

# 细胞色素 P450 3A5 基因多态性与血脂异常的相关性

肖飞<sup>1,2</sup>, 邱健<sup>1</sup>, 赵树进<sup>3</sup>, 石磊<sup>3</sup>, 洪长江<sup>1</sup>, 叶丽丽<sup>1,2</sup>, 贺宝霞<sup>3</sup>

(1 广州军区广州总医院心血管内科, 2 南方医科大学, 3 广州军区广州总医院药学部, 广东省广州市 510010)

[关键词] 细胞色素 P450 3A5 基因多态性; 血脂异常; 高密度脂蛋白胆固醇

[摘要] 目的 研究细胞色素 P450 3A5 基因多态性与血脂异常的相关性。方法 采用 Taqman MGB 探针建立细胞色素 P450 3A5\* 3(6986 A>G)位点的实时荧光定量 PCR 分型方法, 对 321 名中国汉族血脂异常患者和 258 名正常对照者进行细胞色素 P450 3A5\* 3(6986 A>G)位点基因分型, 按常规方法测定血脂水平并进行比较分析。结果 血脂异常组和正常对照组中均检出 AA、GA 和 GG 三种基因型; 血脂异常组 AA、GA、GG 基因型频率分别为 9.0%、46.1% 和 44.9%, 对照组则为 9.7%、39.5% 和 50.8%。血脂异常组 A 及 G 等位基因频率分别为 32.1% 和 67.9%, 对照组则为 29.5% 和 70.5%。两组基因型及等位基因频率比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。通过对不同基因型的血脂分析发现, 血脂异常组 A 等位基因 (AA+GA 型) 携带者的高密度脂蛋白胆固醇水平显著高于 GG 纯合型 ( $P<0.05$ )。结论 细胞色素 P450 3A5\* 3(6986 A>G) 多态性位点与中国汉族人血脂异常的发生可能没有关联, 但 A 等位基因可能对血清高密度脂蛋白胆固醇水平有一定影响。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## The Correlation Between the Cytochrome P450 3A5 Gene Polymorphism and Dyslipidemia

XIAO Fei<sup>1,2</sup>, QIU Jian<sup>1</sup>, ZHAO Shu-Jin<sup>3</sup>, SHI Lei<sup>3</sup>, HONG Chang-Jiang<sup>1</sup>, YE Li-Li<sup>1,2</sup>, and HE Bao-Xia<sup>3</sup>

(1 Department of Cardiovascular, 2 Southern Medical University, 3 Department of Pharmacy, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

[KEY WORDS] Cytochrome P450 3A5 Gene Polymorphism; Dyslipidemia; High Density Lipoprotein Cholesterol

[ABSTRACT] Aim To study the correlation between the cytochrome P450 (CYP) 3A5 gene polymorphism and dyslipidemia. Methods The real-time PCR genotyping at CYP3A5\* 3(6986 A>G) position was established using Taqman minor groove binding (MGB) probes. Total 321 dyslipidemia patients and 258 matched controls of Chinese Han population were genotyped at CYP3A5\* 3(6986 A>G) position using this method. Plasma lipid levels were measured by using routine method. Results All three genotypes AA, GA and GG existed in both dyslipidemia patients and control group. AA, GA, GG genotyped frequencies were 9.0%, 46.1%, 44.9% for patients and 9.7%, 39.5%, 50.8% for control group respectively. A, G allele frequencies were 32.1%, 67.9% for patients and 29.5%, 70.5% for control group respectively, in which the statistic significance was not observed ( $P>0.05$ ). But the results demonstrated that the presence of A allele was associated with high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in patients group. Conclusion CYP3A5\* 3(6986 A>G) polymorphism was not associated with dyslipidemia in Chinese population, however, this polymorphism has some influence on serum HDL-C level.

