

人类 DHODH 19C > A 基因多态性对来氟米特治疗类风湿关节炎临床疗效影响

杨群智 张 舸 和 晶

摘 要 目的 来氟米特(LEF)是一种改善病情的抗风湿药物(DMARDs)。其代谢产物 A771726 具有抑制二氢乳清酸脱氢酶(dihydroorotate dehydrogenase, DHODH)的作用,本研究目的是观察 DHODH(rs3213422)19C > A 基因多态性对 LEF 治疗类风湿关节炎(RA)疗效的影响。**方法** 本研究包括 105 例 RA 患者,口服来氟米特 20mg/d 治疗。3 个月及 6 个月后,评价患者是否达到 ACR20 及 ACR50 缓解标准。并行 DHODH(rs3213422)19C > A 基因多态性检测,观察不同基因类型患者病情改善情况。**结果** LEF 治疗 RA,3 个月时 ACR20 总体缓解率:C 等位基因为 70.0%,A 等位基因为 51.7%,两者比较差异有统计学意义($P=0.012$);ACR50 总体缓解率:C 等位基因为 38.0%,A 等位基因为 28.3%,两者比较差异无统计学意义($P=0.185$)。治疗 6 个月时,ACR20 总体缓解率:C 等位基因为 84.7%,A 等位基因为 61.7%。两者比较差异有统计学意义($P=0.006$);ACR50 总体缓解率:C 等位基因为 60.7%,A 等位基因为 38.3%,两者比较差异有统计学意义($P=0.039$)。**结论** LEF 治疗 RA 患者 ACR20 及 ACR50 缓解率,随治疗时间的延长而增加。DHODH(19C > A)的基因多态性与 LEF 治疗 RA 的临床疗效有一定相关性。携带 C 等位基因的患者应用 LEF 治疗的效果优于携带 A 等位基因的患者,两者之间的差异随治疗时间的延长逐渐增加。

关键词 基因多态性 来氟米特 二氢乳清酸脱氢酶

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.03.033

Investigation of the DHODH Genetic Polymorphism (19C > A) Response to Leflunomide Treatment in Rheumatoid Arthritis. Yang Qunzhi, Zhang Ge, He Jing. Department of Rheumatology and Immunology, Beijing Haidian Hospital, Beijing 100080, China

Abstract Objective Purpose leflunomide (LEF) is a disease-modifying antirheumatic drug used for treating rheumatoid arthritis (RA). It is a prodrug that is rapidly converted *in vivo* to the active metabolite A771726. The mechanism of action of A771726 primarily involves inhibition of the enzyme DHODH. Related studies have found that DHOD gene has polymorphism. The aim of this study was to investigate whether genetic polymorphisms in DHODH (19C > A) influence leflunomide pharmacokinetics and treatment response. **Methods** We studied 105 patients diagnosed with RA and treated with LEF (20 mg daily). Follow-up was 6 months. Clinical improvement was valued according to the American College of Rheumatology 20% and 50% response criteria. The peripheral blood genomic DNA was extracted, and amplified by PCR, analyzed by direct sequencing. The gene detection was performed in our hospital 105 patients with DHODH polymorphism(19C > A). **Results** After 3 months of therapy, the ACR20 criteria was met by 70.0% in C allele, 51.7% in A allele. Differences were statistically significant ($P=0.012$). The ACR50 criteria was met by 38.0% in C allele, 28.3% in A allele. It did not reach statistically significant ($P=0.185$). After 6 months of therapy, the ACR20 criteria was met by 84.7% in C allele, 61.7% in A allele. Differences were statistically significant ($P=0.006$). The ACR50 criteria was met by 60.7% in C allele, 38.3% in A allele. Differences were statistically significant ($P=0.039$). **Conclusion** The remission rate of ACR20 and ACR50 in patients with rheumatoid arthritis was increased with the treatment time. The results of the study suggest that DHODH(19C > A) polymorphism may be associated with LEF treatment outcome in RA patients. Treatment response is better in the patients with the C allele than A allele. This trend is more obvious with the extension of time.

