

小样本探讨黄嘌呤脱氢酶和鸟苷酸合成酶基因多态性对硫唑嘌呤所致骨髓抑制和脱发的影响

钱家健^a, 艾新波^b, 陈超^c, 文志勇^a, 黄思超^a, 周志凌^a[珠海市人民医院(暨南大学附属珠海医院), a.药学部, b.消化内科, c.神经内科, 广东 珠海 519000]

摘要: 目的 研究黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XDH)和鸟苷酸合成酶(guanosine monophosphate synthetase, GMPS)基因多态性对硫唑嘌呤(azathioprine, AZA)所致骨髓抑制和脱发的影响, 探讨上述位点联合 NUDT15 rs116855232 检测对预测 AZA 所致骨髓抑制的价值。方法 回顾性分析曾经服用或正在服用 AZA 治疗自身免疫性疾病患者, 收集静脉血采用直接测序法测定 GMPS rs61750368、rs61750369, XDH rs2295475、rs1884725、rs17011368、rs566362 和 NUDT15 rs116855232 基因型。依据不良反应分为 2 组, 分析上述基因型与 AZA 所致骨髓抑制和脱发的相关性, NUDT15 rs116855232 作为对照位点。结果 共纳入 80 例患者, 2 组在年龄、日剂量、疗程、BMI 以及 6-硫鸟嘌呤核苷酸浓度均无显著性差异。Logistic 回归分析表明, AZA 所致骨髓抑制与 XDH rs2295475 突变相关($P=0.003$, $OR=3.10$, 95%CI: 1.45~6.25), 该基因预测骨髓抑制敏感度为 69.6%, 特异度为 63.2%, ROC 曲线 AUC 为 0.66; NUDT15 rs116855232 突变也和 AZA 所致骨髓抑制相关($P=0.008$, $OR=3.46$, 95%CI: 1.21~9.93); 其余位点基因型暂未发现与骨髓抑制和脱发相关。rs116855232 野生型且 rs2295475 突变型的患者对比两位点野生型的患者, 其骨髓抑制的危险值升高($OR=6.53$, $P=0.004$), 而两位点同时突变者骨髓抑制的危险值更高($OR=51.67$, $P<0.001$)。结论 在中国自身免疫性疾病患者中 XDH rs2295475 突变可能为 AZA 诱导骨髓抑制的独立危险因素, 尽管预测准确度较低但仍有预测价值。尤其 XDH 联合 NUDT15 rs116855232 监测, 可能会弥补 NUDT15 野生型者对骨髓抑制预测不足的风险, 提高 NUDT15 突变型对骨髓抑制预测的准确性, 但以上结果还需更多临床研究验证。

关键词: 硫唑嘌呤; 鸟苷酸合成酶; 黄嘌呤脱氢酶; 骨髓抑制; 脱发

中图分类号: R969.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)20-2498-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.20.012

引用本文: 钱家健, 艾新波, 陈超, 等. 小样本探讨黄嘌呤脱氢酶和鸟苷酸合成酶基因多态性对硫唑嘌呤所致骨髓抑制和脱发的影响[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(20): 2498-2505.

Effects of Xanthine Dehydrogenase and Guanosine Monophosphate Synthetase Gene Polymorphisms on Myelosuppression and Alopecia Induced by Azathioprine in Small Samples

QIAN Jiajian^a, AI Xinbo^b, CHEN Chao^c, WEN Zhiyong^a, HUANG Sichao^a, ZHOU Zhiling^a[Zhuhai People's Hospital(Zhuhai Hospital Affiliated to Jinan University), a.Department of Pharmacy, b.Department of Gastroenterology, c.Department of Neurology, Zhuhai 519000, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of xanthine dehydrogenase(XDH) and guanosine monophosphate synthetase(GMPS) gene polymorphisms on myelosuppression and alopecia induced by azathioprine(AZA). To explore the value that combined detection of NUDT15 rs116855232 and those genotypes predicted AZA induced myelosuppression. **METHODS** Patients who have taken or are taking AZA for autoimmune diseases were retrospective analysed. Genotypes of GMPS rs61750368, rs61750369, XDH rs2295475, rs1884725, rs17011368, rs566362 and NUDT15 rs116855232 were determined by direct sequencing. Patients were grouped according to adverse reactions. The association of these genotypes with AZA-induced myelosuppression and alopecia was analyzed, NUDT15 rs116855232 as control gene. **RESULTS** Eighty patients were included. There were no significant differences in age, daily dose, course of treatment, BMI and 6-thioguanine nucleotide level between two groups. Logistic regression analysis showed that AZA-induced myelosuppression was associated with XDH rs2295475 mutation($P=0.003$, $OR=3.10$, 95%CI: 1.45–6.25). Sensitivity and specificity of this gene predicted myelosuppression were 69.6%, 63.2% respectively, ROC curve was 0.66. AZA-induced myelosuppression was also associated with NUDT15 rs116855232 mutation($P=0.008$, $OR=3.46$, 95%CI: 1.21–9.93). No other genes were found to be associated with myelosuppression and

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(A2017617); 广东省医院药学研究基金(2017A21)

