

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.017

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.017>

海南省黎族与汉族持续性心房颤动患者 CYP2C9*3 基因多态性差异

白敏, 陈向红, 郭照军, 陈磊, 王超, 吴曾繁

(海南医学院第二附属医院心血管内科, 海口 570311)

[摘要] 目的: 分析罹患持续性心房颤动的海南省黎族与汉族患者细胞色素P450酶2C9*3 (CYP2C9*3)基因多态性分布, 评估CYP2C9*3基因多态性对患者稳定服用华法林剂量的影响。方法: 选取2017年1月至2018年12月于海南医学院第二附属医院就诊的罹患持续性心房颤动的海南省黎族患者100例为研究组, 同期海南医学院第二附属医院持续性心房颤动的汉族患者100例为对照组。记录两组研究对象的血清华法林浓度、国际标准化比率(international normalized ratio, INR)达标时间、华法林平均日剂量及总剂量; 提取两组基因组DNA, 采用扩增阻滞突变体系-聚合酶链式反应技术(amplification refractory mutation system, ARMS-PCR)对CYP2C9*3基因位点进行基因分型。结果: 研究组患者A/A与A/C基因型及等位基因A频率显著低于对照组($P < 0.05$), C/C基因型及C频率显著高于对照组($P < 0.05$)。两组不同基因型患者华法林稳定剂量及血清华法林浓度存在差异, 均为A/A型最大($P < 0.05$), 而A/C型与C/C型无差异($P > 0.05$); 研究组A/A基因型患者华法林稳定剂量及血清华法林浓度低于对照组($P < 0.05$), 但两组A/C与C/C基因型患者华法林稳定剂量及血清华法林浓度均无差异($P > 0.05$)。A/A基因型黎族持续性心房颤动患者的INR达标时间、华法林平均日剂量及总剂量最高, C/C基因型最低, A/C基因型次之($P < 0.05$)。结论: CYP2C9基因多态性与持续性心房颤动的海南省黎族患者稳定服用华法林剂量密切相关, C/C型CYP2C9基因持续性心房颤动的海南省黎族患者INR达标时间、华法林平均日剂量及总剂量更低。

[关键词] 持续性心房颤动; 华法林; 细胞色素P450酶2C9基因; 多态性

Different genetic polymorphisms of CYP2C9*3 in Li and Han population patients with persistent atrial fibrillation in Hainan Province

BAI Min, CHEN Xianghong, GUO Zhaojun, CHEN Lei, WANG Chao, WU Zengfan

(Department of Vasculocardiology, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570311, China)

Abstract Objective: To investigate the association of genetic polymorphisms in CYP2C9*3 with warfarin dosage in Li

收稿日期 (Date of reception): 2019-03-01

通信作者 (Corresponding author): 陈向红, Email: 18942895@qq.com

基金项目 (Foundation item): 海南省卫生与计划生育委员会科研项目 [琼卫教科(2018)10号]。This work was supported by Scientific Research Project of Hainan Provincial Health and Family Planning Commission, China [Qiongwei Science (2018) 10].

population patients with persistent atrial fibrillation (PAF) in Hainan Province. **Methods:** A total of 100 Li population patients diagnosed as PAF in our hospital were collected to research group. And 100 Han population patients diagnosed as PAF in the same hospital were collected to control group from January 2017 to December 2018. The indexes of serum warfarin levels, international normalized ratio (INR) standard time, warfarin average daily dosage and warfarin total dosage of two groups were recorded. The DNA samples of two groups were extracted. Then the SNP sites of *CYP2C9*3* gene were genotyped by amplification refractory mutation system (ARMS-PCR) method. **Results:** Compared to control group, the genotype frequencies of A/A and A/C and the allele frequency of A in research group were lower ($P<0.05$), and the genotype frequencies of C/C and the allele frequency of C in research group were higher ($P<0.05$). The warfarin stable dosage and serum warfarin levels in two groups were different among three genotypes ($P<0.05$). The A/A genotype of warfarin stable dosage levels and serum warfarin levels was highest, and the A/C and C/C genotypes were no different ($P>0.05$). The A/A genotype of warfarin stable dosage levels and serum warfarin levels in research group was lower than in control group ($P<0.05$), but the A/C and C/C genotype of warfarin stable dosage levels and serum warfarin levels were no different between two groups ($P>0.05$). The INR standard time, warfarin average daily dosage and warfarin total dosage of Li population patients with PAF were different, and the sequence were A/A>C/C>A/C ($P<0.05$). **Conclusion:** The polymorphisms on *CYP2C9*3* gene is related to warfarin stable dosage levels of Li population patients with PAF. And the INR standard time, warfarin average daily dosage and warfarin total dosage with C/C genotype of *CYP2C9*3* gene are lower than those with A/A and A/C.

