

应用环介导等温扩增法进行卡马西平安全用药监测

王丽彬, 孟玲* (南京医科大学第一附属医院药剂科, 南京 210029)

摘要: 目的 建立环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测卡马西平引起严重皮肤损害的标志基因 HLA-B*1502 的技术平台。方法 对所收集的病例,分别应用 LAMP 和金标准 SSP-PCR 进行标志基因 HLA-B*1502 的检测,验证 LAMP 方法的准确性。结果 LAMP 和 SSP-PCR 检测 38 例对照组和 2 例药疹组患者基因型结果完全一致。结论 LAMP 操作简单快捷,且准确可靠,可以在临床上广泛推广,提高卡马西平安全用药水平。

关键词: 卡马西平; SJS/TEN; HLA-B*1502; 环介导等温扩增法; 引物序列特异性 PCR

中图分类号: R971.6 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)05-0574-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.05.015

Monitoring the Safety of Carbamazepine by Loop Mediated Isothermal Amplification

WANG Libin, MENG Ling* (Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a technology platform for testing the marker gene HLA-B*1502 of severe episypsis induced by carbamazepine using the loop-mediated isothermal amplification(LAMP). **METHODS** The marker gene HLA-B*1502 was tested by LAMP method and the SSP-PCR method, respectively. And the accuracy of the LAMP method was verified. **RESULTS** The genotype results of control group and drug eruption group tested with LAMP method were consistent with those using SSP-PCR method. **CONCLUSION** LAMP method is simple and quick to be operated. It's reliable and accurate, and can be widely applied in clinic.

KEY WORDS: carbamazepine; SJS/TEN; HLA-B*1502; LAMP; SSP-PCR

卡马西平是治疗癫痫和外周神经痛的常用药,由于其疗效好、价格低,近年来应用日趋广泛,临床上成为治疗该类疾病的一线药物。对中国近年的临床不良反应报道进行回顾性分析发现,因服用卡马西平引起的严重不良反应增多,发生罕见且极为严重、甚至致命的皮肤反应 Stevens Johnson 综合征(SJS)及中毒性表皮坏死松解症(TEN)的风险明显增高^[1]。

研究表明,卡马西平所致的 SJS/TEN 患者中 HLA 位点等位基因的出现频率增加,特别是人类白细胞抗原等位基因(HLA-B*1502),几乎存在于 100%卡马西平导致的 SJS 患者体内,而在普通人群中只有 8.6%的检出率^[2]。Nature 在 2004 年刊登文章称 HLA-B*1502 是 Stevens Johnson 综合征的重要标志^[3]。美国食品药品监督管理局(FDA)2007 年 12 月 12 日发布通知,告诫“HLA-B* 1502 等

位基因阳性者服用卡马西平可能发生严重和潜在致命的皮肤反应”,并推荐亚裔血统患者开始使用卡马西平前,需进行血液基因筛查。

目前检测 HLA-B*1502 基因型的经典方法是引物序列特异性 PCR(polymerase chain reaction-sequence specific primer, SSP-PCR),但 SSP-PCR 耗时长(从采血到出报告需要 2 个工作日)、成本高(128 美元)、需要专用设备(PCR 仪和凝胶成像系统),极大限制了其在普通医疗机构的大规模推广。国外已有文献报道应用环介导等温扩增法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测 HLA-B*1502 基因型^[4]。该方法是日本学者 Notomi 等于 2000 年开发的一种新颖的恒温核酸扩增方法^[7],具有简单、快速、特异性强的特点。基因的扩增和产物的检测可一步完成,扩增效率高,弥补了 SSP-PCR 法时间长、成本高的不足,详见表 1。

基金项目:南京市 2012 年度科技发展计划(药学项目)(2012YX006)

作者简介:王丽彬,女,硕士,助理研究员 Tel: 13913972852
师,硕士 Tel: (025)83718836-6822 E-mail: Mengling-ml@163.com

E-mail: wanglibin1999@gmail.com

*通信作者:孟玲,女,主任药

表 1 SSP-PCR 和 LAMP 检测 HLA-B*1502 基因的成本-效益比较表^[4]

