

论著·临床研究

YP2C19 基因多态性与中国北方地区人群缺血性脑卒中氯吡格雷抵抗的相关性研究^{*}董海荣¹,徐肖倩²,康德成¹,嘎勒登玛¹

(1. 呼和浩特市第一医院检验科,内蒙古呼和浩特 010030;2. 内蒙古医科大学公共卫生学院,内蒙古呼和浩特 010059)

摘要:目的 调查 CYP2C19 基因多态性与中国北方人群缺血性脑卒中患者氯吡格雷抵抗(CR)的相关性。**方法** 选取 2015 年 9 月至 2016 年 11 月入住呼和浩特市第一医院并留取基因血标本、临床诊断为缺血性脑卒中的患者作为研究对象;用 Taqman 探针法检测 CYP2C19 基因多态性。**结果** 所研究人群的氯比格雷抵抗的比例为 59%,CYP2C19 * 2 突变株与氯比格雷抵抗有强相关性($P=0.006$),而且发现糖尿病、高血压、吸烟饮酒、C 反应蛋白(CRP)及天门冬氨酸氨基转移酶(ALT)增高与氯比格雷抵抗有相关性。**结论** 携带 CYP2C19 * 2 等位基因的患者在抗血栓治疗时发生氯比格雷抵抗的风险更大,有糖尿病、高血压、吸烟饮酒史及 CRP、ALT 增高的危险因素患者,发生 CR 的风险更大。

关键词:氯吡格雷; 单核苷酸多肽性; CYP2C19**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.016**文章编号:**1673-4130(2018)07-0820-04**中图法分类号:**R596.2/R742**文献标识码:**A

The research of clopidogrel resistance of CYP2C19 gene polymorphisms and the crowd of ischemic cerebral apoplexy in northern China^{*}

DONG Hairong¹, XU Xiaoqian², KANG Decheng¹, GALEDENGMA¹

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Hohhot in Inner Mongolia, Hohhot, Inner Mongolia 010030, China; The School of Public Health, Inner Mongolia Medical University, Hohhot, Inner Mongolia 010059, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between CYP2C19 gene polymorphism and clopidogrel resistance(CR) in patients with ischemic stroke in the north of China. **Methods** The patients with ischemic stroke were selected as the research object from the First Hospital of Hohhot during September 2015 to November 2016. The polymorphism of CYP2C19 gene was detected by Taqman probe method. **Results** The clopidogrel resistance ratio of the study population is 59%. There is a strong correlation between the CYP2C19 * 2 mutant strains with clopidogrel resistance($P=0.006$), and we found that the increased glutamic oxaloacetic transaminase was associated with clopidogrel resistance. **Conclusion** Patients with the CYP2C19 * 2 allele were at greater risk of clopidogrel resistance during antithrombotic therapy.

Key words: clopidogrel; SNP; CYP2C19

氯吡格雷(波立维)是目前世界范围内使用最广泛的噻吩吡啶类抗血小板药,广泛用于急性冠脉综合征、缺血性脑血栓、闭塞性脉管炎、动脉粥样硬化及血栓引起的并发症,可以减少心血管疾病患者心脏病发作、脑卒中以及死亡的风险。氯吡格雷是一种前体药物,在体外无活性,口服后必须在体内经肝脏细胞色素 P450 代谢为有效活性产物才能发挥其抗血小板聚集的作用。虽然氯吡格雷在大多数患者中是安全有效的,但是在不同人群中仍有个体差异性^[1]。当前的

研究表明 4%~30% 的患者在氯吡格雷治疗后不能达到抑制血小板^[2-4],这一现象被称为氯吡格雷抵抗(CR)。事实上,几项临床研究揭示:亚洲的一些国家如中国、日本和韩国,CR 的发生率为 20%~65%,远远高于其他国家报道的发生率^[5-6]。CR 的根本机制仍然未知。先前的研究表明遗传因素可能对血小板活性的变异性有较大影响^[6],越来越多的研究证实某些基因多态性可能是造成氯吡格雷用药个体化差异的主要因素^[7]。近年来,在氯吡格雷临床用药的过程

