

· 研究报道 ·

影响青蒿素类药物代谢的相关基因位点突变在新疆哈萨克族 人群中的分布

周雪红¹, 徐薇², 刁彤², 王丽², 李凯^{2*}

1. 新疆阿勒泰地区人民医院, 新疆 阿勒泰 836500; 2. 新疆军区总医院, 新疆 乌鲁木齐 830000

摘要: **目的** 检测影响青蒿素类药物代谢相关的 CYP2A6*2、CYP2A6*10、CYP2A6*17、CYP2B6*4、CYP2B6*6、CYP2B6*18 等位点的频率在新疆地区哈萨克族人群中的分布, 探究新疆地区哈萨克族人群对于青蒿素类药物的药物遗传学背景, 为新疆地区人群基于青蒿素药物的疟疾治疗和预防提供临床决策。**方法** 选取 CYP2A6*2、CYP2A6*10、CYP2A6*17、CYP2B6*4、CYP2B6*6、CYP2B6*18 共 6 个位点进行测序实验。收集新疆哈萨克族人群全血样本 330 人份, 提取全血 DNA 基因组后, 利用多重 PCR 技术及高通量测序技术进行分型, 分析其分布频率, 采用哈迪-温伯格定律对相应位点的基因型分布进行检验。**结果** 本研究中各单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点测序结果均符合哈迪温伯格平衡定律 ($P>0.05$), 不同性别人群的 SNP 位点分布差异无统计学意义 ($P>0.05$)。CYP2A6*2、CYP2A6*10、CYP2A6*17、CYP2B6*4、CYP2B6*6、CYP2B6*18 测序成功的样本数分别为 326 份、319 份、328 份、318 份、322 份、328 份, 在新疆哈萨克族人群中变异等位基因的频率分别为 0.61%、0%、0%、30.97%、22.98%、0%。**结论** 新疆地区哈萨克族人群中存在影响青蒿素类疟疾预防及治疗药物代谢的相关位点突变, 在使用青蒿素类药物时, 应进一步探索观察用药效果与个体药物遗传学背景的关系。

关键词: 疟疾; 青蒿素; 细胞色素 P450 家族; 基因多态性

中图分类号: R531.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2023)04-435-04

DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2023.04.22

Distribution of gene mutation sites affecting artemisinin metabolism in the Kazak population in Xinjiang

ZHOU Xue-hong¹, XU Wei², DIAO Tong², WANG Li², LI Kai²

1. Altay People's Hospital, Altay, Xinjiang 836500, China;

2. General Hospital of Xinjiang Military Region, Urumqi, Xinjiang 830000, China

Corresponding author: LI Kai, E-mail: 958813693@qq.com

Abstract: **Objective** To detect the distribution of CYP2A6*2, CYP2A6*10, CYP2A6*17, CYP2B6*4, CYP2B6*6, and CYP2B6*18 loci affecting the metabolism of artemisinins in Kazak population in Xinjiang. To explore the pharmacogenetic background of the Kazak population in Xinjiang for artemisinin drugs and provide clinical decision support for the treatment and prevention of malaria based on artemisinin drugs. **Methods** Six SNPs including CYP2A6*2, CYP2A6*10, CYP2A6*17, CYP2B6*4, CYP2B6*6, and CYP2B6*18 were selected for the sequencing experiment. 330 whole blood samples were collected from the Kazak population in Xinjiang. After extracting the whole blood DNA genome, multiplex PCR and high-throughput sequencing were used for genotyping. The allele frequencies were analyzed using the Hardy-Weinberg equilibrium. **Results** In this study all SNPs follow the Hardy-Weinberg equilibrium ($P>0.05$), there was no significant difference in the distribution of SNPs between different genders ($P>0.05$). The number of successfully sequenced samples of CYP2A6*2, CYP2A6*10, CYP2A6*17, CYP2B6*4, CYP2B6*6, and CYP2B6*18 were 326, 319, 328, 318, 322 and 328 respectively. The frequencies of variant alleles of CYP2A6*2, CYP2A6*10, CYP2A6*17, CYP2B6*4, CYP2B6*6, and CYP2B6*18 in Kazak population are: 0.61%, 0%, 0%, 30.97%, 22.98%, 0%. **Conclusions** Mutation alleles affecting the metabolism of artemisinins exist in the Kazak population in Xinjiang. When using artemisinins, the relationship between the drug effect and individual pharmacogenetic background should be further explored.

