

- topyruvate sulfurtransferase / hydrogen sulfide pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 433(4): 401-407.
- [7] WEN JY, GAO SS, CHEN FL, et al. Role of CSE-produced H₂S on cerebrovascular relaxation via RhoA-ROCK inhibition and cerebral ischemia-reperfusion injury in mice [J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10(3): 1565-1574.
- [8] LEVINE AB, PUNIHAOLE D, LEVINE TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications [J]. Cardiology, 2012, 122(1): 55-68.
- [9] 胡丽, 饶婷, 段丹, 等. 新型硫化氢供体 GYY4137 对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 安徽医药, 2018, 22(11): 2092-2095.
- [10] GHEIBI S, ABOUTALEB N, KHAKSARI M, et al. Hydrogen sulfide protects the brain against ischemic reperfusion injury in a transient model of focal cerebral ischemia [J]. J Mol Neurosci, 2014, 54(2): 264-270.
- [11] COLETTA C, MÓDIS K, SZCZESNY B, et al. Regulation of vascular tone, angiogenesis and cellular bioenergetics by the 3-mercapto-pyruvate sulfurtransferase / H₂S pathway: functional impairment by hyperglycemia and restoration by dl- α -lipoic acid [J]. Mol Med, 2015, 21: 1-14.
- [12] 蒋会慧, 胡东华, 陈志武. 非NO、非PGI₂介导大鼠大脑中动脉舒张反应与硫化氢的关系 [J]. 安徽医药, 2012, 16(10): 1406-1408.
- [13] KING AL, POLHEMUS DJ, BHUSHAN S, et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(8): 3182-3187.
- [14] ZHENG HH, XU GX, GUO J, et al. Aquaporin-1 down regulation associated with inhibiting cell viability and inducing apoptosis of human lens epithelial cells [J]. Int J Ophthalmol, 2016, 9(1): 15-20.
- [15] KUO MM, KIM DH, JANDU S, et al. MPST but not CSE is the primary regulator of hydrogen sulfide production and function in the coronary artery [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 310(1): H71-H79.
- [16] 童晓琴, 周方杰, 蔡圣年, 等. 内皮衍生超极化因子对脑缺血损伤大鼠脑血管的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(09): 1233-1237.
- [17] ZHAO W, ZHANG J, LU Y, et al. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener [J]. EMBO J, 2001, 20(21): 6008-6016.
- (收稿日期: 2019-02-15, 修回日期: 2019-04-01)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.12.004

◇ 药学研究 ◇

限制性片段长度多态性聚合酶链反应法检测人细胞色素氧化酶 2D6 药物代谢相关基因位点多态性

夏清荣, 单锋, 徐亚运, 梁俊, 曹银, 柳杨, 闫春宇

作者单位: 合肥市第四人民医院药剂科、安徽省精神卫生中心精神药理研究室, 安徽 合肥 230022

摘要:目的 建立测定人细胞色素氧化酶 2D6(CYP2D6) 基因多态性的限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 检测方法。方法 通过增加 PCR 扩增体系中 DNA 模板上样体积、降低引物浓度以及减少限制性内切酶的用量等方法改进、优化实验条件, 建立以 PCR-RFLP 法为基础的肝药酶 CYP2D6 基因型检测方法。结果 采用 PCR-RFLP 法能够检测 CYP2D6*2、CYP2D6*10 和 CYP2D6*14 基因型, 且过程简便, 经济实用。结论 该方法检测 CYP2D6 药物代谢相关基因位点基因型具有简便、高效、准确和经济的特点, 可在临床及实验室推广使用。

关键词: 细胞色素 P450 CYP2D6; 多态性, 限制性片段长度; 扩增片段长度多态性分析; 基因检测

Detection of CYP2D6 drug metabolism related locus polymorphism by PCR-RFLP

XIA Qingrong, SHAN Feng, XU Yayun, LIANG Jun, CAO Yin, LIU Yang, YAN Chunyu

Author Affiliation: Department of Pharmacy, Hefei Fourth People's Hospital, Mental Pharmacology of Anhui Mental Health Center, Hefei, Anhui 230022, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of human cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene polymorphism by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Methods** The experimental conditions were improved and optimized by increasing the sample size of DNA template, reducing the primer concentration and the amount of restriction endonuclease in PCR amplification system. The method for detecting the CYP2D6 genotype of liver drug enzyme based on PCR-RFLP method was established. **Results** The CYP2D6*2, CYP2D6*10 and CYP2D6*14 genotypes could be detected by PCR-

RFLP method, and the process was simple and economical. **Conclusion** PCR-RFLP method is simple, efficient, accurate and economical for detecting genotypes of CYP2D6 drug-related gene loci and can be used in clinical and laboratory applications.

