

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.21.029

基于药物基因位点检测的华法林、氯吡格雷、阿司匹林用药分析*

徐建东¹, 易娟娟¹, 吴婉静², 宋海林¹, 陈亚珠¹, 张晓燕¹, 陶晓琰¹, 李国文^{2△}

(1. 上海市虹口区江湾医院药剂科, 上海 200434; 2. 上海市中西医结合医院药剂科, 上海 200434)

摘要:目的 提高常用抗栓药物华法林、氯吡格雷、阿司匹林的临床疗效与安全性。方法 选取上海市中西医结合医院心内科2017年1月至2018年12月使用硫酸氢氯吡格雷片、阿司匹林肠溶片、华法林钠片治疗的住院患者169例,采用荧光染色原位杂交检测法检测患者血样的相关单核苷酸多态性基因位点。采用SPSS 18.0统计学软件对各基因位点的基因型分布进行Hardy-Weinberg检验,判断等位基因频率分布是否符合Hardy-Weinberg平衡定律。结果 169例患者中,共检测12个药物相关基因位点。其中,56例使用华法林的患者测量基因位点VKORC1-1639 G > A, CYP2C9 * 3 1075 A > C; 125例使用氯吡格雷的患者测量基因位点PON1 576 A > G, CYP2C19 * 2 681 G > A, CYP2C19 * 3 636 G > A, CYP2C19 * 17 806 C > T, ABCB1 3435 T > C; 83例使用阿司匹林的患者测量基因位点GP IIIa PLA2 T > C, PEAR1 G > A, PTGS1-842 A > G, GP1BA 5792 C > T, GSTP1 313 A > G;除PTGS1未发现G等位基因外,其余基因位点的基因频率分布均符合Hardy-Weinberg平衡定律,样本具有群体代表性。结论 各药物基因表现出自身的分布特点,临床治疗中应根据患者的基因多态性制订用药方案,推动精准治疗工作的开展。

关键词:抗栓;华法林;氯吡格雷;阿司匹林;药物基因组学;单核苷酸多态性

中图分类号:R95;R973⁺.2

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)21-0106-05

Medication Analysis of Warfarin, Clopidogrel and Aspirin Based on the Detection of Drug-Related Gene Loci

XU Jiandong¹, YI Juanjuan¹, WU Wanjiang², SONG Hailin¹, CHEN Yazhu¹, ZHANG Xiaoyan¹, TAO Xiaoyan¹, LI Guowen²

(1. Department of Pharmacy, Shanghai Hongkou Jiangwan Hospital, Shanghai, China 200434; 2. Department of Pharmacy, Shanghai TCM-Integrated Hospital, Shanghai, China 200434)

Abstract: Objective To improve the clinical efficacy and safety of common antithrombotic drugs including warfarin, clopidogrel and aspirin. **Methods** A total of 169 inpatients who were treated with Clopidogrel Bisulfate Hydrogen Sulphate Tablets, Aspirin Enteric-Coated Tablets and Warfarin Sodium Tablets in the Department of Internal Medicine-Cardiovascular in the Shanghai TCM-Integrated Hospital were selected. The related single nucleotide polymorphism (SNP) in blood sample of patients was detected by fluorescence staining in situ hybridization. The genotype distribution of each gene locus was tested by the Hardy-Weinberg equilibrium test with SPSS 18.0 statistical software to judge whether the distribution of allele frequency accorded with Hardy-Weinberg equilibrium law. **Results** A total of 12 drug-related gene loci were detected in 169 patients, of which two gene loci including VKORC1-1639 G > A and CYP2C9 * 3 1075 A > C of 56 patients who treated with warfarin were tested, five gene loci PON1 576 A > G, CYP2C19 * 2 681 G > A, CYP2C19 * 3 636 G > A, CYP2C19 * 17 806 C > T, ABCB1 3435 T > C of 125 patients who treated with clopidogrel were tested, gene loci GP IIIa PLA2 T > C, PEAR1 G > A, PTGS1-842 A > G, GP1BA 5792 C > T, GSTP1 313 A > G of 83 patients who treated with aspirin were tested. The gene frequency distribution of other gene loci accorded with Hardy-Weinberg equilibrium law except for PTGS1 without G allele, which indicated the sample was group representation. **Conclusion** Each drug-gene shows its distribution characteristics. In clinical treatment, the medication regimen should be formulated according to the patients' gene polymorphism to promote the development of precision treatment.

