·老年人认知功能障碍专栏·

阿尔茨海默病 CYP2D6*10 基因多态性与多奈哌齐疗效

郑雪丽[1]，苗 雅[1]，钟 远[1*]，万丽丽[2]

（上海交通大学附属第六人民医院：[1]老年科，[2]药剂科，上海 200233）

【摘 要】**目的** 研究阿尔茨海默病（AD）患者 CYP2D6*10 基因多态性对多奈哌齐疗效的影响。**方法** 筛选 AD 患者 110 例（AD 组）和健康体检者 124 例（对照组），应用限制性片段长度多态性–聚合酶链反应（RFLP-PCR）方法对两组患者进行 CYP2D6*10 基因多态性测定。AD 组给予多奈哌齐治疗 6 个月，于服药前后，应用简易精神状态量表（MMSE）和阿尔茨海默病评定量表认知分量表（ADAS-Cog）进行认知功能测定；应用高效液相色谱–质谱法测定患者血浆中多奈哌齐的稳态血药浓度。**结果** AD 组与对照组 CYP2D6*10 的基因型和等位基因频率分布差异无统计学意义（$P > 0.05$）；AD 组 CYP2D6*10 基因突变型（T/T 型与 C/T 型）的血药浓度、MMSE 和 ADAS-Cog 评分与野生型（C/C 型）相比，差异均有统计学意义（$P < 0.05$）。**结论** 多奈哌齐对阿尔茨海默病 CYP2D6*10 基因突变型患者的疗效优于野生型患者。

【关键词】 CYP2D6*10；基因多态性；阿尔茨海默病；多奈哌齐；治疗效果

【中图分类号】 R741; R968 【文献标识码】 A 【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00067

CYP2D6*10 polymorphism and response to donepezil in patients with Alzheimer′s disease

ZHENG Xueli[1], MIAO Ya[1], ZHONG Yuan[1*], WAN Lili[2]

([1]Department of Geriatrics, [2]Department of Pharmacy, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao tong University, Shanghai 200233, China)

【**Abstract**】 **Objective** To analyze the relation of CYP2D6*10 polymorphism with response to donepezil in patients with Alzheimer′s disease(AD). **Methods** A total of 110 AD patients (AD group) and 124 healthy individuals (control group) were recruited for the study. RFLP-PCR was applied to analyze the CYP2D6*10 gene polymorphisms. Besides, the AD patients were administrated with donepezil 5–10 mg/d for 6 months and evaluated by cognition scales (MMSE and ADAS-Cog) before and after therapy. The steady plasma concentration (Cp) of donepezil was measured by HPLC-MS. **Results** There was no statistical difference in genotypes and allele frequency of CYP2D6*10 between AD group and control group. However, significant differences were found in AD patients on steady concentration of donepezil and cognition scores (MMSE and ADAS-Cog) between CYP2D6*10 mutant genotypes (T/T and C/T group) and wild type (C/C group) ($P < 0.05$). **Conclusions** Donepezil is more effective for AD patients carrying CYP2D6*10 mutants than those carrying wild type.

【**Key words**】 CYP2D6*10; polymorphism; Alzheimer′s disease; donepezil; response

阿尔茨海默病（Alzheimer′s disease, AD）又称老年痴呆，是严重影响老年人生活质量的常见疾病。多奈哌齐是目前治疗轻中度 AD 的推荐药物，但在临床研究中发现其对不同的 AD 患者存在明显的疗效差异，治疗有效率为 20%～60%[1]。

CYP2D6 是与多奈哌齐密切相关的代谢酶，且是肝脏细胞色素 P450 代谢酶家族中最具多态性的亚型，研究表明 CYP2D6*10 是黄种人最常见的基因多态性位点[2]，其外显子 1 上 C188→T 的点突变可导致代谢酶的活性降低，并且其基因突变频率存在明显的种族差异。国外有报道，白种人 CYP2D6 基因多态性与多奈哌齐的疗效有关[3,4]，但国内研究较少。本研究旨在探讨我国汉族人群 AD 患者 CYP2D6*10 基因多态性与多奈哌齐的疗效关系，为临床医生合理用药，治疗 AD 提供更多的依据。

