

CYP3A5 基因多态性与他克莫司血药浓度的相关性分析

齐 林 刘永芳 刘金瑞 张 华 罗 登

摘 要 **目的** 对 CYP3A5 基因多态性与他克莫司血药浓度的相关性进行分析,探讨其在临床肾移植患者个体化治疗中的应用意义。**方法** 选择 2014 年 3 月~2016 年 5 月间,笔者医院收治的获得明确诊断、符合条件接受同种异体肾移植手术患者 115 例作为研究对象,对受试者展开 CYP3A5 基因型检测,而后对不同基因型患者的他克莫司血药浓度/剂量比值、急性排斥反应、不良反应的发生情况进行对比分析。**结果** 肾移植术后随访 3 个月,不同基因型者的他克莫司血药浓度/剂量比值差异有统计学意义,表现为 *3/*3 基因型患者最高($P<0.05$);术后不良反应发生率比较发现,*3/*3 基因型患者的发生率高于其他基因型($P<0.05$);不同基因型患者术后急性排斥反应发生率比较,*1/*1 型急性排斥反应发生率高于其他基因型($P<0.05$)。**结论** CYP3A5 基因多态性会影响到应用他克莫司血药浓度/剂量比值,不同基因型的不良反应发生率不同,在今后的临床工作中,应对其给予足够的重视。

关键词 他克莫司 血药浓度/剂量比值 CYP3A5 基因多态性

中图分类号 R4.93

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.042

Correlation Analysis between CYP3A5 Gene Polymorphisms and Tacrolimus Blood Concentration. Qi lin, Liu Yongfang, Liu Jinrui, et al. Department of Medical Laboratory, Seventh People's Hospital of Zhengzhou, Henan 450016, China

Abstract **Objective** The relationship between CYP3A5 gene polymorphism and tacrolimus plasma concentration was analyzed to explore its application in individualized treatment of patients with clinical kidney transplantation. **Methods** A total of 115 patients with allogeneic renal transplantation were enrolled in our hospital from March 2014 to May 2016, and the subjects were followed up for CYP3A5 genotyping. And then the different genotype of tacrolimus plasma concentration/dose ratio, acute rejection, the incidence of adverse reactions were compared. **Results** After 3 months follow-up, we found that there were significant differences in the plasma/dose ratio of tacrolimus in different genotypes, which showed the highest *3/*3 genotype ($P<0.05$). Comparison of postoperative adverse reactions, the incidence of *3/*3 genotype was higher than that of other genotypes ($P<0.05$). Compared with other genotypes, the incidence of acute rejection in *1/*1 patients was higher than that of others($P<0.05$). **Conclusion** The polymorphism of CYP3A5 gene may affect the application of tacrolimus concentration/dose ratio. In different genotypes, the incidence of adverse reactions was different. So, we should be given enough attention in the future clinical work.

Key words Tacrolimus; Plasma concentration/dose ratio; CYP3A5 gene polymorphisms

肾衰竭终末期有效的临床治疗途径是肾移植,虽然该技术日臻完善,但移植排斥反应依然是器官及受者存活质量中的关键问题之一。他克莫司(tacrolimus, FK506)因具有良好的免疫抑制效果及较弱的肝肾毒性,已成为首选的肾移植术后基础免疫抑制剂。但在临床实践中发现,不同患者对他克莫司的反应性差异较大。有研究表明,他克莫司生物利用度显著的个体差异主要是由于药物基因位点的单核苷酸

多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)引起,不同的基因型与血药浓度具有密切相关性^[1-4]。由于单核苷酸多态性改变了个体对药物的代谢,这对于临床个体化用药具有重要的意义。所以,评价 CYP3A5 基因多态性的临床价值,探讨其与他克莫司血药浓度/剂量比个体差异的关系,有利于他克莫司的个体化治疗。本研究出于对 CYP3A5 基因多态性与他克莫司血药浓度的相关性进行分析探讨的目的,对笔者医院 115 例肾移植应用他克莫司的患者展开了基因型检测,并对检测结果进行了统计分析。

