

中国汉族人群 S-美芬妥英 4'-羟化酶的表型与基因分析

姚彤炜*, 陈枢青, 王彤文, 曾 苏, 阮宏强, 李菊花

(浙江大学湖滨校区药物分析教研室, 杭州 310031)

摘要 目的: 研究中国汉族人群 S-美芬妥英 4'-羟化代谢遗传多态性。方法: 以美芬妥英为探针药物采用手性毛细管气相色谱法测定尿中 S-/R-MP 浓度比值, 对 90 名志愿者进行了表型分型测定, 应用 PCR 技术对其中的 26 名志愿者进行了 S-美芬妥英 4'-羟化酶(CYP2C19)基因分析。结果: 表型分析结果, 11 人属慢代谢者(PM), S/R 比值 ≥ 0.95 ; 基因分析结果, 6 人为野生型纯合子(wt/wt); 10 人为杂合子(wt/m₁ 和 wt/m₂), 9 人为 CYP2C19m₁ 突变型纯合子(m₁/m₁), 1 人为两突变型杂合子(m₁/m₂)。结论: 表型分析与基因分析结果显示了很好的相关性, 本实验测得慢代谢者的频发率为 12.2%, 与文献报道相符。

关键词 美芬妥英; S-美芬妥英 4'-羟化酶(CYP2C19); 表型测定; 基因分析

细胞色素 P450 2C19(CYP2C19)参与十几种药物的代谢, 研究表明, 人群对美芬妥英(mephenytoin, MP)型药物的氧化代谢呈遗传多态性和种族差异^[1]。基因分析证明这种代谢差异与代谢酶基因突变有关^[2]。我们的最新研究发现 CYP2C19 活性可能与某些癌症的发病率有一定关系(未发表)。因此, 以美芬妥英为探针进行表型分型研究, 不仅对临床合理用药, 而且对某些肿瘤的预防都有重要意义。目前, 进行表型分型测定的方法通常是用口服单剂量 MP 后, 收集服药后一定时间内的尿样, 测定尿中 S-MP/R-MP 浓度比值, 以 S/R 比值 0.95 为临界线, 进行快慢代谢分型, S/R > 0.95 的为慢代谢者(PM), S/R < 0.95 的为快代谢者(EM)^[3]。或测定 S-美芬妥英羟化指数(S-MP/4'-OH-MP, HI), 以 log HI 1.5 为分型临界线, ≥ 1.5 为 PM^[4]。测定羟化指数法由于难区分非依从性 EM 和真正 PM, 以及尿样收集不完全, 药物吸收不良引起的假 PM 等缺点, 目前多采用 S/R 比值法进行表型分型测定^[5]。本文采用手性毛细管气相色谱法对 90 名志愿者进行表型分型测定, 并对其中的部分志愿者进行了基因分析比较。

材 料 与 方 法

仪器 岛津 GC-15A 气相色谱仪, CR-4A 数据

处理器。PCR 仪(Hybrid)。

试剂 外消旋美芬妥英对照品, 美芬妥英片(Sandoz 制药有限公司), PCR 试剂盒(Promega 公司), dNTP(Promega 公司), 引物(上海 Sangon 公司), 标准分子量 DNA 样品(华美生物工程公司), Igepal(Sigma 公司), 其他试剂均为分析纯。

表型分析 按文献^[6]方法。

色谱条件 色谱柱: Chirasil-Val 手性毛细管石英开管柱(25 m × 0.32 mm id); 检测器: FID; 以高纯氮为载气, 流速 2.5 ml·min⁻¹; 氢气与空气的流速比为 1:10; 柱温: 185℃; 气化室温度: 220℃; 检测室温度: 250℃。

测定方法 精密吸取已解冻的尿样 3.0 ml, 加二氯乙烷 5.0 ml, 振摇, 离心, 取有机层用 0.01 mol·L⁻¹ NaOH 溶液和 0.01 mol·L⁻¹ HCl 溶液各 1 ml 洗涤, 弃去水液, 有机层置 55℃ 水浴中在氮气流下吹干, 用乙酸乙酯 10 μl 溶解残渣, 取 1 μl 注入气相色谱仪。

