

与 CYPOR 共表达 CYP2D6*1 和 CYP2D6*10 及其代谢活性比较

钱鸣蓉^{1,2}, 陈 静¹, 刘 瑶¹, 余露山¹, 陈枢青¹, 曾 苏^{1*}

(1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058; 2. 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要: 细胞色素 P450 2D6 (cytochrome P450 2D6, CYP2D6) 是一种重要的氧化代谢酶, 呈基因多态性, 对药物的代谢呈现明显的个体差异和种族差异, CYP2D6*10 在中国人群中的发生率高达 51.3%。采用杆状病毒昆虫表达系统, 采用与细胞色素氧化还原酶 (cytochrome oxidoreductase, CYPOR) 共表达的方式获得具有代谢活性的 CYP2D6*1/CYP2D6*10, 并初步研究其催化右美沙芬的代谢活性差异。构建重组质粒 pFastBac-CYP2D6*1, pFastBac-CYP2D6*10 和 pFastBac-CYPOR, 并分别转化 DH10Bac 菌株构建重组 Bacmid-CYPOR, Bacmid-CYP2D6*1 和 Bacmid-CYP2D6*10, 转染 Sf9 昆虫细胞, 获得重组杆状病毒用于病毒扩增和感染 Sf9 昆虫细胞。通过测定混悬蛋白催化右美沙芬的速率来优化重组 CYPOR 和 CYP2D6 病毒感染 Sf9 昆虫细胞的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 值和其比例, 获得活力较高的重组 CYP2D6*1 和 CYP2D6*10。重组 CYP2D6*1 催化右美沙芬的 K_m 为 $(26.67 \pm 2.71) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=3$), $V_{\max}$ 为 $(666.7 \pm 56.78) \text{pmol} \cdot \text{nmol}^{-1}(\text{CYP2D6}) \cdot \text{min}^{-1}$ ($n=3$), 清除率为 25.0; CYP2D6*10 催化右美沙芬的 K_m 为 $(111.36 \pm 10.89) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=3$), $V_{\max}$ 为 $(222.2 \pm 20.12) \text{pmol} \cdot \text{nmol}^{-1}(\text{CYP2D6}) \cdot \text{min}^{-1}$ ($n=3$), 清除率为 2.0。利用杆状病毒昆虫细胞系统表达的重组 CYP2D6*1 和 CYP2D6*10 代谢药物具有活性差异, 可用于体外研究其催化某些药物的代谢差异, 这有助于理解药物代谢的个体差异、预测药物之间的相互作用。

关键词: 昆虫表达系统; 细胞色素 P450 2D6*1; 细胞色素 P450 2D6*10; 细胞色素氧化还原酶; 代谢差异

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 02-0207-06

CYP2D6*1, CYP2D6*10 co-expressed with CYPOR in Bac-to-Bac expression system and activity determination

QIAN Ming-rong^{1,2}, CHEN Jing¹, LIU Yao¹, YU Lu-shan¹, CHEN Shu-qing¹, ZENG Su^{1*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

2. Institute of Quality Standards for Agricultural Products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: CYP2D6 is an important drug-metabolizing enzyme. The polymorphism of CYP2D6 leads to metabolism difference and the different reactions of drugs in the individuals and different races are normal phenomenon in clinical medication. CYP2D6*10 is an important subtype in Asian people and 51.3% Chinese are classified with this subtype. To obtain recombinant active CYP2D6*1/CYP2D6*10 in baculovirus system by optimizing coexpression with CYPOR, and detect their activity to catalyze dextromethorphan, three recombinants pFastBac-CYP2D6*1, pFastBac-CYP2D6*10 and pFastBac-CYPOR were constructed and transformed into DH10Bac cell to obtain the recombinant Bacmid-CYPOR, Bacmid-CYP2D6*1 and Bacmid-CYP2D6*10. And then the recombinant CYP2D6*1 and CYP2D6*10 virus were obtained by transfecting Sf9. Then homogenate protein activity was determined with dextromethorphan as substrate. The multiple of infection (MOI) and its ratio of recombinant CYP2D6 virus to CYPOR virus were adjusted by detecting the activity of the homogenate

