

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)24-0066-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.24.015



2型糖尿病患者达格列净血药浓度与 *UGT1A9* 基因多态性相关性研究*

刘彦儒, 龚婧如, 蒋喆, 陆惠平[△]

(上海市浦东医院, 上海 201399)

摘要:目的 考察2型糖尿病患者达格列净血药浓度与尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)1A9基因多态性的相关性。方法 选取医院2021年3月至6月接受达格列净治疗的2型糖尿病患者30例,用药至少3d后,采用液相色谱串联质谱法测定达格列净稳态血药浓度,采用测序法测定*UGT1A9*基因型,比较不同基因型患者达格列净血药浓度的差异。结果 共检出rs234681098、rs234681543、rs234681426和rs234681645 4个*UGT1A9*的基因突变位点,30例患者达格列净稳态平均血药浓度为(10.62±6.18)ng/mL,不同基因型患者的达格列净血药浓度差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 *UGT1A9*的rs234681098、rs234681543、rs234681426和rs234681645位点基因突变不影响2型糖尿病患者达格列净的血药浓度。

关键词:达格列净;*UGT1A9*;基因多态性;血药浓度;2型糖尿病

Correlation of Dapagliflozin Plasma Concentration with *UGT1A9* Gene Polymorphisms in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

LIU Yanru, GONG Jingru, JIANG Zhe, LU Huiping

(Shanghai Pudong Hospital, Shanghai, China 201399)

Abstract: Objective To investigate the correlation of dapagliflozin plasma concentration with the polymorphisms of uridine diphosphate - glucuronosyltransferase (UGT) 1A9 gene in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Methods** A total of 30 patients with T2DM treated with dapagliflozin in the hospital from March to June 2021 were selected. After at least 3 d of medication, the steady - state dapagliflozin plasma concentration was determined by the liquid chromatography - tandem mass spectrometry, the *UGT1A9* genotype was sequenced by the sequencing method, and the differences in dapagliflozin plasma concentration among patients with different genotypes were compared. **Results** Four *UGT1A9* gene mutation sites including rs234681098, rs234681543, rs234681426 and rs234681645 were detected. The average steady - state dapagliflozin plasma concentration in 30 patients was (10.62 ± 6.18) ng / mL; there was no significant difference in the dapagliflozin plasma concentration among patients with different genotypes ($P > 0.05$). **Conclusion** Mutations at rs234681098, rs234681543, rs234681426 and rs234681645 in *UGT1A9* do not affect the dapagliflozin plasma concentration in patients with T2DM.

Key words: dapagliflozin; *UGT1A9*; gene polymorphisms; plasma concentration; type 2 diabetes mellitus

近年来,钠-葡萄糖协同转运蛋白2(SGLT2)抑制剂作为治疗糖尿病的新靶点受到了广泛关注。达格列净是全球首个上市的用于治疗2型糖尿病的SGLT2抑制剂,通过抑制肾脏的SGLT2,阻止原尿中葡萄糖在肾脏中重吸收,促进其在尿液中的排泄,由此达到降低血糖的目的^[1-2],为非胰岛素依赖性降糖药。达格列净还具有显著的心肾保护作用^[3],可显著降低血糖、减轻体重、改善血压,低血糖发生率低,安全性较好^[4],是国内外指南中合并心血管、肾脏等并发症糖尿病患者的一线推荐药物^[5-7]。该药的体内代谢主要由尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT)1A9介导,*UGT1A9*基因多态

性有可能影响达格列净体内代谢转化速率,造成药物体内暴露量的差异,影响降糖效果和毒副作用,但目前尚缺乏相关的实验数据支持。本研究中探讨了2型糖尿病患者达格列净血药浓度与*UGT1A9*基因多态性的相关性,为其个体化治疗提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:Agilent 1200型高效液相色谱仪、Agilent 6410A型三重四极杆串联质谱仪(美国Agilent公司);CPA225D型电子天平(德国Sartorius公司,精度为0.01 mg);UNIVERSAL32R型台式冷冻离心机(德国Hettich

*基金项目:上海市浦东新区卫生系统学科建设项目[PWZy2020-14];复旦大学附属浦东医院重点专科/专病诊治中心项目[Tszk2020-05]。

第一作者:刘彦儒,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为内分泌临床药学,(电子信箱)ruyan5205@126.com。