^{*} 基金项目:内蒙古自治区科技计划项目(20130423);内蒙古自治区青年创新人才计划。

作者简介:董海荣,女,副主任检验师,主要从事疾病的遗传学研究。

本文引用格式:董海荣,徐肖倩,康德成,等. YP2C19 基因多态性与中国北方地区人群缺血性脑卒中氯吡格雷抵抗的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(7):820-823.

中, CYP2C19 基因多态性与 CR 及临床终点事件的关系日渐成为研究的热点^[8]。本项研究的目的在于从遗传学角度研究 CYP2C19 基因与中国北方人群缺血性脑卒中患者 CR 的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 9 月至 2016 年 11 月在呼和浩特市第一医院住院的缺血性脑卒中患者 196 例, 年龄 45~70 岁, 平均 58.44 岁, 其中男 130 例 (66.3%), 女 66 例 (33.7%)。诊断按照国际和国内的标准执行, 以出院诊断为准。患者入院时签署了预留基因血标本的知情同意书。

1.2 缺血性脑卒中诊断标准 (1)一侧肢体(伴或不伴面部)无力或麻木; (2)一侧面部麻木或口角歪斜; (3)说话不清楚或理解语言困难; (4)双眼向一侧凝视; (5)一侧或双眼丧失或模糊; (6)眩晕伴呕吐; (7)既往少见的严重头痛、呕吐; (8)意识障碍或抽搐。

1.3 DNA 的提取 采集被检个体 EDTA 抗凝血 2 mL, 使用血液基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。血液基因组 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技有限公司。

1.4 基因型分析 本研究选取 CYP2C19 基因的 5 个单核苷酸多态性(SNP)进行研究。CYP2C19 基因的 5 个 SNP 位点包括 rs12248560、rs4244285、rs4986893、rs28399504、rs41291556。CYP2C19 基因的 SNP 位点基因型检测使用美国 Life Tech 公司 Taqman 探针检测试剂盒进行分型检测, 检测流程参照试剂盒使用说明进行; 在美国 Life Tech 生产的 ABI 9700 PCR 仪上进行 PCR 反应, PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 92 °C 15 s, 60 °C 1 min, 60 个循环,

72 °C 10 min; 反应完成后使用 ABI 公司 7900HT 型荧光定量 PCR 仪进行数据扫描, 检测结果使用 SDS2.3 自动分析软件判读基因型。

1.5 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以率(%)表示, 计量资料经正态性和方差齐性检验后, 选择两独立样本的 t 检验或秩和检验, 计数资料采用 χ^2 检验进行统计分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者临床资料 196 例缺血性脑卒中患者, 根据是否发生 CR 被分为非抵抗(NCR)组和 CR 组。196 例患者中, 发生 CR 的患者占 59%。CR 组和 NCR 组, 在性别、胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、丙氨酸转氨酶(ALT)、谷氨酰转肽酶(GGT), 差异无统计学意义($P > 0.05$), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)增高的患者发生 CR 的可能性更高($P < 0.05$)。另外, 高血压、吸烟、饮酒、C 反应蛋白(CRP)增高均有统计学意义($P < 0.05$), 可能导致 CR 的发生, 见表 1。

2.2 CYP2C19 基因 SNP 位点基因分型及突变位点

CYP2C19 基因型判读: *2, *3, *4, *8 杂合型为中等代谢类型; *2, *3, *4, *8 纯型为慢代谢类型; *2, *3, *4, *8 双杂合型为慢代谢类型; CYP2C19 *1/*17 和 CYP2C19 *17/*17 为超快代谢类型; 以上均不含的是 *1*1, 快代谢类型; 携带 *17 和另外任意一个 *2, *3, *4, *8 均为中等代谢类型。见表 2。

