

亡而发挥抗肿瘤作用,这些结构类似的抗癌药物可以用诱导凋亡来评价其抗肿瘤作用。

现有的实验研究表明云南霉素可通过引起细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡来完成在体内外杀伤肿瘤细胞的作用,而其诱导肿瘤细胞凋亡的具体机制还需要做进一步研究,从而为云南霉素能应用于肿瘤治疗提供理论基础。

参考文献

- 1 胡继兰,李月英,张春颖,等. 新的抗肿瘤抗生素云南霉素 I 抗菌生物活性及产生菌的生物学[J]. 中国抗生素杂志,1998, 23(1): 100-103
- 2 陈文君,戚长菁,潘俊. 新的抗肿瘤抗生素云南霉素 II 提纯、理化性质与鉴别[J]. 中国抗生素杂志,1998,23(1):170-174
- 3 甄永苏,薛玉川,吴淑英,等. 新抗肿瘤抗生素云南霉素 III 抗肿瘤作用[J]. 中国抗生素杂志,1998,23(4):274-277
- 4 童彤,郭素萍,白瑾峰,等. 抗肿瘤抗生素云南霉素对细胞周期的作用及分子机理[J]. 癌症,2000,19(4):289-292
- 5 童彤,郭素平,韩迺珺. 阿糖胞苷及云南霉素的细胞周期阻滞作用

- 研究[J]. 中华肿瘤防治杂志,2006,13(20):1525-1529
- 6 ZhenYS, Qi CQ, Hu JL, *et al.* Antitumor activity of yunnanmycin, A novel pyrimidine nucleoside antibiotic[J]. Adv Exp Med Biol,1998, 431:575-579
- 7 郑艳波,许先栋,黄云虹,等. 云南霉素-RGD 二甲酯偶联物的合成及其抗肿瘤细胞侵袭活性[J]. 中国抗生素杂志,2009,34(2): 83-86
- 8 Christgen M, Schniewind B, Jueschke A, *et al.* Gemcitabine-mediated apoptosis is associated with increased CD95 surface expression but is not inhibited by DN-FADD in Colo357 pancreatic cancer cells[J]. Cancer Lett, 2005, 227(2):193-200
- 9 Arlt A, Mürköster SS, Schäfer H. Targeting apoptosis pathways in pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2010, 11:13
- 10 Ciccolini J, Fina F, Bezulier K, *et al.* Transmission of apoptosis in human colorectal tumor cells exposed to capecitabine, Xeloda, is mediated via Fas[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(11):923-927
- 11 Di Gennaro E, Piro G, Chianese MI, *et al.* Vorinostat synergises with capecitabine through upregulation of thymidine phosphorylase[J]. Br J Cancer, 2010, 103(11):1680-1691

(收稿:2010-12-23)

中国汉族人群 CYP2C9 常见多态性位点的检测及其与国外其他人群的比较研究

徐仁爱 戴大鹏 胡利明 杨莉萍 胡国新 蔡剑平

摘要 **目的** 检测中国汉族人群细胞色素 P450 2C9 (CYP2C9) 常见多态性位点的等位基因,为药物基因组学研究提供理论依据。**方法** 用聚合酶链反应产物直接测序和基因克隆测序法对 2127 例中国汉族人群 CYP2C9 基因常见多态性位点 CYP2C9 * 1、CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 等位基因进行检测,明确其在中国汉族人群中的等位基因及基因型频率分布,并与国外不同人群基因多态性进行比较研究。**结果** 中国汉族人群 CYP2C9 基因常见等位基因 CYP2C9 * 1、CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 的等位基因频率分别为 96.94%、0.14%、2.92%,常见基因型 CYP2C9 * 1/* 1、CYP2C9 * 1/* 2、CYP2C9 * 1/* 3、CYP2C9 * 3/* 3 的基因型频率分别为 94.12%、0.28%、5.36%、0.24%。**结论** 中国汉族人群 CYP2C9 基因中以 CYP2C9 * 1 等位基因为最常见,CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 是中国汉族人群罕见等位基因;中国人群 CYP2C9 基因的等位基因频率与日本人群相近,与法国、西班牙和意大利等欧洲人群差异有统计学意义,该研究结果将为我国的临床药物基因组学研究提供有价值的理论依据。

关键词 CYP2C9 基因多态性 基因分型

Polymorphism Analysis of CYP2C9 Common Alleles in Han Chinese. Xu Renai, Dai Dapeng, Hu Limin, Yang Liping, Cai Jianping. Department of Pharmacology, Wenzhou Medical College, Zhejiang 325035 China

