

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000152

中国汉族人群 CYP2D6、CYP3A4 SNP 位点基因多态性分析

杨 栋¹, 万立华¹, 涂 政², 石 屹², 胡 兰²

(1. 重庆医科大学基础医学院法医系, 重庆 400016; 2. 公安部物证鉴定中心法医遗传学重点实验室, 北京 100038)

【摘要】目的:通过对药物代谢酶 CYP2D6 和 CYP3A4 的相关单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)筛选检测, 获得其在中国汉族人群中遗传多态性分布的相关数据。**方法:**筛选 11 个关于 CYP2D6、CYP3A4 基因的 SNP 位点, 取 192 份中国汉族无关个体健康自愿者的血液样本获得基因组 DNA, 根据单碱基延伸技术通过 GenomeLab™ SNPstream® 基因分型系统进行 SNP 分型。**结果:**本次检测的 11 个 SNP 位点在研究人群中全部具有多态性(最小等位基因频率>0.01), 其中 7 个 SNP (RS28624811、RS28670611、RS9623531、RS5758589、RS3735451、RS2246709、RS2404955、RS4646440)位点的等位基因频率在此人群与白种人相比差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论:**汉族人群可能有继承特定的遗传信息, 导致与其他人群具有不同药物代谢率。

【关键词】单核苷酸多态性; CYP2D6; CYP3A4; 内含子

【中图分类号】R89

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-24

Analysis of SNP genetic polymorphism in CYP3A4 and CYP2D6
in Chinese Han populationYang Dong¹, Wan Lihua¹, Tu Zheng², Shi Yi², Hu Lan²

(1. Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University;

2. Institute of Forensic Science, Key Laboratory of Forensic Genetics, Ministry of Public Security)

【Abstract】Objective: To get the data of genetic polymorphism in the Chinese Han population through screening and detecting drug-metabolizing enzyme CYP2D6 and CYP3A4 single nucleotide polymorphism (SNP). **Methods:** Eleven SNP in these 2 CYP genes were screened out. Genomic DNA was prepared from 192 blood samples obtained from individuals of Chinese Han origin. Polymorphism was analyzed by allele-specific primer extension followed by GenomeLab™ SNPstream® analysis system. **Results:** All 11 analyzed SNP were polymorphic (MAF>0.01). Of these 11 SNP, 7 (RS28624811, RS28670611, RS9623531, RS5758589, RS3735451, RS2246709, RS2404955, RS4646440) had an allele frequency, which was different between Chinese Han population and Caucasians ($P<0.01$). **Conclusions:** These data suggest that different ethnic groups might inherit specific genetic information that could lead to different drug metabolism rates.

【Key words】single nucleotide polymorphism; CYP2D6; CYP3A4; intron

当前在法医学鉴定领域药物相关的死亡原因界定是一大难题。除去环境因素、生理因素、药物联合应用相关的因素, 遗传多态性是导致药物代谢酶在个体之间存在酶活性差异的最关键因素^[1-2]。细胞色素 P450 酶 (cytochrome P450 protein, CYP) 作为药物代谢中最主要的酶, 又称混合功能氧化酶或单加氧酶, 它们主要存在于肝微粒体中, 在外源性化

合物(包括药物和毒物)和内源性物质的生物转化中起十分重要的作用^[3]。CYP 酶的活性决定药物的代谢速率, 与药物的清除率直接相关, 是药物代谢的第一相酶。据文献报道^[4]该酶活性存在明显个体差异, 在不同个体的药物治疗作用、药物不良反应及药物毒性中均产生重要影响。在人体中的药物代谢, 主要由 CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 和 CYP3A4 等药物代谢酶参与代谢^[5-6]。CYP3A4 占人体肝微粒体 CYP 酶总含量的 30% 左右, 却代谢了临床中 50% 以上药物; CYP2D6 作为人类唯一有活性的 CYP2D 亚族酶, 仅占 CYP 肝脏总含量的 1%~2%, 却

作者介绍: 杨 栋, Email: 42387946@qq.com,

研究方向: 法医物证。

通信作者: 万立华, Email: ccfw@cqmu.edu.cn。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000152.html>

参与临床上大约 30% 的药物代谢,它也是 CYP 酶系中一种重要的药物代谢酶^[7-8]。本文着重研究 CYP3A4 和 CYP2D6 在汉族人群的相关基因多态性分析。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)指基因组 DNA 中某一特定核苷酸位置上发生转换、颠换等变化。根据其对生物遗传性状的影响可分为同义突变和非同义突变。前者指 SNP 所致的编码序列改变并不影响翻译蛋白质的功能。而非同义突变则指碱基突变使翻译的氨基酸序列改变,进而影响蛋白质的功能^[9]。因为 SNP 仅涉及单个碱基的变异,所以检验 SNP 意味着从单核苷酸水平对个体 DNA 序列多态性进行鉴别和区分,因此它在基因定位及遗传性研究中有其他标记无法比拟的潜力。单碱基延伸技术的方法对 SNP 基因分型具有通量较大、灵敏度高、经济等优势,是现阶段研究 SNP 的主要方法^[10-11]。

