

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.08.013

云南地区汉族人群 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性研究*

赵晓丽,史琼华,黄宏伟,钱净,邵剑春,黎海生,杨悦林,陈俊,胡大春[△]

(云南省昆明市第一人民医院/昆明医科大学附属甘美医院检验科 650011)

[摘要] 目的 了解 CYP2C9 和 VKORC1 基因单核苷酸多态性在云南汉族人群中的频率分布。方法 采用电化学基因传感器法对 202 例样本的 CYP2C9(430C>T,1075A>C 和 1080C>G)位点及 VKORC1(-1639G>A 和 1173C>T)位点基因多态性进行检测,统计其等位基因频率和基因型频率,并与相关人群的基因多态性分布进行分析。结果 202 份样本中共检测到 CYP2C9 * 2 位点 C/C 基因型 202 例(100.0%),等位基因 C 频率为 100.0%;CYP2C9 * 3 位点 A/A 基因型 185 例(91.6%),A/C 基因型 15 例(7.4%),C/C 基因型 2 例(1.0%),等位基因 A 频率为 95.3%,C 为 4.7%;CYP2C9 * 5 位点 C/C 基因型 202 例(100.0%),等位基因 C 频率为 100.0%;VKORC1 的 -1639G>A 位点 A/A 基因型 145 例(71.8%),G/A 基因型 57 例(28.2%),等位基因 A 频率为 85.9%,G 为 14.1%;1173C>T 位点 T/T 基因型 145 例(71.8%),C/T 基因型 57 例(28.2%),等位基因 T 频率为 85.9%,C 为 14.1%。结论 云南汉族人群 CYP2C9 基因和我国其他地区汉族人群分布一致;VKORC1 基因与国外人群、我国汉族和部分少数民族的基因分布有较大区别。

[关键词] 云南;汉族;CYP2C9;VKORC1;基因多态性**[中图分类号]** R540.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)08-1052-03**Genetic polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 among Han population in Yunnan area***

ZHAO Xiaoli, SHI Qionghua, HUANG Hongwei, QIAN Jing, SHAO Jianchun,

LI Haisheng, YANG Yuelin, CHEN Jun, HU Dachun[△]

(Department of Clinical laboratory, Kunming Municipal First People's Hospital/Affiliated Ganmei

Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650011, China)

[Abstract] **Objective** To understand the frequency distribution of CYP2C9 and VKORC1 gene single nucleotide polymorphisms in Yunnan Han population. **Methods** CYP2C9 (430C>T, 1075A>C and 1080C>G) locus and VKORC1 (-1639G>A and 1173C>T) locus gene polymorphisms in 202 samples were detected by adopting electrochemical gene sensor method, and the allele frequencies and genotype frequencies were performed the statistics and the gene polymorphism in relevant populations was analyzed. **Results** Among 202 samples, 202 cases (100.0%) were genotype C/C at CYP2C9 * 2 locus, C allele frequency was 100.0%; 185 cases (91.6%) were genotype A/A at CYP2C9 * 3 locus, 15 cases (7.4%) were A/C genotype, 2 cases (1.0%) were C/C genotype, A allele frequency was 95.3%, C allele frequency was 4.7%; CYP2C9 * 5 locus genotype C/C was in 202 cases (100.0%), C allele frequency was 100%; VKORC1 -1639G>A locus genotype A/A was in 145 cases (71.8%), 57 cases (28.2%) were G/A genotype, A allele frequency was 85.9%, G was 14.1%; 1173C>T locus genotype T/T was in 145 cases (71.8%), C/T gene type in 57 cases (28.2%), T allele frequency was 85.9%, and C was 14.1%. **Conclusion** The distribution of CYP2C9 gene in Yunnan Han population is similar to that in other regions of our country. The VKORC1 gene is different from the foreign population, Chinese Han nationality and partial minority nationalities.

