

# 武汉地区冠心病患者氯吡格雷 药物代谢相关基因 CYP2C19 的多态性分布分析\*

韩瑞玲, 李 艳, 吴 薇 (武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060)

**摘要:**目的 探讨武汉地区冠心病介入患者氯吡格雷代谢相关基因 CYP2C19 多态性的分布。方法 选取 2014 年 1 月~12 月武汉大学人民医院心内科进行介入治疗(PCI)的 316 例冠心病患者作为研究对象。通过基因芯片法检测氯吡格雷代谢相关的 CYP2C19 \*1, \*2, \*3 基因, 并将患者按 CYP2C19 基因型别分为不同代谢类型: 强代谢型(\*1/\*1), 中间代谢型(\*1/\*2, \*1/\*3), 弱代谢型(\*2/\*2, \*3/\*3, \*2/\*3)。结果 根据 CYP2C19 基因多态性位点功能代谢分型, 携带 CYP2C19 \*1 的强代谢型(\*1/\*1)占 43.4%, 携带 CYP2C19 \*2 或 \*3 的中间代谢型(\*1/\*2 和 \*1/\*3)及弱代谢型(\*2/\*2, \*2/\*3 和 \*3/\*3)分别占 42.4%, 14.2%。不同性别在 CYP2C19 基因分型上差异无统计学意义。结论 武汉地区冠心病介入患者中分布有较多的 CYP2C19 氯吡格雷代谢功能缺失基因。

**关键词:**冠心病; 氯吡格雷; CYP2C19 基因; 基因多态性

中图分类号: R541.4; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)03-021-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.03.006

## Analysis of the Polymorphism Distribution of Clopidogrel Metabolism Related Gene CYP2C19 in Patients with Coronary Artery Disease in Wuhan

HAN Rui-ling, LI Yan, WU Wei

(Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

**Abstract:** **Objective** To screen for clopidogrel metabolism related gene CYP2C19 in patients with coronary artery disease in Wuhan. **Methods** 316 patients, from Jan to Dec 2014, after cardiology percutaneous coronary interventional therapy (PCI) for the treatment of coronary artery disease were selected as research object. Clopidogrel metabolism related CYP2C19 genotypes (\*1, \*2, \*3) were detected by the gene chip, and for different types of metabolism of patients according to CYP2C19 gene type: strong metabolize type (\*1/\*1), intermediate metabolizer types (\*1/\*2, \*1/\*3), poor metabolizer types (\*2/\*2, \*3/\*3, \*2/\*3). **Results** According to the CYP2C19 gene polymorphism of metabolic function type, strong metabolic type carrying CYP2C19 \*1 (\*1/\*1) accounted was 43.4%, intermediate metabolizers carrying CYP2C19 \*2 or \*3 (\*1/\*2 and \*1/\*3) and poor metabolizers (\*2/\*2, \*2/\*3 and \*3/\*3) accounted was 42.4% and 14.2%, respectively. Different gender had no statistical significance in CYP2C19 genotype differences. **Conclusion** Clopidogrel metabolism functional of CYP2C19 gene in patients with interventional coronary heart disease in Wuhan area had more deletion gene.

**Keywords:** coronary heart disease; clopidogrel; CYP2C19 gene; gene polymorphism

新型抗血小板药物氯吡格雷与阿司匹林联合应用的双联抗血小板治疗已成为当前经皮冠状动脉介入术(percutaneous coronary intervention, PCI)后预防缺血性事件的常规策略<sup>[1]</sup>。氯吡格雷是吩噻并吡啶类前体药物,经肝脏细胞色素 P450 酶代谢为活性产物而发挥其抗血小板聚集的作用。

细胞色素酶 P450 2C19 (cytochrome P450 2C19, CYP2C19)作为最主要的细胞色素 P450 代谢酶之一,与氯吡格雷的代谢密切相关。研究发现 CYP2C19 在人群中存在一定的基因多态性,且该多态性与氯吡格雷的抗血小板作用减弱及 PCI 术后的临床主要不良心血管事件发生率升高具有一定关联,以致 1%~3% 的 PCI 患者术后发生支架

