

CYP2C9 * 58 型新突变体的体外酶学活性研究

戴大鹏 李传保 王双虎 耿培武 胡国新 蔡剑平

摘要 目的 对 CYP2C9 基因新突变体 (CYP2C9 * 58 型) 开展体外酶学功能研究, 明确其代谢活性与野生型的相关性。方法 以 CYP2C9 基因 cDNA 为模板, 通过定点诱变方法获得 CYP2C9 各变异体的 cDNA 全长, 用以构建昆虫表达载体。利用杆状病毒包装试剂盒包装昆虫病毒, 侵染 *Sf21* 昆虫细胞后获得高效表达 CYP2C9 各型蛋白的微粒体。以甲苯磺丁脲为探针底物药, 利用获得的微粒体体外测定各变异体的最大反应速率 $V_{\max}$ 和米氏常数 K_m , 评价其主要酶促动力学特性。结果 成功构建了 CYP2C9 * 1、CYP2C9 * 2、CYP2C9 * 3 和 CYP2C9 * 58 型 4 种 CYP2C9 昆虫表达载体, Western blot 证实该载体可用于稳定表达相应的 CYP2C9 突变体。CYP2C9 * 2、CYP2C9 * 3 和 CYP2C9 * 58 型变异体的体外酶学活性分别为野生型 CYP2C9 * 1 的 91.6%、13.5% 和 23.1%。结论 CYP2C9 * 58 型的酶学活性较野生型明显降低, 接近于典型缺陷型突变体 CYP2C9 * 3 型, 提示携带此突变型的患者在服用经由 CYP2C9 代谢的相关药物时, 药物代谢速度较野生型携带者会有一定程度的降低。

关键词 CYP2C9 新突变体 体外酶活性研究 慢代谢

*In vitro Enzymatic Activity Analysis of a Novel CYP2C9 Allelic Isoform CYP2C9 * 58.* Dai Dapeng, Li Chuanbao, Wang Shuanghu, Geng Peiwu, Hu Guoxin, Cai Jianping. The Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Hospital & Beijing Institute of Geriatrics, Ministry of Health, Beijing 100730, China

Abstract Objective To assess the biological function of a novel CYP2C9 allelic isoform CYP2C9 * 58 *in vitro* and to study whether the site mutation could influence the metabolic activity of CYP2C9 protein. **Methods** Full-length cDNA fragments of each CYP2C9 allelic isoforms were obtained by PCR site-directed mutagenesis and used for the insect expression vector construction. According to the manufacturer's instruction, insect cell microsomes expressing 4 CYP2C9 variants were obtained using Bac-to-Bac Baculovirus Expression System. Then tolbutamide was used as the probing substrate to assess the metabolic characteristics ($V_{\max}$ and K_m values) of each CYP2C9 variants *in vitro*. **Results** We successfully constructed four insect cell expression vectors for CYP2C9 variants and the results of western blot confirmed that they could be used for highly expressing the corresponding CYP2C9 mutant in insect cells. Functional analysis results revealed that the enzymatic activity of CYP2C9 * 2, CYP2C9 * 3 and CYP2C9 * 58 were 91.6%, 13.5% and 23.1% to that of wild-type CYP2C9 * 1 respectively. **Conclusion** The enzymatic activity of CYP2C9 * 58 is significantly decreased than that of CYP2C9 * 1 and is much closer to that of typical defective variant CYP2C9 * 3. Our data indicate that patients carrying this mutated allele might be a slow metabolizer when they take drugs metabolized by CYP2C9 protein.