Key words: Cytochrome P-450 CYP2D6; Polymorphism, restriction fragment length; Amplified fragment length polymorphism analysis; Genetic testing

人细胞色素氧化酶 2D6 (Cytochrome P450 2D6, CYP2D6) 作为细胞色素 P450 酶家族 (CYP450) 重要的一员, 约 25% 经 CYP450 酶系代谢的药物受其影响, CYP2D6 参与众多药物的体内代谢过程, 主要包括抗抑郁药、抗精神病药和阿片类药物等^[1-2]。相关研究表明, CYP2D6*2、CYP2D6*10 和 CYP2D6*14 基因多态性对 CYP2D6 酶的活性及药物代谢具有重要的影响^[3-5]。限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 是一种经典的基因型检测方法, 具有分型技术简单, 结果稳定, 特异性好, 灵敏度高, 对检材质量要求低等优点^[6-7], 因此, 本实验旨在通过 PCR-RFLP 法建立一种简便、准确和经济的 CYP2D6 基因型检测方法, 为临床个体化用药提供遗传学的依据。

本研究起止时间为 2017 年 8 月至 2018 年 6 月。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 HC-2518 型高速离心机 (安徽中科中佳公司), C1000™ Thermal 型实时定量荧光 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司), DYY-6C 型电泳仪 (北京六一公司), GenoSens-1850 型凝胶成像仪 (上海勤翔公司)。

1.1.2 试剂 (1) DNA 提取试剂盒: 血液 DNA 小量提取试剂盒 (HiPure Blood DNA Mini kit), 型号 D3111-03, Magen 公司; (2) 聚合酶链式反应混合物 (PCR Mix): 货号 P2012, 广州东盛生物科技有限公司; (3) DNA 凝胶加样缓冲液 (DNA loading buffer 5): 上海远慕公司; (4) 无水乙醇: 江苏强盛公司; (5) 琼脂糖: 德国 biofroxx 公司; (6) 引物: 通用生物公司; (7) HpaI 限制性内切酶: 型号 ER1101, Thermo scientific 公司; (8) HhaI 限制性内切酶: 型号 ER1851, Thermo scientific 公司; (9) MspI 限制性内切酶: 型号 ER0541, Thermo scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 样本采集和处理 抽取静脉血 3 mL, 置于乙二胺四乙酸·钾离子 (EDTA·K⁺) 抗凝管中, 4℃ 保存, 长期 -80℃ 保存。

1.2.2 DNA 的提取和 PCR 扩增 外周血总 DNA 提取采用 Magen 公司血液 DNA 小量提取试剂盒, 按照说明书操作。PCR 扩增采用普通 PCR 的方法, 按照说明书操作, 实验中所涉及到的引物序列见表 1。

表 1 PCR 使用的引物

基因	序列
CYP2D6*2	正向引物: 5-CCCCTGCACTGTTTCCCAGA-3
	反向引物: 5-CCCTTCTGTCCCGAGTATG-3
CYP2D6*10	正向引物: 5-CCATTTGGTAGTGAGGCAGGTAT-3
	反向引物: 5-CACCATCCATGTTTGTCTTCTGGT-3
CYP2D6*14	正向引物: 5-CAGAGACTCCTCGGTCTTCTCGCT-3
	反向引物: 5-GTGGATGGTGGGGCTAATGCCTT-3

PCR 扩增反应体系: DNA 模板 5.0 μL, 正向引物 1.0 μL, 反向引物 1.0 μL, 双蒸水 (ddH₂O) 18.0 μL, PCR Mix 25.0 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 10 min, 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 40 个循环, 4℃ 保存, 待酶切。

1.2.3 限制性内切酶处理 PCR 扩增产物 取 4 μL PCR 扩增产物采用 1.5% 凝胶进行凝胶电泳 (80 V 条件下 30 min), 凝胶成像仪下观察 PCR 扩增结果, 确保 DNA 扩增产物量达到酶切的条件。将扩增产物进行酶切, 37℃ 水浴 16 h, 酶切反应体系: PCR 扩增产物 8.0 μL, 限制性内切酶 0.5 μL, 10×New England Biolabs 公司酶缓冲液 (NE Buffer) 2.0 μL, 双蒸水 (ddH₂O) 9.5 μL。

