

DNA 微阵列芯片法与直接测序法 检测 CYP2C19 基因型的比较研究*

吴 薇¹, 王丽岳², 李 艳¹

(1. 武汉大学人民医院检验科, 武汉 430060;

2. 武汉市普仁医院心血管内科, 武汉 430081)

摘要:目的 用 DNA 微阵列芯片法和直接测序法两种方法检测氯吡格雷相关基因 CYP2C19 的突变情况, 并进行比较分析。同时将基因型检测结果与临床资料进行分析, 初步探讨 CYP2C19 基因型检测在氯吡格雷用药治疗中的临床意义。

方法 收集 180 例诊断为急性冠脉综合症并首次接受经皮冠状动脉介入治疗(PCI)的全血标本。其中 90 例患者术后服用氯吡格雷之前, 采用 DNA 微阵列芯片法和 DNA 直接测序法检测 CYP2C19 突变位点, 确定其基因型。另外 90 例对照组患者使用氯吡格雷药物但不检测 CYP2C19 基因型。分析两组患者随访过程中发生冠脉血栓事件的差异。**结果** ①两种检测方法准确度比较: 在试验组 90 例患者中, DNA 微阵列芯片法和 DNA 测序法均检出 4 种基因型组合: *1/*1(636GG, 681GG), *1/*2(636GG, 681GA), *2/*2(636GG, 681AA) 和 *1/*3(636GA, 681GG), 分布频率分别为 44 例(48.9%), 36 例(40%), 5 例(5.6%) 和 5 例(5.6%), 而 *3/*3(636AA, 681GG) 和 *2/*3(636GA, 681GA) 未检测到。两种方法的准确度完全一致。②将检测结果与临床资料进行相关性分析: 经 CYP2C19 基因型指导氯吡格雷用药的患者发生支架冠脉血栓事件的比例(0%) 明显低于对照组(3.33%, $P < 0.05$)。**结论** ①DNA 微阵列芯片法灵敏度和准确度与 DNA 直接测序法(金标准方法)检测相符率为 100%。②DNA 微阵列芯片法是一种快速、准确发现 CYP2C19 突变位点, 鉴别 CYP2C19 基因型的检测方法。③检测结果与临床相关性分析结果显示基因型指导氯吡格雷用药有助于患者用药剂量的调整, 或选用其它抗凝血药物, 从而可降低冠脉血栓事件的发生率。

关键词: 氯吡格雷; CYP2C19; DNA 微阵列芯片法

中图分类号: Q503 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)02-008-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.02.003

Comparison Analysis of CYP2C19 Polymorphisms Detection by DNA Microarray and DNA Microarray

WU Wei¹, WANG Li-yue², LI Yan¹ (1. Department of

Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China;

2. Department of Cardiovascular Medicine, Puren Hospital of Wuhan, Wuhan 430081, China)

Abstract: Objective To compare and analyze the clinical application value of detection of Cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) polymorphisms for clopidogrel application by DNA sequencing and DNA microarray. **Methods** 90 blood samples were randomly collected from patients, who were diagnosed as acute coronary syndrome and treated with percutaneous coronary intervention (PCI) for the first time. The genotyping of CYP2C19 *2 and CYP2C19 *3 alleles were performed in 90 samples through DNA sequencing and DNA microarray before using clopidogrel. The control group contains 90 patients with non-genotype guided clopidogrel usage. The clinical significance of detection of these polymorphisms was evaluated by comparing the proportion of patients, who suffered with the stent thrombosis between control and genotype-guided groups using Chi square test. **Results** Both DNA sequencing and DNA microarray results showed that 4 kinds of gene type were detected: *1/*1(636GG, 681GG), *1/*2(636GG, 681GA), *2/*2(636GG, 681AA) and *1/*3(636GA, 681GG), respectively. The distribution of them were 48.9%, 40%, 5.6% and 5.6% respectively. However, *3/*3(636AA, 681GG) and *2/*3(636GA, 681GA) were not found. Besides, in the studied group, the rate of stent thrombosis (0.0%) was significantly lower than that in the control group (3.3%). **Conclusion** ①As to the sensibility and accuracy of CYP2C19 polymorphism detection, DNA sequencing coincides with DNA microarray. ②The detection of CYP2C19 polymorphism by DNA microarray was validated to be rapid and reliable. ③The genotyping of CYP2C19 with this method can effectively guide clo-