Key words Polymorphism; Leflunomide; Dihydroorotate dehydrogenase

类风湿关节炎(RA)是一种以侵蚀性关节炎为主要表现的全身性自身免疫病。改善病情抗风湿药(DMARDs),如甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶和来氟米特

(LEF),可以延缓或控制疾病的进展^[1]。LEF已被证明治疗 RA 有效,且耐受性好。但 LEF 对 RA 患者的疗效差异有统计学意义,除考虑用药不规范外,患者自身基因的多态性是导致治疗效果出现差异的重要原因。本研究目的是观察 DHODH 基因第 1 个外显子(rs3213422)19C > A 突变对 LEF 治疗 RA 疗效的

作者单位:100080 北京市海淀区医院、北京大学第三医院海淀区风湿免疫科

影响。

对象与方法

1. 研究对象:随机观察 2015 ~ 2016 年期间笔者医院就诊的 RA 患者,共 105 例。所有病例符合美国风湿病协会(1987 年)类风湿关节炎诊断标准。应用 LEF 前 1 个月,未应用 DMASDS 药物,其中男性 23 例,女性 82 例,患者平均年龄 48.2 ± 9.02 岁,且疾病均处于活动期,DAS28 > 2.6。给与 LEF 20mg/d 维持治疗半年,期间未加用其他慢作用药物。病情活动度基线水平应用 DAS28 评分。并分别于 3、6 个月时,评价患者是否达到美国风湿病协会 ACR20、ACR50 缓解标准。此研究通过院伦理会批准,患者均签署知情同意书。

2. 基因分型:(1)应用主要试剂和仪器试剂: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),核酸纯化试剂(北京华夏时代基因科技发展有限公司)。(2)仪器:荧光检测仪(TL998A 西安天隆生物科技有限公司)。(3)基因测序方法 DNA 位点检测方法:将患者 150μl 混匀的血液加入 1000μl 1 倍红细胞裂解液,混合均匀并静置 10min,至混合液澄清透明。将混合液离心 10min,离心后弃上清,向沉淀的白细胞中加入 50μl 核酸纯化试剂,并混匀。取 1.5μl 混悬液加入对应测序反应试剂管中,封管并标记后放入荧光检测仪中。打开电脑中个体化药检测平台程序,并设置相应管道和检测项目,运行检测。对入组患者进行 DHODH(rs3213422)19C > A 基因多态性的临床分型。

3. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料符合正态分布,以均数 ±

标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组间比较计量资料采用方差分析,计数资料组间比较采用 χ^2 检验和 Fisher 精确概率法等统计方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

入组患者 DHODH 基因类型有 3 种,CC 型为野生纯合型,CA 型为突变杂合型,AA 型为突变纯合型。其中,CC 型为 59 例,AC 型为 32 例,AA 型为 14 例。入组患者基因分布符合 Hardy - Weinberg 平衡。各基因类型组治疗前疾病活动度(DSA28)、病程、ESR、RF、CCP 方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。经 LEF 治疗 3 个月后,各基因组 ACR20 和 ACR50 缓解率比较见表 2。CC 型患者缓解率高于 CA 型和 AA 型。其中 ACR20 缓解率 CC 型与 AA 型比较差异有统计学意义($P = 0.032$)。携带 C 等位基因的 ACR20 总体缓解率与携带 A 等位基因的总体缓解率比较差异有统计学意义($P = 0.012$)。3 个月时 ACR50 缓解率:各基因组之间比较差异无统计学意义,携带 C 等位基因的总体缓解率与携带 A 等位基因的总体两者比较,差异无统计学意义。LEF 治疗 6 个月后,各基因组 ACR20、ACR50 缓解率比较见表 3。CC 型患者缓解率仍高于 CA 型和 AA 型。其中,ACR20 缓解率:CC 型与 AA 型比较,差异有统计学意义($P = 0.019$)。携带 C 等位基因的总体 ACR20 缓解率与携带 A 等位基因的总体缓解率两者比较,差异有统计学意义($P = 0.006$)。6 个月时 ACR50 缓解率:各基因组比较,差异无统计学意义。而携带 C 等位基因的总体缓解率与携带 A 等位基因的总体两者比较,差异有统计学意义($P = 0.039$)。

表 1 3 组不同基因类型的 DHODH (rs3213422) :19C > A 患者应用 LEF 治疗前的疾病活动指标

参数	CC 型	CA 型	AA 型	F/χ^2	P
DAS28	4.25 ± 0.91	4.26 ± 1.02	4.20 ± 1.14	0.013	0.987
病程	3.83 ± 2.16	3.68 ± 2.55	2.78 ± 2.75	0.11	0.896
ESR	42.72 ± 13.58	42.12 ± 14.00	43.17 ± 14.1	0.418	0.660
RF 阳性[$n(\%)$]	55(93.2)	30(93.8)	13(92.9)	0.015	0.992
CCP 阳性[$n(\%)$]	57(96.6)	32(100)	14(100)	1.077	0.654

