

· 论 著 ·

基因芯片法检测抗高血压药物 相关基因多态性

杨 凡¹, 赵钢涛¹, 丁媛媛¹, 边佳明¹, 肖乐东², 许景峰¹

[摘要] 目的 检测中国人的 5 个抗高血压药物相关基因的多态位点, 进行基因分型, 计算检测位点的等位基因频率, 为预测遗传因素对治疗高血压药物的影响提供数据。方法 用基因芯片法对 220 例样本的 5 个抗高血压药物相关的基因多态位点进行检测分型。结果 检测了 220 例样本基因型, 计算得到 4 个等位基因频率, CYP2C9*3 为 5.68%, ADRB1 (G1165C) C 为 74.09%, AGTR1 (A1166C) C 为 7.73%, ACE (I/D) 等位基因 D 为 34.09%。有 6 例样本 CYP2D6 基因检测无结果。结论 5 个抗高血压药物相关多态位点在 220 例中国人中均有分布, 可能影响相关药物在个体中的作用, 从而影响高血压病的疗效。

[关键词] 高血压病; 基因芯片; 基因多态性

中图分类号: R972^{+.4} 文献标志码: A 文章编号: 1672-271X(2010)05-0397-04

Detection of polymorphisms in antihypertensive drug related genes by gene microarray

YANG Fan¹, ZHAO Gang-tao¹, DING Yuan-yuan¹, BIAN Jia-ming¹, XIAO Le-dong², XU Jing-feng¹.

1. Department of Pharmacology, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing 100700, China;

2. Hunan Hong Hao Gene Biotechnology Co. Ltd, Changsha, Hunan 410007, China

[Abstract] **Objective** To detect and genotype five polymorphisms in antihypertensive drug related genes in Chinese. The frequencies of the alleles were calculated to provide genetic parameters for prediction of the influence in antihypertensive drug treatment. **Methods** The genotypes of five polymorphisms in antihypertensive drug related genes were detected by gene microarray in 220 samples. **Results** The frequencies of four polymorphisms were calculated in 220 samples, in which frequency of CYP2C9*3 was 5.68%, ADRB1 1165C allele was 74.09%, AGTR1 1166C was 7.73%, and ACE D allele was 34.09% respectively. Six samples were no results in detection of CYP2D6 by gene microarray. **Conclusion** The alleles of five gene polymorphisms were discovery in 220 samples. They maybe affect interaction between body and drug and cause individual variation.

[Key words] hypertension; gene microarray; polymorphism

大部分高血压患者需要长期服用抗高血压药物控制血压, 但药物相关受体和代谢酶具有个体差异, 这种差异主要是由药物相关基因多态性引起的。现已得到一些可能与抗高血压药物有关的基因信息, 可以通过检测这些基因的突变位点, 预测遗传因素对药物反应的影响, 以避免药物不良反应或无效用药^[1-2]。本实验采用高血压药物相关基因芯片检测试剂盒, 对三类抗高血压药物(血管紧张素 II 受体阻断药、β 受体阻断药、血管紧张素转化酶抑制

药) 相关的 5 个基因多态位点 CYP2C9 A1075C (1075C, CYP2C9*3)、ADRB1 G1165C、AGTR1 A1166C、CYP2D6 C100T (100T, CYP2D6*10) 和 ACE 基因第 16 内含子 Alu 序列的插入/缺失即 I/D 多态性进行检测, 分析各基因的基因型, 并对等位基因的频率进行分析。

1 材料与方法

1.1 标本来源 血液标本来自 220 例健康志愿者, 均签署了知情同意书。用 EDTA-K₂ 抗凝管, 采静脉血 2 ml, 置冰箱冷藏, 在 24 h 内提取基因组 DNA。

1.2 仪器与试剂 微阵列芯片扫描仪 (LuxScan 10K-B, 博奥生物公司), PCR 扩增仪 (Tpersonal-48

作者简介: 杨 凡 (1979-), 女, 北京人, 硕士, 主管药师, 从事遗传药理学研究工作

作者单位: 1. 100700 北京, 北京军区总医院药理科; 2. 410007 湖南长沙, 湖南宏灏生物医药有限公司

型,美国 Biometra 公司),微量核酸分光光度计(ASP-2680,美国 Act Gene 公司),高速离心机(Mikro120,德国 Hettich 公司),恒温水浴锅(DKB-501A 型,上海森信公司)。全血基因组 DNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司);高血压药物相关基因芯片检测试剂盒(湖南宏灏生物医药有限公司)。

1.3 检测方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 吸取全血 300 μl 置于 1.5 ml Eppendorf(EP)管中,用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, DNA 干燥后加入 50 μl 试剂盒自带的 DNA 溶解液过夜,使 DNA 完全溶解。

