UGT2B7 基因 SNP rs7439366 影响霉酚酸酯代谢的体外研究

宋国贺　邓贵龙　王宇鹏　孙　星　钟　林　周崇治　卢英豪　张　益　陈　健　于　洋　彭志海　王晓亮

摘　要　目的　体外研究尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGT2B7)基因单核苷酸多态性(SNP)rs7439366 对霉酚酸酯(MMF)代谢的影响。**方法**　采用基因重组、定点突变技术构建 UGT2B7 基因 rs7439366 位点不同等位基因的过表达载体,Lipo2000转染法将重组载体转入 HEK293 细胞,采用 LC/MS/MS 系统检测霉酚酸(MPA)代谢产物 7－O－葡醛酸苷(MPAG)24h 的生成量来评估转染不同等位基因细胞的酶活性。**结果**　成功构建 pIRES2－EGFP－prom(T)和 pIRES2－EGFP－prom(C)重组过表达载体并转染至 HEK293 细胞。LC/MS/MS 系统检测结果显示携带 C 等位基因的突变型 UGT2B7 转化 MPA 的酶活性降低,24h 产物 MPAG 的生成量为野生型的 63.3%($P<0.001$)。**结论**　UGT2B7 基因 SNP rs7439366 可影响对 MMF 的代谢能力,是导致患者间 MMF 代谢差异的因素之一。

关键词　尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶　霉酚酸酯　药物代谢

中图分类号　R969.3　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.007

Effect of SNP rs7439366 in UGT2B7 on MMF metabolism. *Song Guohe, Deng Guilong, Wang Yupeng, et al. Department of General Surgery, First People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China*

Abstract　Objective　To investigate the effect of T/C mutation in rs7439366 site of uridine diphosphate glucuronosyltransferase on mycophenolate mofetil metabolism. **Methods**　Wild and mutant type overexpression vectors containing UGT2B7 gene were constructed by recombinant gene technique and the strategy of site－directed mutagenesis. Then, target genes were transfected into HEK293 cells by lipofectamine and LC/MS/MS system was used to detect the yields of MPAG produced by different types of HEK293 cells. **Results**　The overexpression vectors pIRES2－EGFP－prom(T) and pIRES2－EGFP－prom(C) were successfully constructed and transfected into HEK293 cells. The cells containing UGT2B7 gene with rs7439366－C alleles produced less MPAG than that with rs7439366－T alleles (63.3% of UGT2BT wild type, $P<0.001$). **Conclusion**　The T→C variation of rs7439366 site in UGT2B7 gene can influence the metabolism of MMF.

Key words　UGT2B7; Mycophenolate mofetil; Drug metabolism

霉酚酸酯(mycophenolate mofetil, MMF)是霉酚酸(mycophenolic acid, MPA)的 2－乙基酯类衍生物,当口服或静脉给药时,MMF 在体内迅速转化为 MPA,并以 MPA 为活性成分发挥其药理作用。MMF 可高选择性地抑制鸟嘌呤核苷酸的从头合成途径,抑制 T、B 淋巴细胞增殖,从而能够抑制急性排斥,减缓慢性排斥,是肝、肾等大脏器移植术后重要的免疫抑制剂,因而日益受到重视[1]。但临床观察发现,该药个体间代谢率差异可达数十倍,对同一安全剂量,患者的使用效果并不相同,甚至产生严重的不良反应[2,3]。因此,如何有效提高 MMF 的治疗效率,规避治疗中的风险,采取更有针对性的个体化治疗显得尤为重要。

目前普遍认为 MMF 代谢酶——尿苷二磷酸葡糖醛酸转移酶(UDP－glucuronosyltransferase, UGT)单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是导致 MMF 代谢率差异的重要原因。UGT 介导的代谢过程是生物体内重要的Ⅱ相代谢途径,参与多种药物的代谢,同样也是 MMF 代谢的最重要限速酶之一。MMF 在肝脏、小肠、肾脏等组织中经 UGT 代谢为无生物活性的 7－O－葡醛酸苷(7－O－MPA－glucuronide, MPAG)、少量具有潜在活性的酰基化葡萄糖醛酸化物(acyl glucuronide, AcMPAG)及酚－7－O－葡萄糖苷[4]。人类 UGT 基因分为两大家族:UGT1 和 UGT2。UGT2B7 是亚家族 UGT2B 中的一个组分,该