Keywords: Malaria; artemisinin; cytochrome P450; gene polymorphism

疟疾是由疟原虫所致, 受感染的雌性按蚊通过叮咬将疟原虫传给人类。2020年, 世界有近一半人口面临疟疾风险。高风险人群包括婴儿、5岁以下儿童、孕妇和艾滋病毒感染者/艾滋病患者, 以及无免

疫力的旅行者。2020年, 全球 85 个疟疾流行国家/地区约有 2.41 亿例疟疾病例。29 个国家占全球疟疾病例的 96%, 尼日利亚 (27%)、刚果民主共和国 (12%)、乌干达 (5%)、莫桑比克 (4%)、安哥拉 (3.4%) 和布基

作者简介: 周雪红 (1980—), 女, 本科, 副主任技师, 研究方向: 临床检验。

*通信作者: 李凯, E-mail: 958813693@qq.com

纳法索(3.3%)等6个国家约占全球所有病例的55%^[1]。

青蒿素及其衍生物(双氢青蒿素、青蒿琥酯、蒿甲醚、双氢青蒿素等)源于中国草药青蒿,属于一类独特的半萜内酯过氧化物,是新一代有效抗疟药物^[2]。近年来,关于青蒿素耐药性的报告已愈发多见^[3-4],最主要的原因是疟原虫基因组中耐药基因座的演变^[5]。除疟原虫因素外,还需要进一步研究药理学因素如何影响耐药。目前许多抗疟药是细胞色素P450家族(CYP450)的底物^[6],口服青蒿素后,主要经过CYP2B6形成4种非活性代谢物(脱氧青蒿素、脱氧双氢青蒿素、9,10-二羟基脱氧青蒿素和晶体7)^[7],CYP3A4起次要作用,以补偿CYP2B6的低表达^[8]。青蒿琥酯、蒿甲醚和蒿醚分别通过CYP2A6、CYP3A4/A5和CYP3A4快速代谢形成活性物质双氢青蒿素^[9]。青蒿素及其衍生物的药代动力学特性存在很大的个体间差异^[10-11],主要是由于CYP450具有高度的多态性^[12]。CYP2B6代谢不良表型的人群存在青蒿素药物介导/相关的联合用药失败风险^[13]。CYP2A6*2、CYP2A6*4、CYP2A6*7、CYP2A6*10、CYP2A6*17突变可导致酶活性显著降低或产生非活性酶,可能导致青蒿素前体失活减少或形成的活性代谢物的双氢青蒿素减少,从而影响治疗效果^[14]。

我国新疆地区与中亚、巴基斯坦、印度等疟疾流行国家和地区接壤,存在输入性疟疾的风险。本研究致力于探究新疆哈萨克族人群对于青蒿素类药物的药物遗传学背景。为新疆地区人群基于青蒿素药物的疟疾治疗和预防提供临床参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2021年5月—2021年12月新疆阿勒泰地区人民医院哈萨克族体检血常规标本330例,男女各半,取外周血2 mL,样本放置于4℃冰箱中储存。本研究通过了相关伦理批准。

1.2 方法 查阅文献,对青蒿素类药物代谢相关基因位点进行生物信息学分析及可行性分析,确定测序位点。采用Solarbio公司全血DNA基因组提取试剂盒,按照操作步骤提取DNA,使用超微量紫外分光光度计测定仪检测DNA浓度,送至上海翼和应用生物有限公司进行高通量测序。

1.3 统计学分析 统计野生型(Wt)和突变型(Mut)的频率, $Wt\% = Wt / (Wt + Mut) \times 100\%$, $Mut\% = Mut / (Wt + Mut) \times 100\%$ 。采用哈迪-温伯格定律(Hardy-Weinberg equilibrium)对相应位点的基因型分布进行检验,采用GraphPad Prism 9统计学软件处理数据,进行卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 确定青蒿素类药物代谢相关的基因多态性相关位点 经查阅文献共统计出影响青蒿素类药物代谢相关的基因多态性位点9个:CYP2A6*1B、CYP2A6*2、CYP2A6*4、CYP2A6*7、CYP2A6*10、CYP2A6*17、CYP2B6*4、CYP2B6*6、CYP2B6*18。经生物信息学分析,参考GC含量、染色体位置,依据可行性确定选取CYP2A6*2、CYP2A6*10、CYP2A6*17、CYP2B6*4、CYP2B6*6、CYP2B6*18等6个位点进行测序实验(表1),查阅其对应的SNP编号分别为rs1801272、rs28399468、rs28399454、rs2279343、rs3745274、rs28399499。