不同 CYP2D6 基因型对应的限制性内切酶见表 2。

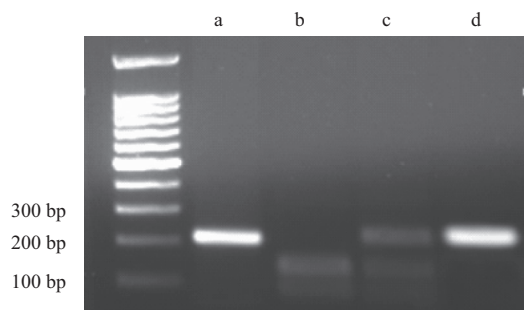
表 2 限制性内切酶的种类

目的基因	限制性内切酶
CYP2D6*2	HhaI
CYP2D6*10	HpaI
CYP2D6*14	MspI

1.2.4 酶切结果 取 8 μL 酶切产物用 2% 凝胶进行凝胶电泳 (80 V 条件下 15 min, 然后 120 V 条件下 15 min), 凝胶成像仪下观察酶切结果。

2 结果

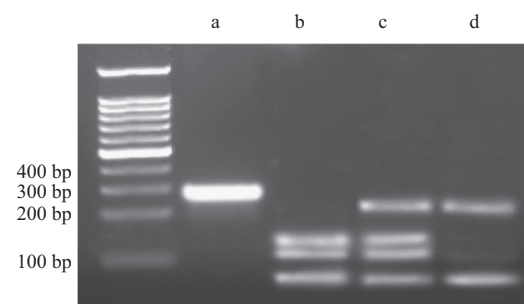
2.1 CYP2D6*2 PCR-RFLP 结果 样本 PCR 扩增产物长度为 211 bp 的特异性片段。CYP2D6*2 野生型纯合子 CC 产生 128 bp+83 bp 的片段, 突变型纯合子 TT 产生 211 bp 的片段, 突变型杂合子 CT 产生 211 bp+128 bp+83 bp 的片段。PCR 扩增产物及经 HhaI 酶切后所得产物结果见图 1。



注:条带a为PCR扩增产物;条带b为野生纯合子C/C;条带c为杂合子T/C;条带d为突变纯合子T/T

图1 CYP2D6*2 扩增产物的酶切结果分析

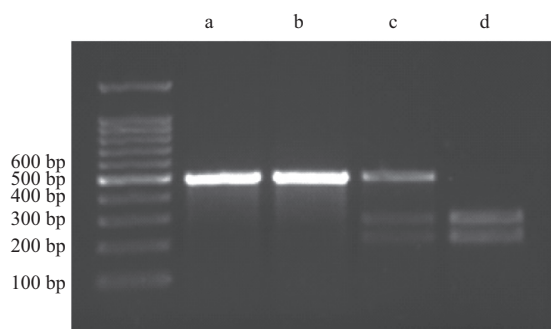
2.2 CYP2D6*10 PCR-RFLP 结果 样本PCR扩增产物长度为272 bp的特异性片段。CYP2D6*10 野生型纯合子CC产生213 bp+59 bp的片段,突变型纯合子TT产生112 bp+101 bp+59 bp的片段,突变型杂合子CT产生213 bp+112 bp+101 bp+59 bp的片段。PCR扩增产物及经HphI酶切后所得产物结果见图2。



注:条带a为PCR扩增产物;条带b为突变纯合子T/T;条带c为杂合子T/C;条带d为野生纯合子C/C

图2 CYP2D6*10 扩增产物的酶切结果分析

2.3 CYP2D6*14 PCR-RFLP 结果 样本PCR扩增产物长度为492 bp的特异性片段。CYP2D6*14 野生型纯合子CC产生285bp+207bp的片段,突变型纯合子TT产生492bp的片段,突变型杂合子CT产生492bp+285bp+207bp的片段。PCR扩增产物及经MspI酶切后所得产物结果见图3。



