

# 癫痫患者CYP2D6\*10基因多态性对丙戊酸钠血药浓度的影响<sup>Δ</sup>

方芳\*,方舟,张大伟,汪凤山,雷力力\*(佳木斯大学附属第一医院,黑龙江佳木斯 154002)

中图分类号 R971<sup>+</sup>.6;R968 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)08-1066-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.08.20

**摘要** 目的:比较不同基因型与血药浓度之间的关系,为实行个体化用药方案提供参考。方法:采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法检测癫痫患者CYP2D6\*10的基因型,高效液相色谱法测定丙戊酸钠的血药浓度。结果:CC、CT、TT 3种基因型基因分别占20.9%、24.4%、54.7%;3种基因型癫痫患者服用丙戊酸钠达稳态血药浓度后测得的血药浓度、标准化血药浓度之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:CYP2D6\*10基因多态性对癫痫患者服用丙戊酸钠的血药浓度没有影响。

**关键词** CYP2D6\*10;基因多态性;癫痫;丙戊酸钠;血药浓度

## Gene Polymorphism of CYP2D6\*10 in Patients with Epilepsy and the Effect on Serum Concentration of Sodium Valproate

FANG Fang, FANG Zhou, ZHANG Da-wei, WANG Feng-shan, LEI Li-li (The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Heilongjiang Jiamusi 154002, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To compare the relationship between different genotype and serum concentration and provide reference for implementing individualized regimen. METHODS: Genotype of CYP2D6\*10 in patients with epilepsy was determined by PCR-RFLP method, and blood drug concentration of sodium valproate was determined by HPLC. RESULTS: Distribution of CC, CT and TT gene were 20.9%, 24.4% and 54.7%, respectively. There were significant differences among the blood drug concentration and standardization plasma concentration determined after steady-state plasma concentrations of sodium valproate in 3 types of patients with genotype epileptic ( $P>0.05$ ). CONCLUSIONS: CYP2D6\*10 gene polymorphism does not affect the serum concentration of sodium valproate administration in patients with epilepsy.

**KEYWORDS** CYP2D6\*10; Gene polymorphism; Epilepsy; Sodium valproate; Blood drug concentration

丙戊酸钠是临床上常用的抗癫痫药,可有效控制多种癫痫类型的发作。丙戊酸钠的体内代谢过程较为复杂,不同的人群对其药动学和药效学的个体差异较大<sup>[1-2]</sup>。因此,运用药物基因组学的方法,寻找影响丙戊酸钠代谢及药物疗效的各种因素,针对这些因素实施个体化用药方案,对临床丙戊酸钠的治疗很有帮助。

近年来,CYP2D6基因多态性在人不同种群的分布、与临床治疗药物的效应关系研究受到广泛重视<sup>[3-4]</sup>。中国人携带CYP2D6\*10等位基因频率较高,CYP2D6\*10型占50%~70%,影响着底物药物在临床使用中的安全性和有效性<sup>[5-6]</sup>。

本研究收集2012年8月—2013年2月我院药剂科治疗药物监测(TDM)室检测的癫痫患者的血药浓度,同时测定患者的CYP2D6\*10的基因型,探讨不同基因型与血药浓度之间的关系。

## 1 材料

### 1.1 仪器

S1000 Thermal Cycler PCR仪(美国Bio-Rad公司);Power-Pac Uniwer Supply电泳仪(美国Bio-Rad公司);JY-SPFT型水平电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);HC-2518R高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);Tocan 360凝

胶成像分析仪(上海领成生物科技有限公司);P230 II型高效液相色谱仪(大连依利特分析仪器有限公司);EC2006色谱数据处理工作站(大连依利特分析仪器有限公司);AUW220D电子分析天平(日本岛津公司)。

### 1.2 药品与试剂

# K0721 Genomic DNA Purification Kit(美国Fermentas公司);Hot Start Green PCR Master Mix(2×)酶(美国Fermentas公司);Hph I内切酶(美国Fermentas公司);引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;GelRad Nucleic Acid Stain(美国Biotium公司);50 bp DNA Ladder(美国Fermentas公司);其他试剂为分析纯。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。

色谱纯乙腈(天津市凯通化学试剂有限公司);丙戊酸钠对照品(湖南省湘中制药有限公司,含量:99.8%,批号:090405);环己烷羧酸(美国Sigma公司,批号:08265PD); $\omega$ -溴苯乙酮(国药集团化学试剂有限公司,批号:20090212);其他试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 研究对象

癫痫患者均为我院TDM室血药浓度检测的患者,健康人标本来源于本校新生体检剩余血(含部分血浆)。

### 2.2 血药浓度测定方法

不同基因型癫痫患者服用丙戊酸钠后,在达到稳态血药浓度后的某个谷浓度时采血,采用高效液相色谱(HPLC)法测定患者血药浓度<sup>[7]</sup>。

<sup>Δ</sup> 基金项目:黑龙江省卫生厅科学基金资助项目(No.2011-389)

