

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.07.014

GP1BA、PTGS1、LTC4S、ITGB3 基因多态性
检测指导阿司匹林使用*冯 淳¹, 姚 杨², 甄拴平¹, 王 慧¹, 赵家骏³, 王 华^{1△}

1. 陕西省宝鸡市中医医院检验科, 陕西宝鸡, 721001; 2. 陕西省宝鸡市妇幼保健院生殖医学中心, 陕西宝鸡 721004; 3. 陕西省宝鸡市中医医院心内科, 陕西宝鸡 721001

摘要:目的 对陕西宝鸡地区阿司匹林药物相关基因的基因型分布进行回顾性分析, 明确与阿司匹林药物相关基因的突变率。方法 选取 2022 年 1 月至 2023 年 5 月在宝鸡市中医医院心内科接受阿司匹林治疗并进行相关基因检测的住院患者 475 例, 采用飞行时间质谱仪对阿司匹林药物相关的 4 个基因[血小板膜糖蛋白 I b α 多肽(GP1BA)基因、前列腺素内过氧化物合酶 1(PTGS1)基因、白三烯 C4 合酶(LTC4S)基因、糖蛋白 III a (ITGB3)基因]进行检测, 然后进行基因多态性分析。结果 各基因分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, GP1BA c. 482C>T 基因型分布频率 CC>CT>TT, ITGB3 c. 176T>C 基因型分布频率 TT>TC>CC, PTGS1 c. -842A>G 基因型分布频率 AA>AG>GG, LTC4S c. -444A>C 基因分布频率 AA>AC>CC; 不同性别、年龄的各基因型分布比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 对阿司匹林药物治疗患者进行阿司匹林药物相关基因检测, 可以为临床医生对患者制订个体化治疗方案提供辅助性的指导, 具有重要的临床价值。

关键词:基因多态性; 阿司匹林; 血小板膜糖蛋白 I b α 多肽基因; 前列腺素内过氧化物合酶 1 基因; 白三烯 C4 合酶基因; 糖蛋白 III a 基因; 个体化治疗

中图法分类号: R446.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2024)07-0929-05

GP1BA, PTGS1, LTC4S and TGB3 gene polymorphism testing for guiding aspirin use*

FENG Chun¹, YAO Yang², ZHEN Shuanping¹, WANG Hui¹, ZHAO Jiajun³, WANG Hua^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Baoji Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Baoji, Shaanxi 721001, China; 2. Department of Reproductive Medicine, Baoji Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Baoji, Shaanxi 721004, China; 3. Department of Cardiology Medicine, Baoji Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Baoji, Shaanxi 721001, China

Abstract: **Objective** To retrospectively analyze the distribution of genotypes of aspirin drug-related genes in Baoji area of Shaanxi, and to definite the mutation rate of aspirin drug-related genes. **Methods** A total of 475 inpatients receiving aspirin treatment in the cardiology medicine department of Baoji Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine from January 2022 to May 2023 were selected. The four genes related to aspirin drugs (GP1BA gene, PTGS1 gene, LTC4S gene, ITGB3 gene) were detected by the time-of-flight mass spectrometer, and then the gene polymorphism of the detection results was analyzed. **Results** The distribution frequency of each gene was in line with Hardy-Weinberg equilibrium rule, GP1BA c. 482C>T genotype distribution frequency CC>CT>TT, ITGB3 c. 176T>C genotype distribution TT>TC>CC, PTGS1 c. -842A>G genotype distribution frequency AA>AG>GG, LTC4S c. -444A>C genotype distribution AA>AC>CC. There was no statistically significant difference in genotype distribution between the different genders and ages. **Conclusion** Aspirin drug-related gene testing for the patients with aspirin drug treatment could provide the auxiliary guidance for clinicians to formulate the individualized treatment regimen for the patients, which has an important clinical value.