[△]通信作者:陆惠平,男,硕士研究生,主任药师,研究方向为药事管理,(电子信箱)lhp310@126.com。

公司);Eppendorf MiniSpin型迷你离心机、移液枪(德国Eppendorf公司);聚合酶链式反应(PCR)9700型扩增仪,3730 XL型测序仪,均购自美国ABI公司;H6-1型微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂);WFH-201A型紫外透射反射仪(上海精科实业有限公司);DYY-6C型稳压稳流电泳仪(北京市六一仪器厂)。

试剂:达格列净标准品(批号为E20J10K90919,含量>98%),达格列净-d5内标(批号为O09IB228105,含量98%),均购自上海源叶生物科技有限公司;基因组DNA抽提试剂盒(批号为DP348),琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(批号为DP219),均购自天根生化科技<北京>有限公司;2×HiFi PCR Master Mix(上海咏科生物科技有限公司,批号为FT203-01);乙腈、甲酸均为质谱纯,甲醇为色谱纯,水为屈臣氏蒸馏水。

1.2 研究对象

纳入标准:符合《中国2型糖尿病防治指南(2020年版)》^[8]中相关诊断标准并确诊,年龄不小于18岁。本研究方案经医院医学伦理委员会批准(编号:YJ-2020006),患者签署知情同意书。

排除标准:酮症酸中毒、高渗性昏迷、乳酸性酸中毒等急性并发症,急性感染、创伤等其他原因引起的应激状态;曾患癌症或有药物滥用史,肝肾功能异常,妊娠期或哺乳期。

病例选择:选取医院2021年3月至6月接受达格列净治疗的2型糖尿病患者30例,其中男17例,女13例;年龄(62.30±14.25)岁,体质指数(26.60±3.60)kg/m²。

1.3 方法

患者口服达格列净片(AstraZeneca AB,国药准字HJ20170118,规格为每片10 mg)每天1片,至少3 d后,于晨起服药30 min前抽取5 mL外周静脉血2份,均置于抗凝管中,其中1份离心后分离,得血清,用于药物浓度检测,另1份用于基因检测。

达格列净血药浓度检测:1)色谱条件,色谱柱为Waters XSELECT HSS柱(100 mm×2.1 mm,3.5 μm);流动相为5 mmol/L的乙酸铵水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~0.5 min时25%B→95%B,0.5~5 min时95%B);流速为0.3 mL/min;柱温为40℃;进样量为10 μL;运行5 min。2)质谱条件,采用电喷雾离子源,负离子电离方式,多反应监测模式采集。电压为6 000 V;干燥气温度为400℃,流速为10 L/min,雾化气(Gas1)气压138 kPa;辅助加热气(Gas2)气压200 kPa。达格列净和达格列净-d5的定量离子对分别为*m/z* 467.2→329.0和*m/z* 473.2→413.1。3)分别取100 μL样品,加入300 μL甲醇(含100 ng/mL达格列净-d5内标溶液)进行蛋白沉淀,涡旋混合5 min后,14 000 r/min离心10 min,取上清液,采用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)

法进行测定。达格列净的线性关系、精密度、准确度、提取回收率、基质效应和稳定性等均符合要求。

基因检测:取样品适量,提取总DNA,针对UGT1A9的外显子区域设计引物,采用PCR法扩增,琼脂糖电泳检测,对扩增的PCR产物进行检测及纯化,采用测序仪对PCR产物行Sanger法测序,利用Sequencher 4.10.1软件对序列进行突变点分析。

1.4 统计学处理

采用SPSS 26.0统计学软件分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,否则以四分位数 $Q_{50}(Q_{25}, Q_{75})$ 表示;方差齐性数据组间行*t*检验,否则行Mann-Whitney检验。计数资料以率(%)表示,采用 χ^2 检验分析患者基因型频率是否符合Hardy-Weinberg平衡。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因检测

共发现4个位点突变,rs234681098和rs234681543均为杂合突变,突变频率分别为0.25和0.30,rs234681426的突变频率为0.5833,rs234681645为纯合突变,突变频率为0.30。基因型频率均符合Hardy-Weinberg平衡($P > 0.05$),表明研究资料具有群体代表性。详见表1。

