

• 论 著 •

四川地区冠心病患者 CYP2C19 基因多态性检测*

曾 敏^{1,2},熊怡淞^{1△},俞 娟³,常 凯¹,吴艾霖¹

(1. 中国人民解放军成都军区总医院检验科 610083;2. 成都医学院检验医学院 2010 级医学检验 610500;
3. 南通大学附属医院检验科,江苏南通 226001)

摘 要:目的 检测四川地区冠心病患者 CYP2C19 基因的多态性,分析基因型与性别、年龄及临床分型之间的相关性。
方法 采用 DNA 微阵列芯片法检测 131 例被确诊为冠心病患者的 CYP2C19 基因型,结合患者的性别、年龄、临床分型进行分组,探讨这些因素与 CYP2C19 基因多态性的相关性。**结果** 131 例冠心病患者中,有 5 种基因型被检测到,分别为 CYP2C19 * 1/ * 1(636GG, 681GG)、CYP2C19 * 1/ * 2(636GG, 681GA)、CYP2C19 * 1/ * 3(636GA, 681GG)、CYP2C19 * 2/ * 2(636GG, 681AA)、CYP2C19 * 2/ * 3(636GA, 681GA)。分布频率分别为 53 例(40.5%)、54 例(41.2%)、6 例(4.6%)、13 例(9.9%)、5 例(3.8%),而 CYP2C19 * 3/ * 3(636AA, 681GG)未被检测到。不同性别冠心病患者 CYP2C19 的基因型、等位基因频率差异无统计学意义($P>0.05$);不同性别的代谢型患者,其 CYP2C19 的基因型分布差异具有统计学意义($\chi^2=6.527, P=0.038$)。不同年龄和临床分型冠心病患者 CYP2C19 的基因型、等位基因频率、代谢型分布差异无统计学意义($P<0.05$)。**结论** 冠心病患者的 CYP2C19 基因型分布、等位基因频率分布与性别、年龄和疾病临床分型无关。

关键词:CYP2C19; 冠心病; 基因芯片; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.10.001 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)10-1363-03

Genetic polymorphism analysis of CYP2C19 in patients with coronary heart disease in Sichuan Province*

ZENG Min^{1,2}, XIONG Yisong^{1△}, YU Juan³, CHANG Kai¹, WU Ailin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China; 2. Medical Laboratory of 2010 Grade, School of Laboratory Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China;
3. Department of Clinical Laboratory, Hospital Affiliated of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, Chian)

Abstract:**Objective** To detect the CYP2C19 gene polymorphisms in patients with coronary heart disease (CHD) in Sichuan Province, and to analyze the correlation of its genotype with gender, age and clinical classification. **Methods** By DNA microarray chip, CYP2C19 gene type of total 131 cases, including 90 males and 41 females, diagnosed with CHD were detected. The correlation of CYP2C19 gene polymorphisms with gender, age and clinical classification was statistically analyzed. **Results** In the 131 cases of CHD patients, five genotypes were detected, including CYP2C19 * 1/ * 1 (636GG, 681GG), CYP2C19 * 1/ * 2 (636GG, 681GA), CYP2C19 * 1/ * 3 (636GA, 681GG), CYP2C19 * 2/ * 2 (636GG, 681AA) and CYP2C19 * 2/ * 3 (636GA, 681GA). The distribution of genotypes were 53 cases (40.5%), 54 cases (41.2%), 6 cases (4.6%), 13 cases (9.9%) and 5 cases (3.8%), respectively. CYP2C19 * 3/ * 3 (636AA, 681GG) was not detected. The CYP2C19 genotypes and allele frequency between different genders had no statistical difference in CHD patients ($P>0.05$), while CYP2C19 metabolic type distributions between male and female CHD patients had significant difference ($\chi^2=6.527, P=0.038$). Different age groups and different CHD clinical sub-type patients had no statistical difference in CYP2C19 genotypes, allele frequency and metabolic type distribution ($P>0.05$), respectively. **Conclusion** CYP2C19 genotype distribution, allele frequency and metabolic type distribution among the CHD patients have no correlation with genders, age and CHD clinical sub-types.

