

• 论 著 •

CYP2D6 * 10 基因多态性检测体系的建立与评价^{*}吴建元¹, 章柏钰¹, 蔡君龙¹, 汪再兴², 刘凤麟², 曾超², 黄建英^{1△}

1. 武汉大学中南医院临床试验中心, 湖北武汉 430071; 2. 武汉友芝友医疗科技股份有限公司, 湖北武汉 430075

摘要: 目的 建立一种快速检测 CYP2D6 * 10 基因多态性的方法。方法 基于荧光定量 PCR 平台, 采用 Taqman 探针分型技术结合扩增阻滞突变聚合酶链式反应(ARMS-PCR)技术, 建立一种适应多种类型临床样本(抗凝全血、石蜡组织切片等)的快速检测 CYP2D6 * 10 基因的方法。使用多种类型的临床样本及不同浓度的基因组 DNA, 对检测体系的准确性、灵敏度进行验证。结果 该研究建立的检测体系适用抗凝全血、石蜡包埋组织等多种类型的临床样本, 基因组 DNA 检测范围为 30~30 000 copy/μL, 检测结果不受同源基因干扰, 且与 Sanger 直接测序法检测结果一致率为 100%。结论 该研究建立的 CYP2D6 * 10 荧光定量 PCR 检测体系准确性好、灵敏度高, 具有广泛的应用价值。

关键词: CYP2D6 * 10; Taqman 探针; 荧光定量 PCR

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.14.011 **中图法分类号:** R440

文章编号: 1673-4130(2022)14-1713-08

文献标志码: A

Establishment and evaluation of CYP2D6 * 10 gene polymorphism detection system^{*}

WU Jianyuan¹, ZHANG Baiyu¹, CAI Junlong¹, WANG Zaixing²,
LIU Fenglin², ZENG Chao², HUANG Jianying^{1△}

1. Clinical Trial Center, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China;

2. Wuhan YZY Medical Science and Technology Co., Ltd., Wuhan, Hubei 430075, China

Abstract: Objective To establish a rapid detection method for CYP2D6 * 10 gene polymorphism.

Methods Based on the fluorescent quantitative PCR platform, the Taqman probe typing method combined with amplification refractory mutation system technology was used to establish a rapid assay for detection of CYP2D6 * 10 suitable for various types of clinical samples (anticoagulated whole blood, paraffin tissue sections, etc). Various types of clinical samples and different concentrations of genomic DNA were used to verify the accuracy and sensitivity of the detection system. **Results** The detection system established in this study was suitable for anticoagulated whole blood, paraffin-embedded tissue and other types of clinical samples. The range of genomic DNA detection was 30~30 000 copy/μL, and the detection results were not interfered by homologous genes, and the consistency rate with the Sanger sequencing result was 100%. **Conclusion** The established CYP2D6 * 10 fluorescent quantitative PCR detection system exhibits high accuracy and sensitivity, and has a wide range of application values.

Key words: CYP2D6 * 10; Taqman probe; fluorescent quantitative PCR

细胞色素 P-450(CYP450)属于单氧酶, 代表亚铁血红素蛋白家族, 因其在 450 nm 有特异吸收峰而得名。CYP2D 是 CYP 家族重要成员, 其基因位于 22 号染色体上, 由 CYP2D6、CYP2D7、CYP2D8 组成, 其中 CYP2D7P 和 CYP2D8P 为假基因, 仅有 CYP2D6 能够在肝脏及其他组织中表达, 编码酶活性蛋白, 发

挥代谢作用。人群中 CYP2D6 的活性呈现强代谢者、中间代谢者、弱代谢者和超强代谢者四态分布的现象。CYP2D6 在药物代谢中起重要作用。去甲替林等抗抑郁药, 奋乃静、硫利达嗪等抗精神病药物、美托洛尔等抗心律失常药物主要由 CYP2D6 代谢, CYP2D6 活性会影响其血药浓度, 进而影响其疗效及

* 基金项目: 湖北省卫生健康委员会科研项目面上项目(WJ2021M169); 武汉大学中南医院 2021 年度医学科技创新平台支撑项目(leyf202107)。

作者简介: 吴建元, 男, 副主任药师, 主要从事药物医疗器械临床评价方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: znyylcsy@126.com。

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220627.1535.002.html>(2022-06-28)

不良反应^[1-2]。此外, CYP2D6 多态性与三环类抗抑郁药、选择性血清素再摄取抑制剂、昂丹司琼和托烷司琼等药物用药的关联已经有相关临床药物基因组学实施联盟(CPIC)指南^[3-6]。与其他大部分 CYP 同工酶不同,CYP2D6 对于酶诱导效应并不敏感。不同基因型对酶活性和药物代谢的影响不一。中国人群中 CYP2D6 最常见的导致酶活性降低的等位基因为 CYP2D6 * 10(C188T), 等位基因频率为 53%^[7]。

