

## $\beta_1$ 肾上腺素能受体基因多态性及其甲基化修饰对美托洛尔降压疗效的影响

刘晶晶, 邢晓为, 袁洪, 黄志军, 林玲, 岑超群, 肖洁

(中南大学湘雅三医院临床药理中心, 湖南省长沙市 410013)

[关键词] 药理学; 美托洛尔;  $\beta_1$  肾上腺素能受体; 基因多态性; 甲基化修饰

[摘要] 目的 研究  $\beta_1$  肾上腺素能受体基因多态性及其甲基化修饰对美托洛尔降压疗效的影响。方法 入选 300 例高血压病患者, 给予相同剂量美托洛尔降压治疗, 同时用聚合酶链反应限制片长多态性法检测其基因型, 比较不同基因型高血压患者血压下降水平; 用甲基化特异性聚合酶链反应法检测相同基因型高血压患者和正常血压者  $\beta_1$  肾上腺素能受体基因甲基化修饰情况。结果 美托洛尔治疗后, Arg389Arg 型患者舒张压较 Gly389Arg 型和 Gly389Gly 型患者明显下降 (降幅  $8.0\% \pm 1.3\%$  比  $4.0\% \pm 1.5\%$  和  $3.0\% \pm 1.1\%$ ,  $P < 0.05$ ); 三种基因型患者收缩压下降幅度差异无显著性。所有研究对象外周血中  $\beta_1$  肾上腺素能受体基因均存在甲基化修饰。结论  $\beta_1$  肾上腺素能受体的 Gly389Arg 基因多态性与美托洛尔降压疗效相关; 外周血  $\beta_1$  肾上腺素能受体基因甲基化修饰未发现与美托洛尔降压疗效相关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Influence on Metoprolol Antihypertensive Effect of $\beta_1$ -Adrenoreceptor Gene Polymorphism and its Methylation

LIU Jing-Jing, XING Xiao-Wei, YUAN Hong, HUANG Zhi-Jun, LIN Lin, CEN Chao-Qun, and XIAO Jie

(Center of Clinical Pharmacology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

[KEY WORDS] Metoprolol;  $\beta_1$ -Adrenoreceptor; Gene Polymorphism; Methylated Modification

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether antihypertensive efficacy in patients with hypertension was impacted by polymorphism and methylation of  $\beta_1$ -adrenoreceptor ( $\beta_1$ -AR) gene. **Methods** Three hundred hypertensive patients enrolled began taking metoprolol by the same dose; the genotype of their  $\beta_1$ -AR gene by PCR-RFLP was tested to compare the antihypertensive efficacy among patients with different genotype. The methylation state in  $\beta_1$ -AR gene detected by methylation specific PCR (MSP) from peripheral blood of patients with the same genotype was controlled by the subjects with normal blood pressure, to make a inquiry into the relationship between the modification and the antihypertensive response to metoprolol. **Results** Patients with Arg389Arg genotype got significant greater decrease in diastolic blood pressure as compared with Gly389Arg and Gly389Gly ( $8.0\% \pm 1.3\%$  vs  $4.0\% \pm 1.5\%$  and  $3.0\% \pm 1.1\%$ ,  $P < 0.05$ ); and the  $\beta_1$ -AR gene from peripheral blood of all subjects was methylated. **Conclusions** Polymorphism at Gly389Arg of  $\beta_1$ -AR gene was associated with antihypertensive response to metoprolol; the methylated modification on  $\beta_1$ -AR gene from human peripheral blood was not found to be related to the response.

美托洛尔作为选择性  $\beta_1$  肾上腺素能受体 ( $\beta_1$ -adrenoreceptor,  $\beta_1$ -AR) 阻滞剂的代表药物, 是广泛应用于临床的第一线降压药物。研究表明, 单用美托洛尔降压治疗, 仅 51% 左右的患者有血压水平的显著下降<sup>[1]</sup>。近年来, 人们通过一系列研究发现, 遗传因素影响了美托洛尔药物疗效, 并证实了美托洛尔降压疗效的个体差异与其作用靶点  $\beta_1$ -AR 的 Gly389Arg 基因多态性密切相关<sup>[2,3]</sup>。但在临床实践

