

GGCX(rs6738645)基因多态性与华法林稳定剂量的关系*

刘寅强,杨百晖,夏健明,张学玉,张桂敏

(昆明医科大学第一附属医院心血管外科,云南昆明 650032)

摘要:目的 探讨 γ 谷氨酰羧化酶(GGCX)(rs6738645)基因型在中国汉族人群中的分布情况,及其基因多态性与瓣膜置换术后华法林稳定剂量的相关性。方法 采用 Snapshot 技术检测 228 例研究对象 GGCX(rs6738645)位点基因型,研究其基因型及等位基因频率;比较其中 176 例瓣膜置换术患者基因多态性与华法林稳定剂量的相关性。结果 228 例研究对象中,GGCX(rs6738645)位点基因型 TT、GT、GG 分别为 84 例(36.84%)、122 例(53.51%)、22 例(9.65%),T 和 G 等位基因的频率分别为 63.60% 和 36.40%;176 例瓣膜置换术后患者服用华法林达稳定状态,华法林日维持剂量 GG 组低于 TT、GT 组,组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$);基因型 3 组间国际标准化比值(INR)、凝血酶原时间(PT)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 中国汉族人群 GGCX(rs6738645)基因多态性可能是瓣膜置换术后华法林个体剂量差异的影响因素。

关键词: γ 谷氨酰羧化酶;基因多态性;华法林;心脏瓣膜假体植入

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.10.010

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)10-1184-03

Research on correlation between GGCX(rs6738645) polymorphism and warfarin stable dose*

Liu Yingqiang, Yang Baihui, Xia Jianming, Zhang Xueyu, Zhang Guimin

(Department of Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To investigate the gamma glutamine carboxylase(GGCX, rs6738645) genotype distribution in Chinese Han population and the correlation between GGCX(rs6738645) polymorphism and the warfarin stable dose in the patient after valve replacement. **Methods** The genotypes of 228 cases were detected by the Snapshot technology in order to explore the genotype and allele frequencies. The correlation between the gene polymorphism in 176 cases after valve replacement and the stable dose of warfarin was compared. **Results** In total of 228 research subjects, the number of TT, GT and GG genotype were 84(36.84%), 122(53.51%) and 22(9.65%). The frequencies of T and G allele were 63.60% and 36.40% respectively; in 176 patients after the valve replacement, the maintenance stable dose of warfarin was lower in GG group than in the TT and GT groups, the differences between the groups showed statistical significance($P < 0.01$). The PT value and INR value had no statistical difference among 3 genotype groups($P > 0.05$). **Conclusion** The GGCX(rs6738645) polymorphism in Chinese Han population may be the influencing factor of warfarin individual dose difference in the patients after valve replacement.

Key words: gamma-glutamyl carboxylation; gene polymorphism; warfarin; heart valve prosthesis implantation

华法林是目前使用最广泛的口服抗凝药,也是惟一被美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)批准的瓣膜置换术后口服抗凝药物^[1]。在临床应用中,华法林治疗适应证较窄,个体用药差异较大,近年的研究认为,基因多态性是决定药效的个体差异的主要原因^[2-4]。国内外研究表明, γ 谷氨酰羧化酶(gamma-glutamyl carboxylation, GGCX)基因多态性与华法林剂量个体差异密切相关^[5-6],目前中国汉族人群的相关研究较少,为了解 GGCX(rs6738645)基因型及等位基因在中国汉族人群中的分布情况及其基因多态性对华法林抗凝的影响。本研究应用 Snapshot 技术对中国汉族人群的 GGCX(rs6738645)基因多态性情况进行分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究选取 228 例中国汉族人群作为研究对象,在取得知情同意后抽血提取 DNA, Snapshot 法检测基因多态性。其中 52 例为健康体检者;176 例为瓣膜置换术患者,为 2010 年 1 月至 2012 年 3 月在昆明医科大学第一附属医院心血管外科行瓣膜置换术后服用华法林抗凝治疗患者,其中男

82 例,女 94 例,年龄(44.44 ± 12.33)岁,体质量(59.19 ± 11.03)kg,身高(1.64 ± 0.71)cm。抗凝强度预设国际标准化比值(international normalized ratio, INR)为 1.5 ~ 2.5,随访 3 ~ 24 个月;瓣膜置换术患者术后均服用华法林抗凝超过 2 个月,两次复查凝血检查 INR 达到抗凝预设标准,无需调整剂量,视为达到抗凝稳定状态。记录华法林日维持剂量,凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、INR 等指标,入选患者肝、肾功能指标无异常,且未服用影响华法林疗效指标药物。