注:条带a为PCR扩增产物;条带b为突变纯合子T/T;条带c为杂合子T/C;条带d为野生纯合子C/C

图3 CYP2D6*14 扩增产物的酶切结果分析

3 讨论

药物代谢主要依赖于肝微粒体中的各种酶系,其中最重要的是CYP450酶系。CYP2D6作为CYP450家族重要的一员,主要参与抗精神病药物、抗抑郁药物和抗心律失常药物等的体内代谢过程^[8]。目前已经发现CYP2D6存在100个以上的等位基因^[9],这些基因突变后往往引起酶活性和数量的改变^[10],进而影响药物在体内的代谢速率,最终影响药物的疗效和导致不良反应的发生。

研究表明,CYP2D6基因多态性与抗高血压药物疗效及不良反应发生率存在一定的相关性^[11-14]。Yoshihiro等^[11]对1 880例研究对象的非同质单核苷酸多态性进行了分析,结果发现CYP2D6*10功能突变位点发生频率最高,达到51%~70%,而CYP2D6*10位点的突变可降低酶的活性,对美托洛尔药代动力学的影响甚为明显^[12]。桑海强等^[13]的研究证实了这一观点,依据基因型确定给药方案的治疗组降压总有效率显著高于常规治疗组,同时不良反应发生率明显降低。目前,临床已推荐口服美托洛尔前检测CYP2D6基因型,根据基因型调整给药剂量,以保证病人获得最大收益的同时降低发生不良反应的风险^[14]。CYP2D6在某些常用的精神科药物代谢过程中亦扮演了重要角色。国内外研究结果显示,利培酮、奋乃静、阿立哌唑、氯丙嗪等抗精神病药物的代谢过程与CYP2D6基因多态性密切相关^[15-17],其中CYP2D6*2、*10、*14基因型对抗精神病药物体内代谢过程影响重大^[3-5],可影响血药浓度、疗效及不良反应的发生,而精神科药物往往不良反应多且相对较为严重,因此,开展CYP2D6基因多态性的临床检测意义重大。

目前,在研究和检测药物基因组学方面,主要技术方法包括PCR-DNA测序技术、基因芯片技术、顺序特异性寡核苷酸聚合酶链式反应(polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide, PCR-SSO)技术及等位基因特异性寡核苷酸探针(polymerase chain reaction-allele specific oligonucleotide, PCR-ASO)技术等,这些技术方法的特点为自动化程度较高,人为操作影响小,但以上技术方法存在检测成本高、实验室条件要求严苛和操作复杂等缺点。因此,我们希望建立一种简便、快速、准确、经济的等位基因检测方法,用于鉴别CYP2D6的基因型,为临床个体化用药提供遗传学依据。

PCR-RFLP是一种经典的基因多态性检测方法,技术方法成熟,具有操作简单、特异性高、重复性好等优点,相对之前所述技术方法而言,仪器设

备、实验条件等投入成本较低,较为适合条件一般的实验室应用,可被广泛使用于医疗机构的临床检验。为此,我们查阅了相关文献,发现有研究者曾采用PCR-RFLP法检测CYP2D6位点的基因多态性。由于CYP2D6在外周血中表达量不及肝脏细胞,故与文献[17]中所采用的方法相比较,本实验通过增加PCR扩增体系中DNA模板上样体积确保扩增效果,同时,本研究降低了引物浓度以减少PCR扩增过程中引物二聚体对结果的影响。另外,我们通过降低退火温度和增加循环数确保模板DNA得到有效扩增的同时避免了杂带扩增带来的不利影响。通过以上的优化和改进,使得模板DNA得到有效的扩增,电泳条带清晰明了,避免了二聚体和杂带扩增带来的影响。

我们的实验方法亦具有经济节约、降低实验成本的优点,相较于采用PCR-DNA测序技术、基因芯片技术等高新技术所需配备的诸如焦磷酸测序仪、基因芯片测序仪等上百万甚至数百万的昂贵设备,PCR-RFLP法仅需配备数千元的设备即可;同时由于限制性内切酶价格较高,在保证酶切结果稳定、可靠、满意的前提下,与文献[17]相比较,本实验酶切体系限制性内切酶的用量减半,有效地降低了实验成本。另外,本研究的结果采用焦磷酸测序法进行了验证(由安徽通用生物系统有限公司完成,测序号为s142585、s143294和s155376),进一步证实了PCR-RFLP法的可靠性。然而,PCR-RFLP法亦有其明显的缺点,主要是通量太低,大量分型时工作量大,并且只适用于部分单核苷酸多态性分型。值得注意的是,采用PCR-RFLP法检测基因多态性时,需尽可能确保模板DNA扩增的特异性,避免非特异性产物的出现从而竞争酶活性,导致模板DNA剪切不完全及杂带的出现;同时,酶切过程需尽可能充分、完全,避免假阴性结果的出现。

