

·研究简报·

中国汉族、维吾尔族、哈萨克族 CYP2D6 基因型与表型比较

李国昌^{1*}, 杨军¹, 周婷¹, 陈志刚¹, 陈文²

(新疆石河子大学 1. 医学院第一附属医院, 新疆 石河子 832008; 2. 药学院, 新疆 石河子 832002)

关键词: 汉族; 维吾尔族; 哈萨克族; CYP2D6; 右美沙芬; 基因型; 表型

中图分类号: R968

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 02-0238-05

CYP2D6 genotypes and phenotypes in Chinese Han, Uygur and Kazakh populations

LI Guo-chang^{1*}, YANG Jun¹, ZHOU Ting¹, CHEN Zhi-gang¹, CHEN Wen²

(1. First Affiliated Hospital, School of Medicine, Xinjiang Shihezi University, Shihezi 832008, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Xinjiang Shihezi University, Shihezi 832002, China)

Abstract: This study is to compare the influence of CYP2D6 *3 and *4 genotypes and phenotypes on the metabolic activity of CYP2D6 in Chinese Han, Uygur and Kazakh ethnic groups. Allele specific amplification (ASA) was used to determine the CYP2D6*3 and CYP2D6*4 genotypes. Phenotypes of CYP2D6 in all subjects were determined using dextromethorphan as probe drug by HPLC methods. Among the 132 Han subjects, one subject (0.76%) exhibited the *1/*3 combination, and one (0.76%) exhibited the *1/*4. Among the 136 Uygur subjects, 4 subjects (2.94%) showed the *1/*3 combination, 12 (8.82%) showed *1/*4, 4 (2.94%) showed *4/*4, and one (0.74%) showed *3/*4. Among the 116 Kazakh subjects, 2 (1.72%) exhibited the *1/*3 combination, 7 (6.03%) exhibited *1/*4, and one (0.86%) showed *4/*4. This research revealed significant differences in the occurrence frequencies of the CYP2D6 genotype between Han and Uygur ethnic groups, as well as between Uygur and Kazakh populations. However, no difference was found between Han and Kazakh populations. In addition, the prevalence of PMs of the Uygur is comparable to that of the Caucasians. However, the molecular mechanism underlying the poor metabolism is different in these two populations.

Key words: Han; Uygur; Kazakh; CYP2D6; dextromethorphan; genotype; phenotype

细胞色素 P450 2D6 (CYP2D6) 是最具有基因多态性的药物代谢酶, 在不同种族人群中呈遗传多态性并存在明显的种族差异, 目前已发现 70 多个变异位点^[1]。基因突变可以引起酶活性及数量的差异^[2], 从而造成不同种族和个体对药物反应存在显著差异。白种人慢代谢 (PM) 发生率为 5%~10%, 多由 CYP2D6*3、*4、*5、*6、*15 等位基因突变造成^[3, 4]。东方人 (中国人、日本人、韩国人) 这些突变等位基

因的发生频率很低, PM 发生率约为 1%^[5, 6]。

新疆维吾尔族和哈萨克族人具有明显的北亚人种中的中亚类型特征, 在体质和遗传构成上与汉族人有明显的差别^[7-9]。两个民族含有高加索人种血缘^[10, 11]。作者对汉族、维吾尔族、哈萨克族人群右美沙芬氧化代谢表型分析^[12]显示: 汉族 PM 发生率 0.76%, 维吾尔族 PM 发生率 8.09%, 哈萨克族 PM 发生率 1.72%。为进一步探讨这 3 个民族人群之间 CYP2D6 代谢可能存在的遗传差异, 本文采用 ASA-PCR 法对新疆境内汉族、维吾尔族和哈萨克族正常人群 CYP2D6*3 和 CYP2D6*4 等位基因进行检测, 同时结合这 3 个民族人群的右美沙芬代谢表型, 比较分

收稿日期: 2010-06-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39960080).

