

·临床研究·

供受体 CYP3A5 和 MDR1 基因多态性与肝移植术后患者他克莫司浓度/剂量比的关系

李 洋, 姜 楠, 郭 宇, 陈冠中, 张 琪, 陆敏强, 杨 扬, 陈规划*

(中山大学附属第三医院肝移植科, 广东 广州 510630)

摘 要:【目的】研究肝移植供受体 CYP3A5 和 MDR1 基因多态性对患者术后他克莫司浓度/剂量比的影响。【方法】选取我中心 32 例肝移植供受体,测定患者术后 1、2、4、12 周体重质量、他克莫司用量及药谷浓度等指标,采用聚合酶链式反应-限制性内切片段长度多态性(PCR-RFLP)方法测定供受体基因分型,比较不同基因型对患者他克莫司浓度/剂量比的影响。【结果】供体 CYP3A5 * 1/* 1 和 * 1/* 3 型患者术后 2、4、12 周他克莫司浓度/剂量比明显低于 * 3/* 3 型患者 ($P < 0.05$);受体 CYP3A5 * 1/* 3 基因型,供受体 MDR1 2677GG/GA 基因型各组间他克莫司浓度/剂量比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。联合分析供受体 CYP3A5 基因型,术后 2、4、12 周,不论受体基因型如何,供体为 CYP3A5 * 3/* 3 基因型患者他克莫司浓度/剂量比均高于供体为 CYP3A5 * 1/* 1 和 CYP3A5 * 1/* 3 基因型患者 ($P < 0.05$);供体基因型相同时,受体组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。【结论】肝移植供体 CYP3A5 * 3 基因多态性与他克莫司浓度/剂量比明显相关,供体携带 * 1 等位基因的患者需更高剂量他克莫司才能达到目标血药浓度。

关键词: 肝移植;他克莫司;CYP3A5;MDR1;基因多态性

中图分类号: R657.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)01-0049-05

Effect of CYP3A5 and MDR1 Gene Polymorphism in both Donor and Recipient on Concentration /Dose Ratios of Tacrolimus in Liver Transplant Patients

LI Yang, JIANG Nan, GUO Yu, CHEN Guan-zhong, ZHANG Qi, LU Min-qiang, YANG Yang, CHEN GUI-hua*

(Department of Liver Surgery and Liver Transplantation Center, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou

510630, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphism in the donor/recipient on the concentration /dose ratio of Tacrolimus in Chinese liver transplant patients. 【Methods】Blood samples were collected from liver transplant patients who received Tacrolimus in the third affiliated hospital of Sun Yat-sen university, and the tissue samples were collected from the corresponding donors. The CYP3A5 andMDR1 genotypes were determined by PCR-RFLP method. At 1,2,4 and 12 weeks after transplantation, Tacrolimus doses (mg/kg/day) and trough blood levels (C0) were determined. 【Results】The concentration /dose ratios of patients with CYP3A5 * 1/* 1 and CYP3A5 * 1/* 3 donors were significantly lower than those with CYP3A5 * 3/* 3 patients at 2,4 and 12 weeks after liver transplantation. No difference was found among the MDR1 genotypes in donor /recipients or CYP3A5 genotypes in recipients. The same results were found in the analysis of the combination of both donors and recipients. 【Conclusion】CYP3A5 * 1/* 3 polymorphism in the donor is correlated with the whole blood concentration /dose ratio in Chinese liver transplant patients. Donors with CYP3A5 * 1 allele require more tacrolimus to reach target concentrations compared to those with CYP3A5 * 3/* 3 genotype.

