

CYP2C19 基因多态性对侵袭性真菌感染患者 伏立康唑游离型药物浓度的影响

熊芳¹, 郭虎², 陈茂林³, 赵爽^{1*}

(1. 三峡中心医院重症医学科, 万州 404100; 2. 三峡中心医院药学部, 万州 404100;

3. 陆军军医大学第二附属医院, 重庆 400000)

摘要 目的: 考察 CYP2C19 基因多态性对侵袭性真菌感染患者伏立康唑游离型药物浓度的影响。方法: 收集三峡中心医院使用伏立康唑进行治疗的患者的血液标本, 进行 CYP2C19 基因型检测和伏立康唑游离型药物浓度测定, 分析 CYP2C19 基因 3 种亚型对伏立康唑游离型药物浓度的影响。结果: 78 例患者的伏立康唑平均游离型药物浓度为 $(2.33 \pm 1.09) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 3 组 CYP2C19 基因亚型患者伏立康唑游离型药物浓度有显著差异 ($P < 0.01$), 组间多重比较显示, 3 组 CYP2C19 基因亚型患者伏立康唑游离型浓度为 EM 型 $<$ IM 型 $<$ PM 型。结论: CYP2C19 基因型多态性对伏立康唑游离型药物浓度有显著影响。
关键词: 伏立康唑; CYP2C19 基因型; 侵袭性真菌感染; 游离型药物浓度

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2019) 02-0291-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.02.15

Influence of CYP2C19 gene polymorphism on unbound plasma concentrations of voriconazole in patients with invasive fungal infections

XIONG Fang¹, GUO Hu², CHEN Mao-lin³, ZHAO Shuang^{1*}

(1. ICU of Sanxia Central Hospital, Wanzhou 404100, China; 2. Pharmacy Department of Sanxia Central Hospital, Wanzhou 404100, China;

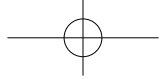
3. The Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400000, China)

Abstract **Objective:** To analyze the influence of CYP2C19 gene polymorphism on unbound plasma concentration of voriconazole in patients with invasive fungal infections (IFIs). **Methods:** Blood samples were collected from patients with IFIs, who treated with voriconazole in our hospital, and detected the CYP2C19 gene polymorphism and unbound plasma concentrations (C_u) of voriconazole. **Results:** 78 patients were enrolled, the average voriconazole C_u was $(2.33 \pm 1.09) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Significant difference was found among the three CYP2C19 subtypes ($P < 0.01$), Multivariate analysis revealed that, EM $<$ IM $<$ PM in C_u of voriconazole ($P < 0.01$). **Conclusion:** CYP2C19 gene polymorphism influence C_u of voriconazole significantly.

Keywords: voriconazole; CYP2C19 gene polymorphism; invasive fungal infections; unbound plasma concentration

* 通信作者 Tel: (023) 68755311; E-mail: zs0327@126.com

第一作者 Tel: 15178730124; E-mail: like-758@163.com



伏立康唑是第一个发现的第二代三唑类广谱抗真菌药,临床广泛用于治疗曲霉菌、念珠菌、隐球菌等真菌所致的侵袭性感染^[1]。体外实验表明,伏立康唑是 CYP2C19、CYP2C9 和 CYP3A4 的底物^[2],总血药浓度受 CYP2C19 基因多态性的影响显著^[3]。大量研究显示,在相同给药剂量下,不同 CYP2C19 基因型的患者总血药浓度有显著差异;但是,相同的伏立康唑总血药浓度下,临床疗效也存在差异^[4],导致这种情况发生的原因尚不明确。

