MTHFR C677T多态性会增加血液系统不良反应发生风险,例如白细胞减少、血小板减低^[21]。然而,我们的研究中MTHFR C677T多态性不增加中性粒细胞减少的发生风险。这可能是由于:①采血时间和相关文献报道有差异。为了避免化疗后发生感染等危险并发症,本研究在化疗结束后14天复查血细胞检测,错过血液学变化最显著的化疗后第7天。②入组样本例数有限。后续,我们将进一步扩大样本量再行分析。

综上所述,我们的研究结果表明MTHFR C677T多态性可增加5-FU相关不良反应的发生率,尤其是3~4级胃肠道反应的风险;MTHFR A1298C多态性、年龄、性别和化疗方案与5-FU相关的不良事件无显著相关性。检测MTHFR基因多态性可以帮助临床制定个性化化疗方案,预测和减少不良反应的发生。

参考文献:

- [1] PULLARKAT S T, STOEHLMACHER J, GHADERI V, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy[J]. *Pharmacogenomics Journal*, 2001, 1(1):65-70.
- [2] KÖHNE C, CUNNINGHAM D, DICOSTANZO F, et al. Clinical determinants of tumor response in patients with 5-FU based treatment for metastatic colorectal cancer. Results of a multivariate analysis of 3 825 patients[J]. *European Journal of Cancer*, 2001, 37(suppl 6):S272.
- [3] 沈玲, 罗波. 晚期胃癌二线使用EOX和FOLFIRI方案化疗的疗效及安全性评价[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2018, 39(4):546-550.
SHEN Ling, LUO Bo. Efficacy and safety of second-line chemotherapy with EOX and FOLFIRI in advanced gastric cancer [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University(Medical Sciences)*, 2018, 39(4):546-550.
- [4] 朱铁峰, 崔贵, 景凯, 等. ERCC1, RRM1, TYMS, TUBB3表达对晚期非小细胞肺癌个体化治疗的应用分析[J]. *中国临床研究*, 2015, 28(6):736-739.
ZHU Tiefeng, CUI Gui, JING Kai, et al. Expression of ERCC1, RRM1, TYMS and tubb3 in the treatment of advanced non-small cell lung cancer[J]. *Chinese Journal of Clinical Research*, 2015, 28(6):736-739.
- [5] EISENTHAL A, EYTAN K, BRAZOWSKI E, et al. Effects of 5-FU on DNA synthesis and cytotoxicity of human lymphocytes induced by IL-2, TGF-beta3 and PGE2[J]. *Anticancer Research*, 2009, 29(10):3925-3930.
- [6] 王莹, 孟猛. 奥沙利铂联合不同使用方法5-FU/FA方案治疗晚期结直肠癌的疗效及不良反应对比[J]. *中外医疗*, 2018, 37(2):7-9.
WANG Ying, MENG Meng. Comparison of curative effect and adverse reactions of oxaliplatin combined with different use methods 5-FU/FA plans in treatment of advanced colorectal cancer [J]. *China Foreign Medical Treatment*, 2018, 37(2):7-9.
- [7] VAN HALTEREN H K, ROUMEN R M, COEBERGH J W, et al. The impact of 5-FU-based bolus chemotherapy on survival in patients with advanced colorectal cancer[J]. *Anticancer Research*, 1999, 19(4C):3447-3449.
- [8] HEGGIE G D, SOMMADOSSI J P, CROSS D S, et al. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile[J]. *Cancer Res*, 1987, 47(8):2203-2206.
- [9] YOSHIDA Y, OGURA K, HIRATSUKA A, et al. 5-Fluorouracil chemotherapy for dihydropyrimidine dehydrogenase-deficient patients: potential of the dose-escalation method[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(9):4881-4887.
- [10] 陆建伟, 高长明, 吴建中, 等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因C677T多态性与胃癌患者对5-FU化疗敏感性的关系[J]. *癌症*, 2004, 23(8):958-962.
LU Jianwei, GAO Changming, WU Jianzhong, et al. Relationship of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and chemosensitivity to 5-fluorouracil in gastric carcinoma[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2004, 23(8):958-962.
- [11] LIU Haizhou, LIU Hui, ZHOU Zhiyi, et al. Herbal formula Huang Qin Ge Gen Tang enhances 5-fluorouracil antitumor activity through modulation of the E2F1/TS pathway[J]. *Cell Communication & Signaling*, 2018, 16(1):7.
- [12] DURINIKOVA E, PLAVA J, TYCIAKOVA S, et al. Cytotoxic response of 5-fluorouracil-resistant cells to gene- and cell-directed enzyme/prodrug treatment[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2018, 25(11/12):285-299.
- [13] KONO S, CHEN Kun. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma[J]. *Cancer Science*, 2005, 96(9):535-542.
- [14] EHSANI M, IMANI A, MORAVVEJI A. Prevalence of factor V leiden, MTHFR C677T and MTHFR A1298C polymorphisms in patients with deep vein thrombosis in Central Iran [J]. *Molecular Biology Reports*, 2018, 45(4):621-624.
- [15] 刘佳宁, 李磊, 崔永霞, 等. 晚期结直肠癌患者5-氟尿嘧啶药代动力学参数AUC与不良(下转38页)