

抗结核药物性肝损害与 *CYP2E1* 和 *GSTM1* 基因多态性的相关性研究[△]

钟洪兰^{1*}, 李祥¹, 孟繁荣², 李卫¹, 黄华英¹(1.广州市胸科医院药剂科, 广州 510095; 2.广州市胸科医院肺部疾病研究所, 广州 510095)

中图分类号 R968 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)02-0149-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.02.02

摘要 目的:分析抗结核药物性肝损害(ADIH)与细胞色素P₄₅₀酶(*CYP*)2E1和谷胱甘肽-S-转移酶(*GST*)M1基因多态性的相关性,并探讨其易感因素。方法:选择我院2011年10月—2015年6月收治的我国南方汉族肺结核住院患者91例,根据治疗过程中是否出现ADIH将其分为ADIH组(34例)和无ADIH组(57例);抽取患者外周静脉血,分别采用聚合酶链式反应(PCR)和多重PCR法检测其*CYP2E1*和*GSTM1*基因多态性,采用Logistic回归分析考察ADIH的易感因素。结果:所有患者*CYP2E1*基因型均为c2/c2型(100%);*GSTM1*基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$)。ADIH组*GSTM1*(+/-)基因型患者有9例(26.5%),*GSTM1*(-/-)基因型患者有25例(73.5%),差异有统计学意义($P<0.05$);无ADIH组*GSTM1*(+/-)基因型患者有17例(29.8%),*GSTM1*(-/-)基因型患者有40例(70.2%),差异有统计学意义($P<0.05$);但*GSTM1*(+/-)和(-/-)基因型在两组患者中的分布差异均无统计学意义($P>0.05$)。Logistic回归分析结果显示,患者性别、年龄、体质质量指数和*GSTM1*基因型与ADIH均无相关性($P>0.05$)。结论:患者性别、年龄、体质质量指数和*GSTM1*基因型可能与ADIH无关。由于仅检出1种*CYP2E1*基因型,尚无法判断其多态性与ADIH的相关性。

关键词 抗结核药物性肝损害;*CYP2E1*;*GSTM1*;基因多态性;相关性

Association of Antituberculosis Drug-induced Hepatotoxicity with *CYP2E1* and *GSTM1* Gene Polymorphisms

ZHONG Honglan¹, LI Xiang¹, MENG Fanrong², LI Wei¹, HUANG Huaying¹(1. Dept. of Pharmacy, Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou 510095, China; 2. Institute of Lung Disease, Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou 510095, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To analyze the association of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity (ADIH) with gene polymorphisms of cytochrome P₄₅₀ (*CYP*)2E1 and glutathione-S-transferase (*GST*)M1, and to discuss susceptibility factor. **METHODS:** 91 southern and Han inpatients with tuberculosis were selected from our hospital during Oct. 2011-Jun. 2015. According to the occurrence of ADIH, those patients were divided into ADIH group (34 cases) and non-ADIH group (57 cases). Peripheral venous blood of patients were collected, PCR and multiple PCR were used to detect *CYP2E1* and *GSTM1* gene polymorphisms. The susceptibility factors of ADIH was investigated by Logistic regression analysis. **RESULTS:** *CYP2E1* genotype of all patients were c2/c2 genotype (100%), and *GSTM1* genotype distribution met Hardy-Weinberg balance ($P>0.05$). There were 9 patients (26.5%) with *GSTM1*(+/-) genotype and 25 patients (73.5%) with *GSTM1*(-/-) genotype in ADIH group, with statistical significance ($P<0.05$). There were 17 patients (29.8%) with *GSTM1*(+/-) genotype and 40 patients (70.2%) with *GSTM1*(-/-) genotype in non-ADIH group, with statistical significance ($P<0.05$). There was no statistical significance in the distribution of *GSTM1*(+/-) and (-/-) genotype between 2 groups ($P>0.05$). Logistic regression analysis showed that there was no correlation of gender, age, BMI and *GSTM1* genotype with ADIH ($P>0.05$). **CONCLUSIONS:** Gender, age, BMI and *GSTM1* genotype may be not correlated with ADIH; The relationship of *GSTM1* genotype with ADIH can not be judged because only one kind of *CYP2E1* genotype has been detected.