细胞色素 P450(CYP)是重要的微粒体混合功能氧化酶, 包括 CYP1~4 四个家族和 A、B、C、D、E 亚家族, 同工酶达数十种。其功能主要是参与外源性物质的代谢和催化内源性物质的转化, 在药物代谢中占有重要的作用, 对某些疾病的发生发展也有重要影响。有文献报道 CYP3A4、CYP3A5 及 CYP2C9 催化 17- $\beta$  雌二醇和雌酮的羟化反应<sup>[1]</sup>, 而

雌激素通过增加低密度脂蛋白受体的表达降低低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC), 从而降低血脂异常发生的危险性。现已发现 CYP3A4\* 3 与治疗前较低的 LDLC 具有关联<sup>[2]</sup>, CYP2C9 基因多态性与女性血脂异常相关<sup>[3]</sup>, 但 CYP3A5 基因多态性与血脂异常相关性尚无研究。本研究旨在探讨 CYP3A5\* 3(6986 A>G) 多态性与中国汉族血脂异常患者的关联以及是否对血脂水平产生影响。

[收稿日期] 2009-12-03 [修回日期] 2010-01-02

[作者简介] 肖飞, 硕士研究生, 医师, Email 为 xfe2010@163.com。通讯作者邱健, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的诊断和治疗, 动脉硬化易感基因及其与炎症的关系, Email 为 xxgnkq@yahoo.cn。赵树进, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为神经生化药理和中药分子生物学鉴定。

## 1 对象和方法

### 1.1 研究对象

321 例血脂异常患者, 血清总胆固醇 (TC)  $\geq$

5.72 mmol/L, LDLC  $\geq 3.36$  mmol/L, 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL)  $\leq 0.9$  mmol/L, 血清甘油三酯 (TG)  $\geq 1.70$  mmol/L, TC、LDLC、HDL 及 TG 中至少 2 个指标异常, 其中男性 162 例, 女性 159 例, 年龄  $53.54 \pm 12.06$  岁。258 例正常对照者, 血尿常规、凝血功能、胸部 X 光及血生化、心电图检查正常, 其中男性 105 例, 女性 153 例, 年龄  $42.69 \pm 11.66$  岁。所有研究对象均为自然人群, 汉族且无血缘关系, 排除肝、肾、肿瘤、甲状腺、糖尿病等其它严重的全身性疾病。

## 1.2 血脂水平测定

空腹 8 h 以上, 于清晨取肘静脉血, 离心取血清, 采用标准酶比色法测定 TC、LDLC、HDL 及 TG。

## 1.3 人基因组 DNA 提取

另取 5 mL 静脉血置于 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝管中保存, 于 -70℃ 超低温冰箱中以备提取 DNA。将储存抗凝血按人血液 DNA 提取试剂盒 (TIAN GEN 公司) 操作步骤提取白细胞基因组 DNA, -20℃ 保存。

## 1.4 引物和 Taqman MGB 探针设计

根据 GenBank 收录的 CYP3A5 基因家族, 查找 CYP3A5\*3 等位基因序列, 通过 BLAST 对比, 针对 CYP3A5\*3 等位基因保守序列设计引物和 Taqman-MGB 探针。引物 F 为 AAT GCT CTA CTG TCA TTT CTA ACC ATA ATC, 引物 R 为 TCA CAC AGG AGC CAC CCA A, 探针 1G 为 FTG TCT TTC AGT ATC TCT TP, 探针 2A 为 6TG TCT TTC AAT ATC TCT TCP (F 代表 FAM, 6 代表 HEX, P 代表 MGB 基团), 以上均由上海基康生物技术有限公司合成。

## 1.5 实时荧光定量 PCR 检测

对 CYP3A5 基因目的片段进行 PCR 扩增及 SNP 分型。实时荧光 PCR 反应体系 25  $\mu$ L, 最终成分为模板 DNA 1  $\mu$ L, MasterMix 酶 12.5  $\mu$ L, 引物各 1  $\mu$ L, 探针各 0.5  $\mu$ L, 灭菌双蒸水 8.5  $\mu$ L。在 Rotor-Gene 6000 实时荧光定量 PCR 仪上反应: 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火延伸 1 min, 仪器同时收集荧光信号, 共进行 40 个循环。软件分析给出单核苷酸多态性 (SNP) 分型结果。

