

免疫抑制剂药效学监测的研究进展

郑丽云*, 罗 密, 叶燕嫦, 刘节君, 覃珠玲, 欧志坚, 白立芳[#](佛山市妇幼保健院, 广东佛山 528000)

中图分类号 R979.5;R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)14-1313-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.14.24

摘要 目的:为合理监测免疫抑制剂的治疗方案提供参考。方法:利用 Elsevier 和 PubMed 数据库查阅相关文献,归纳和总结体现免疫抑制剂生物学效应的药效学监测方法。结果:各种免疫学参数被认为是免疫抑制剂免疫调节的生物标志物,这些生物标志物能反映个体免疫应答,能体现免疫抑制剂的药效学效应。结论:药效学监测法有助于完善免疫抑制剂的个体化用药方案,并且能提高治疗的有效性和安全性。

关键词 免疫抑制剂;生物标志物;个体化用药

环孢霉素和他克莫司等免疫抑制剂的出现为器官移植带来了革命性的变化,大大降低了急性排斥反应的发生率。目前,临床上免疫抑制剂的监测是采用血药浓度监测法,即看其血药浓度是否在规定的治疗浓度范围内。但是由于免疫抑制剂个体差异大,相似的血药浓度对不同的患者将产生不同的效应,也就是所说的药效学差异,因此血药浓度并不能反映每个患者对药物的真实反应。在器官移植领域,需要有能体现每个患者对药物的反应的方法来监测免疫抑制剂的使用以提高治疗的有效性和安全性。于是,在过去几年,对能体现免疫抑制剂生物学效应的生物标志物进行了研究,研究证明这些生物标志物可用于进一步促进免疫抑制剂的个体化用药,也可用于评价药物的作用机制以及不同免疫抑制剂之间相互作用的药效学机制^[1]。各种免疫学参数被认为是免疫抑制剂免疫效应的生物标志物,笔者利用 Elsevier 和 PubMed 数据库查阅相关文献,对已被广泛认可的生物标志物作一综述。

1 目标酶的活性

免疫抑制剂目标酶的活性被认为是免疫抑制剂免疫调节的生物标志物。环孢霉素和他克莫司的目标酶为钙调磷酸酶,霉酚酸酯的目标酶是次黄嘌呤核苷磷酸脱氢酶(IMPDH),雷帕霉素抑制剂、西罗莫司和依维莫司的目标酶为 P70S6 激酶^[2]。研究表明,用环孢霉素治疗的肾移植患者与健康对照组相比,其钙调磷酸酶活性明显受到抑制,给药后 2 h 环孢霉素浓度 384 ng/ml 能很好地抑制酶的活性,且没有移植排斥和毒性反应^[3]。Boleslawski E 等^[4]研究了 21 例用他克莫司治疗的肝移植患者,药物对钙调磷酸酶活性的抑制效应被用作生物标志物,在初始剂量时,他克莫司对钙调磷酸酶的抑制效应从 40%~80% 不等,因此导致了药物的个体间差异。

最初用于测定 IMPDH 活性的方法为放射性同位素法^[5]。随后, Glander P 等^[6]报道了用高效液相紫外检测法测定其活性,此法在外周单核细胞中有很好的重现性。研究结果表明,79 名肾移植患者在移植前的 IMPDH 活性存在很大差异,移植前 IMPDH 活性低的患者在移植后应减少霉酚酸酯的剂量,

因此,测定移植前 IMPDH 活性可以作为调节霉酚酸酯剂量的参考^[7]。并且该研究还发现,IMPDH 活性高于 8.5 nmol/mg 蛋白×h 且所用的霉酚酸酯剂量较低时容易发生急性排斥反应。Brunet M 等^[8]研究表明,应根据霉酚酸酯抑制患者血液中 CEM (来自 T 淋巴细胞的一个细胞系)的增殖情况而选择生物标志物,CEM 能够辨认出在低治疗量时抑制增殖能力较低的亚群,和当霉酚酸酯浓度 < 3 mg/ml 时,却有很好的抑制能力的亚群。15 例接受他克莫司和霉酚酸酯(固定 2 g/d)治疗的肝移植患者,移植后接受 6 个月的监测,结果表明对于肝移植患者,不建议固定给予霉酚酸酯,并且移植后 1 个月内应监测霉酚酸酯浓度。该结果与药效学研究得到的结果是相符的,用 %CEM 作为生物标志物建立的治疗浓度范围适合霉酚酸酯,并且适合对该药敏感的患者。

评价目标酶的活性能很好地反映出与之相应的免疫抑制剂的药效学效应,然而该方法的缺陷在于当不同作用机制的药物联合应用时,评价目标酶的酶活性则不能反映出药物联合应用时所产生的有效效应。