表1 新疆地区哈萨克族人群青蒿素类药物代谢相关基因多态性位点分布

Table 1 Distribution of artemisinin metabolism gene polymorphisms in the Kazak population in Xinjiang

SNP	Wt/Wt	Wt/Mut	Mut/Mut	样本量 Sample number	Wt频率 Wt frequency/%	Mut频率 Mut frequency/%	HWE-p值 HWE-p value	代谢的底物 Metabolic substrates
rs1801272 CYP2A6*2	322	4	0	326	99.39	0.61	0.993 8	青蒿琥酯、青蒿素
rs28399468 CYP2A6*10	319	0	0	319	100.00	0		青蒿琥酯、青蒿素
rs28399454 CYP2A6*17	328	0	0	328	100.00	0		青蒿琥酯、青蒿素
rs2279343 CYP2B6*4	149	141	28	318	69.03	30.97	0.805 1	青蒿素
rs3745274 CYP2B6*6	186	124	12	322	77.02	22.98	0.288 8	青蒿素
rs28399499 CYP2B6*18	328	0	0	328	100.00	0		青蒿素

注: Wt. 野生型; Mut. 突变型; HWE. 哈迪温伯格平衡。Note: Wt. Wide type; Mut. Mutant; HWE. Hardy Weinberg equilibrium.

2.2 新疆阿勒泰地区哈萨克族人群抗疟药物代谢相关基因多态性位点分布 经统计分析,各SNP位点测序结果均符合哈迪温伯格平衡定律($P>0.05$),男性女性的SNP位点分布差异无统计学意义($P>0.05$)。SNP位点 rs1801272、rs28399468、rs28399454、rs2279343、rs3745274、rs28399499 测序成功的样本数分别为:326份、319份、328份、318份、322份、328份。本研究人群中 rs28399468 (CYP2A6*10)、rs28399454 (CYP2A6*17)、rs28399499 (CYP2B6*18)的突变率均为0。位点 rs1801272 (CYP2A6*2)突变率为0.61%,其中纯合突变率为0%;rs2279343 (CYP2B6*4)突变率为30.97%,其中纯合突变率为8.81%;位点 rs3745274 (CYP2B6*6)突变率为22.98%,其中纯合突变率为3.72%。见表2。

表2 不同性别人群青蒿素类药物代谢相关基因多态性位点分布

Table 2 Distribution of artemisinin metabolism gene polymorphisms in different gender

SNP	男性 Male			女性 Female			P
	Wt/Wt	Wt/Mut	Mut/Mut	Wt/Wt	Wt/Mut	Mut/Mut	
rs1801272 CYP2A6*2	162	2	0	160	2	0	
rs28399468 CYP2A6*10	161	0	0	158	0	0	
rs28399454 CYP2A6*17	165	0	0	163	0	0	
rs2279343 CYP2B6*4	74	78	11	75	63	17	0.260 7
rs3745274 CYP2B6*6	92	67	3	94	57	9	0.148 4
rs28399499 CYP2B6*18	165	0	0	163	0	0	

注:Wt.野生型;Mut.突变型。Note:Wt. Wide type; Mut. Mutant.

3 讨论

以青蒿素为基础的联合疗法 (artemisinin-based combination therapy, ACT)是目前世界卫生组织建议用于恶性疟原虫感染的一线疗法^[15]。ACT是将青蒿素衍生物与具有不同作用模式的长效抗疟药物进行组合。目前在疟疾流行区域广泛使用^[16],显著降低了世界范围的疟疾发病率^[17]。作为WHO疟疾指南的推荐疗法,通常非常安全有效,但由于寄生虫、人类和药物的因素,在疟疾流行区域,ACT的疗效也存在差异。

药物的有效性和安全性取决于体内达到适当的药物水平并维持足够长的时间^[18-19],药物水平不足会导致失败和出现耐药性,而过度会带来毒性风

险^[20-21]。在其他因素均相同的情况下,人类基因多态性可以改变药物效果。研究表明人体内的细胞色素P450酶家族和N-乙酰转移酶2(NAT2)基因^[22]广泛参与着各种抗疟药物的代谢。由于不同种族群体的上述基因多态性频率不同,因此种族之间的抗疟药物代谢、药物疗效及安全性也存在差异。

