

PXR 基因的 4 个位点 SNP 与汉族人群高脂血症的关联研究[△]

方方^{1,2*},袁进²,石磊²,刘培庆^{1#}(1.中山大学药学院,广州 510006;2.广州军区广州总医院,广州 510010)

中图分类号 R968;R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)38-3585-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.38.11

摘要 目的:通过研究中国汉族人群 PXR 基因突变频率较高的 SNP 位点与高脂血症的关联性,来对汉族人群高脂血症的发生作前瞻性的探讨。方法:以高分辨率溶解曲线法,对 162 例高脂血症患者和 183 例健康对照个体 rs7643645、rs2461825、rs2472682、rs6785049 位点作 DNA 分型,并进行统计学分析。结果:在显性遗传模式下与野生型比较,rs7643645 TC、CC 型 $P=0.006$,优势比(OR)=0.520,95% 置信区间(CI)为 0.325~0.832;rs6785049 AG、AA 型 $P<0.000 1$, OR=2.320,95% CI 为 1.470~3.662。以当前数据仅在分层分析发现 rs2472682 的组间差异,未见 rs2461825 的组间差异。结论:rs7643645 突变与高脂血症发病风险的降低相关,rs6785049 突变与高脂血症发病风险的增加相关。

关键词 PXR;SNP;高分辨率溶解曲线;高脂血症;关联性

Study on Correlation between 4 SNP of PXR Gene and Hyperlipidemia in Han Population

FANG Fang¹, YUAN Jin², SHI Lei², LIU Pei-qing¹(1. College of Pharmacy, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the occurrence of hyperlipidemia in Han populations prospectively by studying the correlation of SNP genetic locus of PXR gene with hyperlipidemia in Chinese Han populations. METHODS: Four SNP in PXR gene, as rs7643645, rs2461825, rs2472682, rs6785049, were selected and genotyped in 162 hyperlipidemia cases and 183 controls using high resolution melting analysis. Statistical analysis was performed. RESULTS: Comparison between dominant heredity model and wild type, there were the mutant genotype of rs7643645 (TC&CC) [$P=0.006$, OR=0.520, and 95% CI (0.325, 0.832)] and mutant genotype of rs6785049 (AG&AA) [$P<0.000 1$, OR=2.320, 95% CI (1.470, 3.662)]; stratified analysis showed that there was difference in rs2472682 segment among different genotype groups, while no difference was found in rs2461825 segment. CONCLUSIONS: Mutation of SNP rs7643645 may contribute to lowering the risk of hyperlipidemia, while mutation of SNP rs6785049 to increasing the risk of hyperlipidemia.

KEYWORDS PXR; SNP; High resolution melting analysis; Hyperlipidemia; Correlation

孕甾烷受体(Pregnane X receptor, PXR)是一种肝核受体,主要表达于人体肝脏和小肠。PXR 对体内的类固醇激素、胆固醇代谢产物^[1-2]和体外活性物质如维生素 E、利福平、曲格列酮等表现出不同程度的敏感性^[3-4]。同时 PXR 通过调控转录表达的下游基因如 I 相代谢酶细胞色素 P₄₅₀ 家族(CYP)3A、CYP2B、CYP2C 等, II 相代谢酶葡萄糖醛酰转移酶(Uridine diphosphate dependent glycosyl transferases, UGTs)、磺基转移酶(Sulfotransferase, SULTs)、谷胱甘肽转移酶(Glutathione-S-transferase, GSTs)等,以及转运体多药耐药相关蛋白(Multi-drug resistance-associated protein 2, MRP2)、有机阴离子转运因子 2(Organic Anion Transporters 2, OATP2)、多药耐药 1(Multi-drug resistance, MDR1)基因编码产物等,间接参与/外源物质的代谢^[5]。研究发现,激活 PXR 能使三磷酸腺苷(ATP)结合盒转运子(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)和 I 型清道夫受体(Scavenger receptor class B type I, SR-B I)的转录表达量减少,从而降低了肝外胆固醇向肝脏的逆转运过程,减

少了机体胆固醇的分解代谢^[6]。肝脏中胆固醇转化成胆汁酸的限速催化酶是 CYP7A1 和 CYP27A1^[7],胆汁酸羟化产物也是 PXR 的激活物,PXR 的激活将抑制 CYP7A1 基因的表达,使胆固醇经 CYP7A1 催化代谢成的胆汁酸减少,从而实现胆汁酸自身的负反馈调节。动物实验证实,激活 PXR 可以使禁食小鼠肝脏中硬脂酰辅酶 A 脱氢酶 1(Stearoyl-CoA desaturase 1, Scd1)基因表达上调,同时使得肉碱棕榈酰转移酶 1(Carnitine palmitoyltransferase 1, Cpt1a)基因和线粒体三羟基三甲戊二酰(HMG)-辅酶 A 合成酶 2(Mitochondrial HMG-CoA synthase 2, Hmgsc2)基因表达下调,Scd1 可促进脂质合成,Cpt1a 和 Hmgsc2 可促进脂质通过 β -氧化、生酮作用而分解^[8]。PXR 编码基因的单核苷酸多态性位点(Single nucleotide polymorphisms, SNP)可能通过影响信使核糖核酸(mRNA)的剪接、修饰或转录启动及强度而改变 PXR 蛋白的表达或活性,进而影响脂质代谢。本文基于病例对照研究,采用高分辨率溶解曲线法(High resolution melting curve analysis, HRMA, 简称 HRM)探讨中国汉族人群 PXR 基因突变频率较高的 SNP 与血脂异常的关联性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