Key words CYP2C9; Novel mutation; In vitro; Enzymatic activity; Slow metabolizer

细胞色素 P450 2C9 (CYP2C9) 是 P450 酶家族中的重要成员, 是肝微粒体中一种十分重要的药物代谢酶。CYP2C9 代谢和活化约 16% 的临床常用药物, 其中主要包括抗凝药物华法林、降糖药物甲苯磺丁脲、非甾醇类抗炎药物双氯芬酸、降脂药物氯沙坦等^[1]。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31371280); 卫生部行业科研专项基金资助项目 (201302008)

作者单位: 100730 卫生部北京医院/卫生部北京老年医学研究所 (戴大鹏、蔡剑平); 100730 卫生部北京医院检验科 (李传保); 325035 温州医学院药学院药理教研室 (王双虎、耿培武、胡国新); 323000 浙江省丽水市人民医院临床药学实验室 (王双虎) (注: 戴大鹏和李传保对本文贡献相同)

通讯作者: 蔡剑平, 电子信箱: caijp61@vip.sina.com

大量研究表明, CYP2C9 基因具有遗传多态性, 某些碱基的改变会影响酶活性中心的氨基酸组成从而损害或降低酶的催化活性, 是引起个体及种族间对某些药物代谢能力差异的重要原因^[1-3]。目前已报道的 CYP2C9 等位基因共有 57 个, 其中 21 个 (CYP2C9 * 36 ~ CYP2C9 * 56) 为笔者所在实验室在中国汉族人群中发现^[4]。最近我们对 1 例华法林慢代谢患者进行基因分型分析时发现, 该患者携带另外一种全新的突变类型 1009C > A, 该突变可导致 CYP2C9 蛋白的氨基酸组成发生改变 (P337T), 经国际 P450 等位基因命名委员会认可, 该变异类型被命名为新的等位基因 CYP2C9 * 58 型。本文利用昆虫表达系统, 体外大量重组表达该突变型 CYP2C9 蛋白, 并与野生型及典

型缺陷型变异体进行了比较研究,以明确其主要体外药物代谢特性是否发生改变,为临床个体化用药提供理论支持。

材料与方法

1. 材料:(1)主要试剂:*Spodoptera frugiperda* (sf) 21 昆虫细胞, Sf-900™ SFM 昆虫培养基, 胎牛血清及 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (美国 Invitrogen 公司), PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、DNA 连接试剂盒 (日本 Takara 公司), 商业化 CYP2C9 微粒体及细胞色素 b5 微粒体 (美国 BD Gentest 公司), 兔抗人 CYP2C9 多克隆抗体 (英国 AbD serotec 公司), 小鼠抗人 OR 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), HRP 标记的羊抗兔及羊抗鼠二抗 (北京中杉金桥公司), 蛋白定量及 ECL 显色 kit (美国 Pierce 公司), 甲苯磺丁脲 (美国 Sigma 公司), 4'-羟基甲苯磺丁脲 (加拿大 Toronto Research Chemicals 公司), NADPH 生成系统 (美国 Promega 公司), HPLC 级溶剂 (美国 Fisher Scientific 公司), 其余常规试剂均为优级纯或分析纯。(2)主要仪器: PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司)、电泳仪及水平电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司)、FluorChem FC2 凝胶成像系统 (美国 Cell Biosciences 公司)、CEQ 8000 测序仪 (美国 Beckman&Coulter 公司), Waters e2695 型高效液相色谱仪检测 (美国 Waters 公司), 所用常规耗材均购自美国 Axygen 公司。(3)引物合成: 由上海英俊生物工程公司合成 CYP2C9 定点突变及载体构建用引物。

