



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.01.12

文章编号: 2095-1264(2022)01-0077-05

34 例骨肉瘤患者大剂量甲氨蝶呤化疗后血药浓度与不良反应分析

赵晨¹, 兰云意², 杨柱梅¹, 史筱倩¹, 周永春², 孔树佳^{1*}

(¹云南省肿瘤医院药学部, 云南昆明, 650118; ²云南省癌症中心分子诊断分中心, 云南昆明, 650118)

摘要: **目的** 分析骨肉瘤患者使用大剂量甲氨蝶呤(HD-MTX)化疗后肝功能损伤和骨髓抑制的发生情况, 探讨肝损伤和骨髓抑制的发生与 MTX 血药浓度的相关性。**方法** 选取我院 2019 年 1 月—12 月使用 HD-MTX 治疗的 34 例骨肉瘤患者, 采用 HPLC 法测定 MTX 静脉滴注开始后 24 h、48 h、72 h 的血药浓度(C_{24h} 、 C_{48h} 、 C_{72h}), 同时测定患者化疗后肝功能和血常规, 采用 Pearson 法分析药物性肝损伤和骨髓抑制的发生与不同时间点 MTX 血药浓度的相关性。**结果** HD-MTX 化疗完成后, 16 例患者(47.06%)出现急性药物性肝损伤, 主要表现为 GPT 升高; 19 例患者(55.88%)出现骨髓抑制, 主要表现为 WBC 和 NE 下降。GPT 升高与 MTX 血药浓度无明显相关性($P>0.05$), 而 WBC 和 NE 下降与 24 h、48 h 的 MTX 血药浓度显著相关($P<0.01$)。**结论** HD-MTX 所致药物性肝损伤的发生与 MTX 血药浓度无明显相关性, 但骨髓抑制的发生与 MTX 血药浓度显著相关, 给药后 24 h 和 48 h 的 MTX 血药浓度越高, 患者越易发生骨髓抑制。

关键词: 大剂量; 甲氨蝶呤; 骨肉瘤; 血药浓度; 不良反应

中图分类号: R738.1 **文献标识码:** A

Analysis of plasma concentration of methotrexate and adverse reactions in 34 patients with osteosarcoma

ZHAO Chen¹, LAN Yunyi², YANG Zhumei¹, SHI Xiaoqian¹, ZHOU Yongchun², KONG Shujia^{1*}

(¹ Department of Pharmacy, Yunnan Cancer Hospital, Kunming, Yunnan, 650118, China; ² Molecular Diagnostic Center, Yunnan Cancer Center, Kunming, Yunnan, 650118, China)

Abstract: Objective To analyze the occurrence of liver injury and bone marrow suppression after high-dose methotrexate (HD-MTX) chemotherapy in patients with osteosarcoma, and to explore the correlation between the adverse reactions and MTX blood concentration. **Methods** Thirty-four patients with osteosarcoma treated with HD-MTX were selected in this study. The plasma concentration of MTX was detected by HPLC method at 24 h, 48 h and 72 h after the beginning of MTX infusion. The liver function and blood routine indexes were also measured. Pearson method was used to analyze the correlation between the adverse reactions and the concentration of MTX at different time points. **Results** After HD-MTX chemotherapy, 16 patients (47.06%) developed acute drug-induced liver injury, mainly with elevated GPT; 19 patients (55.88%) developed bone marrow suppression, mainly with decreased WBC and NE. There was no correlation between the increase of GPT and the MTX blood concentration ($P>0.05$). However, the decrease of WBC and NE were significantly related to the 24 h and 48 h MTX blood concentration ($P<0.01$). **Conclusion** The study reveals the acute drug-induced liver injury caused by HD-MTX is not related to the MTX plasma concentrations at different time points. However, the bone marrow suppression caused by HD-MTX is significantly related to the MTX plasma concentration. The higher the MTX 24 h and 48 h blood concentration is, the more likely the bone marrow suppression will occur.

