

他克莫司血药浓度检测方法的研究进展

宋爱凤¹, 胡萍², 杨大伟^{2*}

1. 寿光市上口中心卫生院, 山东 寿光 262732

2. 聊城市人民医院 中原生物医学研究院, 山东 聊城 252000

摘要: 他克莫司是一种大环内酯类免疫抑制剂, 临床上广泛用于器官移植和自身免疫系统疾病的治疗, 其疗效和不良反应与该药血药浓度密切相关, 并且个体差异性较大。临床上常用液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS)、微粒子酶免疫分析法 (MEIA)、酶联免疫吸附法 (ELISA)、酶放大免疫分析法 (EMIT)、化学发光微粒子免疫法 (CMIA) 等检测技术对他克莫司血药浓度进行检测。对他克莫司血药浓度检测方法的研究进展进行综述, 为临床合理用药和相关领域的研究提供借鉴。

关键词: 他克莫司; 血药浓度; 检测方法

中图分类号: R969 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)11-3497-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.11.064

Research progress on detection methods of tacrolimus blood concentration

SONG Ai-feng¹, HU Ping², YANG Da-wei²

1. Shouguang Shangkou Township Central Hospital, Shouguang 262732, China

2. Zhongyuan Academy of Biological Medicine, Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, China

Abstract: Tacrolimus is a macrolide immunosuppressive agent widely used in the treatment of organ transplantation and autoimmune diseases. The efficacy and adverse reactions are closely related to the blood drug concentration of the drug, and the individual differences are large. Clinical monitoring of tacrolimus blood concentrations is usually performed by performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS), microparticle enzyme immunoassay assay (MEIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), enzyme-multipliedimmuno assay technique (EMIT), and chemiluminescence microparticle immunoassay assay (CMIA), etc. The research progress on detection methods of tacrolimus blood concentration is reviewed in this paper, which provides reference for the clinical rational drug use and related research in this field.

Key words: tacrolimus; blood concentration; detection methods

他克莫司是一种从筑波链霉菌发酵物中提取的大环内酯类强效免疫抑制剂, 属于钙调磷酸酶抑制剂, 主要通过干扰 T 细胞的活化来发挥其免疫抑制作用^[1]。他克莫司进入 T 细胞中与细胞质免疫亲和素 FKBP12 结合形成复合物从而抑制钙调磷酸酶的活性, 阻碍了钙依赖性信号转导, 并使促进细胞因子基因活化的转录因子 (NF-AT) 失活, 从而抑制白细胞介素-2 (IL-2)、IL-3、IL-4、IL-5, 干扰素- γ 等多种细胞因子的产生和 T 细胞的活化^[2]。在临床上主要用来预防和治疗肝脏、肾脏、心脏等多种实体器官移植的排斥反应, 对于特异性皮炎、类风湿

关节炎等自身免疫性疾病的治疗也有一定的效果^[3]。但由于他克莫司的治疗窗窄, 安全范围小, 患者个体间和个体自身药动学的差异大^[4], 因此在临床使用过程中需要定期进行药物监测, 根据血药浓度对药物剂量进行调整, 实现个体化给药以达到理想的治疗效果。

目前, 临床上常用的他克莫司血药浓度的检测方法主要分为两类, 一是色谱分析法, 包括高效液相色谱法 (HPLC)^[5]、液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS)^[6]、超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS)^[7]等。二是免疫分析法, 包括微粒子

收稿日期: 2019-08-09

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (2015M580595)

作者简介: 宋爱凤, 女, 主管护师。E-mail: skyyjk@126.com

*通信作者 杨大伟, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为代谢组学在肿瘤、中医药等研究中的应用。E-mail: yangdawei775@163.com

酶免疫分析法 (MEIA)、酶联免疫吸附法 (ELISA)^[8]、酶放大免疫分析法 (EMIT)^[9]、化学发光微粒子免疫法 (CMIA)、放射免疫分析法 (RIA) 等。血药浓度监测对于优化临床给药方案、实现个体化用药、减少药物不良反应的发生具有重要意义。本文对近年来他克莫司血药浓度检测方法的研究进展进行综述, 以期为他克莫司血药浓度监测工作提出建设性的意见。

