

• 论 著 •

广东东莞地区心血管疾病患者 CYP2C19 基因多态性分析

华仙丽, 梁爱芬, 雷亚利, 潘俊均, 隋洪
(东莞康华医院检验科, 广东 523080)

摘要:目的 研究广东东莞地区心血管病患者 CYP2C19 基因的多态性分布。方法 选取心内科心血管疾病患者 1 662 例, 抽取外周血并提取基因组 DNA, 用 PCR 技术结合基因芯片技术检测患者的 CYP2C19 基因型。对年龄 <45 岁和年龄 ≥45 岁冠心病患者 CYP2C19 等位基因频率和代谢表型频率进行比较。结果 在 1 662 例患者中, CYP2C19 代谢型 713 例 (42.90%), 中间代谢型 740 例 (44.52%), 慢代谢 209 例 (12.58%)。CYP2C19 * 1、CYP2C19 * 2、CYP2C19 * 3 等位基因频率分别为 65.16%、30.08%、4.75%。<45 岁组检出快代谢型 104 例 (40.00%), 中间代谢型 104 例 (45.38%), 慢代谢型 38 例 (14.62%)。≥45 岁冠心病组检出快代谢型 609 例 (43.44%), 中间代谢型 622 例 (44.37%), 慢代谢 171 例 (12.20%)。<45 岁与 ≥45 岁组各基因型的比例比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 通过检测 CYP2C19 基因型确定患者遗传特征, 可以评估其氯吡格雷抵抗风险, 为患者制订个体化的抗血小板治疗方案。

关键词: CYP2C19 基因; 基因芯片; 氯吡格雷; 个体化用药

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.05.012

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)05-0606-03

Analysis on CYP2C19 polymorphism among patients with cardiovascular diseases in Dongguan area

HUA Xianli, LIANG Aifen, LEI Yali, PAN Junjun, SUI Hong

(Department of Clinical Laboratory, Dongguan Kanghua Hospital, Dongguan, Guangdong 523080, China)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution status of cytochrome CYP2C19 polymorphisms among patients with cardiovascular diseases in Dongguan area. **Methods** A total of 1 662 patients with cardiovascular diseases (CVD) in our hospital were selected. The peripheral blood was collected for extracting genomic DNA. The CYP2C19 genotype was detected by the polymerase chain reaction (PCR) combined with gene chip technology. The allele frequency and metabolic phenotype of CYP2C19 were compared between the CVD patients aged lower than 45 years and aged higher than 45 years old. **Results** Among 1 662 cases, 713 cases (42.90%) were CYP2C19 extensive metabolizer, 740 cases (44.52%) were moderate metabolizer and 209 cases (12.58%) were poor metabolizer. The allele frequencies of CYP2C19 * 1, CYP2C19 * 2 and CYP2C19 * 3 were 65.16%, 30.08% and 4.75% respectively. One hundred and four cases (40.00%) of extensive metabolisms were detected in the lower than 45 years old group, 104 cases (45.38%) of moderate metabolisms and 38 cases (14.62%) were detected. In the higher than 45 years old group, 609 cases (43.44%) of extensive metabolisms, 622 cases of moderate metabolisms and 171 cases (12.20%) of poor metabolism were detected. The proportion of various genotypes had no statistical difference between the lower than 45 year old group and higher than 45 year old group ($P > 0.05$). **Conclusion** Detecting CYP2C19 genotype for determining the genetic characteristics can evaluate the clopidogrel resistance risk and formulate the personalized anti-platelet therapeutic scheme.