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270557, 81110108010);国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81000188)

作者单位:200080　上海交通大学附属第一人民医院普外科(宋国贺、邓贵龙、王宇鹏、孙星、钟林、周崇治、张益、陈健、于洋、彭志海、王晓亮);550004　贵阳医学院附属医院血液科(卢英豪)

通讯作者:王晓亮,电子信箱:xiaoliangwang1975@hotmail.com

基因 SNP rs7439366 是在第 802 位碱基处的 T 碱基突变成了 C 碱基,结果导致其编码的第 268 位氨基酸由酪氨酸(Y)变为组氨酸(H)。体内实验表明该位点突变可影响 MMF 在患者体内的代谢,并与 MMF 的不良反应有一定相关性。但体内研究无法控制其他位点突变或患者自身身体状态对该酶活性造成的影响,因此无法准确预测该位点与 MMF 代谢的关系。为此,本研究通过体外构建 UGT2B7 基因 SNP rs7439366 野生型及突变型过表达载体,在转染细胞后监测 MMF 的代谢产物 MPAG 24h 的生成量,以确定具有不同等位基因的 UGT2B7 对 MMF 的代谢能力,有助于阐明 MMF 代谢个体差异的机制,为指导 MMF 的临床个体化用药提供理论支持。

材料与方法

1. 主要试剂:HEK293 细胞(美国 ATCC 公司);霉酚酸(MPA)、7 - O - 葡醛酸苷(MPAG)(美国 Roche Bioscience 公司); BglⅡ酶、SaⅡ酶(美国 MBI 公司);DNA 连接试剂盒(日本 TaKaRa 公司);DH5α 感受态细胞(北京全式金公司);DMEM 基础培养基、胎牛血清(美国 Invtrogen 公司);小量质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒(美国 Axgene 公司);Lipo2000(上海锐赛生物技术有限公司);质粒 pIRES2 - EGFP、引物设计及目的基因测序(美国 Invitrogen 公司)。

2. 主要仪器:PCR 扩增仪(ABI 公司,美国);CEQ8000 测序仪(Beckman&Coulter 公司,美国);LC - MS/MS 系统包括:Agilent 1100(安捷伦科技有限公司)液相色谱系统,LEAP CTC HTS PAL 自动进样系统(瑞士 CTC 分析仪器股份公司)和 API4000 三重四级杆检测器(美国应用生物系统有限公司),操作软件为 Analyst 1.5.1。

