

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.16.018

人类白细胞抗原基因多态性与服用氯氮平患者白细胞计数相关性研究*

王姝珊, 曲衍衍, 朱浩浩, 张忠东[△]

(南京医科大学附属无锡精神卫生中心药学部, 江苏 无锡 214151)

摘要:目的 探讨人类白细胞抗原基因(*HLA-B*57:01*、*HLA-B*35:08*)多态性与服用氯氮平精神分裂症患者外周血白细胞计数(WBC)的相关性。方法 选取医院2018年至2019年收治的服用氯氮平的精神分裂症住院患者150例。采用多重SNaPShot方法检测患者的基因类型,采用全自动二维液相色谱仪分析患者的氯氮平血药浓度,比较不同基因型患者的氯氮平血药浓度及WBC。结果 女性患者的氯氮平血药浓度明显高于男性($P < 0.05$);不同剂量患者的氯氮平血药浓度-剂量比及2种基因各基因型间氯氮平血药浓度无显著差异($P > 0.05$);*HLA-B*35:08*基因中突变(A/A)型WBC明显低于杂合(G/A)型和野生(G/G)型($P < 0.05$),*HLA-B*57:01*各基因型间WBC无显著差异($P > 0.05$)。结论 *HLA-B*35:08*基因类型与患者的WBC相关,提示WBC减少的HLA基因的免疫源性因素,该结论可为临床安全使用氯氮平提供参考。

关键词:氯氮平;血药浓度;白细胞减少症;*HLA-B*57:01*基因;*HLA-B*35:08*基因;基因多态性;相关性

中图分类号:R969.2

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)16-0068-03

Correlation Between Human Leucocyte Antigen Gene Polymorphism and Leukocyte Count in Patients Treated with Clozapine

WANG Shushan, QU Kankan, ZHU Haohao, ZHANG Zhongdong

(Department of Pharmacy, The Affiliated Wuxi Mental Health Center of Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu, China 214151)

Abstract: Objective To investigate the correlation between human leukocyte antigen gene(*HLA-B*57:01*, *HLA-B*35:08*) polymorphism and peripheral blood white blood cell count(WBC) in schizophrenic patients treated with clozapine. **Methods** A total of 150 schizophrenic inpatients treated with clozapine in our hospital from 2018 to 2019 were selected. Multiple SNaPShot method was used to detect the patients' genotypes. The plasma concentration of clozapine was analyzed by automatic two-dimensional liquid chromatography, and the plasma concentration of clozapine and WBC of patients with different genotypes were compared. **Results** The plasma concentration of clozapine in female patients was significantly higher than that in male patients($P < 0.05$). There was no significant difference in plasma dose-concentration ratio of clozapine among patients with different daily dose, and there was no significant difference in plasma concentration of clozapine between the two genotypes($P > 0.05$). The WBC of patients with mutation(A/A) of *HLA-B*35:08* gene was significantly lower than that of heterozygous(G/A) type and wild(G/G) type of *HLA-B*35:08* gene($P < 0.05$). There was no significant difference in WBC of patients with different *HLA-B*57:01* genotypes($P > 0.05$). **Conclusion** *HLA-B*35:08* genotype is related to patients' WBC, which suggests that the HLA gene is an immunogenic factor of leukopenia, and it can provide a reference for the safe use of clozapine in the clinic.

Key words: clozapine; plasma concentration; leukopenia; *HLA-B*57:01* gene; *HLA-B*35:08* gene; gene polymorphism; correlation

氯氮平为非典型抗精神分裂症药物,能显著改善病程和预后,并对难治性精神分裂症有效^[1]。因其使用过程中会引起白细胞减少症(LP)和严重的粒细胞缺乏症(发生率约为1%),并不作为首选药物^[2-3]。以往通过监

*基金项目:江苏省无锡市卫生计生科研面上项目[MS201716]。

第一作者:王姝珊,女,硕士,主管药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)wangss0321@foxmail.com。

[△]通信作者:张忠东,男,大学本科,主任药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)zzde_831@163.com。

[9] 张永乐,王义生,张世清,等. 大剂量甲强龙对兔髌关节周围骨组织 BMP-2 表达的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2012,47(3):358-361.

[10] 肖春生,林娜,林诗富,等. 不同糖皮质激素诱导鸡股骨头坏死的实验研究[J]. 中国骨伤,2010,23(3):184-187.