作者简介: 赵晨, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 治疗药物检测。

*通信作者: 孔树佳, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 临床药学。

Keywords: HD-MTX; Osteosarcoma; Therapeutic drug monitoring; Adverse reactions

前言

甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)是一种可干扰叶酸代谢的抗肿瘤药物,其结构类似叶酸,可竞争性抑制细胞中的二氢叶酸还原酶,使二氢叶酸无法还原为四氢叶酸,导致胸腺嘧啶核苷和嘌呤核苷酸合成中的一碳单位转移受阻,抑制肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的合成,从而抑制肿瘤细胞的增殖和复制^[1]。骨肉瘤是儿童及青少年最常见的骨原发恶性肿瘤。手术和化疗是其主要治疗方式。大剂量甲氨蝶呤(high dose methotrexate, HD-MTX)联合亚叶酸钙(calcium tetrahydrofolate, CF)解救是骨肉瘤的一线化疗方案^[1-2],但此方案中 MTX 的剂量为 8~12 g·m⁻²,是常规剂量的几十倍,在取得较好的抗肿瘤疗效的同时,也增加了毒副作用的发生率和严重程度。MTX 治疗指数低,个体差异大,因此使用 HD-MTX 治疗时应进行治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM),以保证其有效性和安全性。本研究收集骨肉瘤患者使用 HD-MTX 后 MTX 血药浓度和不良反应相关数据,并分析患者化疗后肝功能损伤和骨髓抑制与 MTX 血药浓度的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2019 年 1 月—12 月于我院就诊的骨肉瘤患者 34 例,其中男性 21 例、女性 13 例,年龄 10~57 岁,中位年龄 18.5 岁。纳入标准:(1)所有患者均符合骨肉瘤诊断标准;(2)化疗前肝功能、肾功能和血常规均正常。排除标准:(1)合并其他严重疾病者;(2)血药浓度检测结果或生化、血常规等资料不全者。

1.2 仪器与试剂

甲氨蝶呤注射液(Pfizer Pty Limited,规格:10 mL/1000 mg);注射用亚叶酸钙(江苏恒瑞医药股份有限公司,规格:25 mg);高效液相色谱系统(Agilent 1260 高效液相色谱仪,G1314F VWD 紫外检测器,ChemStation 工作站)。

1.3 方法

1.3.1 HD-MTX 给药剂量和方法 MTX 8~12 g·m⁻²持续静脉滴注 6 h,至少于化疗前 12 h 开始水化,并持续至 MTX 给药结束后 48 h,使用碳酸氢钠

碱化尿液,使尿液 pH 值维持在 7.0~8.0。MTX 给药结束后 6 h 开始常规 CF 解救,给药方式为肌肉注射,首次给药剂量为 300 mg,之后每 6 h 给药 15 mg,直至 MTX 血药浓度低于 0.1 μmol·L⁻¹。如果 24 h MTX 血药浓度显著高于正常水平,则增加 CF 每次解救剂量,直至 MTX 血药浓度低于 0.1 μmol·L⁻¹。

1.3.2 MTX 血药浓度检测 分别于 HD-MTX 静脉滴注开始后 24 h、48 h、72 h 抽取患者外周静脉血 3~4 mL,置于紫色 EDTA 抗凝管中,使用高效液相色谱法测定 MTX 血药浓度,并记录结果。样本处理方法:4 °C、3000 r·min⁻¹离心 5 min,取血清 500 μL,加入 40% 高氯酸 50 μL,涡旋 3 min 进行蛋白沉淀,22 °C、14 000 r·min⁻¹离心 10 min,取 200 μL 上清进样。色谱条件:色谱柱为 Agilent C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH=6.8):甲醇=80:20,流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长为 306 nm,柱温为 40 °C。