药物进入体内分布后,以游离型和结合型 2 种形式存在,其中只有游离型的药物发挥药理作用。常规血药浓度监测方法测得的为药物总血药浓度^[5-6],并不能准确反映发挥药理作用部分的游离型药物浓度(unbound concentration, C_u)。伏立康唑是重症患者和血液系统疾病移植患者侵袭性真菌感染的一线治疗药物,由于重症患者特殊的病理生理状态,影响伏立康唑血浆蛋白结合率的因素众多,导致在相同的总血药浓度下,游离型药物浓度不同,产生的药理作用也不相同,这可能是相同血药浓度产生不同临床疗效的原因。本研究通过检测三峡中心医院使用伏立康唑进行治疗的患者的 CYP2C19 基因型和伏立康唑游离型药物浓度,分析 CYP2C19 基因多态性与伏立康唑游离型药物浓度的相关性。

1 资料与方法

1.1 纳入与排除标准 纳入标准:(1)三峡中心医院住院患者;(2)年龄 18~90 周岁;(3)分别参照《中国重症患者侵袭性真菌感染诊断与治疗指南(2007)》^[7]或《血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗指南(第四次修订版)》^[8]诊断标准,确诊或拟诊为侵袭性真菌感染者;(4)采用伏立康唑负荷剂量(首个 24 h, $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,静脉滴注,每 12 h 给药 1 次),之后采用维持剂量($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,静脉滴注,每 12 h 给药 1 次)治疗超过 48 h,以保证药物浓度达到稳态。

排除标准:(1)中、重度肾功能损害患者(肌酐清除率 $\leq 50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$);(2)重度肝功能异常患者,丙氨酸转氨酶或天冬氨酸转氨酶超过正常值的 3 倍,或 Child-Pugh 评分 ≥ 10 分);(3)参加其他临床试验;(4)拒绝知情同意;(5)经医师综合评定不宜纳入研究者。

1.2 研究对象 本研究方案经医院医学伦理委员会审核并通过,选取 2016 年 3 月-2017 年 6 月三峡中心医院使用伏立康唑治疗的住院患者。

1.3 治疗方法 所有患者均静脉输注注射用伏立康

唑(0.1 g , 丽珠集团丽珠制药厂),标准剂量给药,即首日给予负荷剂量 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每 12 h 给药 1 次,24 h 后给予维持剂量 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每 12 h 治疗 1 次,以使血药浓度尽快达到稳态。

1.4 伏立康唑游离型药物浓度测定 首次给药 48 h 后,所有患者于下次给药前 0.5~1 h,抽取静脉血 0.5 mL,使用 Millipore Centrifree 超滤装置(美国 Millipore 公司)超滤离心提取游离型伏立康唑,使用岛津 LC-20A 型高效液相色谱仪(配有 LC-20A 型溶剂泵、二极管阵列检测器,日本岛津公司),Diamondsil C₁₈ 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, 广州迪马公司),以乙腈-水(35:65)为流动相, $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速进样超滤提取液,记录 265 nm 处高效液相色谱图,以外标法测定伏立康唑的游离型药物浓度,具体方法详见已研究结果^[9]。

1.5 CYP2C19 基因型分析 取任意血常规检测后剩余血样 500 μL ,提取基因组 DNA,使用 CYP2C19 基因检测试剂盒(上海百傲生物, DNA 微阵列芯片法),用 CYP2C19 基因特异引物对 1 和引物对 2 进行聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)扩增。PCR 反应体系:取 CYP2C19 基因检测试剂盒中 CYP2C19 扩增液 1(内含 CYP2C19 基因特异引物对 1,氯化钾, Tris-HCL 缓冲液,氯化镁等,上海百傲生物)和 CYP2C19 扩增液 2(内含 CYP2C19 基因特异引物对 2,氯化钾, Tris-HCL 缓冲液,氯化镁等,上海百傲生物)各 19 μL ,置 0.2 mL PCR 离心管中,加入反应液 A(含 Taq 酶, UNG 酶,上海百傲生物)1 μL ,DNA 提取溶液 5 μL 。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 25 s, 48 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 5 min。使用 BaiOe-Hyb 全自动杂交仪(上海百傲生物),将带标记的产物与固定在醛基片上的 CYP2C19 基因型检测探针进行特异杂交反应,并通过酶促显色,使特异杂交信号显色;使用 BaiO 基因芯片图像分析仪对芯片进行扫描,得到样本 DNA 扩增产物与每个基因位点的野生型和突变型探针杂交形成杂交图像,通过(BaiO Array Doctor) V 2.0 软件分析该图像,检测待测样本的基因型。检测输出的 6 种基因型结果中, CYP2C19 *2/*2、CYP2C19 *2/*3、CYP2C19 *3/*3 为慢代谢型(poor metabolizer, PM); CYP2C19 *1/*2、CYP2C19 *1/*3 为中等代谢型(inter metabolizer, IM); CYP2C19 *1/*1 为快代谢型(extensive metabolizer, EM)^[10]。

