

# 肝移植术后他克莫司浓度/剂量的影响因素及变化规律<sup>△</sup>

谭昀杜熙<sup>1\*</sup>, 黄磊<sup>2#</sup>, 杨薇<sup>1</sup>, 胡志平<sup>2</sup>(1. 北京大学人民医院药剂科, 北京 100044; 2. 北京大学人民医院肝胆外科, 北京 100044)

中图分类号 R979.5; R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)42-3964-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.42.10

**摘要** 目的: 考察肝移植术后不同时期他克莫司(FK506)血药浓度/千克体质量日剂量(C/D)的影响因素及变化规律。方法: 随访2010—2011年在北京大学人民医院行肝移植术的患者35例, 测定供受体CYP3A5、MDR1基因多态性, 记录患者身高(H)、体质量(W)及术后3、7、14、30、60 d的相关化验指标包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TB)、直接胆红素(DB)、血红蛋白(Hbg)、红细胞比容(HCT)、白蛋白(ALB)、血肌酐(Cr)及FK506浓度值, 利用SPSS 17.0软件对数据进行多元回归分析。结果: C/D受多种因素影响且肝移植术后不同时期主要影响因素不同, 术后3 d与胆红素、肌酐水平密切相关; 术后14、30、60 d时的主要因素分别为体质量、多耐药基因、身高与体质量。结论: 肝移植术后免疫抑制管理需考虑众多影响因素, 且不同时期各影响因素所占权重不同; 早期与肝功能关系较为密切, 稳定期与机体本身关系较大, 宜实行精细化管理。

**关键词** 肝移植术; 他克莫司; 浓度/剂量; 影响因素; 变化规律

## Influential Factors and Regulation of FK506 C/D after Liver Transplantation

TAN Yun-du-xi<sup>1</sup>, HUANG Lei<sup>2</sup>, YANG Wei<sup>1</sup>, HU Zhi-ping<sup>2</sup>(1. Dept. of Pharmacy, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China; 2. Dept. of Hepatobiliary Surgery, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To investigate the main influential factors and regulation of FK506 C/D after liver transplantation. **METHODS:** 35 patients underwent liver transplantation were followed up during 2010—2011. CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms were identified in the donors and recipients. The values of height (H), weight (W), ALT, AST, TB, DB, Hbg, HCT, ALB, Cr and FK506 concentration were recorded on 3 d, 7 d, 14 d, 30 d and 60 d after operation, and SPSS 17.0 software was used to analyze all data. **RESULTS:** FK506 C/D was influenced by various factors, and main influential factors were different in different periods. FK506 C/D was influenced by bilirubin and creatinine closely 3 days after operation. The main influential factors were W, multidrug resistant gene, W and H 14 d, 30 d and 60 d after operation. **CONCLUSIONS:** Multiple influential factors should be considered for immunologic suppression management after liver transplantation. The weights of influential factors are different in different periods. FK506 C/D is closely associated with liver function. at early stage, while is significantly associated with the body at stable phase, and it is suitable to conduct fine management.

**KEY WORDS** Liver transplantation; FK506; C/D; Influential factors; Regulation

他克莫司(FK506)属钙调磷酸酶抑制剂, 目前广泛用于器官移植尤其是肝移植术后排斥反应的预防和治疗。随着对FK506作用机制的分子生物学研究的深入, 发现细胞色素P<sub>450</sub>3A酶系(CYP3A)中的CYP3A5亚系、药物转运体P糖蛋白(P-gp)的基因多态性可能是影响个体FK506血药浓度的重要因素<sup>[1-3]</sup>。此外机体因素如年龄、性别、移植肝功能、血浆中蛋白浓度等也有影响<sup>[4]</sup>。肝脏移植不同于其他任何脏器移植, 肝脏作为药物代谢和生物转化的主要器官, 来源于遗传背景完全不同的供体, 因此, 在对FK506血药浓度的影响因素进行研究时, 需同时考虑到供肝基因型对其代谢的影响。我院为综合性三级甲等医院, 我院肝胆外科自2001年开展肝移植术, 积累了

大量临床经验。本文结合临床病例对以上因素综合考察, 研究肝移植术后他克莫司浓度/剂量的影响因素及变化规律。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