Key words: liver transplantation; tacrolimus; CYP3A5; MDR1; gene polymorphism

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(1):49-53]

收稿日期:2011-09-23

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2009CB522404);广州市科技计划项目(2009Z1-E211)

作者简介:李洋,医学硕士,住院医师,研究方向:免疫抑制剂个体化用药,E-mail: liyang840920@hotmail.com; * 通信作者:陈规划,教授, E-mail: chgh1955@263.net

他克莫司是肝移植术后抗排斥治疗的基础用药,但其具有治疗指数狭窄、药代动力学及毒理学个体差异性大等缺点,临床上根据血药浓度调控药物剂量无法满足个体化用药的需求。近年研究表明,影响他克莫司/环孢素药动学的遗传因素主要和药物代谢酶细胞色素 P450 家族 CYP3A5 及 MDR1 的基因多态性有关^[1],因此了解 CYP3A5 及 MDR1 的基因型对 FK506 的个体化应用具有一定的指导意义。本文通过测定供受体 CYP3A5 和 MDR1 的单核苷酸基因多态性,研究及其对他克莫司浓度剂量比的关系。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

DNA 聚合酶及 PCR 等相关试剂 (TaKaRa 公司),PCR 仪 (GeneAmp PCR System 2400 型),DNA 电泳仪 (上海 Tanon HE-120),天能凝胶电泳 (上海 VE-186),凝胶成像系统 (陪清科技 380A)。

1.2 研究对象

2009 年 2 月至 2009 年 6 月期间本中心符合入选标准的肝移植患者及其对应供体,各 32 例,其中受体组,男性 26 例,女性 6 例,年龄 35~62 岁,平均年龄 43.3 岁,活体肝移植 2 例,全肝移植 30 例。所有患者术后均采用他克莫司+泼尼松三联抗排斥治疗,未出现严重感染或排斥反应,未服用利福平、红霉素等影响 P450 活性的药物,规律随访。

1.3 他克莫司浓度/剂量比测定

他克莫司于术后 1 d 开始口服,初始剂量 1~2 mg/d,间隔 12 h 服用,患者于前晚 8 点口服他克莫司,次日清晨 8 点服用他克莫司前测定血药谷浓度,根据血药浓度调整用量。根据服药剂量、患者体质量及血药谷浓度,分别计算肝移植术后 1、2、4、12 周每天每千克体质量的用药剂量及浓度/剂量比值。

1.4 聚合酶链式反应-限制性内切片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法分析 CYP3A5、MDR1 基因多态性

32 例受体及 2 例活体肝移植供体均取外周静脉血 1 mL,EDTA-Na 抗凝管保存于-30℃冰箱。29 例原位肝移植术供体留取组织标本,保存于-80℃冰箱,基因提取均使用 TaKaRa 试剂盒 D9081。供受体血液及组织标本提取 DNA 后,均采用聚合酶

链式反应-限制性内切片段长度多态性 (PCR-RFLP) 方法测定基因型。CYP3A5 6986 位点上游引物序列为:5'-CATGACTTAGTAGACAGATGAC'-3,下游引物序列为 CYP3A5R:5'-GGTCCAAACAGGGAAGAAATA'-3。MDR1 外显子 21 G2677A 位点上游引物序列为 G2677AF:5'-TACCCATCATTGCAATAGCAG'-3,下游引物序列为 G2677AR:5'-TTTAGTTTTGACTCACCTTTCTAG'-3。PCR 反应过程如下:98℃预变性 3 min 后,98℃变性 15 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,共循环 34 次,最后再 72℃延伸 5 min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,目的条带为 293 bp。PCR 产物进行切胶回收后,于 37℃水浴中行酶切鉴定 2 h,酶切产物在 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳后判定结果。

1.5 统计分析

所有计数资料均采用均数±标准差表示,多组之间比较采用 Kruskal-Wallis 检验,两组间比较采用 Mann-Whitney U 检验,所有统计分析均通过 SPSS 13.0 统计软件完成。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 CYP3A5 及 MDR1 基因分型结果

供受体 CYP3A5 基因型均以 *3/*3 型最多,*1/*1 型最少;MDR1 中均以 GG 型最多,AA 型在供受体中均未检测到,两组基因供受体间差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