基因分析

(1) **DNA 制备** 参考文献^[7]方法, 取血样 2 ml, 加 TKM1(10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 7.6, 10 mmol·L⁻¹ KCl, 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 2 mmol·L⁻¹ EDTA) 2 ml, Igepal 0.05 ml, 充分摇匀, 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min (4℃), 弃去上清液, 加 TKM1 重复上述操作, 于沉淀中加 TKM2(0.4 mol·L⁻¹ NaCl, 其他与 TKM1 同) 0.32 ml, 10% 十二烷基硫酸钠(SDS) 0.02 ml, 置 55℃ 水浴使沉淀溶解, 冰浴冷却 10 min, 加 6 mol·L⁻¹ NaCl 0.12 ml, 继续冷却

10 min, 4°C 10 000 r·min⁻¹离心 10 min, 取上清液, 加无水乙醇, 析出 DNA, 将沉淀溶解在 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 和 1 mmol·L⁻¹ EDTA 混合溶液(pH 8.0)中, 冰箱保存备用。

(2) **ASA-PCR** 反应 参考文献^[8,9]方法, CYP2C19_{m1} 的 ASA-PCR 扩增条件: 94°C 1 min, 61°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环, 72°C 延伸 10 min, 引物:

正向(F₁) = 5'-AATTACAACCAGAGAGCTTGGC-3';

反向(R_{w1}) = 5'-GTAATTTGTTATGGGTTCCC-3';

反向(R_{m1}) = 5'-GTAATTTGTTATGGGTTCCCT-3'。

CYP2C19_{m2} 的 ASA-PCR 扩增条件: 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1.0 min, 30 个循环, 72°C 延伸 10 min, 引物:

正向(F₂) = 5'-TATTATTATCTGTAACTAATATGA-3';

反向(R_{w2}) = 5'-AACTTGGCCTTACCTGGATC-3';

反向(R_{m2}) = 5'-AACTTGGCCTTACCTGGATT-3'。

结 果

1 人群代谢分型测定

志愿者为浙江医科大学学生(20~24岁), 均为汉族, 男生 39 人, 女生 51 人, 体检证明无肝肾疾病,

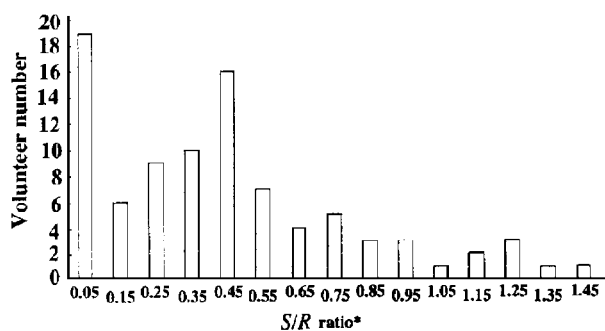


Fig 1 The phenotype analysis of *S*-mephenytoin hydroxylase in Chinese subjects.

* *S/R* ratio: *S*-mephenytoin/*R*-mephenytoin concentration ratio in the urine of 90 Chinese subjects 0 to 8 h after administration of a dose of 100 mg racemic mephenytoin.

讨 论

根据表型分析结果, MP 排泄量与不同代谢类型间没有相关性, 但从总体考虑 PM 尿中 *S*, *R*-MP

睡前 *po* MP 100 mg, 收集 0~8 h 内尿样 100~500 ml 作为人群代谢分型样本, 测定两对映体浓度, 计算 *S/R* 比值, 对 90 名志愿者尿样测定结果见图 1。以 *S/R* 比值 0.95 作为临界线, 受试人群中比值大于 0.95 的有 11 人, 测得大部分 PM 尿中 *S*, *R*-MP 平均浓度分别为 (430 ± 245) ng·ml⁻¹ 和 (402 ± 275) ng·ml⁻¹, EM 中 *S*-MP 平均浓度为 (108 ± 93) ng·ml⁻¹, *R*-MP 平均浓度为 (307 ± 203) ng·ml⁻¹。其中有 2 名 PM 尿中两对映体的浓度比其他慢代谢者高 30~90 倍, *S*-MP 分别为 15 870 和 40 080 ng·ml⁻¹, *R*-MP 分别为 13 140 和 23 860 ng·ml⁻¹。在 EM 中约 90% 的个体 *S/R* 比值在 0.7 以下, 其中 23% 的个体尿中未检出 *S*-MP, 约 10% 的个体 *S/R* 比值在 0.7~0.95 之间(图 1)。