*通讯作者 Tel: 86-993-2852106, Fax: 86-993-2850531,

E-mail: liguochang2005@126.com

析 3 个民族人群基因型与表型间的相关性, 并且与白人慢代谢发生的机制进行比较, 从而揭示不同种族间药物代谢存在遗传差异的机制。

材料与方

试剂和仪器 rTth DNA 聚合酶 (rTth DNA Polymerase, XL&XL Buffer II Pack, Part No. N808-0187; Ampliwax PCR Gem 50 part No. N808-0150, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA); Tag DNA 聚合酶 (Promega 产品); GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI 产品); 基因组 DNA 抽提试剂盒 SK1252 (Sangon 产品); 氢溴酸右美沙芬片, 每片 15 mg, 批号 0004004 (广州光华药业股份有限公司); 右美沙芬对照品, 批号 125-69-9; 去甲右美沙芬对照品, 批号 125-73-5 (对照品均为 ICN Biomedicals Inc. 产品); 1-己烷磺酸钠 (批号 22767-50-6) 和 β-葡萄糖醛酸酶 (142 900 U·mL⁻¹, 批号 9001-45-1) 为 Sigma 公司产品; 乙腈、正己烷为色谱纯 (Tedia 公司产品)。

Perkin-Elmer GeneAmp PCR system 2400; Sigma 3K30 低温高速离心机。高效液相色谱仪: Agilent1100 系列液相色谱系统, 荧光检测器, HP 色谱工作站, 色谱柱和预柱均为 Aglient 产品, XDB-Phenyl (4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 4.6 mm × 12.5 mm, 5 μm)。

受试者 384 名健康受试者 (汉族 132 人, 男 75, 女 57; 维吾尔族 136 人, 男 65, 女 71; 哈萨克族 116 人, 男 51, 女 65); 年龄分别为 (21.11±1.35), (20.01±2.01) 和 (19.84±1.92) 岁; 体重分别为 (59.36±9.82), (56.73±7.57) 和 (57.37±8.84) kg, 受试者均为新疆石河子大学和新疆维吾尔自治区供销学校的学生, 同一民族受试者, 经查证无异族通婚史。维吾尔族和哈萨克族是新疆境内原居住人群, 受试前临床生化检验肝、肾功能等项体检指标均正常, 不嗜烟酒, 受

试前 1 周内未服用任何药物, 并签署知情同意书, 本项目通过新疆石河子大学医学院伦理委员会批准。

样品采集 受试者于服药前日晚餐后, 禁食。受试日早晨首先采集上肢静脉血 3 mL, 置含有抗凝剂 EDTA 的试管中, 用于提取 DNA 进行基因分型。然后每人空腹温开水吞服右美沙芬片 30 mg。服药后禁食 1.5 h, 受试期间统一饮食, 收集 8 h 内全部尿样, 用于右美沙芬和去甲右美沙芬的检测。

基因扩增 按照基因组 DNA 抽提试剂盒 (Sangon 产品) 说明书方法提取 DNA。依据文献^[13]报道 (表 1, 引物由 Sangon 合成), 采用等位基因特异扩增法 (ASA-PCR 两步法, 图 1)。通过第 1 步扩增得到特异的 CYP2D6 基因片段, 排除了 CYP2D7 和 CYP2D8P 假基因的干扰。CPY2D6*3^[14]是在外显子 5 第 2 637 位碱基对缺失 A, 导致阅读框架移码, 使 CPY2D6 活性丧失; CPY2D6*4 是在外显子 4 的接口处出现 C1934→T 拼接错误, 使 RNA 剪切改变, 引起氨基酸的替换, 使 CPY2D6 的活性丧失。第 1 步: 引物为 1BF, 2AR, rTth DNA 聚合酶, 94 °C 预变性 1 min, 以 93 °C × 1 min, 58 °C × 0.5 min, 72 °C × 5 min 扩增 35 个循环, 得到 1 818 bp 片段。

Table 1 Sequence and location of primers for the PCR detection of the *3, *4 and wild-type alleles of the CYP2D6 gene

Name	Primer sequence	Location
Universe primers		
1BF	5'-GCATTTCCCAGCTGGAATCC-3'	1 383 - 1 402
2AR	5'-CCGGCCCTGACACTCCTTCT-3'	3 200 - 3 181
CYP2D6*3		
FA5 (wild type)	5'-CTGCTAACTGAGCACA-3'	2 622 - 2 637
FA6 (*3 allele)	5'-CTGCTAACTGAGCACG-3'	2 622 - 2 637
CYP2D6*4		
RB7 (wild type)	5'-GGCGAAAGGGGCGTCC-3'	1 949 - 1 934
RB8 (*4 allele)	5'-GGCGAAAGGGGCGTCT-3'	1 949 - 1 934

