

多态变异对药物转运体活性影响及其临床意义

张海霞,王连生

(中南大学临床药理研究所,长沙 410008)

[摘要] 药物转运是药物反应个体差异及药物相互作用的重要环节。近年来,随着物质转运研究的深入,转运蛋白超家族成员正在不断增加。在已发现和命名的转运蛋白中,与药物转运有关的主要蛋白有ATP依赖性泵出转运体MDR1、有机阴离子转运蛋白(OATP)。MDR1在胃肠道、肝脏和肾脏等组织广泛分布,影响药物的吸收、分布以及分泌排泄。MDR1基因的多态性影响其表达和功能,改变底物药物体内过程。有机阴离子转运蛋白在肝脏等组织特异表达,调节药物的分泌排出,其遗传多态性是相关药物异常反应的重要原因。

[关键词] 多药耐药蛋白; 有机阴离子转运体; 遗传多态性

[中图分类号] R969 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2008)08-0765-05

Effect of genetic polymorphism on the activity of drug transporters and its clinical significance

ZHANG Hai-xia, WANG Lian-sheng

(Institute of Clinical Pharmacology, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: Drug transport is an important source of inter-individual variations in drug responses and is also a common site where drug-drug interactions happen. In recent years, more and more novel identified transporters have been added into the transporter super family, and this trend will continue in the future. Among the transporter members of this family, ATP-dependent efflux transporter P-glycoprotein (MDR1) and organic anion transporters (OATP) are the most important proteins involved in drug transport. MDR1 is the most well known transporter. Widely distributed in tissues such as the gastrointestinal tract, liver, kidney and so on, MDR1 plays an important role in drug absorption, distribution and excretion. Its functional genetic polymorphisms have significantly changed the pharmacokinetics of its substrate drugs, which has important clinical implications. OATP expressed in multiple tissues, and it mediated the drug excretion through the bile acid and kidney. Some genetic polymorphism of OATP genes is the cause of some abnormal drug responses.

Key words: multidrug resistance protein; organic anion transport proteins; genetic polymorphism

[J Cent South Univ (Med Sci), 2008,33(8):0765-05]

收稿日期 (Date of reception) 2007-12-28

作者简介 (Biography) 张海霞(1982-),女,湖南醴陵人,硕士研究生,主要从事临床药理学研究。

通讯作者 (Corresponding author) 王连生, E-mail: wang_liansheng@hotmail.com

基金项目 (Foundation item) 国家自然科学基金(30200346)。 This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (30200346).

药物转运是机体对药物处置的重要环节。根据药物的转运方式,药物转运体分为外排和摄取性两种。前者主要包括多药耐药基因(multi-drug resistance gene 1, *MDR1*)为代表的 ABC 转运体,又名 P-glycoprotein (P-gp),后者主要包括有机阴离子转运多肽 1B1 (organic anion transporting polypeptide 1B1, OATP1B1) 为代表的有机阴离子转运蛋白。

ABC 转运体(ATP binding cassette, ABC)是一组 ATP 能量依赖性跨膜转运蛋白,位于胞膜以及内质网、过氧化物酶体、线粒体等细胞器膜上,介导内源性物质、药物以及环境毒物的外向排出。ABC 转运体是一个超家族蛋白,现已发现 48 个异构成员。按照基因同源性被归类为 A, B, C, D, E, F 和 G7 个家族。从参与药物转运的重要性来看, *ABCB1* (又名 *MDR1*) 是 ABC 家族中最为重要的成员。该蛋白最初在多药耐药的肿瘤细胞中被发现,它能利用 ATP 水解释放的能量主动地将其底物转运至细胞外,导致细胞内药物浓度低于杀伤浓度而产生耐药。*ABCB1* 的底物有抗肿瘤药物以及许多其他临床药物。有机阴离子转运体 OATP1B1 是主要的药物摄取性转运体, OATP1B1 为肝脏特异表达的转运蛋白,其底物包括他汀类等多种药物。近年来, *ABCB1* 和 OATP1B1 在药物代谢动力学中的作用及其临床意义越来越受到重视,人们尤其关注与它们相关的药物相互作用及药物异常反应现象。

