

中国苗族人群中细胞色素 P450 2C19 基因多态性的研究

张松¹, 周强², 董兆文¹

(1. 国家计生委科学技术研究所分子生物研究室, 北京 100081; 2. 贵州省计划生育科研所, 贵阳 550004)

摘要: 为研究细胞色素 P450 2C19 在中国苗族人群中的基因型, 采用聚合酶链式反应与限制性内切核酸酶片段长度多态性技术分析了 98 例无血缘关系苗族人群的基因型。结果显示 50 人为 CYP2C19 野生型纯合子(*wt/wt*), 39 人为 CYP2C19 *m1* 杂合子(*wt/m1*), 9 人为 CYP2C19 *m1* 突变型纯合子(*m1/m1*)。与国内外相关报道比较, 本实验得出的 CYP2C19 *m1* 突变频率与文献报道相符。

关键词: 细胞色素 P450 2C19; 基因型; 聚合酶链式反应; 限制性内切核酸酶片段长度多态

中图分类号: Q986

文献标识码: A

文章编号: 0253-977X(2001)03-0192-03

Cytochrome P450 2C19 Gene Polymorphism in Chinese Miao Population

ZHANG Song¹, ZHOU Qiang², DONG Zhao-wen¹

(1. National Research Institute For Family Planning, Beijing 100081;

2. Guizhou Research Institute For Family Planning, Guiyang 550004, China)

Abstract: In order to study the cytochrome P450 2C19 gene polymorphism in Miao population, the genotypes of ninety-eight unrelated Miao subjects were studied by polymerase chain reaction and restricted fragment length polymorphism (RFLP). The results showed that fifty were homozygous for wild-type(*wt/wt*); thirty-nine were heterozygous for the CYP2C19 *m1* (*wt/m1*); nine were homozygous for CYP2C19 *m1* (*m1/m1*). The frequency of CYP2C19 *m1* was in agreement with that of other published data.

Key words: cytochrome P450 2C19; genotype; polymerase chain reaction; restricted fragment length polymorphism (RFLP)

细胞色素 P450 2C19 (CYP2C19) 参与十几种药物在人体内的氧化代谢过程, 是药物遗传学研究最为关注的一类代谢酶。CYP2C19 的药物遗传学作用最初是由 K pfer 和 Preisig (1984) 在研究抗惊厥药 S-美芬妥英的 4'-羟化作用时发现。近年来大量实验证明, 人群中 S-美芬妥英 (S-mephenytoin, S-MP) 的羟化代谢呈现明显的遗传多态性, 其遗传遵循常染色体隐性遗传方式^[1]。根据美芬妥英羟化代谢的水平, 个体表型可分为强代谢者 (EM) 和

弱代谢者 (PM), 且弱代谢者的发生率存在着明显的种族差异, 亚洲人 (日本人和中国人) 的 PM 发生率为 13% ~ 23%, 明显高于欧洲和非洲人的 3% ~ 6%^[2,3]。

Morais 等人的研究结果表明, S-美芬妥英弱代谢者的缺陷主要由于 CYP2C19 外显子 5 中第 681 个碱基对发生了单碱基突变 (G→A), 导致核苷酸序列异常, 改变了 mRNA 可读框架, 致使终止密码子过早出现而表达成无功能的酶蛋白^[4]。目前,

收稿日期: 2000-05-18; 修回日期: 2000-07-26

基金项目: 国家科技部计划生育专项基金资助, 编号: 998672

作者简介: 张松 (1973-), 女, 北京人, 硕士研究生, 专业方向: 遗传学。Tel: 010-62179120, E-mail: zwdong@ihw.com.cn

这一突变已被命名为 CYP2C19 $m1$ 。用 PCR 法检测发现,75% 的日本人 PM 和 83% 的白种人 PM 是由 CYP2C19 $m1$ 造成的^[5]。最近,在日本人中又发现了另一个 CYP2C19 的突变型基因 CYP2C19 $m2$,是 CYP2C19 的第 4 个外显子中第 636 个碱基对发生了单碱基突变(G→A)^[6]。CYP2C19 $m1$ 和 $m2$ 两种突变基因可以解释 >99% 的亚洲人 S-MP 弱代谢表型,但 $m2$ 突变基因在白种人 PM 和非洲津巴布韦黑人 PM 中罕见^[7-9]。