2.2 供受体 CYP3A5 基因多态性与肝移植患者术后他克莫司浓度/剂量比关系

术后 1 周他克莫司浓度/剂量比与供体 CYP3A5 基因型未发现相关性,而术后 2、4、12 周他克莫司浓度/剂量比与供体 CYP3A5 基因型明显相关,供体携带 *1 等位基因患者该值明显低于仅携带 *3 等位基因的患者,差异有统计学意义($P<0.05$);组间比较,供体基因型为 CYP3A5 *1/*1 与 CYP3A5 *3/*3,基因型为 CYP3A5 *1/*3 与 CYP3A5 *3/*3 间差异均有统计学意义($P<0.05$);供体携带等位基因 *1 组患者中,基因型为 CYP3A5 *1/*1 与 CYP3A5 *1/*3 组患者间差异无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

单独分析受体,术后 1、2、4、12 周,CYP3A5 基因型与他克莫司浓度/剂量比均无其无明显相关($P>0.05$,表 3)。

表 1 CYP3A5 及 MDR-1 基因分型
Table 1 Frequency of CYP3A5 and MDR1 genotypes in liver transplant patients

Gene	Position	Genotype	Donors (n)	Frequency (%)	Recipients (n)	Frequency (%)
CYP3A5	Intron 3	AA (* 1 / * 1)	5	15.6	1	3.1
	A6986G	AG (* 1 / * 3)	8	25	11	34.4
		GG (* 3 / * 3)	19	59.4	20	62.5
MDR1	Exon 21	GG	23	71.9	29	90.1
	G2677A	GA	9	28.1	3	9.9
		AA	0	0	0	0

表 2 供体 CYP3A5 基因型对患者他克莫司浓度/剂量比的影响
Table 2 Effect of Donors' CYP3A5 genotype on Tacrolimus C/D ratio

Time	Donors' CYP3A5 genotype								
	CYP3A5 * 1 / * 1 (n = 5)			CYP3A5 * 1 / * 3 (n = 8)			CYP3A5 * 3 / * 3 (n = 19)		
	C/(ng·mL ⁻¹)	D/(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	C/D(mg·d·mL ⁻¹)	C/(ng·mL ⁻¹)	D/(mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	C/D/(mg·d·mL ⁻¹)	C/(ng·mL ⁻¹)	D/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	C/D/(mg·d·mL ⁻¹)
1 st week	11.4 ± 7.8	0.036 ± 0.014	238 ± 111	9.8 ± 6.3	0.034 ± 0.015	322 ± 122	9 ± 5	0.035 ± 0.021	309 ± 230
2 nd week	7.0 ± 2.5	0.084 ± 0.024	80 ± 11	8.9 ± 2.5	0.093 ± 0.019	95 ± 17	10 ± 4	0.061 ± 0.017 ¹⁾	168 ± 47 ¹⁾
4 th week	8.3 ± 4.4	0.103 ± 0.016	81 ± 38	8.9 ± 4.6	0.099 ± 0.015	87 ± 42	9 ± 6	0.061 ± 0.017 ¹⁾	149 ± 69 ¹⁾
12 th week	8.0 ± 0.7	0.098 ± 0.013	83 ± 19	8.1 ± 2.6	0.100 ± 0.024	85 ± 31	10 ± 3	0.075 ± 0.021 ¹⁾	130 ± 33 ¹⁾

1) $P < 0.05$

表 3 受体 CYP3A5 基因型对患者他克莫司浓度/剂量比的影响
Table 3 Effect of Recipients' CYP3A5 genotype on Tacrolimus C/D ratio

Time	C/D Ratio (mg·d·mL ⁻¹)		
	CYP3A5 * 1 / * 1	CYP3A5 * 1 / * 3	CYP3A5 * 3 / * 3
	(n = 1)	(n = 11)	(n = 20)
1 st week	192	299 ± 119	308 ± 227
2 nd week	192	118 ± 57	143 ± 51
4 th week	257	116 ± 47	120 ± 72
12 th week	198	106 ± 29	120 ± 38

联合供受体 CYP3A5 基因型分析, 将携带 CYP3A5 * 1 患者定为 * 1 组, 仅携带 CYP3A5 * 3 患者定为 * 3 组。联合分析供受体 CYP3A5 基因型, 术后 2、4、12 周, 不论受体基因型如何, 供体为 CYP3A5 * 3 / * 3 基因型患者他克莫司浓度/剂量比均高于供体为 CYP3A5 * 1 / * 1 和 CYP3A5 * 1 / * 3 基因型患者 ($P < 0.05$); 供体基因型相同时, 受体组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1)。