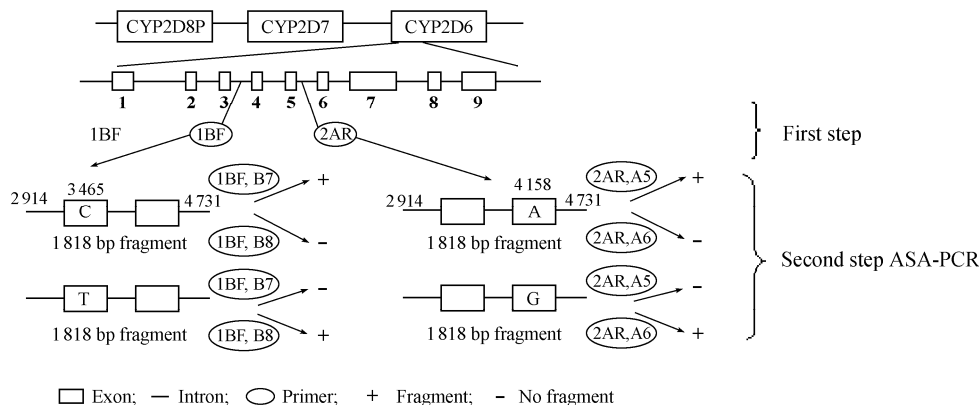


Figure 1 A schematic diagram of allele specific PCR amplification of CYP2D6*4 and CYP2D6*3 genes

第2步: CYP2D6*3 基因检测; 取 1 818 bp 片段为模板, 以引物 2AR, FA5 (CYP2D6*3 野生型引物对) 或 2AR, FA6 (CYP2D6*3 突变引物对), Tag DNA 聚合酶, 94 °C × 1 min, 48 °C × 1 min, 72 °C × 1.5 min 扩增 16 个循环, 得到 579 bp 片段, 电泳分析出 CYP2D6*3 纯合型野生等位基因 (*1/*1); 纯合型突变等位基因 (*3/*3); 杂合型等位基因 (*1/*3)。

CYP2D6*4 基因检测; 取 1 818 bp 片段为模板, 以引物 1BF, RB7 (CYP2D6*4 野生型引物对) 或 1BF, RB8 (CYP2D6*4 突变引物对), Tag DNA 聚合酶, 94 °C × 1 min, 48 °C × 1 min, 72 °C × 1.5 min 扩增 16 个循环。得到 567 bp 片段, 电泳分析出 CYP2D6*4 纯合型野生等位基因 (*1/*1); 纯合型突变等位基因 (*4/*4); 杂合型等位基因 (*1/*4)。

操作时带有阴性质控和阳性质控, 避免出现假阴性和假阳性, 以确保结果的准确性。

基因测序 随机抽取数份 CYP2D6*3 和 CYP2D6*4 基因突变样品送上海生工生物工程公司测序, 结果显示两种基因的突变位点与引物设计一致, CYP2D6*3 在 2 637 位点由 A→G, CYP2D6*4 在外显子 4 接口处出现 C→T, 与 PCR 扩增结果一致。

统计学分析 汉族、维吾尔族、哈萨克族受试人群中 CYP2D6*3、*4 突变基因和基因频率统计学分析采用 χ^2 检验。

结果

1 基因型分析

在 132 名汉族受试者中发现 CYP2D6*1/*3 基因 1 例 (0.76%), CYP2D6*1/*4 基因 1 例 (0.76%)。在 136 名维吾尔族受试者中发现 CYP2D6*1/*3 基因 4 例

(2.94%); CYP2D6*1/*4 基因 12 例 (8.82%), *4/*4 纯合突变基因 4 例 (2.94%), CYP2D6*3/*4 突变基因 1 例 (0.74%)。在 116 名哈萨克族受试者中发现 CYP2D6*1/*3 基因 2 例 (1.72%), CYP2D6*1/*4 基因 7 例 (6.03%), CYP2D6*4/*4 突变基因 1 例 (0.86%), 见表 2。

