文章编号:1000-5404(2010)15-1635-03

论著

多药耐药基因 1 C3435T 多态性对汉族儿童外周血单个核细胞 mRNA 表达的影响

冯 毅,肖剑文,郑启城,肖 莉,谢 茜,罗 庆,于 洁 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院血液肿瘤科)

【摘要】 目的 探讨多药耐药基因 1(multidrug resistance gene 1,MDR1)C3435T 多态性与健康汉族儿童外周血单个核细胞中 mRNA 表达的关系。方法 以 130 例(男性 83 例,女性 47 例)无亲缘关系的中国健康汉族儿童为研究对象,采用 PCR-RFLP 技术检测其 MDR1 基因 C3435T 位点的基因型,实时荧光定量 PCR 法检测其外周血单个核细胞中 MDR1 mRNA 表达水平。结果 130 例儿童中,51 例为 CC 型,63 例为 CT 型,16 例为 TT 型,基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$);CC、CT、TT 各基因型组间外周血单个核细胞 MDR1 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 汉族儿童中 MDR1 基因 C3435T 多态性对外周血单个核细胞中 mRNA 表达无显著性影响。汉族儿童 C3435T 位点多态性不能作为推测 MDR1 表达水平的依据。

【关键词】 多药耐药基因 1;单核苷酸多态性;mRNA 表达;实时荧光定量 PCR
【中图法分类号】 R331.1;R394.5 【文献标志码】 A

Effect of multidrug resistance gene 1 C3435T polymorphism on its mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells in Han children

Feng Yi, Xiao Jianwen, Zheng Qicheng, Xiao Li, Xie Qian, Luo Qing, Yu Jie (Department of Hemooncology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【Abstract】 **Objective** To study the correlation between multidrug resistance gene 1 (MDR1) C3435T polymorphism and its mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of healthy Han populations. **Methods** A total of 130 Chinese Han healthy children at a mean age of 7.62 with no consanguinity (83 males and 47 females) were included in this study. Genotypes of MDR1 C3435T polymorphism were identified by PCR-RFLP, and MDR1 mRNA expression levels in peripheral blood mononuclear cells were measured by SYBR green Ⅰ real-time polymerase chain reaction. **Results** The CC, CT and TT genotypes of MDR1 C3435T polymorphism were identified in 51, 63, and 16 out of the 130 children, respectively. The distribution of genotypes was consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium ($P>0.05$). No significant difference was found in MDR1 mRNA expression levels between the CC, CT and TT genotypes of MDR1 C3435T polymorphism in peripheral blood mononuclear cells. **Conclusion** MDR1 C3435T polymorphism does not significantly influence its mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of Chinese Han children. Genotyping of this polymorphism cannot be used as the evidence for predicting the expression of MDR1 in Chinese Han children.

【Key words】 multidrug resistance gene 1; single nucleotide polymorphism; mRNA expression; SYBR green Ⅰ real-time PCR

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2008BB5207) and the Foundation of Chongqing Medical University (XBYB2008044). Corresponding author: Yu Jie, Tel: 86-23-63635564, E-mail: yujie167@yahoo.com

由多药耐药基因 1(multidrug resistance gene 1,MDR1)编码的 P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)能利用 ATP 水解释放能量,将进入细胞内的药物转运出细胞外,其转运的底物范围非常广泛,包括抗肿瘤药、降压药、抗心律失常药、免疫抑制剂等,故 P-gp 在许多临床常用药物的转运和处置中起重要作用,并与肿瘤的多药耐药密切相关。研究[1-4]提示 MDR1 基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms,SNPs)是影响 P-gp 表达和功能的重要因素,MDR1 基因存在多个 SNPs 位点,其中 C3435T 位点的基因多态性是最早被进行研究的,目前为止被认为最有可能影响 MDR1 表达,进而影响药物体内代谢的 MDR1 基因多态性。许多研究重点关注了 C3435T 位点多态性对 MDR1 基因表达和功能的影响,但这些研究在不同人群中并未获得一致的结果[1-4]。本研究以 130 例无亲缘关系的中

【基金项目】 重庆市自然科学基金(CSTC2008BB5207);重庆医科大学校办课题(XBYB2008044)
【通信作者】 于 洁,电话:(023)63635564,E-mail:yujie167@yahoo.com

