

华南地区汉族人群心脑血管相关基因多态性分析*

刘美玲¹, 张东梅², 罗 娥³ (1. 广州医学院荔湾医院检验科, 广州 510170; 2. 广州医科大学附属第一医院检验科, 广州 510120; 3. 广东美康光大医药有限公司, 广州 510000)

【摘要】 目的 了解心脑血管相关基因细胞色素 P450 酶(CYP)2C19、CYP2C9、维生素 K 环氧化物还原酶复合体 1(VKORC1)和乙醛脱氢酶 2(ALDH2)基因的单核苷酸多态性频率在华南地区汉族人群分布的情况。**方法** 采用芯片技术对 252 例心脑血管疾病患者的 CYP2C19、ALDH2、CYP2C9 以及 VKORC1 位点基因多态性进行检测,并统计男女间基因型频率的差异。**结果** CYP2C19 的野生型 *1/*1 占 42.5%,突变型 *1/*2 占 36.9%, *1/*3 占 7.9%, *2/*2 占 9.9%, *2/*3 占 1.6%, *3/*3 占 1.2%,在男女人群间各类基因型的发生率差异无统计学意义($P>0.05$);CYP2C9 只检测到 2 种等位基因 CYP2C9 *1/*1 和 CYP2C9 *1/*3,男性基因频率分别为 98.6%和 1.4%,女性基因频率分别为 90.1%和 9.9%,在男女人群间的分布差异有统计学意义($P<0.05$);VKORC1 有 3 种基因型 AA、AG 和 GG,频率分别为 80.6%、18.7%和 0.8%,在男女人群间的分布差异无统计学意义($P>0.05$);ALDH2 有 3 种基因型 GG、GL 和 LL 型,频率分别为 55.2%、37.3%和 7.5%,在男女人群间的分布差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** CYP2C9 的多态性分布与性别有关,CYP2C19、VKORC1 和 ALDH2 的多态性分布与性别无关。

【关键词】 CYP2C19; CYP2C9; VKORC1; ALDH2; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.09.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)09-1169-03

Genetic polymorphism of heart head blood-vessel in Han population of southern China* LIU Mei-ling¹, ZHANG Dong-mei², LUO E³ (1. Department of Clinical Laboratory, Liwan Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510170, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 3. Guangdong Business Everbright Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19(CYP2C19), cytochrome P450 2C9(CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase complex(VKORC1), ALDH2 in population of southern China han population. **Methods** CYP2C19, ALDH2, CYP2C9 and VKORC1 were detected by microarray method from 252 patients with disease of heart head blood-vessel. Frequencies of genotypes were calculated, and those were statistical differences between men and women. **Results** Five genotypes were identified in CYP2C19, which were *1/*1(42.5%), *1/*2(36.9%), *1/*3(7.9%), *2/*2(9.9%), *2/*3(1.6%) and *3/*3(1.2%). Only two genotypes were identified in CYP2C9, which were *1/*1(98.6%), *1/*3(1.4%) in man and *1/*1(90.1%), *1/*3(9.9%) in woman. There were statistical difference in men and women in the incidence of genotypes($P<0.05$). Three genotypes were identified in VKORC1, which were AA(80.6%), AG(18.7%) and GG(0.8%). Three genotypes were identified in ALDH2, which were GG(55.2%), GL(37.3%), LL(7.5%). **Conclusion**

Genetic polymorphism distribution related to gender of CYP2C9, but distribution of CYP2C19, VKORC1 and ALDH2 has nothing to do with gender.

【Key words】 CYP2C19; CYP2C9; VKORC1; ALDH2; genetic polymorphism

心脑血管疾病是我国发病率和病死率最高的疾病。目前我国心脑血管疾病患者已经超过 2.7 亿人,每年死于心脑血管疾病的患者近 300 万人,占我国每年总死亡病因的 51%。通过个人基因检测,实施个体化治疗心脑血管疾病,是 1 种全新的医疗模式。细胞色素 P450 酶(CYP)2C19 是一种十分重要的药物代谢酶,与血小板聚集抑制剂氯吡格雷的代谢密切相关,CYP2C19 基因多态性导致酶活性个体差异,进而引起个体间对氯吡格雷表现出不同代谢能力。CYP2C9 和维生素 K 环氧化物还原酶复合体 1(VKORC1)的基因多态性与华法令的