综上所述,本研究建立了以PCR-RFLP法为基础的CYP2D6药物代谢相关基因位点基因型检测的方法,该方法具有简便、高效、准确、经济的特点,可在临床及实验室推广使用,以期为临床个体化合理用药和精准医疗及相关基础研究提供方法依据。

参考文献

- [1] GAEDIGK A. Complexities of CYP2D6 gene analysis and interpretation[J]. *Int Rev Psychiatry*, 2013, 25(5): 534-553.
- [2] 王琴, 胡琪. 他汀类药物代谢相关基因多态性及其不良反应[J]. *安徽医药*, 2016, 20(5): 998-999.
- [3] MONTANE LJ, PAUL J, LALLA A, et al. Impact of CYP2D6 on venlafaxine metabolism in Trinidadian patients with major depressive disorder[J]. *Pharmacogenomics*, 2018, 19(3): 197-212.
- [4] BAGHERI A, KAMALIDEHGHAN B, HAGHSHENAS M, et al. Prevalence of the CYP2D6*10 (C100T), *4 (G1846A), and *14 (G1758A) alleles among Iranians of different ethnicities[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 2627-2634.
- [5] STORELLI F, MATTHEY A, LENGLET S, et al. Impact of CYP2D6 functional allelic variations on phenoconversion and drug-drug interactions[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 104(1): 148-157.
- [6] POURYASIN M, SHARAFI H, BEHNAVA B, et al. A simple PCR-RFLP method for genotyping of IFNL4 rs368234815 polymorphism in patients with chronic hepatitis C[J]. *Lab Med*, 2017, 48(1): 51-56.
- [7] 闫杨, 王红梅, 宋楠, 等. PCR-RFLP和MLPA两种技术方法对脊髓性肌萎缩症的诊断[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, 25(4): 49-51.
- [8] WALDEN LM, BRANDL EJ, TIWARI AK, et al. Genetic testing for CYP2D6 and CYP2C19 suggests improved outcome for antidepressant and antipsychotic medication[J]. *Psychiatry Res*, 2019, 279: 111-115.
- [9] FRIEDRICH DC, GENRO JP, SORTICA VA, et al. Distribution of CYP2D6 alleles and phenotypes in the Brazilian population[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110691. DOI: 10.1371/journal.pone.0110691.
- [10] 闵茗, 陆光华, 禹顺英, 等. CYP2D6基因多态与氯氮平血药浓度的关系[J]. *精神医学杂志*, 2017, 30(3): 213-216.
- [11] KOKUBO Y, TOMOIKE H, TANAKA C, et al. Association of sixty-one non-synonymous polymorphisms in forty-one hypertension candidate genes with blood pressure variation and hypertension[J]. *Hypertension Research*, 2006, 29(8): 611-619.
- [12] BORKAR RM, BHANDI MM, DUBEY AP, et al. An evaluation of the CYP2D6 and CYP3A4 inhibition potential of metoprolol metabolites and their contribution to drug-drug and drug-herb interaction by LC-ESI/MS/MS[J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(10): 1556-1572.
- [13] 桑海强, 宁建平, 袁洪, 等. 美托洛尔常规治疗组与基因导向治疗高血压病的比较[J]. *医学与哲学*, 2008, 29(4): 46-48.
- [14] LI S, LIN H, SUN W, et al. A meta-analysis of the effect of CYP2D6 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of metoprolol[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2017, 55(6): 483-492.
- [15] 曾雷, 元静, 康传媛, 等. CYP2D6基因多态性与利培酮治疗精神分裂症疗效的关联研究[J]. *中华精神科杂志*, 2017, 50(2): 139-145.
- [16] DE LJ. Have we successfully implemented CYP2D6 genotyping in psychiatry? [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2017, 13(12): 1201-1203.
- [17] 张璇, 杨叶雅, 齐立国. CYP2D6基因多态性对阿立哌唑血药浓度及临床疗效的影响[J]. *中国药房*, 2013, 24(18): 1660-1662.

(收稿日期: 2018-10-09, 修回日期: 2018-11-19)