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81200389), 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20120141120077), 教育部中央高校基本科研业务专项基金(121069), 湖北省自然科学基金资助项目(2010CDB8701)的资助。

作者简介: 吴 薇(1980—), 女, 博士, 副主任技师, 主要研究方向: 从事分子诊断与个体化医疗的研究, Tel: 13659845142, E-mail: wuwe_i_vivi2005@126.com。

通讯作者: 李 艳, 女, 博士, 主任技师, Tel: 13886079252, E-mail: yanlitf@yahoo.com.cn。

pidogrel application, and thus reduce the occurrence of stent thrombosis.

Keywords: clopidogrel; CYP2C19; DNA microarray

支架内血栓发生率约为3%,虽然发生率低,但其导致的死亡率可高达20%~45%^[1]。术后服用氯吡格雷可预防动脉粥样硬化血栓形成,而CYP2C19基因突变导致的氯吡格雷抵抗是导致支架内血栓的重要原因之一^[2]。CYP2C19基因变异导致的酶活性多态性主要表现为强代谢型(正常野生型)和弱代谢型,且存在显著个体间差异^[3,4]。在中国人群中最常见的CYP2C19酶代谢缺陷等位基因型主要为CYP2C19 * 2及CYP2C19 * 3^[5]。由于CYP2C19基因多态性与氯吡格雷治疗后心血管不良事件的发生密切相关,因此,通过患者CYP2C19基因分型检测来判定患者药物的代谢能力,实现临床个体化用药显得尤为重要。本试验室早期根据CYP2C19基因多态性位点设计特异性引物,通过PCR及DNA测序法来鉴定CYP2C19 * 2和CYP2C19 * 3,并证明了该方法的有效性和可靠性^[6]。然而该技术工作流程较繁琐且耗时长(一般需3~4天),不能及时将检测结果反馈临床。基因芯片法是最早通过国家食品药品监督管理局批准的可在临床上用于检测患者基因组DNA中CYP2C19基因型的检测方法(一般需8h)。本研究同时利用DNA测序法和基因芯片法检测患者CYP2C19基因型,结果显示这两种方法的检测结果完全一致,且基因芯片技术更加简便快捷,具有良好的临床应用价值。通过比较,我们发现CYP2C19基因型指导氯吡格雷临床用药有助于调整患者氯吡格雷用药剂量,或选用其它抗凝血药物,从而可有效降低心血管事件的发生。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2014年1月~2015年1月武汉大学人民医院心内科诊断为急性冠脉综合征并首次接受经皮冠状动脉介入治疗术(PCI)的180例患者作为研究对象,平均分为试验组和对照组各90例。所有患者采取标准的双联抗血小板治疗(氯吡格雷和拜阿司匹林)、强化他汀调脂治疗及其他抗心绞痛辅助治疗。试验组患者均经基因芯片法和测序法检测基因型,并根据CYP2C19基因型指导氯吡格雷用药。90例对照组患者在治疗过程中与试验组唯一不同在于不接受氯吡格雷基因型检测,术后仅经验性给予氯吡格雷75 mg服用一年。180例研究对象均排除以下人群:消化道溃疡等出血高危人群,PCI术中出现夹层等严重并发症的患者,对氯吡格雷过敏而不能坚持服药的患者。所有患者在接受PCI术前采肘静脉血2~3 ml加

