

维生素D受体基因多态性对肾移植患者术后早期他克莫司浓度的影响

胡楠, 邹素兰, 蒋艳, 杨旭萍, 董露露, 凌静* (常州市第一人民医院/苏州大学附属第三医院药学部, 江苏 常州 213003)

摘要: 目的 研究维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)基因多态性对肾移植术后早期他克莫司浓度的影响。方法 以360例使用他克莫司联合霉酚酸类药物以及糖皮质激素三联抗排异方案的肾移植患者为研究对象, 检测患者 *CYP3A5* (*rs776746*)、*VDR*(*VDR ApaI rs7975232*, *VDR BsmI rs1544410*, *VDR FokI rs2228570* 和 *VDR TaqI rs731236*)基因型, 比较分析不同基因型患者肾移植术后7d时他克莫司血药浓度(concentration, C)、剂量(dose, D)以及浓度剂量比(ratio of concentration to dose, C/D)的差异。结果 *CYP3A5* 非表达组(GG型)患者他克莫司的C和C/D均显著高于*CYP3A5*表达组(AA和AG型)($P<0.05$)。以*CYP3A5*基因型进行分层后, 在*CYP3A5*非表达组中*VDR ApaI rs7975232* AA型患者C/D显著低于AC和CC型患者($P<0.05$), 然而在*CYP3A5*表达组中*VDR ApaI rs7975232*各基因型的C和C/D差异无统计学意义。此外, 无论在*CYP3A5*表达组还是非表达组中, *VDR BsmI rs1544410*, *VDR TaqI rs731236*及*VDR FokI rs2228570*各基因型之间他克莫司的C、D和C/D差异均无统计学意义。结论 *VDR ApaI rs7975232*基因多态性与*CYP3A5*非表达组肾移植患者早期他克莫司血药浓度具有相关性, 该基因型检测可能有助于指导肾移植患者他克莫司个体化用药。

关键词: 肾移植; *CYP3A5*; 维生素D受体; 基因多态性; 他克莫司; 血药浓度; 剂量

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)14-1996-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221989

引用本文: 胡楠, 邹素兰, 蒋艳, 等. 维生素D受体基因多态性对肾移植患者术后早期他克莫司浓度的影响[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(14): 1996-2000.

Influence of Vitamin D Receptor Genetic Polymorphism in Recipients on Concentration of Tacrolimus in the Early Stage After Renal Transplantation

HU Nan, ZOU Sulan, JIANG Yan, YANG Xuping, DONG Lulu, LING Jing* (Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Changzhou/The Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of vitamin D receptor(VDR) genetic polymorphism on the concentration of tacrolimus in renal transplant recipients at early stage after transplantation. **METHODS** The 360 cases of renal transplant recipients who received tacrolimus, mycophenolic acid, and glucocorticoid were recruited. *CYP3A5*(*rs776746*) and *VDR*(*VDR ApaI rs7975232*, *VDR BsmI rs1544410*, *VDR FokI rs2228570* and *VDR TaqI rs731236*) genotypes were determined. The differences of concentration(C), dose(D) and the ratio of concentration to dose(C/D) of tacrolimus were compared among all of the genotype groups at the seventh day after renal transplantation. **RESULTS** The C and C/D of tacrolimus in *CYP3A5* non-expressor(GG genotype) were all significantly higher than *CYP3A5* expresser(AA and AG genotype)($P<0.05$). When taking the different *CYP3A5* genotypes in consideration, it was found that the C/D in patients with *VDR ApaI rs7975232* AA genotype was significantly lower than those with AC and CC genotypes for *CYP3A5* non-expressor($P<0.05$). However, *VDR ApaI rs7975232* gene polymorphism had no influence on C and C/D of tacrolimus in *CYP3A5* expresser. Besides, no matter in *CYP3A5* expresser or in non-expressor, *VDR BsmI rs1544410*, *VDR TaqI rs731236* and *VDR FokI rs2228570* had no effect on C, D and C/D of tacrolimus. **CONCLUSION** During the early stage of renal transplantation, the polymorphism of *VDR ApaI rs7975232* show significant relevance with tacrolimus concentration in *CYP3A5* non-expressor. The detection of the genotype might be helpful to guide individual therapy.