## 1.6 测序验证单核苷酸多态性分型

将 DNA 模板抽样共 20 例, 经 PCR 法对 CYP3A5 基因目的片段进行扩增。引物序列参考文献 [4] 设计, 上游引物为 5'-CAT GAC TTA GTA GAC AGA TGAC-3', 下游引物为 5'-GGT CCA AAC AGG GAA GAA ATA-3', 由上海英骏生物技术有限公司合成。10 $\times$ PCR buffer, TaqDNA 聚合酶、dNTP 等试剂由 TaKaRa 公司生产。扩增产物为 293 bp

建立 50  $\mu$ L 反应体系: 10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu$ L, TaKaRa Taq 0.25  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTP 4  $\mu$ L, 10.0  $\mu$ mol/L 上下游引物各 4  $\mu$ L, 模板 DNA 4  $\mu$ L, 灭菌双蒸水补至 50  $\mu$ L; 扩增循环参数: 94℃ 预变性 7 min, 然后 94℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物送至上海英骏生物技术有限公司直接测序。

## 1.7 统计学方法

CYP3A5\*3 基因型频率及等位基因频率采用频率计数法计算, 然后经 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律检验。组间基因型频率及等位基因频率比较采用  $\chi^2$  检验。两组研究对象临床特征比较、不同基因型及等位基因研究对象间血脂水平比较用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本均数采用  $t$  检验。

# 2 结果

## 2.1 一般临床特征比较

血脂异常组年龄、体质指数、收缩压、肌酐、尿素氮、尿酸、血糖、TC、LDLC 及 TG 等水平较正常对照组明显升高, HDLC 水平较正常对照组明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ; 表 1)。

表 1. 一般临床资料 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 指 标                       | 血脂异常组<br>( $n = 321$ )          | 正常对照组<br>( $n = 258$ ) |
|---------------------------|---------------------------------|------------------------|
| 年龄 (岁)                    | 53.54 $\pm$ 12.06 <sup>b</sup>  | 42.69 $\pm$ 11.66      |
| 男/女 (例)                   | 162/159 <sup>a</sup>            | 105/153                |
| 体质指数 (kg/m <sup>2</sup> ) | 24.53 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>   | 20.51 $\pm$ 2.26       |
| 收缩压 (mmHg)                | 137.34 $\pm$ 8.79 <sup>a</sup>  | 124.70 $\pm$ 16.87     |
| 舒张压 (mmHg)                | 77.00 $\pm$ 10.38               | 75.86 $\pm$ 9.13       |
| 谷丙转氨酶 (U/L)               | 19.05 $\pm$ 9.24 <sup>b</sup>   | 14.90 $\pm$ 7.21       |
| 谷草转氨酶 (U/L)               | 23.94 $\pm$ 7.20 <sup>b</sup>   | 21.67 $\pm$ 4.87       |
| 肌酐 ( $\mu$ mol/L)         | 71.84 $\pm$ 14.77 <sup>a</sup>  | 69.17 $\pm$ 14.54      |
| 尿素氮 (mmol/L)              | 5.01 $\pm$ 0.98 <sup>b</sup>    | 4.74 $\pm$ 0.99        |
| 尿酸 ( $\mu$ mol/L)         | 366.05 $\pm$ 83.56 <sup>b</sup> | 330.07 $\pm$ 84.96     |
| 血糖 (mmol/L)               | 5.24 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>    | 5.01 $\pm$ 0.42        |
| TC (mmol/L)               | 5.81 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>    | 4.57 $\pm$ 0.52        |
| LDLC (mmol/L)             | 3.96 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>    | 2.76 $\pm$ 0.39        |
| HDL (mmol/L)              | 1.26 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>    | 1.46 $\pm$ 0.33        |
| TG (mmol/L)               | 2.30 $\pm$ 1.78 <sup>b</sup>    | 1.01 $\pm$ 0.36        |

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较。

## 2.2 CYP3A5 基因扩增目的片段的 Taqman MGB PCR 体系分型

运用 Taqman MGB 探针法, 所有研究对象的 CYP3A5 基因扩增目的片段均得到满意 SNP 分型结果, 获得三种基因型: AA 野生型 (CYP3A5\*1/\*