1.2 方法

1.2.1 样本采集与 DNA 提取 每例患者在华法林达到稳定剂量时采集静脉血 5 mL,置于枸橼酸钠抗凝管中作 9 : 1 抗凝(标本 1.80 mL,抗凝剂 0.20 mL),2 mL 用于测定 PT、INR,剩余全血 3 000 r/min 离心 10 min,弃上层血浆,分装,沉淀细胞使用基因组试剂盒快速提取基因组 DNA, -20 °C 保存。

1.2.2 基因分型 设计引物扩增包含 GGCX(rs6738645)位点片段,引物由上海捷瑞公司合成。Taq 酶、脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside triphosphate, dNTP)为 Fermentas

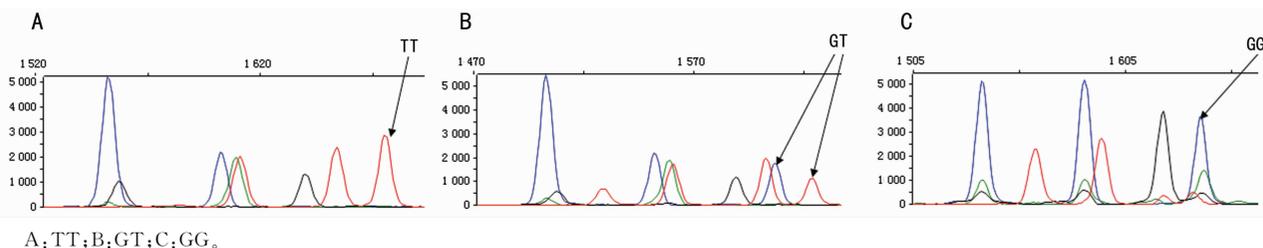


图 1 GGXC(rs6738645)基因型的 Snapshot 峰型序列分析

公司产品,PCR 仪型号为东胜龙(EDC-810)。多重 PCR 反应体系含 1.00 μ L 模板 DNA,1.50 μ L 10 \times buffer 缓冲液,1.50 μ L MgCL₂(25 mmol),0.30 μ L dNTP,0.15 μ L 引物混合(20P),0.30 μ L Taq 聚合酶,补水至 15.00 μ L。扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,60 $^{\circ}$ C 退火 15 s,-0.5 $^{\circ}$ C(每循环降温 0.5 $^{\circ}$ C) 11 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,94 $^{\circ}$ C 变性 15 s,54 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,72 $^{\circ}$ C 加长延伸 3 min,共 24 个循环,扩增后取 3 μ L PCR 产物用于 Exo I 和 Sap 纯化,主要是去除反应产物中的引物及 dNTP。37 $^{\circ}$ C 保持 45 min,80 $^{\circ}$ C 保持 15 min,纯化好后进行延伸反应,预先混好延伸引物。延伸反应体系:PCR 产物 2.00 μ L,Snapshot Mix 试剂 1.00 μ L,延伸引物混合 2.00 μ L,补水至 6.00 μ L,96 $^{\circ}$ C 预变性 1 min,96 $^{\circ}$ C 变性 10 s,52 $^{\circ}$ C 退火 5 s 30 个循环。取 1.00 μ L 延伸产物,加 8.00 μ L 上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 变性 3 min,立即冰水浴。测序仪型号为 ABI 3730XL,研究随机抽取 10% 样本进行重复检验。

1.3 统计学处理 用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,用 χ^2 检验判断等位基因频率和基因型频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。单因素方差分析基因多态性与稳定状态时华法林抗凝指标相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 样本基因型的判定 样本的基因型通过 Snapshot 技术测序,各基因型的峰型测序结果,见图 1。

2.2 GGXC(rs6738645)等位基因和基因型分布频率 228 例研究对象中 GGXC(rs6738645)位点基因型 TT、GT、GG 分别为 84 例(36.84%)、122 例(53.51%)、22 例(9.65%),T 和 G 等位基因的频率分别为 63.60% 和 36.40%;预期基因型 TT、GT 和 GG 分别为 92 例(40.35%)、106 例(46.49%)、30 例(13.16%),经 χ^2 检验分析,所选随机人群 GGXC(rs6738645)等位基因频率和基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2 = 0.592, P = 0.501$)。

表 1 基因多态性与稳定状态华法林抗凝的相关性($\bar{x} \pm s, n = 176$)

