

# 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性对小剂量甲氨喋呤治疗类风湿关节炎不良反应的影响

石宇红, 周润华, 许佳, 朱芳晓, 李宝贞, 李丽梅, 莫汉有

基金项目: 广西卫生厅科研课题(编号:Z2009044); 桂林市科学研究与技术开发项目(编号:20090538)

作者单位: 541002 广西, 桂林医学院附属医院风湿免疫科

作者简介: 石宇红(1977-), 女, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 自身免疫性疾病的诊治。E-mail: stone1977tree@yahoo.com.cn

通讯作者: 莫汉有(1973-), 男, 医学硕士, 副主任医师, 研究方向: 自身免疫性疾病的诊治。E-mail: mohanyou@sohu.com

**[摘要]** **目的** 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因 C677T 多态性对小剂量甲氨喋呤(MTX)治疗类风湿关节炎的影响。**方法** 收集类风湿关节炎患者治疗前及治疗后 0, 12, 24 及 48 w 的临床表现及实验室指标和不良反应信息, 评估疗效。采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)方法测定类风湿关节炎患者 183 例(RA 组)及健康对照组 100 例的 MTHFR 基因 C677T 多态性, 比较两组间基因型分布及等位基因频率。**结果** C677T 基因型分布在 RA 组与健康对照组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); C677T 各基因型在 MTX 治疗有效率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。TT 基因型组肝毒性及血液系统不良反应的发生率明显高于 CC 基因型组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** MTHFR 基因 C677T 多态性与 RA 发病和 MTX 疗效无关, 但与 MTX 治疗后血液系统不良反应、肝毒性有关联。

**[关键词]** 类风湿关节炎; 亚甲基四氢叶酸还原酶基因; 单核苷酸多态性; 甲氨喋呤; 不良反应

**[中图分类号]** R 593.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2013)03-0211-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2013.03.07

**Relationship between single nucleotide polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene and the side effect of low-dose methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis** SHI Yu-hong, ZHOU Run-hua, XU Jia, et al. Department of Rheumatology and Immunology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guangxi 541002, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate single nucleotide polymorphism of methylenetetrahydrofolate(MTHFR) reductase gene and its association with the side effect of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis(RA). **Methods** The clinical and laboratory data of 183 patients with RA were evaluated before treatment and at 0, 12, 24, 48 weeks after treatment. Efficacy and side effects of medication were also analyzed. Real-time fluorescent quantitative PCR was conducted to test gene mutations in RA patients and 100 healthy controls. **Results** There was no significant difference in the frequency of 6777CC, CT, TT between RA patients and the healthy controls( $P > 0.05$ ). There was no significant difference in the frequency of 6777CC, CT, TT between the group in which MTX was effective and the other groups in which MTX was not effective( $P > 0.05$ ). There was significant difference in the frequency of 6777CC, CT, TT between the group with MTX related adverse effects and group without MTX related adverse effects. The occurrence rate of side effects of MTX in the patients with 6777TT was higher than those without mutation(CC)( $P < 0.05$ ). **Conclusion** There is no relationship between the pathogenesis of RA and the C677T mutation of MTHFR gene. MTHFR gene C677T mutation is probably one of genetic risk factors for the side effects of MTX, such as hepatic toxicity and adverse reactions of the blood system.

**[Key words]** Rheumatoid arthritis(RA); Methylenetetrahydrofolate reductase gene; Single nucleotide polymorphism; Methotrexate(MTX); Adverse reaction

