

CYP2C19 基因多态性与抗结核药物性肝损害的关系研究[△]

张晓庆^{1*}, 郝晓晖², 张利斌¹, 李玉平¹, 舒萍¹, 崔振玲³ [1. 同济大学附属上海市肺科医院药剂科, 上海 200433; 2. 同济大学附属上海市肺科医院结核科, 上海 200433; 3. 同济大学附属上海市肺科医院上海市结核病(肺)重点实验室, 上海 200433]

中图分类号 R968;R978.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)10-0887-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.10.09

摘要 目的:探讨肝药酶细胞色素P₄₅₀2C19(CYP2C19)基因多态性与抗结核药物性肝损害(ATDIH)易感性的关系。方法:采用回顾性病例对照研究方法,采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对ATDIH病例组106例与抗结核治疗无肝损害的对照组103例的CYP2C19*2和CYP2C19*3位点进行基因型分型,分析基因多态性与ATDIH的相关性。结果:病例组与对照组CYP2C19*2和CYP2C19*3基因型频率差异无统计学意义($P>0.05$)。根据CYP2C19*2和CYP2C19*3双基因型表的代谢速度分为快代谢型、中间代谢型和慢代谢型。Logistic回归分析表明,慢代谢型患者出现肝损害的危险性是快代谢型的2.657倍(95%CI=1.089~6.482)。结论:汉族人群CYP2C19*2和CYP2C19*3基因多态性可能与ATDIH的发生有关,慢代谢型患者较快代谢型患者更易出现肝损害。

关键词 抗结核药;CYP2C19*2;CYP2C19*3;药物性肝损害;基因多态性

Relationship between Genetic Polymorphism of CYP2C19 and Anti-tuberculosis Drug-induced Hepatotoxicity

ZHANG Xiao-qing¹, HAO Xiao-hui², ZHANG Li-bin¹, LI Yu-ping¹, SHU Ping¹, CUI Zhen-ling³ [1. Dept. of Pharmacy, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China; 2. Dept. of Tuberculosis, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China; 3. Shanghai Tuberculosis (Lung) Key Laboratory of Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the relationship between the genetic polymorphisms of CYP2C19 and susceptibility of anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity (ATDIH) in the tuberculosis patients. METHODS: With retrospective case-control study, genetic polymorphisms of CYP2C19 were analyzed using PCR-RFLP in 106 cases of ATDIH group and 103 case without ATDIH of control group. The relationship of genetic polymorphisms with ATDIH was analyzed. RESULTS: There was no statistical significance in frequency of CYP2C19*2 or CYP2C19*3 genotype between ATDIH group and control group ($P>0.05$). The genotypes that CYP2C19*2 combined with CYP2C19*3 were divided into three types according to metabolism rate of their double gene phenotype: rapid type, intermediate type and slow type. Logistic regression analysis demonstrated that ATDIH risk with slow metabolizer was 2.657 times of rapid metabolizer (95% CI=1.089-6.482). CONCLUSIONS: CYP2C19*2 and CYP2C19*3 genotypes might have association with the risk of ATDIH. The incidence of ATDIH in slow metabolizer is higher than that in rapid metabolizer.

KEYWORDS Anti-tuberculosis drugs; CYP2C19*2;CYP2C19*3;Drug-induced hepatotoxicity;Genetic polymorphism

结核是严重威胁公众卫生健康、加重国民经济负担、影响社会发展的全球性问题。抗结核药物性肝损害(Anti-tuberculosis drug-induced hepatotoxicity, ATDIH)是临床结核病治疗中发生率最高的药品不良反应。常用的一线抗结核药物包括异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇等均有致肝损害的副作用,同时多药联合使用和长期用药等,均使药物性肝损害发生机会增加。ATDIH的发生机制尚不十分清楚,但与机体药物代谢酶系统密切相关。药物代谢酶对抗结核药物在体内的分