Tab 1 Comparison of cost-benefit in detection of HLA-B*1502 by SSP-PCR and LAMP

项目	SSP-PCR	LAMP
试剂盒成本	\$51	\$3.80
人工成本	\$77(培训过的职工×4h)	\$9(普通职工×1h)
总计成本	\$128	\$12.80
手工操作时间	1 h	10 min
检测结果回报时间	1~2 d	1 h
门诊患者去医疗机构次数	≥2 次	1 次

本研究应用 LAMP 对 HLA-B*1502 基因型与卡马西平引起的严重不良反应(尤指 SJS/TEN 综合征)之间相关性进行研究,通过 LAMP 与金标准 SSP-PCR 的比较,验证 LAMP 的准确性,建立 LAMP 检测 HLA-B*1502 基因型的技术平台,使患者在用药前能快速、准确预测不良反应,保证用药者安全。

1 材料与方法

1.1 研究对象

对照组:2008 年 3 月—2008 年 12 月江苏省人民医院、南京市儿童医院及南京市鼓楼医院进行卡马西平血药浓度监测的患者共 38 人,男 17 人,女 20 人,1 人性别不详,平均年龄 30.0 岁。该组患者服用卡马西平后均出现皮肤损害;

药疹组:2008 年 11 月和 2009 年 2 月就诊于江苏省人民医院皮肤科,临床诊断为重症药疹并高度怀疑诱发药物是卡马西平的患者 2 人,均为女性,平均年龄 28.5 岁。

1.2 仪器与试剂

DNA 提取试剂盒 TaKaRa Universal Genomic DNA Extraction Kit(宝生物工程有限公司);红细胞裂解液(天根生化科技有限公司);PCR 试剂(Taq 酶、10×buffer、dNTP)及 DNA maker(南京生兴生物技术有限公司);PCR 仪 PTC-200(美国 MJ Research 公司);凝胶电泳图像分析系统 JD801(江苏省捷达科技发展有限公司);LAMP 试剂盒(深圳博奥生物科技有限公司);恒温水浴锅;低温高速离心机。

1.3 血样的采集

经患者知情同意并通过医院伦理委员会审查后,抽取患者外周静脉血 5 mL,于 EDTA 抗凝管中 4℃ 存放不超过 1 d,立即提取基因组 DNA。

1.4 基因组 DNA 提取

按试剂盒提供方法提取基因组 DNA。

1.5 引物设计

1.5.1 SSP-PCR 反应引物设计 SSP-PCR 反应引物设计,应用 Primer5.0 进行设计,引物具体信息见表 2,其中,SetC1 和 SetC2 为内参引物,用于判定 PCR 反应的成功与否,HLA-B*1502 阳性结果的判定为:PCR 产物中存在 1 340 bp、124 bp 及 369 bp 条带^[5]。

表 2 SSP-PCR 检测 HLA-B*1502 引物信息

Tab 2 Information of sequence specific primers

序号	引物	产物长度/bp
Set1	F1 5-CGA GAG AGCCTG CGG AC-3	1 340
	R1 5-GCC CACTTC TGG AAG GTT CT-3	
Set2	F2 5-CGC GAGTCC GAG GAT GGC-3	124
	R2 5-GCA GGT TCC GCAGGC TCT-3	
Set3	F3 5-GGA GTA TTG GGA CCG GAAC-3	369
	R3 5-GCC ATA CAT CCT CTG GAT GA-3	
SetC1	FC1 5-TGC CAA GTG GAGCAC CCA A-3	796
	RC1 5-GCA TCT TGC TCT GTGCAG AT-3	
SetC2	FC2 5-ATG ATG TTG ACC TTTCCA GGG-3	256
	RC2 5-TTC TGT AAC TTT TCA TCAGTT GC-3	