收稿日期: 2010-09-01.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项课题临床前药物代谢动力学技术平台 (2009ZX09304-003).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-571-88208407, E-mail: zengsu@zju.edu.cn

protein. The K_m and V_{max} are $26.67 \pm 2.71 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=3$) and $666.7 \pm 56.78 \text{ pmol} \cdot \text{nmol}^{-1}(\text{CYP2D6}) \cdot \text{min}^{-1}$ ($n=3$) for CYP2D6*1 to catalyze dextromethaphan. The K_m and V_{max} are $111.36 \pm 10.89 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=3$) and $222.2 \pm 20.12 \text{ pmol} \cdot \text{nmol}^{-1}(\text{CYP2D6}) \cdot \text{min}^{-1}$ ($n=3$) for CYP2D6*10 to catalyze dextromethorphan. There is significant difference between CYP2D6*1 and CYP2D6*10 for V_{max} and K_m ($P<0.01$). The clearance ratio of CYP2D6*1 is 25.0 and the clearance ratio of CYP2D6*10 is 2.0. The expressed CYP2D6*1 and CYP2D6*10 are useful tools to screen the metabolism profile of many xenobiotics and endobiotics *in vitro*, which are benefit to understand individual metabolism difference.

Key words: baculovirus; CYP2D6*1; CYP2D6*10; CYPOR; metabolism difference

药物在体内的生物转化有其相关的酶系, 由主要分布在肝脏中的 CYP450 酶系进行 I 相代谢转化。CYP450 是一组结构和功能相关的超基因家族编码的同工酶。在人类 P450 超家族中, 主要有 CYP1-3 三个家族酶系在体内参与外源性物质的转化, 其中 CYP2D6 是一种重要的氧化代谢酶^[1]。CYP2D6 在肝中仅占 CYP450 总含量的 1%, 但可以催化抗心律失常药、 β 受体阻断药、抗高血压药、三环类抗抑郁药等 30 多类药物的代谢^[2], 发挥多种环境和生物毒素的解毒作用, 该酶在肝脏通过羟化等生物转化使这些药物和生物毒素等降解, 然后经肾脏排出^[3]。因此 CYP2D6 在药物毒理学和药代动力学等方面的研究受到广泛的重视。

药物代谢多态性可以引起病人临床用药的疗效或毒性差异^[4]。CYP2D6 基因位于 22 号常染色体上, 基因呈多态性, 约有 70 多种等位基因突变体, 对药物的代谢呈现明显的个体差异和种族差异, 这是造成临床用药个体差异的主要原因。其中 CYP2D6*10 在中国人群中的发生率高达 51.3%^[3], 与 CYP2D6*1 比较, 氨基酸的相应变化是 34 位 Ser 变为 Pro, 486 位 Thr 变为 Ser。

CYPOR 是一个位于大多数细胞的核膜和内质网上的黄素蛋白, 它可以在还原型辅酶 II (NADPH) 与 CYP450 之间传递电子。它是分子量约为 78 kD 的膜结合蛋白, 以黄素为辅基, 由一摩尔脱辅基蛋白加上一摩尔黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavine-adenine dinucleotide, FAD) 和一摩尔黄素单核苷酸 (flavin mononucleotide, FMN) 构成, 它的作用是在内部电子传递链中, 把电子从 NADPH 传递到 FAD 再到 FMN, 最后到细胞色素 P450^[5, 6]。

为了研究 CYP2D6 及其突变体的活性差异, 本实验利用定点突变的方法将 CYP2D6*10 变为 CYP2D6*1, 在杆状病毒昆虫细胞表达系统中共表达了 CYPOR 与 CYP2D6*1/CYP2D6*10, 并用右美沙芬作为其底物测定了酶活性, 比较了 CYP2D6*1 和