[Key words] Yunnan; Han nationality; CYP2C9; VKORC1; gene polymorphism

华法林是一种香豆素类口服抗凝药,是目前治疗血栓栓塞性疾病的一线抗凝药物,近几年的研究发现华法林的剂量需求受两方面因素影响:(1)非遗传因素,包括年龄、身高、体质量、疾病状态、合并用药等;(2)遗传因素,包括与华法林药代动力学和药效学相关的基因多态性。而细胞色素 P450(CYP)2C9 基因(Cytochrome P450 2C9, CYP2C9)和维生素 K 环氧化物还原酶复合体亚单位 1 基因(vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, VKORC1)是造成个体间华法林维持剂量差异的主要遗传因素,且这两种基因存在明显的种族差异^[1]。本研究分析 CYP2C9 和 VKORC1 基因单核苷酸多态性在云南汉族人群中的频率分布,为实现华法林个体化用药剂量提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1—12 月在本院就诊患者和体检样本共 202 例,男 105 例,女 97 例,年龄 18~85 岁。所有志愿者均需签署知情同意书后方可采样。纳入标准:年龄大于或等于 18 岁,云南汉族,相互之间三代无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器和试剂 血液基因组 DNA 提取试剂盒,华法林敏感性基因检测试剂盒(华法林 PCR 反应液 A,华法林 PCR 反应液 B,华法林敏感性基因质控品,空白对照,华法林杂交液 I,杂交液 II,杂交液 III,华法林电化学传感器)由中山大学达安基因股份有限公司提供。台式高速低温离心机(Heraeus 公司),ABI PCR 扩增仪,电化学基因传感器检测系

* 基金项目:昆明市科技计划项目(2016-1-S-06350)。 作者简介:赵晓丽(1978—),副主任医师,硕士,主要从事临床疾病分子生物学研究。 [△] 通信作者, E-mail: hudach@163.net。

统(中山大学达安基因股份有限公司)。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 选用 EDTA-K₂ 抗凝采血真空管采集外周静脉血 2~3 mL, -80 °C 保存, 使用血液基因组 DNA 提取试剂盒快速提取基因组 DNA。

1.2.3 PCR 反应 采用华法林敏感性基因检测试剂盒, 每个反应体系总体积 40 μL, 华法林 PCR 反应液 A 37 μL, 华法林 PCR 反应液 B 3 μL 和样本核酸 10 μL。扩增条件: 50 °C 3 min, 94 °C 预变性 15 min, 94 °C 变性 30 s, 59 °C 退火 35 s, 72 °C 延伸 40 s, 45 个循环, 最后 72 °C 再延伸 7 min。

1.2.4 芯片杂交和扫描 采用华法林电化学传感器法, 将充分混匀的液体(包括 70 μL 华法林杂交液 I, 10 μL 杂交液 II, 20 μL 杂交液 III 和 25 μL PCR 产物)加入反应管中, 杂交反应和分析均在电化学基因传感器检测系统进行, 最后根据软件判断其基因型。

1.2.5 结果判读 华法林敏感基因质控品相应检测位点基因型结果为 430C/C, 1075A/A, 1080C/C, 1173T/T, -1639A/A。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析。计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CYP2C9 和 VKORC1 基因型芯片杂交情况 本实验总共发现 5 种组合基因型, 包括 C/C、A/C、C/C、T/T、A/A; C/C、A/A、C/C、T/T、A/A; C/C、A/C、C/C、C/T、G/A; C/C、C/C、C/C、T/T、A/A; C/C、A/A、C/C、C/T、G/A, 见表 1~5。

表 1 基因型 C/C、A/A、C/C、C/T、G/A 情况

靶基因	等位基因位点	基因型结果
CYP450 2C9	430C>T(*2)	C/C
CYP450 2C9	1075A>C(*3)	A/A
CYP450 2C9	1080C>G(*5)	C/C
VKORC1	1173C>T	C/T
VKORC1	-1639G>A	G/A
LowSignal Test	LoS control	Pass
HighSignal Test	HiS control	Pass

表 2 基因型 C/C、C/C、C/C、T/T、A/A 情况

靶基因	等位基因位点	基因型结果
CYP450 2C9	430C>T(*2)	C/C
CYP450 2C9	1075A>C(*3)	C/C
CYP450 2C9	1080C>G(*5)	C/C
VKORC1	1173C>T	T/T
VKORC1	-1639G>A	A/A
LowSignal Test	LoS control	Pass
HighSignal Test	HiS control	Pass

2.2 CYP2C9 和 VKORC1 两种基因组合的构成情况 C/C、A/C、C/C、T/T、A/A 3 例(1.5%), C/C、A/A、C/C、T/T、A/A 140 例(69.3%), C/C、A/C、C/C、C/T、G/A 12 例(6.0%), C/C、C/C、C/C、T/T、A/A 2 例(1.0%), C/C、A/A、C/C、C/T、G/A 45 例(22.2%)。

2.3 CYP2C9 和 VKORC1 基因的分布情况 202 份样本中共检测到 CYP2C9 * 2 位点基因型 C/C 202 例(100.0%), 等位

基因 C 频率为 100.0%; CYP2C9 * 3 位点基因型 A/A 185 例(91.6%)、A/C 15 例(7.4%)、C/C 2 例(1.0%), 等位基因 A 频率为 95.3%, C 为 4.7%; CYP2C9 * 5 位点基因型 C/C 202 例 100.0%, 等位基因 C 频率为 100.0%。202 份样本中共检测到 VKORC1 的 -1639G/A 位点基因型 A/A 145 例(71.8%)、G/A 57 例(28.2%), 等位基因 A 频率为 85.9%, G 为 14.1%; 1173T/C 位点基因型 T/T 145 例(71.8%), C/T 57 例(28.2%), 等位基因 T 频率为 85.9%, C 为 14.1%, 见表 6。

