

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.09.012

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.09.012>

PXR2基因多态性对肾移植术后他克莫司血药浓度和药物服用剂量的影响

杨锦然, 杨华, 李新长, 龙成美

(江西省人民医院器官移植科, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 探究孕烷受体(pregnane X receptor, PXR)的剪接变体PAR-2(PXR2)启动子区6 bp-deletion基因多态性对肾移植术后他克莫司血药浓度和药物服用剂量(blood concentration and drug dose, C/D)影响, 从而指导患者肾移植术后他克莫司的个体化治疗。方法: 收集江西省人民医院器官移植科2014年7月至2018年6月73例肾移植患者血液标本, 采用Anelic Special-Touch Down PCR法检测PXR2基因多态性分型。记录患者年龄、性别、体重、血红蛋白、总胆红素值及质子泵抑制剂的使用情况。结果: PCR结果显示, 73例标本中PXR2纯合子型39例(53.42%), 野生型4例(5.48%), 杂合子型30例(41.1%)。多元线性回归分析显示, PAR-2启动子区6 bp-deletion基因多态性的基因分型与C/D无明显相关性, 差异无统计学意义($P>0.05$)。血红蛋白、总胆红素与C/D呈正相关, 差异有统计学意义($P<0.05$)。单因素方差分析显示, 纯合子型、野生型、杂合子型3个组别的C/D数值在术后3 d、2周、1个月组间比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论: PXR-2启动子区6 bp-deletion基因多态性对他克莫司C/D无影响, 血红蛋白、胆红素水平对他克莫司C/D有影响且呈正相关。

[关键词] PXR2; 6 bp-deletion; 基因多态性; 他克莫司; 血药浓度和药物服用剂量

Effect of PXR2 polymorphism on the rate of tacrolimus blood concentration and drug dose in renal transplant patients

YANG Jinran, YANG Hua, LI Xinchang, LONG Chengmei

(Department of Organ Transplantation, Jiangxi Province People's Hospital, Nanchang 330006, China)

Abstract **Objective:** To Explore effect of PAR-2 splice variant of PXR (PXR2) polymorphism on the rate of tacrolimus blood concentration and drug dose (C/D) in renal transplant patients. **Methods:** We collected the 73 blood preparations of the renal transplant patients in the Organ Transplant Department of Jiangxi Province People's

收稿日期 (Date of reception): 2019-01-19

通信作者 (Corresponding author): 龙成美, Email: ddlongchm19@163.com

基金项目 (Foundation item): 江西省卫生与计划生育委员会科技计划 (20155035)。This work was supported by the Science Plan of Jiangxi Provincial Health and Family Planning Commission, China (20155035).

Hospital from July 2014 To June 2017. Detected the PXR2 polymorphism by the means of Anelic Special-Touch Down PCR. Recorded the age, sexual, weight, hemoglobin value, total bilirubin value and the use of proton-pump inhibitor. **Results:** The PCR show that there are three genes types which include 39 homozygote type (53.42%), 4 wild type (5.48%) and 30 heterozygote type (41.1%). The multiple linear regression shows that the 6 bp-deletion polymorphism in the promotor region of PXR2 is unrelated to C/D, and the difference was not statistically significant ($P>0.05$). The hemoglobin value and total bilirubin value was changing positively with the tacrolimus C/D and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The One-Way ANOVA indicated that there was no statistically significant difference of C/D values between the three groups of homozygous, wild and heterozygous types on 3 days, 2 weeks and 1 month after the operation. **Conclusion:** The 6 bp-deletion polymorphism in the promotor region of PXR2 had nothing to do with Tacrolimus C/D. The hemoglobin value and total bilirubin value was changing positively with the Tacrolimus C/D.