Key words: CYP2C19 polymorphisms; gene chip technology; clopidogrel; personalize medication

细胞色素 P450 (CYP450) 同工酶也称药酶, 是存在于肝脏中由一系列结构和功能相关的酶组成的超家族, 是药物在体内代谢的主要酶系。CYP2C19 是 CYP450 家族中的重要药物代谢酶, CYP2C19 影响氯吡格雷、奥美拉唑、地西泮、苯妥英钠、普萘洛尔等药物的代谢, 而其基因多态性是引起同一药物对不同个体药效不同的重要原因之一。氯吡格雷是一种前体药物, 氯吡格雷与阿司匹林联合应用的双联抗血小板治疗是当前急性冠状动脉综合征 (ACS) 和冠状动脉介入治疗术 (PCI) 后的标准治疗药物。CYP2C19 酶是氯吡格雷在体内生物代谢的重要酶, 氯吡格雷经 CYP450 酶代谢转化为活性代谢产物, 通过二硫键不可逆连接到血小板表面二磷酸腺苷 (ADP) 受体 P2Y₁₂ 上, 抑制 ADP 受体依赖性的血小板糖蛋白 II b/III a 复合物的形成而抑制血小板的聚集, CYP2C19 酶基因多态性的存在与该酶活性密切相关^[1]。在中国汉族人群中, CYP2C19 基因突变的类型主要是 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3, 突变等位基因的存在可导致酶活性的缺失, 影响氯吡格雷的代谢过程, 从而

增加 PCI 术后患者血栓事件的再发^[2-3]。本研究采用基因芯片检测技术, 检测了 1 662 例心血管疾病患者的 CYP2C19 基因型, 以指导临床更合理地应用氯吡格雷, 降低支架内血栓形成等不良心血管事件风险。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 1 月至 2015 年 12 月东莞康华医院心血管疾病患者 1 662 例, 男 1 157 例、女 505 例。根据患者年龄进行分组: <45 岁组 260 例, 平均年龄 40 岁; ≥45 岁组 1 402 例, 平均年龄 63 岁。采集各研究对象清晨空腹静脉血 2~3 mL, EDTA 抗凝, 2~8 °C 保存, 一周内提取 DNA。

1.2 试剂与仪器 基因组提取试剂盒和 CYP2C19 基因检测试剂盒, 全自动杂交仪和生物芯片阅读仪购自上海百傲科技有限公司。PCR 扩增仪购自杭州博日公司。

1.3 方法

1.3.1 基因芯片法检测 利用 CYP2C19 基因芯片检测系统检测目的基因和位点突变情况, 检测流程包括: 全血 DNA 提

取、目的基因 PCR 扩增、基因芯片杂交显色、基因芯片扫描与数据分析。质量控制:PCR 扩增时设置阳性对照和阴性对照,反应后可将扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测,阴性对照应检测不出 DNA,阳性对照及样本应检测出较明显的 DNA 条带,而且在后面的杂交实验中检测该阳性对照为 CYP2C19 * 1/ * 3 基因型,以上所有步骤严格按照仪器和试剂盒标准操作规程操作。

1.3.2 基因型检测 本实验中检测的基因型有 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)、CYP2C19 * 3/ * 3(636AA, 681GG)。结果判断:CYP2C19 * 1/ * 1 为野生型,CYP2C19 * 1/ * 2、CYP2C19 * 1/ * 3 为突变杂合型,CYP2C19 * 2/ * 2、CYP2C19 * 2/ * 3 和 CYP2C19 * 3/ * 3 为突变纯合型。根据不同基因型编码的酶对氯吡格雷的不同药物代谢动力学特征将野生基因型归为快代谢型,将突变杂合基因型归为中间代谢型,将突变纯合基因型归为慢代谢型。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行。不同年龄间基因型和表型的比例比较用“行×列表”的 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者 CYP2C19 基因型的检测结果 1 662 例患者的等位基因/基因型检测结果见表 1。检出快代谢型占 42.90% (713/1 662),中间代谢型占 44.52% (740/1 662),慢代谢型占 12.58% (209/1 662)。CYP2C19 * 1、CYP2C19 * 2、CYP2C19 * 3 等位基因频率分别为 65.16%、30.08%、4.75%。