国健康汉族儿童为对象，应用PCR-RLFP技术检测其C3435T位点的多态性，实时荧光定量PCR法检测其外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cells，PBMCs）中MDR1 mRNA表达水平，以探讨在汉族儿童中MDR1基因C3435T多态性对外周血单个核细胞中mRNA表达的影响，为汉族儿童临床合理用药提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象及主要试剂

选择2009年1－7月本院儿童保健科健康体检儿童130例，其中男性83例，女性47例，平均7.62岁。

DNA提取试剂盒、2×HotStart *Taq* PCR MasterMix、RNA提取试剂盒、SYBR Green Ⅰ荧光定量PCR试剂盒（北京天根），人淋巴细胞分离液（天津灏洋），逆转录试剂盒（大连宝生物），限制性内切酶*Dpn* Ⅱ（NEW ENGLAND），引物由上海英骏公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取 取外周静脉血300 μl，肝素抗凝，按试剂盒操作说明提取基因组DNA，－20 ℃保存备用。

1.2.2 C3435T位点多态性检测 应用PCR-RFLP法检测。采用文献[5]中使用的引物：上游引物5′-CTCACAGTAACTTG-GCAG-3′，下游引物5′-CTTACATTAGGCAGTGAC-3′，扩增产物长度为315 bp。PCR体系为2×*Taq* PCR MasterMix 10 μl，上下游引物各0.5 μl，DNA 2 μl，ddH_2O 7 μl，总体积20 μl。反应条件为：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，52 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，35个循环；最后72 ℃延伸5 min。扩增目的基因片段，然后用限制性内切酶*Dpn* Ⅱ对其进行酶切，酶切产物用2.5%琼脂糖凝胶电泳分离，判断多态性。

1.2.3 RNA提取及cDNA合成 取抗凝静脉血3 ml，用人淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞，按试剂盒操作方法提取PBMCs总RNA，应用逆转录试剂盒进行逆转录，反应条件：37 ℃ 15 min，85 ℃ 5 s，所得cDNA于－20 ℃冻存备用。

1.2.4 PBMCs MDR1 mRNA表达检测 采用实时荧光定量PCR法检测。MDR1及β-actin的引物由Primer Premier 5.0序列应用软件设计。MDR1上游引物：5′-CTGTATTGTTTGCCAC-CACGA-3′，下游引物：5′-AGGGTGTCAAATTTATGAGGCAGT-3′，扩增产物长度为139 bp；β-actin上游引物：5′-AAGATGACCCA-GATCATGTTTGAGACC-3′，下游引物：5′-GCCAGGTCCAGACG-CAGGAT-3′，扩增产物长度为191 bp。常规RT-PCR，将其产物稀释1×10^4倍后，以此为母液做10个梯度稀释，各取浓度最低的6个稀释样品应用Bio-Rad公司CFX96荧光定量PCR仪进行扩增，扩增结束后得到相对标准曲线。20 μl PCR体系为2.5×Real MasterMix 9 μl，上下游引物各0.5 μl，cDNA 2 μl，ddH_2O 8 μl。反应条件：95 ℃变性3 min，之后95 ℃ 10 s，60 ℃ 10 s，68 ℃ 10 s，循环40次，反应完毕进行溶解曲线分析以明确产物的特异性。用检测得到的标本中MDR1和β-actin的阈值循环数（threshold cycle，Ct）值，以β-actin为内参照，计算MDR1 mRNA的相对表达量，计算公式：$2^{-\triangle Ct}$。其中△Ct值＝目的基因Ct值－β-actin Ct值。

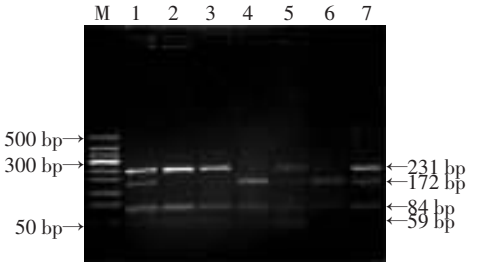
1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件，直接计数汉族儿童MDR1基因C3435T位点各基因型和等位基因频率，χ^2检验确定其是否符合Hardy-Weinberg平衡。PBMCs MDR1 mRNA相对表达量以$\bar{x}\pm s$表示，组间表达水平比较行t检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 MDR1基因C3435T位点多态性

