

论著·临床研究

河南汉族癫痫儿童 UGT1A6 A541G 基因多态性与 丙戊酸血药浓度相关性研究

王艳 高丽 刘艳萍 黄楠楠 许淑静 马冬菊

(河南省人民医院儿科,河南 郑州 450003)

[摘要] 目的 检测尿苷二磷酸葡萄糖醛酰转移酶(UGT)1A6 A541G 基因多态性在汉族癫痫患儿中的分布和突变频率,探讨 UGT1A6 A541G 突变各基因型与丙戊酸血药浓度的关系。方法 气相色谱法测定丙戊酸血药浓度,PCR-RFLP 技术检测 UGT1A6 A541G 基因多态性,PCR 扩增产物直接测序验证基因型检测方法的可靠性。结果 147 例汉族癫痫患儿中 UGT1A6 541 位点的基因型 AA、AG、GG 分别为 76 例、65 例和 6 例。服用单位剂量(mg/kg)引起的血药浓度 AA 基因型患儿为 $3.91 \pm 1.57 \mu\text{g/mL}$, AG 基因型患儿为 $3.59 \pm 1.39 \mu\text{g/mL}$, GG 基因型患儿为 $3.73 \pm 1.28 \mu\text{g/mL}$ 。AG、GG 基因型患儿血药浓度较 AA 基因型患儿偏低,但差异无统计学意义。结论 UGT1A6 A541G 基因多态性与丙戊酸的药浓度无显著相关性,临床个体血药浓度的差异可能是多种因素共同作用的结果。 [中国当代儿科杂志,2010,12(6):429-432]

[关键词] UGT1A6;基因多态性;丙戊酸;癫痫;儿童
[中图分类号] R748 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)06-0429-04

Effect of UGT1A6 A541G genetic polymorphism on the metabolism of valproic acid in Han epileptic children from Henan

WANG Yan, GAO Li, LIU Yan-Ping, HUANG Nan-Nan, XU Shu-Jing, MA Dong-Ju. Department of Pediatrics, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China (Gao L, Email: msgaoli@126.com)

Abstract: Objective To investigate the distribution and frequency of UGT1A6 A541G genetic polymorphism in Han epileptic children from Henan and to evaluate the effect of UGT1A6 A541G genetic polymorphism on serum concentrations of valproic acid. **Methods** The method of gas chromatography was used to assay serum concentrations of valproic acid. UGT1A6 A541G genetic polymorphism was screened by PCR-RFLP. Direct sequencing was used to confirm the expected sequences of each genotype. **Results** The genotypic frequencies of UGT1A6 A541G were as follows: AA in 76 cases, AG in 65 cases and GG in 6 cases. The mean values of serum concentrations of valproic acid in patients with A541G AA, AG and GG were 3.91 ± 1.57 , 3.59 ± 1.39 and $3.73 \pm 1.28 \mu\text{g/mL}$, respectively (dose-adjusted trough concentration on a mg/kg basis). There were no significant differences in serum concentrations of valproic acid among the three groups. **Conclusions** UGT1A6 A541G gene polymorphism does not influence serum concentrations of valproic acid in Han epileptic children. Individual differences in serum concentrations of valproic acid may be attributed to many factors.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (6):429-432]

Key words: UGT1A6; Genetic polymorphism; Valproic acid; Epilepsy; Child

癫痫是危害人类健康的常见病,我国儿童癫痫(不含热性惊厥)每年的发病率为 151/10 万,患病率为 3.45‰。丙戊酸(valproate acid,VPA)^[1]作为儿科最常用的抗癫痫药物之一,临床发现个体差异大,用药剂量与血药浓度之间相关性较差。近年,对影响丙戊酸临床疗效及血药浓度个体差异的研究亦

逐渐增多,尤其是药物代谢的遗传方面。尿苷二磷酸葡萄糖醛酰转移酶(UGT)是丙戊酸Ⅱ相代谢酶。本研究旨在调查 UGT1A6 A541G 基因多态性在汉族癫痫患儿中的分布,探讨基因多态性对丙戊酸代谢的影响及与血药浓度个体差异的关系。

[收稿日期]2009-09-19;[修回日期]2009-12-09
[作者简介]王艳,女,硕士研究生,住院医师。
[通信作者]高丽,主任医师。

1 对象和方法

1.1 对象

河南省人民医院儿科 2007 年 8 月至 2008 年 10 月门诊及住院汉族癫痫患儿 147 例,服用丙戊酸钠单药治疗,且无肝、肾功能受损及进行性器质性脑病或其他中枢神经系统疾病,依照 1989 年国际抗癫痫联盟公布的癫痫发作分类标准确定患儿发作类型,年龄 3 ~ 14 岁。