因此,临幊上需要快速准确的手段对 CYP2D6 进行分型检测,尤其是在中国人群分布广泛的 CYP2D6 * 10 基因型。由于 CYP2D6、CYP2D7、CYP2D8 高度同源,如 CYP2D6 和 CYP2D7 同源性超过 95%,极易干扰 CYP2D6 基因的检测结果。核酸检测时应重点排除 CYP2D7 和 CYP2D8 的影响。目前国内外针对 CYP2D6 分型,多采用 Sanger 直接测序法、PCR 高分辨率溶解曲线法等,这些方法均存在着一定的局限性,如需要特殊仪器、操作复杂等。本研究以当前临幊实验室普遍采用的荧光定量 PCR 平台,采用 Taqman 探针分型技术结合扩增阻滞突变聚合酶链式反应(ARMS-PCR)技术,建立一种适用多种类型临幊样本(抗凝全血、石蜡组织切片等)的快速检测 CYP2D6 * 10 基因的方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝全血、枸橼酸钠抗凝全血、石蜡组织切片,每种样本类型 CYP2D6 * 10 3 种基因型(C/C 野生型, T/T 纯合突变型, C/T 杂合突变型)各 20 例。本研究经武汉大学中南医院医学伦理委员会批准,伦理批件号为科伦[2021083],研究样本的收集与使用均在伦理委员会监督下进行。

1.2 仪器与试剂 ABI7500 荧光定量 PCR 系统;德国 QIAGEN GmbH 公司的 QIAamp DNA Blood Mini Kit(货号 51104)或武汉友芝友医疗科技股份有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒(货号 YZYMT-028)用于提取全血样本、德国 QIAGEN GmbH 公司的 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(货号 56404)或武汉友芝友医疗科技股份有限公司的核酸提取试剂盒(货号 YZYMT-029)用于提取石蜡组织样本;TaKaRa TaqTM HS PCR Kit-UNG plus(TaKaRa, 货号 R013A);引物及探针由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 样本类型选择与提取试剂盒测试 在进行核酸检测前,需要对样本中的核酸进行提取/纯化。该步骤可最大量分离出目的核酸外,还可对核酸进行纯化,尽可能去除血液或组织中会对后续 PCR 检测产

生抑制作用的血红素、蛋白质和脂类物质等。核酸提取的质量,直接影响后续的检测体系的性能。

与 CYP2D6 活性相关的药物极多,用途也很广泛,检测 CYP2D6 * 10 的体系需要可以兼容尽可能多的临幊样本类型。从易于获取、以便于保藏、减轻患者痛苦等方面考虑,选择抗凝全血和石蜡包埋组织作为样本。临幊常见的抗凝剂中,肝素会抑制 Taq 酶的活性,所以选用 EDTA 或枸橼酸(ACD)盐抗凝全血作为全血样本。

随机选取 EDTA 和枸橼酸钠抗凝全血各 5 例,使用德国 QIAGEN GmbH 公司的 QIAamp DNA Blood Mini Kit(货号 51104)和武汉友芝友医疗科技股份有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒(货号 YZYMT-028)两种血液基因组 DNA 提取试剂盒,对同一样本都提取 200 μL 全血 1 次,使用相同的 100 μL 体积洗脱 1 次,使用 NanoDrop One 检测提取的基因组 DNA 的浓度及纯度,比较两种提取试剂盒的提取效能。

随机选取 5 例石蜡包埋组织,使用德国 QIAGEN GmbH 公司的 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(货号 56404)或武汉友芝友医疗科技股份有限公司的核酸提取试剂盒(磁珠法,货号 YZYMT-029)两种石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒,对同一样本使用相同数量的组织切片进行 DNA 提取,使用相同的 100 μL 体积洗脱 1 次,使用 NanoDrop One 检测提取的基因组 DNA 的浓度及纯度,比较两种提取试剂盒的提取效能。

1.3.2 引物探针设计与扩增体系建立 CYP2D6 * 10 的代表单核苷酸多态性(SNP)-rs1065852(C188T)为检测靶标,设计特异性扩增包含该位点的引物,为了覆盖周围序列存在的 SNP,同时利用扩增阻滞突变聚合酶链式反应(ARMS-PCR)技术特异性区分 CYP2D7 序列,设计 2 条不同的下游引物用于含有周围不同 SNP 的序列的扩增。正向引物:5'-CCTGAT-GCACCGGCG-3';反向引物 1:5'-TGGTCCAGCCT-GTGGTTT-3';反向引物 2:5'-GCAGGGGGCCTGG-TA-3'。设计覆盖识别的 SNP 位点,分别对应不同基因型的探针,野生型探针 WP:5'-FAM-CACGCTA-ACCACCAAG-MGB-3';突变型探针:5'-VIC-CTGGT-GAGTAGCGT-MGB-3'。

为了监测荧光定量 PCR 反应是否顺利进行、体系中是否添加了正常的 DNA 样本、提取的样本是否含有抑制 PCR 反应的物质,设计了针对人看家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的特异性内标引物及探针,用于监控 PCR 反应的进行。内标上游引物:5'-GGCCACTAGGCGCTCA-3';内标下游引物:5'-GC-

CACCCGCGAACTCA-3'; 内标探针: ROX-5'-CTC-CCTCCGCGCAGCCG-3'-BHQ2。

配制并优化 CYP2D6 * 10 荧光 PCR 检测体系, 优化体系内的引物和探针浓度, 使体系检测杂合型时两个通道的信号及循环数阈值(Ct 值)接近, 使体系对野生型模板和突变型模板的检测能力相近。建立体系为总体积 25 μL , 含 1 \times 浓度的含尿嘧啶糖基化酶的 PCR 缓冲液 (PCR Buffer for UNG plus), 2.25 mmol/L Mg^{2+} , 内含 0.6 mmol/L 的脱氧尿苷三磷酸 (dUTP) 和 0.2 mmol/L 的脱氧腺苷三磷酸 (dATP)、脱氧鸟苷三磷酸 (dGTP) 和脱氧胞苷三磷酸 (dCTP) 的脱氧核糖核苷三磷酸混合液 (dU plus dNTP Mixture), 0.625 U TaKaRa Taq HS, 0.5 U 尿嘧啶-N-糖基化酶, 400 nmol/L 引物 F、R1 和 R2; 200 nmol/L 探针 WP 和 MP; 200 nmol/L 内标上游和下游引物; 100 nmol/L 内标探针, 0.2~200.0 ng 血液或石蜡组织提取的基因组 DNA。

