

应用硫唑嘌呤治疗炎症性肠病致白细胞减少症的相关因素分析[△]

汪燕燕^{1*}, 苏涌¹, 杨春兰¹, 夏泉¹, 许杜娟^{1#}, 胡乃中²(1.安徽医科大学第一附属医院药剂科, 合肥 230022; 2.安徽医科大学第一附属医院消化内科, 合肥 230022)

中图分类号 R979.5;R574.53 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)17-2348-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.17.15

摘要 目的:探讨硫唑嘌呤(AZA)治疗炎症性肠病(IBD)致白细胞减少症的临床相关因素。方法:收集我院2013年1月—2015年3月114例IBD患者的临床资料,采用高效液相色谱法测定其红细胞内AZA代谢物6-硫鸟嘌呤核苷酸(6-TGNs)的稳态浓度,考察患者性别、年龄、疾病种类、AZA日剂量、6-TGNs血药浓度与AZA致白细胞减少症的相关性,并采用受试者工作特征(ROC)曲线预测白细胞减少的最佳临界值。结果:114例IBD患者中,发生白细胞减少症的患者有40例(35.1%)。不同年龄、性别、疾病种类及AZA日剂量患者间发生白细胞减少症的比例比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。不同6-TGNs血药浓度患者发生白细胞减少症的比例比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。发生白细胞减少症的患者体内6-TGNs平均血药浓度 $[(407.82 \pm 262.88) \text{ pmol}/(8 \times 10^8) \text{ RBC}]$ 高于白细胞水平正常的患者 $[(275.85 \pm 118.37) \text{ pmol}/(8 \times 10^8) \text{ RBC}]$,差异有统计学意义($P<0.05$)。ROC曲线预测其白细胞减少症发生的最佳临界值为6-TGNs血药浓度 $>291.04 \text{ pmol}/(8 \times 10^8) \text{ RBC}$ 。结论:AZA致白细胞减少症的发生可能与IBD患者红细胞内6-TGNs的浓度相关,且高浓度6-TGNs是其发生白细胞减少症的危险因素;医师可结合患者血常规数据与红细胞内6-TGNs浓度的检测结果,针对IBD患者开展AZA个体化治疗,以减少白细胞减少症的发生。

关键词 硫唑嘌呤;炎症性肠病;白细胞减少症;6-硫鸟嘌呤核苷酸;血药浓度

Analysis of Related Factors of Leukopenia Induced by Azathioprine in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease

WANG Yanyan¹, SU Yong¹, YANG Chunlan¹, XIA Quan¹, XU Dujuan¹, HU Naizhong²(1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China; 2.Dept. of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the clinical related factors of leucopenia induced by azathioprine in the treatment of inflammatory bowel disease (IBD). METHODS: Clinical information of 114 IBD patients were collected from our hospital during Jan. 2013-Mar. 2015. Steady concentration of AZA metabolite 6-thioguanine (6-TGNs) in red blood cell was determined by HPLC. The correlation of patient's gender, age, diseases, AZA daily dose and blood concentration of 6-TGNs with leucopenia induced by AZA were investigated. The optimal critical value of leucopenia could be predicted with ROC curves. RESULTS: Among 114 IBD patients, 40 patients suffered from leucopenia (35.1%). There was no statistical significance in the proportion of leucopenia among patients with different age, gender, diseases and AZA daily dose ($P>0.05$). There was statistical significance in the proportion of leucopenia among patients with different concentrations of 6-TGNs ($P<0.05$). Mean blood concentration of 6-TGNs in leucopenia patients $[(407.82 \pm 262.88) \text{ pmol}/(8 \times 10^8) \text{ RBC}]$ was higher than patients with normal leukocyte level $[(275.85 \pm 118.37) \text{ pmol}/(8 \times 10^8) \text{ RBC}]$, with statistical significance ($P<0.05$). ROC curve predicted that the optimal critical value of leucopenia was blood concentration of 6-TGNs $>291.04 \text{ pmol}/(8 \times 10^8) \text{ RBC}$. CONCLUSIONS: AZA induced leucopenia may be related to the concentration of 6-TGNs in red blood cell of IBD patients, and high concentration of 6-TGNs is risk factors of leucopenia. Clinicians can provide AZA individual treatment for IBD patient to reduce the occurrence of leucopenia according to routine blood test and the concentration of 6-TGNs.

