

ABCB1 2677G>T/A 基因多态性与自身免疫病患者 环孢素血药浓度个体差异的相关性研究

束庆^{1#}，刘蕴星^{1#}，葛泳含¹，朱怀军¹，姚瑶¹，王红²，葛卫红^{1*}

¹南京大学医学院附属鼓楼医院药学部，210008；²南京大学医学院附属鼓楼医院风湿免疫科，210008

注：束庆和刘蕴星为并列第一作者；

通讯作者：葛卫红，Email: 6221230@sina.com

摘 要

【摘要】目的：测定在中国自身免疫病患者全血环孢素（cyclosporine, CsA）药物浓度，并对可能影响 CsA 血药浓度的代谢酶、转运体和作用靶点的基因多态性等因素进行分析。**方法：**采用酶放大免疫测定法检测 193 例自身免疫病患者 CsA 稳态血药谷浓度（CsA C₀），并检测入组患者的基因型：CYP3A4 20230C>T、CYP3A5 6986A>G、ABCB1 1236C>T、ABCB1 2677G>T/A、ABCB1 3435C>T、POR 1508C>T 及 FPR1 C>G，分析上述位点的基因多态性对 CsA 血药浓度的影响。**结果：**193 例自身免疫病患者服用 CsA 剂量为 75-200mg/天，患者的血药浓度分布为 33.0-313.8ng·ml⁻¹。服药日剂量和年龄对患者 CsA 血药浓度的影响差异有统计学意义（*P*=0.006）。ABCB1 2677G>T/A（rs2032582）基因多态性对单位剂量 CsA C₀（CsA C₀/d）有影响，野生型（GG）患者的 CsA C₀/d（0.81±0.42ng·ml⁻¹·mg⁻¹）较杂合突变型（GT/GA，0.65±0.30ng·ml⁻¹·mg⁻¹，*P*=0.023）和纯合突变型（TT/AA/TA，0.66±0.34ng·ml⁻¹·mg⁻¹，*P*=0.039）显著升高。**结论：**CsA 血药浓度在个体间差异大，ABCB1 2677G>T/A 基因的野生型患者 CsA 血药浓度的 C₀/d 显著高于突变型患者。

【关键词】：环孢素，自身免疫病，血药浓度，基因多态性

基金项目：南京市医学科技发展资金项目（QRX17140）；国家自然科学基金（81603087）；江苏省医学创新团队项目（CXTDA2017041）；江苏省研究型医院学会精益化用药科研基金（JY202002）；南京鼓楼医院新技术发展基金项目（XJSFZJJ201806）

**Correlationship Between ABCB1 2677G>T/A Gene Polymorphism And
Cyclosporine Blood Concentration In Patients With Autoimmune Diseases**

SHU Qing¹, LIU Yunxing¹, GE Yonghan², ZHU Huaijun¹, YAO Yao¹, WANG Hong²,
GE Weihong¹

¹Department of Pharmacy, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Jiangsu 210008, China;²Department of Rheumatology and Immunology, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Jiangsu 210008, China

Corresponding author: Ge Weihong, Email:6221230@sina.com

[ABSTRACT] Objective: To investigate the distribution of blood concentration of cyclosporine (CsA) in patients with autoimmune disease in China, and analyze effect of genetic polymorphisms of CsA-metabolizing enzymes, transporters and target enzymes on CsA levels. **Methods:** A total of 193 patients' steady-state trough blood concentrations (CsA C₀) were detected by enzyme multiplied immunoassay technique. The genotype of the following sites in the included patients: CYP3A4 20230C> T, CYP3A5 6986A> G, ABCB1 1236C> T, ABCB1 2677G> T/A, ABCB1 3435C> T, POR 1508C> T and FPR1 C> G were sequenced by RT-PCR. **Results:** 193 patients in rolled took CsA doses ranging from 75-200mg and the patients' blood concentration distribution span was wide (33.0-313.8ng·mL⁻¹). ABCB1 2677G> T/A (rs2032582) gene polymorphism has an effect on the unit dose of CsA C₀ (CsA C₀/d), CsA C₀/d (0.81±0.42ng·mL⁻¹·mg⁻¹) in wild type (GG) was higher than heterozygous mutant (GT/GA, 0.65±0.30ng·mL⁻¹·mg⁻¹, P=0.023) and homozygous mutant (TT/AA/TA, 0.66±0.34ng·mL⁻¹·mg⁻¹, P=0.039). **Conclusion:** The blood concentration of patients varies greatly among individuals. ABCB1 2677G> T/A gene polymorphism is one of the reasons that cause the individual difference of CsA blood concentration.

【Key words】 Cyclosporine, Autoimmune disease, Blood concentration, Gene polymorphism

Fund program: This work is supported by 1. Nanjing Medical Science and Technique Development Foundation (QRX17140; QRX17040); 2. Jiangsu Medical

Innovation Team (Leading Talents) Project (CXTDA2017041); 3. National Natural Science Fund (81603087); 4. Jiangsu Research Hospital Association for Precision Medication); 5. New Technology Development Fund Project of Nanjing Drum TowerHospital (XJSFZJJ201806).

