

·综述·

药物基因组学在药动学研究中的应用

卢琴,陈西敬^{*},王广基

(中国药科大学药物代谢与动力学研究中心,南京 210009)

【摘要】 药物基因组学是一门充满活力并迅速发展的新兴学科,以探讨药物作用的遗传分布,确定药物作用靶点,提高药物效应及安全性为目标,研究影响药物分布、消除等个体差异的基因特性,以及基因变异所致的不同病人对药物的不同反应等。本文综述了药物基因组学在药动学研究中的进展情况,介绍和论述了药物基因组学的概念和研究内容;探讨了药物基因组学在药动学中的应用,药物代谢酶的多态性和药物转运体的多态性;并展望药物基因组学的应用前景。

【关键词】 药物基因组学;药动学;代谢酶;转运蛋白

【中图分类号】 Q789; R969.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000—5048(2005)05—0473—04

1 药物基因组学的概念和研究内容

药物基因组学(pharmacogenomics)是在药物遗传学基础上发展起来的,以提高药物疗效及安全性为目标,研究影响药物分布、消除等个体差异的基因特性,以及基因变异所致的不同病人对药物的不同反应,并由此开发新的药物和用药方法的学科。

随着分子生物学、分子遗传学与分子药理学等学科的发展,人们逐渐认识到不同个体对同一种药物反应的不同大多是由个体基因的差异,主要是因为药物代谢酶、药物转运蛋白、药物作用靶点(如受体)等药物相关基因的多态性所造成。通过阐明这些基因多态性与药物反应之间的关系导致了一门新的学科——药物基因组学的产生。1997年6月28日,法国巴黎金塞特和可博特实验室宣布成立世界上第一个独特的基因与制药公司,正式提出“药物基因组学”这一概念。

药物基因组学以探讨药物作用的遗传分布,确定药物作用靶点来满足临幊上最佳的药物效应及安全性为目标。它研究遗传多样性引起药物或有毒物质反应的差异及基因多样性与药效的关系,以及个体差异与同种药物不同作用靶点的关系等^[1]。当前药物基因组学主要包含3个方面的内容:(1)药物作用与机体基因组之间的关系;(2)药物作用与产生药物的基因组之间的关系;(3)药物作用与病原生物基因组之间的关系。目前的研究工作主要集中在药物作用与机体基因组之间的关系上。

药物基因组学的研究大体可分为3个阶段:首先检测一些候选基因,寻找等位缺失及其造成的生物学后果;然后借助现有分子遗传学等技术,进行更多候选基因的研究;最

后进行基因组水平的关联分析^[2]。药物基因组学主要研究药物起效、活化、排泄等过程相关的候选基因,寻找变异基因序列,以此确定基因对药物效应的多态性。其涉及到的方法及技术主要有表型(phenotype)和基因型(genotype)分析,连锁分析(linkage analysis)、关联分析(association analysis),药物效应图谱(medicine response profiles MRPs),单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms SNPs),DNA芯片技术(DNA chip),应用DNA微阵列(DNA microarrays)监测基因表达^[3]及表达水平多态性质谱分析等。还可用高效的测定手段如凝胶电泳技术、包括聚合酶链反应、等位基因特异的扩增技术、荧光染色高通量基因检测技术来检测一些与药物作用的靶点或与控制药物作用、转运、消除等相关的基因变异^[4]。

2 药物基因组学在药动学研究中的应用

药物在体内产生疗效或不良反应多态性的机理见图1。药物在不同个体的反应是源于药动学及药效学反应的综合结果。药物代谢酶及药物转运体的多态性影响药动学过程,而药物靶目标及疾病相关途径的多态性则影响药物的药效学过程,个体对药物的反应可视为这两个过程的结合产物。

下面就药物代谢酶及药物转运体的多态性的研究近况作一综述。

2.1 药物代谢酶多态性导致的机体对药物代谢能力的差异

细胞色素P450酶(CYP450酶)家族的基因依靠其氨基酸序列的相似性。在人类中已发现39种活性CYP酶,其中可能只有CYP1、2、3酶家族参与外来物质的代谢,其他的

CYP酶家族主要参与内源性化合物如甾类化合物的代谢。CYP2家族是最大的一个家族，并且占人类所有CYP酶的1/3。它有4个成员具有基因多态性：CYP2B6、2C、2C9、2D6。现已被证明其广泛参与超过当前所有临床约40%的药物的代谢，另外还有CYP2A6、3A4等。