1 多药耐药蛋白 MDR1 相关的遗传药理学进展

ABCB1 又称多药耐药蛋白 MDR1。MDR1 由 2 个对映结构体构成,其蛋白质含 1 280 个氨基酸,有 2 个 ATP 结合位点和 12 个跨膜区。MDR1 广泛分布在肠道、肝脏等各种组织。肠道上皮细胞表达的 MDR1 直接将肠腔吸收的药物外排返回到肠腔,减少药物的吸收,还间接促进药物的肠道代谢,增加药物首关消除。这是因为,MDR1 对药物的外排与肠道对药物的反复吸收往往延长药物在肠道的滞留时间,代谢相应增强。药物进入血液循环后,肝脏和肾脏的 MDR1 分别将药物不断外排至胆汁和尿液。位于血脑、血睾等人体生理屏障组织的 MDR1 通过外排限制药物进入相

应组织。可见,MDR1 对其底物药物的吸收、组织分布以及排出各个环节都发挥重要作用,并在宏观上对药物生物利用度及半衰期具有重要影响。MDR1 的底物谱广泛,诸多临床用药都可被其转运,如心血管药物地高辛和维拉帕米,免疫抑制剂环孢素 A,他克莫司;HIV 蛋白酶抑制剂印地那韦、那非那韦和沙奎那韦以及许多抗肿瘤药物等。

MDR1 基因染色体定位于 7q21,基因全长超过 100 kb,含有 28 个外显子和 28 个内含子。*MDR1* mRNA 长 4.5 kb,编码区长度占基因全长比例少于 5%。*MDR1* 在人群中是一个多态变异基因,目前已经发现 40 多个单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP)。根据现有报道,除 C3 435T 外,已研究的 MDR1 多态变异对 MDR1 的转运功能没有显著影响,尽管有些变异改变了其氨基酸序列。C3 435T 位于 26 号外显子,属于无义变异。在人群中变异频率非常高,高加索人为 52%,非洲裔美国人 16%,亚洲人为 39% ~ 54%^[1-3]。

Hoffmeyer 等^[1]首先发现,在人体肠道组织,3 435TT 型个体 MDR1 组织含量不到野生型个体 3 435CC 的一半,杂合子 MDR1 组织含量居中。口服 MDR1 底物药物地高辛后,3 435CC 型受试者血药峰浓度 C_{max} 、药时曲线下面积(area under curve, AUC)均低于 TT 受试者。这种现象在应用强诱导剂利福平进行基因诱导表达处理后仍然存在。而且,不仅限于肠道,在外周血单核细胞、肿瘤等其他组织也观察到了类似结果^[4-7]。3 435CC 个体外周血单核细胞排出 MDR1 探针染料罗丹明的活性显著高于 TT 型^[8]。HIV 蛋白酶抑制剂是 MDR1 的底物之一,MDR1 可以降低其生物利用度,限制药物进入治疗相关靶组织,如 CD4⁺ 细胞、HIV 病毒隐藏的睾丸等组织。Fellay 等^[8]开展的临床观察发现,经过 6 个月的抗病毒治疗后,携带 3 435T 等位基因的 HIV 病人疗效显著优于野生型 MDR1 患者。上述结果分别得到了 Brumme 等^[9] 和 Haas 等^[10] 课题组的研究证实。另外有实验证明 MDR1 在外周血单核细胞的表达与另一种抗艾滋病药物——奈韦拉平的细胞内浓度相关。3 435CC 患者在外周血 CD4⁺ 细胞内奈韦拉平 AUC 显著低于 TT 患者^[11]。总之,C3 435T 变异对组织 MDR1 含量具有决定作用,这种作用在药动学、药效学及临床药物治疗学等方面具有十分广泛的影响和现实的意义。

C3 435T 影响 MDR1 表达的原因目前还不清楚。一种可能是该位点影响基因 mRNA 翻译效率、或 mRNA 稳定性、或 mRNA 的剪接、加工和翻译调控中的某个环节。也有学者认为, C3 435T 可能与 MDR1 基因的另外一些突变位点存在连锁关系, 这些位点位于启动子或增强子区域, 或者是对 mRNA 加工很重要的区域。因此, 要阐明 C3 435T 对 MDR1 基因表达影响机制需要开展单倍型研究。