1.6 数据处理方法 自制病例报告表记录患者基本信

息,包括姓名、性别、年龄、ID、床号、诊断,伏立康唑给药剂型、首次给药日期,血药浓度测定取样日期和时间点,肝肾功能等相关指标和游离型药物浓度测定结果。

在排除性别、年龄、体重影响的情况下,考察CYP2C19基因多态性对伏立康唑游离型药物浓度的影响。采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3种CYP2C19基因亚型组间比较采用单因素方差分析;采用LSD法进行组间多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者一般资料和游离型浓度 本研究共纳入患者78例,男女比例约1.5:1,年龄 $[53.86 \pm 18.5 (18 \sim 87)]$ 岁,伏立康唑游离型药物浓度为 $2.330 \pm 1.088 (0.343 \sim 5.060) \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。78例患者经基因型分析,结果显示33例(42.3%)为快代谢型(EM型),28例(35.9%)为中等代谢型(IM型),17例(21.8%)为慢

代谢型(PM型),78例使用伏立康唑进行治疗患者一般资料见表1,1例快代谢型患者基因检测结果见表2,伏立康唑游离型药物浓度测定色谱图见图1。患者均为重症患者,合并多种疾病诊断,均有侵袭性真菌感染的临床适应症。

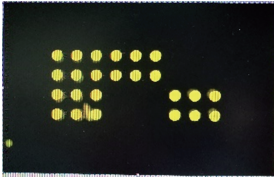
表1 78例使用伏立康唑进行治疗患者一般资料

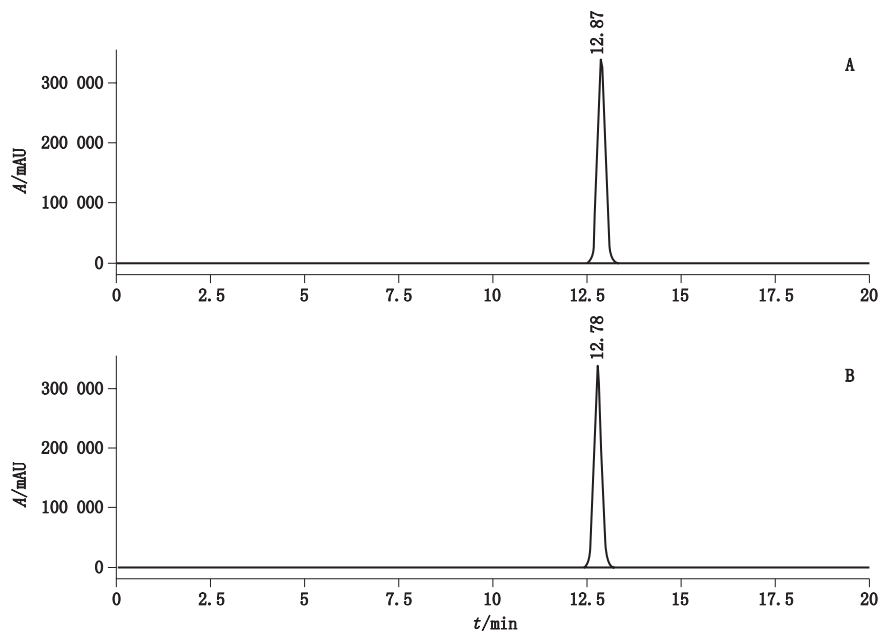
Tab. 1 General conditions of 78 patients treated with voriconazole