Key words:CYP2C19; coronary heart disease; gene chip; gene polymorphism

在我国,冠心病的发病率和致死率呈逐年上升趋势。目前抗血小板药物氯吡格雷(商品名:波立维或泰嘉)是用于治疗冠心病患者的一种临床经典药物,这种药能够降低患者不良心血管事件的风险^[1]。据文献报道,在临床治疗用药过程中,有相当部分患者服用常规剂量氯吡格雷后仍然发生心血管不良事件,这种现象称为氯吡格雷抵抗(CR)^[2-3]。CR 机制尚不明确,目前认为其可能机制包括遗传基因多态性、血小板活化因素、生物利用度差异、胰岛素抵抗与阿司匹林抵抗因素、依从性与剂量因素及药物相互作用等。其中,药物代谢基因的多态性是 CR 的重要原因之一。氯吡格雷是一种前体药物,本身没有抗

血小板作用,在体内经 CYP2C19 代谢后产生活性产物,从而发挥抗血小板作用。CYP2C19 基因多态性对 CYP2C19 酶活性的影响起着决定性作用。因此,为了进一步探讨 CYP2C19 酶活性对氯吡格雷用药效果的影响,本研究通过建立合适的样本群,对 CYP2C19 基因多态性进行了检测,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 131 例 2014 年 11 月至 2015 年 3 月在中国人民解放军成都军区总医院确诊为冠心病的患者,年龄 35~100 岁,平均(66.07±12.03)岁,均为汉族。患者中男 90

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81302596,81301484);成都军区总医院院管课题(2013YG-B064)。

作者简介:曾敏,女,技师,主要从事临床检验方面的研究。△ 通信作者,E-mail:xys10@163.com。

例,女 41 例;35~50 岁 15 例,>50~65 岁 50 例,>65~80 岁 50 例,>80~100 岁 16 例;心肌梗死 31 例,稳定性心绞痛 50 例,不稳定性心绞痛 50 例。

1.2 仪器与试剂 血液基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];CYP2C19 基因检测试剂盒(DNA 微阵列芯片法,上海百微科技股份有限公司);PCR 扩增仪(美国 ABI 公司,型号 Veriti96);BaiO®e-Hyb 全自动杂交仪(上海百微科技股份有限公司,型号 BSE03011);BaiO®BE-2.0 生物芯片识读仪(上海百微科技股份有限公司,型号 BSE01011);台式高速离心机(美国 EPPENDORF 公司,型号 5415R);低速离心机(河北白洋离心机厂,型号 40C);手掌式离心机(江苏新康医疗器械有限公司,型号 xk-700)。

1.3 方法 采用 DNA 微阵列芯片法检测 CYP2C19 基因多态性。

1.3.1 聚合酶链反应(PCR)扩增 采集研究对象静脉全血 2 mL 于乙二胺四乙酸二钠抗凝管中,按血液基因组 DNA 提取试剂盒使用说明书提取和纯化 DNA。PCR 按照 CYP2C19 扩增液 1 或 CYP2C19 扩增液 2 19 μ L+1 μ L 反应液 A+5 μ L 全血 DNA 溶液配制。扩增条件:50 $^{\circ}$ C,5 min;94 $^{\circ}$ C,5 min;94 $^{\circ}$ C 25 s;48 $^{\circ}$ C 40 s;72 $^{\circ}$ C 30 s;35 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增完后取出扩增产物,2~8 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.2 杂交显色 操作按照试剂盒说明书,在 BaiO®e-Hyb 全自动杂交仪中进行。吸取 180 μ L 杂交缓冲液,加入 10 μ L CYP2C19 扩增产物 1 和 10 μ L CYP2C19 扩增产物 2,混匀,制成杂交反应液,将试管架放入杂交仪中,运行杂交程序。待反应结束后,取出芯片,放入生物芯片识读仪中,用 BaiO®基因芯片图像分析软件(BaiO Array Doctor)V 2.0 进行图像扫描与数据分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件处理数据,计数资料采用百分数表示,组间比较用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 5 种 CYP2C19 基因型芯片模式 本研究一共检测了 131 例冠心病患者的 CYP2C19 基因多态性,共发现 5 种基因型:

