

急性心肌梗死患者 CYP2C19、ABCB1 基因多态性与血小板抵抗的相关性分析

关 宏

摘 要 **目的** 探讨急性心肌梗死患者 CYP2C19、ABCB1 基因多态性与血小板抵抗的相关性。**方法** 自 2016 年 1 月 ~ 2017 年 6 月,连续性收集笔者医院收治的急性心肌梗死患者 163 例,测定患者是否为阿司匹林抵抗或氯吡格雷抵抗,并分析其与患者 CYP2C19、ABCB1 基因多态性的相关性。**结果** 阿司匹林抵抗和阿司匹林半抵抗的患者 CYP2C19 基因 rs4244285 和 rs4986893 呈明显多态性分布,突变型基因频率均显著高于阿司匹林敏感组 ($P < 0.05$)。氯吡格雷抵抗的患者 CYP2C19 基因 rs4244285 和 ABCB1 基因 rs2235048 呈明显多态性分布,突变型基因频率均显著高于氯吡格雷敏感的患者 [(37.50% vs 13.64%, $P = 0.000$) 和 (18.75% vs 9.60%, $P = 0.017$)]。**结论** 阿司匹林抵抗与 CYP2C19 基因 rs4244285 和 rs4986893 突变有关,氯吡格雷抵抗与 CYP2C19 基因 rs4244285 和 ABCB1 基因 rs2235048 突变有关。

关键词 急性心肌梗死 CYP2C19 ABCB1 血小板抵抗

中图分类号 R542.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.12.034

Correlation Analysis of CYP2C19, ABCB1 Gene Polymorphism and Platelet Resistance in Patients with Acute Myocardial Infarction. Guan Hong, Department of Cardiology. The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Inner Mongolia 010050, China

Abstract **Objective** To investigate the correlation between CYP2C19, ABCB1 gene polymorphism and platelet resistance in patients with acute myocardial infarction. **Methods** From January 2016 to June 2017, 163 consecutive patients with acute myocardial infarction in our hospital were collected. The patients with resistance to aspirin or clopidogrel were detected so as to study their association with CYP2C19, ABCB1 gene polymorphism. **Results** CYP2C19 and rs4986893 were significantly distributed in patients with aspirin resistance and aspirin half-resistance, and their frequencies of mutant genes were both significantly higher than that of rs4244285 sensitive group ($P < 0.05$). CYP2C19 gene rs4244285 and ABCB1 gene rs2235048 in patients with clopidogrel resistance had obvious polymorphism distribution, and their frequencies of mutant gene were both significantly higher than that of clopidogrel sensitive patients [(37.50% vs 13.64%, $P = 0.000$) and (18.75% vs 9.60%, $P = 0.017$)]. **Conclusion** Aspirin resistance is associated with mutations in the CYP2C19 gene rs4244285 and rs4986893, and clopidogrel resistance is associated with the mutation in the CYP2C19 gene rs4244285 and the ABCB1 genes rs2235048

Key words Acute myocardial infarction; CYP2C19; ABCB1; Platelet resistance

急性心肌梗死是常见的、致死性疾病,常常需要介入治疗^[1-4]。几十年来冠状动脉支架置入术在改善患者生存时间和生活质量的同时,也带来术后并发症高、需要长期抗血小板治疗等系列问题^[5,6]。双联抗血小板治疗是冠状动脉支架置入术后常规治疗,旨在防止支架内血栓、再发心肌梗死等^[7,8]。但是部分患者存在血小板抵抗的现象,即常规使用阿司匹林、氯吡格雷治疗后,无法有效达到理想的抗血小板治疗效果,这可能是导致冠状动脉支架置入术后并发症发生率较高的主要原因^[9]。为此,有必要探讨急性心肌梗死患者血小板抵抗的相关因素,为后续调整治疗

