

NUDT15c.415C>T 和 TPMT*3C 基因多态性检测方法的比较与临床应用

曾大勇, 董家珊, 王长连, 黄品芳*, 林荣芳, 刘亦伟(福建医科大学附属第一医院药学部, 福州 350005)

摘要: 目的 建立准确、快速、经济的方法, 检测 *NUDT15 c.415C>T* 和 *TPMT*3C* 基因多态性, 探讨临床应用价值。方法 收集 2017 年 5 月—2018 年 5 月期间福建汉族患者服用硫唑嘌呤 2 周以上的血清样本, 提取 DNA 或白细胞后分别采用 PCR-RFLP 法、PCR-Sanger 测序法和荧光定量 PCR 法对 *NUDT15 c.415C>T* 和 *TPMT*3C* 进行基因多态性分型, 比较这 3 种方法的准确性、简便性及经济性。根据白细胞值分组, 结合临床资料, 探讨基因多态性等因素与硫唑嘌呤致白细胞减少的相关性。结果 共纳入 129 例患者, 其中硫唑嘌呤致白细胞减少 15 例(11.6%)。3 种方法的基因多态性检测结果一致, *TPMT*3C* 未发现突变纯合子。携带 *NUDT15c.415C>T* 突变等位基因者服用硫唑嘌呤致白细胞减少的风险高于携带野生等位基因者($OR=6.2$, $95\%CI: 2.5\sim15.4$, $P=0.000\ 054$), 而携带 *TPMT*3C* 突变等位基因者与野生等位基因者出现白细胞减少比例并无显著性差异($P=0.393$)。 *NUDT15c.415C>T* 基因多态性预测白细胞减少敏感度为 53.3%, 特异度为 85.1%, ROC 曲线 AUC 为 0.69。结论 3 种方法都可用于临床检测 *NUDT15 c.415C>T* 和 *TPMT*3C* 基因多态性。PCR-RFLP 法不需要专用试剂盒, 也不需要昂贵的仪器设备, 成本较低, 过程简单, 易于操作, 特别适合条件有限的单位开展工作。福建汉族患者在服用硫唑嘌呤前进行 *NUDT15c.415C>T* 基因多态性检测比 *TPMT*3C* 更具临床价值。

关键词: 硫唑嘌呤; 白细胞减少; *NUDT15c.415C>T*; *TPMT*3C*; 基因多态性检测

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)09-1102-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.09.015

引用本文: 曾大勇, 董家珊, 王长连, 等. *NUDT15c.415C>T* 和 *TPMT*3C* 基因多态性检测方法的比较与临床应用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(9): 1102-1106.

Comparison and Clinical Application of Genotyping Approaches for Azathioprine Induced Leukocyte Reduction Alleles *NUDT15C.415C>T* and *TPMT*3C*

ZENG Dayong, DONG Jiashan, WANG Changlian, HUANG Pinfang*, LIN Rongfang, LIU Yiwei(Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an accurate, rapid and economical method for detecting *NUDT15 c.415C>T* and *TPMT*3C* gene polymorphisms and evaluate the value of their clinical application. **METHODS** Serum samples of patients taking azathioprine for more than 2 weeks from May 2017 to May 2018 in Fujian were collected. *NUDT15 c.415C>T* and *TPMT*3C* were genotyping by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), PCR-Sanger, and real-time PCR. The accuracy, simplicity and economy of the three methods were compared. The association between genetic polymorphisms and azathioprine-induced leukocyte reduction was analyzed in combination with clinical data. **RESULTS** A total of 129 patients were included, 15 (11.6%) of whom developed leukopenia. The results of the methods were essentially equivalent. No mutant homozygote genotype was found in *TPMT*3C* gene. There was strong associations of *NUDT15 c.415C>T* with azathioprine-induced leukopenia ($OR=6.2$, $95\%CI: 2.5\sim15.4$, $P=0.000\ 054$), whereas there was no relevance for *TPMT*3C* ($P=0.393$). The predictive sensitivity of *NUDT15 c.415C>T* was 53.3%, specificity was 85.1%, and AUC of ROC curve was 0.69. **CONCLUSION** The three methods can be used for clinical detection of *NUDT15 c.415C>T* and *TPMT*3C* gene polymorphisms. The PCR-RFLP method does not require special kit, no expensive equipment, low cost, simple process, easy operability, and especially applicable to the basic medical institutions or scientific research units with limited conditions. The detection of *NUDT15c.415C>T* gene polymorphisms for Fujian Han patients with azathioprine has better clinical value than the detection of *TPMT*3C*.