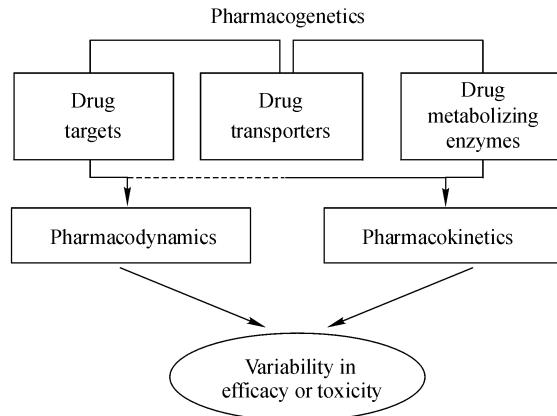


Fig. 1 Mechanism of difference of efficacies or toxicities of drugs caused by genetic polymorphisms

2.1.1 CYP3A4 CYP3A4是代谢药物最多的一种代谢酶，包括对乙酰氨基酚、卡马西平、洛伐他汀、硝苯地平等。目前已发现变体种类近20种^[5]，但导致个体对药物反应改变的变体不多。1998年，在研究硝苯地平的药物反应时，发现其5'启动子区的多态性CYP3A4-V71。这种等位基因在高加索人中占9%，在非裔美洲人中占53%，但未在台湾人中发现。变体CYP3A4*2(Ser222Pro)在高加索人中的频率为27%，未在非裔美洲人和华人中发现。CYP3A4*2对硝苯地平的体内清除率较野生型低，但在对睾酮 β -羟基化代谢中，未见显著差异。

变体CYP3A*3(MT)在体内对睾酮代谢无影响，其在高加索人中的频率为0.47%~4%，华人中占1.5%。变体CYP3A4*10(D174H)对睾酮、黄体酮及7BFC的体内代谢无影响，其在高加索人中占0.24%~2%，非裔美洲人中占2%，墨西哥人中占5%。

2.1.2 CYP2D6 CYP2D6主要参与精神类药物的代谢，包括抗抑郁药等，如异喹啉、丙咪嗪、氯氮平等常用药物。降低CYP2D6的代谢活性会产生一系列副反应。目前已发现超过70种的CYP2D6变体。其中15种SNP导致无功能的产物；2种(CYP2D6*4和CYP2D6*11)引起剪接缺陷，5种为错义突变造成翻译提早终止或活性位点改变，8种(CYP2D6*3、CYP2D6*6、CYP2D6*13、CYP2D6*16、CYP2D6*19、CYP2D6*20、CYP2D6*38等)引起移码突变；相反，在某些个体中，CYP2D6由于基因拷贝数增加等原因，引起酶活力增加(如CYP2D6*1)。CYP2D6酶缺失在高加索人中发生率为7%~10%，在亚洲人中发生率为1%~2%，这将导致在普通剂量时可产生代谢药物浓度的增加。

超快代谢者(Ultrarapid Metabolisms, UMs)通常在普通剂量时达不到治疗浓度，这是由于功能基因的拷贝数增加因而需要增加剂量以达到治疗效果。UMs在高加索人中发生率为1%~10%。

2.1.3 CYP2A6 CYP2A6在个体与种族间的表达及活性有很大的差异，目前认为这主要是由基因多态性造成。已发现13种CYP2A6变体。其中一些可导致酶活性改变，因而影响CYP2A6的代谢底物(包括临床与非临床用药物、毒素和诱癌物质等)。

CYP2A6活性在个体间有较大的差异，可通过香豆素、尼古丁及可铁宁(cotinine)^[6]进行体内/外实验证明，香豆素为CYP2A6的选择性底物，并用于评估体外CYP2A6的活性。弱代谢者(Poor Metabolisms, PMs)是这些有2个失活基因变体及无酶活性功能(如同型结合的两个无活性的突变遗传因子CYP2A6*41*4或CYP2A6*21*2)。强代谢者(Extensive Metabolisms, EMs)有1个或2个活性突变遗传因子的复制体(如野生型的同型结合的CYP2A6*11*1)。快代谢者(Fast Metabolisms, FMs)有2个活性基因的复制体(如基因复制产物CYP2A6*1/*1X2)。通过对其表型的研究发现，当香豆素作为探针药物时，PMs所分泌的7-hydroxy coumarin很少(低于EMs的0.1%)，当用尼古丁时，PMs所分泌的尼古丁也较少(约为EMs的0~15%)^[7]。相反，CYP2A6的FMs可快速代谢尼古丁。

