

[文章编号] 1007-3949(2009)17-05-0395-04

· 临床研究 ·

细胞色素氧化酶 P450 2C9基因多态性与冠心病及血脂水平的关系

李锐¹, 邱健¹, 赵树进², 石磊², 洪长江¹, 付锐斌¹, 贺宝霞²

(广州军区广州总医院 1. 心血管内科, 2 药学部, 广东省广州市 510010)

[关键词] 细胞色素氧化酶 P450 2C9 基因; 多态性; 冠心病; 血脂水平

[摘要] 目的 探讨细胞色素氧化酶 P450 2C9 (CYP2C9) 基因多态性与冠心病和血脂水平的相关性。方法 应用聚合酶链反应和基因测序方法, 检测 218 例经冠状动脉造影确诊冠心病或有明确心肌梗死的患者及 200 例经冠状动脉造影排除冠心病的对照者的 CYP2C9 基因型, 并对突变基因型者和野生基因型者的血脂按常规方法测定并进行比较分析。结果 冠心病组突变型 CYP2C9*3 基因发生率显著高于非冠心病对照组 ($P < 0.05$), 突变型 CYP2C9*3 基因型者和野生型 CYP2C9*1 基因型者血脂水平差异无统计学意义。结论 CYP2C9 基因多态性与冠心病的发生可能相关, 但未发现与血脂水平有相关性。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Correlation Between the Cytochrome P450 2C9 Gene Polymorphism and Coronary Heart Disease as Well as Plasma Lipid Levels

LI Rui¹, QIU Jian¹, ZHAO Shu-Jin², SHI Lei², HONG Chang-Jiang¹, FU Rui-Bing¹, and HE Bao-Xia²

(1 The Department of Cardiology; 2 The Department of Pharmacy, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010 China)

[KEY WORDS] Cytochrome P450 2C9 Gene Polymorphism; Coronary Heart Disease; Plasma Lipid Level

[ABSTRACT] **Aim** To study the relationship between Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) gene polymorphism and coronary heart disease (CHD) and to investigate if there is the effect of CYP2C9 gene polymorphism on plasma lipid levels.

Methods The polymerase chain reaction and gene sequence detection were used to detect CYP2C9 genotypes in 218 CHD cases and 200 controls. Plasma lipid levels were measured by using routine method. **Results** Statistical differences in CYP2C9*1 and CYP2C9*3 frequencies between CHD cases and controls were seen ($P < 0.05$). The frequency of CYP2C9*3 was significantly higher than that in controls. Unfortunately, no relationship was seen between CYP2C9 gene polymorphism and plasma lipid levels.

Conclusion These results suggest that CYP2C9 gene polymorphism is in association with the occurrence and development of CHD. But it does not affect the plasma lipid levels.

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 是人群常见病和多发病, 由不良生活习惯、环境与遗传等多方面因素综合所致^[1], 严重地危害人们健康。人细胞色素氧化酶 P450 (cytochrome P450, CYP) 是一组由 CYP 超基因家族编码的酶系, 涉及许多内源性、外源性物质的代谢。CYP2C9 是其中重要的一种, 在人肝脏微粒体中含量丰富, 约占总 CYP 蛋白量的 20%, 仅次于 CYP3A4。CYP2C9 参与许多内源性、外源性物质的代谢, 包括一些重要内源性物质的代谢, 如其在血管的平滑肌细胞中参与了从花生四烯

酸 (arachidonic acid, AA) 合成环氧花生酸 (epoxyeicosatrienoic acid, EET) 的代谢, 而 EET 是一种内皮衍生性超极化因子 (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF), 能够影响血压和血管内皮功能^[2-5], 从而可能影响冠心病发病。许多重要的心血管疾病药物如华法林、沙坦类降压药等主要由 CYP2C9 代谢^[6]。编码 CYP2C9 酶的 CYP2C9 基因具有遗传多态性, 并导致 CYP2C9 酶活性存在差异, 对内源性、外源性物质的代谢存在差异, 进而对机体包括疾病的发生产生影响。本研究采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和基因测序方法, 检测了冠心病患者与对照者的 CYP2C9 基因的 CYP2C9*1 野生型和 CYP2C9*3 突变型基因型, 并检测 CYP2C9 不同基因型者的血脂水平, 目的在于研究 CYP2C9 基因多态性与冠心病是否有关及其是否对血脂质、脂蛋白水平产生影响。