Abstract Objective To investigate the genetic polymorphism of CYP2C9 in Han Chinese population and compare the distribution profile of CYP2C9 polymorphism with that of other races. **Methods** PCR combined with DNA sequencing method was used to analyze the sequences of CYP2C9 in 2127 healthy people from Han population in China. **Results** The allele frequencies of CYP2C9 * 1, CYP2C9 * 2

基金项目:科技部重大新药创制心脑血管疾病新药临床评价技术平台研究(2008ZX09312-005)

作者单位:325035 温州医学院药学院药理教研室(徐仁爱、胡利明、胡国新);100730 卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所/卫生部老年医学重点实验室(戴大鹏、蔡剑平);100730 卫生部北京医院药学部(杨莉萍)

通讯作者:蔡剑平,电子信箱:caijp61@vip.sina.com

and CYP2C9 * 3 were 96. 94% , 0. 14% , 2. 92% respectively. The genotype frequencies of CYP2C9 * 1/ * 1, CYP2C9 * 1/ * 2, CYP2C9 * 1/ * 3 and CYP2C9 * 3/ * 3 were 94. 12% , 0. 28% , 5. 36% , and 0. 24% respectively. **Conclusion** Our results showed that the distribution profile of CYP2C9 common alleles in Han population is similar to that of population in Japanese , whereas it is significantly different from that of French, Spain and Italian populations. The present data resulted from our study will be useful for the clinical drug therapy , especially for individual medicine of Han Chinese population.

Key words CYP2C9; Genetic polymorphism; Genotyping

细胞色素 P450 2C9 (cytochrome P450 2C9, CYP2C9) 是人类肝微粒体中一种重要的药物代谢酶, 大约有 16% 的临床药物经细胞色素 P450 2C9 代谢转化^[1]。随着药物遗传学研究的发展, 人们已认识到各种族间和个体间用药剂量的差异与药物代谢酶基因的遗传多态性相关。目前的研究表明, 人类细胞色素 P450 2C9 编码基因 CYP2C9 具有遗传多态性, 已发现 34 种由单核苷酸多态造成的等位基因变异体^[2]。在 CYP2C9 基因中研究较为深入的等位基因有 CYP2C9 * 1 (野生型)、CYP2C9 * 2 (突变型) 和 CYP2C9 * 3 (突变型)。CYP2C9 * 2 (Arg144Cys, 430C > T) 基因分型的变异位点分别位于第 3 号外显子, CYP2C9 * 3 (Ile359Leu, 1075A > C) 则位于第 7 号外显子。本研究用聚合酶链反应直接测序法, 以及基因克隆直接测序法对中国汉族人群 CYP2C9 基因的多态性开展了大样本的基因分型研究, 获得了迄今为止最为精确的分型结果, 并结合国外文献与国外不同人群进行了比较研究, 本研究的结果将为通过细胞色素

P450 2C9 代谢的治疗药物, 特别是治疗窗窄的药物如药华法林、苯妥英钠等的个体化给药提供理论依据。

材料与方法

- 1. 研究对象: 共有 1192 名浙江温州和 935 名河北保定无亲缘关系个体参加了本次研究, 均为我国汉族人。
- 2. 材料: (1) 主要试剂: Taq DNA 聚合酶, dNTP、DNA 相对分子质量梯度标准 Marker 等 (日本 TaKaRa 公司); E. Z. N. A. 胶回收试剂盒 (美国 Omega Bio - tek. 公司); CEQ™ DTCS Quick StartDNA 测序试剂盒 (美国 BeckmanCoulter 公司); 虾碱性磷酸酶 SAP (美国 promega 公司) 和核酸外切酶 Exo I (美国 NEB 公司)。(2) 仪器与耗材: 普通 PCR 仪 (美国 AB 公司)、电泳仪及水平电泳槽 (北京市六一仪器公司)、凝胶成像系统 (上海复日公司)、CEQ™ 8000 测序仪 (美国 Beckman-Coulter 公司)、UV200 紫外分光光度仪 (日本岛津公司)。所用常规耗材均购自 Axygen 公司。(3) 引物: 根据 CYP2C9 位点多态性和已知的 DNA 序列, 参照相关文献^[3~5]由上海英俊生物工程公司合成 PCR 扩增引物和测序用引物, 引物序列见表 1。