KEYWORDS: renal transplantation; *CYP3A5*; vitamin D receptor(VDR); genetic polymorphism; tacrolimus; drug concentration; dosage

钙调磷酸酶抑制剂他克莫司是目前肾移植免疫抑制剂中的核心药物。他克莫司通过与内源性细胞内受体结合成复合物, 抑制胞浆内磷酸酶神

经钙蛋白的活性, 阻断IL-2转录, 抑制T细胞活化, 发挥免疫抑制作用。他克莫司在体内主要在肝脏和小肠中被CYP3A酶代谢。他克莫司的治疗

基金项目: 江苏省研究型医院学会精益化用药-石药专项科研基金项目(JY202043); 常州市科技基础设施建设计划-常州市临床药学重点实验室(CM20223005)

作者简介: 胡楠, 女, 博士, 副主任药师, 硕导

E-mail: hn_324@163.com

*通信作者: 凌静, 女, 硕士, 主管药师

E-mail: lingjing198888@126.com

窗窄且个体差异大,血药浓度过高或过低会引起不良反应或排斥反应,因此临床需进行治疗药物浓度监测(therapeutic drug monitoring, TDM),并根据浓度及时调整用药剂量。近年来大量文献报道以及笔者所在课题组前期研究发现^[1-3],一些代谢酶、转运体和受体等基因多态性对他克莫司血药浓度有重要影响。其中 *CYP3A5 rs776746*(*CYP3A5**3) 基因多态性被证实与他克莫司浓度有很强的相关性,并且这种影响早在首次剂量时就发生^[4-6]。维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)属于核受体 NR1I 亚家族成员。VDR 与配体 1,25-(OH)₂VD₃(简称“VD₃”)结合形成异二聚体,再与 *CYP3A4* 基因启动子结合,从而诱导 *CYP3A4* 的表达^[7-8]。有研究发现血清中 VD₃ 水平与他克莫司浓度存在相关性^[9]。VDR 基因多态性会对 *CYP3A4* 的表达产生影响,从而导致他克莫司的药动学个体差异。VDR 多态性比较广泛,如 *VDR Apal rs7975232*(A>C), *VDR BsmI rs1544410*(G>A), *VDR FokI rs10735810*(C>T)和 *VDR TaqI rs731236*(T>C)等。目前有关 VDR 基因多态性对他克莫司浓度影响的研究较少^[10-11],因此本研究分析 *CYP3A5* 和 *VDR* 基因多态性对肾移植术后早期(移植后第 7 天)他克莫司浓度的影响,旨在为他克莫司个体化用药提供参考依据。

1 材料、对象与方法

1.1 研究对象

本研究为回顾性研究,选取 2012 年 1 月—2021 年 1 月在常州市第一人民医院接受同种异体肾移植的患者为研究对象。纳入标准:在笔者所在医院接受肾移植手术; >18 周岁;手术和病案资料完整;肾移植受者术后 7 d 内使用他克莫司+霉酚酸类药物+糖皮质激素三联抗排异方案;规律进行他克莫司治疗药物监测。排除标准:二次肾移植的受者;从环孢素改用他克莫司的受者;术后 7 d 内同时联用 CYP3A 酶抑制剂或诱导剂的受者。共纳入患者 360 例。从笔者所在医院联众数字化病案应用系统中调取病案资料,从药学部 TDM 数据库中收集他克莫司治疗药物监测数据。患者他克莫司剂量为 0.07~0.15 mg·kg⁻¹·d⁻¹,每天 2 次,早 8 点和晚 8 点口服给药,首次剂量在肾移植术后第 1~3 天给予,移植后 7 d 左右,患者首次服用他克莫司达稳态时,于早上服药前 30 min 空腹采血 2~3 mL,采用均相酶扩大免疫测定技术测定他克莫司血药浓度^[3]。用于基因多态性检测的血液样本来自于笔者所在医

院肾移植患者血液标本库。本研究经苏州大学附属第三医院伦理委员会批准(2021 科第 151 号)。

1.2 基因型分析

采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)-限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术检测肾移植受者 *CYP3A5* 和 *VDR* 基因型^[11-13]。各单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 PCR primer sequence