1.5.2 LAMP 引物的设计 LAMP 引物的设计在 <http://primerexplorer.jp/e> 网站进行,LAMP 引物的设计主要是针对靶基因的 6 个不同区域,基于靶基因 3'端的 F3c、F2c 和 F1c 区以及 5'端的 B1、B2 和 B3 区等 6 个不同的位点设计 4 种引物,示意图见图 1。FIP 引物(Forward Inner Primer):上游内部引物,由 F2 区与 F1C 区域组成,F2 区与靶基因 3'端的 F2c 区域互补,F1 区与靶基因 5'端的 F1c 区域序列相同。F3 引物(Backward Inner Primer):上游外部引物,由 F3 区组成,并与靶基因的 F3c 区域互补。BIP 引物(Backward Inner Primer):下游内部引物,由 B1C 和 B2 区域组成,B2 区与靶基因 3'端的 B2c 区域互补,B1C 域与靶基因 5'端的 B1c 区域序列相同。B3 引物(Backward Outer Primer):下游外部引物,由 B3 区域组成,和靶基因的 B3c 区域互补。

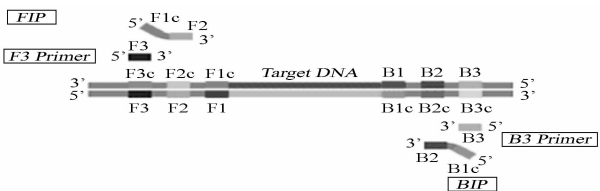


图 1 LAMP 引物示意图

Fig 1 Schematic diagram of LAMP primers

根据提示输入基因序列后，键入引物要求，系统自动生成若干组引物，根据 LAMP 引物的相关要求，选择适合本研究的引物，本实验选取 2 套引物进行试验，即 Set A 和 Set B，以保证结果的准确性，引物具体信息见表 3。

表 3 LAMP 检测 HLA-B*1502 引物信息
Tab 3 Information of LAMP primers Set A primer set

Set A primer set	
F3	AGCCCCGCTTCATCGC
B3	CGCAGGCTCTCTCGGTAAG
FIP (F2-F1C)	ATCCTCGGACTCGCGCGT-AGTGGGCTAC GTGGACG
BIP (B1C-B2)	CGGGCGCCATGGATAGAGC-CTGTGTGTG GTCTTGGAGA
LF	AACCTCACGAAGTGGGTGT
LB	CCGGAGTATTGGGACCGGAAC
Set B primer set	
F3	ACCAGTCCGCTACGACG
B3	CCTTCCCCTTCTCCAGGT
FIP (F2-F1C)	ATCTGAGCCGCCGTGTCCG-GCAAGGATTA CATCGCCCTG
BIP (B1C-B2)	CGTGAGGCGGAGCAGCTGA-CTGCGGAGC CACTCCA
LF	GGAGCTCAGTCTCTCGTT

1.6 基因型的检测

1.6.1 SSP-PCR 检测 HLA-B*1502 基因型 ①提取基因组：按试剂盒说明提取。②PCR 扩增反应：采集患者血样并提取基因组 DNA 后，立即进行用 SSP-PCR 法检测 HLA-B*1502 基因型。反应体系 20 μL ，其中 $10\times\text{Buffer}$ 2 μL 、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 0.4 μL 、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的上、下游引物各 1 μL 、25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 1.2 μL 、DNA Taq 聚合酶 0.2 μL 。内参引物的扩增参数为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，共 30 个循环，最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。序列特异性引物的扩增参数为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，共 30 个循环，最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。③PCR 产物电泳凝胶分析：PCR 产物各取 7 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，于凝胶电泳图像分析系统中读取结果。

1.6.2 LAMP 检测 HLA-B*1502 基因型 上述结果反馈临床后，本实验室进行了用 LAMP 检测 HLA-B*1502 基因型的摸索。按照 LAMP 试剂盒说明要求进行 LAMP 反应(模板、引物、酶、dNTP 等于 63 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min)；反应结束后，加入 SYBR