表 1 患者的临床资料

指标	NCR(n=80)	CR(n=116)	t/χ^2	P
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$)	59.910 ± 5.245	58.240 ± 6.477	40 535.000	0.006
性别(男/女, n/n)	57/23	73/43	1.467	0.226
糖尿病[n(%)]	63(79)	57(49)	17.488	0.000
高血压[n(%)]	56(70)	59(51)	7.152	0.007
吸烟[n(%)]	43(54)	45(39)	4.281	0.039
饮酒[n(%)]	55(69)	61(53)	5.121	0.024
TC(mmol/L)	5.047 ± 0.761	5.005 ± 0.781	46 360.000	0.948
TG(mmol/L)	3.593 ± 1.457	3.412 ± 1.222	42 948.000	0.105
LDL-C(mmol/L)	2.921 ± 0.897	3.028 ± 0.970	44 133.000	0.280
HDL-C(mmol/L)	2.249 ± 0.398	2.221 ± 0.361	46 153.000	0.873
ALT(U/L)	26.659 ± 13.579	27.929 ± 14.529	43 968.000	0.248
AST(U/L)	27.406 ± 8.455	30.736 ± 11.277	39 635.500	0.002
GGT(U/L)	35.165 ± 21.505	35.022 ± 23.820	45 151.500	0.539
CRP(mg/L)	3.270 ± 1.030	3.542 ± 1.597	40 802.500	0.009

2.3 缺血性脑卒中患者 CYP2C19 基因型和等位基因分布 CYP2C19 *2 基因 rs4244285 位点突变基因

型(AA+AG)与野生型(GG)相比, 有更高的发生 CR 的可能性($OR=5.027, P=0.006$), 其他 SNP 位点与

CR 发生没有明显相关性。见表 3。

表 2 CYP2C19 基因 SNP 位点基因分型及突变位点

SNP	基因分型	代谢类型	突变碱基	突变氨基酸
rs4244285	AA	CYP2C19 * 2 / * 2	CCG=CCA	P[Pro]=P[Pro]
rs4244285	AG	CYP2C19 * 2 杂合型携带者		
rs4244285	GG	正常类型		
rs4986893	AA	CYP2C19 * 3 / * 3		
rs4986893	AG	CYP2C19 * 3 杂合型携带者	TGG=TGA	W[Trp]=Ter[*][OPA]
rs4986893	GG	正常类型		
rs12248560	CC	正常类型	NA=NA	NA
rs12248560	CT	CYP2C19 * 17 杂合型携带者		
rs12248560	TT	CYP2C19 * 17 / * 17		
rs28399504	AA	正常类型	ATG=GTG	M[Met]=V[Val]
rs28399504	AG	CYP2C19 * 4 杂合型携带者		
rs28399504	GG	CYP2C19 * 4 / * 4		
rs41291556	CC	正常类型	TGG=CGG	W[Trp]=R[Arg]
rs41291556	CT	CYP2C19 * 8 杂合型携带者		
rs41291556	TT	CYP2C19 * 8 / * 8		

表 3 缺血性脑卒中患者 CYP2C19 基因型和等位基因分布

SNP	基因分型	NCR	CR	χ^2	P	OR	95%CI
rs4244285	AA+AG	3	19	7.579	0.006	5.027	(1.435,17.616)
rs4244285	GG	77	97				
rs4986893	AA+AG	1	2	0.000	1.000	1.386	—
rs4986893	GG	79	114				
rs12248560	TT+CT	0	2	0.434	0.514	—	—
rs12248560	CC	80	114				
rs28399504	GG+AG	0	0	—	—	—	—
rs28399504	AA	80	116				
rs41291556	TT+CT	22	37	0.435	0.510	1.235	—
rs41291556	CC	58	79				