1 LC-MS/MS 法

随着分析技术的不断发展, LC-MS/MS 作为一种液相分离结合串联质谱检测的新型分析仪器, 近年来得到了迅速发展, 成为现代分析仪器的主流。LC-MS/MS 具有低成本、高准确度、分析范围广、检测时间短、特异性强、通量高等优点, 所以在临床血药浓度监测中将逐步取代酶免分析法成为常规检测方法。金瑛等^[10]收集 253 例心脏移植患者术后服用他克莫司的全血样本, 采用 HPLC-MS/MS 法测定全血他克莫司血药浓度进行方法学验证, 并与化学发光微粒子免疫检测法的测定结果进行比较, 进一步证实 HPLC-MS/MS 法测定他克莫司血药浓度定量特异性强, 灵敏度高。LC-MS/MS 法不受他克莫司体内代谢产物的影响, 能有效区分他克莫司和代谢产物, 可以避免抗原抗体反应中交叉反应的情况, 很好地解决由于药物代谢产物的影响而导致的测定结果偏高的问题。Ansermot 等^[11]对比研究 LC-MS/MS 法与酶放大免疫法测定全血他克莫司血药浓度, 表明由于与代谢物的交叉反应, EMIT 存在显著正偏差, 所以对于移植患者中的治疗药物监测 LC-MS/MS 法相对更加准确。Sallustio 等^[12]研究也表明在定量全血中他克莫司的浓度, 与免疫测定和常规 HPLC 方法相比, LC-MS/MS 具有显著的重复性和准确性优势。根据国际共识建议, LC-MS 或 LC-MS/MS 是目前用于量化免疫抑制药物的最佳方法, 特别是在代谢物可能积累的某些临床情况下, 所以 LC-MS/MS 法被视为他克莫司血药浓度测定的“金标准”。Han 等^[13]用 LC-MS/MS 法测定肾移植患者细胞内和血液中他克莫司的浓度, 进一步研究两者之间的关系以及他克莫司浓度和免疫反应状态之间的相关性。Park 等^[14]建立了一种基于液-液萃取, 温和超声波然后进行 LC-MS/MS 分析来确定大鼠全血中他克莫司血药浓度的新方法, 并且成功应用于市售产品的研究。

但是目前国内对他克莫司血药浓度的常规监测

方法仍以免疫分析法为主, LC-MS/MS 法仍多应用于实验室研究。一方面因其设备比较昂贵, 初始成本高, 在临床常规检测中难以普及应用; 更主要的原因是 LC-MS/MS 法对操作人员的专业技术水平要求比较高, 样品前处理过程较繁琐、周期长, 前处理方法学、色谱、质谱条件等因不同实验室而难以标准化操作, 缺乏一个商业化的规范操作规程, 因此此方法无法得到广大医生的认可。

2 MEIA

免疫分析法与色谱分析法相比, 具有试剂商品化、有效期较长、自动化程度高、准确性和重复性较好、检测速度快、操作简便等优势, 更适用于大量成批的样品测定, 在临床常规检测中得以广泛应用。但是免疫分析法试剂盒的价格较为昂贵, 并且目前市场上的免疫分析试剂盒种类有限, 也不能实现同时测定多个药物。