解和代谢起关键性作用^[1],因此药物代谢酶的基因多态性可能与ATDIH存在相关性。

细胞色素P₄₅₀(CYP)是人体重要的药物代谢酶,参与绝大多数临床药物的生物转化。研究表明,利福平能显著诱导CYP2C19、CYP2B6的表达,能增加CYP3A4、CYP2C8、CYP2C9的表达,最终可导致自身代谢加速^[2]。CYP2C19存在多个多态性位点,其中CYP2C19*2和CYP2C19*3为该基因的主要突变体,这两个等位基因可引起慢代谢,从而影响药物的代谢^[3]。本文通过检测CYP2C19基因分型,分析其基因多态性与ATDIH易感性的相关性,探讨ATDIH的遗传学基础,为减少抗结核药物不良反应的发生提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集我院2010年1月—2013年1月ATDIH病例106例为

△基金项目:上海市卫生局科研课题面上项目(No.20124079);上海市肺科医院院级课题(No.FK0945)

*主管药师,博士。研究方向:临床药学与临床药理学。电话:021-65115006-3080。E-mail: zxqkitten@163.com

#通信作者:副研究员。研究方向:结核病的诊断与检测。电话:021-65115006-3037。E-mail: cuizhenling@163.com

病例组,以103例用药后无肝损害者为对照组,进行回顾性病例对照研究。所有患者均为中国汉族人,自愿参与试验并签署知情同意书。所有患者入选标准:符合临床结核病的诊断标准,抗结核治疗采用四联用药(2HRZE/4HR);化疗开始时检验肝功能正常,排除任何可能引起肝损害的因素,如营养不良、人类免疫缺陷病毒感染、嗜酒、病毒性肝炎、肝病、心功能不全及配伍用其他药物等,治疗过程中能密切监测肝功能变化。病例组ATDIH的诊断标准:(1)发病前有明确的抗结核药物用药史;(2)用药后肝功能检查丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、胆红素(BIL)单项或多项升高,而其中有一项超过正常上限的2倍。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA提取。取上述结核病患者外周抗凝血1 ml,按照全基因组DNA提取试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]说明流程提取基因组DNA, -20℃低温保存,备用。

1.2.2 基因分型。设计特异性引物,采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)方法进行CYP2C19基因分型。扩增CYP2C19*2等位基因的引物序列为:5'-AAT TAC AAC CAG AGC TIG GC-3'; 5'-TAT CAC TTT CCA TAA AAG CAA G-3'。扩增CYP2C19*3等位基因的引物序列为:5'-TAT TAT TAT CTG TTA ACT AAT ATG A-3'; 5'-ACT TCA GGG CTT CAA TA-3'。两个等位基因的扩增参数均为:94℃预变性5 min;94℃变性20 s,53℃退火10 s,72℃延伸10 s,共35个循环;最后72℃延伸5 min。CYP2C19*2的等位基因扩增得到169 bp的片段,用Sma I酶经25℃消化3 h酶切后,据酶切结果可判定关于CYP2C19*2等位基因的CYP2C19基因型。CYP2C19*3的等位基因扩增得到329 bp的片段,用BamH I酶经30℃消化3 h酶切后,据酶切结果可判定关于CYP2C19*3等位基因的CYP2C19基因型。两者结合的等位基因测定结果可判定受试者的CYP2C19基因型。分别用3%琼脂糖凝胶电泳分离,在凝胶成像分析系统上观察,并记录结果。

1.3 统计学分析

应用SPSS 16.0软件进行 χ^2 、*t*检验以分析性别、年龄在病例组与对照组间的差异;采用非条件Logistic回归模型进行单因素回归分析,计算各基因型的优势比(Odds ratio, OR)及其95%置信区间(95% Confidence interval, CI),分析CYP2C19基因多态性与肺结核患者发生肝损害的危险性关联。所有检验均为双侧检验,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有非常显著意义。

