

• 临床检验研究论著 •

# 黄石地区 76 例氯吡格雷治疗患者 CYP2C19 不同代谢表型的分布

朱中梁<sup>1,2</sup>, 李从荣<sup>2△</sup>, 汪宏良<sup>1</sup>, 李振龙<sup>3</sup>

(1. 湖北省黄石市中心医院检验科, 湖北黄石 435000; 2. 武汉大学人民医院检验科, 湖北武汉 430060;  
3. 湖北省黄石市中心医院心血管内科, 湖北黄石 435000)

**摘要:**目的 探讨湖北黄石地区氯吡格雷治疗患者 CYP2C19 不同代谢表型的分布。方法 取 76 例心内科住院氯吡格雷治疗患者的外周血, 采用基因芯片方法对 CYP2C19 基因进行分型, 了解其代谢表型的分布, 并与文献报道的中国正常汉族人群进行比较。结果 在 76 例检测标本中检测出 CYP2C19 的 3 种代谢表型, 快代谢型、中间代谢型以及慢代谢型, 所占比例分别为 39.47%、44.74% 和 15.79%。与中国健康汉族人总体比例基本一致。结论 湖北黄石地区氯吡格雷治疗患者的临床个体化用药方案可以中国汉族健康人群的个体化用药方案为参考依据。

**关键词:**氯吡格雷; CYP2C19; 代谢表型; 基因芯片

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)11-1410-03

## Analysis of CYP2C19 metabolism phenotypes distribution of 76 patients with clopidogrel treatment in Huangshi

Zhu Zhongliang<sup>1,2</sup>, Li Congrong<sup>2△</sup>, Wang Hongliang<sup>1</sup>, Li Zhenlong<sup>3</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Huangshi Central Hospital, Huangshi, Hubei 435000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China;

3. Department of Cardiovascular, Huangshi Central Hospital, Huangshi, Hubei 435000, China)

**Abstract:** Objective To investigate the distribution of CYP2C19 metabolism phenotype in patients with clopidogrel treatment in Huangshi. **Methods** The peripheral blood samples were obtained from 76 patients with clopidogrel treatment in Cardiovascular Department. CYP2C19 genotypes were determined by the gene chip, CYP2C19 metabolism phenotype were investigated and compared with the data of healthy Han Chinese from the published papers. **Results** There were three kinds of metabolizers about the metabolism phenotypes of CYP2C19, which were extensive metabolizers, intermediate metabolizers and poor metabolizers. In the 76 patients, the ratios of these metabolism phenotypes were 39.47%, 44.74% and 15.79%, respectively. The result coincided with the healthy Han Chinese. **Conclusion** The clinical individualized medication of healthy Han Chinese could be referred to the clinical individualized medication of patients with clopidogrel treatment in Huangshi.

**Key words:** clopidogrel; CYP2C19; metabolism phenotype; gene chip

细胞色素 P450 酶(CYP450)是人体内主要的药物代谢酶系, 主要存在于肝脏微粒体中, 临床上许多常用的药物都需要通过其代谢。CYP2C19 酶是 CYP450 酶系中的一种同工酶, 在药物代谢过程中起重要作用<sup>[1]</sup>。通过其代谢的药物主要有: 质子泵抑制剂、氯吡格雷、伏立康唑、抗抑郁药及抗癫痫药等<sup>[2-8]</sup>。

CYP2C19 基因存在多态性, 在中国汉族人群中, 主要的突变等位基因多态性位点为 CYP2C19 \* 2(681G-A)和 CYP2C19 \* 3(636G-A)<sup>[2]</sup>。其主要基因型为 6 种, 分别为 CYP2C19 \* 1/\* 1、\* 1/\* 2、\* 1/\* 3、\* 2/\* 2、\* 2/\* 3、\* 3/\* 3。根据对药物代谢速率的不同, 可将个体分为快代谢(EM)型、中间代谢(IM)型及慢代谢(PM)型。因为不同代谢表型的个体间存在代谢速度上的差异, 从而导致了血药浓度的个体差异。明确个体 CYP2C19 代谢表型对于合理选择用药方案, 提高药物疗效, 避免不良心血管事件的发生具有重要的临床指导意义。本研究采用基因芯片方法对湖北黄石地区 76 例氯吡格雷治疗患者进行 CYP2C19 基因位点分型, 旨在了解黄石地区氯吡格雷治疗患者的 CYP2C19 代谢表型的分布情况, 并以中国汉族健康人群的 3 种代谢表型发生率作为对照, 为湖北黄石地区氯吡格雷治疗患者的临床个体化用药方案提供资料。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 受试者共 76 例, 为黄石市中心医院心内科氯吡格雷治疗患者, 男 45 例, 女 31 例, 年龄(55±9)岁, 患者均为汉族人, 患者之间无血缘关系。