方案提供依据。目前较多研究探讨 CYP2C19 基因、ABCB1 基因对阿司匹林、氯吡格雷抵抗的影响,但对于 CYP2C19 基因 rs4244285、rs4986893 核苷酸、ABCB1 基因 rs2235048 核苷酸在急性心肌梗死患者中的作用较少涉及。本研究旨在探讨急性心肌梗死患者 CYP2C19 基因 rs4244285、rs4986893、ABCB1 基因 rs2235048 多态性与血小板抵抗的相关性。

资料与方法

1. 一般资料:自 2016 年 1 月 ~ 2017 年 6 月,连续性收集笔者医院收治的急性心肌梗死患者。(1)入选标准:①急性 ST 抬高型心肌梗死(入院离发病不超过 6h);②有明确的冠状动脉病变,并行冠状动脉支架置入治疗;③患者年龄 18 ~ 75 岁;④同意参与本

研究。(2)排除标准:①凝血功能障碍,有出血倾向;②血小板计数 $<100\times10^9/L$;③肝脏、肾脏等脏器功能不全;④6个月内大手术史;⑤4周内曾使用非甾体类抗炎药、低分子肝素等;⑥全身或局部严重感染;⑦未能配合完成本研究。本研究中所有患者均知情同意并签署知情同意书,本研究通过医院伦理委员会批准。

2. 研究方法:(1)根据患者是否合并阿司匹林抵抗,将患者分为阿司匹林抵抗组($n=8$),阿司匹林半抵抗组($n=73$),阿司匹林敏感组($n=82$),观察3组患者CYP2C19和ABCB1基因多态性差异。(2)根据患者是否合并氯吡格雷抵抗,将患者分为氯吡格雷抵抗组($n=64$)和氯吡格雷敏感组($n=99$),观察两组患者CYP2C19和ABCB1基因多态性差异。

3. 诊断标准:(1)阿司匹林抵抗: $10\mu\text{mol/L}$ 二磷酸腺苷诱导的血小板聚集率 $\geq 70\%$ 且 $500\mu\text{mol/L}$ 花生四烯酸诱导的血小板聚集率 $\geq 20\%$ ^[10];如仅满足上述一项则为阿司匹林半抵抗。(2) $10\mu\text{mol/L}$ 二磷酸腺苷诱导的血小板聚集率 $\geq 70\%$ 则为氯吡格雷抵抗^[11]。

4. 检测方法:选择CYP2C19的标签SNP为rs4244285、rs4986893,ABCB1的标签SNP为rs2235048,清晨空腹条件下抽取患者肘静脉血1ml置于EDTA真空的抗凝管中, -20°C 保存,以待DNA的提取和检测,相关引物序列:rs4244285(F:5'-ACGTTGGATGGCAATAATTTTCCCACTATC-3',R:5'-ACGTTGGATCACTTTCTCCAAAATATCAC-3')、rs4986893(F:5'-ACGTTGGATGAACATCAGGATTGTAAGCAC-3',R:5'-ACGTTGGATGGACTGTAAGTGGTTTCTCAG-3')、rs2235048(F:5'-TGAGAACATTGCCTATGGAG-3',R:5'-AAGGAGGGTCAGGTGATCAG-3')。DNA提取:取血液样本,取相应样本900 μl Cell Lysis Solution加至1.5ml EP管中,加入

300 μl 全血,盖上管盖,温室孵育10min,13000r/min离心20s,如有白色沉淀则移取300 μl Nuclei Lysis Solution至EP管中,混匀,再移取Protein Precipitation Solution 100 μl 滴入EP管,激烈震动20s,13000r/min离心3min,移取EP管中上清液至灭菌EP管,加入300 μl 异丙醇,混匀,13000r/min室温离心1min,弃上清液和剩余异丙醇,加入300 μl 70%乙醇,13000r/min离心,去除70%乙醇,滤纸吸干液体后风干,100 μl DNA Rehydration Solution至沉淀,将提取的DNA样本置于 -20°C 冷柜中保存。PCR反应体系:DNA 2 μl 、上下游产物2 μl 、Taq Master Mix 25 μl ,加去离子水至50 μl 。扩增反应体系:PCR热循环仪(Bio-Rad, USA), 94°C 预变性5min后, 94°C 30s, 54°C 30s, 72°C 30s,进行30个循环后,扩增的PCR反应产物为302bp,取5 μl PCR扩增产物,行2%琼脂糖凝胶电泳(溴化乙锭染色,150V电压下电泳30min后使用凝胶成像系统测定PCR扩增产物质量),对合格PCR产物进行直接测序(上海生工生物工程有限公司,焦磷酸测序)。