1.4 不良反应评价

1.4.1 急性药物性肝损伤 HD-MTX 化疗结束后每天监测患者肝功能指标。根据 2015 年中华医学会肝病学会制定的药物性肝损伤诊治指南^[3],符合以下情况即可诊断为药物性肝损伤:(1)化疗前肝功能指标均正常;(2)化疗后,血清谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, GPT)≥3×健康人群上限(upper limit of normal, ULN)或碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)≥2×ULN。基于受损靶细胞类型,可将药物性肝损伤分为四类,即肝细胞损伤型、胆汁淤积型、混合型 and 肝血管损伤型。由国际医学组织理事会建立并修订的前三种药物性肝损伤判断标准^[4]为:(1)肝细胞损伤型:GPT≥3×ULN,且 R≥5;(2)胆汁淤积型:ALP≥2×ULN,且 R≤2;(3)混合型:GPT≥3×ULN,ALP≥2×ULN,且 2<R<5。其中, R=(GPT_{实测值}/GPT_{ULN})/(ALP_{实测值}/ALP_{ULN})。

1.4.2 骨髓抑制 HD-MTX 化疗结束后每天对患者进行血常规检查,根据 WHO 抗癌药物急性及亚急性毒性反应分级标准,符合以下情况即可诊断为骨髓抑制:(1)化疗前血常规检查正常;(2)化疗后血常规:HGB 95~109 g·L⁻¹或 WBC(3.0~3.9)×10⁹ L⁻¹或 NE(1.5~1.9)×10⁹ L⁻¹或 PLT(75~99)×10⁹ L⁻¹为 I 度骨髓抑制;HGB 80~94 g·L⁻¹或 WBC(2.0~2.9)×10⁹ L⁻¹或 NE(1.0~1.4)×10⁹ L⁻¹或 PLT(50~74)×10⁹ L⁻¹为

Ⅱ度骨髓抑制;HGB 65~74 g·L⁻¹或 WBC(1.0~1.9)×10⁹ L⁻¹或 NE(0.5~0.9)×10⁹ L⁻¹或 PLT(25~49)×10⁹ L⁻¹为Ⅲ度骨髓抑制;HGB<65 g·L⁻¹或 WBC<1.0×10⁹ L⁻¹或 NE<0.5×10⁹ L⁻¹或 PLT<25×10⁹ L⁻¹为Ⅳ度骨髓抑制。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。采用 Pearson 分析法对不良反应与 MTX 24 h 血药浓度(C_{24h})、48 h 血药浓度(C_{48h})、72 h 血药浓度(C_{72h})的相关性进行分析,以 R 值表示。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血药浓度检测结果 给药后 24 h、48 h、72 h 的 MTX 血药浓度见表 1。为方便统计分析,血药浓度<0.1 μmol·L⁻¹时记为 0.1 μmol·L⁻¹。

表 1 给药后各时间点 MTX 血药浓度

Tab. 1 Plasma concentration of MTX at various time points

时间点	MTX 血药浓度/(μmol·L ⁻¹)			
	平均值	最大值	最小值	中位值
24 h	3.14	6.94	0.47	2.93
48 h	0.21	0.89	0.1	0.14
72 h	0.11	0.26	0.1	0.1

2.2 HD-MTX 所致药物性肝损伤 34 例患者中,16 例出现肝功能损伤,发生率为 47.06%。其中,12 例为肝细胞损伤型,4 例为混合型。肝损伤患者 GPT 水平为 167~1328 U·L⁻¹,中位水平为 251.5 U·L⁻¹;ALP 水平为 63~255 U·L⁻¹,中位水平为 103.5 U·L⁻¹。HD-MTX 所致药物性肝损伤主要表现为 GPT 升高。

2.3 HD-MTX 所致骨髓抑制 34 例患者中,19 例出现骨髓抑制,发生率为 55.88%。其中,6 例为Ⅰ度,10 例为Ⅱ度,3 例为Ⅲ度;HGB 下降(81~108 g·L⁻¹,中位值 96 g·L⁻¹)7 例,WBC 下降[(1.42~3.69)×10⁹ L⁻¹,中位值 2.47×10⁹ L⁻¹]17 例,NE 下降[(0.77~1.95)×10⁹ L⁻¹,中位值 1.26×10⁹ L⁻¹]14 例,PLT 下降(51×10⁹ L⁻¹)仅 1 例。HD-MTX 所致骨髓抑制主要表现为 WBC 和 NE 降低。

