

· 药物与临床 ·

丙戊酸钠及其代谢产物与肝损伤的相关性分析

周 浚¹, 陈 顺², 宗传峰³, 高守红² (1. 海军军医大学附属长海医院药学部, 上海 200433; 2. 海军军医大学附属长征医院药学部, 上海 200003; 3. 解放军 73132 部队, 浙江 金华 321000)

[摘要] 目的 研究丙戊酸钠及 3 个代谢产物(2-丙基-4-五烯酸、3-羟基丙戊酸、5-羟基丙戊酸)对肝损伤参考指标的相关性分析。方法 共收集 328 例癫痫患者血样, 其中, 123 例肝功能异常癫痫患者血样为试验组, 205 例肝功能正常癫痫患者血样为对照组, 采用 LC-MS/MS 方法测定两组血样(丙戊酸钠及代谢产物)的血药浓度, 通过 ROC 曲线分析丙戊酸及其代谢产物浓度对肝功能异常的诊断价值。结果 肝功能异常组患者丙戊酸钠及其 3 个代谢产物平均血药浓度均高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。丙戊酸钠及其代谢产物的血药浓度均可作为诊断肝损伤的参考指标, 5-羟基丙戊酸比丙戊酸钠有更好的诊断价值。结论 丙戊酸钠代谢产物与肝毒性有关, 能够作为肝损伤的诊断指标, 可将其应用于临床, 为丙戊酸钠有效给药提供参考。

[关键词] 丙戊酸钠; 2-丙基-4-五烯酸; 3-羟基丙戊酸; 5-羟基丙戊酸; 血药浓度; 肝毒性

[中图分类号] R575 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)03-0273-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.201910080

Correlation analysis of valproic acid and its metabolites to hepatotoxicity

ZHOU Xun¹, CHEN Shun², ZONG Chuanfeng³, GAO Shouhong² (1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200003, China; 3. No.73132 Troops of PLA, Jinhua 321000, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the correlation of valproic acid and its metabolites (2-propyl-4-pentenoic acid, 3-hydroxy valproic acid, 5-hydroxy valproic acid) with liver injury reference index. **Methods** 328 plasma samples from epilepsy patients were collected and divided into two groups (123 samples from patients with abnormal liver function, experimental group; 205 samples from patients with normal liver function, control group). The plasma concentrations of valproic acid and its metabolites in the two groups were determined by LC-MS/MS method and the diagnostic value of the concentrations to liver dysfunction was analyzed by ROC curve. **Results** The mean plasma concentration of valproic acid and its three metabolites in the patients with abnormal liver function was higher than that in the control group with was statistically difference ($P < 0.05$). The concentration of valproic acid and its metabolites could be used as a reference for the diagnosis of liver injury, 5-hydroxy valproic acid had better diagnostic value than valproic acid. **Conclusion** The metabolites of valproic acid were associated with hepatotoxicity, which could be used as a diagnostic index of liver injury and could be a reference for clinical safe application of valproic acid.

[Key words] valproic acid; 2-propyl-4-pentenoic acid; 3-hydroxy valproic acid; 5-hydroxy valproic acid; plasma concentration; hepatotoxicity

丙戊酸钠(valproate acid, VPA)是临床上常用的广谱抗癫痫药, 对各种类型癫痫均有治疗作用, 且广泛用于其他神经系统疾病^[1-2]。研究显示, 长期使用 VPA 存在潜在的不良反应, 临床上常见的不良反应主要有胰腺炎、致畸性和肝毒性, 其中最严

重的不良反应就是肝毒性, 严重时甚至可发生急性肝坏死^[3-4]。因此, 深入研究 VPA 肝毒性的发病机制, 对于预防 VPA 毒副作用和促进临床安全用药具有重要指导意义。

