

· 论著 ·

MDR1 基因多态性和单倍体对肾移植术后稳定期患者他克莫司浓度/剂量比值的影响

张燕青^a, 陈锦珊^a, 李金雨^b, 林秀丽^a, 石鹤坤^a, 林小凤^a (解放军 175 医院, a. 药学科; b. 泌尿外科, 福建 漳州 363000)

[摘要] **目的** 探讨 MDR1 C1236T、G2677T/A 和 C3435T 基因多态性和单倍体对中国汉族肾移植术后稳定期患者他克莫司浓度/剂量比值的影响, 为他克莫司个体化用药提供依据。**方法** 采用 PCR-基因测序法检测 104 例肾移植术后稳定期患者 MDR1 C1236T、G2677T/A 和 C3435T 的基因多态性, 采用均相酶免疫测定方法 (EMIT 法) 测定他克莫司的谷浓度, 比较不同基因型患者之间他克莫司血药浓度/(剂量×体质量)(C/D) 比值。**结果** 104 例患者中, MDR1 C1236T、G2677T/A 和 C3435T 突变频率分别为 56.73%、55.77% 和 33.17%。MDR1 C3435T、MDR1 TTT 单倍体与他克莫司 C/D 比值具有相关性 ($P < 0.05$)。CYP3A5 * 3 * 3 患者中, MDR1 TTT 单倍体与他克莫司 C/D 比值仍存在显著相关 ($P < 0.05$)。MDR1 C1236T、G2677T/A、CGC 单倍体与他克莫司 C/D 比值无显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论** MDR1 C3435T、MDR1 TTT 单倍体与中国汉族肾移植术后稳定期患者他克莫司 C/D 比值具有显著相关性, 是影响肾移植患者他克莫司浓度个体化差异的重要因素。

[关键词] 肾移植; 他克莫司; 多药耐药基因; 基因多态性; 单倍体

[中图分类号] R979.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)05-0415-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.05.008

Influence of multidrug resistant gene polymorphisms and haplotype on blood concentration of tacrolimus in individuals in stable phases after renal transplantation

ZHANG Yanqing^a, CHEN Jinshan^a, LI Jinyu^b, LIN Xiuli^a, SHI Hekun^a, LIN Xiaofeng^a (No. 175 Hospital of PLA, a. Department of Pharmacy, b. Department of Urology, Zhangzhou 363000, China)

[Abstract] **Objective** To study the relevance between the polymorphisms and haplotype of multidrug resistant gene (MDR1) and the ratio of blood concentration/dosage in individuals treated by tacrolimus in stable phases post renal transplantation, and to provide data for personalized FK-506 administration. **Methods** The MDR1 C1236T, G2677T/A and C3435T genotypes of 104 renal transplantation patients were determined by PCR followed sequencing method. The blood concentration of tacrolimus was detected by EMIT method. The differences in concentration/(dose×weight) (C/D) ratios were compared among all of the genotype groups treated by tacrolimus. **Results** In the 104 renal transplantation recipients, the frequency of MDR1 C1236T, G2677T/A and C3435T mutation alleles was 56.73%, 55.77% and 33.17%, respectively. A correlation was revealed among SNP of MDR1 C3435T, TTT haplotype and the C/D ratios ($P < 0.05$). In patients of CYP3A5 * 3 * 3, A correlation was also found among TTT haplotype and the C/D ratios ($P < 0.05$). No difference was found among the MDR1 C1236T, G2677T/A, CGC haplotype and the C/D ratios ($P > 0.05$). **Conclusion** It is demonstrated that genetic polymorphisms of MDR1 C3435T and TTT haplotype are correlated with C/D ratio of tacrolimus in Chinese renal transplant patients in stable stage. These findings affect the dose-adjusted concentration of tacrolimus individually.