表 2 不同基因类型 DHODH(rs3213422)19C > A 患者 LEF 治疗 3 个月后 ACR20、ACR50 缓解率比较[$n(\%)$]

基因类型	n	ACR20 缓解率	组间比较	χ^2	P	ACR50 缓解率	组间比较	χ^2	P
CC	59	43(72.9)	CC vs CA	1.743	0.187	23(39.0)	CC vs CA	0.188	0.664
CA	32	19(59.4)	CA vs AA	1.071	0.301	11(34.4)	CA vs AA	0.281	0.596
AA	14	6(42.9)	CC vs AA	4.622	0.032	3(21.4)	CC vs AA	0.851	0.356
等位基因	n	ACR20 缓解率	组间比较	χ^2	P	ACR50 缓解率	组间比较	χ^2	P
C	150	105(70.0)	C vs A	6.312	0.012	57(38.0)	C vs A	1.755	0.185
A	60	31(51.7)				17(28.3)			

表3 不同基因类型的 DHODH (rs3213422) 19C > A 患者 LEF 治疗 6 个月后 ACR20、ACR50 缓解率比较 [n(%)]

基因类型	n	ACR20 缓解率	组间比较	χ^2	P	ACR50 缓解率	组间比较	χ^2	P
CC	59	52 (91.2)	CC vs CA	3.786	0.052	37 (62.7)	CC vs CA	0.79	0.374
CA	32	23 (71.9)	CA vs AA	0.408	0.523	17 (53.1)	CA vs AA	1.183	0.277
AA	14	8 (57.1)	CC vs AA	5.459	0.019	5 (35.7)	CC vs AA	3.376	0.066
等位基因	n	ACR20 缓解率	组间比较	χ^2	P	ACR50 缓解率	组间比较	χ^2	P
C	150	127 (84.7)	C vs A	7.643	0.006	91 (60.7)	C vs A	4.273	0.039
A	60	37 (61.7)				27 (38.3)			

讨 论

类风湿关节炎(RA)是以对称性外周关节受累为主的多系统炎性疾病,我国大陆地区的 RA 发生率约为 0.2% ~ 0.4%,是造成我国人群丧失劳动力和致残的主要病因之一。改善病情抗风湿药物(DMARDs)旨在减缓疾病进展和防止关节破坏。标准的一线药物治疗包括:甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶、来氟米特(LEF)等^[2]。但不同的 RA 患者对抗风湿药物的治疗效果存在差异。除考虑患者用药不规范,以及年龄、肝肾功能等因素以外,与药物代谢相关的酶、转运蛋白及药物靶受体的基因多态性,对药物的疗效及不良反应起着重要的作用^[3,4]。近年来,药物基因组学(pharmacogenomics)发展迅速,药物基因组学是把基因结构的差异即多态性与药物作用的药理学差异联系起来的一门科学。药物基因组学可阐明基因序列中与疾病、药物相关的基因组信息,用以帮助每位患者了解疾病,优化药物治疗。从而为临床医师从药物基因组学的角度对个体实施精准的药物疗法,提高治疗的安全性提供了依据和参考^[5]。

相关研究发现,类风湿关节炎患者中存在多种影响抗风湿药物代谢及作用的基因变异。这些基因变异可导致抗风湿药物代谢发生异常,并可影响其治疗效果^[6,7]。以 LEF 为例,目前已发现多个与 LEF 治疗效果及不良反应相关的基因类型^[8~13]。LEF 是一种前体药物,在体内迅速转换成活性代谢物 A77 1726。A77 1726 作用机制是抑制二氢乳清酸脱氢酶(dihydroorotate dehydrogenase, DHODH),这是嘧啶类化合物从头合成的关节酶。

在类风湿关节炎患者的关节中有大量活化的 T 细胞,它们需要大量嘧啶以维持其增殖。当嘧啶合成被 LEF 抑制后,关节中活化 T 细胞亦停止扩增,从而达到控制炎症,抑制病情进展的作用^[14~18]。人类编码 DHODH 基因位于 16 号染色体的长臂,约 16kb 的长度^[19]。DHODH 基因第 1 外显子(rs3213422)发生 19C > A 突变时,导致 Gln7Lys 氨基酸替换,出现 3 种

