

抗癫痫药物皮肤不良反应与 *HLA-B*1502* 基因关联性研究

高玫梅 石奕武 于美娟 李雪莲 王鹏 刘晓蓉 黎冰梅 邓宇虹 常好会 廖卫平

【摘要】 目的 研究抗癫痫药物引致的皮肤不良反应和人白细胞抗原 *HLA-B*1502* 基因的关联性,探讨抗癫痫药物的个体化治疗。方法 广州医学院第二附属医院癫痫门诊自 2007 年 1 月至 2008 年 5 月共收治癫痫患者 31 例,其中应用卡马西平 (CBZ) 引致皮肤不良反应 13 例 [Stevens-Johnson 综合征(SJS)6 例、轻度斑丘疹(MPE)7 例],无皮肤不良反应 15 例,应用拉莫三嗪 (LTG)引致 MPE 3 例。采用顺序特异性引物聚合酶链反应(PCR-SSP)检测以上患者和未服用过 CBZ 或 LTG 的 30 例正常对照者的 *HLA-B*1502* 基因分型。结果 *HLA-B*1502* 基因型阳性例数和基因频率分别为:CBZ 引致 SJS 组 6 例 (6/6,100%),CBZ 引致 MPE 组 4 例 (4/7,57%),LTG 引致 MPE 组 1 例(1/3,33%),无皮肤不良反应组 1 例(1/15,7%),正常对照组 3 例(3/30,10%)。CBZ 引致 SJS 组、CBZ 引致 MPE 组患者 *HLA-B*1502* 基因型阳性率均高于正常对照组和无皮肤不良反应组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论 CBZ 导致的皮肤不良反应与 *HLA-B*1502* 基因型有关。

【关键词】 人白细胞抗原 *HLA-B*1502* 基因; 抗癫痫药物; 皮肤不良反应

【中图分类号】 R742.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)05-0493-03

Association between cutaneous adverse reactions to antiepileptic drugs and *HLA-B*1502* allele

GAO Mei-mei, SHI Yi-wu, YU Mei-juan, LI Xue-lian, WANG Peng, LIU Xiao-rong, LI Bing-mei, DENG Yu-hong, CHANG Hao-hui, LIAO Wei-ping. Institute of Neuroscience, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the association between cutaneous adverse drug reactions (CADRs) caused by antiepileptic drugs and *HLA-B*1502* allele. **Methods** In 31 epileptic patients presented to the Epilepsy Clinic of the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College between January 2007 and May 2008, 13 had CADR to carbamazepine (CBZ) including 6 with Stevens-Johnson syndrome (SJS) and 7 with mild maculopapular exanthema (MPE); 15 were CBZ-tolerant, and 3 had lamotrigine (LTG)-induced MPE. All the patients underwent examinations using polymerase chain reaction with sequence specific primers to analyze *HLA-B*1502* allele frequencies, with 30 healthy subjects without a history of using CBZ or LTG as the control. **Results** *HLA-B*1502* allele frequency was 100% (6/6) in patients with CBZ-SJS, 57% (4/7) in patients with CBZ-induced MPE, and 33% (1/3) in patients with LTG-induced MPE. The frequency was 7% (1/15) in CBZ-tolerant patients and 10% (3/30) in the control subjects. Compared with the CBZ-tolerant patients and the control subjects, the patients with CBZ-induced SJS and MPE had significantly increased *HLA-B*1502* allele frequency ($P<0.05$). **Conclusions** *HLA-B*1502* allele is associated with CADRs to CBZ in epileptic patients.

【Key words】 *HLA-B*1502*; Antiepileptic drugs; Cutaneous adverse drug reactions

抗癫痫药物如卡马西平(carbamazepine, CBZ)、

拉莫三嗪 (lamotrigine, LTG)、苯巴比妥 (phenobarbital, PB)及苯妥英钠(phenytoin, PHT)均可引起皮肤不良反应^[1],包括轻度斑丘疹(mild maculopapular exanthema, MPE)以及严重危及生命的皮肤反应,如 Stevens-Johnson 综合征(SJS)、中毒性表皮坏死松解症(toxic epidermal necrolysis, TEN)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.05.015

基金项目:广东省自然科学基金(5300988);广州医学院第二附属医院基金(2007-5)