环孢素 (cyclosporine, CsA) 是一种从多孢木霉菌和柱孢菌素代谢产物中分离出来的多肽, 由于 CsA 能特异和可逆地作用于 T 淋巴细胞, 使钙调磷酸酶无法被激活, 导致细胞因子的合成与释放受阻或抑制 T 细胞增殖, 而发挥免疫抑制作用。而 T 淋巴细胞在自身免疫病的发病中扮演了重要角色, 因此, CsA 目前在临床上除了应用于脏器移植也应用于系统性红斑狼疮^[1] (systemic lupus erythematosus, SLE)、类风湿关节炎^[2] (rheumatoid arthritis, RA) 和干燥综合征^[3] (Sjogren's syndrome, SS) 等自身免疫病的治疗。

CsA 的治疗窗狭窄且个体差异大, 治疗药物监测 (therapeutic drug monitoring, TDM) 有助于临床根据药物浓度和患者临床反应调整药物剂量。但由于 CsA 上市时最初用于脏器移植的治疗, 因为目前针对移植患者的 CsA 的谷浓度 C_0 值较为明确, 而针对自身免疫病患者的 CsA 用药的目标浓度仍无定论。此外, CsA 血药浓度个体差异大, 目前的研究提示参与 CsA 代谢、机制作用相关的酶的单核苷酸基因多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是影响 CsA 血药浓度的重要因素。SNPs 被认为是人类基因组中密度最大的遗传标记, 基因型改变可能影响相应酶的表达及活性, 从而影响药物在体内的代谢过程。据估计, 遗传因素可解释 20–95% 的药物个体差异^[4]。CsA 在体内主要由肝脏中的细胞色素酶 (cytochrome P450, CYP) 亚型中的 CYP3A4 和 CYP3A5 酶代谢^[5], 个体 SNP 的差异是影响这些酶的代谢活性的主要因素^[6,7]。此外, CsA 作为细胞膜上外排泵 P-gp (p-glycoprotein, P-gp, 编码基因 ABCB1) 的底物, 可被 P-gp 泵出细胞外从而减少药物的吸收, 从而影响 CsA 代谢和疗效发挥^[8]。除代谢酶和转运体外, 也有部分研究考察了 CsA 代谢酶的上游调控因子、其他潜在受体, 如孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR)^[9]、细胞色素 P450 氧化还原酶 (cytochrome P450 oxidoreductase, POR) 以及甲酰肽受体 1 (formyl peptide receptor 1, FPR1) 的

SNPs 与 CsA 血药浓度的相关性^[10]。上述基因的多态性研究大都集中在器官移植患者中，对于自身免疫病患者 CsA 血药浓度水平的影响还知之甚少。

综上，以自身免疫病患者为研究对象的考察环孢素血药浓度个体差异临床研究仍较少且无定论，目前仍没有可供临床自身免疫病患者用药的参考阈值范围。因此，本研究首先考察 CsA 在自身免疫病患者中的血药浓度分布状况，其次进一步探讨了与 CsA 代谢和作用相关的又在我国人群中突变频率较高的几个位点：CYP3A4*1G (rs2242480 C>T)、CYP3A5*3 (rs776746 A>G)、ABCB1 (rs1128503 C>T、rs2032582G>T/A、rs1045642 C>T)、POR*28 (rs1057868 C>T)、FPR1 (rs2070745C>G) 与患者个体血药浓度差异的相关性。

1 研究对象和材料

1.1 研究对象

选取 2018 年 7 月至 2020 年 1 月就诊于南京市鼓楼医院风湿免疫科，使用 CsA 进行治疗的自身免疫病患者。

纳入标准：（1）符合临床诊断自身免疫病的标准；（2）使用 CsA 治疗自身免疫病至少满 4 天且达到稳态血药浓度。

排除标准：（1）妊娠、伴其他严重并发症，如恶性肿瘤、重症感染等的病例；（2）病情急性加重入院只用药 1 次的死亡案例；（3）病历资料严重缺失的案例；（4）CsA 血药浓度超出最高检测限的病例；（5）合并使用氟康唑、酮康唑、利福平、地尔硫卓等显著影响 CsA 浓度的病例。

1.2 主要试剂

CsA 浓度测定试剂盒（6R079UL, Siemens Healthcare Diagnostics Inc）；Ezup 柱式血液基因组 DNA 抽提试剂盒（B518253, 上海生工生物工程股份有限公司）；Taq Plus DNA 聚合酶（B600090, 上海生工生物工程股份有限公司）；10X PCR Buffer（含 Mg²⁺）（B600017, 上海生工生物工程股份有限公司）；dNTP（10mM）（B500056, 上海生工生物工程股份有限公司）；SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒（B518141, 上海生工生物工程股份有限公司）；BigDye Terminator v1.1 测序试剂盒（4336701, Thermo Fisher Scientific）。

1.3 主要仪器

台式高速离心机 (TD5A-WS, 湖南湘仪实验仪器开发有限公司); PCR 仪 (Verity 96well, 美国 ABI); 凝胶成像仪 (FR-980A, 上海复日科技有限公司); 测序仪 (3730XL, 美国 ABI); 电泳仪 (DYY-6C, 北京六一仪器厂); 数显恒温水浴锅 (HS-800D, 太仓市科教器材厂);