KEYWORDS Azathioprine; Inflammatory bowel disease; Leukopenia; 6-thioguanine; Blood concentration

硫唑嘌呤(Azathioprine, AZA)是一种无活性的前体药物,口服后在体内几乎全部代谢为6-巯基嘌呤(6-Mercaptopurine, 6-MP),再经一系列的生物代谢,生成活性代谢物6-硫鸟嘌呤

核苷酸(6-Thioguanine nucleotides, 6-TGNs),从而发挥免疫抑制作用。AZA最早主要应用于器官移植(如肾移植)、类风湿性关节炎及系统性红斑狼疮等疾病的治疗。1962年,Bean RH^[1]首次将AZA用于溃疡性结肠炎(Ulcerative colitis, UC)的治疗;1966年,Bowen GE等^[2]将其应用于9例UC及1例克罗恩病(Crohn disease, CD)患者的治疗。目前,AZA已广泛应用于炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD,包括UC和CD)的缓解、维持治疗及术后复发的预防^[3-4],但仍有部分患者在用药

[△] 基金项目:安徽省自然科学基金青年项目(No.1508085QH166)

* 主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0551-62922422。E-mail:wyybj2007@163.com

通信作者:主任药师,副教授,博士。研究方向:临床药学。电话:0551-62922442。E-mail:xudujuan6365@163.com

后出现血液系统毒性、肝功能损害等不良反应^[6],限制了该药物的临床应用。在AZA的不良反应中,血液系统毒性的发生率最高,且以白细胞减少最为常见。前期研究发现,AZA致IBD患者白细胞减少可能与其红细胞内高水平的6-TGNs密切相关^[6-7]。本研究在此基础上,选择我院服用AZA的IBD患者,测定其红细胞内AZA代谢物6-TGNs的稳态浓度,初步探讨AZA致白细胞减少症的相关因素,为临床合理、安全用药提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择我院消化内科2013年1月—2015年3月IBD患者共114例。纳入标准:①据中华医学会消化分会于2012年制定的《IBD诊断和治疗的共识意见》^[8],经临床、实验室、内镜或手术病理标本明确诊断为IBD;②连续服用AZA超过1个月,6-TGNs血药浓度已达到稳态^[9]。排除标准:①AZA治疗前白细胞计数 $<4.0 \times 10^9 L^{-1}$ 的患者;②肝/肾功能异常者。

1.2 6-TGNs血药浓度的测定

患者当日服用AZA前采集静脉血2 ml至乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,采用高效液相色谱(HPLC)法测定患者红细胞内6-TGNs的浓度。方法学考察及其临床应用参见本课题组前期试验内容^[10]。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0软件分析所得数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验或非参数检验;计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用 χ^2 检验计算比值比(OR)及95%置信区间(CI),评价患者体内6-TGNs血药浓度与白细胞减少症的相关性,并结合受试者工作特征(ROC)曲线预测其最佳临界值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的一般情况

共收集IBD患者114例,年龄为15~69岁,平均年龄(36.05±12.00)岁,平均体质量为(57.00±12.30)kg;AZA剂量为50~150 mg/d,平均剂量为(78.51±29.73)mg/d;红细胞中6-TGNs的浓度为41.86~1 682.97 pmol/(8×10^8)RBC,平均浓度为(322.16±192.11)pmol/(8×10^8)RBC。其中,男性患者68例,女性患者46例;CD患者91例,UC患者23例;发生白细胞减少症(血常规示白细胞计数 $<4.0 \times 10^9 L^{-1}$)的患者共40例(35.1%),白细胞水平正常的患者共74例(64.9%)。114例患者的一般情况见表1。

表1 114例患者的一般情况(例)

Tab 1 General condition of 114 patients(case)

