

CYP3A4*1G 基因多态性与紫杉醇血药浓度的关系研究^Δ

荆洪英*, 王玉芝, 太史婧华, 张志国, 董丽华[#](佳木斯大学附属第一医院, 黑龙江 佳木斯 154002)

中图分类号 R969.1;R979.1⁹ 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)08-1063-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.08.19

摘要 目的:研究乳腺癌化疗患者CYP3A4*1G基因多态性与紫杉醇血药浓度的关系。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法测定紫杉醇血药浓度,以聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性法(PCR-RFLP)检测CYP3A4*1G基因多态性,探讨使用紫杉醇化疗患者CYP3A4*1G基因型与紫杉醇血药浓度的关系。结果:不同基因型患者紫杉醇血药浓度分别为:CC型(0.097 6±0.042 9) μg/ml、CT型(0.102 4±0.046 6) μg/ml、TT型(0.106 5±0.036 7) μg/ml。3种基因型之间,紫杉醇血药浓度差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:CYP3A4*1G基因突变对紫杉醇血药浓度无影响。

关键词 高效液相色谱法; CYP3A4*1G; 紫杉醇; 乳腺癌; 基因多态性

Study on the Relationship of CYP3A4*1G Gene Polymorphism and Plasma Concentrations of Paclitaxel

JING Hong-ying, GUO Yu-zhi, TAISHI Jing-hua, ZHANG Zhi-guo, DONG Li-hua (The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the relationship between the genetic polymorphism of CYP3A4*1G and the plasma concentrations of Paclitaxel in the chemotherapy patients with breast cancer. METHODS: The plasma concentrations of paclitaxel were detected with high performance liquid chromatography (HPLC), and the genetic polymorphism of CYP3A4*1G was determined using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) to analysis the relationship between the genotypes of CYP3A4*1G and the plasma concentrations of paclitaxel in the chemotherapy patients with breast cancer. RESULTS: The plasma concentrations of paclitaxel in patients with different genotypes were CC allele (0.097 6±0.042 9) μg/ml, CT allele (0.102 4±0.046 6) μg/ml and TT allele (0.106 5±0.036 7) μg/ml. There were no significant differences of the plasma concentrations of paclitaxel among these 3 genotypes ($P>0.05$). CONCLUSION: There are no relation between the gene mutation of CYP3A4*1G and the plasma concentrations of Paclitaxel.

KEYWORDS HPLC; CYP3A4*1G; Paclitaxel; Breast cancer; Genetic polymorphism

- simulation [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61(3):621.
- [7] 魏敏吉, 张慧琳, 孙培红, 等. 注射用哌拉西林钠/舒巴坦钠(4:1)药动学研究[J]. *中国抗生素杂志*, 2007, 32(2): 95.
- [8] 胡慧慧, 谢林, 肖大为, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中头孢吡肟浓度及其药动学[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2007, 24(1):53.
- [9] 赵彩芸, 李家泰, 张莉, 等. 单次静脉美罗培南在健康人体的药代动力学[J]. *中国临床药理学杂志*, 2004, 20(3): 189.
- [10] 张沂, 王洪武, 王睿, 等. 阿米卡星的临床药动学与体内抗生素后效应[J]. *中国药理学杂志*, 2000, 35(5):321.
- [11] 赵香兰, 黄民, 何洁英, 等. 环丙沙星3种剂型在62名健康志愿者的药物动力学研究[J]. *中国抗生素杂志*, 1995, 20(2):105.
- [12] Couet W, Grégoire N, Gobin P, et al. Pharmacokinetics of colistin and colistimethate sodium after a single 80-mg intravenous dose of CMS in young healthy volunteers [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 89(6):875.
- [13] Lomaestro BM, Drusano GL. Pharmacodynamic evaluation of extending the administration time of meropenem using a Monte Carlo simulation [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(1):461.
- [14] Akers KS, Cota JM, Frei CR, et al. Once-daily amikacin dosing in burn patients treated with continuous venovenous hemofiltration [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(10):4 639.
- [15] Tam VH, Rogers CA, Chang KT, et al. Impact of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(9):3 717.
- [16] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 铜绿假单胞菌下呼吸道感染诊治专家共识[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(1):9.
- [17] Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(Suppl 2):27.
- [18] Abdi-Ali A, Mohammadi-Mehr M, Agha Alaei Y. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2006, 27(3):196.