2 研究方法

2.1 血样收集

收集患者服药前静脉采血的测定 CsA 浓度的残血 1ml 于 EDTA 抗凝管中, 保存于 -80°C 冰箱中。

2.2 外周血 DNA 的提取

冷冻血充分解冻后混匀, 取 300ul 加入 900ml 细胞裂解液内, 颠倒 5-6 次混匀, 室温静置 10min, 颠倒 2-3 次, 14000×g 室温离心 30s, 后弃上清, 保留 10-20ul, 涡旋振荡器上充分震荡 15-20s; 加入 300ul 核酸裂解液, 反复吹打 5-6 次, 液体变粘稠; 加入 100ul 蛋白沉淀液, 14000×g 室温离心 3min; 在另一 1.5ml EP 管中加入 300ul 室温异丙醇, 将前一步骤中的上清液全部加入其中, 轻柔反复颠倒至白色絮状沉淀出现; 14000×g 室温离心 1min, 弃上清液, 加入 300ul 室温 70% 乙醇, 轻柔颠倒 EP 管; 再次于 14000×g 室温离心 1min, 弃上清液, 室温静置 15min; 加入 100ul DNA 再水化液溶解 DNA, 标记后于 -80°C 冰箱保存。

2.3 引物设计及测定条件

在 NCBI 中查找目标 SNPs 参考序列, 使用软件 Primer Premier 5 进行引物设计。

SNPs	正向引物 F	反向引物 R
rs 1128503	5' GTAAGTCTGAGTTGGCCATCTATC 3'	5' CAAACAATACAGGTTCTGACTC 3'
rs 2032582	5' GCTTTAGTAATGTTGCCGTGAT 3'	5' GAAGAACAGTGTGAAGACAATGG 3'
rs 1045642	5' CACACAACTTTTCCTTAATCTCAC 3'	5' CCCAGACTCTGTACTTGGACTTAAA 3'
rs 776746	5' TACAGGCAACATGACTTAGTAGACA 3'	5' TAGCACTGTTCTGATCACGTCG 3'
rs 2242480	5' TGCTTATTGTTAGATGCCACTG 3'	5' ATGATTTGCCTTATTCTGGTTCTG 3'
rs 1057868	5' TGTGCGGTGTTGTGGAGT 3'	5' TCTCACCTTGTGGGACTGCTC 3'
rs 2070745	5' TATTCAGGAGCAGACAAGATGG 3'	5' CATTATCCTCTCTTTAGGGTTCG 3'

PCR 反应体系: 25μl 体系的配制为: 1ul 模板、0.5ul 正向引物、0.5ul 反向引物、0.5ul 的 10mM dNTP、2.5ul Taq Buffer、0.2ul 的 5U/ul Taq 酶、20ul 的水。

PCR 反应条件: 95°C 预变性 3min; 94°C 变性 30s; 58°C 退火 30s; 72°C 延伸

60s; 进行 35 个循环; 72°C 修复延伸 10min。

基因型测序: 用 PCR 产物纯化回收试剂盒对产物进行回收, 并用测序仪对其序列进行测定 (3730XL 美国 ABI), 得到序列峰图进行分析。

2.4 统计学分析

用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。计量资料服从正态分布的用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均值比较用 t 检验, 多样本均值比较采用方差分析, 计数资料采用构成比或率表示, 组间比较采用卡方检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。为消除患者给药剂量对 CsA C_0 的影响, 将 CsA C_0 矫正为单位剂量 CsA C_0 (CsA C_0/d)。对纳入患者的各基因型频率进行 Hardy-Weinberg (HWE) 平衡检验, $P > 0.05$ 说明入组的患者具有良好的群体代表性。

3 结果

3.1 患者基本资料

本部分研究共纳入自身免疫病患者 193 例, 具体内容如下表 1 所示。

表 1 患者基本资料信息表

名称	分类	数值
性别	男	41
	女	152
年龄 (岁)		47.40±14.58
诊断	SLE	31 (16.06%)
	SS	62 (32.12%)
	DM	43 (22.28%)
	其他 ADs	57 (29.53%)
CsA 日剂量 (mg)		150.91±31.91
	≤125mg	34 (17.62%)
	125-175mg	119 (61.66%)
	≥175mg	40 (20.73%)
CsA C_0 (ng·ml ⁻¹)	中位数	86.20
	平均值	101.00±52.77

3.2 服药日剂量与血药浓度

纳入患者的服药日剂量主要集中分布在 125-175mg。当日剂量低于 175mg, C_0 主要分布在 50-100ng·ml⁻¹, 当日剂量超过 175mg, C_0 多分布在 100-150ng·ml⁻¹(表 2)。采用卡方检验比较不同剂量组内 C_0 分布状况, 结果显示不同剂量组内的患者 CsA C_0 分布情况有显著差异, 提示血药浓度具有剂量依赖性, 而在同一剂量组内 CsA 患者 CsA C_0 分布情况仍有显著差异, 提示服用 CsA 后个体间的生物利用度差异大。

表 2 日剂量与 CsA C₀ 分布

C ₀ 分布 (ng·ml ⁻¹)	人数	剂量 (mg)		
		≤125	125-175	≥175
<50	13	4 (11.76%)	8 (6.72%)	1 (2.50%)
50-100	111	23 (67.65%)	75 (63.03%)	13 (32.50%)
100-150	43	4 (11.76%)	21 (17.65%)	18 (45.00%)
>150	26	3 (8.83%)	15 (12.60%)	8 (20.00%)
总体	193	34	119	40
<i>P</i>		<0.001	<0.001	0.001