表1 基因突变检测结果

基因位点	基因型分布[例(%)]			等位基因分布[例(%)]	
	野生型	杂合突变型	纯合突变型		
rs234681098	GG[15(50.00)]	GC[15(50.00)]	CC[0(0)]	G[45(75.00)]	C[15(25.00)]
rs234681543	GG[12(40.00)]	GC[18(60.00)]	CC[0(0)]	G[42(70.00)]	C[18(30.00)]
rs234681426	TT[12(40.00)]	TC[11(3.33)]	CC[17(56.67)]	T[25(41.67)]	C[35(58.33)]
rs234681645	GG[21(70.00)]	GC[0(0)]	CC[9(30.00)]	G[42(70.00)]	C[8(30.00)]

2.2 不同基因型患者一般资料

4组基因型患者一般资料比较,均无显著差异($P > 0.05$)。详见表2(其中BMI为体质指数,HbA_{1c}为糖化血红蛋白,FBG为空腹血糖)。

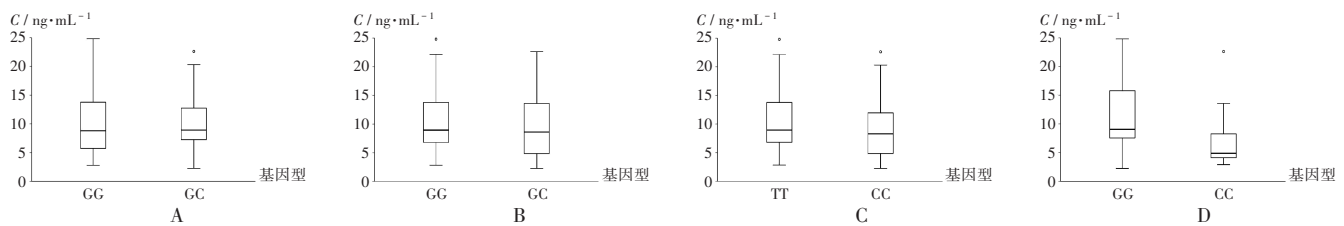
2.3 血药浓度与UGT1A9基因多态性的相关性分析

30例患者达格列净稳态血药浓度平均值为(10.62±6.18) ng/mL。按UGT1A9各个位点基因分型,rs234681098位点基因型GG和GC患者的中位血药浓度分别为8.82 ng/mL和8.94 ng/mL,rs234681543位点基因型GG和GC患者的中位血药浓度分别为8.93 ng/mL和8.60 ng/mL,rs234681426位点基因型TT和CC患者的中位血药浓度数分别为8.93 ng/mL和8.27 ng/mL,rs234681645位点基因型GG和CC患者的中位血药浓度分别为9.04 ng/mL和4.86 ng/mL,但不同基因型患者达格列净血药浓度差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见图1(由于rs234681426基因位点的TC型仅1例,故无

表2 4组不同基因型患者一般资料比较

Tab.2 Comparison of the general data of patients with different genotypes among the four groups

项目	rs234681098		rs234681543		rs234681426			rs234681645	
	GG	GC	GG	GC	TT	TC	CC	GG	CC
性别(男/女,例)	9/6	8/7	7/5	10/8	7/5	0/1	10/7	12/9	5/4
χ^2 值	0.136		0.023		1.350			0.006	
P值	1.000		1.000		0.689			1.000	
年龄(岁)	71(61.50,72.50)	64(51.50,70.00)	71(63.50,72.50)	64(50.75,72.00)	71(63.50,72.50)	84.00	64(50.00,69.00)	70(64.00,73.50)	53(45.00,69.00)
W值	136		130		130			134	
P值	0.339		0.373		0.231			0.081	
BMI(kg/m ²)	26.92±3.55	26.27±3.74	26.92±3.98	26.38±3.42	26.92±3.98	27.69	26.30±3.51	26.57±4.11	26.67±2.05
t值	0.493		0.396		0.441			86.000	
P值	0.626		0.695		0.663			0.717	
HbA _{1c} (%)	9.57±2.12	8.37±1.39	9.55±2.26	8.59±1.50	9.55±2.26	8.50	8.59±1.54	7.90(7.60,10.40)	8.90(8.20,8.40)
t值	1.840		1.410		1.360			78.500	
P值	0.077		0.170		0.186			0.483	
FBG(mmol/L)	9(7.55,13.50)	8.30(6.40,9.60)	8.55(7.20,13.45)	8.75(6.73,9.93)	8.55(7.20,13.45)	9.00	8.70(6.70,10.00)	7.80(6.80,10.00)	9.55(8.70,10.90)
W值	160		130		125			60.5	
P值	0.054		0.362		0.330			0.129	