不同 DHODH 基因类型:CC 型(野生纯合型)、CA 型(突变杂合型)、AA 型(突变纯合型)。本实验是观察 RA 患者 DHODH 基因多态性对 LEF 治疗效果的影响。通过对携带不同基因类型 DHODH (19C > A) 的 RA 患者,应用 LEF 20mg/d 治疗 3 个月及 6 个月时行 ACR20、ACR50 缓解率评价,观察到 LEF 在治疗 RA 方面具有较好的疗效,6 个月时有大约 79% 的患者可达到 ACR20 缓解,56% 患者可达到 ACR50 缓解。所以 LEF 是一种具有良好疗效的一线 DMARDs 药物。但 RA 患者对 LEF 治疗效果存在差异。

综上所述,通过对 DHODH (19C > A) 不同基因类型分组观察,携带 C 型(野生型)等位基因的患者病情缓解率较携带 A 型(突变型)等位基因的患者高,随着治疗时间的延长,差异越明显。两者之间 ACR20 和 ACR50 缓解率在 6 个月时比较,差异有统计学意义。本研究显示,DHODH 的多态性与 LEF 治疗 RA 的效果相关有一定相关性。故对 RA 患者应用 LEF 治疗时,进行 DHODH (19C > A) 基因多态性检测,对预测药物治疗效果,指导临床用药有一定的帮助。

参考文献

- 蒋明, Yu D, 林孝义, 等. 中华风湿病学[M]. 北京: 华夏出版社, 2004: 1714 - 1715
- Proudman SM, Keen HI, Stamp LK, *et al.* Response - driven combination therapy with conventional disease - modifying antirheumatic drugs can achieve high response rates in early rheumatoid arthritis with minimal glucocorticoid and nonsteroidal anti - inflammatory drug use [J]. *Seminars Arthritis Rheum*, 2007, 37(2): 99 - 111
- 赵可新, 石蕊, 李岑, 等. 药物基因组学对个体化药物治疗的影响 [J]. *中国医师* 2016, 6(19): 1162 - 1166
- Ritchie MD, Motsinger AA. Multifactor dimensionality reduction for detecting gene - gene and gene - environment interactions in pharmacogenomics studies [J]. *Pharmacogenomics*, 2015, 6(8): 823 - 834
- March IL. Pharmacogenetics; the genomics of drug response [J]. *Yeast*, 2000, 17(1): 16 - 21
- Rahman P. Pharmacogenetics of rheumatoid arthritis: potential targets from susceptibility genes and present therapies. [J] *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 2010, 3: 15 - 31

- 7 陈雁飞, 吴吉荣. 药物基因组学在自身免疫性疾病治疗中的研究进展[J]. 临床荟萃, 2017, 32(4):357-359
- 8 O'Doherty C, Schnabl M, Spargo L, *et al.* Association of DHODH haplotype variants and response to leflunomide treatment in rheumatoid arthritis. [J]. Pharmacogenomics, 2012, 13(12):1427-1434
- 9 Wiese MD, Schnabl M, O'Doherty C, *et al.* Polymorphisms in cytochrome P450 2C19 enzyme and cessation of leflunomide in patients with rheumatoid arthritis. [J]. Arthritis Res Therapy, 2012, 14(4):R163
- 10 Vega D, Petragalli A, Fernández D, *et al.* Polymorphism on leflunomide: stability and crystal structures[J]. J Pharmaceut Sci, 2006, 95(5):1075-1083
- 11 Dziejek V, Kurzawski M, Safranow K, *et al.* The effect of ESR1 and ESR2 gene polymorphisms on the outcome of rheumatoid arthritis treatment with leflunomide. [J]. Pharmacogenomics, 2011, 12(1):41-47
- 12 Pawlik A, Herczynska M, Kurzawski M, *et al.* The effect of exon (19C>A) dihydroorotate dehydrogenase gene polymorphism on rheumatoid arthritis treatment with leflunomide. [J]. Pharmacogenomics, 2009, 10(2):303
- 13 Hopkins AM, O'Doherty CE, Foster DJ, *et al.* The rheumatoid arthritis susceptibility polymorphism PTPN22 C1858T is not associated with leflunomide response or toxicity[J]. Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics, 2014, 39(5):555
- 14 Listed N. Leflunomide for rheumatoid arthritis. [J]. Drug Therapeuti Bulletin, 2000, 38(7):52-54
- 15 Lolli ML, Giorgis M, Tosco P, *et al.* New inhibitors of dihydroorotate dehydrogenase(DHODH) based on the 4-hydroxy-1,2,5-oxadiazol-3-yl(hydroxyfurazanyl) scaffold[J]. Eur Journal of Medicinal Chemistry, 2012, 49(1):102-109
- 16 Baumann P, Mandlweber S, Völkl A, *et al.* A771726, leflunomide, apoptosis, myeloma[J]. Mol Cancer Therapeut, 2004, 23(8):307-310
- 17 Munier-Lehmann H, Vidalain PO, Tangy F, *et al.* On dihydroorotate dehydrogenases and their inhibitors and uses. [J]. J Med Chem, 2013, 56(8):3148-3167
- 18 Davis JP, Cain GA, Pitts WJ, Magolda RL, *et al.* The immunosuppressive metabolite of leflunomide is a potent inhibitor of human dihydroorotate dehydrogenase[J]. Biochemistry, 1996, 35(4):1270-1273
- 19 Barnes T, Parry P, Hart I, *et al.* Regional mapping of the gene encoding dihydroorotate dehydrogenase, an enzyme involved in UMP synthesis, electron transport, and superoxide generation, to human chromosome region 16q22. [J]. Somatic Cell Mol Genet, 1993, 19(4):405-411