CYP2D6*10 催化代谢右美沙芬的酶动力学差异。

材料与方法

实验材料 大肠杆菌菌株 *E.coli* DH10Bac 和 pFastBacTM 载体购于 Invitrogen 公司。草地夜蛾卵巢细胞 Sf9 购于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), pGEM-T 载体购于 Promega 公司。右美沙芬购自中国药品生物制品检定所; 右羟吗啡、氯高铁血红素 (hemin)、异柠檬酸、异柠檬酸脱氢酶、NADPH、NADP⁺、细胞色素 c、6-磷酸葡萄糖脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖购自 Sigma 公司。工具酶、引物和其他常用分子生物学试剂均购自上海生物工程有限公司; 突变试剂盒购于 TaKaRa 公司; Grace's 培养基购于 Gibco 公司。

PCR 扩增仪 (Eppendorf); Centrifuge 5415 离心机 (Eppendorf); EC 250-90 电泳仪 (BIORAD 公司); 凝胶成像系统 (BIORAD 公司); 核酸蛋白测定仪 (安玛西亚公司); 液相色谱仪 (Shimadzu LC-10AT); Esquire 3000 plus 型电喷雾 LC-MS 质谱仪 (Bruker 公司)。

CYP2D6*1, CYP2D6*10, CYPOR 克隆的重组构建 以肝组织为模板, 通过 Trizol 试剂提取总 RNA, 通过 RT-PCR, 分别得到 CYPOR 的 cDNA 的前后两端序列。上部分的上下游引物序列分别为 5'-GAATTC GCCAGCGTTTCATGATCAAC-3', 5'-ACATGACGAC GTCCAGGTCGG-3', 下部分的上下游引物序列分别为: 5'-CCGACCTGGACGTCGTCATGT-3', 5'-ATTAG AATTCATGGGAGACTCCCACGTGGAC-3'。经测序鉴定正确后 (GenBank: NM_000941, 用 *EcoR* I、*Aat* II 和 *Xho* I 3 个酶切位点, 将 pFastBac 载体和 CYPOR 的 cDNA 片段连接)。CYP2D6*10 由浙江大学生理病理教研室赠予^[7], 采用 TaKaRa 突变试剂盒, 将 100 位的 T > C, 1 486 位的 A > T 得到 CYP2D6*1 基因, 采用 *EcoR* I 和 *Xho* I 两个酶切位点, 将 pFastBac 分

别与 *CYP2D6*1*, *CYP2D6*10* 的 cDNA 连接。分别将 pFastBac-CYPOR, pFastBac-2D6*1 和 pFastBac-2D6*10 转化 DH10Bac 感受态细胞, 采用碱裂解法提取重组的 Bacmid-2D6*1, Bacmid-2D6*10 以及 Bacmid-CYPOR。

重组 CYP2D6 的优化表达 将重组粘粒 Bacmid-2D6*1, Bacmid-2D6*10 以及 Bacmid-CYPOR 通过脂质体转导进 Sf9 细胞。大约 96 h 左右, 待细胞出现明显感染症状时, 收集病毒液, 4 °C 避光保存。扩增病毒, 采用噬斑实验测定病毒的滴度。通过测定含重组 CYP2D6 的 Sf9 细胞混悬液催化右美沙芬代谢的活力, 优化重组 CYP2D6 杆状病毒和重组 CYPOR 杆状病毒感染 Sf9 昆虫细胞所需的 MOI 值及两者比例。

CO 差分分光光度法测定重组酶中 P450 的含量 感染 Sf9 细胞 24 h 后, 在培养基中加氯高铁血红素至 $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 再过 72 h, 收集细胞。用 PBS 洗涤 3 遍。最后加入一定量的溶液 A (K_3PO_4 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 苯甲基磺酰氟 (PMSF) $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 20% 甘油), 超声破碎细胞 10 次, 每次 5 s, $1\,500\times g$ 离心 10 min, 将上清液转移到另一离心管, $10\,000\times g$ 4 °C 离心 60 min, 所得的膜沉淀溶解于一定量的溶液 B 中 (K_3PO_4 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 20% 的甘油), 匀浆混匀。

