

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.07.012

重庆地区人群 CYP2C19 基因型表型多态性分析及检测的临床意义*

邓济甦,唐翌姝,毕小云[△]

(重庆医科大学附属第一医院检验科 400016)

[摘要] **目的** 了解重庆地区汉族人群的细胞色素氧化酶 P450C19(CYP2C19)基因型,根据基因型选择药物并合理调整药物剂量,提高疗效、降低不良反应发生概率,以期达到疗效最大、不良反应最少及费用最低的效果。**方法** 应用基因芯片的方法进行基因分型。**结果** 男性中基因型为野生型纯合子*1/*1(wt/wt)占 40.47%(17/42),基因型为*1/*2(wt/ml)占 38.09%(16/42),基因型为*1/*2(wt/m2)占 11.90%(5/42),基因型为*2/*2(m1/ml)占 7.14%(3/42),基因型为*2/*2(m1/m2)为 0(0/42),基因型为*2/*2(m2/m2)占 2.38%(1/42)。女性中基因型为野生型纯合子*1/*1(wt/wt)占 57.14%(8/14),基因型为*1/*2(wt/ml)占 28.57%(4/14),基因型为*1/*2(wt/m2)占 7.14%(1/14),基因型为*2/*2(m1/ml)为 0(0/14),基因型为*2/*2(m1/m2)为 0(0/14),基因型为*2/*2(m2/m2)占 7.14%(1/14)。在本实验中未发现*2/*2(m1/m2)基因型。**结论** 在中国男性和女性受试者中,性别对重庆地区汉族人群细胞色素氧化酶 CYP2C19 遗传多态性的影响在统计学上无差别。

[关键词] 细胞色素氧化酶 P450C19(CYP2C19);基因多态性;基因型
[中图分类号] R394 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)07-0899-03

CYP2C19 polymorphism and the effects of drug metabolism in Chongqing patients*

Deng Jisu, Tang Yushu, Biao Xiaoyun[△]

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To learn the CYP2C19 genotype in Chongqing Han population and lay foundation for individualized treatment. **Methods** The genotyping of CYP2C19 were determined by gene chip. **Results** According to genotyping results, the frequencies of wild type *1/*1(wt/wt), *1/*2(wt/ml), *1/*2(wt/m2), *2/*2(m1/ml), *2/*2(m1/m2), *2/*2(m2/m2) were 40.47%(17/42), 38.09%(16/42), 11.90%(5/42), 7.14%(3/42), 0%(0/42), 2.38%(1/42) successively in male. Otherwise, in female, the frequencies of wild type *1/*1(wt/wt), *1/*2(wt/ml), *1/*2(wt/m2), *2/*2(m1/ml), *2/*2(m1/m2), *2/*2(m2/m2) were 57.14%(8/14), 28.57%(4/14), 7.14%(1/14), 0(0/14), 0(0/14), 7.14%(1/14) respectively. **Conclusion** Among the Chinese volunteers, the incidence of poor metabolizer phenotype for CYP2C19 in male and female were 9.53% and 7.14% respectively. No significant differences in the incidence were found between extensive and poor metabolizers.

[Key words] cytochrome oxidase P450C19(CYP2C19); polymorphism; genotype

肝脏是人体重要的解毒器官,许多药物都经肝脏代谢,细胞色素 P450(cytochrome P450)是主要的肝细胞 I 相代谢酶之一。在 CYP2C 亚家族中,CYP2C19 亚型对药物反应起着关键性的作用,因为他们的活性存在显著的个体差异,表现为遗传多态性,从而产生血药浓度的个体差异。CYP2C19 酶主要分布在肝脏,同时也广泛分布于肾、脑、皮肤、肺、胃肠道及胎盘等组织器官,参与多种外源性物质代谢,如:药物、乙醇、抗氧化剂、有机溶剂、染料、环境污染物质等。遗传学的改变使 CYP450 酶表现出遗传多态性,并且具有明显个体、种族或地域差异。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(EM);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(PM),这对治疗的个体反应和药物不良反应都产生重要影响。本文通过对重庆地区人群基因组 DNA 中 CYP2C19 基因型的分型检测,判定患者的药物代谢速率类型,从而帮助医生正确选择药物并合理调整药物剂量,提高药物使用有效性,为降低不良反应提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 56 例受试者来源于 2012 年 5 月至 2013 年 3 月本院进行 CYP2C19 基因型检测的汉族人群,其中,男 42 例,