2 结果

2.1 一般资料

病例组与对照组患者的性别、年龄、体质量指数(BMI)等差异无统计学意义,用药前ALT、天冬氨酸氨基转移酶(AST)及总胆红素(TBIL)、ALP均在正常值范围内。用药前后两组患者ALT、AST、TBIL、ALP、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)比较差异无统计学意义, P 均大于0.05。两组患者用药前后参数比较见表1。

2.2 基因型结果判定(参考文献^[4]方法)

表1 两组患者用药前后参数比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of parameters between 2 groups before and after treatment($\bar{x}\pm s$)

项目	病例组	对照组	<i>P</i>
性别(男/女),例	71/35	73/30	0.543
年龄,岁	46.43±17.49	45.67±17.82	0.771
用药前			
ALB,g/L	30.21±6.332	29.99±6.509	
TP,g/L	64.10±8.515	63.73±8.849	
TBIL,μmol/L	10.37±4.212	10.45±4.374	
ALT,IU/L	31.16±13.92	29.94±12.04	
AST,IU/L	24.20±9.360	23.54±9.59	
ALP,IU/L	78.83±26.82	75.50±26.33	
用药后			
ALB,g/L	29.82±6.619	30.61±5.798	
TP,g/L	63.20±10.20	64.30±8.211	
TBIL,μmol/L	13.14±9.876	10.69±4.927	
ALT,IU/L	205.80±230.10	32.91±13.70	
AST,IU/L	166.60±166.80	28.02±9.58	
ALP,IU/L	246.00±120.40	94.31±20.36	

2.2.1 CYP2C19*2分型。经PCR扩增后,产物长度为169 bp。当等位基因为681G时,Sma I酶将片段切为129 bp和49 bp两条片段;当等位基因为681A时,酶切位点消失,片段不被切开。因此基因型判断如下:GG基因型(120、49 bp两条片段),GA基因型(169、120、49 bp三条片段),AA基因型(169 bp一条片段)。

2.2.2 CYP2C19*3分型。经PCR扩增后,产物长度为233 bp。当等位基因为636G时,BamH I酶将片段切为137 bp和96 bp两条片段;当等位基因为636A时,酶切位点消失,片段不被切开。因此基因型判断如下:GG基因型(137、96 bp两条片段),GA基因型(233、137、96 bp三条片段),AA基因型(233 bp一条片段)。

2.3 CYP2C19基因型分布与ATDIH易感性的关系

本试验检测CYP2C19基因,共检测到以下基因分型:CYP2C19*2有GG、GA、AA三种基因型,CYP2C19*3有GG、GA、AA三种基因型。病例组与对照组之间CYP2C19各基因型分布频率结果见表2。在病例组与对照组中CYP2C19*2 GG野生基因型分别占41.5%和51.5%,GA突变杂合子基因型分别占49.1%和41.7%,AA突变纯合子基因型分别占9.4%和6.8%,两组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$);但GA突变杂合子基因型和AA突变纯合子基因型发生药物性肝损害OR值偏高,分别为1.457(95% CI=0.825~2.571)、1.721(95% CI=0.605~4.894)。在病例组与对照组中CYP2C19*3 GG野生基因型分别占77.4%和85.4%,GA突变杂合子基因型分别占19.8%和12.6%,AA突变纯合子基因型分别占2.8%和1.9%,两组之间比较差异无统计学意义($P>0.05$);但GA突变杂合子基因型和AA突变纯合子基因型发生药物性肝损害OR值偏高,分别为1.734(95% CI=0.815~3.686)、1.610(95% CI=0.262~9.878)。

2.4 CYP2C19双位点基因型与ATDIH易感性的关系(参考文献^[4]方法)

对CYP2C19*2和CYP2C19*3两个基因位点进行基因型分析,发现了6种双位点基因型,分别是681GG-636GG(纯合

表2 209例结核病患者CYP2C19*2和CYP2C19*3基因型与ATDIH的关系

Tab 2 Relationship between CYP2C19*2, CYP2C19*3 genotypes and ATDIH of 209 tuberculosis patients