[11] LI P, SUN N, ZENG J, et al. Differential expression of miR-672-5p and miR-146a-5p in osteoblasts in rats after steroid intervention[J]. Gene, 2016, 591(1):69-73.

[12] WANG C, MENG H, WANG Y, Analysis of early stage os-

teonecrosis of the human femoral head and the mechanism of femoral head collapse[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(2):156-164.

[13] 杨家爱. HPLC 法测定注射用甲泼尼龙琥珀酸钠主药及游离甲泼尼龙含量[J]. 中国药师, 2013, 16(8):1164-1166.

[14] SIDDIRAJU S, LAL PRASANTH ML, SIRISHA T. A novel LC-MS/MS assay for methylprednisolone in human plasma and its pharmacokinetic application[J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, 11(3):459-468.

(收稿日期:2020-09-02;修回日期:2021-02-23)

测血药浓度协助临床调整药物剂量^[4-5],近年来关于基因多态性和血药浓度潜在的相互关联与LP的差异分析成为研究热点。有研究表明,人类白细胞抗原基因(*HLA-B*)差异是氯氮平导致LP个体差异的重要原因之一^[6],可从此着手减少不良反应的发生风险。本研究中探讨了*HLA-B*57:01*[分为野生(*G/G*)型和杂合(*G/A*)型]、*HLA-B*35:08*[分为野生(*G/G*)型、杂合(*G/A*)型、突变(*A/A*)型]基因多态性与精神分裂症患者氯氮平用药治疗过程中血药浓度和LP的相关性,为减少不良反应发生风险及安全用药提供参考。现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取医院2018年至2019年收治的精神分裂症患者,年龄18~65岁;汉族;符合第10版国际疾病分类标准(ICD-10)关于精神分裂症的诊断(F20);以氯氮平为主要治疗药物,白细胞计数(WBC)为 $(4\sim10)\times10^9\text{L}^{-1}$ 。排除严重躯体疾病、妊娠妇女,以及氯氮平治疗前已存在外周血白细胞绝对计数和/或粒细胞绝对值异常者。本研究经医院医学伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

1.2 方法

用药情况统计:统计患者使用氯氮平治疗精神分裂症的实际剂量,首次剂量为25~75 mg/d,逐渐缓慢增加至常用剂量200~400 mg/d,最高可达600 mg/d。根据患者的临床表现可调整为25~600 mg/d,调整间隔不短于24 h。

血药浓度监测:患者使用氯氮平需5~7个消除半衰期后达到稳态血药浓度。约9~10 d(± 1 d)后,末次服药15~45 min前,采集外周静脉血4 mL,置乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管,离心,分离得血浆,−20℃保存。采用FLC-2701型全自动二维液相色谱耦合仪(长沙安莱科分析仪器有限公司),第一维色谱系统(LC1)主要负责样品在线富集及第一维初步分离,第二维色谱系统(LC2)主要负责进一步分离检测。第一维色谱柱为Aston SX1柱(25 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为10 mmol/L磷酸二氢铵-乙腈-甲醇(92:6:2, V/V/V, pH 3.5),流速为1.0 mL/min,中间柱为Aston SCB柱(10 mm×4.6 mm,5 μm);第二维色谱柱为Aston SCB柱(100 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为20 mmol/L磷酸二氢铵-乙腈-甲醇(50:30:20, V/V/V, pH 3.0),流速为1.2 mL/min,进样量为200 μL,柱温为40℃。紫外吸收波长channel 1为262 nm,channel 2为290 nm。氯氮平血药浓度测定,考察线性范围,结果线性范围为0~1 105.2 ng/mL($R^2=0.9999$)。计算单位剂量血药浓度(血药浓度-剂量比)。

HLA基因检测:采用多重SNaPShot检测方法检测*HLA-B*基因位点,测序分型首先需通过多重聚合酶链反应(PCR)扩增得到包含所研究SNP位点的DNA片段,采用3730XL型基因测序仪(美国ABI公司)检测*HLA-B*57:01*、*HLA-B*35:08*基因多态性,上游引物分别为5'-TGTTCACTGGCTCCGAGCACA-3'和5'-CTCTTAGCAATTGTACCCATC-3',下游引物分别为5'-GGCCAGAGAGGCTGCCACATG-3'和5'-TAGTAAGCAGTAGGGAGTAAC-3'。