1 对象与方法

1.1 对象

2009 年 1 月～2011 年 3 月上海交通大学附属第六人民医院老年科门诊或住院患者及健康体检者。

收稿日期：2011-08-24；修回日期：2011-11-18

通讯作者：钟 远，Tel: 021-24056227, E-mail: zhongyuan60@yahoo.com.cn

患者入组标准如下: （1）汉族, 年龄≥65 岁; （2）由两名有经验的医师, 依据美国国立神经病学、语言障碍和卒中研究所及 AD 和相关疾病协会的标准诊断的很可能为 AD 的患者; （3）神经心理学量表评估, 10 分≤简易精神状态量表（mini-mental state examination, MMSE）评分≤23 分, 临床痴呆评定量表评分≥1 分, 总体衰退量表评分≥4 分, Hachinski 缺血量表评分＜4 分; （4）无胆碱类药物过敏史。体检者入组标准如下: （1）汉族, 年龄≥65 岁; （2）神经心理学量表评估: MMSE≥29 分。排除标准如下: （1）患任何引起痴呆的其他神经系统疾病如帕金森病、癫痫、脑外伤、肿瘤、感染、中毒等; （2）患符合美国精神病学会精神障碍诊断和统计手册诊断标准的其他精神疾病; （3）患头颅 CT、磁共振成像及血液等检查明确的非 AD 痴呆; （4）合并服用其他改善认知功能的药物; （5）合并服用其他影响 CYP2D6 酶功能的药物（其他抗胆碱酯酶药物、抗抑郁药、抗精神病药、β 受体阻滞剂等）。符合入组标准的患者（AD 组）110 例, 男 72 例, 女 38 例, 平均年龄（80.6 ± 4.9）岁; 健康体检者（对照组）124 例, 男 83 例, 女 41 例, 平均年龄（80.2 ± 4.7）岁。

1.2 干预方法

所有 AD 患者睡前口服多奈哌齐（商品名: 安理申, 日本卫材株式会社）, 5mg/d, 1 个月后, 耐受良好者剂量增加至 10mg/d, 干预治疗 6 个月。患者于服药前及治疗结束后, 由经过专业培训的医师对其进行认知功能测定, 随访的神经心理学量表为 MMSE 和 AD 评定量表的认知分量表（Alzheimer disease assessment scale-cognitive subscale, ADAS-Cog）。

1.3 CYP2D6*10 基因型测定

应用限制性片段长度多态性–聚合酶链反应（restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction, RFLP-PCR）方法测定 CYP2D6*10 基因型。

1.3.1 提取基因组 DNA 所有试验者, 空腹 12 h, 取肘静脉血 5ml, EDTA 抗凝, 利用基因组抽提试剂盒提取基因组 DNA, 分光光度计测定基因组 DNA 的含量和纯度。

1.3.2 扩增目的基因片段 按照参考文献[5]设计引物: 上游引物 5′-CCATTTGGTAGTGAGGCAGGTAT-3’; 下游引物 5′-CACCATCCATGTTTGCTTCTGGT-3′。PCR 反应体系为: 0.5～1μg DNA 模板、2μl 10×缓冲液（含 15mmol/L $MgCl_2$）、1μl DMSO、1μl 2.5mmol/L dNTPs、10μmol/L 上下游引物各 0.3μl、0.25μl Taq DNA 聚合酶（5U/μl）, 用蒸馏水补至 20μl。扩增循环参数: 94℃预变性 5min, 94℃变性 30s, 58℃退火 30s, 72℃延伸 30s, 共 32 个循环, 最后 72℃延伸 5min。2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物（120V, 30min）。

1.3.3 酶切 PCR 产物及电泳 酶切体系为: PCR 产物 5μl、ddH_2O 12.5μl、限制性内切酶 *Hph*I（10U/μl）0.5μl、10×缓冲液 2μl, 置 37.0℃水浴箱 12h。5μl 酶切产物与 1μl 6×上样缓冲液混合, 行 12%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（150V, 4h）。

1.3.4 硝酸银染色及显影 电泳结束后, 凝胶采用 0.1%$AgNO_3$ 染色 15 min; 显影液（1.2%NaOH 和 0.4%甲醛）显影 5min, 拍片观察。

1.4 血浆多奈哌齐浓度测定

所有患者服药 6 个月后, 空腹 12h, 取肘静脉血 5 ml, EDTA 抗凝, 离心并分离血浆, –80℃保存待用。应用高效液相色谱–质谱法测定血浆多奈哌齐的稳态浓度。

1.4.1 色谱与质谱条件 色谱柱为 C18 柱; 流动相组成为: A 相, 5mmol/L 甲酸胺和 0.1%甲酸水溶液, B 相, 乙腈, pH4.0; 流速 0.4ml/min, 柱温 32℃, 进样量 5μl; 采用正离子方式, 多重反应监测扫描。