Green I 显色，阳性显绿色，阴性显黄色橙色。其中阳性对照反应体系为 LAMP 反应液 18 μL 、LAMP DNA 聚合酶 1 μL 、阳性对照引物 1 μL 、阳性对照模板 1 μL 及适量水补至 25 μL 。阴性对照反应体系为 LAMP 反应液 18 μL 、LAMP DNA 聚合酶 1 μL 、阳性对照引物 1 μL 及适量水补至 25 μL 。空白对照反应体系为水 25 μL 。样品反应体系为 LAMP 反应液 18 μL 、LAMP DNA 聚合酶 1 μL 、11 种 LAMP 引物各 0.5 μL 、及适量水补至 25 μL 。

2 结果与分析

2.1 SSP-PCR 检测结果

在 38 例对照组中仅有 1 例为 HLA-B*1502 基因型阳性，2 例药疹组患者均为 HLA-B*1502 基因型阳性，电泳图见图 2 和图 3。图 2 的 2 例卡马西平药疹患者血样的 PCR 产物电泳图中，产物 1 340 bp、124 bp 及 369 bp 条带均存在，说明 HLA-B*1502 基因型阳性；图 3 对照组患者的 PCR 产物电泳图中，缺少 369bp 条带，说明该患者 HLA-B*1502 基因型阴性。

立刻将基因检测结果告知临床医师，建议这 2 例患者今后在抗癫痫治疗中选择卡马西平之外的药物，避免再次发生严重的甚至危及生命的皮肤损害。

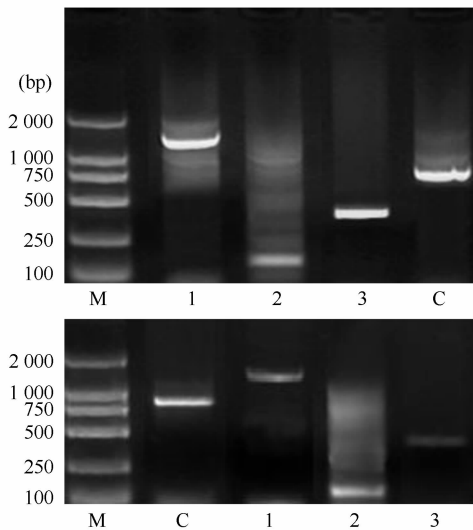


图 2 发生严重药疹的 2 例患者血样的 PCR 结果电泳图
M-分子量标记；1,2,3-分别是引物 1、2、3 的 PCR 产物；C-内部指
控引物的 PCR 产物

Fig 2 The PCR production electropherogram of the two severe epispsis patients

M-marker; 1,2,3-PCR products of primer 1, 2 and 3, respectively;
C-PCR product of internal control primer

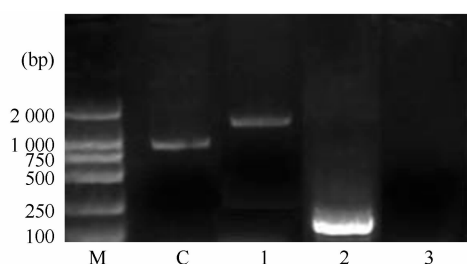


图3 参比对照组 HLA-B*1502 阴性患者样本的 PCR 结果电泳图

M—分子量标记；1,2,3—分别是引物 1、2、3 的 PCR 产物；C—内部指控制引物的 PCR 产物

Fig 3 The PCR production electropherogram of control patient

M—marker; 1,2,3—PCR products of primer 1, 2 and 3, respectively; C—PCR product of internal control primer

2.2 LAMP 法检测结果

LAMP 检测结果显示，阳性对照为绿色，说明 LAMP 反应正常进行；阴性对照为橙色，说明试验中不存在污染和假阳性的情况；2 例卡马西平药疹患者为 HLA-B*1502 基因型阳性(绿色)，2 个对照组患者为 HLA-B*1502 基因型阴性(橙色)。

实验结果表明，本研究中 LAMP 方法实施中设立了阳性对照和阴性对照，证实该方法的可靠性；LAMP 对于对照组和药疹组共计 40 例血样的检测结果与 SSP-PCR 方法的检测结果完全一致，充分验证了该方法的准确性。