从上述研究可看出,CYP2C19 $m1$ 是导致人群中 S-美芬妥英羟化弱代谢者出现的主要原因。由于 PM 的发生率在种族间有很大的差异,国内已有人对汉族、白族和侗族的 CYP2C19 的多态性进行了研究^[10]。我们对 98 名中国苗族人群 CYP2C19 $m1$ 突变基因的多态性进行了初步研究,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 资料来源

98 份 EDTA 抗凝血血样采自贵州黔东南苗族自治州的无血缘关系的苗族个体,20℃ 保存。

1.2 分析方法

1.2.1 DNA 提取

利用常规酚/氯仿抽提法提取 DNA^[4]。

1.2.2 基因型分析

参照文献,根据 CYP2C19 等位基因的第 4 个内含子与第 5 个外显子连接处两侧的碱基序列合成特异性 PCR 引物,用以检测 CYP2C19 $m1$ 型突变基因^[4]。引物序列为

5'-AATTACAACCAGAGCTTGGC-3'

5'-TATCACTTCCATAAAAAGCAAG-3'

PCR 反应总体积 50 μ l,含有 10mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、50mmol/L KCl、3mmol/L MgCl₂、0.2mmol/L dNTP、0.25 μ mol/L 的引物、0.3 μ g 的 DNA 模板和 2.0 单位的 Taq DNA 聚合酶(华美生物工程公司)。循环条件包括:94℃ 变性 1min,52℃ 复性 30sec,72℃ 延伸 1min,共循环 30 次;最初变性条件是 94℃ 5min,最末延伸条件是 72℃ 7min,PCR 扩增是用 Perkin Elmer 480 热循环仪。扩增片段长度为 169bp,将 PCR 产物 20 μ l 用 10 单位的 SmaI 限制性内切核酸酶消化 3 小时后,进行 8% 的聚丙烯酰胺电泳。电泳结果用 BioRad 的 Gel Doc 1000 紫外凝胶

成像系统观察和分析。

2 结果与讨论

药物遗传学的目的在于研究药物代谢中遗传因素的影响和不同基因型个体对药物反应的差异,从而为临床有针对性地合理用药和根据不同基因型群体对药物的反应来改进药物设计提供了理论基础依据。近十几年来,国内外有关药物代谢酶的研究主要集中在具有遗传多态性的两种氧化酶(细胞色素 P450 酶 CYP2D6、CYP2C19)和一种结合酶(N-乙酰化转移酶 NAT2)的个体和种族差异上。国内这方面研究开展得相对较晚,而且我国是个多民族国家,有许多独特的基因资源可以利用。苗族人群 CYP2C19 的 SmaI 酶切图谱见图 1。

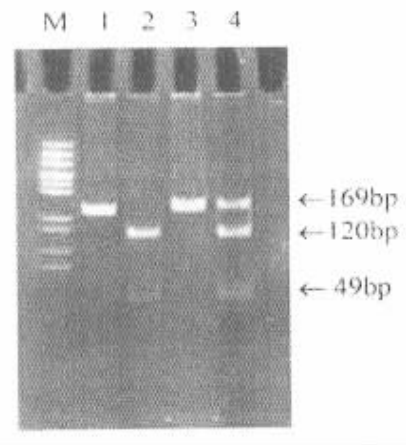


图 1 CYP2C19 基因内含子 4~外显子 5 扩增产物的 SmaI 酶切分析

M: pGEM-3Z(+)/HaeIII Marker; 1: PCR 产物;
2: 野生型纯合子(wt/wt); 3: CYP2C19 $m1$ 突变型纯合子($m1/m1$); 4: CYP2C19 $m1$ 杂合子($wt/m1$)