测试退火温度、退火时间、循环数等反应条件, 优化的反应条件: 37 $^{\circ}\text{C}$, 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 40 个循环, 于 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火步骤末采集 FAM、VIC 和 ROX 通道荧光信号。

1.3.3 性能评价 为了验证 CYP2D6 * 10 基因多态性检测体系是否受同源序列干扰, 将检测的序列放入美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库进行 blast 数据库比对, 将同源序列与内标序列共同构建到 pUC57 质粒之中构成 CYP2D7 质粒, 用于验证检测体系的特异性。选取已知 CYP2D6 * 10 基因纯合野生、纯合突变和杂合突变基因型的 EDTA 抗凝全血、枸橼酸钠抗凝全血和石蜡组织各 20 例样本, 采用本研究建立的方法进行检测, 确定样本适用类型。分别选取已知 CYP2D6 * 10 基因纯合野生、纯合突变和杂合突变基因型的浓度为 100 ng/ μL 的基因组 DNA, 配制 100.0、60.0、30.0、10.0、5.0、0.5 和 0.1 ng/ μL 的浓度梯度, 然后采用本研究建立的方法进行检测, 以评价本方法的灵敏度。选取抗凝全血和石蜡组织切片, 每种样本类型 CYP2D6 * 10 3 种基因型 (野生、杂合突变、纯合突变) 已知样本各 20 例, 采用本研究建立的方法进行检测, 与直接测序确定基因型进行比较, 评价本方法的准确性。

2 结 果

2.1 样本提取试剂盒的选择 德国 QIAGEN GmbH 公司的 QIAamp DNA Blood Mini Kit 和武汉友芝友医疗科技股份有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒对 EDTA 和枸橼酸钠抗凝全血样本的提取的基因组 DNA 的质量比对结果见表 1 样本序号 1~10 所示。

从提取的 DNA 的纯度及浓度测定结果来看, 二者都可以提取出 EDTA 和枸橼酸钠抗凝全血中的基因组 DNA。同样的 200 μL 全血, 同样的 100 μL 体积洗脱, 两种试剂盒提取基因组 DNA 浓度虽有差别, 但都在 30 ng/ μL 以上; 武汉友芝友医疗科技股份有限公司的血液基因组 DNA 提取试剂盒提取的基因组 DNA 的纯度稍好于德国 QIAGEN GmbH 公司的 QIAamp DNA Blood Mini Kit, 但都可以用于后续检测。

对于石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒的选择, 本研究选用德国 QIAGEN GmbH 公司的 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 和武汉友芝友医疗科技股份有限公司的核酸提取试剂盒两种常见的石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒进行提取效果对比。随机选取石蜡包埋组织各 5 例, 使用两种试剂盒, 按照各自的试剂盒说明书, 对同一样本都取 10 μm 切片 3 片并提取 1 次, 均使用 100 μL 体积洗脱, 使用 NanoDrop One 检测提取的基因组 DNA 的浓度, 比较两种试剂盒的提取效能, 结果见表 1 样本序号 11~15 所示, 并且从提取的 DNA 的浓度测定结果来看, 二者提取相同的石蜡组织获得的基因组 DNA 量比较相近, 都可以用于后续检测。

