文章编号:1000-5404(2006)19-1971-02

论著

mdr1 基因 C3435T 多态性与口服 FK506 后血药浓度关系的实验研究

陈 伟,胡志德,吴丽娟,邓少丽 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科,重庆 400042)

提 要:目的 调查中国汉族肾脏移植人群 mdr1 基因 C3435T 单核苷酸多态性与口服 FK506 后血药浓度的关系。**方法** 采用不同引物进行 PCR 扩增了 17 例中国汉族人群的基因组,判断人群的 C3435T 基因型,结合其口服 FK506 12 h 后血药浓度,判断二者是否存在关联。**结果** 口服相同剂量的 FK506 以后,基因类型为 T/T 的患者血药浓度最高,C/T 次之,C/C 最低,三者存在显著差异($P<0.05$)。**结论** mdr1 基因的 C3435T 与口服 FK506 后的血药浓度密切相关,检测汉族肾脏移植患者 mdr1 基因的 C3435T,对指导临床上 FK506 的使用有一定帮助。

关键词: mdr1;单核苷酸多态性(SNPs);FK506
中图法分类号: R394.5; R969.1; R978.1 **文献标识码**: A

Relationship between mdr1 gene C3435T polymorphism and blood concentration of FK506 after oral administration

CHEN Wei, HU Zhi-de, WU Li-juan, DENG Shao-li (Department of Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between the mdr1 gene C3435T polymorphism and the blood concentration of tacrolimus (FK506) after oral administration. **Methods** PCR was used to amplify the target gene from 17 Chinese Han patients after renal transplantation. The FK506's blood concentration was detected 12 h after oral application. Then the relationship between them was estimated. **Results** As for those patients who had taken FK506 at the same dose, the blood concentration was highest in those of T/T genotypes, and then C/T and C/C genotype followed. Significant differences were found among these 3 groups. **Conclusion** FK506's blood concentration after orally application is associated with the mdr1 gene C3435T polymorphism. Detecting the polymorphism of mdr1 gene C3435T is helpful when FK506 is given orally.

Key words: mdr1 gene; single nucleotide polymorphism; tacrolimus (FK506)

口服 FK506 后,个体之间的药物代谢动力学差异较大,已经有研究表明,在人体中 mdr1 基因及其编码的 P-糖蛋白(P-glycoprotein, Pgp)是导致个体之间 FK506 药物代谢动力学差异较大的原因[1]。Pgp 属于 ABC(ATP-binding cassett)家族的成员,系一种能量依赖性的药物外运泵,能将多种进入细胞的药物泵出细胞外,降低细胞内药物的浓度,减轻药物对细胞的毒性。Pgp 在 FK506 吸收和代谢的多个环节中影响药物代谢动力学。最近的研究显示,mdr1 基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与其编码的 Pgp 的活性密切相关[2],因此认为其 SNP 也与 FK506 的药物代谢动力学密切相关。国外开展了一些调查,但尚缺乏统一认识,在不同的种族,不同的器官移植患者中展开的调查,结果差异较大。也有学者的调查研究显示 mdr1 基因的 SNP 与 FK506 的药物代谢无关。本研究旨在检测中国人群 mdr1 基因的 C3435T 多态性,了解其对口服 FK506 后血药浓度的影响。

作者简介:陈 伟(1954-),女,重庆市人,硕士,主任技师,主要从事临床实验室诊断方面的研究。电话:(023)68757252
收稿日期:2005-10-11;**修回日期**:2006-07-18

1 材料与方法

1.1 标本的采集与分离

收集我院 2005 年 2-4 月肾移植患者的血液 17 例,其中男性 9 例,女性 8 例,均为汉族,年龄(41.3±17.2)岁。于患者口服 FK506 12 h 后从静脉采集患者血液,EDTA 或肝素抗凝,24 h 内分离出全血 DNA,使用全血 DNA 提取试剂盒(北京博大泰克生物技术有限公司),严格按照说明书操作,提取 DNA 在 -20 ℃保存备用。使用前经 DU 800 spctrophotometer 检测,$D(260)/D(280)$均在 1.4~2.3 范围内,DNA 浓度均在 30 μg/ml 以上。2% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 均在 800 bp 以上。

1.2 PCR 试剂的配置及反应条件

参照文献[1]设计引物,将引物设计于 SNP 位点上,利用引物的差异判断 SNP 的类型,野生型(W)mdr1 基因的正义链引物为:5′-GTGGTGTCACAGGAAGAGGTC-3′,突变型(M)mdr1 基因的正义链引物为:5′-GTGGTGTCACAGGAAGAGGTG-3′,两者反义链引物均为 5′-ACTATAGGCCAGAGAGGCTGC-3′。PCR 产物大小为 134 bp。野生型引物扩增获得产物表明 Mdrl 基因的 C_{3435} 位置为 T,突变型引物获得产物表明 Mdrl 基因位置 C_{3435} 为 C。PCR 扩增体系体积为 25 μl。反应系统含:*Taq* 酶0.25 μl(1.25 U)、10 × *Taq* 酶缓冲液 2.5 μl(内含 500 mmol/L KCl、100 mmol/L pH 值为 8.4 的 Tris-HCl、20 mmol/L $MgCl_2$)、2.5 μl

PCR 染料(公司赠送)、正反链引物各 20 pmol/L、dNTPs 8 mmol/L,模板5 μl。以上 PCR 反应试剂均购自北京赛百盛基因技术有限公司。扩增时 95 ℃预变性 4 min,94 ℃ 40 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,进行 38 个循环,最后 72 ℃度延伸 4 min。每份血液均用上述不同的引物进行扩增反应。