基因型	病例组		对照组		OR(95%CI)	χ^2	P
	例数	构成比,%	例数	构成比,%			
CYP2C19*2	106		103				
GG	44	41.5	53	51.5	1.00(ref)		
GA	52	49.1	43	41.7	1.457(0.825~2.571)	1.683	0.195
AA	10	9.4	7	6.8	1.721(0.605~4.894)	1.036	0.309
G	140	66.0	149	72.3	1.00(ref)		
A	72	34.0	57	27.7	1.344(0.886~2.040)	1.934	0.164
CYP2C19*3	106		103				
GG	82	77.4	88	85.4	1.00(ref)		
GA	21	19.8	13	12.6	1.734(0.815~3.686)	2.044	0.153
AA	3	2.8	2	1.9	1.610(0.262~9.878)	0.265	0.607
G	185	87.3	189	91.7	1.00(ref)		
A	27	12.7	17	8.3	1.623(0.856~3.077)	2.199	0.138

野生,无突变)、681GG-636GA(*2纯合野生,*3杂合子)、681GA-636GG(*2杂合子,*3纯合野生)、681AA-636GG(*2纯合突变,*3纯合野生)、681GA-636GA(*2杂合子,*3杂合子)、681GG-636AA(*2纯合野生,*3纯合突变)。病例组与对照组之间CYP2C19的6种双位点基因型各基因型分布频率见表3。两组之间CYP2C19各基因型分布频率比较,差异无统计学

意义($P>0.05$)。但681GA-636GG、681GG-636GA、681AA-636GG、681GA-636GA、681GG-636AA等基因型发生药物性肝损害OR值偏高,分别为1.726(95%CI=0.902~3.303)、2.098(95%CI=0.835~5.272)、2.198(95%CI=0.743~6.503)、4.615(95%CI=0.865~24.634)、2.308(95%CI=0.361~14.766)。

表3 209例结核病患者CYP2C19*2和CYP2C19*3双位点基因型与ATDIH的关系

Tab 3 Relationship between CYP2C19*2, CYP2C19*3 genotypes and ATDIH of 209 tuberculosis patients

双位点基因型	病例组		对照组		OR(95%CI)	χ^2	P
	例数	构成比,%	例数	构成比,%			
681GG-636GG	26	24.5	40	38.8	1.00(ref)		
681GA-636GG	46	43.4	41	39.8	1.726(0.902~3.303)	2.719	0.099
681GG-636GA	15	14.2	11	10.7	2.098(0.835~5.272)	2.484	0.115
681AA-636GG	10	9.4	7	6.8	2.198(0.743~6.503)	2.024	0.155
681GA-636GA	6	5.7	2	1.9	4.615(0.865~24.634)	3.204	0.073
681GG-636AA	3	4.7	2	1.9	2.308(0.361~14.766)	0.780	0.377

2.5 CYP2C19不同代谢型与ATDIH易感性的关系

参考文献^[9],CYP2C19分为快代谢型(681GG-636GG、681GG-636GA、681GA-636GG)和慢代谢型(681AA-636GG、681GA-636GA、681GG-636AA),此种分类方法目前国内较为多见。统计学分析两种代谢基因型与ATDIH的关系,结果表明两种基因型在病例组与对照组中频率的差异无统计学意义($P>0.05$)。进一步根据不同等位基因功能缺失,CYP2C19

分为快代谢型(681GG-636GG)、中间代谢型(681GG-636GA、681GA-636GG)和慢代谢型(681AA-636GG、681GA-636GA、681GG-636AA)^[9]。中间代谢型在病例组与对照组中频率的差异无统计学意义($P>0.05$),而快代谢型、慢代谢型在病例组与对照组中频率的差异有统计学意义($P<0.05$),慢代谢型患者出现肝损害的危险性是快代谢型的2.657倍(95%CI=1.089~6.482),结果见表4。