3.3 患者年龄与血药浓度

本研究采用四分位法对患者年龄进行分组, 将 193 例自身免疫病患者按年龄分为 4 组, 分别为≤36 岁组、37-48 岁组、49-59 岁组和≥60 岁组。对各年龄组间的 CsA C₀、CsA C₀/d 分布进行比较, 差异有统计学意义(表 3)。

将 4 个年龄组的自身免疫病患者 CsA C₀ 两两之间进行方差分析, 发现≤36 岁组与≥60 岁组、37-48 岁与≥60 岁组间的血药浓度存在显著性差异(表 4)。将 4 个年龄组的自身免疫病患者 CsA C₀/d 两两之间进行方差分析, 发现≤36 岁组与≥60 岁组、37-48 岁与≥60 岁组、49-59 岁与≥60 岁组间的血药浓度均存在显著性差异(表 5)。提示年龄对 CsA 血药浓度有显著影响。

表 3 年龄与 CsA 血药浓度水平

年龄	人数	C ₀ (ng·ml ⁻¹)	C ₀ /d (ng·ml ⁻¹ ·mg ⁻¹)
≤36 岁	50	85.17±43.51	0.57±0.27
37-48 岁	52	97.46±38.11	0.64±0.26
49-59 岁	43	103.54±55.75	0.68±0.30
≥60 岁	48	121.34±64.26	0.87±0.47
<i>P</i>		0.006	<0.001

表 4 各年龄组患者 CsA C₀ 和 C₀/d 的方差分析

	≤36 岁		37-48 岁		49-59 岁		≥60 岁	
	C ₀	C ₀ /d	C ₀	C ₀ /d	C ₀	C ₀ /d	C ₀	C ₀ /d
≤36 岁	—	—	0.23	0.27	0.09	0.12	0.001*	0.001*
37-48 岁	0.23	0.27	—	—	0.56	0.62	0.02*	0.001*
49-59 岁	0.09	0.12	0.56	0.62	—	—	0.10	0.006*
≥60 岁	0.001*	0.001*	0.02*	0.001*	0.10	0.006*	—	—

**P*<0.05。

3.4 患者性别与血药浓度

193 例自身免疫病患者中, 男性占 21.24%, 女性占 78.76% (表 5)。对各性别组间 C₀ 分布、C₀/d 分布进行比较分析, 差异无统计学意义。

表 5 性别与 CsA 血药浓度水平

性别	人数 (百分比)	C ₀ (ng·ml ⁻¹)	C ₀ /d (ng·ml ⁻¹ ·mg ⁻¹)
----	----------	---------------------------------------	--

男	41 (21.24%)	99.73±46.55	0.64±0.28
女	152 (78.76%)	102.06±53.85	0.70±0.37
<i>P</i>		0.323	0.061

3.5 患者临床诊断与血药浓度

193 例自身免疫病患者，按临床诊断分为 4 组，其中 SLE 31 例，SS 62 例，皮肌炎（dermatomyositis, DM）43 例，其他自身免疫病 57 例，主要包括：血管炎、多发性肌炎、抗合成酶抗体综合征、免疫性血小板减少、混合型结缔组织病等（表 6）。各诊断组间 C_0 分布、 C_0/d 分布比较，差异无统计学意义。

表 6 诊断与 CsA 血药浓度水平

诊断	人数 (百分比)	C_0 (ng·ml ⁻¹)	C_0/d (ng·ml ⁻¹ ·mg ⁻¹)
SLE	31 (16.06%)	100.05±56.86	0.71±0.38
SS	62 (32.12%)	108.76±55.41	0.72±0.35
DM	43 (22.28%)	98.61±41.92	0.65±0.32
其他	57 (29.53%)	96.80±53.74	0.67±0.35
<i>P</i>		0.616	0.663

3.6 CYP3A4、CYP3A5、ABCB1、POR 和 FPR1 基因型测定

CYP3A4(rs2242480)、CYP3A5(rs776746)、ABCB1(rs 1128503、rs2032582、rs1045642)、POR (rs1057868) 及 FPR1 (rs2070745) 七个位点不同突变的图谱如图 1 所示。其中，ABCB1 的 rs2032582 有 6 种基因型：野生型 (GG)、杂合突变型 (GA+GT)、纯合突变型 (AA+AT+TT)。