KEYWORDS: azathioprine; leukocyte; *NUDT15 c.415C>T*; *TPMT*3C*; gene polymorphism detection

硫唑嘌呤是嘌呤类免疫抑制剂, 主要用于治疗器官移植后免疫抑制及类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫性疾病, 广泛用于治疗克罗恩病、溃疡性结肠炎等慢性炎症性肠道疾病^[1]。

硫唑嘌呤作为前体药物, 经肝脏代谢成为活性产物 6-硫鸟嘌呤核苷酸后发挥治疗作用, 硫嘌呤甲基转移酶(thiopurine S-methyltransferase, TPMT)是影响硫唑嘌呤代谢的关键酶之一。TPMT 基因突

基金项目: 福建省卫生计生中青年骨干人才培养项目(2016-ZQN-38); 福建省卫生计生科研人才培养项目资助(2018-ZQN-53)

作者简介: 曾大勇, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0591)87981331 E-mail: 34173005@qq.com *通信作者: 黄品芳, 女, 主任药师 Tel: (0591)87981331 E-mail: 2363869908@qq.com

变导致酶活性降低或缺乏,使得 6-硫鸟嘌呤核苷酸浓度过高而引起严重的骨髓抑制^[2]。TPMT 常见的突变等位基因为 *TPMT*2*、*TPMT*3A*、*TPMT*3B* 和 *TPMT*3C*。其中 *TPMT*3C* 是非洲、亚洲人群最常见的突变等位基因^[3]。*NUDT15* 作为水解酶,能使硫唑嘌呤的活性代谢物 6-TGTP 和 6-TGDP 去磷酸化而减少毒性,近年多项研究发现,在亚裔人群中该基因突变率远高于 *TPMT*3C*,与硫唑嘌呤致白细胞减少有更强的相关性^[4-8]。因此,建立一种准确、快速、经济的方法用于检测 *NUDT15 c.415C>T* 和 *TPMT*3C* 基因多态性,合理调整硫唑嘌呤用量,避免白细胞减少,具有较好的临床应用价值。

1 仪器与材料

1.1 研究样本

2017 年 5 月—2018 年 5 月在福建医科大学附属第一医院接受硫唑嘌呤治疗 2 周以上的福建籍汉族患者。硫唑嘌呤致白细胞值(WBC)<3.0×10⁹·L⁻¹ 归入白细胞减少组, WBC=(3.0~9.5)×10⁹·L⁻¹ 者归入白细胞正常组。未服用硫唑嘌呤,服用硫唑嘌呤前白细胞减少或其他药品或疾病会引起白细胞减少者均不纳入。

1.2 仪器与试剂

BIO-RAD T100 梯度 PCR 仪(美国伯乐公司); TL998A 型基因扩增荧光检测仪(西安天隆科技有限公司); ABI 3730 型基因分析仪(美国应用生物系统公司); DYY-7C 型转印电泳仪(北京市六一仪器厂); Tocan240 全自动凝胶成像系统(上海领成生物科技有限公司); TCHS-05RO/10F 检验分析用纯水设备(杭州天创环境科技股份有限公司); CU-420 电热恒温水槽(上海一恒科学仪器有限公司); AE-240 双量程电分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

血液基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型); 测序反应通用试剂盒(北京华夏时代基因科技发展有限公司,批号: 4220180119); 2xTaq PCR MasterMix [天根生化科技(北京)有限公司]; 扩增引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]; 4S GelRed 核酸染料、琼脂糖、DNA Marker 均来自 BBI 生命科学有限公司; 限制性内切酶 Taal(HpyCH4III)、AccI(Xmil)均来自赛默飞世尔科技公司。