作者单位:510260 广州,广州医学院第二附属医院神经科学研究所基础部

及药物超敏综合征 (drug hypersensitivity syndrome, HSS)。SJS 和 TEN 是严重的皮肤和黏膜反应,可导致永久性残疾甚至致命。TEN 致死率高达 40%。研究显示中国台湾和香港地区癫痫患者应用 CBZ 引致的 SJS、TEN 和人类白细胞抗原基因 *HLA-B*1502* 有强相关性,*HLA-B*1502* 基因与 LTG 和 PHT 的相关性尚不确定^[2,3]。该等位基因在中国、东南亚和南亚的印度血统的人群中比率较高。在中国汉族人群中,8%~15%或更多的人可能是 *HLA-B*1502* 阳性基因型。因此,研究中国人群中抗癫痫药物引致的皮肤不良反应是否和 *HLA-B*1502* 基因有关,对指导临床用药有很大意义。大陆地区抗癫痫药物引致皮肤不良反应与 *HLA-B*1502* 基因的关系研究目前尚少见报道。为此,本研究应用了一套特异、高精度的检测方法检测 *HLA-B*1502* 基因的特殊序列,并初步探讨抗癫痫药物引致皮肤不良反应与 *HLA-B*1502* 基因型的关联性,现报道如下。

资料和方法

一、临床资料

广州医学院第二附属医院癫痫门诊自 2007 年 1 月到 2008 年 5 月共收治父母籍贯均为广东或湖南省汉族人的癫痫患者 31 例。其中 CBZ 引致皮肤不良反应患者 13 例,包括 SJS 6 例、MPE 7 例;LTG 引致皮肤不良反应患者 3 例,均为 MPE。皮肤不良反应组纳入标准:发生皮肤不良反应前首次单独服用过 CBZ 或者 LTG,有一定的潜伏期,符合药疹的诊断和分型标准,排除与药疹相似的其他皮疹如麻疹等疾病,停药后皮肤不良反应症状减轻或消失。未发生皮肤不良反应组 15 例,为首次单独服用 CBZ 3 个月以上没有出现皮肤不良反应的癫痫患者。30 例正常对照组来自于正常志愿者,从未服用过 CBZ 或者 LTG。所有参与者均签署了知情同意书。

二、研究方法

1. 基因组 DNA 的制备:采集患者和正常志愿者静脉血,EDTA 抗凝管收集,应用全血 DNA 抽提试剂盒(德国 QIAGEN 公司),测定 DNA 纯度和浓度后,将浓度调至 30 ng/ μ L, -40 $^{\circ}$ C 保存。

2. 顺序特异性引物聚合酶链反应(PCR sequence specific primers, PCR-SSP):参考文献[4],设计 4 对特异性引物(分别为 S1、S2、S3、S4)及 2 对内参引物(C1、C2)。25 μ L PCR 反应体系如下:DNA 30~50 ng, dNTPs 200 μ mol/L, *Taq* 聚合酶 0.05

U/ μ L,各引物终浓度为 1 μ mol/L,反应缓冲液终浓度为 1 \times PCR 缓冲液。PCR 反应条件如下:PCR 扩增热循环的条件为:96 $^{\circ}$ C 预变性 60 s、96 $^{\circ}$ C 变性 30 s、62 $^{\circ}$ C 退火 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,4 个循环;96 $^{\circ}$ C 变性 10 s、58 $^{\circ}$ C 退火 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,21 个循环;96 $^{\circ}$ C 变性 10 s、55 $^{\circ}$ C 退火 50 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,9 个循环。2.0%凝胶电泳检测,凝胶成像系统成像。

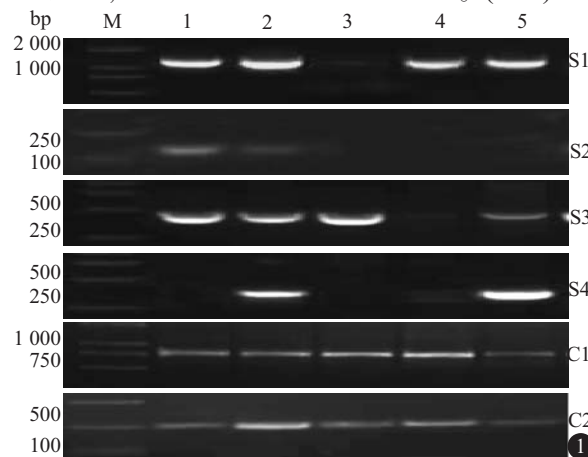
三、统计学分析

采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,基因频率(gene frequencies, GF) 用相对数表示,比较采用 Fisher's 确切概率检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、PCR-SSP 检测 *HLA-B*1502* 基因的结果