人群资料 (demographic characteristic)	$\bar{x} \pm s$
例数 (sample)	78
性别 (男/女) [(sex ratio) (M/F)]	47/31
年龄 / 岁 (age/years)	$53.86 \pm 18.50 (44 \sim 79)$
体质量 (body mass) / kg	$60.92 \pm 10.58 (18 \sim 87)$
代谢型 (metabolic type) / (EM/IM/PM)	33/28/17
伏立康唑游离型药物浓度 (unbound plasma concentrations of voriconazole) / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2.330 ± 1.088 (0.343~5.060)

表2 1例快代谢型(EM)患者基因检测结果

Tab. 2 Result of CYP2C19 genotype for a extensive metabolizer (EM) sample

芯片图 (microarray)	CYP2C19 基因型 (CYP2C19 genotype)	代谢型 (metabolic type)	结果 (result)
	*1/*1 (636 GG, 681 GG)	快 (extensive)	+
	*1/*2 (636 GG, 681 GA)	中 (inter)	-
	*1/*3 (636 GA, 681 GG)	中 (inter)	-
	*2/*2 (636 GG, 681 AA)	慢 (poor)	-
	*2/*3 (636 AA, 681 GG)	慢 (poor)	-
	*3/*3 (636 GA, 681 GA)	慢 (poor)	-

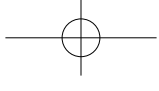


1. 伏立康唑 (voriconazole)

A. 对照品 (reference substance) B. 血浆样本 (plasma sample)

图1 伏立康唑游离型药物浓度测定色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms in the determination of unbound concentration of voriconazole



2.2 试验结果统计分析 CYP2C19 3 种基因亚型患者年龄、体重和伏立康唑游离型药物浓度均满足方差齐性,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果见表 3。首先,采用独立样本 t 检验,发现性别对伏立康唑游离型药物浓度无显著影响 ($P>0.05$);其次,采用单因素方差分析,比较 CYP2C19 3 种基因亚型患者年龄、体重和伏立康唑游离型药物浓度差异,结果显示,3 种

CYP2C19 3 种基因亚型患者年龄和体重无显著差异 ($P>0.05$),伏立康唑游离型药物浓度有显著差异 ($P<0.01$)。采用 LSD (least significant difference, 最低显著性差异) 法对 3 种 CYP2C19 基因亚型的伏立康唑游离型药物浓度进行多重比较,发现 3 种 CYP2C19 基因亚型间游离型药物浓度均有差异,表现为 PM 型 > IM 型 > EM 型, P 均小于 0.05, 3 种基因亚型结果见表 4。

表 3 按基因亚型分组后患者一般情况和游离型伏立康唑浓度 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 General conditions and C_u of groups by CYP2C19 subtypes

基因型分组 (genotype group)	性别 (男/女) [(sex ratio) (M/F)]	年龄 / 岁 (age/years)	体质量 (body mass) / kg	游离型药物浓度 (unbound plasma concentrations) / (mg · mL ⁻¹)
EM	21/12	53.8 ± 18.8 (18~80)	62.12 ± 11.28 (45~79)	1.674 ± 0.810 (0.343~3.622)
IM	16/12	53.9 ± 19.6 (19~87)	60.14 ± 9.38 (44~78)	2.555 ± 0.881 (0.685~5.060)
PM	10/7	53.9 ± 16.9 (19~77)	59.88 ± 11.42 (44~78)	3.233 ± 1.113 (0.468~4.738)

表 4 3 种 CYP2C19 基因亚型的伏立康唑
游离型浓度差异的多重比较

Tab. 4 Multiple comparisons of C_u between the
three CYP2C19 subtypes

比较 (comparison)	浓度均数差值 (difference of the average concentration)	P	组间 F 值 (F -value among groups)
EM & IM	0.880	<0.01	17.887
EM & PM	1.558	<0.01	
IM & PM	0.677	0.018	