VPA 在体内的代谢受多种因素影响, 治疗窗范围窄, 个体差异大, 有效治疗血药浓度为 50~100 $\mu\text{g/ml}$, 超过 100 $\mu\text{g/ml}$ 易产生不良反应, 因此需要进行血药浓度监测^[5-6]。VPA 的毒副作用与其血药浓度相关, 及时监测血药浓度可有效控制癫痫发作和减少不良反应发生。研究显示, VPA 的肝毒性与其体内代谢特征相关, VPA 及其代谢产物所诱

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81302856); 上海市科学技术委员会计划项目(13ZR1413800)

[作者简介] 周 浚, 药师, Tel: (021)31162601, Email: 41396868@qq.com

[通讯作者] 高守红, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药物分析与临床药学, Tel: (021)51322403, Email: gaoshouhong@126.com

导的线粒体功能障碍与肝毒性相关^[7-9]。已有研究证明, VPA 的不饱和代谢产物 2-丙基-4-五烯酸(2-propyl-4-pentenoic acid, 4-ene-VPA)能通过抑制线粒体脂肪酸的 β 氧化, 还能通过各种代谢途径与谷胱甘肽反应使其大量消耗降低机体的抗氧化能力进而产生肝毒性。但是, 少见有 3-羟基丙戊酸(3-hydroxy valproic acid, 3-OH-VPA)和 5-羟基丙戊酸(5-hydroxy valproic acid, 5-OH-VPA)与肝毒性相关的文献报道。本课题组前期对 VPA 及其代谢产物的体外肝毒性研究中发现, VPA 及 3 个代谢产物对体外人正常肝细胞增殖具有一定抑制作用, 且表现为时间依赖性和浓度依赖性^[9]。本研究首次将 VPA 及其 3 个代谢产物血药浓度对肝毒性的诊断进行分析和比较, 将 VPA 的 3 个代谢产物作为生物标志物用于临床肝损毒性诊断, 为临床安全给药提供合理依据。

1 样本与材料

1.1 样本来源

自 2016 年 4 月至 2018 年 3 月, 收集海军军医大学附属长征医院临床药理实验室服用 VPA 治疗的癫痫患者血样, 共收集肝功能正常癫痫患者血样 205 例, 肝功能异常癫痫患者血样 123 例。入选标准: 仅为癫痫患者无其他并发症, 单用 VPA 治疗癫痫, 取血时间点达稳态血药浓度, 无联合用药, 服药前后均做过肝功能检查者。排除标准: 有其他并发症、服药前肝或肾功能异常、与其他药物联合使用患者。

1.2 仪器与试剂

安捷伦 1200 高效液相色谱串联安捷伦 6410 A 质谱仪(美国安捷伦公司), 丙戊酸钠(VPA, 批号: FLA3C, 纯度: 98%, 东京化工有限公司), 2-丙基-4-五烯酸(4-ene-VPA, 批号: 3-XAL-91-4, 纯度 98%)、3-羟基丙戊酸(3-OH-VPA, 批号: 1-TVP-92-13)、5-羟基丙戊酸(5-OH-VPA, 批号: 1-TVP-149-5)均购自多伦多研究化学品公司, 苯甲酸(批号: TS0911CA14, 纯度 98%, 上海源叶生物科技有限公司), 甲醇、甲酸、醋酸铵均为进口色谱级试剂(德国 Merck 公司)。

1.3 统计学方法

本研究采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据处理, 计量数据用($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差和 t 检验分析, 以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 方法

2.1 标本采集

收集 123 例肝功能异常(谷丙转氨酶 ALT>50)癫痫患者血样为实验组, 男性 96 例, 女性 27 例; 205 例肝功能正常癫痫患者血样为对照组, 男性 127 例, 女性 78 例。口服丙戊酸钠缓释片(德巴金), 首次服药 2 周, 调整剂量后 1 周, 在患者血药浓度达稳态后, 取清晨空腹静脉血 2~3 ml, 经 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清监测血药浓度。