CYP2A6*1为野生型，具有CYP2A6的全部活性。变体CYP2A6*2(Leu160His)在体内外实验中均无活性^[8]。CYP2A6*3并不存在或很少^[9,10]，变体CYP2A6*1B是由于CYP2A7的3'端末翻译区有一58 bp基因变化而产生，并且它保持了酶活性^[9]。体内外实验证实，基因缺陷型变体CYP2A6*4对香豆素和尼古丁没有活性。CYP2A6*5在香豆素弱代谢者(PMs)中存在，它在外显子(exon)(在底物识别位点6)处有一Gly479Val并且编码一种不稳定的蛋白质^[9]。CYP2A6包含一个在外显子3处的单核苷H⁺多态性，并产生Arg128Gln替代，在体外活性降低。CYP2A6*7对尼古丁的代谢活性降低，而对香豆素的活性不变。CYP2A6*10(Ile471Thr, Arg485Leu)在体内可降低对尼古丁及香豆素的活性，并可能对一些其它甚至所有底物都会失去活性。CYP2A6*11(Ser224Pro)体内外均能降低酶活性。

最近研究表明，已知的CYP2A6等位基因发生频率在不同种族间有着很大的区别。如CYP2A6*2在高加索人中发生率为1.1%~3.0%，中国人为0.0%~0.7%，日本人为0.0%，CYP2A6*7在高加索人中为1.0%，中国人为2.2%，日本人为6.3%。而CYP2A6*9在高加索人中发生率为5.2%，中国人为15.7%^[7,9,10]。

2.1.4 CYP2C9 CYP2C9代谢华法令、苯妥英、洛沙坦、非甾体类抗炎药(如布洛芬、celecoxib)及口服降糖药(如格列本脲、甲苯磺丁脲等)。目前已发现6种CYP2C9变体，野生

型 CYP2C9 * 1 在白人中大约占 83%, CYP2C9 * 3(Ile59Leu)在白人中约占 7%, 它在 1075 位的外显子 7 处出现 A>C 替代物。CYP2C9 * 4 只在日本人中发现, CYP2C9 * 5(Asp390Glu)只在非裔美国人中发现, CYP2C9 * 3 和 CYP2C9 * 2 对甲苯磺丁脲一次代谢的产物——4' 羟甲基甲苯磺丁脲(4'methyl hydroxylated tolbutamide)的内在清除率(CL_{int})及 V_{max} 均较野生型(CYP2C9 * 1)低, 而其 K_m 则较野生型高。在口服葡萄糖及格列本脲后, CYP2C9 弱代谢者(PMs: CYP2C9 * 3/*3)的血浆胰岛素水平高于快代谢者(Intermediate Metabolisms IMs: CYP2C9 * 1/*3, * 2/*3)及强代谢者(EMs: CYP2C9 * 1/*1, * 1/*2, * 2/*2)。