基因型	n	INR	PT	华法林(mg/d)
TT	62	1.85 \pm 0.27	21.26 \pm 2.16	3.13 \pm 0.87
GT	96	1.88 \pm 0.20	21.65 \pm 1.70	3.20 \pm 0.95
GG	18	1.93 \pm 0.27	21.97 \pm 2.30	1.85 \pm 0.73
F		0.420	0.611	8.805
P		0.658	0.545	0.000

2.3 GGXC(rs6738645)基因多态性对华法林抗凝的影响 176 瓣膜置换术患者,基因型 TT、GT、GG 分别为 62 例,96 例,18 例,当达到稳定抗凝状态时,GGXC(rs6738645)基因型 3

组 INR、PT 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);华法林日维持剂量 GG 型低于 TT、GT 型,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

3 讨 论

人工机械瓣膜置换术后患者需要终身服用华法林抗凝治疗,但华法林治疗适应证较窄,个体用药差异大,容易导致出血、栓塞等严重并发症。近年来,国内外研究表明,基因多态性与华法林剂量有重要相关性^[7-10]。GGCX 是维生素 K 循环中的关键酶,其作用是将无活性的维生素 K 依赖性凝血因子 II、VII、IX、X 的前体羧化后成为有活性的凝血因子,近年的研究表明,GGCX 是影响抗凝药华法林剂量个体差异的遗传因素之一^[11-12],其中研究较多的是 G3261A(rs12714145)位点多态性与华法林剂量个体差异的相关性,但对于 GGXC(rs6738645)位点多态性的研究,国内少有相关报道。

本研究中,采用了 Snapshot 技术,对中国汉族人群 GGXC(rs6738645)基因多态性进行分析。研究结果显示,228 例中国汉族人群 GGXC(rs6738645)位点的基因型 TT、GT、GG 分别为 84 例(36.84%)、122 例(53.51%)、22 例(9.65%),T 和 G 等位基因的频率分别为 63.60% 和 36.40%;预期基因型 TT、GT 和 GG 分别为 92 例(40.35%)、106 例(46.49%)、30 例(13.16%),经 χ^2 检验分析,所选人群 GGXC(rs6738645)等位基因频率和基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡($\chi^2 = 0.592, P = 0.501$)。其中少数等位基因 G 的频率为 36.40%。台湾人群研究显示,少数等位基因频率为 39.25%^[13];Wadelius 等^[14]对欧洲人群研究显示,少数等位基因频率为 30%,与本研究结果基本一致。本研究对 176 例瓣膜置换术后华法林抗凝治疗的患者进行基因多态性测序,176 瓣膜置换术患者,基因型 TT、GT、GG 分别为 62 例,96 例,18 例,当达到稳定抗凝状态时,GGXC(rs6738645)基因型 3 组 INR、PT 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);华法林日维持剂量比较,GG 型低于 TT、GT 型,差异有统计学意义($P < 0.01$)。台湾人群研究显示,华法林日维持剂量与基因多态性无显著相关性($P = 0.914$)^[13];对欧洲人群研究显示,华法林日维持剂量与 GGXC(rs6738645)基因多态性具有显著相关性($P < 0.05$)^[6,14-16],研究结果在不同人群间存在差异,可能与不同人种间基因多态性差异相关。

综上所述,本文初步得出中国汉族人群 GGXC(rs6738645)基因型及等位基因分布频率,并且证实其基因多态性与华法林剂量有显著相关性,其基因多态性可能是华法林剂量个体性差异的影响因素,但本研究样本例数较少,需要进一步明确 GGXC(rs6738645)基因多态性与华法林抗凝的相关情况,尚需今后扩大样本量进行深入研究。

参考文献:

[1] 徐丹,刘媛,钟诗龙,等.心脏瓣膜置换术后影响华法林抗

- 凝疗效的人口学因素分析[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(5):750-753.
- [2] Miao L, Yang J, Huang C, et al. Contribution of age, body weight, and CYP2C9 and VKORC1 genotype to the anti-coagulant response to warfarin; proposal for a new dosing regimen in Chinese patients [J]. *Eur Clin Pharmacol*, 2007, 63(12):1135-1141.
- [3] Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism[J]. *Hum Genet*, 2007, 121(1):23-34.
- [4] Limdi NA, Arnett DK, Goldstein JA, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms on warfarin dose, anticoagulation attainment and maintenance among European American and African Americans[J]. *Pharmacogenomics*, 2008, 9(5):511-526.
- [5] Chen LY, Eriksson N, Gwilliam R, et al. Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) microsatellite and warfarin dosing [J]. *Blood*, 2005, 106(10):3673-3674.
- [6] de Visser MC, Roshani S, Rutten JW, et al. Haplotypes of VKORC1, NQO1 and GGCX, their effect on activity levels of vitamin K-dependent coagulation factors, and the risk of venous thrombosis [J]. *Thromb Haemost*, 2011, 106(3):563-565.
- [7] Shin J, Cao D. Comparison of warfarin pharmacogenetic dosing algorithms in a racially diverse large cohort [J]. *Pharmacogenomics*, 2010, 12(1):125-134.
- [8] Finkelman BS, Gage BF, Johnson JA, et al. Genetic warfarin dosing; tables versus algorithms[J]. *Am Coll Cardiol*, 2011, 57(5):612-618.
- [9] Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose[J]. *Blood*, 2008, 111(8):4106-4112.
- [10] Cooper GM, Johnson JA, Langae TY, et al. A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose[J]. *Blood*, 2008, 112(4):1022-1027.
- [11] Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S, et al. Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and gamma-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity[J]. *Blood*, 2004, 103(7):2630-2635.
- [12] Huang SW, Xiang DK, Huang L, et al. Influence of GGCX genotype on warfarin dose requirements in Chinese patients[J]. *Thromb Res*, 2011, 127(2):131-134.
- [13] Lee MT, Chen CH, Chou CH, et al. Genetic determinants of warfarin dosing in the Han-Chinese population [J]. *Pharmacogenomics*, 2009, 10(12):1905-1913.
- [14] Wadelius M, Chen LY, Downes K, et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose [J]. *Pharmacogenomics J*, 2005, 5(4):262-270.
- [15] Wadelius M, Chen LY, Downes K. Association of the GGCX (CAA)16/17 repeat polymorphism with higher warfarin dose requirements in African Americans [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2012, 22(2):152-158.
- [16] Watzka M, Westhofen P, Hass M, et al. Polymorphisms in VKORC1 and GGCX are not major genetic determinants of vitamin K-dependent coagulation factor activity in Western Germans [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 102(2):418-420.
- (收稿日期:2013-09-20 修回日期:2013-12-24)
-
- (上接第 1183 页)
- [5] Ostermann M, Chang R, Riyadh ICU Program Users Group. Correlation between the AKI classification and outcome[J]. *Criti Care*, 2008, 12(6):R144.
- [6] 刘之蕙, 孟群, 沈颖. 急性肾损伤 269 例[J]. *实用儿科临床杂志*, 2011, 26(17):1340-1342.
- [7] 方艺, 丁小强, 钟一红, 等. 住院患者急性肾损伤的发病情况调查[J]. *中华肾脏病杂志*, 2007, 23(7):417-421.
- [8] Pundziene B, Dobilienė D, Rudaitis S. Acute kidney injury in pediatric patients; Experience of a single center during an 11-year period[J]. *Medical (Kaunas)*, 2010, 46(8):511-514.
- [9] 杨华彬. 儿童急性肾损伤病因及预防[J]. *中国实用儿科杂志*, 2010, 25(10):739-745.
- [10] 易著文, 刘琳. 急性肾损伤的定义、诊断及治疗[J]. *临床儿科杂志*, 2009, 24(4):301-306.
- [11] Karvellas CJ, Farhat MR, Sajjad I, et al. A comparison of early versus late initiation of renal replacement therapy in critically ill patients with acute kidney injury; a systematic review and meta-analysis [J]. *Criti Care*, 2011, 15(1):R72.
- [12] 陈丽植, 陈蕾, 蒋小云, 等. 118 例儿童急性肾损伤预后因素的临床分析[J]. *中华肾脏病杂志*, 2010, 26(7):497-503.
- [13] Shema L, Ore L, Geron R, et al. Hospital-acquired acute kidney injury in israel [J]. *Israel Med Assoc J*, 2009, 11(5):269-274.
- [14] Gong WK, Tan TH, Foong PP, et al. Eighteen years experience in pediatric acute dialysis; analysis of predictors of outcome[J]. *Pediatr Nephrol*, 2001, 16(3):212-215.
- [15] Bresolin N, Silva C, Hallal A, et al. Prognosis for children with acute kidney injury in the intensive care unit [J]. *Pediatr Nephrol*, 2009, 24(3):537-544.
- (收稿日期:2013-09-23 修回日期:2013-12-27)