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一类以对称性外周关节受累为主的多系统炎症的疾病, 是造成我国人群劳动力丧失及致残的主要病因之一。甲氨喋呤 (methotrexate, MTX) 在 RA 的治疗中占有核心地位, 常用于急性期活动控制及长期维持治疗。不同个体对 MTX 的敏感性及耐受性差异较大, 文献报道<sup>[1]</sup> 有 10% ~ 30% 患者因不能耐受不良反应而被迫停药。研究表明, 个体基因遗传差异是药物疗效和不良反应的重要原因, MTX 的作用机制与抑制依赖叶酸的酶相关, 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate, MTHFR) 为叶酸代谢过程中的关键酶, 具有多态性<sup>[2]</sup>。本研究通过分析 MTHFR 基因 C677T 多态性与 MTX 疗效、血液系统不良反应、肝毒性的关系, 为临床用药提供帮助。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** (1) RA 组: 选择 2010-01 ~ 2012-01 在桂林医学院附属医院初诊 RA 的患者 183 例, 均为来自广西桂北地区汉族患者, 其中男 41 例, 女 142 例, 年龄 18 ~ 60 岁, 病程 0.3 ~ 10 年; RA 患者诊断均符合美国风湿病学会 (ACR) 1987 年 RA 分类标准; 剔除联合其它慢作用抗风湿药物 (DMARDs) 治疗者、严重心肾等重要脏器损伤者、血液系统疾病 ( $WBC < 4 \times 10^9/L$ ,  $Hb < 80 g/L$ ,  $PLT < 70 \times 10^9/L$ ) 者、肝转氨酶及血肌酐和尿素氮超过正常上限 1.5 倍者、近 1 个月有失血情况者。(2) 正常对照组: 随机选择我院健康体检者 100 名作为正常对照, 其中男 38 例, 女 62 例, 年龄 22 ~ 58 岁, 均为桂林地区汉族人。本实验符合人体试验委员会制定的伦理学标准, 并获得受试者的知情同意。

**1.2 给药方式** MTX (上海信谊药厂有限公司, 批号: 国药准字 H31020644) 10 ~ 17.5 mg, 每周 1 次口服。根据病情选用非甾体抗炎药 (NSAIDs), 必要时加用泼尼松 10 ~ 15 mg, 1 次/d 口服。

**1.3 疗效及血液系统不良反应的评价** 分别于治疗 0、12、24、48 周对患者进行随访。记录各临床指标 (晨僵时间、关节压痛数、关节肿胀数、医生评估情况、患者评估情况及健康问卷状况) 及实验室指标 (血沉、C 反应蛋白、血常规、尿常规、肝功能、肾功能等)。随访期间记录患者口服 MTX 后相关不良反应发生情况及相应处理措施, 治疗 24 周后评价疗效。疗效评价采用 ACR20 标准: 患者疼痛及肿胀关节数 (28 个) 的改善以及下列 5 项中至少 3 项改善  $\geq 20\%$ 。(1) 受试者评估疼痛采用 10cm 目测模拟标尺 (visual analogue, VAS) 结果; (2) 受试者评估疾病

总体状况 VAS 评分结果; (3) 研究者评估疾病总体状况 VAS 评分结果; (4) 健康状况问卷 (health assessmentl questionnaire, HAQ) 结果; (5) 急性期反应物红细胞沉降率 (ESR) 或 C 反应蛋白 (CRP) 结果。疗效评价采用 ACR20 标准, 达到 ACR20 标准被判定为治疗有效组。不良反应的观察包括: 消化道症状 (恶心、呕吐、消化不良、便秘、腹痛), 肝毒性 (谷丙转氨酶、谷草转氨酶较正常上限升高 1.5 倍以上), 血液系统症状 ( $WBC < 3.5 \times 10^9/L$ ,  $Hb < 80 g/L$ ,  $PLT < 80 \times 10^9/L$ ), 皮肤黏膜症状 (脱发、口腔溃疡), 生殖系统症状 (停经, 月经不调), 神经系统症状 (头痛、头昏、全身乏力)。