Sf9 细胞膜蛋白溶液 (约为 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 400 μL 稀释液 (K_3PO_4 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, EDTA $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 20% 甘油) 得到 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白混合液, 加入少许连二亚硫酸钠固体颗粒, 混匀分装于 2 个样品池体积为 200 μL 的比色杯中, 一个比色杯用分光光度计扫描 400~500 nm 的吸收值曲线, 作为校准基线; 另一个比色杯通入 CO 20 s 后, 同样扫描吸收曲线, 计算 $\Delta A_{450-490}$ 的值, 根据 $\varepsilon = 91 (\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm})^{-1}$ 计算蛋白中 CYP450 的含量^[8]。

重组 CYP2D6*1 和 CYP2D6*10 催化右美沙芬的代谢 测定右美沙芬和右羟吗喃的流动相条件为: $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 缓冲液添加 5% 三乙胺 (采用磷酸调节至 pH 2.5)-乙腈 (78 : 22); 流速为 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。采用荧光检测器: 激发波长为 280 nm, 发射波长为 310 nm。代谢孵育体系为 200 μL , 在孵育液中加入重组 CYP2D6 膜蛋白和右美沙芬, 37 °C 预孵育 5 min 后加入 NADPH (10 mg NADPH, 20 mg NADP 溶解于 1 mL 1% NaHCO_3) 2 μL 启动反应。在含 CYP2D6*1 的孵育液中, 右美沙芬的孵育浓度为 $1.56\sim 1\,000.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 在含 CYP2D6*10 的孵育液中, 右美沙芬

的孵育浓度为 $15.63\sim 4\,000.00 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 孵育一定时间后, 加入 36% 高氯酸 50 μL , 混匀后冰上放置数分钟, $13\,000\times g$ 离心 20 min, 取上清液进样, 根据标准曲线计算代谢生成的右羟吗喃的量。

结果

1 *CYP2D6*1* 和 *CYP2D6*10* 重组构建的结果

1.1 *CYP2D6*1* 和 *CYP2D6*10* 重组子的酶切鉴定 鉴定结果见图 1。

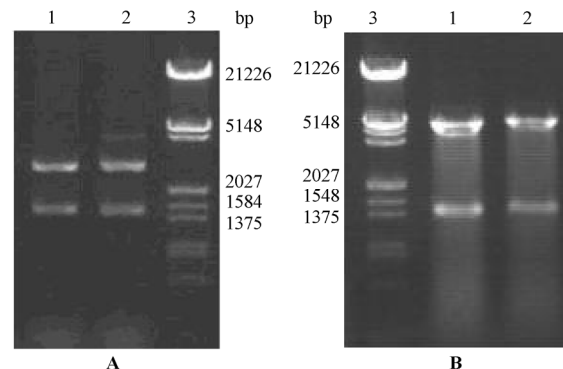


Figure 1 Identification of the *CYP2D6*1/10* recombinants by electrophoresis. **A**: Lane 1-2: The recombinant pGEM-2D6*1 and pGEM-2D6*10 digested by *EcoR* I and *Xho* I; Lane 3: Marker (λ DNA/*EcoR* I and *Hind* III); **B**: Lane 1-2: The recombinant pFastBac-2D6*1 and pFastBac-2D6*10 digested by *EcoR* I and *Xho* I; Lane 3: Marker (λ DNA/*EcoR* I and *Hind* III)

