

MDR1基因多态性对口服环孢素 A药代动力学的影响

焦正, 梁惠琪, 丁俊杰, 李中东, 施孝金, 钟明康*

(复旦大学附属华山医院 临床药学研究室, 上海 200040)

摘要: 目的 非线性混合效应模型 (NONMEM) 考察中国健康人多药耐药基因 (MDR1) 中 26 外显子的 C3435T 多态性与环孢素 A (CsA) 药代动力学特性间的关系。方法 HPLC 法测定 20 名健康男性单次口服 CsA 微乳溶液制剂 500 mg 后 24 h 内不同时间点的药物浓度。MDR1 的基因多态性测定采用 DNA 限制性片段长度多态性法, 并用基因测序法验证。数据处理与模型拟合采用 NONMEM 法。结果 中国健康人中含 MDR1 C3435T CC 或 CT 型的相对生物利用度较 TT 型高 40%。结论 MDR1 中 C3435T 多态性是个体间 CsA 相对生物利用度差异的影响因素。

关键词: 环孢素 A; P-糖蛋白; 多药耐药基因; 非线性混合效应模型

中图分类号: R969; R979.5 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2004)12 - 0971 - 04

Effect of MDR1 polymorphic expression on oral disposition of cyclosporine A

JIAO Zheng, LIANG Hui-qi, DING Jun-jie, LI Zhong-dong, SHI Xiao-jin, ZHONG Ming-kang*

(Clinical Pharmacy Laboratory, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: Aim To determine the relationship between C3435T mutation in exon 26 of the human multidrug resistant 1 gene and cyclosporine (CsA) pharmacokinetic (PK) parameters among healthy Chinese volunteers by nonlinear mixed effect model (NONMEM). **Methods** Twenty healthy subjects were given orally a single dose of 500 mg CsA in microemulsion solution. Blood CsA concentrations were measured with HPLC and the genotype for the C3435T polymorphism of MDR1 gene was determined with the PCR and restriction fragment length polymorphism. The results were further confirmed by sequencing. NONMEM was performed to assess the effect of genotype on CsA PK profile. **Results** MDR1 C3435T genotype was identified as the best predictor of CsA systemic exposure. The relative bioavailability of CsA was 40% higher in subjects who carried at least one 3435C allele compared to that of TT type individuals in the study population. **Conclusion** The MDR1 C3435T genotype offers a potential basis of mechanism to explain inter-subject differences in CsA oral bioavailability.

Key words: cyclosporine A; P-glycoprotein; multidrug resistance gene; nonlinear mixed effect model

环孢素 A (cyclosporine A, CsA) 是一种强效免疫抑制剂, 目前广泛用于同种异体器官移植术后患者的免疫抑制治疗。在健康人和器官移植患者中, CsA 的药代动力学个体间差异很大。影响因素中除了病理、生理、合并用药以外, 国外报道多药耐药基

因 (multidrug resistance gene, MDR1) 多态性与 CsA 的药代动力学特征相关, 但报道结果不一^[1-4]。本文以 20 名服用单剂量 CsA 的健康志愿者为研究对象, 用非线性混合效应模型 (nonlinear mixed effect model, NONMEM) 分析, 首次在中国人群中考察 MDR1 C3435T 多态性与药代动力学参数的关系, 为临床个体化给药提供依据。

收稿日期: 2004-02-12.

基金项目: 上海市卫生局百人计划项目 II 期资助项目 (98BR009).