(收稿日期:2014-11-06 修回日期:2014-12-31)

(编辑:余庆华)

Δ 基金项目:黑龙江省教育厅2013年度科学技术研究项目(No.12531683)

*主任药师, 硕士。研究方向:医院药学。电话:0454-8623361。E-mail: wjinghongying@126.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。电话:0454-8623363。E-mail: wdonglihua@126.com

近年来,在细胞色素 P₄₅₀ 酶(CYP)的研究中,CYP1B1 和 CYP3A4 作为新的药物靶点日益受到重视。基于 CYP1B1 和 CYP3A4 在多种肿瘤组织中(前列腺、结直肠等)^[1-3] 特异性高表达,而在相应的正常组织中不表达这一特点,认为 CYP1B1 和 CYP3A4 为一个抗癌治疗、耐药逆转的新靶点。紫杉醇(Paclitaxel, 商品名为 Taxol)是一种天然广谱抗肿瘤药,是目前治疗晚期乳腺癌最有效的药物^[4],对乳腺癌有较好的疗效。然而,与其他化疗药物一样,由于紫杉醇的耐药性和骨髓抑制、心血管毒性、神经毒性及胃肠道反应等剂量依赖性或剂量限制性不良反应个体差异的存在,限制了其化疗效果及广泛应用。为探讨紫杉醇在体内的代谢途径,以提高疗效及降低不良反应,笔者比较了 CYP3A4*1G 3 种不同基因型之间的血药浓度的差异。

1 材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪,包括 P230 II 高压恒流泵、ZW II 温度控制器、UV230 II 紫外可见检测器、EC2006 色谱数据处理工作站(大连依利特分析仪器有限公司); Finnpiptette F3 微量移液器(美国 Thermo 公司); AUV220D 电子分析天平(日本岛津公司); S1000 Thermal Cycler 聚合酶链式反应(PCR)仪、Power-Pac Universal 通用型电泳仪、ChemiDoc XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); H2500R-2 高速冷冻离心机(上海沪誉贸易有限公司,本试验离心半径:8 cm)。

1.2 药品与试剂

紫杉醇对照品(批号:100382-200301)、地西洋对照品(批号:171225-200302)均购自中国食品药品检定研究院; Genomic DNA Purification Kit、Star pcr Taq、100 bp DNA Ladder、Oli I 内切酶均由 Fermentas 公司生产; CYP3A4*1G 扩增引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司北京测序部完成。乙腈、乙酸铵、氢氧化钠为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Hpersil ODS2 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.4% 乙酸铵-乙腈(56:44); 流速: 1.4 ml/min; 检测波长: 227 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 40 μl。

2.2 研究对象及血样采集方法

选择经病理或细胞学检查确诊为乳腺癌病例作为入选试验对象,预计生存期不低于 3 个月,1 个月内未用紫杉醇进行抗肿瘤治疗。血常规及肝、肾功能正常者检测 CYP3A4*1G 位点基因型,根据基因型分为 CC 型(野生纯合子)、CT 型(杂合子)、TT 型(突变纯合子)3 组,每组 6 例。化疗前检查患者身高、体质量用于计算体表面积,再按患者体表面积确定给药剂量为 200 mg/m² 静脉滴注。开始化疗次日晨采集乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)抗凝血浆 4 ml 检测紫杉醇血药浓度。

