

· 药物与临床 ·

肾移植患者 *MDR1C3435T* 基因多态性对他克莫司血药浓度 / 剂量比及疗效的影响

侯明明^{1,2}, 宋洪涛¹, 王庆华³, 杨顺良³, 谭建明³ (1. 南京军区福州总医院药学科, 福建 福州 350025; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 3. 南京军区福州总医院泌尿外科, 福建 福州 350025)

[摘要] 目的 研究肾移植术后患者 *MDR1C3435T* 基因多态性对他克莫司 (FK506) 血药浓度 / 剂量比 (C/D) 及急性排斥反应和不良反应的影响。方法 采用聚合酶链反应 (PCR) 和限制性内切片段长度多态性 (RFLP) 的方法检测肾移植患者 *MDR1C3435T* 基因型, 比较不同基因型患者之间 FK506 的 C/D 值以及急性排斥反应、不良反应的差异。结果 *MDR1C3435T* 各基因型组间 FK506 的 C/D 值及急性排斥反应、不良反应均无显著性差异。结论 *MDR1C3435T* 基因多态性与肾移植患者 FK506 的 C/D 值及急性排斥反应、不良反应间无显著相关性。

[关键词] 肾移植; 他克莫司; *MDR1*; 基因多态性; 血药浓度 / 剂量比; 疗效; 不良反应

[中图分类号] R617 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1006-0111(2010)01-0029-03

Effect of *MDR1C3435T* genetic polymorphism on concentration / dose and efficacy of tacrolimus in patients with kidney transplantation

HOU Ming-ming^{1,2}, SONG Hong-tao¹, WANG Qing-hua³, YANG Shun-liang³, TAN Jian-ming³ (1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China; 2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Department of Urology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the impact of *MDR1C3435T* genetic polymorphism on the concentration/dose (C/D) ratio, acute rejection and adverse effect of tacrolimus (FK506) in the renal patients after transplantation. **Methods** The *MDR1C3435T* genotype was determined by PCR-RFLP method. The differences of C/D ratio, acute rejection and adverse reaction were compared among all of the genotype groups treated with FK506. **Results** There was no significant difference in the C/D ratio, rejection and adverse reaction of FK506 among *MDR1C3435T* genotype groups. **Conclusion** There was no significant relation between the C/D ratio, acute rejection and adverse reaction of FK506 and *MDR1C3435T* genetic polymorphism in the transplant patients.

[Key words] renal transplantation, tacrolimus; *MDR1*; genetic polymorphism; concentration/dose; efficacy; adverse reaction

他克莫司 (FK506) 现已广泛用于预防器官移植后的抗排斥治疗。对 2007 年我院肾移植病例调查结果显示, 我院临床最常使用的免疫抑制方案为 FK506 + 吗替麦考酚酯 (MMF) + 醋酸泼尼松 (Pred) 和环孢素 A (CsA) + MMF + Pred 三联治疗方案, 但与 CsA 三联方案相比, FK506 方案则是肾移植术后防治排斥反应更有效、更经济的治疗方案^[1]。但 FK506 在药动学和毒理学方面存在明显的个体差异, 且治疗指数较窄, 临床上个体间给药剂量存在很大差异, 用药不当即会产生急性排斥反应或不良反应。多药耐药基因 1 (*MDR1*) 编码的 P 糖蛋白 (P-gp) 在 FK506 的吸收过程中起很大的作用, 肠黏膜表面的 P-gp 通过将药物泵回肠腔而影响 FK506 的

吸收并间接影响血药浓度, 在已发现的 48 个单核苷酸多态性 (SNPs) 中, 外显子 26 的 *C3435T* SNPs 具有重要的功能意义^[2], 该位点的 C > T 突变可导致 *MDR1* 的表达量和 P-gp 功能的明显下降^[3]。因此有必要研究 *MDR1C3435T* 基因多态性对 FK506 血药浓度 / 剂量比 (C/D) 及排斥反应、不良反应的影响, 以便为肾移植术后更加安全有效的应用该免疫抑制方案提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2006 年 8 月至 2008 年 10 月在福州某三甲医院首次接受肾移植术患者 129 例, 男性 111 例, 女性 18 例, 平均年龄 (37 ± 11) a, 平均体重 (61 ± 7.5) kg。