CYP2C19 * 1/ * 1、CYP2C19 * 1/ * 2、CYP2C19 * 1/ * 3、CYP2C19 * 2/ * 2、CYP2C19 * 2/ * 3。未检测到 CYP2C19 * 3/ * 3。为了方便,后面将 CYP2C19 * 1/ * 1 简写为 * 1/ * 1,以此类推。

2.2 131 例冠心病患者 CYP2C19 基因型、等位基因、代谢型频率分布 在 131 例冠心病患者中,野生型 CYP2C19 基因型 * 1/ * 1 有 53 例(40.5%);杂合子基因型 * 1/ * 2 有 54 例(41.2%);* 1/ * 3 有 6 例;* 2/ * 2 有 13 例(9.9%);* 2/ * 3 有 5 例(3.8%);基因型 * 3/ * 3 有 0 例。等位基因型 * 2 有 85 例(32.4%),* 3 有 11 例(4.2%)。代谢型快者(基因型为 * 1/ * 1)有 53 例(40.5%),代谢型中间者(基因型为 * 1/ * 2 和 * 1/ * 3)有 60 例(45.8%),代谢型慢者(基因型为 * 2/ * 2、* 2/ * 3 和 * 3/ * 3)有 18 例(13.7%)。

2.3 不同性别冠心病患者 CYP2C19 基因型、等位基因、代谢型频率分布 本研究将冠心病患者按性别分为男、女两个组。结果显示,男、女性冠心病患者 CYP2C19 基因型分布差异无统计学意义($\chi^2=6.660,P=0.155$);等位基因频率分布差异无统计学意义($\chi^2=3.063,P=0.216$);代谢型分布差异具有统计学意义($\chi^2=6.527,P=0.038$)。见表 1。

2.4 不同年龄段冠心病患者 CYP2C19 基因型、等位基因、代谢型频率分布 本研究将冠心病患者按年龄不同分为 4 个组,分别是 35~50 岁、>50~65 岁、>65~80 岁、>80~100 岁。结果显示,不同年龄的冠心病患者 CYP2C19 基因型分布差异无有统计学意义($\chi^2=12.702,P=0.391$);等位基因频率分布差异无统计学意义($\chi^2=7.854,P=0.249$);代谢型分布差异无统计学意义($\chi^2=4.527,P=0.606$)。见表 2。

2.5 不同临床分型的冠心病患者 CYP2C19 基因型、等位基因、代谢型频率分布 本研究对 131 例冠心病患者按临床分型分为心肌梗死组、稳定性心绞痛组和不稳定心绞痛组。结果显示,不同临床分型冠心病患者的 CYP2C19 基因型分布差异无统计学意义($\chi^2=7.368,P=0.497$);等位基因分布差异无统计学意义($\chi^2=5.326,P=0.255$);代谢型分布差异也无统计学意义($\chi^2=4.193,P=0.380$)。见表 3。

表 1 不同性别的患者 CYP2C19 基因型、等位基因、代谢型分布[n(%)]

性别	n	基因型					等位基因		代谢型		
		* 1/ * 1	* 1/ * 2	* 1/ * 3	* 2/ * 2	* 2/ * 3	* 2	* 3	快	中	慢
男性	90	35(38.9)	34(37.8)	4(4.4)	12(13.3)	5(5.6)	63(35.0)	9(5.0)	35(38.9)	38(42.2)	17(18.9)
女性	41	18(44.0)	20(48.8)	2(4.9)	1(2.4)	0(0.0)	22(26.8)	2(2.4)	18(44.0)	22(53.7)	1(2.4)
χ^2				6.660				3.063		6.527	
P				0.155				0.216		0.038	

表 2 不同年龄段的患者 CYP2C19 基因型、等位基因、代谢型分布[n(%)]