**1.2 仪器与试剂** 全血基因组 DNA 提取试剂盒(上海百傲科技有限公司, 批号: 20120208), 含蛋白酶 K, 缓冲液 BL、BW1、BW2、BW1、BW2、BH1、BH2、BE。CYP2C19 基因检测试剂盒(上海百傲科技有限公司, 批号为 20120306), 含 CYP2C19 扩增液 1、2, 反应液 A、B, 基因芯片、阳性对照、阴性对照及杂交显色试剂盒, 显色试剂盒含预杂交液, 杂交缓冲液, 洗液 1、2、3, 抗体及抗体稀释液, 显色液。e-Hyb 全自动杂交仪(上海百傲科技有限公司), BE-2.0 生物芯片识读仪(上海百傲科技有限公司), PCR 仪(应用生物系统公司 ABI7300), 干式恒温器(杭州蓝焰科技), 离心机(珠海黑马医学仪器有限公司), 涡旋振荡器(江苏海门其林贝尔仪器厂)。

## 1.3 方法

**1.3.1 DNA 提取** 所有患者在首次服用氯吡格雷前静脉采血 2 mL, 采用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取全血基因组 DNA 作为 PCR 扩增反应的模板。DNA 提取步骤: (1) 取 1.5 mL 离心管, 每管中依次加入 20  $\mu$ L 蛋白酶 K 溶液、200  $\mu$ L

血液样品,200  $\mu$ L 缓冲液 BL,振荡 15 s 混匀。(2)低速离心,使管壁血液离心至底部,56  $^{\circ}$ C 放置 10 min。(3)加 200  $\mu$ L 无水乙醇,充分颠倒混匀,低速离心。(4)将上一步所得溶液和絮状沉淀都加入一个已用 BH1 和 BH2 活化的吸附柱中(吸附柱放入收集管中),12 000 r/min 离心 1 min,弃去装废液的收集管,将吸附柱插入新的收集管中。(5)向吸附柱中加入 500  $\mu$ L 缓冲液 BW1,12 000 r/min 离心 1 min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中。(6)向吸附柱中加入 500  $\mu$ L 缓冲液 BW2,12 000 r/min 离心 1 min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中。(7)将吸附柱放回收集管中,12 000 r/min 离心 1 min,彻底去除吸附材料中残余的漂洗液。(8)将吸附柱转入一个干净的离心管中,向吸附膜中间位置悬空滴加 60  $\mu$ L 洗脱缓冲液 BE,室温放置 5 min,12 000 r/min 离心 1 min,将溶液收集到离心管中。

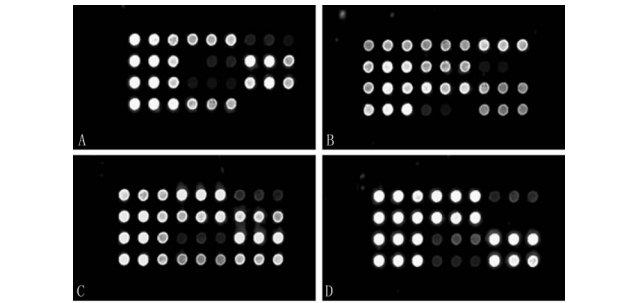
**1.3.2 PCR 扩增** 将 CYP2C19 扩增液 1 和扩增液 2 分装到 0.2 mL PCR 反应管中,扩增反应体系为 25  $\mu$ L,包括: CYP2C19 扩增液 19  $\mu$ L、反应液 A 1  $\mu$ L、DNA 模板 5  $\mu$ L。扩增条件为:50  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 25 s,48  $^{\circ}$ C 40 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 5 min 终止反应。将扩增产物 1 和扩增产物 2 置于 2~8  $^{\circ}$ C 保存。