统计学分析表明: CYP2D6*3 基因频率在 3 个民族间没有显著差异; CYP2D6*4 基因频率在汉族与维吾尔族、汉族与哈萨克族间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 维吾尔族与哈萨克族间没有显著差异。

2 基因型与表型比较

汉族、维吾尔族、哈萨克族同一个受试人群的右美沙芬代谢表型分析^[12]表明, 在 132 名汉族受试者中有 1 名 (0.76%) 慢代谢者 (PMs); 136 名维吾尔族受试者中有 11 名 (8.09%) PMs; 116 名哈萨克族受试者中有 2 名 (1.72%) PMs。对汉族 1 名 PMs、维吾尔族 11 名 PMs、哈萨克族 2 名 PMs 的 CYP2D6*3 和 CYP2D6*4 基因检测结果 (表 3) 显示, 1 名汉族 PMs 基因检测未发现 CYP2D6*3 和 CYP2D6*4 基因突变。

维吾尔族受试人群的右美沙芬表型分析表明, 有 11 名 (8.09%) PMs, 与汉族受试人群 PMs 发生率 (0.76%) 有显著差异, CYP2D6*4 基因频率在这两个民族间也有显著差异, 表明这两个人群间存在遗传差异。但是, 在 11 名 PMs 中 CYP2D6*3、*4 的基因检测结果是: *4/*4 突变基因 4 例 (36.4%), *3/*4 突变基因 1 例 (9.1%), *1/*4 基因 3 例 (27.3%), *1/*1 基因 3 例 (27.3%)。维吾尔族人群中致慢代谢的缺陷基因 5 例 (3.68%), 表型与基因型的吻合率为 45.5%。右美沙芬代谢表型和基因型之间有较大差别, 说明 CYP2D6*3、*4 基因突变并不是导致维吾尔族人 PMs

Table 2 The occurrence of various genotypes and gene frequencies of CYP2D6*3 and *4 alleles in Chinese Han, Uygur and Kazakh ethnic groups

Population	CYP2D6*3 allele					CYP2D6*4 allele				
	*1/*1	*1/*3	*3/*4	*3/*3	Gene frequency/%	*1/*1	*1/*4	*3/*4	*4/*4	Gene frequency/%
Han	131	1	0	0	0.38	131	1	0	0	0.38
Uygur	132	3	1	0	1.47	120	11	1	4	7.35
Kazakh	114	2	0	0	0.86	108	7	0	1	3.88

Table 3 The detecting results of CYP2D6*3 and *4 alleles in 1 Chinese Han, 11 Uygur and 2 Kazakh of PMs

Population	Poor metabolizer	CYP2D6*3, *4											
		*1/*1	%	*1/*3	%	*3/*3	%	*1/*4	%	*4/*4	%	*3/*4	%
Han	1	1	100.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Uygur	11	3	27.3	0	0.0	0	0.0	3	27.3	4	36.4	1	9.1
Kazakh	2	1	50.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	50.0	0	0.0

发生的主要原因, 主要造成维吾尔族人慢代谢的缺陷基因有待进一步研究。

哈萨克族受试者中 2 名 PMs 中有 1 名为 CYP2D6 *4/*4 基因突变, 表型与基因型的吻合率为 50%, 仍有相当一部分缺陷基因未被发现。

3 个民族人群基因型与表型比较显示: CYP2D6 介导的药物代谢表型以及发生的机制在汉族与维吾尔族人群间存在遗传差异; 在哈萨克族与汉族人群间未发现不同; 维吾尔族和白种人慢代谢发生率吻合, 但在慢代谢发生的机制方面存在较大不同。3 个民族人群受试者表型与基因型分布见图 2。