表 1 CYP2C19 的基因型/基因频率和代谢表型

基因型或等位基因	代谢表型	频数 (n)	基因型或基因频率 (%)
* 1/ * 1(636GG, 681GG)	快代谢型	713	42.90
* 1/ * 2(636GG, 681GA)	中间代谢型	633	38.09
* 1/ * 3(636GA, 681GG)	中间代谢型	107	6.44
* 2/ * 2(636GG, 681AA)	慢代谢型	160	9.63
* 2/ * 3(636GA, 681GA)	慢代谢型	47	2.83
* 3/ * 3(636AA, 681GG)	慢代谢型	2	0.12
CYP2C19 * 1	—	2 166	65.16
CYP2C19 * 2	—	1 000	30.08
CYP2C19 * 3	—	158	4.75

注:—表示该项无数据。

2.2 不同年龄患者 CYP2C19 基因型与表型 <45 岁组检出快代谢型 104 例(40.00%),中间代谢型 118 例(45.38%),慢代谢型 38 例(14.62%)。≥45 岁组检出快代谢型 609 例(43.44%),中间代谢型 622 例(44.37%),慢代谢型 171 例(12.20%)。两组患者 CYP2C19 的基因型比例比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。<45 岁组的 CYP2C19 * 1、CYP2C19 * 2、CYP2C19 * 3 等位基因频率分别为 62.69%、32.88%、4.42%;≥45 岁组的 CYP2C19 * 1、CYP2C19 * 2、CYP2C19 * 3 等位基因频率分别为 65.62%、29.56%、4.81%。两组患者 CYP2C19 的等位基因频率比较,差异无统计学差异($P > 0.05$)。

表 2 不同年龄患者 CYP2C19 基因的基因型与基因频率结果

CYP2C19 等位基因型	代谢表型	基因型或基因[n(%)]	
		<45 岁	≥45 岁
* 1/ * 1(636GG, 681GG)	快代谢型	104(40.00)	609(43.44)
* 1/ * 2(636GG, 681GA)	中间代谢型	104(40.00)	529(37.73)
* 1/ * 3(636GA, 681GG)	中间代谢型	14(5.38)	93(6.63)
* 2/ * 2(636GG, 681AA)	慢代谢型	29(11.15)	131(9.34)
* 2/ * 3(636GA, 681GA)	慢代谢型	9(3.46)	38(2.71)
* 3/ * 3(636AA, 681GG)	慢代谢型	0(0.00)	2(0.14)
CYP2C19 * 1	—	326(62.69)	1 840(65.62)
CYP2C19 * 2	—	171(32.88)	829(29.56)
CYP2C19 * 3	—	23(4.42)	135(4.81)

注:—表示该项无数据。

3 讨论

随着氯吡格雷临床应用的日益广泛,目前许多研究表明氯吡格雷对血小板聚集的抑制作用有显著的个体差异,使部分冠心病支架术后患者发生不良心血管事件的概率增高。有研究报道氯吡格雷抵抗与多种因素有关,外在因素包括药物间相互作用、氯吡格雷的生物利用度低、氯吡格雷剂量过低、患者依从性差等,内在因素包括基因多态性、ADP 释放增加、血小板激活途径增加等^[4]。其中,CYP2C19 酶基因多态性是引起氯吡格雷抵抗最重要的内在因素。CYP2C19 酶主要存在于肝微粒体中,位于 10 号染色体 10q24 上,由 490 个氨基酸组成,其完整顺序包括 9 个外显子和 5 个内含子,序列已被探明。CYP2C19 除了野生型等位基因 CYP2C19 * 1 外,存在 CYP2C19 * 2 至 CYP2C19 * 28 等多种突变等位基因,CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 等位基因在亚洲人群中最为常见。CYP2C19 * 1/ * 1(野生型)编码的酶具有完全的活性,CYP2C19 * 2 是指该基因第 5 外显子第 681 位碱基发生 G>A 突变,CYP2C19 * 3 是由于外显子 4 第 636 位碱基发生 G>A 突变。有研究证实,CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 突变体其终产物均为无催化活性的酶蛋白,降低了对经其代谢底物药的能力,容易发生严重的用药不良反应,从而影响临床治疗^[5]。Mega 等^[6]发现,在服用氯吡格雷治疗的健康受试者中,携带至少 1 个 CYP2C19 突变基因的患者较正常活性等位基因携带者,血浆氯吡格雷活性代谢产物减少 32.4%,氯吡格雷对血小板的抑制作用减低,有较高的心血管事件风险。在氯吡格雷的实际临床应用中,可以根据患者的基因代谢型调整其剂量,慢代谢型的患者应考虑增加剂量或更换其他抗凝血药物^[7]。