注 (note): $P<0.05$, 差异有统计学意义 (When $P<0.05$, it is statistically different)

3 讨论

伏立康唑的体内代谢具有非线性动力学的特征,增加相同的给药剂量,在不同患者体内呈现不同程度的药物-时间曲线下面积变化,临床表现为血药浓度的个体差异较大。已有研究表明,患者的年龄、性别、身体质量指数、N-代谢产物、CYP2C19 等因素的个体差异都会影响伏立康唑的总血药浓度^[4, 11-12];同时,由于伏立康唑用于治疗侵袭性真菌感染,感染者大多基础疾病多,病理生理状态特殊^[7],同服药物、血浆白蛋白浓度、胆红素浓度和一些游离脂肪酸的变化都会影响伏立康唑的体内分布特征^[13],从而可能造成最终发挥药理作用的游离型药物浓度占总血药浓度的比例发生变化。所以,研究伏立康唑的游离型药物浓度,相对于总血药浓度具有更直接的临床意义。

本研究通过收集使用伏立康唑进行侵袭性真菌感染治疗患者的血浆样本,分析 CYP2C19 基因型,测定伏立康唑游离型药物浓度并记录患者年龄、性别、体重等基本资料,通过公斤/体质量方式调整给药剂量,以排除患者体质量对游离型药物浓度的影响。所纳入的 78 例患者中,快代谢型 33 例 (42.3%)、中等代谢型 28 例 (35.9%)、慢代谢型 17 例 (21.8%)。采用独立样本 t 检验显示,患者性别对伏立康唑的游离型药物浓度无显著影响,单因素方差分析显示 3 组 CYP2C19 基因型患者年龄、体重无差异 ($P>0.05$),伏立康唑游离型浓度有显著差异 ($P<0.05$)。采用 LSD 法对 3 组基因型进行两两比较,结果显示 3 组基因型之间伏立康唑游离型浓度均呈显著差异,表现为 PM 型患者伏立康唑游离型浓度高于 IM 型和 EM 型,IM 型患者伏立康唑游离型浓度高于 EM 型,该研究结论与已有的针对患者伏立康唑总血药浓度的研究结果一致^[14],表明在侵袭性真菌感染患者复杂的病理生理状态下,即使白蛋白水平、胆红素浓度波动等可能影响伏立康唑蛋白结合率,肾脏功能状态、补液、引流等可能影响伏立康唑排泄率和表观分布容积的情况下, CYP2C19 基因多态性仍会显著影响患者体内伏立康唑的有效血药浓度,即游离型药物浓度。所以,临床上对于使用伏立康唑治疗的患者进行 CYP2C19 基因检测,参照 CYP2C19 基因型调整伏立康唑的给药剂量,具有重要意义。

该研究也存在一些不足之处。由于患者大多数处于昏迷状态,导致肝功能损害的因素众多,所以无

法观察其视觉障碍、肝酶谱升高等不良反应;也由于经验性治疗、抢先治疗在侵袭性真菌感染治疗中非常常见,且导致患者死亡的原因也是方方面面的,故而无法对其疗效进行评价。即使一些文献进行了疗效评价^[15-16],其结论也可能存在争议。所以,在临床实践中,由于疗效、不良反应的监测比较困难,为保证患者用药的安全、有效,测定伏立康唑的游离型药物浓度,可排除体内过程中的干扰,得到了真正发挥药理作用的药物浓度,有利于实现治疗药物浓度监测的精准化。对于影响伏立康唑游离型药物浓度的其他因素,也需要更多的临床研究来证明。