* 通讯作者 Tel: 86 - 21 - 62511127 - 381,

Fax: 86 - 21 - 32120059,

E-mail: hshpham@sh163.net

材料与方法

仪器 Waters 2690 高效液相色谱系统; Waters

2487紫外检测器; Millennium 色谱工作站 (Version 3.2, Waters Inc. MA, USA); DL-8R冷冻离心机 (上海离心机械研究所); PCR扩增仪 (Biometra, Germany); 紫外凝胶成像系统 (UV/WHITE ANALYSIS RS-200, 上海复日科技有限公司); 电泳仪 (DYY-III-8B, 北京六一仪器厂)。

药品与试剂 CsA口服微乳溶液 (新赛斯平, 福建科瑞药业有限公司); CsA标准品 (纯度 98.8%, 中国药品生物制品检定所提供); 环孢素 D (内标, 纯度 99%, 国家医药管理局福建微生物研究所提供); 乙腈、甲醇和水为 HPLC级; 其他试剂均为分析纯。DNA抽提试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司); 引物 (上海博亚生物技术有限公司合成); Taq DNA聚合酶和 Mbo I限制性内切酶购自 Invitrogen Corp. CA, USA; 其他 PCR反应试剂均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

数据分析程序 WinNonlin (Version 4.1, Pharsight Corp. CA, USA), NONMEM (Version V, level 1.1, Globomax Corp., MD, USA)。

研究对象 20名男性健康志愿者, 平均年龄 (23.0 ± 1.2) 岁, 平均体重 (67 ± 7) kg, 平均身高 (173 ± 7) cm。经血常规、肝肾功能及心电图检查, 各项检查指标均正常。

试验方案 受试前 2周内未服用任何药物。服药前禁食 10 h, 服药后 5 h进统一标准餐。晨起空腹 *po* CsA微乳液 500 mg, 温开水 200 mL送服, 分别于给药前和给药后 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0和 24.0 h取静脉血 5 mL, 置肝素化试管中, -20 °C保存待测。试验期间禁用其他药物及含咖啡因饮料, 禁止吸烟、饮酒。

CsA血药浓度的测定 采用已验证的 HPLC法进行测定^[5], 方法简述如下。色谱条件: HPLC分析柱 (Diamonsil C₁₈, 250 mm × 4.6 mm ID, 5 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-水 (73:5:22, *v/v/v*); 流速: 1.5 mL·min⁻¹; 柱温: 60 °C, 检测波长: 210 nm。取全血样品 1.0 mL, 加入内标液 50 μL、氯化钠 50 mg和重蒸乙醚 4 mL, 涡旋混合 1.5 min, 离心分离醚层并用氮气吹干, 甲醇-25 mmol·L⁻¹ HCl (1:1) 200 μL重组, 用正己烷 0.5 mL洗涤, 取水层 100 μL进样。方法的线性范围为 50 - 1 200 ng·mL⁻¹, 平均回收率为 100.8%, 批内和批间 RSD小于 10%。

C3435T基因型分析 采用文献^[1,6]报道的 DNA限制性片段长度多态法。取静脉血 5 mL, DNA抽提试剂盒提取 DNA。引物: 正向 5'-TGCTGGTC

CTGAAGTTGATCTGTGAAC-3'; 反向 5'-ACATTAGG CAGTGACTCGATGAAGGCA-3' (Genebank: J05168 and AC 005068)。PCR产物为 248 bp, 经 Mbo I限制性内切酶切后, 野生型等位基因 (CC型) 产生 172 bp, 60 bp和 16 bp的片段, 突变型等位基因 (TT型) 产生 16 bp和 238 bp的产物, 杂合型 (CT型) 则产生 238 bp, 172 bp, 60 bp和 16 bp的产物。3种基因型用测序方法验证 (上海生工生物工程技术有限公司)。

非线性混合效应模型分析

药代动力学模型 应用 WinNonlin程序, 根据残差平方和与 AIC值确定 CsA的药代动力学模型为一级吸收和消除的二房室模型。参数估算时采用一级条件估算法 (first order conditional estimation, FOCE) 和 INTERACTION选项^[7]。