2 方法

2.1 样本收集及 DNA 提取

经患者知情同意采取外周静脉血 1 mL, EDTA

抗凝,以吸附柱法提取 DNA,紫外检测法测定 DNA 纯度。标准为 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值 1.7~1.9,达标后将浓度调至 20 ng·μL⁻¹, -70 °C 保存。

2.2 PCR 扩增

根据参考文献 [9] 设计引物。*NUDT15 c.415C>T* 引物序列: F 5-CCCAAATAAACACCCT TTGTTTTCTGT-3, R 5-CCTTTGTATCCCACCAG ATGGTTC-3; *TPMT*3C* 引物序列: F 5-CACCCA GCCAATTTTGAGTA-3, R 5-CAGGTAACACATG CTGATTGG-3。

扩增体系: 2xTaq PCR Master Mix 12.5 μL, 样本 DNA 2 μg, 上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 1.0 μL, 加双蒸水至 25.0 μL。

扩增条件: 预变性 95 °C 10 min, 变性 95 °C 1 min、退火(*NUDT15 c.415C>T* 62 °C; *TPMT*3C* 60 °C)45 s、延伸 72 °C 45 s, 共 35 个循环, 终末延伸 72 °C 10 min, 4 °C 保存。

凝胶电泳, *NUDT15 c.415C>T* 和 *TPMT*3C* 扩增产物分别在 191 bp 和 494 bp 处有特异性条带的,再分别采用 RFLP 法和 Sanger 测序[委托生工生物工程(上海)股份有限公司],进行基因分型。

2.3 PCR-RFLP 法

Taal 酶切反应体系(20 μL): PCR production 10 μL、10×Buffer Tango 2 μL、Taal 1 μL、Nuclease-free water 7 μL。反应条件: 65 °C 下水浴 4 h; AccI 酶切反应体系(20 μL): PCR production 10 μL、10×Buffer Tango 2 μL、AccI 1 μL、Nuclease free water 7 μL。反应条件: 37 °C 下水浴 4 h。酶切产物经凝胶电泳,拍照留底。

结果判定: *NUDT15 c.415C>T* 野生纯合子(CC)仅保留 191 bp 特异性条带;突变杂合子(CT)在 191, 122, 69 bp 处出现特异性条带;突变纯合子(TT)在 122, 69 bp 处出现特异性条带。*TPMT*3C* 野生纯合子(AA)仅保留 494 bp 特异性条带;突变杂合子(AG)在 494, 314, 180 bp 处出现特异性条带;突变纯合子(GG)在 314, 180 bp 处出现特异性条带。

2.4 荧光定量 PCR 法

根据操作手册,从患者血液样本中提取白细胞,加入 60 μL 专用 SNP 分析保存液,混匀后取 1.5 μL 加入专用 SNP 分析样本处理试剂,充分混匀放入 TL998A 检测仪器中,运行程序,自动分析得到 *TPMT*3C* 基因多态性结果。由于没有 *NUDT15 c.415C>T* 专用试剂盒,其基因多态性未按此法检测。

2.5 统计方法

使用 SPSS 20 统计软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ ，计数资料采用 χ^2 检验和 Fisher 精确检验，白细胞减少相关因素采用 Logistic 回归分析，相关因素敏感度采用 ROC 曲线图分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 基本资料

本研究共纳入 129 例患者，男女比例为 89 : 40，平均年龄为 (34 ± 11) 岁，(13~66) 岁。白细胞减少组 15 例(11.6%)，白细胞正常组 114 例(88.4%)，经分析，2 组在性别、年龄和硫唑嘌呤剂量方面差异均无统计学意义，结果见表 1。

表 1 硫唑嘌呤致白细胞减少相关因素分析

Tab. 1 Analysis of related factors of leukocyte reduction induced by azathioprine

相关因素	男性(%)	年龄/岁	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
白细胞减少组($n=15$)	8(53.3)	34.1 ± 9.8	1.2 ± 0.4
白细胞正常组($n=114$)	81(71.1)	33.7 ± 11.1	1.3 ± 0.5
χ^2/t 值	1.21	0.32	0.73
P 值	0.272	0.570	0.395