Key words: gene polymorphism; aspirin; GP1BA gene; PTGS1 gene; LTC4S gene; ITGB3 gene; individualized treatment

心脑血管缺血事件二级预防的主要障碍是高血小板反应(HTPR), 而引起 HTPR 的主要原因之一为

* 基金项目: 陕西省宝鸡市卫生健康委员会科研项目(2021-42)。

作者简介: 冯淳, 男, 技师, 主要从事生物化学与分子生物学相关研究。△ 通信作者, E-mail: 1020329451@qq.com。

阿司匹林抵抗(AR)^[1]。阿司匹林在临床作为经典的抗血小板聚集药物被广泛使用^[2],临床发现部分血栓患者在服用常规剂量的阿司匹林后仍然不可避免地会再次出现血栓^[3],从而引起预后不良,因而有必要对引起患者 AR 的影响因素进行探讨,以期临床提供完善的药物治疗方案。血小板膜糖蛋白 I b α 多肽(GP1BA)基因、前列腺素内过氧化物酶 1 (PTGS1) 基因、白三烯 C4 合酶(LTC4S)基因、糖蛋白 III a(ITGB3)基因的异常表达会通过活性、功能等对血小板产生影响^[4-5]。本研究将回顾性分析近年在宝鸡市中医医院接受阿司匹林抗血小板治疗的患者资料,探讨 GP1BA、PTGS1、LTC4S、ITGB3 4 种基因多态性检测对指导临床使用阿司匹林抗血小板治疗的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2022 年 1 月至 2023 年 5 月在宝鸡市中医医院心内科接受阿司匹林肠溶片(拜耳医药保健有限公司,国药准字 J20130087)治疗并进行相关基因检测的住院患者 475 例,其中男 322 例、女 153 例,平均年龄(66.3 $\pm$ 10.7)岁。在医院信息系统收集患者相关资料并进行回顾性分析。本研究通过医院医学伦理委员会审批。

1.2 方法 先对临床送检的患者全血标本进行核酸提取,然后利用聚合酶链反应(PCR)对目的基因进行体外扩增,最后采用飞行时间质谱仪对扩增产物中的药物基因位点进行检测。

全血基因组 DNA 提取:采集患者空腹状态下的

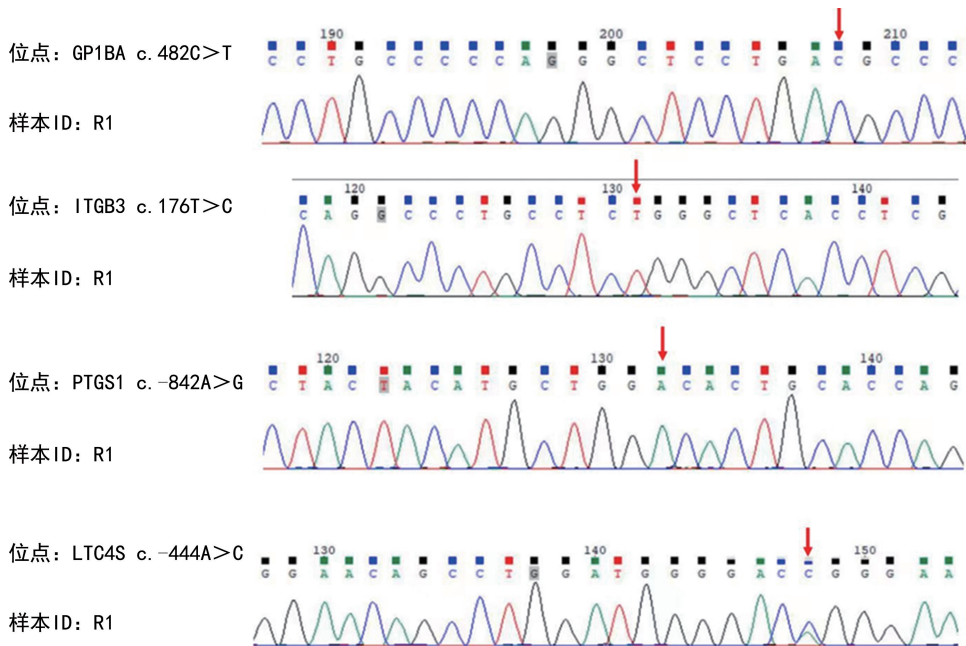
乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血 2 mL,利用西安天隆科技有限公司的 NP968-C 型全自动核酸提取仪和全血基因组 DNA 提取试剂盒(20T/盒)提取全血基因组 DNA,并用 Thermo Fisher 公司的 NanoDrop One 检测 DNA 水平,将 DNA 水平 $\geq$ 10 μ g/ μ L 的标本贮存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱待测。

