

中国汉族人依赖还原型辅酶 I / II 醌氧化还原酶基因多态性

邵明¹ 刘焯霖¹ 陈彪² 陶恩祥¹ 潘锡榜¹

(1 中山医科大学附属第一医院神经科; 广州, 510080 2 美国帕金森病研究所)

摘要 目的: 确定中国汉族人依赖还原型辅酶 I / II [NAD(P)H:]醌氧化还原酶(NQO1)基因 cDNA 的 609 位点 C→T (C₆₀₉→T)突变的频率分布。**方法:** 利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术分析了 81 名正常中国汉族人 NQO1 基因 cDNA 的 609 位点的多态性。**结果:** 中国汉族人 NQO1 基因的 C₆₀₉→T 的频率为 0.426; 基因型 T₆₀₉/T₆₀₉、C₆₀₉/C₆₀₉与 C₆₀₉/T₆₀₉的比率分别为 0.17、0.32 和 0.51。**结论:** 该结果提示中国汉族人 NQO1 基因的 C₆₀₉→T 位点的多态性分布规律与西方人有明显的差异。

主题词 硫辛酰胺脱氢酶/遗传学; 多态性, 限制性片段长度

中图分类号 Q 347

PRELIMINARY STUDY OF NAD(P)H:QUINONE OXIDOREDUCTASE GENE POLYMORPHISM IN CHINESE POPULATION

Shao Ming Liu Zhuolin Chen Biao Tao Enxiang Pan Xibang

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital,

Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

Abstract Objective: To confirm the mutation frequency of C₆₀₉→T in exon 6 of NAD (P)H:quinone oxidoreductase I (NQO1) gene in Chinese population. **Methods:** The polymorphism of C₆₀₉→T in exon 6 of NQO1 gene was analyzed in the population of 81 randomly selected Chinese individuals by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results:** The frequency of NQO1 C₆₀₉→T allele was 0.426. The index of genotype T₆₀₉/T₆₀₉, C₆₀₉/C₆₀₉ and C₆₀₉/T₆₀₉ were 0.17, 0.32 and 0.51 respectively. **Conclusion:** The results suggested that the polymorphism of NQO1 C₆₀₉→T in Chinese individuals is different from the Western individuals significantly.

Subject headings lipamide dehydrogenase/genetics; polymorphism, restriction fragment length

依赖还原型辅酶 I / II 醌氧化还原酶 [NAD (P) H: quinone oxidoreductase, NQO1, EC 1.6.99.2], 又称 DT-硫辛酰胺脱氢酶 (DT-diphosphorase), 是 1 种黄素酶, 它催化醌双电子还原反应, 对醌及其衍生物有解毒作用^[1]。其基因定位在第 16 号染色体上, 由 6 个外显子间以 5 个内含子组成, 在人体的各个组织中均有表达^[2]。醌是 1 种有毒的化合物, 能诱发哺乳动物细胞癌变、突变和坏死, 它在自然界中广泛存在, 如汽车废气、烟草的烟雾等, 甚至存在于人们的许多食物中。在其代谢

过程中, 经 I 相解毒酶 P450 催化, 以供给单电子的方式还原为半醌, 再将半醌还原为水溶性的醌。单电子的还原方式被认为是醌的主要毒性机理, 因为半醌能生成有活性的烷基化基团, 并且能自动氧化, 生成毒性的自由基, 如超氧阴离子和有毒的活性氧。由于 NQO1 催化醌还原为亲电子的水溶性醌, 避免了亲核性的醌损伤 DNA。另外, NQO1 催化的还原反应直接供给醌双电子, 无代谢中间物半醌形成, 从而减少了活性氧的形成, 起到保护细胞的作用。许多研究发现 NQO1 对醌及其衍生物所致的突变、癌变和其它毒性有保护作用, 因此对该

酶的研究日益重视。在正常人群中,该酶的活性有差异,Edwards 等曾报道在英国人中有 4% 缺乏 NQO1 活性^[5]。最近的研究发现,该酶的活性差异是因编码该酶的基因在其 cDNA⁶⁰⁹ 位点碱基突变(C₆₀₉→T)所致^[3]。迄今尚未见到国内对 NQO1 基因的 C₆₀₉→T 位点的研究报道。因此,我们对一组中国汉族人的 NQO1 基因多态性做了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