资料与方法

1. 研究对象:选择 2014 年 3 月~2016 年 5 月

作者单位:450016 郑州市第七人民医院检验科(齐林),肾内科(刘永芳、刘金瑞);442008 十堰,湖北医药学院附属东风医院(张华);430060 武汉大学人民医院(罗登)

通讯作者:齐林,电子信箱:qlnature009003@163.com

间笔者医院收治的,获得明确诊断的,接受肾移植手术治疗患者,共计选择 115 例作为研究对象,其中男性 77 例,女性 38 例,患者年龄 21 ~ 65 岁,平均年龄 39.8 ± 11.2 岁,体重 43 ~ 65kg,平均 58.7 ± 14.2 kg。所有患者均符合临床诊断标准,自愿接受临床治疗与检查,并签署了知情同意书。

2. 实验方法:(1)研究对象均在肾移植术后接受他克莫司+麦考酚吗乙酯+肾上腺皮质激素三联免疫抑制方案治疗。他克莫司生产厂家为爱尔兰藤泽药品有限公司,用药剂量为 $0.15 \sim 0.30 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,每天给药 2 次,饭前 1h 或者是饭后 2h 口服给药。对受试者均展开他克莫司血药浓度及 CYP3A5 基因型检测,而后对不同基因型患者的他克莫司血药浓度/剂量比值、急性排斥反应、不良反应的发生情况进行对比分析。(2)他克莫司血药浓度测定:给药 12h 后清晨空腹抽取静脉血 2 ~ 3ml,EDTA 抗凝,精确吸取 200 μl 全血样本及 200 μl 样本萃取液于 1.5ml 微型离心管,立即涡旋混匀 5 ~ 10s,38500r/min 离心 5min,倒上清至预处理样本转移管,再次涡旋混匀 5 ~ 10s,装入 Architect i2000 化学发光免疫分析系统进行测定。他克莫司血药浓度测定试剂盒由美国雅培公司提供。(3)CYP3A5 基因型检测:在 ABI Steponeplus 实时荧光定量 PCR 分析仪上进行,试剂盒购自天津秀鹏生物技术开发有限公司。按操作说明书提取相应的样本 DNA,用 PCR-SSP 技术进行基因扩增。PCR 反应体系配制:取 25 μl 的工作液置于 PCR 管,加入 3 μl DNA,混匀,离心数秒;在引物板中,每人份(2 孔)每孔加入 10 μl 上述混合液,再加入 15 ~ 20 μl 石蜡油,封板膜封板。循环参数:96 $^{\circ}\text{C}$ 2min;96 $^{\circ}\text{C}$ 20s,68 $^{\circ}\text{C}$ 60s,5 个循环;96 $^{\circ}\text{C}$ 20s,65 $^{\circ}\text{C}$ 45s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30s,10 个循环;96 $^{\circ}\text{C}$ 20s,63 $^{\circ}\text{C}$ 45s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30s,15 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 2min。用 ABI Steponeplus Software Version2.2.2 软件在每阶段的循环末收集荧光信号,并进行溶解曲线分析。结果判读:记录每个检测孔位 Ct 值及特征性溶解曲线导数峰,若 $\text{Ct} > 22$ 或者 $\text{D}(1)/\text{D}(2) > 1.5$,该孔为阴性;若 $10 < \text{Ct} \leq 22$ 或者 $\text{D}(1)/\text{D}(2) \leq 1.5$,该孔为阳性。若 1 孔为阳性 2 孔为阴性,该位点判断为 *1/*1 型;若 1 孔 2 孔均为阳性,该位点判断为 *1/*3 型;若 1 孔为阴性 2 孔为阳性,该位点判断为 *3/*3 型。

3. 统计学方法:所有数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行处理,计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验比较各不良反应组间的差异,非正

态分布的变量进行对数转换。计数资料采用例数(百分率)[*n*(%)]表示,进行 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 受试者 CYP3A5 基因分布:本组受试者,经基因检测发现,CYP3A5 *1/*1 型者 18 例,CYP3A5 *1/*3 型者 35 例,CYP3A5 *3/*3 型者 62 例。

