

氯吡格雷抵抗细胞色素 P450C19 基因多态性与复发性缺血性脑卒中的相关性研究

李彦弢 王珩 刘琳

300100, 天津市南开医院治未病科

通讯作者: 李彦弢, Email: dog20000@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.04.015

【摘要】 目的 研究氯吡格雷抵抗细胞色素 P450C19 (CYP2C19) 基因多态性与复发性缺血性脑卒中的相关性。**方法** 选取 2015 年 4 月至 2017 年 3 月天津市南开医院收治的 38 例复发性缺血性脑卒中患者, 按照使用氯吡格雷后是否有抵抗将患者分为抵抗组 (13 例) 和非抵抗组 (25 例)。分析 2 个单核苷酸多态性 (SNPs) 的等位基因频率和基因型频率, 检测两组 2 个 SNPs 的分布情况。**结果** CYP2C19 (636G>A, rs4986893) 和 CYP2C19 (681G>A, rs4244285) 等位基因和基因频率符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P>0.05$)。非抵抗组 CYP2C19*2 (rs4244285) GG 型分布率显著高于抵抗组 (68.00% 比 30.77%, $P<0.05$), GA+AA 型分布率显著低于抵抗组 (32.00% 比 69.23%, $P<0.05$), 两组 CYP2C19*3 (rs4986893) GG 型 (76.00% 比 92.31%)、AG+AA 型 (24.00% 比 7.69%) 分布率比较差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。**结论** 氯吡格雷抵抗 CYP2C19 基因多态性和复发性缺血性脑卒中密切相关。

【关键词】 脑卒中; 缺血性; 氯吡格雷; 细胞色素 P450C19 基因多态性

基金项目: 天津市医药卫生中医中西医结合科研课题 (2015028)

Study on correlation between clopidogrel resistance to CYP2C19 gene polymorphism and recurrent ischemic stroke Li Yantao, Wang Heng, Liu Lin

Department of Treatment of the Pre-Disease, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China

Corresponding author: Li Yantao, Email: dog20000@126.com

【Abstract】 Objective To study the relationship between clopidogrel resistance to cytochrome P450C19 (CYP2C19) gene polymorphism and recurrent ischemic stroke. **Methods** A total of 38 patients with recurrent ischemic stroke admitted to Tianjin Nankai Hospital from April 2015 to March 2017 were enrolled, and they were divided into a resistance group (13 cases) and a non-resistance group (25 cases) according to clopidogrel resistance being present or not. The allele frequencies and genotype frequencies of two single nucleotide polymorphisms (SNPs) were analyzed, and the distributions of two SNPs in the two groups were analyzed. **Results** The CYP2C19 (636G>A, rs4986893) and CYP2C19 (681G>A, rs4244285) alleles and gene frequencies were consistent with Hardy-Weinberg balance ($P>0.05$). The GG pattern distribution rate of CYP2C19*2 (rs4244285) in the non-resistance group was significantly higher than that in the resistance group (68.00% vs. 30.77%, $P<0.05$), and the GA+AA type distribution rate in the non-resistance group was significantly lower than that in the resistance group (32.00% vs. 69.23%, $P<0.05$), the comparisons of distribution rates of CYP2C19*3 (rs4986893) GG type (76.00% vs. 92.31%), AG+AA type (24.00% vs. 7.69%) between two groups had no statistical significant differences ($P>0.05$). **Conclusion** The clopidogrel resistance to CYP2C19 gene polymorphism is closely related to recurrent ischemic stroke.

【Key words】 Stroke, ischemic; Clopidogrel; CYP2C19 gene polymorphism

Fund program: Tianjin Medical and Health Chinese Medicine Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Research Project (2015028)

缺血性脑卒中属于临床上较为常见的一种多发病, 其致残率和病死率均较高, 且发病率呈现逐年增加的趋势。治疗缺血性脑卒中较为常见的方法是长时间使用抗血小板药物, 特别是在缺血性脑卒中二级预防过程中抗血小板药物占有重要地位。氯吡格雷为临床常见的一种抗血小板聚集药物, 在治疗缺血性脑卒中时有重要作用, 然而伴随着临床应用的增加, 氯吡格雷的疗效表现出不稳定性, 某些患者在规律使用氯吡格雷后并没有出现抗血小板效应, 即氯吡格雷抵抗^[1-2]。相关研究显示, 缺血性脑卒中患者发生氯吡格雷抵抗的概率为 4%~30%^[3]。本