Key words: antithrombotic; warfarin; clopidogrel; aspirin; pharmacogenomics; single nucleotide polymorphism

阿司匹林、氯吡格雷为常用抗血小板药物,而华法林为常用抗凝药物,根据病情需要单独应用其中1种,二联甚至三联疗法的治疗方案常见^[1]。多数患者在抗栓治疗过程中获益,但由于药物反应个体差异、临床疗

效差异大、不良反应频发、病情反复等原因,给医务人员和患者带来严重困扰。研究发现,CYP2C9和VKORC1基因多态性影响华法林的剂量和疗效^[2]。2010年,美国食品药品监督管理局(FDA)发布了关于氯吡格雷药物包装

*基金项目:上海市自然科学基金[18ZR1436400];上海市药学会医院药学科研基金[2019-YY-26];上海市虹口区国医强优中医药科研基金项目[HGY-KY-2018-18]。

第一作者:徐建东,大学本科,主任药师,研究方向为药事管理和临床药学,(电话)021-65422593(电子信箱)tq0506@qq.com。

△通信作者:李国文,博士,主任药师,研究方向为中药制剂和新药,(电子信箱)15921248270@163.com。

上的盒装警告,要求检测药物基因型以明确患者氯吡格雷的代谢变化、不良反应风险、基因多态性对氯吡格雷的代谢及临床影响。阿司匹林抵抗发生率存在明显的种族差异,基因多态性在阿司匹林抵抗中起着重要作用,主要集中在血小板表面糖蛋白Ⅲa(GPⅢa)、血小板内皮聚集受体 1(PEAR1)、前列腺素内过氧化物合酶 1(PTGS1)等^[3]。在此,通过分析群体药物相关单核苷酸的多态性,为临床医师的抗凝用药提供参考。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择上海市中西医结合医院心内科 2017 年 1 月至 2018 年 12 月使用硫酸氢氯吡格雷片(赛诺菲制药有限公司,国药准字 J20130083)、阿司匹林肠溶片(拜耳医药保健有限公司,国药准字 J20130087)、华法林钠片(上海上药信谊药厂有限公司,国药准字 H31022123)治疗并进行相关基因检测的住院患者 169 例。于医院信息管理系统中收集患者的性别、年龄、民族、用药情况等相关信息。

1.2 方法

采用荧光染色原位杂交检测法对患者血样的药物相关基因位点进行检验,仪器为 Fluotec 48E 型微量荧光检测仪(西安天隆科技有限公司)。

荧光分子杂交测序:1)EDTA 抗凝管采集到的临床全血样本,上下颠倒混匀。取若干 1.5 mL 离心管,并在管盖上编写序号,与抗凝管上的编号一致。2)采用 H1620-W 型水平转子离心机(湖南湘仪公司),于 1.5 mL 离心管中加入 1.2 mL $1 \times \text{NH}_4\text{Cl}$ 预处理液。3)取 150 μL 混匀的临床全血,加入对应编号的 $1 \times \text{NH}_4\text{Cl}$ 预处理液离心管中。4)上下颠倒 10 次,室温静置 5 min,此时 $1 \times \text{NH}_4\text{Cl}$ 裂解红细胞。血样与 $1 \times \text{NH}_4\text{Cl}$ 混匀,液体颜色会逐渐变为澄清的红色。5)室温 700 g 离心 5 min,将上层透明红色液体吸干净,注意避免吸走管底白细胞。6)加入 1 mL $1 \times \text{NH}_4\text{Cl}$ 彻底重悬白细胞,室温 700 g 离心 5 min,将上层液体吸干净,注意避免吸走管底白细胞。7)向富集有白细胞的离心管中加入 50 μL 核酸纯化保存液,反复吹打混匀。8)上机检测时加入 1.5 μL 处理液,处理后样本置测序反应通用试剂盒中选择相应温度检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,采用 Hardy-Weinberg 检验等位基因分布的独立性。 $P > 0.05$ 表示符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。