目前在疟疾流行地区对于抗疟药物代谢的遗传学背景研究是一大热点。例如PERNAUTE-LAU等^[23]认为与药物代谢或毒性相关的宿主基因变异是抗疟药不良反应的重要决定因素,研究者分析了48名加蓬儿童恶性疟疾患者体内的21个抗疟药物代谢相关基因,发现1/6~1/3的个体携带CYP2A6、CYP2B6、CYP2D6和CYP2C8的低活性等位基因,研究结果对该地区青蒿素、氯喹和阿莫地喹治疗用药具有重要意义。PHOMPRADIT等^[24]研究了71名缅甸恶性疟疾患者的CYP2A6、CYP2B6等基因的多态性以及青蒿素类药物的治疗效果,在CYP2A6酶活性降低的患者中,活性双氢青蒿素的浓度低于其他患者,CYP2B6突变基因型在治疗失败者中的携带比例高于正常药物应答者。

本研究人群的CYP2A6*10、CYP2A6*17、CYP2B6*18位点中未发现与抗疟药物代谢相关的突变。CYP2A6*2、CYP2B6*4、CYP2B6*6的突变率为0.61%、30.97%、22.98%,表明新疆哈萨克族人群中存在上述基因的遗传多态性,需要进一步评估在该人群中CYP450家族多态性对青蒿素类药物临床结果的影响。

与世界其他种族人群数据(NIH dbSNP数据库 www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1801272、rs28399468、rs28399454、rs2279343、rs3745274、rs28399499)相比,本研究人群rs1801272(CYP2A6*2)位点的突变率与欧洲、拉美人群相差较大,与东亚、南亚、非洲人群相似;rs28399468(CYP2A6*10)位点的突变率与东亚人群测序数据存在不同;rs28399454(CYP2A6*17)位点的突变率与欧洲、东亚、南亚人群相近,与非洲、拉美人群存在不同;rs2279343(CYP2B6*4)位点的突变率高于欧洲人群,低于南亚人群;rs3745274(CYP2B6*6)位点的突变率与欧洲、东亚人群接近;rs28399499(CYP2B6*18)位点的突变率异于非洲、拉美人群。未发现与本研究人群上述基因突变频率全部接近的种族,青蒿素药物代谢相关的基因突变位点分布在本研究人群中具有其特殊性。

随着“一带一路”倡议不断推进,内联西北,外接欧亚的新疆,已成为向西开放的枢纽核心。新疆与世界的人员、货物流动更加频繁,也面临着传染病输入的风险。WHO《2020年世界疟疾报告》显示,新疆周

边陆地接壤国家中疟疾流行趋势较为严峻:印度2019年发病数量为560万例,世卫组织东地中海区域2019年的500万病例数中约1/4来源于巴基斯坦和阿富汗。赵江山等^[25]在新疆输入性疟疾的流行特征研究中发现,新疆地区输入性疟疾中最为凶险的恶性疟占比高达62.5%,新疆8个地(州、市)12个区县均有病例报告。应进一步加强对流动人口的管理和监测,特别是提高医疗机构的诊治能力,防止发生境外输入再传播。对新疆地区人群的抗疟药物代谢遗传学背景进行调查有助于指导新疆地区人群的精细合理用药,还有助于进一步探究治疗效果与遗传背景的关系。