2 细胞因子的合成

尽管监测细胞因子产物,特别是循环中的细胞因子有难度,但还是有研究者评价了将细胞因子的合成作为生物标志物。评价细胞因子合成的方法有流式细胞术^[9]、PCR 法和酶联免疫吸附法^[10]。Barten MJ 等^[11]采用流式细胞术细胞计数微球阵列法发现,在用环孢霉素和霉酚酸酯进行治疗的心脏移植患者中,细胞因子白细胞介素(IL)-2 和 IL-4 在给药后 2 h 明显降低,而 TNF- α 和 IL-6 相比移植前则表达增加,IL-10 和 IFN- γ 则在移植前后无明显变化。

移植超过 5 年、采用环孢霉素治疗的肾移植患者,其细胞核因子(NFAT)相关基因的表达越低则越容易获得感染或者肿瘤病变。Giese T 等^[12]通过研究证实,对于肾移植术后长期存活的患者,NFAT 相关基因表达的理想范围为 20%~30%,这一结果在 Sommerer C 等^[13]的一项前瞻性研究中得到了证实,该研究观察了 NFAT 相关基因(IL-2、IFN- γ 等)的表达和患者临床表现之间的联系:在稳定的肾移植患者中,NFAT 相关基因的表达低于 15% 时获得感染的几率显著增高(57.4% vs. 14.7%, $P < 0.001$),患非黑瘤细胞癌的几率以及环孢霉素产生副作用的几率也较之增大。结果发现环孢霉素血药浓度水平

* 药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0757-82969754。E-mail:liyuncsu@163.com

通信作者:副主任医师。研究方向:普外科。电话:0757-82969891。E-mail:luoyuwang@163.com

在移植排斥和不排斥的患者之间并无显著差异。相反,对于环孢霉素血药浓度水平相近的患者,NFAT相关基因(IL-2、IFN- γ)低表达者有较高的免疫抑制效应,从而容易发生免疫过度抑制和产生药物毒性。总之,在Sommerer C等的试验中,药理学指标(NFAT相关基因的表达)比药动学指标与临床表现之间的相关性要好^[13]。

确定细胞亚群的种类和正在合成的细胞因子是非常有意义的,因为细胞种类能决定免疫应答。Ahmed M等^[14]发现合成细胞因子IL-2和IFN- γ 的细胞亚群CD8⁺和CD8⁺的频数和他克莫司的生物学效应有很好的相关性。Boleslawski E等^[1]在用他克莫司和强的松治疗的肝移植患者中发现,反应合成IL-2的CD3⁺CD8⁺T细胞的百分比(而不是他克莫司的血药浓度)与急性排斥反应的发生密切相关,移植前CD8⁺和IL-2百分比越高的患者,移植后发生急性排斥反应的概率也越大。而免疫抑制剂的血药浓度水平和这些淋巴细胞内生物标志物并无显著联系,这点可能恰好也证实了即使免疫抑制剂的浓度和剂量都相似,但在不同个体中将会产生不同的效应。

3 淋巴细胞的增殖

由于目前所有的免疫抑制剂都会抑制淋巴细胞增殖,所以该参数常被作为免疫抑制程度的标志物。评价淋巴细胞增殖有多种方法,有DNA合成检测法、流式细胞术检测细胞在不同细胞周期的增殖细胞核抗原(PCNA)表达法以及可以检测到7~10次细胞分裂的荧光染料染色法^[15]。

淋巴细胞表面抗原是潜在的生物标志物,它在T淋巴细胞活化和纯系扩增过程中表现活跃,尤其是在共刺激、黏附和凋亡过程中。最常被评估的标志物是IL-2受体(CD25),调整淋巴细胞激活的第3次信号就是由IL-2和CD25联合介导的。CD95(Fas)和CD69在免疫系统已经活化的细胞中表达会增多,通过细胞凋亡而结束细胞应答,也是两个非常有意义的标志物。

Wieland E等^[16]发现在肾移植后的第1周CD26的表达会自发减少,倾向于发生排斥反应;而CD71表达的减少则发生感染的几率增大,可能预示着免疫过度抑制。Boleslawski E等^[17]报道在肝移植后长期生存的患者中CD28表达的减少与恶性肿瘤的发生有关,而其表达增多时则易发生排斥反应。在用西罗莫司单方案治疗的稳定的移植患者中,将西罗莫司抑制淋巴细胞的增殖作为生物标志物,结果发现,尽管所有患者的西罗莫司治疗浓度范围都为8~12 ng/ml,但从标志物得到的结果却显示出了很大的个体间差异,抑制范围从31%到96%不等^[18]。该结果也表明了每位患者结合药理学和药动学监测来调整药物剂量的重要性。