5. 统计学方法:采用SPSS 22.0统计学软件进行统计分析,组间的计量和计数资料分别采用独立样本 t 检验和 χ^2 检验分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 人口基线特征:研究期间,根据入选标准和排除标准,共纳入急性ST抬高型心肌梗死患者163例。其中男性92例,女性71例,高血压病125例,糖尿病82例,吸烟56例,平均血小板计数为 $(195.38\pm42.83)\times10^9/L$ 。阿司匹林抵抗组、阿司匹林半抵抗组和阿司匹林敏感组患者基础资料比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。氯吡格雷抵抗组、氯吡格雷敏感组基础资料比较差异均无统计学意义($P>0.05$,表1)。

表 1 研究对象的人口基线特征(n)

类别	性别		高血压病	糖尿病	吸烟	血小板计数($10^9/L$)
	男性	女性				
汇总	92	71	125	82	56	195.38 ± 42.83
阿司匹林抵抗组	5	3	4	3	3	191.56 ± 40.81
阿司匹林半抵抗组	40	33	59	40	23	195.49 ± 43.67
阿司匹林敏感组	47	35	62	39	30	195.72 ± 42.48
氯吡格雷抵抗组	37	27	48	35	24	192.48 ± 46.72
氯吡格雷敏感组	50	49	77	47	32	197.77 ± 41.28

2. 阿司匹林抵抗与 CYP2C19 基因 rs4244285 多态性的相关性:阿司匹林抵抗组和阿司匹林半抵抗组患者 CYP2C19 基因 rs4244285 呈明显多态性分布,突

变型 A 基因频率均显著高于阿司匹林敏感组 ($P < 0.05$,表 2)。

表 2 阿司匹林抵抗与 CYP2C19 基因 rs4244285 多态性的相关性

组别	n	rs4244285 基因型			rs4244285 基因频率(%)	
		GG	GA	AA	G 基因频率	A 基因频率
阿司匹林抵抗组	8	3	3	2	56.25	43.75
阿司匹林半抵抗组	73	34	21	18	60.96	39.04
阿司匹林敏感组	82	72	9	1	93.29	6.71
χ^2		35.603			49.675	
P		0.000			0.000	

3. 阿司匹林抵抗与 CYP2C19 基因 rs4986893 多态性的相关性:阿司匹林抵抗组和阿司匹林半抵抗组患者 CYP2C19 基因 rs4986893 呈明显多态性分布,突

变型 A 基因频率均显著高于阿司匹林敏感组 ($P < 0.05$,表 3)。

表 3 阿司匹林抵抗与 CYP2C19 基因 rs4986893 多态性的相关性

组别	n	rs4986893 基因型			rs4986893 基因频率(%)	
		GG	GA	AA	G 基因频率	A 基因频率
阿司匹林抵抗组	8	4	3	1	68.75	31.25
阿司匹林半抵抗组	73	57	12	4	86.30	13.70
阿司匹林敏感组	82	72	9	1	93.29	6.71
χ^2		7.673			10.837	
P		0.006			0.004	

4. 阿司匹林抵抗与 ABCB1 基因 rs2235048 多态性的相关性:阿司匹林抵抗组、阿司匹林半抵抗组和阿司匹林敏感组野生型基因 G 和突变型基因 A 频率等差异均无统计学意义 ($P = 0.170$,表 4)。