1 材料与方法

1.1 SNP 位点的选择和引物的设计

以群体多态性、特异性高为原则,并且使所选择的位点尽量避免连锁不平衡,主要集中在内含子区域,根据 HapMap 数据库信息,从 CYP2D6 与 CYP3A4 筛选出 11 个 SNP 位点。筛选位点的序列信息自 NCBI 数据库获得。使用 Beckman Autoprimer[®] 在线软件设计 11 对引物,并根据组合配对效果对个别位点引物使用 Primer Premier 5 软件修正重新设计。

1.2 DNA 的提取

取 192 名健康汉族无关个体 2 ml 血液样品,使用 QIAamp DNA Blood Midi kits 试剂盒提取基因组,每份样品获得 300 μ l 的基因组 DNA。之后采用 Qubit Fluorometer 进行定量,保证浓度范围为 120~200 ng/ μ l。

1.3 PCR 扩增及 SNPs 的检测

5 μ l 多重 PCR 扩增体系:内含 10 $\times$ PCR 缓冲液(含 15 mmol/L Mg^{2+}),75 μ mol/L dNTP,25 mmol/L $MgCl_2$,5 U/ μ l hot-star Taq(Qiagen[®]),10 μ mol/L 引物池和 2~20 ng/ μ l 模板 DNA。

按照 95 $^{\circ}C$ 15 min;94 $^{\circ}C$ 30 min;55 $^{\circ}C$ 30 min;72 $^{\circ}C$ 1 min,40 个循环;程序进行扩增。产物经 EXO、SAP 酶纯化,荧光 ddNTP 延伸,后再杂交至 SNPware 芯片上,清洗杂交后的芯片板置入 SNPstream 图像系统,双色荧光 CCD 扫描获得图像数据。

1.4 统计学处理

使用 Microsoft Office 2010 Excel 软件数据进行分析;哈迪-温伯格平衡使用 Haploview 4.2 软件进行检验。文中均是计数资料,以率表示,实验人群所选位点等位基因频率与高加索人进行卡方检验比较,以 $P \leq 0.01$ 为差异有统计学意义。哈迪-温伯格平衡检验以 $P \geq 0.05$ 为符合哈迪-温伯格平衡。

2 结果

2.1 SNP 扫描结果

具体内容详见图 1。

2.2 SNP 分型结果

具体内容详见表 1。

表 1 SNP 分型结果

Tab.1 Results of SNP genotyping

CYP	dbSNP	CC	CT	TT	FL
2D6	RS28624811	129	58	2	3
	RS28670611	104	40	14	34
	RS9623531	8	53	129	2
	RS12169962	65	23	0	104
	RS5758589	83	84	22	3
3A4	RS28371759	0	4	186	2
	RS3735451	13	76	100	3
	RS2246709	24	98	68	2
	RS2404955	51	37	99	5
	RS4646437	140	48	3	1
	RS4646440	111	64	6	11

注:FL 表示分析失败的基因数

2.3 等位基因频率

在 11 个 SNP 位点的等位基因频率中,11 个位点的最小等位基因频率(minimum allele frequency,MAF)均大于 0.01,具有多态性,但是 RS12169962、RS2404955 位点不符合哈

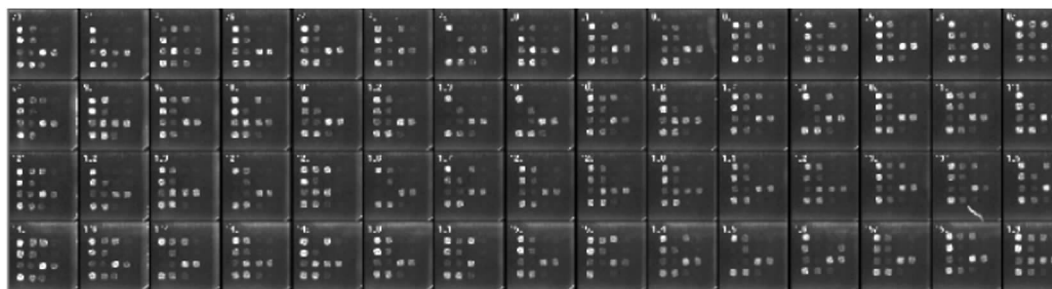


图 1 图像扫描结果

Fig.1 Results of SNP scanning

表 2 11 个 SNP 位点在本研究人群的等位基因频率及其他已有数据
Tab.2 Allele frequencies of 11 SNP for Chinese Han population and Caucasian population