S1~S4、C1、C2 扩增片段大小见图 1。61 例标本中,两对内参 C1、C2 全部扩增成功。如样本 2(CBZ 引致 SJS 组)所示,S1~S4 均扩增出目的片段,则为 *HLA-B*1502* 基因型;如样本 1、3、4、5(正常对照组、CBZ 无皮肤不良反应组、CBZ 引致 MPE 组、LTG 引致 MPE 组) 所示,S1~S4 中有 1 条或几条无法扩增出产物,则为非 *HLA-B*1502* 基因型。(图 1)



S1:1331 bp;S2:125 bp;S3:488 bp;S4:375 bp;C1:782 bp;C2:250 bp

M:marker;1: 正常对照组;2:CBZ 引致 SJS 组;3:CBZ 无皮肤不良反应组;4:CBZ 引致 MPE 组;5:LTG 引致 MPE 组

图 1 PCR-SSP 法检测 *HLA-B*1502* 基因结果

Fig.1 DNA typing for *HLA-B*1502* by PCR with sequence-specific primers

二、*HLA-B*1502* 基因分型的统计结果

各组中 *HLA-B*1502* 基因型阳性例数和基因频率分别为:CBZ 引致 SJS 组 6 例(6/6, 100%),CBZ 引致 MPE 组 4 例 (4/7, 57%),LTG 引致 MPE 组 1 例 (1/3, 33%),CBZ 无皮肤不良反应组 1 例(1/15, 7%),正常对照组 3 例 (3/30, 10%)。与正常对照组比较,

CBZ 引致 SJS 组、CBZ 引致 MPE 组 *HLA-B*1502* 基因频率增高, 差异均有统计学意义 ($\chi^2=21.600$, $P=0.000$; $\chi^2=8.223$, $P=0.015$); LTG 引致 MPE 组 *HLA-B*1502* 基因频率无明显变化, 差异无统计学意义 ($\chi^2=1.394$, $P=0.330$)。与 CBZ 无不良反应组比较, CBZ 引致 SJS 组、CBZ 引致 MPE 组 *HLA-B*1502* 基因频率增高, 差异均有统计学意义 ($\chi^2=16.800$, $P=0.000$; $\chi^2=6.924$, $P=0.021$)。说明 CBZ 引致的 SJS 或 MPE 与 *HLA-B*1502* 基因型有关。

讨 论

皮肤不良反应是抗癫痫药物常见的副作用, 一线抗癫痫药物 CBZ 引起皮肤不良反应的概率在 4%~33% 间, 是导致严重皮肤不良反应的重要药物, CBZ 引致的严重皮肤不良反应中有 20% 左右会发展为 SJS 和 TEN。SJS 和 TEN 是严重的皮肤和黏膜反应, 可导致永久性残疾甚至致命, 而且超过 90% 的严重皮肤反应发生在用药后的 2 个月内, 最短的潜伏期仅为 2~3 d。免疫反应认为是抗癫痫药物引起皮肤不良反应的重要机制, CBZ 引起的皮肤不良反应患者的病灶区发现大量浸润性炎症细胞, 加大 CBZ 的用量可明显缩短炎症细胞出现的时间, 加重病症^[5]。CD₄⁺T 细胞和 CD₈⁺T 细胞介导的细胞毒性反应分别是引致 MPE 或 HSS 和 SJS 或 TEN 的主要原因^[6,7]。