1.4.2 溶液配制与样品处理 精密称取多奈哌齐对照品 5mg, 以 50%甲醇溶解并定容, 制成 1g/L 的贮备液; 精密称取尼罗替尼 2 mg, 以甲醇溶解并定容, 制成 0.2g/L 的贮备液。量取储备液适量稀释至 1μg/L, 作为含内标沉淀溶液。取血浆样品 30μl, 加 5mmol/L 甲酸胺, 0.1%甲酸溶液 30 μl, 振摇, 再加含内标的 0.1%甲酸乙腈溶液 120μl, 振摇, 15 970*g* 离心 10min, 取上清层进样分析。

1.4.3 线性范围 取空白血浆加入多奈哌齐系列浓度工作溶液, 制成浓度为 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0μg/L 的血浆样品, 按照 1.4.2 项的方法处理后进样。以样品峰面积与内标峰面积的比值 A 为纵坐标, 浓度 c 为横坐标, 进行线性回归, 回归方程为: $c=0.0687\times A+0.0526$, $r=0.9981$, 表明多奈哌齐在线性范围内线性关系良好。

1.4.4 保留时间及定量限 多奈哌齐及内标的保留时间分别为 6.1min 和 6.6min; 血浆中多奈哌齐的最低定量浓度为 0.2μg/L 。

1.5 统计学处理

使用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。所有

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组计量资料比较采用 t 检验，两组以上计量资料比较采用单因素方差分析，计数资料采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CYP2D6*10 基因型及等位基因频率分布

CYP2D6*10 的 PCR 扩增片段为 272bp（图 1），该片段中存在限制性内切酶 *Hph*I 的酶切位点，如果出现 C188→T 突变，则在 T188 位点上形成第二个 *Hph*I 酶切位点。聚丙烯酰胺凝胶电泳检测酶切产物时，野生型基因（C/C）可检测到 213bp 和 59bp 酶切片段，突变杂合子（C/T）可检测到 213bp, 112bp, 101bp 和 59bp 酶切片段，突变纯合子（T/T）为可检测到 112bp, 101bp 和 59bp 酶切片段（图 2）。

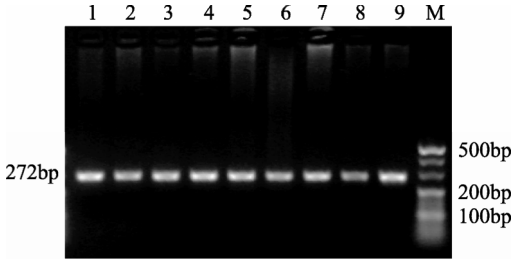

图 1 CYP2D6*10 PCR 扩增产物琼脂糖电泳图谱
Figure 1 Agarose gel electrophoresis of CYP2D6*10 PCR amplification fragment
M: DNA 分子量标记; 1-9: 272bp 扩增片段

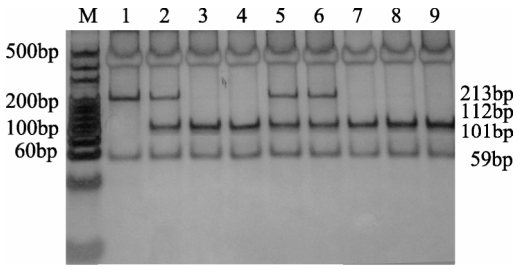

图 2 CYP2D6*10 三种基因型非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳电泳图谱
Figure 2 Non-denaturant polyacrylamide gel electrophoresis of CYP2D6*10 three genotypes
M: DNA 分子量标记; 1: C/C 基因型; 2, 5, 6: C/T 基因型; 3, 4, 7, 8, 9: T/T 基因型

AD 组 110 例患者中 96 例完成 6 个月随访，其余 14 例由于腹泻、失眠等副作用失访。96 例患者中 C/C 型 27 例、C/T 型 25 例、T/T 型 44 例; C 和 T 的等位基因频率为 41.1%和 58.9%。对照组 124 例完成随访，其中 C/C 型 25 例、C/T 型 44 例、T/T 型 55 例; C 和 T 的等位基因频率为 37.9%和 62.1%。AD 组与对照组的 CYP2D6*10 基因型和等位基因频率卡方检验，显示差异均无统计学意义（$P > 0.05$; 表 1）。

