

CYP2C9 新变异体 A149V 的发现及药物代谢活性研究

周 珊 赵按照 赵芳玲 洪 芸 陈 浩 刘 健 罗庆锋 杨杰孚 蔡剑平 戴大鹏

摘 要 **目的** 研究中国汉族人群中发现的 CYP2C9 新变异体 A149V 的药物代谢活性。**方法** 随机采集 2018 年北京医院心内科住院患者血样并采用磁珠法抽提基因组 DNA, PCR 扩增 CYP2C9 基因启动子区及 9 个外显子区用于基因分型。体外构建双表达杆状病毒载体 pFastBac - OR - CYP2C9, 转染 DH10Bac 大肠杆菌获得杆粒, 使用昆虫系统表达 CYP2C9 及 CYPOR, 并进行 Western blot 法验证。采用差速离心法制备 CYP2C9 微粒体, 使用 3 种探针药物进行体外酶活性研究。**结果** 513 例样本中检测到一种新的 CYP2C9 突变 446C > T, 可导致 CYP2C9 第 149 位氨基酸由丙氨酸被缬氨酸替换 (A149V)。利用昆虫表达系统成功获得了新变异体 A149V 及典型 CYP2C9 变异体的微粒体, Western blot 法检测结果显示, A149V 的氨基酸替换并不会影响 CYP2C9 酶的表达水平。体外药物代谢活性数据显示, 新变异体 A149V 对 3 种探针药物甲苯磺丁脲、双氯芬酸和氯沙坦的清除率分别是野生型的 17.90%、24.73% 和 5.54%。**结论** 中国汉族人群中发现的 CYP2C9 新变异体 A149V 为慢代谢类型。

关键词 CYP2C9 变异体 A149V 代谢活性

中图分类号 R394.6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.06.008

Identification of a New CYP2C9 Variant A149V and Assessment of Its Drug Metabolic Activity. ZHOU Shan, ZHAO Anxu, ZHAO Fangling, et al. The Key Laboratory of Geriatrics, Beijing Institute of Geriatrics, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, National Health Commission, Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Abstract **Objective** To study the metabolic activity of a newly detected CYP2C9 variant A149V in Chinese Han population. **Methods** Blood samples were collected from inpatients in the Department of Cardiology and genomic DNAs were extracted with magnetic beads. The promoter region and 9 exons of CYP2C9 gene were amplified by PCR and used for the sequencing and genotyping. The baculovirus vector pFASTBac - OR - CYP2C9 was constructed in vitro and transfected into Escherichia coli DH10Bac to obtain the bacmid plasmid. CYP2C9 and CYPOR were then expressed with insect cell expression system and verified by Western blot. The CYP2C9 microsomes were prepared by differential centrifugation and their metabolic activities were investigated with three probe drugs in vitro. **Results** A new CYP2C9 mutation 446C > T was detected in 513 individuals, and this genetic mutation can cause the amino acid substitution of alanine with valine at site 149 (named A149V). Microsomes of A149V and typical CYP2C9 variants were successfully obtained by the insect expression system. Western blot results showed that amino acid substitution of A149V did not affect the expression level of CYP2C9 enzyme. In vitro data of metabolic activity analysis indicated that the clearance rates of novel variant A149V for tolbutamide, diclofenac and losartan were only 17.90%, 24.73% and 5.54% of the wild type, respectively. **Conclusion** Newly detected CYP2C9 variant A149V in Chinese Han population belongs to the poor metabolic mutation.

Key words CYP2C9; Variant; A149V; Metabolic activity

现代医疗离不开药物,但患者对药物治疗的反应存在较大的个体差异,只有 50% ~ 75% 的患者对药物治疗干预反应充分,而其他患者要么疗效欠佳,要

么遭受不良反应事件^[1,2]。药物治疗结果可被多种因素影响,如环境因素(共同用药、饮食、吸烟等)、生理因素(性别、年龄、伴生疾病等)和遗传因素,其中遗传变异可解释 20% ~ 30% 的不同治疗结局^[3]。随着对基因型 - 药物反应关系理解的不断加深,美国食品和药品监督管理局和欧洲药品管理局针对医疗机构发布了含药物遗传学信息的药品标签,近年来其数量呈现出不断递增的趋势^[4]。根据临床药物基因组学实施联盟(Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, CPIC)发布的指南,目前已有 119 种基因被认为具有药物遗传学活性,如 HLA、CYP、MTH2、

基金项目:国家重点研发计划项目(2020YFC2008301);国家自然科学基金资助项目(81971323,81570307)