81 例健康成年汉族人,分别来自门诊健康查体,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 43 名,女性 38 名,年龄 27~72 岁。

1.2 DNA 的提取

抽静脉血 10 mL,肝素抗凝,利用常规酚/氯仿抽提法提取 DNA,采取紫外分光光度法将 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,采用陈彪报道的方法^[4]。根据 NQO1 基因 cDNA⁶⁰⁹ 位点相当于 NQO1 基因全序列第 6 号外显子 40 位点设计引物^[2],其序列如下: NQO1 F: 5' AAGCCCAGACCAACTTCT-3' (位于 intron 5 71~78)、NQO1 R: 5'-GCGTTTCTTC-CATCCTTC-3' (位于 exon 6 104~87)。PCR 扩增是用 Perkin-Elmer 9600 PCR 仪,反应总体积 30 μ L,含有 200 μ mol/L dNTP、两种引物各 0.2 μ mol/L、5% 的 DMSO、0.4 μ g DNA、2 单位 *Taq* DNA 聚合酶(华美生物工程公司)、10 mmol/L Tris-HCl (pH9.0)、1.5 mmol/L MgCl₂ 50 mmol/L KCl、0.1% Triton X-100。扩增长度为 195 bp。先在 95 $^{\circ}$ C 下预变性 2 min,再以下列温度和时间循环 35 次:94 $^{\circ}$ C 30 s;55 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 45 s;最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min。将扩增产物 10 μ L 用 5 单位 *Hinf* I 限制性内切酶(SABC 产品)在 37 $^{\circ}$ C 下消化 2 h,最后以 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳及 EB 染色。若 NQO1C₆₀₉→T 碱基替换时,则产生 1 个 *Hinf* I 酶切位点。扩增的片段被切成 119 bp 和 76 bp 两个片段(图 1)。

2 结果

81 名中国汉族人 NQO1 C₆₀₉→T 位点多态性频率及基因型多态性分布见表 1、表 2。

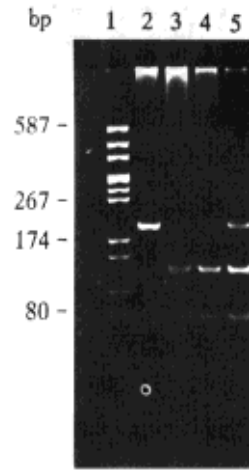


图 1 NQO1 基因 6 号外显子扩增产物 *Hinf* I 酶切电泳图
Fig. 1 Polyacrylamide gel showing amplified and *Hinf* I-digested NQO1 gene exon 6 fragments

PGEM-3E(+)/*Hae* III DNA marker (lane 1). The undigested wild-type homozygous (C/C) fragment is 195 bp (lane 2). The homozygous fragment (T/T) digest to yield 119 bp, 76 bp (lane 3, 4). The heterozygous fragment (T/C) digest to yield 195 bp, 119 bp, 76 bp (lane 5)

表 1 NQO1 基因 C₆₀₉→T 位点多态性频率分布 (n=81)

Table 1 Frequencies of the T allele at nucleotide 609 in the NQO1 locus (n=81)

	Number of Chromosome	T allele	frequency
Male	86	39	0.453
Female	76	30	0.385
Total	162	69	0.426

表 2 NQO1 基因 C₆₀₉→T 位点基因型多态性频率分布 (n=81)

Table 2 Frequencies of genotype at position 609 in the NQO1 locus

Genotype	Number	Frequency
C/T	41	0.51
C/C	26	0.32
T/T	14	0.17

由表 1、表 2 可见中国汉族人 NQO1C₆₀₉→T 位点 T 突变等位基因的频率为 0.426;T₆₀₉/T₆₀₉ 纯合子及 C₆₀₉/C₆₀₉ 纯合子的比率分别为 0.17 和 0.32,T₆₀₉/C₆₀₉ 杂合子的比率为 0.51。经 χ^2 检验 NQO1C₆₀₉→T 位点 T 突变等位基因频率在男性和女性之间无显著差异 ($P>0.1$);基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡分布。