1.2 免疫抑制给药方案 免疫抑制治疗方案采用 FK506 + MMF + Pred 三联用药。FK506 (他克莫司片, 爱尔兰藤泽药品有限公司): 剂量为 0.15 ~ 0.30

[作者简介] 侯明明 (1982-), 女, 硕士研究生。Tel: (0591) 22859972, E-mail: ming19820615@163.com。

[通讯作者] 宋洪涛。Tel: (0591) 22859459, E-mail: sohoto@vip.sohu.com。

mg/(kg·d), 2次/d, 饭前 1 h或饭后 2 h口服给药, 首次剂量在肾移植术后 24 h内给予。如患者不能口服, 可静脉给药, 剂量为 0.05~0.10 mg/(kg·d), 均 24 h持续静滴。MMF(吗替麦考酚酯胶囊, 上海罗氏制药有限公司): 剂量为 0.5~2.0 g/d, 2次/d, 自术后第一天开始口服。激素: 术后一次性静脉给甲基强的松龙 500 mg, 以后每天减少 40 mg 直至 40 mg/d, 次日起口服 Pred 20 mg/d。

1.3 全血谷浓度测定 测定仪器为全自动微粒子酶免分析仪, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)对 FK506的全血谷浓度进行测定, 监测 FK506全血谷浓度, 根据血谷浓度值调整用药剂量, 维持术后 1个月内血药谷浓度值在 7~10 μg/L 范围内。统计时将血药浓度的结果变换为 C/D值进行分析, 即以血药浓度除以每日每公斤体重的 FK506剂量。

1.4 基因组 DNA的提取 对肾移植患者抽取静脉血 2~3 ml置 EDTA 抗凝管中低温(4℃)保存, 在一周内采用改良碘化钾法^[4]提取基因组 DNA。用紫外分光光度法测定所提取基因组 DNA的 OD260、OD280, 计算 OD260/OD280, OD260/OD280 >1.7 则其纯度合格。

1.5 PCR扩增

1.5.1 引物序列设计

F1: 5'-TGC TGG TCC TGA AGT TGA TCT GTG AAC-3'

F2: 5'-ACA TTA GGC AGT GAC TCG ATG AAG GCA-3'

1.5.2 PCR扩增体系 在 200 μl 薄壁管内, 以提取的 DNA(2 μl)为模板, 加入 10×PCR 缓冲液(2.5 μl)、dNTP(2.5 mmol/L, 2 μl)、正向与反向引物(20 mmol/L, 各 0.5 μl)及 Taq DNA 聚合酶(5 U/μl, 0.125 μl), 加双蒸水至反应总体积 25 μl, 混匀后进行 PCR 反应。

1.5.3 PCR扩增条件 94℃ 预变性 5 min, 变性、退火、延伸条件分别为 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 60 s, 最后 72℃ 5 min, 共 35 个循环。

1.6 限制性内切酶酶切 取 PCR 扩增产物 10 μl, 以限制酶 Sau3A I 于 37℃ 孵育酶切 4 h, 酶切反应完毕, 取 2 μl 10×loading buffer 终止反应, 取 15 μl 酶切产物 3% 琼脂糖凝胶上电泳, 1×TAE 电泳液, 电压 100 V, 30 min, 分子量标准为 20 bp DNA Marker 作为分子量标记, 在紫外灯下观察电泳结果。野生型纯合子(C/C)的 PCR 扩增产物内有两个限制性内切酶 Sau3A I 的识别位点, 可将此段 248 bp 的 PCR 产物消化成三条片段: 172 bp、59 bp 和 17 bp; 突变型纯合子(T/T)的 PCR 扩增产物内只有一个限制性内切酶