参数	结果	参数	结果
性别		诊断	
男	68	CD	91
女	46	UC	23
年龄		白细胞水平	
≤18岁	5	减少	40
>18岁	109	正常	74

2.2 患者年龄、性别及疾病种类与白细胞减少症的相关性

114例IBD患者中,男性患者发生白细胞减少症的比例为27.9%(19例),女性患者发生白细胞减少症的比例为45.7%

(21例),其差异无统计学意义($P=0.052$);≤18岁患者发生白细胞减少症的比例为20.0%(1例),>18岁患者发生白细胞减少症的比例为35.8%(39例),其差异无统计学意义($P=0.807$);CD患者发生白细胞减少症的比例为34.1%(31例),UC患者发生白细胞减少症的比例为39.1%(9例),其差异无统计学意义($P=0.649$)。结果表明,患者的年龄、性别、诊断均与白细胞减少症的发生无相关性。患者性别、年龄、诊断与白细胞减少症的相关性见表2。

表2 患者性别、年龄及疾病种类与白细胞减少症的相关性

Tab 2 The correlation between gender, age, diseases and leucopenia of patients

临床特征	白细胞水平正常,例(%)	白细胞减少症,例(%)	χ^2	P
性别			3.799	0.052
男	49(72.1)	19(27.9)		
女	25(54.3)	21(45.7)		
年龄			0.059	0.807
≤18岁	4(80.0)	1(20.0)		
>18岁	70(64.2)	39(35.8)		
疾病种类			0.207	0.649
CD	60(65.9)	31(34.1)		
UC	14(60.9)	9(39.1)		

2.3 AZA日剂量与白细胞减少症的相关性

114例IBD患者中,AZA日剂量 <1.0 mg/kg的患者发生白细胞减少症的比例为28.6%(12例),AZA日剂量为 $1.0 \sim 1.5$ mg/kg的患者发生白细胞减少症的比例为47.6%(10例),AZA日剂量 >1.5 mg/kg的患者发生白细胞减少症的比例35.3%(18例),其差异无统计学意义($\chi^2=2.323, P=0.328$)。结果表明,AZA日剂量与白细胞减少症的发生无相关性。患者AZA日剂量与白细胞减少症的相关性见表3。

表3 AZA日剂量与白细胞减少症的相关性

Tab 3 The correlation between daily dose of AZA and leucopenia

日剂量,mg/kg	白细胞水平正常,例(%)	白细胞减少症,例(%)	χ^2	P
<1.0	30(71.4)	12(28.6)		
$1.0 \sim 1.5$	11(52.4)	10(47.6)	2.232	0.328
>1.5	33(64.7)	18(35.3)		

2.4 6-TGNs血药浓度与白细胞减少症的相关性

χ^2 检验结果显示,6-TGNs血药浓度 <200 pmol/(8×10^8)RBC的患者中,有4例患者发生白细胞减少症,占19.0%;6-TGNs血药浓度为 $200 \sim 350$ pmol/(8×10^8)RBC的患者中,有16例患者发生白细胞减少症,占27.6%;6-TGNs浓度 >350 pmol/(8×10^8)RBC的患者中,有20例患者发生白细胞减少症,占57.1%,其差异有统计学意义($\chi^2=11.280, P=0.004$)。表明6-TGNs血药浓度与白细胞减少症的发生相关。6-TGNs血药浓度与白细胞减少症的相关性见表4。

由表4可见,6-TGNs血药浓度 >350 pmol/(8×10^8)RBC的患者发生白细胞减少症的风险高于血药浓度 <200 pmol/(8×10^8)RBC的患者[OR=5.67,95%CI(1.58,20.35)],差异有统计学意义($\chi^2=7.778, P=0.005$);6-TGNs血药浓度 >350 pmol/(8×10^8)RBC的患者发生白细胞减少症的风险也高于血药浓度为 $200 \sim 350$ pmol/(8×10^8)RBC的患者[OR=3.50,95%CI(1.45,8.46)],差异有统计学意义($\chi^2=8.037, P=0.005$);而

6-TGNs 血药浓度为 200~350 pmol/(8×10⁸)RBC 的患者发生白细胞减少症的风险与血药浓度 <200 pmol/(8×10⁸)RBC 的患者比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.595, P=0.441$)。