研究患者均存在颈动脉狭窄, 且这些患者中发生氯吡格雷抵抗的比例约为 34%, 抵抗率明显升高。有研究显示, 氯吡格雷抵抗的诱发因素很大程度上是因为体内相关过程蛋白的基因多态性^[4]。氯吡格雷作为前体药物, 自身缺乏抗血小板功能, 需要通过细胞色素 P450 (CYP450) 使其转化为活性代谢产物才能发挥血小板抑制功能, CYP450 同工酶家族中的 CYP450C19 (CYP2C19) 能影响氯吡格雷的代谢过程, 基因多态性会对氯吡格雷的反应造成影响^[5]。有研究显示, CYP2C19*2、CYP2C19*3 位点的突变频率较高, 与氯吡格雷抵抗的发生有关^[6]。

但目前也有相关研究表明,基因多态性与药物抵抗无关^[7]。本研究分析氯吡格雷抵抗 CYP2C19 基因多态性与复发性缺血性脑卒中的相关性,为临床预防复发性缺血性脑卒中提供指导价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象的选择:选取 2015 年 4 月至 2017 年 3 月本院收治的 38 例复发性缺血性脑卒中患者。

1.1.1 纳入标准:① 诊断符合《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014》^[8]的标准;② 经磁共振成像(MRI)或 CT 血管造影(CTA)证实大动脉粥样硬化;③ 存在颈动脉狭窄。

1.1.2 排除标准:① 胶原病、恶性肿瘤;② 近 1 个月内使用过阿司匹林、双嘧达莫等其他抗血小板药物或抗凝药物治疗;③ 近 1 个月内进行过较大外科手术。

1.1.3 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,经本院医学伦理委员会批准,所有检测和治疗方法经患者或家属知情同意。

1.2 分组及一般资料:按是否有氯吡格雷抵抗将患者分为抵抗组(13 例)和非抵抗组(25 例)。两组性别、年龄、既往史、并发症、合并症等比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$;表 1),有可比性。

表 1 是否发生氯吡格雷抵抗两组患者一般资料比较

组别	例数 (例)	性别(例)		年龄(岁)		既往史(例)	
		男性	女性	范围	$\bar{x} \pm s$	饮酒	吸烟
抵抗组	13	10	3	62~84	73.03±2.86	3	7
非抵抗组	25	18	7	60~83	72.97±2.83	9	13

组别	例数 (例)	并发症、合并症(例)			
		卒中后肺炎	高脂血症	糖尿病	高血压
抵抗组	13	13	5	2	13
非抵抗组	25	25	9	4	21

氯吡格雷抵抗评价标准:服用氯吡格雷 1 d 以上用 10 $\mu\text{mol/L}$ 二磷酸腺苷(ADP)诱导的血小板聚集率(PAR)测定其变化值, $\leq 10\%$ 为氯吡格雷抵抗,PAR $>90\%$ 为非抵抗。

1.3 基因型检测:取肘静脉血 1 mL,置于乙二胺四乙酸(EDTA)真空抗凝管中,常温保存,进行 DNA 的检测和提取。基因组 DNA 的提取根据试剂盒完成,试剂盒由上海百傲科技有限公司提供。CYP2C19*2 和 CYP2C19*3 位点所在 DNA 片段使用美国 BIO-RAD 公司生产的 PTC-200 型聚合酶链反应(PCR)扩增仪进行扩增,用上海百傲科技有限公司生产的 BE-2.0 型生物芯片识读仪识读芯片。

1.4 统计学处理:使用 SPSS 11.5 统计软件分析

数据,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验;计数资料以例(率)表示,采取 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 单核苷酸多态性(SNPs)的等位基因和基因型频率(表 2):CYP2C19*3(636G>A, rs4986893)、CYP2C19*2(681G>A, rs4244285)等位基因以及基因频率符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$)。

表 2 SNPs 的等位基因频率和基因型频率

突变位点	等位基因分布频率		基因型分布频率		
	G	A	GG	AG	AA
CYP2C19*3	0.95	0.05	0.90	0.10	0.00
CYP2C19*2	0.74	0.26	0.58	0.33	0.09

2.2 两组 SNPs 分布情况比较(表 3):非抵抗组 CYP2C19*2(rs4244285)GG 型分布率显著高于抵抗组,GA+AA 型分布率显著低于抵抗组(均 $P<0.05$),两组 CYP2C19*3(rs4986893)GG 型、AG+AA 型分布率比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

表 3 SNPs 分布情况比较

组别	例数 (例)	CYP2C19*2[%(例)]		CYP2C19*3[%(例)]	
		GG	GA+AA	GG	AG+AA
抵抗组	13	30.77(4)	69.23(9)	92.31(12)	7.69(1)
非抵抗组	25	68.00(17)	32.00(8)	76.00(19)	24.00(6)
χ^2 值		4.795		1.514	
P 值		0.029		0.219	