MEIA 法是目前临床上最常用的他克莫司血药浓度的检测方法, 原理是将标本中他克莫司与微粒子上包被的抗体进行反应。将反应液转移到能吸附微粒的玻璃纤维上, 洗去未结合成分, 加入底物在碱性磷酸酶的作用下生成甲基伞形酮。该生成物受荧光照射后会产生荧光, 根据出现的荧光量, 做标准曲线, 即可得他克莫司的含量。MEIA 法使用美国 Abbott 公司开发的全自动快速微粒子酶分析仪 (IMx), 该系统自动化程度较高, 体积小、设计巧妙、应用灵活, 适合各大中型医院的使用^[15], 近几年市场上不断涌出一些国产试剂盒, 价格相对低廉, 其操作性和适应性也与雅培公司的相同, 有研究比较了雅培与国产的 MEIA 法他克莫司测定试剂盒, 发现两种试剂盒的检测结果一致性很好, 统计学上没有显著差异^[15]。随着技术的不断优化, 国产试剂盒可以凭借价格以及供货速度的优势将逐渐替代进口试剂盒。

MEIA 法虽然有操作简便、速度快捷、稳定性好等优点, 但其属于免疫分析法, 所以也存在交叉免疫反应。马嵘等^[16]研究发现可以通过建立多元分析模板图, 对 MEIA 法测定的他克莫司血药浓度数据的处理结果, 建立患者个体化监测图, 为临床患者他克莫司理想治疗窗浓度提供实用方法。

3 ELISA

ELISA 是 1971 年由荷兰和瑞典的学者提出, 原理是酶分子与抗原或抗体共价结合后, 既保留其免疫活性又保留酶的活性, 此种酶标记抗体或抗原

与吸附在固相载体的抗原或抗体发生特异性结合。加入酶反应的底物后,底物被酶催化由无色变为有色产物,产物的量与标本中受检物质(抗原或抗体)的量成正比,故可根据颜色反应的深浅来确定样品中他克莫司的浓度。ELISA 法具有灵敏度高、特异性强、仪器试剂费用相对低的特点,适合临床批量样本的检测,但是测定步骤比较烦琐、周期长,全程手工操作,测定结果易受外界因素影响,需要有效控制实验室环境,制定标准操作规范以及做好室内质控,提高实验数据的准确性。

周台玲等^[17]考察了 ELISA 法和 EMIT 法分别测定同一血样中他克莫司浓度的结果,显示两种方法相关性较好,但二者测定的他克莫司血液浓度差异显著,需各自建立治疗窗范围进行判断,检测结果不可相互替换。这一结论与钱文璟等^[18]认为 EMIT 法结果显著高于 ELISA 法结果、李想等^[19]研究发现 ELISA 和 EMIT 两种方法在 5~20 $\mu\text{g/L}$ 的结果差异没有显著性意义,但是在患者血药浓度极低($<2.0 \mu\text{g/L}$)时,EMIT 法较 ELISA 法高的研究基本相符,可以很好地相互印证。虽然酶联免疫吸附法具有较高的灵敏性和准确性,但由于存在交叉反应,可能检测到具有免疫抑制活性的他克莫司代谢产物,导致结果会偏高。因此有条件的话可用液相质谱法进行血药浓度的分析作为检测的参考标准。

4 EMIT

EMIT 法是 20 世纪 70 年代初开发应用的一种半定量的均相酶免疫分析技术,基本原理是半抗原与酶结合成酶标半抗原,保留半抗原和酶的活性。当酶标半抗原与样本中的药物竞争抗体结合后,使酶的活性中心受到影响而活性被抑制。反应后酶活力大小与标本中的半抗原量呈一定的比例,可以根据酶的活性来确定样本中待测物的浓度。该检测方法自动化程度高、样品前处理简单快速、测定周期短,适用于临床急诊和大样本的分析测定。但是 EMIT 法受温度湿度等环境因素^[20]、试剂盒本身的贮存条件有效期等影响较大,所以需要做好正确的分析质控标准。各个实验室需要建立他克莫司血药浓度监测的质量控制方法,来提高血药浓度监测的准确性。

我国国内各临床检验室广泛使用的是西门子公司自动化 Viva-E 生化分析仪来检测他克莫司的血药浓度。兰顺等^[21]和宋晓勇等^[22]都用该法测定他克莫司全血谷浓度,来研究他克莫司治疗肾病综合