作者单位:100730 北京医院、国家老年医学中心、国家卫生健康委北京老年医学研究所、国家卫生健康委北京老年医学重点实验室、中国医学科学院老年医学研究院(周珊、赵芳玲、刘健、蔡剑平、戴大鹏);100730 北京医院心内科(赵按照、陈浩、杨杰孚),消化科(洪芸、罗庆锋)

通信作者:戴大鹏,电子信箱:daidapeng@163.com

VKORC1 等。

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 是人体主要的药物代谢酶,它们能催化代谢多种内源、外源物质,通过结构中存在的铁离子传递电子氧化异源物,增强异源物的水溶性使其更易排出体外^[5]。CPIC 发布的被认为具有药物遗传学活性的基因中,包含多个 CYP 的亚家族,如 CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 等,其中 CYP2C9 是 CYP2 亚家族中的重要成员,约占肝微粒体 P450 蛋白总量的 20%,约有 16% 的临床药物经由 CYP2C9 代谢^[6]。已有研究表明,CYP2C9 编码基因的遗传多态性可显著改变 CYP 酶的药物代谢活性,进而影响药物的体内代谢情况,并导致可能的药物不良反应的发生,尤其是针对像华法林这类低治疗窗的药物时更为显著^[7]。

前期研究中,笔者针对中国汉族人群建立了国际范围内单一民族最大的 CYP2C9 等位基因遗传多态性数据库,共检测到 14 种已知等位基因,同时还发现了 22 种新的非同义突变,其中的 21 种被国际人类 CYP 等位基因命名委员会命名为新等位基因 CYP2C9 * 36 ~ CYP2C9 * 56,后续研究中笔者又发现了 4 种 CYP2C9 新变异类型,即 CYP2C9 * 58、CYP2C9 * 59、CYP2C9 * 60、CYP2C9 * 62^[8-12]。研究结果表明,汉族人群中可能还存在许多未被发现的 CYP2C9 突变类型。本研究对近年来发现的另外一种 CYP2C9 新变异体 A149V 进行了体外重组表达,并在此基础上开展了药物代谢活性研究。

材料与方法

1. 材料:FineQuick 快速磁珠法血液基因组提取试剂盒购自常州济凡生物科技有限公司;2 × Rapid Taq Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PrimeSTAR Max DNA Polymerase 高保真扩增酶、EcoR I 及 Sal I 限制性内切酶、DNA 连接试剂均购自日本 TaKaRa Bio 公司;PCR 扩增及测序用引物均由北京擎科生物科技有限公司合成;草地贪夜蛾昆虫细胞(Sf21)、Sf-900™ III SFM 昆虫培养基、胎牛血清和 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统购自美国 Invitrogen 公司;双表达杆状病毒载体 pFastBac-OR 为实验室自主构建^[13];兔多克隆 CYP2C9 抗体购自英国 Abcam 公司;小鼠单克隆 CYPOR 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司。甲苯磺丁脲和氯沙坦购自美国 Sigma-Aldrich 公司。双氯芬酸购自日本东京化学工业公司。NADPH 购自美国 Promega 公司。高效液相色谱级溶剂购自美国 Fisher Scientific 公

司。所有使用的其他化学物质和溶剂都是分析级或更高等级。

2. 样本采集及 CYP2C9 基因分型分析:本研究随机采集 2018 年北京医院内科京籍汉族患者的全血样本,所有纳入实验的研究对象均已签署知情同意书,本研究已获北京医院医学伦理学委员会审批(伦理批件号:2021BJYYEC-324-01)。取 200 μl EDTA 抗凝全血样本,参照 FineQuick 快速磁珠法血液基因组提取试剂盒使用说明,利用全自动核酸提取纯化仪(常州济凡生物科技有限公司)提取基因组 DNA。利用 2 × Rapid Taq Master Mix 参照先前报道的方法开展 CYP2C9 基因启动子区及外显子区扩增,产物切胶回收后送北京天一辉远生物科技有限公司开展 Sanger 测序^[13-16]。PharmVar 网站下载 CYP2C9 的参考序列(NG_008385.1),使用 Lasergene (Version:7.1.0) 软件的 Seqman 组件将获得的测序序列与参考序列进行比对分析,并参照 PharmVar 网站中列出的等位基因信息,对入组样本进行 CYP2C9 基因分型分析。