2.3 试验溶液的制备

准确称取紫杉醇对照品 10.24 mg,置于 10 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,制成质量浓度为 1 024 μg/ml 的对照品贮备液,以倍增法加流动相制成质量浓度为 512、256、128、64、32、16、8、4、2 μg/ml 的系列对照品溶液,于 -20 °C 冰箱保存,备用。另准确称取地西洋对照品 10.12 mg,置于 50 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,取该溶液 5 ml,置于 50 ml 量瓶中,加甲醇至刻度,混匀,制成质量浓度为 20.24 μg/ml 的内标溶液,于 -20 °C 冰箱保存,备用。

2.4 血浆样品处理

取血浆 1 000 μl,置于 10 ml 玻璃试管中,加入质量浓度为 20.24 μg/ml 的地西洋内标溶液 10 μl 和浓度为 1 mol/L 的碳酸氢钠溶液 100 μl,涡旋混匀,加入乙醚溶液 3 ml 涡旋提取 3 min,3 000 r/min 离心 5 min,分取上层溶液,40 °C 水浴氮气吹干,残渣加流动相 0.1 ml 溶解,3 000 r/min 离心 1 min,作为样品溶液。

2.5 专属性试验

取空白血浆+512 μg/ml 紫杉醇对照品溶液 10 μl 以及用患者血浆样品溶液,按“2.4”项方法处理,后按“2.1”项色谱条件进样测定,记录色谱图。在该条件下,血浆中的内源性物质不干扰紫杉醇及内标地西洋的测定。色谱见图 1。

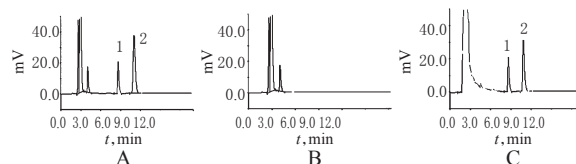


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血浆+512 μg/ml 紫杉醇对照品溶液; B. 空白血浆; C. 患者血浆; 1. 地西洋; 2. 紫杉醇

Fig 1 Typical chromatograms of paclitaxel in HPLC

A. blank plasma+512 μg/ml paclitaxel standard; B. blank plasma; C. patient plasma; 1. diazepam; 2. Paclitaxel

2.6 线性关系考察

取空白人血浆,按“2.4”项方法操作,分别加紫杉醇系列对照品溶液各 10 μl,制备成含紫杉醇质量浓度为 5.12、2.56、1.28、0.64、0.32、0.16、0.08、0.04、0.02 μg/ml 的系列溶液,按“2.1”项色谱条件进样测定,记录色谱。以各质量浓度(x)对其峰面积与内标峰面积的比值(y)进行线性回归,得回归方程: $y = 1.814 5x + 0.142 9$ ($r = 0.995 7$)。结果表明,紫杉醇血药浓度在 0.02~2.56 μg/ml 范围内线性关系良好,最低检测限为 0.02 μg/ml。

2.7 精密度及回收率试验

取空白血浆,按“2.4”项方法分别制备成含紫杉醇高、中、低质量浓度(2.56、0.32、0.04 μg/ml)样品溶液,分别于 1 d 内和 5 d 内各进样检测 6 次,采用内标法计算测得量。以 1 d 内测得量与加入量的比值计算方法回收率;以 1 d 内及 5 d 内测得的样品峰面积与内标峰面积比值计算日内和日间精密度;配制经过体积折算后的高、中、低浓度的溶液各 6 份,直接进样测定,以 1 d 内进样测定的峰面积与直接测定的相应浓度血浆样品峰面积比值计算提取回收率。精密度及回收率试验结果表 1。

表 1 精密度及回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 1 Results of recovery and accuracy tests($\bar{x} \pm s, n = 6$)

加入浓度, μg/ml	日内 RSD, %	日间 RSD, %	方法回收率, %	RSD, %	提取回收率, %	RSD, %
2.56	7.95	8.44	103.06±8.98	8.71	86.29±3.81	4.41
0.32	8.51	8.90	101.99±9.51	9.32	88.32±8.72	9.88
0.04	8.81	8.32	101.79±9.83	9.65	85.14±7.40	8.69