表4 209例结核病患者CYP2C19不同代谢型与ATDIH的关系

Tab 4 Relationship between different metabolic types of CYP2C19 genes and ATDIH of 209 tuberculosis patients

CYP2C19 基因型	病例组		对照组		OR(95%CI)	χ^2	P
	例数	构成比,%	例数	构成比,%			
二分类							
快代谢型	87	82.1	92	89.3	1.00(ref)		
慢代谢型	19	17.9	11	10.7	1.872(0.822~4.058)	2.187	0.139
三分类							
快代谢型	26	24.5	40	38.8	1.00(ref)		
中间代谢型	61	57.5	52	50.5	1.805(0.974~3.345)	3.518	0.061
慢代谢型	19	17.9	11	10.7	2.657(1.089~6.482)	4.614	0.032*

与快代谢型组比较:* $P<0.05$

vs. rapid metabolism type group: * $P<0.05$

3 讨论

ATDIH^[7]是结核病治疗中最为常见的不良反应,也是结核病治疗不易耐受导致失败的主要原因之一。如何降低抗结核药的毒副作用,实现个体化用药,是结核病治疗需解决的关键

问题。临床实践发现,不同的结核病患者给予标准抗结核治疗后是否出现ATDIH存在个体差异。分析药物代谢酶基因多态性与ATDIH的相关性,探讨ATDIH的遗传学基础,也成为近年来研究的热点方向^[8-9]。

CYP2C19酶是常见的药物代谢酶细胞色素P₄₅₀超家族主要的同工酶之一,是一种很重要的药物代谢酶。遗传学的因素使CYP2C19酶具有基因多态性,并且具有明显的个体、种族和地域差异,从而表观上在人群中CYP2C19酶活性分为快、中、慢三种代谢型。因此通过影响该酶代谢或该酶活性而影响代谢的药物随患者基因型的不同,其疗效和副作用也明显不同。

ATDIH在临床很常见,研究显示在易引发药物性肝损害的药物中抗结核药物排名在前5位^[10-11]。由于抗结核药物需联合长期应用,因此不可避免会出现一定程度的药品不良反应。常用的一线抗结核药物利福平、异烟肼、吡嗪酰胺均具有一定的肝损害副作用,且相互间具有协同作用。抗结核药物中,最易引起肝损害的利福平在人体内外均能显著诱导CYP2C19的表达。CYP2C19酶的活性不仅与基因多态性有关,还受外界环境影响,许多药物可诱导或抑制其活性,其诱导剂有巴比妥类、苯妥英钠、炔诺酮、利福平、泼尼松等。研究显示不同民族的CYP2C19酶活性存在差异,成为它们之间酶活性种族差异的遗传基础。既往研究表明,利福平能显著诱导CYP2C19,最终可导致自身代谢加速。大量研究表明,CYP2C19酶基因多态性与多种疾病及药物代谢相关。Kim SH等^[12]的研究发现,CYP2C19和CYP2C9酶的基因多态性与抗结核药物引起的斑丘疹有相关性。我们推测CYP2C19酶的基因多态性可能与ATDIH有相关性。目前研究CYP2C19酶基因多态性与ATDIH的风险是否有有关的报道很少。Tang SW等^[13]通过病例对照研究发现,CYP3A4、CYP2C9和CYP2C19酶等5个基因多态性位点与ATDIH的发生没有相关性。Kim SH等^[14]对韩国人的研究报道提示,CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6等酶的基因多态性与ATDIH的发生差异无统计学意义。这可能是样本量差异、ATDIH的损害程度不同、地域差异或人种差异等因素导致阴性结果。