G2 677T/A (Ala893Ser/Thr) 是与 C3 435T 一起作为 MDR1 单倍型研究的一个常见突变位点, 也是临床研究较多的一个 SNP。Kim 等^[12] 用 H1 抗组胺药物非索非那定作为 MDR1 的底物研究发现, 2 677GG 型组其 AUC 较之 TT 型基因组明显降低, 和 C3 435T 基因型对 AUC 的影响趋势一致; MDR1 * 2 / * 2 [1 236TT, 2 677TT 和 3 435TT] 型个体非索非那定 AUC 较之 MDR1 * 1 / * 1 [1 236CC, 2 677GG 和 3 435CC] 明显降低。与体内研究一致, 他们在稳定表达 MDR1 的细胞也证实了等位基因 2 677T 型细胞 MDR1 转运地高辛的活性高于 2 677G 型细胞, 细胞内地高辛聚集减少。

上述研究表明, MDR1 对相关药物体内过程及其疗效具有重要影响, 其遗传多态性是临床药物反应个体差异形成的重要原因。

2 有机阴离子转运蛋白 OATP 相关的遗传药理学进展

在人体肠道、肝脏、肾脏等组织与器官, 药物的转运通常由泵出和泵入性转运体共同完成。泵入性转运体有有机阴离子转运蛋白 (organic anion transport proteins, OATPs) 与有机阳离子转运体 (organic cation transport, OCT) 两大家族。OATPs 家族有 11 个成员, 由于最先克隆的家族成员 OATPA 被认为仅参与有机阴离子的转运, 而将该转运家族命名为有机阴离子转运体家族。人们后来发现, OATP 转运体同样参与有机阳离子、中性离子以及两性离子的转运。在 OATP 超家族中, OATP1B1 是目前阐述最多的药物摄入性转运体。OATP1B1 只在肝细胞的基底膜外侧有表达, 能够摄取从肝门静脉来源的两性内源性物质、外源性化学物质和普伐他汀、阿伐他汀、罗素他汀,

非索非那定等药物。

群体基因研究表明, OATP1B1 也是一个高度变异基因。已在人群中发现 44 个突变位点, 其中 17 个为外显子非同义突变, 4 个为同义突变, 20 个位于内含子, 其余 3 个位于基因启动子区。非同义突变中有 7 个为高频变异, 在不同人群中它们的频率具有较大的差异。A388G (Asn130Asp) 和 T521C (Val174Ala) 在非-美裔人中的频率分别为 74% 和 1%, 亚洲人为 63% 和 16%, 高加索人为 40% 和 14%; A388G 和 T521C 分别被命名为 OATP1B1 * 1b 和 OATP1B1 * 5 突变, 两种突变合称 OATP1B1 * 15, 野生型的则称 OATP1B1 * 1a。A452G (Asn151Ser) 仅在亚洲人中有发现, 频率为 3.8%; C463A (Pro155Thr) 和 A1 929C (Leu643Phe) 则仅在高加索人中有报道, 频率分别为 8% 和 9%; G1 463C (Gly488Ala) 和 A2 000G (Glu667Gly) 则只在非-美裔人中有报道, 频率分别为 9% 和 34%^[13-15]。细胞水平和相关的临床研究显示, A388G, T521C, G1 463C 和 A2 000G 等突变不同程度地降低了 OATP1B1 的转运活性^[13-14, 16]。