2.4 HD-MTX 所致不良反应与其血药浓度的相关性 HD-MTX 给药后,患者肝功能指标 GPT 和 ALP 与不同时间点 MTX 血药浓度(C_{24h}、C_{48h}、C_{72h})无相关性(P>0.05),即 HD-MTX 所致药物性肝损伤与 MTX 血药浓度无关。HD-MTX 给药后患者骨髓功能指

标 HGB 和 PLT 与不同时间点 MTX 血药浓度(C_{24h}、C_{48h}、C_{72h})无明显相关性(P>0.05),但 WBC 和 NE 与 MTX 血药浓度相关,尤其与 C_{24h}、C_{48h} 呈显著负相关(P<0.01),即 HD-MTX 化疗后 24 h 和 48 h,患者 MTX 血药浓度越高,WBC 和 NE 水平越低,骨髓抑制的发生率则越高(表 2)。

表 2 临床指标与各时间点 MTX 血药浓度的相关性

Tab. 2 Correlation between clinical biochemical indicators and MTX concentration at various time points

生化指标	C _{24h}		C _{48h}		C _{72h}	
	R	P	R	P	R	P
WBC	-0.741	0.000	-0.589	0.001	-0.324	0.061
NE	-0.621	0.000	-0.592	0.003	-0.278	0.111
HGB	-0.219	0.213	-0.190	0.282	-0.192	0.277
PLT	-0.254	0.148	-0.182	0.302	-0.045	0.418
GPT	0.039	0.826	0.179	0.311	0.057	0.748
ALP	0.077	0.666	0.074	0.679	0.106	0.552

3 讨论

骨肉瘤患者使用 HD-MTX 化疗的输注时间为 4~6 h,输注结束时 MTX 峰浓度能更好地预测其临床疗效,24 h、48 h、72 h 的 MTX 血药浓度均可作为排泄延迟和用药安全的预测指标^[5]。Aquerreta 等^[6]研究认为,24 h MTX 血药浓度>3.5 μmol·L⁻¹提示患者有较高毒性风险,刘权祥等^[7]认为,检测 24 h MTX 血药浓度有益于临床尽早关注高血药浓度患者并进行治疗干预,以防止严重不良反应的发生。本研究对 34 例骨肉瘤患者 HD-MTX 化疗后骨髓抑制的发生与不同时间点 MTX 血药浓度的相关性进行分析,发现 WBC 和 NE 下降与 C_{24h}、C_{48h} 显著相关,二者均可预测化疗后是否发生骨髓抑制,并认为 C_{24h} 更具有时效性和指导意义,通过监测 24 h MTX 血药浓度,医生可及时调整后续治疗方案,对高血药浓度患者尽早处理,预防性给予升白细胞药物,警惕粒细胞缺乏伴发热,并增加 CF 的给药剂量和频次,有研究认为,可视情况将 CF 增至 100 mg·m⁻² q3h^[8]。

虽然有研究提示,骨肉瘤患者经 HD-MTX 治疗后,肝损伤的生率与 24 h 和 48 h MTX 血药浓度密切相关^[9],但也有研究认为,肝损伤仅与 24 h MTX 血药浓度呈正相关,与 48 h、72 h MTX 血药浓度无关^[10]。但本研究显示,HD-MTX 所致急性药物性肝损伤与不同时间点 MTX 血药浓度均无相关性,仅提

示肝损伤多表现为 GPT 升高,类型多为肝细胞损伤型,可为肝损伤的对症治疗提供一定依据。骨肉瘤患者使用 HD-MTX 后出现肝损伤的影响因素是我们下一步要研究的内容。有 Meta 分析显示,在儿童恶性肿瘤中,*MTHFR* C677T 基因多态性与 MTX 引起的肝损伤显著相关^[11]。也有研究报道,*MTRR* 基因 rs1801394 位点多态性与 HD-MTX 致急性淋巴细胞白血病(acute lymphoblastic leukemia, ALL)患儿肝功能损伤有关^[12]。虽然上述研究针对的是儿童血液系统恶性肿瘤,但也为 HD-MTX 所致肝损伤的研究提供了新的思路,未来可进一步分析 HD-MTX 所致骨肉瘤患者肝损伤是否与 *MTHFR*、*MTRR* 基因多态性相关。动物实验研究发现,在 Wistar 大鼠体内,螺旋藻的抗氧化、抗炎症、抗凋亡等作用可对抗 MTX 引起的肝毒性^[13],提示后续研究也可以探讨肿瘤患者自服的一些保健品是否可降低 MTX 所致肝损伤的严重程度。因此,下一步研究中,我们将扩大样本量,并对患者自身因素(如年龄、性别)、生活习惯(如吸烟史、饮酒史、是否服用保健品)、合并疾病(如既往肝病史、HBV 感染情况)、MTX 累积剂量、*MTHFR* 和 *MTRR* 基因多态性等因素与 MTX 化疗所致肝损伤进行相关性分析。