MDR1基因C3435T位点扩增目的片段为315 bp，经*Dpn* Ⅱ酶切后出现3种基因型：CC型（终产物为59、172、84 bp的3条条带）、CT型（终产物为231、59、172、84 bp的4条条带）、TT型（终产物为231、84 bp的2条条带），各基因型电泳结果见图1。130例儿童中，51例为CC型，63例为CT型，16例为TT型，CC、CT、TT各基因型的分布频率分别为39.2%、48.5%与12.3%；其C等位基因频率为63.5%，T等位基因频率为36.5%；基因型频率分布符合Hardy-Weinberg平衡（$\chi^2=0.263$，$P>0.05$），说明具有群体代表性。



M：DNA标准；1，5，7：CT基因型；2，3：TT基因型；4，6：CC基因型

图1 MDR1基因C3435T位点酶切片段电泳结果

2.2 实时荧光定量PCR的特异性

MDR1及β-actin扩增产物熔解曲线均显示单一锐利峰，熔解温度分别为82 ℃、88 ℃，表明检测无污染，扩增产物为特异性产物。

2.3 相对标准曲线

6个稀释样品分别进行定量PCR扩增结果显示，在6个数量级范围内其对数值与相应的阈值循环数（Ct值）有良好的线性相关性，相关系数$r^2=0.999$，$E_{MDR1}=94.5\%$，$E_{\beta\text{-actin}}=96\%$。

2.4 性别差异对MDR1基因PBMCs mRNA表达水平的影响

男、女MDR1基因PBMCs mRNA相对表达量分别为$(4.048\pm2.682)\times10^{-3}$与$(4.720\pm2.951)\times10^{-3}$，经$t$检验显示二者PBMCs mRNA表达水平差异无统计学意义（$t=1.289$，$P>0.05$）。

2.5 MDR1基因C3435T多态性对PBMCs mRNA表达水平的影响

MDR1基因C3435T位点CC、CT、TT各基因型组的PBMCs mRNA相对表达量分别为$(4.165\pm3.060)\times10^{-3}$、$(4.323\pm2.693)\times10^{-3}$与$(4.565\pm2.368)\times10^{-3}$。经单因素方差分析显示3组间PBMCs mRNA表达水平差异无统计学意义（$F=0.132$，$P>0.05$）。