女 14 例。
1.2 标本采集 每位受试者静脉采血 2 mL,EDTA 抗凝,用于提取 DNA。
1.3 试剂与仪器 DNA 提取和杂交试剂由上海百傲科技有限公司提供,批号分别为 20120211、20120223。PCR 扩增仪型号 TC-96,由杭州博日科技有限公司提供。e-Hyb 全自动杂交仪和 BE-2.0 生物芯片识读仪均由上海百傲科技有限公司生产。金属浴和漩涡振荡器。
1.4 DNA 提取
1.4.1 吸附柱的活化 将吸附柱置于收集管中,加入 500 μ L 缓冲液 BH1,静置 2~3 min,12 000 r/min(9 500 $\times$ g)离心 30 s,弃去收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中,在吸附柱中加入 500 μ L 缓冲液 BH2,12 000 r/min (9 500 $\times$ g)离心 30 s,弃去收集管中的废液,将吸附柱放回收集管中待用。
1.4.2 离心 在离心管中加入 20 μ L 蛋白酶 K,将 EDTA 抗凝血混匀后吸取 200 μ L 至离心管中,再加入 200 μ L 缓冲液 BL,振荡 15 s,混匀后低速离心,恒温金属浴 56 $^{\circ}$ C 放置 10 min,加入无水乙醇 200 μ L,充分颠倒混匀,低速离心。将所得溶液和絮状沉淀都加入一个活化的吸附柱中,12 000 r/min (9 500 $\times$ g)离心 1 min,弃去装废液的收集管,将吸附柱插入新

* 基金项目:国家临床重点专科建设基金资助项目(财社[2010]305 号)。 作者简介:邓济甦(1963—),主管技师,本科,主要从事临床检验工作。 [△] 通讯作者,Tel:13527332663;E-mail:BX Y20061963@163.com。

表 1 56 例受检人群各种基因型分布[n(％)]

性别	* 1/* 1	* 1/* 2	* 1/* 2	* 2/* 2	* 2/* 2	* 2/* 2	合计
男	17(40.47)	16(38.09)	5(11.90)	3(7.14)	0(0)	1(2.38)	42(100.00)
女	8(57.14)	4(28.57)	1(7.14)	0(0)	0(0)	1(7.14)	14(100.00)

的收集管中,向吸附柱中加入 500 μ L 缓冲液 BW1,12 000 r/min (9 500 $\times$ g)离心 1 min,倒掉收集管中的废液,再向吸附柱中加入 500 μ L 缓冲液 BW2,12 000 r/min (9 500 $\times$ g)离心 1 min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱插入收集管中,12 000 r/min (9 500 $\times$ g)离心 1 min,将吸附柱转入一个新的洁净的 1.5 mL 离心管中,向吸附膜中间位置悬空滴加 60 μ L 洗脱缓冲液 BE,56 $^{\circ}$ C 放置 5 min,12 000 r/min (9 500 $\times$ g)离心 1 min,将溶液收集到离心管中-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 DNA PCR 扩增 试剂从试剂盒中取出解冻后,将 CYP2C19 扩增液 1 和扩增液 2 低速离心分装到 0.2 mL PCR 扩增管中,每管 19 μ L,在各扩增管中分别加入 1 μ L 反应液 A,5 μ L 提取好的样品 DNA 溶液,混匀后瞬时离心,放入 PCR 扩增仪中,参照 GenBank 设计引物。上游引物:5'-AAT TAC AAC CAG AGC TTG GC-3';下游引物:5'-TAT CAC TTT CCA TAA AAG CAA-3'。按下列条件扩增:50 $^{\circ}$ C 5 min 1 个循环;94 $^{\circ}$ C 5 min 1 个循环;94 $^{\circ}$ C 25 s,48 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min 1 个循环。扩增产物放入 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.6 杂交显色和扫描 将反应液 B 低速离心,吸取 10 μ L 加入杂交缓冲液瓶中混匀成为杂交反应液,取出 1 支抗体低速离心,加入 1 mL 抗体稀释剂,混匀备用。吸取 180 μ L 杂交反应液,加入 10 μ L CYP2C19 扩增产物 1 和扩增产物 2,混匀待用。准备各管试剂于 2 mL 离心管中,按要求加入相应的试剂,插入试管盒相应位置中,设置百傲 e-Hyb 全自动杂交仪杂交程序,取出基因芯片插入杂交仪插片口中,将试管盒放入杂交仪中,运行杂交程序。杂交结束取出芯片用蒸馏水冲洗芯片表面,自然晾干,启动 BE-2.0 生物芯片识读仪,进行扫描分析,得出基因分型结果。

