

# 中国人细胞色素 P450<sub>2D6</sub> 基因第 1号 和第 9号外显子多态性

陶恩祥<sup>①</sup> 刘焯霖 陈彪<sup>②</sup> 黎锦如 潘锡榜

(中山医科大学神经病学教研室; 广州, 510080)

**摘要** 利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术对 83 名正常中国人 CYP<sub>2D6</sub> 基因的第 1 号和第 9 号外显子的多态性做了分析。结果发现, 在 CYP<sub>2D6</sub> 基因的第 188 位点 G→T 的频率为 0.59, 第 4268 位点 G→C 的频率为 0.66, 而且 T<sub>188</sub>/T<sub>188</sub> 纯合子及 C<sub>4268</sub>/C<sub>4268</sub> 纯合子的比率分别为 0.38 和 0.34。与国外报道比较, 发现中国人 CYP<sub>2D6</sub> 基因的这 2 个位点的多态性分布规律与西方人有明显的不同。这可能有助于解释中国人在药物代谢及某些疾病 (如帕金森病等) 的易感性方面与西方人的差异。

**主题词** 细胞色素 C 氧化酶 遗传学; 多态性, 限制性片段长度; 外显子 遗传学

**中图分类号** R 345.99; R394.3; R394.6

药物的临床试验和严格控制的药代动力学研究发现, 人们对一些药物的毒性反应有明显的个体差异, 即存在药物代谢多态性<sup>[1]</sup>。通过家系分析证明其遗传方式是单基因控制的常染色体隐性遗传<sup>[2]</sup>, 后来证实它是细胞色素氧化酶大家族中的一种特异性酶活性的多态性所致。这种酶通过 4-羟化作用能将异哇肌等药物降解, 故被称为异哇肌羟化酶<sup>[3]</sup>。近年来根据细胞色素氧化酶 P450 命名法, 将异哇肌羟化酶定义为细胞色素 P450<sub>2D6</sub> (CYP<sub>2D6</sub>)。

借助药物代谢分析, 我们可以把个体 CYP<sub>2D6</sub> 表型区分为药物强代谢者 (EM) 和弱代谢者 (PM)。白种人 PM 的频率为 0.05~0.1<sup>[4]</sup>。PM 个体除了对异哇肌有代谢缺陷外, 还对 30 余种重要的药物有代谢障碍, 而且与某些疾病的易感性有密切关系<sup>[5]</sup>。因此, 近年来 CYP<sub>2D6</sub> 基因多态性在药物遗传学和环境流行病学中的作用受到广泛的重视。国外研究<sup>[6]</sup>发现, 该基因除了 A、B、C、D 和 E 5 种导致酶活性缺失的突变外, 部分个体还存在该基因的第 1 号和第 9 号外显子的多态性变化, 而且这 2 个位点的多态性有时与该基因的重复相连锁, 引起 CYP<sub>2D6</sub> 酶活性的提高, 而且在不同种族间多态性分布的频率有明显的差异<sup>[7]</sup>。但是, 国内迄今尚未见到对 CYP<sub>2D6</sub> 基因的研究报道。因此我们对一组中国大陆居民的 CYP<sub>2D6</sub> 基因的第 1 号和第 9 号外显子的多态性做了初步的研究, 现报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本的来源

83 例健康成年人, 分别来自门诊健康体检和本校 1994 年研究生, 排除家族性疾病、肿瘤、风湿病及神经系统疾病等。其中男 49 名, 女 34 名, 年龄 27~70 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<sup>[6,7]</sup>, 引物序列设计在 CYP<sub>2D6</sub> 基因的第 1 号和第 9 号外显子保守区, 引物序列及其在 CYP<sub>2D6</sub> 基因上的位置详见表 1。引物由美国帕金森氏病研究所合成。

PCR 扩增是用 Perkin-Elmer 9600 PCR 仪, 反应总体积 50 μL, 含有 200 μmol/L dNTP, 0.25 μmol/L 的引物, 5% 的 DMSO, 0.4 μg DNA, 1U Taq DNA 聚合酶 (华美生物工程公司), 10 mmol Tris HCl (pH 9.0), 1.5 mmol MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol KCl, 0.1% Triton X-100。