**1.3.3 杂交显色** 取出杂交显色试剂盒,将反应液 B 低速离心,吸取 10  $\mu$ L 加入杂交缓冲液瓶中混匀。临用前,取出 1 支抗体,低速离心,加入 1 mL 抗体稀释液,振荡混匀,制成抗体使用液。取出基因芯片,做好标记,将 CYP2C19 基因芯片放入杂交仪片架中,旋紧杂交舱盖。将各试剂按要求分装到 2 mL 离心管中,插入试管架中。取 180  $\mu$ L 杂交缓冲液于离心管中,再分别加入 10  $\mu$ L 扩增产物 1 和扩增产物 2,混匀,放入试管架中。将试管架放入杂交仪中,运行杂交程序。取出芯片,放入生物芯片识读仪中,用百微基因芯片图像分析软件进行图像扫描和数据分析,输出检测结果。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

76 例样本均检测到 CYP2C19 的 681 位点 G-A 突变和 636 位点 G-A 突变,共检测出 4 种基因型 3 种表型;CYP2C19  $\ast 1/\ast 1$ 、 $\ast 1/\ast 2$ 、 $\ast 1/\ast 3$ 、 $\ast 2/\ast 2$ 、其中 CYP2C19  $\ast 1/\ast 1$  为 EM,CYP2C19  $\ast 1/\ast 2$ 、 $\ast 1/\ast 3$  为 IM,CYP2C19  $\ast 2/\ast 2$  为 PM。EM 共检测到 30 例,占 39.47%,IM 共检测到 34 例,占 44.74%,PM 只检测到 12 例,所占比例为 15.79%,与中国汉族健康人群中发生比例(14.1%)基本一致,表现型比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。本研究各型别基因芯片检测结果见表 1 和图 1。



A:EM 型(CYP2C19  $\ast 1/\ast 1$ );B:IM 型(CYP2C19  $\ast 1/\ast 2$ );C:IM 型(CYP2C19  $\ast 1/\ast 3$ );D:PM 型(CYP2C19  $\ast 2/\ast 2$ )。

图 1 基因芯片检测 CYP2C19 不同代谢表型结果

表 1 CYP2C19 不同代谢表型统计结果[n(%)]				
组别	n	EM 型	IM 型	PM 型
疾病观察人群	76	30(39.47)	34(44.74)	12(15.79)
中国汉族健康人群 <sup>[1]</sup>	283	120(42.40)	123(43.50)	40(14.10)

3 讨 论

基因多样性决定了其表型的多样性,等位基因突变使相应酶活性降低甚至缺失。由于等位基因不同的组合方式,使个体对药物代谢能力呈现快代谢、中间代谢及慢代谢等不同的速率。中国是一个地域广阔的多民族国家,在遗传背景大致相似的基础上又有各自的特色<sup>[1,10]</sup>。CYP2C19 有多种基因型,最常见的突变类型为 CYP2C19  $\ast 2$ 、 $\ast 3$ ,这 2 种突变几乎涵盖了中国人群中所有的突变类型<sup>[2]</sup>。在本研究中,对 76 例患者进行 CYP2C19 基因型的分析,检测到 CYP2C19  $\ast 2$  突变的发生率是 15.8%,与汉族人群 CYP2C19  $\ast 2$  突变发生率 14.1% 基本相当<sup>[1]</sup>。

由于氯吡格雷作为一种无活性前体药物,在临床治疗中的大量应用,因此 CYP2C19 基因型研究对于氯吡格雷的用药方案具有极其重要的指导意义。对 38 例仓鼠透壁下壁心肌梗模型(TRITON-TIMI 38)实验中使用氯吡格雷治疗急性冠脉综合征的独立样本进行队列研究,结果表明携带 CYP2C19 功能缺失等位基因的仓鼠较无携带者发生心血管性死亡、非致死性心肌梗死或非致死性脑卒中等事件的可能性增加,同时支架内血栓的风险也增加<sup>[11]</sup>。对 233 例非 ST 段抬高急性心肌梗死行 PCI 术的患者进行 CYP2C19 基因研究,发现 CYP2C19  $\ast 2$  携带患者服用氯吡格雷更容易发生高血小板反应性(HPR),且发生周期性心肌梗死(PMI)的风险也增加,是非携带者的 3 倍<sup>[12]</sup>。本研究中,中间代谢与慢代谢者合计占全部测试者的 60.5%,对于这部分患者临床医生应该根据 CYP2C19 代谢表型的结果合理选择用药方案。