A. rs234681098 B. rs234681543 C. rs234681426 D. rs234681645

图1 达格列净血药浓度与UGT1A9关系的箱形图

A. rs234681098 B. rs234681543 C. rs234681426 D. rs234681645

Fig.1 Box plot of the correlation of dapagliflozin plasma concentration with UGT1A9

法用箱形图表示)。

3 讨论

糖尿病患者使用口服降糖药的治疗效应个体差异显著,而相关药物代谢酶和受体的遗传多态性是降糖药药物代谢动力学和药物效应动力学个体差异的重要原因^[9]。因此,国内外对药物基因多态性与降糖药的个体化差异之间相关性的研究也在不断探索,如吕秋菊等^[10]探讨了CYP2C9与KCNJ11基因多态性对2型糖尿病患者格列美脲降糖效果的影响,但未发现2种靶点的3个位点基因多态性与疗效的显著相关性。

达格列净主要通过肝脏代谢消除,主要代谢途径包括葡萄糖醛酸化、脱烷基化和氧化。其中,66%的原药会被直接葡萄糖醛酸化,9%会被氧化代谢,氧化代谢产物的29%会进一步被葡萄糖醛酸化^[11]。主要的代谢产物是无活性的达格列净3-O-葡萄糖醛酸苷,主要由UGT1A9介导生成^[12]。体内研究显示,与代谢酶诱导剂利福平合用,达格列净的最大血药浓度降低7%,血药浓度-时间曲线下面积降低22%,受试者24h尿

糖排泄减少10%;而与UGT1A9的抑制剂霉酚酸合用,达格列净的最大血药浓度升高13%,血药浓度-时间曲线下面积增加51%,受试者24h尿糖排泄增加18%^[13]。本研究中针对30例患者的达格列净谷浓度检测结果发现,个体之间的差异较大(2.32~24.81ng/mL)。

UGT1A9存在多种基因多态性,迄今共发现等位基因21种,其中11个位于启动子,4个位于第1外显子,6个位于第1内含子^[14]。研究发现,携带C-2152T和T-275A基因变异的肝微粒体中UGT1A9蛋白表达水平和其葡萄糖醛酸化的活性比野生型高,-118T(9>10)基因变异后使荧光素报告酶活性升高2.6倍^[15]。I399C>T是位于第1内含子的点突变,有研究发现该基因变异可导致UGT1A9蛋白表达升高,并加快伊立替康活性产物SN-38的消除^[16]。研究显示UGT1A9C-440T/T-331C的基因变异可提高麦考酚酸的葡萄糖醛酸化代谢,明显升高肾移植患者活性产物霉酚酸的浓度^[17]。对奥卡西平的研究结果显示,UGT1A9等位基因变异I399C>T携带者的活性代谢产物血浆浓度显著降低,癫痫发作控制

效果较非携带者差^[18]。本研究中通过基因测序发现了4个位点的突变, *rs234681098*、*rs234681543* 和 *rs234681426* 3个位点的突变与达格列净血药浓度差异无显著相关性, 虽然 *rs234681645* 位点纯合突变(CC)型患者较野生型(GG)患者的药物浓度偏低, 但可能因样本数量较少, 差异不具有统计学意义, 还需进一步开展针对该位点的深入研究。

尽管 *UGT1A9* 存在多种基因多态性, 但其氨基酸或蛋白质序列改变却非常罕见, 因此 *UGT1A9* 基因多态性对不同药物甚至同一药物的药物代谢动力学影响的研究结果可能不一致。美国 AstraZeneca 公司分析了达格列净 II 期药物临床试验中患者的 *UGT1A9* 基因多态性与药物清除率的相关性, 未发现 *I399C > T*、*rs2011404*、*rs6759892*、*rs7577677*、*rs4148323*、*UGT1A9*2* 和 *UGT1A9*3* 7个位点突变对其清除率有显著影响^[19], 上述突变在本研究人群中未发现。本研究还存在样本量较小、缺少药物效应动力学评估等局限性, 尚需进一步针对有关基因突变开展大样本、高质量的临床研究, 以进一步明确有关基因突变对达格列净临床治疗的影响, 从而促进个体化降糖治疗。

综上所述, *UGT1A9* 的 *rs234681098*、*rs234681543*、*rs234681426* 和 *rs234681645* 位点基因突变不影响 2 型糖尿病患者达格列净的血药浓度。

