

中国广东籍汉族人细胞色素 P450_{2E1} 基因 5'侧翼区多态性

王建 刘焯霖 黎锦如 邵明 潘锡榜 陈彪^①

(中山医科大学附属第一医院神经内科; 广州, 510080)

摘要 目的: 探讨中国广东籍汉族人细胞色素 P450_{2E1} 基因 5'侧翼区的多态性分布规律。方法: 利用聚合酶链反应和 *Rsa* I、*Pst* I 限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术对 82 名正常中国广东籍汉族人的细胞色素 P450_{2E1} 基因 5'侧翼区的多态性进行了检测。结果: 82 名正常中国广东籍汉族人的细胞色素 P450_{2E1} 基因 5'侧翼区 C₁(*Rsa* I +, *Pst* I -)、C₂(*Rsa* I -, *Pst* I +) 等位基因频率分别为 0.854、0.146; 基因型 C₁C₁、C₁C₂、C₂C₂ 的比率分别为 0.732、0.244、0.024, 符合 Hardy-Weinberg 平衡分布。结论: 中国广东籍汉族人细胞色素 P450_{2E1} 基因 5'侧翼区 *Rsa* I 和 *Pst* I 多态性分布规律与欧美人显著不同。

关键词 细胞色素 P-450/ 遗传学; 多态性, 限制性片段长度

中图分类号 R 345.99

Polymorphisms in the 5'-Flanking Region of Cytochrome P450_{2E1} Gene in Guangdong Hans

Wang Jian Liu Zhuolin Li Jinru Shao Ming Pan Xibang Chen Biao

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University
of Medical Sciences Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: To determine the distribution of genetic polymorphisms in the 5'-flanking region of the cytochrome P450_{2E1} (CYP_{2E1}) in Guangdong Hans. **Methods:** 82 normal Guangdong Hans were studied with polymerase chain reaction (PCR) and *Rsa* I or *Pst* I restriction fragment length polymorphic (RFLP) techniques. **Results:** The allelic frequencies of C₁(*Rsa* I +, *Pst* I -) and C₂(*Rsa* I -, *Pst* I +) alleles were 0.854 and 0.146. The genotypic frequencies of C₁C₁、C₁C₂、C₂C₂ genotypes were 0.732, 0.244 and 0.024, respectively, which met Hardy-Weinberg equilibrium. **Conclusions:** The results suggest that the genotypic and allelic frequencies of CYP_{2E1} 5'-flanking region polymorphisms in Guangdong Hans are significantly different from those of European populations.

Subject headings cytochrome P 450/genetics; polymorphism, restriction fragment length

人类细胞色素氧化酶 P450_{2E1} (CYP_{2E1}) 是细胞色素 P450 家族的成员之一。它主要催化乙醇、亚硝酸胺、卤代烃和苯等许多小分子化合物的代谢, 并易受乙醇等毒物、致癌物的诱导。CYP_{2E1} 在亚硝酸胺致癌中的作用已明确。它是通过氧化还原反应催化致癌物前体 (procarcinogen) 生成亲电的、致突变的代谢产物, 也参与自由基的生成和氧化应激

反应^[1]。在人肝标本中发现, 该酶 mRNA 和蛋白质水平的表达有个体差异。该酶基因 5'侧翼区的遗传多态性是导致其转录活性有明显差异的主要因素^[2]。但是, 国内迄今尚未见到对 CYP_{2E1} 基因多态性的研究报道。因此, 我们对一组中国广东籍汉族人 CYP_{2E1} 基因 5'侧翼区多态性做了初步研究。

1 材料和方法

1.1 研究对象

82例健康广东籍汉族人,分别来自门诊查体健康者,无遗传病家族史,无肿瘤、风湿病及神经系统疾病等。其中男性46名,女性36名,年龄27~72岁。

1.2 DNA的提取

抽静脉血10 mL, ACD抗凝,采用常规酚/氯仿抽提法提取DNA,采取紫外分光光度法根据OD₂₆₀值将DNA稀释至500 mg/L。

1.3 多态性分析

利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术,参照Hayashi等^[2]报道的方法。引物序列为J9: 5'-CCAGTTCGAGTCTA-CATTGTCA-3' (位于-1372~-1352); J8: 5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3' (位于-960~-980)。引物由美国帕金森病研究所合成。