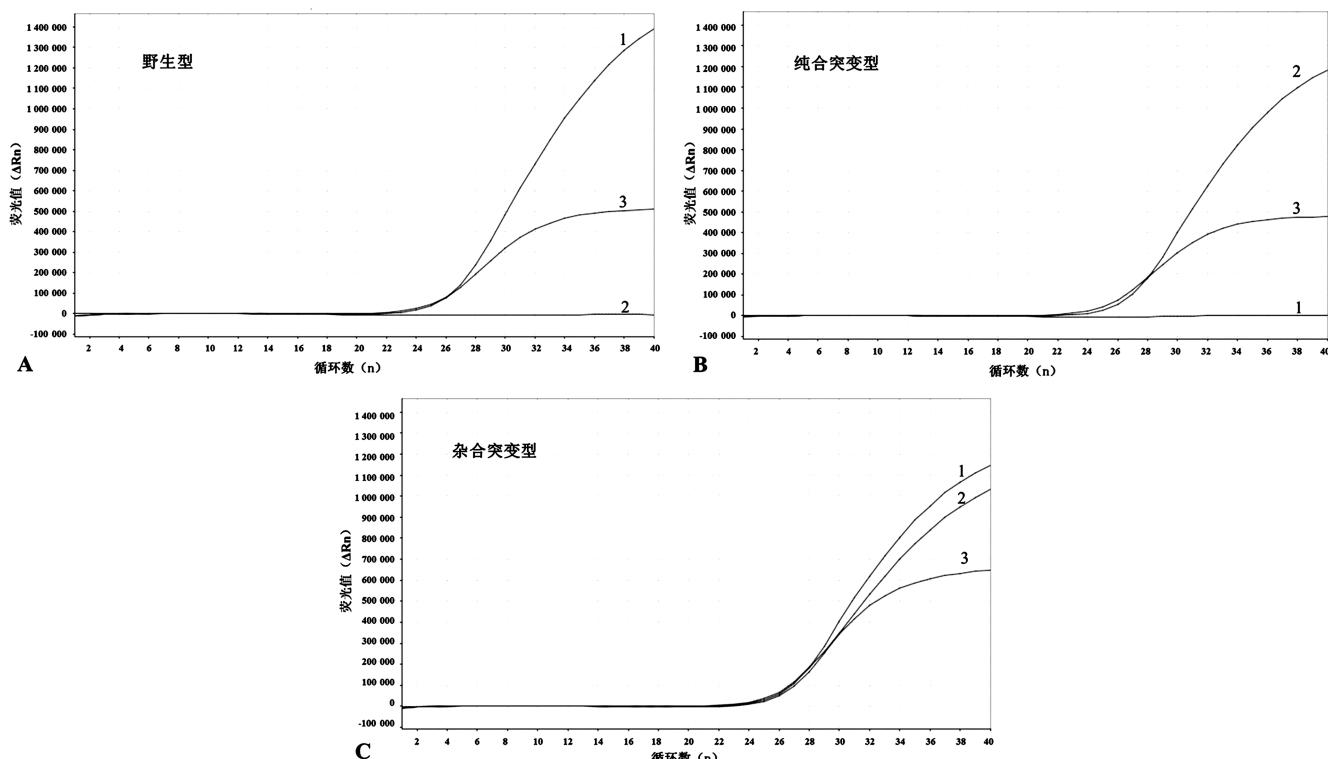
2.2 CYP2D6 * 10 荧光 PCR 检测体系的建立 本研究建立的 CYP2D6 * 10 基因荧光 PCR 检测体系, 经过对体系内引物、探针浓度的优化之后, 检测 CYP2D6 * 10 野生型 FAM 通道有 S 型扩增曲线, VIC 通道扩增信号出现; 检测 CYP2D6 * 10 纯合突变型 VIC 通道有 S 型扩增曲线, FAM 通道扩增信号出现; 检测 CYP2D6 * 10 杂合突变型 FAM 通道和 VIC 通道均有 S 型扩增曲线, 可有效区分不同基因型。检测不同基因型样本, 内标 ROX 通道均有 S 型扩增曲线, 可有效指示 PCR 反应的进行, 见图 1、表 2。

表 1 DNA 提取试剂盒提取质量对比

样本序号	样本类型	德国 QIAGEN GmbH 公司		武汉友芝友医疗科技股份有限公司	
		DNA 浓度 (ng/ μL)	DNA 纯度 ($\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$)	DNA 浓度 (ng/ μL)	DNA 纯度 ($\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$)
1	EDTA 抗凝全血	38.27	1.81	39.52	1.86
2	EDTA 抗凝全血	60.17	1.67	49.19	1.85

续表 1 DNA 提取试剂盒提取质量对比

样本序号	样本类型	德国 QIAGEN GmbH 公司		武汉友芝友医疗科技股份有限公司	
		DNA 浓度(ng/μL)	DNA 纯度(A_{260}/A_{280})	DNA 浓度(ng/μL)	DNA 纯度(A_{260}/A_{280})
3	EDTA 抗凝全血	82.38	1.69	38.48	1.86
4	EDTA 抗凝全血	68.82	1.73	39.46	1.86
5	EDTA 抗凝全血	30.42	1.80	39.84	1.81
6	枸橼酸钠抗凝全血	38.43	1.81	59.71	1.84
7	枸橼酸钠抗凝全血	44.67	1.73	79.47	1.87
8	枸橼酸钠抗凝全血	35.16	1.81	37.86	1.91
9	枸橼酸钠抗凝全血	32.13	1.76	47.39	1.92
10	枸橼酸钠抗凝全血	33.18	1.78	32.04	1.88
11	石蜡包埋组织	110.2	1.89	120.1	1.86
12	石蜡包埋组织	205.3	1.91	198.2	1.82
13	石蜡包埋组织	120.4	1.92	140.5	1.88
14	石蜡包埋组织	113.6	1.86	122.7	1.81
15	石蜡包埋组织	98.7	1.84	100.8	1.90



注: A 为 CYP2D6 * 10 野生型模板扩增结果, B 为 CYP2D6 * 10 纯合突变型模板扩增结果, C 为 CYP2D6 * 10 杂合突变型模板扩增结果; 1 为 FAM 通道, 2 为 VIC 通道, 3 为 ROX 通道。