作者简介: 钱家健, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0756)2162032 E-mail: 378607273@qq.com

alopecia. Patients with *rs116855232* wild-type and *rs2295475* mutant had higher risk of myelosuppression compared to those with two-gene wild-type($OR=6.53$, $P=0.004$), while the patients with both genes mutated at the same time had much higher risk of myelosuppression($OR=51.67$, $P<0.001$). **CONCLUSION** XDH *rs2295475* mutation may be an independent risk factor for AZA-induced myelosuppression in Chinese autoimmune patients. Although the prediction accuracy is low but still has predictive value. Particularly, XDH combine with NUDT15 *rs116855232* monitoring may compensate for the risk of inaccurate prediction of myelosuppression in NUDT15 wild-type patients. Combined testing can improve the accuracy of prediction of myelosuppression by NUDT15 mutant type. But these results are further validated by clinical studies.

KEYWORDS: azathioprine; guanosine monophosphate synthetase; xanthine dehydrogenase; myelosuppression; alopecia

硫唑嘌呤(azathioprine, AZA)是一种应用于临床的免疫抑制剂。然而, AZA 因 20%~30%药物不良反应发生率而限制其使用^[1], 这些不良反应包括骨髓毒性、胃肠道不适、肝损伤、脱发等。一些研究^[2-4]报道, NUDT15 R139C (*rs116855232*)突变与 AZA 所致的白细胞减少和严重脱发密切相关。但在目前研究中注意到对于服药 8 周后的患者, NUDT15 R139C 基因型突变与 AZA 所致白细胞减少症的相关性弱^[4-6]。其次, 携带 NUDT15 R139C 野生型的中国患者有 8.5%~17.2%出现白细胞减少症^[4-6], 而携带 NUDT15 R139C 杂合子的中国患者有 32.1%~50.0%未观察到白细胞减少症。这些研究提示, 中国患者是否还有其他高突变率并且与 AZA 不良反应高度相关的基因, 或者有无其他基因与 NUDT15 R139C 联合检测可以更好地提高骨髓抑制的预测率。

鸟苷酸合成酶(guanosine monophosphate synthetase, GMPS)是 AZA 代谢的限速酶之一, 可以催化 6-巯基黄嘌呤单磷酸盐(6-thioxanthosine monophosphate, 6-TXMP)转化成活性代谢产物 6-巯鸟嘌呤核苷酸(6-thioguanine nucleotide, 6-TGN)。Kudo 等^[7]发现, GMPS IVS 5-7T>C (*rs61750368*)和 993A>G (*rs61750369*) 突变率在日本人群分别为 27%和 28%, 然而他们没有提及这 2 个位点的突变是否会增加 AZA 不良反应的风险。黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, XDH)与黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)同为黄嘌呤氧化还原酶的变异体, 在 AZA 代谢中起重要作用。Smith 等^[8]报道 XDH 837C>T 变异携带者发生不良反应较少, 有较弱的保护效应($P=0.048$), 然而具有 XDH 837C>T 变异的患者数量非常少。目前国内对 XDH 基因多态性与 AZA 不良反应的相关性研究较少。

本研究回顾性分析中国自身免疫性疾病患者 GMPS *rs61750368*, GMPS *rs61750369*, XDH

rs2295475, XDH *rs1884725*, XDH *rs17011368* 和 XDH *rs566362* 的基因多态性, 并评价上述基因与 AZA 所致骨髓抑制和脱发的关系。探讨上述基因联合 NUDT15 *rs116855232* 检测对预测 AZA 所致骨髓抑制的价值。

1 资料与方法

1.1 资料来源

选择在珠海市人民医院曾经服用或正在服用 AZA, 且被诊断患有自身免疫性疾病的中国患者为研究对象。AZA 剂量范围为 $0.5\sim 2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 疗程>1 个月, 同时还包括因 1 个月内发生严重不良反应而终止 AZA 治疗的患者。该研究得到了医院伦理委员会批准, 并在检查前获得了所有患者的知情同意。发生骨髓抑制和脱发不良反应的患者定义为研究组, 未发生骨髓抑制和脱发不良反应的患者定义为对照组。排除标准: ①不良反应发生时合并使用其他可能导致骨髓抑制和脱发的免疫抑制剂, 如吗替麦考酚酯、甲氨蝶呤或环磷酰胺等; ②AZA 不良反应发生时合并服用干扰 AZA 代谢的药物(如别嘌醇); ③严重心脏、肝脏和(或)肾功能不全的患者; ④AZA 剂量 $<0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 或 $>2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; ⑤妊娠期或哺乳期患者; ⑥年龄<16 岁或>80 岁的患者; ⑦服药前 1 个月内已出现严重骨髓抑制或脱发的患者; ⑧考虑骨髓抑制或脱发由自身疾病引起; ⑨不愿意参与的患者; ⑩不能提供详细临床资料。纳入患者将记录相关临床资料, 包括年龄、性别、诊断、检验结果、用药史、药物不良反应。

1.2 不良反应标准

采用国家药品不良反应监测中心推荐的方法评估不良反应的关联性。AZA 所致的骨髓抑制定义为白细胞计数 $<3.5\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$ 或者中性粒细胞计数 $<2.0\times 10^9\cdot\text{L}^{-1}$ ^[9]。脱发包括轻度脱发和重度脱发, 轻度脱发为患者自觉脱发增加但不会引起外观问题, 重度脱发为患者自觉脱发严重而中断 AZA 治疗^[4]。