PCR扩增采用Perkin-Elmer 9700 PCR仪,反应总体积30 μL,含有200 μL/L dNTP、两种引物

各0.25 μmol/L、体积分数为0.05的DMSO、0.4 μg DNA、2U Taq DNA聚合酶(加拿大真达科技有限公司)、10 mmol/L Tris-HCl(pH9.0)、1.5 mmol/L MgCl₂、50 mmol/L KCl 体积分数为0.001的Triton × 100。扩增长度为410 bp。先在95 °C下预变性2 min,再以下列温度和时间循环35次:95 °C 45 s; 55 °C 1 min; 72 °C 1 min;最后在72 °C下延伸10 min。将扩增产物8 μL分别用10 U *Rsa* I 和 *Pst* I 限制性内切酶(Promega产品)在37 °C下消化2 h,再以8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳及EB染色。若存在一个 *Rsa* I 酶切位点,则扩增产物被切成360 bp和50 bp两个片段;若存在一个 *Pst* I 酶切位点,则扩增产物被切成290 bp和120 bp两个片段。

2 结果

82名中国广东籍汉族人CYP₂E₁基因5'侧翼区C₁(*Rsa* I +, *Pst* I -)、C₂(*Rsa* I -, *Pst* I +)等位基因的频率、基因型频率分布及与其它人群的比较见表1。

表1 不同研究报道的人类CYP₂E₁基因5'侧翼区多态性分布对比

Table 1 Comparison of current results with other reports

Groups	No. of cases	Genotype of CYP ₂ E ₁			Allele Frequency		Reference No.
		A(C ₁ C ₁)	B(C ₁ C ₂)	C(C ₂ C ₂)	C ₁	C ₂	
Guangdong Hans	82	0.732	0.244	0.024	0.854	0.146	This study
Japanese	202				0.807 ¹⁾	0.193	6
Caucasians	107				0.98 ²⁾	0.02	7
African American	126	0.98	0.02	0.00	0.99 ²⁾	0.01	8
European American	449	0.92	0.07	0.01	0.96 ²⁾	0.04	8

1) compared with Guangdong Hans, $P > 0.05$; 2) $P < 0.0001$

由表1可见,中国广东籍汉族人CYP₂E₁基因5'侧翼区C₁、C₂等位基因的频率分别为0.854、0.146。C₁C₁、C₁C₂和C₂C₂的基因型频率分别为0.732、0.244、0.024。在所研究的人群中CYP₂E₁ *Rsa* I 和 *Pst* I 多态性是完全连锁的。经 χ^2 适合度检验CYP₂E₁基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡分布。

3 讨论

帕金森病(PD)中黑质细胞死亡的原因至今不明,但可能与自由基的生成和氧化应激有关。对易感人群,外源性(如MPTP)和内源性毒素(如 iso-

quinolines, 异喹啉)可能是启动黑质细胞变性的主要因素^[3]。一些研究表明,部分与解毒有关的酶(如P450酶族)的遗传多态性可以导致帕金森病患病危险性的增高^[4]。在人类P450大家族中,主要有3个基因家族(CYP₁、CYP₂、CYP₃)参与外源物(xenobiotics)的代谢和激活。P450酶的合成受遗传因素的调控,因此,一旦基因发生变异,它所调控生成的P450酶和酶所催化的药物代谢即发生变化。因此,P450基因的多态性是构成药物或外源性毒素代谢个体差异和种族差异的基础。已知在人P450酶系统中具有两态分布的有CYP₁A₁、CYP₁A₆、CYP₂C、CYP₂D₆、CYP₂E₁等。

CYP₂E₁可被乙醇诱导,能代谢一系列低分子

量有机化合物包括亚硝酸、乙醇和苯等。它不仅存在于肝脏中,而且广泛存在于肝外组织,包括脑。最近 Riedl 等^[5]采用抗肽抗血清的免疫组化技术发现,在大鼠的黑质和纹状体内有 CYP_{2E1} 表达,提示它可能与黑质细胞的功能有关。CYP_{2E1} 参与活性氧的生成,而后者可能是 PD 黑质细胞死亡的原因之一。在培养的皮层星型胶质细胞中,CYP_{2E1} 由乙醇诱导后可以增加活性氧的生成,降低抗氧化剂(如谷胱甘肽等)的水平。CYP_{2E1} 还与内源性毒素如异喹啉的生成有关。它是将乙醇代谢为乙醛,后者再与多巴胺缩合生成异喹啉衍生物。因此,CYP_{2E1} 活性增加或者是黑质多巴胺的蓄积均可造成异喹啉衍生物对黑质细胞的慢性损伤,最终导致神经变性。