注:—表示此处无数据

3 讨 论

CYP2C19 酶广泛分布于肝、肾、脑等组织器官,主要分布于肝脏。其参与多种外源性物质代谢,如:药物、酒精、抗氧化剂、有机溶剂、染料、环境污染物等。从理论上讲,所有的药物代谢酶都具有遗传多态性。等位基因编码的代谢酶具有不同的代谢能力,正常野生型表现为快代谢型;绝大多数突变型等位基因,因碱基的突变、插入或缺失而造成酶代谢能力降低,表现为慢代谢型,这对治疗的个体反应和药物毒性反应都产生重要影响。

有研究认为,CYP2C19 基因多态性是引起氯吡格雷个体化差异的重要原因^[9],并且肝脏中 CYP2C19 基因的变异被认为是造成这种差异的最主要原因^[10],并受到越来越多的关注。CYP2C19 至少存在 14 种突变基因和 18 种等位基因突变。编码正常酶活性的基因是 CYP2C19 * 1,CYP2C19 等位基因

主要是 * 1, * 2, * 3…… * 17。CYP2C19 具有很多 SNP 位点,而 CYP2C19 * 2 和 CYP2C19 * 3 等位基因占东方人弱代谢表型的 99% 以上。* 2, * 3 等位基因编码的酶无活性,CYP2C19 * 2 等位基因变异的外显子 5 第 681 位处的碱基发生变异(G/A)形成了一个异常剪接点,从而在翻译时丢失了 215~227 位氨基酸,因此在 215 位氨基酸下游第 20 个氨基酸处提前产生 1 个终止密码,使蛋白合成过早被终止,结果使这一蛋白质丧失了催化活性。由此导致的慢代谢在中国人中的发生率约为 30%。CYP2C19 * 3 等位基因是在外显子 4 第 636 位发生 G/A 突变,产生了提前的终止密码,蛋白合成终止,使 CYP2C19 酶活性丧失。通过该酶代谢的药物(如质子泵抑制剂、抗惊厥药等)随患者基因型不同,其疗效和不良反应也有明显不同。

在本研究中,CR 的发生率为 59%。TRENK 等^[11]报道等位基因(* 2 和 * 3)功能缺失型 CYP2C19 与低活性代谢水平有关,降低了对血小板的抑制,并且会导致用氯吡格雷治疗时不良心血管事件的发生。沈智杰等^[12]研究初步证实 CYP2C19 基因多态性通过对氯吡格雷代谢产物的影响进而影响血小板聚集率。SIBBING 等^[13]报道 CYP2C19 * 17 可能增强血小板的反应性,增加出血风险。在心血管和脑血管病的患者中,CYP2C19 是 CR 的独立预测因素。在先前的研究中,CYP2C19 * 2 变异体被认为是氯吡格雷抵抗的一个危险因素^[14-15]。WANG 等^[16]研究发现,CYP2C19 * 2 是氯吡格雷活性代谢产物的形成以及抗血小板效应中的决定性因素。本研究也证实了这一结论,CYP2C19 * 2 等位基因与 CR 有相关性($P=0.006$)。因此,CYP2C19 * 2 等位基因降低了

CYP2C19 的活性,减少了活性代谢产物的产量,减弱了氯吡格雷诱导的对血小板的抑制。

在最近的研究报道中,发现在中国人群中 CR 的发生率与高血压相关^[17]。在本研究中也发现 CR 的发生率与高血压相关($P=0.007$)。先前的研究表明糖尿病影响氯吡格雷的抗血小板效应,在本研究中也发现 CR 的发生率与高血压相关($P=0.000$)。在北方地区,吸烟饮酒较为常见,尤其饮酒更多见,这些习惯都可能导致 CR 的发生。另外本研究发现 AST 增高和 CRP 增高是氯吡格雷抗血小板效应的一个非遗传因素。AST 是肝功能异常的灵敏指标,它的增高可能是因为肝脏中 CYP2C19 基因的变异联合导致 CR 的发生。CRP 是一种急性时相反应蛋白,它的检测在临床应用相当广泛,包括疾病的诊断及病程检测等。影响 CR 发生率的非遗传因素的差异,在不同的人群和种族可能会有所不同。而且,非遗传因素的影响可能会和遗传因素共同导致 CR 的发生。