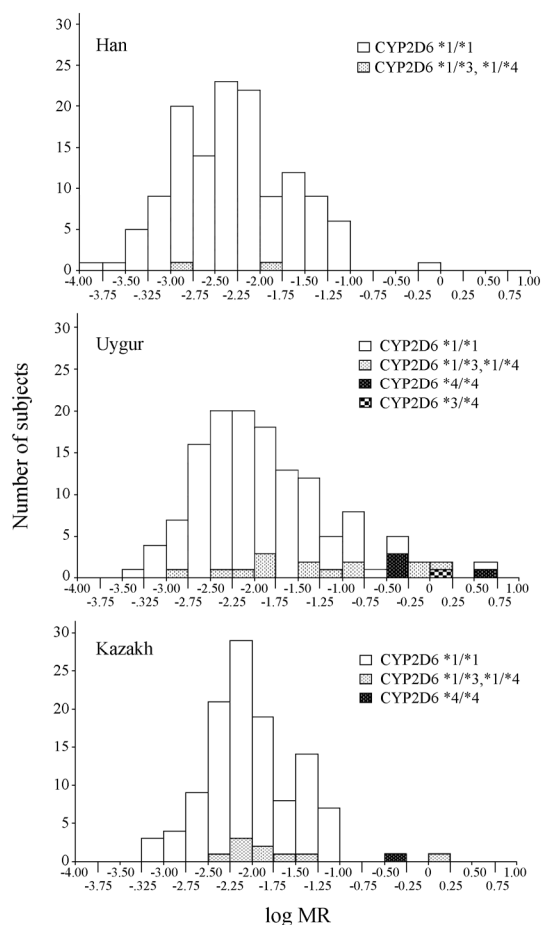


Figure 2 Influence of CYP2D6*3 and *4 genotype on the phenotype of CYP2D6 in Han, Uyghur and Kazakh subjects. MR: Metabolic ratio

3 不同民族人群受试者间比较

汉族、维吾尔族、哈萨克族 CYP2D6*3、*4 基因型与表型的样品采集和分析是在等同条件下选择的, 是这 3 个民族的同一批受试人群。避免了不同受试者机体内生物特性的差异, 便于分析基因型与表型的直接联系, 且能反映基因型与表型的内在关系。

采用 SPSS 软件对 3 个民族间性别统计分析: $\chi^2 = 4.399, P = 0.111$; 3 个民族间年龄统计分析: $F = 2.652, P = 0.072$ 。

讨论

右美沙芬在体内的代谢为 CYP2D6 基因调控^[15], 而与右美沙芬慢代谢表型主要相关的缺陷等位基因 CYP2D6*3、*4 等多在白种人中发现, 很少在汉族人中找到。本研究显示, 在 132 名汉族受试人群中 131 名 EMs 和 1 名 PMs (0.76%), 基因检测中没有发现 CYP2D6*3、*4 突变型基因, 这和文献报道^[16, 17] 结果基本一致。

资料显示: 到目前为止, 在白种人中最频繁出现的无效等位基因是 CYP2D6*4, 其等位基因频率大约在 20%~25%, 并且在所有 PM 表型中的 70%~90% 是由它引起的^[18]。维吾尔族受试人群中 PM 发生率 8.09%, 这和白种人群中 PM 发生率是吻合的。但是, 维吾尔族人群中 CYP2D6*4、*3 突变基因 5 例 (3.68%), 在 11 名 PMs 中只占 45.5%, CYP2D6*4 基因频率为 7.35%。表明维吾尔族人和高加索人在慢代谢发生的机制方面存在较大差别, 同时也提示维吾尔族人含有部分与高加索人相同的缺陷等位基因。

哈萨克族受试人群中 PM 发生率 1.72%, 维吾尔族人群慢代谢发生率 8.09%, 哈萨克族与维吾尔族人群间有显著差异。但是, CYP2D6*3、*4 基因频率哈萨克族是 0.86% 和 3.88%, 维吾尔族是 1.47% 和 7.35%, 统计分析显示两个民族间没有显著差异。资料报道这两个民族较接近, 同属于蒙古人的中亚人种, 混有高加索人种血缘, 但可能混有的程度在群体内部也不均一, 而引起这两个民族内部变异的程度比较大, 毕竟这两个民族的起源不同^[9, 19]。然而, 哈萨克族与维吾尔族人群右美沙芬代谢表型与 CYP2D6 *3、*4 基因型的研究结果, 或许是一个例子。

遗传因素是导致药物代谢种族差异和个体差异的主要因素之一。中国作为一个幅员辽阔, 民族众多的国家, 由于地域和历史的原因, 在不同民族人群间存在遗传多态性。对 3 个民族人群基因型和表型的研究, 不仅探明不同民族间存在的遗传差异, 也将有助于阐明药物代谢在种族和个体间差异的机制, 为不同民族人群临床安全有效用药提供一个准确的用药剂量和药物相互作用的理论依据。

致谢: 本研究得到复旦大学药学院蔡卫民教授的大力支持, 特此致谢!