CYP2C19 的基因多态性分布具有明显的种族和地域差异。亚洲人群中 CYP2C19 * 2 变异型等位基因频率约为 30%,显著高于白人(约 13%)和非洲裔美国人(约 18%)^[8]。本次研究的人群主要来自广东地区的汉族人群。共分析了 1 662 例心脑血管疾病患者的 CYP2C19 基因多态性,检测到了 CYP2C19 的 6 个不同基因型,入选患者 CYP2C19 * 1、* 2 及 * 3 等位基因的发生频率分别为 65.16%、30.08% 和 4.75%。CYP2C19 纯合子快代谢型 713 例,占 42.90%;中间代谢型 740 例占 44.52%;慢代谢型 209 例,占 12.58%,与郭涛等^[9]报道的汉族人群 CYP2C19 * 1、* 2、* 3 等位基因的发生频率 64.54%、32.73%、2.73% 基本一致;与徐韞健等^[10]报道中国

华南地区汉族人群快代谢型占 42.3%，中间代谢型占 45.1%，慢代谢型占 12.3% 相符。本研究还对年龄 < 45 岁患者与年龄 ≥ 45 岁患者的 CYP2C19 基因频率进行了统计分析，年龄 < 45 岁组与 ≥ 45 岁组慢代谢型分别为 14.62%、12.20%。与年龄 ≥ 45 岁组相比，年龄 < 45 岁组的心血管疾病患者慢代谢型的发生率稍高，CYP2C19 * 1 等位基因的频率稍低，CYP2C19 * 2 等位基因的发生频率稍高，但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究由于实验范围与条件的限制，选择对象存在选择性偏倚。

综上所述，当 CYP2C19 成为药物的主要代谢酶时，不同基因型个体的药动和药效学参数将受到不同的影响，临床医师应对该药物在患者中的个体化差异足够重视。通过检测 CYP2C19 基因型确定患者遗传特征，可以评估其氯吡格雷抵抗风险，从而为患者制定个体化的抗血小板治疗方案以及预测患者心血管事件发生风险。

参考文献

[1] Fefer P, Matetzky S. The genetic basis of platelet responsiveness to clopidogrel. A critical review of the literature [J]. *Thromb Haemost*, 2011, 106(2): 203-210.
 [2] Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(4): 363-375.
 [3] Frere C, Cuisset T, Morange PE, et al. Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome [J]. *Am J Cardiol*, 2008, 101(8): 1088-1093.
 [4] Bouman HJ, Harmsze AM, Van Werkum JW, et al. Varia-

bility in on-treatment platelet reactivity explained by CYP2C19 * 2 genotype is modest in clopidogrel pretreated patients undergoing coronary stenting [J]. *Heart*, 2011, 97(15): 1239-1244.