3. 方法

(1)目的基因的定点突变及各基因型过表达载体的构建:根据含有目的基因(UGT2B7)序列的质粒为模板,PCR 扩增目的基因。扩增引物设计序列见表 1,并在上游引物的 5′端、下游引物的 3′端分别加上 BglⅡ酶切位点和 SaⅡ酶切位点,采用的表达载体图谱见图 1。所用的扩增体系为:10 × AccuPrime pfx Reaction mix,5μl;10 × enhancer,5μl;Fmu - BglⅡ,Rmu - SalⅠ各 1μl;目的基因 UGT2B7,1μl;AccuPrime pfx polymerase,0.5μl;ddH_2O,36.5μl,共 50μl 反应体系。使用以下 PCR 程序进行扩增:95℃ 变性 3 min;95℃ 变性 30s,56℃ 退火 30s,68℃ 延伸 1.5min,共计 35 个循环,最终延伸 10min 后终止反应。扩增完毕后电泳回收目的片段,经 BglⅡ酶和 SalⅠ酶同时酶切目的片段及载体,回收后连接目的片段及载体,并测序验证重组克隆插入片段的序列信息。根据目的基因突变位点信息设计突变引物,所选用引物序列见表 1。按照突变 PCR 扩增程序分段扩增后电泳切胶回收两个片段,以上两个 PCR 回收产物为模板,拼接目的基因序列。采用扩增体系如下:10 × Buffer,5μl;$MgSO_4$(50mmol/L),1μl;dNTP(10mmol/L),1μl;Fmu - BglⅡ/Rmu - SalⅠ,各 0.5μl;以上两个 PCR 回收产物,各 1μl;AccuPrime pfx polymerase 0.5μl;ddH_2O 39.5μl,共 50μl 反应体系。反应完毕后经电泳回收拼接的含目的基因突变位点的扩增产物,再经 BglⅡ酶和 SalⅠ酶分别双酶切回收产物及载体 pIRES2 - EGFP,通过 10 × Ligation buffer 0.5μl;酶切 DNA 片段 3.0μl;酶切载体 1.0μl;T4 DNA Ligase(10U/μl)0.5μl 连接体系连接目的片段和载体,再次测序验证重组克隆插入片段的序列信息,最终成功构建了含有目的基因 802 位点不同等位基因的过表达载体。

表 1　扩增与突变引物对序列

引物名称	引物序列(5′→3′)
A:Fmu - BglⅡ	gacacAGATCTgccgccaccATGTCTGTGAAATGGACTTCAGTAATTTTGC
B:Rmu - SalⅠ	gtgtcGTCGACCTAATCATTTTTTCCCTTCTTTGCTTTTCTAGC
C:Fmu - 802	ctggaattttcagtttccaCatccactcttaccaaatgttgatt
D:Rmu - 802	ttggtaagagtggatGtggaaactgaaaattccaggagtttcg

A、B. UGT2B7 扩增引物序列; C、D. 突变引物序列;下划线部分分别为 BglⅡ与 SalⅠ酶切位点

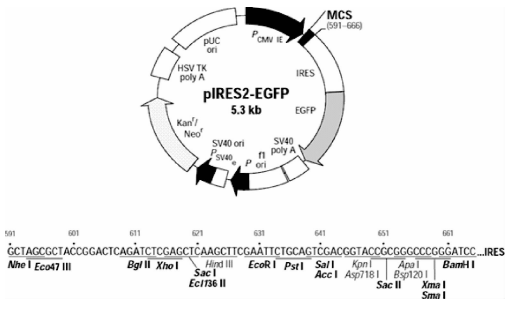

图 1　载体 pIRES2 - EGFP 图谱

序列插入位点:BglⅡ/SalⅠ

(2)目的基因过表达载体转染 HEK293 细胞:采用 Lipo2000 转染法将携带绿色荧光蛋白的目的基因真核过表达载体 pIRES - EGFP - UGT2B7 转入 HEK293 细胞。于转染前 1 天,利用胰酶充分消化 HEK293 细胞后接入 6 孔板,将细胞置于 1ml DMEM + 10% FBS + 1% P/S + 1% Glutamax 培养基中,在 5% CO_2、95% 湿润空气、37℃ 环境下培养,调整接板密度转染使转染前细胞融合度约 70% ~80%。转染当天从细胞中移除培养基,换上新鲜的 900μl DMEM + 10% FBS 培养基(不含抗生素),37℃ 孵育。所配制转染试剂混合物为 A 管:分别取目的基因真核过表达载体、阴性对照质粒及阳性对照质粒

1.2μg 与 50μl Opti－MEM，混匀；B 管：300μl Opti－MEM 与 19.2μl Lipo2000，混匀（6 孔用量）。室温静置 5min 后，分别取 50μl B 管溶液加入 A 组各管中，混匀，室温孵育 20min。取 100μl 上述 DNA－Lipo2000 混合液分别均匀滴加到 6 孔板的对应的 HEK293 细胞中，轻轻摇匀细胞培养板，37℃培养箱中孵育。转染 6h 后，换上新鲜的完全培养基，放回培养箱继续培养。转染 48h 后，荧光显微镜观察细胞的转染效率并记录。