3. 表达载体的构建和重组 CYP2C9 蛋白的表达:参照先前报道的重叠延伸 PCR 扩增方法,构建典型 CYP2C9 缺陷型变异体 CYP2C9 * 3^[13-16]。同时利用引物 5' - AGAGGAAGtCCGCTGCC - 3' 及 5' - GGCAGCGGactTCCTCT - 3' (突变位点用小写字母标注)通过两轮 PCR 扩增将 446C > T 突变引入 CYP2C9 cDNA,从而获得新变异体 A149V 的编码区全长片段。扩增产物切胶纯化后利用 EcoR I 及 Sal I 双酶切,酶切产物纯化后连接至 pFastBac Dual-OR 载体,得到双表达杆状病毒载体 pFastBac-OR-CYP2C9。载体转化大肠杆菌 DH10Bac 后,利用 M13F 及 M13R 引物筛选阳性克隆并提取杆粒 DNA。参照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统说明书,转染昆虫细胞 Sf21 获得同时表达 CYP2C9 及 CYPOR 的昆虫病毒悬液,并用于昆虫细胞中大量表达 CYP2C9 和 CYPOR (cytochrome P450 oxidoreductase)。采用差速离心法制备昆虫微粒体,Western blot 法验证 CYP2C9 和 CYPOR 的表达,利用 CYP2C9 标准品对表达的各 CYP2C9 变异体进行目的蛋白定量分析。

4. 酶动力学分析:参照文献[13~15]的方法,使用 3 种 CYP2C9 探针药物(双氯芬酸、甲苯磺丁脲和氯沙坦)评估野生型和突变型 CYP2C9 的药物代谢活性,使用 GraphPad Prism 9.0 软件计算酶促动力学参数 K_m 、 V_{max} 及清除率 $Cl_{int} (V_{max}/K_m)$ 。使用 SPSS 25.0 统计学软件对数据进行统计分析,经 t 检验分析

各 CYP2C9 变异体间的药代参数,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

本研究通过对 513 例汉族住院患者开展了 CYP2C9 基因遗传多态性分析,发现其中 1 例患者携带了一种全新的 CYP2C9 突变类型。测序结果表明,新的突变位点位于 CYP2C9 基因第 3 外显子, cDNA 第 446 位(C > T),会导致 CYP2C9 蛋白第 149 位的丙氨酸被替换为缬氨酸(缩写为 A149V),其测序峰图详见图 1。

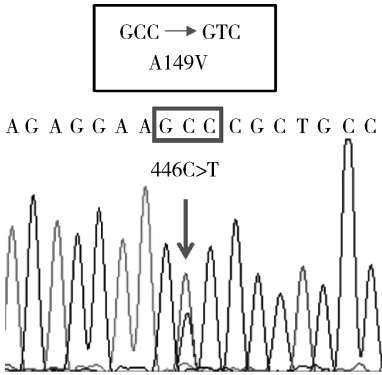


图 1 新变异体 A149V 携带者基因测序峰图
箭头所指为新突变的杂合位点,方框内为第 149 位密码子及其变异情况

利用昆虫细胞表达系统成功重组表达 CYP2C9 和 CYPOR,经蛋白免疫印迹分析。如图 2 所示, A149V 的蛋白质表达水平与野生型 CYP2C9.1、典型突变体 CYP2C9.3 相近。

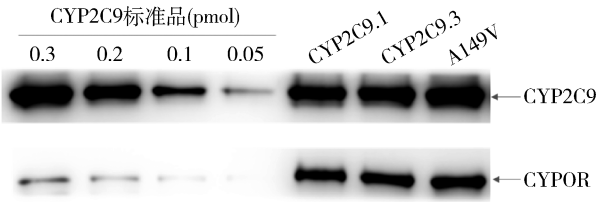


图 2 昆虫细胞微粒体中重组表达的 CYP2C9 和 CYPOR 蛋白免疫印迹分析

为深入研究新突变位点对 CYP2C9 酶活性的影响,采用 3 种 CYP2C9 典型探针药物甲苯磺丁脲、双氯芬酸和氯沙坦开展了体外药物代谢活性分析。图 3 为这些底物的 Michaelis - Menten 拟合曲线图,其中新变异体 A149V 的代谢活性远小于野生型,与典型慢代谢变异体 CYP2C9.3 相近。表 1 为重组表达的 3 种 CYP2C9 蛋白针对 3 种探针药物的药代动力学参数,新变异体 A149V 针对 3 种探针药物的清除率分别仅为野生型的 17.90%、24.73% 和 5.54%,提示新变异体 A149V 的药物代谢活性由于 149 位处丙氨酸被替换为缬氨酸而显著降低。