1)、GA 杂合突变型 (CYP3A5\* 1/\* 3)和 GG 纯合突变型 (CYP3A5\* 3/\* 3), 见图 1。

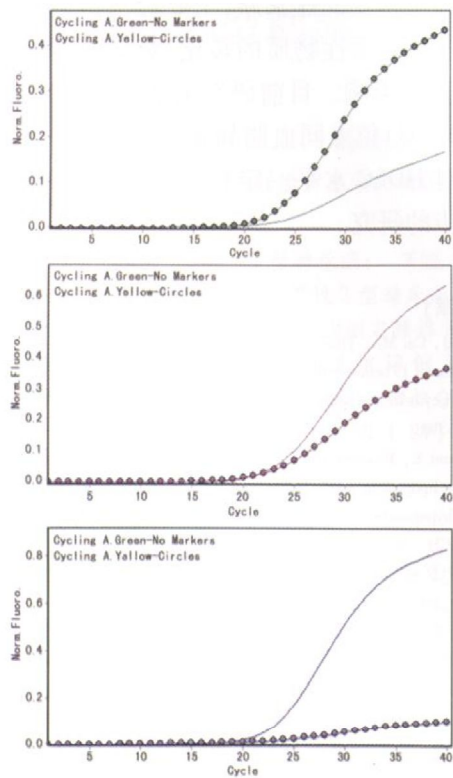


图 1 CYP3A5基因扩增目的片段 SNP分型 从上至下为 CYP3A5\* 3野生型 (CYP3A5\* 1/\* 1)、CYP3A5\* 3杂合突变型 (CYP3A5\* 1/\* 3)、CYP3A5\* 3纯合突变型 (CYP3A5\* 3/\* 3)。

表 2 CYP3A5\* 3基因型及等位基因在血脂异常组和正常对照组的分布

| 分 组   | n   | 基因型 (例)   |             |             | 等位基因 (例)    |             |
|-------|-----|-----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|       |     | AA        | GA          | GG          | A           | G           |
| 血脂异常组 | 321 | 29 (9.0%) | 148 (46.1%) | 144 (44.9%) | 206 (32.1%) | 436 (67.9%) |
| 正常对照组 | 258 | 25 (9.7%) | 102 (39.5%) | 131 (50.8%) | 152 (29.5%) | 364 (70.5%) |

2.5 不同基因型间血脂水平比较

血脂异常组 A 等位基因携带者 (AA + GA 型) HDLC 水平高于 GG 基因型者 (P < 0.05), 不同基因型间其他血脂指标没有显著差异 (表 3)。

表 3 两组不同基因型血脂水平比较 (x ± s)

| 指 标<br>(mmol/L) | 血脂异常组 (n = 321)          |             | 正常对照组 (n = 258) |             |
|-----------------|--------------------------|-------------|-----------------|-------------|
|                 | AA + GA                  | GG          | AA + GA         | GG          |
| TC              | 5.85 ± 0.90              | 5.76 ± 1.02 | 4.56 ± 0.49     | 4.59 ± 0.54 |
| LDLC            | 4.02 ± 0.84              | 3.89 ± 0.93 | 2.81 ± 0.40     | 2.71 ± 0.38 |
| HDLC            | 1.30 ± 0.33 <sup>a</sup> | 1.21 ± 0.29 | 1.44 ± 0.30     | 1.47 ± 0.35 |
| TG              | 2.13 ± 1.17              | 2.51 ± 2.31 | 1.02 ± 0.32     | 1.01 ± 0.40 |

a为 P < 0.05 与 GG 基因型组比较。

2.3 CYP3A5基因扩增目的片段的测序情况

抽样测序的 20 例 DNA 模板 PCR 产物均得到满意扩增。20 例样本测序结果与 Taqman MGB 分型结果一致。检测到三种基因型: AA 野生型 (CYP3A5\* 1/\* 1)、GA 杂合突变型 (CYP3A5\* 1/\* 3)和 GG 纯合突变型 (CYP3A5\* 3/\* 3), 见图 2。