1.3 FK506 血药浓度的测定

将患者全血 EDTA-K_2抗凝,EMIT 2000 Tacrolimus Calibrator (DADE BEHRING 公司)预处理于全血标本,严格按照试剂说明书操作,于 Vitalab Viva 上检测其中 FK506 的血药浓度。

1.4 PCR 产物的检查

PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶(内含 0.03% 的 EB)电泳 30 min,所加电压为 100 V。在紫外灯下观察条带。

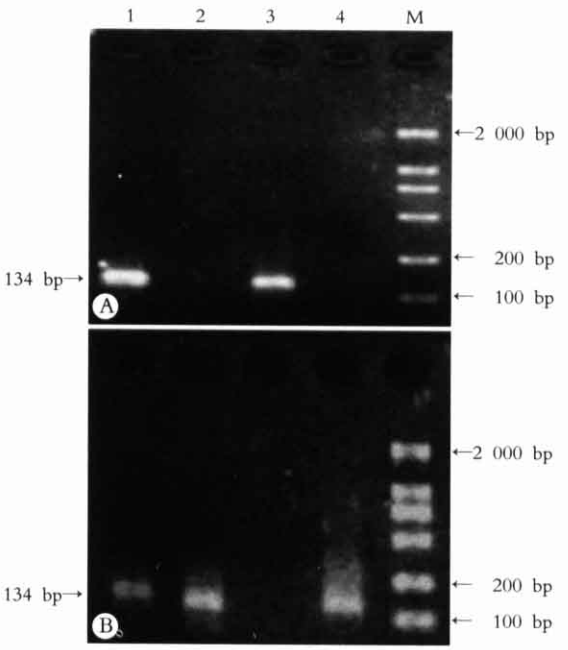
1.5 统计学处理

采用 SPSS 8.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 PCR 产物电泳结果

取 PCR 产物 6 μl 加样电泳,于紫外灯下观察 PCR 扩增结果。见图 1。



A:野生型引物;B:突变型引物 1:存在野生型及突变型扩增产物,基因型为 T/C;2,4:只存在突变型扩增产物,基因型 C/C;3:只存在野生型扩增产物,基因型为 T/T;M:DL2000 标准

图 1 野生型引物与突变型引物扩增产物的电泳结果

从图 1 不难看出,1 号标本为杂合子,2、4 号标本均为突变型纯合子,3 号标本为野生型纯合子。我们共检测了 17 例肾移植患者 mdr1 基因的 C3435T,其中 C/C 8 例,C/T 5 例,T/T 4 例。

FK506 的谷值血药浓度与 mdr1 基因 SNP 的关系见表 1。经单因素方差分析显示 3 组之间存在明显差异($F=4.78$, $P<0.05$)。基因型为T/T的患者在服用相同剂量的 FK506 之后,谷值血药浓度是C/C基因型患者浓度的 2 倍。

表 1 Mdr1 不同基因型患者的血药浓度(ρ_B/μg·ml^{-1})

基因型	n	FK506 谷值血药浓度
C/C	8	9.83 ± 4.11
C/T	5	15.23 ± 3.89[a]
T/T	4	20.13 ± 3.67[ab]

a: $P<0.05$, 与 C/C 比较; b: $P<0.05$, 与 C/T 比较

3 讨论

在研究 mdr1 基因的 C3435T 与 FK506 的药物代谢动力学的过程中,目前尚缺乏统一认识,有的则认为两者无关[2],有的认为两者明显相关[3,4],可能在于不同的器官移植患者、不同的民族,mdr1 基因的多态性对 FK506 的药代动力学影响不同。我们在调查了 17 例肾移植患者的 mdr1 基因的 C3435T 与 FK506 的药物代谢动力学关系后发现 3 种基因类型的患者服用相同剂量的 FK506 以后,基因类型为 T/T 的患者血药浓度最高,C/T 患者次之,C/C 患者血药浓度最低。从我们的调查结果来看,在中国人群中,mdr1 基因的 C3435T 与肾移植患者的 FK506 的药物代谢动力学密切相关。

Hoffmeyer 等[4]在研究 mdr1 基因的 SNPs 时发现:C3435T 与其编码的 Pgp 的活性密切相关,基因型为 T/T 的患者,其 mdr1 基因编码的 Pgp 的活性明显较其他 2 种基因编码的 Pgp 的活性低。我们研究表明基因类型为 T/T 的肾移植人群,其口服 FK506 的生物利用度较高,结合 Pgp 的生理功能,我们的实验结果支持 Hoffmeyer 的结论,即基因型为 T/T 的人群,mdr1 基因编码的 Pgp 活性较低,所以 FK506 能较好地被吸收,维持相对较高的血药浓度。

从本实验结果来看,中国汉族人群的 mdr1 基因 C3435T SNP 与 FK506 的代谢密切相关,在肾脏移植术后患者服用免疫抑制的过程中,检测患者的 mdr1 基因 C3435T 有助于指导临床应用 FK506 进行免疫抑制,减少其副作用,使其血药浓度维持在治疗范围之内。

参考文献:

[1] SONG P, LI S, MEIBOHM B, *et al*. Detection of mdr1 single nucleotide polymorphisms C3435T and G2677T using real-time polymerase chain reaction: mdr1 single nucleotide polymorphism genotyping assay [J]. AAPS Pharm Sci, 2002, 4(4): E29.

[2] 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.

[3] ZHENG H, WEBBER S, ZEEVI A, *et al*. Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and mdr1 gene polymorphisms[J]. Am J Transplant, 2003, 3(4): 477-483.

[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 U S A, 2000, 97(7): 3473-3478.

(编辑 张大春)