表 3 基因型 C/C、A/A、C/C、T/T、A/A 情况

靶基因	等位基因位点	基因型结果
CYP450 2C9	430C>T(*2)	C/C
CYP450 2C9	1075A>C(*3)	A/A
CYP450 2C9	1080C>G(*5)	C/C
VKORC1	1173C>T	T/T
VKORC1	-1639G>A	A/A
LowSignal Test	LoS control	Pass
HighSignal Test	HiS control	Pass

表 4 基因型 C/C、A/C、C/C、T/T、A/A 情况

靶基因	等位基因位点	基因型结果
CYP450 2C9	430C>T(*2)	C/C
CYP450 2C9	1075A>C(*3)	A/C
CYP450 2C9	1080C>G(*5)	C/C
VKORC1	1173C>T	T/T
VKORC1	-1639G>A	A/A
LowSignal Test	LoS control	Pass
HighSignal Test	HiS control	Pass

表 5 基因型 C/C、A/C、C/C、C/T、G/A 情况

靶基因	等位基因位点	基因型结果
CYP450 2C9	430C>T(*2)	C/C
CYP450 2C9	1075A>C(*3)	A/C
CYP450 2C9	1080C>G(*5)	C/C
VKORC1	1173C>T	C/T
VKORC1	-1639G>A	G/A
LowSignal Test	LoS control	Pass
HighSignal Test	HiS control	Pass

表 6 CYP2C9 和 VKORC1 基因型及基因频率分布情况

基因	位点	基因型	n	基因型频率	基因频率
CYP2C9	430C>T(*2)	C/C	202	100.0%	C=100.0%
		A/A	185	91.6%	A=95.3%,
		A/C	15	7.4%	C=4.7%
CYP2C9	1075A>C(*3)	C/C	2	1.0%	
		C/C	202	100.0%	C=100.0%
		C/C	202	100.0%	C=100.0%
VKORC1	-1639G>A	A/A	145	71.8%	A=85.9%,
		G/A	57	28.2%	G=14.1%
		G/A	57	28.2%	G=14.1%
VKORC1	1173C>T	T/T	145	71.8%	T=85.9%,
		C/T	57	28.2%	C=14.1%

3 讨 论

CYP2C9 是人体肝细胞中 CYP450 酶系中重要成员之一,能代谢大量重要的临床药物,是华法林代谢的关键酶,CYP2C9 基因具有高度遗传多态性,存在野生型 CYP2C9 * 1 和突变型 CYP2C9 (* 2 ~ * 13)。本研究选取 CYP2C9 * 2、CYP2C9 * 3 和 CYP2C9 * 5 位点进行的研究,结果发现 CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 5 位点基因型均为敏感基因型,只有 CYP2C9 * 3 基因分布频率具有明显种族差异。CYP2C9 * 3 主要是第 359 位的氨基酸由异亮氨酸变成亮氨酸,导致底物识别位点的一个 β 折叠破坏,改变酶的结构,使酶的催化能力降低 80%,CYP2C9 * 3 突变携带者华法林剂量需求较野生型患者低^[2-5]。

本研究结果显示,云南地区汉族人群 CYP2C9 * 3 位点基因型 A/A 185 例(91.6%)、A/C 15 例(7.4%)、C/C 2 例(1.0%),等位基因 A 和 C 频率分别为 95.3%和 4.7%,上海汉族人群分别为 95%、5%、0.98%和 2%^[6],皖南汉族人群分别为 94.7%、5.19%、0.74%、96.6%和 3.33%^[7],差异无统计学意义($P > 0.05$)。CYP2C9 * 3 基因的华法林敏感性基因型为 A/A,云南地区汉族人群 A/A 型占 91.6%,提示临床维持经验用药。

VKORC1 主要由 VKORC1 基因编码,其编码的产物 VKORC1 是复合脂蛋白酶系,存在于内质网膜上。通过阻碍维生素 K 由氧化型转化为有活性的氢醌型,阻断维生素 K 依赖性凝血因子 II、VII、IX 和 X 的活化而发挥抗凝作用^[8-9]。本文研究的主要位点是位于启动子区 -1639G > A 和内含子区 1173C > T 等位基因位点。-1639G > A 和 1173C > T 两个位点在亚洲人群中呈现强烈连锁不平衡^[10],研究表明,VKORC1 相关等位基因与华法林高剂量相关。G/G 和 A/G 基因型与 A/A 基因型相比,其启动子活性高,VKORC1 mRNA 表达增加,VKORC1 蛋白也相应增加,引起 VKORC 活性增高,促使凝血因子生成,所以 G/G 和 G/A 基因型患者所需华法林剂量高,表现为华法林抵抗。