表 4 6-TGNs 浓度与白细胞减少症的相关性

Tab 4 The correlation between 6-TGNs plasma concentration and leukopenia

血药浓度, pmol/(8×10 ⁸)RBC	白细胞正常, 例(%)	白细胞减少, 例(%)	χ^2	P
<200	17(81.0)	4(19.0)		
200~350	42(72.4)	16(27.6)	11.280	0.004
>350	15(42.9)	20(57.1)		

通过绘制箱线图(见图 1)和 *t* 检验,进一步比较发生白细胞减少症的患者与白细胞正常的患者体内 6-TGNs 血药浓度的差异。结果显示,前者体内 6-TGNs 的平均血药浓度 [(407.82±262.88)pmol/(8×10⁸)RBC] 明显高于后者 [(275.85±118.37)pmol/(8×10⁸)RBC], 差异有统计学意义 ($t=3.014, P=0.004$)。

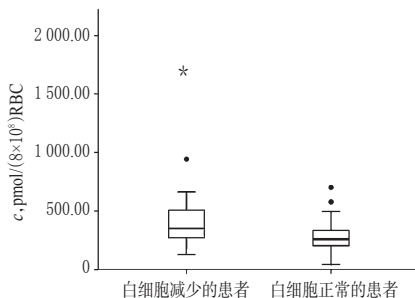


图 1 发生白细胞减少症的患者与白细胞正常的患者体内 6-TGNs 血药浓度的差异

注:箱内横线表示中位数;封闭箱上下的横线分别表示上、下四分位数;箱上端横线表示最大值,下端横线表示最小值;“·”表示温和异常值(即四分位数的 1.5~3 倍);“*”表示极端异常值(即超过四分位数的 3 倍)

Fig 1 The difference of blood concentrations of 6-TGNs in leukopenia patients and normal patients

Note: the horizontal line in the middle of the box indicates Median; the upper horizontal line of the box indicates upper quartile; the under horizontal line of the box indicates lower quartile; the horizontal line above the box indicates maximum value, the horizontal line under the box indicates minimum value; “·” indicates moderate abnormal value (the value is 1.5-3 times more than interquartile range); “*” means extreme abnormal value (the value is over 3 times as against interquartile range)

以患者体内 6-TGNs 血药浓度为检验变量绘制 ROC 曲线(见图 2),预测其发生白细胞减少症的最佳临界值。结果显示,当约登指数(Youden index,即“敏感度+特异性-1”最大时)为 0.35,即 6-TGNs 血药浓度 >291.04 pmol/(8×10⁸)RBC 时,患者更易发生白细胞减少症,提示高浓度 6-TGNs 是发生白细胞减少症的危险因素。

3 讨论

IBD 是一种病因机制尚不明确的慢性非特异性肠道炎症性疾病,包括 UC 和 CD。据不完全统计,我国 UC 的发病率约为 0.116%, CD 的发病率约为 0.114%,且呈逐年上升趋势^[11-12]。由于 IBD 具有慢性发展、反复发作、可致残致癌等特点,严重影响着患者的身体健康和生