2.2 药物转运蛋白的多态性

除了代谢酶之外, 药物转运蛋白在决定药物吸收分布和药物排泄中起着重要的作用^[1]。以下就目前研究较多的 MDR1 和 MRP2 的情况介绍如下。

2.2.1 MDR1(ABCB1) MDR1 基因位于 7 号染色体, 由 28 个外显子组成, P-gp 为 MDR1(ABCB1) 基因的产物, P-gp 在药物吸收、分布和排泄中起着重要的作用, 它是一种将外源性药物从细胞内排出的外排型转运体, 具有 ATP 依赖性。目前, 在 MDR1 基因中已发现有超过 20 种的 SNPs。Hoffmeyer 等^[12] 发现有 6 种 SNPs 位于编码区。Kim 等发现在高加索人及非裔美国人人种中有 MDR1 变体, 其中有 9 种变体改变了 P-gp 的氨基酸顺序。靠近 P-gp N 端的 A61G SNP 导致从 Asn 到 Asp 氨基酸的改变。G1199A 变体(Ser400Asn)位于胞质环中, 靠近 ATP 的第一个结合位点, 最常见的 SNP(G2677T/A)位于跨膜第二区域中, 导致 Ala 到 Ser 或 Thr 的氨基酸的顺序改变。G2995A 变体也在跨膜第二区中。T307C(Phe-Leu)变体并没发现有大量存在。研究发现 C3435T 变体与高加索人的肠 P-gp 的表达水平有关。CC 基因型个体的 P-gp 表达水平是 TT 基因型的两倍, CT 基因型的 P-gp 表达水平介于两者之间。Tanabe 等发现 TT 基因型病人的胎盘中的 P-gp 水平显著高于 CT 基因型。Nakamura 等报道在 3435TT 日本人中, MDR1 mRNA 水平并未显著高于 CT 及 CC 组。Hoffmeyer 等^[12] 报道, 由于 3435TT 基因型在肠中的 P-gp 表达较低, 因此 TT 基因型中地高辛(P-gp 底物)血药浓度最大值高于 CC 基因型。而 Kim 等^[13] 报道, 服用抗 H1 受体组胺药非索非那定(fexofenadine)后, 3435TT 基因型的 AUC 显著低于 CC 组。

2.2.2 MRP2(ABCC2) MRP2(ABCC2) 在很多底物的胆排泄中起着重要的作用, MRP2 在个体间功能上的差异可能影响药物的分布, 其有 ATP 依赖性。MRP2 的底物有 LTC4、锑(Antimony)、镉(Cadmium)、甘草甜素(Glycyrrhizin)、胆红素双尿苷酸化物(Bilirubin diglucuronide)、普伐他汀(pravastatin)等。食物或药物在 MRP2 的表达水平中可能起一定作用。目前已有 6 种 MRP2 的 SNPs 被确认, 其中 C-24T(promoter), G1249A(exon 10, Val1417Ile) 及 C3972T(exon

Ile324Ile) 的频率分别为 18.8%、12.5% 和 21.9%。G1249A 在 417 位处出现从 Val 到 Ile 氨基酸顺序改变, 而“silent”变体 C3972T 在 1324 处出现从 Ile 到 Ile 氨基酸顺序改变, 另外 3 种 SNPs 分别为 C2302T(exon 18, Arg768Trp)、C2366T(exon 18, Ser789Phe) 及 G4348A(exon 31, Ala1450Thr), 其频率均为 1%^[14]。G4348A(Ala1450Thr)可能影响 MRP2 功能。在 MRP2 增强子区的 SNPs 突变或(和)DNA 位点结合蛋白(如 PXR)^[15], 可能与 MRP2 个体间表达水平差异有关。

2.2.3 OATP-C 和 OAT3 近年来通过体内外研究表明 OATP-C 和 OAT3 主要分别负责有机阴离子的肝和肾摄取。在人类 OATP-C 基因中至少发现 17 种非同源性(nonsynonymous)变体, 其中 Asn130Asp 和 Val174Ala 在日本人和白种人中有着广泛分布。Tirona 等^[16] 报道变体 Asn30Asp 在日本人和非裔美洲人发生率高于欧裔美国人, 而日本人和欧裔美国人的 Val174Ala 发生率却远高于非裔美洲人。变体 Asn151Ser 只在日本人中发现, 变体 Pro155Thr(欧裔美国人发生率为 16%)和 Glu667Gly(非裔美洲人为 34%)未在日本人中发现。

在 OATP-C * 1a/*1a, * 1a/*1b 及 * 1b/*1b 中普伐他汀的平均 CL_t 及 CL_{nr} 无显著差异, 而 OATP-C * 15 的普伐他汀的 AUC 增加, 杂合子(* 1b/*15)的 CL_t 和 CL_{nr} 值则显著低于纯合子 * 1b(* 1b/*1b)。OAT3 基因有 2 种多态型, 在正常组、T723A 及 Ala389Val 3 种基因组中, 普伐他汀的平均 CL_t 及 CL_{sec} 无显著差别^[17]。

2.2.4 还有其他一些转运蛋白, 如 OATP-2 的 SNP 分析已有报道, 通过野生型(wt)与突变型 OATP-2 的体外细胞培养的实验表明, 一些 SNP 突变型可降低其转运活性^[18]。

3 展望

药物基因组学出现于 20 世纪末, 是一门发展迅速的新学科。它不仅从基因水平关注药物作用的安全性, 还指导人们从基因组的研究中寻找新的药物, 对它的研究增加了药物的有效性和安全性, 同时缩短了新药开发的周期, 也降低了成本。

