

自身免疫性疾病患者检测 PAI-1(4G/5G), ABCB1(3435T>C)在预防甲强龙治疗发生股骨头坏死风险的应用*

张莹,程晓东,胡玉皎,王昊,周铁成,郝晓柯

(空军军医大学西京医院全军临床检验中心,西安 710032)

摘要:目的 检测化学药物甲强龙的耐药位点 PAI-1(4G/5G) 和 ABCB1(3435T>C),为使用甲强龙治疗的患者提供精准的用药指导,避免股骨头坏死风险的发生。**方法** 收集 94 例血液样本,使用荧光探针原位杂交技术对甲强龙耐药位点 PAI-1(4G/5G) 和 ABCB1(3435T>C) 进行检测和分析,评估不同患者甲强龙药物使用的可行性。**结果** 94 例患者中,PAI-1(4G/5G)位点检测结果 5G5G(野生型)的患者 20 例(21.28%),检测结果 4G5G(杂合突变型)的患者 43 例(45.74%),检测结果 4G4G(纯合突变型)的患者 31 例(32.98%);ABCB1(3435T>C) 位点检测结果 TT(野生型)的患者 17 例(18.09%),检测结果 TC(杂合突变型)的患者 44 例(46.81%),检测结果 CC(纯合突变型)的患者 33 例(35.10%)。12.77% 的患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险为低风险,60.63% 的患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险为中等风险,26.60% 的患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险是高风险。使用卡方检验,激素甲强龙化学药物两个耐药位点间检测结果对于评估股骨头坏死的风险度没有差异。**结论** 在进行糖皮质激素甲强龙冲击治疗前给患者作甲强龙化学药物耐药基因检测,根据检测结果精准用药,可以使 26.59% 的患者避免股骨头坏死风险的出现,为患者提供安全的用药指导。

关键词:PAI-1(4G/5G);ABCB1(3435T>C);甲强龙;激素性股骨头坏死

中图分类号:R593.2;Q503 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2019)02-014-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.02.004

Detection of PAI-1(4G/5G) and ABCB1(3435T>C) in Patients with Autoimmune Diseases for the Prevention of the Risk of Femoral Head Necrosis in the Impact Therapy of Meprednisolone

ZHANG Ying, CHENG Xiao-dong, HU Yu-jiao, WANG Hao, ZHOU Tie-cheng, HAO Xiao-ke

(Center of Clinical Laboratory Medicine of People's Liberation Army,

Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: **Objective** To detect the genes of hormone methylprednisolone for the patients who used glucocorticoid therapy and provide them with accurate guidelines to avoid the occurrence of femoral head necrosis. **Methods** Collected 94 cases and detected the PAI-1(4G/5G) and ABCB1 (3435T>C) of glucocorticoid methylprednisolone using fluorescent dye solution in situ hybridization specificity probe position, analyzed the test results of genetic loci, and evaluated different patients use different dose of hormone methylprednisolone. **Results** The cases of 5G5G of PAI-1 (4G/5G) were 20 (21.28%), the cases of 4G5G of PAI-1 (4G/5G) were 43 (45.74%) and the cases of 4G4G of PAI-1 (4G/5G) were 31 (32.98%). The cases of TT of ABCB1 (3435 t>C) were 17 (18.09%), the cases of TC of ABCB1 (3435 t>C) were 44 (46.81%), the cases of CC of ABCB1 (3435 t>C) were 33 (35.10%). 12.77% of the patients with hormone methylprednisolone shock treatment caused the risk of femoral head necrosis was low risk, 60.63% of the patients with hormone methylprednisolone impact caused the risk of femoral head necrosis as medium risk treatment, and 26.60% of the patients with hormone treatment cause the risk was high risk of femoral head necrosis. **Conclusion** Before glucocorticoids impact methylprednisolone therapy for patients with methylprednisolone genetic testing, which can guide accurate drug use. Such, 26.59% of the patients would avoid the risk of femoral head necrosis, and this also provide safe medication guide for other patients.