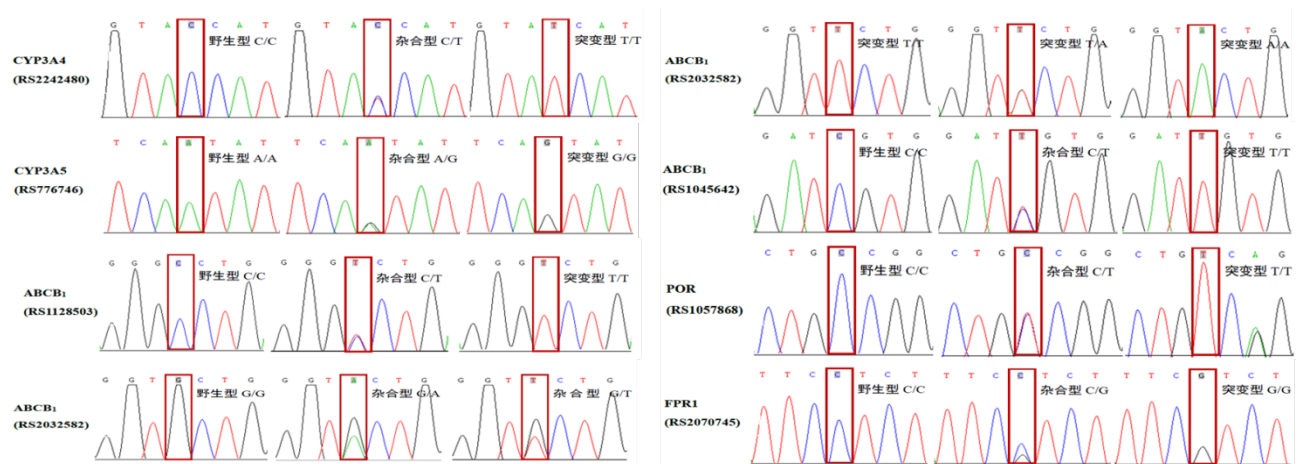


图 1 七个 SNP 位点不同基因型的图谱

3.7 CYP3A4、CYP3A5、ABCB1、POR 和 FPR1 等位基因及基因型的分布频率

190 例患者的 CYP3A4、CYP3A5、ABCB1、POR 和 FPR1 等位基因及基因型频率分布见表 7。其中，rs1128503 基因型未检测出患者 2 例，rs2032582 基因型未检测出患者 1 例，rs2242480 基因型未检测出患者 1 例。对本研究考察的 7

个 SNP 位点的基因分型结果进行 HWE 平衡检验, 结果显示, 除 rs2070745 外, 其余位点均符合 HWE 平衡 ($P>0.05$)。

表 7 CYP3A4、CYP3A5、ABCB1、POR 和 FPR1 等位基因及基因型频率分布

基因名称	基因型	人数 (n)	基因型频率 (%)	等位基因分析		
				等位基因	等位基因频率 (%)	HWE 检验- <i>P</i>
CYP3A4 (rs2242480)	CC	108	57.14	C	75.40	0.826
	CT	69	36.51	T	24.60	
	TT	12	6.35			
CYP3A5 (rs776746)	AA	17	8.94	A	27.11	0.264
	AG	69	36.31	G	72.89	
	GG	104	54.73			
ABCB1 (rs1128503)	CC	18	9.57	C	34.84	0.121
	CT	95	50.53	T	65.16	
	TT	75	39.89			
	GG	34	17.99	G	41.27	
	GT	65	34.39	T	43.39	
ABCB1 (rs2032582)	GA	23	12.17	A	15.34	0.726
	TT	35	18.52			
	AA	3	1.59			
	TA	29	15.34			
ABCB1 (rs1045642)	CC	69	36.32	C	60.79	0.712
	CT	93	48.94	T	39.21	
	TT	28	14.74			
POR (rs1057868)	CC	60	31.58	C	58.42	0.148
	CT	102	53.68	T	41.58	
	TT	28	14.74			
FPR1 (rs2070745)	CC	41	21.58	C	40.00	0.001
	CG	70	36.84	G	60.00	
	GG	79	41.58			

3.8 CYP3A4、CYP3A5、ABCB1、POR 和 FPR1 基因型对 CsA 血药浓度的影响

CYP3A4、CYP3A5、ABCB1、POR 和 FPR1 基因型多态性对 190 例自身免疫病患者 CsA 血药浓度的影响见表 8。CYP3A4(rs2242480)、CYP3A5(rs776746)、ABCB1(rs1128503)、ABCB1(rs1045642)、POR(rs1057868)及 FPR1(rs2070745)的 SNPs 与 CsA 血药浓度没有显著的相关性, ABCB1(rs2032582)野生型(GG)患者的 CsA C_0/d ($0.81\pm 0.42\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) 显著高于较杂合突变型(GT/GA,

0.65±0.30ng·ml⁻¹·mg⁻¹, *P*=0.023)和纯合突变型(TT/AA/TA, 0.66±0.34ng·ml⁻¹·mg⁻¹, *P*=0.039)。

表 8 CYP3A4、CYP3A5、ABCB1、POR 和 FPR1 基因多态性对 CsA 血药浓度的影响

	SNPs	n	CsA C ₀ (ng·ml ⁻¹)	CsA C ₀ /d (ng·ml ⁻¹ ·mg ⁻¹)
CYP3A4 (rs2242480)	CC	108	101.00±51.45	0.66±0.35
	CT	69	99.32±50.99	0.69±0.31
	TT	12	119.17±68.98	0.85±0.49
<i>P</i>			0.477	0.204
CYP3A5 (rs 776746)	AA	17	110.29±70.91	0.72±0.38
	AG	69	96.00±48.57	0.67±0.32
	GG	104	103.56±51.42	0.69±0.35
<i>P</i>			0.498	0.848
ABCB1 (rs 1128503)	CC	18	108.63±54.50	0.66±0.26
	CT	95	101.53±50.28	0.68±0.33
	TT	75	99.67±55.39	0.69±0.38
<i>P</i>			0.811	0.917
ABCB1 (rs2032582)	GG	34	115.80±59.35	0.81±0.42
	GT/GA	88	95.13±48.91	0.65±0.30*
	TT/AA/TA	67	102.73±52.44	0.66±0.34*
<i>P</i>			0.145	0.059
ABCB1 (rs1045642)	CC	69	106.17±53.23	0.71±0.36
	CT	93	97.71±50.80	0.66±0.32
	TT	28	102.01±55.80	0.69±0.38
<i>P</i>			0.597	0.584
POR (rs1057868)	CC	60	103.29±55.78	0.71±0.36
	CT	102	101.03±54.45	0.67±0.34
	TT	28	98.81±35.31	0.69±0.31
<i>P</i>			0.927	0.769
FPR1 (rs2070745)	CC	41	101.03±48.13	0.74±0.42
	CG	70	103.16±63.49	0.68±0.37
	GG	79	100.07±43.26	0.66±0.27
<i>P</i>			0.937	0.468