使用剂量密切相关。华法令是一种香豆素类口服抗凝血药,是治疗血栓栓塞性疾病的一线药物,在临床使用过程中,临床疗效和不良反应个体差异很大。乙醛脱氢酶 2(ALDH2)是硝酸甘油形成有效代谢物一氧化氮的关键,通过对 ALDH2 基因的检测,可为硝酸甘油的用药提供有效的参考依据。本文采用基因芯片检测技术对华南地区心脑血管疾病患者同时进行 CYP2C19、ALDH2、CYP2C9 和 VKORC1 常见基因位点多态性分析,为心脑血管疾病个体化用药剂量提供参考,现将结果报道如下。

* 基金项目:广东省重点专科项目(2012)。

作者简介:刘美玲,女,主管技师,本科,主要从事临床检验技术研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取广州医学院荔湾医院和广州医科大学附属第一医院住院和门诊心脑血管疾病患者 252 例,其中男 141 例,女 111 例,年龄 17~91 岁。所有入选检测者籍贯均为华南地区的汉族人,均无血缘关系和异族通婚史。

1.2 仪器与试剂 CYP2C19 基因多态性检测试剂盒、CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性检测试剂盒、ALDH2 基因检测试剂盒、血液基因组 DNA 提取试剂盒、R-526-24 全自动杂交仪、BE-2.0 生物芯片识读仪均购自上海百傲科技股份有限公司;ABI 7900 PCR 仪购自美国 life 公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 采集临床患者 2 mL EDTA-K₂ 抗凝静脉血,使用血液基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,按试剂盒说明书方法进行操作。基因组 DNA -20 ℃ 保存。

1.3.2 PCR 反应体系和条件 CYP2C19 反应体系为:基因组 DNA 5 μL,CYP2C19 扩增液(1 或 2)19 μL,反应液 A 1 μL,总体积 25 μL;CYP2C19 扩增液中含生物素残基标记的引物对。扩增条件为:50 ℃ 5 min,94 ℃ 5 min;94 ℃ 25 s,48 ℃ 40 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 5 min。CYP2C9 和 VKORC1 每

个样品均有 3 个扩增体系,每个反应体系总体积 25 μL,含扩增液 22 μL,模板 DNA 2 μL,反应液 A 1 μL。扩增条件:50 ℃ 5 min,94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 5 min。ALDH2 的反应体系为:基因组 DNA 2 μL,ALDH2 扩增液 22 μL,反应液 A 1 μL,总体积 25 μL;扩增条件为:50 ℃ 5 min,94 ℃ 5 min;94 ℃ 25 s,60 ℃ 25 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 5 min。所有项目均设置阳性对照和阴性对照,与标本一起扩增。

1.3.3 芯片杂交、扫描判断基因型 依据试剂盒说明书方法进行 PCR 产物的基因芯片杂交,杂交反应均在全自动杂交仪上完成,杂交结束后采用生物芯片识读仪进行扫描识读,根据软件判断其基因型。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理,人群间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CYP2C19 基因多态性分布结果 野生型 *1/*1 最多见占 42.5%,突变型以 *1/*2 为主占 36.9%,*1/*3 占 7.9%,*2/*2 占 9.9%,*2/*3 占 1.6%,*3/*3 占 1.2%。各基因型在男女人群间的分布差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 CYP2C19 基因多态性分布结果[n(%)]

组别	<i>n</i>	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
男	141	58(41.1)	52(36.9)	10(7.1)	18(12.8)	2(1.4)	1(0.7)
女	111	49(44.1)	41(36.9)	10(9.0)	7(6.3)	2(1.8)	2(1.8)
合计	252	107(42.5)	93(36.9)	20(7.9)	25(9.9)	4(1.6)	3(1.2)

2.2 CYP2C9 基因多态性分布结果 CYP2C9 以野生型 *1*1 最为多见,其次为 *1/*3,其他突变型 *1/*2、*2/*3、*3/*3 和 *2/*2 未见。*1/*1 基因频率为 94.8%,*1/*3 为 5.2%,在男女人群间的分布差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 CYP2C9 基因多态性分布情况

组别	<i>n</i>	*1/*1[n(%)]	*1/*3[n(%)]	<i>P</i>
男	141	139(98.6)	2(1.4)	0.002 5
女	111	100(90.1)	11(9.9)	—
合计	252	239(94.8)	13(5.2)	—