2.2 血药浓度的测定

采用本课题组前期建立的 LC-MS/MS 测定 VPA 和其 3 个代谢产物 3-OH-VPA、4-ene-VPA 和 5-OH-VPA 的方法^[10]。检测两组癫痫患者血样中的 VPA 及其代谢产物血药浓度。其中, VPA 及其 3 个代谢产物标准曲线的线性范围分别为 VPA: 2~150 $\mu\text{g/ml}$; 4-ene-VPA: 50~5 000 ng/ml ; 3-OH-VPA 及 5-OH-VPA: 50~1 000 ng/ml 。

3 结果

3.1 肝功能正常与异常的癫痫患者血药浓度比较

将肝功能正常组与肝功能异常组患者的 VPA 及其 3 个代谢产物血药浓度分析比较, 结果显示, 肝功能异常组平均血药浓度比肝功能正常组高, 且差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示肝毒性不仅与 VPA 血药浓度有关, 且与代谢产物血药浓度也有关系, 结果见表 1。

3.2 丙戊酸钠及其代谢产物对肝毒性相关性分析

从本研究收集的 123 例肝功能异常者不同血药浓度分布(表 2)可以看出, 未超过中毒血药浓度而产生肝毒性的患者占 69.10%, 超过中毒血药浓度而产生肝毒性的患者占 30.90%。结果表明: 仅检测 VPA 血药浓度可能不能及时发现肝毒性不良反应的发生, 因此考虑代谢产物的血药浓度是否可作为诊断肝损伤的参考指标。以 VPA 及其 3 个代

表 1 两组患者 VPA 及其 3 个代谢产物平均血药浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	VPA($\mu\text{g/ml}$)	4-ene-VPA(ng/ml)	3-OH-VPA(ng/ml)	5-OH-VPA(ng/ml)
肝功能正常组($n=205$)	62.44 \pm 31.24	3 229.34 \pm 1 704.30	597.85 \pm 396.13	446.01 \pm 403.15
肝功能异常组($n=123$)	83.50 \pm 31.57**	4 306.01 \pm 1 811.00**	740.43 \pm 609.33*	795.14 \pm 557.11**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与肝功能正常组比较。

谢产物血药浓度为变量做受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC), 检测其诊断肝毒性损伤的能力, 因 ROC 曲线不受患者患病率的影响, 对临床诊断具有研究意义。对 VPA 及其 3 个代谢产物进行 ROC 曲线作图, 可看出 ROC 曲线下面积分别为 0.690、0.682、0.594 和 0.736, 均大于 0.5, P 值均小于 0.05, 说明 VPA 及其 3 个代谢产物可以用于肝毒性的诊断。因此, 通过同时监测 VPA 及 3 个代谢产物的血药浓度能更好地预警肝毒性不良反应的发生, 及时调整癫痫患者 VPA 的剂量, 为临床合理化用药提供帮助。结果见表 2、表 3、图 1。

表 2 123 例肝功能异常患者血药浓度分布

血药浓度($\mu\text{g/ml}$)	肝功能异常例数(%)
<50	21(17.07)
50~100	64(52.03)
>100	38(30.90)

表 3 VPA 及其 3 个代谢产物 ROC 曲线分析参数

组别	AUC	标准偏差	P 值	95%置信区间	
				下限	上限
VPA	0.690	0.030	<0.001	0.631	0.748
4-ene-VPA	0.682	0.039	<0.001	0.625	0.74
3-OH-VPA	0.594	0.032	0.004	0.532	0.657
5-OH-VPA	0.736	0.028	<0.001	0.681	0.791

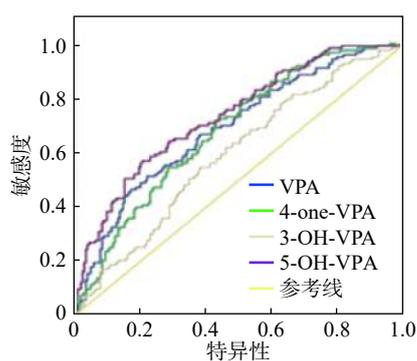


图 1 VPA 及其 3 个代谢产物的 ROC 曲线

4 讨论

VPA 在体内药动学复杂, 治疗窗窄, 个体差异大, 其毒副作用与其血药浓度相关, 本研究对肝功能正常与异常的癫痫患者的 VPA 及其 3 个代谢产物血药浓度与肝毒性进行相关性分析, 结果显示: 肝功能异常组中 VPA 及其 3 个代谢产物的血药浓