**1.4 MTHFR 基因型分析** 取周围静脉血 5 ml, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝, 淋巴细胞分离液分离出白细胞, 用 NP40、酚、氯仿法提取基因组 DNA,  $-20^\circ C$  保存待测。以 GeneAmp ABI9600 型扩增仪进行扩增。引物序列参考文献设计。引物 1: 5'-GAAG-GAGAAGGTGTCTGCGGGA-3', 引物 2: 5'-CACTTT-GTGACCATTCCG-GTTTG-3'。30  $\mu l$  PCR 混合液中含 0.5  $\mu g$  模板 DNA、0.4  $\mu mol/L$  各引物、0.1 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L  $MgCl_2$ , 1.2 U Taq DNA 聚合酶及其 1  $\times$  反应缓冲液。PCR 在 GeneAmp 2400 热循环仪上进行, 条件为  $94^\circ C$  预变性 2 min,  $94^\circ C$  30 s,  $61^\circ C$  30 s 和  $72^\circ C$  30 s 进行 30 个循环, 最后  $72^\circ C$  延伸至 7 min。扩增产物片段长度为 198 bp。PCR 产物酶切体系 20  $\mu l$ , BSA 0.2  $\mu l$ , ddH<sub>2</sub>O 7.8  $\mu l$ , 10  $\times$  缓冲液 2  $\mu l$ , 扩增产物 10  $\mu l$ , HinfI 0.5  $\mu l$ 。在 3% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/L 溴化乙锭) 电泳后, 在 UVP 凝胶成像系统中检测。

**1.5 统计学方法** 应用 SPSS13.0 软件包进行数据分析, 确认各基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡和各组间基因型及等位基因频率比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 MTHFR 基因型分析结果** 根据 ABI 公司提供的位点信息, C677/T 基因型分为 VIC: CC (野生型); FAM: TT (纯合突变型); BOTH: CT (杂合突变型)。有 6 份 RA 患者和 4 份健康人 DNA 的基因型未检出, 获得 177 份 RA 及 96 例健康对照标本基因型, 检出成功率 96.5%。

**2.2 MTHFR 基因型和等位基因在各组的分布** 计算各人群中的各等位基因频率, 均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ( $\chi^2 = 3.84, P > 0.05$ ), 表明各等位基因已经达到遗传平衡, 具有群体代表性。实验结果

表明,677C/T 位点的基因型分布(CC/CT/TT)在健康对照组和 RA 患者组中差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 MTHFR677C/T 基因型在 RA 组及健康对照组的分布[n(%)]

| 组 别      | 例数  | CC       | CT        | TT       |
|----------|-----|----------|-----------|----------|
| RA 组     | 177 | 32(18.1) | 117(66.1) | 28(15.8) |
| 对照组      | 96  | 23(24.0) | 57(59.4)  | 16(16.7) |
| $\chi^2$ | -   | 1.33     | 1.22      | 0.03     |
| $P$      | -   | 0.25     | 0.27      | 0.86     |

2.3 MTHFR C677T 多态性与 MTX 疗效的关联性  
收集检出基因型的 177 例 RA 患者的临床资料,24 周后按 ACR20 标准评价疗效,分为治疗有效组 143 例,无效组 34 例。MTHFR C677 中 CC、CT、TT 基因型各组患者疗效差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.729, P > 0.05$ ),表明 MTHFR C677C/T 位点的基因多态性与疗效无明显关联( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 MTHFR C677T 基因型患者 MTX 疗效比较[n(%)]

| 基因型 | 例数  | 有效       | 无效       |
|-----|-----|----------|----------|
| CC  | 32  | 26(81.3) | 6(18.7)  |
| CT  | 117 | 96(82.1) | 21(17.9) |
| TT  | 28  | 21(75.0) | 7(25.0)  |

注:各组间两两比较均  $P > 0.05$

2.4 不良反应 177 例患者出现的 MTX 相关不良反应主要为血液系统不良反应及肝毒性,其他不良反应(皮肤、消化道、神经系统不良反应等)无法用客观指标评估,且多为一过性反应,干扰因素较多,尚无法明确其统计学意义。