2. 不同基因型受试者术后血药浓度/剂量比值变化:肾移植术后,随访 3 个月,不同基因型者的他克莫司血药浓度/剂量比值差异有统计学意义,表现为 *3/*3 基因型患者最高($P < 0.05$,表 1)。

表 1 不同基因型受试者术后血药浓度/剂量比值变化情况统计($\bar{x} \pm s$)

基因型	<i>n</i>	血药浓度 (ng/ml)	日剂量 (mg/kg)	C/D
CYP3A5 *1/*1	18	$6.21 \pm 1.32^*$	$0.086 \pm 0.020^*$	$72 \pm 21^*$
CYP3A5 *1/*3	35	$6.95 \pm 1.35^*$	$0.078 \pm 0.023^*$	$89 \pm 33^*$
CYP3A5 *3/*3	62	8.61 ± 2.08	0.062 ± 0.019	139 ± 52

与 *3/*3 基因型比较, * $P < 0.05$

3. 不同基因型受者术后不良反应发生率比较:术后不良反应发生率比较发现,*3/*3 基因型患者的发生率高于其他基因型($P < 0.05$);不同基因型患者术后急性排斥反应发生率比较,*1/*1 型急性排斥反应发生率明显高于 *1/*3 型和 *3/*3 型($P < 0.05$,表 2)。

表 2 不同基因型受者术后不良反应发生率比较[*n*(%)]

不良反应	CYP3A5 基因型		
	*1/*1(<i>n</i> =18)	*1/*3(<i>n</i> =35)	*3/*3(<i>n</i> =62)
肾功能异常	2(11.11)*	6(17.14)*	23(37.09)
肝功能异常	1(5.55)*	3(8.57)*	9(14.51)
肺部感染	3(16.67)*	5(14.28)*	13(20.96)
白细胞减少	0(0)*	2(5.71)*	5(8.06)
急性排斥反应	5(27.7)	3(8.57) [#]	2(3.22) [#]

与 *3/*3 基因型比较, * $P < 0.05$; 与 *1/*1 基因型比较, [#] $P < 0.05$

讨 论

人们对临床个体化用药的认识随着医学的进步正逐步深入,人类基因组学的发展为此提供了一个崭新的途径,即通过检测患者的基因型,使临床用药个体化,既能保证疗效,又能避免不良反应的发生和医疗资源的浪费。已有研究表明,CYP3A5 基因多态性对肾移植受者他克莫司血药浓度就有显著影响^[5,6]。检测 CYP3A5 基因分型对肾移植术后优化免疫抑制

方案、预防排斥反应与减少肾毒性及感染等不良反应都具有重要意义^[7]。CYP3A 是 CYP 超家族中的一种酶,在肝脏和肠道中高度表达,CYP3A5 是该酶的重要亚型。近年研究显示,改变 CYP3A5 的活性即可改变以其为底物的药代动力学^[8]。Utecht 等^[9]在肾移植患者中发现,达到相同的他克莫司血药浓度,基因型为 CYP3A5 * 1/* 1 或 CYP3A5 * 1/* 3 的患者比基因型为 CYP3A5 * 3/* 3 的患者需要更大的每日剂量,即携带 CYP3A5 * 1 的患者较 CYP3A5 * 3 患者有更高的他克莫司清除率。Wu 等^[10]和 Provenzani 等^[11]研究表明,CYP3A5 * 1/* 1 和 * 1/* 3 型肾移植受者由于浓度/剂量(C/D)比值较低,需要更大的剂量以达到治疗浓度,而 CYP3A5 * 3/* 3 型肾移植受者需要相对较小的剂量,以免出现过度免疫抑制及不良反应。