Sau3A I 的识别位点, 可将此段 248 bp 的 PCR 产物消化成两条片段: 231 bp 和 17 bp; 突变杂合子(C/T)的 PCR 扩增产物内一条链上有两个限制性内切酶 Sau3A I 的识别位点, 另一条链上有一个限制性内切酶 Sau3A I 的识别位点, 可将此段的 PCR 产物消化成四条片段: 231 bp、172 bp、59 bp 和 17 bp。

1.7 统计学方法 数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 统计分析使用 SPSS 13.0 软件。两组间比较采用配对 t 检验; 对于正态分布的参数, 分析差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA); 对于偏态分布的参数, 采用两独立样本的非参数检验; 计数资料间比较采用 χ^2 检验。显著性界限定为 0.05。

2 结果

2.1 MDR1C3435T 等位基因在肾移植患者中的突变频率 研究测得中国汉族肾移植患者 129 例中 MDR1C3435T 等位基因突变频率为 45.3%, 等位基因突变频率及基因型频率见表 1。经 Hardy-Weinberg 检验分析, 结果显示 $P > 0.05$, 所研究的 SNPs 位点上观察值与期望值相吻合, 各基因频率达到遗传平衡, 研究资料具有群体代表性。

表 1 MDR1C3435T 基因型频率及等位基因频率

等位基因	n	突变频率/%
C/C	36	27.9
C/T	69	53.5
T/T	24	18.6
C	141	54.6
T	117	45.3

2.2 基因多态性与肾移植患者术后 FK506 C/D 值的相关性 肾移植术后 1 个月内, MDR1C3435T 各基因型组间 FK506 的 C/D 值无显著性差异。结果如表 2 所示。

表 2 MDR1C3435T 基因多态性与 FK506 的 C/D 值的关系

基因型	n	FK506 谷浓度 (ng/ml)	FK506 日剂量 (mg/kg)	C/D 值 (ng/ml per mg/kg)
C/C	36	7.99 ± 2.44	0.070 ± 0.023	126.9 ± 52.0
C/T	69	7.33 ± 2.23	0.067 ± 0.027	129.0 ± 64.9
T/T	24	7.37 ± 2.25	0.063 ± 0.026	134.0 ± 58.1

2.3 基因多态性对肾移植术后急性排斥反应和不良反应的影响

2.3.1 急性排斥反应 我院使用 FK506 三联免疫抑制方案的 129 例肾移植患者中, 在移植术后 3 个月内共发生急性排斥反应 14 例, 发生率为 10.8%, 而 MDR1C3435T 各基因型组间在急性排斥反应发

生率上并无显著性差异。

2.3.2 不良反应 肾移植术后 3 个月内, C/C 型、C/T 型和 T/T 型组分别共有 27 例、53 例和 17 例患者发生不良反应, 不良反应发生率分别为 75.0%、76.8%

和 70.8%, 各基因型组间总不良反应发生率无显著性差异, 肝功能异常、高血糖、药物肾毒性、肺部感染、消化道症状、胆固醇增高和白细胞减少等方面的发生率各基因型组间也无显著性差异, 结果详见表 3。

表 3 MDR1C3435T 型患者的不良反应发生率

不良反应	C/C		C/T		T/T	
	n	发生率 / %	n	发生率 / %	n	发生率 / %
肝功能异常	1	2.9	6	8.7	3	12.5
高血糖	5	13.9	6	8.7	4	16.7
肾毒性	8	22.2	16	23.2	7	29.2
肺部感染	7	19.4	10	14.5	4	16.7
消化道症状	6	16.7	11	15.9	3	12.5
高血脂	4	11.1	6	8.7	2	8.3
白细胞减少	3	8.3	4	5.8	1	4.2