2.8 稳定性试验

分别制备含紫杉醇高、中、低质量浓度(2.56、0.32、0.04 μg/ml)的血浆样品,分别于室温放置 6 h,反复冻融 3 次,-20 °C 冷冻保存 20 d,按“2.4”项方法处理后按“2.1”项色谱条件进样测定,考察相关稳定性,结果见表 2。

2.9 CYP3A4*1G 基因检测

表2 稳定性试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Results of stability tests($\bar{x} \pm s, n=6$)

保存条件	加入浓度, $\mu\text{g/ml}$	测得浓度, $\mu\text{g/ml}$	RSD, %
室温放置	2.56	2.575 4 \pm 0.194 6	7.55
	0.32	0.316 9 \pm 0.025 3	7.99
	0.04	0.040 0 \pm 0.003 7	9.18
反复冻融3次	2.56	2.554 6 \pm 0.260 4	10.19
	0.32	0.321 2 \pm 0.033 5	10.43
	0.04	0.041 3 \pm 0.004 6	11.16
-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻20 d	2.56	2.576 6 \pm 0.232 9	9.04
	0.32	0.315 7 \pm 0.035 4	11.20
	0.04	0.040 9 \pm 0.003 8	9.26

primer-F, 5'-AATAGAAAGCAGATGAACCAGAGCC-3'
 primer-R 5'-CACCCCTGATGTCCAGCAGAAACT-3'; PCR 组
 分及条件: Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) 12.5 μl ,
 F、R 引物各 1 μl , 血液 DNA 模板 1 μl , ddH₂O 9.5 μl ; 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变
 性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个
 循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。酶切及电泳: 10 \times green buffer 2 μl ,
 PCR 产物 10 μl , Rsa I 内切酶 1.0 μl , ddH₂O 17 μl ; 水浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶
 切 5 min, 然后取出置水浴 65 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min。使用 2.0% 琼脂糖
 凝胶电泳 30 min, 电压 140 V。

按条件进行试验得 PCR 扩增产物片段长度为 287 bp。
 RsaI 限制性内切酶在 287 bp 野生型片段上有一个酶切位点,
 如果出现突变就不会再出现酶切位点, 因此 CC 型被酶切为
 215、72 bp 两个片段; CT 型被酶切后形成 287、215、72 bp 3 条
 片段; TT 型不被酶切, 为 287 bp 1 条片段, 分析结果与毛细管
 电泳测序结果比较, 基因型一致。CYP3A4*1G 扩增酶切后电
 泳结果见图 2; 毛细管电泳测序结果见图 3。

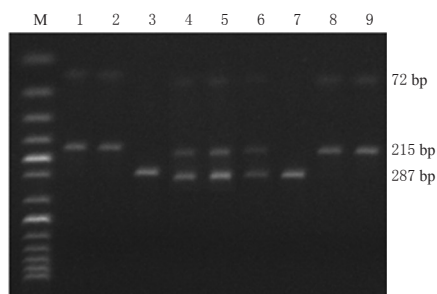


图2 CYP3A4*1G 扩增酶切后电泳结果

M. 50 bp DNA Marker; 1, 2, 8, 9 泳道为 CC 型; 4, 5, 6 泳道为 CT 型; 3, 7 泳道为 TT 型

Fig 2 Electrophoresis results of restriction digestion of the amplification products containing CYP3A4*1G

M. 50 bp DNA Marker; 1, 2, 8, 9 lanes were CC type; 4, 5, 6 lanes were CT type; 3, 7 lanes were TT type

2.10 患者基因型与血药浓度关系

2011 年 11 月—2013 年 5 月, 共检测使用紫杉醇化疗患者 CYP3A4*1G 基因型和血药浓度 130 例, 其中 CC 型 59 例 (45.38%), CT 型 65 例 (50.00%), TT 型 6 例 (4.61%)。不同基因型患者人口学资料与血药浓度见表 3。

2.11 统计分析

将 130 例使用紫杉醇进行化疗的乳腺癌患者血药浓度数据按三种不同基因型分为 3 组, 分别进行统计学 *t* 检验, CC 型与 CT 型数据比较: $P=0.56$; CC 型与 TT 型比较: $P=0.63$; CT 型与 TT 型比较: $P=0.84$ 。