2.4.1 血液系统不良反应发生情况 177 例 RA 患者中有 38 例出现不同程度的血液系统损害(男 6 例,女 32 例,年龄 21~67 岁,病程 6 个月~20 年),其中 26 例白细胞减少,9 例达粒细胞缺乏症标准( $WBC < 0.5 \times 10^9/L$ ),5 例贫血(均为轻到中度贫血,其中 1 例轻度贫血患者大便潜血阳性,胃镜检查示十二指肠球部溃疡,2 例血小板下降,3 例白细胞减少合并贫血,2 例全血细胞减少)。共有 28 例患者行骨髓检查,其中骨髓增生活跃 14 例,增生减低 9 例,包括全血细胞减少 2 例。剔除不相关的血液系统不良反应,将有、无血液系统不良反应的两组中 MTHFR C677T 各基因型患者 MTX 治疗血液系统不良反应发生率比较差异有统计学意义( $\chi^2 = 9.669, P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 MTHFR C677T 各基因型患者单用 MTX 治疗血液系统不良反应发生率比较[n(%)]

| 基因型 | 例数  | 有血液系统不良反应 | 无血液系统不良反应 |
|-----|-----|-----------|-----------|
| CC  | 32  | 2(6.3)    | 30(93.7)  |
| CT  | 117 | 25(21.4)  | 94(78.6)  |
| TT  | 28  | 11(39.3)  | 17(60.7)  |

注:CC VS TT, $P = 0.002$ ;CT VS TT, $P = 0.05$ ;CC VS CT, $P < 0.05$

2.4.2 肝毒性发生情况 177 例患者中有 34 例出现不同程度的肝功能异常(男 3 例,女 31 例,年龄 26~68 岁,病程 2 年~12 年),其中谷丙转氨酶增高 4 例,谷草转氨酶增高 6 例,二者均增高 24 例。均除外病毒性肝炎所致肝功能异常。MTHFR C677T 各基因型患者 MTX 治疗肝毒性发生率比较差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.029, P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 MTHFR C677T 各基因型患者单用 MTX 治疗肝毒性发生率的比较[n(%)]

| 基因型 | 例数  | 有肝毒性反应   | 无肝毒性反应   |
|-----|-----|----------|----------|
| CC  | 32  | 3(9.4)   | 29(90.6) |
| CT  | 117 | 21(17.9) | 96(82.1) |
| TT  | 28  | 10(35.7) | 18(64.3) |

注:CC VS TT, $P = 0.05$ ;CC VS CT, $P > 0.05$ ;CT VS TT, $P > 0.05$

### 3 讨论

3.1 在 RA 的治疗中 MTX 占有关键地位,常作为与其他慢作用抗风湿药的联合用药的基石,但其不良反应是限制其在临床上应用的主要原因。MTX 是二氢叶酸还原酶(DHFR)的竞争性抑制剂,可以在细胞内抑制二氢叶酸转化为四氢叶酸,使二氢叶酸及其代谢产物多聚谷氨酸盐在细胞内蓄积,同时使还原型叶酸成分减少,造成嘌呤和胸腺嘧啶合成障碍,干扰 DNA、RNA 和蛋白质合成,抑制细胞增殖,发挥抗炎、抑制免疫等作用。MTHFR 是叶酸代谢过程中的关键酶,催化 5,10-亚基四氢叶酸还原为 5-甲基四氢叶酸。后者是同型半胱氨酸再甲基化过程中重要的甲基供体,MTHFR 活性或数量改变会影响叶酸代谢和同型半胱氨酸的甲基化从而引起高同型半胱氨酸血症<sup>[3]</sup>。

3.2 人类 MTHFR 基因定位于 1p36.3,整个编码区长 1 980 bp,包含 11 个外显子和 10 个内含子,存在数种多态性标记<sup>[4]</sup>。C677T 有 3 种基因型:TT 纯合突变型,TC 杂合突变型,CC 野生型。MTHFR C677T 多态性产生了丙氨酸-缬氨酸的替换,导致了 MTHFR 的热力学变异,导致酶活性降低。MTH-

FR677C→T 基因差异很大, Wilchen 等<sup>[5]</sup> 研究显示不同种族间差异很大, TT 基因型在中国北方约有 20%, 意大利南部为 26%, 墨西哥为 32%, 非洲的发生率较低约为 6.6%。在本研究中, TT 基因型在 RA 组中为 21%, 对照组中为 18%, 其分布均与中国北方人群分布相符。