1.3.2 基因组 DNA 完整性及浓度纯度检测 取 DNA 溶液 2 μl , 与 6 \times Loadingbuffer 1 μl 混合点样。用琼脂糖凝胶电泳,电压 90 V,时间 40 min。电泳完毕,将胶放入溴化乙锭(EB)溶液中浸泡 20 min 后,取出放置于凝胶成像系统观察平台上,在紫外灯下观察基因组 DNA 完整性。用紫外分光光度计检测 DNA 样本,仪器自动计算得到样本浓度和纯度。

1.3.3 基因扩增 取经过灭菌的 200 μl PCR 离心管(5 支/样本,共检测 5 个位点)置于 96 孔板上并编号,放在冰盒内。配制 20 μl 反应体系,依次在每管中加入芯片试剂盒自带的 PCR 反应液 18.8 μl 、尿苷酶(UNG)0.2 μl 及 Taq DNA 聚合酶 0.2 μl ,最后加入样本基因组 DNA 0.8 μl ,混匀后 8000 r/min 离心数秒,置 PCR 扩增仪中进行扩增。反应程序为:37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,70 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环后,70 $^{\circ}\text{C}$ 2 min。每次扩增时设置一份空白对照。

1.3.4 芯片杂交 在芯片杂交舱中两侧滴入约 200 μl 双蒸水,再将芯片平放入舱内。从每个样本的 5 个 PCR 产物中分别吸取 3 μl 至 200 μl PCR 管中,再加入 8 μl 杂交反应液(先 41 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,振荡混匀)和 1 μl 定位参照液,混匀后离心数秒备用。吸取 20 μl 混合液,加于芯片反应区内,并使其均匀平铺,盖上杂交舱并使之密闭,放入 41 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中杂交 2 h。然后取出芯片去除上面的覆膜,用试剂盒自带的洗涤液浸洗芯片,用蒸馏水洗去残留洗涤液,最后放入离心机内甩干。

1.3.5 芯片扫描 从离心机内取出芯片,放入芯片扫描仪中进行扫描,生成图谱,再用仪器自带的软件分析处理图谱上的荧光信号数据,保存为 Excel 文件,同时可将扫描图以图片格式保存。最后,使用高血压数据分析软件 1.0(湖南宏灏生物医药有限公司研发)分析数据即可得基因分型结果。

1.4 统计学处理 计数基因型和等位基因的频率。

采用 SPSS13.0 软件包,用 χ^2 检验验证哈代-温伯格遗传平衡定律, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因组 DNA 完整性及浓度 基因组 DNA 荧光条带位于 20 kb 以上位置,表明其完整性较好,可用于下一步扩增。同时,使用紫外分光光度计检测 DNA 样本,结果样本浓度在 100 ~ 200 ng/ μl ,纯度检测值 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 为 1.8 ~ 2.0,符合扩增条件。

2.2 芯片检测结果 实验得到了 220 例样本的 5 个基因多态性位点的检测结果。图 1A 为一例样本的芯片扫描图,图 1B 为芯片各位点探针分布图示,其检测结果为:CYP2C9(A1075C)为 AA 野生型纯合子,ADRB1(G1165C)基因为 CC 突变纯合子,AGTR1(A1166C)为 AA 野生型纯合子,CYP2D6(C100T)为 CYP2D6*10 突变纯合子,ACE 为 ID 杂合子。在检测的样本中发现了 23 例 CYP2C9*3 突变杂合子和 1 例突变纯合子,34 例 AGTR1(A1166C)AC 突变杂合子,没有发现突变纯合子。表 1 为 5 个检测位点基因型的分布比率。另外,样本中有 6 例 CYP2D6 基因型没有检测出结果(表 1),可能是具有 CYP2D6*5 突变,为 CYP2D6 基因缺失。根据芯片分型结果得到样本的基因型,计算得到等位基因的频率(表 2)。经 χ^2 检验,基因型比率符合哈代-温伯格遗传平衡定律($P > 0.05$)。

3 讨论

CYP2C9 及 CYP2D6 基因均属于细胞色素 P450 (CYP450)基因家族,它们负责编码产生的蛋白是主要的药物代谢酶之一,作用底物包含了多种药物,如 CYP2C9 可代谢苯妥英、华法林、沙坦类抗高血压药物等,CYP2D6 的底物包括普萘洛尔等 β 受体阻断药^[3]。CYP2C9*3、CYP2D6*10 是中国人中主要的基因突变类型,在中国人中的分布分别为 2% ~ 6%,51.3% ~ 70%,突变可导致相应的酶活性下降,从而影响药物的代谢水平^[3-5]。本实验检测结果显示,CYP2C9*3 等位基因的频率为 5.68%,经检验基因型分布符合哈代-温伯格遗传平衡定律,与以往报道基本一致。