1.2 标本采集及血药浓度测定及其标准化

至少 5 个半衰期后,于下次服药前,血药浓度达到稳态时采集静脉血^[2],不抗凝,气相色谱法^[3]测定丙戊酸血药浓度($\mu\text{g/mL}$)。为消除体重及服药剂量对血药浓度的影响,将气相色谱法所测得血药浓度除以患者每日每公斤体重的服药量(mg/kg),即标准化的血药浓度^[4]。

1.3 DNA 提取与基因多态性检测

酚-氯仿法进行全血基因组 DNA 提取,聚合酶链扩增反应-限制性长度片段多态性(PCR-RFLP)技术检测 UGT1A6 541 位点的多态性。PCR 扩增引物由大连宝生物技术有限公司合成。引物序列^[5]:上游引物序列:5'- CTT TAA GGA GAG CAA GTT TGA TG-3',下游引物序列:5'- CCA CTC GTT GGG AAA AAG TC-3'。PCR 反应体系:DNA 模板 2 μL , PCR SmartMix 溶液 12.5 μL ,引物 P1、P2 各加入 1 μL ,加超纯水至 25 μL 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,57.5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 4 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。限制性内切酶 Sph I (上海生物技术有限公司)酶切 PCR 产物。扩增产物由北京天根生化科技有限公司 ABI 3730XL 测序仪直接测

序进一步验证分析方法的可靠性。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 10.0 计算机统计学软件处理,所有数值均用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,UGT1A6 541 位点的基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡及不同种族间基因多态性分布的差异用 χ^2 检验,UGT1A6 541 位点 AA、AG、GG 基因型间血药浓度差异的分析用方差分析,检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 UGT1A6 541 位点基因突变类型

野生纯合子 AA 的电泳产物为 215 bp 的片段;杂合子 AG 的电泳产物为 215 bp、128 bp 和 87 bp 的 3 个片段;突变纯合子 GG 的电泳产物为 128 bp 和 87 bp 的 2 个片段。见图 1。各基因型测序结果见图 2。基因测序结果与基因库中序列对比后发现:测序图(WW)第 99 等位基因点为野生型碱基 A 单峰,测序图(WM)第 101 位点为杂合型 AG 双峰,测序图(WM)97 位点为纯合碱基 G 单峰。