入到含0.2 ml 2 g/dl EDTA的抗凝管中,4℃保存备用。

1.2 试剂和仪器 伯乐T100型基因扩增仪购自美国Biorad公司,ABI3500测序仪购自美国Applied Biosystem公司,e-Hyb全自动杂交仪和BE-2.0生物芯片识读仪均购自上海百傲科技有限公司。磁珠法外周血基因组DNA提取试剂盒购自上海复星长征医学科学有限公司。DNA胶回收试剂盒(DNA Gel Extraction Kit)购自美国Axygen公司。CYP2C19基因分型检测试剂盒(DNA微阵列芯片法)购自上海百傲科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 外周血基因组DNA提取:参照厂家说明书,采用外周血DNA提取试剂盒提取患者外周血基因组DNA后立即检测或于-20℃保存备用。

1.3.2 测序法 PCR反应条件:用本实验室设计并合成的引物^[6]以及MBI Fermentas 2xPCR mix PCR反应液进行PCR扩增,PCR扩增条件:94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 50 s, 35个循环;最后72℃ 10 min。

1.3.3 DNA测序:PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离,后经DNA胶回收试剂盒回收、纯化后,分别对包含CYP2C19基因多态性位点的DNA片段进行测序并用ABI3500测序仪和Sequencing Analysis 5.2软件分析扩增产物。

1.3.4 基因芯片法检测CYP2C19基因型:参照厂家说明书,采用CYP2C19基因分型检测试剂盒(DNA微阵列芯片法)鉴别CYP2C19基因型。

1.3.5 患者随访:所有患者PCI术后一周左右出院,出院后继续坚持双联抗血小板治疗(氯吡格雷和拜阿司匹林)、强化他汀调脂治疗及其他必要的辅助治疗。每个月门诊或电话随访,若患者有胸痛、胸闷等怀疑心绞痛症状,建议尽快入院检查。

1.4 统计学分析 应用SPSS17.0软件进行统计分析,计量资料组间比较采用 t 检验,以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料组间比较采用配对 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNA测序鉴别CYP2C19基因多态性结果

90例试验组患者CYP2C19基因型经DNA测序法检测分析后,其测序结果如下: * 1 / * 1 (636GG, 681GG), * 1 / * 2 (636GG, 681GA), * 2 / * 2 (636GG, 681AA)和 * 1 / * 3 (636GA, 681GG),分布频率分别为44例(48.9%),36例(40%),5例

(5.6%), 5例(5.6%), 而 *3/*3(636AA, 681GG)和 *2/*3(636GA, 681GA)未检测到。

2.2 基因芯片法鉴别 CYP2C19 基因型 90例试验组患者 CYP2C19 基因型经基因芯片法检测分析后,其结果显示:*1/*1(636GG, 681GG), *1/*2(636GG, 681GA), *2/*2(636GG, 681AA)和 *1/*3(636GA, 681GG)均被检测到,分布频率分别为44例(48.9%), 36例(40%), 5例(5.6%), 5例(5.6%), 而 *3/*3(636AA, 681GG)和 *2/*3(636GA, 681GA)未检测到。基因芯片法检测结果与DNA测序法结果完全一致。

2.3 CYP2C19 基因多态性检测与未检测组心血管事件发生率结果比较 在至少7个月的随访中,试验组患者未发现急性血栓形成相关的事件。对照组在19个月的随访中共出现3例通过冠脉造影确诊为支架内血栓形成的心肌梗死患者。与对照组相比,试验组冠脉血栓事件显著降低(0 vs 3.33%, $P < 0.05$)。试验组与对照组均无严重出血事件发生。

3 讨论 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,用于急性冠脉综合征患者动脉粥样硬化血栓形成、心肌梗死和缺血性卒中等疾病的预防^[7]。氯吡格雷本身并不具备抗血小板活性,必须在肝脏经细胞色素(CYP)P450酶代谢转化为活性代谢产物,而CYP2C19是CYP酶系的主要成分^[8]。在人群中,占据大部分比例的是CYP2C19野生型,即CYP2C19 *1型,该型别患者对氯吡格雷的代谢功能完好,而CYP2C19 *2, CYP2C *3, CYP2C *4, CYP2C *5, CYP2C *6, CYP2C *7和CYP2C *8突变型都是氯吡格雷慢代谢的基因类型,另外一种极其罕见的型别,即CYP2C19 *17型是氯吡格雷强代谢的基因类型^[8,9]。中国汉族人群中,CYP2C19的变异型别又以CYP2C19 *2和CYP2C *3型最为常见,其突变会导致个体对氯吡格雷药物反应的巨大差异。因此在应用氯吡格雷前,检测患者CYP2C19基因的多态性对于其在临床安全有效地应用十分关键。