利益冲突声明 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] World Health Organization. World malaria report 2021[R]. Geneva: World Health Organization, 2021.
- [2] WHITE N J. Qinghaosu (artemisinin): the price of success[J]. Science, 2008, 320(5874): 330-334.
- [3] KOEHNE E, ADEGNIKA A A, HELD J, et al. Pharmacotherapy for artemisinin-resistant malaria[J]. Expert Opin Pharmacother, 2021, 22(18): 2483-2493.
- [4] TALMAN A M, CLAIN J, DUVAL R, et al. Artemisinin bioactivity and resistance in malaria parasites[J]. Trends Parasitol, 2019, 35(12): 953-963.
- [5] KHOURY D S, CAO P X, ZALOUMIS S G, et al. Artemisinin resistance and the unique selection pressure of a short-acting antimalarial[J]. Trends Parasitol, 2020, 36(11): 884-887.
- [6] MEHLOTRA R K, HENRY-HALLDIN C N, ZIMMERMAN P A. Application of pharmacogenomics to malaria: a holistic approach for successful chemotherapy[J]. Pharmacogenomics, 2009, 10(3): 435-449.
- [7] NAVARATNAM V, MANSOR S M, SIT N W, et al. Pharmacokinetics of artemisinin-type compounds[J]. Clin Pharmacokinet, 2000, 39(4): 255-270.
- [8] SVENSSON U S, ASHTON M. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of artemisinin[J]. Br J Clin Pharmacol, 1999, 48(4): 528-535.
- [9] LI X Q, BJÖRKMAN A, ANDERSSON T B, et al. Identification of human cytochrome P₄₅₀s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from in vitro data[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2003, 59(5): 429-442.
- [10] MCGREADY R, STEPNIIEWSKA K, WARD S A, et al. Pharmacokinetics of dihydroartemisinin following oral artesunate treatment of pregnant women with acute uncomplicated falciparum malaria[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2006, 62(5): 367-371.
- [11] MITHWANI S, AARONS L, KOKWARO G O, et al. Population pharmacokinetics of artemether and dihydroartemisinin following single intramuscular dosing of artemether in African children with severe falciparum malaria[J]. Br J Clin Pharmacol, 2004, 57(2): 146-152.
- [12] ZHOU Y, INGELMAN-SUNDBERG M, LAUSCHKE V M. Worldwide distribution of cytochrome P450 alleles: a meta-analysis of population-scale sequencing projects[J]. Clin Pharmacol Ther, 2017, 102(4): 688-700.
- [13] KERB R, FUX R, MÖRIKE K, et al. Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport[J]. Lancet Infect Dis, 2009, 9(12): 760-774.
- [14] TANNER J A, TYNDALE R F. Variation in CYP2A6 activity and personalized medicine[J]. J Pers Med, 2017, 7(4): 18.
- [15] NORDMANN T, BORRMANN S, RAMHARTER M. Drug-induced hypersensitivity to artemisinin-based therapies for malaria[J]. Trends Parasitol, 2022, 38(2): 136-146.
- [16] BOSMAN A, MENDIS K N. A major transition in malaria treatment: the adoption and deployment of artemisinin-based combination therapies[J]. Am J Trop Med Hyg, 2007, 77(6_Suppl): 193-197.
- [17] KOKWARO G. Ongoing challenges in the management of malaria[J]. Malar J, 2009, 8(Suppl 1): S2.
- [18] BARNES K I, LINDEGARDH N, OGUNDAHUNSI O, et al. World antimalarial resistance network (WARN) IV: clinical pharmacology[J]. Malar J, 2007, 6: 122.
- [19] SEVENE E, GONZÁLEZ R, MENÉNDEZ C. Current knowledge and challenges of antimalarial drugs for treatment and prevention in pregnancy[J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(8): 1277-1293.
- [20] EFFERTH T, KAINA B. Toxicity of the antimalarial artemisinin and its derivatives[J]. Crit Rev Toxicol, 2010, 40(5): 405-421.
- [21] LI Q G, HICKMAN M. Toxicokinetic and toxicodynamic (TK/TD) evaluation to determine and predict the neurotoxicity of artemisinins[J]. Toxicology, 2011, 279(1/2/3): 1-9.
- [22] STAEHLI HODEL E M, CSAJKA C, ARIEY F, et al. Effect of single nucleotide polymorphisms in cytochrome P450 isoenzyme and N-acetyltransferase 2 genes on the metabolism of artemisinin-based combination therapies in malaria patients from Cambodia and Tanzania[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(2): 950-958.
- [23] PERNAUTE-LAU L, ADEGNIKA A A, ZHOU Y T, et al. Pharmacogene sequencing of a Gabonese population with severe *Plasmodium falciparum* malaria reveals multiple novel variants with putative relevance for antimalarial treatment[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2021, 65(7): e0027521.
- [24] PHOMPRADIT P, MUHAMAD P, CHEOYMANG A, et al. Preliminary investigation of the contribution of CYP2A6, CYP2B6, and UGT1A9 polymorphisms on artesunate-mefloquine treatment response in Burmese patients with *Plasmodium falciparum* malaria[J]. Am J Trop Med Hyg, 2014, 91(2): 361-366.
- [25] 赵江山, 史光忠, 王翊, 等. 新疆2016—2020年输入性疟疾流行特征[J]. 中国热带医学, 2021, 21(7): 694-697.
- ZHAO J S, SHI G Z, WANG S, et al. Epidemic characteristics of imported malaria in Xinjiang, 2016-2020[J]. China Trop Med, 2021, 21(7): 694-697. (in Chinese)

收稿日期:2022-09-24 编辑:王佳燕