基因位点	引物
<i>CYP3A5 rs776746</i>	正向引物: 5'-AGAGTGGCATAGGAGATA-3' 反向引物: 5'-ATGAAGGGTAATGTGGTC-3'
<i>VDR Apal rs7975232</i>	正向引物: 5'-GGATCCTAAATGCACGGAGA-3' 反向引物: 5'-GCCACAGGCTGTCCTAGTCA-3'
<i>VDR BsmI rs1544410</i>	正向引物: 5'-CGGGGAGTATGAAGGACAAA-3' 反向引物: 5'-CTTCCTCTTCGGCCTTTTCT-3'
<i>VDR FokI rs2228570</i>	正向引物: 5'-AGGGCGAATCATGTATGAGG-3' 反向引物: 5'-CCCTTCATGGAACACCTTG-3'
<i>VDR TaqI rs731236</i>	正向引物: 5'-GGATCCTAAATGCACGGAGA-3' 反向引物: 5'-GCCACAGGCTGTCCTAGTCA-3'

1.3 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析使用 SPSS 19.0 软件。用 χ^2 检验等位基因分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡;用单因素方差分析比较各基因型间浓度剂量差异; $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

360 例肾移植患者的一般资料,如患者性别、年龄、体质量、移植前血红蛋白、肝肾功能等指标见表 2。

2.2 等位基因及基因型频率分布

CYP3A5 rs776746、*VDR Apal rs7975232*、*VDR BsmI rs1544410*、*VDR FokI rs2228570*、*VDR TaqI rs731236* 的突变频率分别为 70.69%, 71.11%, 4.31%, 43.19%和 4.17%,基因型及等位基因频率见表 3。各位点均符合 Hardy-Weinberg 平衡,研究资料具有群体代表性。

2.3 *CYP3A5 rs776746* 基因多态性对他克莫司浓度的影响

根据 *CYP3A5 rs776746* 基因型的不同将患者分为 *CYP3A5* 表达组(AA 和 AG 型)和 *CYP3A5* 非表达组(GG 型)。每组患者移植术后 7 d 他克莫司血药浓度(concentration, C)、剂量(dose, D)及浓度剂量比(ratio of concentration to dose, C/D)见图 1。

表 2 肾移植患者的一般资料($\bar{x} \pm s$, $n=360$)

Tab. 2 General data of renal transplant recipients($\bar{x} \pm s$, $n=360$)

项目	参数
性别(男/女)/例	247/113
年龄/岁	36.14±10.66
体质量/kg	59.28±13.44
血红蛋白/g·L ⁻¹	120.18±20.36
谷丙转氨酶/U·L ⁻¹	17.42±10.59
谷草转氨酶/U·L ⁻¹	15.40±7.91
碱性磷酸酶/U·L ⁻¹	165.94±122.55
总胆汁酸/μmol·L ⁻¹	3.00±2.22
总胆红素/μmol·L ⁻¹	5.49±2.40
血清肌酐/μmol·L ⁻¹	853.14±280.60

2 组间他克莫司的 D 接近, 而 *CYP3A5* 表达组的 C 以及 C/D 在术后 7 d 显著低于 *CYP3A5* 非表达组 ($P<0.01$)。

表 3 *CYP3A5* rs776746 和 *VDR* *ApaI* rs7975232, *VDR* *BsmI* rs1544410, *VDR* *FokI* rs2228570, *VDR* *TaqI* rs731236 基因型和等位基因频率($n=360$)

Tab. 3 Allelic and genotypic frequencies of *CYP3A5* rs776746, *VDR* *ApaI* rs7975232, *VDR* *BsmI* rs1544410, *VDR* *FokI* rs2228570 and *VDR* *TaqI* rs731236($n=360$)

基因	单核苷酸多态性位点	基因型	例数	基因型频率/%	等位基因	例数	等位基因频率/%
<i>CYP3A5</i> *3	rs776746 (A>G)	AA	38	10.56	A	211	29.31
		AG	135	37.50	G	509	70.69
		GG	187	51.94			
<i>VDR</i> <i>ApaI</i>	rs7975232 (A>C)	AA	33	9.17	A	208	28.89
		AC	142	39.44	C	512	71.11
		CC	185	51.39			
<i>VDR</i> <i>BsmI</i>	rs1544410 (G>A)	GG	329	91.39	G	689	95.69
		GA	31	8.61	A	31	4.31
		AA	0	0			
<i>VDR</i> <i>FokI</i>	rs2228570 (C>T)	CC	126	35.00	C	409	56.81
		CT	157	43.61	T	311	43.19
		TT	77	21.39			
<i>VDR</i> <i>TaqI</i>	rs731236 (T>C)	TT	330	91.67	T	690	95.83
		TC	30	8.33	C	30	4.17
		CC	0	0			