固定效应模型 本研究考察了下列固定效应因素对药代动力学参数的影响: 年龄、身高、体重、每公斤剂量。NONMEM法计算时采用扩展最小二乘法, 使目标函数值最小。不同目标函数值的差值近似服从 χ^2 分布, 可通过假设检验来确定某一固定效应对药代动力学参数影响的显著性。固定效应的筛选采用加法模型法 (generalized additive method, GAM)^[8], 首先建立不含任何固定效应因素的最简模型, 用加法模型逐一加入各因素。检验水平设为 0.05, 若加入某一固定效应因素后, 目标函数值的改变大于 3.8 (自由度为 1), 则将该因素加入模型, 反之予以剔除。反复该过程直至目标函数值无显著改变, 得全量回归模型。然后用向后剔除法 (backward elimination method, BEM) 考察各影响因素。将检验水平定为 0.01, 逐一剔除各影响因素 (即将该因素固定为 0 或 1), 若目标函数值的改变大于 6.6, 则视该因素有显著性意义, 模型中予以保留。排除无显著性意义的固定效应参数后, 得最终回归模型。模型选取中除了用统计学检验外, 还须结合固定效应因素对权重残差的散点图综合判断。

统计学模型 个体间变异模型和残差模型分别用加法模型、乘法模型和指数模型进行拟合, 取函数目标值和变异值最小的模型为最终统计学模型。残差指个体间变异以外的变异, 包括取样、分析方法、模型等造成的误差。

结果

1 基因型分析

20例健康志愿者中 4例为 CC型, 12例为 CT

型, 4 例为 TT 型, 不同基因型的 CsA 平均血药浓度-时间曲线见图 1, 曲线下面积 (area under the curve, AUC) 和相对清除率见表 1。

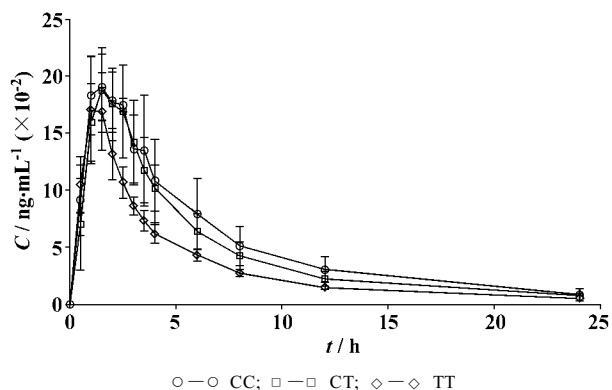


Figure 1 Effect of MDR1 C3435T genotype on cyclosporine (CsA) blood concentration ($\bar{x} \pm s$) after a single oral dose of CsA microemulsion solution 500 mg. Subjects with MDR1 3435 CC genotype ($n=4$), CT ($n=12$) versus TT group ($n=4$)

Table 1 Demographics and cyclosporine A (CsA) pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s$) according to multidrug resistance gene (MDR1) (C3435T) genotypes

Parameter	TT ($n=4$)	CT ($n=12$)	CC ($n=4$)
Age / year	22.5 ± 1.7	23.3 ± 0.8	22.3 ± 1.5
Height / cm	181 ± 7	172 ± 6	169 ± 5
Weight / kg	74 ± 9	65 ± 5	64 ± 4
Dose / mg · kg ⁻¹	6.8 ± 0.9	7.7 ± 0.6	7.9 ± 0.4
AUC _{0-inf} / ng · h · mL ⁻¹	8 515 ± 1 062	11 765 ± 2 267	13 765 ± 3 303
(CL/F _r) / L · h ⁻¹	59 ± 8	44 ± 9	38 ± 7

2 非线性混合效应模型

GAM法和 BEM法的统计学结果显示:身高、体重和每公斤体重剂量不影响 CsA 的药代动力学特征, 而 MDR1 基因 C3435T 多态性是影响其相对清除率 (CL/F_r) 的因素 ($P < 0.001$)。其中 CT 型和 CC 型间无显著差异, 但二者与 TT 型有显著差异。由于相对清除率和相对生物利用度 (F_r) 相关, 故在模型中引入 F_r, 估算不同基因型的个体口服 CsA 的 F_r。结果显示引入 F_r 后, 目标函数值继续下降了 16.9 ($P < 0.001$), 且个体间 CL/F_r 的变异显著减小, 故认为不同基因型清除率的不同是由于相对生物利用度的不同引起的, 在最终模型中予以保留。进一步比较不同基因型之间的差异, 发现 CC 和 CT 型间无显著差异 ($P > 0.05$), 而二者与 TT 型有显著差异 ($P < 0.001$)。最终模型如下。