1.3 基因检测以及 6-TGN 测定方法

入组患者抽取外周静脉血 2 mL, 置于乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)抗凝管中。采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和直接测序法对 GMPS *rs61750368*、GMPS *rs61750369*、XDH *rs2295475*、XDH *rs1884725*、XDH *rs17011368*、XDH *rs566362* 和 NUDT15 *rs116855232* 测定分型。DNA 提取、各位点引物序列的设计和合成以及测序由北京六合华大基因科技有限公司完成。正在服用 AZA 患者在服用 AZA 1 个月后抽取外周静脉血 2 mL, 置于 EDTA 抗凝管中, 采用 HPLC 测定红细胞中 6-TGN 浓度^[4], 血液样本送至广州达安临床实验中心检测。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 25.0 统计软件包进行各项统计分析。计量资料符合正态分布者以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不符合正态分布者以中位数/四分位数表示, 分类变量以人数或频率表示。分类变量间的比较采用 χ^2 检验、连续校正 χ^2 检验或 Fisher 检验。采用 Mann-Whitney *U* 检验或 *t* 检验评价连续变量之间的差异。导致骨髓抑制或脱发的危险因素采用二元 Logistic 多因素回归分析, 采用 ROC 曲线图分析相关因素敏感度。用 Hardy-Winberg 平衡检验样本的群体代表性, 计算各等位基因的频率。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料

共随访 112 例正在服用或曾经服用 AZA 的患者, 其中 32 例由于以下原因被排除在研究之外: 不愿参与($n=18$), 提供资料不全($n=6$), 同时服用另一种免疫抑制剂($n=4$), 失去随访($n=4$)。最后纳入 80 例患者进行分析, 自身免疫性疾病分布如下: 系统性红斑狼疮($n=6$)、克罗恩病($n=45$)、视神经脊髓炎($n=12$)、自身免疫性肝炎($n=2$)、多发性硬化($n=4$)、IgG4 相关疾病($n=1$)、血管炎($n=1$)、溃疡性结肠炎($n=4$)、自身免疫性脑炎($n=2$)、吉兰-巴雷综合征($n=1$)、重症肌无力($n=1$)、白塞氏病($n=1$)。研究组 35 例, 其中 24 例出现骨髓抑制, 13 例出现脱发, 其中 4 例因为脱发严重在服用 AZA 1 个月后停药。2 组患者在年龄、体质量指数(body mass index, BMI)、AZA 剂量、AZA 疗程、6-TGN 浓度均无显著性差异, 结果见表 1。性别在

2 组间有统计学差异($P=0.048$), 进行亚组分析性别在骨髓抑制发生率间无差异($P=0.84$), 而在脱发发生率间有差异($P < 0.001$)。

2.2 XDH *rs2295475*、XDH *rs1884725*、XDH *rs17011368*、XDH *rs566362*、GMPS *rs61750368*、GMPS *rs61750369* 和 NUDT15 *rs116855232* 基因型分析结果

经检验, XDH *rs2295475*、XDH *rs1884725*、GMPS *rs61750368*、GMPS *rs61750369* 和 NUDT15 *rs116855232* 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。XDH *rs17011368* 和 XDH *rs566362* 未发现基因突变, 结果见表 2。在 80 例患者中, XDH *rs2295475* GG、GA 和 AA 型基因频率分别为 53.75%、37.50%和 8.75%。XDH *rs1884725* GG、GA 和 AA 型基因频率分别为 66.25%、31.25%和 2.50%。GMPS *rs61750368* TT、TC 和 CC 型基因频率分别为 66.25%、30.00%和 3.75%。GMPS *rs61750369* AA、AG 和 GG 型基因频率分别为 65.00%、30.00%和 5.00%。NUDT15 *rs116855232* CC 和 CT 型基因频率分别为 80.00%和 20.00%。

表 1 2 组患者一般临床资料比较

Tab. 1 Comparison of clinical baseline in two groups

临床资料	研究组	对照组	<i>P</i>
例数/例(%)	35(43.75)	45(56.25)	—
男/女 ^a /例	14/21	28/17	0.048
年龄 ^b /岁	32.00(28.00~35.00)	33.00(28.00~44.50)	0.43
BMI ^b /kg·m ⁻²	20.58(18.82~22.51)	21.26(18.34~23.80)	0.47
AZA 剂量 ^b /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	1.43(0.93~1.67)	1.56(1.43~1.71)	0.12
6-TGN ^b /pmol·8×10 ⁻⁸ RBC	258.38(212.66~372.43)	279(215.89~377.99)	0.95
AZA 疗程/月	6(2~24)	9(6~24)	0.17
疾病分布情况/例			
系统性红斑狼疮	4	2	
克罗恩病	19	26	
视神经脊髓炎	4	8	
自身免疫性肝炎	1	1	
多发性硬化	1	3	
IgG4 相关疾病	0	1	
血管炎	0	1	
溃疡性结肠炎	4	0	
自身免疫性脑炎	1	1	
吉兰-巴雷综合征	1	0	
白塞氏病	0	1	
重症肌无力	0	1	

注: a- χ^2 检验; b-Mann-Whitney *U* 检验。

Note: a- χ^2 test; b-Mann-Whitney *U* test.