MTX 的治疗窗较窄,因此 HD-MTX 导致的毒副反应发生率和严重程度均增加。由于二氢叶酸还原酶对 MTX 的亲合力远高于其对叶酸或二氢叶酸的亲合力,因此,给予大剂量叶酸不能逆转 MTX 的抗代谢作用。而 CF 是四氢叶酸(叶酸的还原型)甲酰化衍生物的钙盐,进入人体后可越过 MTX 所阻断的代谢途径,从旁路直接转化为四氢叶酸,发挥解救作用,进而降低 MTX 相关不良反应的发生率或严重程度。目前,国内外对于使用 HD-MTX 后 CF 解救剂量和时机尚无统一规范,但必须在 MTX 开始给药后 24~42 h 内或给药结束后 6~18 h 内进行首次解救^[1]。本研究中,CF 解救方式均为 HD-MTX 给药结束后 6 h 给予 CF 首剂量 300 mg 肌肉注射,此后每 6 h 给药 15 mg,直至 MTX 血药浓度 $<0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。有临床医生认为,CF 首剂量为 300 mg 的目的是预防 MTX 不良反应,但本研究认为此剂量值得商榷,因为 CF 在解救正常细胞的同时可在一定程度上救援肿瘤细胞,从而增加肿瘤细胞对 HD-MTX 的耐药性。王军等^[14]对 33 例使用 HD-MTX 治疗的 ALL 患者进行研究,发现不同 CF 解救剂量的患者不良反应发生率无显著差异。闫克里等^[15]将 30 例使用 HD-

MTX 治疗的骨肉瘤患者分为常规组和实验组,两组患者的 CF 解救剂量和给药时间均不相同,但均未出现严重的不可逆毒副反应。目前,大部分 HD-MTX 联合 CF 解救方案推荐的 CF 常规剂量为 12~15 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$ q6h 10~12 次,且不会导致肿瘤救援^[1]。为进一步促进 HD-MTX 的合理应用,保证 MTX 最大程度杀伤肿瘤细胞的同时降低其不良反应发生率,需要进一步验证 CF 解救首剂量 300 mg 是否必要。

综上所述,24 h 和 48 h MTX 血药浓度均可预警 HD-MTX 所致骨肉瘤患者骨髓抑制的发生,因 24 h 血药浓度时效性更好,所以更具有临床意义。本研究未发现 MTX 所致药物性肝损伤与 MTX 血药浓度相关,骨肉瘤患者使用 HD-MTX 后出现肝损伤的影响因素将是我们后续研究的内容之一。本研究属于回顾性研究,入组病例较少,统计分析可能存在偏差,后期需要扩大样本量进一步研究。