本研究对 115 例肾移植患者展开 CYP3A5 基因型和他克莫司血药浓度检测显示,不同基因型患者的他克莫司血药浓度/剂量比值差异有统计学意义($P < 0.05$),表现为 * 3/* 3 基因型患者最高;术后不良反应发生率比较发现,* 3/* 3 基因型患者的发生率高于其他基因型;不同基因型患者术后急性排斥反应发生率比较,* 1/* 1 型急性排斥反应发生率明显高于 * 1/* 3 型和 * 3/* 3 型。这一结果与相关文献报道结果相似^[10-12]。由此表明,CYP3A5 基因多态性会影响到应用他克莫司血药 C/D 值,不同基因型的不良反应发生率差异有统计学意义,在今后的临床工作中,应对其给予足够的重视。依据 CYP3A5 基因多态性,在他克莫司给药时给予不同的起始剂量,使其尽快达到术后治疗的目标浓度,不仅能够有效降低移植急性排斥反应及不良反应的发生率,提高移植肾的临床药效及人肾短期和长期存活率,也将为肾移植术后个体化治疗奠定遗传学基础,对合理选用免疫抑制剂具有重要的指导意义。

基因多态性的检测不影响患者的治疗,而且一次分型终生受益,但药物代谢的影响因素是复杂的。除了基因多态外,可能还会受到其他因素的影响,包括环境以及基因间的协同叠加作用。所以笔者推测,他克莫司的代谢除受 CYP3A5 基因的调控外,可能还受其他基因的影响。本研究由于样本数目偏少,单用化学发光法进行药物浓度的测定可能也具有一定的局限性。基于上述问题,笔者将在今后的研究中扩大样本量,并克服方法学上的局限性,在此基础上笔者还

将选取更多相关基因位点来探索它们之间的相互作用。同时笔者还将构建单倍型并分析其对蛋白表达的影响,从功能上进一步探索 CYP3A5 基因多态与他克莫司血药浓度的关联性,为肾移植术后排斥反应的预防和治疗提供更多的实验数据及新的线索和途径。

参考文献

- MacPhee IAM, Fredericks S, Tai T. Tacrolimus pharmacogenetic-polymorphisms associated with expression of cytochrome P4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement [J]. Transplantation, 2002, 74(11): 1486-1489
- Durand P, Debray D, Kolaci M, et al. Tacrolimus dose requirement in pediatric liver transplantation: influence of CYP3A5 gene polymorphism [J]. Pharmacogenomics, 2013, 14(9): 1017-1025
- Cho JH, Yoon YD, Park JY, et al. Impact of cytochrome P450 3A and ATP-binding cassette subfamily B member 1 polymorphisms on tacrolimus dose-adjusted trough concentrations among Korean renal transplant recipients [J]. Transplant Proc, 2012, 44(1): 109-114
- Gijsen V, Mital S, van Schaik RH, et al. Age and CYP3A5 genotype affect tacrolimus dosing requirements after transplant in pediatric heart recipients [J]. J Heart Lung Transplant, 2011, 30(12): 1352-1359
- 庞新路, 丰贵文, 尚文俊, 等. 基于 CYP3A5 多态性的肾移植他克莫司个体化用药 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2014, 5(19): 294-296
- 冯时. 细胞色素 P450 3A5 基因分型对肾移植受者他克莫司剂量的影响 [J]. 中华器官移植杂志, 2014, 35(1): 25-28
- 林玲, 宋文利, 沈中阳, 等. 肾移植受者 CYP3A5 * 3 和 CYP3A4 * 18B 对他克莫司药动学的影响 [J]. 中华器官移植杂志, 2012, 33(4): 220-224
- Suh JM, Koo BK, Zhang SY, et al. Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopiogrel [J]. CMAJ, 2006, 174(12): 1715-1722
- Utecht KN, Hiles JJ, Kolesar J. Effects of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors [J]. Am J Health Syst Pharm, 2006, 63(23): 2340-2348
- 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
- Provenzani A, Notarbartolo M, Labbozzetta M, et al. Influence of CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and other factors on tacrolimus dosing in Caucasian liver and kidney transplant patients [J]. Int J Mol Med, 2011, 28(6): 1093-1102
- Li X, Meng D, Long C, et al. Effect of CYP3A5 genetic polymorphism on concentration and efficacy of tacrolimus in patients with kidney transplantation [J]. Chinese J Tiss Eng Res, 2012, 16(18): 3255-3258

(收稿日期: 2016-10-28)

(修回日期: 2016-11-04)