

【 临床评价 】

亚甲基四氢叶酸还原酶 C677T 与 A1298C 基因多态性在卡培他滨治疗中晚期结直肠癌患者的临床意义

王凌凌, 王 皓, 郭 茜, 武振明*

中国石油天然气集团公司中心医院, 河北 廊坊 065000

摘 要: 目的 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR) C677T 与 A1298C 基因多态性在卡培他滨治疗中晚期结直肠癌(CRC)患者的安全性及有效性, 为临床诊治 CRC 提供理论依据。方法 收集经病理诊断确诊的中晚期结直肠癌患者 50 例, 用实时荧光定量 PCR 仪进行 MTHFR C677T 与 A1298C 基因多态性检测, 观察不同基因型之间安全性及有效性的差异。结果 MTHFR C677T 的 CC、CT、TT 基因型频率分别为 46%、40%、14%, TT 基因型恶心呕吐的发生率及有效率高于 CC 与 CT 基因型, 差别具有统计学意义 ($P < 0.05$)。MTHFR A1298C 的 AA、AC、CC 基因型频率分别为 60%、34%、6%, CC 基因型腹泻发生率高于 AA 与 AC 基因型, 差别具有统计学意义 ($P < 0.05$), MTHFR A1298 C 中各基因型有效率差异无统计学意义。结论 MTHFR C677T 与 MTHFR A1298C 基因多态性在卡培他滨治疗 CRC 患者具有较好的临床意义, 但 MTHFR A1298C 与药物治疗有效率无关。

关键词: MTHFR C677T; MTHFR A1298C; 结直肠癌; 卡培他滨

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)06-1073-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.024

Clinical significance of MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms in capecitabine treatment of patients with moderate and advanced colorectal cancer

WANG Lingling, WANG Hao, GUO Qian, WU Zhenming

Central Hospital of China Petroleum and Natural Gas Group Corporation, Langfang 065000, China

Abstract: **Objective** To investigate the safety and efficacy of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms in advanced colorectal cancer patients treated by capecitabine. **Methods** Fifty patients with advanced colorectal cancer diagnosed by pathology were collected. The MTHFR C677T and A1298C polymorphisms were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, and the differences in safety and efficacy between different genotypes were observed. **Results** The frequency of CC, CT and TT genotypes of MTHFR C677T were 46%, 40% and 14% respectively. The incidence of nausea and vomiting and effective rate of TT genotype were higher than those of genotype CC and CT ($P < 0.05$). The frequencies of AA, AC and CC genotypes in MTHFR A1298C were 60%, 34% and 6%, respectively. The incidence of diarrhea in CC genotype was higher than that in AA and AC genotype ($P < 0.05$). There was no significant difference in the genotype efficiency between MTHFR A1298 C genotypes. **Conclusion** MTHFR C677T and MTHFR A1298C polymorphisms in capecitabine treatment of CRC patients with good clinical significance, but there was no correlation between MTHFR A1298C and capecitabine treatment efficiency.