[Key words] renal transplantation; tacrolimus; MDR1; polymorphisms; haplotype

肾移植术后患者需要长期甚至终身接受免疫抑制剂治疗, 其中钙调磷酸酶抑制剂他克莫司 (FK-506)

已逐渐取代环孢素 (CsA), 成为预防和治疗肾移植术后排斥反应的首选药物^[1, 2]。研究表明, 他克莫司血药浓度与排斥反应和毒副作用密切相关^[3]。

药物转运体 P-糖蛋白 (P-gp) 是多药耐药基因 1 (multi drug resistance 1, MDR1) 编码的产物, 主要作用是能量依赖性地将作用底物由细胞膜内转运至细胞膜外, 其基因多态性会影响 P-gp 的活性和功能。他克莫司是 P-gp 的底物, 编码 P-gp 的基因表

[基金项目] 漳州市科学技术局科研课题 (ZZ2012J27)

[作者简介] 张燕青, 硕士, 药师. 研究方向: 临床药学. Tel: (0596) 2975804; E-mail: yanqing0108@163.com

[通讯作者] 陈锦珊, 主管药师. 研究方向: 医院药学、临床药学. Tel: (0596) 2975795; E-mail: cjs1223@sohu.com

现高度多态性,不同的基因变异携带者对他克莫司的代谢和疗效具有重要影响^[4]。在已发现的 48 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)中,外显子 21、26 和 12 的 G2677T/A、C3435T 和 C1236T SNP 具有重要的功能意义,且它们之间有一定的连锁,其连锁程度在不同种族间差异很大。本研究旨在考察 MDR1 (G2677T/A、C3435T 和 C1236T)多态性和单倍体对中国汉族肾移植术后稳定期患者他克莫司血药浓度/(剂量×体质量)(C/D)的影响,进而探讨基因多态性与药效的关系,为临床个体化给药提供参考。

1 试剂与仪器

他克莫司检测试剂盒、标准曲线试剂盒和质控试剂盒(Siemens Healthcar Diagnostics Inc.);人血基因组 DNA 提取试剂盒(Omega);引物合成和 PCR 产物基因测序由华大基因科技有限公司完成;Viva-E 型药物浓度分析仪(德国西门子);高速离心机(美国 Thermo);PCR 仪(杭州博日)。

2 方法

2.1 研究对象 选择 2013 年 6 月至 2014 年 12 月在解放军 175 医院门诊复诊的采用他克莫司+吗替麦考酚酯+糖皮质激素三联免疫抑制抗排斥的汉族肾移植术后稳定期(>6 个月)受者 104 例,均签订知情同意书。其中,男 75 例,女 29 例,年龄 17~65 (43.3±10.7)岁,体质量 42~87 (59.9±10.7) kg。排除标准:①移植肾功能正常,血清肌酐 > 300 μmol/L;②因感染等因素使用与他克莫司存在相互作用的药物,尤其是大环内酯类抗生素及酮康

唑、氟康唑、克霉唑等抗真菌药物;③需服用与他克莫司存在相互作用的利福平的结核病患者;④服用葡萄柚汁及地尔硫、硝苯地平、五酯制剂等食物或药物以提高他克莫司浓度的受者。

2.2 观察指标

2.2.1 临床指标 收集入选患者的性别、年龄、身高、体质量、服药量、激素剂量、合并用药、血脂、红细胞比容、血清白蛋白、肝功能等指标。

2.2.2 实验室指标 ①他克莫司全血谷浓度测定:对入选患者严格规范服药时间和采血时间,前 1 日晚 20:00 服用他克莫司,次日晨 8:00 服药前抽血 2 ml,加入 EDTA 抗凝备用,测定他克莫司全血谷浓度。②C1236T 和 G2677T/A、C3435T 基因分型检测:采用 Omega 血液基因组 DNA 提取试剂盒,按照说明书提取 DNA。采用基因测序法对 C1236T 和 G2677T/A、C3435T 进行基因分型,扩增引物见表 1,测序图谱见图 1。实验条件:①反应体系:DNA 样本 1 μl,前后引物各 1 μl,KAPA2G Fast Multiplex Mix 12.5 μl,水 9.5 μl。②反应程序:94 °C 5 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 90 s,30 次循环;72 °C 5 min。