3 讨论

国外报道在正常人群中 有 4%~10% 的人缺乏 NQO1 的活性, 11% 的人该酶的活性为中等水平^[5,6], 最初其原因并不清楚。Traver 等人在 BE 细胞株(NQO1 活性很低的肾上腺细胞瘤株)中, 应用反转录 PCR 技术扩增出 NQO1 的 cDNA 序列, 经测序发现其 609 位点发生了 C₆₀₉→T 的错义突变^[3], 随后 Siegel 等在非小细胞肺癌(NSCLC) H597 细胞株中, Kolesar 等在 1 例患有加德纳综合征并 IV 期直肠癌的患者的血细胞中证实了该突变^[7]。进一步的研究发现该突变并非癌细胞所特有, 在正常人群中均有该突变位点等位基因的纯合子和杂合子存在^[8]。说明 NQO1 基因在该位点具有多态性。该突变导致 NQO1 基因编码的 187 位氨基酸由脯氨酸变成了色氨酸, 虽不影响其 mRNA 的合成, 但可能改变了酶的 2 级结构, 使酶的活性降低。本研究发现中国汉族人 NQO1C₆₀₉→T 位点等位基因频率为 0.426; 其基因型分布野生型(C₆₀₉/C₆₀₉)0.32, 杂合子(T₆₀₉/C₆₀₉)0.51, 突变纯合子(T₆₀₉/T₆₀₉)0.17。经 χ^2 检验 T 等位基因频率在男性和女性之间无显著差异($P>0.1$); 基因型分布符合 Hardy Weinberg 平衡分布, 说明该样本基本代表中国汉族人群该基因的多态性分布规律。Rosvold 等在 1 组用于建立等位基因频率的参考人群中发现该突变的等位基因频率为 13%, 并符合孟德尔遗传方式^[9]; 在 1 组高加索人该突变等位基因频率为 20%^[10]。Kuehl 等报告在 44 例加拿大的正常人中 40% 为 T₆₀₉/C₆₀₉ 基因型, 9% 为 T₆₀₉/T₆₀₉ 基因型^[8]。而陈彪等发现美国人中该突变等位基因频率为 1.9%^[4]。我们的结果表明中国汉族人的 NQO1C₆₀₉→T 位点等位基因频率较其他人种的突变频率高, 说明该位点的多态性具有种族差异。

目前的研究发现在肝、肺、直肠癌及乳腺癌组织中, NQO1 的基因表达增加, 提示该酶在肿瘤的发展和肿瘤初发时细胞的防御机理中有重要作用^[8]。NQO1 基因的多态性有两方面的意义: ① 因其多态性造成的 NQO1 酶活性的降低或缺乏, 减弱了 NQO1 在对抗醌及其衍生物毒性的保护作用, 使机体倾向于罹患恶性疾病。② 其多态性在肿瘤的化学治疗中亦有重要意义, 因为许多抗肿瘤

药物是含醌的化合物, 需要经 NQO1 催化还原为水溶性的醌, 再经自动氧化生成活性氧或经重排生成有活性的烷基化物, 即所谓“生物还原活化作用”, 从而起到抗肿瘤作用。如果在 NQO1 活性低或无活性的病人中, 应用上述抗肿瘤药则效果不佳, 可改用其它种类的药物。因此, 在临床上应用 PCR-RFLP 技术检测肿瘤病人的 NQO1 的基因型对指导抗肿瘤药物的应用有着重要的意义。

另外, 对其它解毒酶的多态性已有了广泛的研究, 如 I 相解毒酶 P450 和 II 相解毒酶谷胱甘肽转硫酶的多态性, 其多态性被认为与人体对一些外界毒素的反应差异, 并导致对某些疾病的易感性有关。NQO1 基因的多态性除与肿瘤有关外, 还可能与其它一些疾病有关, 如神经系统的变性疾病帕金森病^[4], 有关研究正在进行之中。