Keywords persistent atrial fibrillation; warfarin; *CYP2C9*; polymorphism

持续性心房颤动(以下简称房颤)患者存在高血管栓塞的风险,因此国内外多个房颤临床治疗指南均推荐持续性房颤患者口服华法林抗凝,并且临床研究也证实华法林可有效预防持续性房颤患者的血栓形成及降低血管栓塞概率^[1]。华法林会显著影响体内凝血-抗凝系统,目前临床主要通过国际标准化比率(international normalized ratio, INR)进行动态监测^[2]。但临床实践^[3]发现:华法林临床应用剂量的个体差异较大,剂量很难用相对统一的药代动力学公式进行计算。研究^[4]证实:以细胞色素P450酶2C9*3(cytochrome P450 2C9*3, *CYP2C9*3*)为代表的某些基因多态性分布是造成华法林维持剂量个体差异的主要因素之一。海南省是我国黎族居民聚集地区,使用华法林的持续性房颤黎族患者数量逐年上升,目前尚没有临床研究对黎族患者群体的*CYP2C9*3*基因多态性分布特点以及对华法林维持剂量影响进行评估,因此本研究对此进行探讨。

1 对象与方法

1.1 对象

选取2017年1月至2018年12月于海南医学院第二附属医院住院就诊的持续性房颤黎族患者

100例作为为研究组,其中男53例,女47例;年龄46~69(57.5±11.2)岁。其中扩张型心肌病11例,缺血性心脏病89例。选取同期海南医学院第二附属医院住院的持续性房颤汉族患者100例为对照组,其中男55例,女45例;年龄47~75(61.8±14.5)岁。扩张型心肌病10例,缺血性心脏病90例。

纳入标准:1)临床确诊为持续性房颤;2)合并慢性心衰,纽约心脏病学会(New York Heart Association, NYHA)分级为3~4级;3)服用华法林达到稳定剂量,平均每个月监测1次INR。排除标准:1)合并有严重肝肾肺等重要脏器功能不全;2)同时服用阿司匹林、胺碘酮以及维生素K等影响华法林代谢药物以及影响CYP450酶活性药物;3)近期罹患活动性溃疡、支气管扩张等出血性疾病;4)罹患血液病、凝血系统障碍以及甲状腺功能异常等。本研究患者相互间均无血缘关系,且均对本研究知情,并自愿签署知情同意书。本研究经海南医学院第二附属医院医学伦理委员会审核批准。两组患者年龄、性别比、病程、体重指数(BMI)及原发疾病等方面差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 基础信息采集

收集两组患者姓名、性别、民族、年龄、体

重、吸烟状况、诊断、INR、INR达标时间、华法林平均日用量和达标时华法林总用量、服药时间以及合并用药、富含维生素K食物摄入情况等基本信息。华法林稳定剂量=实际华法林剂量/INR值。

1.3 CYP2C9 基因分型检测

1.3.1 基因组 DNA 提取

两组患者均在入组后次日清晨空腹抽取肘静脉外周血5 mL, 置于EDTA-Na抗凝管中, 加红细胞裂解液后摇晃5~6次, 在室温下放置10 min, 获得白细胞, 应用DNA提取试剂盒(Blood DNA MiniKit, 英国Crawley公司)提取样本基因组DNA。提取的DNA样本置于-20 °C冰箱保存待检。

1.3.2 扩增阻滞突变体系-聚合酶链式反应技术基因分型

本研究采用扩增阻滞突变体系-聚合酶链式反应技术(amplification refractory mutation system, ARMS-PCR)和DNA直接测序技术对CYP2C9*3(1075A-C)基因进行基因分型, 引物序列为: 5'-CATGCAAGACAGGAGCCAC-3'及5'-TTGGGAATGAGATAGTTTCTGAATT-3', 扩增和测序引物为上海生工公司合成。PCR扩增时以GAPDH为阳性对照, 扩增条件PCR反应体系为25 μL, 其中10×PCR Buffer 12.5 μL、引物探针混合液6.5 μL、超纯水4 μL、基因组DNA 2 μL。应用美国安捷伦Mx3000荧光定量PCR仪器进行PCR, 反应条件: 95 °C预变性3 min, 95 °C变性30 s, 57 °C复性0.5 min, 60 °C延伸0.5 min, 30个循环后72 °C延伸10 min。