3.2 基因分型结果

NUDT15c.415C>T 基因分型：CC 104 例(80.7%)，CT 23 例(17.9%)，TT 2 例(1.6%)，等位基因(T)突变频率为 10.5%；TPMT*3C 基因分型：AA 125 例(96.8%)，AG 4 例(3.2%)，没有发现突变纯合子，等位基因(G)突变频率为 1.6%。2 种基因多态性分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律，结果见表 2。

表 2 NUDT15 c.415C>T 和 TPMT*3C 基因分型结果

Tab. 2 NUDT15 c.415C>T and TPMT*3C genotyping results

NUDT15 c.415C>T+ TPMT*3C	白细胞减少组/ 例数(%)	白细胞正常组/ 例数(%)	合计/ 例数(%)
CC+AA	7(46.7)	95(83.3)	102(79.1)
CC+AG	—	2(1.8)	2(1.6)
CT+AA	5(33.3)	16(14.0)	21(16.3)
CT+AG	1(6.7)	1(0.9)	2(1.6)
TT+AA	2(13.3)	—	2(1.6)
合计	15	114	129

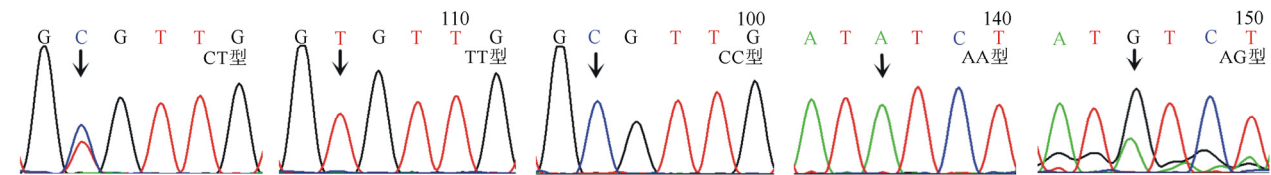


图 2 NUDT15 c.415C>T 和 TPMT*3C 扩增产物测序片段图

Fig. 2 DNA sequencing analysis results of PCR amplification products of NUDT15 c.415C>T and TPMT*3C

PCR-RFLP 法、PCR-Sanger 测序及荧光定量 PCR 法结果分别见图 1~3。

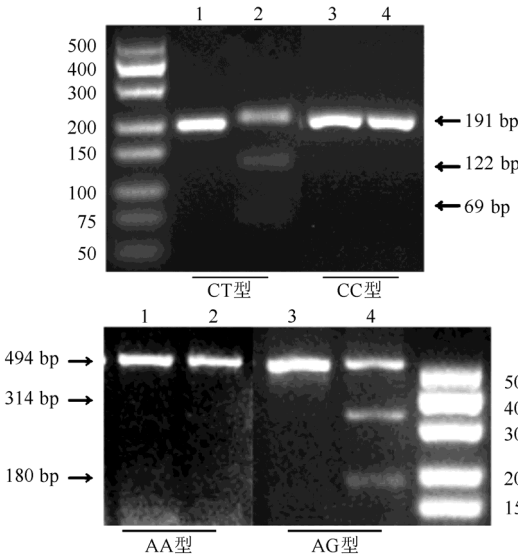


图 1 NUDT15 c.415C>T 和 TPMT*3C 扩增产物及酶切产物电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis results of PCR amplification products and digestion products of NUDT15 c.415C and TPMT*3C

3.3 方法比较

经互相验证，3 种方法测定结果一致，都可用于 NUDT15 c.415C>T 和 TPMT*3C 基因多态性检测，但各有优缺点。PCR-RFLP 法操作步骤最多，但耗时较短，仪器设备要求低，单次成本最低；荧光定量 PCR 法最简便，耗时最短，但必须有专用试剂盒，且价格较贵，单次成本最高；PCR-Sanger 测序法仪器成本最昂贵，若委托公司测序，耗时将大幅增加，见表 3。

3.4 基因多态性与硫唑嘌呤致白细胞减少的相关性

携带 NUDT15c.415C>T 突变等位基因者服用硫唑嘌呤致白细胞减少比例高于携带野生等位基因者($OR=6.2$, $95\%CI: 2.5 \sim 15.4$, $P=0.000\ 054$)，而携带 TPMT*3C 突变等位基因者与野生等位基因者出现白细胞减少比例并无显著性差异($P=0.393$)。NUDT15c.415C>T 基因多态性预测白细胞减少敏感度为 53.3%，特异度为 85.1%，ROC 曲线 AUC 为 0.69，结果见表 4。