内血栓<sup>[2,3]</sup>。目前研究表明 CYP2C19 主要的突变点为 CYP2C19 \*2 及 \*3,该位点突变者临床使用氯吡格雷效果差,研究表明 \*2 位点突变所导致的缺血缺氧性心血管事件或 1 年内死亡率的风险比高达 2.42<sup>[2]</sup>。所以通过检测患者 CYP2C19 基因型,判断患者代谢速度(快代谢、慢代谢),合理调整用药剂量,是提高氯吡格雷的药物疗效,减少毒副作用的有效途径。本研究旨在揭示氯吡格雷相关基因 CYP2C19 多态性在武汉地区冠心病介入患者中的分布,为进一步研究打下基础。

### 1 材料与方法

1.1 研究对象 2014 年 1 月~12 月在武汉大学人民医院心内科住院,诊断为冠心病、拟进行 PCI

\* 基金项目:国家重大技术专项资助项目(2009ZX10004-207);国家自然科学基金资助项目(81200389)。

作者简介:韩瑞玲(1978—),女,博士后,主管药师,研究方向:临床分子诊断,Tel:027-88041911-81176,E-mail:hanruling@whu.edu.cn。

通讯作者:李 艳(1961—),女,博士,教授,博士生导师,主任技师,研究方向:临床分子诊断,Tel:027-88041911-88245,E-mail:yanlitf1120@163.com。

手术并以氯吡格雷治疗的湖北籍无血缘关系的患者 316 例。所有患者均否认家族遗传病病史,汉族,年龄 41~72 岁,平均年龄  $60.3 \pm 9.64$  岁,男性 179 例,女性 137 例。并发高血压病患者 179 例(56.6%),并发 2 型糖尿病患者 58 例(18.4%),并发脂异常患者 207 例(65.5%),有吸烟史者 147 例(46.5%),合并家族史者 54 例(17.1%),确诊为急性心肌梗死者 11 例(3.5%)。

1.2 试剂和仪器 BR-526-24 全自动杂交仪, BE2.0 生物芯片识读仪(上海百傲科技有限公司), Veriti PCR 仪(美国 ABI 公司),干式恒温器(杭州奥盛公司),高速离心机(美国 Thermo 公司),涡旋振荡器(江苏海门其林贝尔仪器厂)。全血基因组 DNA 提取试剂盒, CYP2C19 基因检测 DNA 微阵列芯片法试剂盒(上海百傲科技有限公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 外周血 DNA 提取:所有患者在首次服用氯吡格雷前静脉采血 1~2 ml(EDTA 管抽取, 4℃ 存放),按照试剂盒使用说明书进行 DNA 提取和纯化。

1.3.2 PCR 扩增条件:采用生物素标记的特异性荧光引物,将不同浓度 CYP2C19 基因特异引物对 1 和引物对 2 进行不对称 PCR 反应,对 DNA 标本扩增,使扩增出的目的片段以单链为主。PCR 扩增总反应体系为 25  $\mu$ l,即取 CYP2C19 扩增液 1 和扩增液 2 各 19  $\mu$ l,分别加入反应液 A 1  $\mu$ l 和 DNA 模板 5  $\mu$ l。扩增条件:50℃ 5 min;预变性 94℃ 5 min;变性 94℃ 25 s, 48℃ 40 s, 72℃ 30 s, 35 个循环;72℃ 延伸 5 min。PCR 产物置于 4℃ 冰箱储存。

1.3.3 杂交显色:杂交显色原理是将扩增产物(带生物素标记)与固定在醛基基片上的特异性 CYP2C19 基因型检测探针(636G, 636A, 681G, 681A)进行杂交反应,然后通过酶促显色反应使特异性杂交信号呈现出颜色。具体操作如下: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 抗体稀释剂,振荡混匀,制成抗体使用液。吸取 180  $\mu$ l 杂交缓冲液,加入 10  $\mu$ l CYP2C19 扩增产物 1 和 10  $\mu$ l CYP2C19 扩增产物 2,混匀,制成杂交反应液,加入试管中,放入试管架 B 位置。准备各管试剂于 2 ml 离心管中,并将准备好的离心管插入试管盒相应位置中,将试管架放入杂交仪中,按照使用说明书运行杂交程序。