表 2 XDH *rs2295475*、XDH *rs1884725*、XDH *rs17011368*、XDH *rs566362*、GMPS *rs61750368*、GMPS *rs61750369* 和 NUDT15 *rs116855232* 等位基因的分布

Tab. 2 Distribution of alleles XDH *rs2295475*, XDH *rs1884725*, XDH *rs17011368*, XDH *rs566362*, GMPS *rs61750368*, GMPS *rs61750369* and NUDT15 *rs116855232*

位点	基因型	序号	基因型频率/%	等位基因关联		
				等位基因	等位基因频率/%	HWE <i>P</i> 值
XDH <i>rs2295475</i>	GG	43	53.75	G	72.50	0.87
	GA	30	37.50	A	27.50	
	AA	7	8.75			
XDH <i>rs1884725</i>	GG	53	66.25	G	81.87	0.89
	GA	25	31.25	A	18.13	
	AA	2	2.50			
XDH <i>rs17011368</i>	TT	80	100.00	T	100.00	—
XDH <i>rs566362</i>	GG	80	100.00	G	100.00	—
GMPS <i>rs61750368</i>	TT	53	66.25	T	81.25	0.99
	TC	24	30.00	C	18.75	
	CC	3	3.75			
GMPS <i>rs61750369</i>	AA	52	65.00	A	80.00	0.86
	AG	24	30.00	G	20.00	
	GG	4	5.00			
NUDT15 <i>rs116855232</i>	CC	64	80.00	C	90.00	0.61
	CT	16	20.00	T	10.00	

注: HWE 表示 Hardy-Weinberg 平衡。

Note: HWE meant Hardy-Weinberg equilibrium.

2.3 XDH、GMPS、NUDT15 基因多态性与 6-TGN 浓度、骨髓抑制以及脱发的相关性

应用二元 Logistics 多因素回归分析 XDH、GMPS 及 NUDT15 基因型与 AZA 所致不良反应间的关系。携带 XDH *rs2295475* 野生型(GG)患者 13 例(30.23%)出现骨髓抑制或脱发,突变型(GA+AA)患者 22 例(59.46%)出现骨髓抑制或脱发,该位点突变型与野生型比较有统计学差异($P=0.002$)。与携带野生等位基因(G)者相比,携带突变等位基因(A)者出现骨髓抑制或脱发风险更高($OR=3.08$, 95%CI: 1.50~6.34)。该基因预测骨髓抑制或脱发风险的敏感度为 57.1%, 特异度为 71.0%, ROC 曲线 AUC 为 0.64。携带 NUDT15 *rs116855232* 野生型(CC)患者 23 例(35.94%)出现骨髓抑制或脱发,突变型(CT)患者 12 例(75.00%)出现骨髓抑制或脱发,该位点突变型与野生型比较有统计学差异($P=0.026$)。与携带野生等位基因(C)者相比,携带突变等位基因(T)者出现骨髓抑制或脱发风险更高($OR=4.45$, 95%CI: 1.37~14.47)。而 XDH *rs1884725*、GMPS *rs61750368*、GMPS *rs61750369* 暂未发现其基因突变会增加骨髓抑制或脱发风险,结果见表 3。

携带 XDH *rs2295475* 野生型(GG)患者 7 例(16.28%)出现骨髓抑制,突变型(GA+AA)患者 17 例(45.95%)出现骨髓抑制,该位点突变型与野生型比较有统计学差异($P=0.003$)。与携带野生等位基因(G)者相比,携带突变等位基因(A)者出现骨髓抑制风险更高($OR=3.10$, 95%CI: 1.45~6.25)。该基因预测骨髓抑制敏感度为 69.6%,特异度为 63.2%, ROC 曲线 AUC 为 0.66。携带 NUDT15 *rs116855232* 野生型(CC)患者 15 例(23.44%)出现骨髓抑制,杂合子(CT)患者 9 例(56.25%)出现骨髓抑制,该位点突变型与野生型比较有统计学差异($P=0.008$)。与携带野生等位基因(C)者相比,携带突变等位基因(T)者出现骨髓抑制风险更高($OR=3.46$, 95%CI: 1.21~9.93)。而 XDH *rs1884725*、GMPS *rs61750368*、GMPS *rs61750369* 暂未发现其基因突变会增加骨髓抑制风险,结果见表 3。纳入研究的位点暂未发现其基因突变会增加脱发风险,尤其对 4 例因脱发而停药者暂未发现差异。

2.4 6-TGN 红细胞浓度与不同位点基因分型以及不良反应间的关系

共 62 例患者监测 6-TGN 红细胞浓度, XDH

表 3 XDH、GMPS 基因型、6-TGN 浓度与脱发和骨髓抑制的相关性

Tab. 3 Association of XDH and GMPS genotype, 6-TGN levels with alopecia and myelosuppression