Nishizato 等^[16] 首先发现, 口服 OATP1B1 底物普伐他汀后, 携带 388G / 521C 等位基因的受试者普伐他汀的总清除率显著低于野生基因型受试者。随后研究证实 A388G 和 T521C 多态性变异对 OATP1B1 活性影响非常显著。OATP1B1 * 5 突变可造成普伐他汀的 AUC_(0,5) 和 C_{max} 值明显升高。OATP1B1 * 1a / * 15 个体较之 OATP1B1 * 1a / * 1a 个体和 OATP1B1 * 1b / * 1b 个体 AUC 值分别高 45% 和 80%; OATP1B1 * 15 / * 15 个体较之 OATP1B1 * 1a / * 1a 个体 AUC 值要高 92%, 比 OATP1B1 * 1b / * 1b 则要高 149%^[17]。OATP1B1 * 15 和 OATP1B1 * 5 等位基因可减少普伐他汀在肝排出^[15, 18]。进一步的研究发现, OATP1B1 基因型还和普伐他汀的药物疗效相关, 不同基因型患者服用普伐他汀治疗后, 总胆固醇下降幅度有显著差异^[19]。除普伐他汀外, 这两个多态基因位点对罗素他汀、匹伐他汀、辛伐他汀药动学也有类似的影响^[20-22], 而且, 相关研究提示, 它们还可能是临床他汀类药物治疗中相关横纹肌溶解不良反应易感性的遗传因素^[23]。

在肝脏组织表达的 OATPs 中, 除了 OATP1B1 外, 还有 OATP2B1 和 OATP1B3。目前对后两者参与药物转运情况研究相对较少。已有报道表

明 OATP2B1 外显子区具有高频多态变异 C1 457T (Phe486Ser) 及 C1 175T (Thr392Ile)。它们对 OATP2B1 底物雌素酮硫酸盐的转运活性都没有显著影响。在高加索人群中发现了 OATP1B3 的 3 个非同义突变: T334G (Ser112Ala), G699A (Met233Ile) 和 G1 564T (Gly522Cys), 频率分别为 78%, 71% 和 2%。比较它们的功能时发现, 携带 334G 和 699A 等位基因的 OATP2B1 具有相同的磺溴酞钠与胆汁酸的转运能力, 而 1 564T 突变则使之完全丧失磺溴酞钠的转运活性^[24]。

OATP1A2 是 OATP 超家族中另一个受到关注的药物转运体。目前已知, OATP1A2 参与转运的底物包括胆汁酸盐, 磺溴酞钠, 类固醇结合物, 甲状腺激素 T3 和 T4, 内皮素受体拮抗剂, 凝血酶抑制剂, 阿片受体激动剂, 非索非那定, 毒毛旋花子苷 G, 罗库溴铵, N-甲基奎宁等, 它是 OATP 家族中转运两性底物数目最多的成员。由于该转运体主要分布于大脑毛细血管内皮细胞, 成为一些物质进入中枢神经组织的通道, 对中枢组织药物浓度大小及效应具有重要影响。在一些人群的基因序列对比研究结果表明, OATP1A2 相对变异程度小, 但仍然存在一些多态变异位点。在非-美裔人中, 先后发现 A404T (Asn135Ile)、A516C (Glu172Asp) 以及 C2 003G (Thr668Ser), 其频率分别为 11%, 5% 和 4%。体外研究提示 516C, 404T 和 2 003G 为活性低下的 OATP1A2 等位基因, 它们可能是一些中枢作用的药物效应或不良反应个体差异的重要原因^[25]。

3 结语和展望

过去 20 多年来, 人们对药物代谢酶的遗传药理学研究已经取得令人瞩目的成就, 并由此启动了遗传药理学这一新兴的交叉研究专门领域和分支学科。随着近年转运体研究的迅猛发展, 药物转运机制及其在药动学、药效学、药物治疗学与新药研发中的意义也将越来越明确。有理由相信, 药物转运研究及其相关的遗传药理学研究成果必将显示越来越重要的影响。

高通量的 DNA 测序技术为遗传药理学的研究提供了强大的支撑, 也必将极大有利于药物转运体基因多态变异的检测。但如何更好利用这些资源, 还需要合理科学的设计和研究方法。例如, 深入开展单倍体的相关研究, 而不仅仅是局