随着人类基因组计划的完成,越来越多的专家和学者认识到个体化用药的重要性。个体对药物的反应存在差异,服用相同剂量的药物后一些患者会出现治疗失败,有些患者甚至会因不良反应而死亡。基因导向的个体化用药不仅可以预防不良反应的发生,还可以帮助患者获得最佳的治疗效果,真正体现出“因人而异,量体裁衣”的原则。

参考文献

[1] 付良青,黄丰,吴德政,等.中国汉族人群不同性别细胞色素氧化酶 CYP2C19 基因多态性的比较[J].药学报,2004,39(3):161-163.

[2] 郑露,邵建国.CYP2C19 的基因多态性与临床[J].第二军医大学学报,2008,28(11):1262-1265.

[3] 张莉蓉,张伟,阴振坤,等.河南地区汉族人群药物代谢酶 CYP2C19,NAT2 和 TPMT 基因多态性分析[J].中国新药与临床杂志,2006,25(8):561-566.

[4] Klotz U. Clinical impact of CYP2C19 polymorphism on the action of proton pump inhibitors;a review of a special problem[J]. Intern J Clin Pharmacol Ther,2006,44(7):297-302.

[5] Weiss J, Hoevel MM, Burhenne J, et al. CYP2C19 genotype is a major factor contributing to the highly variable pharmacokinetics of voriconazole[J]. J Clin Pharmacol,2009,49(2):196-204.

[6] Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, et al. Common (下转第 1414 页)

因素的双重影响更加加重了精液质量的下降,从而增加了男性不育的机会。

关于沙眼衣原体对男性不育的影响,研究者用电镜在不育男性精液、睾丸及附睾中均观察到了沙眼衣原体,精子形态异常,包含大量胞浆残余体,顶体与核分离,精子膜破损乃至完全缺失和线粒体破坏。许多区域附睾上皮细胞膜破裂,细胞质成分外溢,管腔中可见到内质网和高尔基体,因此,沙眼衣原体感染后,可以对男性睾丸和附睾产生破坏作用,直接影响精子的发生与成熟。其二,沙眼衣原体可以吸附精子表面,并进入精子内部,在精子内部形成网状体并大量繁殖,造成精子膜和顶体的破坏。其三,沙眼衣原体感染后,容易引起慢性前列腺炎,降低精浆中酸性磷酸酶的活性,导致精子的畸形率明显上升<sup>[8]</sup>。

支原体、AsAb 对精液质量的影响可能是通过下列途径进行的:第一,一方面支原体透过生精小管屏障侵入生精细胞,影响精子的发育与成熟,导致精子数量的下降,同时支原体侵入曲精小管,干扰精子的正常产生,并导致精子畸形,另一方面支原体直接和精子表面的结合点结合,导致精子畸形,同时也使精子的体积增大,故活力降低,畸形率增高<sup>[9]</sup>。第二,支原体感染后精子的生存环境发生了改变,可使精液渗透压增加,精子细胞脱水,造成精子活力下降,甚至死亡。支原体感染还可以引起 T 细胞数目明显增加,巨噬细胞吞噬功能也增强,加强了对精子的吞噬、加工、递呈,诱导产生 AsAb<sup>[10]</sup>。第三,各种因素诱导产生的 AsAb 与精子膜固有成分结合能导致补体的活化,使 C3 裂解加速,进而导致精子结合功能受损,精子功能遭到破坏,活率降低、病死率增高<sup>[3]</sup>。同时 AsAb 可阻止精子穿过宫颈黏液,影响精子活力,封闭顶体膜上抗原位点,抑制精子对透明带的附着和穿透,影响精卵结合<sup>[11]</sup>,从而导致不孕。