Keywords: PAI-1(4G/5G);ABCB1(3435T>C);methylprednisolone;steroid necrosis of the femoral head

糖皮质激素可用于治疗多种自身免疫性疾病,但糖皮质激素冲击治疗或长期使用可能导致的股骨头坏死会给患者带来更大的痛苦,怎样合理有效的使用激素冲击治疗显得尤为重要。随着基因概念的提出和化学药物用药的深入研究,大量的研究

表明由于基因存在的多态性导致同一药物对不同人群及个体所产生的效果和反应不同,而导致部分患者出现严重的不良反应。甲强龙的耐药位点 PAI-1(4G/5G) 是纤溶酶原激活物抑制剂的效应分子,PAI-1(4G/5G)的突变与心脑血管疾病的发

* 作者简介:张莹(1981—),女,硕士研究生,主管技师,主要从事临床生化方面的工作,E-mail:xxfzzy@163.com。

通讯作者:程晓东,硕士研究生,主治医师,科室副主任,E-mail:xjyyjyk@fmmu.edu.cn。

生有关^[1-2],与深静脉血栓的形成有关^[3],也有文献报道,PAI-1(4G/5G)的突变可导致股骨头坏死的发生^[4-5]。甲强龙的耐药位点 ABCB1(3435T>C)是糖皮质激素的药物转运体,ABCB1(3435T>C)的突变会导致药物转运及代谢障碍^[6]。使用激素甲强龙治疗的患者,这两个耐药位点基因的突变将会给患者带来严重的后果,有必要在用药前给患者做相应的化学药物耐药位点检测。

本文使用数字荧光检测仪和荧光染色原位杂交技术,实现小片段测序和 SNP 分型,检测甲强龙耐药位点 PAI-1(4G/5G)和 ABCB1(3435T>C),根据不同患者的基因型特性进行合理用药,达到提高药效、降低毒性和减少不良反应发生的效果,为甲强龙药物使用的患者提供精准的用药指导。

1 材料与方法

1.1 研究对象 我院 2016 年 8 月~2018 年 1 月接受甲强龙耐药位点 PAI-1(4G/5G)和 ABCB1(3435T>C)检测的患者 94 例(其中天疱疮类疾病患者 39 例,皮炎类患者 30 例,系统性红斑狼疮患者 25 例),男性 37 例,女性 57 例,平均年龄 43.69 ± 11.49 岁。

1.2 试剂和仪器 试剂:10×NH₄Cl 预处理液,处理血液样本时用于裂解红细胞;耀金保(核酸纯化试剂),用于在进行 SNP 分析前保存标本;耀金分(测序反应通用试剂盒),用于数字荧光分子杂交、化学药物用药指导时的样本分析;软件设定液,用于制备标准曲线;阳性对照监测仪器是否在控。以上试剂均由北京华夏时代基因科技发展有限公司提供。仪器:TL998A 荧光检测仪(西安天隆科技有限公司提供)。

1.3 方法

1.3.1 血液样本:2~3 ml 静脉全血(不需空腹),使用一次性真空采血管(EDTA 抗凝紫帽管)采集,于 4℃低温保存,保存时间不宜超过 24 h。

1.3.2 标本前处理:在 1.5 ml 离心管中加入 1.0 ml 1×NH₄Cl 预处理液,吸取 200 μl 混匀的全血,室温静置 5 min,待红细胞完全破裂,液体颜色变为澄清的红色后 3 000 r/min 离心 5 min。将上层透明红色液体吸取干净,向管底富集的白细胞团块中加入 30 μl 耀金保使白细胞的胞膜破裂。充分混匀,为了更好的使细胞核内的核酸游离出来,室温静置 30~60 min,等待检测。

1.3.3 检测过程:样本检测:吸取 1.5 μl 处理后的白细胞样本加到相应的试剂中上机检测。阳性对照:吸取 1.5 μl 的阳性质控品分别加到对应的软件设定液中。阴性对照:吸取 1.5 μl 耀金保保存液,加到试剂中。

1.3.4 质控结果分析:阴性对照用以监测实验室和前处理过程中是否存在污染,检出结果应为“重测”;阳性对照用以监测实验能否正常检出阳性标本,检出结果应为阳性质控品的基因型。