在以前的研究里我们建立了一个以DNA测序技术为基础的可准确有效鉴别患者CYP2C19基因型的临床检验方法,然而其缺点是耗时费力。通过比较DNA微阵列芯片法和DNA直接测序法检测CYP2C19突变位点以及基因型,我们证实DNA微阵列芯片法是一种快速、准确鉴别CYP2C19基因型的检测方法。通过此方法在临床的应用,医生和患者可以在1天时间内获取患者准确的CYP2C19基因型信息,使得氯吡格雷的用药

安全性和有效性得到保障。另外,由于CYP2C19是多种药物的代谢酶,除了氯吡格雷,还作用于丙戊酸、苯妥英和奥美拉唑等药物^[10~12],因此基因芯片法检测CYP2C19基因型可辅助指导所有这些相关药物的临床应用。

通过分析CYP2C19基因多态性在本试验组患者中的分布情况,我们在湖北地区汉族人群中发现了CYP2C19 *1, CYP2C19 *2和CYP2C19 *3等位基因型。基因芯片检测法采用的商品化试剂盒不能检测CYP2C19 *17基因型,测序法可以检测到相应的位点,然而结果显示本试验组所有患者均未发现CYP2C19 *17型突变。在本试验组中,湖北地区汉族人群CYP2C19基因存在多态性:CYP2C19 *1, CYP2C19 *2和CYP2C19 *3者比例分别为48.9%, 40%和5.6%; CYP2C19 *1/*1, CYP2C19 *1/*2, CYP2C19 *1/*3, CYP2C19 *2/*2, CYP2C19 *3/*3和CYP2C19 *2/*3的比率分别为48.9%, 40%, 5.6%, 5.6%, 0%和0%,分析结果与其他研究小组以及我们以前关于中国汉族人群的统计结果类似^[6,13]。本试验的另一个重要结果即是进一步验证我们以前研究结果^[6]的正确性:检测CYP2C19基因型可实现氯吡格雷的个性化用药,对于降低心血管疾病的病死率具有重要的临床意义。

参考文献:

- [1] Montalescot G, Brieger D, Dalby AJ, et al. Duration of dual antiplatelet therapy after coronary stenting: a review of the evidence[J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 66(7):832-847.
- [2] 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.
- [3] Niu X, Mao L, Huang Y, et al. CYP2C19 polymorphism and clinical outcomes among patients of different races treated with clopidogrel: A systematic review and meta-analysis[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog(Med Sci), 2015, 35(2):147-156.
- [4] 何楠, 周宏灏. CYP2C19遗传多态性的研究进展[J]. 生理科学进展, 2003, 34(2):171-174.
He N, Zhou HH. The progress in CYP2C19 polymorphism research[J]. Progress in Physiological Science, 2003, 34(2):171-174.
- [5] Xiao ZS, Goldstein JA, Xie HG, et al. Differences in the incidence of the CYP2C19 polymorphism affecting the S-mephenytoin phenotype in Chinese Han and Ban populations and identification of a new rare CYP2C19