征的临床疗效与其血药浓度的相关性,均获得疗效满意谷浓度范围。国外关于 EMIT 相较于传统的 MEIA 法的对比研究,认为这两种方法所测得结果相似,可互相代替。Yamaoka 等^[23]采用 MEIA、ELISA 和 EMIT 3 种方法检测一位肾移植患者全血中他克莫司的浓度,结果分别为 3.7、3.2、3.0 mg/L ,说明 3 种检测方法结果一致性很好。Saint-Marcoux 等^[24]比较了 EMIT、CMIA、LCMS/MS 3 种检测方法测定他克莫司血药浓度,发现虽然两种免疫测定法均与 LC-MS 相比具有正偏差,但是采用贝叶斯估计分析技术会增加结果的准确性。

5 CMIA

CMIA 法是近年发展起来的一种高灵敏度的检测方法,原理为采用吡啶酯标记他克莫司分子作为酶竞争物,用他克莫司单克隆抗体包被的顺磁微珠作为捕获物,将样品与顺磁微珠混合反应,加入酶竞争物,与微珠上的抗体空位结合,外加磁场使微珠分离,清洗后加入预激发与激发试剂产生化学发光反应,化学发光的强度与样品中他克莫司的浓度成反比,根据标准曲线,即可求得样品中他克莫司的浓度^[15]。雅培公司生产的 CMIA 他克莫司测定试剂盒就是根据这个原理设计,以及配套的自动免疫分析系统检测。该平台自动化程度更高,检测速度更快,检测的精密度更好,但同时该设备价格昂贵、使用维护成本高、因此目前仍主要在一些大型医院使用。多数学者研究表明 CMIA 法测定他克莫司血药浓度测定不仅准确度和精密度较高,同时携带污染率及漂移度对其测定结果没有影响,性能指标可靠性高^[25-27]。

6 结语

他克莫司为免疫抑制剂,临床上用于器官移植免疫排斥治疗,其临床疗效与不良反应与血药浓度相关。检测方法学研究的进步为高水平临床血药浓度监测工作的开展提供了技术保证,对临床用药安全有着更深层次的意义。然而,不同实验室之间水平存在差异,所以如何基于现有的技术条件,采用合理的分析方法,做好室内、室间质量控制,利用有限点的血药浓度值准确地估算药物暴露量,进一步研究他克莫司的药动力学是今后的研究重点。

参考文献

- [1] Miyata S, Ohkubo Y, Mutoh S. A review of the action of tacrolimus (FK506) on experimental models of rheumatoid arthritis [J]. *Inflamm Res*, 2005, 54(1):1-9.