3 讨论

缺血性脑卒中有较高的发病率、致残率、病死率及复发率,在全球死亡因素中居第三位。目前抗血小板药物在缺血性脑卒中二级预防中起重要作用,但有些患者脑卒中却反复发作。这除了与患者生活方式以及各种脑卒中危险因素控制不理想有关外,抗血小板药物的使用不当也存在一定作用。

氯吡格雷作为前体药物,本身无抗血小板活性,当被机体吸收后,需通过肝 CYP450 酶(CYP2C19、CYP3A5、CYP3A4、CYP2B6 等)代谢为活性产物,进而阻碍血小板的聚集,在治疗复发性缺血性脑卒中时能发挥良好疗效,然而会有部分患者发生氯吡格雷抵抗^[9]。目前,关于氯吡格雷抵抗的发生机制尚未完全明确,可能与用药剂量、环境和遗传因素等相关。相关研究显示, CYP2C19 基因突变会导致血小板对氯吡格雷呈现出低反应或无反应^[10]。CYP2C19 作为氯吡格雷发挥抗血小板聚集作用的关键酶,主要有 5 个内含子和 9 个外显子, CYP2C19

基因多态性可能会使编码功能蛋白表达水平异常,从而出现氯吡格雷抵抗。

在氯吡格雷的转化过程中, CYP2C19 作为代谢酶具有重要作用,基因多态性会对氯吡格雷在机体内的反应造成影响,但大部分氯吡格雷弱代谢人群均属于 CYP450 酶基因位点突变,其中较为常见的等位基因有 CYP2C19*1、CYP2C19*2、CYP2C19*3、CYP2C19*5 和 CYP2C19*6,而其中的 CYP2C19*2 和 CYP2C19*3 属于重要的无功能等位基因,携带慢代谢等位基因者,其血小板聚集率上升,氯吡格雷血药浓度下降,缺血性脑卒中不良事件的再发生率明显增加^[11-12]。

有研究显示,氯吡格雷抵抗极易导致脑卒中复发,氯吡格雷已广泛应用于预防缺血性脑卒中的治疗,但由于个体差异导致其疗效不同^[13]。药物、血糖之间的相互作用均会影响氯吡格雷抵抗的发生。CYP2C19 基因多态性的变化会降低氯吡格雷抗血小板的效果^[14]。CYP2C19 存在于肝脏微粒体中,主要由 490 个氨基酸残基组成,编码基因定位于染色体 10p24。在 CYP2C19*2 和 CYP2C19*3 基因型的外显子突变状况下终止密码提取,从而终止蛋白质合成,导致 CYP2C19 活性丧失,进而降低氯吡格雷对 ADP 诱导的 PAR 的阻碍效应。本研究显示, CYP2C19*3(rs4986893) 和 CYP2C19*2(rs4244285) 等位基因和基因频率符合 Hardy-Weinberg 平衡,非抵抗组 CYP2C19*2(rs4244285)GG 型分布率显著高于抵抗组,GA+AA 型分布率显著低于抵抗组,两组 CYP2C19*3(rs4986893)GG 型、AG+AA 型分布率比较差异无统计学意义,提示氯吡格雷抵抗受到代谢酶 CYP2C19 的 2 个 SNPs 的影响, CYP2C19*2 GA+AA 型是诱导氯吡格雷抵抗的重要危险因素。