Keywords PXR2; 6 bp-deletion; polymorphism; tacrolimus; blood concentration and drug dose

肾移植是终末期肾病最有效的治疗手段, 但术后移植器官的长期存活离不开免疫抑制剂的应用, 以用于预防术后的排斥反应。钙调磷酸酶抑制剂(calcineurin inhibitors, CNI)是肾移植术后常用的基础免疫抑制剂。CNI类主要包括环孢素和他克莫司(FK506)。因他克莫司免疫抑制强度相对于环孢素更强, 故其临床应用相对更为广泛。但他克莫司的安全用药窗窄, 其浓度偏低则免疫抑制强度不足, 易诱发排斥反应, 使得肾移植植物功能障碍甚至丢失。他克莫司浓度偏高除存在药物本身的肝肾毒性外, 主要还会导致免疫抑制强度过度, 而诱发感染。因此肾移植术后患者需密切监测他克莫司的血药浓度, 予以动态调整。基因多态性对他克莫司血药浓度存在影响。研究^[1]表明: 孕烷受体(pregnane X receptor, PXR)的变异会导致药物代谢的差异, 进而影响他克莫司的血药浓度。目前已经发现了十余种人孕烷受体(hPXR)的剪接变体[如PXR1, PAR-2(SV1), PXR.2, PXR.3等]。PAR-2的启动子区存在6 bp-deletion(“-133GAGAAG-128”缺失), 会使PAR-2的表达量明显下降, 这一变异使PAR-2、总PXR和其下游靶基因CYP3A4和MDR1的表达减低^[2]。推测PAR-2启动子区6 bp-deletion多态性可能会影响FK506的体内代谢。本研究旨在探究PAR-2启动子区6 bp-deletion基因多态性对肾移植受者FK506血药浓度的影响, 在药物浓度监测(therapeutic drug monitoring, TDM)前指导FK506临床用药, 快速达到有效浓度, 减少不良反应的发生。

1 对象与方法

1.1 对象

选择2014年7月至2018年6月江西省人民医院器官移植科收治的73例肾移植患者为研究对象, 其中男女比例为1.52:1, 年龄(40.35 ± 3.78)岁, 体重(59.28 ± 9.46) kg。纳入标准: 年龄18~65岁; 首次行同种异体肾移植术; 均采用FK506+吗替麦考酚酯胶囊+强的松三联术后用药; 用药时间在半年以上; 患者自愿参加本研究并签署书面知情同意书。本研究经江西省人民医院医学伦理委员会审核批准。

1.2 方法

患者均未行抗体诱导治疗, 均使用以吗替麦考酚酯胶囊(骁悉)+他克莫司胶囊(普乐可复、FK506)+强的松为基础的免疫抑制方案。术中、术后第1天、术后第2日均给予甲强龙500 mg冲击治疗, 第4天始给予强的松50 mg/d口服, 每3 d递减10 mg, 快速减至10 mg维持。体重大于75 kg者骁悉用量为每12 h 1 000 mg口服, 体重75 kg以下者则为每12 h 750 mg口服。肾移植术后第1天即开始服用他克莫司, 他克莫司初始剂量为0.1~0.15 mg/kg, 移植术后半年以内他克莫司血药浓度维持于8~12 ng/dL, 6~12个月维持于8~10 ng/dL。因地尔硫卓及五酯胶囊均会影响他克莫司血药浓度, 故凡服用上述2类药物的患者均不进入本研究。治疗随访期间发生严重感染以致停用免疫抑制剂或移植植物丢失者均退出本研究。

1.2.1 PCR 检测基因表达

收集 73 例患者血液标本, 采用 Anelic Special-Touch Down PCR 法检测 6 bp-deletion 基因多态性分型。全血基因组 DNA 抽提, 以基因组为模板, 进行 PCR。正向引物为 5'-TGTTCAAAGTGGACCCAGG-3', 反向引物为 5'-GTGGTGAGTCCTGGTGACTG-3'。引物长度为 536 bp。提取 DNA 后进行 PCR 电泳。PCR 反应体系如表 1 所示, PCR 反应条件如表 2 所示(退火温度为 65~55 °C)。

表 1 PCR 反应体系

Table 1 Reaction system of PCR

反应组成	容积/ μL
gDNA template	2.0
10 × Taq buffer (mg^{2+} plus)	5.0
dNTP mixture (10 mmol/L)	1.0
08LS02-1F (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
08LS02-1R (10 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
Taq DNA polymerase (5 U/ μL)	0.5
Milli-Q H_2O	To 50 μL^*

*补水到总体积 50 μL 。

*Replenish water to total volume 50 μL .