\* 主管药师。研究方向:临床药理学。电话:0454-8605640。E-mail: fafa317@163.com

# 通信作者:主任药师。研究方向:临床药理学。电话:0454-8623360。E-mail: leil1888@126.com

### 2.3 DNA的提取扩增及酶切分析

DNA的提取按提取试剂盒说明书提取血液DNA。扩增引物为:上游:5'-CCATTTGGTAGTGAGGCAGGTAT-3';下游:5'-CACCATCCATGTTTCTCTGGT-3';扩增反应体系:反应总体积25 μl,包括热启动酶10 μl,提取DNA2 μl,上、下游引物各1 μl, ddH<sub>2</sub>O 11 μl。扩增反应条件:95 °C预变性4 min, 95 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 循环35次, 最后72 °C延伸5 min。酶切体系:10×green buffer 1.5 μl, PCR产物8 μl, Hph I 酶0.5 μl, ddH<sub>2</sub>O 5 μl;酶切条件:37 °C水浴酶切4 h, 然后取出立即置65 °C水浴灭活20 min。使用1%琼脂糖凝胶, 电压145 V, 电泳50 min。电泳结束, 把凝胶从胶板上取出, 放到凝胶成像系统中观察结果并拍照。野生型纯合子(CC)为213、58 bp, 杂合子(CT)为213、112、101、58 bp, 突变型纯合子(TT)为112、101、58 bp。

### 2.4 统计学方法

使用SPSS 17.0软件进行统计。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用方差分析和 $\chi^2$ 检验。用Hardy-Weinberg平衡定律检验各等位基因频率是否符合群体遗传学规律。所有检验均为双侧检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 基本情况

不同基因型癫痫患者的基本情况见表1。

表1 不同基因型癫痫患者的基本情况( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 General condition of the patient in different genotypes of epilepsy ( $\bar{x} \pm s$ )

基因型	n	性别 (男性/女性), 例	年龄, 岁	体质量, kg	每日剂量, mg/d	血药浓度, μg/ml
CC	18	12/6	6.44 ± 6.66	21.18 ± 14.38	484.11 ± 328.92	75.79 ± 35.81
CT	21	11/10	12.67 ± 12.83	29.86 ± 19.73	541.14 ± 325.91	76.53 ± 26.22
TT	47	20/27	9.50 ± 13.20	23.60 ± 17.55	398.81 ± 283.07	72.97 ± 35.69

表1数据经SPSS 17.0软件处理, 年龄与体质量两两进行t检验, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 各组男女性别进行 $\chi^2$ 检验, 差异无统计学意义( $\chi^2 = 3.09, P > 0.05$ )。各组数据按性别进行t检验, 体质量、年龄与血药浓度差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3.2 基因型分型

CYP2D6\*10扩增后的片段大小为213 bp, 在使用内切酶进行酶切时, TT基因型具有Hph I 识别位点而切开, 突变型因碱基T突变为C而不能被切开。结果为:CYP2D6\*10的PCR产物大小为213 bp, TT基因型具有两个Hph I 酶切位点, 产物大小分别为112、101、58 bp。CT基因型只有一个Hph I 酶切位点, 产物大小分别为213、112、101、58 bp。CC基因型没有Hph I 酶切位点, 产物大小为213、58 bp。CYP2D6\*10电泳图谱见图1; CYP2D6\*10测序图谱见图2。

### 3.3 癫痫患者CYP2D6\*10不同基因型分布

对健康人(145例)和癫痫患者(86例)进行基因型检测, 测得的基因型及基因频率见表2。

表2数据经SPSS 17.0软件处理, 健康人与癫痫患者C、T等位基因频率经 $\chi^2$ 检验, 差异有统计学意义( $\chi^2 = 5.11, P < 0.01$ ); CC/CT/TT 3种基因型经 $\chi^2$ 检验, 差异有高度统计学意义( $\chi^2 = 10.64, P < 0.01$ )。

本研究健康人与文献报道健康人C、T等位基因频率经 $\chi^2$ 检验, 差异无统计学意义( $\chi^2 = 2.73, P > 0.05$ ); CC/CT/TT 3种