1.4 华法林浓度测定

两组患者入组后接受华法林口服治疗, 定期监测INR, 使INR保持在1.35左右, 采集患者的肘静脉外周血5 mL, 以1 500 r/min离心5 min, 将血浆转移至Nansep 10k (美国Pall公司), 在37 °C水浴

1 h后, 2 400 r/min离心10 min, 将离心后的200 μL超滤液中加入0.1 mol/L乙酸20 μL, 震荡30 s, 再加入乙酸乙酯1 mL, 震荡2 min, 再以5 000 r/min离心5 min, 取800 μL上清液在氮气下吹干, 再加入100 μL复溶液震荡1 min后以14 000 r/min高速离心10 min。最后将上清液转移至进色谱及质谱条件色谱柱(Acquity UPLC BEH C18, 50 mm×2.1 mm)检测华法林浓度^[5]。

1.5 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件进行数据分析。采用Hardy-Weinberg遗传平衡检验群体代表性; 计量资料数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。不同基因型间华法林剂量比较均先进行Levene方差齐性检验。两组间均数比较采用成组t检验; 多组间均数比较采用ANOVA分析, 两两比较采用LSD-t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CYP2C9*3(1075A-C) 基因型频率和等位基因频率比较

研究组患者A/A与A/C基因型频率显著低于对照组(P<0.05), C/C基因型频率显著高于对照组(P<0.05); 而研究组患者等位基因A频率显著低于对照组(P<0.05), C频率显著高于对照组(P<0.05, 表1)。

2.2 两组不同基因型患者的血清华法林浓度比较

两组不同基因型患者的血清华法林浓度均存在差异, 均为A/A型最大(P<0.05), 而A/C型与C/C型差异无统计学意义(P>0.05); 研究组A/A基因型患者的血清华法林浓度显著低于对照组(P<0.05), 但两组之间A/C与C/C基因型患者的血清华法林浓度差异无统计学意义(P>0.05, 表2)。

表1 两组患者CYP2C9*3(1075A-C)基因型及等位基因频率比较(n=100)

Table 1 Comparison of the genotype and allele frequencies of CYP2C9*3 (1075A-C) between the 2 groups (n=100)

组别	基因型/[例(%)]			等位基因/[例(%)]	
	A/A	A/C	C/C	A	C
研究组	85 (85.0)	3 (3.0)	12 (12.0)	173 (86.5)	27 (13.5)
对照组	92 (92.0)	6 (6.0)	2 (2.0)	190 (95.0)	10 (5.0)
χ^2	5.345	8.736	11.445	5.688	9.267
P	0.039	0.001	0.001	0.031	0.001

表2 两组不同基因型患者的血清华法林浓度比较

Table 2 Comparison of serum warfarin concentrations in patients with different genotypes between the 2 groups

组别	华法林浓度/(ng·mL ⁻¹)			F	P
	A/A	A/C	C/C		
研究组	638.5 ± 106.2	612.4 ± 87.1	601.6 ± 98.4	4.856	0.045
对照组	675.8 ± 92.3	616.5 ± 94.2	607.4 ± 103.5	4.928	0.042
t	2.651	1.099	0.406	—	—
P	0.004	0.137	0.343	—	—

2.3 两组不同基因型的患者华法林稳定剂量比较

两组不同基因型患者的华法林稳定剂量均存在差异, 均为A/A型最大($P < 0.05$), 而A/C型与C/C型差异无统计学意义($P > 0.05$); 研究组A/A基因型患者的华法林稳定剂量显著低于对照组($P = 0.019$), 但两组A/C与C/C基因型患者的华法林

稳定剂量差异无统计学意义($P > 0.05$, 表3)。

2.4 研究组不同基因型患者华法林抗凝效果比较

不同基因型黎族持续性房颤患者的INR达标时间、华法林平均日剂量及总剂量均存在差异, 顺序均为: A/A > A/C > C/C ($P < 0.05$, 表4)。

表3 两组不同基因型患者的华法林稳定剂量比较

Table 3 Comparison of warfarin stable dose in patients with different genotypes between the 2 groups

组别	华法林剂量/(mg·d ⁻¹)			F	P
	A/A	A/C	C/C		
研究组	3.12 ± 0.41	2.71 ± 0.38	2.65 ± 0.36	5.768	0.019
对照组	3.29 ± 0.53	2.98 ± 0.44	2.89 ± 0.39	5.802	0.018
t	2.373	0.901	0.794	—	—
P	0.019	0.397	0.442	—	—