- mutant allele[J]. J Pharmacol Experi Ther, 1997, 281(1): 604-609.
- [6] 吴 薇, 韩瑞玲, 王丽岳, 等. DNA 测序法检测 CYP2C19 基因多态性指导氯吡格雷用药的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(4): 433-435.
Wu W, Han RL, Wang LY, et al. Clinical value of DNA sequencing for CYP2C19 polymorphisms detection on the application of clopidogrel[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2015, 12(4): 433-435.
- [7] Wang Y, Chen W, Wang Y. Dual antiplatelet therapy with clopidogrel and aspirin for secondary stroke prevention[J]. Curr Cardiol Rep, 2015, 17(10): 1-6.
- [8] Osnabrugge RL, Head SJ, Zijlstra F, et al. A systematic review and critical assessment of 11 discordant meta-analyses on reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes in clopidogrel users[J]. Genet Med, 2015, 17(1): 3-11.
- [9] Bennis Y, Bodeau S, Bouquie R, et al. High metabolic N-oxidation of voriconazole in a patient with refractory aspergillosis and CYP2C19 * 17/* 17 genotype[J]. Br J Clin Pharmacol, 2015, 80(4): 782-784.
- [10] Pestka EL, Hale AM, Johnson BL, et al. Cytochrome P450 testing for better psychiatric care[J]. J Psychosoc Nurs Ment Health Serv, 2007, 45(10): 15-18.
- [11] Bertilsson L. Metabolism of antidepressant and neuroleptic drugs by cytochrome p450s: clinical and interethnic aspects[J]. Clin Pharmacol Ther, 2007, 82(5): 606-609.
- [12] 谭喜云, 张 宇, 王淑云, 等. CYP2C9 与 CYP2C19 基因多态性与癫痫患者丙戊酸血药浓度关系研究[J]. 药学与临床研究, 2011, 19(2): 123-126.
Tan XY, Zhang Y, Wang SY, et al. Association between genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 and serum valproate concentration[J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2011, 19(2): 123-126.
- [13] 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.
Gu LY, Zhao P. A study on the distribution of CYP2C19 genetic polymorphism among han chinese in jiangsu province[J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2011, 15(1): 125-128.

收稿日期: 2015-08-28

修回日期: 2015-09-25

(上接 7 页)

- [7] Agirre X, Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, et al. ASPP1, a common activator of TP53, is inactivated by aberrant methylation of its promoter in acute lymphoblastic leukemia[J]. Oncogene, 2006, 25(13): 1862-1870.
- [8] Wang C, Gao C, Chen Y, et al. Expression pattern of the apoptosis-stimulating protein of p53 family in p53 + human breast cancer cell lines[J]. Cancer Cell Int, 2013, 13(1): 116.
- [9] Zhou Y, Pan Y, Zhang S, et al. Increased phosphorylation of p70 S6 kinase is associated with HPV16 infection in cervical cancer and esophageal cancer[J]. Br J Cancer, 2007, 97(2): 218-222.
- [10] Cao L, Huang Q, He J, et al. Elevated expression of iASPP correlates with poor prognosis and chemoresistance/radioresistance in FIGO Ib1-IIa squamous cell cervical cancer[J]. Cell Tissue Res, 2013, 352(2): 361-369.
- [11] Su M, Gu Y, Su S, et al. Expression of ASPP gene family and its relationship with survival of patients with non-small cell lung cancer[J]. Chin J Oncol, 2014, 36(4): 268-272.
- [12] Chen Y, Yan W, He S, et al. In vitro effect of iASPP on cell growth of oral tongue squamous cell carcinoma[J]. Chin J Cancer Res, 2014, 26(4): 382-390.
- [13] Slee EA, Gillotin S, Bergamaschi D, et al. The N-terminus of a novel isoform of human iASPP is required for its cytoplasmic localization[J]. Oncogene, 2004, 23(56): 9007-9016.
- [14] Fogal V, Kartasheva NN, Trigiante G, et al. ASPP1 and ASPP2 are new transcriptional targets of E2F[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(4): 369-376.
- [15] Hershko T, Chaussepied M, Oren M, et al. Novel link between E2F and p53: proapoptotic cofactors of p53 are transcriptionally upregulated by E2F[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(4): 377-383.
- [16] Lopez CD, Ao Y, Rohde LH, et al. Proapoptotic p53-interacting protein 53BP2 is induced by UV irradiation but suppressed by p53[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(21): 8018-8025.

收稿日期: 2015-06-09

修回日期: 2015-12-08