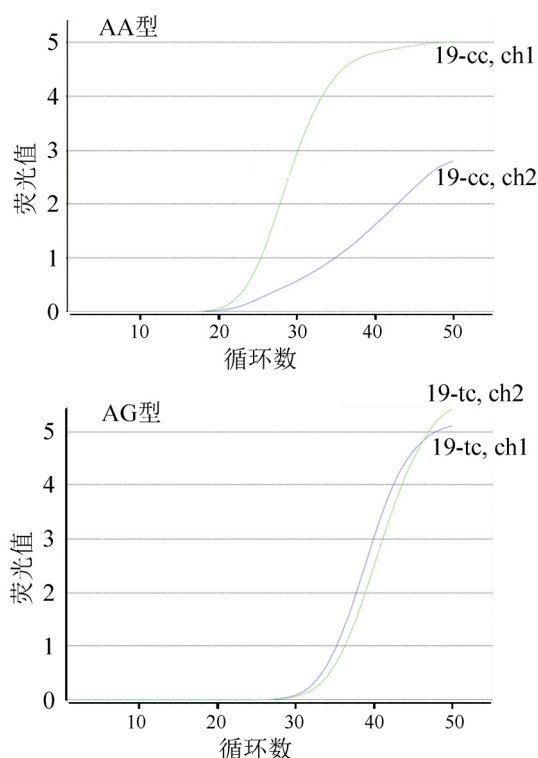


图3 *TPMT*3C* 荧光定量 PCR 法检测结果

Fig. 3 Realtime fluorescence quantitative PCR results of *TPMT*3C*

表3 3种基因多态性检测方法的比较

Tab. 3 Comparison of three genetic polymorphisms detection methods

检测方法	主要步骤	耗时/ h	试剂/ 元/位点	仪器/ 万元
PCR-RELP 法	DNA 提取-PCR 扩增-凝胶电泳拍照-酶切-凝胶电泳拍照分析	7.0	35	6
PCR-Sanger 测序法	DNA 提取-PCR 扩增-凝胶电泳拍照-扩增产物提纯-测序分析	7.5	55	406
委托测序	DNA 提取-PCR 扩增-凝胶电泳拍照-委托测序分析	50.0	40	6
荧光定量 PCR 法	白细胞提取-加入专用试剂-进样后自动分析	3.0	350	-

注：主要仪器成本参考 Thermal cycler T100PCR 仪与 ABI3730 全自动序列分析仪价格，TL998A 检测仪器与试剂盒配套，成本分摊至试剂盒中。

Note: The main instrument cost refers to the price of Thermal cycler T100PCR and ABI3730. The price of TL998A allocates to the kit.

表4 *NUDT15* c.415C>T 和 *TPMT*3C* 基因多态性与硫唑嘌呤致白细胞减少关联性

Tab. 4 Association of *NUDT15* and *TPMT*3C* genotypes and leukopenia

基因	类型	白细胞减少比例/%	P 值	等位基因	频率/%	P 值	OR(95%CI)
<i>NUDT15</i> c.415>T	CC	6.7(7/104)	0.000 372	C	89.5	0.000 054	6.2(2.5~15.4)
	CT	26.1(6/23)		T	10.5		
	TT	100.0(2/2)					
<i>TPMT*3C</i>	AA	11.2(14/125)	0.393	A	98.4	0.393	2.6(0.3~27.2)
	AG	25.0(1/4)		G	1.6		