[收稿日期] 2009-02-12 [修回日期] 2009-05-10

[作者简介] 李锐, 硕士研究生, 主治医师, Email 为 linu109xt@163.com。通讯作者邱健, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 广州军区广州总医院心血管内科主任, 主攻方向为冠心病的诊断和治疗, 动脉硬化易感基因及其与炎症关系, 联系电话为 020-36653568, Email 为 xxgnkq@yahoo.cn。赵树进, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 广州军区广州总医院药学部主任, 主攻方向为神经生化药理和中药分子生物学鉴定。

1 对象与方法

1.1 对象及分组

所有研究对象均为本院住院病人,由两位冠心病介入专家对患者冠状动脉造影结果进行评估,将冠状动脉狭窄程度 $\geq 50\%$ 或者有明确的心肌梗死病史者作为冠心病组,而将冠状动脉血管造影正常者作为对照组。冠心病组 218 例,男 186 例,女 32 例,年龄 63.4 ± 10.9 岁,冠状动脉造影结果显示至少有 1 支或 1 支以上冠状动脉的直径狭窄程度 $\geq 50\%$ 者或未行冠状动脉造影但有明确的心肌梗死病史者,心肌梗死诊断按中华医学会心血管分会制定的心肌梗死诊断标准诊断;④对照组 200 例,男 159 例,女 41 例,年龄 60.6 ± 9.7 岁,经冠状动脉造影证实未见明显冠状动脉狭窄性病变。两组年龄、性别及家族史等条件具有可比性。冠心病组及对照组所有研究对象均为汉族,研究个体间无血缘关系,且均排除肝、肾、肿瘤、甲状腺、糖尿病等疾病。

1.2 研究方法

受试者于服用降脂药物前空腹 8 h 以上,于清晨 6~7 时取卧位肘静脉血置于干燥管测定血脂;另取 5 mL 静脉血置于 EDTA-K2 抗凝管中保存于 -70°C 超低温冰箱中以备提取 DNA。

1.3 血脂指标测定方法

采用标准酶比色法测定总胆固醇 (total cholesterol TC)、甘油三脂 (triglyceride TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol LDLC) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol HDLC),用免疫浊度法测定载脂蛋白 A1 (apoA1) 和载脂蛋白 B (apoB) 及脂蛋白 (a)。

1.4 细胞色素氧化酶 P450 2C9 基因分型

人的基因组 DNA 提取:将上述抗凝血按人血液 DNA 提取试剂盒操作步骤提取白细胞基因组 DNA, DNA 提取试剂盒为 TIANGEN 公司人血/细胞/组织 DNA 提取试剂盒,所提 DNA -20°C 保存。④CYP2C9 基因扩增:采取聚合酶链反应 (PCR) 法对 CYP2C9 基因目的片段进行扩增,引物由上海英骏生物技术有限公司合成,引物序列:上游 5' -TGC ACG AGG TCC AGA GGT AC-3', 下游 5' -ACA AAC TTA CCT TGG GAA TGA GA-3'^[7]。10×PCR buffer, TaqDNA 聚合酶、dNTP 等试剂由 TaKaRa 公司生产。扩增产物为 105 bp 片段,建立 25 μL 反应体系,内含 10×PCR buffer 2.5 μL 、TaqDNA 聚合酶 2.5 U、2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL 、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 1 μL 、基因组 DNA 3.0 μL 、灭菌双蒸水补至 25 μL ;扩增循环参数:95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min 后,

95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s \rightarrow 60 $^\circ\text{C}$ 复性 30 s \rightarrow 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 s 共 35 个循环,最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min^[7]。(四)PCR 产物送上海英骏生物技术有限公司直接测序。

1.5 统计学方法

CYP2C9 基因型频率及等位基因频率采用频率计数法计算,组间基因型频率及等位基因频率比较采用 χ^2 检验,不同基因型研究对象间血脂用均数 \pm 标准差表示,两样本均数比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。应用 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析。

2 结果

2.1 CYP2C9 基因扩增目的片段的测序结果

所有研究对象的 CYP2C9 基因 PCR 目的片段均得到满意扩增,特异性片段长度为 105 bp。测序后与 CYP2C9 基因片段序列比对,显示突变型 CYP2C9* 3 基因型 1075 碱基发生了 A \rightarrow C 突变(箭头示处),使得编码多肽链第 359 位异亮氨酸的密码子 ATT 突变为亮氨酸密码子 CTT。检测到的所有突变型 CYP2C9* 3 基因型均为 CYP2C9* 1 / CYP2C9* 3 杂合子,未检测到 CYP2C9* 3 / CYP2C9* 3 型纯合子(图 1)。