1.2 CYPOR 重组子的酶切鉴定 获得正确的 pGEMT-CYPOR 上下游克隆 (**A**)。预计两段各在 1 000 bp 左右, 图 2 中显示结果正确, 之后成功构建 pFastBac-CYPOR 重组质粒 (**B**)。

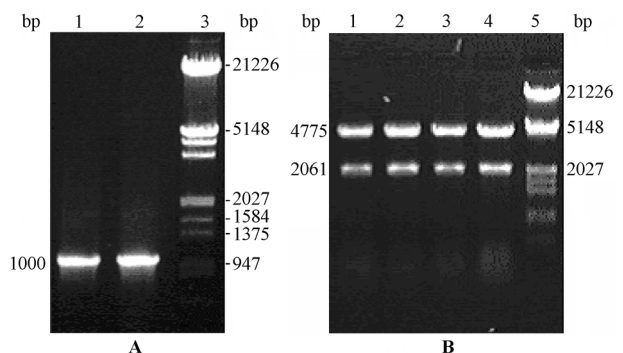


Figure 2 Identification of the CYPOR by electrophoresis. **A**: The PCR product of upper and down part of CYPOR. Lane 1: Upper part of CYPOR; Lane 2: Down part of CYPOR; Lane 3: Marker (λ DNA/*EcoR* I and *Hind* III); **B**: Lane 1-4: The recombinant of pFastBac-CYPOR digested by *EcoR* I and *Xho* I; Lane 5: Marker (λ DNA/*EcoR* I and *Hind* III)

1.3 重组粘粒的 PCR 鉴定结果 用 M13-(+) and M13-(-) 作为引物, 采用 PCR 的方法对重组的 Bacmid-CYP2D6*1、Bacmid-CYP2D6*10 和 Bacmid-CYPOR 进行验证, 结果显示正确 (图 3)。

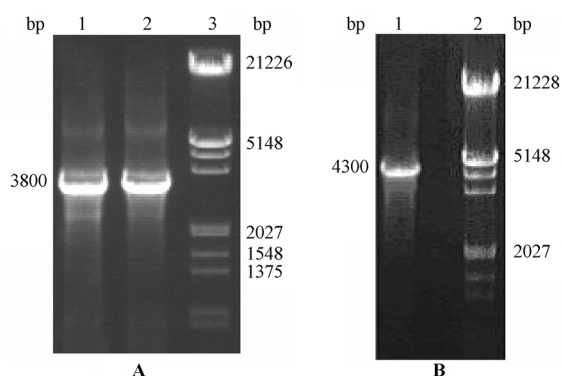


Figure 3 The recombinant Bacmids were identified by PCR with the primers of M13-(+) and M13-(-). **A:** Lane 1: The PCR product from Bacmid-CYP2D6*1; Lane 2: The PCR product from Bacmid-CYP2D6*10. Lane 3: Marker (λ DNA/EcoR I and Hind III); **B:** Lane 1: The PCR product from Bacmid-CYPOR; Lane 2: Marker (λ DNA/EcoR I and Hind III)

2 优化重组 CYP2D6*1 的杆状病毒 (v2D6*1) 和重组 CYPOR 杆状病毒 (vOR) 的 MOI 值以及两者之间的比例

2.1 优化 v2D6*1 的 MOI 值 采用培养密度达到 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 的贴壁细胞, v2D6*1 的 MOI 研究范围为: 0.03、0.12、0.24、0.36 和 0.72, vOR 与 v2D6*1 的 MOI 值比例固定为 1:9, 24 h 后, 加入氯高铁血红素浓度至 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表达时间为 96 h。收集细胞, 反复冻融 3 次后超声破碎, 测定细胞混悬液的蛋白浓度, 检测其代谢右美沙芬的活性。底物浓度为 $30.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 孵育时间为 20 min。每个点为 3 次重复实验的平均值 (图 4)。

2.2 vOR 与 v2D6*1 的比例优化 采用培养密度达到 $3 \times 10^5/\text{mL}$ 的贴壁细胞, v2D6*1 的 MOI 值选定

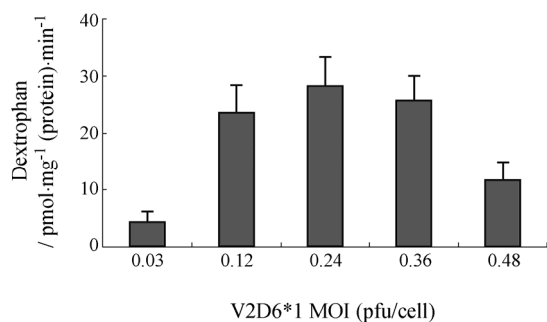


Figure 4 Effect of v2D6*1 and vOR on CYP2D6*1 catalyzing dextromethorphan. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