注: *与野生型比较 *P*<0.05

4 讨论

CsA 作为 T 淋巴细胞抑制剂, 近年来越来越多的应用于干燥综合征、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等自身免疫病的治疗, 由于其生物利用度个体间差异大, 且治疗窗狭窄, 临床上对 CsA 用药患者常规进行治疗药物浓度监测。有研

究提示 CsA 体内代谢酶、转运体和作用靶点的基因多态性可能是导致患者血药浓度个体差异的重要原因。

本研究首先测定了服用 CsA 的自身免疫病患者的血药浓度，然后进一步检测了与 CsA 代谢酶、转运体和调控因子相关的 SNPs 基因型，并进一步分析了这些 SNPs 对其血药浓度的影响情况。血药浓度的研究结果示：血药浓度具有剂量依赖性，但是个体间差异很大。ABCB1 G2677T/A (rs2032582) 等位基因突变与 CsA C_0/d 显著相关，其野生型 (GG) 患者的 CsA C_0/d 显著高于杂合突变型和纯合突变型患者。

环孢素血药浓度差异大，在自身免疫病患者中的研究较少，因此安全有效的血药浓度范围仍无定论。以自身免疫病相关的间质性肺病为例，有研究表明 100-200 $ng \cdot mL^{-1}$ 为治疗达标浓度^[11]。有研究对 45 位服用 CsA 的自身免疫病患者开展血药浓度监测，CsA C_0 的中位数为 91 $ng \cdot mL^{-1}$ ，平均值为 104.4±119.5 $ng \cdot mL^{-1}$ ，研究结果表明大多数临床医生期望谷浓度不超过 100 $ng \cdot mL^{-1}$ 以降低药物毒副作用的发生率^[12]。一项老年与中青年肾移植患者 CsA 血药浓度比较分析的研究发现^[13]，18 至 60 岁、超过 60 岁这两个年龄段的患者 CsA 血药浓度有显著差异，血药浓度随着年龄的增长而逐渐升高，可能是因为老年患者的 CYP 酶活性降低，肝脏血流量减少，使得 CsA 消除变慢。

其次，190 例入组患者的 CYP3A4 (rs2242480)、CYP3A5 (rs776746)、ABCB1 (rs1128503、rs2032582、rs1045642)、POR (rs1057868) 及 FPR1 (rs2070745) 基因突变频率分别为 24.60%、72.89%、65.16%、58.73%、39.21%、41.58%、60.00%，这与以亚洲人群为研究对象的结果基本一致^[14-16]。进一步分析发现，ABCB1 G2677T/A (rs2032582) 等位基因突变与 CsA C_0/d 显著相关，其野生型 (GG) 患者的 CsA C_0/d 显著高于杂合突变型和纯合突变型患者。

ABCB1 G2677T/A (rs2032582) 突变为非同义 SNPs，其序列改变导致编码对应丙氨酸变为苏氨酸或丝氨酸，使其由亲脂性变为亲水性，从而改变蛋白表达，进而影响了 P-gp 的转运功能^[17]。ABCB1 G2677T/A 的 SNPs 对 CsA 药代动力学的影响尚存争议。谢宇对 141 例肾移植患者进行该等位基因的检测，发现 TT、AA 携带者移植后 7、14、30 天的 C_0/d 值显著高于 GG 患者^[18]。而 Fady Daniel 等的研究显示相反的结果，G2677T/A 基因型为 TT 型的患者，CsA 血药浓度较

其它基因型患者低^[19]。这与本文研究结果呈现的趋势一致，本研究发现野生型（GG）患者的 CsA C_0/d 较杂合突变型（GA+GT）和纯合突变型（AA+AT+TT）偏高。而本研究涉及的其他两个 ABCB1 基因：ABCB1 C3435T (rs1045642)和 C1236T (rs1128503)的位点突变为同义 SNPs，即编码序列的改变未影响蛋白质的氨基酸序列，对转运体 ABCB1 的影响较小，有研究证实 CsA 的药代动力学不受 ABCB1 SNPs 的影响^[14]。112 名中国肾脏移植患者的研究发现 ABCB1 C3435T (rs1045642)三种基因型的 C_0 和 C_0/d 没有显著性差异^[20]。对于 C1236T (rs1128503) 突变患者，可能在 CsA 服药后显示出较高的 C_0 。在中国重症肌无力患者的研究中^[21]，发现 C1236T 突变型纯合子的 C_0 显著高于野生型纯合子，然而其 C_0/d 间无统计学差异。类似报道，在肾脏移植早期 ABCB1 C1236T 的 SNPs 与 CsA C_0/d 无关^[20]。