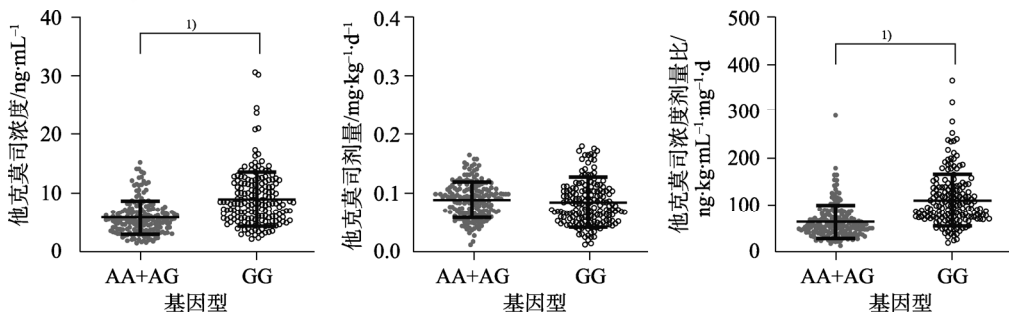


图 1 不同 *CYP3A5* 基因型患者的他克莫司浓度、剂量及浓度剂量比与 AA+AG 型患者相比, $^{1)}P<0.01$ 。

Fig. 1 Tacrolimus blood concentration, dose and ratio of concentration to dose in patients with different *CYP3A5* genotypes Compared to AA+AG patients, $^{1)}P<0.01$.

2.4 *VDR* 基因多态性对他克莫司浓度的影响

VDR 4 种基因多态性(*VDR* *ApaI* rs7975232、*VDR* *BsmI* rs1544410、*VDR* *FokI* rs2228570、*VDR* *TaqI* rs731236)不同基因型患者他克莫司的 C、D 及 C/D 见表 4。各组间的 D 无差异。各基因型对术后早期他克莫司的 C 及 C/D 均无显著影响。*VDR* *ApaI* rs7975232 AA 型患者他克莫司的 C 和 C/D 比较 AC 型和 CC 型低, 但差异无统计学意义。

2.5 根据 *CYP3A5* 基因分型后, *VDR* 基因多态性对他克莫司浓度的影响

为进一步研究 *CYP3A5* 和 *VDR* 基因多态性对他克莫司浓度的影响, 笔者根据 *CYP3A5* rs776746 基因分型后, 分别统计了不同 *VDR* 基因多态性在 *CYP3A5* 表达组和非表达组中的他克莫司的 C、D 及 C/D。

表 4 不同 *VDR* 基因型患者的他克莫司浓度(C)、剂量(D)及浓度剂量比(C/D)

Tab. 4 Tacrolimus blood concentration(C), dose(D) and ratio of concentration to dose(C/D) in patients with different *VDR* genotypes

基因位点	基因型	C/ng·mL ⁻¹	D/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	C/D/ ng·kg ⁻¹ ·mL ⁻¹ ·mg ⁻¹ ·d
<i>VDR Apal</i> <i>rs7975232</i> (A>C)	AA	6.35±3.51	0.088 9±0.033 1	73.74±37.52
	AC	7.18±4.36	0.086 5±0.039 3	90.65±60.48
	CC	7.05±4.29	0.088 6±0.037 5	87.47±52.92
<i>VDR BsmI</i> <i>rs1544410</i> (G>A)	GG	7.09±4.35	0.088 0±0.038 1	87.62±56.00
	GA	6.55±3.06	0.085 9±0.031 7	86.07±56.48
<i>VDR FokI</i> <i>rs2228570</i> (C>T)	CC	6.92±4.60	0.088 1±0.039 9	85.53±58.93
	CT	7.18±4.48	0.089 2±0.039 8	88.22±58.20
	TT	6.56±3.61	0.084 6±0.036 4	86.18±53.35
<i>VDR TaqI</i> <i>rs731236</i> (T>C)	TT	7.12±4.33	0.088 4±0.038 0	87.74±55.99
	TC	6.17±3.22	0.081 3±0.032 3	84.84±56.58
	CC	—	—	—

VDR Apal rs7975232 不同基因型对 *CYP3A5* 表达组和非表达组他克莫司的 C 及 C/D 的影响见图 2。在 *CYP3A5* 表达组中, *VDR Apal rs7975232* 不同基因型间 C、D、C/D 均没有统计学差异。而在 *CYP3A5* 非表达组中, *VDR Apal rs7975232* AA 型 C/D 显著低于 AC 和 CC 型($P<0.01$)。AA 型的 C 也低于 AC 和 CC 型, 但差异无统计学意义。