2 结 果

2.1 56 例检测人群进行基因分型后的分布情况 男性中基因型为野生型纯合子* 1/* 1(636GG,681GG)占 40.47%(17/42),基因型为杂合子* 1/* 2(636GG,681GA)和* 1/* 2(636AG,681GG)占 50.00%(21/42),基因型为突变型纯合子* 2/* 2(636GG,681AA)和* 2/* 2(636AA,681GG)占 9.53%(4/42);而女性中基因型为野生型纯合子* 1/* 1占 57.14%(8/14),基因型为杂合子* 1/* 2和* 1/* 2占 35.71%(5/14),基因型为突变型纯合子* 2/* 2和* 2/* 2占 7.14%(1/14)。见表 1。

2.2 56 例检测人群 CYP2C19 快、慢代谢结果 男性快代谢占 90.47%,女性快代谢占 92.86%,男性慢代谢占 9.53%,女性慢代谢占 8.93%,男女总快代谢占 91.07%,男女总慢代谢占 8.93%。见表 2。

表 2 56 例受检人群 CYP2C19 快、慢代谢结果

性别	CYP2C19[n(％)]		合计
	快代谢	慢代谢	
男	38(90.47)	4(9.53)	42
女	13(92.86)	1(7.14)	14
合计	51(91.07)	5(8.93)	56

3 讨 论

个体间药物反应差异是许多药物临床使用时面临疗效不佳或药物中毒的一个重要问题,其主要原因之一就是肝脏相关药物代谢酶活性存在很大的可变性,造成这种可变性的原因包括了遗传和非遗传的因素。遗传学改变导致的代谢酶表现出遗传多态性,具体体现在由等位基因编码的代谢酶,其代谢能力大相径庭:野生型的正常等位基因通常表现为快代谢型;而绝大多数突变型等位基因,因为碱基的突变等而影响了酶活性,表现为代谢能力明显下降,称为慢代谢型,其中,慢代谢型发生往往存在明显的个体、种族和地域的差异性,进而导致在治疗过程中,对个体反应和药物不良反应等产生重要影响^[1]。

细胞色素 P450(cytochrome P450)是肝细胞代谢中的关键代谢酶之一,其中,CYP2C 亚家族中的 CYP2C19 亚型在药物反应中发挥着至关重要的作用。大量研究显示,CYP2C19 参与了多种药物的代谢,如质子泵抑制剂(奥美拉唑、兰索拉唑),抗痉挛药物(S-美芬妥因)等^[2-4],CYP2C19 活性表现出的明显个体差异及双峰性分布正是人们所熟知的基因多态性。而正是由于 CYP2C19 基因多态性产生了血药浓度的个体差异,严重干扰了治疗效果。1989 年,Wilkinson 等^[5]根据美芬妥因的代谢差异将个体分为快代谢型和慢代谢型两种亚型,其中慢代谢型存在 S-美芬妥因-4'羟化酶(即现在的 CYP2C19)的缺陷,这种缺陷在中国汉族人群中的比例达 22.5%^[6]。研究显示^[7]CYP2C19 存在多种突变基因和等位基因突变。CYP2C19* 1 作为野生型基因能够编码正常酶活性,其等位基因则包括了* 1……* 17。而 CYP2C19* 2(ml 突变)和 CYP2C19* 2(m2 突变)等位基因占东方人慢代谢型的 99%以上。其中,最主要的 CYP2C19* 2 等位基因变异是由于外显子 5 第 681 位处的碱基发生变异(G/A),从而导致了异常剪接点的形成和阅读框的移位,产生一个提前终止密码子和截短的蛋白;而 CYP2C19* 2 等位基因则在第 4 外显子的 636 位发生 G/A 突变,同样产生了提前的终止密码,导致蛋白合成终止,两种突变均引起 CYP2C19 酶活性的丧失。慢代谢型患者通过该酶代谢的药物随患者基因型不同,其疗效和不良反应也有明显不同^[7]。