我们选用相对较大的样本量进行研究,所选的ATDIH中60%以上的患者为中重度肝损患者(ALT超过正常上限的5倍以上),人群主要分布在中国长江三角一带的南方人群。尽管ATDIH病例组CYP2C19*2和CYP2C19*3高表达GG基因分布频率低于对照组,中表达GA基因分布频率略低于对照组,低表达AA基因分布频率高于对照组,但最终结果显示病例组与对照组各基因型频率差异无统计学意义($P>0.05$)。进一步将CYP2C19*2和CYP2C19*3进行双基因位点联合分析,分为快代谢型、中间代谢型和慢代谢型三类。最终结果发现,在南方人群中,慢代谢型患者出现肝损害的可能性是快代谢型的2.657倍(95%CI=1.089~6.482)。按照目前国内常用的二分类分为快代谢型和慢代谢型进行分析,最终结果未发现病例组与对照组的基因型频率差异有统计学意义。这与Tang SW等^[13]对中国北方人群研究的结果不完全一致,可能是由于所在地域不同、肝损害程度不同、使用不同的分类方法和统计学方法分析、研究人群有差别等因素所致。

本课题研究结果显示,中国汉族人群CYP2C19酶*2和*3两个位点的基因多态性与ATDIH易感性可能有关,通过检测患者的CYP2C19*2和*3的基因型,对临床进行抗结核治疗时减少ATDIH有一定的指导意义。然而由于ATDIH是多因素、多

基因相关疾病,分析时没有完全排除其他各因素的影响,因此尚需要更大的样本量、多因素分析的前瞻性随机研究来进一步证实CYP2C19酶基因多态性与ATDIH的关系。

参考文献

- [1] 朱冬林,席云,吴雪琼.抗结核药物性肝损害易感基因研究进展[J].中国人兽共患病学报,2012,28(2):172.
- [2] 贺敏,黄仁彬,刘曦.利福平对细胞色素P₄₅₀超家族及其相关药物的作用[J].中国药房,2006,17(21):1664.
- [3] 周健,吕虹,康熙雄.药物代谢酶CYP2D6和CYP2C19的基因多态性与个体化治疗[J].中国医药生物技术,2009,4(4):299.
- [4] 于洁,邵宏,聂小燕,等.CYP2C19基因多态性对癫痫患者丙戊酸血药浓度的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2007,12(6):700.
- [5] 王阳,张志贤,常福厚,等.CYP2C19基因多态性与肝癌易感性关系的研究[J].中南药学,2012,10(7):481.
- [6] 刘涛,李妍,尹涛,等.CYP2C19基因多态性与冠心病危险因素对氯吡格雷抵抗的影响[J].现代生物医学进展,2012,12(7):1265.
- [7] Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, et al. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(2):192.
- [8] Kim SH, Kim SH, Lee JH, et al. Polymorphisms in drug transporter genes (ABCB1, SLCO1B1 and ABCG2) and hepatitis induced by antituberculosis drugs[J]. *Tuberculosis: Edinb*, 2012, 92(1):100.
- [9] Kim SH, Kim SH, Yoon HJ, et al. GSTT1 and GSTM1 null mutations and adverse reactions induced by antituberculosis drugs in Koreans[J]. *Tuberculosis: Edinb*, 2010, 90(1):39.
- [10] 杜建霞,沈玲.170例药物性肝损害的临床分析[J].中国药房,2008,19(2):138.
- [11] 岳晓红,黄荆南,杜书章,等.3246例药物性肝损害回顾分析及经济学评价[J].中国现代药物应用,2012,6(11):80.
- [12] Kim SH, Kim SH, Yoon HJ, et al. NAT2, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2E1 genetic polymorphisms in anti-TB drug-induced maculopapular eruption[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011, 67(2):121.
- [13] Tang SW, Lv XZ, Chen R, et al. Lack of association between genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP2C9 and CYP2C19 and antituberculosis drug-induced liver injury in a community-based Chinese population[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2013, 40(5):326.
- [14] Kim SH, Kim SH, Bahn JW, et al. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and anti-TB drug-induced hepatitis[J]. *Pharmacogenomics*, 2009, 10(11):1767.

(收稿日期:2013-06-06 修回日期:2013-10-11)