2 CYP2C19 基因分析

选取 10 名慢代谢和 16 名快代谢进行基因分析, 结果见图 2。在 10 名慢代谢中, 9 名是 CYP2C19_{m1} 突变型纯合子 (*m1/m1*), 1 名是 CYP2C19_{m1} 和 CYP2C19_{m2} 杂合子 (*m1/m2*); 在 16 名快代谢中, 6 名是野生型纯合子 (*wt/wt*), 7 名为 CYP2C19_{m1} 杂合子 (*wt/m1*), 3 名为 CYP2C19_{m2} 杂合子 (*wt/m2*)。

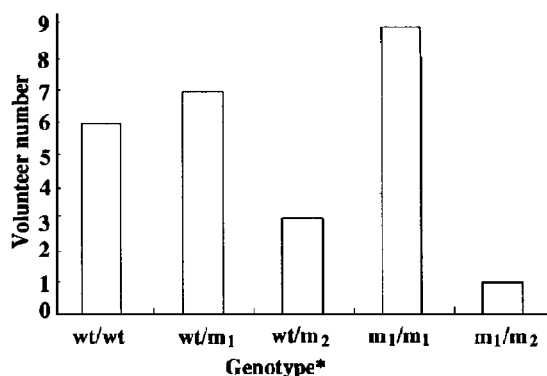


Fig 2 The genotype analysis of *S*-mephenytoin hydroxylase in Chinese subjects.

* *wt/wt*: CYP2C19_{wt}/CYP2C19_{w/t} homozygous;
wt/m1: CYP2C19_{wt}/CYP2C19_{m1} heterozygous;
wt/m2: CYP2C19_{wt}/CYP2C19_{m2} heterozygous;
m1/m1: CYP2C19_{m1}/CYP2C19_{m1} homozygous;
m1/m2: CYP2C19_{m1}/CYP2C19_{m2} heterozygous.

平均浓度均高于 EM。*S*-美芬妥英羟化代谢 PM 发生率存在着明显的种族差异, 北美、欧洲白种人为 3%~5%, 日本人为 18%~23%^[2], 中国人为 14%~18%^[5]。本文以 *S/R* 比值 0.95 为临界线, 测得

PM 发生率为 12.2%。Xiao ZS 等^[10]在对中国不同民族 S-美芬妥英 4-羟化代谢多态性研究时以 S/R 比值 0.78 为临界线进行分型, de Morais 等^[11]测得 EM 与 PM 间 S/R 比值有部分重叠。本实验中有 3 人 S/R 比值在 0.8~0.95 之间, 若以 S/R 比值 0.8 为临界线, 则 PM 发生率为 15.6%。

比较第 1 次取样测定结果, 其中两名志愿者两法结果不符, 重新取样进行了基因和表型分析。并将部分尿样酸化进行对照分析, 测得结果, 两名志愿者未酸化的尿样的 S/R 比值分别为 0.16 和 0.08, 酸化后的尿样的 S/R 分别为 0.73 和 0.72。基因分析结果仍为 wt/wt。由重测结果可以确证该两个志愿者属 EM。根据文献^[10]指出, 某些快代谢尿中存在着酸不稳定代谢物, 这些代谢物在尿中可分解再生成为 S-MP, 使 S/R 比值增加, 导致错判, 因此, 若尿样酸化后 S/R 比值明显增加, 表明该个体为快代谢。可见, 尿样 pH 很重要, 一般正常尿样

pH 为 5.5~6.0, 我们用盐酸酸化, 酸化后的尿样 pH 为 1~1.5, S/R 比值较未酸化的大 4~9 倍。此外, 尿样的储存时间对测定也有影响, 对两名志愿者的第 1 次样品是在 -20℃ 下保存了一个多月后测定的, 而第 2 次测定是取新鲜尿样当天测定, 尿样在储存期间可能会起一些变化, 导致 S/R 比值改变。