淋巴细胞增殖与活化的抑制是非特异性标志物,它可以监测免疫抑制剂联合用药后的对免疫系统的协同效应,这相对于只可以反映一种免疫抑制剂效应的特异性标志物来说是个很大的优势。另外,此类标志物可能有助于进一步理解药物的作用机制和药物联合应用时的相互作用机制。

4 耐受标志物

过去几年,大部分移植研究都致力于评估免疫耐受状

态。研究中,移植器官在没有给予免疫抑制剂的情况下不明确地被机体所接受,还有一些移植患者则在减少免疫抑制剂用量时自发地达到了这种状态,直到完全抑制排斥。这种情况在肝移植患者中出现的最多(大约20%的患者会耐受)。目前,很多研究者都致力于寻找可靠的生物标志物,来确定患者是否具有在无免疫抑制剂的情况下有达到这种免疫耐受状态的倾向。认识此类生物标志物有助于寻找刺激免疫耐受产生的方案,以减少药物用量,提高治疗的安全性。

为了诱导这种耐受的状态,大部分能引起器官排斥的Th1都必须消除,同时,CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(可以抑制细胞毒性并且保护移植器官)的数量和功能都必须提高。调节性T细胞抑制免疫活性,在维持耐受状态中起主要作用;而转录因子FoxP3在这种细胞群中高度表达,在这类细胞的发展过程中起决定性作用。

因此,一些研究评估了将CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺作为移植患者逐渐减少免疫抑制剂用量生物标志物。Braudeau C等^[19]将未使用免疫抑制剂的已产生耐受肾移植患者与肾功能稳定的未产生耐受的肾移植患者进行比较。与未使用免疫抑制剂的肾移植患者相比,慢性排斥者FoxP3的转录和CD4⁺CD25⁺T细胞都减少了,在肝移植患者中发现了类似的结果。Segundo DS等^[20]在肾功能稳定的移植患者中评估了不同免疫抑制剂对CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺百分比的影响,结果发现,不同于西罗莫司,环孢霉素和他克莫司都会减少循环中Treg细胞的数量。因此,研究者建议可以用血中Treg细胞的水平来确认那些对减少免疫抑制剂用量非常敏感的患者。

5 细胞免疫应答标志物

测定T淋巴细胞(CD4⁺)经植物凝集素刺激有丝分裂后细胞内三磷酸腺苷(ATP)的增加值为一种测定移植患者整体免疫应答的新方法。大部分免疫系统CD4⁺的功能直接或间接依赖ATP的产量,ATP是细胞能量的来源并且为大部分免疫系统效应器提供能量。根据ATP水平可将免疫应答分为低(<225 ng/ml)、中(225~524 ng/ml)、高(>525 ng/ml)3类,低ATP时患者感染的概率高,而高ATP时患者发生移植排斥的概率高^[21]。

Kowalski RJ等^[22]进行了一项多中心试验来评估该标志物,试验在504例器官移植患者中进行(其中肾移植243例、肝移植150例、心移植86例、小肠移植25例)。其中有39例活检证实有排斥,66例被感染。与其他器官移植相比,小肠移植发生排斥者ATP水平都很高(平均769 ng/ml),肝移植发生感染者ATP水平都极低(平均60 ng/ml)。结果表明CD4⁺T细胞内ATP的浓度与患者的临床表征有很好的相关性,尤其是感染的发生率与极低的ATP浓度有很大的相关性。尽管CD4⁺T细胞内ATP的浓度是确定患者是否有免疫过度抑制或药物毒性的良好生物标志物,但该标志物需要与其他标志物联合运用才能更好地发挥作用。

6 结语

生物标志物能反映免疫抑制剂的真实情况,而且耐受标志物还可辨认移植患者是否可以考虑减免免疫抑制剂的使用。虽然药动学监测能确保每种药物在治疗浓度范围内,但

对治疗的监测应不再只局限于药动学监测,但还应该考虑患者的遗传药理学特征,选择更合理的药物。但目前药效学生物标志物监测在免疫抑制剂治疗方案中的应用主要受限于方法上的困难,而且数据较少,主要从有限的单中心试验中获得。基于初期的研究,还不能确定哪些标志物最适合用于预防排斥和不良反应,尚需进一步进行大样本多中心试验对已有的研究成果进行验证,以选择最有效的生物标志物来反映免疫抑制剂对免疫系统的效应。