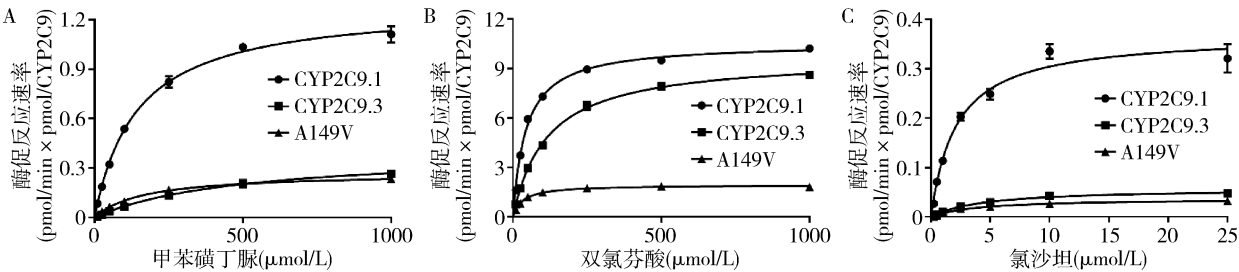


图 3 CYP2C9 微粒体对 3 种探针药物代谢的酶动力学曲线
A. 甲苯磺丁脲 B. 双氯芬酸 C. 氯沙坦

表 1 CYP2C9 各突变型微粒体对探针药物代谢的酶动力学参数

底物	变异体	最大反应速率[V_{max} , pmol/(min · pmol P450)]	米氏常数(K_m , $\mu\text{mol/L}$)	清除率(V_{max}/K_m)	相对清除率(/CYP2C9.1, %)
甲苯磺丁脲	CYP2C9.1	1.300 ± 0.065	143.600 ± 15.027	(9.050 ± 0.490) × 10 ⁻³	100.00
	CYP2C9.3	0.400 ± 0.038 *	501.430 ± 65.610 *	(0.810 ± 0.051) × 10 ⁻³ *	8.93 *
	A149V	0.270 ± 0.011 *	168.700 ± 22.130	(1.620 ± 0.150) × 10 ⁻³ *	17.90 *
双氯芬酸	CYP2C9.1	10.550 ± 0.050	4.430 ± 0.210	2.380 ± 0.100	100.00
	CYP2C9.3	9.690 ± 0.140 *	11.650 ± 0.570 *	0.830 ± 0.030 *	34.95 *
	A149V	1.940 ± 0.030 *	3.290 ± 0.110 *	0.590 ± 0.010 *	24.73 *
氯沙坦	CYP2C9.1	0.370 ± 0.026	2.160 ± 0.390	0.170 ± 0.020	100.00
	CYP2C9.3	0.0580 ± 0.002 *	4.420 ± 0.390 *	7.61 *	
	A149V	0.038 ± 0.001 *	3.940 ± 0.380 *	5.54 *	

与 CYP2C9.1 比较, * $P < 0.05$

讨 论

本研究在对汉族志愿者的 CYP2C9 基因测序分型筛查工作中发现了一种全新的 CYP2C9 变异体 A149V, 体外酶动力学实验显示该变异体的药物代谢活性明显降低, 为一种慢代谢突变类型。前期笔者通过对 2127 例汉族志愿者的基因分型, 曾发现 CYP2C9 蛋白的第 149 位氨基酸存在着丙氨酸被苏氨酸替换 (A149T) 的变异类型, 并已被人类 CYP 等位基因命名委员会命名为 CYP2C9 * 46^[8]。随后的体外功能研究表明, CYP2C9 * 46 为慢代谢突变类型并导致其蛋白表达水平较野生型明显降低^[17]。本研究中 A149V 的体外结果与此类似。另一方面, 在 CYP2C9 第 149 位氨基酸附近已有多种变异类型被相继发现, 如 CYP2C9 * 2 (R144C)、CYP2C9 * 8 (R150H)、CYP2C9 * 27 (R150L) 和 CYP2C9 * 63 (R144H) 等^[18-20]。体内外药物代谢活性研究表明, 与野生型 CYP2C9 * 1 比较, CYP2C9 * 2 为慢代谢类型, CYP2C9 * 8 为快代谢类型, CYP2C9 * 27 代谢活性无明显改变, 而 CYP2C9 * 63 活性尚未报道。这些结果与本研究结果共同显示, CYP2C9 的第 149 位及其周围的氨基酸容易出现遗传变异, 同时这些位点对于药物代谢活性的正常维持具有重要作用。