CYP3A 是肝脏代谢药物的主要酶，这些酶的 SNPs 中，CYP3A5*3 和 CYP3A4*1G 的突变频率在中国人群中较高，可能会影响 CYP3A 整体的活性^[57]。CYP3A5 * 3 是 CYP3A5 A6986G (rs776746) 的变异等位基因，其野生型等位基因为 CYP3A5*1。CYP3A5*3 等位基因的纯合子携带者表达的功能性 CYP3A5 蛋白水平非常低^[22]，因此理论上来说这种突变会降低对 CsA 的清除。CYP3A5*3 在中国人群中的突变发生率高达 70%，一项中国肾移植患者研究结果亦显示，该等位基因可作为早期肾移植患者确定 CsA 治疗剂量的指标^[14]，此外有研究证实：移植后第一周的 C_0/d 较低（*1/*1 < *1/*3 < *3/*3）^[23]；但有文献提示：CYP3A5*3 变异等位基因携带者的 C_0/d 较低^[24]，还有一项在 82 名亚洲肾移植患者中进行的研究也得出了与本文相同的结论^[25]，即 CYP3A5 (rs776746) 位点突变未对 CsA 血药浓度产生显著影响。而 CYP3A4*1G 是 CYP3A4 C20230T (rs2242480) 的变异等位基因，该等位基因的突变可能使得 CYP3A4 酶活性提高^[60]，理论上 CsA 血药浓度应降低。中国肾移植患者术后 1 月内，CYP3A4*1/*1 野生纯合子携带者 CsA 的 C_0 及 C_0/D 明显高于携带 CYP3A4*1/*1G 或 CYP3A4*1G /*1G 患者^[26]。但本研究未发现其与 CsA 血药浓度的相关性。以上位点在脏器移植患者人群中的研究较多，针对使用环孢素的剂量低于脏器移植患者的免疫病患者的研究仍亟待扩大样本进一步考察和确认。

此外,本研究也未发现 POR (rs1057868) 及 FPR1 (rs2070745) 的 SNPs 与 CsA 血药浓度的相关性。细胞色素 P450 氧化还原酶 POR 是构成 CYP 酶的重要元素,其基因中最常见的突变为 POR*28 (C1508T, rs1057868),该位点突变能影响 CYP3A 酶的活性,从而影响 CsA 的药代动力学过程。不表达 CYP3A5 (CYP3A5*3/*3 携带者) 的 POR*28/*28 患者显示 CsA 的 C_0/d 显著降低,提示 CYP3A4 活性增加^[27]。但也有研究表明并未发现 POR*28 与 CsA 药动学存在关联^[28]。FPR1 上 101 位携带亮氨酸取代缬氨酸的基因突变(p.V101L, rs2070745),通过提高 FPR1 受体对 CsA 的亲和力从而抑制 FPR1 功能,该位点的 SNP 可能仅从药效学作用,致使 CsA 不良反应发生率升高,而对 CsA 的血药浓度无影响。但考虑对纳入患者该位点的各基因型频率进行 Hardy-Weinberg 平衡检验,结果未符合 HWE 平衡,提示针对该位点的研究,入组的患者并不具有良好的群体代表性,这也可能是未发现 rs2070745 与 CsA 的血药浓度相关性的原因。

本研究主要针对目前研究较少的自身免疫病患者开展,发现 ABCB1 (rs2032582) 基因多态性对 CsA 血药浓度有影响,野生型患者的药物浓度显著高于突变型患者,研究结果将有助于临床医生选择或调整 CsA 用药剂量、判断药物疗效提供参考,保障患者合理安全及个体化精准用药。但是,本研究仍存在一定局限性:研究中存在患者失访,部分临床指标数据缺失,且未对纳入患者进行用药依从性评价,可能对血药浓度以及临床指标造成影响。本研究为单中心研究,对中国庞大的自身免疫病患者总数来说代表意义有限,需将来进行多中心、大样本的研究来进一步确证。

声明:所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mok C C. Calcineurin inhibitors in systemic lupus erythematosus[J]. Best Practice and Research: Clinical Rheumatology, 2017, 31(3): 429–438. DOI:10.1016 / j.berh.2017.09.010
- [2] Dougados M. Cyclosporin in rheumatoid arthritis[C]. Clinical and Experimental Rheumatology. 1994, 12 SUPPL 11(4):S75-8. DOI: 10.1007/BF00541320
- [3] Fox R I, Stern M, Michelson P. Update in Sjogren syndrome[J]. Current Opinion in Rheumatology, 2000, 12(5): 391–398. DOI: 10.1097/00002281-200009000-00007.
- [4] Evans W E, McLeod H L. Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects[J]. New England Journal of Medicine, 2003, 348(6): 538–549. DOI: 10.1056/NEJMra020526.
- [5] Kronbach T, Fischer V, Meyer U A. Cyclosporine metabolism in human liver: Identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme