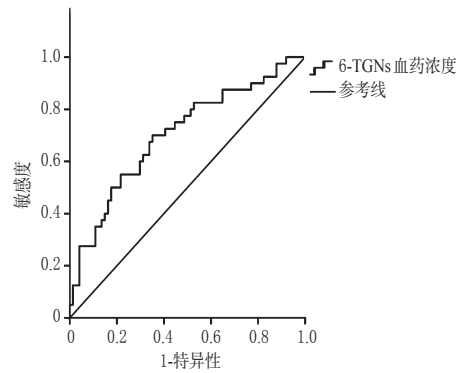


图 2 ROC 曲线

Fig 2 ROC Curve

IBD 目前尚无根治的办法,只能通过长期用药来控制临床症状,防止并发症的发生。IBD 传统治疗药物(如柳氮磺吡啶、美沙拉嗪)的疗效并不十分理想,糖皮质激素类药物仅能用于急性期的诱导缓解而不能用于长期维持治疗。近年来,免疫抑制剂已被广泛用于 IBD 的治疗,尤其是以 AZA 为代表的巯基嘌呤类药物,对疾病的控制发挥着重要作用。Rougoc C 等^[13]开展了一项有关 CD 治疗的研究,纳入 1995-2002 年与 2003-2011 年的治疗数据进行对比,结果显示巯基嘌呤类药物的使用率呈逐年上升趋势,患者的住院率和手术率则呈下降趋势,且传统治疗药物氨基水杨酸的使用率也逐年下降。目前, AZA 已是氨基水杨酸及糖皮质激素类药物控制不佳患者的首选治疗药物,可以用于 IBD 活动期的缓解、维持治疗、糖皮质激素依赖及手术后复发的患者,在 IBD 的治疗中发挥着重要的作用。然而, AZA 的临床应用显示出其存在显著的个体差异,虽然 67% 的患者可有效控制 IBD 的进展,但仍有 15% 的患者对治疗没有应答,其中 9%~25% 的患者则可能出现严重的、甚至危及生命的不良反应(如骨髓抑制、肝功能损害、胰腺炎等),其中以白细胞减少症最为常见^[14]。

AZA 为无活性的前体药物,在肝脏内由谷胱甘肽 S-转移酶催化为无活性的中间产物 6-MP。6-MP 进入细胞后面临 3 种竞争性酶代谢途径:(1)由次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPR)催化生成巯基次黄嘌呤单磷酸盐,再经次黄嘌呤核苷单磷酸脱氢酶生成巯基黄嘌呤单磷酸盐,之后经鸟苷单磷酸合成酶形成 6-TGNs,整合到 DNA 或 RNA 中生成无功能的核苷酸或核酸,导致细胞凋亡,从而产生疗效,但这也是产生骨髓抑制的主要原因;(2)由黄嘌呤氧化酶(XO)氧化为非活性产物 6-巯尿酸;(3)经巯嘌呤甲基转移酶(TPMT)生成 6-甲巯嘌呤(6-MMP),该产物被认为与肝毒性有关。现有多项研究表明,白细胞下降可能与 6-TGNs 有关:Derijks LJ 等^[15]认为, IBD 患者红细胞中 6-TGNs 浓度在 250~500 pmol/(8×10⁸)RBC 时可有效控制疾病且不宜发生骨髓抑制; Dervieux T 等^[16]认为, 6-TGNs 血药浓度 >450 pmol/(8×10⁸)RBC 的患者出现白细胞减少的风险明显增加; Dassopoulos T 等^[17]则认为, 6-TGNs 血药浓度控制在 250~400 pmol/(8×10⁸)RBC 范围内最佳,但日本学者则认为 IBD 患者发生白细胞减少症与 6-TGNs 血药浓度并没有相关性^[18]。

在本研究中,共纳入服用 AZA 的 IBD 患者 114 例,其中 40 例出现白细胞减少,发生概率为 35.1%,高于相关报道^[14]。进

一步的分析结果提示,白细胞减少症的发生与患者年龄、性别、诊断、AZA日剂量无显著的相关性。多项研究结果显示,6-TGNs治疗窗下限一般为235~250 pmol/(8×10⁸)RBC,上限则为400、450、500 pmol/(8×10⁸)RBC不等^[6,15-17,19],故本研究根据文献报道及前期6-TGNs血药浓度检测结果,将其划分为<200、200~350、>350 pmol/(8×10⁸)RBC 3个范围,各血药浓度范围患者发生白细胞减少症的比例分别为19.0%、27.6%、57.1%,差异有统计学意义($P<0.05$)。发生白细胞减少症的患者体内6-TGNs血药浓度高于白细胞水平正常的患者,差异有统计学意义($P<0.05$),提示6-TGNs血药浓度与白细胞减少症的发生有关。ROC曲线预测白细胞减少症发生的最佳临界值为6-TGNs浓度>291.04 pmol/(8×10⁸)RBC,提示高浓度6-TGNs是IBD患者发生白细胞减少症的危险因素。以上结果均与文献报道相符^[6,15-17]。