① 第一作者, 1961 年出生, 男, 博士研究生; ② 第三作者为该校客座教授, 现在美国帕金森病研究所

用引物 P1和 P2扩增第 1号外显子,扩增长度为 220 bp 先在 97°C下预变性 10 min,再以下列温度和时间循环 35次: 95°C, 30 s; 59.5°C, 30 s; 72°C, 50 s;最后在 72°C下延伸 7 min 将扩增产物 20 μL 用 8U *Hph*I限制性内切酶 (New England Biolabs 产品)在 37°C下消化 2 h,再以 10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳。若 CYP<sub>2D6</sub>基因的第 188位点的碱基 C被碱基 T 替换 (C<sub>188</sub>→T),则产生一个 *Hph*I酶切位点。扩增产物被切成 101 bp和 109 bp的片段 (图 1)

表 1 引物的序列及在 CYP<sub>2D6</sub>基因上的位置

引物名称	序 列	位 置
P1	5'-CATTTGGTAGTGAGGCAGGT-3'	69- 88
P2	5'-CTCCAGGACCTCCTCCCTC-3'	289- 271
P3	5'-TCAAGTGGGGAGACAAAC-3'	3623- 3640
P4	5'-ATATAGCTCCCTGACGCC-3'	4810- 4793

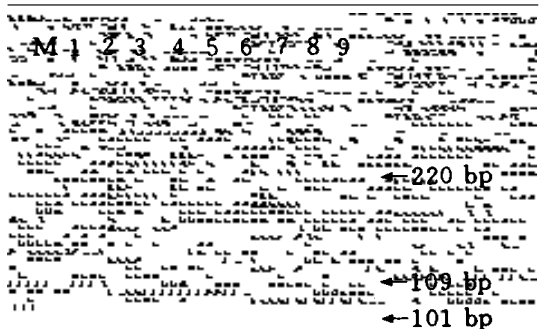


图 1 CYP<sub>2D6</sub>第 1号外显子扩增产物的 *Hph*I 酶切分析

M 为 pGEM 3zf(+)DNA/*Hae*III DNA Marker; 1 3 和 7为 C<sub>188</sub>/C<sub>188</sub>纯合子; 2 4 5 6和 8为 C<sub>188</sub>/T<sub>188</sub>杂合子; 9为 T<sub>188</sub>/T<sub>188</sub>纯合子

用引物 p3和 p4扩增第 9号外显子,扩增长度为 1187 bp 先 97°C预变性 10 min,再按 95°C, 30 s; 62°C, 45 s; 72°C, 2 min的温度和时间循环 35次,最后在 72°C下延伸 7 min 将扩增产物 20 μL用 8UBst EII 限制性内切酶 (New England Biolabs 产品)在 65°C下消化 2 h,以 10%的聚丙烯酰胺电泳。若 CYP<sub>2D6</sub>基因的第 4268位点的碱基 G被碱基 C 替换 (C<sub>4268</sub>→C),则该部位出现一个 *Bst*EII 酶切位点,扩增产物被切成两段,分别为 542 bp和 645 bp(图 2)



图 2 CYP<sub>2D6</sub>第 9号外显子扩增产物的 *Bst*EII 酶切分析

M 为 pBR328/*Bgl*I和 pBR328/*Hinf*I DNA Marker; 1 和 8为 C<sub>4268</sub>/C<sub>4268</sub>纯合子; 其余均为 C<sub>4268</sub>/C<sub>4268</sub>杂合子

## 2 结 果

83名中国人 CYP<sub>2D6</sub>基因第 1号和第 9号外显子多态性分布特点见表 2和表 3

表 2 83名中国人 CYP<sub>2D6</sub>基因第 1号和第 9号外显子多态性分布

	染色体数 (n= 166)	频 率
C <sub>188</sub> →T	98	0.59
C <sub>4268</sub> →C	109	0.66

表 3 83名正常人 CYP<sub>2D6</sub>第 1号和 9号外显子基因型频率

基因型	人 数	频 率
第 188位点		
C/T	34	0.41
C/C	17	0.21
T/T	32	0.38
第 4268位点		
G/C	46	0.55
G/G	9	0.11
C/C	28	0.34