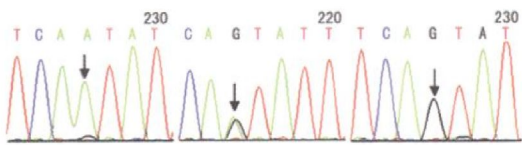


图 2 CYP3A5基因扩增目的片段的测序 从左至右为 CYP3A5\* 3野生型 (CYP3A5\* 1/\* 1)、杂合突变型 (CYP3A5\* 1/\* 3)、纯合突变型 (CYP3A5\* 3/\* 3)。

2.4 CYP3A5\* 3 (6986 A > G)多态性位点基因型及等位基因分布

两组 CYP3A5\* 3 (6986 A > G)基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡 (P > 0.05)。血脂异常组与正常对照组相比该多态性位点的基因型频率和等位基因频率差别均无统计学意义 (P > 0.05, 表 2)。

3 讨论

CYP3A5是细胞色素 P450家族 3A 亚家族中重要的亚型,位于人类 7号染色体 q21-q22.1上,长约 31 kb,含 13个外显子,编码 502个氨基酸,主要分布在肝脏、肾脏及小肠。Kuehl等<sup>[5]</sup>发现位于 CYP3A5第 3号内含子的 6986 A > G 突变最具功能意义,它导致 mRNA 的剪接发生改变以及蛋白质截短,使 CYP3A5 活性降低或消失。文献报道 CYP3A5\* 3分布频率存在明显的种族差异<sup>[6]</sup>。很多临床研究提示 CYP3A5\* 3基因多态性与各类疾病具有明显相关性。李振华等<sup>[7]</sup>发现,携带 CYP3A5\* 1基因型者患前列腺癌的风险较携带

CYP3A5\* 3者低 30%, 原因可能是前者的 CYP3A 蛋白含量和催化活性增高, 睾酮灭活加快所致。在本研究中, CYP3A5\* 3在正常对照组中的等位基因分布频率为 70.5%, 在血脂异常组中的分布频率为 67.9%, 两者无明显差异, 基本符合中国正常人群分布, 这提示 CYP3A5\* 3突变与血脂异常发病可能无关, 同韦侃侃等<sup>[8]</sup>研究结论一致。

本研究中进一步分析 CYP3A5\* 3基因多态性同血脂间的关系, 发现在血脂异常人群中, A 等位基因携带者血浆 HDLC 水平高于非 A 等位基因携带者。这可能与 CYP 参与调节胆固醇在体内环境的稳定状态有关, 这种平衡状态的维持机理在于胆固醇的蓄积能增强羟基胆固醇的产生来激活胆固醇的清除机制<sup>[9]</sup>。早就有关于肝微粒体 P450 诱导作用提高血浆载脂蛋白 A iv 和 HDLC 水平的研究<sup>[10]</sup>。后进一步的研究证实, P450 酶类能维持体内胆固醇的平衡, 借助的是胆固醇的代谢产物羟基化胆固醇、胆汁酸来激活胆固醇清除机制<sup>[11]</sup>。羟基化胆固醇是重要的内源性化合物, 经肝 X 受体 (LXR) 诱导参与胆固醇的流出、运输、排泄及吸收<sup>[12]</sup>。而 P450 酶系如 CYP7A1、CYP27A1、CYP46A1 及 CYP3A4 在羟基化胆固醇的生成和代谢上发挥重要作用, 其中 CYP3A4 参与胆固醇及胆汁酸的新陈代谢, 产生 4 $\beta$ -羟基胆固醇<sup>[13]</sup>。羟基化胆固醇的生成与这些基因自然的激活能力有关<sup>[14]</sup>。这些基因中拥有较高活性者, 能更好的促进羟基化胆固醇生成, 从而激活清除机制发生应答反应, 致细胞内胆固醇流出细胞外, 提高血浆 HDLC, 相应的, 拥有较低活性或基因遗传缺陷可能导致这种反应的减弱。而 CYP3A5 与 CYP3A4 在结构与功能上紧密相关<sup>[15]</sup>, 与编码 CYP3A4 的氨基酸有 84% 的相似, 甚至近有研究发现在一些个体中 CYP3A5 占肝脏 CYP3A 总量的 50%, 是重要的细胞色素 P450 酶系, 所以推测 CYP3A5 可能也与羟基化胆固醇的生成代谢有关, 其表达差异影响羟基化作用的强弱, 导致胆固醇清除机制不同的效应。Kuehl 等<sup>[5]</sup>报道应至少携带一个 CYP3A5\* 1(A) 等位基因, 才能在体内转录完整的 CYP3A5 mRNA, 较好的表达 CYP3A5 蛋白, 说明 A 等位基因携带者拥有高的 CYP3A5 活性, 可以认为它能更好的介导胆固醇清除机制, 提高 HDLC 水平。本研究结果似乎可以用以上观点解释, 但这仅