2 结果

2.1 一般资料

169 例患者的平均年龄(77.82 ± 10.57)岁;男 67 例(39.64%),女 102 例(60.36%);均为汉族;使用华法林 56 例,氯吡格雷 125 例,阿司匹林 83 例。

2.2 基因型与表现型

2.2.1 华法林

VKORC1 分型:GG 2 例,GA 11 例,AA 43 例,A 等位基因频率为 86.61%;CYP2C9 分型:AA 49 例,AC 7 例,C 等位基因频率为 6.25%。详见表 1。

表 1 3 种抗凝药物基因型频率分布[例(%)]

Tab. 1 The genotype frequency distribution of three anticoagulant drugs[case(%)]

药物	基因	位点	基因型	数量	频率(%)	χ^2 值	P 值	
华法林 (n = 56)	VKORC1	- 1639 G > A	AA	43	76.79	1.32	0.25	
			GA	11	19.64			
			GG	2	3.57			
	CYP2C9 * 3	1075 A > C	AA	49	87.50	0.25	0.62	
			AC	7	12.50			
氯吡格雷 (n = 125)	PON1	576 A > G	AG	59	47.20	0.00	0.98	
			GG	48	38.40			
			AA	18	14.40			
	CYP2C19 * 2	681 G > A	GA	51	40.80	3.12	0.08	
			GG	48	38.40			
			AA	26	20.80			
	CYP2C19 * 3	636 G > A	GG	113	90.40	0.32	0.57	
			GA	12	9.60			
	CYP2C19 * 17	806 C > T	CC	123	98.40	0.01	0.93	
			CT	2	1.60			
	ABCB1	3435 T > C	TC	58	46.40	0.01	0.94	
			CC	51	40.80			
			TT	16	12.80			
阿司匹林 (n = 83)	GPⅢa PLA2	T > C	TT	80	96.39	0.03	0.87	
			TC	3	3.61			
	PEAR1	G > A	GA	37	44.58	0.34	0.56	
			GG	32	38.55			
			AA	14	16.87			
	PTGS1	- 842 A > G	AA	83	100.00	-	-	
	GPIBA	5792 C > T	CC	75	90.36	2.62	0.11	
			CT	7	8.43			
			TT	1	1.20			
	GSTP1	313 A > G	AA	49	59.04	2.43	0.12	
			AG	26	31.33			
			GG	8	9.64			

注: - 为无法计算。

Note: - means that can't be calculated.

2.2.2 氯吡格雷

PON1 分型:GG 48 例,AG 59 例,AA 18 例,G 等位基因频率为 62.00%;CYP2C19*2 分型:GG 48 例,GA 51 例,AA 26 例,A 等位基因频率为 41.20%;CYP2C19*3 分型:GG 113 例,GA 12 例,A 等位基因频率为 4.80%;CYP2C19*17 分型:CC 123 例,CT 2 例,T 等位基因频率为 0.80%;ABCB1 分型:TC 58 例,CC 51 例,TT 16 例,

C 等位基因频率为 64.00%。CYP2C19 * 2, CYP2C19 * 3, CYP2C19 * 17 等位基因可导致人群出现慢代谢型、中间代谢型、快代谢型和超快代谢型 4 种表型。详见表 1 和表 2。

表 2 服用氯吡格雷患者的 CYP2C19 基因型及表现型分布 (n=125)
Tab. 2 CYP2C19 genotype and phenotype distribution of patients treated with clopidogrel (n=125)

表现型	基因型			例数	频率(%)
	CYP2C19 * 2	CYP2C19 * 3	CYP2C19 * 17		
超快代谢型	GG	GG	CT/TT	0	0
快代谢型	GG	GG	CC	41	32.80
中间代谢型	GA	GG	CC	47	43.20
	GG	GA	CC	6	
	GG	GA	CT	1	
慢代谢型	AA	GG	CC	25	24.00
	GA	GA	CC	4	
	AA	GA	CC	1	