3 讨论

FK506 为脂溶性药物, 首过效应明显, 口服生物利用度在 4% ~ 89% 之间, 平均 20%, 个体差异显著。FK506 入血后与血浆蛋白具有高度亲和力, 主要与血浆清蛋白及酸性糖蛋白结合, 当血浆清蛋白浓度过低可增加其肾毒性, 而浓度过高则可降低药效并产生急性排斥反应。有研究表明, 导致 FK506 血药浓度的个体间差异最主要的原因在于首过效应的区别, 即肝脏对药物的代谢和清除, 以及肠道 CYP3A 亚家族的代谢和肠黏膜 P-gp 的“抗吸收作用”等^[5]。

研究表明 MDR1 基因的 SNPs 与 P-gp 的表达和功能变化有关。目前已经发现了 MDR1 基因的几种 SNPs, 其中在外显子 12、21 和 26 上发生的突变与 MDR1 基因的表达及 P-gp 的功能有关^[6]。目前关于 MDR1 基因 SNPs 与免疫抑制剂生物利用度关系的研究结果并不一致。Von Ahnsen 等^[7]发现在稳定的肾移植受者中 MDR1 外显子 26 上的 C3435T 突变与 CsA 谷浓度无关。然而, 别的研究却发现该 SNP 可以提高 CsA 的 AUC 达 22%。此外, Yamauchi 等^[8]发现外显子 21 上 2677 位突变是 FK506 神经毒性的阳性预测因素, C3435T 却不是。

我们的试验探讨了移植术后早期 (1 个月内) 中国肾移植人群中 MDR1 的 C3435T 位点基因多态性对 FK506 的 C/D 值以及急性排斥反应及不良反应的影响, 发现患者 MDR1 的 C3435T 基因多态性与 FK506 的 C/D 值之间无显著相关性, 术后 3 个月内各基因型组患者间在急性排斥反应及不良反应发生率也无显著性差异。P-gp 在体内多个器官表达, 底物种类多样且作用过程复杂, 各底物之间可能也会

出现相互作用。不仅仅是 MDR1 基因的单核苷酸多态性会影响 P-gp 的表达水平和功能, 还要综合考虑多种因素的影响, 如药物代谢相关酶基因多态性对药物的影响、患者不同的病理生理状态等, 故在肾移植领域探讨 FK506 与 MDR1 的基因多态性还需要进行多方面多因素的综合分析。

【参考文献】

- [1] 侯明明, 高菲, 宋洪涛. 肾移植术后 2 组免疫抑制剂用药方案的成本-效果分析 [J]. 中国药房, 2009, 20(5): 331.
- [2] 胡永芳, 周宏灏. CYP3A4, CYP3A5 和 MDR1 基因多态性对环孢素处置的影响 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(3): 257.
- [3] Ruzilawati AB, Suhaimi AW, Gan SH. Genetic polymorphisms of CYP3A4: CYP3A4 * 18 allele is found in five healthy Malaysian subjects [J]. Clinica Chimica Acta, 2007, 383(8): 158.
- [4] 涂向东, 江清华, 兰风华. 三种简易提取全血基因组 DNA 方法的比较 [J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(3): 264.
- [5] Mancnellil M, Frassetto L, Florenl C. The pharmacokinetics and metabolic disposition of tacrolimus: a comparison across ethnic groups [J]. Clin pharmacol Ther, 2001, 69(1): 24.
- [6] Paulussen A, Lavrijsen K, Bohets H, et al. Two linked mutations in transcriptional regulatory elements of the CYP3A5 gene constitute the idaj of genetic determinant of polymorphic activity in humans [J]. Pharmacogenetics, 2000, 10(3): 415.
- [7] Von Ahnsen N, Richter M, Grupp C, et al. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose adjusted cyclosporine A trough concentrations of rejection incidence in stable renal transplant recipients [J]. Clin Chem, 2001, 47(3): 1048.
- [8] Yamauchi A, Leiri I, Kataoka Y, et al. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene [J]. Transplantation, 2002, 74: 571.

[收稿日期] 2009-06-29

[修回日期] 2009-08-18