参考文献

- [1] 中国临床肿瘤学会(CSCO),中国临床肿瘤学会抗白血病联盟,中国临床肿瘤学会抗淋巴瘤联盟.大剂量甲氨蝶呤亚叶酸钙解救疗法治疗恶性肿瘤专家共识[J].中国肿瘤临床,2019,46(15):761-767. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2019.15.748.
- [2] 中国医师协会骨科医师分会骨肿瘤专业委员会.骨肉瘤临床循证诊疗指南[J].中华骨与关节外科杂志,2018,11(4):288-301. DOI: 10.3969/j.issn.2095-9958.2018.04.005.
- [3] 中华医学会肝病学会分会药物性肝病学组.药物性肝损伤诊治指南[J].临床肝胆病杂志,2015,31(11):1752-1769. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2015.11.002.
- [4] CHALASANI N P, HAYASHI P H, BONKOVSKY H L, et al. ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury [J]. Am J Gastroenterol, 2014, 109(7): 950-966; quiz967. DOI: 10.1038/ajg.2014.131.
- [5] 宋再伟,黄振城,张恩瑶,等.血液肿瘤患者大剂量甲氨蝶呤输注 24 h 时血药浓度与临床结局相关性的 Meta 分析[J].药物不良反应杂志,2019,21(3):183-189. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-5734.2019.03.005.
- [6] AQUERRETA I, ALDAZ A, GIRÁLDEZ J, et al. Pharmacodynamics of high-dose methotrexate in pediatric patients [J]. Ann Pharmacother, 2002, 36(9): 1344-1350. DOI: 10.1345/aph.1A446.
- [7] 刘权祥,齐明宇,杨鑫磊,等.骨肉瘤患者行大剂量甲氨蝶呤化疗后 24 h 血药浓度分析[J].北京大学学报(自然科学版),2019,20(5):682-685. DOI: 10.11713/j.issn.1009-4822.2019.05.020.
- [8] JAFFE N, GORLICK R. High-dose methotrexate in osteosarcoma: let the questions surcease—time for final acceptance [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(27): 4365-4366. DOI: 10.1200/JCO.2007.14.7793.
- [9] 王欣晨,孙言才.56 例骨肉瘤患者使用大剂量甲氨蝶呤血药浓度与其急性肝肾损伤的相关性研究[J].中国药师,2018,21(6):1064-1066. DOI: 10.3969/j.issn.1008-049X.

- 2018.06.030.
- [10] 饶晶晶, 张威, 朱思源, 等. 大剂量甲氨蝶呤化疗致儿童骨肉瘤患者肝功能损伤的危险因素分析[J]. 临床药物治疗杂志, 2019, 17(12): 40-43. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3384.2019.12.010.
- [11] ZHU C, LIU Y W, WANG S Z, et al. Associations between the C677T and A1298C polymorphisms of *MTHFR* and the toxicity of methotrexate in childhood malignancies: a meta-analysis [J]. *Pharmacogenomics J*, 2018, 18(3): 450-459. DOI: 10.1038/tpj.2017.34.
- [12] 何霞, 姚平立, 吴宇, 等. *MTRR* 和 *SLCO1B1* 基因多态性与 ALL 患儿 MTX 血药浓度及 HD-MTX 致不良反应的相关性研究[J]. 中国药房, 2019, 30(24): 3428-3433. DOI: 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.24.21.
- [13] KHAFAGA A F, EL-SAYED Y S. *Spirulina* ameliorates methotrexate hepatotoxicity via antioxidant, immune stimulation, and proinflammatory cytokines and apoptotic proteins modulation [J]. *Life Sci*, 2018, 196: 9-17. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.01.010.
- [14] 王军, 郑云艳, 宋森花, 等. 比较不同剂量亚叶酸钙在大剂量甲氨蝶呤治疗急性淋巴细胞白血病中的解毒作用[J]. 华南国防医学杂志, 2014, 28(6): 552-553, 560.
- [15] 闫克里, 朱秀卿. 大中剂量甲氨蝶呤血药浓度监测及亚叶酸钙解救方法研究[J]. 中国药物与临床, 2005, 5(3): 226-228. DOI: 10.3969/j.issn.1671-2560.2005.03.027.
- 收稿日期: 2020-03-09 校稿: 王娟 李征
- 本文引用格式:** 赵晨, 兰云意, 杨柱梅, 等. 34 例骨肉瘤患者大剂量甲氨蝶呤化疗后血药浓度与不良反应分析[J]. 肿瘤药学, 2022, 12(1): 77-81. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.01.12.
- Cite this article as:** ZHAO Chen, LAN Yunyi, YANG Zhumei, et al. Analysis of plasma concentration of methotrexate and adverse reactions in 34 patients with osteosarcoma [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2022, 12(1): 77-81. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2022.01.12.