CYP	dbSNP	等位基因	实验人群等位基 因频率	中国人群 NCBI 数 据库已知等位基 因频率	高加索人 NCBI 数 据库已知等位基 因频率	哈迪-温伯格平衡 <i>P</i> 值
2D6	RS28624811	C/T	0.836/0.164	0.854/0.146	0.653/0.347	0.165
	RS28670611	C/T	0.785/0.215	0.793/0.207	0.546/0.454	0.046
	RS9623531	C/T	0.182/0.818	0.200/0.800	0.331/0.669	0.727
	RS12169962	C/T	0.869/0.131	-/-	-/-	0.000
	RS5758589	C/T	0.661/0.339	0.733/0.263	0.531/0.469	1.000
3A4	RS28371759	C/T	0.011/0.989	-/-	-/-	1.000
	RS3735451	C/T	0.270/0.730	0.360/0.640	0.080/0.920	0.963
	RS2246709	C/T	0.384/0.616	0.407/0.593	0.279/0.724	0.292
	RS2404955	C/T	0.372/0.628	0.688/0.312	0.888/0.112	0.000
	RS4646437	C/T	0.916/0.084	0.878/0.122	0.867/0.133	0.911
	RS4646440	C/T	0.790/0.210	0.773/0.227	0.992/0.008	0.5415

注: -, 无可用数据

表 3 研究人群与其他人群等位基因频率统计比较
Tab.3 Frequency distribution between Chinese Han population and Caucasian population

dbSNP	实验人群等位基因频率	高加索人等位基因频率	χ^2 值	<i>P</i> 值
RS28624811	0.836/0.164	0.653/0.347	32.23	<0.01
RS28670611	0.785/0.215	0.207/0.454	42.07	<0.01
RS9623531	0.182/0.818	0.331/0.669	17.77	<0.01
RS5758589	0.661/0.339	0.531/0.469	14.47	<0.01
RS28371759	0.005/0.995	-/-	-	-
RS3735451	0.270/0.730	0.080/0.920	53.72	<0.01
RS2246709	0.384/0.616	0.279/0.724	10.43	<0.01
RS4646437	0.859/0.141	0.867/0.133	0.08	>0.01
RS4646440	0.790/0.210	0.992/0.008	52.01	<0.01

注: -, 无可用数据

迪-温伯格平衡(不参与与白种人等位基因频率的比较), RS28670611 的 *P* 值为 0.046(可能由于样本量的原因,最后还是选用此位点数据做人群比较),其他位点 *P* 值都大于0.1。11 个位点在本次研究人群中的等位基因频率和 NCBI 数据库中汉族人群及白种人的等位基因频率在表 2 中给出。

2.4 与现有数据相比较

在 11 个 SNP 位点的结果中 7 个 SNP(RS28624811、RS28670611、RS9623531、RS5758589、RS3735451、RS2246709、RS4646440)位点的等位基因频率在此人群与白种人相比差异具有统计学意义(*P*<0.01)(表 3)。

3 讨 论

不同种族或区域背景的人群的药物代谢率存在差异^[12]。在中国,汉族人口占绝大多数,几乎分散于全国各地。一个关于汉族人群 Y 染色体和 mtR-NA 多态性的研究证实了汉族人群具有相对一致的遗传同质性^[13]。然而,现有的 SNP 遗传数据主要集

中与疾病的关联,且目前 SNP 等位基因数据在汉族人群的分布信息缺乏。通过研究 CYP2D6 CYP3A4 相关 SNP 数据及相关人群药物遗传代谢的影响,可以为法医学鉴定药物相关性死亡提供一种新的参考信息^[14]。

本次研究提供了汉族人群 11 个 SNP 位点的等位基因频率数据,且有 2 个位点(RS12169962 RS28371759)缺乏人群 SNP 基因分型数据,它可作为 1 个补充数据添加到 CYP 数据库。位点 RS12169962 分型成功率只有 45.8%,其原因分析最大可能是由于引物设计的原因,PCR 复合扩增时引物间相互干扰,影响此位点 PCR 的扩增的成功率。对 11 个 SNP 位点关于 CYP2D6、CYP3A4 的基因分析,11 个位点的 MAF>0.01,具有多态性。此外,有 7 个位点(RS28624811、RS28670611、RS9623531、RS5758589、RS3735451、RS2246709、RS4646440)等位基因频率在汉族人群与白人相比较具有统计学差异。这些数