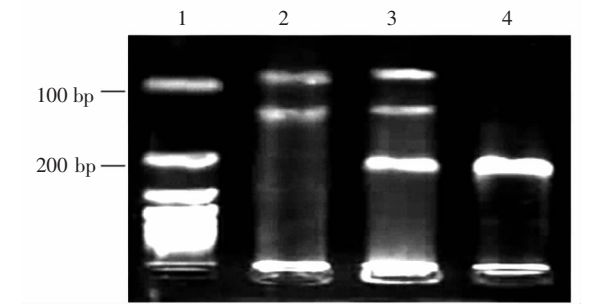


图 1 UGT1A6 A541G 各基因型 PCR-RFLP 电泳结果 1:DNA 标记物; 2:GG 基因型; 3:AG 基因型; 4:AA 基因型。

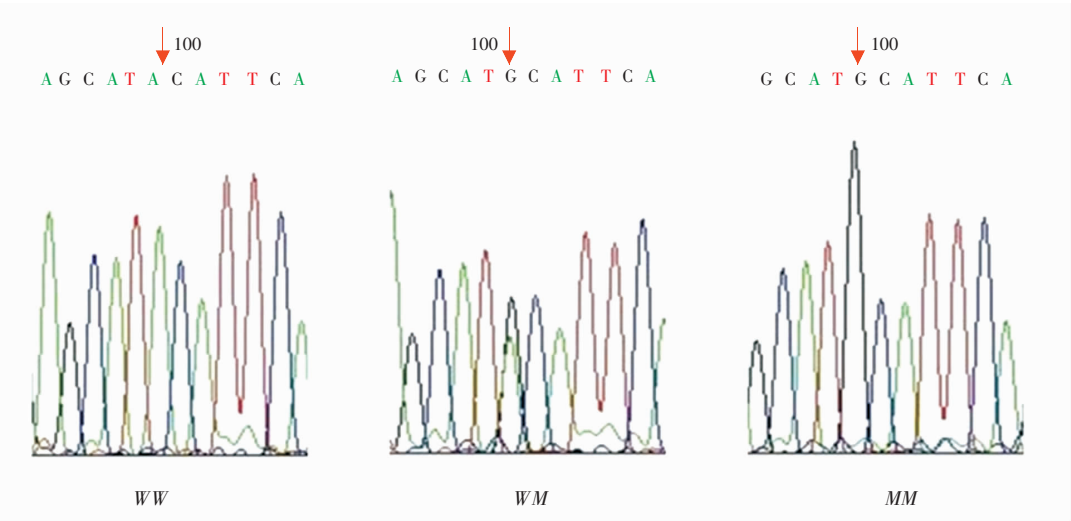


图 2 UGT1A6 A541G 各基因型直接测序结果 WW:野生纯合型; WM:突变杂合型; MM:突变纯合型。

2.2 基因多态性与丙戊酸血药浓度的关系

147例汉族癫痫患儿中UGT1A6 541位点A、G的等位基因频率分别为73.8%和26.2%,其基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡($P > 0.05$)。其中AG基因型患儿65例,血药浓度为 $3.59 \pm 1.39 \mu\text{g/mL}$,GG基因型患儿6例,血药浓度为 $3.73 \pm 1.28 \mu\text{g/mL}$,AA基因型患儿76例,血药浓度为 $3.91 \pm 1.57 \mu\text{g/mL}$,AG基因型及GG基因型患儿血药浓度较AA基因型患儿偏低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 基因多态性与不同剂型丙戊酸血药浓度的关系

服用丙戊酸钠糖浆患儿86例,血药浓度为 $3.05 \pm 1.10 \mu\text{g/mL}$,服用丙戊酸钠缓释片的患儿为61例,血药浓度为 $4.77 \pm 1.36 \mu\text{g/mL}$,两者比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。进一步分析显示服用丙戊酸钠糖浆患儿中,AA基因型患儿血药浓度为 $3.10 \pm 1.12 \mu\text{g/mL}$,AG基因型患儿血药浓度为 $2.96 \pm 1.04 \mu\text{g/mL}$,GG基因型患儿血药浓度为 $3.71 \pm 1.98 \mu\text{g/mL}$,AG基因型患儿血药浓度较GG基因型偏低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。服用丙戊酸钠缓释片患儿血药浓度:AA基因型患儿为 $4.97 \pm 1.52 \mu\text{g/mL}$,AG基因型患儿为 $4.92 \pm 1.07 \mu\text{g/mL}$,GG基因型患儿为 $3.75 \pm 0.39 \mu\text{g/mL}$,与AA及AG基因型患儿比较,GG基因型患儿血药浓度偏低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

随着I相代谢酶(常见的是CYP450)的研究发现基因变异是许多药物代谢个体差异的原因,II相代谢酶的研究日趋增多(最常见的是UGT),其中UGT1A6^[6-7]参与丙戊酸的代谢,且UGT1A6基因存在多态性,这可能是底物糖酯化作用存在个体差异的重要原因^[8]。

本研究对河南汉族癫痫患儿中UGT1A6 A541G多态性的分布进行分析显示,A541G突变发生率为26.2%,与日本人群的突变频率基本一致,也与高加索和非裔美国人群的突变频率基本一致^[5,9]。UGT1A6 A541G位点的基因多态性与丙戊酸血药浓度的关系研究显示,杂合子突变型及突变纯合型较野生基因型丙戊酸血药浓度偏低,但基因型间血药浓度差异无统计学意义,与一些文献^[10-13]的研究结果不一致,但与Krishnaswamy等^[14]及Peters等^[15]的研究结果基本一致,这可能与以下因素有关:①本研究样本量较小,尤其是突变纯合型样本少,可能导