2010—2011年在我院肝胆外科行肝移植术的患者35例, 其中男性28例, 女性7例, 年龄34~72岁, 平均年龄为52岁; 体质量41~118 kg, 平均体质量为71 kg。患者术前签署知情同意书。

### 1.2 药品及给药方法

术后免疫治疗方案为三联用药: 他克莫司(规格: 0.5 mg/粒、1 mg/粒, 爱尔兰藤泽制药公司)0.05~0.1 mg/(kg·d), q12h, po+吗替麦考酚酯(规格: 250 mg/粒, 上海罗氏制药有限公司)750 mg, q12h, po+泼尼松(规格: 5 mg/片, 河南天方药业股份有限公司), 术后第1天甲强龙40 mg, qid, iv, 后逐渐减量至20 mg, qd, 替换为口服, 一般1个月内减量至5 mg, qd, 并停用。

### 1.3 血药浓度测定

<sup>△</sup> 基金项目: 北京大学人民医院研究与发展基金(No.2009)

\* 主管药师, 硕士。研究方向: 临床药学。电话: 010-88325752。

E-mail: yanmu-tanyun@163.com

# 通信作者: 主任医师, 副教授, 博士。研究方向: 肝癌、肝移植。电话: 010-88326700。E-mail: stones@medmail.com

取患者早晨服药前静脉血 2 ml( $c_0$ ), EDTA 抗凝, 用 IMx 全自动免疫分析仪 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) 及微粒酶联免疫吸附法 (Microparticle enzyme immunoassay, MEIA) (试剂盒: Tacrolimus II, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) 测定患者全血中 FK506 浓度。

#### 1.4 DNA 提取及测序

肝移植术前取供体、受体静脉血各 2 ml, 24 h 内采用 QIAamp DNA Mini Kit-硅胶膜通用型 DNA 小提试剂盒对供受体外周血标本进行 DNA 提取、分装、冻存。提取 DNA 溶于 100  $\mu$ l 保存液中, 测定 DNA 浓度, 合格后分装为 20  $\mu$ g/管,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

查阅相关文献获得各基因位点引物序列, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 见表 1。PCR 反应条件见表 2。提取 DNA 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 不同基因位点的引物设计

Tab 1 PCR primer design of genetic locus

检测位点	引物序列
CYP3A5	F:5'-CATCAGTTAGTAGACAGATGA-3' R:5'-GGTCCAACAGGGAAGAAATA-3'
MDR1 C1236T	F:5'-TCTTTGTCACCTTTATCCAGC-3' R:5'-TCTCACCATCCCTCTGT-3'
MDR1 G2677T/A	F:5'-TGCAGGCTATAGGTTCCAGG-3' R:5'-TTTAGTTGACTCACCTCCCG-3'
MDR1 C3435T	F:5'-CTCACAGTAACTGGCAG-3' R:5'-CTTACATTAGGCAGTGAC-3'

表 2 PCR 反应条件

Tab 2 PCR condition

检测位点	预变性	变性	退火	延伸	延伸
CYP3A5	95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	
MDR1 C1236T	95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	61 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	35 个循环后
MDR1 G2677T/A	95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min
MDR1 C3435T	95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min	95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s	

#### 1.5 基因型的确定

将测序结果与目标序列进行比对, 并通过 Chromas 应用程序查看和编辑 DNA 的峰形图, 确定基因型, 如下图 1 时判读为杂合子。

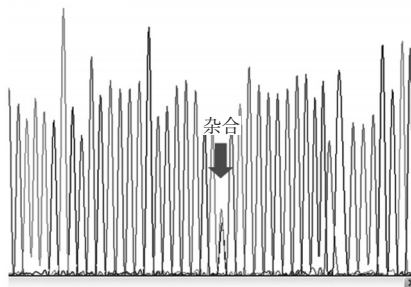


图 1 基因型的判读

Fig 1 Judgment of genotype

#### 1.6 病例随访

设计病例随访调查表, 定期随访, 收集整理患者身高(H)、体重(W)及术后 3、7、14、30、60 d 的相关化验指标包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TB)、直接胆红素(DB)、血红蛋白(Hbg)、红细胞比容(HCT)、白蛋白(ALB)、血肌酐(Cr)及 FK506 浓度值, 记录排斥反应、药品不良反应等特殊事件。