2. 方法:(1)定点突变获取各突变型 CYP2C9 cDNA 全长: 参照文献[4,5]利用重叠 PCR 的方法,以野生型 CYP2C9 * 1 质粒为模板,获得 CYP2C9 * 2、CYP2C9 * 3、CYP2C9 * 58 的 cDNA 全长。CYP2C9 * 58 扩增使用的上游引物序列为 5'-ACCGGAGCACCCTGCATGCAAGACAG-3', 下游引物序列为 5'-CATGCAGGTCCTCCGGTTCTGCCA-3', 其中突出显示部分为 cDNA 第 1009 位的定点突变碱基。(2)pFastBac-dual-OR-2C9 昆虫表达载体的构建: 将 CYP2C9 的 cDNA 区扩增产物切胶回收后进行 EcoR I/Sal I 双酶切,与同样酶切的中间载体 pFastbac-dual-OR (可表达细胞色素 P450 氧化还原酶 OR) 连接,连接产物转化后菌落 PCR 筛选阳性克隆,大量扩繁阳性克隆后提取质粒,利用 Beckman 公司 CEQ 8000 测序仪对插入片段进行序列测定,以确认所获载体中定点诱变位点碱基与设计完全一致。(3)微粒体的获得: 参照 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System 试剂盒使用说明,包装可表达野生型及突变型 CYP2C9 的昆虫病毒,所获病毒测定效价后按照 MOI 为 4 的侵染量侵染 sf21 昆虫细胞,72h 后离心收集细胞,洗涤后再次重悬于 5ml 重悬液 (0.25mol/L 蔗糖, 1mmol/L EDTA, 0.5mmol/L PMSF) 中超声破碎,12000 × g 4℃ 下离心 20min 去除细胞碎片,上清取出后 100000 × g 4℃ 下超速离心 60min,沉淀物重悬于微粒体保存液 (含 20% 甘油的 0.1mol/L KPO₄, pH 值 7.4) 中,分装后冻存于 -80℃ 冰箱备用。(4)蛋白表达量的检测: 微粒体蛋白浓度定量后,取 2μg 微粒体进行 SDS-PAGE 胶电泳,电泳结束后样品转移至

PVDF 膜,含 5% 脱脂奶粉的封闭液封闭 1h 后,按照 1:5000 的稀释度加入兔抗人 CYP2C9 或鼠抗人 OR 抗体,4℃ 下杂交过夜,次日洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔或羊抗鼠二抗 (稀释度 1:5000),室温下孵育 30min 后洗涤 3 次,ECL 发光 kit 检测杂交信号。(5)体外药物代谢特性检测: 1) 反应体系: 100mmol/L Tris-HCl (pH 值 7.4), 1 × NADPH 辅酶生成系统, 10pmol 细胞色素 b5 及甲苯磺丁脲 (终浓度为 10 ~ 1000μmol/L), 总体积 200μl。2) 反应过程: 37℃ 预孵育 5min 后,加入 5 ~ 20pmol 的重组微粒体启动反应。37℃ 孵育 60min 后,加入 40μl 0.1mol/L HCl 和 50μl 20ng/μl 内标氯磺丙脲并涡旋震荡 2min。加入 800μl 冰乙酸乙酯涡旋震荡 2min,4℃ 下 10000 × g 离心 5min。小心转移有机层,氮吹仪下吹干,加入 100μl 流动相复溶并取 20μl 于 Waters e2695 型高效液相色谱仪检测。3) 色谱检测条件: 色谱柱为 ZORBAX SB-C18 柱 (2.1mm × 150.0mm, 5-μm, 美国 Agilent 公司); 流动相为 0.1% TFA: 水: 乙腈 = 20: 35: 45; 柱温为 40℃; 检测波长为: 230nm; 流速 1.0ml/min。此条件下 4'-羟基甲苯磺丁脲及甲苯磺丁脲的滞留时间分别为 5.1min 和 14.0min。4) 最大反应速度 V_{max} 及米氏常数 K_m 值的计算: 根据标准曲线,将各变异体的代谢产物 4'-羟基甲苯磺丁脲定量后,利用 Prism 软件 (version 5, 美国 GraphPad 公司) 计算 V_{max} 及 K_m 值,按照以下公式计算各突变体的清除率: $Cl_{int} = V_{max}/K_m$ 。

结 果

1. pFastbac-dual-OR-2C9 野生型和各突变型昆虫表达载体的构建: 将定点诱变得到的各型 CYP2C9 的 cDNA 全长,连接入 pFastBac-dual-OR 载体后获得了可表达 CYP2C9 * 2、CYP2C9 * 3 和 CYP2C9 * 58 型的昆虫表达载体。将构建后的载体进行相应 ORF 区扩增,PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上呈现出 1 条约 1.5kb 的明亮条带 (图 1),与设计产物大小相符。各突变体 ORF 区测序序列与 GenBank 中 CYP2C9 mRNA 标准序列比对后确认全部预设位点定点诱变成功 (图 2)。