基因型经 $\chi^2$ 检验, 差异无统计学意义( $\chi^2 = 2.66, P > 0.05$ )。

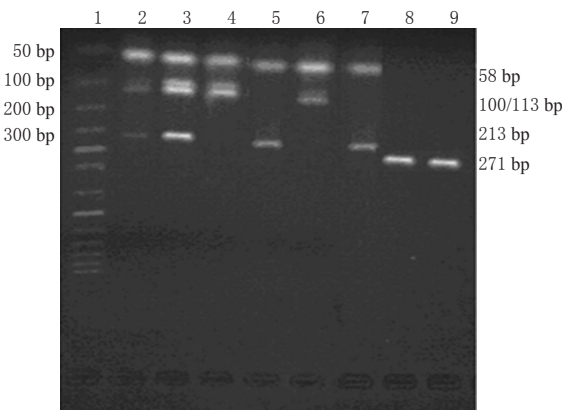


图1 CYP2D6\*10电泳图谱

1. 泳道50 bp Marker; 2、3. CT型; 4、6. TT型; 5、7. CC型; 8、9. 扩增产物

Fig 1 Gelelectrophoretogram of CYP2D6\*10

1. Lane 50 bp Marker; 2, 3. CT type; 4, 6. TT type; 5, 7. CC type; 8, 9. PCR products

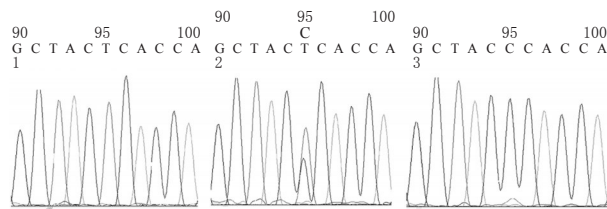


图2 CYP2D6\*10测序图谱

95位为突变基因位点; 1. TT型; 2. CT型; 3. CC型

Fig 2 Result of gene sequencing

The 95 is the gene mutation; 1. TT type; 2. CT type; 3. CC type

表2 健康人和癫痫患者CYP2D6\*10基因型分布频率[例(%)]

Tab 2 Distribution frequencies of genotype CYP2D6\*10 in healthy individuals and epilepsy patients [case(%)]

项目	CC	CT	TT	C	T
癫痫患者	18(20.9)	21(24.4)	47(54.7)	57(33.1)	115(66.9)
健康人	32(22.1)	63(43.4)	50(34.5)	127(43.8)	163(56.2)
报道	82(16.7)	213(43.4)	196(39.9)	377(38.4)	605(61.6)

从统计结果可见, 本研究中健康人的等位基因频率及基因型分布与文献报道一致, 差异无统计学意义; 本研究健康人与癫痫患者等位基因频率有高度显著性, 3种基因型分布频率有显著性, 提示癫痫的发生与CYP2D6\*10的碱基变异可能具有相关性, 但由于检验数据比较少, 有待进行大样本数据分析。

### 3.4 不同基因型癫痫患者血药浓度及标准化血药浓度比较

为消除服药剂量和体质量对患者血药浓度的影响, 使用标准化血药浓度进行比较, 即血药浓度除以按千克体质量的服药剂量, 单位为 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}/(\text{ml} \cdot \text{mg})$ 。不同基因型癫痫患者血药浓度及标准化血药浓度比较见表3。

表3数据经SPSS 17.0软件处理, 不同基因型癫痫患者血药浓度及标准化血药浓度没有差异( $P > 0.05$ )。

### 3.5 不同基因型癫痫患者未达到最低有效浓度和超过最小中毒浓度比较

丙戊酸钠的有效浓度范围为50~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在测得的数据中, 有未达到最低有效浓度和超过最小中毒浓度的数据。

不同基因型癫痫患者未达到最低有效浓度和超过最小中毒浓度比较见表4。

表3 不同基因型癫痫患者血药浓度及标准化血药浓度比较( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 3 Comparison of serum concentration and standard blood drug concentration of patients with different genotypes epilepsy ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	CC(n=18)	CT(n=21)	TT(n=47)
测得血药浓度, $\mu\text{g/ml}$	75.80 $\pm$ 35.81	76.53 $\pm$ 26.22	72.97 $\pm$ 35.69
标准化血药浓度, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}/(\text{ml}\cdot\text{mg})$	3.72 $\pm$ 2.75	4.99 $\pm$ 4.32	5.72 $\pm$ 4.88

表4 不同基因型癫痫患者未达到最低有效浓度和超过最小中毒浓度比较[例(%)]

Tab 4 Comparison of under the MEC and over the MTC of patients with different genotypes epilepsy [case(%)]

项目	CC(n=18)	CT(n=21)	TT(n=47)
未达到最低有效浓度(<50 $\mu\text{g/ml}$ )	5(27.8)	6(28.6)	13(27.7)
超过最小中毒浓度(>100 $\mu\text{g/ml}$ )	4(22.2)	5(23.8)	10(21.3)

表4数据经SPSS 17.0软件处理,不同基因型癫痫患者未达到最低有效浓度和超过最小中毒浓度病例数,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

#### 4 讨论

本试验采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法进行基因检测,较毛细管电泳法经济,较等位基因特异扩增(ASA-PCR)法准确,可以同时对本样本进行检测。对基因的部分样本采用毛细管电泳法进行测序,毛细管电泳法与PCR-RFLP法检测结果完全一致,证明了PCR-RFLP法在CYP2D6基因检测领域中应用的可行性。