#### 1.7 数据处理

所有统计分析均通过 SPSS 17.0 统计软件完成。  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。以不同时期(术后 3、7、14、30、60 d) FK506 血药浓度/千克体质量日剂量(C/D)为因变量, 通过多元线性回归分析方法对 FK506 血药浓度可能的影响因素包括 H、W、ALT、AST、TB、DB、Hbg、HCT、ALB、Cr、供体 CYP3A5 基因位点(3A5<sub>供</sub>)、供体 MDR1 基因位点(MDR1 1236<sub>供</sub>\MDR1 2677<sub>供</sub>\MDR1 3435<sub>供</sub>)、受体 CYP3A5 基因位点(3A5<sub>受</sub>)、受体 MDR1 基因位点(MDR1 1236<sub>受</sub>\MDR1 2677<sub>受</sub>\MDR1 3435<sub>受</sub>) 进行考察。

#### 2 结果

##### 2.1 基因频率

供受体不同基因位点等位基因型分布如下表 3。

表 3 供受体基因型分布 (%)

Tab 3 Distribution of genotype in donor and acceptor (%)

人群	等位基因								
	3A5*1	3A5*3	MDR1 1236C	MDR1 1236T	MDR1 2677G	MDR1 2677T	MDR1 2677A	MDR1 3435C	MDR1 3435T
供体人群	32.8	67.2	71.0	29.0	64.1	20.3	15.6	87.9	12.1
受体人群	23.4	76.6	53.3	46.7	77.3	18.2	0.05	84.4	15.6
总体	30.3	69.7	62.3	37.7	70.8	19.2	10.0	86.2	13.8

##### 2.2 影响因素及多元回归方程

以“C/D”为因变量, 分组为术后 3、7、14、30、60 d, 利用 SPSS 17.0 软件对 H、W、ALT、AST、ALB、TB、DB、Cr、Hbg、HCT、供受体 3A5 基因位点、MDR1 1236 基因位点、MDR1 2677 基因位点、MDR1 3435 基因位点等变量进行多元回归。回归方程中每个变量前的数值为 Beta 值, 代表该项指标与 C/D 的关系, 以  $P \leq 0.05$  判定为差异有统计学意义, 作为 C/D 的主要影响因素, 相关指标见表 4。

综上, 术后 3 d C/D 与胆红素、肌酐水平密切相关, 术后 7 d 未得到差异有统计学的影响因素, 术后 14、30、60 d 时的主要因素分别为体质量、多耐药基因、身高与体质量。

#### 3 讨论

FK506 药动学差异大、治疗窗窄, 相同起始剂量给药, 稳态血药浓度可相差 2 倍以上。当药物浓度过高, 可发生严重药物不良反应如中枢神经毒性和对移植肝的损伤, 药物浓度过低则达不到免疫抑制效果, 都可能增加肝移植围手术期并发症, 威胁肝移植术后患者生命, 是肝移植术后临床治疗中的难点。目前临床使用 FK506 主要通过测定其谷浓度  $c_0$  来调整给药剂量, 一般在给药 3~5 d、FK506 达到稳态血药浓度之后开始, 此时正是移植术后容易发生急性器官排斥反应的时间。这时根据监测结果调整给药剂量, 通常 50% 以上的器官移植患者达不到或超过理想的靶血浓度<sup>[9]</sup>。因此血药浓度测定仅能滞后性地反映药物的体内浓度, 而不能有效预测给药量, 尤其是术后早期的初始给药剂量, 这对于肝移植术后的早期免疫抑制治疗管理来说远远不够。本研究旨在考察移植术后不同时期 C/D 的影响因素, 通过拟合方程中不同变量的权重为临床预测患者血药浓度, 选取合适的给药剂量提供参考。

肝脏的细胞色素酶 P<sub>450</sub>(CYP) 是一类非常重要的药物代谢酶家族, 其中 CYP3A 亚家族代谢 50% 以上的药物, 包括 FK506。CYP3A4 和 CYP3A5 是 CYP3A 亚家族中最丰富、最重要的酶, 两者在结构和功能上非常相近, 主要分布在肝脏和胃肠道<sup>[6]</sup>。根据文献报道, CYP3A4\*18B 和 CYP3A5\*3 是目前在