表 2 PCR 反应条件

Table 2 Reaction condition of PCR

编号	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间	循环
1	95	5 min	—
2	95	30 s	—
3	65	30 s	-0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{cycle}^*$
4	72	30 s	2~4, 20
5	95	30 s	—
6	55	30 s	—
7	72	30 s	5~7, 20
8	72	3 min	—
9	25	hold	—

*每个循环降低 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

*Each cycle reduces 0.5 $^{\circ}\text{C}$.

对 PCR 产物进行测序: 由于正向引物和反向引物到测序位点均有 PolyA 结构, 造成测序峰形较差, 重新设计 PCR 产物步移引物进行测序。

08LS02-R2: 5'-ATCCCAGTTCCCATAGTC-3'。

1.2.2 他克莫司血药浓度检测

以肾移植术后第 3 d、2 周、1 个月为时间节点, 对所有入组患者采血行他克莫司血药浓度和药物服用剂量(blood concentration and drug dose, C/D)。逐一剂量, 并记录每次所测他克莫司药物浓度及当天所对应的血红蛋白值、总胆红素值、单位公斤体重药物服用剂量, 计算 C/D。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 对数据进行多元线性回归分析及方差分析, 以他克莫司 C/D 为应变量, 不同基因型、年龄、性别、组别、血红蛋白、胆红素水平及质子泵抑制剂使用情况为自变量, 采用多远线性回归分析, 分析各自变量因素对应变量他克莫司 C/D 的影响结果。以他克莫司 C/D 为应变量, 不同基因型为自变量, 采用单因素方差分析, 分析不同基因型对他克莫司 C/D 的影响。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 部分 Anelic Special-Touch Down PCR 电泳图

部分 Anelic Special-Touch Down PCR 电泳图可见存在 6 bp-deletion 基因的表达, 目标基因引物片段为 536 bp。图 1 为 24 个标本电泳图, 其中第 17 个标本为实验失败标本, 予以剔除。

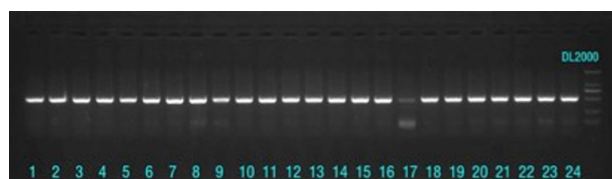


图 1 Anelic Special-Touch Down PCR 法检测 6 bp-deletion 基因多态性分型的电泳

Figure 1 Electrophoretogram of the polymorphism typing of 6 bp-deletion gene detected by Anelic Special-Touch Down PCR

2.2 3 个基因组分析

各组所占比例为: 纯合子型 53.42%, 野生型 5.48%, 杂合子型 41.1%, 男性占比为 60.27%, 女性占比为 39.72%, 即男:女 = 1.52, 体重为 (59.28 \pm 9.46) kg, 年龄为 (40.35 \pm 3.78) 岁。

2.3 多元线性回归分析

数据服从正态分布(表3), 表示该多元线性回归分析可信度高, 其中各时间段总胆红素、血红蛋白差异有统计学意义($P < 0.05$), 代表C/D值与总胆红素、血红蛋白呈正相关, 故在比较各基因型所致C/D值差异时必须对其相对应的总胆红素、血红蛋白进行分析, 排除其原因所致统计学偏倚。

表3 多元线性回归分析结果

Table 3 Results of multiple linear regression analysis

参数	均值	r^2	回归系B	t	P
术后第3天					
血红蛋白/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	92.47 ± 16.66		0.637	2.15	0.035
总胆红素/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	23.34 ± 7.56	0.11	0.23	3.12	0.024
各基因组别	—		7.801	1.53	0.13
术后第14天					
血红蛋白/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	91.96 ± 15.61		1.105	2.87	0.005
总胆红素/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	24.13 ± 13.26	0.11	1.73	5.24	0.015
各基因组别	—		-3.429	0.55	0.581
术后第30天					
血红蛋白/(g/L)	115.56 ± 18.72		0.86	2.89	0.005
总胆红素/($\mu\text{mol}/\text{L}$)	19.3 ± 5.62	0.11	3.21	7.83	0.016
各基因组别	—		4.7	0.82	0.415