实验中 6 例样本没有检测出 CYP2D6 的基因型,这可能是由于样本在基因多态性检测位点具有其他类型的突变,据分析很可能为 CYP2D6*5。CYP2D6*5 为基因缺失型突变,可使酶活性丧失,引起药物不良反应的发生^[6]。在一项对 223 例中国人的检测中,曾发现其等位基因频率可达 7.2%,而

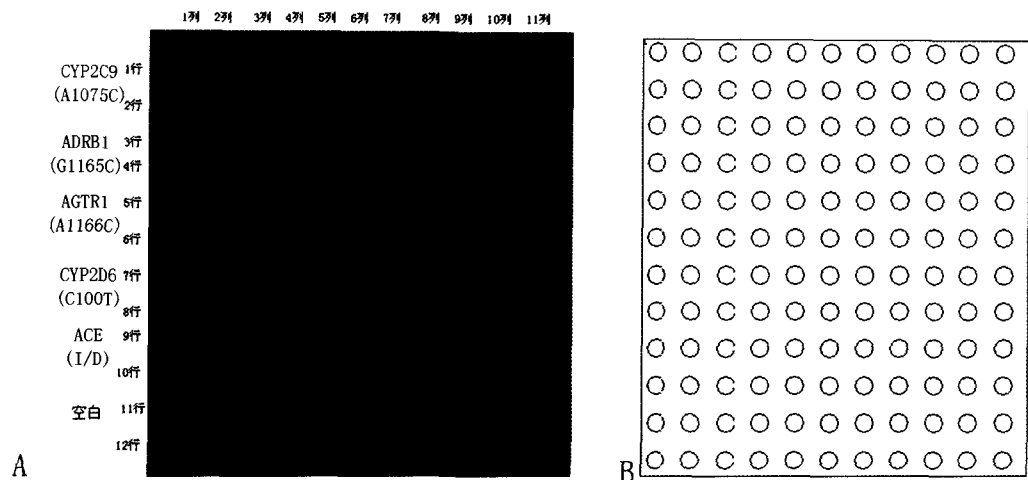


图 1 A:一例芯片检测扫描图; B:芯片各位点探针分布图示

第 1 列为芯片杂交定位参照,2~6 列为基因多态位点的野生型探针(或 ACE I 型),7~11 列为突变型探针(或 ACE D 型)。第 1 行 2~11 列检测 CYP2C9(A1075C),第 2 行 2~6 列为此基因阳性参照,7~11 列为阴性参照;以下各行顺序检测 ADRB1(G1165C)、AGTR1(A1166C)、CYP2D6(C100T)、ACE(I/D)基因型,最后两行 2~11 列为空白对照

表 1 基因分型结果[*n* = 220,例(%)]

检测位点	野生型纯合子(II)	突变型杂合子(ID)	突变型纯合子(DD)	测不出
CYP2C9(A1075C)	196(89.10)	23(10.45)	1(0.45)	0(0.00)
ADRB1(G1165C)	16(7.27)	82(37.27)	122(55.46)	0(0.00)
AGTR1(A1166C)	186(84.55)	34(15.45)	0(0.00)	0(0.00)
CYP2D6(C100T)	56(25.45)	62(28.18)	96(43.64)	6(2.73)
ACE(I/D)	88(40.00)	114(51.82)	18(8.18)	0(0.00)

表 2 等位基因频率分布(%)

等位基因	CYP2C9		ADRB1		AGTR1		ACE	
	A	C	G	C	A	C	I	D
频率	94.32	5.68	25.91	74.09	92.27	7.73	65.91	34.09

注:对 6 例 CYP2D6 基因未检出,未列入

CYP2D6*10 则为 51.6%,说明 CYP2D6*5 在中国人中具有一定的分布,应予以重视^[7]。CYP2D6*10 在中国人中分布较广,我们所采用的基因芯片主要是针对此种突变,缺乏对 CYP2D6*5 的检测手段,因此需要进一步研究,用其他方法检测。

ADRB1 基因编码 β_1 受体,它的 G1165C 多态位点被认为与抗高血压药物 β 受体阻断药的药效有关,而 AGTR1(A1166C)基因多态性则可能影响沙坦类药物的反应^[8]。ACE 基因的片段插入/缺失型变异(I 或 D)可能影响血管紧张素转化酶抑制药的作用^[1]。

综上所述, CYP2C9(A1075C)、ADRB1(G1165C)、AGTR1(A1166C)、CYP2D6(C100T)和 ACE(I/D)基因多态性与抗高血压药物反应相关。检测这 5 个基因多态位点在中国人中的分布,有助