度均高于肝功能正常组患者, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 提示 VPA 代谢产物中不仅 4-ene-VPA 血药浓度与肝毒性有关, 3-OH-VPA 和 5-OH-VPA 与肝毒性也有关系, 同时监测 VPA 及其 3 个代谢产物血药浓度可以更好地预警肝毒性不良反应的发生。

本研究通过 VPA 及其 3 个代谢产物血药浓度为变量做 ROC 曲线, 检测其诊断肝毒性损伤的能力, 通过 ROC 曲线分析, VPA 及其 3 个代谢产物的血药浓度均可作为诊断肝损伤的参考指标。其中, 5-OH-VPA 的 ROC 曲线下面积大于 VPA。

综上, VPA 及其 3 个代谢产物血药浓度均与肝毒性有关, 这与课题组之前研究的 VPA 及其 3 个代谢产物对人体正常肝细胞体外肝毒性实验得到的结果一致, 3-OH-VPA 组和 5-OH-VPA 组差异更为明显。本研究还以 VPA 及其 3 个代谢产物血药浓度为变量做 ROC 曲线, 检测其诊断肝毒性损伤的能力, 5-OH-VPA 大于 VPA 的 ROC 曲线下面积, 结果提示临床可结合 VPA 及其代谢产物的血药浓度设计临床个体化给药方案, 还可作为预警肝毒性不良反应发生的指标, 为临床安全、有效给药提供参考。对于将 VPA 3 个代谢产物作为标志物用于临床肝毒性诊断, 还有待加大样本量验证, 以确保诊断的特异性。

【参考文献】

- [1] GHODKE-PURANIK Y, THORN C F, LAMBA J K, et al. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2013, 23(4): 236-241.
- [2] 应义, 崔斌, 张慧. 抗癫痫药物研究现状与新进展[J]. *中国药业*, 2012, 21(20): 110-112.
- [3] 王灿, 马虹英, 王方杰, 等. 丙戊酸肝毒性的早期预警及预防研究状况[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(2): 150-154.
- [4] SCHMID M M, FREUDENMANN R W, KELLER F, et al. Non-fatal and fatal liver failure associated with valproic acid[J]. *Pharmacopsychiatry*, 2013, 46(2): 63-68.
- [5] 陈玲, 苗苗, 刘俊. 癫痫患者丙戊酸血清浓度监测及与临床疗效的关联性分析[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2015, 15(12): 1613-1616.
- [6] WANG W Z, WU J Z, LI S C, et al. Sodium valproate for epilepsy in rural China: an efficacy and safety assessment in primary care[J]. *Epilepsy Res*, 2012, 102(3): 201-205.
- [7] SURENDRADOSS J, CHANG T K, ABBOTT F S. Assessment of the role of *in situ* generated(E)-2, 4-diene-valproic acid in the toxicity of valproic acid and(E)-2-ene-valproic acid in sandwich-cultured rat hepatocytes[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264(3): 413-422.
- [8] 储小曼, 郭岑, 张丽芳. 丙戊酸的代谢特征与肝毒性的相关性

[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(19): 1611-1614.

[9] 谢新芳, 温燕, 高守红, 等. 丙戊酸钠及其代谢产物的体外肝毒性研究[J]. 药学实践杂志, 2017, 35(1): 43-47, 53.

[10] GAO S H, MIAO H J, TAO X, et al. LC-MS/MS method for simultaneous determination of valproic acid and major metabol-

ites in human plasma[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879(21): 1939-1944.