[5] Shimatani T, Inoue M, Kuroiwa T, et al. Effect of omeprazole 10 mg on intragastric pH in three different CYP2C19 genotypes, compared with omeprazole 20 mg and lafutidine 20 mg, a new H2-receptor antagonist [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003, 18(11/12): 1149-1157.
 [6] Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(4): 354-362.
 [7] Umemura K, Furuta T, Kondo K. The common gene variants of CYP2C19 affect pharmacokinetics and pharmacodynamics in an active metabolite of clopidogrel in healthy subjects [J]. *J Thromb Haemost*, 2008, 6(8): 1439-1441.
 [8] Desta Z, Zhao X, Shin JG, et al. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2002, 41(12): 913-958.
 [9] 郭涛, 罗建章, 刘雯, 等. 新疆喀什地区汉族与维吾尔族心脑血管疾病患者 CYP2C19 基因多态性分析 [J]. *山东医药*, 2014, 54(23): 20-22.
 [10] 徐韞健, 王慧, 宋金龙, 等. 性别对华南地区汉族人群细胞色素 P450 酶 2C19 基因遗传多态性的影响 [J]. *山东医药*, 2013, 53(12): 63-65.

(收稿日期: 2016-08-20 修回日期: 2016-10-12)

(上接第 605 页)

验用药，应根据药敏试验结果使用。万古霉素、利奈唑胺耐药率为 0.0%，确认为革兰阳性球菌感染时可考虑使用。感染无乳链球菌的患儿均是新生儿，考虑是母婴传播，氨苄西林、青霉素对该菌的耐药率为 0.0%，可作为经验用药^[6]。

据以往文献报道，小儿 BSI 阴性杆菌主要为大肠埃希菌等肠杆菌科细菌^[7]。本次调查发现，本地区小儿 BSI 阴性杆菌主要为铜绿假单胞菌、木糖氧化无色杆菌、人苍白杆菌等非发酵菌，与文献报道不一致，考虑可能与地域不同或病原菌菌群变迁有关。木糖氧化无色杆菌和人苍白杆菌虽为少见条件致病菌，但近年来逐渐有报道指出其引起 BSI^[8-9]，本地患儿检出率高，应引起临床医生关注。革兰阴性杆菌对哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟、美罗培南的耐药率分别为 9.3%、0.0%、9.1%、5.0%，可作经验用药。

本次调查发现患儿多因呼吸道感染入院，与熊燕等^[4]研究一致。呼吸道是小儿 BSI 主要的感染病灶，这可能是由于小儿气道黏膜血管丰富、纤毛运动能力差且免疫系统发育不全，对入侵细菌抵抗清除能力不足。作者将做进一步调查，以探讨小儿 BSI 的感染源，从而有效地进行预防。

参考文献

[1] 马小波, 梁朝霞, 徐庆雷, 等. 血培养污染菌鉴别分析与对策 [J]. *实验与检验医学*, 2015, 33(3): 351-352.
 [2] 蔡芸. 血培养污染及判定 [J]. *医学信息: 下旬刊*, 2009, 1

(10): 221-222.

[3] Stoesser N, Moore CE, Pocock J M, et al. Pediatric bloodstream infections in Cambodia, 2007 to 2011 [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2013, 32(7): 272-276.
 [4] 熊燕, 张虹, 陈炎添, 等. 社区和医院获得性血流感染的病原菌分布及感染途径调查 [J]. *检验医学*, 2014, (10): 1007-1012.
 [5] 肖英俊. 儿科血流感染凝固酶阴性葡萄球菌的研究 [J]. *全科医学临床与教育*, 2016, 14(1): 104-105.
 [6] 杨淋, 赵德军. 某地区 1082 例孕妇生殖道无乳链球菌筛查及耐药性分析 [J]. *中国现代医药杂志*, 2016, 18(2): 90-91.
 [7] 刘建华, 周秀珍, 张智洁, 等. 儿童血流感染病原菌分布及耐药性分析 [J]. *中国小儿急救医学*, 2013, 20(6): 643-645.
 [8] 王伟宝, 王建芳, 谢飞, 等. 新生儿木糖氧化无色杆菌败血症临床特征及耐药性分析 [J]. *临床儿科杂志*, 2015, 33(1): 17-19.
 [9] 吴晓明, 钟华敏, 关小珊, 等. 婴幼儿血培养分离细菌及其耐药性分析 [J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(5): 591-593.

(收稿日期: 2016-08-30 修回日期: 2016-10-22)