1.4 统计学分析 收集、记录相关数据,录入 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行分析和相关处理,定性资料以百分率(%)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲强龙化学药物基因位点检测结果 PAI-1(4G/5G)位点检测结果为 5G5G 的患者 20 人,占总人数的 21.28%;检测结果为 4G5G 的患者 43 人,占总人数的 45.74%;检测结果为 4G4G 的患者 31 人,占总人数的 32.98%。ABCB1(3435T>C)位点检测结果为 TT 的患者 17 人,占总人数的 18.09%;检测结果为 TC 的患者 44 人,占总人数的 46.81%;检测结果为 CC 的患者 33 人,占总人数的 35.10%。激素甲强龙化学药物两个耐药位点间检测结果对于评估股骨头坏死的风险度差异无统计学意义($\chi^2 = 6.855, P = 0.142$)。

2.2 激素甲强龙化学药物各个基因位点检测结果风险度分布情况 对于 PAI-1(4G/5G)基因,激素甲强龙冲击治疗引起股骨头坏死高风险的基因型是 4G5G/4G4G,占 78.72%(74/94),5G5G 基因型为低风险基因占 21.28%(20/94);对于 ABCB1(3435T>C)基因,CC 基因型为高风险基因,占 35.10%(33/94),TT/TC 基因型为低风险基因,占 64.90%(61/94)。

PAI-1(4G/5G)和 ABCB1(3435T>C)基因均为高风险基因型时,患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险为高风险;PAI-1(4G/5G)和 ABCB1(3435T>C)基因有一个为高风险基因型时,患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险为中等风险;PAI-1(4G/5G)和 ABCB1(3435T>C)基因均为低风险基因型时,患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险为低风险。

故激素甲强龙的用药情况,12.77%(12/94)的患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险为低风险;60.63%(57/94)的患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险为中等风险,在进行治疗时需要关注骨骼反应;但是还有 26.60%(25/94)的患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险是高风险,需高度关注骨骼反应,同时配伍用双膦酸盐,降低激素剂量并换用其他药物,也可使用阿司匹林等药物进行治疗降低风险。

3 讨论 糖皮质激素冲击治疗可用于治疗系统性红斑狼疮、全身性皮肌炎(多发性肌炎)、天疱疮、严重的多形红(Stevens-Johnson 综合征)、剥脱性皮炎、大疱性皮炎、严重的脂溢性皮炎、严重的银屑病、蕈样真菌病、荨麻疹等皮肤病。但是激素冲击治疗或长期使用可能导致的股骨头坏死会给患者带来更大的痛苦,合理有效的使用激素治疗显得尤为重要。随着精准医疗概念的提出,化学药物用药的深入研究,发现基因多态性的存在,导致同一药物对不同人群及个体所产生的效果和反应不同,导致部分患者出现严重的不良反应。

甲强龙的耐药基因 PAI-1(4G/5G) 是纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor, PAI-1)的效应分子,PAI-1 是血浆纤溶系统中主要的一种抑制物,可以控制和降低纤溶系统的活性,通过 PAI-1 的调节作用,维持纤溶系统的动态平衡,才能保持血浆纤溶活性。因此,血液循环中 PAI-1 水平异常,就容易诱发血栓形成^[7-8]。股骨头本身血液供应有限,如并发血栓风险则会大大提升坏死风险。PAI-1(4G/5G) 基因突变,血浆纤溶活性降低,血栓形成,股骨头血液供应减少,股骨头坏死风险提高^[9-10]。

甲强龙的另一个耐药基因 ABCB1(3435T>C) 是多耐药基因 1 的 3435 位点,是糖皮质激素药物转运体。ABCB1 位于第 7 号染色体长臂上,含 29 个外显子,位于 26 号外显子 C3435T 位置的许多个单核苷酸多态性 SNP 位点最被广泛研究。内源性及外源性的糖皮质激素均是 P-gp 的转运底物,CROWE 等^[11]研究显示,在 Caco-2 细胞株中,激素向细胞内的渗透受 P-gp 的限制,ABCB1 基因的敲除或表达降低,均使组织或细胞内激素的浓度降低。GONG 等^[12-13]对 ABCB1(3435T>C) 基因多态性与糖皮质激素性股骨头坏死的研究进行了分析,结果显示 C 等位基因增加了糖皮质激素诱导股骨头坏死的相关性,我国学者也做了类似的研究。

本文研究结果显示,根据激素甲强龙 PAI-1(4G/5G) 和 ABCB1(3435T>C) 2 个耐药位点对患者进行糖皮质激素冲击治疗时风险的评估是一致的。根据 2 个耐药位点对风险程度的评估,12.77% 的患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险为低风险,60.63% 的患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险为中度风险,在进行治疗时需要关注骨骼反应,一旦有不良反应征象,即配伍用双膦酸盐,而 26.60% 的患者进行激素甲强龙冲击治疗时引起股骨头坏死的风险为高风险,这些患者进行激素甲强龙冲击治