因此,检测 CYP2C19 酶对药物代谢速率的快、慢,可以合理调整药物剂量,提高疗效、降低不良反应发生概率。临床上有许多药物经过 CYP2C19 的代谢,其中包括质子泵抑制剂:奥美拉唑、兰索拉唑、泮托拉唑等;抗抑郁药:氟西汀、西酞普兰、艾司西酞普兰、阿米替林、氯米帕明、丙咪嗪、吗氯贝胺、曲米帕明、依替唑仑等;抗癫痫药:安定、氯巴占、苯妥英钠、苯巴比妥、丙戊酸等;抗肿瘤药:环磷酰胺等;血小板聚集抑制剂:氯吡格雷等;抗疟疾药:氯胍等;抗真菌药:伏立康唑等;孕激素:黄体酮等。

CYP2C19 酶集中分布于肝脏,但是在其他众多器官也有一定的分布,如脑、胃肠道、肺等。研究证明 CYP2C19 基因多态性与神经系统、消化系统、心血管等药物使用均产生了明显的影响。在神经系统使用的药物中,CYP2C19 的多态性差异导致血浆中药物(如苯妥英钠)的清除率明显下降^[8-9],携带 CYP2C19 突变的患者丙戊酸(VPA)等药物血药浓度升高,分布曲线明显右移^[10]。由此可见,CYP2C19 酶突变导致 PM 患者药物代谢延缓,血药浓度较高,进而增强了药物的疗效。黄

越等^[11]也证明多数 CYP2C19 正常代谢患者,在进行抗癫痫治疗时,其 VPA 的血药浓度无法达到治疗血药浓度。值得注意的是,血药浓度高虽然能增强药物的疗效,但是也增加了不良反应的发生率,尤其是抗癫痫药物,由于其中毒剂量与治疗有效剂量十分接近,剂量的微小偏差就可能引起药物中毒。消化系统用药中,受 CYP2C19 影响最大的是质子泵抑制剂(PPI),其中,第一代 PPI 主要在肝脏代谢,对于 p450 酶的依赖性强,无论是口服给药还是静脉注射,CYP2C19 的多态性对于这类药物(奥美拉唑和兰索拉唑)都有着明显的影响,PM 的血药浓度相对较高,而快代谢型患者由于血药浓度低,往往需要增大剂量才能达到预期的治疗效果^[12]。除此之外,研究显示 CYP2C19*2 会增加接受氯吡格雷治疗急性冠状动脉综合征(ACSs)患者发生严重不良心血管事件的风险,尤其是那些接受经皮冠状动脉介入(PCI)治疗的患者,提示 CYP2C19 基因型导向的抗血小板治疗在心血管疾病治疗中的重要性^[13]。Tantry 等^[14]研究进一步证明 CYP2C19 基因型会对氯吡格雷抑制血小板的效应产生影响,而对替卡格雷治疗效果则无干扰。由此可见,通过检测 CYP2C19 基因型对于患者药物的正确选择有着十分关键的作用。

因而,分析 CYP2C19 基因多态性,深入了解药物受 CYP2C19 影响及二者相互作用,对于指导临床个性化用药治疗奠定了基础。本研究对重庆市 56 例受试者进行 CYP2C19 基因多态性检测,结果男性中基因型为野生型纯合子*1/*1wt/wt 占 40.47%(17/42),基因型为杂合子*1/*2(wt/ml1)占 38.09%(16/42)和*1/*2(wt/m2)占 11.90%(5/42),基因型为突变型纯合子*2/*2(ml1/ml1)和*2/*2(m2/m2)占 9.53%(4/42);而女性中基因型为野生型纯合子*1/*1(wt/wt)占 57.14%(8/14),基因型为杂合子*1/*2(wt/ml1)和*1/*2(wt/m2)占 35.71%(5/14),基因型为突变型纯合子*2/*2(ml1/ml1)和*2/*2(m2/m2)占 7.14%(1/14)。在本实验中未发现*2/*2(ml1/m2)基因型。在重庆地区男性和女性受试者中,(wt/wt)和(ml/ml)的发生率无显著差别。性别对重庆地区汉族人群细胞色素氧化酶 CYP2C19 遗传多态性的影响在统计学上无差别。男性快代谢占 90.47%,慢代谢占 9.53%,女性快代谢占 92.86%,慢代谢占 7.14%,与牛春燕等^[15]报道一致。