表 4 阿司匹林抵抗与 ABCB1 基因 rs2235048 多态性的相关性

类别	n	rs2235048 基因型			rs2235048 基因频率(%)	
		GG	GA	AA	G 基因频率	A 基因频率
阿司匹林抵抗组	8	5	2	1	75.00	25.00
阿司匹林半抵抗组	73	55	14	4	84.93	15.07
阿司匹林敏感组	82	69	9	4	89.63	10.37
χ^2		2.460			3.541	
P		0.117			0.170	

5. 氯吡格雷抵抗与 CYP2C19 基因 rs4244285 多态性的相关性:氯吡格雷抵抗组患者与 CYP2C19 基因 rs4244285 多态性呈明显多态性分布,突变型 A 基因频率显著增高(37.50% vs 13.64%, $P = 0.000$,表 5)。

表 5 氯吡格雷抵抗与 CYP2C19 基因 rs4244285 多态性的相关性

组别	n	rs4244285 基因型			rs4244285 基因频率(%)	
		GG	GA	AA	G 基因频率	A 基因频率
氯吡格雷抵抗组	64	31	18	15	62.50	37.50
氯吡格雷敏感组	99	78	15	6	86.36	13.64
χ^2		17.697			24.994	
P		0.000			0.000	

6. 氯吡格雷抵抗与 CYP2C19 基因 rs4986893 多态性的相关性:氯吡格雷抵抗组和氯吡格雷敏感组患

者突变型基因 A 频率比较,差异无统计学意义(14.84% vs 8.59%, $P=0.078$,表6)。

表 6 氯吡格雷抵抗与 CYP2C19 基因 rs4986893 多态性的相关性

组别	n	rs4986893 基因型			rs4986893 基因频率(%)	
		GG	GA	AA	G 基因频率	A 基因频率
氯吡格雷抵抗组	64	49	11	4	85.16	14.84
氯吡格雷敏感组	99	84	13	2	91.41	8.59
χ^2		2.651			3.099	
P		0.266			0.078	

7. 氯吡格雷抵抗与 ABCB1 基因 rs2235048 多态性的相关性:氯吡格雷抵抗组患者 ABCB1 基因

rs2235048 基因突变型基因 A 频率显著高于氯吡格雷敏感组(18.75% vs 9.60%, $P=0.017$,表7)。

表 7 氯吡格雷抵抗与 ABCB1 基因 rs2235048 多态性的相关性

组别	n	rs2235048 基因型			rs2235048 基因频率(%)	
		GG	GA	AA	G 基因频率	A 基因频率
氯吡格雷抵抗组	64	45	14	5	81.25	18.75
氯吡格雷敏感组	99	84	11	4	90.40	9.60
χ^2		4.976			5.689	
P		0.083			0.017	

讨 论

血小板的活化与血栓形成是动脉粥样硬化发病的重要基础,冠状动脉粥样硬化后可导致心肌血供下降,进而导致心肌梗死^[12]。支架置入介入治疗目前是冠状动脉病变导致的心肌梗死患者最主要的治疗方法,这类患者术后往往需要辅以双联抗血小板治疗,但对于部分患者而言,即使经过足剂量、足疗程的双联抗血小板治疗,仍可发生支架内血栓等严重不良事件,其主要原因是这类患者存在对抗血小板药物的抵抗,也称“血小板抵抗”^[13, 14]。由于目前主要的双联抗血小板治疗的药物是阿司匹林联合氯吡格雷,因此血小板抵抗又可分为阿司匹林抵抗和氯吡格雷抵抗^[15, 16]。本研究分析了血小板抵抗与 CYP2C19、ABCB1 基因多态性的相关性,发现阿司匹林抵抗与 CYP2C19 基因 rs4244285 和 rs4986893 突变有关,氯吡格雷抵抗与 CYP2C19 基因 rs4244285 和 ABCB1 基因 rs2235048 突变有关,因此临床上对于冠状动脉支架置入术后的心肌梗死患者,因检测 CYP2C19 基因 rs4244285 和 rs4986893、ABCB1 基因 rs2235048 多态性,以早期识别和干预血小板抵抗患者,降低患者远期心血管并发症的发生率。