基因多态性检测:采用浙江迪谱诊断技术有限公司的 DP-TOP 飞行时间质谱仪及其配套的飞行时间质谱检测试剂(心血管药物基因检测试剂盒,384T/盒),严格按照说明书进行实验操作,基因检测位点主要包括 GP1BA c. 482C>T、ITGB3 c. 176T>C、PTGS1 c. -842A>G、LTC4S c. -444A>C。抽取随机标本对阿司匹林药物相关 4 个基因位点使用 Sanger 测序技术进行验证;使用 4 组引物对 4 个位点进行 PCR 扩增,外送至浙江尚亚生物技术有限公司进行测序。

1.3 统计学处理 采用 SPSS21.0 统计软件进行数据处理。计数资料以率或构成比表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 飞行时间质谱平台与 Sanger 测序法检测结果比较 分别利用飞行时间质谱仪与一代测序仪,抽取随机样本进行阿司匹林药物相关 4 个基因位点检测(GP1BA c. 482C>T、ITGB3 c. 176T>C、PTGS1 c. -842A>G、LTC4S c. -444A>C),两种方法检测结果完全一致。见图 1。



注:箭头所指为飞行时间质谱与一代测序检测结果一致处。

图 1 4 个基因位点飞行时间质谱检测结果

2.2 阿司匹林药物相关基因型分布频率 475 例接受阿司匹林肠溶片治疗的患者,药物基因分布如表 1 所示,

其中 GP1BA c. 482C>T 基因型分布频率 CC>CT>TT, ITGB3 c. 176T>C 基因型分布频率 TT>TC>CC, PTGS1 c. -842A>G 基因型分布频率 AA>AG>GG, LTC4S c. -444A>C 基因型分布 AA>AC>CC。

2.3 阿司匹林药物相关等位基因分布频率 475 例患者各等位基因分布频率见表 1。各基因分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。

表 1 阿司匹林药物相关基因的基因型及等位基因分布频率[n(%)]

基因位点		分布频率	
GP1BA c. 482C>T	基因型	CC	429(90.32)
		CT	46(9.68)
		TT	0(0.00)
	等位基因	C	904(95.16)
		T	46(4.84)
ITGB3 c. 176T>C	基因型	TT	469(98.74)
		TC	6(1.26)
		CC	0(0.00)
	等位基因	T	944(99.37)
		C	6(0.63)
PTGS1 c. -842A>G	基因型	AA	470(98.95)
		AG	5(1.05)
		GG	0(0.00)
	等位基因	A	945(99.47)
		G	5(0.53)
LTC4S c. -444A>C	基因型	AA	336(70.74)
		AC	130(27.37)
		CC	9(1.89)
	等位基因	A	802(84.42)
		C	148(15.58)

2.4 不同性别阿司匹林药物相关基因分布情况 对

322 例男性患者和 153 例女性患者阿司匹林药物相关基因型分别进行分析,不同性别的阿司匹林药物相关基因型的分布频率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.5 不同年龄段阿司匹林药物相关基因分布情况 将 475 例患者按年龄分为 3 组,分别为<55 岁(72 例)、55~70 岁(218 例)和>70 岁(185 例),发现不同年龄组的阿司匹林药物相关基因型的分布频率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 2 阿司匹林药物相关基因的基因型分布与性别的关系[n(%)]

基因位点	性别	n	基因型	分布频率	χ^2	P
GP1BA c. 482C>T	男	322	CC	287(89.13)	0.557	0.456
			TT	35(10.87)		
	女	153	CC	142(92.81)		
			TT	11(7.19)		
ITGB3 c. 176T>C	男	322	TT	320(99.38)	0.255	0.614
			TC	2(0.62)		
	女	153	TT	149(97.39)		
			TC	4(2.61)		
PTGS1 c. -842A>G	男	322	AA	319(99.07)	<0.01	>0.999
			AG	3(0.93)		
	女	153	AA	151(98.69)		
			AG	2(1.31)		
LTC4S c. -444A>C	男	322	AA	229(71.12)	2.009	0.366
			AC	90(27.95)		
	女	153	CC	3(0.93)		
			AA	107(69.94)		
			AC	40(26.14)		
			CC	6(3.92)		