Key words: MTHFR C677T; MTHFR A1298C; colorectal cancer; capecitabine

结直肠癌(CRC)是危害人类健康的常见恶性肿瘤, 发病率及死亡率呈逐年上升趋势, 多数患者

被发现时已属中晚期, 其严重威胁着人群生命。目前结肠癌的治疗方法包括了手术、放射和药物治疗

收稿日期: 2018-02-05

第一作者: 王凌凌(1981—), 女, 本科, 主治医师, 研究方向为肿瘤。E-mail: gdj657asf854@163.com

*通信作者: 武振明 E-mail: czh87213@163.com

等, 卡培他滨 (capecitabine) 是治疗结直肠癌的常用药物, 为 5-氟尿嘧啶 (5- fluorouracil, 5- FU) 的前药, 5-FU 主要通过抑制胸苷酸合成酶 (TS) 的氟脱氧尿苷单磷酸 (FdUMP) 起作用, FdUMP 可与胸苷酸合酶、甲基供体还原叶酸 5,10 亚甲基四氢叶酸 (5,10-MTHF) 之间形成无活性的共合物, 进而影响 DNA 的修复与合成。亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR) 是叶酸代谢的关键酶, 可将 5,10-MTHF 不可逆地转化为 5-甲基四氢叶酸, 后者作为甲基供体, 在 DNA 甲基化中具有关键作用。MTHFR 基因存在多态性, 其中最常见的是 MTHFR C677T 与 A1298C 单核苷酸多态性, 目前对 MTHFR 基因多态性与卡培他滨治疗恶性肿瘤的相关研究结果不一, 所以本研究通过分子相关技术, 对 MTHFR C677T 与 A1298C 基因位点进行检测, 探索其与卡培他滨治疗中晚期 CRC 患者的安全性及有效性, 为临床治疗 CRC 提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2015 年 1 月—2017 年 7 月在中国石油天然气集团公司中心医院接受治疗的结直肠癌 50 例, 所有患者均经病理诊断确诊的中晚期结肠癌患者, 经影像学证实有可测量病灶, 一个月内未接受任何化疗方案, 并以卡培他滨作为治疗的主要药物。

1.2 方法

1.2.1 试剂及仪器 DNA 测序试剂盒 (北京华夏时代基因公司): 10×NH₄Cl 预处理液、核酸纯化试剂盒 (耀金保, 10 mL/瓶)、测序反应通用试剂盒 (耀金分, 25 μL/支, 20 支/盒)。TL998A 型实时荧光定量 PCR 仪 (西安天隆公司)。

1.2.2 标本采集及基因检测 取研究对象化疗前静脉血 3 mL 置于乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝管中, 样本处理: 将 10×NH₄Cl 预处理液与灭菌水以 1:9 的比例稀释为 1×NH₄Cl 预处理液, 取 150 μL 的待检血样本加入 1 mL 1×NH₄Cl 预处理液中, 充分混匀后室温静置 5 min, 放入离心机以 3 000 r/min 离心 5 min, 用枪头吸弃上清液后, 加入 30 μL 核酸纯化试剂, 彻底混匀, 在室温静置 30 min; 将处理好的患者血液样本使用 TL998A 型实时荧光定量 PCR 仪进行基因检测。

1.3 安全性与疗效评估

安全性评价采用常用不良反应事件评价标准 (CTCAE) 4.0 版, 对药物毒性反应进行评价。疗效

评价参照实体瘤疗效评价标准 (RECIST) 1.1 版: 完全缓解 (CR)、部分缓解 (PR)、稳定 (SD)、进展 (PD); 定义化疗总有效率 (ORR) 为 (CR+PR)/样本数。

1.4 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行统计分析, 对 MTHFR 基因型分布进行哈迪-温伯格平衡检验, MTHFR 基因型与卡培他滨药物化疗安全性及有效性均采用检验或似然比检验, 以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 基线资料

本次研究共收集中晚期结肠癌患者 50 例, 平均年龄 (57.6±11.4) 岁, 男性 26 (52.0%) 例, 结肠癌 28 例 (56%), 直肠癌 22 例 (44.0%), 详见表 1。

表 1 CRC 患者的基线特征
Table 1 Baseline features of CRC patients

变量	例数	占比/%
年龄	57.6±11.4	
男性	26	52.0
疾病部位		
结肠	28	56.0
直肠	22	44.0
TNM 分期		
II	7	14.0
III	26	52.0
IV	17	34.0
组织病理		
高分化	2	4.0
中分化	24	48.0
低分化	24	48.0
转移部位		
肺	7	14.0
肝	9	18.0
其他	34	68.0

2.2 MTHFR 基因型分布及哈迪-温伯格平衡检验

MTHFR C677T 的基因型分布为: CC 基因型 23 例 (46%), CT 基因型 20 例 (40%), TT 基因型 7 例 (14%); MTHFR A1298C 的基因型分布: AA 基因型 30 例 (60%), AC 基因型 17 例 (34%), CC 基因型 3 例 (6%), 均满足哈迪-温伯格平衡定律 (表 2)。

2.3 MTHFR 基因型与卡培他滨药物化疗安全性

化疗毒性反应主要表现为中性粒细胞减少症、恶心呕吐、腹泻、手足综合征等, MTHFR C677T

表2 MTHFR 基因型分布及哈迪-温伯格平衡检验
Table 2 Distribution of MTHFR genotypes and Hardy Weinberg equilibrium test

项目	C677T/例			A1298C/例		
	CC	CT	TT	AA	AC	CC
观测值	23	20	7	30	17	3
理论值	21.8	22.4	5.8	29.6	17.7	2.6