本研究通过检测CYP2D6\*10碱基突变,比较了本地区癫痫患者和健康人之间的差异。结果显示,本地区癫痫患者与健康人等位基因频率有高度显著性,3种基因型分布频率有显著性,提示癫痫的发生与CYP2D6\*10的碱基变异可能具有相关性<sup>[8]</sup>,但由于检验数据比较少,有待进行大样本数据分析。

本试验通过比较CYP2D6\*10不同基因型癫痫患者丙戊酸钠血药浓度和标准化血药浓度的情况,结果显示CYP2D6\*10

3种基因型的血药浓度和标准化血药浓度之间没有差异。本试验通过比较CYP2D6\*10不同基因型癫痫患者未达到最低有效浓度和超过最小中毒浓度情况,结果显示CYP2D6\*10 3种基因型未达到最低有效浓度和超过最小中毒浓度例数之间没有差异。说明CYP2D6\*10基因多态性不影响癫痫患者丙戊酸钠的血药浓度。

#### 参考文献

- [1] Jankovic SM, Milovanovic JR. Pharmacokinetic modeling of valproate from clinical data in Serbian epileptic patients[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2007, 29(10):673.
- [2] Jankovic SM, Milovanovic JR, Jankovic S. Factors influencing valproate pharmacokinetics in children and adults [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2010, 48(11):767.
- [3] Neafsey P, Ginsberg G, Hattis D, et al. Genetic polymorphism in cytochrome P<sub>450</sub> 2D6 (CYP2D6): population distribution of CYP2D6 activity[J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2009, 12(5/6):334.
- [4] De Gregori M, Allegri M, De Gregori S, et al. How and why to screen for CYP2D6 interindividual variability in patients under pharmacological treatments[J]. *Curr Drug Metab*, 2010, 11(3):276.
- [5] 韩璐,刘洁.CYP2D6基因多态性及对药物代谢的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(1):105.
- [6] 谭蓉,郑志昌,杨继红,等.CYP2D6\*10等位基因特性对临床用药安全性和有效性的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2009, 29(21):1883.
- [7] 张志国,雷力力,李冬,等.HPLC法测定丙戊酸钠血药浓度的衍生化影响因素考察[J]. *中国药房*, 2010, 21(34):3204.
- [8] 荆洪英,董丽华,谷继卜,等.癫痫患者CYP2D6\*10基因多态性分析[J]. *黑龙江医药科学*, 2012, 35(5):3.

(收稿日期:2014-05-14 修回日期:2015-01-12)

(编辑:余庆华)

## 国家卫生和计划生育委员会副主任金小桃带队督查湖北省春节期间食品安全工作

本刊讯 根据国务院食品安全委员会工作部署,2015年2月7-10日,国家卫生和计划生育委员会(以下简称国家卫计委)副主任金小桃带队第三联合督查组,对湖北省春节期间食品安全工作进行现场督查。督查组抽查了湖北省政府和武汉市政府、黄冈市政府、武汉江夏区政府及其工作部门,实地查看了沙湖农贸市场、汉口精武食品工业园有限公司、湖北青腾有机蔬菜生产基地、湖北省实验中学食堂等17家单位食品安全主体责任的落实情况。湖北省人民政府梁惠玲副省长出席督查座谈会并介绍了本省食品安全工作情况。

督查组以现场检查、查阅资料、随机走访的形式,认真检查了春节期间食品安全工作的安排部署、风险排查、督促整改等情况。对地方针对节日热销食品、重点餐饮服务单位、重点区域场所监管措施落实情况以及交通运输领域安全保障进行了重点督查。督导组还核查了春节期间食品安全应急值守、食源性疾病预防报告工作安排部署,突发事件

应对处置预案制定及执行,舆情监测、宣传引导和畅通投诉举报渠道等情况。

金小桃对湖北省人民政府认真落实国务院食品安全委员会第二次全体会议精神,进一步加强了春节期间食品安全工作,保障人民群众饮食安全给予肯定,客观、中肯地指出督查中发现的问题和不足,提出有针对性的整改要求。金小桃强调,各地党委政府要进一步提高认识,高度重视食品安全工作,切实增强责任感和紧迫感;要认真整改存在的问题和隐患,坚决守住食品安全底线,塑造良好的食品安全氛围;要加大食品安全工作投入,明确责任,狠抓落实,保证食品安全各项措施落地、见效,要确保春节期间不发生重大食品安全问题,让人民群众过一个安乐祥和的传统佳节。

国家卫计委、质检总局、食品药品监管总局等有关负责同志和专家参加了督查,湖北省人民政府及相关部门的负责同志陪同督查。