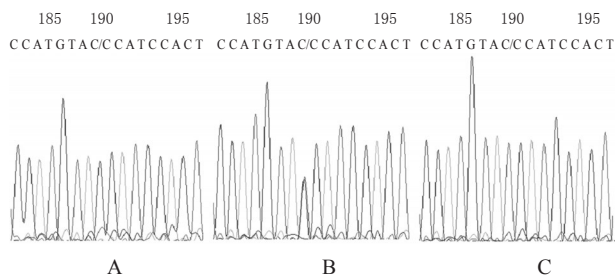


图3 CYP3A4*1G 3 种基因型毛细管电泳测序结果 (突变位点在 189 位)

A. CC 型; B. CT 型; C. TT 型

Fig 3 Sequencing maps of automatic capillary electrophoresis of 3 genotypes of CYP3A4*1G (Mutations locus was in 189)

A. CC type; B. CT type; C. TT type

表 3 不同基因型患者人口学资料与血药浓度 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Demographic data, genotypes and plasma concentrations ($\bar{x} \pm s$)

基因型	年龄, 岁	体质量, kg	身高, cm	血药浓度, $\mu\text{g/ml}$
CC	50.05 \pm 6.55	51.41 \pm 5.25	161.52 \pm 6.20	0.097 6 \pm 0.042 9
CT	49.83 \pm 6.20	51.31 \pm 5.29	161.92 \pm 6.08	0.102 4 \pm 0.046 6
TT	49.33 \pm 7.49	50.33 \pm 6.29	162.83 \pm 6.09	0.106 5 \pm 0.036 7

3 讨论

紫杉醇血药浓度与肿瘤治疗效果及不良反应有关^[5-7], 在使用同样剂量的患者中, 24 h 血药浓度有很大差异, 需要进行血药浓度监测, 但是由于何种原因产生血药浓度差异有待进一步研究。有文献关于紫杉醇由 CYP3A4 酶代谢的报道, 而 CYP3A4 酶的体内合成受 CYP3A4 基因的调控, CYP3A4 基因的众多突变位点中, CYP3A4*1G 是突变频率较高的位点, 在本研究中, 各基因型之间 24 h 紫杉醇血药浓度无差异, 表明 CYP3A4*1G 基因多态性对紫杉醇的代谢无影响。

参考文献

- [1] 肖昌琼, 周宏灏. 细胞色素 P₄₅₀ 药物氧化酶基因多态性与乳腺癌易感性研究进展[J]. 中国肿瘤, 2009, 18(1): 38.
- [2] Ilaria P, Elisa G, Aldo C, et al. Cytochrome 450 1B1 (CYP1B1) polymorphisms associated with response to docetaxel in Castration-resistant prostate cancer (CRPC) patients[J]. *BMC Cancer*, 2010(10): 511.
- [3] Joanna T, Ewa G, Janina S, et al. Variant alleles of the CYP1B1 gene are associated with colorectal cancer susceptibility[J]. *BMC Cancer*, 2010(10): 420.
- [4] 李德琼, 何雪华. 紫杉醇联合顺铂治疗晚期乳腺癌临床观察[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(9): 1 707.
- [5] 刘加涛, 孙国平, 陈小欢, 等. 紫杉醇用于非小细胞肺癌的药代动力学与疗效、毒性反应的关系研究[J]. 安徽医药, 2012, 16(9): 1 253.
- [6] 钟皎, 赵文艳, 王丽萍. 高效液相色谱法测定非小细胞癌患者血浆中紫杉醇浓度[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(7): 538.
- [7] 叶敏, 朱珠, 傅强, 等. 紫杉醇用于卵巢癌化疗的临床药理学研究[J]. 中国药理学杂志, 1999, 34(5): 313.

(收稿日期: 2014-07-17 修回日期: 2014-08-10)

(编辑: 李 劲)