表4 研究组不同基因型患者华法林抗凝效果比较

Table 4 Comparison of warfarin anticoagulation effect in patients with different genotypes in the research group

基因型	INR达标时间/d	平均日剂量/g	总剂量/g
A/A	14.1 ± 3.1	4.0 ± 0.8	51.9 ± 3.8
A/C	9.7 ± 2.3	3.6 ± 0.9	27.8 ± 2.9
C/C	8.8 ± 1.9	3.2 ± 0.4	25.3 ± 2.6
F	9.247	6.002	10.215
P	0.001	0.011	0.001

3 讨论

国内冠心病、慢性心衰、高血压等心血管疾病发病率维持高水平, 持续性房颤发生率也呈逐年增加趋势^[6]。华法林被公认能有效预防房颤患者

血栓形成, 然而华法林临床应用的安全窗较小, 剂量难以确定, 即便定期监测INR、调整剂量, 也易存在剂量不足或过量, 进而导致血栓或出血事件发生, 目前国内外对理想的INR水平尚无统一的标准^[7]。近年来精准医学研究^[2,6]认为: 华法林稳

定剂量存在较大的族群个体差异, 这与华法林剂量维持相关的基因存在着遗传多态性有关。华法林的主要代谢酶, 即细胞色素P450酶(CYP)基因多态性是华法林遗传药理学研究的热点, 也是被认为是影响华法林剂量需求最主要的因素^[4]。

CYP2C9主要存在于人体肝中, 是目前研究最广泛、最深入的一种CYP家族基因^[8]。华法林主要通过CYP2C9基因编码蛋白酶代谢, CYP2C9基因突变会导致该酶代谢活性发生改变, 因此CYP2C9基因多态性能影响华法林稳定剂量^[9]。CYP2C9有多个的突变位点, 目前对于基因多态性种族差异主要集中在CYP2C9*3等位基因。研究^[10]证实: CYP2C9*3基因具有低华法林代谢活性, 分别较CYP2C9*1纯合子代谢活性约80%。因此与CYP2C9*1纯合子相比, CYP2C9*3等位基因更容易增加出血的风险, 达到同样抗凝效果剂量需求则更低, 达到稳定的INR所需时间更长。

不同种族之间CYP2C9*3等位基因发生频率的差异较大^[11]。白种人的CYP2C9*3等位基因的发生频率较高, 为6%~10%。而亚洲人CYP2C9*3的频率仅为1%~2%^[12]。由此导致不同种族间华法林维持剂量差异有统计学意义, 黄种人平均维持剂量显著低于白种人和黑种人^[13-14]。国内研究^[15]也显示: 内蒙古地区和南方地区人群的CYP2C9*3等位基因发生频率存在差异, 这提示国内不同地区或民族人群的华法林维持剂量也存在差异。

海南省是多个少数民族聚集的地区, 使用华法林的少数民族患者数量逐年上升, 大部分患者缺乏系统的药学监护, 并且针对海南省黎族、苗族等少数民族CYP2C9*3基因多态性与华法林维持剂量相关研究尚未见报道。本研究以服用华法林抗凝治疗的持续性房颤患者为研究对象, 探讨黎族人群中CYP2C9*3基因多态性与华法林稳定剂量的关系, 以期黎族人群持续性房颤患者华法林的个体化用药提供依据。

本研究结果显示: 罹患持续性房颤黎族患者的C/C基因型占优势, 而汉族患者A/A与A/C基因型占优势; 与此同时, 等位基因C频率在持续性房颤黎族患者中比例显著高于持续性房颤汉族患者, 提示等位基因C或CC基因型与持续性房颤黎族患者华法林稳定剂量的相关, 而AA基因型频率在汉族人群中比率最高, 与既往研究^[15]结果一致。A/A基因型持续性房颤黎族患者的华法林稳定剂量及血清华法林浓度均高于A/C型与C/C型, 这一点与对照组汉族A/A基因型患者也是最高相同, 表明黎族与汉族C/C基因型或等位基因C患者华法

林稳定剂量及血清华法林浓度较低, 发生出血性事件危险均较小。同时本研究也表明: 在相同A/A基因型持续性房颤患者中, 黎族患者华法林稳定剂量及血清华法林浓度低于汉族, 而A/C与C/C基因型则无差异, 这提示仅A/A基因型患者的华法林剂量及浓度存在族群差异, 这值得临床进一步研究。C/C基因型黎族持续性房颤患者的INR达标时间、华法林平均日剂量及总剂量最低, 安全性较好, 这从临床表现上证实了C/C基因型或等位基因C会降低持续性房颤黎族患者华法林稳定剂量以及稳态达标时间。