CYP2C19 是机体较为重要的药物代谢酶,同时是 CYP450 酶的重要组成部分,高表达于肝脏,具有

众多 SNP 位点,其中 rs4244285 和 rs4986893 两个突变位点与代谢遗传缺陷密切相关,不同人种在 CYP2C19 的底物的代谢能力有很大差异,较早的一项研究显示亚洲人对药物的代谢能力较弱,主要原因是 rs4244285 和 rs4986893 两个突变位点的高突变率造成的^[17]。Tatarunas 等^[18]研究显示 CYP2C19 基因 rs4244285 突变与血小板抵抗有关,可明显影响氯吡格雷的临床效果。Li 等^[19]研究也证实了这一观点。Tang 等^[20]研究则显示 CYP2C19 基因 rs4244285 和 rs4986893 多态性是预测经皮冠状动脉支架置入术后患者远期严重不良心血管事件的可靠指标。Zhang 等^[21]在我国人群中的研究则显示 CYP2C19 基因 rs4244285 和 rs4986893 多态性与血小板抵抗有关,该研究同时指出 ABCB1 基因 rs2235048 多态性分布与氯吡格雷抵抗无关。但本研究显示氯吡格雷抵抗的患者 ABCB1 基因 rs2235048 基因突变型基因 A 频率显著高于氯吡格雷敏感的患者(18.75% vs 9.60%, $P=0.017$)。造成本研究与该研究结果相互矛盾的原因可能跟临床病例的选择误差有关,且不同人群 ABCB1 基因 rs2235048 多态性并不一致,因此尚需要大样本量的研究证实。

ABCB1 基因位于人类 7 号染色体 q21.1,编码一个 170000 的跨膜糖蛋白,而氯吡格雷是该蛋白的作

用底物,因此抑制该蛋白亦可以明显抑制氯吡格雷活性,导致氯吡格雷抵抗。Lin 等^[22]研究证实了 rs2235048 多态性与血小板抵抗的相关性。Jessica 等研究也证实了经皮冠状动脉支架置入术后患者再发严重心血管不良事件增加与 ABCB1 基因 SNP 的多态性分布有关。及早监测氯吡格雷和阿司匹林抵抗性,并探讨相关机制,可以为临床及早预防心血管不良事件提供参考和依据。李江等研究显示替格瑞洛对于氯吡格雷抵抗的患者具有良好的替代作用。增加阿司匹林、氯吡格雷的用量对这类患者也有积极意义,但是仍应常规检测凝血功能,防止过度抗凝导致颅内出血等严重并发症。