注:—表示无数据。

2.3 VKORC1 基因多态性分布结果 VKORC1 以突变型(即 AA)最为多见,其次为 AG,女性中可见 GG,AA、AG、GG 基因频率分别为 80.6%、18.7%、0.8%,在男女人群间的分布差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 VKORC1 基因多态性分布情况

组别	<i>n</i>	AA[n(%)]	AG[n(%)]	GG[n(%)]	<i>P</i>
男	141	118(83.7)	23(16.3)	0(0.0)	0.077
女	111	85(76.6)	24(21.6)	2(1.8)	—
合计	252	203(80.6)	47(18.7)	2(0.8)	—

注:—表示无数据。

2.4 ALDH2 基因多态性分布结果 野生型纯合子(GG)占 55.2%,突变型纯合子(LL)占 7.5%,突变型杂合子(GL)占

37.3%。在男女人群间,ALDH2 各基因型的分布差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 4 ALDH2 基因多态性分布结果[n(%)]

组别	<i>n</i>	GG	GL	LL
男	141	77(54.6)	54(38.3)	10(7.1)
女	111	62(55.9)	40(36.0)	9(8.1)
合计	252	139(55.2)	94(37.3)	19(7.5)

3 讨 论

早在 20 世纪 50 年代,有学者就提出了关于药物代谢的遗传多态性与药效的关系,主要的药物代谢酶有 CYP、N-乙酰转移酶、醇脱氢酶、酯酶等,在这些代谢酶中 CYP 起重要作用,不仅代谢降解 40%~50% 的药物,而且显示了基因多态性。CYP2C19 遗传多态性使不同个体间酶活性存在显著不同,由于突变产生了终止密码使蛋白合成终止,进而使 CYP2C19 酶活性丧失。氯吡格雷是吩噻嗪并吡啶类前体药物,经由 CYP2C19 代谢,其代谢产物能抑制血小板聚集,慢代谢型则会引起经皮冠状动脉介入治疗患者术后发生支架内血栓^[1],因此国内外相关指南建议患者在使用氯吡格雷之前检测 CYP2C19 的基因型^[2]。本研究中,华南地区汉族人群快代谢型占 42.5%,中间代谢型占 44.8%,慢代谢型占 12.7%,与文献报道相符^[3]。本研究还对不同性别人群的频发率进行统计分析,发现在男性和女性中各类基因型的发生率差异无统计学意义($P>0.05$)。

CYP2C9 是人体肝细胞中 CYP 酶系的重要成员之一,能代谢大量重要的临床药物。CYP2C9 基因具有遗传多态性,存在多种等位基因突变体,CYP2C9 的多态性造成了个体对华法令敏感性的差异,影响华法令的使用剂量^[4]。本研究结果显示,本地区人群 CYP2C9 以野生型 *1/*1 最为多见,其次为 *1/*3,其他突变型 *1/*2、*2/*3、*3/*3 和 *2/*2 均未见,与湖北地区报道一致^[5]。CYP2C9 *2 等位基因在中国的汉族群体及日本、韩国人群中极为罕见,但在中国新疆部分少数民族人群中却能达到 2.77%^[6]。本研究 CYP2C9 在男女人群间的分布差异有统计学意义,但也有与性别差异无统计学意义的报道^[7]。因此,对于 CYP2C9 的代谢底物如华法令,其药物代谢能力存在显著的人群和地域差异。

VKORC1 基因突变也与华法令耐药及药效学差异相关,华法令通过抑制 VKORC1 的活性,阻碍维生素 K 由环氧化物转化成氢醌,从而阻断凝血因子的活化,达到抗凝的目的。该基因突变会导致华法令结合力降低,抗凝作用减弱。本研究中 VKORC1 以突变型即 AA 最为多见,其次为 AG,女性中可见 GG。但在高加索人和非洲裔美国人中 VKORC1 基因以 GG、AG 型占大多数^[8],提示在不同种族间 VKORC1 基因多态性分布存在人种差异。华南地区心脑血管疾病患者中主要以 CYP2C9 *1/*1 合并 VKORC1 AA 型为主,此型患者华法令用量处于中等水平,建议 3~4 mg 的初始剂量。检测 VKORC1 和 CYP2C9 基因多态性可以作为临床长期口服华法令的心脑血管疾病患者药物使用剂量的依据,其他如 CYP4F2、GGCX、EPHX1 以及 ApoE 基因,性别、年龄、体质量、同服药物等因素也可能对华法令使用剂量产生影响^[9]。临床药师应综合考虑患者各方面相关因素预测华法令的日用量,与美国食品药品监督管理局推荐剂量相比,更合理、安全使用华法令。