（3）评估转染后的 HEK293 细胞对 MMF 代谢的影响：MMF 在体内血液中的活性成分为 MPA，因此可通过检测 MPA 代谢产物 7－O－葡醛酸苷 MPAG（mycophenolic acid glucuronide）的生成量来评价转染野生型和突变型 UGT2B7 细胞对 MMF 的代谢能力。首先将 MPA 用 DMSO 配制成浓度为 600mmol/L 的溶液，再用 DMEM Media 稀释至孵育时的终浓度 600μmol/L。DMSO 在培养样本中的终浓度为 0.1%。分别把浓度为 600μmol/L 的 MPA 与转染 UGT2B7 突变型、野生型及空白质粒的 HEK293 细胞于 37℃、5% CO_2 条件下培养 2、4 和 24h 后，用 4 倍量的含内标的预冷甲醇终止反应，离心取上清后采用 LC/MS/MS 系统检测代谢产物 MPAG 的生成量。最终结果以突变型 UGT2B7 的相对活性表示，计算公式：相对活性（%）＝突变型亚酶活性/野生型亚酶活性 ×100%。

4. 统计学方法：对数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。两组间比较采用 t 检验，以 $P<0.001$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 过表达载体定点突变后测序鉴定：经基因测序验证成功地将插入的目的基因相应位点（UGT2B7 基因第 802 位碱基）的 T 碱基突变为 C 碱基，与基因库中该基因序列相比对，在扩增产物的其他位置处不存在差异。测序结果使用专业软件进行了分析和比对，确保测序结果中每个扫描峰图与其对应碱基的一致性，测序结果见图 2。

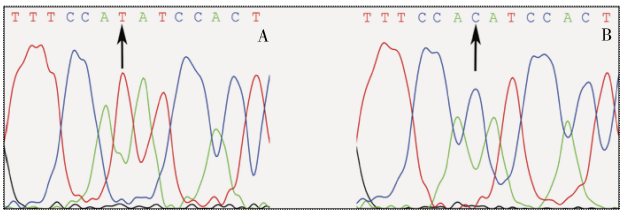

图 2　目的基因 UGT2B7 SNP rs7439366 测序图

A. 定点突变前测序图；B. 定点突变后测序图

2. 目的基因过表达载体转染细胞结果：将携带有野生型位点、突变型位点及空白对照质粒的 UGT2B7 基因过表达载体（表达绿色荧光蛋白）成功转入 HEK293 细胞中，转染 48h 后在荧光显微镜下观察，结果显示实验组和对照组中质粒转染效率均在 50% 以上，两组间并无明显差异（图 3）。