年龄 (岁)	n	基因型					等位基因		代谢型		
		* 1/ * 1	* 1/ * 2	* 1/ * 3	* 2/ * 2	* 2/ * 3	* 2	* 3	快	中	慢
35~50	15	6(40.0)	8(53.3)	0(0.0)	1(6.7)	0(0.0)	10(33.3)	0(0.0)	6(40.0)	8(53.3)	1(6.7)
>50~65	50	17(34.0)	25(50.0)	1(2.0)	6(12.0)	1(2.0)	38(38.0)	2(2.0)	17(34.0)	26(52.0)	7(14.0)
>65~80	50	21(42.0)	19(38.0)	3(6.0)	4(8.0)	3(6.0)	30(30.0)	6(6.0)	21(42.0)	22(44.0)	7(14.0)
>80~100	16	9(56.3)	2(12.5)	2(12.5)	2(12.5)	1(6.3)	7(21.9)	3(9.4)	9(56.3)	4(25.0)	3(18.8)
χ^2				12.702				7.854		4.527	
P				0.391				0.249		0.606	

表 3 不同临床分型的患者 CYP2C19 基因型、等位基因、代谢型分布[n(%)]

临床分型	n	基因型					等位基因		代谢型		
		* 1/ * 1	* 1/ * 2	* 1/ * 3	* 2/ * 2	* 2/ * 3	* 2	* 3	快	中	慢
心肌梗死	31	15(48. 4)	11(35. 5)	1(3. 2)	3(9. 7)	1(3. 2)	18(58. 1)	2(3. 2)	15(48. 4)	12(38. 7)	4(12. 9)
稳定性心绞痛	50	23(46. 0)	20(40. 0)	2(4. 0)	5(10. 0)	0(0. 0)	30(30. 0)	2(2. 0)	23(46. 0)	22(44. 0)	5(10. 0)
不稳定性心绞痛	50	15(30. 0)	23(46. 0)	3(6. 0)	5(10. 0)	4(8. 0)	37(37. 0)	7(7. 0)	15(30. 0)	26(52. 0)	9(18. 0)
χ^2				7. 368				5. 326		4. 193	
P				0. 497				0. 255		0. 380	

3 讨 论

氯吡格雷是噻吩并吡啶类衍生物,属于一种前体药物,需通过 CYP450 酶系氧化形成 2-氧基-氯吡格雷,再经过水解形成一种硫醇衍生物发挥活性作用。据国内外大量文献报道,CYP2C19 基因多态性中的 * 2 等位基因突变,可以增大 CR 的可能,致使不良心血管事件发生率增高^[4-5], * 3 等位基因突变降低了患者对氯吡格雷的反应性,从而增大不良心血管事件发生的可能性^[6]。

CYP2C19 可以代谢抗抑郁药、抗真菌药、抗癫痫药、镇静、催眠药、质子泵抑制剂等^[7-11]。CYP2C19 基因型为快代谢型,代谢药物快,患者对药物的反应性相对其他基因型的好,不易发生不良反应,治疗效果好;若基因型为慢代谢型,代谢药物慢,药物在体内容易蓄积,易发生不良反应,治疗效果就大打折扣。因此,对于快代谢型的患者,在用相关药的时候可以适当加大剂量,这样能保证有效血药浓度,而慢代谢型的患者,应适当减小剂量或者换用非此基因代谢的同种药效的药物,以防药物的不良反应。

