

论著·基础研究

湖北人群 CYP2D6 多态性的初步研究*

曾 嵘,毛晓兵,刘 湘[△],黄 婧[▲]
(湖北中医药大学检验学院,武汉 430065)

摘 要:目的 初步研究湖北人群中 CYP2D6 基因的多态性,为后续的应用研究打下基础。方法 采集 137 例志愿者静脉血,采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)法分析 CYP2D6 * 10 基因多态性,测序法验证结果,哈迪-温伯格平衡定律检测基因型分布,卡方检验进行验证,并将结果和以往文献相比较。结果 经测序验证,137 例样本中,野生型(CC)为 35 例,出现频率为 25.5%;杂合子(CT)为 52 例,出现频率为 38.0%;突变型(TT)为 50 例,出现频率为 36.5%,C 等位基因的频率为 44.5%,T 等位基因的频率为 55.5%,和以往研究结果相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 湖北人群中 CYP2D6 * 10 存在较高突变频率,在人群中开展基因分型对正确指导临床用药十分有必要。

关键词:CYP2D6 基因; 多态性; 限制性片段长度多态性聚合酶链反应
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.13.002 **中图法分类号:**R969.1
文章编号:1673-4130(2018)13-1540-04 **文献标识码:**A

Analysis of CYP2D6 gene polymorphism of Chinese population in Hubei*
ZENG Rong, MAO Xiaobing, LIU Xiang[△], HUANG Jing[▲]

(School of Laboratory Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430065, China)

Abstract: Objective To preliminary study the distribution of CYP2D6 polymorphism in Hubei population, with the intention of solid base for further applied research. **Methods** Venous blood was collected from 137 volunteers, analysed CYP2D6 * 10 Gene Polymorphism by using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. genotypes can be distinguished by agarose gel electrophoresis and gene sequencing. Hardy-Weinberg equilibrium law could be used to detect whether the genotype distribution was balanced, and chi-square test was used for verification, and the results were compared with the previous literature. **Results** Among the 137 samples, wild type (CC) was 35, the frequency was 25.5%. Heterozygote (CT) was 52, the frequency was 38.0%. And mutant (TT) was 50, the frequency was 36.5%. Also, C allele frequency was 44.5% while the T allele was 55.5%. There was no statistical difference compared with previous studies ($P>0.05$). **Conclusion** Since there is a high mutation frequency of CYP2D6 * 10 in Hubei population, it is very necessary to carry out genotyping to guide clinical medication correctly.

Key words:CYP2D6 gene; polymorphism; polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

细胞色素 P450(CYP450)超家族是一大类单加氧酶,是人体重要的 I 相药物代谢酶。CYP2D6 是 P450 酶家族中唯一不能被诱导的酶,具有低容量、高亲和力的特性,虽然仅占肝 CYP450 酶蛋白总量的 2%,但却能代谢约 25% 临床常用药物^[1],在机体对药物反应性中占据着重要的地位。CYP2D6 酶活性受遗传、环境、生理等各种因素影响,导致不同个体对相同剂量的药物的代谢能力存在差异,其中遗传因素是主要的原因。

CYP2D6 基因定位于第 22 号染色体(22q13.1)上,由 9 个外显子和 8 个内含子构成,序列全长约为 7 kb^[2]。目前已发现超过 100 种 CYP2D6 等位基因的变异(<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>),而基因多态决定了药物代谢强度的差异,并影响临床用药品种和剂量的选择^[3]。大量研究表明检测 CYP2D6 基因型可用于预测个体间对药物反应的差异,决定临床对用药品种和剂量的选择,美国食品药品监督管理局已将 CYP2D6 基因型作为药物基因组学生物标

* 基金项目:中国博士后科学基金面上项目(2014M552023);湖北省自然科学基金面上项目(2014CFB220)。
作者简介:曾嵘,女,实验师,主要从事分子生物学、生物技术、生物医学、医学方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: 2813408598@qq.com; [▲] 共同通信作者, E-mail: 95353562@qq.com。
本文引用格式:曾嵘,毛晓兵,刘湘,等. 湖北人群 CYP2D6 多态性的初步研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(13): 1540-1542.