综上所述,氯吡格雷抵抗 CYP2C19 基因多态性与复发性缺血性脑卒中密切相关,通过检测此基因能为氯吡格雷的使用提供参考依据。

参考文献

- [1] 孙宁宁, 庞晓. CYP2C19 基因检测对冠心病患者氯吡格雷治疗的临床意义 [J]. 临床心血管病杂志, 2017, 33 (4): 309-313. Sun NN, Pang X. Clinical significance of CYP2C19 gene detection in the treatment of clopidogrel in patients with coronary heart disease [J]. J Clin Cardiol, 2017, 33 (4): 309-313.
- [2] 李厚敏, 冯燕妮, 黄宇理, 等. 急性冠脉综合征患者 CYP2C19 基因多态性与氯吡格雷反应性及与血浆 EETs 的相关性 [J]. 实用医学杂志, 2017, 33 (6): 912-916. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2017.06.017. Li HM, Feng YX, Huang YL, et al. The relationship of CYP2C19 gene polymorphism with clopidogrel responsiveness and the level of EETs in patients with acute coronary syndrome [J]. J Pract Med, 2017, 33 (6): 912-916. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2017.06.017.
- [3] Hokimoto S, Tabata N, Akasaka T, et al. Gender differences in impact of CYP2C19 polymorphism on development of coronary artery disease [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2015, 65 (2): 148-152. DOI: 10.1097/FJC.000000000000171.
- [4] 马辉, 胡增春, 吕慧怡, 等. CYP2C19 基因多态性检测在 PCI 术后氯吡格雷用药中的研究 [J]. 医学与哲学, 2016, 37 (8): 29-31. DOI: 10.12014/j.issn.1002-0772.2016.04b.10. Ma H, Hu ZC, Lyu HY, et al. Research of CYP2C19 gene polymorphism detection in clopidogrel treatment after PCI [J]. Med Philos, 2016, 37 (8): 29-31. DOI: 10.12014/j.issn.1002-0772.2016.04b.10.
- [5] 翟万庆, 杨丽娟, 宋丽艳, 等. 缺血性卒中氯吡格雷治疗后病情进展与 CYP2C19 基因多态性的关系 [J]. 山东医药, 2016, 56 (33): 83-85. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2016.33.030. Zhai WQ, Yang LJ, Song LY, et al. The relationship between the disease progression and CYP2C19 gene polymorphism after treatment with clopidogrel after ischemic stroke [J]. Shandong Med J, 2016, 56 (33): 83-85. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2016.33.030.
- [6] Wang XQ, Shen CL, Wang BN, et al. Genetic polymorphisms of CYP2C19 2 and ABCB1 C3435T affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel in 401 patients with acute coronary syndrome [J]. Gene, 2015, 558 (2): 200-207. DOI: 10.1016/j.gene.2014.12.051.
- [7] 闻绍云, 王云玲. 血栓素 A₂ 受体基因多态性与阿司匹林抵抗的相关性研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (3): 175-179. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.004. Wen SY, Wang YL. A study on correlation between thromboxane A₂ receptor gene polymorphism and aspirin resistance [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2014, 21 (3): 175-179. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.03.004.
- [8] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014 [J]. 中华神经科杂志, 2015, 48 (4): 246-257. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2015.04.002. Neurology Branch of Chinese Medical Association, Cerebrovascular Group Neurologic Branch Chinese Medical Association. Guidelines for diagnosis and treatment of acute ischemic stroke in China 2014 [J]. Chin J Neurol, 2015, 48 (4): 246-257. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2015.04.002.
- [9] 蔡皓伟, 高丽娜, 周少旦, 等. 缺血性脑卒中患者 CYP2C19 基因多态性与氯吡格雷抗血小板作用的关系 [J]. 山东医药, 2015, 55 (28): 49-50. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2015.28.019. Cai HW, Gao LN, Zhou SD, et al. The relationship between the polymorphism of CYP2C19 gene and the antiplatelet effect of clopidogrel in ischemic stroke patients [J]. Shandong Med J, 2015, 55 (28): 49-50. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2015.28.019.
- [10] 王雷, 袁良津, 唐向阳. CYP2C19 基因多态性与急性脑梗死患者氯吡格雷疗效的相关性研究 [J]. 临床神经病学杂志, 2015, 28 (2): 99-102. Wang L, Yuan LJ, Tang XY. Study on correlation between the gene polymorphisms of CYP2C19 and the curative effects of clopidogrel in patients with acute cerebral infarction [J]. J Clin Neurol, 2015, 28 (2): 99-102.
- [11] Kupstyte N, Zaliunas R, Tatarunas V, et al. Effect of clinical factors and gene polymorphism of CYP2C19*2, *17 and CYP4F2*3 on early stent thrombosis [J]. Pharmacogenomics, 2015, 16 (3): 181-189. DOI: 10.2217/pgs.14.165.
- [12] 喻良, 黄雨兰, 黄斌, 等. CYP2C19 基因多态性对长期服用氯吡格雷脑梗死患者卒中复发的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32 (1): 41-44. Yu L, Huang YL, Huang B, et al. The effects of CYP2C19 gene polymorphisms on recurrence of stroke in long-term taking clopidogrel patients after the first attack of cerebral infarction [J]. J Apopl Nerv Dis, 2015, 32 (1): 41-44.
- [13] 喻良, 黄雨兰, 黄斌, 等. 非心源性 TIA 患者服用氯吡格雷后短期内缺血性脑卒中复发与 CYP2C19 基因多态性的关系 [J]. 临床神经病学杂志, 2015, 28 (5): 334-337. Yu L, Huang YL, Huang B, et al. Relationship between the recurrence of ischemic stroke in short period after taking clopidogrel and the CYP2C19 gene polymorphisms in non-cardiogenic TIA patients [J]. J Clin Neurol, 2015, 28 (5): 334-337.
- [14] Uno Y, Matsushita A, Shukuya M, et al. CYP2C19 polymorphisms account for inter-individual variability of drug metabolism in cynomolgus macaques [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 91 (2): 242-248. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.07.004.

(收稿日期: 2018-03-15)