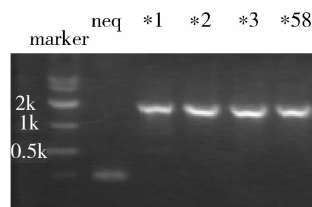


图 1 CYP2C9 各突变型阳性克隆的筛选 PCR 结果

2. 人重组 CYP2C9 野生型和各突变型蛋白的表达: 利用昆虫表达系统,笔者在昆虫微粒体中成功表达出了全部 4 种 CYP2C9 蛋白 (图 3)。Western blot 结果显示,各型 OR 表达量基本一致,CYP2C9 蛋白表

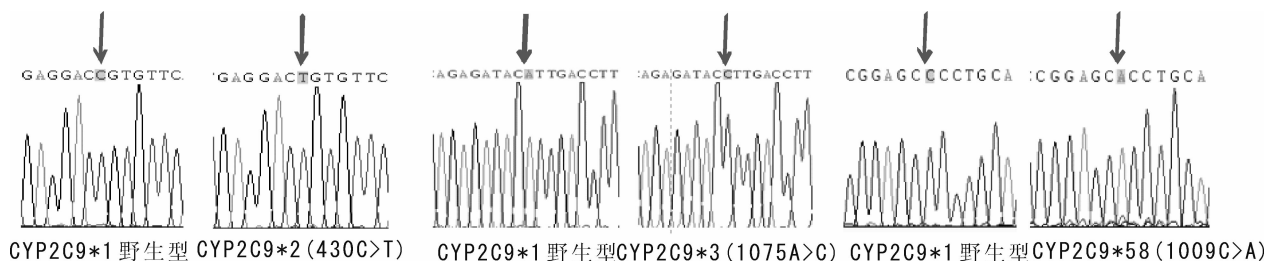


图2 CYP2C9 表达载体测序图

箭头所指为预设定点诱变位点

达量也基本一致。经与购买的商业化 CYP2C9 微粒体对比定量计算,所得微粒体中 CYP2C9 * 1、CYP2C9 * 2、CYP2C9 * 3、CYP2C9 * 58 的含量分别为 1.95、1.85、0.85、1.80pmol/ μ g。

3. 各型 CYP2C9 蛋白对甲苯磺丁脲代谢的影响: 体外代谢检测表明, CYP2C9 * 58 (P337T) 对于甲苯磺丁脲的清除率明显下降, 仅为野生型 CYP2C9 * 1 清除率的 23.2%, 差异具有统计学意义(表 1)。由图 4 可见 CYP2C9 * 58 的代谢活性介于 CYP2C9 * 1 和 CYP2C9 * 3 型之间, 更接近于典型缺陷型突变体 CYP2C9 * 3 型。

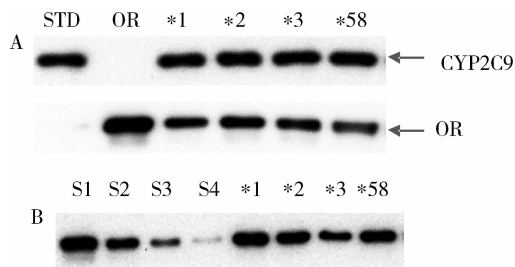


图3 微粒体中 CYP2C9 Western blot 检测(A)及定量(B)结果

STD 为购自美国 BD Gentest 公司的 CYP2C9 标准品; OR 为只表达细胞色素 P450 氧化还原酶的阴性对照。S1 ~ S4 分别为 2、1、0.5、0.25pmol/ μ g 的 CYP2C9 标准品