中, 人们同时也发现基因型的差异与药物疗效的差异并不完全匹配。目前, 表遗传性因素在影响基因表达上的作用日益为人们所重视, 而 DNA 甲基化是其中一个主要的内容<sup>[4]</sup>。生物信息学分析显示  $\beta_1$ -AR 基因存在高度可能被甲基化修饰的部位 (CpG 岛), 提示该基因的甲基化修饰可能影响受体功能, 从而影响美托洛尔降压疗效。本研究拟从基因型和表遗传的角度对高血压患者美托洛尔药物疗效个体差异的机制进行探讨。

[收稿日期] 2007-08-23

[修回日期] 2008-02-01

[基金项目] 重大基础研究前期研究专项计划 (2005 CCA 04000)

[作者简介] 刘晶晶, 硕士, 医师, 研究方向为高血压病个体化治疗, E-mail 为 ivljingjing@126.com。黄志军, 博士研究生, 研究方向为心血管病基因治疗。通讯作者袁洪, 博士, 教授, 研究方向为高血压病个体化治疗, E-mail 为 yuanhong01@vip.sina.com。

### 1 对象和方法

#### 1.1 对象

原发性高血压患者 300 例, 男 162 例, 女 138 例,

年龄 18~75 岁, 汉族, 来自湖南省中部高血压防治基地, 符合《中国高血压防治指南》<sup>[5]</sup> 标准分级中的 1、2 级, 自愿参加试验并签署知情同意书。排除继发性高血压、各种  $\beta_1$ -AR 阻滞剂禁忌症。正常健康者 46 例, 男 25 例, 女 21 例, 年龄  $57 \pm 10$  岁, 无高血压、糖尿病、心脏疾病史, 无服用降压药物史。

## 1.2 基因多态性检测

抽取静脉抗凝血 3 mL, 提取血白细胞 DNA, 采用聚合酶链反应限制片段多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 法<sup>[3]</sup> 鉴定  $\beta_1$ -AR 基因多态性。 $\beta_1$ -AR 389 位的上游引物序列为 5'-CAT CAT GGG CGT CTT CAC GC-3', 下游引物序列为 5'-TGG GCT TCG AGT TCA CCT GC-3'。用 PCR 仪 (Eppendorf, 9600 型) 进行扩增。PCR 产物点样于含溴乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳, Markers 为 Promega 公司产品。引物链由上海英骏生物技术公司合成。

## 1.3 给药方法和疗效判断标准

给予高血压患者等剂量的  $\beta_1$ -AR 阻滞剂美托洛尔 (25 mg, 阿斯利康公司) 降压治疗。给药方案为美托洛尔片 50 mg, 口服, 每天 2 次, 治疗 8 周。每周末各随访 1 次, 测量血压。降压疗效参考卫生部《心血管药物临床指导原则》<sup>[6]</sup> 进行判断: 显效是指舒张压下降超过 10 mmHg 并达到正常范围 ( $\leq 140/90$  mmHg), 或者虽未降到正常范围, 但已经下降了 20 mmHg 或以上; 有效是指舒张压下降不及 10 mmHg, 但已达到正常范围, 或者舒张压下降 10~19 mmHg, 但未达到正常范围, 如为收缩性高血压, 收缩压下降 30 mmHg 以上; 无效则是指未达到以上标准者。

## 1.4 甲基化特异性聚合酶链反应法检测 $\beta_1$ 肾上腺素能受体基因甲基化修饰情况

**1.4.1 生物信息学分析** 通过互联网 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide>) 查询人  $\beta_1$ -AR 基因 (基因号 4557264) 的基因序列, 再运用甲基化在线分析软件 (<http://cpgislands.usc.edu/>) 分析序列甲基化修饰情况。人类  $\beta_1$ -AR 基因定位于 10q24-q26 (图 1), 该基因的全长处于一个 CpG 岛中, 这就为进一步研究这种基因组 DNA 甲基化修饰提供了可能。

**1.4.2 甲基化特异性聚合酶链反应法** 根据相关资料及  $\beta_1$ -AR 基因全序列, 将引物设计位点选在启动区的甲基化位点, 设计甲基化引物对 5'-AGT GTT GCG ATT TCG TTA TTA ATG-3' 和 5'-CTT CTT CAC CTA CTT CTA AAC CTC G-3', 非甲基化引物对 5'-GTG TTG TGA TTT TGT TAT TAA TTG G-3' 和 5'-CTT CTT CAC CTA CTT CTA AAC CTC AG-3'。在