致血药浓度结果不呈正态分布,有待进一步扩大样本量深入研究;②有研究报道饮食因素可影响UGT1A6的表达^[16],本研究没有严格控制饮食,亦可能是与其他研究结果存在差异的原因之一;③丙戊酸的代谢过程比较复杂,在UGT1A6参与丙戊酸代谢的过程中,有其他II相代谢酶的交叉效应(如UGT1A9,UGT2B7)^[6,17],可能存在I相代谢酶(如CYP2A6,CYP2B6)及其他结合蛋白(如脂肪酸结合蛋白)的影响^[18-19],可能影响丙戊酸的代谢,有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Stokes T, Shaw EJ, Juarez-Garcia A, Camosso-Stepinovic J, Baker R (2004). Clinical Guidelines and Evidence Review for the Epilepsies: diagnosis and management in adults and children in primary and secondary care. London: Royal College of General Practitioners. <http://www.nice.org.uk/>.
- [2] Sánchez-Alcaraz A, Quintana MB, López E, Rodríguez I. Valproic acid clearance in children with epilepsy [J]. Clin Pharm Ther, 1998, 23(1):31-34.
- [3] 郑惠良,刘文弟,祁元明,杨莹,黄喜顺,景学医,等. 丙戊酸钠治疗不同年龄的癫痫血药浓度研究[J]. 实用儿科临床杂志, 1995,13(3):168.
- [4] von Ahnen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V co allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients [J]. Clin Chem, 2001, 47(6):1048-1052.
- [5] Nagar S, Zalatoris JJ, Blanchard RL. Human UGT1A6 pharmacogenetics: identification of a novel SNP, characterization of allele frequencies and functional analysis of recombinant allozymes in human liver tissue and in cultured cells [J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(8):487-499.
- [6] Ethell BT, Anderson GD, Burchell B. The effect of valproic acid on drug and steroid glucuronidation by expressed human UDP-glucuronosyltransferases [J]. Biochem Pharmacol, 2003, 65(9):1441-1449.
- [7] Yamagata T, Momoi MY, Murai K, Ikematsu K, Suwa K, Sakamoto K, et al. Penipenem-betamipron and decreases in serum valproic acid concentration [J]. Ther Drug Monit, 1998, 20(4):396-400.
- [8] Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferase: metabolism, expression, and disease [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000, 40:581-616.
- [9] Urawa N, Kobayashi Y, Araki J, Sugimoto R, Iwasa M, Kaito M, et al. Linkage disequilibrium of UGT1A1 *6 and UGT1A1 *28 in relation to UGT1A6 and UGT1A7 polymorphisms [J]. Oncol Rep, 2006, 16(4):801-806.
- [10] Giotti M, Marrone A, Potter C, Owens IS. Genetic polymorphism in the human UGT1A6 (planar phenol) UDP-glucuronosyl-transferase: pharmacological implications [J]. Pharmacogenetics, 1997, 7(6):485-495.
- [11] Nagar S, Zalatoris J, Blanchard R. Human UGT1A6 pharmacogenetics: identification of a novel SNP, characterization of allele frequencies and functional analysis of recombinant allozymes in hu-

man liver tissue and in cultured cells [J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(8):487-499.

[12] 郭栋,周红灏. UGT1A6 及 UGT1A1 基因多态性对体内胆红素水平及对乙酰氨基酚代谢的影响 [D]. 中南大学学位论文, 2006.

[13] 孙妍萍,谭兰,王雁,宋敬卉. 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A6 基因多态性对丙戊酸钠代谢的影响 [J]. 中华医学杂志, 2007, 87(29):2033-2035.

[14] Krishnaswamy S, Hao Q, Al-Rohaimi A, Hesse LM, von Moltke LL, Greenblatt DJ, et al. UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A6 pharmacogenetics: II. Functional impact of the three most common nonsynonymous UGT1A6 polymorphisms (S7A, T181A, and R184S) [J]. Pharmacol Exp Ther, 2005, 313(3): 1340-1346.

[15] Peters WH, Morsche RH, Roelofs HM. Combined polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases 1A1 and 1A6: implications for patients with Gilbert's syndrome [J]. J Hepatol, 2003, 38(1): 3-8.

[16] Krishnaswamy S, Hao Q, Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH. Evaluation of 5-hydroxytryptophol and other endogenous serotonin (5-hydroxytryptamine) analogs as substrates for UDP-glucuronosyltransferase 1A6 [J]. Drug Metab Dispos 2004, 32(8): 862-869.

[17] Chung JY, Cho JY, Yu KS, Kim JR, Lim KS, Sohn DR, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction of lorazepam and valproic acid in relation to UGT2B7 genetic polymorphism in healthy subjects [J]. Clin Pharmacol Ther, 2008, 83(4): 595-600.

[18] Klotz U. The role of pharmacogenetics in the metabolism of antiepileptic drugs: pharmacokinetic and therapeutic implications [J]. Clin Pharmacokinet, 2007, 46(4):271-279.

[19] Aksenova MG, Burd SG, Kachalin Elu, Avakian GN, Badalian OL, Savenkov AA, et al. An association between the FABP2 gene polymorphism and efficacy of valproates [J]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova, 2007, 107(1):42-45.

(本文编辑:黄 榕)

· 消息 ·

欢迎订阅《中国当代儿科杂志》

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)收录期刊,北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威检索机构美国 MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)和荷兰《医学文摘》(EM)收录期刊。同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并被《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》全文收录。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有英文论著、中文论著(临床研究、实验研究、儿童保健、疑难病研究)、临床经验、病例讨论、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊,每月15日出版,向国内外公开发行。中国标准刊号:ISSN 1008-8830, CN 43-1301/R。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价12元,全年144元。邮发代号:国内 42-188;国外 3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。向本刊投稿一律通过网上稿件远程处理系统,免收审稿费。审稿周期4~6周。欲浏览本刊或投稿,请登录本刊网站。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号《中国当代儿科杂志》编辑部 邮编:410008
电话:0731-84327402 传真:0731-84327922 Email:ddek7402@163.com
网址: [http:// www. cjcp. org](http://www.cjcp.org)