记^[4-5]。因此,对患者进行 CYP2D6 基因突变检测的研究,对于指导临床用药,实现个体化诊疗有着重要的意义。

本文选取亚洲人群 CYP2D6 基因中最常见突变位点 100 C/T 作为研究对象,因其外显子 1 上 C188→T 的点突变引起蛋白酶第 34 位 Pro(P)变成 Ser(S),G4268→C 的碱基突变使第 486 位 Ser(S)变为 Thr(T),致使形成活性低且不稳定的代谢酶^[6]。在 CYP2D6 中,C188→T 基因型存在明显的种族差异,汉族人、蒙古人、苗族人 CYP2D6 * 10 等位基因频率分别为 0.573 5、0.456 2、0.475 0,不同样本量及不同检测方法所得到的结果有所不同,目前并没有较为一致的研究结果,本文旨在采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (PCR-RFLP) 的方法对湖北人群 CYP2D6 多态性进行检测并采用直接测序法验证结果,从而研究湖北地区人群 CYP2D6 100 C/T 基因突变频率,为实现个体化诊疗的研究提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 2017 年征集 137 例湖北志愿者,男 87 例,女 50 例,年龄 20~24 岁。经志愿者同意后,采集 137 例志愿者上肢新鲜静脉血 2 mL,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,用于提取白细胞基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 采 NaI 裂解法破碎细胞,用氯仿/异戊醇抽提法提取基因组 DNA,保存于-20.0℃。

1.2.2 PCR 反应体系的配制 根据引物设计原则,设计扩增 CYP2D6 * 10 基因片段的一对特异性引物,序列为上游引物(P1):CCA TTT GGT AGT GAG GCA GGT AT;下游引物(P2):TGG TCG AAG CAG TAT GGT GT。配制 50 μL PCR 体系为 Taq 缓冲液(不含 Mg²⁺):5 μL;MgCl₂:4 μL;Taq DNA 聚合酶(2.5 U/μL):0.8 μL;4×脱氧核糖核苷三磷酸:1 μL;P1:1 μL;P2:1 μL。加入模版后用双蒸水补足到 50 μL,并加入 20 μL 的石蜡油。进行 PCR 扩增,反应条件:94.0℃预变性 5 min;94.0℃变性 30 s,56.4℃退火 30 s,72.0℃延伸 40 s,循环 30 次;72.0℃延伸 5 min。

1.2.3 酶切反应 将 PCR 产物进行 RFLP 酶切,参照限制性内切酶 Hph I 说明书配制 20 μL 酶切体系如下:PCR 产物 10 μL;10×缓冲液 B 溶液 2 μL;无核酸酶水:7 μL;Hph I (10 U/μL) 1 μL。混合后,置 37.0℃恒温水浴箱,水浴过夜。电泳酶切产物,用凝胶成像系统判断酶切结果。

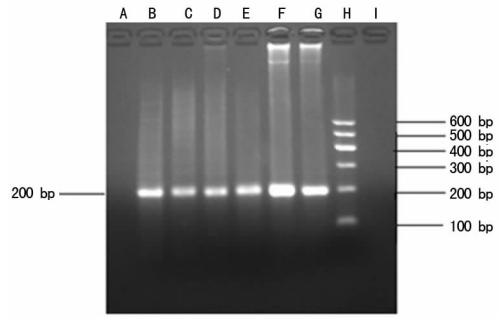
1.2.4 测序验证结果 抽取部分 PCR 产物送上海 Invitrogen 生物技术公司测序验证其 CYP2D6 * 10 基因型。

1.3 统计学处理 计算 CYP2D6 基因型(C188→T)

频率,用哈迪-温伯格平衡定律检验 CYP2D6 * 10 基因型在湖北人群中分布,并用 χ^2 检验验证其结果。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

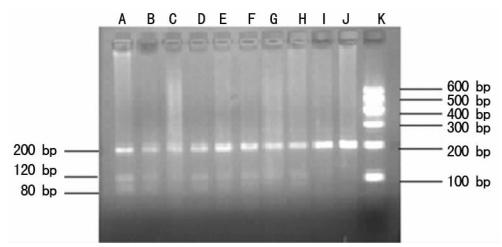
2.1 PCR 结果 PCR 产物经过电泳后,经凝胶成像系统所得,使用的标记物为 100、200、300、400、500、600 bp,扩增得到 200 bp 特异性片段,与引物理论设计长度一致,结果见图 1。