图 1 不同 CYP2D6 * 10 基因型的检测扩增曲线

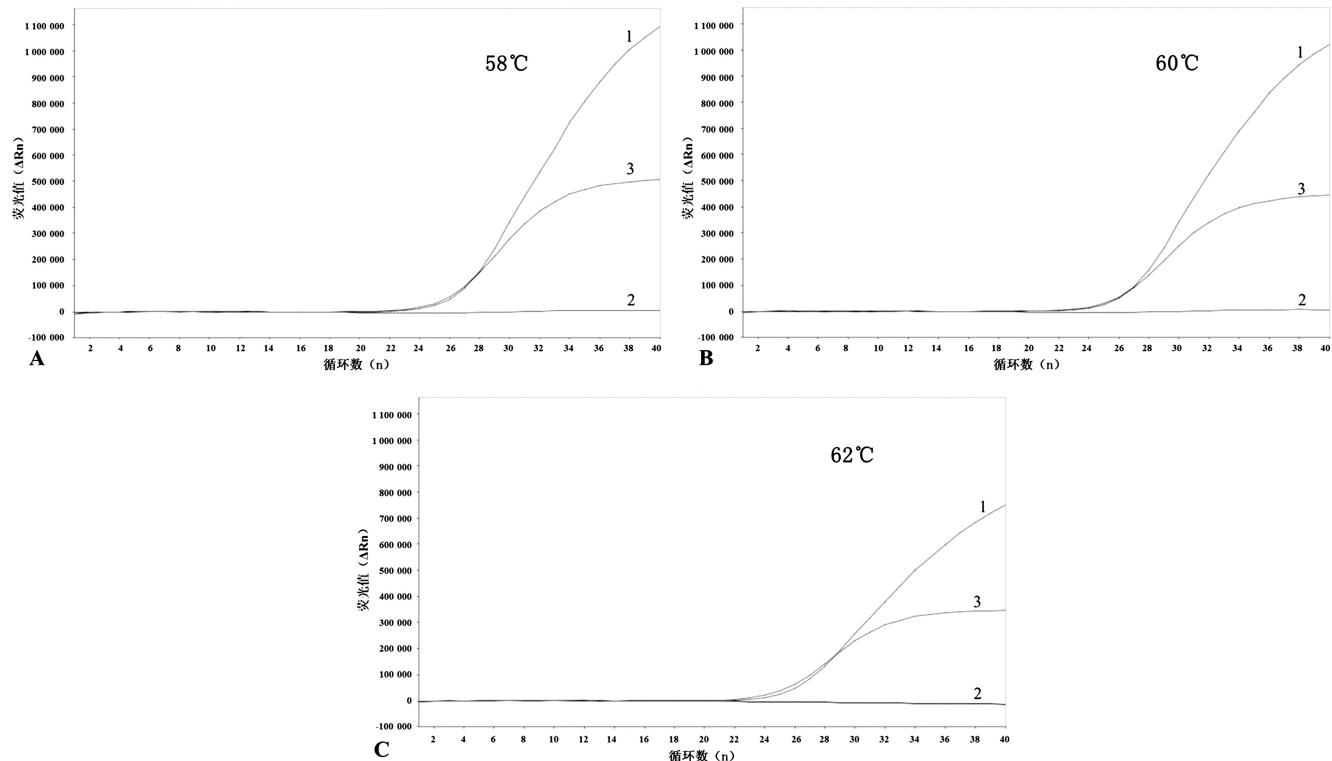
从图 1 及表 2 显示的结果来看,设计的引物和探针对 3 种不同基因型(野生型、纯合突变型、杂合突变型)有识别能力,这一检测体系可以作为初始体系,并对该检测体系的扩增程序进行了优化,分别对退火温度、延伸时间和循环数进行测试。见图 2~4。

体系随着退火温度升高,体系特异性提高,但是目标信号值下降,S 型曲线拐点滞后,说明扩增效率随之降低。60 °C 退火的特异性优于 58 °C,扩增效率优

于 62 °C,因此优选退火温度为 60 °C; 延伸时间为 45 s 时,体系扩增曲线拐点不明显,且扩增信号值较低; 延伸时间为 60 s 和 70 s 时,扩增曲线无明显差异,考虑扩增时间,延伸时间选择 60 s; 循环数为 35 个循环时,体系扩增信号值太低,S 型不明显; 循环数为 45 个循环时,程序运行时间延长; 循环数为 40 个循环时信号值优于循环数为 35 个循环时的信号值,并且与循环数为 45 个循环时的信号值无明显差异,可以满足

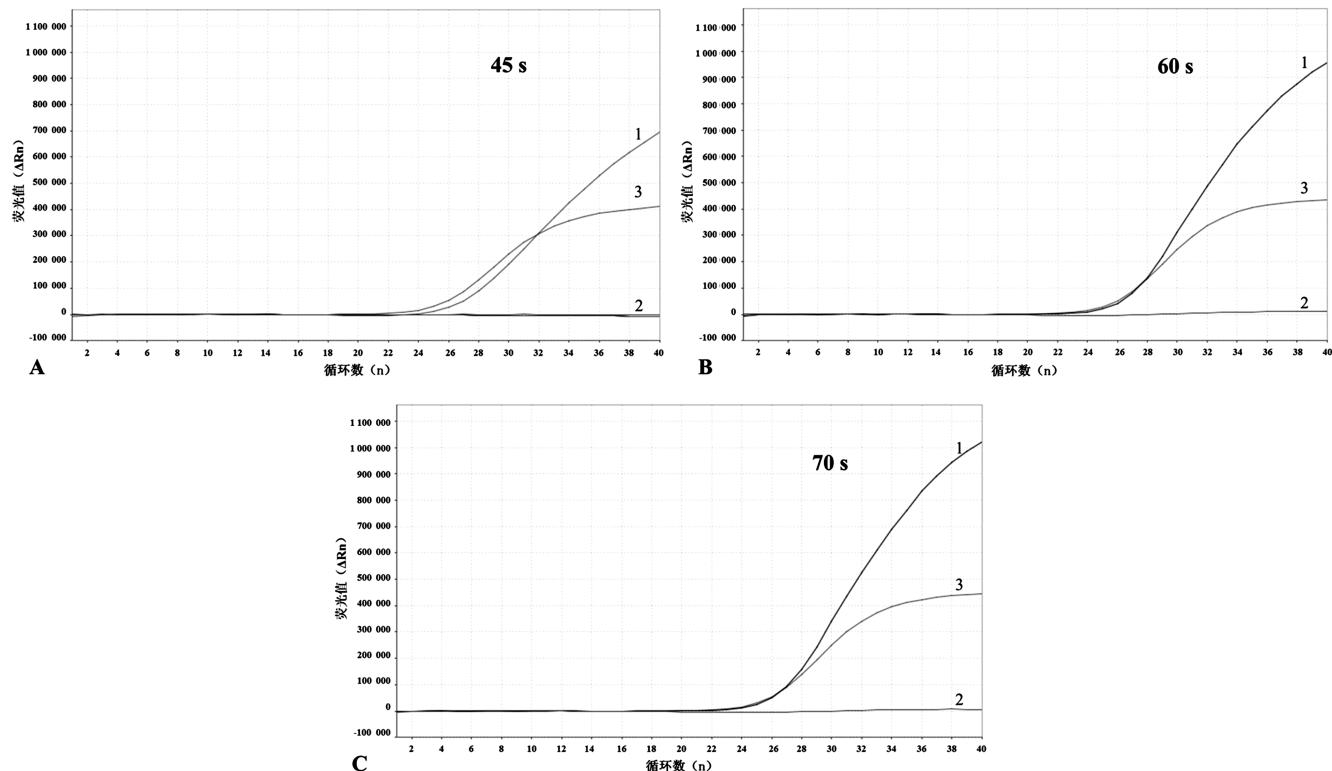
需求,因此选择循环数为 40 个循环进行 PCR 扩增。优化后的扩增程序:37 °C,10 min,95 °C,5 min;95