位点	基因型	人数	6-TGN/ pmol·8×10 ⁻⁸ RBC	不良反应/例(%)		
				骨髓抑制或脱发	骨髓抑制	脱发
XDH <i>rs2295475</i>	GG	43	288.00(<i>n</i> =35)(215.86~354.51)	13(30.23)	7(16.28)	8(18.60)
	GA	30	282.02(<i>n</i> =24)(218.22~447.48)	16(53.33)	13(43.33)	3(10.00)
	AA	7	159.30(<i>n</i> =3)(132.50~237.90)	6(85.71)	4(57.14)	2(28.57)
<i>P</i>			0.89 ^a	0.002	0.003	0.89
等位基因 <i>OR</i> (95% <i>CI</i>)			—	3.08(1.50~6.34)	3.10(1.45~6.26)	0.97(0.37~2.49)
XDH <i>rs1884725</i>	GG	53	297.18(<i>n</i> =40)(214.26~380.72)	23(43.40)	15(28.30)	9(16.98)
	GA	25	247.19(<i>n</i> =22)(216.92~325.95)	10(40.00)	7(28.00)	4(16.00)
	AA	2	—	2(100.00)	2(100.00)	0(0.00)
<i>P</i>			0.35 ^a	0.85	0.92	0.97
等位基因 <i>OR</i> (95% <i>CI</i>)			—	1.12(0.50~2.52)	1.40(0.59~3.27)	0.79(0.25~2.50)
GMPS <i>rs61750368</i>	TT	53	302.30(<i>n</i> =41)(228.03~388.35)	23(43.40)	16(30.19)	9(25.00)
	TC	24	252.60(<i>n</i> =19)(156.82~309.00)	10(41.67)	6(25.00)	4(26.67)
	CC	3	118.90~607.53(<i>n</i> =2)	2(66.67)	2(66.67)	0(0.00)
<i>P</i>			0.038 ^a	1.00	1.00	1.00
等位基因 <i>OR</i> (95% <i>CI</i>)			—	1.03(0.42~2.52)	1.31(0.56~3.06)	0.91(0.27~3.08)
GMPS <i>rs61750369</i>	AA	52	302.30(<i>n</i> =41)(228.03~388.35)	23(44.23)	16(30.77)	9(17.31)
	AG	24	253.34(<i>n</i> =18)(156.11~309.54)	10(41.67)	6(25.00)	4(16.67)
	GG	4	156.82(<i>n</i> =3)(118.90~607.53)	2(50.00)	2(50.00)	0(0.00)
<i>P</i>			0.041 ^a	1.00	1.00	1.00
等位基因 <i>OR</i> (95% <i>CI</i>)			—	1.07(0.49~2.33)	1.16(0.50~2.69)	0.69(0.22~2.16)
NUDT15 <i>rs116855232</i>	CC	64	271.07(<i>n</i> =53)(215.88~377.61)	23(35.94)	15(23.44)	8(12.50)
	CT	16	252.60(<i>n</i> =9)(188.61~370.40)	12(75.00)	9(56.25)	5(31.25)
<i>P</i>			0.77	0.026	0.008	0.63
等位基因 <i>OR</i> (95% <i>CI</i>)			—	4.45(1.37~14.47)	3.46(1.21~9.93)	2.66(0.84~8.44)

注：a 表示 Mann-Whitney *U* 检验，突变型与野生型比较。

Note: a meant Mann-Whitney *U* test, comparison of mutant and wild type.

rs2295475、XDH *rs1884725* 和 NUDT15 *rs116855232* 野生型与突变型者 6-TGN 红细胞浓度无统计学差异，而 GMPS *rs61750368* 和 GMPS *rs61750369* 野生型患者 6-TGN 红细胞浓度高于突变型患者，差异有统计学意义($P=0.038$, $P=0.041$)，结果见表 3。出现骨髓抑制患者 6-TGN 红细胞浓度 307.62(216.94~477.48)pmol·8×10⁻⁸RBC，未出现骨髓抑制患者 6-TGN 红细胞浓度 261.56(215.33~351.25)pmol·8×10⁻⁸RBC，两者无统计学差异($P=0.38$)。出现脱发患者 6-TGN 红细胞浓度 246.00(207.22~307.84)pmol·8×10⁻⁸RBC，未出现脱发患者 6-TGN 红细胞浓度 290.65(218.04~391.78)pmol·8×10⁻⁸RBC，两者 6-TGN 红细胞浓度无统计学差异($P=0.24$)。

2.5 XDH *rs2295475* 基因分型下不同临床资料对不良反应的影响

探讨 XDH *rs2295475* 野生型患者与突变型患者 6-TGN 红细胞浓度、性别、疗程和 AZA 剂量对骨髓抑制或脱发的发生率有无影响，结果见表 4，XDH *rs2295475* 野生型下，女性患者服用 AZA 后出现脱发的人次高于男性患者，差异有统计学意义($P=0.017$)。XDH *rs2295475* 突变型下，出现骨髓抑制者 6-TGN 红细胞浓度高于无骨髓抑制患者，但差异无统计学意义[378.40(235.61~607.53)pmol·8×10⁻⁸ RBC vs 242(172.90~335.09)pmol·8×10⁻⁸ RBC, $P=0.068$]。AZA 用药剂量以及服药疗程在不同 XDH *rs2295475* 基因分型下对骨髓抑制或脱发均无影响。