由表 2可见,中国人第 1号外显子 C<sub>188</sub>→T等位基因的频率为 0.59,而 C<sub>4268</sub>→C多态性的频率是 0.66 表 3显示 T<sub>188</sub>/T<sub>188</sub>纯合子及 C<sub>4268</sub>/C<sub>4268</sub>纯合子的比率分别为 0.38和 0.34

### 3 讨 论

CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 主要存在于肝脏的内质网中,发挥多种药物、环境及生物毒素的第 2相解毒作用<sup>[3,4]</sup>,该酶在肝脏通过 4-羟化作用使这些药物、生物毒素等降解,然后经肾脏排出。如果肝脏缺乏 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub>,并且摄入这类药物等物质时,机体即容易出现一系列中毒反应。例如服用普通治疗剂量的异哇肌,存在 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 缺陷的人会出现严重的低血压反应,因此对 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 的研究在药物毒理学、药代动力学等方面受到广泛的重视。近来有人试图利用 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 基因多态性特点解释多种遗传易感性疾病(如帕金森病、类风湿病及肿瘤等)的发病机理<sup>[11]</sup>。具有 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 基因突变的个体生活在有化学污染、生物毒素的环境中,由于体内 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 酶缺陷,其通过皮肤、呼吸或消化道进入机体的毒素不能被有效清除,造成体内蓄积,因而导致疾病。

CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 基因的主要突变方式是单个或数个碱基的缺失或替换引起读码框架的移位,以及大片段的基因丢失,包括第 5号外显子的 2637位点的 1个碱基 G 的丢失(A突变);第 3号外显子的最后 1个碱基 G 被 A 替换(B突变);第 5号外显子上相连的 A<sub>2701</sub>~G<sub>2703</sub> 3个碱基缺失(C突变);整个 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 基因缺失(D突变)及与 Xba I 内切酶限制性长度 13 kb 片段相连锁的 E 突变<sup>[6,11]</sup>。这几种突变造成 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 酶活性的缺失。除此之外,CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 基因还可能出使酶活性提高的突变,不同时伴有 A B C D 和 E 5种突变,主要是第 1号和第 9号外显子常存在多态性位点,即 C<sub>188</sub>→T 和 G<sub>4268</sub>→C,国外研究发现它们常与该基因的重复相连锁,从而使 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 活性提高,故表型可能为强代谢或超强代谢型<sup>[7,9,11]</sup>。这 2种多态性变化通常被作为 L 等位基因。

本实验对 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 基因 188和 4268两个位点的研究发现,中国人 C<sub>188</sub>→T 的频率高达 0.59,而且 T<sub>188</sub>/T<sub>188</sub> 纯合子的比例达 0.38;G<sub>4268</sub>→C 的频率为 0.66,C<sub>4268</sub>/C<sub>4268</sub> 纯合子的比例为 0.34 Armstrong<sup>[7]</sup> 及 Wang<sup>[9]</sup> 等研究发现海外华侨及台湾居民的 C<sub>188</sub>→T 的频率为 0.47~0.70 G<sub>4268</sub>→C 的频率为 0.47~0.76,与我们的结果基本一致,Armstrong<sup>[7]</sup> 还发现欧美人 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 基因的 C<sub>188</sub>→T 和 G<sub>4268</sub>→C 的频率分别为 0.05和 0.32,由此可见华人该基因的 C<sub>188</sub>→T 和 G<sub>4268</sub>→C 的多态性变化分别是欧美人的 10