参 考 文 献

- 1 Ernster L. DT-diaphorase. *Meth Enzymol*, 1967, 10: 309
- 2 Jaiswal A K, McBride O W, Adesnik M, *et al*. Human dioxin-inducible cytosolic NAD (P) H:menadione oxidoreductase. cDNA sequence and localization of gene to chromosome 16. *J Biol Chem*, 1988, 263 (27): 13572
- 3 Traver R D, Horikoshi T, Danenberg K D, *et al*. NAD (P) H: quinone oxidoreductase gene expression in human colon carcinoma cells: characterization of a mutation which modulates DT-diaphorase activity and mitomycin sensitivity. *Cancer Res*, 1992, 52(4): 797
- 4 Chan P. Identification of an NAD (P): quinone oxidoreductase polymorphism and its association with Parkinson's disease. *Movement Disorder*, 1997, 12 (suppl): 26
- 5 Edwards Y, Potter J, Hopkinson D A. Human FAD-dependent NAD (P) H diaphorase. *Biochem J*, 1980, 429
- 6 Eickelmann, P, Ebert T, Warskulat V, *et al*. Expression of NAD (P) H:quinone oxidoreductase and glutathione S-transferases alpha and pi in human renal cell carcinoma and in kidney cancer-derived cell lines. *Carcinogenesis*, 1994, 15(2): 219
- 7 Kolesar J M, Kuhn J G. Detection of a point mutation in NQO1 (DT-diaphorase) in a patient with colon cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87: 1022
- 8 Kuehl B L, Paterson J W, Peacock J W. Presence of a heterozygous substitution and its relationship to DT-diaphorase activity. *Br J Cancer*, 1995, 72(3): 555
- 9 Rosvold E A, McGlynn K A, Lustbader E D, *et al*. Identification of an NAD (P) H:quinone oxidoreductase poly-

- morphism and its association with lung cancer and smoking. *Pharmacogenetics*, 1995, 5(4):199
- 10 Rosvold E A, McGlynn K A, Lustbader E D. Redetection of a point mutation in NQO1 (DT-diaphorase) in a patient with colon cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1995, 87:1802
(1997-07-19 收稿 1997-10-07 修回)

(上接第 17 页)

参 考 文 献

- 1 梁秀龄, 刘焯霖, 陈 嵘, 等. 肝豆状核变性的系列研究. *中山医科大学学报*, 1996, 17(3):161
- 2 Bull P C, Thomas G R, Rommens J M, *et al.* The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature Genet*, 1993, 5:327
- 3 Tanzi R E, Petrukhin K, Chernov I, *et al.* The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nature Genet*, 1993, 5:344
- 4 Petrukhin K, Fischer S G, Pirastu M, *et al.* Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nature Genet*, 1993, 5:338
- 5 Thomas G R, Forbes J R, Roberts E A, *et al.* The Wilson disease gene: Spectrum of mutations and their consequences. *Nature Genet*, 1995a, 9:210
- 6 Chuand L M, Wu H P, Jang M H, *et al.* High frequency of two mutations in codon 778 in exon 8 of the ATP7B gene in Taiwanese families with Wilson disease. *J Med Genet*, 1996, 33:521
- 7 Knudson A G. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Nat Acad Sci*, 1971, 68:820
- 8 Thomas G R, Roberts E A, Walshe J M, *et al.* Haplotypes and mutations in Wilson disease. *Am J Hum Genet*, 1995, 56:1315
- 9 Guptan P K, Shao C, Zhu Y, *et al.* Loss of heterozygosity analysis in a human fibrosarcoma cell line. *Cytogenet Cell Genet*, 1997, 76:214
- 10 Scheffer H, Kema I P, Kondo I, *et al.* Localization at a subband level of polymorphic 13q14 DNA probes for diagnosis of hereditary retinoblastoma and Wilson disease. *Hum Genet*, 1987, 77:335
(1997-10-31 收稿 1997-12-01 修回)
- 6 Aghajanian G K. Modulation of a transient outward current in serotonergic neurons by alpha-adrenoceptors. *Nature (London)*, 1985, 315:501
- 7 Halliwell J V, Othman I B, Pelchem-Matteus A, *et al.* Central actions of dendrotoxin: selective reduction of a transient K conductance in hippocampus and binding to localized receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83:493
- 8 Loo D T, Copani A, Pike C J, *et al.* Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:7951
- 9 Rene E, Etsuro I, Christopher S K, *et al.* Soluble beta-amyloid induction of Alzheimer's phenotype for human fibroblast K⁺ channels. *Science*, 1994, 264:276
- 10 Brorson J R, Bindokas V P, Iwama T, *et al.* The Ca²⁺ influx induced by beta-amyloid peptide 25~35 in cultured hippocampal neurons results from network excitation. *J Neurobiol*, 1995, 26(3):325
(1997-04-24 收稿 1997-11-06 修回)

(上接第 22 页)