2.2 细胞色素氧化酶 P450 2C9 基因型及等位基因分布

冠心病组和对照组 CYP2C9* 1 基因型(野生型)和 CYP2C9* 3 基因型(突变型)数量和频率见表 1,冠心病组突变型 CYP2C9* 3 基因型检出率为 8.26%,高于对照组检出率 3.50%,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.197, P < 0.05$, 表 1)。冠心病组 CYP2C9* 3 等位基因即 C 等位基因频率也显著高于对照组 ($\chi^2 = 4.068, P < 0.05$, 表 2)。

表 1 两组突变型 CYP2C9* 3 基因型检出率比较

分 组	CYP2C9* 3 (突变型)	CYP2C9* 1 (野生型)	合计	OR 值	95% CI
冠心病组	18(8.26%) ^a	200(91.74%)	218	2.48	1.04~5.93
对照组	7(3.50%)	193(96.50%)	200		

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

表 2 冠心病组、对照组 CYP2C9 等位基因频率

分 组	C(基因频率)	A(基因频率)	OR 值	95% CI
冠心病组	18(4.13%) ^a	418(95.87%)	2.48	(1.03~6.00)
对照组	7(1.75%)	393(98.25%)		

a为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

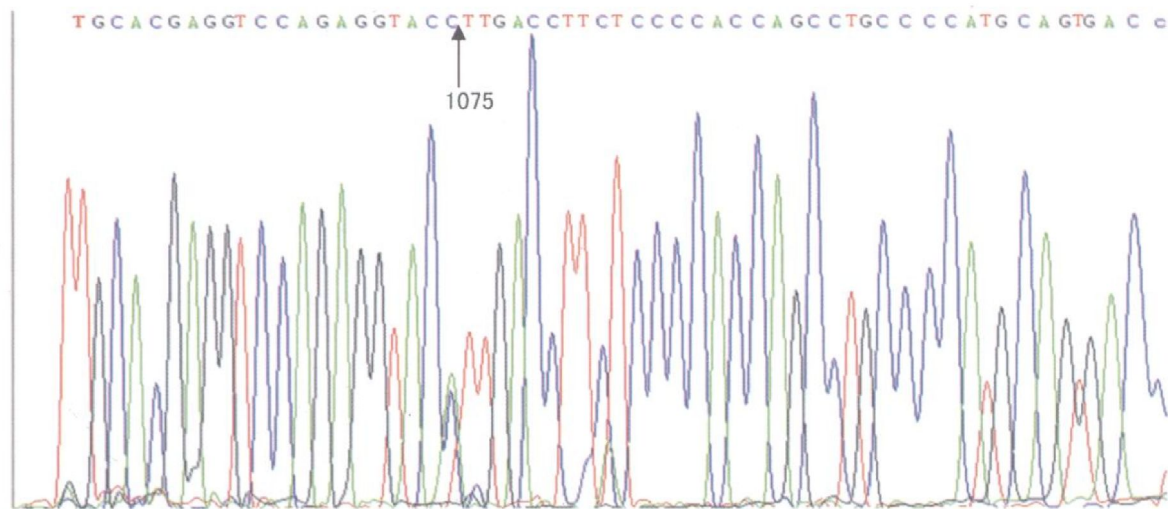


图 1 CYP2C9* 3突变基因型扩增目的片段的测序结果 (箭头示处显示 1075位碱基发生了 A \rightarrow C突变, 编码第 359位异亮氨酸的密码子 ATT突变为亮氨酸密码子 CTT)

(箭头示处显示 1075位碱基发生了 A \rightarrow C突变, 编码第 359位异亮氨酸的

2.3 CYP2C9* 3基因型和条件匹配 CYP2C9* 1基因型血脂比较

冠心病组和对照组中共检出 25名 CYP2C9* 3基因型(突变型)者,组成 CYP2C9* 3基因型组,自所有表现为 CYP2C9* 1基因型(野生型)者中挑选出性别、年龄、造影结果、饮食习惯、冠心病危险因素等基本条件与 25名 CYP2C9* 3基因型(突变型)者相同或相近者组成 CYP2C9* 1基因型组,比较 25名 CYP2C9* 3基因型(突变型)者和 25名 CYP2C9* 1基因型(野生型)者血脂,两组研究对象内不同 CYP2C9基因型组之间血脂、脂蛋白水平比较差异无显著性(表 3)。