目前已明确东方人的 CYP2C19 的两个突变等位基因是 CYP2C19_{m1} 和 CYP2C19_{m2}, 其中具有 CYP2C19_{m1} 等位基因的占慢代谢的 75%~83%^[12]。Xiao ZS 等^[10]和 Ferguson 等^[13]最近在白种人中发现一个新的突变位点, 命名为 CYP2C19_{m3}; 在中国白族人中也发现了一个新的突变位点, CYP2C19 基因的第 9 外显子 1297 位碱基对发生了突变(C→T), 命名为 CYP2C19_{m4}。本实验测得 PM 中具有 m₁/m₁ 纯合子突变基因的占 90%, m₁/m₂ 杂合子突变基因的占 10%, 未检出 CYP2C19_{m2} 纯合子(m₂/m₂), 这与文献报道的 CYP2C19_{m1} 和 CYP2C19_{m2} 基本解释了东方人 S-MP 慢代谢是相一致的。表型分型结果与基因分型结果完全一致(表 1)。慢代谢的频发率也与文献报道的基本相符。

Tab 1 The phenotype and genotype analysis of S-mephenytoin hydroxylase in Chinese subjects[▲]

Urine No.	Genotype [*]			Phenotype ^{**}	
	CYP2C19 _{m1}	CYP2C19 _{m2}	Genotype	S/R ratio	Phenotype
1	wt/m ₁	wt/m ₂	m ₁ /m ₂	1.20	PM
2	m ₁ /m ₁	wt/wt	m ₁ /m ₁	1.00	PM
3	m ₁ /m ₁	wt/wt	m ₁ /m ₁	1.21	PM
4	m ₁ /m ₁	wt/wt	m ₁ /m ₁	1.22	PM
5	m ₁ /m ₁	wt/wt	m ₁ /m ₁	1.21	PM
6	m ₁ /m ₁	/	m ₁ /m ₁	1.06	PM
7	m ₁ /m ₁	/	m ₁ /m ₁	0.95	PM
8	m ₁ /m ₁	/	m ₁ /m ₁	0.99	PM
9	m ₁ /m ₁	/	m ₁ /m ₁	1.14	PM
10	m ₁ /m ₁	/	m ₁ /m ₁	1.41	PM
11	wt/wt	wt/wt	wt/wt	0.08	EM
12	wt/wt	wt/wt	wt/wt	0.16	EM
13	wt/wt	wt/wt	wt/wt	0	EM
14	wt/wt	wt/wt	wt/wt	0.56	EM
15	wt/wt	wt/wt	wt/wt	0	EM
16	wt/wt	wt/wt	wt/wt	0.41	EM
17	wt/wt	wt/m ₂	wt/m ₂	0	EM
18	wt/wt	wt/m ₂	wt/m ₂	0	EM
19	wt/wt	wt/m ₂	wt/m ₂	0.34	EM
20	wt/m ₁	wt/wt	wt/m ₁	0.6	EM
21	wt/m ₁	wt/wt	wt/m ₁	0.26	EM
22	wt/m ₁	wt/wt	wt/m ₁	0.4	EM
23	wt/m ₁	wt/wt	wt/m ₁	0.35	EM
24	wt/m ₁	wt/wt	wt/m ₁	0.84	EM
25	wt/m ₁	wt/wt	wt/m ₁	0.75	EM
26	wt/m ₁	/	wt/m ₁	0.61	EM

[▲] Individuals were phenotyped with the S-mephenytoin/R-mephenytoin concentration ratio in urine after an oral dose of 100 mg racemic mephenytoin. * wt: wild-type; m₁: CYP2C19 mutation in exon 5; m₂: CYP2C19 mutation in exon 4. ** S/R: the S-mephenytoin/R-mephenytoin concentration ratio; PM: poor metabolizer; EM: extensive metabolizer.