参考文献

- [1] DONNELLY JP, PAUW BE. Voriconazole—a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity[J]. Clin Microbiol Inf, 2004, 10(Suppl 1): 107
- [2] HYLAND R, JONES BC, SMITH DA. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole[J]. Drug Metab Dispos, 2003, 31(5): 540
- [3] WEISS J, TEN HM, BURHENNE J, et al. CYP2C19 genotype is a major factor contributing to the highly variable pharmacokinetics of voriconazole[J]. J Clin Pharmacol, 2009, 49(2): 196
- [4] ELEWA H, EL-MEKATY E, EL-BARDISSY A, et al. Therapeutic drug monitoring of voriconazole in the management of invasive fungal infections: a critical review[J]. Clin Pharmacokinet, 2015, 54(12): 1223
- [5] 任秋霞, 吴荣荣, 朱红, 等. UPLC 法测定肝硬化患者伏立康唑血药浓度[J]. 解放军药学报, 2015, 31(3): 240
REN QX, WU RR, ZHU H, et al. UPLC determination of voriconazole plasma concentration in liver cirrhosis patients[J]. Pharm J Chin PLA, 2015, 31(3): 240
- [6] SAINI L, SEKI JT, KUMAR D, et al. Serum voriconazole level variability in patients with hematological malignancies receiving voriconazole therapy[J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2014, 25(5): 271
- [7] 中华医学会重症医学分会. 重症患者侵袭性真菌感染诊断与治疗指南(2007)[J]. 中华内科杂志, 2007, 46(11): 960
Chinese Society of Critical Care Medicine. Guidelines for diagnosis and treatment of invasive fungal infections in critically ill patients (2007)[J]. Chin J Intern Med, 2007, 46(11): 960
- [8] 中国侵袭性真菌感染工作组. 血液病恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗指南(第四次修订版)[J]. 中华内科杂志, 2013, 52(8): 704
Chinese Working Group of Invasive Fungal Infections. Diagnostic criteria and treatment guidelines for invasive mycosis in patients with hematological malignancies (The fourth revised edition)[J]. Chin J Intern Med, 2013, 52(8): 704
- [9] 陈茂林, 周世文. 超滤法结合 HPLC 法测定人血浆中伏立康唑蛋白结合率[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 36(8): 724
CHEN ML, ZHOU SW. Determination of human plasma protein binding of voriconazole by ultrafiltration and HPLC[J]. Chin J Hosp Pharm, 2017, 36(8): 724
- [10] 王璵珏, 唐惠林, 段京莉. CYP2C19 基因多态性对伏立康唑药代动力学影响的系统评价[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(8): 607
WANG PJ, TANG HL, DUAN JL. Systematic review of influence on pharmacokinetics of voriconazole on CYP2C19 gene polymorphisms[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2011, 27(8): 607
- [11] YAMADA T, MINO Y, YAGI T, et al. Saturated metabolism of voriconazole N-oxidation resulting in nonlinearity of pharmacokinetics of voriconazole at clinical doses[J]. Biol Pharm Bull, 2015, 38(10): 1496
- [12] DOLTON MJ, RAY JE, CHEN SC, et al. Multicenter study of voriconazole pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(9): 4793
- [13] VANSTRAELEN K, WAUTERS J, VERCAMMEN I, et al. Impact of hypoalbuminemia on voriconazole pharmacokinetics in critically ill adult patients[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(11): 6782
- [14] 梁峰华, 孟冬梅, 谢慧, 等. CYP2C19 基因多态性对侵袭性真菌感染重症患者伏立康唑血药浓度的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 28(16): 613
LIANG FH, MENG DM, XIE H, et al. Effects of CYP2C19 gene polymorphism on plasma concentration of voriconazole in critically ill patients with invasive fungal infections[J]. Chin J Hosp Pharm, 2015, 28(16): 613
- [15] 林群. 伏立康唑治疗 ICU 耐氟康唑肺部念珠菌感染疗效观察[J]. 中国实用医药, 2014, 9(11): 141
LIN Q. Observe the effect of voriconazole on fluconazole-resistant pulmonary candidiasis in ICU[J]. China Prac Med, 2014, 9(11): 141
- [16] ROBERTS JA, LIPMAN J. Antibacterial dosing in intensive care: pharmacokinetics, degree of disease and pharmacodynamics of sepsis[J]. Clin Pharmacokinet, 2006, 45(8): 755

(本文于 2018 年 1 月 25 日收到)