表 1 C1236T 和 G2677T/A、C3435T 等位基因扩增引物

SNP	扩增引物	产物大小(bp)
MDR1 C1236T	F:5'-ttcgaagagtgggcacaacc-3' R:5'-ctgatcaccgcagggtcta-3'	427
MDR1 G2677T/A	F:5'-gctataggttcagggttgc-3' R:5'-tccaagaactggcttgc-3'	389
MDR1 C3435T	F:5'-ttcaaagtgtgctgtcc-3' R:5'-acctgaagtggtegaacac-3'	488

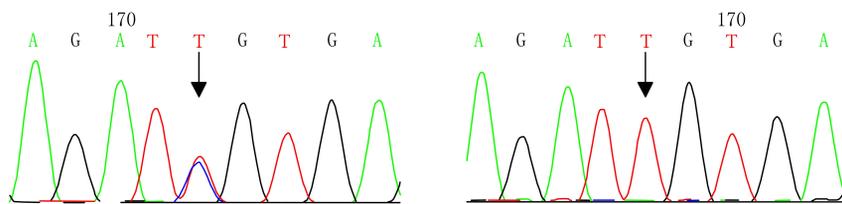


图 1 MDR1 C3435T PCR 产物测序图

注:箭头所指处表示突变位置

2.3 统计方法 采用 SPSS 20.0 软件和 SHEsis 在线平台(<http://analysis.bio-x.cn/myAnalysis.php>)进行统计分析,所有计量数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有统计检验均为双侧检验,显著性水平为 $P \leq 0.05$;检测样本等位基因频率是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律采用卡方(χ^2)检验;血药浓度数据经正态检验和方差齐性分析,符合正态分

布,不同基因型的他克莫司浓度/(剂量×体质量)的比较采用 t 检验或单因素方差分析(ANOVA)。

3 结果

3.1 MDR1 C1236T、G2677T/A 和 C3435T 等位基因频率 104 例汉族肾移植患者 MDR1 C1236T、G2677T/A 和 C3435T 基因型频率和等位基因频率

见表2,突变频率分别为56.73%、55.77%和33.17%。对基因型进行Hardy-Weinberg遗传平衡检验($P>0.05$),表明研究资料具有群体代表性。

表2 104例汉族肾移植患者MDR1 C1236T、G2677T/A和C3435T基因频率

基因型	等位基因频率 (%)	基因型频率 (%)
MDR1 C1236T	C 90(43.27)	CC 20(19.23)
	T 118(56.73)	CT 50(48.08)
		TT 34(32.69)
MDR1 G2677T/A	G 92(44.23)	GG 25(24.04)
	A 45(21.63)	GA 20(19.23)
	T 71(34.14)	GT 22(21.15)
		AT 17(16.35)
		AA 4(3.85)
		TT 16(15.38)
MDR1 C3435T	C 139(66.83)	CC 50(48.08)
	T 69(33.17)	CT 39(37.50)
		TT 15(14.42)

采用SHEsis在线平台分析连锁不平衡关系,结果显示,G2677T/A与C3435T、C1236T与C3435T、G2677T/A与C1236T之间标准化的连锁不平衡系数 D' 和相关系数 r^2 分别为 $D'=0.955, r^2=0.48$; $D'=0.585, r^2=0.129$; $D'=0.378, r^2=0.078$ 。研究表明,G2677T/A与C3435T、C1236T与C3435T存在一定程度的连锁。对MDR1单倍体进一步分析发现了4种主要单倍体和6种次要单倍体。4种主要单倍体为:TTT(27.3%)、CGC(22%)、TGC(21.3%)、CAC(14.7%),6种次要单倍体共占14.7%。54.8%(57/104)患者的G2677T/A与C3435T为单倍体连锁;24.04%(25/104)患者的C1236T、G2677T/A和C3435T为单倍体连锁。

3.2 MDR1基因多态性对他克莫司C/D比值的影响 根据给药剂量和体质量将血药浓度标准化,以观察MDR1基因多态性对血药浓度的影响。结果显示(表3),MDR1 C1236T和MDR1 G2677T/A各组之间比较无显著差异($P>0.05$),表明MDR1 C1236T和MDR1 G2677T/A对肾移植术后稳定期患者他克莫司的C/D值无明显影响;MDR1 3435CC型C/D比值明显低于CT+TT型,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3.3 MDR1单倍体对他克莫司C/D比值的影响 根据连锁不平衡分析结果,对MDR1主要单倍体TTT和CGC与他克莫司的C/D比值进行研究,结果见表4。TTT型携带者与非携带者他克莫司的C/D比值存在显著性差异($P<0.05$),而CGC型