ALDH2 不仅是乙醇代谢过程中的关键酶,也是硝酸甘油代谢中的关键酶,对硝酸甘油转化产生一氧化氮起了关键作用。ALDH2 基因 Glu504Lys 多态性,可编码具有 ALDH 活力的酶(GG 型)、酶活性下降的酶(GL 型)和酶活性基本丧失的异常纯合子型(LL 型)。研究显示^[10],携带有 ALDH2 GL 和 LL 基因型人群患冠心病的风险是 GG 基因型的 2.09 倍。本研究中,华南地区心脑血管疾病患者中 GG、GL、LL 的分布频率为 55.2%、37.3%、7.5%,GL、LL 基因在欧美人群中检出率极低,但在中国人群中高达 30%^[11]。硝酸甘油作为心绞痛治疗药物,使用无效常常会产生严重后果。因此,在心脑血管疾病

患者中检测 ALDH2 基因多态性具有积极的现实意义。

参考文献

- [1] Rai M, Seip RL, Gupta A, et al. CYP2C19 genotype-guided antiplatelet therapy in a patient with clopidogrel resistance [J]. Connecticut Medicine, 2012, 76 (5): 267-272.
- [2] 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.
- [3] 韩瑞玲,李艳,吴薇.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[J].现代检验医学杂志,2015,30(3):21-23.
- [4] 娄莹,刘红,韩璐璐,等. CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性对肺栓塞患者华法令初始抗凝疗效的影响[J].中国临床药理学杂志,2012,28(4):256-259.
- [5] 黄爱霞,乔斌.湖北地区房颤患者 VKORC1、CYP2C 基因多态性及其对华法令用量的影响[J].微循环学杂志,2014,24(4):44-48.
- [6] 张艳,赵军,凯塞尔·吾甫尔,等.新疆维吾尔族和哈萨克族健康人群 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性研究[J].中国药师,2013,16(12):1759-1763.
- [7] 陈晖,马蕾. CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性与华法令个体化用药的临床研究[J].中国实用医药,2015,10(12):3-5.
- [8] Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, et al. Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups [J]. Blood, 2010, 115 (18):3827-3834.
- [9] Finkelman BS, Gage BF, Johnson JA, et al. Genetic warfarin dosing: tables versus algorithms [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2011, 57(5):612-618.
- [10] 张冬青,王海滨,刘森,等. CYP2C19、ALDH2 和 MTHFR 基因多态性与冠心病的相关性研究[J].标记免疫分析与临床,2015,22(3):207-210.
- [11] 杨春晓,张玉,师少军. SNP 基因分型检测技术及应用进展[J].中国药师,2013,16(6):811-816.

(收稿日期:2015-11-25 修回日期:2016-01-24)

(上接第 1168 页)

- [5] 马学斌,马骢,杨明,等.血栓弹力图同常规凝血试验的相关性研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(24):3335-3336.
- [6] Halset HJ, Hanssen SW, Espinosa A, et al. Tromboelastography: variability and relation to conventional coagulation test in non-bleeding intensive care unit patients [J]. BMC Anesthesiol, 2015, 15:28.
- [7] 韩旭东,黄晓英,殷国平,等.血栓弹力图与传统凝血试验评价肝病凝血功能的相关性研究[J].交通医学,2010,24(2):162-164.
- [8] Tripodi A, Salerno F, Chantarangkul V, et al. Evidence of normal thrombin generation in cirrhosis despite ab-normal

conventional coagulation tests [J]. Hepatology, 2005, 41 (3):553-558.

- [9] 王克迪,孔玉华,康熙雄.血栓弹力图仪临床应用报道[J].现代检验医学杂志,2011,26(4):135-137.
- [10] Shore-Lesserson L, Manspeizer HE, DePerio M, et al. Thromboelastography-guided transfusion algorithm reduces transfusions in complex cardiac surgery [J]. Anesthesia & Analgesia, 1999, 88(2):312-319.
- [11] Luddington RJ. Thrombelastography/thromboelastometry [J]. Clin Lab Haematol, 2005, 27(2):81-90.

(收稿日期:2015-10-25 修回日期:2015-12-20)