表4 肝移植术后不同时期影响FK506血药浓度的主要因素及多元回归方程

Tab 4 Main factors and multiple regression equation of FK506 blood concentration in different periods after liver transplantation

时间	多元逐步回归方程及不同变量Beta值
术后3 d	$C/D = (1.728)H + (0.943)W + (0.153)ALT + (0.222)AST + (-4.744)TB^{**} + (7.964)DB^{**} + (-2.227)ALB + (-1.305)Cr^{*} + (-1.040)Hbg + (-178.892)HCT + (-40.458)3A5_{\text{供}} + (-17.324)MDR1\ 1236_{\text{供}} + (6.198)MDR1\ 2677_{\text{供}} + (-49.260)MDR1\ 3435_{\text{供}} + (-17.882)3A5_{\text{受}} + (16.471)MDR1\ 1236_{\text{受}} + (-28.460)MDR1\ 2677_{\text{受}} + (35.250)MDR1\ 3435_{\text{受}}$
术后7 d	$C/D = (-0.287)H + (1.831)W + (-0.070)ALT + (0.048)AST + (1.126)TB + (-1.693)DB + (-1.448)ALB + (-0.002)Cr + (578.433)Hbg + (1.973)HCT + (-41.519)3A5_{\text{供}} + (30.317)MDR1\ 1236_{\text{供}} + (-15.398)MDR1\ 2677_{\text{供}} + (38.604)MDR1\ 3435_{\text{供}} + (50.105)3A5_{\text{受}} + (33.393)MDR1\ 1236_{\text{受}} + (-35.066)MDR1\ 2677_{\text{受}} + (5.730)MDR1\ 3435_{\text{受}}$
术后14 d	$C/D = (0.955)H + (2.733)W^{*} + (0.056)ALT + (-0.234)AST + (0.452)TB + (-0.670)DB + (-3.258)ALB + (1.488)Cr + (-0.095)Hbg + (153.676)HCT + (-19.637)3A5_{\text{供}} + (-25.618)MDR1\ 1236_{\text{供}} + (2.058)MDR1\ 2677_{\text{供}} + (-25.849)MDR1\ 3435_{\text{供}} + (29.792)3A5_{\text{受}} + (22.677)MDR1\ 1236_{\text{受}} + (24.072)MDR1\ 2677_{\text{受}} + (-52.175)MDR1\ 3435_{\text{受}}$
术后30 d	$C/D = (-4.822)H + (1.967)W + (-0.989)ALT + (3.701)AST + (-3.069)TB + (3.659)DB + (1.329)ALB + (-0.723)Cr + (1.279)Hbg + (-0.468)HCT + (25.617)3A5_{\text{供}} + (18.796)MDR1\ 1236_{\text{供}} + (34.921)MDR1\ 2677_{\text{供}} + (-114.854)MDR1\ 3435_{\text{供}} + (44.705)3A5_{\text{受}} + (12.498)MDR1\ 1236_{\text{受}} + (102.378)MDR1\ 2677_{\text{受}} + (-2.827)MDR1\ 3435_{\text{受}}$
术后60 d	$C/D = (-7.533)H^{*} + (4.456)W^{**} + (1.179)ALT + (1.023)AST + (-11.201)TB + (17.369)DB + (-7.187)ALB + (1.100)Cr + (-6.995)Hbg + (2\ 615.135)HCT + (30.789)3A5_{\text{供}} + (-24.529)MDR1\ 1236_{\text{供}} + (-17.275)MDR1\ 2677_{\text{供}} + (20.408)MDR1\ 3435_{\text{供}} + (53.529)3A5_{\text{受}} + (38.945)MDR1\ 1236_{\text{受}} + (37.200)MDR1\ 2677_{\text{受}}$

注: \*表示该指标  $P \leq 0.05$ ; \*\*表示该指标  $P \leq 0.01$ 。术后3 d: TB ( $P=0.003$ ), DB ( $P=0.001$ ), Cr ( $P=0.016$ ); 术后14 d: W ( $P=0.020$ ); 术后30 d: MDR1 2677 ( $P=0.05$ ); 术后60 d: H ( $P=0.022$ ), W ( $P=0.008$ )

note: \* means  $P \leq 0.05$ ; \*\* means  $P \leq 0.01$ . 3 days after operation: TB ( $P=0.003$ ), DB ( $P=0.001$ ), Cr ( $P=0.016$ ); 14 days after operation: W ( $P=0.020$ ); 30 days after operation: MDR1 2677 ( $P=0.05$ ); 60 days after operation: H ( $P=0.022$ ), W ( $P=0.008$ )