表3 MDR1基因多态性对他克莫司C/D值的影响

SNP	C/D($\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}/\text{ml} \cdot \text{mg}^{-1}$)
MDR1 C1236T	CC 131.89±76.65
	CT 156.56±92.40
	TT 152.80±73.49
MDR1 G2677T/A	GG 120.65±63.29
	GT+GA 151.28±79.76
	TT+TA+AA 170.02±94.83
MDR1 C3435T	CC 130.70±76.27
	CT+TT 169.00±86.22*

* $P<0.05$,与MDR1 3435CC比较

表4 MDR1单倍体对他克莫司C/D值的影响

单倍体	C/D($\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}/\text{ml} \cdot \text{mg}^{-1}$)
TTT	携带者 171.66±85.56
	非携带者 131.80±77.53*
CGC	携带者 144.17±80.82
	非携带者 156.08±85.97

* $P<0.05$,与MDR1 TTT单倍体比较

携带者与非携带者他克莫司的C/D比值无明显差异($P>0.05$)。他克莫司是CYP3A酶和P-gp的共同底物。P-gp的活性可调整CYP3A5酶对他克莫司的代谢,故选择不表达CYP3A5酶即CYA5*3*3患者评价P-gp独立的功能。对65例CYA5*3*3基因型患者进行MDR1单倍体分析,结果TTT型携带者他克莫司的C/D比值显著高于非TTT型携带者($P<0.05$,表5)。

表5 携带CYA5*3*3的MDR1单倍体对他克莫司C/D值的影响

单倍体	C/D($\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1}/\text{ml} \cdot \text{mg}^{-1}$)
TTT	携带者 201.47±89.90
	非携带者 150.29±85.93*
CGC	携带者 166.01±91.64
	非携带者 156.08±85.97

* $P<0.05$,与CYA5*3*3 MDR1 TTT携带者比较

4 讨论

他克莫司在药动学和毒理学方面存在明显的个体差异,且治疗窗窄,如果用药不当极易引起排斥反应或肾毒性等不良反应,因此稳态的靶血药浓度对保证肾移植术后的疗效和移植患者的存活率极为重要。研究表明,遗传因素是他克莫司血药浓度个体差异的重要原因。因此,研究MDR1多态性和单倍体对他克莫司C/D比值的影响,能为肾移植患者他克莫司个体化给药提供依据。国内在他克莫司与药物基因组学的研究中,入选患者未排除服用五酯制

剂对他克莫司血药浓度的影响^[5-7],本研究严格排除服用五酯制剂等药物的病例,较客观地反应了肾移植术后稳定期患者血药浓度个体化差异的药物基因组学因素。本研究中基因分型方法采用直接测序法,该方法是基因突变检测的金标准,具有准确性高、方法简单快捷等优点。

本研究中 104 例肾移植患者的 MDR1 C1236T、G2677T/A 和 C3435T 等位基因突变频率均达到遗传平衡,与文献报道的中国汉族人群各位点突变频率基本一致^[8]。G2677T/A 与 C3435T 存在较强的连锁,C1236T 与 C3435T 存在一定程度的连锁,与文献报道基本吻合^[9]。TTT 单倍体的频率为 27.3%,说明突变单倍体在中国汉族人群中频率较高。