注:A~H 泳道分别代表不同志愿者 PCR 结果,I 泳道为 DNA 标记物

图 1 CYP2D6 基因片段 PCR 结果电泳图

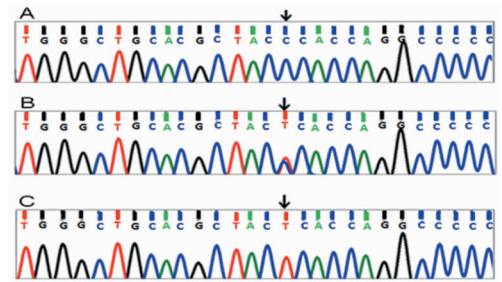
2.2 酶切结果 PCR 扩增产物为 200 bp,经限制性内切酶 Hph I 酶切后可得到 80 bp,以及 120 bp 的两个片段。若为野生型(CC),Hph I 不能将其切开,只在 200 bp 处有一条片段;若为杂合子(CT),Hph I 可以将其中一条链切开,可得到 80、120、200 bp 的 3 条片段;若是突变(TT),只有 80、120 bp 两条片段,结果见图 2。



注:K 为 DNA 标记物;杂合子(C188T):A、B、D、E、F、G、H;野生型(C188C):C、I、J

图 2 CYP2D6 基因片段 PCR 酶切结果

2.3 测序结果 测序结果显示,PCR-RFLP 方法所得结果和测序发完全一致,图 3 为测序所得到的 CYP2D6 * 10 的 3 种基因型。



注:A 为 CC 纯合子,B 为 CT 杂合子,C 为 TT 纯合子

图 3 CYP2D6 * 10 基因型测序

2.4 基因型分布 在本研究 137 例样本中检出 CC

纯合子、CT 杂合子和 TT 纯合子 3 种基因型,其基因型及等位基因频率分布见表 1,该位点的基因型频率分布符合哈迪-温伯格平衡定律($\chi^2 = 4.842, P > 0.05$),和以往文献[7]研究结果比较差异无统计学意义($P = 0.654$ 和 $0.308 > 0.05$),说明该结果和以往研究一致,所选样本具有群体代表性。

表 1 CYP2D6 * 10 SNP 基因型及等位基因频率分布				
CYP2D6 * 10	当前研究[n(%)]	以往研究[n(%)]	χ^2	P
基因型				
CC	35(25.5)	66(29.6)	0.849	0.654
CT	52(38.0)	84(37.7)		
TT	50(36.5)	73(32.7)		
等位基因				
C	122(44.5)	216(48.4)	1.039	0.308
T	152(55.5)	230(51.6)		

3 讨 论

物质的代谢需要多种酶的参与,而 CYP 是一种较为重要的酶外源性物质和内源性物质都能与其相互作用,最终转变为亲水性的化合物,对于维持机体内外环境的稳定是必不可少的^[7]。CYP 是一组含亚铁血红素的酶,存在于细胞内质网膜上,当一氧化碳与它结合后,它在 450 nm 附近有特征吸收而得名。外来物如药物、环境致癌物、化学毒物的代谢主要依靠 P450 酶系^[2]。通过检测基因型来确定代谢型并不意味着突变型(TT)就是弱代谢型,因为代谢不仅由遗传因素决定,还与环境因素有关。饮食可能也是影响 CYP2D6 的重要因素,影响 CYP2D6 活性的饮食主要是生食的蔬菜和包含多环芳香族碳氢化合物和甲基黄嘌呤的烤牛肉,饮食甚至是引起药物代谢的种族差异的原因^[8]。

CYP2D6 的检测最开始使用的是探针药物,异喹胍、右美沙芬、普萘洛尔、司巴丁等,但是由于探针药物可能会加重某些疾病,不符合伦理道德;也不能用于肝、肾功能不正常者;不同的药物之间相互作用会造成假弱代谢而产生分型偏差,探针的药物运用受到一定的限制。近年来,随着分子生物学的发展,一系列与分子相关的方法逐步运用到 CYP2D6 的分析,比如等位基因特异扩增(ASA-PCR)法、PCR-RFLP 方法、四引物聚合酶链式反应(tetra-primer PCR)法。不同的方法所得到的结果略有不同,然而目前并没有统一的方法。PCR-RFLP 是最经典的方法,ASA-PCR 是在近年来新兴的一种基因检测方法,而 tetra-primer PCR 则是其改进。本文主要采用经典的 PCR-RFLP,首先设计特异性的引物扩增出目的片段,由于不同的基因片段具有不同的酶切位点,将 PCR 产物进行酶切,可得到不同长度的片段,经过琼脂糖凝胶电泳分析,可确定基因型。此法虽然简单、方便,但需