受孕是一个复杂的生理过程,受多种因素的影响,排除女方不孕原因外,良好的精液质量是保证受孕的必备条件。受精的完成,除了卵细胞之外,精子的数量、质量、活动度都起着重要的作用,其中精子的质量尤为重要。男方每次排的精液量少于 1.5 mL,精子数少于  $20 \times 10^9$  /L,精子畸形率超过 20%,精子病死率超过 50%,精子活动力低于 60%,精液 0.5 h 内不液化等等,都可引起不孕<sup>[12]</sup>。本研究表明,阳性组中,精子活率都低于 60%,A 级+B 级精子的活力小于 50%,精子的畸形率大于 20%,液化时间大于 30 min,白细胞数每高倍视野下大于 5 个,与阴性组比较,都有显著性差异。这说明支原体、衣原体感染以及 AsAb 的产生,都可以引起精液质量的下降,从而导致男性不育症的发生。

由于环境、心理、社会等多种因素的影响,男性不育症的发生呈上升趋势。环境因素包括农药及杀虫剂的应用,废气的排放,电离辐射。自身原因如:过度吸烟与饮酒,药物、化妆品的乱用,吸毒以及性病的感染都是引起精液质量下降的原因;精神过度紧张,社会压力过大同样也可以引起精液质量的下降。感染因素和免疫因素的影响使男性精子数量和质量的下降日益严重,尤其是支原体、衣原体感染后,以及受感染因素主导引起的 AsAb 的产生,使精液质量下降明显,引起男性不育的机会大大增加。因此对不明原因引起的男性不育者进行支原体、衣原体及 AsAb 的检测是非常必要的,同时也要对患者进行必要的健康教育,加强道德修养,洁身自好,积极治疗。

参考文献

[1] 佟爱华,董梅,孙敏霞,等. 泌尿系感染的病原菌分布及耐药性调查[J]. 武警医学,2012,23(4):321-322.

[2] 黄敏婷,陆春. 解脲脲原体感染对男性精液质量影响的研究进展[J]. 皮肤性病诊疗学杂志,2011,18(1):64-66.

[3] 徐丽,周运恒,李骥,等. 男性不育患者解脲脲原体感染与精子质量和抗精子抗体的关系[J]. 武警医学,2013(8):686-688.

[4] 彭兰,万芳,邹志宝,等. 男性不育症的检测及意义[J]. 检验医学与临床,2012,9(4):453-454.

[5] 仲人前,范列英. 自身抗体基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社. 2006:199-201.

[6] 农建宏,苏国生. 不孕不育患者抗精子抗体检测及临床意义[J]. 右江医学,2008,35(6):674-675.

[7] Soffer Y, Ron-El R, Golan A, et al. Male genital mycoplasmas and Chlamydia trachomatis culture: its relationship with accessory gland function, sperm quality, and autoimmunity[J]. Fertil Steril, 1990,53(2):331-336.

[8] 徐晨. 沙眼衣原体与不育不孕[J]. 男性学杂志,1994,8(3):180-184.

[9] 李向安,肖坤萍,奉小凤,等. 生殖道解脲支原体感染与精液异常关系的研究[J]. 中国计划生育学杂志,2004,12(3):164-166.

[10] 张明,额尔敦,高智文,等. 不育男性抗精子抗体与解脲支原体检测的意义[J]. 放射免疫学杂志,2013,26(3):348-350.

[11] Ness RB, Markovic N, Carlson CL, et al. Do men become infertile after having sexually transmitted urethritis? An epidemiologic examination[J]. Fertil Steril, 1997,68(2):205-213.

[12] 熊立凡,李树仁,丁磊成. 临床检验基础[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社. 2003:255-259.

(收稿日期:2014-01-12)

(上接第 1411 页)

polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel[J]. J Thromb Haemost, 2007,5(12):2429-2436.

[7] Jiang DC, Bai XR, Zhang QX, 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.

[8] 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.

[9] Goldstein JA, Ishizaki T, Chiba K, et al. Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and

American black populations[J]. Pharmacogenetics, 1997,7(1):59-64.

[10] 顾连云,赵萍. CYP2C19 基因多态性在江苏及其周边地区汉族人群的调查研究[J]. 实用临床医药杂志,2011,15(1):125-128.

[11] Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome P-450 polymorphisms and response to clopidogrel[J]. N Engl J Med, 2009,302(1):849-857.

[12] Wu HY, Qian JY, Sun AJ, et al. Association of CYP2C19 genotype with periprocedural Myocardial Infarction after uneventful stent implantation in Chinese patients receiving clopidogrel pretreatment[J]. Circ J, 2012,76(12):2773-2778.

(收稿日期:2014-01-18)