参考文献

1. 蒋年新, 葛俊伟, 鲜玉琼, 等. 基于心房颤动患者CYP2C9和VKORC1基因型、年龄、身高建立并评价华法林给药剂量计算公式[J]. 山东医药, 2016, 56(11): 14-17.
JIANG Nianxin, GE Junwei, XIAN Yuqiong, et al. Warfarin-dosing algorithm based on CYP2C9 and VKORC1 genotypes, age and height of patients with atrial fibrillation[J]. Shandong Medical Journal, 2016, 56(11): 14-17.
2. Park YK, Lee MJ, Kim JH, et al. Genetic and non-genetic factors affecting the quality of anticoagulation control and vascular events in atrial fibrillation[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2017, 26(6): 1383-1390.
3. Huang TS, Zhang L, He Q, et al. DNA sensors to assess the effect of VKORC1 and CYP2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirement in Chinese patients with atrial fibrillation[J]. Australas Phys Eng Sci Med, 2017, 40(1): 249-258.
4. Baranova EV, Verhoef TI, Ragia G, et al. Dosing algorithms for vitamin K antagonists across VKORC1 and CYP2C9 genotypes[J]. J Thromb Haemost, 2017, 15(3): 465-472.
5. Chen W, Wu L, Liu X, et al. Warfarin dose requirements with different genotypes of and for patients with atrial fibrillation and valve replacement[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2017, 55(2): 126-132.
6. Wypasek E, Mazur P, Bochenek M, et al. Factors influencing quality of anticoagulation control and warfarin dosage in patients after aortic valve replacement within the 3 months of follow up[J]. J Physiol Pharmacol, 2016, 67(3): 385-393.
7. Jiang NX, Ge JW, Xian YQ, et al. Clinical application of a new warfarin-dosing regimen based on the CYP2C9 and VKORC1 genotypes in atrial fibrillation patients[J]. Biomed Rep, 2016, 4(4): 453-458.
8. Park YK, Lee MJ, Kim JH, et al. Lack of association of clinical factors (SAME-TT2R2) with CYP2C9/VKORC1 genotype and anticoagulation control quality[J]. J Stroke, 2015, 17(2): 192-198.
9. Lee YM, Eggen J, Soni V, et al. Warfarin dose requirements in a

- patient with the CYP2C9*14 allele[J]. *Pharmacogenomics*, 2014, 15(7): 909-914.
10. Ozer N, Cam N, Tangurek B, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements in an adult Turkish population[J]. *Heart Vessels*, 2010, 25(2): 155-162.
 11. Gaikwad T, Ghosh K, Shetty S. VKORC1 and CYP2C9 genotype distribution in Asian countries[J]. *Thromb Res*, 2014, 134(3): 537-544.
 12. Chen W, Wu L, Liu X, et al. Warfarin dose requirements with different genotypes of CYP2C9 and VKORC1 for patients with atrial fibrillation and valve replacement[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2017, 55(2): 126-132.
 13. Zhang J, Chen Z, Chen C. Impact of CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 genetic polymorphisms on maintenance warfarin dosage in Han-Chinese patients: a systematic review and meta-analysis[J]. *Meta Gene*, 2016, 9: 197-209.
 14. Johnson M, Richard C, Bogdan R, et al. Warfarin dosing in a patient with CYP2C9(*3)*3 and VKORC1-1639 AA genotypes[J]. *Case Rep Genet*, 2014, 2014: 413743.
 15. 姜海涛, 李文忠, 王树林, 等. 内蒙古地区蒙古族VKORC11639 G/A和CYP2C9基因多态性与华法林应用剂量关系的研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(20): 2340-2344.
- JIANG Haitao, LI Wenzhong, WANG Shulin, et al. Study of VKORC1 and CYP2C9 polymorphism on dosage of warfarin in atrial fibrillation patients in inner Mongolian area[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio/Cerebrovascular Disease*, 2016, 14(20): 2340-2344.

本文引用: 白敏, 陈向红, 郭照军, 陈磊, 王超, 吴曾繁. 海南省黎族与汉族持续性心房颤动患者CYP2C9*3基因多态性差异[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(3): 641-646. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.017

Cite this article as: BAI Min, CHEN Xianghong, GUO Zhaojun, CHEN Lei, WANG Chao, WU Zengfan. Different genetic polymorphisms of CYP2C9*3 in Li and Han population patients with persistent atrial fibrillation in Hainan Province[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(3): 641-646. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.03.017