2.3 供受体 MDR1 基因多态性与肝移植患者术后他克莫司浓度/剂量比值关系

术后 1、2、4、12 周, 单独及联合分析供受体 MDR1 2677 基因型与他克莫司剂量、他克莫司浓

度/剂量比均无明显相关 ($P > 0.05$, 表 4)。

3 讨 论

他克莫司是肝移植术后抗排斥治疗基础用药, 不同个体口服生物利用度在 4% ~ 89%^[2], 造成个体差异的主要原因在于肠道的首过效应及肝脏对药物的代谢清除^[3]。国内外相关研究集中于供体肝脏对其代谢的影响, 而受体本身对代谢的影响目前还不明确。本研究就供、受体双方 CYP3A5、MRD1 基因多态性与他克莫司浓度/剂量比的关系进行分析, 我们发现供体与他克莫司代谢明显相关的 CYP3A5 基因, 在受体方面两者却无相关性。为排除供受体相互影响导致偏差, 我们进一步分层分析, 更加全面的探讨了两者关系。

CYP3A5 基因位于 7 号染色体。CYP3A5 野生型定义为 * 1, 其第 3 内含子 6986 位点为腺嘌呤 A, 若突变为鸟嘌呤 G, 则定义为 * 3。该位点单核苷酸突变, 会导致转录的 RNA 在 109 位点提前出现终止密码子, 翻译出无功能蛋白片段^[4]。本研究中, CYP3A5 * 1 等位基因频率为 24%。而白种人为 10%~15%, 黑种人则高达 60%~80%, 因此可见 CYP3A5 遗传多态性在种族间也存在明显差异, 提示研究我国人群 CYP3A5 遗传多态性的必要性^[5]。

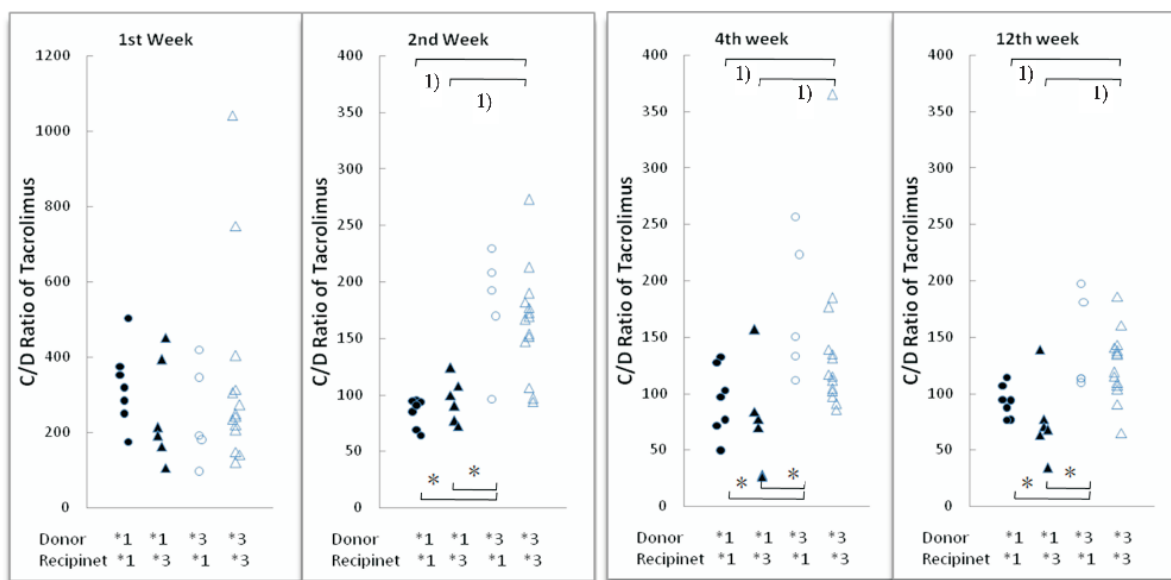


图 1 术后 1、2、4、12 周供受体 CYP3A5 基因型对他克莫司浓度/剂量比的影响

Fig.1 Effect of both donors & recipients' CYP3A5 genotype on Tacrolimus C/D ratio