Fig.1 CYP2C19 gene intron 4 to exon 5 PCR products digested with SmaI

M: pGEM-3Z(+)/HaeIII marker; 1: PCR products;
2: Homozygous for wild-type(wt/wt);
3: Homozygous for CYP2C19 $m1$ ($m1/m1$);
4: Heterozygous for CYP2C19 $m1$ ($wt/m1$)

在对 98 名中国苗族进行 CYP2C19 基因型分析后发现,50 人为野生型纯合子(wt/wt);39 人为 CYP2C19 $m1$ 杂合子($wt/m1$);9 人为 CYP2C19 $m1$ 突变型纯合子($m1/m1$)。其中,CYP2C19 $m1$ 型突变基因占总基因座的 0.291。目前,关于 CYP2C19 $m1$ 在中国人群中基因频率的研究已有报

道 de Morais 报道汉族人的 $m1$ 为 0.289 ;Shu 等发现白族人的 $m1$ 频率为 0.257 ,侗族人的 $m1$ 频率为 0.399 ,而汉族人的 $m1$ 频率为 0.366^[10]。由本实验得出苗族人群中 CYP2C19 $m1$ 的基因频率是 0.291 ,与上述报道的基因频率相近 ,说明中国各民族间 CYP2C19 基因多态性具有一定的可比性 ,同时由于各民族遗传背景的差异 ,各民族间的基因频率又有所不同。

随着分子遗传学技术的发展 ,PCR 技术、RFLP 技术及基因测序技术正越来越多地应用于药物遗传学的研究中。由于这种基因分型方法可以快速、准确地诊断出有药物代谢酶活性异常的患者 ,因此对临床合理用药起到了一定的指导作用 ,同时 CYP2C19 基因多态性的研究也大大丰富了人类基因组多样性的研究内容。

参 考 文 献 (References) :

- [1] Bertilsson L ,Lou YC ,Du YU ,*et al.* Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylation of debrisoquin and S - mephenytoin[J]. Clin Pharmacol Ther ,1992 ,51 :388 ~ 397.
- [2] Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation[J]. Clin Pharmacokinet ,1995 ,29 :192 ~ 209.
- [3] Kaneko A ,Lum J K ,Yaviong J ,*et al.* High and variable frequencies

of CYP2C19 mutations : medical consequences of poor drug metabolism in Vanuatu and other Pacific islands[J]. Pharmacogenetics ,1999 ,9 :581 ~ 590.

- [4] de Morais S M F ,Wilkinson G R ,Blaisdell J ,*et al.* The major genetic defect responsible for the polymorphism of S - mephenytoin metabolism in humans[J]. J Biol Chem ,1994 ,269 :15419 ~ 15422.
- [5] 姚彤炜 ,陈枢青 ,王彤文 ,等 . 中国汉族人群 S - 美芬妥英 4' - 羟化酶的表型与基因分析 . 药学学报 ,1999 ,34(5) :338 ~ 341.
- [6] de Morais S M F ,Wilkinson G R ,Blaisdell J ,*et al.* Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of S - mephenytoin metabolism in Japanese[J]. Mol Pharmacol ,1994b ,46 (4) :594 ~ 598.
- [7] Golstein J A ,Ishizaki T ,Chiba K ,*et al.* Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental ,Caucasian ,Saudi Arabian and American black population[J]. Pharmacogenetics ,1997 ,7 :59 ~ 64.
- [8] Brosen K ,de Morais S M F ,Meyer U A ,*et al.* A multifamily study on the relationship between CYP2C19 genotype and S - mephenytoin oxidation phenotype[J]. Pharmacogenetics ,1995 ,5(5) :312 ~ 317.
- [9] Masimirembwa C ,Bertilsson L ,Johansson I ,*et al.* Phenotyping and genotyping of S - mephenytoin hydroxylase (cytochrome P450 2C19) in a Shona population of Zimbabwe[J]. Clin Pharmacol Ther ,1995 ,57(6) :656 ~ 661.
- [10] Shu Yan ,Zhou Hong-Hao. Individual and ethnic differences in CYP2C19 activity in Chinese population[J]. Acta Pharmacol Sin , 2000 ,21(3) :193 ~ 199.