°C,15 s,60 °C,1 min,40 个循环,于 60 °C 退火步骤采集 FAM、VIC 和 ROX 通道荧光信号。



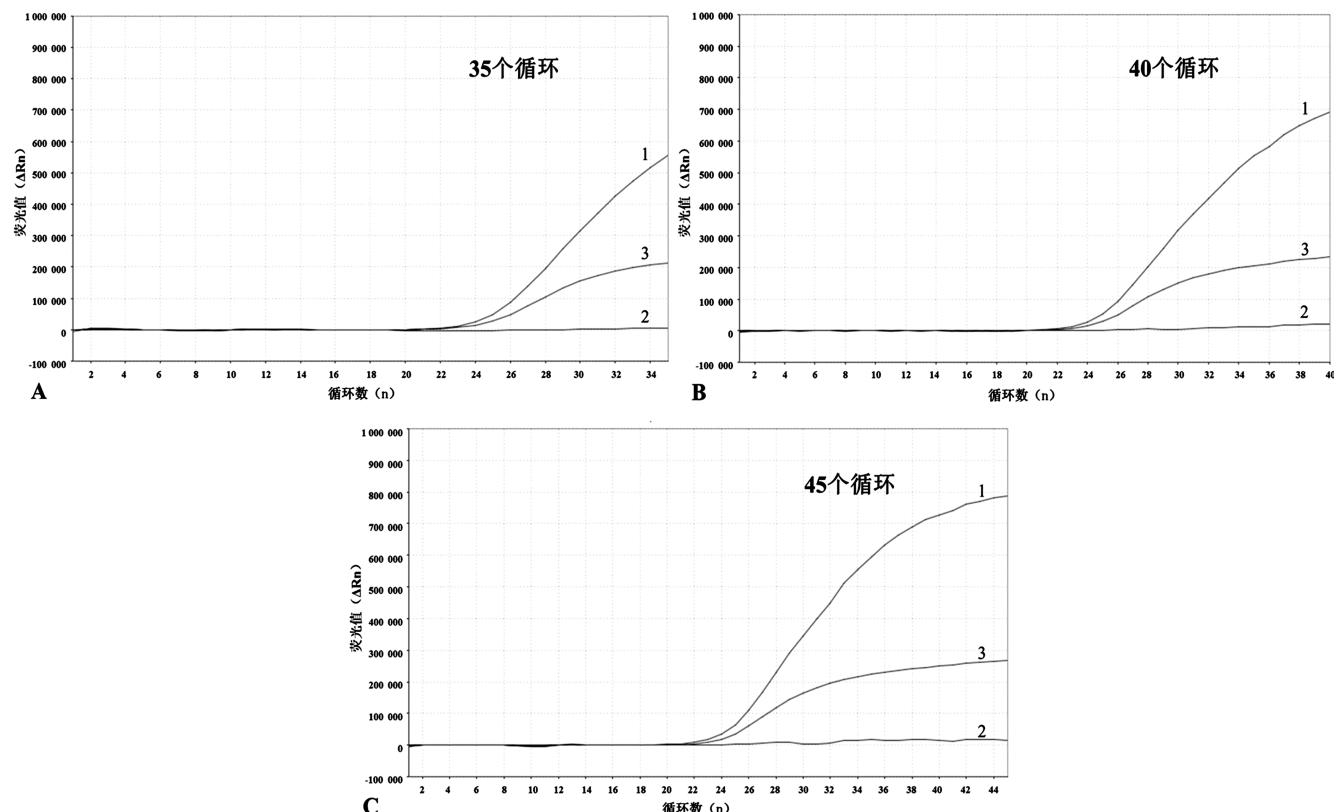
注: A 为 CYP2D6 * 10 野生型模板 58 °C 退火扩增结果, B 为 CYP2D6 * 10 野生型模板 60 °C 退火扩增结果, C 为 CYP2D6 * 10 野生型模板 62 °C 退火扩增结果; 1 为 FAM 通道, 2 为 VIC 通道, 3 为 ROX 通道。

图 2 退火温度对比



注: A 为 CYP2D6 * 10 野生型模板退火 45 s 扩增结果, B 为 CYP2D6 * 10 野生型模板退火 60 s 扩增结果, C 为 CYP2D6 * 10 野生型模板退火 70 s 扩增结果; 1 为 FAM 通道, 2 为 VIC 通道, 3 为 ROX 通道。