为 0.24, vOR 与 v2D6*1 的比例范围为: 1:36、1:18、1:9、1:3 和 1:1, 24 h 后, 加入氯高铁血红素至 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表达时间为 96 h, 测定这些重组蛋白酶的活性, 结果见图 5。

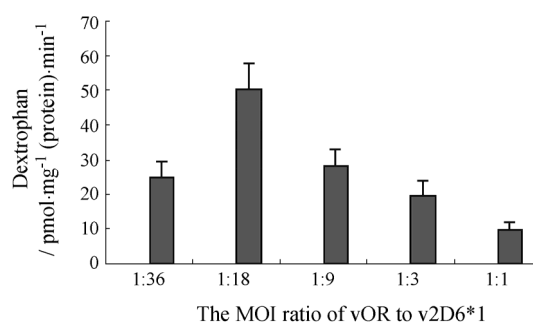


Figure 5 Effect of the MOI ratio of vOR to vCYP2D6*1 on CYP2D6*1 catalyzing dextromethorphan. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 CO 差示分光光度法定量重组 CYP2D6*1 和 CYP2D6*10

按 MOI 比为 18:1, 分别选取 vCYP2D6*1 的 MOI 值为 0.24, vCYPOR 的 MOI 值为 0.013, 用 CO 差示光谱法扫描重组表达后经超速离心所得的 CYP2D6*1 膜蛋白成分, 根据公式 (每 mg 蛋白含 P450 的量 = $\Delta A_{450-490} / C \times 0.091$) 计算 CYP2D6*1 的含量为 $0.21 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{protein})$ 。

vCYP2D6*10 与 vCYPOR 的 MOI 和两者比例的选择与 CYP2D6*1 相似, 最后选择 vCYP2D6*10 的 MOI 值为 0.35, vCYPOR 的 MOI 值为 0.04。用 CO 差示光谱法扫描重组表达后经超速离心所得的 CYP2D6*10 膜蛋白成分, 根据公式计算 CYP2D6*10 的含量为 $0.16 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}(\text{protein})$ 。

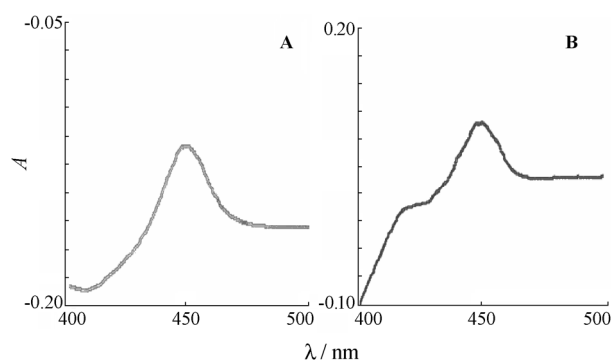


Figure 6 Carbon monoxide difference spectroscopy of CYP2D6*1 (A) and CYP2D6*10 (B)

3 重组表达的 CYP2D6*1 和 CYP2D6*10 代谢右美沙芬的动力学研究

CYP2D6*1 催化右美沙芬的动力学结果 (图 7), 根

据 Michaelis-Menten 方程计算所得结果 K_m 为 $(26.67 \pm 2.71) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=3$), $V_{\max}$ (以每 nmol CYP2D6*1 计) 为 $(666.7 \pm 56.78) \text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$ ($n=3$), 清除率为 25.0。

CYP2D6*10 催化右美沙芬的动力学结果 (图 8), 根据 Michaelis-Menten 方程, 计算所得结果 K_m 为 $(111.36 \pm 10.89) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=3$), $V_{\max}$ (以每 nmol CYP2D6*10 计) 为 $(222.2 \pm 20.12) \text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$ ($n=3$), 清除率为 2.0。