表 3 阿司匹林药物相关基因的基因型分布与年龄的关系[n(%)]

基因位点	基因型	基因型分布频率			χ^2	P
		<55 岁组 (n=72)	55~70 岁组 (n=218)	>70 岁组 (n=185)		
GP1BA c. 482C>T	CC	64(88.89)	195(89.45)	170(91.89)	0.667	0.717
	CT	8(11.11)	23(10.55)	15(8.11)		
ITGB3 c. 176T>C	TT	71(98.61)	217(99.54)	181(97.84)	2.793	0.247
	TC	1(1.39)	1(0.46)	4(2.16)		
PTGS1 c. -842A>G	AA	71(98.61)	215(98.62)	184(99.46)	<0.01	>0.999
	AG	1(1.39)	3(1.38)	1(0.54)		
LTC4S c. -444A>C	AA	46(63.89)	155(71.10)	135(72.97)	4.250	0.373
	AC	25(34.72)	60(27.52)	45(24.33)		
	CC	1(1.39)	3(1.38)	5(2.70)		

3 讨 论

阿司匹林作为环氧合酶抑制剂可以通过乙酰化血小板 COX-1 的丝氨酸 529 位点,阻止花生四烯酸进入酪氨酸 385 处酶的催化部位,进而抑制血小板依赖性血栓素 A₂ 的形成,从而发挥抗血栓作用^[6-8]。阿司匹林作为抗血小板药物已经在心脑血管疾病一级和二级预防中广泛使用^[9],但是有 5%~45% 患者存在 AR^[10],AR 发生的作用机制复杂,目前尚未完全明确,但已有报道指出 AR 与细胞及遗传等因素有关^[11]。

GP1BA 基因编码的血小板表面膜糖蛋白(GP1b)是由两个二硫键连接的 α 和 β 亚基组成的异二聚体^[12]。GP1BA 作为糖蛋白抗体可以对血小板细胞膜产生针对性作用,该基因异常会影响血小板的活性、免疫性及功能等^[13]。GP1b 是血管性血友因子(VWF)和 α-凝血酶的主要受体,其 α 和 β 亚基可以和血小板糖蛋白Ⅸ、血小板糖蛋白 V 结合形成受体复合物(GP1b-Ⅸ-V),该复合物与 VWF 结合促进血小板与血管内皮下膜的黏附,并且还启动血小板内信号传导,促进血小板活化、止血或形成血栓^[14]。研究发现 GP1BA 基因 145Thr 突变为 Met(即 5792C>T)后对阿司匹林敏感性增强,AR 发生风险降低^[15]。本研究结果显示,475 例患者中,CC 基因型 429 例(90.32%)、CT 基因型 46 例(9.68%),等位基因 C 占 95.16%、T 占 4.84%,表明 GP1BA 基因在本地区人群中大多数为野生纯合型 CC,即 AR 风险增加,临床应该关注患者 GP1BA 基因型进而实现精准用药治疗。

ITGB3 是一种跨膜糖蛋白受体,存在于血小板和巨核细胞表面,有调节细胞黏附、凋亡、迁移和介导细胞与胞外基质连接的功能^[16],ITGB3 可以诱导血小板生成素活化,激活造血干细胞(HSC)并维持其活性,促进血小板合成,当血小板受到活化刺激后,GPⅡb/Ⅲa 复合物就会发生空间构型改变从而暴露纤维蛋白原受体结合部位,促进血小板聚集^[17]。GPⅡb/Ⅲa 是血小板、血栓形成的共同通路,然而不同个体血小板表面受体表达存在差异,尤其是 ITGB3 基因突变后会导致 AR。ITGB3 基因 rs5981(P1A)单核苷酸多态性与 AR 有关,基因突变后引起药效下降甚至无应答^[18]。本研究中,ITGB3 基因 TT 型有 469 例,占 98.74%、TC 型有 6 例,占 1.26%,说明该基因位点在本地区人群中大多数是阿司匹林低抵抗型,对于少数药物高抵抗者建议临床选用不受 ITGB3 基因多态性影响的抑制血小板药物,如血栓通等。