表1 CYP2C9 各突变型微粒体代谢甲苯磺丁脲后的酶动力学参数

变异体	V_{max} [pmol/(min · pmol P450)]	K_m (μ mol/L)	清除率 (V_{max}/K_m)	相对值 (CYP2C9 * 1, %)
CYP2C9 * 1	7.44 ± 0.35	52.43 ± 10.82	$(1.41 \pm 0.27) E-01$	100.00
CYP2C9 * 2	4.00 ± 0.19	30.80 ± 3.44	$(12.99 \pm 0.51) E-02$	91.58
CYP2C9 * 3	2.28 ± 0.10	118.80 ± 16.71	$(1.92 \pm 0.25) E-02$	13.55 *
CYP2C9 * 58	2.01 ± 0.20	61.31 ± 24.32	$(3.28 \pm 0.45) E-02$	23.20 *

与野生型相比, * $P < 0.05$

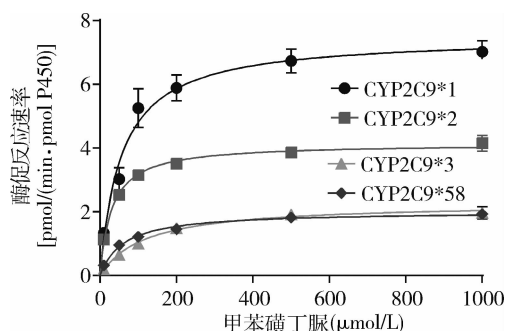


图4 CYP2C9 * 58 型 (P337T) 微粒体代谢甲苯磺丁脲的酶动力学曲线

讨 论

CYP2C9 基因定位于染色体 10q24.2, 全长约 55.6kb, 含有 9 个外显子和 8 个内含子, 编码 490 个氨基酸残基。CYP2C9 基因编码的蛋白在肝微粒体

中含量丰富, 约占 CYP450 总量的 20%, CYP2C9 可代谢多种不同性质药物, 华法林是其中重要的代谢底物之一^[6]。大量的研究证实 85% 以上的 S - 华法林经由 CYP2C9 代谢转化为无活性的 7 - 羟化产物。CYP2C9 基因具有高度遗传多态性, 目前报道的突变体有 50 多种, 较常见的基因突变体是 CYP2C9 * 2 型和 CYP2C9 * 3 型, 它们和野生型 CYP2C9 * 1 是目前研究最多的 3 种型别, CYP2C9 * 2 型及 CYP2C9 * 3 型的酶活性分别比野生型降低 30% 和 80%^[7,8]。

笔者的前期研究表明, 稀有等位基因在中国汉族人群中的发生率约为 1.5%, 大量稀有等位基因的存在是 CYP2C9 基因引起药物氧化代谢个体差异和种族差异的遗传基础, 研究低频或者罕见等位基因型对 CYP2C9 酶活性的影响, 对个体化指导用药具有深远的意义^[4]。CYP2C9 * 58 型突变体是我们在 1 例常

年口服低剂量(1.5~2.0mg/d)华法林患者体内发现的新型别,其携带的 1009C>A 突变可引起 CYP2C9 蛋白第 337 位氨基酸由脯氨酸(P)突变为苏氨酸(T)。现有研究表明,中国人群中最常见的 CYP2C9 缺陷型突变体为 CYP2C9*3 型,携带该基因的个体华法林服用剂量较野生型个体明显降低,前期遗传学分析表明,该患者并未携带 CYP2C9*3 型突变,与华法林代谢密切相关的另外 2 个基因 VKORC1 和 CYP4F2 也未发生基因变异^[4,9]。为研究该突变的生物学和临床意义,借助本室的昆虫表达系统平台,我们成功将 CYP2C9*58 型突变体在昆虫细胞微粒体中重组表达,Western blot 结果表明,其蛋白表达量与野生型相比无明显差别。

体外代谢活性实验检测结果显示,CYP2C9*58 型对于探针药物甲苯磺丁脲的体外清除率为 0.032849,是 CYP2C9 野生型清除率的 23.2%(表 1),代谢曲线(图 4)显示 CYP2C9*58 型的代谢活性非常接近于*3 型。这一结果提示,与常见缺陷型突变体 CYP2C9*3 类似,新的突变体 CYP2C9*58 型的酶学活性明显下降,携带该基因型的患者如服用经由 CYP2C9 代谢的药物(如华法林、甲苯磺丁脲、双氯芬酸等)时,体内药物代谢清除速率减慢,容易造成体内药物蓄积,应严密监控其药量和一些不良并发症的发生。