表 4 XDH *rs2295475* 不同基因分型患者性别、剂量、疗程、6-TGN 浓度对不良反应的影响

Tab. 4 Under XDH *rs2295475* different genotyping, the effects of gender, dose, course of treatment and 6-TGN concentration on adverse reactions

不良反应	性别(男/女)		AZA 剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹		AZA 疗程/月		6-TGN/pmol·8 × 10 ⁻⁸ RBC	
	野生 ¹⁾	突变 ²⁾	野生 ¹⁾	突变 ²⁾	野生 ¹⁾	突变 ²⁾	野生 ¹⁾	突变 ²⁾
骨髓抑制	1/6	12/5	1.33±0.46	1.38±0.29	10.0(2.0~20.0)	6.0(3.5~24.0)	230.88(188.61~330.37)	378.40(235.61~607.53)
无骨髓抑制	18/18	11/9	1.60±0.46	1.40±0.46	6.50(4.5~24.0)	10.5(5.2~24.0)	290.65(222.31~371.53)	242(172.90~335.09)
<i>P</i> 值	0.18	0.33	0.64	0.058	0.85	0.69	0.40	0.068
脱发	0/8	1/4	1.44(0.95~2.38)	0.85(0.82~1.67)	6.0(1.1~20.5)	12.0(1.0~60.0)	237.48(184.00~307.84)	246.00(219.77~322.72)
无脱发	19/16	22/10	1.56(1.23~1.82)	1.44(1.14~1.67)	7.00(6.0~24.0)	6.00(4.2~24.0)	293.30(227.67~374.85)	260.47(194.30~504.90)
<i>P</i> 值	0.017	0.11	0.85	0.27	0.18	0.91	0.24	0.68

注: ¹⁾XDH *rs2295475* 野生型(GG); ²⁾XDH *rs2295475* 突变型(GA+AA)。

Note: ¹⁾XDH *rs2295475* wild type(GG); ²⁾XDH *rs2295475* mutant type(GA+AA).

探讨 XDH *rs2295475* 与 NUDT15 *rs116855232* 联合检测与骨髓抑制的相关性。相对于 XDH *rs2295475* 野生型, NUDT15 *rs116855232* 突变引起骨髓抑制危险值 $OR=9.07(P=0.027)$; XDH *rs2295475* 突变型、NUDT15 *rs116855232* 野生型者引起骨髓抑制危险值 $OR=6.53(P=0.004)$; 而双位点突变引起骨髓抑制的危险值 $OR=51.67(P<0.001)$, 后者大于前两者, 见表 5。另外 1 例同时出现双位点突变的男性患者服用 AZA 后没有出现骨髓抑制, 但患者自诉服药后脱发明显。

表 5 不同基因组合引起硫唑嘌呤所致骨髓抑制风险的比较

Tab. 5 Comparison of azathioprine-induced myelosuppression induced by different gene combinations

组合类型	基因型	发生人数/未发生人数	OR(95%CI)	<i>P</i> 值
XDH <i>rs2295475</i> ⁻ / NUDT15 ⁻	GG/CC	3/31	1	
XDH <i>rs2295475</i> ⁻ / NUDT15 ⁺	GG/CT	4/5	9.07(1.55~53.07)	0.027
XDH <i>rs2295475</i> ⁺ / NUDT15 ⁻	GG+AA/CC	12/19	6.53(1.63~26.15)	0.004
XDH <i>rs2295475</i> ⁺ / NUDT15 ⁺	GA+AA/CT	5/1	51.67(4.45~600.16)	<0.001

注: ⁻表示野生型; ⁺表示突变型。

Note: ⁻meant wild type; ⁺meant mutant type.

3 讨论

美国胃肠病协会指南^[10]建议, 当 AZA 作为单一治疗时, 应监测患者 6-TGN 浓度, 参考范围 230~450 pmol·8 × 10⁻⁸ RBC。然而, 大量研究发现仅监测 6-TGN 预测 AZA 的疗效和安全性仍存在争议。Fei 等^[4]发现, 出现白细胞减少症与没有出现白细胞减少症的患者 6-TGN 浓度没有统计学差异 ($P=0.15$)。本研究也发现出现骨髓抑制者 6-TGN

浓度与未出现骨髓抑制者无统计学差异 ($P=0.38$)。尽管没有统计学差异, 但对于 XDH *rs2295475* 基因突变的患者, 出现骨髓抑制者 6-TGN 浓度略高于未出现骨髓抑制者 [378.40(235.61~607.53) pmol·8 × 10⁻⁸ RBC vs 242(172.90~335.09) pmol·8 × 10⁻⁸ RBC, $P=0.068$]。由于本研究仅有 62 例患者进行 6-TGN 红细胞浓度监测, 因此上述的现象有无统计学差异还需要更多的样本验证。