[△] 基金项目:广东省科技计划项目(No.2011B031800187)

* 硕士研究生。研究方向:临床药理学。E-mail:xxcgff@126.com

通信作者:博士生导师。研究方向:心血管药理学及分子生物学。

电话:020-39943061。E-mail:liuqp@mail.sysu.edu.cn

本试验共采集 374 份血液样本,部分样品在 HRM 基因分型时响应不佳未进入结果分析环节,最终分析高脂血症病例 162 例,对照组 183 例。研究对象来自广州军区广州总医院和增城老人院,均为汉族,平均年龄和性别概况见表 1。入排标准:(1)符合高脂血症诊断标准入选病例组:空腹血清检查总胆固醇(TC)≥5.70 mmol/L;低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) > 3.90 mmol/L;甘油三酯(TG) > 1.69 mmol/L;高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) < 0.91 mmol/L。以上 4 项指标中至少 2 项异常,且经过问诊结合临床检查排除糖尿病、慢性肾病和肾病综合征、肝功能不全、阻塞性肝胆疾病、肝糖原贮存病、胰腺炎、酒精中毒、甲状腺功能减退、特发性高钙血症、多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、系统性红斑狼疮^[9-10]、神经性厌食及某些药物如氢氯噻嗪的应用。(2)基因变异与疾病相关分析健康对照组:未经药物干预,通过病史询问、体格检查、血常规、凝血功能、胸部 X 光及血生化、心电图检查正常,可纳入健康对照组。本研究经医院医学伦理委员会批准,患者知情同意。定量资料年龄、体质量指数(BMI)用两独立样本的 *t* 检验分析,性别二分类资料以卡方检验分析,未见 3 个因素在病例组、对照组间有统计学差异,可以认为在该样本量下,潜在影响因素在组间的分布均衡,见表 1。

表 1 研究对象基本信息

Tab 1 General characteristics of research object

因素	对照组(n=183)	病例组(n=162)	统计量	P
年龄,岁	73.33±10.25	74.82±13.07	<i>t</i> =-1.183	0.238
BMI, kg/m ²	23.40±3.18	23.83±3.43	<i>t</i> =-1.10	0.272
性别 男性,例(%)	109(59.6)	108(66.7)	$\chi^2=1.858$	0.173
女性,例(%)	74(40.4)	54(33.3)		

1.2 人基因组 DNA 提取

人源基因组 DNA 提取采用 TIANamp Blood DNA Kit (0.1~1 ml),经 NanoDrop 2000 确定纯度后定量冻存分装于 -20 °C 备用。

1.3 SNP 所在片段 PCR 扩增引物

结合美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库中 PXR 基因 SNP 侧翼序列及 Roche HRM 试剂盒的使用要求,进行 L₉ (3⁴) 正交试验优化聚合酶链式反应(PCR)条件选定 4 组引物和必要的测序引物,备用于基因分型。优化的项目包括 20 μl 体系最佳引物退火温度、引物浓度、DNA 模板浓度、Mg²⁺ 浓度。

1.4 DNA 样本的 PCR 扩增及基因分型

HRM 基因分型采用德国罗氏诊断有限公司的 Roche-LightCycler[®]480 高分辨溶解扩增试剂盒,按标准作业程式操作在 LightCycler[®]480 高通量实时荧光定量 PCR 系统进行。根据 PCR-HRM 实验检测得到产物溶解曲线、T_m 峰图形状,选定不同的 DNA 样品送华大基因有限公司测序。根据测序返回的结果峰图,分别选择该 SNP 3 种不同基因型作为后续 HRM 实验的溶解曲线对照样品,批实验加入无 DNA 模板的阴性对照。

1.5 PCR 扩增子样本测序

编号的 DNA 样本根据 PCR-HRM 实验检测得到扩增产物溶解曲线、T_m 峰图形状,选定有明显差异的扩增产物送华大基因有限公司测序。根据测序返回的结果峰图,分别选择该 SNP 3 种不同基因型样品作为后续 HRM 实验的溶解曲线对照样品,批实验设无 DNA 模板的阴性对照以监测 DNA 气溶胶污染对测定的干扰。