本研究首次在内蒙古呼和浩特地区对缺血性脑卒中患者开展氯吡格雷基因分型与抵抗的研究。本研究发现 CYP2C19 * 2 等位基因和一些非遗传因素是本地区 CR 发生的危险因素。本研究受样本量所限,需要进行进一步的研究证实遗传和非遗传因素与 CR 的相关性。

参考文献

- [1] PERRY C G, SHULDINER A R. Pharmacogenomics of anti-platelet therapy: how much evidence is enough for clinical implementation? [J]. *J Hum Genet*, 2013, 58(6): 339-345.
- [2] NGUYEN T A, DIODATI J G, PHARAND C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(8): 1157-1164.
- [3] SEREBRUCHY V L, STEINHUBL S R, BERGER P B, et al. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(2): 246-251.
- [4] FORD N F. Clopidogrel resistance: pharmacokinetic or pharmacogenetic [J]. *J Clin Pharmacol*, 2009, 49(5): 506-512.
- [5] HASAN M S, BASRI H B, HIN L P, et al. Genetic polymorphisms and drug interactions leading to clopidogrel resistance: why the Asian population requires special attention [J]. *Int J Neurosci*, 2013, 123(3): 143-154.
- [6] JIANG X L, SAMANT S, LESKO L J, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2015, 54(2): 147-166.
- [7] KAZUI M, NISHIYA Y, ISHIZUKA T, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite [J]. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38(1): 92-99.
- [8] BOKERIYA O L, KUDZOEVA Z F, SHVARTS V A, et al. The possibility of selecting optimal antiplatelet therapy in patients with coronary heart disease in terms of CYP2C19 polymorphism [J]. *Ter Arkh*, 2016, 88(5): 47-54.
- [9] SHULDINER A R, O'CONNELL J R, BLIDEN K P, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy [J]. *JAMA*, 2009, 302(8): 849-857.
- [10] HOLMES DR J R, DEHMER G J, KAUL S, et al. ACCF/AHA clopidogrel clinical alert: approaches to the FDA "boxed warning": a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on clinical expert consensus documents and the American Heart Association endorsed by the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions and the Society of Thoracic Surgeons [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56(4): 321-341.
- [11] TRENK D, HOCHHOLZER W, FROMM M F, et al. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51(20): 1925-1934.
- [12] 沈智杰, 陈晓康, 王英杰, 等. 229 例急性冠脉综合征氯吡格雷抵抗患者 CYP2C19 基因多态性与中医证型分布的相关性 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(3): 291-296.
- [13] SIBBING D, KOCH W, MASSBERG S, et al. No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(13): 1605-1613.
- [14] TRESUKOSOL D, SUKTITIPAT B, HUNNANGKUL S, et al. Effects of cytochrome P450 2C19 and paraoxonase 1 polymorphisms on antiplatelet response to clopidogrel therapy in patients with coronary artery disease [J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110188.
- [15] JIA D M, CHEN Z B, ZHANG M J, et al. CYP2C19 polymorphisms and antiplatelet effects of clopidogrel in acute ischemic stroke in China [J]. *Stroke*, 2013, 44(6): 1717-1719.
- [16] WANG X Q, SHEN C L, WANG B N, et al. Genetic polymorphisms of CYP2C19 * 2 and ABCB1 C3435T affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel in 401 patients with acute coronary syndrome [J]. *Gene*, 2015, 558(2): 200-207.
- [17] SU J F, HU X H, LI C Y. Risk factors for clopidogrel resistance in patients with ischemic cerebral infarction and the correlation with gene rs1045642 polymorphism [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(1): 267-271.