于进一步研究基因多态性对抗高血压药物的影响,对于综合衡量药物药效及不良反应、实现个体化用药具有重要意义。此外有研究认为, AGTR1(A1166C)和 ACE(I/D)等基因多态性在高血压患者中与健康人中的分布具有差异,可能与高血压的易感性相关,但研究结论并不一致^[8-10],因此需要大量的数据去证实。检测大量样本的基因多态性,分析人群中的分布频率,可为进一步探讨基因多态性与高血压易感性的相关性提供理论基础。

本实验采用的高血压药物相关基因检测芯片,每片可检测 4 个样本,一次可同时检测分析 5 种基因多态位点,是一种高通量、高效率的基因突变检测方法。整个检测操作过程从目的片段 PCR 扩增到最后的芯片荧光信号的扫描和数据分析所需时间在 8 h 以内,可立即得到基因分型的结果。分析过程中不需再进行电泳观测或纯化回收 PCR 产物,减少

了 EB 的使用及其对操作人员的危害,同时节省了大量时间。而传统基因检测方法,如限制性内切酶片段长度多态性、直接测序等,这些方法较为耗时费力、所需设备和耗材昂贵,尤其是难以同时对不同基因的多个突变位点进行检测^[11]。

基因芯片技术则可同时检测大量的样本或多种基因,具有高通量、高灵敏度、操作简便等优点,可用于多个研究领域^[12-14]。国内在高血压相关研究中已有采用基因芯片筛选易感基因的报道,在分析基因多态性对抗高血压药物药效的研究中也有应用^[15-16],为实验研究提供了有力支持。

抗高血压药物相关基因芯片可为相关基因多态性研究提供高效的检测平台,在实现临床快速检测高血压患者相关基因多态性,预测降压药物的药效,选择更适于个体情况的治疗药物^[17],避免严重不良反应的发生等方面具有广阔的应用前景。

【参考文献】

- [1] 王瑞石,胡伟新,李 瑛. 高血压病的药物基因组学研究[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2003,12(3):262-267.
- [2] 徐国辰,刘文玲,梅其炳,等. 药物基因组学对心血管病个体化治疗的启示[J]. 中国药理学杂志,2005,40(3):172-174,189.
- [3] 王 睿,向 倩,陈 颢,等. 细胞色素 P450 氧化酶基因多态性对药物代谢影响的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2004,20(2):134-138.
- [4] 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.
- [5] Joy MS, Dornbrook-Lavender K, Blaisdell J, et al. CYP2C9 genotype and pharmacodynamic responses to losartan in patients with primary and secondary kidney diseases[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2009, 65(9): 947-953.
- [6] Lee SY, Ki CS, Hong KS, et al. A case report of a poor metabolizer of CYP2D6 presented with unusual responses to nortriptyline medication[J]. J Korean Med Sci, 2004, 19(5): 750-752.
- [7] Ji Ling, Pan Shixiu, Wu Jianmin, et al. Genetic polymorphisms of CYP2D6 in Chinese mainland[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(12): 1780-1784.
- [8] 杨天伦,陈美芳,谢启应. 沙坦类药物代谢酶 CYP2C9 和受体 AT1 基因的遗传多态性在高血压患者中的分布特征[J]. 中南药学,2007,5(1):6-9.
- [9] 方金瑞,马丽雅,伊 琳. AT1R、ACE 基因多态性与东乡族原发性高血压的关系及其对降压药效的影响[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(3):187-190.
- [10] 李 莉,殷丽天,杨建一,等. 山西汉族正常人群 ACE 基因多态性频率的分布[J]. 中国优生与遗传杂志,2009,17(11):14-15.
- [11] 王国建,戴 朴,韩东一,等. 基因芯片技术在非综合征性耳聋快速基因诊断中的应用研究[J]. 中华耳科学杂志,2008,6(1):61-66.
- [12] Yoo SM, Choi JH, Lee SY, et al. Applications of DNA microarray in disease diagnostics[J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(7): 635-646.
- [13] Gemignani F, Perra C, Landi S, et al. Reliable detection of β -thalassemia and G6PD mutations by a DNA microarray[J]. Clin Chem, 2002, 48(11): 2051-2054.
- [14] Batchelor M, Hopkins KL, Liebana E, et al. Development of a miniaturised microarray-based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria[J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 31(5): 440-451.
- [15] 洪承吕,陈长曦,杨德业,等. 基因芯片筛查原发性高血压相关基因的研究[J]. 安徽医学,2008,29(6):683-686.
- [16] 赵钢涛,王金萍,杨 凡,等. 基因芯片检测方法检测抗高血压药物相关基因 20 例[J]. 医药导报,2008,27(12):1518-1521.
- [17] 戴新民,倪素贤,刘 毅,等. 某地区老年人高血压用药现状及思考[J]. 东南国防医药,2008,10(1):49-50.

(收稿日期:2010-03-15;修回日期:2010-04-20)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)