日本人和中国人中发现的发生频率最高的单核苷酸多态性,可能与FK506血药浓度相关<sup>[7-9]</sup>。但也有学者研究显示由于CYP3A5\*3与CYP3A4\*18B存在一定的连锁不平衡,通过基因分层研究提示CYP3A4\*18B对他克莫司浓度的影响还是来自于与CYP3A5\*3的连锁不平衡,其单独对他克莫司血药浓度没有影响,起作用的主要还是CYP3A5<sup>[9]</sup>。因此本研究选取CYP3A5位点进行考察,同时纳入报道较多的编码P-gp的MDR1基因的3个位点。为了观察机体因素如肝肾功能对C/D的影响,观察相应化验指标,最终通过统计学方法获得肝移植术后不同时期C/D的拟合方程及主要影响因素。由于近两年供体来源减少,研究期间共收集35例移植患者的有关信息;

但拟合方程中收集的影响因素较多,因此在回归时采取分组回归的办法,将个体因素如身高、体重为一组,供受体不同位点基因型为一组,生化、血常规等化验检查指标为一组分别进行逐步回归,可相应减少统计过程中的偏倚。如能进一步扩大样本量将可得到更有说服力的结论。

根据本研究结果,临床上多种因素都可能对肝移植患者术后C/D值造成影响,且术后不同时期影响程度不同,主要影响因素不同。除  $P \leq 0.05$  的变量外,拟合方程中不同变量Beta值代表了该变量与C/D值的关系为正向或负向;影响程度与Beta值大小有关,虽然差异无统计学意义,但也对临床有一定的提示意义。术后3 d患者的肝肾功能水平是主要的影响因素,可能与药物在体内的代谢排泄过程受到较大影响有关;术后7 d差异无统计学意义的变量作为主要影响因素;而随着术后时间延长,机体内环境逐渐稳定,术后30 d以后体质量、基因型等个体因素成为主要影响因素。这提示临床在治疗过程中,需要结合各个时期的特点进行精细化管理。

(致谢:衷心感谢北京大学人民医院中心实验室平台提供的各项支持,以及郁卫东、乔正国等各位老师给予的指导和帮助!)

### 参考文献

- [1] 刘其雨,李立,李晓延,等. ABCB1基因多态性对肝移植后他克莫司用量的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(31): 5 717.
- [2] 李洋,姜楠,郭宇,等. 供受体CYP3A5和MDR1基因多态性与肝移植术后患者他克莫司浓度/剂量比的关系[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2012, 33(1): 50.
- [3] Li D, Zhu JY, Gao J, et al. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, cytochrome P<sub>450</sub>3A5 and ABCB1 in Chinese liver transplant patients treated with immunosuppressant tacrolimus[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 383(1/2): 133.
- [4] 何霞,童荣生,肖开春,等. 他克莫司血药浓度影响因素的研究进展[J]. 中国药业, 2011, 20(11): 80.
- [5] 胡永芳,孙忠实,翟所迪. 从药代动力学到药物基因组学: 免疫抑制治疗的新方法[J]. 中国执业药师, 2009, 6(6): 10.
- [6] 余松峰,吴丽花,金晶,等. 供体CYP3A5基因多态性影响肝移植术后FK506的个体化用药[J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(4): 314.
- [7] Mendes J, Martinho A, Simoes O, et al. Genetic polymorphisms in CYP3A5 and MDR1 genes and their correlations with plasma levels of tacrolimus and cyclosporine in renal transplant recipients[J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(3): 840.
- [8] 朱琳,宋洪涛,王庆华,等. CYP3A4\*18B和CYP3A5\*3基因多态性对肾移植患者他克莫司剂量及浓度的影响[J]. 药理学杂志, 2012, 47(7): 878.

(收稿日期:2013-04-12 修回日期:2013-09-02)