PTGS1 活性部位第 530 位丝氨酸乙酰化后抑制花生四烯酸与乙酰位点结合,进而阻止血栓素 A₂ 合

成,这是阿司匹林发挥抗血小板聚集作用的机制之一^[19-20]。PTGS1 单核苷酸多态性对其蛋白构象有所影响,其通过引起启动子连接部位变化及氨基酸替换,影响内显子和外显子功能,进而使其对阿司匹林产生抑制作用。PTGS1 基因突变会催化前列腺素 I₂ 生成异常,导致血管收缩、血小板聚集,进而影响阿司匹林治疗效果^[21-22]。本研究的 475 例患者中,AA 基因型占 98.95%、AG 基因型占 1.05%,说明本地区 PTGS1 基因突变率较低,但是单基因单核苷酸突变并不足以说明体内整个药物代谢过程,还应该对药物代谢过程中的其他基因从整体过程全面研究。

LTC4S 是半胱酰白三烯合成通路中的关键酶,半胱酰白三烯广泛参与多种炎症病理过程,是很强的炎症介质,半胱氨酰白三烯能激活半胱酰白三烯受体 1 和受体 2,改变内皮细胞通透性以及影响血管内皮细胞的迁移,介导平滑肌痉挛、微血管渗透等。LTC4S c.-444A>C 突变会增加冠状动脉的钙含量及颈动脉内膜厚度,该基因位点突变在动脉粥样硬化形成过程中起重要作用^[23]。研究表明 LTC4S 基因-1072AA 可以增加脑血管的患病风险,相反 444CC 可以降低脑血管患病风险^[24]。本研究发现 LTC4S 基因 CC 型仅占 1.89%、C 等位基因频率为 15.58%,说明本地区人群中低风险基因型占比很少,所以应该以基因检测作为精准诊疗的基础。

本研究针对本地区阿司匹林药物相关 4 种基因进行了分型,发现基因存在一定的差异进而会导致药物代谢的个体化差异。因此,对患者进行药物基因检测可以为临床医生对患者使用阿司匹林进行相关治疗提供辅助性指导,具有重要的临床价值。而且本研究所涉及的阿司匹林药物相关 4 个基因的多态性分布与杨公强^[25]报道的枣庄地区相关基因分布相似,但与刘少波等^[26]报道的东莞地区以及钱剑宁^[27]报道的肇庆地区基因分布有所不同。阿司匹林药物相关的这 4 种基因分布是否具有南北方差异需要进一步开展相关基因型分布的地区与种族差异性研究,并建立本地区相关基因数据库,为本地区的精准诊疗、精准用药提供参考。人体内药物代谢过程较为复杂,后续也需要更加完整、全面的关键基因来解释个体化用药差异,为精准医疗提供理论基础。

致谢:浙江迪谱诊断技术有限公司朱雨晨女士对本文提供的帮助。

参考文献

[1] FIOLAKI A,KATSANOS A H,KYRITSIS A P,et al. High on treatment platelet reactivity to aspirin and clopidogrel in ischemic stroke:a systematic review and meta-