1.3 统计学处理

采用SPSS 26.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X}\pm s$ 表示,行One-Way ANOVA双尾检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

共入组150例患者,其中男65例,女85例;平均年龄 (46.07 ± 10.22) 岁;稳态时氯氮平稳态血药浓度为 $(415.39\pm10.95)\text{ng/mL}$,其中女性较男性高,与杨淑珍等^[7]的研究结果一致。详见表1。

表1 患者一般资料($\bar{X}\pm s$)
Tab.1 General data of patients($\bar{X}\pm s$)

项目	男性($n=65$)	女性($n=85$)	合计($n=150$)
年龄(岁)	45.91±12.75	46.44±11.38	46.07±10.22
发病年龄(岁)	28.40±11.60	30.31±12.07	29.32±10.30
氯氮平稳态血药浓度(ng/mL)	311.04±6.38*	454.21±12.64	415.39±10.95

注:与女性比较,* $P<0.05$ 。

Note: Compared with those of female, * $P<0.05$.

2.2 服药剂量对血药浓度的影响

结果见表2。可见,服用不同日剂量氯氮平的患者血药浓度-剂量比无显著差异($P>0.05$)。

表2 不同日剂量氯氮平患者的血药浓度
Tab.2 Plasma concentration of patients treated with different daily doses of clozapine

日剂量(mg/d)	例数	血药浓度($\bar{X}\pm s$, ng/mL)	血药浓度-剂量比
100	10	233.61±23.51	0.036
150	12	289.12±10.43	0.174
200	14	310.32±33.40	0.052
250	57	318.93±14.27	0.076
325	27	372.09±19.33	0.037
350	16	422.10±50.59	0.035
400	14	473.18±21.61	0.058

2.3 基因型对氯氮平血药浓度及WBC的影响

*HLA-B*57:01*基因中,*G/G*型与*G/A*型患者氯氮平血药浓度和WBC均无显著差异($P>0.05$)。*HLA-B*35:08*基因中,3型患者氯氮平血药浓度无

表3 不同基因型患者的氯氮平血药浓度和白细胞计数($\bar{X} \pm s$)
Tab.3 Plasma concentration of clozapine and WBC of patients with different genotypes($\bar{X} \pm s$)

基因型	血药浓度(ng/mL)	白细胞计数($\times 10^9 L^{-1}$)
HLA-B*57:01 G/G型(n=96)	318.67 $\pm$ 11.93	4.65 $\pm$ 0.34
G/A型(n=54)	347.17 $\pm$ 4.64	4.53 $\pm$ 0.52
P值	0.563	0.674
HLA-B*35:08 G/G型(n=74)	329.46 $\pm$ 13.66	4.27 $\pm$ 0.63
G/A型(n=53)	377.74 $\pm$ 4.98	4.55 $\pm$ 0.72
A/A型(n=23)	364.28 $\pm$ 1.90	3.77 $\pm$ 0.24
P值	0.052	0.043

显著差异($P>0.05$),但 A/A 型患者的 WBC 显著低于 G/G 型和 G/A 型($P<0.05$)。详见表 3。

3 讨论

药物致白细胞减少主要有 2 种机制,一种是药物选择性对骨髓造血系统的白细胞有直接的、呈量效关系的毒性作用,可抑制粒细胞形成;另一种是迟发性反应,这可能是抗体介导的特异性、与剂量无关的、免疫源性的特异质反应^[8-9]。本研究,HLA-B*57:01 和 HLA-B*35:08 不同基因型间氯氮平血药浓度无显著差异,但 HLA-B*35:08($P<0.05$)A/A 型患者的 WBC 显著小于 G/A 型和 G/G 型,显示出免疫介导的特异性。WICIŃSKI 等^[10]的研究表明,尚未代谢的氯氮平被白细胞吸收,并通过氧化过程转化为诱导凋亡的代谢物。目前的理论认为,活性氧-硝酸根离子是引起 LP 的最重要因素,有自身免疫的背景,而不是毒性^[10]。

HLA-B*57:01 和 HLA-B*35:08 不同基因型间氯氮平血药浓度无显著差异,提示氯氮平血药浓度在治疗范围内,但 LP 患者可能存在白细胞中氯氮平血药浓度升高。