两个酶的 K_m 和 $V_{\max}$ 经 t 检验 $P < 0.01$, 都存在显著性差异, 清除率之比为 12.5。

讨论

现已有多种表达系统用于重组表达人 CYP450, 包括细菌、酵母、昆虫和哺乳动物细胞^[9]。其中, 昆虫细胞模型通过杆状病毒感染, 不仅可以比哺乳动物细胞获得表达更高的目的蛋白, 还可降低重组代谢酶的异源性^[10, 11]。

CYP450 催化的氧化还原反应需要 CYPOR 参与, 该酶主要起传递电子的作用, 它在 Sf9 细胞中表达量较低, 可以重组表达并纯化该酶, 在孵育时添加提高 CYP450 的反应活性。本实验采用 CYP2D6 与 CYPOR 共表达的方式^[12], 这是一种比较简便的方法, 不足之处是两种病毒共感染细胞会互相影响蛋白的表达,

因此需要对两种重组病毒的 MOI 比例进行优化。本实验的结果表明共表达 CYP2D6 需要 MOI 较低的 CYPOR 病毒。Sf9 细胞没有内源性的血红素, 而 P450 需要血红素结合才能形成有活性的结构, 但浓度过高的血红素对 Sf9 细胞有毒性, 会引起细胞的裂解, 本实验在外源表达的时候加入了 $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯高铁血红素。与 UGT 的表达相比较^[13], CYP2D6 表达所需的重组病毒滴度相对较低, 表达时间较长。由此可推测形成有活性的 CYP450 需要一个相对较长的时间。

CYP2D6*1 催化右美沙芬的动力学结果, 清除率为 25.0, 属于快代谢型; 而 CYP2D6*10 清除率为 2.0, 属于慢代谢型。这与文献^[14]报道结果一致, 同时与体内的结果也有很好的相关性。

CYP2D6 在肝脏中的含量较少, 约占 P450 总量的 1%, 但其所代谢药物的量却占 P450 所代谢药物的 30%, 对肝脏内药物和外源物代谢起重要作用。文献报道它主要参与代谢一些抗心律失常、抗抑郁和镇静药。CYP2D6 存在大量的多态性, 经研究, 51.3% 的中国人为 CYP2D6*10 亚型。CYP2D6*1 与 CYP2D6*10 之间氨基酸的变化为 34 位由 Pro 突变为 Ser, 486 位由 Ser 突变为 Thr。根据氨基酸结构分析, Ser 与 Thr 的结构相似, 而 Pro 的结构与 Ser 的结构相差较大, 推测 34 位的突变可能有比较重要的影响。根据临床

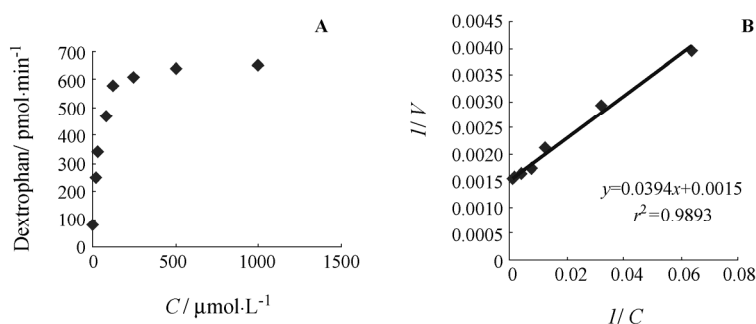


Figure 7 The kinetic curve for the dextromethorphan metabolized by CYP2D6*1 (per nmol)

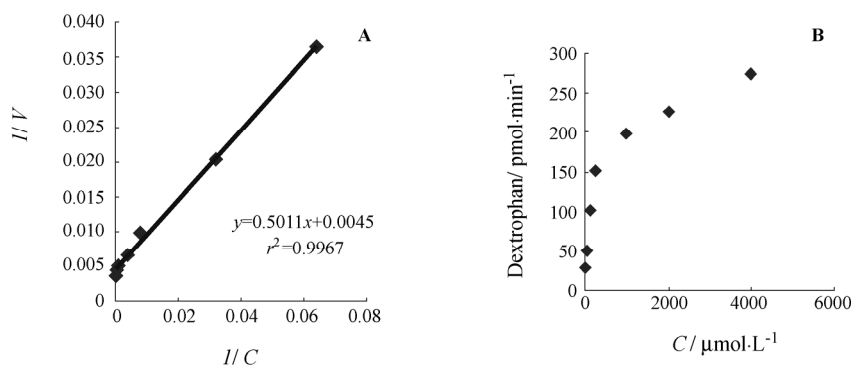


Figure 8 The kinetic curve for the dextromethorphan metabolized by CYP2D6*10 (per nmol)