DNA 中加入 3 mol/L NaOH, 37 °C 温浴; 在 DNA 变性混合物中加入由 NaHSO<sub>3</sub>、NaOH 和对苯二酚配成的磺化混合物, 55 °C 温育; 用 DNA 纯化试剂盒 (TaKaRa 公司) 抽提; 加入 3 mol/L NaOH, 静置 10 min 后加入 10 mol/L NH<sub>4</sub>AC, 无水乙醇沉淀, -20 °C 过夜, 20  $\mu$ L TE 溶解, 冻存。同一模板同时用两对引物扩增, 设计 PCR 扩增体系 20  $\mu$ L, 用热启动 DNA 聚合酶 (TaKaRa 公司) 循环 40 次, PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。

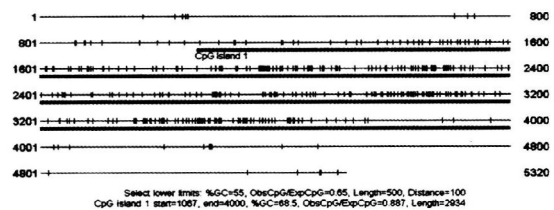


图 1. 用甲基化在线分析软件分析人类  $\beta_1$  肾上腺素能受体基因序列甲基化修饰情况

## 1.5 统计学分析

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。遗传平衡检验采用 Hardy-Weinberg 平衡定律; 不同基因型组间计量资料的比较采用方差分析, 计数资料的比较采用  $\chi^2$  检验; 治疗前后血压比较用重复测量数据的方差检验。使用 SPSS11.5 统计软件进行数据处理。

## 2 结果

### 2.1 整体分析情况

300 例高血压病患者中, 14 例患者因依从性差退出试验, 4 例患者基因型检测失败, 资料完整入选对象为 282 例, 失访率为 4.0%。其中 Arg389Arg、Gly389Arg 和 Gly389Gly 基因型患者分别为 148 例 (52.5%)、128 例 (45.4%) 和 6 例 (2.1%), Arg389 和 Gly389 等位基因频率分别为 75.2% 和 24.8%。群体经检验符合 Hardy-Weinberg 平衡。不同基因型患者间年龄、性别、身高、体重、入选收缩压、入选舒张压、体质指数 (body mass index, BMI) 及腰臀比比较差异无统计学意义。

### 2.2 药物干预后不同基因型的高血压患者血压下降值比较

美托洛尔降压治疗后, Arg389Arg、Gly389Arg 和 Gly389Gly 基因型患者收缩压和舒张压与治疗前比较差异显著 ( $P < 0.05$ ), 三种基因型患者中收缩压

下降幅度比较差异无统计学意义, Arg389Arg 组舒张压下降幅度较 Gly389Arg 组和 Gly389Gly 组明显下降( $P < 0.05$ ), 但 Gly389Arg 组与 Gly389Gly 组相比差异无统计学意义(表 1)。

表 1. 治疗前后三种基因型患者血压的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

基因型	收缩压 (mmHg)			舒张压 (mmHg)		
	治疗前	治疗后	降幅	治疗前	治疗后	降幅
Arg389Arg	147.0 $\pm$ 14.5	136.0 $\pm$ 14.0 <sup>a</sup>	11.0% $\pm$ 2.2%	89.0 $\pm$ 9.3	81.0 $\pm$ 9.5 <sup>a</sup>	8.0% $\pm$ 1.3% <sup>b</sup>
Gly389Arg	148.0 $\pm$ 15.6	140.0 $\pm$ 14.8 <sup>a</sup>	8.0% $\pm$ 1.9%	87.0 $\pm$ 8.3	83.0 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	4.0% $\pm$ 1.5%
Gly389Gly	157.0 $\pm$ 14.9	144.0 $\pm$ 11.8 <sup>a</sup>	12.0% $\pm$ 1.4%	89.0 $\pm$ 10.8	85.0 $\pm$ 8.3 <sup>a</sup>	3.0% $\pm$ 1.1%

a 为  $P < 0.05$ , 与治疗前比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 Gly389Gly 组比较。