1.3.4 基因分型结果分析:启动 BE2.0 生物芯片识读仪扫描芯片,得到不同的探针信号,显示出有差异的基因位点图像,采用上海百傲公司提供的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,输出检测结果。根据百傲公司的分型检测说明书的定义说明, CYP2C19 等位基因的野生纯合子型为 \*1/\*1,单突变型为 \*1/\*2 及 \*1/\*3,纯合子突变型为 \*2/\*2 及 \*3/\*3,双突变杂合子型定义为 \*2/\*3。此外,将 \*1/\*1 定义为强代谢型(正常代谢型), \*1/\*2 和 \*1/\*3 定义为中间代谢型, \*2/\*2, \*2/\*3 和 \*3/\*3 定义为弱代谢型。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。计数资料采用  $\chi^2$  检验进行统计分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。Hardy-Weinberg 平衡定律计算各等位基因频率分布数据的可靠性。

2 结果 各等位基因的频率符合 Hardy-Weinberg 平衡定律( $\chi^2 = 0.124$ ,  $P = 0.877$ ),群体基因遗传平衡,数据来自同一孟德尔群体。CYP2C19 基因型采用生物芯片判读并分类,其性别分布及总体分布情况见表 1 和表 2,可见不同性别患者 CYP2C19 各基因型及总体的分布差异无统计学意义。

表 1 CYP2C19 基因型及其在不同性别中的分布[n(%)]

基因型	男性(n=179)	女性(n=137)	合计(n=316)	$\chi^2$	P
*1/*1	81(45.3)	56(40.9)	137(43.4)	0.44	0.507
*1/*2	63(35.2)	60(43.8)	123(38.9)	2.07	0.150
*1/*3	5(2.8)	6(4.4)	11(3.5)	0.20	0.655
*2/*2	23(12.8)	12(8.8)	35(11.1)	0.94	0.332
*2/*3	7(3.9)	3(2.2)	10(3.2)	0.29	0.590
*3/*3	0(0)	0(0)	0(0)	-	-

表 2 各代谢型基因的频率分布[n(%)]

基因型	男性(n=179)	女性(n=137)	合计(n=316)	$\chi^2$	P
强	81(45.3)	56(40.9)	137(43.4)	0.44	0.507
中间	68(38.0)	66(48.2)	134(42.4)	2.89	0.089
弱	30(16.8)	15(10.9)	45(14.2)	1.70	0.192

3 讨论 氯吡格雷作为一种抗血小板聚集作用的药物,对心血管病的重要辅助治疗作用已得到证实。在中国人中,氯吡格雷相关代谢酶 CYP2C19 等位基因主要是 \*1, \*2 和 \*3 型,其中 \*2 和 \*3 变异也称缺失功能等位基因(loss-of-function alleles, LOF alleles),会导致酶催化活性降低,减弱氯吡格雷代谢,导致抗血小板作用减弱,并可能造成缺血时间增加,影响氯吡格雷的疗效及安全性,此现象亦称为氯吡格雷抵抗。近来研究发现,大约有 25%~50% 患者具有氯吡格雷抵抗,服药后血中活性代谢产物浓度比未变异者低  $1/3^{[4-6]}$ ,并且

此变异在亚洲人群多发。因此,国内外相关指南建议在氯吡格雷低反应的患者中进行 CYP2C19 基因型测定,以指导该药物使用<sup>[7,8]</sup>。

我们的研究结果显示,武汉地区拟行 PCI 的冠心病患者中,CYP2C19 基因的多态性分布与性别差异无统计学显著意义,这与其他地区的报道相似<sup>[9,10]</sup>,表明在与 CYP2C19 基因多态性相关的代谢模式与疗效之间,不必过多地考虑性别因素。此外,我们的研究结果表明具有多态性的中间代谢型和弱代谢型占 56.6%,这比相关文献报道的亚洲人群约 50% 突变率要高<sup>[11,12]</sup>,与另一文献报道的 60.7% 要低<sup>[5]</sup>,但本研究里中间代谢型略低于此报道的 47.59%,弱代谢型略高于此报道的 13.11%。本研究与这些报道的基因多态性分布不同的原因可能与研究对象的选择标准不同、研究对象的遗传背景及研究例数不同等有关。此外,本研究仅在武汉大学人民医院进行分析,存在一定的片面性,需要进行更大样本的抽样调查,才能取得更有价值的资料。对于携带 CYP2C19 \* 2 和(或)CYP2C19 \* 3 的患者,建议增加氯吡格雷的剂量或改服其他抗血小板药物(如倍林达等)。