疗时需高度关注骨骼反应,同时配伍用双膦酸盐,降低激素剂量并换用其他药物,也可使用阿司匹林等药物进行治疗降低风险。实验数据显示在进行激素甲强龙冲击治疗前给患者作甲强龙化学药物基因检测,根据检测结果合理精准用药,可以使 26.60% 的患者避免股骨头坏死风险的出现,为患者提供安全的用药指导。

参考文献:

- [1] LIANG Zhongshu,JIANG Weihong,OUYANG Mao, et al. PAI-1 4G/5G polymorphism and coronary artery disease risk:a meta-analysis[J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2015, 8 (2):2097-2107.
- [2] 茅新蕾,韩丽雅,黄向东,等. 纤溶酶原激活物抑制物-1 基因 4G/5G 位点多态性与脑梗死的相关性研究[J]. 现代实用医学,2016,28(8):988-989,1008. MAO Xinlei, HAN Liya, HUANG Xiangdong, et al. The relationship of plasminogen activator inhibitor-1 gene 4G/5G polymorphism and cerebral infarction [J]. Modern Practical Medicine, 2016, 28 (8): 988-989,1008.
- [3] GIURGEA G A,BRUNNERZIEGLER S,JILMA B, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G genotype and residual venous occlusion following acute unprovoked deep vein thrombosis of the lower limb: A prospective cohort study[J]. Thrombosis Research, 2017,153:71-75.
- [4] KIM Hyeok,CHO Changhoon,CHO Yoonje, et al. Significant associations of PAI-1 genetic polymorphisms with osteonecrosis of the femoral head[J]. BMC Musculoskeletal Disorders,2011,12:160-167.
- [5] ZENG Zheng,WANG Bing,DAN Haitao, et al. Relation between osteonecrosis of the femoral head and PAI-1 4G/5G gene polymorphism: a meta-analysis [J]. International Journal of Clinical and Experimental Medicine,2015,8(11):20337-20342.
- [6] NAITO T,MINO Y,AOKI Y, et al. ABCB1 genetic variant and its associated tacrolimus pharmacokinetics affect renal function in patients with rheumatoid arthritis[J]. Clin Chim Acta,2015,455:79-84.
- [7] KATHIRESAN S,GABRIEL S B,YANG Q, et al. Comprehensive survey of common genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus and relations to circulating plasminogen activator inhibitor-1 levels[J]. Circulation,2005,112(12):1728-1735.
- [8] VAUGHAN D E. PAI-1 and atherothrombosis[J]. Journal Thromb Haemost,2005,3(8):1879-1883.
- [9] BJORKMAN A,SVENSSON P J,HILLARP A, et al. Factor V leiden and prothrombin gene mutation: risk factors for osteonecrosis of the femoral head in adults[J]. Clin Orthop Relat Res, (下转 19 页)

(上接 16 页)

- 2004,425:168-172.
- [10] ASANO T, TAKAHASHI K A, FUJIOKA M, et al. Relationship between postrenal transplant osteonecrosis of the femoral head and gene polymorphisms related to the coagulation and fibrinolytic systems in Japanese subjects[J]. Transplantation, 2004,77(2):220-225.
- [11] CROWE A, TAN A M. Oral and inhaled corticosteroids: differences in P-glycoprotein(ABCB1) mediated efflux[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 260(3):294-302.
- [12] GONG Lili, FANG Lianhua, WANG Heyao, et al.

Genetic risk factors for glucocorticoid-induced osteonecrosis: a meta-analysis[J]. Steroids, 2013, 78(4):401-408.

- [13] 杨晶, 张爱玲, 鲁憬莉, 等. ABCB1 基因多态性与糖皮质激素性股骨头坏死相关性的 Meta 分析[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(9):732-737.
- YANG Jing, ZHANG Ailing, LU Jingli, et al. Correlation between ABCB1C3435T and G2677T/A polymorphism and steroid induced osteone cross of femoral head: A Meta analysis[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2016, 36(9):732-737.

收稿日期:2019-01-06

修回日期:2019-02-14