中 TT 基因型恶心呕吐的发生率高于 CC 及 CT 基因型, MTHFR A1298C 中 CC 基因型腹泻发生率高于

AA 及 AC 基因型, 差别具有统计学意义($P < 0.05$), 其余毒性反应均无统计学意义(表3)。

2.4 MTHFR 基因型与卡培他滨药物化疗有效性

MTHFR C677T 中 TT 基因型化疗有效率为 57.1%, 高于 CT 基因型 30%, CC 基因型 17.4%, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 而 MTHFR A1298C 中各基因型有效率差异无统计学意义(表4), 本研究未发现 CR 患者。

表3 MTHFR 基因型与卡培他滨药物化疗安全性

Table 3 Correlation between MTHFR genotypes and capecitabine chemotherapy safety

基因型	n/例	中性粒细胞减少症		恶心呕吐		感染		腹泻		口腔黏膜炎		手足综合征		
		n/例	占比/%	n/例	占比/%	n/例	占比/%	n/例	占比/%	n/例	占比/%	n/例	占比/%	
C677T	CC	23	2	8.7	3	13.0	1	4.3	2	8.7	1	4.3	3	13.0
	CT	20	3	15.0	2	10.0	0	0.0	2	10.0	1	5.0	2	10.0
	TT	7	2	28.6	4	57.1 ^{*#}	0	0.0	1	14.3	0	0.0	2	28.6
A1298C	AA	30	3	10.0	6	20.0	1	33.3	2	6.7	1	3.3	0	0.0
	AC	17	2	11.8	3	17.6	0	0.0	1	5.9	1	5.9	0	0.0
	CC	3	0	0.0	1	33.3	0	0.0	2	66.6	0	0.0	0	0.0

与基因型 CC 比较: ^{*} $P < 0.05$; 与基因型 CT 比较: [#] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs genotypic CC; [#] $P < 0.05$ vs genotypic CT

表4 MTHFR 基因型与卡培他滨药物化疗有效性

Table 4 Correlation between MTHFR genotype and efficacy of capecitabine chemotherapy

基因型		n/例	PR		SD		PD	
			n/例	占比/%	n/例	占比/%	n/例	占比/%
C677T	CC	23	4	17.4	1	4.3	18	78.3
	CT	20	6	30.0	1	5.0	13	65.0
	TT	7	4	57.1 ^{*#}	2	28.6	1	14.3
A1298C	AA	30	12	40.0	7	23.3	11	36.7
	AC	17	5	29.4	4	23.5	8	47.1
	CC	3	1	33.3	1	33.3	1	33.3

与基因型 CC 比较: ^{*} $P < 0.05$; 与基因型 CT 比较: [#] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs genotypic CC; [#] $P < 0.05$ vs genotypic CT

3 讨论

CRC 是消化系统常见的恶性肿瘤, 由于前期症状不明显, 多数患者被诊断时已属 CRC 中晚期, 给人类健康带来严重的危害。流行病学资料显示, 机体缺乏叶酸可使 CRC 的发病风险增高, 而 MTHFR 在叶酸代谢过程中具有关键作用^[1]。MTHFR 基因具有遗传多态性, Frosst 等^[2]于 1995 年发现 MTHFR 基因的 9 个突变位点, 其中 677 位点的碱基 C 被 T 置换突变最为常见。有研究发现, 该突变主要改变了相关酶活性及热稳定性, 纯合突变基因型 TT 的酶活性为野生型 CC 的 30%, 杂合

子基因型 CT 的酶活性为野生型 CC 的 60%, 同时引起相关酶的热稳定性下降^[3]。MTHFR 1298 位点突变最先于 1998 年被发现^[4], 同时发现 MTHFR A1298C 中纯合突变基因型 CC 的酶活性为野生型 AA 的 60%, 杂合子基因型 AC 的酶活性为野生型 AA 的 50%~60%。

本研究通过分子相关技术, 对 MTHFR C677T 与 A1298C 基因多态性在卡培他滨治疗中晚期 CRC 患者的安全性及有效性进行了研究。结果显示 MTHFR C667T 的 CC、CT、TT 基因型频率分别为 46%、40%、14%, MTHFR A1298C 的 AA、AC、