要长时间孵育,而且 Hph I 酶比较昂贵,其应用也受到了一定的限制。

本实验 137 例湖北籍志愿者中,基因型 CC 的频率为 25.5%,基因型 CT 的频率为 38.0%,基因型为 TT 的频率为 36.5%,等位基因(C)的频率为 44.5%,等位基因(T)的频率为 55.5%。这一结果与以往研究结果^[8-10]基本一致,存在少许差异的可能性:(1)可能与各地区的区域差异有关,因为该基因多态性的分布与种群差异有关;(2)不同实验的实验样本量很有限,存在很大的偶然因素。

哈迪-温伯格平衡定律由 1908 年提出的关于群体内基因频率和基因型频率变化的规律。哈迪-温伯格平衡定律指在一个足够大群体中,第一:其交配是随机的,如果没有影响基因频率变化的因素存,那么群体基因的频率每代保持不变;第二:无论上一代的基因频率怎样,只要经过一代随机交配,常染色体上的等位基因所构成的基因型频率即可达到平衡,只要基因频率不发生变化,经过随机交配,这种平衡可保持不变^[11]。本实验可认为理论结果与实际结果是相符合的($\chi^2 = 4.842, P > 0.05$),其偏差是由随机误差造成的,可通过增加样本量的方法来减少随机误差。

与以往中国其他地区研究一样,本研究发现在湖北人群中 CYP2D6 * 10 突变频率较高,由于突变型基因型影响其酶表达的活性,进而决定了药物代谢强度的差异,影响着临床用药品种和剂量的选择检测^[12-13]。以乳腺癌内分泌治疗常用药物他莫西芬为例,CYP2D6 基因型与他莫昔芬的疗效密切相关,CYP2D6 基因突变型患者和野生型患者相比,其疾病复发风险较高,无事件生存率和无病生存率较低,且他莫昔芬的活性产物的血药浓度的变化与患者的基因型亦密切相关^[13]。为此,美国食品药品监督管理局在其用于药物标注的药物基因组学生物标记中,已将 CYP2D6 多态性作为他莫西芬的生物标注。因此,在湖北地区人群中检测患者 CYP2D6 基因型,对于指导临床用药有着重要的意义,其相关领域的研究是当前药物基因组学的热点之一。

4 结 论

本研究依据相关文献建立了一种限制性内切酶法对湖北地区人群 CYP2D6 * 10 基因型进行了检测,该法为一种经典基因分型法,简便快速,成本低,可用于人群大规模检测。同时,本研究将 CYP2D6 * 10 位点基因型及等位基因频率分布和以往研究进行了比较,发现在湖北人群中 CYP2D6 * 10 突变频率较高,为日后临床用药提供了实验室依据,也为进一步探讨不同人群 CYP2D6 基因多态性奠定了一定基础。总之,随着分子生物学的进一步发展,对 CYP2D6 的检测方法会更加多元化和简便,结果也会更加准确。CYP2D6 多态性的进一步研究能够从分子水平上揭示人们代谢的差异,用于指导临床个(下转第 1546 页)

相关细胞因子对甲状腺的损伤,值得在临床上推广运用。

参考文献

[1] ANTONELLI A, FERRARI S M, CORRADO A, et al. Autoimmune thyroid disorders[J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(2):174-180.

[2] 李玉姝, 单忠艳. 自身免疫性甲状腺疾病的诊断和治疗[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2012, 32(3):155-157.

[3] WANG W, XUE H, LI Y. Effects of selenium supplementation on spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD. H-2h4 mice[J]. *Thyroid*, 2015, 25(10):1137-1144.

[4] 李丽琴, 杨星, 冯珏. 自身免疫性甲状腺疾病与 Th1/Th2 细胞因子的关系[J]. *医学综述*, 2006, 12(19):1160-1163.