2.2 多奈哌齐血药浓度与认知量表评分

AD 患者按照 CYP2D6*10 基因型不同分为 C/C 组、C/T 组和 T/T 组, 3 组在性别、年龄、受教育时间及治疗前 MMSE 和 ADAS-Cog 评分的比较，差异均无统计学意义（$P > 0.05$），表明 3 组基线资料基本匹配，具有可比性（表 2）。

表 1 CYP2D6*10 基因型及等位基因频率分布
Table 1 Genotypes of CYP2D6*10 and distribution of allele frequency

组别	n	CYP2D6*10 基因型[n(%)]			等位基因频率(%)	
		C/C	C/T	T/T	C	T
AD 组	96	27(28.1)	25(26.0)	44(45.8)	41.1	58.9
对照组	124	25(20.2)	44(35.5)	55(44.4)	37.9	62.1

表 2 3 组间基线资料比较
Table 2 Demographic and cognition scores of three CYP2D6*10 genotypes ($\bar{x} \pm s$)

项目	C/C 组 (n=27)	C/T 组 (n=25)	T/T 组 (n=44)
性别(男/女)	19/8	20/5	27/17
年龄(岁)	80.6 ± 4.6	81.0 ± 4.0	81.3 ± 4.7
受教育时间(年)	12.6 ± 4.5	13.6 ± 3.4	13.2 ± 3.4
MMSE(分)	21.4 ± 1.8	20.8 ± 2.1	20.8 ± 2.5
ADAS-Cog(分)	14.8 ± 4.0	14.7 ± 4.2	15.4 ± 3.6

服药 6 个月后，CYP2D6*10 基因突变组（C/T 和 T/T 组）的血药浓度分别为（50.0 ± 12.7）μg/L 和（59.0 ± 13.0）μg/L，而野生型基因组（C/C 组）的血药浓度为（40.1 ± 14.0）μg/L，3 组间比较差异均有统计学意义（$P < 0.05$; 表 3）。

表 3 血药浓度及认知量表比较
Table 3 Donepezil Cp and cognition scores of different CYP2D6*10 genotypes ($\bar{x} \pm s$)

项目	C/C 组 (n=27)	C/T 组 (n=25)	T/T 组 (n=44)
稳态血药浓度(μg/L)	40.1 ± 14.0	50.0 ± 12.7*	59.0 ± 13.0$^{**\#}$
MMSE(分)	21.0 ± 3.0	23.1 ± 2.5*	23.3 ± 3.6**
△MMSE(分)	– 0.4 ± 2.6	2.3 ± 2.6**	2.3 ± 2.2**
ADAS-cog(分)	14.9 ± 4.1	12.2 ± 3.3**	12.6 ± 3.3*
△ADAS-cog(分)	0.1 ± 2.9	– 2.5 ± 3.8*	– 2.8 ± 1.9**

注：与 C/C 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 C/T 组比较，$^{\#}P < 0.05$

C/T 组和 T/T 组的 MMSE 和 ADAS-Cog 评分与 C/C 组比较差异均有统计学意义（$P < 0.05$）；△MMSE 比较，C/T 组和 T/T 组约增加 2.3 分，而 C/C 组约下

降 0.4 分，前两组与 C/C 组比较差异均有统计学意义（$P < 0.01$）；△ADAS-Cog 比较，C/T 组和 T/T 组分别约下降 2.5 分和 2.8 分，而 C/C 组约增加了 0.1 分，前两组与 C/C 组比较，差异均有统计学意义（$P < 0.05$, $P < 0.01$; 表 3）。

3 讨 论

某些研究表明，AD 患者的年龄、性别、受教育时间和基础认知水平的差异对多奈哌齐疗效有一定程度的影响[6]，而个体代谢药物的酶基因多态性对多奈哌齐的疗效差异性也是目前研究的重点[3,4]，故本研究排除了上述年龄等因素，探讨了 CYP2D6 基因多态性与多奈哌齐的疗效的关系。