**3.3** 目前国内外关于 MTHFR 基因多态性与 MTX 疗效及不良反应的研究结果报道不一。Wessels 等<sup>[1]</sup> 发现 MTHFR677CC 型患者使用 MTX 可得到更好的疗效, 而 Kumagaik 等<sup>[6]</sup> 研究提示 MTHFR C677T 多态性与 MTX 疗效及不良反应无关。Kim 等<sup>[7]</sup> 对韩国 RA 患者的研究表明 MTHFR C677T 多态性可能是 RA 患者 MTX 相关毒副作用的重要预测指标。杨丽华等<sup>[8]</sup> 研究发现 MTHFR C677T 基因多态性与高剂量 MTX 化疗所致肝脏损害密切相关, MTHFR 677CT + TT 基因型的急性淋巴细胞白血病发生肝脏损害的风险明显增高。引起这些报道研究结果的差异可能与很多因素有关, 如种族差异、多基因遗传及环境因素、样本数量多少。而在本研究中发现广西桂北地区汉族 RA 患者中, 使用 MTX 治疗的 RA 患者中, MTHFR C677T 多态性与 MTX 疗效无明显相关性, 而与不良反应, 尤其是血液系统及肝毒性的不良反应差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。677TT 基因型出现以上两种不良反应明显高于 CC 基因型者。提示 MTHFR C677T 突变型可能是不良反应的危险因素。

**3.4** 由于我们的研究数量有限, 未能进行更深层次的研究, 同时, 种族差异、多基因遗传及环境因素都可能影响研究结果。目前多数研究采用的是病例对照研究, 研究的样本量多少不同, 对于研究结果也可能带来较大的影响, 进一步研究还需要更完善的方

法来揭示 MTHFR 基因多态性与小剂量 MTX 治疗 RA 疗效及不良反应的关系。

参考文献

- 1 Wessels JA, de Vries-Bonwstro JK, Heijmans BT, et al. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphism in genes coding for folate pathway enzymes[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(4): 1087 - 1095.
- 2 Weisman MH, Furst DE, Park GS, et al. Risk genotype in folate-dependent enzymes and their association with methotrexate-related side effects in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(2): 607 - 612.
- 3 Hiratsuka M, Kudo M, Koseki N, et al. A novel single nucleotide polymorphism of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene in Japanese individuals[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2005, 20(5): 387 - 390.
- 4 Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase[J]. Nat Genet, 1995, 10(1): 111 - 113.
- 5 Wilcken B, Bamforth F, Li Z, et al. Geographical and ethnic variation of the 677C > T allele of 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide[J]. J Med Genet, 2003, 40(8): 619 - 625.
- 6 Kumagaik K, Hiyama K, Oyama T, et al. Polymorphisms in the thymidylatd synthetase and MTHFR genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis[J]. Int J Mol Med, 2003, 11(5): 593 - 600.
- 7 Kim SK, Jun JB, El-Sonemy A, et al. Cost-effectiveness analysis of MTHFR polymorphism screening by polymerase chain reaction in Korean patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate[J]. J Rheumatol, 2006, 33(7): 1266 - 1274.
- 8 杨丽华, 刘 茹, 曾其毅. 急性淋巴细胞白血病患儿童亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与大剂量甲氨蝶呤不良反应的相关性[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(6): 440 - 442.

[收稿日期 2012 - 11 - 26][本文编辑 宋卓孙 蓝斯琪]

《中国临床新医学》杂志投稿须知

凡投本刊的稿件, 务请补全以下内容与项目:

1. 中文摘要、关键词(按规范格式书写)。
2. 英文题目, 作者(汉拼), 英文单位名称, 英文摘要和关键词(按规范格式书写)。
3. 论文的统计学处理方法。
4. 单位投稿介绍信。
5. 作者简介(姓名、出生年月、性别、学历、学位、职称、研究方向)。
6. 须寄(送) A4 纸打印稿一份, 并发电子邮件到本编辑部。
6. 第一作者联系地址、邮编、电话和 E-mail。

• 本刊编辑部 •