据揭示汉族人群可能有继承特定的遗传信息,导致于其他人群具有不同药物代谢率。

本次研究的 11 个 SNP 位点主要选自内含子调控区域。DNA 不同区域内的单核苷酸变异以不同的方式影响最后蛋白质酶的生成效应。具有编码蛋白质功能的 DNA 被称为外显子,外显子区域 SNP 可导致生成蛋白质的主要氨基酸发生改变,而改变蛋白质的功能^[15-17]。内含子区域 DNA 不编码蛋白质,且在 mRNA 由核酸翻译成蛋白质前被剪切掉,但它们的多样性可以改变 mRNA 剪切的位置而导致 mRNA 剪切的改变,调节 mRNA 的转录后修饰和蛋白质生成^[18]。已经有文献报道该区域 SNP 导致 CYP 酶活性降低而产生药物代谢副作用^[15]。目前这方面研究主要集中在外显子区域,内含子区域涉及较少。因此本研究的 SNP 位点组合可以为以后内含子区域 SNP 相关研究提供参考。

人类基因组计划的完成使个性化用药研究得到进一步发展。基于 CYP 酶的活性,不同个体的药物代谢可以分为 4 种不同的表型,弱代谢型、中间代谢型、强代谢型和超强代谢型^[19]。中间代谢型和强代谢型通常是具有正常的功能蛋白的代谢表型;超强代谢型由于代谢太快可能需要加大剂量才能达到治疗效果;弱代谢型由于代谢相对较慢而药物滞留时间长可能导致更严重的药物副作用,甚至导致药物过量而死亡。研究 CYP SNP 位点等位基因频率差异导致的药物代谢率的差异对于人群内药物获得更好的临床疗效及药物使用规范在本人群的重新制定具有重大意义,并且对于一些死亡原因不明的案件的鉴定也提供了一条新的途径。

参 考 文 献

- [1] Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, 37(3): 269-296.
- [2] Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, 20(8): 342-349.
- [3] Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(1): 103-141.
- [4] Venkatakrishnan K, Von Moltke ML, Greenblatt DJ, et al. Human drug metabolism and the cytochrome P450: application and relevance of in vitro models[J]. *J Clin Pharmacol*, 2001, 41(11): 1149-1179.
- [5] 王睿, 向倩, 陈轲, 等. 细胞色素 P450 氧化酶基因多态性对药物代谢影响的研究进展[J]. *中国临床药理学杂志*, 2004, 20(2): 134-138.
- [6] 周宏灏. 遗传药理学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 55-195.
- [7] Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, et al. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 392(6): 1093-1108.
- [8] Levo A, Koski A, Ojanpera I, et al. Post-mortem SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite ratios in blood[J]. *Forensic Sci Int*, 2003, 135(1): 9-15.
- [9] Krawczak M. Informativity assessment for biallelic single nucleotide polymorphisms[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(8): 1676-1681.
- [10] Shen M, Shi Y, Xiang P. CYP3A4 and CYP2C19 genetic polymorphisms and zolpidem metabolism in the Chinese Han population: a pilot study[J]. *Forensic Sci Int*, 2013, 227(1-3): 77-81.
- [11] Shi Y, Xiang P, Li L, et al. Analysis of 50 SNPs in CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 and CYP1A2 by MALDI-TOF mass spectrometry in Chinese Han population[J]. *Forensic Sci Int*, 2011, 207(1-3): 183-187.
- [12] Wilson JF, Weale ME, Smith AC, et al. Population genetic structure of variable drug response[J]. *Nat Genet*, 2001, 29(3): 265-269.
- [13] Wen B, Li H, Lu D, Song X, et al. Genetic evidence supports demic diffusion of Han culture[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 302-305.
- [14] Li L, Li CT, Li RY, et al. SNP genotyping by multiplex amplification and microarrays assay for forensic application[J]. *Forensic Sci Int*, 2006, 162(1-3): 74-79.
- [15] White RM Sr, Wong SH. Pharmacogenomics and its applications[J]. *MLO Med Lab Obs*, 2005, 37(3): 20-27.
- [16] Ingelman-Sundberg M, Sim SC, 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.
- [17] Roden DM, Altman RB, Benowitz NL, et al. Pharmacogenomics: challenges and opportunities[J]. *Ann Intern Med*, 2006, 145(10): 749-757.
- [18] Ingelman-Sundberg M, Sim SC. Intronic polymorphisms of cytochromes P450[J]. *Hum Genomics*, 2010, 4(6): 402-405.
- [19] Weinshboum R. Inheritance and drug response[J]. *N Engl Med*, 2003, 348(6): 529-537.

(责任编辑: 冉明会)