图 3 延伸时间对比



注: A 为 CYP2D6 * 10 野生型模板扩增 35 个循环的结果, B 为 CYP2D6 * 10 野生型模板扩增 40 个循环的结果, C 为 CYP2D6 * 10 野生型模板扩增 45 个循环的结果; 1 为 FAM 通道, 2 为 VIC 通道, 3 为 ROX 通道。

图 4 扩增循环数对比

表 2 不同 CYP2D6 * 10 基因型的检测 Ct 值

CYP2D6 * 10 基因型	Ct FAM 值	Ct VIC 值	Ct ROX 值
野生型	27.66	—	27.98
纯合突变型	—	27.58	28.01
杂合突变型	28.51	28.49	27.96

注: 模板浓度为 5 000 copy/μL; — 表示无数据。

2.3 CYP2D6 * 10 荧光定量 PCR 检测体系性能验证 对 CYP2D6 * 10 基因多态性检测体系所要检测的序列的同源序列进行系统分析, 将其序列放入 NCBI 数据库进行 blast 数据库比对。显示 CYP2D7 基因与 CYP2D6 * 10 基因野生型有 94% 的一致率。这表明检测体系的扩增区域与 CYP2D7 基因同源性极高, 有一定的非特异性扩增的风险。将选定的 CYP2D7 序列及内标序列共同构建到 pUC57 质粒之中, 获得 CYP2D7 质粒, 使用 CYP2D6 * 10 荧光 PCR 检测体系, 分别检测 30 000、20 000、10 000、600、150 和 30 copy/μL 的 CYP2D7 质粒, 见表 3。

由表 3 检测结果可知, 检测体系扩增最可能产生干扰的 CYP2D7 同源基因, FAM 和 VIC 通道均无扩增, 说明检测体系可以很好的区分同源序列, 特异性能符合要求。本研究建立的方法进行检测, 其检测结果与 Sanger 直接测序法结果符合率为 100%, 见表 4,

而且由表 4 检测结果可知, 本研究建立的 CYP2D6 * 10 检测体系可以对 EDTA 抗凝全血、枸橼酸钠抗凝全血和石蜡包埋组织的 CYP2D6 * 10 基因多态性进行准确的检测。

检测浓度分别为 30 000、18 000、9 000、4 500、1 500、150 和 30 copy/μL 的 CYP2D6 * 10 基因型为野生型、纯合突变型和杂合突变型的基因组 DNA, 检测 20 次, 见表 5, 而且由表 5 结果可见, 本研究建立的 CYP2D6 * 10 基因荧光 PCR 检测体系都可以 100% 准确检出 CYP2D6 * 10 基因不同的基因型, 灵敏度较高。

表 3 CYP2D7 质粒检测结果

模板浓度 (copy/μL)	检测次数 (n)	Ct FAM 值	Ct VIC 值	Ct ROX 值
30 000	3	—	—	22.99
20 000	3	—	—	23.20
10 000	3	—	—	24.38
600	3	—	—	29.08
150	3	—	—	31.27
30	3	—	—	33.73

注: — 表示无数据。

表 4 本方法与 Sanger 直接测序法结果一致性比较

样本类型	Sanger 直接测序法		本方法		一致率(%)
	CYP2D6 * 10 基因型	n	CYP2D6 * 10 基因型	n	
EDTA 抗凝全血	C/C 野生型	20	C/C 野生型	20	100
	T/T 纯合突变型	20	T/T 纯合突变型	20	100
	C/T 杂合突变型	20	C/T 杂合突变型	20	100
枸橼酸钠抗凝全血	C/C 野生型	20	C/C 野生型	20	100
	T/T 纯合突变型	20	T/T 纯合突变型	20	100
	C/T 杂合突变型	20	C/T 杂合突变型	20	100
石蜡组织	C/C 野生型	20	C/C 野生型	20	100
	T/T 纯合突变型	20	T/T 纯合突变型	20	100
	C/T 杂合突变型	20	C/T 杂合突变型	20	100

表 5 灵敏性检测结果

CYP2D6 * 10 基因型	模板浓度(copy/μL)	准确检测次数(n)	Ct FAM 值	Ct VIC 值	Ct ROX 值	准确检出率(%)
野生型	30 000	20	24.22	—	24.66	100
	18 000	20	25.39	—	25.85	100
	9 000	20	26.23	—	26.63	100
	4 500	20	27.06	—	27.47	100
	1 500	20	28.27	—	28.94	100
	150	20	31.39	—	32.01	100
	30	20	33.29	—	33.98	100
纯合突变型	30 000	20	—	24.45	24.83	100
	18 000	20	—	25.24	25.25	100
	9 000	20	—	26.05	26.61	100
	4 500	20	—	26.98	27.52	100
	1 500	20	—	28.05	28.91	100
	150	20	—	30.96	31.64	100
	30	20	—	32.90	33.63	100
杂合突变型	30 000	20	24.54	24.49	24.68	100
	18 000	20	25.00	25.15	25.20	100
	9 000	20	26.36	26.03	26.33	100
	4 500	20	27.16	27.23	27.27	100
	1 500	20	28.66	28.76	28.81	100
	150	20	31.12	31.26	31.41	100
	30	20	33.31	33.49	33.63	100