3 讨论

MDR1基因多态性可能是引起不同个体同一组织

P-gp 表达和功能差异的主要原因[6]。Hoffmeyer 等[3]首次对健康白种人的 MDR1 基因多态性进行了系统筛查并研究了其功能多态性,结果显示 3435CC 基因型个体的 MDR1 基因表达高于 3435TT 基因型个体,口服地高辛后 3435CC 基因型个体的血浆药物浓度低于 3435TT 基因型个体。Hattori 等[7]以日本九州地区的急性淋巴细胞白血病(ALL)儿童及健康儿童为研究对象,发现 3435TT 型的频率在 ALL 儿童中显著高于健康儿童,认为 MDR1 基因多态性与儿童 ALL 的发生相关可能是由于基因多态性影响了 MDR1 的 mRNA 表达。Kodaira 等[8]发现在健康日本人中 3435TT 基因型受试者的兰索拉唑血药浓度高于其他 2 种基因型的受试者,认为 C3435T 多态性对兰索拉唑药物代谢动力学有影响。但是也有研究得出不尽一致的结果:Efferth 等[9]对 ALL 患者 MDR1 C3435T 多态性与药物治疗关系进行研究,发现 C3435T 多态性和 MDR1 mRNA 表达与患者对阿霉素耐药无关;Jamroziak 等[10]的研究结果显示 MDR1 C3435T 多态性与成人急性髓细胞样白血病(AML)易感性及与 AML 细胞的 P-gp 表达均无关。这些研究结果产生矛盾可能是由于在不同国家、不同地区、不同种族的人群中,MDR1 基因 C3435T 多态性对 MDR1 表达和功能的影响不同。不同地区种族的人群存在遗传背景差异、不同的病理生理状态以及饮食生活习惯等,这些都可能会影响 MDR1 的表达,进而影响 P-gp 的功能。如有研究证实 MDRl 启动子区域的甲基化程度可以影响 P-gp 的表达并与乳腺癌的侵袭性相关[11]。此外,MDR1 的表达也受到各种环境因素的影响,研究[12]发现联合给药和食物能抑制或促进 MDR1 表达,从而造成不同的研究结果之间没有良好的一致性。因此,在研究 MDR1 基因型与其表型的相关性时应尽可能控制某些潜在的影响因素,鉴于多数研究以成年人为对象,而儿童有其独特的病理生理特点,并且 C3435T 多态性位点的分布具有明显的种族和地区差异[5],变异位点分布的种族差异会影响到不同种族个体的体内药物处置过程,需要在不同地区和种族中开展这项研究以全面了解 MDR1 基因多态性对其表达和功能的影响。本课题组选择 130 例重庆地区汉族健康体检儿童的外周血标本进行研究,结果显示在这 130 例儿童中 MDR1 基因表达具有较大的个体差异,进一步的统计分析提示男、女组间和 C3435T 位点各基因型组间 MDR1 基因表达差异无统计学意义。在排除了性别因素对 MDR1 表达的影响后,该研究结果初步证明在汉族儿童中 MDR1 基因 C3435T 多态性对 mRNA 表达并没有显著性影响,也进一步表明 MDR1 基因 C3435T 多态性与其表达之间的关系具有人种地区差异,提示中国汉族儿童中 C3435T 多态性对 P-gp 的表达可能不起独立的影响作用,对于汉族儿童 C3435T 位点多态性不能作为推测 MDR1 表达水平的依据。而另一方面个体之间 MDR1 基因的表达有较大差异,因此有必要进一步对个体间的 MDR1 表达差异与不同个体的药物疗效、不良反应之间的关系进行深入研究。

参考文献:

[1] Kimchi-Sarfaty C, Oh J M, Kim I W, *et al*. A" Silent "polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity[J]. Science, 2007, 315(5811):525 - 528.

[2] Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, *et al*. Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex[J]. Pharmacogenomics J, 2007, 7(1):56 - 65.

[3] Hoffmeyer S, Burk O, von-Richter O, *et al*. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7):3473 - 3478.

[4] 陈伟,胡志德,吴丽娟,等. mdr1 基因 C3435T 多态性与口服 FK506 后血药浓度关系的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(19):1971 - 1972.

[5] 郑启城,冯毅,肖莉,等. 重庆地区汉族人群 MDR1 基因单核苷酸多态性及单倍型分析[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(22):2631 - 2634.

[6] Woodahl E L, Ho R J. The role of MDR1 genetic polymorphisms in interindividual variability in P-glycoprotein expression and function[J]. Curr Drug Metab, 2004, 5(1):11 - 19.

[7] Hattori H, Suminoe A, Wada M, *et al*. Regulatory polymorphisms of multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with the development of childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Leuk Res, 2007, 31(12):1633 - 1640.

[8] Kodaira C, Sugimoto M, Nishino M, *et al*. Effect of MDR1 C3435T polymorphism on lansoprazole in healthy Japanese subjects[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2009, 65(6):593 - 600.

[9] Efferth T, Sauerbrey A, Steinbach D, *et al*. Analysis of single nucleotide polymorphism C3435T of the multidrug resistance gene MDR1 in acute lymphoblastic leukemia[J]. Int J Oncol, 2003, 3(2):509 - 517.

[10] Jamroziak K, Balcerczak E, Cebula B, *et al*. No influence of 3435C > T ABCB1 (MDR1) gene polymorphism on risk of adult acute myeloid leukemia and P-glycoprotein expression in blast cells[J]. Ther Drug Monit, 2006, 28(5):707 - 711.

[11] Sharma G, Mirza S, Parshad R, *et al*. CpG hypomethylation of MDR1 gene in tumor and serum of invasive ductal breast carcinoma patients[J]. Clin Biochem, 2010, 43(4/5):373 - 379.

[12] Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen J H, *et al*. Concise review: Clinical relevance of drug drug and herb drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein)[J]. Oncologist, 2007, 12(8):927 - 941.

(收稿 2010-01-06 修回 2010-02-06)
(编辑 龙 亮)