2 结果

2.1 20 μl 体系高分辨溶解扩增的优化

根据人 PXR 基因 SNP 位点 rs7643645、rs2461825、rs2472682、rs6785049 的侧翼序列为每个位点设计多组相应的引物,梯度 PCR 后筛选的引物以及最优扩增条件(见表 2、表 3),用于 HRM 溶解扩增。

表 2 SNP 位点及扩增引物

Tab 2 SNP and amplification primer

SNP	片段长度, bp	引物序列 F/R	变异
rs7643645	130	F-5' - AATAGGCACAAGTCTCTCAAT-3' R-5' - CAACTAAGTAGCCAGGCAGAT-3'	T>C
rs2461825	77	F-5' - GAAGCAGCTTTGGGTC-3' R-5' - AGGCTCATGCGGAAAAGG-3'	A>G
rs2472682	124	F-5' - GGGGTTTCAGATGGTAGCAAAT-3' R-5' - AAGTGGGAAGCCCTGGTGTTA-3'	T>G
rs6785049	84	F-5' - CAGCCACAGTCATCCTCAGGG-3' R-5' - CACCAGCAGCCATCCCTCAAT-3'	G>A
rs2461825 测序引物	287	F-5' - GAAAGAAGCAGCTTTGGG-3' R-5' - CATTTGCGGGTAGGAGTG-3'	
rs6785049 测序引物	243	F-5' - CAGCCACAGTCATCCTCAGGG-3' R-5' - CAGGTTCCAGTCTCCGCATTG-3'	

表 3 20 μl PCR-HRM 体系最优方案

Tab 3 Optimal plan of 20 μl PCR-HRM reaction system

SNP	LightCycle 480 Mix [§] , μl	MgCl ₂ 溶液 [*] , μl	20 mmol/L 引物 F & R, μl	DNA, ng	总体积, μl
rs7643645	10.0	3.0	0.3	0.3	20
rs2461825	10.0	2.5	0.2	0.2	20
rs2472682	10.0	3.0	0.3	0.3	20
rs6785049	10.0	2.5	0.4	0.4	20

* LightCycle[®] 480 Mix 和 MgCl₂ 溶液均来自 RocheLightCycler[®] 480 高分辨溶解扩增试剂盒

§ LightCycle480 Mix 内含快速启动 Taq DNA 聚合酶、反应缓冲液、以 dUTP 替代 dTTP 的 dNTP 混合物,还有高分辨率溶解染料

* LightCycle[®] 480 Mix and MgCl₂ were from RocheLightCycler[®] high resolution melting master kit

§ LightCycle480 Mix contains FastStart Taq DNA Polymerase, reaction buffer, dNTP mixture (with dUTP instead of dTTP), and high resolution melting dye

2.2 测序确定 SNP 各基因型对照样品

HRM 结束后选定各个位点有差异(相似度置信区间阈值 0.7)的扩增产物外送测序得到的结果峰图,见图 1~图 4。图中从左到右表示测序片段的 5' 到 3' 方向序列,序列标注阴影的位置即 SNP 所在;阴影标注位置正下方的测序峰图表示检测到的具体碱基,单峰对应于纯合子,重叠峰对应于杂合子,如图 1 的 3 个峰图 a、b、c 分别表示纯合型 AA、突变杂合型 AG 和突变纯合型 GG,由此确定各个 SNP 的对照基因型样品并可验证 HRM 分型结果。图 4 中 rs6785049 的测序峰图因正义链上该 SNP 距离扩增片段测序起始位置近,影响了测序效果,故采用反向测序保证测序结果稳定准确,实为检测了互补配对链。故根据碱基互补配对原则可知正义链基因型分别为:单峰 C 对应 GG,重叠峰 C/T 对应 GA,单峰 T 对应 AA。

2.3 HRM 基因分型

HRM 基因分型实验中加入 SNP 相应的各个基因型对照 DNA 样品作阳性对照,同时设无 DNA 的阴性对照,实验结束后即可根据已知基因型的 T_m 峰图轨迹确定同批试验中其他

待测 DNA 样本的 SNP 变异类型,并根据阴性对照确定实验操作过程中 DNA 气溶胶的污染状态是否在正常范围。

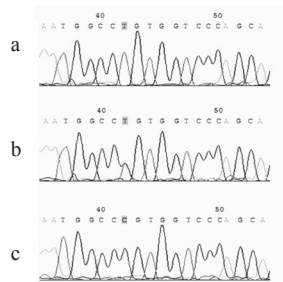


图 1 位点 rs7643645 (T>C) 测序结果

a.TT 野生型;b.TC 突变杂合型;
c.CC 突变纯合型

Fig 1 Sequencing result of rs7643645 (T>C)