表 3 CYP2C9* 3基因型组与 CYP2C9* 1基因型组基线血脂特征 ($\bar{x} \pm s$, $n = 25$)

指标	CYP2C9* 3	CYP2C9* 1
甘油三酯 (mmol/L)	1.53 \pm 0.61	1.74 \pm 0.84
总胆固醇 (mmol/L)	4.66 \pm 0.55	4.45 \pm 0.59
低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	3.11 \pm 0.52	2.76 \pm 0.58
高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L)	1.00 \pm 0.25	0.96 \pm 0.22
载脂蛋白 A1 (g/L)	0.97 \pm 0.34	1.04 \pm 0.21
载脂蛋白 B (g/L)	0.84 \pm 0.17	0.74 \pm 0.17
脂蛋白 (a) (g/L)	0.29 \pm 0.19	0.26 \pm 0.14

3 讨论

细胞色素氧化酶 P450 2C9是人类肝脏中含量丰富的一种 CYP450酶,它能代谢和/或活化许多种

内、外源性物质,如多种药物包括多种心血管药物、前致癌物、前毒物和致突变剂。同时,编码 CYP2C9的 CYP2C9基因位于染色体 10q24.2上,全长约为 55 kb,含有 8个内含子,9个外显子。CYP2C9基因具有遗传多态性,除野生型 CYP2C9* 1外,已报道的突变等位基因型有 CYP2C9* 2~ CYP2C9* 30^[8], CYP2C9* 2和 CYP2C9* 3突变是最常见的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), CYP2C9等位基因的分布具有明显的种族、人群和地域差异,在中国及东亚人群中,主要突变型基因为 CYP2C9* 3^[9-11]。CYP2C9* 3是在 7号外显子上 1075位发生 A \rightarrow C突变,造成 CYP2C9多肽链第 359位异亮氨酸变为亮氨酸 (Ile359 \rightarrow Leu359)。研究表明, CYP2C9基因多态性在药物代谢中具有重要的作用,表现在临床方面可导致药效增强或降低,甚至增加药物毒副作用^[12]。在 CYP2C9基因多态性与疾病的关系方面, CYP2C9基因多态性与肿瘤尤其肺癌的关系方面相关文献报道较多,但结果并不一致^[13]。CYP2C9酶在血管的平滑肌细胞中参与了从花生四烯酸合成 EET的代谢,而 EET是一种 EDHF,能够影响血压和血管内皮功能,因而提示 CYP2C9活性的变化可能会影响某些心血管疾病的发病率,而 CYP2C9活性主要受 CYP2C9基因多态性的影响,因此推测 CYP2C9基因多态性可能影响冠心病发病率。一项关于急性心肌梗死的研究表明,女性中携带 CYP2C9* 2和 CYP2C9* 3型突变的个体的急性心肌梗死的发病风险高于野生型^[14]。在对 CYP2C9基因多态性与高血压发病率间的关系

的研究发现,在女性中,CYP2C9*3在高血压患者组中的发生率显著低于健康对照组,而在男性组中没有差别^[15]。国内尚无CYP2C9基因多态性与冠心病关系的研究报道,至于其它基因的基因多态性与血脂代谢关系的研究方面,目前已有不少报道,但尚无CYP2C9基因多态性与血脂关系的研究报道,因CYP2C9与多种内源性、外源性物质的代谢有关,故CYP2C9基因多态性是否对血脂代谢存在影响有待探讨。