4 讨论

本研究中 3 种方法相互验证，确保结果的可靠性。实时荧光定量 PCR 法利用不同等位基因标记的荧光染料性质差异，通过检测特定的荧光信号来判断基因分型，灵敏度高，结果准确，操作简便，耗时最短，所用仪器并不很昂贵，易于推广使用。但该方法必须有市场化的专用试剂盒，且成本较高，适用于对少量位点、大样本检测。PCR-RFLP 通过限制性核酸内切酶切片长度多态性揭示 DNA 碱基序列组成的异同，是最早用于基因分型的经典方法之一，现在仍被临床广泛采用。具有灵敏度较高，对扩增产物纯度要求不苛刻，无需特别的仪器设备，成本低，可重复性强等特点，但主要以手工操作为主，受通量限制，工作量较大，不利于大样本检测，且只适合部分单核苷酸多态性分型，用于设备条件有限的实验室开展小样本分型。Sanger 法测序，也称直接测序法，是 DNA 序列分析的经典方法，被公认为是基因分型的金标准。该法可从仪器上直接读取 DNA 序列，但基因测序仪昂贵，对实验室环境、操作技术，扩增产物纯度等要求较高，大规模临床应用受限，不易普及。如果选择外送测序，可能影响时效性。

无论是酶切法还是测序法都必须经过 PCR 扩增和凝胶电泳等过程，因此优化 PCR 扩增反应体系、反应条件及电泳条件等成为检测过程的关键部分。在反应体系中 DNA 的纯度，扩增酶的高效及保真性，引物设计的优劣等都会影响检测结果。在反应条件中退火温度是最重要环节，由引物的长度、碱基组成及其浓度，还有靶基序列的长度决定。本研究中 *NUDT15* 扩增分别以不同梯度温度(56, 58, 60, 62, 64 °C)作为退火温度，根据结果确定最优退火温度为 62 °C；*TPMT*3C* 扩增分别以不同的梯度温度(52, 54, 57, 60, 62 °C)作为退火温度，最后确定最优退火温度为 60 °C。琼脂糖凝胶浓度的高、低影响结果判读，浓度过低产物不能很好的分离，浓度过高需要延长电泳

时间或增大电压, 这些因素会导致 PCR 产物或酶切产物容易弥散, 电泳条带模糊。因此, 本研究预实验分别制备不同浓度(1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4%)的琼脂糖凝胶, 在不同电压(80, 90, 100, 110 V)及不同时间(45, 60, 75, 90, 105 min)下电泳, 最后确定 3.5%的琼脂糖凝胶在 100 V、90 min 条件下, DNA Marker 和 PCR 产物或酶切产物电泳效果最好。

本研究病例中 *NUDT15 c.415C>T* 和 *TPMT*3C* 等位基因突变率分别为 10.5%和 1.6%, 低于国际千人基因组数据库中中国南方汉族人群突变率 16.19%和 2.86%^[10], 与张建萍等^[11]研究中国汉族健康人群 *TPMT*3C* 突变率 1.33%相近。结果显示, *NUDT15 c.415C>T* 突变者更易发生白细胞减少($P<0.05$)。其中 2 例携带该基因突变纯合子的患者服用硫唑嘌呤后还出现 IV 度严重骨髓抑制, 与国内 2 篇病例报道^[8,12]相似。*TPMT*3C* 突变与白细胞减少并不显著相关, 这与亚裔人群 *TPMT* 突变率低密切相关。因此, 在亚裔人群中为了避免硫唑嘌呤致白细胞减少, 用药前进行 *NUDT15 c.415C>T* 基因多态性检测比 *TPMT*3C* 检测可能更有临床意义, 但并不代表 *TPMT* 基因多态性检测没有价值。有大量证据支持在突变率高的白种人群和非裔美国人群中 *TPMT*3C* 的检测价值, 而且该基因突变还与顺铂所致儿童耳毒性密切相关^[13]。因此, FDA 已批准在 6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、硫唑嘌呤和顺铂的药品说明书中增加在用药前进行 *TPMT* 基因多态性检测的建议。鉴于 6-硫鸟嘌呤核苷酸浓度和骨髓抑制或肝毒性等不良反应的关联性尚存争议^[14-15], 还有待扩大样本量进一步明确, 因此药物代谢相关基因的检测就突显价值。