2.2.3 阿司匹林

GPⅢa PLA2 分型: TT 80 例, TC 3 例, C 等位基因频率为 1.81%; PEAR1 分型: GG 32 例, GA 37 例, AA 14 例, A 等位基因频率为 39.16%; PTGS1 分型: AA 83 例, G 等位基因频率为 0; GP1BA 分型: CC 75 例, CT 7 例, TT 1 例, T 等位基因频率为 5.42%; 谷胱甘肽巯基转移酶 P1(GSTP1)分型: AA 49 例, AG 26 例, GG 8 例, G 等位基因频率为 25.30%。PTGS1 基因多态性的 G 等位基因频率为 0, 因此, 无法计算 χ^2 值, 其余基因型的频率未显著偏离 Hardy - Weinberg 均衡。详见表 1。

3 讨论

3.1 华法林用药相关基因检测

华法林通过抑制维生素 K 依赖性凝血因子(Ⅱ, Ⅶ, Ⅸ, X)的活化来介导抗凝作用^[4]。不同个体之间维持剂量存在较大差异, 主要与 VKORC1 和 CYP2C9 有关。VKORC1 为华法林的作用靶点, 是维生素 K 代谢过程中的限速酶, 决定了维生素 K 环氧还原酶的活性^[5], 控制维生素 K 依赖性凝血因子生成。突变 AA 型患者的 VKORC1 酶表达水平下降, 维生素 K 循环受限。由表 1 可知, 华法林 VKORC1 - 1639 AA 型患者 43 例(76.79%)需使用小剂量, GA 型 11 例(19.64%)需减少剂量。华法林经 CYP2C9 代谢失活, CYP2C9 具有高度多态性, CYP2C9 * 3 在亚洲人中更普遍^[6], CYP2C9 基因突变导致华法林在体内蓄积, 应减量, VKORC1 和 CYP2C9 基因检测结果用于起始剂量和维持剂量的计算。文献[7-8]显示, 华法林的维持剂量存在民族差异。华法林的维持剂量随着 VKORC1 的变异而降低, 纯合子 VKORC1 变异携带者在白种人、西班牙人和亚洲人中分别为 15%, 15%, 79%。因此, 华法林用量白种人最高,

亚洲人最低。国际华法林遗传药理学协会(IWPC)根据不同种族人群的大量数据提炼遗传药理学的剂量计算法则, 应用于华法林剂量的调整^[9]。VKORC1 - 1639 AA 型在中国人群中占多数, 可能是中国人华法林应用剂量偏低的原因。2007 年, PDA 已把遗传药理学的信息增加到华法林产品标签中^[10]。