本研究对218例经冠状动脉造影或因明确心肌梗死史而确诊为冠心病的患者和200例经冠状动脉造影排除冠心病的对照者的CYP2C9*3基因型检测结果表明,冠心病组突变型CYP2C9*3基因型检出率为82.6%,高于对照组检出率35.0%,差异有统计学意义,冠心病组CYP2C9*3等位基因频率(41.3%)也显著高于对照组(17.5%),提示冠心病发病可能和CYP2C9基因多态性有关,即CYP2C9*3突变增加了冠心病的发病危险,这似乎可以用CYP2C9酶对EET代谢的影响来解释,因为CYP2C9*3型基因突变导致CYP2C9酶活性降低,进而导致EET生成减少,从而减弱了EET的血管舒张和血管内皮保护的作用,进而导致冠心病的发病风险增加。本研究中对照组CYP2C9*3等位基因频率为17.5%,低于Hong等^[9]报道的中国人CYP2C9*3等位基因频率33%,可能是因为本研究中对照组研究对象均为年龄较大的冠状动脉造影正常者,也可以从侧面说明CYP2C9*1野生型基因可能对心血管系统具有保护作用,延缓了冠心病的发生发展,这需要进一步的对照研究。本研究中虽然未发现CYP2C9基因多态性与血脂间存在显著性关联,但CYP2C9*3基因型组与CYP2C9*1基因型组比较,CYP2C9*3基因型组低密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白B有增高趋势,而低密度脂蛋白胆固醇和载脂蛋白B为冠心病重要危险因素,这种表现趋势与冠心病组CYP2C9*3突变基因型表现率显著高于对照组的的结果是一致的,两者间关系出现阴性结果是否和CYP2C9*3突变基因型组研究例数少有关,还值得进一步研究。因CYP2C9基因突变率在中国人中很低,造成研究所需样本量较大,本研

究所得结论尚需加大样本量进一步分析以得到更可信的结论。本研所得结论,可能会对临床中冠心病的预防、诊断提供一定的参考价值。同时,因一些心血管系统常用药物如华法林、沙坦类降压药主要经CYP2C9酶代谢,而CYP2C9基因多态性明显影响CYP2C9酶活性,进而影响药物代谢,因此,对一些罹患心血管疾病的患者进行CYP2C9基因型检测,可对临床治疗中进行个体化用药提供一定的帮助。

[参考文献]

- [1] 徐敏,孙建辉,罗光华,等. 脂蛋白相关磷脂酶A2基因R92H基因多态性与汉族人群冠心病易感性的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(12): 965-968
- [2] Fleming I. Cytochrome p450 and vascular homeostasis [J]. *Circ Res* 2001, 89(9): 753-762
- [3] Daksh BE, Lasker M, Raucy JL, et al. Regio- and stereoselective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P450 2C8 and 2C9 [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 1994, 271(3): 1427-433
- [4] Fisslthaler B, Popp R, Kiss I, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries [J]. *Nature* 1999, 401(6752): 493-497
- [5] Quilley J, McGiff JC. Is EDHF an epoxyeicosatrienoic acid [J]? *Trends Pharmacol Sci* 2000, 21(4): 121-124
- [6] Kirchheiner J, Brockmoller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms [J]. *Clin Pharmacol Ther* 2005, 77(1): 1-16
- [7] 杨天伦,陈美芳,谢启应,等. 沙坦类药物代谢酶CYP2C9和受体AT1基因的遗传多态性在高血压患者中的分布特征[J]. 中草药, 2007, 38(1): 6-8
- [8] Magnus IS, Ann KD, Diniel WN, et al. CYP2C9 allele nomenclature [EB/OL]. <http://www.cypallele.ki.se/CYP2C9.htm>. 2007-04-04
- [9] Hong X, Zhang S, Mao G, et al. CYP2C9*3 allelic variant is associated with metabolism of ibesartan in Chinese population [J]. *Eur J Clin Pharmacol* 2005, 61(9): 627-634
- [10] Bae JW, Kim HK, Kim JH, et al. Allele and genotype frequencies of in a Korean population [J]. *Br J Clin Pharmacol* 2005, 60(4): 418-422
- [11] Nakai K, Habano W, Nakai K, et al. Ethnic differences in CYP2C9*2 (Arg144Cys) and CYP2C9*3 (Ile359Leu) genotypes in Japanese and Israeli populations [J]. *Life Sci* 2005, 78(1): 107-111
- [12] 李智,王果,周宏瀛. CYP2C9基因多态性及其功能意义研究进展[J]. 中国临床药理学及治疗学, 2008, 13(6): 601-609
- [13] 王启明,卢桥发,甄海宁,等. CYP2C9, GST M1基因多态性与肺癌易感性的关系[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(1): 8-10
- [14] Yasar U, Bennet AM, Eliasson E, et al. Allelic variants of cytochromes P4502C modify the risk for acute myocardial infarction [J]. *Pharmacogenetics* 2003, 13(12): 715-720
- [15] Yu BN, Luo CH, Wang D, et al. CYP2C9 allele variants in Chinese hypertension patients and healthy controls [J]. *Clin Chim Acta* 2004, 348(1-2): 57-61

(此文编辑 李小玲)