研究结果显示,MDR1 C1236T、G2677T/A 与肾移植术后稳定期患者的他克莫司 C/D 比值无显著相关,C3435T 与他克莫司 C/D 比值存在显著相关性,突变型患者 C/D 比值较野生型患者高,即 MDR1 C3435T 野生型肾移植患者可能需要服用较高剂量的他克莫司才能达到治疗靶浓度,与 Wu 等^[10]的研究结果一致。MDR1 C3435T 基因突变降低了 P-gp 活性,主动将药物泵出细胞外的能力下降,进而表现为细胞内的药物浓度高于野生型患者。这提示 MDR1 C3435T 基因多态性可能是他克莫司药动学个体差异的重要原因。但也有研究发现 MDR1 C3435T 基因多态性与他克莫司 C/D 比值无相关性^[11,12]。因 MDR1 C1236T、G2677T/A 和 C3435T 存在连锁不平衡,对他克莫司的药动学影响较复杂,采用单倍体分析可能更好地解释他克莫司血药浓度的差异。

本研究发现,MDR1 基因 TTT 单倍体与他克莫司血药浓度具有显著相关性;排除 CYP3A5 * 3 多态性对 P-gp 活性的影响,CYA5 * 3 * 3 基因型患者中,TTT 单倍体与他克莫司血药浓度仍存在显著相关。而 MDR1 基因 CGC 单倍体对他克莫司血药浓度无影响。携带 TTT 单倍体患者他克莫司 C/D 比值显著高于非携带者,表明携带 TTT 单倍体患者仅需服用较低剂量的他克莫司,便可达到有效的血药浓度,与 Cusinato 等^[13]的研究结果相近。携带 TTT 单倍体患者比携带单个突变位点的 P-gp 活性更低,主动转运药物能力更弱,进一步解释了 TTT 单倍体患者具有较高的他克莫司 C/D 比值。

综上所述,MDR1 C3435T 和 TTT 单倍体与肾移植术后稳定期患者他克莫司 C/D 比值具有显著相关性。MDR1 C3435T 和 TTT 单倍体是中国汉族肾移植人群稳定期他克莫司药动学的主要影响因

素之一,故临床上使用他克莫司时不仅需考虑 MDR1 C3435T,还要结合单倍体对他克莫司浓度的影响,综合分析 MDR1 多态性对他克莫司血药浓度的影响。

【参考文献】

- [1] Margreiter R. Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study [J]. *Lancet*, 2002, 359: 741-746.
- [2] Sandrini S, Aslam N, Tardanico R, et al. Tacrolimus versus cyclosporine for early steroid withdrawal after renal transplantation [J]. *J Nephrol*, 2012, 25(1):43-49.
- [3] Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, et al. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European Consensus Conference [J]. *Ther Drug Monit*, 2009, 31(2):139-152.
- [4] Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 2000, 97(7):3473-3478.
- [5] 曾明, 邸晓辉, 赵维娟, 等. 五酯胶囊(片)对他克莫司血药浓度及药动学参数影响的 Meta 分析 [J]. *解放军药学学报*, 2014, 30(5):405-409.
- [6] 吴雪, 蔡林, 石珊平, 等. 五酯胶囊对肾移植患者他克莫司血药浓度的影响 [J]. *中国药房*, 2013, 24(43):4094-4097.
- [7] 刘龙山, 王长希, 傅茜, 等. 五酯片用于肾移植患者对他克莫司药代动力学的影响及长期疗效观察 [J]. *器官移植*, 2012, 3(1):33-36.
- [8] 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):257-261.
- [9] 李丹滢, 方芸. CYP3A4/5, ABCB1 基因单倍型与中国肾移植患者他克莫司血药谷浓度相关性研究 [J]. *药学与临床研究*, 2014, 22(1):20-24.
- [10] Wu P, Ni X, Wang M, et al. Polymorphisms in CYP3A5 * 3 and MDR1, and haplotype modulate response to plasma levels of tacrolimus in Chinese renal transplant patients [J]. *Ann Transplant*, 2011, 16(1):54-60.
- [11] Glowacki F, Lionet A, Buob D, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(9):3046-3050.
- [12] Rong G, Jing L, Deng L, et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese renal transplant recipients [J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(9):3455-3458.
- [13] Cusinato DA, Lacchini R, Romao EA, et al. Relationship of CYP3A5 genotype and ABCB1 diplotype to tacrolimus disposition in Brazilian kidney transplant patients [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, 78(2):364-72.

[收稿日期] 2015-03-09 [修回日期] 2015-07-06

[本文编辑] 李睿曼