随着基因检测技术的日益更新与成熟, 越来越多快速、有效、经济的单核苷酸多态性研究方法不断出现, 比如高分辨率熔解曲线法等, 但是新技术广泛普及尚需时日。如果实验室有严格的质控措施和操作规程, 并能通过国家卫计委临检中心室间质评, 一些经典检测方法依然可以使用。本研究已证实 PCR-RFLP 法可以用于检测 *NUDT15 c.415C>T* 和 *TPMT*3C* 基因多态性, 具有准确、快速、简便、经济等优点, 特别适合基层医疗机构或科研单位, 有助于降低硫唑嘌呤致白细胞减少的发生风险, 提高患者用药安全。

REFERENCES

- [1] PRESENT D H, KORELITZ B I, WISCH N, et al. Treatment of Crohn's disease with 6-mercaptopurine. Along-term, randomized, double-blind study [J]. *N Engl J Med*. 1980(302): 981-987.
- [2] 马晓莉, 吴敏媛, 胡亚美, 等. 硫唑嘌呤甲基转移酶基因多态性位点与酶活性的关系[J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(6): 456-459.
- [3] LENNARD L. Implementation of TPMT testing [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, 77(4): 704-714.
- [4] YANG S K, HONG M, BAEK J, et al. A common missense variant in *NUDT15* confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia [J]. *Nature genetics*, 2014, 46(9): 1017-1020.
- [5] ZHU X, WANG X D, CHAO K, et al. *NUDT15* polymorphisms are better than thiopurine S-methyltransferase as predictor of risk for thiopurine-induced leukopenia in Chinese patients with Crohn's disease [J]. *Alimentary Pharmacol Therapeutics*, 2016, 44(9): 967-975.
- [6] KAKUTA Y, NAITO T, ONODERA M, et al. *NUDT15* R139C causes thiopurine-induced early severe hair loss and leukopenia in Japanese patients with IBD [J]. *Pharmacogenomics J*, 2016, 16(3): 280-285.
- [7] SHAH S A, PARADKAR M, DESAI D, et al. Nucleoside diphosphate-linked moiety X-type motif 15 C415T variant as a predictor for thiopurine-induced toxicity in Indian patients [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 32(3): 620-624.
- [8] ZHOU Y, WU J, GUO W, et al. A variant of the gene *NUDT15* caused azathioprine-induced myelosuppression: a case report [J]. *Fudan Univ J Med Sci (复旦学报: 医学版)*, 2017, 44(4): 542-544.
- [9] HO C C, FONG W Y, LEE Y H, et al. Novel tetra-primer ARMS-PCR assays for thiopurine intolerance susceptibility mutations *NUDT15 c. 415C>T* and *TPMT c. 719A>G (TPMT*3C)* in East Asians [J]. *Genes*, 2017, 8(10): 1-8.
- [10] IGS and the 1000 Genomes Project [DB/OL]. [2019-04-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes>.
- [11] ZHANG J P, GUAN Y Y, WANG Y Y, et al. Genetic polymorphism of the thiopurine s-methyltransferase of healthy Han Chinese [J]. *Chin J Cancer (癌症)*, 2003, 22(4): 385-388.
- [12] FEI X, SHU Q, HUA B Z, et al. *NUDT15* R139C variation increases the risk of azathioprine-induced toxicity in Chinese subjects: Case report and literature review [J]. *Medicine*, 2018, 97(17): e0301. Doi: 10.1097/MD.00000000000010301
- [13] ROSS C J, KATZOV-ECKERT H, DUBÉ M P, et al. Genetic variants in *TPMT* and *COMT* are associated with hearing loss in children receiving cisplatin chemotherapy [J]. *Nat Genet*, 2009, 41(12): 1345-1349. www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics.
- [14] ZOCHOWSKA D, ZEGARSKA J, HRYNIEWIECKA E, et al. Determination of concentrations of azathioprine metabolites 6-thioguanine and 6-methylmercapto purine in whole blood with the use of liquid chromatography combined with mass spectrometry [J]. *Transplant Proc*, 2016, 48(5): 1836-1839.
- [15] LI X, MEI S, GONG X, et al. Relationship between Azathioprine metabolites and therapeutic efficacy in Chinese patients with neuromyelitis optica spectrum disorders [J]. *Bmc Neurol*, 2017, 17(1): 130. Doi: 10.1186/s12883-017-0903-5.

收稿日期: 2018-06-16

(本文责编: 蔡珊珊)