巯嘌呤甲基转移酶(thiopurine *S*-methyltransferase, TPMT)是 AZA 关键代谢酶之一, 有研究报道 TPMT 突变与 AZA 所致骨髓抑制相关^[1]。若干国外指南^[10-12]建议, 在使用 AZA 之前检测患者 TPMT 基因型有助于预测药物所致的骨髓毒性风险。然而, 一些研究表明^[5-6], 在中国人群中 TPMT 基因型检测的敏感性较低。并且他们还发现在预测中国患者白细胞减少和中性粒细胞减少风险方面, NUDT15 基因型检测的敏感性和特异性优于 TPMT 基因型检测。NUDT15 是一种裸子水解酶, 能使 AZA 活性代谢产物去磷酸化, 阻止它们渗入 DNA 而减少毒性。本研究选择 NUDT15 *rs116855232* 作为对照位点, 结果提示该位点突变是 AZA 所致骨髓抑制的独立危险因素 ($P=0.008$), 与其他研究报道基本一致。但研究报道^[4-6]约 8.5%~17.2% NUDT15 *rs116855232* 野生型患者出现白细胞减少症, 约有 32.1%~50.0% 突变型患者未观察到骨髓抑制。本研究约 23% NUDT15 *rs116855232* 野生型患者出现骨髓抑制, 约 43% 突变型患者未观察到骨髓抑制。而本研究发现 NUDT15 *rs116855232* 野生型且 XDH *rs2295475* 突变型的患者对比两位点野生型的患者, 其骨髓抑制的危险值升高 ($OR=6.53, P=0.004$), 而两位点同时突变者骨髓抑制的危险值更高 ($OR=51.67$,

$P<0.001$)。上述结果提示两位点联合监测可能会弥补 NUDT15 *rs116855232* 野生型者对骨髓抑制预测不足的风险,可能会提高 NUDT15 *rs116855232* 突变型对骨髓抑制预测的精准度。

口服 AZA 后可迅速在体内转化为 6-巯基嘌呤, XDH 是第 1 种参与 6-巯基嘌呤代谢的酶, 6-巯基嘌呤约 84% 被 XDH 代谢转化为无药理活性的 6-硫尿酸^[13]。当别嘌醇与标准剂量 AZA 合用时, 别嘌醇可降低 XDH 活性导致 AZA 严重不良反应, 因此两者合用时 AZA 必须减量。理论上, 如果 XDH 基因突变或酶活性降低, 则药物不良反应可能增加。Kudo 等^[14]发现 10 个 XO 基因突变能改变内源底物黄嘌呤的活性。其中 2 个突变 (Arg149Cys, Thr910Lys) 使酶活性缺乏, 6 个突变 [Pro555Ser, Arg607Gln, Thr623Ile, Asn909Lys (*rs566362*), Pro1150Arg 和 Cys1318Tyr (*rs2295475*)] 使酶活性降低, 2 个突变 [Ile703Val (*rs17011368*), His1221Arg] 使酶活性增加。他们^[15]还发现其中 4 个突变 [Arg149Cys, Asn909Lys (*rs566362*), Thr910Lys 和 Pro1150Arg] 对外源底物 6-硫黄嘌呤的代谢不活跃, 而 2 个突变 [Arg607Gln 和 Cys1318Tyr (*rs2295475*)] 则降低代谢活性。

Park 等^[13]报道 Arg149Cys 和 Thr910Lys 突变比较罕见。Hawwa 等^[16]无法证实 XDH c.1936A>G 和 c.2107A>G 与 AZA 所致骨髓抑制相关。在本研究中, 不能监测到 XDH *rs17011368* (c.2107A>G) 突变。Kurzawski 等^[17]报道 XDH *rs2295475* 和 XDH *rs1884725* 的突变与肾移植受者中 AZA 相关的白细胞减少没有显著相关, 这与本课题组对 *rs1884725* 突变的研究是一致的。但不同的是, 本课题组发现 *rs2295475* 突变是 AZA 所致的骨髓抑制的独立危险因素 ($P=0.003$)。这些结果差异可能与评价指标不同和实验方法不同有关。Kurzawski 研究为前瞻性研究, AZA 剂量会根据 WBC 计数变化进行调整, 白细胞减少定义为白细胞计数 $<3.0 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 。本课题为回顾性研究, 患者服用 AZA 剂量根据 6-TGN 红细胞浓度调整。而本研究白细胞减少的定义参考英国指南的推荐^[10], 即白细胞计数 $<3.5 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 同时也参考指南把中性粒细胞 $<2.0 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 的患者也纳入骨髓抑制。该指南描述, 若白细胞或中性粒细胞低于上述数值, 应该暂停 AZA 治疗直至两指标恢复正常。而本研究也发现 XDH *rs2295475* 突变虽然对预测 AZA 所致骨

髓抑制有一定价值, 但预测的准确性较低 (ROC 曲线 AUC 为 0.66)。

约 20% 对 AZA 无效的炎症性肠病患者优先代谢为 6-甲基巯基嘌呤 (6-methylmercaptopurine, 6-MMP)。Roberts 等^[18]报道任何损害 GMPS 功能的遗传变异都会减少 6-TGN 的生成, 他们发现在 11 名 6-MMP : 6-TGN 比率非常高的患者中检测到 GMPS 的 2 个非同义单核苷酸 (*rs747629729*, *rs61750370*)。他们进一步研究发现, 在 264 例高加索人群炎症性肠病患者中发现 6-MMP : 6-TGN ≥ 100 与 *rs61750370* 显著相关 ($P=0.031$)。尽管本课题以及目前国内外研究暂未发现 GMPS *rs61750368* 和 GMPS *rs61750369* 突变会增加 AZA 相关骨髓抑制和脱发的风险, 但本研究发现 GMPS *rs61750368* 和 GMPS *rs61750369* 突变者 6-TGN 浓度低于野生型患者, 可能这 2 个位点的突变导致该酶的活性降低, 减少 6-TXMP 转化成 6-TGN。