表 2. 治疗前后三组降压疗效比较

基因型	<i>n</i>	显效+ 有效 (例)	无效 (例)	总有效
Arg389Arg	148	122	26	82.4% <sup>a</sup>
Gly389Arg	128	82	46	64.1%
Gly389Gly	6	3	3	50.0%

a 为  $P < 0.05$ , 与 Gly389Arg 组和 Gly389Gly 组比较。

## 2.4 $\beta_1$ 肾上腺素能受体甲基化情况

148 例 Arg389Arg 组患者和 46 例正常对照组标本进行了甲基化检测, 发现  $\beta_1$ -AG 均有甲基化产物, 即在 131 bp 和 130 bp 处出现目的条带(图 2)。

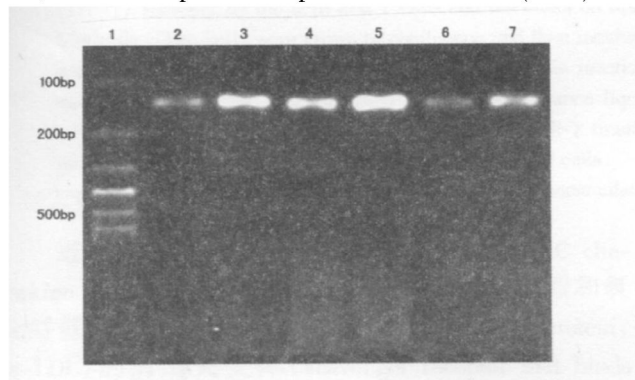


图 2. 各组患者外周血 DNA 甲基化情况 1 为 DNA 分子量标记, 2 和 3 分别为有效患者甲基化、非甲基化产物, 4 和 5 分别为无效患者甲基化、非甲基化产物, 6 和 7 分别为正常对照者甲基化、非甲基化产物。

## 3 讨论

药物疗效的个体差异是一直困扰临床疾病治疗的一个大问题。随着人类基因组计划的实施和药物基因组学研究的不断深入, 证实了药物代谢酶、转运蛋白和受体的基因多态性是影响药物反应个体差异

## 2.3 降压疗效比较

Arg389Arg 组降压疗效与 Gly389Arg 组和 Gly389Gly 组比较差异显著( $P < 0.05$ ), Gly389Arg 组降压疗效与 Gly389Gly 组比较差异无显著性(表 2)。

的重要因素<sup>[6]</sup>。Podlowski 等<sup>[7]</sup>通过研究辨别了 7 种人类  $\beta_1$ -AR 基因所具有的单核苷酸多态性(SNP), 而且该基因编码区的这 7 种多态性都能导致一种氨基酸的替换。后来的研究证实其中 1165G $\rightarrow$ C 的替代具有重要的功能意义, 它导致 389 残基 Gly 转变为 Arg<sup>[8]</sup>。许多学者进行了大量相关研究甚至临床实践。美托洛尔为  $\beta_1$ -AR 阻断剂, 其药物作用靶点即  $\beta_1$ -AR 的遗传多态性明显影响美托洛尔的药物疗效。本研究发现, Arg389Arg 型患者使用美托洛尔治疗后, 其舒张压较 Gly389Arg 和 Gly389Gly 型患者明显下降, 提示 Arg389Arg 型个体对美托洛尔疗效更加敏感。这一结果与大多数相关研究的结果是一致的<sup>[2,3]</sup>。 $\beta_1$ -AR 基因的变异可能影响了  $\beta_1$ -AR 的 G-蛋白偶联, 改变了腺苷酸环化酶的活化程度, 从而影响了受体功能<sup>[9]</sup>。但在进一步研究和临床实践中, 人们发现仅用基因型差异不能完全解释药物疗效的差异。如有研究表明, 在中国人群中,  $\beta_1$  受体基因的敏感型在中国人群中占到了 74%<sup>[10]</sup>, 但单药治疗仅 51% 左右的患者有血压水平的显著下降。在本研究中, 我们同样发现, 对同一基因型亚组个体的降压疗效进行分析后显示, 降压疗效也存在差异。Arg389Arg 型患者显效+ 有效尽管较普通高血压人群有明显上升, 但仍有部分敏感基因型患者未表现出明显的降压疗效。基因型差异并不能完全解释个体对美托洛尔疗效的差别。