3 讨论

肾移植术后最常用的及其最主要的抗排斥方案是以抗增殖类+CNI类+糖皮质激素为组合的三联免疫抑制方案。目前临床上使用最广泛的CNI类药物有环孢素及他克莫司。由于他克莫司免疫抑制强度较环孢素更强, 并具有肾毒性较小、能更好地保护移植肾、移植肾存活时间相对更长等优点, 故其临床应用更为广泛, 是CNI类的首选药物。但他克莫司有一个突出的临床问题: 其治疗窗窄, 生物利用度在个体间差异很大, 服用相同单位体重的药物剂量所致的血药浓度可能差异很大; 当其血药浓度过高, 可能导致免疫抑制过度, 增加感染机会, 同时合并肝肾毒性; 血药浓度过低则可能导致免疫抑制不足而诱发排斥反应, 故在监测血药浓度的同时, 应根据不同个体给予个体化的治疗。想要了解其生物利用度, 就必须了解他克莫司的药物代谢动力学。他克莫

2.4 单因素方差分析

纯合子型、野生型、杂合子型3个组别的C/D [$\text{ng}/(\text{mL}\cdot\text{mg}^{-1})$]数值在术后3 d、2周、1个月分别为: 44.43 ± 4.75 , 55.24 ± 20.5 , 64.3 ± 10.03 ($P=0.073$); 64.58 ± 8.31 , 93.22 ± 19.84 , 60.36 ± 8.57 ($P=0.065$); 65.34 ± 7.40 , 88.76 ± 32.91 , 73.90 ± 9.51 ($P=0.565$), 组间比较, 差异均无统计学意义。

司主要由肝及肠道中细胞色素P450, CYP3A4, CYP3A5代谢。CYP3A4, CYP3A5, CYP氧化还原酶(POR), 孕烷X受体编码基因(*NK1I2*)与MDR1等都存在基因多态性, 上述基因的多态性均能影响他克莫司血药浓度^[2]。PXR又名类固醇和外源性受体(steroid and xenobiotic receptor, SXR), 是核受体家族重要成员之一, 由*NR1I2*基因编码, 能被多种天然或合成孕激素激活。PXR主要表达于肝和小肠, 在肾和肺叶中表达相对较少。Nishimura等^[3]运用Taqman探针, 发现18种组织中存在PXR的表达。PXR为多种药物代谢酶(如CYP3A4, CYP3A5等)和药物转运体(如MDR1, MRP2, MRP3, MRP4等)基因的上游调控关键因子, 其变异会导致他克莫司血药浓度的差异^[4-5]。因此PXR的遗传变异, 可能是解释CYP3A4和MDR1存在如此大的个体差异的重要方向。PXR主要通过调节下游靶基因表达来体现其单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)。

目前虽然已发现3个SNPs会导致PXR不同程度的功能下降,但这3个突变的频率都非常低^[5],也不能解释PXR下游靶基因活性为何存在如此巨大个体差异。

基因的可变剪接体是分子生物学最为常见的现象之一,即1个基因转录产生多个mRNA,从而翻译成多种蛋白,是基因多态性的一个重要原因。PXR也存在可变剪接体,hPXR的剪接体为PXR1,PAR-2(SV1),PXR.2及PXR.3等。其中PAR-2(SV1)起始于外显子1b区,转录起始点为ATG,比hPXR.1(野生型,WT)的NH2端多出39个氨基酸,因此PAR-2共编码473个氨基酸。PAR-2与PXR.1对配体的激动活性基本相同^[6],提示PAR-2表达的下降可能会影响总PXR的表达和功能。2003年,Uno等^[7]发现了PAR-2的启动子区存在6 bp-deletion(“-133GAGAAG-128”缺失),这6 bp-deletion会使PAR-2的表达量明显下降。故6 bp-deletion基因突变及多态性可影响他克莫司血药浓度。