KEYWORDS Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity; *CYP2E1*; *GSTM1*; Gene polymorphisms; Association

目前,结核病仍然是严重威胁人类健康的疾病,全球有约20亿人感染结核,每年新发结核患者超过900万人,其中约130万死于结核或其并发症^[1]。我国的结核防控情况亦不乐观。2010年,我国15岁以上人群中活动性肺结核的患病率为459/10万,涂阳肺结核患病率为66/10万^[2]。该症治疗需长时间联用多种抗结核药物,易

产生多种药品不良反应(ADR),以药物性肝损害最为常见^[3],其高发生率及严重程度常使抗结核治疗中断,是细菌耐药和抗结核治疗失败的主要原因。抗结核药物性肝损害(Antitubercular drug-induced hepatic-injury, ADIH)与体内代谢酶系统密切相关^[4]。由于肝脏中的细胞色素P₄₅₀酶(*CYP*)2E1、谷胱甘肽-S-转移酶(*GST*)M1和T1/转运蛋白(MRP)2等均参与了ADIH的病理过程^[5-6],且代谢酶的基因分型在不同地域、人群间存在差异,故检测其基因分型或许可以较为准确、全面地预测在抗结核治

△ 基金项目:广东省医学科研基金项目(No.A2011498)

* 主任药师。研究方向:医院药学。电话:020-83595977。E-mail: zhonghongl1206@21cn.com

疗过程中是否会出现 ADIH。因此,本研究通过检测我国南方汉族肺结核患者的 *CYP2E1* 和 *GSTM1* 的基因分型,初步探讨 ADIH 与其基因多态性的相关性,旨在为结核患者的个体化治疗提供参考。

1 材料

1.1 仪器

C1000™ Thermal Cycler 聚合酶链式反应(PCR)扩增仪、Gel Doc™ XR+ ImagineSystem 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);DL-600C 型 DNA 水平电泳仪(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);Centrifuge 5417C 型离心机(德国 Eppendorf 公司);DRP-9802 型电热恒温培养箱(上海森信实验仪器有限公司);MilliQ Biacel™ A10™ 型纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

通用基因组 DNA 提取试剂盒[批号:DV811A, 包含核糖核酸酶(RNase)A1、溶剂 A、溶剂 B、溶剂 C、溶剂缓冲液、洗液 A、洗液 B、洗脱缓冲液和核酸纯化柱]、DNA 聚合酶(配套 10×PCR Buffer、dNTP Mixture 和 TaKaRa Ex Taq 系列,批号:RR001A)、Afa I 限制性内切酶[配套 Afa I 10×缓冲液和 0.1% 牛血清白蛋白(BSA),批号:1080S]、100 bp DNA 条带(DNA Ladder,批号:3422B)均购自宝生物工程(大连)有限公司;SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒[生工生物工程(上海)有限公司,批号:SK8142];琼脂糖粉(香港基因有限公司,批号:111935);Gold View 核酸染料(北京鼎国昌盛生物技术有限公司,批号:DH392-5)。

2 方法

2.1 研究对象

选择我院 2011 年 10 月—2015 年 6 月确诊为肺结核、祖辈 3 代及父母双方均为汉族且在我国南方(广东、广西、湖南、湖北、江西、福建)生活的住院患者。结核病诊断依据结核病分类诊断标准^[7],ADIH 诊断参照有关药物性肝病的诊断标准^[8]及因果关系评价法(RUCAM)。排除罹患肝病、心力衰竭、呼吸衰竭、菌血症等可能引起肝脏损伤疾病者,抗结核治疗前丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)或胆红素升高者及拒绝参与试验的患者。本研究共纳入肺结核患者 91 例,根据治疗过程中是否出现 ADIH 分为 ADIH 组和无 ADIH 组,分别为 34 和 57 例。本研究经医院医学伦理委员会批准,所有患者均知情同意并签署知情同意书。

2.2 基因型检测与分析

2.2.1 DNA 的提取 抽取患者外周静脉血 250 μL,按 DNA 提取试剂盒说明书操作,提取患者 DNA。方法如下:取全血 250 μL 至收集管中,加入溶剂 A 500 μL,加入 RNase A1 1 μL,振荡 15 s,冰浴 5 min;加入溶剂 B 4 000 μL,加入 4 ℃溶剂 C 1 mL,以离心半径 16 cm、转速 12 000 r/min 离心 2 min(下同);弃去上层有机相,再加入 4 ℃溶剂 C 1 mL,充分混匀后,离心;将水相转移至收集管中的

过滤杯内,离心;在滤液中加入溶剂缓冲液 400 μL,混匀;将其转移至试剂盒中的核酸纯化柱中,离心 1 min,弃去滤液;重复冲洗过程 1 次。将离心后的核酸纯化柱置于另一 1.5 mL 离心管中,于纯化柱膜中央处加入洗脱缓冲液 50~200 μL,室温下静置 1 min,离心,洗液置于 -20 ℃ 冷冻保存,备用。具体方法按说明书进行。