本研究存在一定局限性。首先, 本研究样本量小, 课题结果需要更多样本来验证。尤其对于同时存在 XDH *rs2295475* 和 NUDT15 *rs116855232* 突变是否能提高 NUDT15 *rs116855232* 预测价值, 值得进一步研究。其次, 本课题为回顾性分析, 部分患者并不能按时监测血常规和肝功能。而 AZA 其他不良反应如胃肠道反应、流感样症状可能为一过性或者与合并药物有关, 患者难以追述而回顾性研究也难以甄别。因此, 本课题仅纳入骨髓抑制和脱发作为监测指标。同时也需要设计更严谨的前瞻性研究来评估 XDH 和 GMPS 基因多态性与 AZA 相关不良反应的风险。

综上所述, 本研究发现在中国自身免疫性疾病患者中 XDH *rs2295475* 突变可能为 AZA 诱导骨髓抑制的独立危险因素, 尤其联合 NUDT15 *rs116855232* 监测, 可能会弥补 NUDT15 *rs116855232* 野生型者对骨髓抑制预测不足的风险, 提高 NUDT15 *rs116855232* 突变型对骨髓抑制预测的准确性, 但以上结果还需更多临床研究验证。

REFERENCES

- [1] HE M, LI M, ZHOU L J, et al. Associations of TPMT and ITPA genetic polymorphisms and blood concentration of 6-guanine nucleotides with azathioprine-related adverse drug reactions in systemic lupus erythematosus patients [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2019, 28(12): 1531-1536.
- [2] 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.
- [3] KIM S Y, SHIN J H, PARK J S, et al. NUDT15 p. R139C variant is common and strongly associated with azathioprine-induced early leukopenia and severe alopecia in Korean patients with various neurological diseases [J]. *J Neurol Sci*, 2017(378): 64-68.
- [4] FEI X, SHU Q, ZHU H, et al. NUDT15 R139C variants increase the risk of azathioprine-induced leukopenia in Chinese autoimmune patients [J]. *Front Pharmacol*, 2018(9): 460.
- [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]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 44(9): 967-975.
- [6] WANG H H, HE Y, WANG H X, et al. Comparison of TPMT and NUDT15 polymorphisms in Chinese patients with inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(8): 941-948.
- [7] KUDO M, SAITO Y, SASAKI T, et al. Genetic variations in the HGPRT, ITPA, IMPDH1, IMPDH2, and GMPS genes in Japanese individuals [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2009, 24(6): 557-564.
- [8] SMITH M A, MARINAKI A M, ARENAS M, et al. Novel pharmacogenetic markers for treatment outcome in azathioprine-treated inflammatory bowel disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2009, 30(4): 375-384.
- [9] LAMB C A, KENNEDY N A, RAINE T, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults [J]. *Gut*, 2019, 68(3): s1-s106.
- [10] FEUERSTEIN J D, NGUYEN G C, KUPFER S S, et al. American gastroenterological association institute guideline on therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(3): 827-834.
- [11] GORDON C, AMISSAH-ARTHUR M B, GAYED M, et al. The British Society for Rheumatology guideline for the management of systemic lupus erythematosus in adults: Executive Summary [J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2018, 57(1): 14-18.
- [12] DRENTH J P H. EASL clinical practice guidelines: Autoimmune hepatitis [J]. *J Hepatol*, 2015, 63(4): 971-1004.
- [13] PARK S K, HONG M, YE B D, et al. Influences of XDH genotype by gene-gene interactions with SUCLA2 for thiopurine-induced leukopenia in Korean patients with Crohn's disease [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2016, 51(6): 684-691.
- [14] KUDO M, MOTEKI T, SASAKI T, et al. Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2008, 18(3): 243-251.
- [15] KUDO M, SASAKI T, ISHIKAWA M, et al. Kinetics of 6-thioxanthine metabolism by allelic variants of xanthine oxidase [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2010, 25(4): 361-366.
- [16] HAWWA A F, MILLERSHIP J S, COLLIER P S, et al. Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2008, 66(4): 517-528.
- [17] KURZAWSKI M, DZIEWANOWSKI K, SAFRANOW K, et al. Polymorphism of genes involved in purine metabolism (XDH, AOX1, MOCOS) in kidney transplant recipients receiving azathioprine [J]. *Ther Drug Monit*, 2012, 34(3): 266-274.
- [18] ROBERTS R L, WALLACE M C, SEINEN M L, et al. Nonsynonymous polymorphism in guanine monophosphate synthetase is a risk factor for unfavorable thiopurine metabolite ratios in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(12): 2606-2612.

收稿日期: 2019-10-09
(本文责编: 沈倩)