抗癫痫药物引发的皮肤不良反应和不同人种的 *HLA-B*1502* 基因型密切相关。近年来的研究报道表明, 中国台湾地区汉族人和香港人中 *HLA-B*1502* 基因与 CBZ 导致的 SJS 或 TEN 存在强相关性, 但与 MPE 或 HSS 无相关性; *HLA-B*1502* 与 LTG 和 PHT 的相关性尚不确定^[4,8]。但在白种人中 *HLA-B*1502* 与 CBZ 导致的 SJS 或 TEN 不存在相关性。该基因在中国裔、东南亚裔及印度裔血统的人群中比率较高, 如中国汉族人种中 *HLA-B*1502* 的比率达 8%~15%, 日本和韩国的比率小于 1%, 欧洲人种的比率只有 1%~2%^[9]。地缘相近地区 *HLA-B*1502* 的等位基因频率也有所不同; 广东汉族人中为 11.5%, 中国香港人中为 10.2%, 新加坡人中为 5.7%^[10]。有研究建议有 *HLA-B*1502* 流行地区的血统, 如中国裔、东南亚裔及印度裔的患者, 在开始服用 CBZ 之前, 应接受 *HLA-B*1502* 等位基因检测; 如果是 *HLA-B*1502* 阳性基因者, 则不宜使用 CBZ, 除非预期收益要明显大于 SJS/TEN 风险的增加。

Chung 等^[2]后续的研究表明 *HLA-B*1502* 基因

和 CBZ 引致的 MPE/HSS 无明显相关性; 香港 Celeste 等^[9]研究显示在香港地区人群中支持同样的观点。本研究建立了一套 *HLA-B*1502* 分型检测方法, 并首次对大陆地区汉族人中 CBZ、LTG 引起的皮肤不良反应和 *HLA-B*1502* 基因型的相关性进行了研究。研究结果表明, CBZ 引起的皮肤不良反应和 *HLA-B*1502* 基因存在关联性。本研究入组的患者中, 6 例 CBZ 引致的 SJS 患者均为 *HLA-B*1502* 基因型, 与上述研究结果完全一致, 印证了 CBZ 引致的 SJS 和 *HLA-B*1502* 基因有 100% 的关联性; 7 例 MPE 患者中有 4 例是 *HLA-B*1502* 基因型, 与两对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$), 显示 CBZ 引起的 MPE 和 *HLA-B*1502* 基因也有关联性, 但程度较低, 这可能是因为我们在给患者首次服用 CBZ 时, 所用起始剂量较低, 加量速度较慢, 对患者反复强调可能出现的皮肤不良反应症状, 因此一旦发现轻微的症狀就及时停药, 未发展为严重的皮肤不良反应。本研究结果表明: *HLA-B*1502* 基因与 SJS 有非常强的关联性, 与 MPE 也有一定的关联性。

CBZ 作为一线抗癫痫药物和神经镇痛类药物, 广泛应用于癫痫、神经病理性疼痛和躁狂/抑郁症的治疗, 但其主要的副作用皮肤不良反应, 尤其是严重的皮肤不良反应致死率达到 30% 以上, 一直是制约 CBZ 使用的瓶颈问题, 目前尚没有很好的解决办法。鉴于 *HLA-B*1502* 阳性基因和 CBZ 引致的皮肤不良反应具相关性且该基因在中国人群中比率较高(8%~15%), 因此笔者建议有条件者在首次服用 CBZ 前进行 *HLA-B*1502* 筛查。*HLA-B*1502* 基因筛查对临床 CBZ 用药有明确的指导作用, 如检测结果呈阳性, 则不宜使用 CBZ, 除非药品的预期收益明显大于严重皮肤反应风险的增加。LTG 是一种新型抗癫痫药物, 据报道服用 LTG 的患者中皮疹的发生率高达 5%~10%, 如果通过基因型分析可以预测患者是否对该药物过敏, 对指导临床用药将有重要意义。国际上对 *HLA-B*1502* 和 LTG 的相关性尚没有明确结论, 目前仅见香港学者的报道。由于病例数太少没有统计学意义, 本次研究仅收入 3 例服用 LTG 引起的皮肤不良反应病例, 1 例发现 *HLA-B*1502* 基因阳性, 与正常对照组比较差异无统计学意义, 因此在未来的研究中应扩大样本数量以明确 *HLA-B*1502* 基因型与服用 LTG 所致的皮肤不良反应是否有关联性。本研究对象均为华南地区的汉族人群, 对于中国南北地区的汉族人群中可

(下转 499 页)