参考文献

- [1] van Rossum HH, Press RR, den Hartigh J, et al. A call for advanced pharmacokinetic and pharmacodynamic monitoring to guide calcineurin inhibitor dosing in renal transplant recipients[J]. *Clinical Chemistry*, 2010, 56(5): 732.
- [2] Millán O, Urtasun N, Brunet M. Biomarkers of the immunomodulatory effect of immunosuppressive drugs in transplant recipients[J]. *Transplantation Reviews*, 2009, 23(2): 120.
- [3] Weimert NA, Derotte M, Alloway RR, et al. Monitoring of inosine monophosphate dehydrogenase activity as a biomarker for mycophenolic acid effect: potential clinical implications[J]. *Ther Drug Monit*, 2007, 29(2): 141.
- [4] Boleslawski E, Conti F, Sanquer S, et al. Defective inhibition of peripheral CD8+ T cell IL-2 production by anti-calcineurin drugs during acute liver allograft rejection[J]. *Transplantation*, 2004, 77(12): 1815.
- [5] Weigel G, Griesmacher A, Zuckermann AO, et al. Effect of mycophenolate mofetil therapy on inosine monophosphate dehydrogenase induction in red blood cells of heart transplant recipients[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2001, 69(3): 137.
- [6] Glander P, Hambach P, Braun KP, et al. Pre-transplant inosine monophosphate dehydrogenase activity is associated with clinical outcome after renal transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2004, 4(12): 2045.
- [7] Sommerer C, Giese T, Schmidt J, et al. Cyclosporin A tapering monitored by NFAT-regulated gene expression: a new concept of individual immunosuppression[J]. *Transplantation*, 2008, 85(1): 15.
- [8] Brunet M, Cirera I, Martorell J, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolic acid in liver transplant patients treated with mycophenolate mofetil[J]. *Transplantation*, 2006, 81(4): 541.
- [9] Barten MJ, Tamok A, Garbade J, et al. Pharmacodynamics of T-cell function for monitoring immunosuppression[J]. *Cell Prolif*, 2007, 40(1): 50.
- [10] Flores MG, Zhang S, Ha A, et al. In vitro evaluation of the effects of candidate immunosuppressive drugs: flow cytometry and quantitative real-time PCR as two independent and correlated read-outs[J]. *J Immunol Methods*, 2004, 289(1/2): 123.
- [11] Barten MJ, Rahmel A, Bocsi J, et al. Cytokine analysis to predict immunosuppression[J]. *Cytometry A*, 2006, 69(3): 155.
- [12] Giese T, Sommerer C, Zeier M, et al. Approaches towards individualized immune intervention[J]. *Dig Dis*, 2010, 28(1): 45.
- [13] Sommerer C, Zeier M, Meuer S, et al. Immunomonitoring of NFAT-regulated gene expression: clinical benefit of clinical stable renal allograft recipients[J]. *Ther Drug Monit*, 2011, 33(6): 469.
- [14] Ahmed M, Venkataraman R, Logar AJ, et al. Quantitation of immunosuppression by tacrolimus using flow cytometric analysis of interleukin-2 and interferon-gamma inhibition in CD8(-) and CD8(+) peripheral blood T cells[J]. *Ther Drug Monit*, 2001, 23(4): 354.
- [15] Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2012, 413(17/18): 1338.
- [16] Wieland E, Shipkova M, Martius Y, et al. Association between pharmacodynamic biomarkers and clinical events in the early phase after kidney transplantation: a single-center pilot study[J]. *Ther Drug Monit*, 2011, 33(3): 341.
- [17] Boleslawski E, Othman SB, Grabar S, et al. CD25, CD28 and CD38 expression in peripheral blood lymphocytes as a tool to predict acute rejection after liver transplantation[J]. *Clin Transplant*, 2008, 22(4): 494.
- [18] Brunet M, Campistol JM, Diekmann F, et al. T-cell function monitoring in stable renal transplant patients treated with sirolimus monotherapy[J]. *Mol Diagn Ther*, 2007, 11(4): 247.
- [19] Braudeau C, Racape M, Giral M, et al. Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immunoregulatory properties in long-term graft outcome[J]. *Transpl Int*, 2007, 20(10): 845.
- [20] Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, et al. Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients[J]. *Transplantation*, 2006, 82(4): 550.
- [21] Kobashigawa JA, Kiyosaki KK, Patel JK, et al. Benefit of immune monitoring in heart transplant patients using ATP production in activated lymphocytes[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2010, 29(5): 504.
- [22] Kowalski RJ, Post DR, Mannon RB, et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay[J]. *Transplantation*, 2006, 82(5): 663.

(收稿日期:2013-08-26 修回日期:2013-12-02)