仅是推测而已。

综上, CYP3A5 基因是细胞色素氧化酶 P450 超基因家族中重要的亚家族, 主要参与外源性物质的代谢和催化内源性物质的转化, 对某些疾病的发生发展有重要影响。目前研究未能显示 CYP3A5\* 3 (6986 A>G) 位点同血脂异常有关联, 但 A 等位基因可能对 HDLC 水平一定影响, 其机制和意义有待于进一步的研究。

#### [参考文献]

- [1] Lee AJ, Cai MX, Thomas PE, et al. Characterization of the oxidative metabolites of 17 $\beta$ -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome p450 isoforms [J]. *Endocrinology*, 2003, **144** (8): 3382-398.
- [2] Kajinani K, Brousseau ME, Ordovas JM, et al. CYP3A4 genotypes and plasma lipoprotein levels before and after treatment with atorvastatin in primary hypercholesterolemia [J]. *Am J Cardiol*, 2004, **93** (1): 104-107.
- [3] Luo CH, Wang A, Zhu RH, et al. Gender specific association of CYP2C9\* 3 with hyperlipidaemia in Chinese [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2005, **60** (6): 629 - 631.
- [4] Yong-Fang Hu, Jun He, Guo-Lin Chen, et al. CYP3A5\* 3 and CYP3A4\* 18 single nucleotide polymorphisms in a Chinese population [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2005, **353** (1-2): 187-192.
- [5] Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression [J]. *Nat Genet*, 2001, **27** (4): 383-391.
- [6] Fukuen S, Fukuda T, Maune H, et al. Novel detection assay by PCR-RFLP and frequency of the CYP3A5 SNPs CYP3A5\* 3 and \* 6 in a Japanese population [J]. *Pharmacogenetics*, 2002, **12** (4): 331-334.
- [7] 李振华, 孔垂泽, 王立忠. 前列腺癌发生风险与 CYP3A5 基因多态性的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 2003, **12** (20): 1098-099.
- [8] 韦侃侃, 贾敏, 付强, 等. 影响他汀类药物降脂治疗的相关基因的多态性及其与高脂血症的关系 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2008, **27** (8): 570-575.
- [9] Luoma PV. Cytochrome P450 and gene activation—from pharmacology to cholesterol elimination and regression of atherosclerosis [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2008, **64** (9): 841-850.
- [10] Luoma PV, Pelkonen RO, Sotaniemi EA. Plasma high-density lipoprotein cholesterol and hepatic drug-metabolizing enzyme activity in man [J]. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1979, **473**: 71.
- [11] Björkhem I, Diczfalussy U, Lofgren D. Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms [J]. *Curr Opin Lipidol*, 1999, **10** (2): 161-165.
- [12] Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease [J]. *Mol Endocrinol*, 2003, **17** (6): 985-993.
- [13] Björkhem I, Diczfalussy U. Hydroxycholesterols—friends, foes or just fellow passengers [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (5): 734-742.
- [14] Ory DS. Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home [J]. *Circ Res*, 2004, **95** (7): 660-670.
- [15] Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, et al. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2002, **30** (8): 883-891.

(此文编辑 文玉珊)