The influence of both donors and recipients' CYP3A5 genotype on the concentration/dose (C/D) ratio of tacrolimus in 1, 2, 4, 12 weeks. The cases in which CYP3A5 genotype was determined in both donors and recipients were categorized into four groups based on donors' genotype and recipients' genotype (*1, CYP3A5 *1/*1 and CYP3A5 *1/*3; *3, CYP3A5 *3/*3). The C/D ratio of tacrolimus is compared in each group. 1) $P < 0.05$, significant difference between groups.

表 4 供受体 MDR1 基因型对患者他克莫司浓度/剂量比的影响

Table 4 Effect of donors'/recipients' MDR1 genotype on Tacrolimus C/D ratio

Time	C / D Ratio (mg·d·mL ⁻¹)			
	Donors' MDR1		Recipients' MDR1	
	2677GA (n=9)	2677GG (n=23)	2677GA (n=3)	2677GG (n=28)
1 st week	279 ± 128	310 ± 213	418 ± 293	289 ± 180
2 nd week	116 ± 52	144 ± 54	151 ± 26	134 ± 56
4 th week	114 ± 52	126 ± 72	133 ± 22	123 ± 69
12 th week	97 ± 40	117 ± 36	136 ± 2	109 ± 39

近年研究表明供体 CYP3A5 6986 位点基因多态性与多种实体器官移植患者术后他克莫司血药浓度/剂量比相关。Haufrond^[6]发现携带 CYP3A5 *1 基因的肾移植患者预期他克莫司的清除率较只携带 CYP3A5 *3 的突变型纯合子提高 25%~40%, 血药谷浓度更是降低 3 倍以上。成人肺移植及儿童心脏移植患者中也有相似结果报道。Maki 及 Miwa 等^[7-8]分别在供体肝脏和受体肠道活检标本中, 也检测到了此位点多态性与该酶转录 mRNA 存在明显相关。

我们的研究发现术后 2 周、4 周、12 周供体为 CYP3A5 *1/*1 和 CYP3A5 *1/*3 的患者较供体为 CYP3A5 *3 的纯合子的患者标准化他克莫司浓度/剂量比低, 二者差异具有统计学意义。术后 1 周, 移植肝未能完全发挥作用, 他克莫司代谢影响因素也较多, 随着供肝功能稳定, 2 周后遗传因素逐步占据他克莫司代谢的主导作用, 从而出现药物代谢的个体差异。

CYP3A5 酶在肠道也有丰富的表达, 理论上受体 CYP3A5 多态性对患者术后他克莫司血药浓度也有影响, 但目前研究结果尚存争议。我们并未发现受体 CYP3A5 多态性与他克莫司浓度/剂量比有相关性。为排除供体影响, 我们联合分析供受体, 将携带 *1 者定义为 *1 组, 包括 CYP3A5 *1/*1 及 CYP3A5 *1/*3, 将仅携带 *3 者定义为 *3 组, 即 CYP3A5 *3/*3。不论受体基因型如何, 供体为 *3 组他克莫司浓度/剂量比均高于供体为 *1 组 ($P < 0.05$); 而当供体基因型相同时, 受体 *1、*3 组并无统计学差异 ($P > 0.05$), 因此供肝 CYP3A5 的基因型为他克莫司药代动力学个体差异主要原因。但 Miwa 等^[8]发现活体肝移植术后, 当供体均为 *1 组时, 前 4 周内受体 *1 组与受

体 * 3 组有明显统计学差异, 但第 5 周此差异消失。该结果可能与其研究对象为活体肝移植患者相关。半肝移植, 肝脏体积有限, 供肝 CYP3A5 总表达及活性明显低于全肝移植, 此时移植肝 CYP3A5 酶的影响相对全肝移植降低, 肠道 CYP3A5 酶影响随之提高, 因此早期受体 * 1 与 * 3 组差异明显, 而随着供肝体积的增长, 这种差异逐步消失。