参考文献

- Glinge C, Sattler S, Jabbari R, *et al.* Epidemiology and genetics of ventricular fibrillation during acute myocardial infarction[J]. *J Geriatr Cardiol*,2016,13(9):789-797
- Satoh H, Sano M, Suwa K, *et al.* Pregnancy-related acute myocardial infarction in Japan: a review of epidemiology, etiology and treatment from case reports[J]. *Circ J*,2013,77(3):725-733
- Yamaji K, Natsuaki M, Morimoto T, *et al.* Long-term outcomes after coronary stent implantation in patients presenting with versus without acute myocardial infarction (an observation from coronary revascularization demonstrating outcome study - Kyoto registry cohort - 2) [J]. *Am J Cardiol*,2015,116(1):15-23
- Tokushige A, Shiomi H, Morimoto T, *et al.* Influence of initial acute myocardial infarction presentation on the outcome of surgical procedures after coronary stent implantation: a report from the CREDO - Kyoto PCI/CABG Registry Cohort - 2 [J]. *Cardiovasc Interv Ther*, 2013,28(1):45-55
- Komiya R, Kamintani K, Kubo E, *et al.* [Perioperative management and postoperative complication rates of patients on dual antiplatelet therapies after coronary drug eluting stent implantation] [J]. *Masui*, 2014,63(6):629-635
- Suh JW, Lee SP, Park KW, *et al.* Multicenter randomized trial evaluating the efficacy of cilostazol on ischemic vascular complications after drug-eluting stent implantation for coronary heart disease: results of the CILON-T (influence of Cilostazol-based triple antiplatelet therapy ON ischemic complication after drug-eluting stent implantation) trial[J]. *J Am Coll Cardiol*,2011,57(3):280-289
- Luque Ramos A, Ohlmeier C, Enders D, *et al.* Initiation and duration of dual antiplatelet therapy after inpatient percutaneous coronary intervention with stent implantation in Germany: an electronic healthcare database cohort study[J]. *Z Evid Fortbild Qual Gesundheitsw*, 2017,120(12):31-38
- Lee H, Koo BK, Park KW, *et al.* A randomized clinical trial comparing long-term clopidogrel vs aspirin monotherapy beyond dual antiplatelet therapy after drug-eluting coronary stent implantation: design and rationale of the Harmonizing Optimal Strategy for Treatment of coronary artery stenosis - Extended Antiplatelet Monotherapy (HOST-EXAM) trial[J]. *Am Heart J*,2017,185(32):17-25
- Liang ZY, Han YL, Zhang XL, *et al.* The impact of gene polymorphism and high on-treatment platelet reactivity on clinical follow-up: outcomes in patients with acute coronary syndrome after drug-eluting stent implantation[J]. *EuroIntervention*,2013,9(3):316-327
- Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, *et al.* Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease[J]. *Am J Cardiol*,2001,88(3):230-235
- Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, *et al.* Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis[J]. *J Am Coll Cardiol*,2007,49(24):2312-2317
- Akboga MK, Canpolat U, Yayla C, *et al.* Association of platelet to lymphocyte ratio with inflammation and severity of coronary atherosclerosis in patients with stable coronary artery disease[J]. *Angiology*, 2016,67(1):89-95
- Siasos G, Oikonomou E, Vavuranakis M, *et al.* Genotyping, platelet activation, and cardiovascular outcome in patients after percutaneous coronary intervention: two pieces of the puzzle of clopidogrel resistance[J]. *Cardiology*,2017,137(2):104-113
- Binderup HG, Houliand K, Madsen JS, *et al.* Aspirin resistance may be identified by miR-92a in plasma combined with platelet distribution width[J]. *Clin Biochem*,2016,49(15):1167-1172
- Urbanowicz T, Komosa A, Michalak M, *et al.* The incidence of aspirin resistance in heart transplantation recipients[J]. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*,2017,14(2):115-119
- Su J, Yu Q, Zhu H, *et al.* The risk of clopidogrel resistance is associated with ABCB1 polymorphisms but not promoter methylation in a Chinese Han population[J]. *PLoS One*,2017,12(3):4511-4516
- de Moraes SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, *et al.* The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans[J]. *J Biol Chem*,1994,269(22):15419-15422
- Tatarunas V, Kupstyte N, Giedraitiene A, *et al.* The impact of CYP2C19*2, CYP4F2*3, and clinical factors on platelet aggregation, CYP4F2 enzyme activity, and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid concentration in patients treated with dual antiplatelet therapy[J]. *Blood Coagul Fibrin*,2017,12(5):771-777
- Li XG, Ma N, Sun SS, *et al.* Association of genetic variant and platelet function in patients undergoing neuroendovascular stenting[J]. *Postgrad Med J*,2017,14(6):672-678
- Tang XF, Han YL, Zhang JH, *et al.* CYP2C19 genotyping combined with on-clopidogrel platelet reactivity in predicting major adverse cardiovascular events in Chinese patients with percutaneous coronary intervention[J]. *Thromb Res*,2016,147(12):108-114
- Zhang L, Chen Y, Jin Y, *et al.* Genetic determinants of high on-treatment platelet reactivity in clopidogrel treated Chinese patients [J]. *Thromb Res*,2013,132(1):81-87
- Lin KM, Chiu YF, Tsai IJ, *et al.* ABCB1 gene polymorphisms are associated with the severity of major depressive disorder and its response to escitalopram treatment[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2011, 21(4):163-170

(收稿日期:2017-09-21)

(修回日期:2017-11-06)