$$F_j = F_r \times e^{\eta_{F_j}} \quad (1)$$

$$CL_j = CL \times e^{\eta_{CL_j}} \quad (2)$$

$$V_{2j} = V_2 \times e^{\eta_{V_{2j}}} \quad (3)$$

$$Q_j = Q \times e^{\eta_{Q_j}} \quad (4)$$

$$V_{3j} = V_3 \times e^{\eta_{V_{3j}}} \quad (5)$$

$$K_{aj} = K_a \times e^{\eta_{K_{aj}}} \quad (6)$$

$$C_{ij} = C \times e^{\epsilon_{ij}} \quad (7)$$

上式中 F_r 是相对生物利用度, CL 是相对清除率, V₂ 是中央室的表观分布体积, Q 是中央室和周边室间的清除率, V₃ 是周边室的表观分布体积, K_a 是吸收速率常数; F_r, CL_j, V_{2j}, Q_j, V_{3j} 和 K_{aj} 为某一受试者的药代动力学参数值; F_r, CL, V₂, Q, V₃ 和 K_a 为该群体药代动力学参数的典型值; η^{F_j}, η^{CL_j}, η^{V_{2j}}, η^{Q_j}, η^{V_{3j}} 和 η^{K_{aj}} 是呈正态分布, 均数为 0, 方差为 ω_F², ω_{CL}², ω_{V₂}², ω_Q², ω_{V₃}² 和 ω_{K_a}² 的个体间变异; C_{ij} 是实际观察值, C 是模型预测值, ε_{ij} 是正态分布的均数为 0, 方差为 σ_ε² 的残差变异。

各参数的估算值见表 2。结果显示 CC 或 CT 型的个体比 TT 型的生物利用度高 40%。

Table 2 Final pharmacokinetic parameters estimated by NONMEM

Parameter	Meaning	Value	Standard error / %
CL / L · h ⁻¹	Clearance	59.1	5.10
V ₂ / L	Central volume	195	13.2
Q / L · h ⁻¹	Intercompartmental clearance	35.5	16.8
V ₃ / L	Peripheral volume	210	8.60
K _a / h ⁻¹	Absorption rate	0.898	15.7
F _r	Bioavailability ratio of CT/TT to CC	1.40	6.90
η _{CL}	Intersubject variance of CL	0.019 3	1 126
η _{V₂}	Intersubject variance of V ₂	0.141	108.0
η _Q	Intersubject variance of Q	0.028 8	8 901
η _{V₃}	Intersubject variance of V ₃	0.077 3	685.1
η _{K_a}	Intersubject variance of K _a	0.322	52.8
η _F	Intersubject variance of F	0.170	31.8
ε	Residual error	0.183	28.5

$$K = CL/V_2; K_{12} = Q/V_2; K_{21} = Q/V_3$$

讨论

本研究首次以中国健康志愿者为对象, 考察了中国人 MDR1 中 26 外显子的 C3435T 多态性与 CsA 药代动力学特性间的关系。由于 MDR1 是编码 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 的基因, 而 P-gp 的作用是将药物从细胞内主动转运到细胞外, 降低细胞内的药物浓度。故国外有学者认为, 口服 CsA 吸收不完全、个体间吸收的变异大, 除了与 CsA 水溶性差有关以外, 还与 MDR1 多态性有关^[1,9]。尽管大

多数学者认为 CsA 是 P-gp 的底物,但在人体中的研究结果非常不一致。有学者^[4,10-12]认为两者不相关,但这些研究多用谷浓度作为 PK 的特征参数,而谷浓度已被证实无法表征 CsA 在体内的药代动力学变化。目前在治疗药物监测中已采用服药 2 h 后或者多时间点取样法^[13,14]。本研究排除了其他因素的影响,结果显示中国健康个体中 C3435T 为 TT 型的相对生物利用度较其他基因型低约 40%。与 Chowbay B 等^[3]报道的结果恰相反。而同样采用 NONMEM 法分析的 Yates CR 等^[2]报道显示 TT 型、CT 型与 CC 型的药物处置有差别,前二者的相对生物利用度较后者低约 36.2%。提示在健康人与器官移植患者之间或者不同种族之间,不同的基因型可能对 PK 的影响有差异。