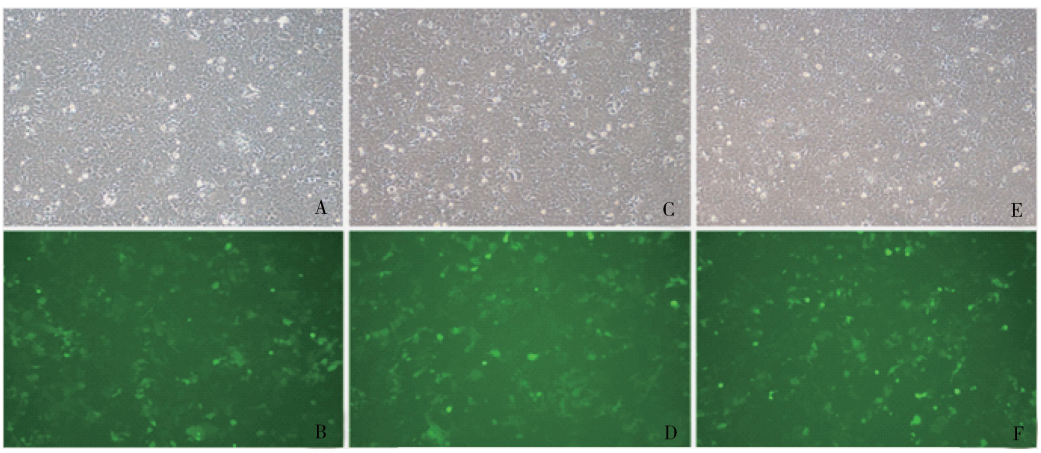

图 3　过表达载体转染 HEK293 细胞荧光图

A. 质粒 pIRES－EGFP－UGT2B7（野生型）48h 普通图；B. 质粒 pIRES－EGFP－UGT2B7（野生型）48h 荧光图；C. 质粒 pIRES－EGFP－UGT2B7（突变型）48h 普通图；D. 质粒 pIRES－EGFP－UGT2B7（突变型）48h 荧光图；E. 质粒 pIRES－EGFP 对照组 48h 普通图；F. 质粒 pIRES－EGFP 对照组 48h 荧光图

3. 转染不同过表达载体的 HEK293 细胞对 MPA 代谢的影响：在转染空白质粒的 HEK293 细胞对照组中未检测到反应产物，而 UGT2B7 基因 802 位点 T 碱基突变为 C 碱基后使 UGT2B7 转化 MPA 的酶活性降低（表 2），其突变型细胞代谢产生 MPAG 的浓度为野生型的 63.3%（$P<0.001$，图 4）。说明该位点突变显著影响了 MPA 代谢产物 MPAG 的生成。

表 2　两种 UGT2B7 类型产生 MPAG 的浓度

类型	24h MPAG 的浓度（nmol/L）	相对于野生型的活性（%）
UGT2B7 野生型	32.7	100.0
UGT2B7 突变型	20.7	63.3

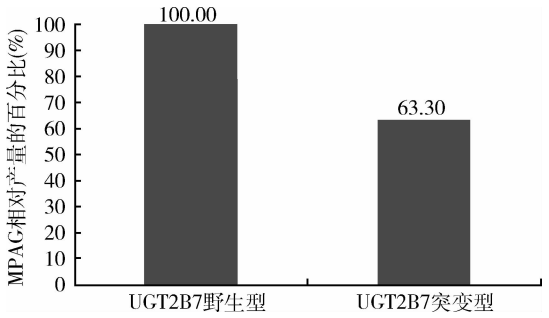

图 4 不同 HEK293 细胞生成 MPAG 相对产量的对比

讨 论

MMF 已广泛应用于器官移植及各种自身免疫性疾病,并取得较好的治疗效果。但由于 MMF 本身具有较窄的治疗安全窗,且在不同患者间的药代动力学方面存在显著差异,临床使用剂量稍有不当就可产生严重性甚至致命性的不良反应[5]。研究表明除了患者的年龄、性别、肝肾功能状态以及药物间的相互作用等可影响 MMF 在体内的代谢外,尿苷二磷酸葡糖醛酸转移酶(UDP - glucuronosyltransferase,UGT)的酶活性及 UGT 基因多态性在体内 MMF 的代谢中发挥着至关重要的作用。

UGT 基因包含 UGT1 和 UGT2 两大家族,又分为 3 个亚族:UGT1A(1、3 ~ 10)、UGT2A(1 ~ 3)和 UGT2B(4、7、10、11、15、17、28)。UGT2B 是由 4 号染色体上成簇分布的相互独立的基因组成,2B7 是其中主要的一个亚型。已知 UGT2B7 基因全长 16kb,包含 6 个外显子和 5 个内含子,编码 529 个氨基酸残基。研究发现,UGT2B7 在人群中广泛存在着基因多态性,其多个位点可发生碱基的替换,并且该基因多态性与多种药物的代谢相关[6,7]。临床上有多项体内实验表明携带 UGT2B7 基因 802 位点不同基因型的患者对 MMF 的代谢能力具有个体差异性,其中 C/C 型相比 C/T、T/T 型患者对 MMF 的体内清除率更低[8]。另有关于 MMF 不良反应的体内研究实验显示,携带 UGT2B7 基因 802 位点 CC 型患者比 CT、TT 型患者服用 MMF 具有更严重的胃肠道症状(症状包括腹痛、胃酸反流、消化不良、腹泻、便秘)。以上研究均提示 UGT2B7 基因多态性参与 MMF 代谢的过程,并导致患者间对 MMF 的代谢产生差异性。但临床体内研究无法精确控制患者自身状态对药物代谢产生的影响,也无法排除该基因其他位点变异所带来的干扰效应。