a.wild type TT; b.heterozygote TC;c. homozygote CC

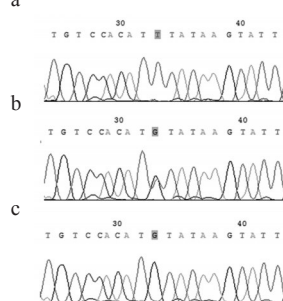


图 3 位点 rs2472682 (T>C) 测序结果

a.TT 野生型;b.TG 突变杂合型;
c.GG 突变纯合型

Fig 3 Sequencing result of rs2472682(T>C)

a.wild type TT; b.heterozygote TG;c.homozygote GG

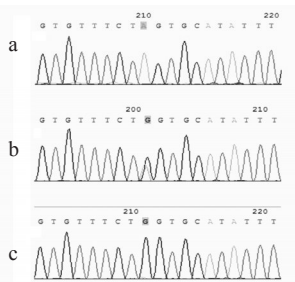


图 2 位点 rs2461825 (A>G) 测序结果

a.AA 野生型;b.AG 突变杂合型;
c.GG 突变纯合型

Fig 2 Sequencing result of rs2461825 (A>G)

a. wild type AA; b. heterozygote AG;c. homozygote GG

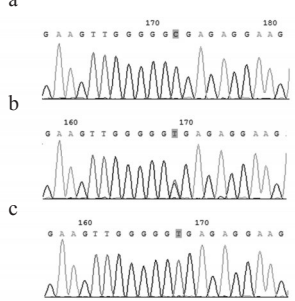


图 4 位点 rs6785049 (G>A) 测序结果

a.GG 野生型;b.GA 突变杂合型;
c.AA 突变纯合型

Fig 4 Sequencing result of rs6785049 (G>A)

a.wild type GG; b.heterozygote GA;c.homozygote AA

在批实验结束后随机抽取 HRM 轨迹不同的扩增样本测序验证 HRM 检测结果的准确性。4 个 SNP 的 HRM 基因分型图见图 5~图 8。PCR 扩增循环结束后自动进入熔解曲线分析,PCR 扩增子逐渐解链,解链初期荧光强度很高,随着温度升高,双链 DNA 逐渐减少,荧光强度渐降。仪器每摄氏度采集 25 次荧光信号,按照每个样品的温度扫描系列荧光值设定其自身荧光强度为 0%~100%,得出标准化的荧光信号的时间图(标准熔解曲线)。因 PCR 扩增子中 SNP 位点碱基不同,扩增子的 Tm 值改变,从而得以检测基因型。以 SNP 的某一基因型作为标准绘出的 3 种基因型相对熔解曲线即得到差异化视图,这一过程中饱和染料的使用可确保荧光信号对 DNA 解链的高分辨率和 HRM 的准确性。

经 HRM 分析得到 PXR 基因上 4 个 SNP 病例对照组各自的基因型数据。分析发现 rs7643645 病例组野生型(WT) 59 例,突变杂合型(M-HETER) 72 例,突变纯合型(M-HOMO) 31 例,对照组野生型 42 例,突变杂合型 83 例,突变纯合型 58 例。PXR 基因 SNP 的病例对照基因型数据分别标注于图 9。

2.4 群体 HWE 检验

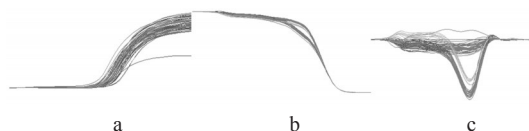


图 5 位点 rs7643645 (T>C) PCR-HRM 扩增分型结果图

a.扩增曲线;b.标准化视图;c.差异化视图

Fig 5 PCR-HRM amplification and typing results of rs7643645 segment (T>C)

a. amplification curve; b.standardized melting curve ; c.differentiated curve

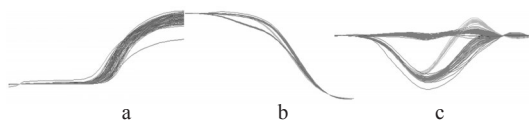


图 6 位点 rs2461825 (A>G) PCR-HRM 扩增分型结果图

a.扩增曲线;b.标准化视图;c.差异化视图

Fig 6 PCR-HRM amplification and typing results of rs2461825 segment (A>G)

a. amplification curve; b.standardized melting curve ; c.differentiated curve

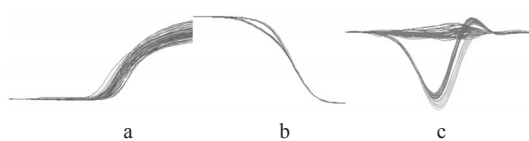


图 7 位点 rs2472682 (T>G) PCR-HRM 扩增分型结果图

a.扩增曲线;b.标准化视图;c.差异化视图

Fig 7 PCR-HRM amplification and typing results of rs2472682 segment (T>G)