参考文献

- [1] CHAO EC, HENRY RR. SGLT2 inhibition — a novel strategy for diabetes treatment[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(7):551 - 559.
- [2] ASO Y, KATO K, SAKURAI S, et al. Impact of dapagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on serum levels of soluble dipeptidyl peptidase - 4 in patients with type 2 diabetes and non - alcoholic fatty liver disease[J]. *International Journal of Clinical Practice*, 2019, 73(5):e13335.
- [3] PFISTER M, WHALEY JM, ZHANG L, et al. inhibition of SGLT2: a Novel Strategy for Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus [J]. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2011, 89(4):621 - 625.
- [4] BAILEY CJ, VILLEGAS EC, WOO V, et al. Efficacy and safety of dapagliflozin monotherapy in people with Type 2 diabetes: a randomized double - blind placebo - controlled 102 - week trial[J]. *Diabetic Medicine*, 2015, 32(4):531 - 541.
- [5] 国家老年医学中心, 中华医学会老年医学分会, 中国老年保健协会糖尿病专业委员会. 中国老年糖尿病诊疗指南(2024版)[J]. *中华老年医学杂志*, 2024, 43(2):105 - 147.
- [6] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease [J]. *Kidney Int*, 2024, 105(4S):S117 - S314.
- [7] 中华预防医学会肾脏病预防与控制专业委员会. 中国慢性肾脏病早期评价与管理指南[J]. *中华内科杂志*, 2023, 62(8):902 - 930.
- [8] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020年版)[J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(4):315 - 409.
- [9] 刘谋泽, 何发忠, 陈长仁, 等. 常用口服降糖药的药物基因组学研究进展[J]. *药学进展*, 2017, 41(2):101 - 109.
- [10] 吕秋菊, 徐锐, 蒲强红. CYP2C9 与 KCNJ11 基因多态性对 2 型糖尿病患者格列美脲降血糖效果的影响[J]. *中国药业*, 2021, 30(17):89 - 91.
- [11] KASICHAYANULA S, LIU XN, LACRETA F, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of dapagliflozin, a selective inhibitor of sodium - glucose co - transporter type 2[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2014, 53(1):17 - 27.
- [12] OBERMEIER M, YAO M, KHANNA A, et al. In vitro characterization and pharmacokinetics of dapagliflozin (BMS - 512148), a potent sodium - glucose cotransporter type II inhibitor, in animals and humans [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38(3):405 - 414.
- [13] KASICHAYANULA S, LIU X, GRIFFEN SC, et al. Effects of rifampin and mefenamic acid on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of dapagliflozin [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2012, 15(3):280 - 283.
- [14] GUILLEMETTE C. Pharmacogenomics of human UDP - glucuronosyltransferase enzymes[J]. *Pharmacogenomics Journal*, 2003, 3(3):136 - 158.
- [15] SÁNCHEZ - FRUCTUOSO AI, MAESTRO ML, CALVO N, et al. The prevalence of uridine diphosphate - glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single - nucleotide polymorphisms T - 275A and C - 2152T and its influence on mycophenolic acid pharmacokinetics in stable renal transplant patients [J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(6):2313 - 2316.
- [16] SANDANARAJ E, JADA SR, SHU X, et al. Influence of *UGT1A9* intronic I399C > T polymorphism on SN - 38 glucuronidation in Asian cancer patients [J]. *Pharmacogenomics Journal*, 2008, 8(3):174 - 185.
- [17] BALDELLI S, MERLINI S, PERICO N, et al. C - 440T / T - 331C polymorphisms in the *UGT1A9* gene affect the pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplantation [J]. *Pharmacogenomics*, 2007, 8(9):1127 - 1141.
- [18] LU Y, FANG YX, WU XY, et al. Effects of *UGT1A9* genetic polymorphisms on monohydroxylated derivative of oxcarbazepine concentrations and oxcarbazepine monotherapeutic efficacy in Chinese patients with epilepsy [J]. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2017, 73(3):307 - 315.
- [19] NAAGAARD MD, CHANG R, NÅGÅRD M, et al. Common *UGT1A9* polymorphisms do not have a clinically meaningful impact on the apparent oral clearance of dapagliflozin in type 2 diabetes mellitus [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2022, 88(4):1942 - 1946.

(收稿日期:2023 - 12 - 12;修回日期:2024 - 06 - 29)