- explains interactions of cyclosporine with other drugs[J]. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1988, 43(6): 630–635. DOI: 10.1038/clpt.1988.87.
- [6] Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression[J]. *Nature Genetics*, 2001, 27(4): 383–391. DOI: 10.1038/86882.
- [7] Wang D, Guo Y, Wrighton S A, et al. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs[J]. *Pharmacogenomics Journal*, 2011, 11(4): 274–286. DOI: 10.1038/tpj.2010.28.
- [8] Kim R B. MDR1 single nucleotide polymorphisms: Multiplicity of haplotypes and functional consequences[J]. *Pharmacogenetics*, 2002, 12(6): 425–427. DOI: 10.1097/00008571-200208000-00002.
- [9] Pascussi J M, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, et al. Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2001, 268(24): 6346–6358. DOI: 10.1046/j.0014-2956.2001.02540.x.
- [10] Zhou C, Zhou Y, Wang J, et al. V101L of human formyl peptide receptor 1 (FPR1) increases receptor affinity and augments the antagonism mediated by cyclosporins[J]. *Biochemical Journal*, 2013, 451(2): 245–255. DOI:10.1042/BJ20121839
- [11] Miyake S, Ohtani Y, Sawada M, et al. Usefulness of cyclosporine A on rapidly progressive interstitial pneumonia in dermatomyositis[J]. *Sarcoidosis Vasculitis and Diffuse Lung Diseases*, 2002, 19(2): 128–133. DOI:10.1046/j.1440-1843.2002.00381.x
- [12] Tesfaye H, Prusa R, Jedlickova B, et al. Cyclosporine use in miscellaneous clinical settings other than organ transplantations: Is there any evidence for target levels?[J]. *Annals of Transplantation*, 2008, 13(4): 34–40. DOI:10.1016/j.athoracsur.2008.04.068
- [13] 董卫华, 董亚琳, 王茂义等. 老年与中青年肾移植患者环孢素A血药浓度比较分析[J]. *中国药房*, 2005, 10: 762–764. DOI:10.3969/j.issn.1001-0408.2005.10.019.
- [14] Meng X G, Guo C X, Feng G Q, et al. Association of CYP3A polymorphisms with the pharmacokinetics of cyclosporine A in early post-renal transplant recipients in China[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2012, 33(12): 1563–1570. DOI: 10.1038/aps.2012.136.
- [15] Zhou L Y, Zuo X C, Chen K, et al. Significant impacts of CYP3A4*1G and CYP3A5*3 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of diltiazem and its main metabolites in Chinese adult kidney transplant patients[J]. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2016, 41(3): 341–347. DOI: 10.1111/jcpt.12394.
- [16] 刘世浩. 再生障碍性贫血患儿体内环孢素血药浓度影响因素及群体药代动力学研究[J]. *中国医科大学*, 2019.
- [17] Llaudó I, Colom H, Giménez-Bonafé P, et al. Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study[J]. *Transplant International*, 2013, 26(2): 177–186. DOI: 10.1111/tri.12018.
- [18] 谢宇, 宋洪涛, 王庆华等. CYP3A5*3和MDR1G2677T/A基因多态性对肾移植患者环孢素A血药浓度及疗效的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2011, 46(20): 1591–1596.
- [19] Daniel F, Lioriot M A, Seksik P, et al. Multidrug resistance gene-1 polymorphisms and resistance to cyclosporine A in patients with steroid resistant ulcerative colitis[J]. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2007, 13(1): 19–23. DOI: 10.1002/ibd.20046.

- [20] Wang Y, Wang C, Li J, et al. Effect of genetic polymorphisms of CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine concentration during the early stage after renal transplantation in Chinese patients co-treated with diltiazem[J]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2009, 65(3): 239–247. DOI: 10.1007/s00228-008-0577-4.
- [21] Zhang Y T, Yang L P, Shao H, et al. ABCB1 polymorphisms may have a minor effect on ciclosporin blood concentrations in myasthenia gravis patients[J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2008, 66(2): 240–246. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2008.03180.x.
- [22] Hustert E, Haberl M, Burk O, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism[J]. *Pharmacogenetics*, 2001, 11(9): 773–779. DOI: 10.1097/00008571-200112000-00005.
- [23] Hu Y F, Qiu W, Liu Z Q, et al. Effects of genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation[J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2006, 33(11): 1093–1098. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2006.04492.x.
- [24] Chu X M, Hao H P, Wang G J, et al. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on cyclosporine A metabolism and elimination in Chinese renal transplant recipients[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2006, 27(11): 1504–1508. DOI:10.1111 / j.1745-7254.2006.00428.x.
- [25] Loh P T, Lou H X, Zhao Y, et al. Significant Impact of Gene Polymorphisms on Tacrolimus But Not Cyclosporine Dosing in Asian Renal Transplant Recipients[J]. *Transplantation Proceedings*, 2008, 40(5): 1690–1695. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.04.010.
- [26] 胡永芳, 翟所迪, 邱雯. CYP3A5*3和CYP3A4*18B基因多态性对肾移植患者环孢素药代动力学的影响[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(03): 378–382. DOI:10.3321/j.issn:1001-1978.2009.03.024
- [27] Elens L, Hesselink D A, Bouamar R, et al. Impact of POR*28 on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine A in renal transplant patients[J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2014, 36(1): 71–79. DOI: 10.1097/FTD.0b013e31829da6dd.
- [28] Lunde I, Bremer S, Midtvedt K, et al. The influence of CYP3A, PPARA, and POR genetic variants on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients[J]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2014, 70(6): 685–693. DOI: 10.1007/s00228-014-1656-3.