3.2 氯吡格雷用药相关基因检测

氯吡格雷作为一种前体药物, 经口服后在小肠中的吸收受到 ABCB1 基因编码的 P - 糖蛋白调控, 85% 在血液中转化为非活性的氯吡格雷酸并被代谢掉, 余下 15% 在肝脏中通过细胞色素 P450 酶、PON1 酶等催化转化为活性代谢物, 选择性地、不可逆地与血小板中的 P2Y₁₂ 受体结合, 抑制血小板聚集^[11]。在氯吡格雷转化为活性代谢物的过程中, 细胞色素 P450 酶系起着非常重要的作用。细胞色素 P450 在单加氧酶家族中属高度多态性酶系, 基因多态性与酶的活性紧密相关。其中主要以 CYP2C19 * 2 在基因介导的氯吡格雷反应中占主导作用。CYP2C19 的表型多态性具有明显的种族差异, 白种人慢代谢型发生率仅为 3%, 津巴布韦黑种人慢代谢型发生率仅为 4%, 中国人慢代谢型发生率仅为 15% ~ 17%^[12]。本研究中, 对 125 例服用氯吡格雷的患者进行 CYP2C19 * 2, CYP2C19 * 3 和 CYP2C19 * 17 等位基因检测, 其中超快代谢型为 0, 快代谢为 32.80%, 中间代谢为 43.20%, 慢代谢为 24.00%。对于中间代谢型和慢代谢型患者在使用氯吡格雷时应注意氯吡格雷抵抗。2015 年实行的《药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)概要》^[13]建议 CYP2C19 * 1/*1 基因型个体应用氯吡格雷有效, 可常规使用; CYP2C19 * 2/*3 基因型个体对氯吡格雷疗效降低, 建议更换为普拉格雷或替卡格雷; CYP2C19 * 2/*3 突变型纯合子个体应用氯吡格雷效果差, 建议换用普拉格雷或替卡格雷。同时, CYP2C19 的活性受多种药物影响, 质子泵抑制剂(PPI)作为该酶的底物可竞争性地抑制氯吡格雷的代谢。国家药品监督管理局药品不良反应信息通报(第 55 期)《警惕质子泵抑制剂的骨折、低镁血症风险以及与氯吡格雷的相互作用》及文献[14-15]显示, 某些 PPI 会降低氯吡格雷的疗效, 患者血栓不良事件增加。其中, 奥美拉唑对 CYP2C19 具有高度亲和力, 大大降低氯吡格雷疗效, 因而抗血小板作用影响最强, 泮托拉唑具有独特的 II 相代谢途径, 所以对氯吡格雷影响最弱。

3.3 阿司匹林用药相关基因检测

3.3.1 阿司匹林抵抗相关基因

阿司匹林抵抗通常是指阿司匹林不能发挥预期的生物学作用或不能预防栓塞性疾病, 发生率为 5.5% ~ 60.0%^[16]。基因多态性在阿司匹林抵抗中起着重要作用, 主要集中

在 GPⅢa, PEAR1, PTGS1 等。

GPⅢb/Ⅲa 是血小板表面的受体蛋白,与 vWF 和纤维蛋白原均可引发血小板的聚集,是血小板激活的最后环节。其中,GPⅢa 是一种多型蛋白,最常见的等位基因亚型是 PLA1 和 PLA2。PLA2 位点的外显子 2 位置的 T 突变为 C,导致 GPⅢa 蛋白的第 33 个位点从脯氨酸变为亮氨酸。体外研究表明,PLA2 基因突变可增加血小板表面的 GPⅢb/Ⅲa 对纤维蛋白原的反应,增加血小板聚集,这是导致阿司匹林抵抗的主要原因^[17]。

PEAR1 是参与血小板激活途径的一种横跨细胞膜的分子,磷酸化作用可促进血小板聚集。研究证明,中国人群中 PEAR1 的野生 G 基因的基因频率为 0.61%,突变 A 基因的基因频率为 0.39%^[18]。突变基因型 AA 或 AG 的患者使用阿司匹林(或结合氯吡格雷)时的心肌梗死发生率和死亡率会增高。

阿司匹林主要通过抑制环氧合酶 1(COX-1)和环氧合酶 2(COX-2)发挥药理作用,可使 COX-1 位点甲基化而使该酶失活,阻断血小板聚集反应。阿司匹林对 COX-2 的抑制作用远低于 COX-1,且有研究表明主要是编码 COX-1 的 PTGS1 基因多态性与发生阿司匹林抵抗相关。LEPÄNTALO 等^[19]以血小板聚集率为标准定义阿司匹林抵抗,发现 60% 的阿司匹林抵抗患者均携带突变位点 G,而无阿司匹林抵抗者仅有 17% 携带突变基因。

由表 1 可知,阿司匹林 PTGS1 基因无患者携带突变位点 G,均为 AA 野生型。GPⅢa PLA2 等位基因由 T 突变为 C 有 3 例,突变频率为 3.61%。PEAR1 基因 AA 型 14 例,突变频率为 16.87%;GA 型 37 例,突变频率为 44.58%。应注意患者发生阿司匹林抵抗的风险。