(收稿日期:2017-05-02)

(修回日期:2017-05-31)

(上接第 129 页)

- 8 周翠红, 顾婷, 何珊珊, 等. 异氟烷对小鼠神经干细胞 BDNF/Caspase3 及 Notch 信号相关基因表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(1):16-19
- 9 陈宇新, 杨璐军, 张凤兰, 等. BDNF 转染神经干细胞可降低 β -淀粉样蛋白对神经元的毒性[J]. 中华神经医学杂志, 2015, 14(1):2-8
- 10 He BL, Ba YC, Wang XY, *et al.* BDNF expression with functional improvement in transected spinal cord treated with neural stem cells in adult rats[J]. Neuropeptides, 2013, 47(1):1-7
- 11 李敬花, 张涛, 张红军, 等. 硫酸软骨素酶 ABC 联合骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤后神经功能的恢复作用[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(2):122-127
- 12 李江, 谭龙旺, 刘强. 不同时间嗅鞘细胞移植联合电针对大鼠脊髓损伤后 Nestin 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2):507-509
- 13 Huang H, Liu L, Li B, *et al.* Ketamine interferes with the proliferation and differentiation of neural stem cells in the subventricular zone of neonatal rats[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(1):315-321
- 14 Cascante A, Klum S, Biswas M, *et al.* Gene-specific methylation control of H3K9 and H3K36 on neurotrophic BDNF versus astroglial GFAP genes by KDM4A/C regulates neural stem cell differentiation[J]. J Mol Biol, 2014, 426(20):3467-3471
- 15 郑衍芳, 李艳君, 杨丽, 等. 灵芝孢子粉联合脑源性神经营养因子对神经干细胞分化的影响[J]. 广东医学, 2014, 35(1):50-52
- 16 南国新, 匡红, 汪九龄, 等. 大鼠脊髓损伤后神经元再生研究[J]. 中华创伤杂志, 2015, 31(2):164-168
- 17 王晓华, 程明和, 王新霞, 等. 脑源性神经营养因子缓释微球对周围神经损伤大鼠的神经保护作用[J]. 第二军医大学学报, 2015, 36(6):639-643
- 18 黄斐, 马广文, 尹宗生, 等. 脑源性神经营养因子缓释胶原凝胶支架对神经干细胞生长和分化的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(5):586-590
- 19 吴中华. 脑外源性神经因子基因修饰神经干细胞对脑卒中的神经保护机制[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(45):7331-7336
- 20 Xia GN, Zou Y, Wang YC, *et al.* Neural stem cells grafts decrease neural apoptosis associated with caspase-7 downregulation and BDNF upregulation in rats following spinal cord hemisection[J]. Cell Mol Neurobiol, 2013, 33(7):1013-1022

(收稿日期:2017-06-22)

(修回日期:2017-07-05)