a. amplification curve; b.standardized melting curve ; c.differentiated curve

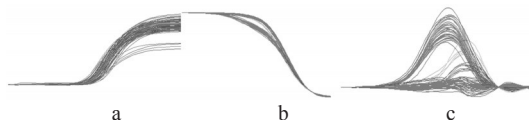


图 8 位点 rs6785049 (G>A) PCR-HRM 扩增分型结果图

a.扩增曲线;b.标准化视图;c.差异化视图

Fig 8 PCR-HRM amplification and typing results of rs6785049 segment (G>A)

a. amplification curve; b.standardized melting curve ; c.differentiated curve

为保证群体关联分析统计量不被人群选择时引入的偏差所影响,对群体行哈迪温伯格平衡(Hardy-Weinberg equilibrium, HWE)检验,见表 4。表 4 提示 SNP 位点的 HWE 检验 P 值,按照检验水准 $\alpha=0.05$,不拒绝零假设,可以认为该群体处于 HWE,数据适用于群体关联分析。

2.5 基因型频率分布差异与高脂血症发病风险的关联性

双等位基因 SNP 每个位点有 3 种可能的基因型,对 rs7643645 (T>C),突变杂合型指 TC,突变纯合型指 CC,野生型为 TT。表 5 是在各常见遗传模型下考察 PXR 基因的 4 个 SNP 位点在病例对照组的突变基因型与相应参照比较患病风险的结果,其中在共显性模型进行统计分析时因采用卡方检验两两比较,次数为 2,故按照 Bonferroni 法校正检验水准 $\alpha=0.05/2=0.025$ 。发现病例组及对照组之间的频率分布差异有统计学意义的前提下,通过相应的优势比(OR)值可评估突变

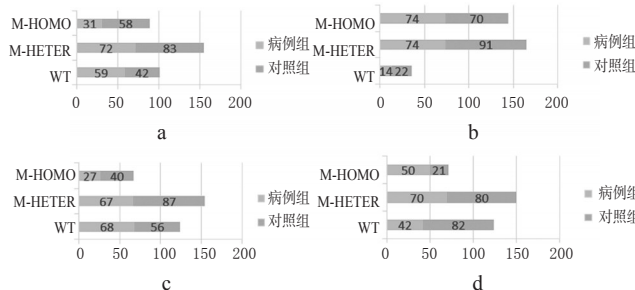


图9 四位点 rs7643645、rs2461825、rs2472682、rs6785049 基因型

a. rs7643645 基因型; b. rs2461825 基因型; c. rs2472682 基因型; d. rs6785049 基因; M-HOMO 代表突变纯合型; M-HETER 代表突变杂合型; WT 代表野生型

Fig 9 Genotyping results of rs7643645, rs2461825, rs2472682 and rs6785049 segment

a.rs7643645 genotype; b. rs2461825 genotype; c. rs2472682 genotype; d. rs6785049 genotype; M-HOMO represents homozygote; M-HETER represents heterozygote; WT represents wild type

表4 群体 HWE 检验

Tab 4 Deviation of Hardy-Weinberg equilibrium

SNP	rs7643645	rs2461825	rs2472682	rs6785049
野生型	101	144	124	124
突变杂合型	155	165	154	150
突变纯合型	89	36	67	71
<i>P</i>	0.067	0.28	0.12	0.086

与高脂血症发病风险的关联性。SNP rs7643645 (T>C), 在共显性遗传模型下, 仅见突变纯合型 CC 频数在病例对照组间的分布差异有统计学意义 ($P=0.001, \alpha=0.025$), $OR_{CC/TT}=0.38$, 95% 置信区间 (CI) 为 0.211~0.686, 在显性和隐性模型下均发现组间频数差异, 即基于该样本 rs7643645 突变基因型的高脂血症患病风险较野生型低。SNP rs6785049 (G>A) 在共显性模型下的 $OR_{AA/GG}=4.64$, 95% CI 为 2.473~8.736, 突变纯合型 AA 的高脂血症发病风险较野生型 GG 的高。仅在显性模型下发现 SNP rs2472682 的 $OR_{(TG+GG)/TT}=0.61$, 95% CI 为 0.391~0.949, 提示该位点突变可能与高脂血症的风险降低相关。SNP rs2461825 在病例组与对照组中的基因型频率分布未见统计学意义上的差异, 即该样本不能检测出它与高脂血症的关联性, 说明 rs2461825 和 rs2472682 与疾病可能确实无关联, 或关联性较弱而在现有样本量下未能充分显现。

2.6 性别分层探讨比较基因与疾病风险

作性别分层后考察各基因型与疾病发病风险的相关性, 结果见表 6。由于卡方检验的两两比较次数为 2, 故将检验水准按 Bonferroni 法校正为 $\alpha=0.025$ 。分层后男性的基因型与疾病发生风险相关性结果与基本未分层结果一致, 而未见女性 SNP rs7643645 与疾病发生风险的相关性; 与此同时, 女性群体 SNP rs2472682 的突变纯合型 $OR_{GG/TT}=0.235$, 95% CI 为 0.074~0.749, 提示该突变类型与高脂血症发生风险的降低相关, 而在未分层群体中并未发现。