CYP2D6 基因位于 22q13.1～13.2，根据酶活性的不同将个体分为四种表型：弱代谢者（poor metabolizers, PM）、中间代谢者（intermediate metabolizers, IM）、泛代谢者（extensive metabolizers, EM）和超快代谢者（ultra rapid metabolizers, UM）[7]。人群中约 80%为 EM，但其他表型却存在明显的种族差异，其中白种人 7%～10%为 PM，5%为 UM，而亚洲人最常见的突变类型是 IM，PM 仅 0.94%[8]。有报道，白种人 AD 患者，服用多奈哌齐 3 个月测定其 CYP2D6 基因型、血药浓度及 MMSE 评分，结果发现，UM 者的血药浓度明显低于 EM 者，且临床疗效差于 EM 者[3]；此外有学者发现，CYP2D6 多态性位点 rs1080985C→G 点突变导致代谢酶的活性增强，并且量表评分表明，多奈哌齐对基因突变型患者的疗效差于野生型患者[4]。国内有研究表明，70 例 AD 患者服用多奈哌齐 6 个月，血药浓度高的患者反而临床疗效差[9]。除此之外，国内外未见类似报道，并且上述研究结果存在争议，仍需进一步研究。

文献报道，CYP2D6*10 基因突变频率中国大陆人群为 48.0%～70.0%[2,10]、日本人 40.8%[11]、白种人仅 1.5%[12]。本研究表明，对照组的基因突变频率为 62.1%，与上述报道吻合，并且与 AD 组比较差异无统计学意义，表明 AD 患者基因突变率与正常人群相似。此外，研究表明，CYP2D6*10 基因突变组的血药浓度明显高于野生型基因组，并且前者的认知评分明显优于后者，但突变纯合子（T/T 组）和突变杂合子（C/T 组）的认知评分差异却没有统计学意义。我们考虑，虽然测出 T/T 组和 C/T 组的血药浓度具有差异性，但由于血药浓度并不是唯一影响药物疗效的因素，并且纳入研究的样本量相对偏小，研究周期较短，并且目前量表评分带有一定主观性，故两组的疗效无统计学差异。

本研究表明，多奈哌齐对汉族人群 AD 患者 CYP2D6*10 基因突变型的疗效好于野生型患者，并且其基因突变频率较高，故测定该基因多态性可以指导临床医生合理选择药物剂量，对野生基因型疗效差的患者可及早增加药物剂量，但该研究结果仍需大样本、多中心的证据支持。此外，探讨多奈哌齐的治疗机制及与其疗效的相关性也是我们继续研究的方向。

【参考文献】

[1] Winblad B, Engedal K, Soininen H, *et al*. A 1-year, randomized, placebo-controlled study of donepezil in patients with mild to moderate AD[J]. Neurology, 2001, 57(3): 489-495.

[2] Ji L, Pan S, Wu J, *et al*. Genetic polymorphisms of CYP2D6 in Chinese mainland[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(12): 1780-1784.

[3] Varsaldi F, Miglio G, Scordo MG, *et al*. Impact of the CYP2D6 polymorphism on steady-state plasma concentrations and clinical outcome of donepezil in Alzheimer's disease patients[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2006, 62(9): 721-726.

[4] Pilotto A, Franceschi M, D'Onofrio G, *et al*. Effect of a CYP2D6 polymorphism on the efficacy of donepezil in patients with Alzheimer disease[J]. Neurology, 2009, 73(10): 761-767.

[5] Garcia-Barceló M, Chow LY, Chiu HF, *et al*. Genetic analysis of the CYP2D6 locus in a Hong Kong Chinese population[J]. Clin Chem, 2000, 46(1): 18-23.

[6] Haywood WM, Mukaetova-Ladinska EB. Sex influences on cholinesterase inhibitor treatment in elderly individuals with Alzheimer's disease[J]. Am J Geriatr Pharmacother, 2006, 4(3): 273-286.

[7] Cacabelos R. Pharmacogenomics in Alzheimer's disease[J]. Methods Mol Biol, 2008, 448: 213-357.

[8] Cacabelos R. Pharmacogenomics and therapeutic prospects in Alzheimer's disease[J]. Expert Opin Pharmacother, 2005, 6(12): 1967-1987.

[9] Yang YH, Wu SL, Chou MC, *et al*. Plasma concentration of donepezil to the therapeutic response of Alzheimer's disease in Taiwanese[J]. J Alzheimers Dis, 2011, 23(3): 391-397.

[10] 李 芹, 王 睿, 郭 雅, 等. 中国人群 CYP2D6 基因多态性对美托洛尔药代动力学的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(7): 796-802.

[11] Tateishi T, Chida M, Ariyoshi N, *et al*. Analysis of the CYP2D6 gene in relation to dextromethorphan O-demethylation capacity in a Japanese population[J]. Clin Pharmacol Ther, 1999, 65(5): 570-575.

[12] Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, *et al*. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences[J]. Am J Hum Genet, 1997, 60(2): 284-295.

（编辑：任开环）