VDR BsmI rs1544410、*VDR FokI rs2228570*、*VDR TaqI rs731236* 不同基因型对 *CYP3A5* 表达组和非表达组的他克莫司的 C 及 C/D 均没有显著性影响。

3 讨论

影响他克莫司体内代谢的因素很多, 包括性别、年龄、体质量、生理病理状态、肝肾功能等, 近年来研究发现药物代谢酶和转运体等基因多态性也是影响他克莫司体内代谢的重要因素。*CYP3A5*3(rs776747 A>G)* 是目前发现对他克莫司体内浓度影响最大的基因突变位点。*CYP3A5*3* 突变可导致 *CYP3A5* 翻译出无功能的蛋白, 酶活性低, 体内浓度升高^[12]。笔者所在课题组前期也曾分析过 *CYP3A5* 不同基因型对肾移植患者他克莫司浓度的影响, 和文献报道一致, *CYP3A5* 非表达组的 C 及 C/D 在术后 1 个月内各个时间点均显著高于 *CYP3A5* 表达组^[2]。此外课题组也发现 *ABCB1 3435* 和 *POR*28* 等基因多态性也与他克莫司浓度具有一定相关性^[1]。以上影响他克莫司浓度的遗传和非遗传因素还不能完全解释他克莫司个体差异的原因, 因此有必要对其他可能影响他克莫司代谢的基因多态性进行探索。

VDR 可调控 *CYP3A4* 的转录和表达。*VDR* 基因位于染色体 12q13.11 区域, 由 9 个外显子和 8 个内含子组成, 总长度约 75 kb。*VDR* 基因存在多个 SNP, 近年来研究较多的 *VDR* 基因 SNP 有 *Apal rs7975232*(位于第 8 内含子上)、*BsmI rs1544410*(位于第 8 内含子上)、*FokI rs2228570*(位于第 2 外显子上)、*TaqI rs731236*(位于第 9 外显子上)。*VDR Apal rs7975232* 和 *VDR BsmI rs1544410* 突变与

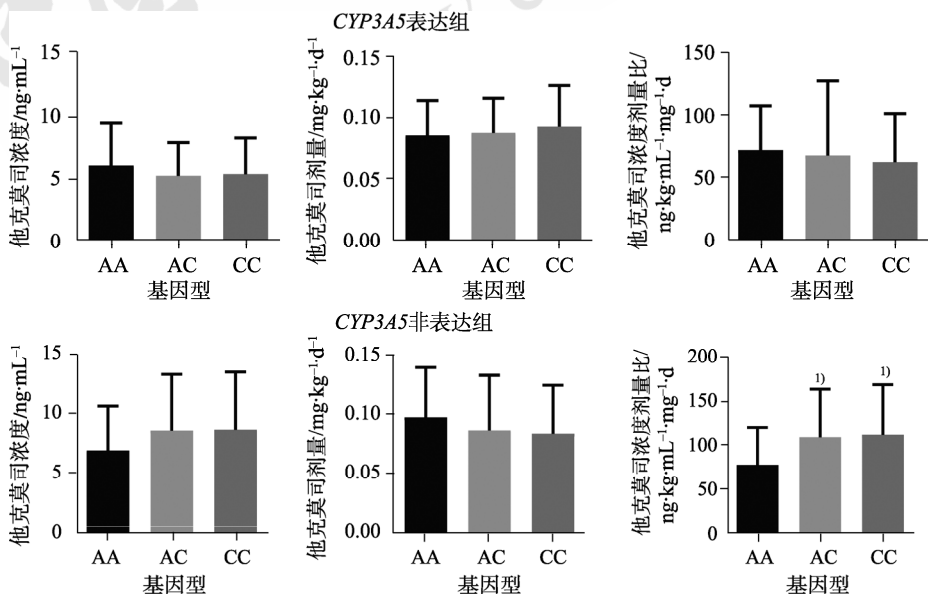


图 2 不同 *VDR Apal rs7975232* 基因型患者他克莫司浓度(C)、剂量(D)及浓度剂量比(C/D)与 AA 型患者比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Tacrolimus blood concentration(C), dose(D) and ratio of concentration and dose(C/D) in patients with different *VDR Apal rs7975232* genotypes Compared with AA patients, ¹⁾ $P<0.01$.