References

- [1] Benny K, Adithan C. Genetic polymorphism of CYP2D6 [J]. *Indian J Pharmacol*, 2001, 33: 147-169.
- [2] Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, et al. Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6 [J]. *Pharmacogenetics*, 2001, 11: 573-585.
- [3] Bertilsson L, Lou YQ, Du YL, et al. Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylations of debrisoquin and *S*-mephenytoin [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1992, 51: 388-397.
- [4] Sohn DR, Shin SG, Park CW, et al. Metoprolol oxidation polymorphism in a Korean populations: comparison with native Japanese and Chinese populations [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1991, 32: 504-507.
- [5] Sachse C, Brockmüller J, Bouer S, et al. Cytochrome P4502D6 variants in a Caucasian population: frequencies and phenotypic consequences [J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 60: 284-295.
- [6] Schmid B, Bricher J, Preisig R, et al. Polymorphic dextromethorphan metabolism: co-segregation of oxidative *O*-demethylation with debrisoquin hydroxylation [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1985, 38: 618-624.
- [7] Ai QH, Xiao H, Zhao JX, et al. A survey on physical characteristics of Uygur nationality [J]. *Acta Anthrop Sin (人类学学报)*, 1993, 12: 357-364.
- [8] Cui J, Shao XZ, Wang JL, et al. Anthropological survey on Hasake nationality in Xinjiang Uygur autonomous region [J]. *Acta Anthrop Sin (人类学学报)*, 1991, 10: 305-312.
- [9] Yuan YD, Du RF. The pilot study of the genetic distance in Chinese seventeen nationalities [J]. *Acta Gene Sin (遗传学报)*, 1983, 10: 398-405.
- [10] Yu MS, Qiu XF, Xue JL, et al. Study on the polymorphism of mitochondrion DNA in Han, Uygur, Hasake and Hui nationalities in China [J]. *Chin Sci (B) (中国科学 B 辑)*, 1988, (1): 60-70.
- [11] Zhao TM, Zhang GL, Yuan YD, et al. The genetic distance of populations calculated by frequency of HLA gene [J]. *Acta Anthrop Sin (人类学学报)*, 1984, 3: 165-169.
- [12] Li GC, Chen Y, Chen W, et al. Study on the phenotype in the metabolic polymorphism of dextromethorphan in Han, Uygur, Hasake nationalities [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2004, 20: 104-108.
- [13] Chen SQ, Chou WH, Robert A, et al. The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1996, 60: 522-533.
- [14] Evans WE, Relling MV. Concordance of P450 2D6 (debrisoquine hydroxylase) phenotype and genotype: inability of dextromethorphan metabolic ratio to discriminate reliably heterozygous and homozygous extensive metabolizers [J]. *Pharmacogenetics*, 1991, 1: 143-148.
- [15] Kupfer A, Schmid B, Preisig R, et al. Dextromethorphan as a safe probe for debrisoquine hydroxylation polymorphism [J]. *Lancet*, 1984, 2: 517-518.
- [16] Lee EJ, Jeyaseelan K. Frequency of human CYP2D6 mutant alleles in a normal Chinese population [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1994, 37: 605-607.
- [17] Wang SL, Huang JD, Lai MD, et al. Molecular basis of genetic variation in debrisoquin hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RFLP and DNA sequence of CYP2D6 [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1993, 53: 410-418.
- [18] Xu TX, Yang XY, Zhao K, et al. Progress on research for genetic polymorphism of drug metabolic enzyme cytochrome P450 2D6 [J]. *Chin J Antibio (中国抗生素杂志)*, 2009, 34: 385-391.
- [19] Feng JS, Cheng SL, Mu GW. Brief Edition of Uygur Historical Documents (维吾尔族史料简编) [M]. 3rd ed. Beijing: Nationalities Publishing House, 1981: 1-61.