总之,CYP2C19 基因多态性在武汉地区冠心病人群中分布比较普遍,这对于临床实践具有重要的指导意义。因此,我们建议武汉地区的医务工作者在允许的条件下,对使用氯吡格雷的患者尽可能检测 CYP2C19 基因分型,明确其遗传特征,以调整用药剂量或种类,达到优化个体化用药的目的,降低术后心血管不良事件的发生率,提高患者的生活质量。

#### 参考文献:

- [1] Dobesh PP, Beavers CJ, Herring HR, et al. Key articles and guidelines in the management of acute coronary syndrome and in percutaneous coronary intervention: 2012 update[J]. *Pharmacotherapy*, 2012, 32(12): e348-e386.
- [2] Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, 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.
- [3] Rai M, Seip RL, Gupta A, et al. CYP2C19 genotype-guided antiplatelet therapy in a patient with clopidogrel resistance[J]. *Conn Med*, 2012, 76(5): 267-272.
- [4] Al Shamiri MQ, Abdel Gader AM, Bayoumy NM. Evaluation of resistance to anti-platelet therapy in patients with coronary heart disease in a developing country[J]. *Clin Lab*, 2014, 60(9): 1449-1455.
- [5] Liu T, Yin T, Li Y, et al. CYP2C19 polymorphisms and coronary heart disease risk factors synergistically impact clopidogrel response variety after percutaneous coronary intervention[J]. *Coron Artery Dis*, 2014, 25(5): 412-420.
- [6] Park KJ, Chung HS, Kim SR, et al. Clinical, pharmacokinetic, and pharmacogenetic determinants of clopidogrel resistance in Korean patients with acute coronary syndrome[J]. *Korean J Lab Med*, 2011, 31(2): 91-94.
- [7] Wright RS, Anderson JL, Adams CD, et al. 2011 ACCF/AHA focused update of the guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 57(19): e215-e367.
- [8] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 非 ST 段抬高急性冠状动脉综合征诊断和治疗指南[J]. *中华心血管病杂志*, 2012, 40(5): 353-367.  
Cardiology branch of Chinese Medical Association, Editorial Committee of Chinese Journal of cardiovascular disease. Guidelines for diagnosis and treatment of non-ST segment elevation acute coronary artery syndrome[J]. *Chin J Cardiol*, 2012, 40(5): 353-367.
- [9] 吴干斌, 周建华, 刘科兰. 河南汉族冠心病患者 CYP2C19 基因多态性分布[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2014, 49(4): 568-571.  
Wu GB, Zhou JH, Liu KL. Distribution of CYP2C19 genetic polymorphism in patients of Han nationality with coronary artery disease from Henan Province[J]. *Journal of Zhengzhou University (Medical Science)*, 2014, 49(4): 568-571.
- [10] 热依汗·依明, 帕丽达·阿布来提, 古丽扎尔·买买提明. 维吾尔族、汉族冠心病人群 CYP2C19 基因多态性分析[J]. *心血管康复医学杂志*, 2014, 23(2): 127-130.  
Reyihan YM, Palida ABLT, Gulizhaer MT. Genetic polymorphism analysis of CYP2C19 in Uighur and Han nationality patients with coronary heart disease[J]. *Chin J Cardiovasc Rehabil Med*, 2014, 23(2): 127-130.
- [11] Sorich MJ, Rowland A, McKinnon RA, et al. CYP2C19 genotype has a greater effect on adverse cardiovascular outcomes following percutaneous coronary intervention and in Asian populations treated with clopidogrel: a meta-analysis[J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2014, 7(6): 895-902.
- [12] Jeong YH, Tantry US, Kim IS, et al. Effect of CYP2C19 \* 2 and \* 3 loss-of-function alleles on platelet reactivity and adverse clinical events in East Asian acute myocardial infarction survivors treated with clopidogrel and aspirin[J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2011, 4(6): 585-594.