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 Mo SL, Zhou ZW, Yang LP, *et al.* New insights into the structural features and functional relevance of human cytochrome P450 2C9[J]. Part I [J]. *Curr Drug Metab*, 2009, 10 (10): 1075 - 1126
- 3 Wang B, Wang J, Huang SQ, *et al.* Genetic polymorphism of the human cytochrome P450 2C9 gene and its clinical significance [J]. *Curr Drug Metab*, 2009, 10 (7): 781 - 834
- 4 Dai DP, Xu RA, Hu LM, *et al.* CYP2C9 polymorphism analysis in Han Chinese populations: building the largest allele frequency database [J]. *Pharmacogenomics J*, 2013, DOI: 10.1038/tpj.2013.2
- 5 王双虎,戴大鹏,胡利明,等. 细胞色素 P450 2C9 药物代谢酶体外酶学活性检测新方法的建立 [J]. *医学研究杂志*, 2013, 42 (2): 23 - 26
- 6 Daly AK. Optimal dosing of warfarin and other coumarin anticoagulants: the role of genetic polymorphisms [J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87 (3): 407 - 420
- 7 Hiratsuka M. *In vitro* assessment of the allelic variants of cytochrome P450 [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 27 (1): 68 - 84
- 8 Verhoef TI, Redekop WK, Hegazy H, *et al.* Long - term anticoagulant effects of CYP2C9 and VKORC1 genotypes in phenprocoumon users [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10 (12): 2610 - 2612
- 9 Lam MP, Cheung BM. The pharmacogenetics of the response to warfarin in Chinese [J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2012, 73 (3): 340 - 347 (收稿日期:2013 - 07 - 18)
(修回日期:2013 - 08 - 22)

埃克替尼治疗复治晚期肺腺癌的临床分析

张贝贝 何春晓 宋正波 姜广媛 余新民 赵 珺 石志永 张沂平

摘要 目的 本研究旨在评价埃克替尼在复治晚期肺腺癌患者的近期疗效与安全性。方法 回顾性分析 2011 年 8 月~2012 年 2 月在浙江省肿瘤医院就诊的 51 例曾经接受过一线或一线以上化疗方案治疗失败的 IV 期的肺腺癌患者,给予埃克替尼治疗(125mg 口服,每日 3 次)直至疾病进展。卡方检验比较不同因素在缓解率及疾病控制率方面有无差异,Kaplan - Meier 法进行生存分析和比较。结果 51 例患者中 12 例患者达到部分缓解(partial response, PR) (23.5%), 27 例患者达到疾病稳定(stable disease, SD) (52.9%), 客观缓解率(objective response rate, ORR) 达到 23.5%, 疾病控制率(disease control rate, DCR) 达到 76.5%。患者中位无进展生存期(median progression - free survival, mPFS) 为 5.13 个月(95% CI: 0.41 ~ 9.90), 自服用埃克替尼直至死亡的中位生存期(median overall survival, mOS) 为 12.47 个月(95% CI: 10.06 ~ 14.88)。常见的不良反应为皮疹和腹泻,大部分为轻到中度。结论 埃克替尼可以有效治疗复治晚期肺腺癌患者,且耐受性良好。

关键词 埃克替尼 靶向治疗 晚期 肺腺癌

基金项目:卫生部医药卫生科技发展研究中心基金资助项目(W2012FZ134);浙江省自然科学基金资助项目(LY13H160024);吴阶平医学基金资助项目(320.6750.11091, 320.6750.11059)

作者单位:310053 杭州,浙江中医药大学第二临床医学院(张贝贝、何春晓);310022 杭州,浙江省肿瘤医院(宋正波、姜广媛、余新民、赵珺、石志永、张沂平)

通讯作者:张沂平,电子信箱:zpy@medmail.com.cn