本研究笔者采用定点突变的方法获得了含有 UGT2B7 基因 802 位点不同等位基因的重组过载体,最终成功地将携带该基因的不同载体转染进细胞,并检测了 MMF 主要代谢产物 MPAG 24h 的累积生成量。数据统计分析表明,携带 C 等位基因的突变型 UGT2B7 转化 MPA 的酶活性降低,其产物 MPAG 24h 的生成量为野生型的 63.3%($P < 0.001$)。表明在 MMF 的代谢过程中,UGT2B7 基因 802 位点 T/C 碱基的替换使得该酶对 MMF 的代谢活性降低。据此笔者推测是由于该位点的变异导致该基因编码的氨基酸发生转变,从而使 UGT 酶的空间结构发生变化,并影响了该酶的活性,具体发生机制还需要进一步研究。

UGT2B7 基因多态性是影响 MMF 代谢水平的关键因素之一,本研究为 MMF 的临床个体化用药提供了理论基础。临床上针对患者不同的基因型信息选择最合适的药物剂量,不仅能取得较好的治疗效果,更能避免各种并发症的发生,从而提高患者的生活质量。

参考文献

1 van Gelder T, Le Meur Y, Shaw LM, *et al*. Therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil in transplantation[J]. Therapeutic Drug Monitoring,2006,28(2):145 - 154

2 Hao C, Anwei M, Bing C, *et al*. Monitoring mycophenolic acid pharmacokinetic parameters in liver transplant recipients: prediction of occurrence of leukopenia[J]. Liver Transplantation ,2008,14(8):1165 - 1173

3 Pithukpakorn M, Tiwawanwong T, Lalerd Y, *et al*. Mycophenolic acid AUC in Thai kidney transplant recipients receiving low dose mycophenolate and its association with UGT2B7 polymorphisms[J]. Pharmacogenomics and Personalized Medicine,2014,7:379 - 385

4 Ting LS, Benoit - Biancamano MO, Bernard O, *et al*. Pharmacogenetic impact of UDP - glucuronosyltransferase metabolic pathway and multidrug resistance - associated protein 2 transport pathway on mycophenolic acid in thoracic transplant recipients: an exploratory study[J]. Pharmacotherapy,2010,30(11):1097 - 1108

5 Vitiello M, Shelling M, Camacho I, *et al*. Fatal cutaneous Strongyloidiasis as a side effect of Pemphigus foliaceus treatment with mycophenolate mofetil[J]. Journal of Drugs in Dermatology,2011,10(4):418 - 421

6 Sastre JA, Varela G, Lopez M, *et al*. Influence of uridine diphosphate - glucuronyltransferase 2B7 (UGT2B7) variants on postoperative buprenorphine analgesia[J]. Pain Practice ,2015,15(1):22 - 30

7 Haas DW, Kwara A, Richardson DM, *et al*. Secondary metabolism pathway polymorphisms and plasma efavirenz concentrations in HIV - infected adults with CYP2B6 slow metabolizer genotypes[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy,2014,69(8):2175 - 2182

8 Zhao W, Fakhoury M, Deschenes G, *et al*. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of mycophenolic acid following administration of mycophenolate mofetil in de novo pediatric renal - transplant patients[J]. Journal of Clinical Pharmacology,2010,50(11):1280 - 1291

(收稿日期:2015 - 04 - 08)
(修回日期:2015 - 05 - 23)