多药耐药基因 MDR-1 位于 7 号染色体, 有研究报道外显子 26 3435 位点基因多态性与他克莫司药代动力学有相关性, 但该位点并不造成翻译后氨基酸序列的改变^[9]。而外显子 21 2677 位点 G/A 突变与其有连锁不平衡现象, 且此位点突变可导致丙氨酸由丝氨酸或苏氨酸替换, 从而影响 RNA 结构、稳定性及翻译效率^[10]。

本组研究未发现供受体 MDR1 2677G/A 多态性与肝移植术后患者他克莫司血药浓度/剂量比有明显相关性。虽然理论上 MDR1 2677 位点突变会导致氨基酸序列改变, 影响 Pgp 的表达, 但 Maki 等^[7]在检测移植肝脏 MDR1 mRNA 表达时并未发现其量与 MDR1 C3435T 有明显相关, Owen 等^[11]在人体肝脏细胞研究发现虽然 Pgp 的表达量个体中存在 20 ~ 200 倍差异, 但其与 MDR1 C3435T 和 MDR1 G2677AT 均无相关性。受体方面, Alessio 等^[12]等多数学者在不同地区种族人群受体中均发现 MDR1 G2677A 对他克莫司药代动力学无影响。本组研究因受体组 GA 型仅有 3 例, 可能偏差较大。此外, 其连锁位点 3435 的研究结果也尚存争议。Pgp 底物众多, 各药物代谢相关关系复杂, 对于其编码基因 MDR1 多态性的影响仍需进一步研究。

综上所述, 供体 CYP3A5 * 3 基因多态性与他克莫司浓度/剂量比明显相关, 供体携带 * 1 等位基因的患者需更高剂量他克莫司才能达到目标血药浓度。供体 CYP3A5 基因型测定, 可以为免疫抑制剂的个体化运用提供积极的指导作用。

参考文献:

- [1] Kuypers DRJ. Immunosuppressive drug monitoring-what to use in clinical practice today to improve renal graft outcome [J]. *Transpl Int*, 2005, 23(18): 140-150.
- [2] Gaston RS. Maintenance immunosuppression in the

transplant recipient: an overview [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 35(3): 25-35.

- [3] Mancinelli LM, Frassetto L, Floren LC, et al. The pharmacokinetics and metabolic disposition of Tacrolimus: a comparison across ethnic groups [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 69(2): 24-31.
- [4] Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic Basis of polymorphic CYP3A5 expression [J]. *Nat Genet*, 2001, 27(4): 383-391.
- [5] Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, et al. Clinical pharmacokinetics of Tacrolimus [J]. *Clin Pharmacokinet*, 1995, 29(6): 404-430.
- [6] Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and Tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients [J]. *Pharmacogenetics*, 2004, 14(3): 147-154.
- [7] Maki G, Satohiro M, Tetsuya K, et al. CYP3A5 * 1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of Tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation [J]. *Pharmacogenetics*, 2004, 14(7): 471-478.
- [8] Miwa U, Masuda S, Katsura T, et al. Effect of intestinal CYP3A5 on postoperative Tacrolimus trough levels in living donor liver transplant recipients [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2006, 16(2): 119-127.
- [9] 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(6): 3473-3478.
- [10] Kim RB, Leake BF, Choo EF, et al. Identification of Functionally Variant MDR1 Alleles Among European Americans and African Americans [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 70(2): 189-193.
- [11] Owen A, Goldring C, Morgan P, et al. Relationship between the C3435T and G2677T(A) polymorphisms in the ABCB1 gene and P-glycoprotein expression in human liver [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2005, 59(3): 365-370.
- [12] Alessio P, Monica N. The effect of CYP3A5 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on tacrolimus does requirements in Caucasian liver transplant patients [J]. *Ann Transplant*, 2009, 14(1): 23-31.

(编辑 徐 杰)