本研究通过PCR技术检测6 bp-deletion突变的基因分型,可分为纯合子型、野生型及杂合子型,结果显示:73例肾移植患者血清中其纯合子型53.42%,野生型5.48%,杂合子型41.1%。可见野生型人群所占比例最低,但本研究样本量相对较少,在一定程度上会使实验数据存在一定偏倚,对本试验的阴性结果可能存在一定影响。

他克莫司血药浓度影响因素是多样性的,如血红蛋白、总胆红素水平以及是否使用能够影响P450酶代谢的药物,如五酯胶囊、地尔硫卓、唑类抗真菌药、抗结核药利福平、质子泵抑制剂、糖皮质激素等。本组患者均未使用上述前4种药物,质子泵抑制剂及糖皮质激素(甲强龙/强的松)的使用方案均相同,无明显差异。但仍存在并非单一因素,故应对6 bp-deletion基因多态性、血红蛋白及胆红素水平进行多因素的分析。结果显示:6 bp-deletion基因多态性对他克莫司血药浓度无影响,但需要考虑胆红素水平、血红蛋白水平、质子泵抑制剂、糖皮质激素使用情况。基因多态性是能影响他克莫司血药浓度的主要因素,目前对其的研究也是热门。但并非所有基因呈现多态性都一定会影响到他克莫司的代谢。6 bp-deletion基因多态性对他克莫司血药浓度无明显影响,即为阴性结果。但阴性结果需尽量摒弃所有混杂因素,本研究重点考虑的因素首先为野生型样本量所占比例小以致其野生型总样本量相对较小。该因素可能带来样本量小所致的偏倚。故后

期研究仍需要扩大样本量来进一步验证。其次能影响他克莫司血药浓度的基因众多,正如前所述CYP3A4, CYP3A5, CYP氧化还原酶(POR)、孕烷X受体编码基因(NK1I2)与MDR1等都存在基因多态性,不同基因所致效应可能存在交叉影响。亦可深入探究PXR其他剪接体基因多态性对他克莫司代谢的影响,从而为他克莫司合理及个体化用药提供指导。

参考文献

1. Knops N, Levtchenko E, Bert VDH, et al. From gut to kidney: transporting and metabolizing calcineurin-inhibitors in solid organ transplantation[J]. *Int J Pharm*, 2013, 452(1/2): 14-35.
2. 蔡宜朋,陈泉金,谢培华,等.影响他克莫司血药浓度的基因多态性的研究进展[J]. *中国药房*, 2016, 27(26): 3741-3744. CAI Yingpeng, CHEN Quanjin, XIE Peihua, et al. Advances in gene polymorphism of effect on Tacrolimus blood concentration[J]. *China Pharmacy*, 2016, 27(26): 3741-3744.
3. Nishimura M, Naito S, Yokoi T. Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies[J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2004, 19(2): 135-149.
4. Sueyoshi T, Negishi M. Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, 41: 123-143.
5. Koyano S, Kurose K, Saito Y, et al. Functional characterization of four naturally occurring variants of human pregnane X receptor (PXR): one variant causes dramatic loss of both DNA binding activity and the transactivation of the CYP3A4 promoter/enhancer region[J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(1): 149-154.
6. Kurose K, Koyano S, Ikeda S, et al. 5' diversity of human hepatic PXR (NR1I2) transcripts and identification of the major transcription initiation site[J]. *Mol Cell Biochem*, 2005, 273(1/2): 79-85.
7. Uno Y, Sakamoto Y, Yoshida K, et al. Characterization of six base pair deletion in the putative HNF1-binding site of human PXR promoter[J]. *J Hum Genet*, 2003, 48(11): 594-597.

本文引用: 杨锦然, 杨华, 李新长, 龙成美. PXR2基因多态性对肾移植术后他克莫司血药浓度和药物服用剂量的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(9): 1929-1933. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.09.012

Cite this article as: YANG Jinran, YANG Hua, LI Xinchang, LONG Chengmei. Effect of PXR2 polymorphism on the rate of tacrolimus blood concentration and drug dose in renal transplant patients[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(9): 1929-1933. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.09.012