3.3.2 其他相关基因

MATSUBARA 等^[20]首次发现,GP1BA 基因 145Thr 突变为 Met(即 5792 C>T)会增强患者对阿司匹林抗血小板的敏感性。SHIOTANI 等^[21]研究发现,GSTP1 基因的 G 位点可能与肠道出血的风险增加有关,GG 型和 AG 型使用阿司匹林消化道出血风险增加。本研究结果显示,GP1BA 基因 CT 型 7 例,突变频率为 8.43%,对阿司匹林抗血小板的敏感性增强。提示用药过程中应关注患者的出血风险。GSTP1 基因 GG 型 8 例,突变频率为 9.64%;AG 型 26 例,突变频率为 31.33%。可见,此基因类型患者在使用阿司匹林时应密切关注消化道出血风险。

3.4 小结

华法林的出血风险,氯吡格雷和阿司匹林的抵抗,均会导致患者心血管不良事件的发生率大大增加。除了疾病和依从性因素外,相关基因突变是造成药物出血或抵抗的重要因素。基因型检测可为临床提供患者药物相

关的遗传信息,结合临床实际和相关实验室检查结果,对实行个体化治疗具有重要意义。

参考文献

- [1] 谢泽彦. 阿司匹林、氯吡格雷和华法林三联抗栓方案在冠心病治疗中的应用[J]. 世界最新医学信息文摘,2017,17(72):63.
- [2] 刘治军,胡欣,傅得兴. 药物基因组学在个体化医疗中的应用进展和实例[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(24):2107-2110.
- [3] 石秀锦,胡志旭,彭文星,等. GPⅢa PLA2、PEAR1、PTGS1 基因多态性与阿司匹林临床抗血栓疗效关联性研究[J]. 中国药物应用与监测,2018,15(1):1-4.
- [4] 许建文,刘亦伟,林荣芳,等. 基因多态性对华法林谷浓度及维持剂量的影响[J]. 中国现代应用药学,2020,37(19):2378-2382.
- [5] 张阳,宋沧桑,王威丽,等. 基于 CYP2C9 和 VKORC1 基因检测指导华法林剂量的临床研究[J]. 中国医院药学杂志,2020,40(10):1140-1144.
- [6] MAK M, LAM C, PINEDA SJ, et al. Pharmacogenetics of warfarin in a diverse patient population[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2019,24(6):521-533.
- [7] KAYE JB, SCHULTZ LE, STEINER HE, et al. Warfarin pharmacogenomics in diverse populations[J]. Pharmacotherapy, 2017, 37(9):1150-1163.
- [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] KLEIN TE, ALTMAN RB, ERIKSSON N, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data[J]. N Engl J Med, 2009,360(8):753-764.
- [10] ANCRENAZ V, DAALI Y, FONTANA P, et al. Impact of genetic polymorphisms and drug-drug interactions on clopidogrel and prasugrel response variability[J]. Curr Drug Metab, 2010, 11(8):667-677.
- [11] 周婷婷. 氯吡格雷抵抗与基因多态性的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志,2017,33(13):1276-1279.
- [12] 付良青,吴德政. 细胞色素氧化酶 P450 及其遗传多态性[J]. 中国药理学通报,2001,17(1):21-25.
- [13] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. 药物代谢酶和药物作用靶点基因检测技术指南(试行)概要[J]. 实用器官移植电子杂志,2015,3(5):257-267.
- [14] 刘书源,苏长海,苏伊新. 口服抗栓药与质子泵抑制剂相互作用的研究进展[J]. 中国药师,2019,22(1):137-140.
- [15] JUURLINK DN, GOMES T, KO DT, et al. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and ST-segment clopidogrel[J]. CMAJ, 2009,180(7):713-718.
- [16] GASPARYAN AY, WATSON T, LIPG H, et al. The Role of Aspirin in Cardiovascular Prevention: Implications of Aspirin Resistance[J]. J AM Coll Cardiol, 2008,51(19):1829-1843.
- [17] VERSCHUREN JJ, TROMPET S, WESSELS JA, et al. A systematic review on pharmacogenetics in cardiovascular disease: is it