2.7 高脂血症分层探讨比较基因与疾病风险

为考察 PXR 基因上的 4 个 SNP 基因型分布在各组高甘油三酯血症、高胆固醇血症、混合型高脂血症和低密度脂蛋白血症中差异有无统计学意义, 分组后作卡方分析, 检验水准按 Bonferroni 法校正为 $\alpha=0.025$ 。每个 SNP 都分别以分层后的高

表5 常见遗传模型下 SNPs 突变基因型与相应参照比较的 OR 值及其 95% CI

Tab 5 OR and 95% CI for SNPs mutation type vs. corresponding control under common genetic models

SNP	遗传模型	基因型	频数 (%)		<i>P</i> *	OR (95% CI)
			对照组 (n=183)	病例组 (n=162)		
rs7643645	共显性	TT	42 (22.9)	59 (36.4)	参照	
		TC	83 (45.4)	72 (44.4)	0.061	-
		CC	58 (31.7)	31 (19.1)	0.001	0.380 (0.211~0.686)
	显性	TT	42 (22.9)	59 (36.4)	参照	
		TC or CC	141 (77.0)	103 (63.6)	0.006	0.520 (0.325~0.832)
		TT or TC	125 (68.3)	131 (80.9)	参照	
rs2461825	共显性	AA	22 (12.0)	14 (8.6)	参照	
		AG	91 (49.7)	74 (45.7)	0.514	
		GG	70 (38.3)	74 (45.7)	0.180	
	显性	AA	22 (12.0)	14 (8.6)	参照	
		AG or GG	161 (88.0)	148 (91.4)	0.305	
		AA or AG	113 (61.7)	88 (54.3)	参照	0.510 (0.309~0.841)
rs2472682	共显性	TT	56 (30.6)	68 (42.0)	参照	
		TG	87 (47.5)	67 (41.4)	0.060	
		GG	40 (21.9)	27 (16.7)	0.055	
	显性	TT	56 (30.6)	68 (42.0)	参照	
		TG or GG	127 (69.4)	94 (58.0)	0.028	0.610 (0.391~0.949)
		TT or TG	143 (78.1)	135 (83.3)	参照	
rs6785049	共显性	GG	40 (21.9)	27 (16.7)	0.224	
		GA	82 (44.8)	42 (25.9)	参照	
		AA	21 (11.5)	50 (30.9)	<0.000 1	4.649 (2.473~8.736)
	显性	GG	82 (44.8)	42 (25.9)	参照	
		GA or AA	101 (55.2)	120 (74.1)	<0.000 1	2.320 (1.470~3.662)
		GG or GA	162 (88.5)	112 (69.1)	参照	
隐性	AA	21 (11.5)	50 (30.9)	<0.000 1	3.444 (1.960~6.052)	

* $\alpha=0.05$ 并按照具体比较次数以 Bonferroni 法校正检验水准

* $\alpha=0.05$ and inspection level was adjusted by Bonferroni correction according to concrete comparison times

脂血症组突变纯合子频数、野生型频数与对照组相应数据作比较, 结果见表 7。其中, 高甘油三酯血症组仅发现 rs6785049 突变纯合型 AA 分布频率差异有统计学意义 ($P<0.000 1$), $OR=6.248$, 95% CI 为 2.480~15.742; 高胆固醇血症中 rs7643645 突变纯合型 CC 频数分布差异有统计学意义 ($P=0.018$), 与野生型比较该基因型具有一定的保护作用; 混合型高脂血症组 rs2472682 突变杂合型 TG 也表现出一定的保护作用; 4 种高脂血症分组组均可见 rs6785049 突变纯合型增加疾病风险。

3 讨论

机体的代谢调控是一个十分庞大而又复杂的网络, PXR 处在一个相对重要的关键节点上, 许多体内外信号的刺激都能使其产生相应的调节反应。当它的编码基因所在区域发生变异时, 可能对自身的表达产生多种效应: 在外显子上能引起蛋白质产物改变的突变, 通常会使得携带者发生明显的表型特征变异, 但是这种变异在人群中的发生频率极低——罕见变异, 在相对小的样本中通常难以检测; 另一些在内含子中频率较高的突变统称为常见变异, 通常不直接引起蛋白质产物的一级结构改变, 但是处于内含子的它们, 也有可能对产物的二

表6 男女分层分析SNPs 突变基因型与相应参照比较的OR值及其95% CI

Tab 6 OR and 95% CI for SNPs mutation type vs. corresponding control under common gender stratified analysis