司巴丁用药的代谢速率分型, CYP2D6*10 位基因属于中间代谢型, 但是 CYP2D6 突变体代谢药物产生的活性差异有底物依赖性^[15], 可用体外重组的 CYP2D6*1 和 CYP2D6*10 比较其催化一些药物的代谢差异, 这些数据有助于理解药物代谢的个体差异、预测药物之间的相互作用^[16]。

References

- [1] Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I [J]. Clin Pharmacokinet, 2009, 48: 689–723.
- [2] Zhao L, Lou YQ. Study of the molecular mechanism of human cytochrome P450 and genetic polymorphism of drug oxidative metabolizing enzyme [J]. Prog Physiol Sci (生理科学进展), 1997, 28: 35–40.
- [3] Chen B, Cai WM. Influence of CYP2D6*10B genotype on pharmacokinetics of propafenone enantiomers in Chinese subjects [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24: 1277–1280.
- [4] Chen Y, Chen S, Li X, et al. Genetic variants of human UGT1A3: functional characterization and frequency distribution in a Chinese Han population [J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34: 1462–1467.
- [5] Shen AL, Christensen MJ, Kasper CB. NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase. The role of cysteine 566 in catalysis and cofactor binding [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 19976–19980.
- [6] O'Leary KA, Kasper CB. Molecular basis for cell-specific regulation of the NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase gene [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 379: 97–108.
- [7] Zhuge J, Yu YN, Wu XD. Stable expression of human cytochrome P450 2D6*10 in HepG2 cells [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10: 234–237.
- [8] Zeng S. Drug Metabolism (药物代谢学) [M]. 2nd ed. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2008: 337.
- [9] Lv Q, Chen SQ, Zeng S. Study heterogenous expression and activity determination of human cytochrome P450 2B6 [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2007, 42: 1610–1614.
- [10] Lu K, Zeng S, Yao TW. Expression of human CYP2E1 in insect cells using bac-to-bac expression system [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci) (浙江大学学报医学版), 2008, 37: 118–125.
- [11] Wang XW, Zeng S. Heterogenous expression and activity analysis of human cytochrome P450 3A4 mutants CYP3A4. 3, CYP3A4. 4, CYP3A4. 5 and CYP3A4. 18 [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2009, 23: 456–463.
- [12] Dietrich M, Grundmann L, Kurr K, et al. Recombinant production of human microsomal cytochrome P450 2D6 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. ChemBioChem, 2005, 6: 2014–2022.
- [13] Zheng SL, Qian MR, Li X, et al. Expression of human UGT1A6 in insect cell with baculovirus expression system [J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2004, 18: 444–448.
- [14] Abduljalil K, Frank D, Gaedigk A, et al. Assessment of activity levels for CYP2D6*1, CYP2D6*2, and CYP2D6*41 genes by population pharmacokinetics of dextromethorphan [J]. Clin Pharmacol Ther, 2010, 88: 643–651.
- [15] Bapiro TE, Hasler JA, Ridderstrom M, et al. The molecular and enzyme kinetic basis for the diminished activity of the cytochrome P450 2D6.17 (CYP2D6.17) variant. Potential implications for CYP2D6 phenotyping studies and the clinical use of CYP2D6 substrate drugs in some African populations [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64: 1387–1398.
- [16] Schroth W, Goetz MP, Hamann U, et al. Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen [J]. J Am Med Assoc, 2009, 302: 1429–1436.