2.2.2 扩增引物 *CYP2E1*、*GSTM1* 基因扩增所需引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。*CYP2E1* 引物分别为 5' -CCA- GTCGAGTCTACATTGTCA-3'(上游引物)、5' -TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3'(下游引物);*GSTM1* 引物分别为 5' -CTGCCCTACTTGATTGATGGG-3'(上游引物)、5' -CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3'(下游引物);内参引物分别为 5' -GGTTGGC-CAATCTACTCCCAGG-3'(上游引物)、5' -GCTCACT-CAGTGTGGCAAAG-3'(下游引物)。

2.2.3 *CYP2E1* 基因扩增及酶切 采用 PCR 法扩增 *CYP2E1* 基因。PCR 反应总体积为 50 μL,包括 5 U/μL TaKaRa Ex Taq 0.5 μL、10×PCR Buffer 5 μL、dNTP Mixture 4 μL、DNA 模板 1 μL、上游引物及下游引物各 2 μL、灭菌蒸馏水 35.5 μL。反应条件:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,62 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,循环 35 次;最后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物各取 4 μL 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,置于凝胶成像仪中观察结果。酶切反应体系为 Afa I 1 μL、10×缓冲液 2 μL、0.1% BSA 2 μL、DNA 1 μg,加双蒸水补足至 20 μL。酶切条件:37 ℃ 下静置 1 h,酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.2.4 *GSTM1* 基因扩增 采用多重 PCR 法扩增 *GSTM1* 基因与 Beta 内参。PCR 反应总体积为 50 μL,包括 5 U/μL TaKaRa Ex Taq 0.5 μL、10×PCR Buffer 5 μL、dNTP Mixture 4 μL、DNA 模板 1 μL、上游引物及下游引物各 2 μL、灭菌蒸馏水 35.5 μL。反应条件为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,62 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,循环 35 次;最后 72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物各取 4 μL 经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,置于凝胶成像仪中观察结果。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以频数或百分比表示。采用 χ^2 检验判断 *CYP2E1*、*GSTM1* 基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡;采用 *t* 检验比较不同患者年龄、体质量指数间的差异,采用 Logistic 回归分析 ADIH 的易感因素。

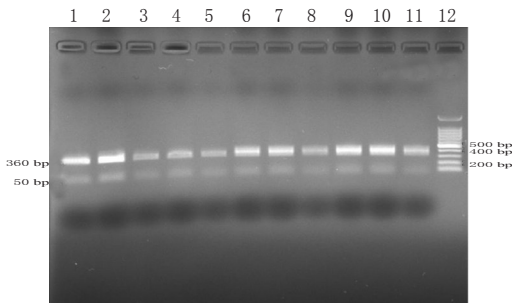
3 结果

3.1 患者一般情况

ADIH 组患者 34 例,其中男性 29 例、女性 5 例,年龄 16~83 岁,平均年龄(46.7 ± 18.1)岁,体质量指数(19.1 ± 2.1)kg/m²;无 ADIH 组患者 57 例,其中男性 43 例、女性 14 例,年龄 15~89 岁,平均年龄(49.7 ± 19.9)岁,体质量指数(17.4 ± 2.8)kg/m²。两组患者性别、年龄、体质量指数间的差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

3.2 基因型分型

按“2.2.3”项下条件进行试验得PCR扩增产物酶切片段的长度为360、50 bp。共检出CYP2E1基因型1种,即CYP2E1 c2/c2(突变型纯合子)。CYP2E1基因扩增酶切后电泳结果见图1。

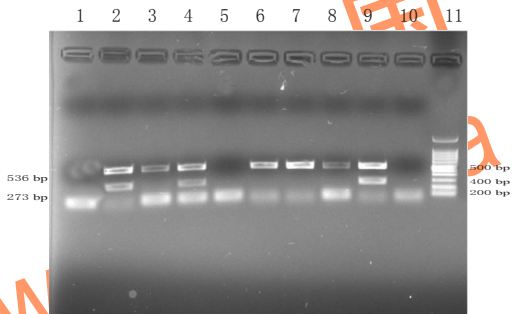


1~11泳道为CYP2E1 c2/c2基因型;12泳道为DNA Marker
lane 1-11 were CYP2E1 c2/c2 genotype; lane 12 was DNA Marker

图1 CYP2E1基因扩增酶切后电泳结果

Fig 1 Electrophoresis results of CYP2E1 gene amplification and enzyme restriction