SNP	基因型	男性				女性			
		对照组	病例组	P*	OR(95%CI)	对照组	病例组	P*	OR(95%CI)
rs7643645	TT	23	44		参照	19	15		参照
	TC	55	46	0.010	0.437(0.231~0.828)	28	26	0.712	
	CC	31	18	0.002	0.304(0.141~0.655)	27	13	0.304	
rs2461825	AA	11	11		参照	11	3		参照
	AG	56	49	0.776		35	25	0.160	
	GG	42	48	0.779		28	26	0.072	
rs2472682	TT	36	43		参照	20	25		参照
	TG	50	43	0.284		37	24	0.098	
	GG	23	22	0.552		17	5	0.011	0.235(0.074~0.749)
rs6785049	GG	57	28		参照	25	14		参照
	GA	38	48	0.003	2.571(1.382~4.785)	42	22	0.875	
	AA	14	32	<0.000 1	4.653(2.146~10.089)	7	18	0.005	4.592(1.542~13.671)

* $\alpha=0.025$ 并以 Bonferroni 法校正检验水准

* $\alpha=0.025$ and inspection level was adjusted by Bonferroni correction

表7 高脂血症分层分析SNPs 突变基因型与相应参照比较的OR值及其95% CI

Tab 7 OR and 95% CI for SNPs mutation type vs. corresponding control by hyperlipidemia stratified analysis

SNP	基因型	高甘油三酯血症		高胆固醇血症		混合型高脂血症		低密度脂蛋白胆固醇血症	
		P*	OR [§] (95%CI)	P*	OR [§] (95%CI)	P*	OR [§] (95%CI)	P*	OR [§] (95%CI)
rs7643645	CC	0.209		0.018	0.279(0.092~0.841)	0.063		0.051	
	TC	0.094		0.081		0.608		0.082	
rs2461825	GG	0.338		0.184		1.000		0.587	
	AG	0.566		0.304		1.000		0.886	
rs2472682	GG	0.696		0.164		0.332		0.078	
	TG	0.595		0.052		0.017	0.322(0.122~0.847)	0.169	
rs6785049	AA	<0.000 1	6.248(2.480~15.742)	0.015	3.905(1.379~11.057)	0.008	5.467(1.576~18.961)	<0.000 1	5.206(2.395~11.320)
	GA	0.250		0.503		0.030		0.617	

* $\alpha=0.025$ 并以 Bonferroni 法校正检验水准

§以野生型作为参照

* $\alpha=0.025$ and inspection level was adjusted by Bonferroni correction

§wild type was set as reference

级精细结构的形成产生微妙的影响或者影响 mRNA 的剪切而使产物异常。除了单独研究他们与疾病的关联,还可以将其作为特定基因的标记组成单体型研究该基因与疾病的关联,这也是后续实验的重要方向之一。

本实验对病例对照的入组筛查谨慎,从病史询问到实验室检查都严格按照既定标准完成,较好地控制了采样所引入的偏倚,HWE 平衡检验也印证了这一点;在数据处理环节,删除存疑或丢失较多的数据项目(饮食锻炼习惯、烟酒史和部分 HRM 基因分型响应不佳个体的数据),虽丢失部分可能与基因共同影响疾病的信息,但也在最大限度上提高了结果分析的可信度。在分别讨论 SNP rs7643645 各个基因型的卡方检验中,突变纯合子 CC 与高脂血症的发生呈负相关,与此同时未能发现该位点突变杂合子 TC 与高脂血症发生风险的统计学意义联系,但是计算所得 $P=0.061$,提示 TC 可能也具有 CC 相似的效应,只是在现有样本量下未能被检测;对 SNP rs2461825 各突变基因型与野生型两两比较时未见具体基因型频数在组间的统计学差异。因此,相对较小的样本量是本实验的一个主要限制因素。

综合实验结果的分析发现,PXR 基因的 SNP rs7643645 突变可降低高脂血症的发病风险,SNP rs6785049 突变可增加高脂血症发病风险。基于该样本,仅在女性分层分析中发现

SNP rs2472682 突变纯合型 GG 与高脂血症发病风险的降低相关,这是否与 PXR 调节雌激素作用有联系仍需进一步证实^[1];rs2472682 在混合型高脂血症中突变杂合型 TG 具一定保护性效应, $P=0.017$,提示该位点可能介入 TG 和胆固醇的代谢过程;同时未能检测到 rs2461825 与高脂血症发病风险的关联性。当然,所发现的相关性也可能是与检测位点处于连锁不平衡状态的其他位点与疾病相关性的展现,这需要后续实验进一步验证。PXR 与机体脂质代谢的关系密切,而脂质代谢异常,尤其高脂血症是许多心脑血管疾病发生发展的危险因素。经本实验证实 PXR 基因变异与高脂血症存在一定关联,后续可根据遗传连锁不平衡对 PXR 基因上的其他 SNP 作优化筛选后尽可能扩大样本量研究其变异与高脂血症的关联,分析 PXR 基因与其他基因间的相互作用以及 PXR 对血脂代谢影响的具体机制,从而为死亡原因之首的心脑血管疾病的发生发展提供更详尽的依据。