随着人类基因组研究的快速发展,个性化用药引起了广泛的关注,越来越多临床医生意识到了其重要性。由于药物反应存在的个体性差异,根据临床常规剂量进行治疗,可能会引起部分患者血药浓度过高而产生中毒反应,或者血药浓度低无法达到预期疗效。因而利用有效的基因检测方法帮助了解患者的基因型,根据基因多态性进行用药,为药物的选择和剂量的调整提供了新的指针,能够更好地实现疗效最佳、不良反应最少的个性化治疗。相信不久的将来,基因检测导向的个性化治疗将广泛用于临床并成为临床治疗的重要手段。基因芯片检测 CYP2C19 基因型,一次检测,患者终身适用。同时指导了医生用药,让患者在最短的时间,以最低的费用,达到最好的治疗效果。避免用药无效、毒副反应的发生,为临床诊疗提供了有力的实验室依据。不足之处,本研究中受试者数量较少,研究不全面,需要继续增加样本量,进行进一步的研究探讨。

参考文献

- [1] 郑露,邵建国. CYP2C19 的基因多态性与临床[J]. 第二军医大学学报,2008,28(11):1262-1264.
- [2] Wrighton SA, Stevens JC, Becker GW, et al. Isolation and characterization of human liver cytochrome P450 2C19: correlation between 2C19 and S-mephenytoin 4'-hydroxylation[J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 306(1): 240-245.
- [3] Klotz U, Schwab M, Treiber G. CYP2C19 polymorphism and proton pump inhibitors[J]. Pharmacol Toxicol, 2004, 95(1): 2-8.
- [4] Desta Z, Zhao X, Shin JG, et al. Clinical significance of the cytochrome P4502C19 genetic polymorphism [J]. Clin Pharmacokinet, 2002, 41(12): 913-958.
- [5] Wilkinson GR, Guengerich FP, Branch RA. Genetic polymorphism of S-mephenytoin hydroxylation[J]. Pharmacol Ther, 1989, 43(1): 53-76.
- [6] Blaisdell J, Mohrenweiser H, Jackson J, et al. Identification and functional characterization of new potentially defective alleles of human CYP2C19[J]. Pharmacogenetics, 2002, 12(9): 701-711.
- [7] 李小雯, 郑松柏. CYP2C19 基因多态性及其对质子泵抑制剂疗效影响研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 32(10): 775-779.
- [8] Yukawa E, Mamiya K. Effect of CYP2C19 genetic polymorphism on pharmacokinetics of phenytoin and phenobarbital in Japanese epileptic patients using Non-linear Mixed Effects Model approach[J]. J Clin Pharm Ther, 2006, 31(3): 275-282.
- [9] Watanabe M, Iwahashi K, Kugoh T, et al. The relationship between phenytoin pharmacokinetics and the CYP2C19 genotype in Japanese epileptic patients[J]. Clin Neuropharmacol, 1998, 21(2): 122-126.
- [10] 王育琴, 齐晓涟, 黄越, 等. 丙戊酸药物浓度与 CYP2C19 基因多态性关系的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(6): 670-673.
- [11] 黄越, 齐晓涟, 王育琴, 等. CYP2C19 基因型对丙戊酸及其与苯妥英联合用药时血药浓度影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2003, 10(2): 266-268.
- [12] Uno T, Niioka T, Hayakari M, et al. Absolute bioavailability and metabolism of omeprazole in relation to CYP2C19 genotypes following single intravenous and oral administrations [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2007, 63(2): 143-149.
- [13] Scott SA, Sangkuhl K, Gardner EE, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) genotype and clopidogrel therapy [J]. Clin Pharmacol Ther, 2011, 90(2): 328-332.
- [14] Tantry US, Bliden KP, Wei C, et al. First analysis of the relation between CYP2C19 genotype and pharmacodynamics in patients treated with ticagrelor versus clopidogrel: the ONSET/OFFSET and RESPOND genotype studies[J]. Circ Cardiovasc Genet, 2010, 3(6): 556-566.
- [15] 牛春燕, 罗金燕. 中国汉族人群细胞色素 P450 酶 CYP2C19 基因多态性分析[J]. 中华实用医药杂志, 2004, 4(15): 212-213.