本研究所有标本均来自成都军区总医院住院的四川人群,结果显示,野生纯合子基因型 * 1/ * 1 占 40. 5%,杂合子突变型以 * 1/ * 2(41. 2%)为主, * 1/ * 3 占 4. 6%,突变纯合子以基因型 * 2/ * 2 为主(基因型 * 3/ * 3 未被测出)。本地区本次人群基因型分布频率与文献报道^[11]的分布频率相差不大,海口市人民医院 380 例冠心病患者进行 CYP2C19 基因多态性检测,结果发现野生纯合子基因型 * 1/ * 1 占 39. 7%,杂合子突变型 * 1/ * 2 占 39. 2%、* 1/ * 3 占 8. 6%,突变纯合子 * 2/ * 2 占 8. 6%、而 * 3/ * 3 仅占 0. 26%,这在一定程度上说明了本研究未检测到 * 3/ * 3 是由于这种基因型在人群中分布频率极低。除了目前发现并被报道的前述 6 种基因型,理论上还应该存在 CYP2C19 (636GA, 681AA)、CYP2C19 (636AA, 681GA)、CYP2C19(636AA,681AA)等 3 种基因型,但本研究目前发现的文献都未有此类基因型的报道,可能因为这些基因型中由于突变累积过多而在发育早期即被自然淘汰。

本研究结果显示,CYP2C19 基因型分布频率与性别、年龄无关($P>0. 05$),与文献^[12]报道一致。本文还特别研究了 CYP2C19 基因型分布频率与疾病临床分型是否有统计学意义,结果显示,基因型分布频率差异无统计学意义($P>0. 05$)。

由于部分患者存在 CR,冠心病患者进行 CYP2C19 基因多态性检测势在必行。本文发现患者的性别、年龄、冠心病临床分型对 CYP2C19 基因型无影响,为今后进一步开展个体化治疗研究打下基础。对于已经出现 CR 的问题,该如何从 CYP2C19 基因多态性角度着手解决,有待进一步研究。

参考文献

[1] 郭建华,杨雅娟. 氯吡格雷与阿司匹林治疗老年冠心病的临床疗效[J]. 检验医学与临床,2014,11(16):2289-2290.

[2] Yi X, Lin J, Wang Y, et al. Association of Cytochrome P450 Genetic Variants with Clopidogrel Resistance and Outcomes in Acute Ischemic Stroke [J]. J Atheroscler Thromb,2016,23(10):1188-1200.

[3] Arya V, Mahajan P, Saraf A, et al. Association of CYP2C19,CYP3A5 and GPIIb/IIIa gene polymorphisms with Aspirin and Clopidogrel Resistance in a cohort of Indian patients with Coronary Artery Disease [J]. Int J Lab Hematol,2015,37(6):809-818.

[4] 王谦,张国军,康熙雄. CYP2C19 基因多态性对氯吡格雷代谢的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版),2013,7(21):9746-9749.

[5] Yi X, Lin J, Zhou Q, et al. Clopidogrel Resistance Increases Rate of Recurrent Stroke and Other Vascular Events in Chinese Population [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis,2016,25(5):1222-1228.

[6] Hulot JS, Bura A, Villard E, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects [J]. Blood, 2006,108(7):2244-2247.

[7] Yu BN, Chen GL, He N, et al. Pharmacokinetics of citalopram in relation to genetic polymorphism of CYP2C19 [J]. Drug Metab Dispos,2003,31(10):1255-1259.

[8] Scholz I, Oberwittler H, Riedel KD, et al. Pharmacokinetics, metabolism and bioavailability of the triazole antifungal agent voriconazole in relation to CYP2C19 genotype [J]. Br J Clin Pharmacol,2009,68(6):906-915.

[9] Jiang D, Bai X, Zhang Q, et al. Effects of CYP2C19 and CYP2C9 genotypes on pharmacokinetic variability of valproic acid in Chinese epileptic patients: nonlinear mixed-effect modeling [J]. Eur J Clin Pharmacol,2009,65(12):1187-1193.

[10] Sim SC, Nordin L, Andersson TM, et al. Association between CYP2C19 polymorphism and depressive symptoms [J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2010,153B(6):1160-1166.

[11] 范超,张燕,何建维,等. 重庆地区冠心病介入治疗患者 CYP2C19 基因多态性分布 [J]. 重庆医学,2016,45(11):1549-1551.

[12] 张海涛,苟文,秦华迪,等. CYP2C19 基因多态性对氯吡格雷抵抗患者预后的影响 [J]. 检验医学与临床,2014,11(13):1761-1763,1766.