表 1 扩增 CYP2C9 基因所用引物序列

引物	引物序列 (5'→3')	扩增位点	扩增长度 (bp)	退火温度 (℃)
P1	F: TACAAATACAATGAAAATATCATG	CYP2C9 * 2	690	50
	R: CTAACAACCAGGACTCATAAT			
	S: CTAACAACCAGGACTCATAAT			
P2	F: CCCCTGAATTGCTACAACAAA	CYP2C9 * 3	345	59
	R: ACCCGGTGATGGTAGAGGTT			
	S: GATACTATGAATTTGGGACTTC			

F: 正向扩增引物; R: 反向扩增引物; S: 测序引物

3. 方法: (1) 基因组 DNA 的提取: 用 EDTA 抗凝真空采血管收集外周血 5 ~ 10ml, 采用盐析法提取基因组 DNA, - 20℃ 储存备用。(2) PCR 扩增: PCR 扩增采用 25μl 的反应体系, 内含 1 × PCR 缓冲液, MgCl₂ 为 1. 5mmol/L, 50 ~ 100ng 的基因组 DNA, 上下游引物均为 0. 2μmol/L, dNTP 为 0. 2mmol/L, TaKaRa rTaq DNA 聚合酶 0. 75U。PCR 扩增循环参数如下: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 退火 30s, 72℃ 延伸 30s, 30 个循环后再延伸 5min。用聚合酶链反应分别从基因组 DNA 中特异性的扩增 P450 2C9 基因的第 3 号外显子及第 7 号外显子。(3) DNA 产物测序分析: 参照 CEQ™ DTCS Quick Start

Kit 末端标记试剂盒说明, 取 5μl PCR 产物加入 0. 3μl 消化酶 (按虾碱性磷酸酶 SAP 及核酸外切酶 Exo I 16: 5 配制) 在 37℃ 反应 30min 去除寡核苷酸, 以测序引物进行扩增反应, 用 CEQ8000 自动序列分析仪进行核苷酸序列测定, 结果用 DNASTar 6. 0 软件进行比对, 识别变异序列。对不确定的序列需进行基因克隆测序分析。(4) 基因克隆测序分析: 将 P450 2C9 基因第 3 号外显子及第 7 号外显子的 PCR 扩增产物经电泳分离、切胶回收后与 pMD - 18T 载体连接, 形成 T 载体质粒, 分别以 M13 (- 47) 和 RV - M 引物对所有 T 载体质粒进行双向测序 PCR 反应, PCR 产物经乙醇沉淀、纯化后, 用

CEQ8000 自动序列分析仪进行核苷酸序列测定,输出序列经 DNASTar 6.0 和 Chromas 软件进行拼接和比对,验证各载体插入序列的正确性。(5)统计学分析:采用 SHEsis 软件平台进行各位点的 *Hardy - Weinberg* 平衡检验,其余数据均采用 SPSS 11.5 软件统计分析。用基因计数法计算 CYP2C9 等位基因和基因型频率,各组间等位基因频率和基因型频率的比较使用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CYP2C9 多态性位点的检测:我们用 PCR 产物直接测序法对 2127 名参试者的 CYP2C9 基因第 3 号外显子和第 7 号外显子进行了测序分析。通过对第 3 号外显子的检测分析发现第 430 号碱基存在 C > T 的基因结构改变,共发现 CC 和 CT 两种基因型。通