AZA的药效个体差异较大^[14],且本研究也提示其日剂量与白细胞减少症的发生无相关性,故单纯地以用药剂量来预测AZA的疗效或不良反应的发生风险可能具有较大误差;而监测患者红细胞中6-TGNs的浓度相对于剂量而言能更真实地反映患者用药后的情况。建议临床可采取血常规和6-TGNs血药浓度的联合监测,预防白细胞减少症的发生,以提高AZA在临床应用中的安全性,使患者最大获益。

本研究初步探讨了IBD患者服用AZA致白细胞减少症的相关因素,但由于样本量较少,且未纳入联合用药等其他影响因素,故还有待进行更深入的研究。

参考文献

[1] Bean RH. The treatment of chronic ulcerative colitis with 6-mercaptopurine[J]. *Med J Aust*, 1962,49(2):592.

[2] Bowen GE, Irons GV Jr, Rhodes JB, et al. Early experiences with azathioprine in ulcerative colitis, a note of caution[J]. *JAMA*, 1966, 195(6):460.

[3] Meyer V, Beissert S. Azathioprine in the treatment of autoimmune blistering diseases[J]. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2012,32(2):295.

[4] Levesque BG, Loftus EV Jr. Initiating azathioprine for Crohn's disease[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10(5):460.

[5] Schwab M, Schäffeler E, Marx C, et al. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism[J]. *Pharmacogenetics*, 2002, 12(6):429.

[6] Lee MN, Kang B, Choi SY, et al. Relationship between azathioprine dosage, 6-thioguanine nucleotide levels, and therapeutic response in pediatric patients with IBD treated with azathioprine[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(5):1 054.

[7] Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterolo-*

gy, 2000,118(4):705.

- [8] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组.炎症性肠病诊断与治疗的共识意见[J]. *中华消化杂志*, 2012, 32(12):796.
- [9] Derijks LJ, Gilissen LP, Engels LG, et al. Pharmacokinetics of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease: implications for therapy[J]. *Ther Drug Monit*, 2004,26(3): 311.
- [10] 黄燕,夏泉,汪燕燕,等. HPLC法测定炎症性肠病患者红细胞中硫鸟嘌呤核苷酸浓度[J]. *中国药房*, 2013, 24(26):2 436.
- [11] 王玉芳,欧阳钦,胡仁伟,等.炎症性肠病流行病学研究进展[J]. *胃肠病学*, 2013, 18(1):48.
- [12] Ben Musa R, Gampa A, Basu S, et al. Hepatitis B vaccination in patients with inflammatory bowel disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2014,20(41):15 358.
- [13] Rougoc C, Langholz E, Andersson M, et al. Changes in medical treatment and surgery rates in inflammatory bowel disease: a nationwide cohort study 1979-2011[J]. *Gut*, 2014,63(10):1 607.
- [14] Sandborn WJ. A review of immune modifier therapy for inflammatory bowel disease: azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine, and methotrexate[J]. *Am J Gastroenterol*, 1996,91(3):423.
- [15] Derijks LJ, Gilissen LP, Hooymans PM, et al. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006,24(5):715.
- [16] Dervieux T, Meyer G, Barham R, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of erythrocyte thiopurine nucleotides and effect of thiopurine methyltransferase gene variants on these metabolites in patients receiving azathioprine/6-mercaptopurine therapy[J]. *Clin Chem*, 2005,51(11):2 074.
- [17] Dassopoulos T, Dubinsky MC, Bentsen JL, et al. Randomised clinical trial: individualised vs. weight-based dosing of azathioprine in Crohn's disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014,39(2):163.
- [18] Odahara S, Uchiyama K, Kubota T, et al. A prospective study evaluating metabolic capacity of thiopurine and associated adverse reactions in Japanese patients with inflammatory bowel disease (IBD)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0137 798.
- [19] Gilissen LP, Wong DR, Engels LG, et al. Therapeutic drug monitoring of thiopurine metabolites in adult thiopurine tolerant IBD patients on maintenance therapy[J]. *J Crohns Colitis*, 2012,6(6):698.

(收稿日期:2015-10-16 修回日期:2016-04-15)

(编辑:张元媛)