Hayashi 等^[2]研究发现,CYP_{2E1} 基因 5'侧翼区的遗传多态性影响其转录活性,进而导致药物氧化活性的个体差异。他用 PCR 方法扩增出 5'侧翼区-1 372 到-960 的 DNA 片段,与 SV40 启动子一起融合到报道基因(reporter gene)中进行表达,结果发现 C 型 DNA(即 C₂/C₂ 突变型纯合子)增强子活性是 A 型 DNA(C₁/C₁ 野生型纯合子)增强子活性的 10 倍。DNase I 印迹分析结果表明,Rsa I 多态性位点是导致其转录活性有明显差别的主要因素^[2]。Watanabe 等^[9]在 202 位日本人 CYP_{2E1} 基因的 5'侧翼区用 Rsa I 和 Pst I 内切酶检测到二种连锁的多态性——C₁ 单倍型(Rsa I 位点+, Pst I 位点-),C₂ 单倍型(Rsa I 位点-, Pst I 位点+)。在人群中这二种基因位点的频率分别为 0.807 和 0.193。

本研究发现中国广东籍汉族人 CYP_{2E1} 5'侧翼区 C₁、C₂ 等位基因的频率分别为 0.854, 0.146; 其基因型分布野生型纯合子 0.732, 杂合子 0.244, 突变纯合子 0.024, 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡分布,说明本样本基本代表中国广东籍汉族人该基因位点的多态性分布规律。在我们所研究的人群中发现,CYP_{2E1} Rsa I 和 Pst I 多态性是完全连锁的。这与以往报道一致^[9]。同时将本文资料与其它几个主要研究 CYP_{2E1} 基因多态性的报道比较(表 1),可见中国广东籍汉族人 CYP_{2E1}

C₁、C₂ 等位基因频率与日本人接近,但与欧美人显著不同,C₂ 等位基因频率显著高于欧美人,说明该基因的多态性具有种族差异。

既然 CYP_{2E1} 活性改变可能决定黑质细胞对慢性自由基损伤的易感性,且该基因 5'侧翼区多态性影响其转录活性。因此很有必要研究 CYP_{2E1} 基因多态性与 PD 发生的关系。我们目前正就 CYP_{2E1} 是否是 PD 的一个遗传易感性基因进行研究。

参 考 文 献

- Gonzalez I J, Gelboin H V. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev*, 1994, 26(1~2): 165
- Hayashi S L, Watanabe J, Kawajiri K, *et al*. Genetic polymorphisms in 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450 II E1 gene. *J Biochem(Tokyo)*, 1991, 110(4): 559
- Tipton K F. Might environmental factors contribute to neurodegenerative diseases? *Biochem Soc Trans* 1995, 23(2): 429
- Armstrong M, Daly A K, Cholerton S, *et al*. Mutant debrisoquine hydroxylation gene in Parkinson's disease. *Lancet*, 1992, 339(8800): 1017
- Riedl A G, Watts P M, Edwards R J, *et al*. Selective localization of P 450 enzymes and NADPH-P 450 oxidoreductase in rat basal ganglia using anti-peptide antisera. *Brain Res*, 1996, 743(1~2): 324
- Watanabe J, Hayashi S, Nakachi K, *et al*. Pst I and Rsa I RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP_{2E1} gene. *Nucleic Acids Res* 1990, 18(23): 7194
- Kato S, Shields P G, Caporaso N E, *et al*. Cytochrome P 450 II E1 polymorphisms, racial variation and lung cancer risk. *Cancer Res*, 1992, 52(23): 6712
- Stephens E A, Taylor J A, Kaplan N, *et al*. Ethnic variation in the CYP_{2E1} gene; polymorphism analysis of 695 African-Americans European-Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics*, 1994, 4(4): 185

(1998-03-12 收稿 1998-05-04 修回)