本研究结果显示,云南地区汉族人群 VKORC1 的 -1639G > A 基因型以 A/A 为主占 71.8%,G/A 占 28.2%,G/G 型未检出,等位基因 A 和 G 频率分别为 85.9%和 14.1%,欧美人群分别为 12.10%、45.24%、42.65%、34.73%和 65.27%,我国汉族人群为 77.53%、20.93%、1.55%、87.99%和 12.01%^[11],新疆少数民族人群 41.70%、44.27%、14.03%、36.17%和 63.83%^[12],差异有统计学意义($P < 0.05$)。A/A 基因型患者所需的平均华法林维持剂量较 G/A 基因型的患者少^[8]。我国新疆少数民族的 A/A 基因型则较汉族明显偏低,推测云南少数民族的相关基因可能与云南汉族有差异。本研究结果显示,云南汉族人群的 VKORC1 的 -1639G > A 和 1173C > T 的突变率较高,建议临床医生在给患者实施华法林治疗时需要检验 VKORC1 基因。

本文通过对 202 例云南汉族人群华法林相关药物遗传学基因 CYP2C9 和 VKORC1 的研究发现,云南汉族人群 CYP2C9 基因分布情况与我国其他地区汉族人群一致,VKORC1 基因与国外人群、我国汉族人群、新疆少数民族人群的基因分布有差异。目前针对云南地区各少数民族人群的研究较少,应加强进一步研究,从而推动云南地区华法林个体化用药的发展。

参考文献

- [1] 沈为勤,刘俊.华法林基因导向的个体化抗凝研究进展[J].药学与临床研究,2015,23(5):475-478.
- [2] VASILYEV F F,DANILOVA D A,KAIMONOV V S,et al. Frequency distribution of polymorphisms of CYP2C19,CYP2C9,VKORC1 and SLCO1B1 genes in the Yakut population[J]. Res Pharm Sci,2016,11(3):259-264.
- [3] HADJIPANAGI D,CHRYSANTHOU S,VOSKARIDES K,et al. Genetic polymorphisms in warfarin and tacrolimus-related genes VKORC1,CYP2C9 and CYP3A5 in the Greek-Cypriot population [J]. BMC Research Notes,2014,7:123.
- [4] WANG M S,LANG X L,CUI S T,et al. Clinical application of Pharmacogenetic-Based Warfarin-Dosing algorithm in patients of Han nationality after rheumatic valve replacement:a randomized and controlled trial[J]. Int J Med Sci,2012,9(6):472-479.
- [5] KUROSE K,SUGIYAMA E,SAITO Y. Population differences in major functional polymorphisms of pharmacokinetics/pharmacodynamics-related genes in Eastern Asians and Europeans:implications in the clinical trials for novel drug development[J]. Drug Metab Pharmacokinet,2012,27(1):9-54.
- [6] 薛乾.CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性对华法林抗凝强度影响的研究[D].上海:第二军医大学,2013.
- [7] 张国强,刘俊.皖南某地汉族人群 CYP2C9 1075A/C 和 VKORC1-1164G/A 基因多态性研究[J].贵州医药,2015,39(11):964-966.
- [8] GU Q,KONG Y,SCHNEEDE J,et al. RC1-1639G > A, CYP2C9,EPHX1691A > G genotype, body weight, and age are important predictors for warfarin maintenance doses in patients with mechanical heart valve prostheses in southwest China[J]. Eur J Clin Pharmacol,2010,66(12):1217-1227.
- [9] CHERTOVSKIKH Y V,MALOVA E U,MAKSIMOVA N R,et al. VKORC1 polymorphisms and warfarin maintenance dose in population of Sakha (Yakuts)[J]. Int J Risk Saf Med,2015,27 Suppl 1:S17-18.
- [10] 赵磊,贾玫.CYP2C9 1075A > C 和 VKORC1-1639 G > A 基因多态性与华法林用药剂量差异的相关性及检测方法研究[J].中华检验医学杂志,2012,35(11):1010-1015.
- [11] 刘媛,钟诗龙,杨敏,等.华法林药代学和药动学通路突变等位基因在中国汉族人群中的分布[J].北京大学学报(医学版),2011,43(6):798-803.
- [12] 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.