SSP-PCR 和 LAMP 均证实药疹组患者 HLA-B*1502 基因为阳性，说明携带该基因的患者在服用卡马西平后，极易出现严重的皮肤损害，提示该类人群存在不良反应的风险；而对照组在 38 例对照组中仅有 1 例为 HLA-B*1502 基因型阳性，且临床随访表明这 1 例阳性基因患者并未发生皮肤损害事件，说明携带 HLA-B*1502 基因的患者服用卡马西平后并不是 100%的发生严重皮疹，而是不良反应的风险增加，进而提示医师在用药前后密切监测患者情况，随时做出判断和治疗。

3 讨论

Man 等^[2]2007 年在发表于 *Epilepsia* 上的文章里称，他们对所收集的 24 名因服用抗癫痫药物卡马西平而引起 SJS/TEN 综合征的中国香港汉族患者的 HLA-B*1502 基因型进行分析，结果显示 100%患者的 HLA-B*1502 基因型为阳性。Lonjou 等^[8]在欧洲人群中进行研究后称，该种相关性不具有世界性，仅存在于亚裔尤其是中国汉族人群中，提示该标志基因具有种族特异性。

在本研究中，对照组 HLA-B*1502 基因型阳性率为 2.63%，而药疹组为 100%，可初步推断出 HLA-B*1502 与 SJS-TEN 存在很大程度的相关性。但是，由于卡马西平药疹患者极为少见，所以 2 组在数量上缺乏统计学意义，在今后研究中希望能继续扩大样本量，更加科学的评判 HLA-B*1502 基因型与卡马西平严重皮疹之间的相关性。

本试验中，LAMP 对 HLA-B*1502 基因型的检测结果与金标准 SSP-PCR 完全一致，验证了其准确性，但还需更加充足的样本量支持。

LAMP 由于本身高灵敏度的特点，在研究中对实验环境要求非常严格。如 DNA 提取区域和扩增区要严格分离，空气流向也必须从扩增区流向提取区，2 个区域实验耗材和仪器、实验服不能混用等。

HLA-B*1502 等位基因已被 FDA 确定为服用卡马西平前需检定的位点，但国内医疗机构多为研究性质的检测，在临床上推广还受到成本-效益等诸多因素的影响^[6]。LAMP 这种新的基因扩增方法降低了患者诊疗成本、避免多次往返医疗机构，其检测结果同样能够满足对卡马西平用药前的指导作用。

REFERENCES

- [1] BAO X P, YANG Y, YANG Z X. Adverse drug reaction of carbamazepine [J]. *Chin J Misdiagn*(中国误诊学杂志), 2009, 9(22): 5529-5530.
- [2] MAN C B, KWAN P, BAUM L, et al. Association between HLA-B*1502 allele and antiepileptic drug-induced cutaneous reactions in Han Chinese [J]. *Epilepsia*, 2007, 48(5): 1015-1018.
- [3] CHUNG W H, HUNG S I, HONG H S, et al. A marker for Stevens-Johnson syndrome [J]. *Nature*, 2004, 428(6982): 486.
- [4] CHENG S H, KWAN P, NG H K, et al. New testing approach in HLA genotyping helps overcome barriers in effective clinical practice [J]. *Clin Chem*, 2009, 55(8): 1568-1572.
- [5] BUNCE M, O'NEILL C M, BARNARDO M C, et al. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers(PCR-SSP) [J]. *Tissue Antigens*, 1995, 46(5): 355-367.
- [6] HENG X L. Carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome with negative HLA-B*1502: case report and literature review [J]. *J Clin Pediatr*(临床儿科杂志), 2012, 30(11): 1006-1010.
- [7] NOTOMI T, OKAGAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.
- [8] LONJOU C, THOMUS L, BOROT N, et al. A marker for Stevens-Johnson syndrome: ethnicity matters [J]. *Pharmacogenomics J*, 2006, 6(4): 265-268.

收稿日期：2013-07-19