参 考 文 献

- 1 Wilkinson GR, Guengerich FP, Branch RA. Genetic polymorphism of S-mephenytoin hydroxylation. *Pharmacol Ther*, 1989, **43**:53
- 2 Kubota T, Chiba K, Ishizaki T, et al. Genotyping of S-mephenytoin 4'-hydroxylation in an extended Japanese population. *Clin Pharmacol Ther*, 1996, **60**:661
- 3 匡唐永, 张家美, 邹安庆, 等. 手性毛细管气相色谱法测定人尿中美芬妥英光学异构体含量的方法学研究. *药理学报*, 1993, **28**:307
- 4 阮邹荣, 赵奕, 周君富, 等. 中国健康志愿者 S-美芬妥英和苯妥英 4'-羟化代谢的相关性研究. *中国临床药理学杂志*, 1994, **10**:22
- 5 楼雅卿, 匡唐永. 美芬妥英代谢及其羟化代谢多态性研究. *中国临床药理学杂志*, 1992, **8**:173
- 6 姚彤炜, 曾苏, 阮宏强, 等. 手性毛细管气相色谱法测定人尿中美芬妥英对映体的含量及其在代谢分型中的应用. *色谱*, 1998, **16**:408
- 7 Chen S, Chou WH, Blouin RA, et al. The cytochrome P450-2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry. *Clin Pharmacol Ther*, 1996, **60**:522
- 8 赵鲁杭, 孙红颖, 郑妮娜, 等. 细胞色素 P450 2C19 单碱基突变位点 CYP2C19_{m1} 的分析. *中国现代应用药理学*, 1998, **15**:36
- 9 赵鲁杭, 孙红颖, 付云峰, 等. 等位基因特异扩增法分

- 析 CYP2C19_{m2} 突变. 浙江肿瘤, 1998, 4:162
- 10 Xiao ZS, Goldstein JA, Xie HG, *et al.* Differences in the incidence of the CYP2C19 polymorphism affecting the *S*-mephenytoin phenotype in Chinese Han and Bai populations and identification of a new rare CYP2C19 mutant allele. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 281:604
- 11 de Morais SMF, Goldstein JA, Xie HG, *et al.* Genetic analysis of the *S*-mephenytoin polymorphism in a Chinese population. *Clin Pharmacol Ther*, 1995, 58:404
- 12 Ieiri I, Kubota T, Urae A, *et al.* Pharmacokinetics of omeprazole (a substrate of CYP2C19) and comparison with two mutant alleles, CYP2C19_{m1} in exon 5 and CYP2C19_{m2} in exon 4, in Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 1996, 59:647
- 13 Ferguson RJ, de Morais SMF, Benhamou S, *et al.* A novel genetic defect of human CYP2C19 responsible for poor metabolism of *S*-mephenytoin. Presented at ISSX (San Diego, CA), 1996

THE PHENOTYPE AND GENOTYPE ANALYSIS OF *S*-MEPHENYTOIN HYDROXYLASE (CYP2C19) IN CHINESE SUBJECTS

Yao Tongwei(Yao TW), Chen Shuqing(Chen SQ), Wang Tongwen(Wang TW),
Zeng Su(Zeng S), Ruan Hongqiang(Ruan HQ) and Li Juhua(Li JH)

(Department of Pharmaceutical Analysis, Zhejiang University, Hangzhou 310031)

ABSTRACT AIM: To assess the phenotype and genotype pattern of *S*-mephenytoin 4'-hydroxylation in Chinese population. **METHODS:** The phenotypes of ninety healthy subjects were analyzed with *S/R* mephenytoin ratio in urine after an oral dose of 100 mg racemic mephenytoin by chiral GC-FID method. The genotypes of twenty-six among the 90 subjects were analyzed with identifying the wild-type(wt) gene and two mutations, CYP2C19_{m1} and CYP2C19_{m2} by PCR method. **RESULTS:** Of the 90 subjects eleven were identified as poor metabolizers with the *S/R* ratio of ≥ 0.95 . Among the 26 genotyped subjects six were homozygous for wild-type (wt/wt); nine were homozygous for CYP2C19_{m1}(m₁/m₁); seven were heterozygous for the CYP2C19_{m1}(wt/m₁); three were heterozygous for the CYP2C19_{m2}(wt/m₂); one was the heterozygous for the two defects (m₁/m₂). **CONCLUSION:** The result of CYP2C19 genotype analysis was in agreement with that of phenotype analysis. The frequency of PM by phenotype analysis was 12.2%.

KEY WORDS mephenytoin; *S*-mephenytoin hydroxylase(CYP2C19); phenotype analysis; genotype analysis