按“2.2.4”项下条件进行试验得多重PCR扩增产物凝胶电泳片段的长度为536、273 bp。共检出GSTM1基因型2种,分别为GSTM1(-/-)(缺失型,536 bp)和GSTM1(+/-)(非缺失型,536、273 bp)。GSTM1基因凝胶电泳图见图2。



2、4、9泳道为GSTM1(+/-)基因型;3、6、7、8泳道为GSTM1(-/-)基因型;1、5泳道为扩增失败标本;10泳道为阴性对照;11泳道为DNA Marker

lane 2, 4, 9 were GSTM1 (+/-) genotype; lane 3, 6, 7, 8 were GSTM1 (-/-) genotype; lane 1, 5 were fail cases; lane 10 was the negative control; lane 11 was DNA marker

图2 GSTM1基因凝胶电泳图

Fig 2 Gel electrophoresis pattern of GSTM1 gene

3.3 基因型分布

3.3.1 CYP2E1基因型分布 两组患者CYP2E1基因型均为c2/c2型(100%)。

3.3.2 GSTM1基因型分布 ADIH组GSTM1(+/-)基因型患者有9例(占26.5%),(-/-)基因型患者有25例(占73.5%),差异有统计学意义($P < 0.05$);273 bp与536 bp条段基因频率分别为0.13和0.87。无ADIH组GSTM1(+/-)基因型患者有17例(占29.8%),(-/-)基因型患者有40例(占70.2%),差异有统计学意义($P < 0.05$);273 bp与536 bp条段基因频率分别为0.15和

0.85。两组患者GSTM1基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡(χ^2 分别为0.79、1.75, $P > 0.05$),提示样本来自遗传平衡群体,有较好的代表性;但GSTM1(+/-)和(-/-)基因型在两组患者中的分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3.4 ADIH易感因素分析

Logistic回归分析结果显示,患者的性别、年龄、体质量指数和GSTM1基因型与ADIH均无相关性($P > 0.05$)。各因素与ADIH的相关性见表1。

表1 各因素与ADIH的相关性

Tab 1 The association of different factors with ADIH

因素	优势比	95%置信区间	P
性别	0.602	0.081, 4.453	>0.05
年龄	0.977	0.930, 1.027	>0.05
体质量指数	1.313	0.922, 1.869	>0.05
GSTM1基因型	0.878	0.150, 5.135	>0.05

4 讨论

CYP2E1可将异烟肼水解成有肝毒性的乙酰烟肼,导致肝细胞损伤和坏死。研究发现,CYP2E1 c1/c1基因型与肝损害的发生呈正相关^[9]。CYP2E1基因型在不同人群中存在不同的分布特点^[10],突变型纯合子(c2/c2基因型)较为少见,但本研究所选的患者基因型均为突变型纯合子。本研究纳入的病例均为随机选择,出现这样的结果可能与其所处地域有关。由于研究病例均为c2/c2基因型,故在ADIH易感因素分析中,并未考虑CYP2E1基因多态性。

相关性分析结果显示,患者性别、年龄、体质量指数和GSTM1基因型与ADIH无相关性。GST酶是体内重要的II相代谢酶,在抗结核药物的解毒和代谢中发挥着重要的作用;GSTM1或GSTT1基因缺失会导致该基因无法编码相应蛋白,对应的酶活性消失,从而使药物毒性代谢产物和还原型谷胱甘肽结合发生障碍,引起肝细胞损伤或坏死^[11]。相关研究发现,GSTM1基因缺失型是患者发生ADIH的高危因素^[12];但也有研究表明,GSTM1基因型与肝损害的发生无显著性关系^[13]。出现这种情况可能与GSTM1和T1酶存在底物交叉现象有关。抗结核药物的毒性产物被GSTM1酶解毒,但也有部分会被GSTT1酶解毒,因此会出现GSTM1基因与ADIH相关性的不同结论。由于本课题组试验条件的限制,本研究未对GSTT1基因多态性进行检测。此外,II相代谢酶中的N-乙酰基转移酶-2(NAT2)和尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)在对毒性物质的转移方面也起着重要的作用,且具有NAT2慢乙酰基因(NAT2*6A/*7B)和GSTM1基因缺失型的患者发生ADIH的概率比只携带1种基因型的患者要高,也进一步提示毒性物质的转移受多种酶的影响^[14-15]。因此,不同研究会因人群、种族及其基因型的差异而产生不同的结论。本研究结果显示,虽然ADIH组和无ADIH组GSTM1基因缺失型患者均多于非缺失型患者,但组间比较差异无统计学意义($P >$