限于单个 SNP; 同时, 在研究中选择理想的探针药物及其剂量; 保证足够的样本量等。

将药物转运体的遗传药理学研究成果应用到实践中并发挥其指导作用, 还有很长的路要走。但是, 现有的研究成果已使人们对转运体的认识发生改变, 在药物前体化合物的选择和合成等方面需要考虑药物转运体的因素, 以优化药物分子进入作用靶点的过程。它还有助于对药物体内过程、药物的相互作用、个体对药物效应和毒性易感性进行精确的分析, 从而为合理用药及新药研发提供新方向。

参考文献:

- [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] Ameyaw M M, 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.
- [3] Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, et al. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects [J]. *Pharm Res*, 2001, 18(10): 1400-1404.
- [4] Johne A, Kopke K, Gerloff T, et al. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 72(5): 584-594.
- [5] Verstuyft C, Schwab M, Schaeffeler E, et al. Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003, 58(12): 809-812.
- [6] Verstuyft C, Strabach S, E1-Morabet H, et al. Dipyridamole enhances digoxin bioavailability via P-glycoprotein inhibition [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2003, 73(1): 51-60.
- [7] Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56⁺ natural killer cells [J]. *Pharmacogenetics*, 2001, 11(4): 293-298.
- [8] Fellay J, Marzolini C, Meaden E R, et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study [J]. *Lancet*, 2002, 359(9300): 30-36.
- [9] Brumme Z L, Dong W W, Chan K J, et al. Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR-1 genes on initial antiretroviral therapy response [J]. *AIDS*, 2003, 17

- (2):201-208.
- [10] Haas D W, Smeaton L M, Shafer R W, et al. Pharmacogenetics of long-term responses to antiretroviral regimens containing efavirenz and/or nelfinavir: an adult AIDS clinical trials group study [J]. *J Infect Dis*, 2005, 192 (1): 1931-1942.
- [11] Almond L M, Edirisinghe D, Dalton M, et al. Intracellular and plasma pharmacokinetics of nevirapine in HIV-infected individuals [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2005, 78 (2): 132-142.
- [12] Kim R B, Leake B F, Choo E F, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 70 (2): 189-199.
- [13] Tirona R G, Leake B F, Merino G, et al. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (38): 35669-35675.
- [14] Nozawa T, Nakajima M, Tamai I, et al. Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC21A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and functional analysis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 302 (2): 804-813.
- [15] Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, et al. High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SLC01B1) [J]. *Pharmacogenetics*, 2004, 14 (7): 429-440.
- [16] Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, et al. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2003, 73 (6): 554-565.
- [17] Ho R H, Choi L, Lee W, et al. Effect of drug transporter genotypes on pravastatin disposition in European- and African-American participants [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2007, 17 (8): 647-656.
- [18] Mwinyi J, Johne A, Bauer S, et al. Evidence for inverse effects of OATP-C (SLC21A6) 5 and 1b haplotypes on pravastatin kinetics [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, 75 (5): 415-421.
- [19] Zhang W, Chen B L, Ozdemir V, et al. SLC01B1 521T→C functional genetic polymorphism and lipid-lowering efficacy of multiple-dose pravastatin in Chinese coronary heart disease patients [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 64 (3): 346-352.
- [20] Ho R H, Wang Y, Leake B F, et al. Multiple OATP transporters mediate the cellular uptake of rosuvastatin [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2005, 77 (3): 11-51.
- [21] Ieiri I, Suwannakul S, Maeda K, et al. SLC01B1 (OATP1B1, an uptake transporter) and ABCG2 (BCRP, an efflux transporter) variant alleles and pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82 (5): 541-547.
- [22] Pasanen M K, Neuvonen M, Neuvonen P J, et al. SLC01B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2006, 16 (12): 873-879.
- [23] Morimoto K, Oishi T, Ueda S, et al. A novel variant allele of OATP-C (SLC01B1) found in a Japanese patient with pravastatin-induced myopathy [J]. *Drug Metab Pharmacokin*, 2004, 19 (6): 453-455.
- [24] Letschert K, Keppler D, Konig J. Mutations in the *SLCO1B3* gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8) [J]. *Pharmacogenetics*, 2004, 14 (7): 441-452.
- [25] Lee W, Glaeser H, Smith L H, et al. Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (10): 9610-9617.

(本文编辑 郭征)