注:—表示无数据。

3 讨 论

CYP2D6 在药物代谢中起重要作用。CYP2D6 基因多态性会影响其酶活性,造成药物血药浓度波动,进而影响其疗效及不良反应^[8-9]。

他莫昔芬(TAM)属于三苯乙烯非甾体类抗雌激素受体拮抗剂,通过与雌激素竞争结合雌激素受体,从而抑制乳腺癌细胞的增殖,广泛应用于雌激素受体阳性乳腺癌的治疗。国内外的大量研究证实,

CYP2D6 的基因多态性,尤其是 CYP2D6 * 10 基因多态性,与乳腺癌患者服用 TAM 的疗效密切相关^[10-12]。CPIC、荷兰药物遗传学工作组(DPWG)、加拿大药物基因组学药物安全网络(CPNDS)临床推荐小组,都建议根据 CYP2D6 代谢强弱指导 TAM 的用药^[13-15]。2015 年国家卫生和计划生育委员会医政医管局发布的《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)》中指出携带“CYP2D6 * 10 等位基因

的患者他莫昔芬的疗效欠佳”^[7]。CYP2D6 基因多态性对其他大量药物的其疗效及不良反应也有重要的影响。如精神类药物去甲替林、帕罗西汀,抗心律失常药物美托洛尔、美西律等。

开展中国人群的 CYP2D6 * 10 基因多态性检测可以预测 CYP2D6 酶活性,能为相关药物使用提供指导。目前国内外针对 CYP2D6 分型,一般采用 Sanger 直接测序法。该方法需要对测序样品扩增、纯化、序列分析,过程比较繁琐、耗时长,且对取材和技术要求比较高,在临床应用中有一定的局限性。另一种常用方法是高分辨率溶解曲线法,该方法对设备要求较高,要求设备温度控制及均一性达到较高水平,且对待分析 DNA 样本的浓度及纯度有较高的要求,此外,该方法设备运行时间长,结果分析复杂。

荧光定量 PCR 技术操作简单、设备要求较低、设备运行时间短,通量大,已经成为临床常用的检测方法。本研究基于荧光定量 PCR 技术平台,采用 Taqman 探针分型技术结合扩增阻滞突变聚合酶链式反应(ARMS-PCR)技术,建立了一种适用多种类型临床样本(抗凝全血、石蜡组织切片等)的快速检测 CYP2D6 * 10 基因的方法。该方法适用样本类型多,检测的灵敏度高、准确性好,将极大促进 CYP 的科学及临床研究。

参考文献

[1] 杨军,王爽,董天崴,等. CYP2D6 * 10 基因多态性与美托洛尔治疗高血压疗效的关系[J]. 心血管康复医学杂志, 2014, 23(2):155-159.

[2] RAU T, WUTTKE H, MICHELS L M, et al. Impact of the CYP2D6 genotype on the clinical effects of metoprolol: a prospective longitudinal study[J]. Clin Pharmacol Ther, 2009, 85(3):269-272.

[3] 冯颖青,李勇,张宇清. β 受体阻滞剂在高血压应用中的专家指导建议[J/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2013, 5(4):29-39.

[4] HICKS J K, SANGKUHL K, SWEN J J, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline (CPIC) for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants: 2016 update[J]. Clin Pharmacol Ther, 2017, 102(1):37-44.

[5] HICKS J K, BISHOP J R, SANGKUHL K, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and do-

sing of selective serotonin reuptake inhibitors [J]. Clin Pharmacol Ther, 2015, 98(2):127-134.

[6] BELL G C, CAUDLE K E, WHIRL-CARRILLO M, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guideline for CYP2D6 genotype and use of ondansetron and tropisetron [J]. Clin Pharmacol Ther, 2017, 102(2):213-218.

[7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)概要[J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2015, 3(5):257-267.

[8] WERNER S, STEFAN W, THOMAS M, et al. Improved prediction of endoxifen metabolism by CYP2D6 genotype in breast cancer patients treated with tamoxifen[J]. Frontiers Pharmacol, 2017, 8(1):582.

[9] BAI Y, WU H W, ZHANG Y H. Effects of CYP2D6 * 10 polymorphism on tamoxifen pharmacokinetics in patients with breast cancer in Asia: a meta-analysis[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2019, 83(1):71-79.

[10] LAN B, MA F, ZHAI X Y, et al. The relationship between the CYP2D6 polymorphisms and tamoxifen efficacy in adjuvant endocrine therapy of breast cancer patients in Chinese Han population[J]. Int J Cancer, 2018, 143(1):184-189.

[11] HE W, GRASSMANN F, ERIKSSON M, et al. CYP2D6 genotype predicts tamoxifen discontinuation and prognosis in patients with breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2020, 38(6):548-557.

[12] 田方圆,陈昭燕,徐斑. 亚洲人群 CYP2D6 * 10 基因多态性与乳腺癌患者他莫昔芬治疗效果的 Meta 分析[J]. 中南药学, 2018, 16(10):129-133.

[13] GOETZ M P, SANGKUHL K, GUCHELAAR H J, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy [J]. Clin Pharmacol Ther, 2018, 103(5):770-777.

[14] SWEN J J, NIJENHUIS M, BOER A D, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte—an update of guidelines[J]. Clin Pharmacol Ther, 2011, 89(5):662-673.

[15] DRÖGEMÖLLER B I, WRIGHT G E B, SHIH J, et al. CYP2D6 as a treatment decision aid for ER-positive non-metastatic breast cancer patients: a systematic review with accompanying clinical practice guidelines[J]. Breast Cancer Res Treat, 2019, 173(3):521-532.

(收稿日期:2021-10-15 修回日期:2022-06-23)