在本研究中, 我们试图从表遗传的角度来解释这部分基因型相同人群中药物疗效的差异。DNA 的甲基化是表观遗传学研究中的主要研究内容之一, 它主要指胞嘧啶—鸟嘌呤二核苷酸(CpG) 中的胞嘧啶为甲基基团所修饰, 修饰后基因转录沉默<sup>[11]</sup>。目前关于基因的甲基化研究主要集中在肿瘤及遗传性疾病发生发展的研究中<sup>[12,13]</sup>。由于对

$\beta 1$ -AR 基因的生物信息学分析提示了该基因有被甲基化修饰而发生转录改变的可能。我们首次将基因甲基化的概念引入对药物疗效的个体化研究中。本研究结果发现,无论是在高血压患者还是正常人群中,其外周血  $\beta 1$ -AR 基因均显示被甲基化修饰。尽管外周血中  $\beta 1$ -AR 基因的甲基化修饰在不同的药物疗效组中均未表现出明显差异。但是由于  $\beta 1$ -AR 仅在心肌细胞和大血管平滑肌细胞膜上表达,在外周血中无表达,我们推测,在外周血中  $\beta 1$ -AR 基因甲基化修饰的普遍存在可能与外周血该基因表达沉默有关。在进一步的实验研究中,我们将检测  $\beta 1$ -AR 阻滞剂直接作用的靶器官如心肌和大血管平滑肌细胞上该基因甲基化修饰情况,以进一步探讨表遗传因素在药物疗效中的作用。另外,本试验是一个探索性的研究,甲基化特异性聚合酶链反应法为定性方法,为探讨药物疗效个体差异与基因关系提出了一种新的思路,在进一步实验探讨中需要更大的样本量及更精确的定量方法来支持。

#### [参考文献]

- [1] Materson BJ, Reda DJ, Cushman WC, et al. Single-drug therapy for hypertension in men. A comparison of six antihypertensive agents with placebo. The Department of Veterans Affairs Cooperative Study Group on Antihypertensive Agents [J]. *N Engl J Med*, 1993, **328**: 914-921.
- [2] Johnson JA, Zineh I, Puckett BJ, et al. Beta 1-adrenergic receptor polymorphisms and anti-hypertensive response to metoprolol [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2003, **74**: 44-52.
- [3] Liu J, Liu ZQ, Tan ZR, et al. Gly389Arg polymorphism of beta1-adrenergic receptor is associated with the cardiovascular response to metoprolol [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2003, **74**: 373-379.
- [4] Holliday R. DNA methylation and epigenotypes [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2005, **70**: 500-504.
- [5] 中国高血压防治指南修订委员会. 2004 年中国高血压防治指南(实用本) [J]. *高血压杂志*, 2004, **12** (6): 483-486.
- [6] Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003, **59**: 303-312.
- [7] Podlowski S, Wenzel K, Lutter HP, et al.  $\beta 1$ -adrenoceptor gene variations: a role in idiopathic dilated cardiomyopathy [J]? *J Mol Med*, 2000, **78**: 87-93.
- [8] Zill P, Baghai TC, Engel R, et al. Beta1-adrenergic receptor gene in major depression: influence on antidepressant treatment response [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2003, **120**: 85-89.
- [9] Mason DA, Moore JD, Green SA, et al. A gain-of-function polymorphism in a G-protein coupling domain of the human  $\beta 1$ -adrenergic receptor [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 12 670-674.
- [10] Xie HG, Dishy V, Sofowora G, et al. Arg389Gly beta 1-adrenoceptor polymorphism varies in frequency among different ethnic groups but does not alter response in vivo [J]. *Pharmacogenetics*, 2001, **11**: 191-197.
- [11] Ortmann CA, Burchert A, Holze K, et al. Down-regulation of interferon regulatory factor 4 gene expression in leukemic cells due to hypermethylation of CpG motifs in the promoter region [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**: 6 895-905.
- [12] Goessl C, Krause H, Muller M, et al. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids [J]. *Cancer Res*, 2000, **60**: 5 941-945.
- [13] 史惠蓉, 吴庆华, 索振河, 等. 宫颈癌组织中 FHIT 基因 5 端 CpG 岛甲基化及其与基因失活的关系[J]. *癌症*, 2005, **4**: 7-11.

(此文编辑 文玉珊)