- analysis[J]. J Neurol Sci, 2017, 376: 112-116.
- [2] POLZIN A, DANNENBERG L, SCHNEIDER T, et al. Malondialdehyde assay in the evaluation of aspirin anti-platelet effects[J]. Pharmacology, 2019, 103(1/2): 23-29.
- [3] FERREIRA M, FREITAS-SILVA M, ASSIS J, et al. The emergent phenomenon of aspirin resistance: insights from genetic association studies[J]. Pharmacogenomics, 2020, 21(2): 125-140.
- [4] 楚明明, 王强, 张喆, 等. 西南地区动脉粥样硬化性心血管疾病患者阿司匹林抗血小板药效相关基因多态性分析[J]. 中国药业, 2019, 28(18): 15-17.
- [5] 李雪红. GPⅢa 基因缺失/插入致血小板无力症家系调查并基因缺陷文献复习[D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- [6] FINNERAN M M, GONZALEZ-BROWN V M, SMITH D D, et al. Obesity and laboratory aspirin resistance in high-risk pregnant women treated with low-dose aspirin[J]. Am J Obstet Gynecol, 2019, 220(4): 385. e1-385. e6.
- [7] ZHAO Y X, YANG S J, WU M. Mechanism of improving aspirin resistance: blood-activating herbs combined with aspirin in treating atherosclerotic cardiovascular diseases[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 794417.
- [8] SCHRÖR K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis[J]. Semin Thromb Hemost, 1997, 23(4): 349-356.
- [9] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组缺血性脑卒中二级预防指南撰写组. 中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南 2010[J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(2): 154-160.
- [10] CHADHA D S, SUMANA B, KARTHIKEYAN G, et al. Prevalence of aspirin resistance in Asian-Indian patients with stable coronary artery disease[J]. Catheter Cardio-vasc Interv, 2016, 88(4): E126-E131.
- [11] REVIKINE I. New horizons in platelet research: understanding and harnessing platelet functional diversity[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2015, 60(1): 133-152.
- [12] BERNDT M C, GREGORY C, KABRAL A, et al. Purification and preliminary characterization of the glycoprotein Ib complex in the human platelet membrane[J]. Eur J Biochem, 1985, 151(3): 637-649.
- [13] 常升, 王铭, 奚志, 等. AT1R 及 MCP-1 基因多态性与脑梗死患者预后相关性分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2020, 23(16): 1448-1452.
- [14] 杨秀峰, 刘净, 乔馨, 等. 缺血性脑卒中患者抵抗阿司匹林干预与 GP1BA 基因多态性关系的探讨[J]. 中国实验诊断学, 2020, 24(8): 1251-1253.
- [15] MATSUBARA Y, MURATA M, WATANABE G, et al. Enhancing effect of the 145Met allele of GPIb alpha on platelet sensitivity to aspirin under high shear conditions[J]. Thromb Haemost, 2008, 123(2): 331-335.
- [16] UMEMOTO T, MATSUZAKI Y, SHIRATSUCHI Y, et al. Integrin $\alpha\beta 3$ enhances the suppressive effect of interferon- γ on hematopoietic stem cells[J]. EMBO J, 2017, 36(16): 2390-2403.
- [17] 杨承志, 李再利, 孟新颜. 血栓通与阿司匹林对 ITGB3 基因多态性药物抵抗患者治疗作用的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(5): 493-496.
- [18] KNOWLES J W, WANG H, ITAKURA H, et al. Association of polymorphisms in platelet and hemostasis system genes with acute myocardial infarction[J]. Am Heart J, 2007, 154(6): 1052-1058.
- [19] SCHWARZBACH S V, MELO C F, XAVIER P L P, et al. Morphine, but not methadone, inhibits microsomal prostaglandin E synthase-1 and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 in lipopolysaccharide-stimulated horse synoviocytes[J]. Biochimie, 2019, 160: 28-33.
- [20] 刘盈盈, 易兴阳, 王淳, 等. COX 基因多态性与缺血性卒中的相关性研究[J]. 西部医学, 2019, 31(6): 883-888.
- [21] SIVAPALARATNAM S, MELISSA H, LENTAIGNE C, et al. Congenital aspirin-like defect as a result of autosomal recessive variants in PTGS1[J]. Blood, 2018, 132(S1): 1156.
- [22] 许海宁, 秦润祥, 李俊飞, 等. PTGS1 基因多态性与急性脑梗死患者阿司匹林抗血栓疗效的相关性[J]. 卒中与神经疾病, 2021, 28(6): 646-650.
- [23] 邓淑敏. CYP4F2、CYP4A11 及 LTC4S 基因多态与缺血性脑卒中相关性研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2010.
- [24] FREIBERG J J, TYBJAERG-HANSEN A, SILLESEN H, et al. Promotor polymorphisms in leukotriene C4 synthase and risk of ischemic cerebrovascular disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(5): 900-996.
- [25] 杨公强. 枣庄地区急性脑梗死患者阿司匹林相关药物基因多态性分析[J]. 中国处方药, 2023, 21(4): 53-57.
- [26] 刘少波, 黄灿, 钟婉平, 等. 药物基因多态性检测在脑梗死患者抗血小板治疗中的应用[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(10): 79-83.
- [27] 钱剑宁. PTGS1、LTC4S、GP1BA 基因多态性与肇庆地区动脉粥样硬化型脑梗死急性期患者阿司匹林疗效的相关性研究[J]. 中国实用医药, 2021, 16(18): 181-183.

(收稿日期: 2023-09-22 修回日期: 2023-11-28)