倍和 2倍左右,这两个位点的多态性与欧美人有明显的差别。

既然 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 多态性在药物代谢及疾病易感性等方面有重要作用,本研究发现中国人 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 基因第 1号和第 9号外显子的多态性分布与西方人不同,这可能有助于解释中国人与西方人之间某些疾病的易感性及药物代谢动力学存在差异的原因,但是要彻底揭示中国人 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 多态性的意义,还有待于进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, *et al.* Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet*, 1977, 2(8037): 584
- 2 Evans DAP, Mahgoub A, Sloan TP, *et al.* A family and population study of the genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in the white British population. *J Med Genet*, 1980, 17(1): 102
- 3 Brosen K, Gram LF. Clinical significance of the debrisoquine/sparteine oxidation polymorphism. *Eur J Clin Pharmacol*, 1989, 36(6): 537
- 4 Eichelbaum M, Gross AS. The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism: clinical aspects. *Pharmacol Ther*, 1990, 46(3): 377
- 5 Daly AK, Cholerton S, Armstrong M, *et al.* Genotyping for polymorphisms in xenobiotic metabolism as a predictor of disease susceptibility. *Environ Health Perspect*, 1994, 102(suppl 9): 56
- 6 Daly AK, Armstrong M, Monkman SC, *et al.* Genetic and metabolic criteria for the assignment of debrisoquine 4-hydroxylation (cytochrome P450<sub>2</sub>D<sub>6</sub>) phenotypes. *Pharmacogenetics*, 1991, 1(3): 33
- 7 Armstrong M, Fairbrother K, Idle JR, *et al.* The cytochrome P450 CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> allelic variant CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> and related polymorphisms in a European population. *Pharmacogenetics*, 1994, 4(2): 73
- 8 Kimura S, Umeno M, Skoda R, *et al.* The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP<sub>2</sub>D) locus sequence and identification of the polymorphic

- CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> gene, a related gene and a pseudogene. Am J Hum Genet, 1989, 45(6): 889
- 9 Wang SL, Huang JD, Lai MD, *et al.* Molecular basis of genetic variation in debrisoquine hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RELP and sequence of CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub>. Clin Pharmacol Ther, 1993, 53(4): 410
- 10 Matsunaga E, Zeugin T, Zanger UM, *et al.* Sequence requirements for cytochrome P450II D1 catalytic activity. J Biol Chem, 1990, 265(28): 1719
- 11 陶恩祥, 刘焯霖. 细胞色素氧化酶 P450<sub>2</sub>D<sub>6</sub> 多态性及其分子生物学进展. 国外医学遗传学分册, 1996, 19(4): 180
- (1996-09-13收稿 1996-12-10修回)

## THE POLYMORPHISM OF EXON 1 AND EXON 9 OF CYTOCHROME P450<sub>2</sub>D<sub>6</sub> GENE IN CHINESE SUBJECTS

Tao Enxiang Liu Zhuolin Chen Biao Li Jinru Pan Xibang

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

The polymorphism of cytochrome P450<sub>2</sub>D<sub>6</sub> (debrisoquine-4-hydroxylase) is a genetic variation in drug metabolism, which can be characterized by two phenotypes, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The frequencies of the phenotypes and the polymorphism of CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> gene in different nationalities are obviously different. This paper analysed DNA from 83 Chinese subjects for the polymorphism of C<sub>188</sub>→T in exon 1 and G<sub>4268</sub>→C in exon 9 of CYP<sub>2</sub>D<sub>6</sub> gene by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The frequencies of C<sub>188</sub>→T allele and G<sub>4268</sub>→C allele were 0.59 and 0.66 respectively. Both T<sub>188</sub>/T<sub>188</sub> and C<sub>4268</sub>/C<sub>4268</sub> homozygous alleles were 0.38 and 0.34 respectively. In contrast to the other reports, the frequencies of T<sub>188</sub> and C<sub>4268</sub> alleles in the Chinese were shown significantly higher than those of the European.

**Subject headings** cytochrome C oxidase/genetics; polymorphism; restriction fragment length; exons/genetics

(上接第 4 页)

shrunk, the dendrites decreased, compared with the youngs. The old learning and memory normal rats showed no obviously changes. IBAS image system was used for quantity analysis. The cell number, the cell area and the gray level of NOS neurons in the basal forebrain of the aged-deficits obviously decreased compared with the youngs ( $P < 0.01$ ). The escape latencies of the tested rats correlated inversely with the NOS neuron numbers in the basal forebrain. The results indicated that the changes of NOS neurons in basal forebrain is one of the nerve mechanism of aged learning and memory deficits.

**Subject headings** prosencephalon/cytology; learning disorders/pathology; memory disorders/pathology; neuron/cytology; rats; aging