参考文献

- [1] Mnif W, Pascussi JM, Pillon A, et al. Estrogens and antiestrogens activate hPXR[J]. *Toxicol Lett*, 2007, 170(1): 19.
- [2] Goodwin B, Gauthier KC, Umetani M, et al. Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor[J]. *Proc Natl*

HPLC法同时测定人血清中氯氮平与喹硫平的浓度

梁俊*,曹银,夏清荣#,刘恺(合肥市第四人民医院药剂科,合肥 230022)

中图分类号 R969.1;R971⁺.41 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)38-3590-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.38.12

摘要 目的:建立同时测定人血清中氯氮平与喹硫平浓度的方法。方法:人血清样品经0.01 mol/L 氢氧化钠溶液碱化后,采用正戊烷萃取。以高效液相色谱(HPLC)法进样分析,色谱柱为SB-C₁₈,流动相为甲醇-水-四甲基乙二胺-冰醋酸(620:380:4.4:3.52),流速为0.8 ml/min,柱温为40 ℃,紫外检测波长为254 nm,进样量为20 μl,内标为2-氨基-5-氯-2'-氟二苯甲酮。结果:氯氮平、喹硫平血药浓度分别在10~1 200、10~700 μg/L范围内线性关系良好(r 分别为0.998 5、0.996 3),定量下限均为10 μg/L。氯氮平与喹硫平高、中、低3个浓度的提取回收率均>70%,日内、日间的RSD均<15%($n=5$)。结论:本方法灵敏度高,操作简便、快速,结果准确,可用于人血清中氯氮平和喹硫平血药浓度测定。

关键词 氯氮平;喹硫平;2-氨基-5-氯-2'-氟二苯甲酮;高效液相色谱法;血清;血药浓度

Concentration Determination of Clozapine and Quetiapine in Human Serum by HPLC

LIANG Jun, CAO Yin, XIA Qing-rong, LIU Kai (Dept. of Pharmacy, Hefei Fourth People's Hospital, Hefei 230022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of clozapine and quetiapine concentration in human serum. METHODS: After alkalinizing by 0.01 mol/L NaOH, human serum samples were extracted by *n*-pentane and analyzed by HPLC. The determination was performed on SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-water-tetramethylethylenediamine-acetic acid (620:380:4.4:3.52) at the flow rate of 0.8 ml/min. The column temperature was 40 ℃ and UV detection wavelength was set at 254 nm. Injection volume was 20 μl, and 2-amino-5-chloro-2'-fluoro benzophenone was used as internal standard. RESULTS: The linear range were 10-1 200 μg/L for clozapine ($r=0.998\ 5$) and 10-700 μg/L for quetiapine ($r=0.996\ 3$), respectively, the quantitative lower limit were both 10 μg/L. The extraction recoveries of clozapine and quetiapine at high, middle and low concentrations were greater than 70%. The intra-day and inter-day RSD were less than 15% ($n=5$). CONCLUSIONS: The method is sensitive, simple, rapid and accurate, and can be used for the determination of clozapine and quetiapine concentration in human serum.

KEYWORDS Quetiapine; Clozapine; 2-amino-5-chloro-2'-fluorine benzophenone; HPLC; Serum; Blood concentration

Acad Sci USA, 2003, 100(1):223.

- [3] Hernandez JP, Mota LC, Baldwin WS. Activation of CAR and PXR by dietary, environmental and occupational chemicals alters drug metabolism, intermediary metabolism, and cell proliferation[J]. *Curr Pharmacogenomics Person Med*, 2009, 7(2): 81.
- [4] Staudinger JL, Ding X, Licht K. Pregnane X receptor and natural products: beyond drug-drug interactions[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2(6): 847.
- [5] Wada T, Gao J, Xie W. PXR and CAR in energy metabolism[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20(6): 273.
- [6] Sporstøl M, Tapia G, Malerød L, et al. Pregnane X receptor-agonists down-regulate hepatic ATP-binding cassette transporter A1 and scavenger receptor class B type I [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(4): 1 533.
- [7] Pullinger CR, Eng C, Salen G, et al. Human cholesterol

7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(1):109.

- [8] Nakamura K, Moore R, Negishi M, et al. Nuclear pregnane X receptor cross-talk with FoxA2 to mediate drug-induced regulation of lipid metabolism in fasting mouse liver [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(13): 9 768.
- [9] Wu T, Xie C, Han J, et al. Metabolic disturbances associated with systemic lupus erythematosus[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): 37 210.
- [10] Zeng T, Li SJ, Ao W, et al. The detection of autoantibodies to ATP-binding cassette transporter A1 and its role in the pathogenesis of atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Clin Biochem*, 2012, 45(16/17): 1 342.
- [11] Zhou J, Zhai Y, Mu Y, et al. A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21): 15 013.

(收稿日期:2014-07-13 修回日期:2014-08-12)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0551-63616152。E-mail:liangjun_0918@126.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0551-63616022。E-mail:xiaqingrong519@hotmail.com