血管活性药物治疗肝硬化致食管胃底静脉曲张破裂出血的循证药物经济学评价^Δ

龚金红^{1*}, 杜沈莹², 刘广军¹, 杜贯涛¹, 翁春梅^{1#} (1.南京医科大学附属常州第二人民医院药学部, 江苏常州 213000; 2.中国药科大学药学院, 南京 211198)

中图分类号 R956;R975 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)02-0152-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.02.03

摘要 目的:评价血管活性药物治疗肝硬化致食管胃底静脉曲张破裂出血(EGVB)的临床效果及经济性。方法:采用循证医学方法,检索国内正式发表的有关血管活性药物治疗肝硬化致EGVB的药物经济学研究文献,筛选文献并进行资料提取后,采用RevMan 5.2软件进行Meta分析,评价不同血管活性药物治疗肝硬化致EGVB的临床效果,并运用药物经济学分析方法评价不同药物方案的经济性。结果:纳入符合标准的文献共10篇。其中,4项研究的止血有效率Meta分析结果显示:奥曲肽组(130例)与生长抑素组(135例)的止血有效率相似[RR=0.89, 95%CI(0.80, 1.00), P=0.06],但平均止血时间较生长抑素组略长[SMD=0.32,

0.05],可能与本研究并未综合考虑所选患者NAT2基因分型、样本量较少等因素有关。

综上所述,本研究考察了我国南方汉族人群中CYP2E1和GSTM1基因型与ADIH的关系,但未发现GSTM1基因缺失与ADIH的发生相关;由于本研究所有患者的CYP2E1基因型均一致,故尚无法判断两者的相关性。肝损害的发生过程受多种代谢酶(如GSTT1、NAT2、UGT等酶)的影响,其编码基因也都存在多态性,这些酶之间是否存在关联性值得深入探讨;同时,本研究也提示,足够的样本量和多种基因型的综合分析可能会对揭示ADIH的机制具有更大的帮助。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report:2015 [EB/OL]. [2016-06-07]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en.

[2] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8):485-508.

[3] 夏愔愔,詹思延. 国内抗结核药品不良反应发生率的综合分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(6):419-423.

[4] Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, et al. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(2):192-202.

[5] 张晓庆,郝晓晖,张利斌,等. CYP2C19基因多态性与抗结核药物性肝损害的关系研究[J]. 中国药房, 2014, 25

(10):887-890.

[6] 周利婷,周燕,张国强,等. 异烟肼对小鼠肝细胞膜转运体Mrp2, Bsep, P-gp和Ntcp表达的影响[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(4):298-302.

[7] 叶任高. 内科学[M]. 6版. 北京:人民卫生出版社, 2014:39-57.

[8] 权启镇,孙自勤,王要军. 新肝脏病学[M]. 3版. 济南:山东科技出版社, 2002:895-899.

[9] 王涛,玉巍,王仲元,等. 细胞色素P4502E1基因多态性与抗结核药物性肝损害的相关性[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(8):585-587.

[10] 王健,刘焯霖,黎锦如,等. 中国广东籍汉族人细胞色素P₄₅₀2E1基因5'侧翼区基因多态性[J]. 中山医科大学学报, 1999, 20(1):29-31.

[11] 冷曙光,宋文佳,王雅文,等. 中国汉族人口三种谷胱甘肽S-转移酶基因多态性分析[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(3):159-162.

[12] 安慧茹,吴雪琼,王仲元. N-乙酰基转移酶2及谷胱甘肽S转移酶M1基因多态性与抗结核药物性肝损伤的关系研究[J]. 中国防痨杂志, 2014, 36(1):14-20.

[13] 朱冬林,席云,吴雪琼. GSTM1和GSTT1基因多态性与抗结核药物性肝损害的关系[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(11):864-868.

[14] 许瑞,刘亚敏,郭振勇. 基因多态性与抗结核药物致肝损害易感性研究进展[J]. 北京医学, 2012, 34(9):846-849.

[15] 沈婷婷,张琴,张文宏,等. 中国汉族结核病患者N-乙酰基转移酶2基因型与药物性肝损伤以及抗结核疗效的关系[J]. 中华传染病杂志, 2015, 3(6):327-329.

(收稿日期:2016-01-22 修回日期:2016-07-29)

(编辑:张元媛)

本栏目协办

南京正大天晴制药有限公司

地址:江苏省南京市玄武区长江路188号德基大厦22层
电话:025-86816983 邮编:210018

Δ基金项目:江苏省药学会-奥赛康临床药学基金(No.201410)

* 主管药师, 硕士。研究方向:临床药学。电话:0519-88132683。E-mail: ghszq@qq.com

通信作者:主任药师。研究方向:药事管理。电话:0519-88111166。E-mail: chunmeiweng@sina.com