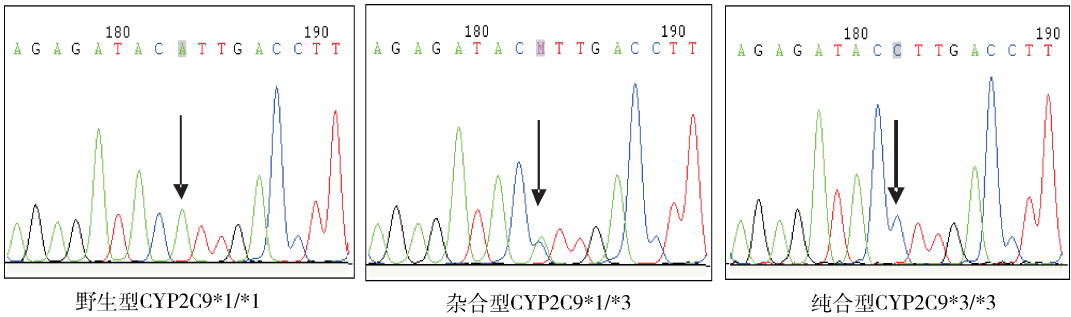


图 2 CYP2C9 * 3 各基因型代表性测序图

2. CYP2C9 常见多态性位点在中国汉族人群的分布结果:本研究通过对 2127 名例中国汉族人群 CYP2C9 常见多态性位点的检测分析,在中国北方汉族人群发现 6 例 CYP2C9 * 1 / * 2 杂合突变型、66 例 CYP2C9 * 1 / * 3 杂合突变型和 2 例 CYP2C9 * 3 / * 3 纯合突变型携带者;在中国南方汉族人群中发现 48 例 CYP2C9 * 1 / * 3 杂合突变型和 3 例 CYP2C9 * 3 / * 3 纯合突变型携带者。各等位基因频率和基因型频率分别见表 1、表 2。经 χ^2 检验,中国汉族人群 CYP2C9 等位基因及基因型频率分布符合 *Hardy - Weinberg* 平衡定律,具有群体代表性。

3. 中国汉族人群与其他种族人群的 CYP2C9 常见等位基因分布比较:将本研究结果与法国、西班牙、意大利和日本人群中常见的 CYP2C9 等位基因的分布

过对第 7 号外显子的检测分析发现第 1075 号碱基存在 A > C 的基因结构改变,共发现 AA、AC、CC 3 种基因型,结果见图 1、图 2。这些基因变异位点都用基因克隆测序法进行了确认。

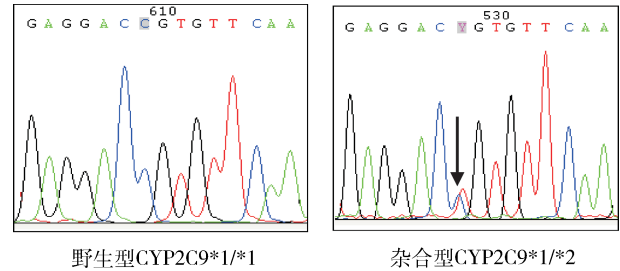


图 1 CYP2C9 * 2 各基因型代表性测序图

表 3 中国汉族人群 CYP2C9 基因多态位点基因型频率的分布 [n(%)]

基因型	中国南方人群	中国北方人群	总和
CYP2C9 * 1 / * 1	1076(95.47)	926(92.60)	2002(94.12)
CYP2C9 * 1 / * 2	0(0)	6(0.60)	6(0.28)
CYP2C9 * 1 / * 3	48(4.26)	66(6.60)	114(5.36)
CYP2C9 * 3 / * 3	3(0.27)	2(0.20)	5(0.24)
总和	1127(100)	1000(100)	2127(100)

布比较发现,中国汉族人群与法国、西班牙和意大利人群之间存在显著性差异,而与日本人群差异无统计学意义。CYP2C9 * 1 等位基因频率显著高于法国、西班牙和意大利人群,而 CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 等位基因频率显著低于法国、西班牙和意大利人群,而与日本人群接近(表 4)。

讨 论

人类的 CYP2C9 基因位于第 10 号染色体 10q24.2 上,全长约为 55.6kb,由 9 个外显子和 8 个内含子组成,mRNA 编码 490 个氨基酸残基,蛋白相对分子质量约为 55.6kDa。目前的研究表明,在 CYP2C9 基因存在广泛的遗传变异,有几十个遗传变异及多态性位点,已经命名的共有 34 种,其中以

表 2 中国汉族人群 CYP2C9 基因多态位点等位基因频率的分布 [n(%)]

等位基因	中国南方人群	中国北方人群	总和
CYP2C9 * 1	2200(97.60)	1924(96.20)	4124(96.94)
CYP2C9 * 2	0(0)	6(0.30)	6(0.14)
CYP2C9 * 3	54(2.40)	70(3.50)	124(2.92)
总和	2254(100)	2000(100)	4254(100)

表 4 中国汉族人群与国外不同人群 CYP2C9 基因
常见基因多态性位点的分布 (%)

人群	n	CYP2C9 * 1	CYP2C9 * 2	CYP2C9 * 3
中国汉族人群	2127	96.94	0.14	2.92
法国 ^[6]	151	77.00	15.00	8.00
西班牙 ^[7]	157	69.50	14.30	16.20
日本 ^[8]	218	97.94	0	2.06
意大利 ^[9]	360	77.80	12.50	9.70
瑞士 ^[10]	430	81.90	10.70	7.40
罗马 ^[11]	465	72.70	11.80	15.50
土耳其 ^[12]	499	79.40	10.60	10.00

CYP2C9 * 1(野生型)、CYP2C9 * 2、CYP2C9 * 3 最为常见。由于 CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 等位基因编码的 CYP2C9 蛋白酶活性较野生型低,其代谢底物药的能力也较野生型的低,因此药物的清除率明显下降,消除半衰期被延长,携带有这类等位基因的患者在接受 CYP2C9 底物药治疗时,容易发生严重的不良反应^[13]。