随着蛋白质组学研究的迅速发展并与药物基因组学研究相结合, 将有可能从核酸和蛋白质水平来阐明遗传多态性与药物疗效、不良反应之间的相互关系。对这些领域的广泛和深入研究, 促进了临床药物基因组学的快速发展。可以预料, 药物基因组学将为特定人群设计最为有效的药物, 为每一个病人设计最为理想的用药方案, 这不仅可以提高疗效, 缩短疗程, 而且可以减少不良反应, 给人们带来极大的益处。预计在未来的几年中, 药物基因组学将会得到快速的发展, 并逐渐应用于临床。

【参考文献】

[1] Norton RM. Clinical pharmacogenomics: application in pharmaceuticals. China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

- R&D[J]. *Drug Discov Today*, 2001, **6**(4): 180—185.
- [2] 华允芬(Hua YF), 明镇寰(Ming ZH), 张 铭(Zhang M). 药物基因组学研究进展[J]. 药学学报(*Acta Pharm Sin*), 2002, **37**(8): 668—672.
- [3] Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, et al. Expression profiling using cDNA microarrays[J]. *Nat Genet*, 1999, **21**(1 Suppl): 10—14.
- [4] Canulli GP, Artinger M, Swain PM, et al. High throughput analysis of differential gene expression[J]. *J Cell Biochem*, 1998, **30**—**31**(Suppl): 286—296.
- [5] Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, et al. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism[J]. *Adv Drug Del Rev*, 2002, **54**(10): 1 271—1 294.
- [6] Draper AJ, Madan A, Parkinson A. Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1997, **341**(1): 47—61.
- [7] Nakajima M, Kwon JT, Tanaka N, et al. Relationship between interindividual differences in nicotine metabolism and CYP2A6 genetic polymorphism in humans[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, **69**(1): 72—78.
- [8] Benowitz NL, Griffin G, Tyndale R. Deficient cooxidation of nicotine continued[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, **70**(6): 567.
- [9] Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, et al. Identification and characterization of novel polymorphisms in the CYP2A locus: implications for nicotine metabolism[J]. *FEBS Lett*, 1999, **460**(2): 321—327.
- [10] Chen GF, Tang, YM, Green B, et al. Low frequency of CYP2A6 gene polymorphism as revealed by a one step polymerase chain reaction method[J]. *Pharmacogenetics*, 1999, **9**(3): 327—332.
- [11] Sekine T, Cha SH, Endou H. The multispecific organic anion transporter (OAT) family[J]. *Pflugers Arch*, 2000, **440**(3): 337—350.
- [12] Hoffmeyer S, Burk O, Richter OV, 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): 3 473—3 478.
- [13] Kim RB, Leake BF, Choo EF, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European-Americans and African-Americans[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, **70**(2): 189—199.
- [14] Ito S, Ieiri I, Tanabe M, et al. Polymorphism of the ABC transporter genes MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects[J]. *Pharmacogenetics*, 2001, **11**(2): 175—184.
- [15] Hustert E, Zibat A, Presecan SE, et al. Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4[J]. *Drug Metab Dispos*, 2001, **29**(11): 1 454—1 459.
- [16] Tokui T, Nakai D, Nakagomi R, et al. Pravastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, is transported by rat organic anion transporting polypeptide oapt2[J]. *Pharm Res*, 1999, **16**(6): 904—908.
- [17] 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.
- [18] Tirona RG, Leake BF, 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): 35 669—35 675.

Application of Pharmacogenomics in Pharmacokinetic Study

LU Qin, CHEN Xi-Jing, WANG Guang-Ji

(Center of Drug Metabolism & Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

【ABSTRACT】 Pharmacogenomics is a burgeoning discipline and is being developed rapidly. The aim of pharmacogenomics is to investigate the genetic distribution of the drugs, and to determine the targets of the drugs so as to ensure the optimal efficacy and safety in the clinical practices. It is also used to investigate individual gene characteristics which affect distribution and elimination, and patients' different response to the drug owing to gene variation is also studied. The advancement of pharmacogenomics in pharmacokinetic study was reviewed in this paper. And the polymorphisms of drug metabolizing enzymes and drug transporters were discussed as well. The prospect of its application was also forecast.

【KEY WORDS】 Pharmacogenomics; Pharmacokinetics; Metabolizing enzyme; Transporters