- [2] Roehrl M H, Kang S, Aramburu J, *et al.* Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(20): 7554-7559.
- [3] Kitahara K, Kawai S. Cyclosporine and tacrolimus for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2007, 19(3): 238-245.
- [4] Wu P, Ni X, Wang M, *et al.* Polymorphisms in CYP3A5*3 and MDR1, and haplotype modulate response to plasma levels of tacrolimus in Chinese renal transplant patients [J]. *Ann Transplant*, 2011, 16(1): 54-60.
- [5] 赵碎巧. 他克莫司血药浓度的方法学评价 [J]. 中国医药导刊, 2012, 14(2): 342-343.
- [6] 王燕, 李鹏飞, 马萍, 等. LC-MS/MS 法检测他克莫司血药浓度室内质控回顾性分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(15): 1873-1875.
- [7] 赵冠人, 申健, 彭明丽, 等. HPLC-MS/MS 法测定全血中他克莫司的浓度 [J]. 中国药物应用与监测, 2014, 11(5): 276-278.
- [8] 王春燕, 纪松岗, 陆世宇, 等. 酶放大免疫法与酶联免疫吸附法测定他克莫司血药浓度的对比研究 [J]. 中国药房, 2014, 25(30): 2816-2818.
- [9] 张丽萍, 郝钦芳, 刘元明, 等. 酶增强免疫分析法与微粒子酶联免疫吸附法检测他克莫司药物浓度的结果对比研究 [J]. 检验医学, 2011, 26(8): 501-505.
- [10] 金瑛, 蒋娟娟, 段兵, 等. 在中国心脏移植患者中高效液相色谱串联质谱法和化学发光微粒子免疫分析法测定他克莫司血药浓度的比较 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(15): 1902-1905.
- [11] Ansermot N, Fathi M, Veuthey J L, *et al.* Quantification of cyclosporine and tacrolimus in whole blood. Comparison of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry with the enzyme multiplied immunoassay technique [J]. *Clin Biochem*, 2008, 41(10/11): 910-913.
- [12] Sallustio B C, Noll B D, Morris R G. Comparison of blood sirolimus, tacrolimus and everolimus concentrations measured by LC-MS/MS, HPLC-UV and immunoassay methods [J]. *Clin Biochem*, 2010, 44(2/3): 231-236.
- [13] Han S S, Yang S H, Kim M C, *et al.* Monitoring the intracellular tacrolimus concentration in kidney transplant recipients with stable graft function [J]. *PloS One*, 2016, 11(4): e0153491.
- [14] Park J S, Cho H R, Kang M J, *et al.* A rapid and sensitive method to determine tacrolimus in rat whole blood using liquid-liquid extraction with mild temperature ultrasonication and LC-MS/MS [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(1): 73-82.
- [15] 冯艳青, 刘振红, 张杨丽, 等. 三种他克莫司测定试剂盒测定移植病人全血中他克莫司浓度的比较 [J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(8): 1993-1996.
- [16] 马嵘, 胡翠华, 刘桂芹, 等. 多元分析模板图在监测肝移植受者 FK506 治疗窗浓度中的应用 [J]. 微循环学杂志, 2010, 20(3): 41-43.
- [17] 周台玲, 张浩, 张朝锋. 两种不同试剂盒检测手段对肝移植患者他克莫司血液浓度的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(12): 192-195.
- [18] 钱文璟, 李璐, 田洁, 等. 酶放大免疫测定法和酶联免疫吸附法测定他克莫司血药浓度的比较 [J]. 中国药房, 2013, 24(26): 2424-2427.
- [19] 李想, 颜鸣, 史国兵, 等. 两种免疫法联合肾功能指标测定他克莫司血药浓度的比较 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(5): 736-741.
- [20] Martiny D, Macours P, Cotton F, *et al.* Reliability of mycophenolic acid monitoring by an enzyme multiplied immunoassay technique [J]. *Clin Lab*, 2010, 56(7/8): 345-353.
- [21] 兰顺, 叶冬梅, 莫广艳. 他克莫司血药浓度与肾病综合征的临床疗效相关性研究 [J]. 中国现代应用药理学, 2013, 30(8): 896-900.
- [22] 宋晓勇, 宋卫中, 侯彦涛, 等. 酶放大免疫测定法动态监测肾病综合征患者他克莫司血药浓度 [J]. 中国新药与临床杂志, 2014, 33(9): 694-697.
- [23] Yamaoka M, Kawamura R, Shioda Y, *et al.* Analysis of the plasma concentration of tacrolimus: a useful method for distinguishing falsely elevated tacrolimus concentrations reported by the ACMIA [J]. *Rinsho Byori*, 2010, 58(12): 1188-1192.
- [24] Saint-Marcoux F, Debord J, Parant F, *et al.* Development and evaluation of a simulation procedure to take into account various assays for the Bayesian dose adjustment of tacrolimus [J]. *Ther Drug Monit*, 2011, 33(2): 171-177.
- [25] 汪涛. 化学发光微粒子免疫法在测定他克莫司血药浓度中的作用 [J]. 检验医学与临床, 2015, 12(23): 3502-3504.
- [26] 朱静楠. 化学发光微粒子免疫法监测肝移植受者他克莫司全血浓度的系列研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [27] 刘旭华, 戚润鹏. 化学发光微粒子免疫法监测他克莫司血药浓度的临床应用评价 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(11): 1216-1218.