遗传学研究表明, 新发现的变异体 A149V 在全部 513 例样本中仅有 1 例患者携带, 其基因型频率仅为 0.19%, 与其他除 CYP2C9 * 3 外的突变型等位基因类似, A149V 属于典型的罕见突变类型。另一方面, 本研究结果表明, 与多数汉族人群中发现的罕见型突变体类似, A149V 也是一种典型的慢代谢型 CYP2C9 变异体, 其针对双氯芬酸及氯沙坦的代谢速率甚至低于典型慢代谢类型 CYP2C9.3, 提示携带这一突变的个体在服用经由 CYP2C9 代谢的药物时可能会呈现出比 CYP2C9 * 3 等位基因携带者更低的药代特征, 进而更容易出现药物不良反应, 尤其在服用治疗窗狭窄的药物 (如抗凝药物华法林) 时可能需要密切关注和调整药物剂量。结合既往研究, 中国汉族人群中约有 5% 的个体携带各种罕见型 CYP2C9 变异体, 通过遗传学研究及时发现并进一步分析这些罕见变异体的药代特性, 具有重要的临床应用价值^[8-12]。

综上所述, 本研究发现了一种全新的 CYP2C9 慢代谢变异体 A149V, 其人群中的等位基因频率需开展进一步的研究予以揭示。这些 CYP2C9 变异体的发现进一步丰富了人们对药物基因组学的认知, 并为建立适用于我国汉族人群的个体化用药指导原则具

有重要的理论指导意义。

参考文献

- 高洁, 乔海灵. 人肝 CYP450 酶含量与活性研究进展 [J]. 药学进展, 2018, 42(8): 564-573
- Lauschke VM, Ingelman-Sundberg M. The importance of patient-specific factors for hepatic drug response and toxicity [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(10): 1714
- Kulma I, Boonprasert K, Na-Bangchang K. Polymorphisms of genes encoding drug transporters or cytochrome P450 enzymes and association with clinical response in cancer patients: a systematic review [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2019, 84(5): 959-975
- Haga SB, Mills R, Moaddeb J. Pharmacogenetic information for patients on drug labels [J]. Pharmacogenomics Pers Med, 2014, 7: 297-305
- 涂安娜, 林崇良, 鲍曦, 等. 鸡尾酒法评价猫人参对大鼠细胞色素 450 酶活性的影响 [J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(16): 1985-1990
- Si D, Guo Y, Zhang Y, et al. Identification of a novel variant CYP2C9 allele in Chinese [J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(7): 465-469
- Asimwe IG, Zhang EJ, Osanlou R et al. Warfarin dosing algorithms: a systematic review [J]. Br J Clin Pharmacol, 2021, 87(4): 1717-1729
- Dai DP, Xu RA, Hu LM, et al. CYP2C9 polymorphism analysis in Han Chinese populations: building the largest allele frequency database [J]. Pharmacogenomics J, 2014, 14(1): 85-92
- Luo SB, Li CB, Dai DP, et al. Characterization of a novel CYP2C9 mutation (1009C>A) detected in a warfarin-sensitive patient [J]. J Pharmacol Sci, 2014, 125(2): 150-156
- Dai DP, Wang SH, Li CB, et al. Identification and functional assessment of a new CYP2C9 allelic variant CYP2C9 * 59 [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(8): 1246-1249
- Dai DP, Li CB, Wang SH, et al. Identification and characterization of a novel CYP2C9 allelic variant in a warfarin-sensitive patient [J]. Pharmacogenomics, 2015, 16(13): 1475-1486
- Chen H, Dai DP, Zhou S, et al. An identification and functional evaluation of a novel CYP2C9 variant CYP2C9 * 62 [J]. Chem Biol Interact, 2020, 327: 109168
- 戴大鹏, 李传保, 王双虎, 等. CYP2C9 * 58 型新突变体的体外酶学活性研究 [J]. 医学研究杂志, 2013, 42(11): 58-61
- 李传保, 戴大鹏, 王双虎, 等. CYP2C9 基因 1300A>T 突变对体外药物代谢活性的影响 [J]. 中华检验医学杂志, 2014, 5: 383-385
- 戴大鹏, 李传保, 王双虎, 等. 细胞色素 P450 2C9 新突变 1400T>C 的发现及体外酶活性研究 [J]. 中华医学杂志, 2013, 93(44): 3547-3541
- 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
- Dai DP, Wang YH, Wang SH, et al. In vitro functional characterization of 37 CYP2C9 allelic isoforms found in Chinese Han population [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(11): 1449-1456
- Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, et al. Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9 [J]. Pharmacogenetics, 1994, 4(1): 39-42
- 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
- Maekawa K, Fukushima-Uesaka H, Tohkin M, et al. Four novel defective alleles and comprehensive haplotype analysis of CYP2C9 in Japanese [J]. Pharmacogenet Genomics, 2006, 16(7): 497-514

(收稿日期: 2021-10-31)

(修回日期: 2021-12-02)