CC 基因型频率分别为 60%、34%、6%，均符合哈迪-温伯格平衡遗传定律。在安全性研究中，MTHFR C667T 中 TT 基因型恶心呕吐的发生率高于 CC 及 CT 基因型，MTHFR A1298C 中 CC 基因型腹泻发生率高于 AA 与 AC 基因型，其余毒性反应均无统计学意义。van Huis-Tanja 等^[5]在 MTHFR 多态性和卡培他滨诱导的转移性结直肠癌患者的毒性研究中发现，MTHFR1298A>C 和 677C>T 基因型与 3~4 级总体毒性、发热性中性粒细胞减少症或手足综合征无关，而 MTHFR1298CC 纯合子在单一治疗中显示腹泻的发病率高于 MTHFR1298AC 或 AA 患者，与本研究的毒性反应结果一致。Yeh 等^[6]研究则发现，携带 MTHFR677 TT 基因型的患者中重度中性粒细胞减少症发生率(7.1%)显著高于携带 CC 或 CT 基因型的患者(分别为 0.8 和 0.9%)($P=0.01$)，MTHFR A1298C 基因多态性与化疗毒性反应无关，而本研究未发现服用卡培他滨药物后中性粒细胞减少症的发生率与 MTHFR 基因多态性相关。而 Cortejoso 等^[7]综合 C677T 和 A1298C 基因多态性与 5-FU 化疗毒性的多项研究，认为药物遗传学不被推荐用于预测与 MTHFR 多态性相关的毒性。

MTHFR 基因型与卡培他滨药物化疗有效性的研究中发现，MTHFR C667T 中 TT 基因型化疗有效率为 57.1%，高于 CT 基因型(30%)及 CC 基因型(17.4%)，差异具有统计学意义($P<0.05$)，与高俊等^[8]研究发现各种化疗方案中 MTHFR 677TT 基因型的有效率均高于 TC 及 CC 基因型的结果一致。本研究同时发现 MTHFR A1298 C 中各基因型有效率差异无统计学意义的，与董秋美等^[9]对 75 例 CRC 患者进行研究的结果一致。

本研究 MTHFR C667T 纯合突变基因型对卡培他滨的药物敏感性高于野生型，可能是由于突变基因导致 MTHFR 酶活性及稳定性下降，从而导致细胞内 5,10-MTHFR 含量增加，进而加强了对 TS 的抑制作用，使癌细胞对 5-FU 的敏感性增加，进而增强了此类药物的抗肿瘤作用。

综上所述，MTHFR C667T 与 MTHFR A1298 C

基因多态性对卡培他滨治疗中晚期结直肠癌患者具有较好的临床意义，由于本研究样本量小，研究结果受到限制，未得出 MTHFR A1298 C 基因型与卡培他滨治疗有效率相关的结论，相关研究还需进一步增加样本量进行。

参考文献

- [1] Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review [J]. Am J Epidemiol, 2004, 159: 423-443.
- [2] Frosst P, Blom H J, 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.
- [3] Weisberg I, Tran P, Christensen B, et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity [J]. Mol Gen Metab, 1998, 64(3): 169-172.
- [4] van der Put N M. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene : an additional risk factor for neural-tube defects?[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62: 1044-1051.
- [5] VanHuis-Tanja L H, Gelderblom H, Punt C J A, et al. MTHFR polymorphisms and capecitabine-induced toxicity in patients with metastatic colorectal cancer [J]. Pharmacogen Genom, 2013, 23(4): 208-218.
- [6] Yeh C C, Lai C Y, Chang S N, et al. Polymorphisms of MTHFR C677T and A1298C associated with survival in patients with colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy [J]. Int J Clin Oncol, 2017, 22(3): 484-493.
- [7] Cortejoso L, López-Fernández L A. Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients [J]. Pharmacogenomics, 2012, 13(10): 1173-1191.
- [8] 高俊, 杨牡丹, 刘晓玲, 等. MTHFR 多态性对晚期胃肠癌患者 5-氟尿嘧啶为基础化疗作用的研究 [J]. 中国药物与临床, 2015, 15(1): 70-72.
- [9] 董秋美, 黎莹, 黄赛花. 亚甲基四氢叶酸还原酶 A1298 C 多态性与结直肠癌患者化疗敏感性的相关性研究 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2016, 25(9): 978-981.