CYP2C9 基因多态性的分布具有显著的种族和地域差异性,CYP2C9 * 2 等位基因在中国、韩国、日本等亚洲人群中极为罕见。迄今为止,在日本和韩国人群中尚无此等位基因的报道,在我国人群中仅报道了 1 例^[6]。反之,CYP2C9 * 2 等位基因在欧美高加索人群中却普遍存在,其分布频率为 8% ~ 19%,远远高于亚洲人群。本研究对 2127 名中国汉族人群(已知最大样本)进行了基因分型检测,也只检测到 6 例 CYP2C9 * 1/* 2 杂合个体。这进一步证明了 CYP2C9 * 2 在中国人群中的罕见性,同时也为相应临床药物的正确使用提供了有价值的理论支持。

值得注意的是,本研究首次在中国汉族人群中发现 5 例 CYP2C9 * 3/* 3 纯合个体,而这些纯合个体之前只见于欧洲人群的报道。然而,本研究得到的中国汉族人群 CYP2C9 * 3 等位基因频率(2.92%)与文献报道的亚洲人群(3.3%)基本一致。该结果不同于欧美高加索人群的 CYP2C9 * 3 等位基因频率(3.3% ~ 16.2%),其异质性很大。临床上,CYP2C9 * 3/* 3 纯合个体对其底物药(如华法林、苯妥英和甲苯磺丁脲等)的药代动力学有非常显著性的影响,因此这一发现具有非常独特的临床意义,在常规的临床药物使用中要充分地考虑这一特点。

根据文献的统计,本研究所用人群数为迄今为止研究 CYP2C9 基因多态性的最大样本数(表 4),是最为精确的中国汉族人群 CYP2C9 基因多态性和基因

变异的统计资料,该结果丰富了中国汉族人群药物代谢酶 CYP2C9 基因多态性的信息。本研究结果表明,在临床应用相关药物,特别是治疗窗窄的 S-华法林和苯妥英进行治疗时,应该先检测患者 CYP2C9 基因的基因型,以保证患者用药安全性和有效性,减少药物的不良反应。因此,本研究结果对临床个体化用药具有非常重要的指导意义。

参考文献

- 1 Van Booven D, Marsh S, McLeod H, *et al.* Cytochrome P450 2C9 – CYP2C9[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2010,20(4):277 – 281
- 2 <http://www.cypalleles.ki.se/CYP2C9.htm>
- 3 Blaisdell J, Jorge – Nebert LF, Coulter S, *et al.* Discovery of new potentially defective alleles of human CYP2C9[J]. *Pharmacogenetics*, 2004, 14(8):527 – 537
- 4 Imai J, Ieiri I, Mamiya K, *et al.* Polymorphism of the cytochrome P450 (CYP) 2C9 gene in Japanese epileptic patients:genetic analysis of the CYP2C9 locus[J]. *Pharmacogenetics*,2000,10(1):85 – 89
- 5 Sullivan – Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, *et al.* The role of the CYP2C9 – Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism [J]. *Pharmacogenetics*, 1996,6(4):341 – 349
- 6 Yang JQ, Morin S, Verstuyft C, *et al.* Frequency of cytochrome P450 2C9 allelic variants in the Chinese and French populations[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2003,17(3):373 – 376
- 7 Garcia – Martin E, Martinez C, Ladero JM, *et al.* High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2001, 57(1):47 – 49
- 8 Nasu K, Kubota T, Ishizaki T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population[J]. *Pharmacogenetics*, 1997,7(5):405 – 409
- 9 Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, *et al.* Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population [J]. *Pharmacol Res.*,2004,50(2):195 – 200
- 10 Yasar U, Eliasson E, Dahl ML, *et al.* Validation of methods for CYP2C9 genotyping:frequencies of mutant alleles in a Swedish population[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999,254(3):628 – 631
- 11 Sipeky C, Lakner L, Szabo M, *et al.* Interethnic differences of CYP2C9 alleles in healthy Hungarian and Roma population samples: relationship to worldwide allelic frequencies[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2009,43(3):239 – 242
- 12 Aynacioglu AS, Brockmoller J, Bauer S, *et al.* Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1999,48(3):409 – 415
- 13 Lindh JD, Holm L, Andersson ML, *et al.* Influence of CYP2C9 genotype on warfarin dose requirements – a systematic review and meta – analysis[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009,65(4):365 – 375

(收稿:2011 – 03 – 04)