传统的药代动力学非房室模型采用曲线下面积 (AUC) 和相对清除率 (CL/F_r) 等来表征药物在体内的过程。由于相对清除率中含有相对生物利用度 (F_r) 项,用传统方法无法单独将 F_r 作为独立变量考察。而运用 NONMEM 法分析,可建立混杂效应模型,排除其他因素的干扰,对 F_r 、 K_s 和 CL 等各药代动力学参数进行定量考察。同时,也可对各药代动力学参数的个体间的变异程度和模型的预测误差有合理的估计。该法还可用于临床稀疏数据的分析^[15]。

本研究证实了在中国健康人中 MDR1 的 C3435T 基因多态性是口服 CsA 生物利用度的影响因素,提示为患者制定给药方案时,需考虑 MDR1 的基因多态性,对携带有 C3435T TT 型的个体需相应增加剂量。同时,本研究获得的药代动力学参数可为今后进一步的研究打下基础。

References:

- [1] 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 USA*, 2000, **97**(7): 3473 - 3478.
- [2] Yates CR, Zhang W, Song P, *et al.* The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients [J]. *J Clin Pharmacol*, 2003, **43**(6): 555 - 564.
- [3] Chowbay B, Kumaraswamy S, Cheung YB, *et al.* Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients [J]. *Pharmacogenetics*, 2003, **13**(2): 89 - 95.
- [4] Min DI, Ellingord VL. C3435T mutation in exon 26 of the human MDR1 gene and cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects [J]. *Ther Drug Monit*, 2002, **24**(3): 400 - 404.
- [5] Ding JJ, Li ZD, Jiao Z, *et al.* Determination of cyclosporine A in human whole blood by HPLC and its application in human pharmacokinetic study [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2004, **35**(2): 91 - 93.
- [6] Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, *et al.* MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity [J]. *Pharmacogenetics*, 2001, **11**(3): 217 - 221.
- [7] Wahlby U, Bouw MR, Jonsson EN, *et al.* Assessment of type I error rates for the statistical sub-model in NONMEM [J]. *J Pharmacokinetics Pharmacodynamics*, 2002, **29**(3): 251 - 269.
- [8] Wahlby U, Jonsson EN, Karlsson MO. Comparison of stepwise covariate model building strategies in population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis [J]. *AAPS Pharm Sci*, 2002, **4**(4): 27.
- [9] Zhang Y, Benet LZ. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein [J]. *Clin Pharmacokinetics*, 2001, **40**(3): 159 - 168.
- [10] Ahsen NV, Richter M, Grupp C, *et al.* No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporine A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients [J]. *Clin Chem*, 2001, **47**(6): 1048 - 1052.
- [11] Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, *et al.* Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2003, **74**(3): 245 - 254.
- [12] Balram C, Shama A, Sivathasan C, *et al.* Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphism in an Asian population: phenotypic-genotypic correlates [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2003, **56**(1): 78 - 83.
- [13] Levy G, Therret E, Lake J, *et al.* Patient management by Neoral C(2) monitoring: an international consensus statement [J]. *Transplantation*, 2002, **73**(Suppl 9): S12 - 18.
- [14] Ding JJ, Jiao Z, Li ZD, *et al.* Validation of the multi-regression model of Limited Sampling Strategy by Bootstrap method [J]. *Chin J Health Stat* (中国卫生统计), 2004, **21**(5): 280 - 282.
- [15] Vozeh S, Steimer JL, Rowland M, *et al.* The use of population pharmacokinetics in drug development [J]. *Clin Pharmacokinetics*, 1996, **30**(2): 81 - 93.