BERGEMANN 等^[11]研究发现,LP 患者(1 例)白细胞中的氯氮平浓度约为接受氯氮平治疗患者(10 例,无严重不良反应)的 8 倍,而氯氮平的血药浓度无显著差异。但该研究缺少对于 HLA 的分析。本研究中并未检测白细胞内氯氮平浓度的差异,更未将这种差异与 2 种基因进行关联分析,是本研究存在不足之处,需扩大样本量和改进分析设备。

HLA-B*57:01 和 HLA-B*35:08 多态性主要与抗原结合裂隙有关,从而使 HLA 同种异型所选择的自源性和病原体源性多肽抗原的种类多样化。部分研究强调了 HLA 多态性在药物基因组学中的重要性,并为涉及小分子药物的 HLA 连锁超敏反应提供机制分析^[12-13]。在中国人群中,HLA-A、-B、-C、-DRB1 和 -DQB1 位点共有 676 个等位基因被成功定义,包括 159 个常见等位基因和 517 个有文献记载的等位基因^[14]。由于其多基因特性的复杂化,难具有普遍性,以至于开发具有高特异

性和高灵敏度的临床预测性的基因产品困难重重^[15]。

综上所述,HLA-B*57:01 和 HLA-B*35:08 不同基因型引起 WBC 不同程度减少,提示了 LP 的 HLA 基因的免疫源性原因,为降低用药风险,提高用药的安全性提供了参考。但 HLA 过于复杂的多基因特性,可能会阻碍开发具有临床实际应用价值的基因检测产品。

参考文献

- [1] 谢小兵,谢七零,吴清培. 第 2 代抗精神病药物所致锥体外系反应相关因素调查[J]. 中国药业,2018,27(16):81-83.
- [2] 关振龙. 氟哌啶醇联合氯氮平治疗难治性精神分裂症的疗效及安全性临床评价[J]. 中国药业,2017,26(3):36-38.
- [3] 李媛媛,张云淑,王红英,等. 氯氮平片联合利培酮片治疗难治性精神分裂症安全性的系统评价[J]. 中国临床药理学杂志,2017,33(18):1813-1816.
- [4] 曲衍街,张晨宁,王姝,等. 基于全自动二维液相色谱的精神疾病靶症状的氯氮平有效血药浓度实验研究[J]. 沈阳药科大学学报,2019,36(10):926-933.
- [5] 陈颖,瞿发林,李琰,等. 高效液相色谱法测定人血浆中氯氮平和氯磺必利浓度研究[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(21):2140-2142.
- [6] NIKBIN B, NICHNAM MH, HADINEDOUSHAN H, et al. Human leukocyte antigen (HLA) class I and II polymorphism in Iranian healthy population from Yazd Province[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol,2017,16(1):1-13.
- [7] 杨淑珍,赵晶媛,宋学勤. 氯氮平治疗女性精神分裂症患者血药浓度与细胞因子相关性分析[J]. 重庆医学,2015,44(24):3399-3401.
- [8] LEGGE SE, WALTERS JT. Genetics of clozapine-associated neutropenia: recent advances, challenges and future perspective[J]. Pharmacogenomics,2019,20(4):279-290.
- [9] 鲍爽,庄红艳,刘珊珊,等. 喹硫平致白细胞减少和中性粒细胞减少 1 例[J]. 中国医院药学杂志,2020,40(1):125-126.
- [10] WICIŃSKI M, WĘCLEWICZ MM. Clozapine-induced agranulocytosis/granulocytopenia: mechanisms and monitoring[J]. Curr Opin Hematol,2018,25(1):22-28.
- [11] BERGEMANN N, ABU-TAIR F, ADERJAN R, et al. High clozapine concentrations in leukocytes in a patient who developed leukocytopenia[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,2007,31(5):1068-1071.
- [12] ILLING PT, VIVIAN JP, DUDEK NL, et al. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire[J]. Nature,2012,486(7404):554-558.
- [13] PAVLOS R, DESHPANDE P, CHOPRA A, et al. New genetic predictors for abacavir tolerance in HLA-B*57:01 positive individuals[J]. Hum Immunol,2020,81(6):300-304.
- [14] HE YM, LI JD, MAO W, et al. HLA common and well-documented alleles in China[J]. HLA,2018,92(4):199-205.
- [15] DE WITH SAJ, PULIT SL, STAAL WG, et al. More than 25 years of genetic studies of clozapine-induced agranulocytosis[J]. Pharmacogenomics J,2017,17(4):304-311.

(收稿日期:2020-10-16;修回日期:2021-02-24)