VDR mRNA 的稳定性降低和表达水平降低有关。而 *VDR FokI rs2228570* 和 *VDR TaqI rs731236* 突变可影响蛋白质的剪接甚至结构^[13]。

本研究结果发现,在 *CYP3A5* 非表达组中, *VDR ApaI rs7975232* AA 型的 C/D 显著低于 AC 和 CC 型,然而在 *CYP3A5* 表达组中未发现此影响。*CYP3A5* 非表达型患者体内 *CYP3A5* 蛋白缺失,不表达 *CYP3A5* 功能,此时体内他克莫司的代谢主要依赖于 *CYP3A4*。推测 *VDR ApaI rs7975232* 突变可能影响 *CYP3A4* 功能, *CYP3A4* 代谢能力降低,导致 AC 和 CC 型患者他克莫司 C/D 增高。因此 *VDR ApaI rs7975232* 突变对 *CYP3A5* 非表达组他克莫司的浓度影响更大。

本研究分析了 *VDR* 基因多态性与他克莫司浓度的相关性,发现 *VDR ApaI rs7975232* 基因型对 *CYP3A5* 非表达组他克莫司 C/D 有显著影响,该基因型检测有助于指导他克莫司的临床个体化用药。

REFERENCES

- [1] HU N, CAO J J, QIAN Q, et al. Effect of CYP3A5 and POR polymorphism on dosage and concentration of tacrolimus in renal transplant patients during hospital stay[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2020, 40(1): 65-70.
- [2] HU N, TANG Y F, QIAN Q, et al. Effect of CYP3A5 and ABCB1 polymorphism on dosage and concentration of tacrolimus and renal function in renal transplant recipients at early postoperative period[J]. Central South Pharm(中南药学), 2019, 17(4): 489-494.
- [3] HU N, ZHAO J F, JIANG Y, et al. Blood concentration monitoring of tacrolimus in 180 renal transplant recipients[J]. Her Med(医药导报), 2018, 37(12): 1500-1505.
- [4] CHEUNG C Y, OP DEN BUIJSCH R A, WONG K M, et al. Influence of different allelic variants of the CYP3A and ABCB1 genes on the tacrolimus pharmacokinetic profile of Chinese renal transplant recipients[J]. Pharmacogenomics, 2006, 7(4): 563-574.
- [5] HTUN Y Y, SWE H K, SAW T M. CYP3A5*3 genetic polymorphism and tacrolimus concentration in Myanmar renal transplant patients[J]. Transplant Proc, 2018, 50(4): 1034-1040.
- [6] STIFFT F, VAN KUIJK S M J, BEKERS O, et al. Increase in tacrolimus exposure after steroid tapering is influenced by CYP3A5 and pregnane X receptor genetic polymorphisms in renal transplant recipients[J]. Nephrol Dial Transplant, 2018, 33(9): 1668-1675.
- [7] QIN X, WANG X. Role of vitamin D receptor in the regulation of CYP3A gene expression[J]. Acta Pharm Sin B, 2019, 9(6): 1087-1098.
- [8] THIRUMARAN R K, LAMBA J K, KIM R B, et al. Intestinal CYP3A4 and midazolam disposition *in vivo* associate with VDR polymorphisms and show seasonal variation[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84(1): 104-112.
- [9] LINDH J D, ANDERSSON M L, ELIASSON E, et al. Seasonal variation in blood drug concentrations and a potential relationship to vitamin D[J]. Drug Metab Dispos, 2011, 39(5): 933-937.
- [10] QIN L, LI J L, LIU X M, et al. Associations of VDR polymorphisms with tacrolimus concentrations in Chinese renal transplant recipients[J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2017, 52(5): 760-765.
- [11] LANCIA P, ADAM DE BEAUMAIS T, ELIE V, et al. Pharmacogenetics of post-transplant diabetes mellitus in children with renal transplantation treated with tacrolimus[J]. Pediatr Nephrol, 2018, 33(6): 1045-1055.
- [12] 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.
- [13] TAMASAUSKIENE L, GOLUBICKAITE I, UGENSKIENE R, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in atopy[J]. Immun Inflamm Dis, 2021, 9(4): 1153-1159.

收稿日期: 2022-05-31

(本文责编: 李艳芳)