[收稿日期] 2019-10-25 [修回日期] 2019-12-24

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 244 页)

药物作用于乳腺癌细胞时 p-ERK1/2、p-AKT 表达水平显著降低, 说明 EA 能抑制 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路活性。但是, 当 EA 药物和 PKD1 过表达同时处理时, PKD1 过表达能显著恢复 EA 对 p-ERK1/2、p-AKT 的抑制作用。实验结果证实 EA 可能通过干扰 PKD1 介导 MAPK 和 PI3K/AKT 信号通路活性, 从而抑制了乳腺癌细胞增殖。

此外, 肿瘤的发生和发展是一个复杂的过程, 本研究证实 PKD1 能显著促进乳腺癌细胞的增殖能力, 这与已有的文献报道中 PKD1 会促进乳腺癌细胞增殖能力的结果是吻合的。但是在其他文献中报道过表达 PKD1 会显著抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭过程^[11]。也就是说在肿瘤发生转移和侵袭前, 肿瘤细胞大量增殖的阶段可以通过药物抑制 PKD1 的表达和活性, 从而抑制肿瘤细胞的增殖。因此, 在乳腺癌发生转移和侵袭前, 使用 EA 抑制 PKD1 的表达和活性, 可能具有抑制乳腺癌细胞增殖的功能。但是, 如果肿瘤发生转移和侵袭后, 药物抑制 PKD1 的表达, 可能会产生促进肿瘤转移和侵袭的结果, 使得肿瘤疾病向更加恶化的方向发展。因此, EA 在乳腺癌中的应用应该严格注意肿瘤病理状态, 在未发生转移和侵袭的患者中 EA 可通过抑制 PKD1 发挥抗肿瘤作用, 而在已发生肿瘤转移和侵袭的患者中则应该谨慎使用调控 PKD1 的药物。

综上所述, 经过一系列研究证实 EA 以剂量依赖的方式抑制乳腺癌细胞中 PKD1 的表达, 而 PKD1 过表达能恢复 EA 对乳腺癌细胞增殖能力的抑制作用。同时, EA 可能通过干扰 PKD1 介导的 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路的活性抑制乳腺癌细胞的增殖能力。总之, 本研究首次揭示了 EA 药物通过抑制 PKD1 的表达及其介导的 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 信号通路发挥抑制乳腺癌细胞的增殖作用。

【参考文献】

- [1] GBD Causes Of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1736-1788.
- [2] DESANTIS C E, LIN C C, MARIOTTO A B, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014[J]. *CA: Cancer J Clin*, 2014, 64(4): 252-271.
- [3] 曹青青, 李盛建, 李云青, 等. 月腺大戟的化学成分及其乳腺癌细胞毒活性研究[J]. 药学实践杂志, 2019, 37(3): 309-313.
- [4] 李盛建, 王莹, 王强利, 等. 月腺大戟素A抗乳腺癌活性[J]. 第二军医大学学报, 2018, 39(7): 765-769.
- [5] EISELER T, DÖPPLER H, YAN I K, et al. Protein kinase D1 regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits breast cancer cell invasion[J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(1): R13.
- [6] GAO S M, LI X Y, DING X, et al. Cepharanthine induces autophagy, apoptosis and cell cycle arrest in breast cancer cells[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(4): 1633-1648.
- [7] MENG H, PENG N, YU M W, et al. Treatment of triple-negative breast cancer with Chinese herbal medicine: A prospective cohort study protocol[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(44): e8408.
- [8] QI F H, ZHAO L, ZHOU A Y, et al. The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer[J]. *Biosci Trends*, 2015, 9(1): 16-34.
- [9] LI X, YANG G Y, LI X X, et al. Traditional Chinese medicine in cancer care: a review of controlled clinical studies published in Chinese[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60338.
- [10] KARAM M, LEGAY C, AUCLAIR C, et al. Protein kinase D1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of MCF-7 human breast cancer cells through a MEK/ERK-dependent signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(5): 558-569.
- [11] DURAND N, BORGES S, STORZ P. Functional and therapeutic significance of protein kinase D enzymes in invasive breast cancer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72: 4369-4382.

[收稿日期] 2019-12-03 [修回日期] 2019-12-27

[本文编辑] 李睿旻