[5] 窦景云, 于俊生. 夏枯草药理作用及临床应用研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2013, 31(7):1039-1041.

[6] KHAN FA, ALJAMEIL N, KHAN M F, et al. Thyroid dysfunction: an autoimmune aspect[J]. *Inter J Clin Exp Med*, 2015, 8(5):6677-6681.

[7] 马倩倩, 于世鹏. CD4⁺ T 淋巴细胞与桥本氏甲状腺炎[J]. *济宁医学院学报*, 2015, 38(6):434-437.

[8] NANBA T, WATANABE M, INOUE N, et al. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease[J]. *Thyroid*, 2009, 19(5):495-501.

[9] PYZIK A, GRYWALSKA E, MATYJASZEK-MATUSZEK

B, et al. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far[J]. *Immunol Res*, 2015, 97(9):167-175.

[10] BASLER M, MUNDT S, BITZER A, et al. The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2015, 33(4):74-79.

[11] LIANG Y, PAN H F, YE D Q. IL-17A-producing CD8(+) T cells as therapeutic targets in autoimmunity[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(5):651-661.

[12] RAAD H, ESKALLI Z, CORVILAIN B, et al. Thyroid hydrogen peroxide production is enhanced by the Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, through increased expression of the dual oxidase 2 and its maturation factor DUOX2[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 56(3):216-225.

[13] FIGUEROA-VEGA N, ALFONSO-PEREZ M, BENEDICTO I, et al. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(2):953-962.

[14] 薛磊. 优甲乐联合夏枯草胶囊对桥本甲状腺炎患者自身抗体及 Th17 细胞的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(14):4053-4054.

[15] 黎亮, 许杰艺. 细胞因子 Th1/Th2 失衡在 AITD 发病中的作用[J]. *中国现代普通外科进展*, 2016, 19(10):801-802.

(收稿日期:2017-11-20 修回日期:2018-02-19)

(上接第 1542 页)

体化的给药,从而减少不良反应,也有利于药企针对 CYP2D6 开发新的药物,为人类的健康带来福音。

参考文献

[1] EICHELBAUM M, INGELMAN-SUNDBERG M, EVANS W E. Pharmacogenomics and individualized drug therapy[J]. *Annu Rev Med*, 2006, 57(1):119-137.

[2] ZANGER U M, RAIMUNDO S, EICHELBAUM M. Cytochrome P4502D6: Overview and update on Pharmacology, genetics, biochemistry[J]. *Naunyn-Schönberg Arch Pharmacol*, 2004, 369(1):23-37.

[3] INGELMAN-SUNDBERG M, SIM S C, GOMEZ A, et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects[J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 116(3):496-526.

[4] JIN Y, DESTA Z, STEAMS V, et al. CYP2D6 genotype antidepressant use and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(1):30-39.

[5] 徐田雪, 杨信怡, 赵昆, 等. 药物代谢酶细胞色素 P4502D6 的遗传多态性研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2009, 34(7):385-391.

[6] BENNY K, ADITHAN C. Genetic polymorphism of CYP2D6[J]. *Indian J Pharmacol*, 2001, 33(1):147-169.

[7] SISTONEN J, SAJANTILA A, LAO O, et al. CYP2D6 worldwide genetic variation shows high frequency of altered activity variants and no continental structure[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2007, 17(2):93-101.

[8] DE JONGE H, NAESSENS M, KUYPERS D R. New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid: possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation[J]. *Ther Drug Monit*, 2009, 31(4):416-435.

[9] 成碟, 徐为人, 刘昌孝. 细胞色素 P450(CYP450)遗传多态性研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(12):1409-1414.

[10] 付良青, 吴德政. 细胞色素 P4502D6 的研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2000, 16(6):453-457.

[11] 蔡卫民, 陈冰, 陶欣, 等. 细胞色素 P4502D6 酶基因多态性与右美沙芬氧化代谢相关研究[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2000, 17(3):181-184.

[12] 雷霆雯, 许庆忠, 吴宁, 等. 中国苗族 CYP2D6 * 10B 基因多态性研究[J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(4):439-440.

[13] 杨业华, 马正强, 张天真, 等. 普通遗传学[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006:307-310.

(收稿日期:2017-11-22 修回日期:2018-02-26)