

氯吡格雷、阿司匹林和他汀类药物基因多态性在心血管患者中的分布

Distribution of Clopidogrel, Aspirin, and Statin Gene Polymorphisms in Cardiovascular Patients

陈欣 李媛* 吴彭春 李金莲 段奉元

Xin Chen Yuan Li* Pengchun Wu Jinlian Li Fengyuan Duan

昆明金域医学检验所有限公司 中国·云南昆明 650506

Kunming Kingmed Institute for Clinical Laboratory Co., Ltd., Kunming, Yunnan, 650506, China

摘要: 目的: 研究氯吡格雷、阿司匹林、氯吡格雷和他汀类药物相关基因多态性在心血管患者中的分布频率, 为临床个体化用药提供实验依据; 方法: 使用 MALDI-TOF 检测实验组和对照组基因型, SPSS 统计学系统进行数据处理; 结果: CYP2C19、PTGS1、LTC4S、GP1BA、SLCO1B1 和 ApoE 在两组受试者各基因频率均符合 Hardy-Winberg 平衡 ($P > 0.05$), 具有群体代表性。在两组受试者中, CYP2C19、LTC4S、GP1BA 和 SLCO1B1 基因型分布无显著性差异 ($P > 0.05$), PTGS1 和 ApoE 基因型分布组间比较有显著性差异 ($P=0.021$; $P=0.002$); 结论: 与对照组相比, 心血管患者中 PTGS1 携带 G 等位基因和携带 ApoE 基因 E4 表型的比例增加, 提示药物抵抗及患病风险升高。

Abstract: Objective: To investigate the distribution frequency of gene polymorphism related to clopidogrel, aspirin and statins in cardiovascular patients, and to provide experimental basis for clinical individualized medication. **Methods:** MALDI-TOF was used to detect the genotypes of the experimental group and the control group, and SPSS statistical system was used for data processing. **Results:** CYP2C19, PTGS1, LTC4S, GP1BA, SLCO1B1 and ApoE were in line with Hardy-Winberg equilibrium ($P > 0.05$), indicating population representability. There was no significant difference in the genotype distribution of CYP2C19, LTC4S, GP1BA and SLCO1B1 between the two groups ($P > 0.05$), but there was significant difference in the genotype distribution of PTGS1 and ApoE between the two groups ($P=0.021$; $P = 0.002$). **Conclusions:** Compared with the control group, the proportion of PTGS1 carrying the G allele and ApoE carrying the E4 phenotype increased in cardiovascular patients, suggesting drug resistance and increased risk of disease.

关键词: 氯吡格雷; 阿司匹林; 他汀类药物; 基因多态性; 心血管疾病

Keywords: Clopidogrel; Aspirin; Statins; genotype polymorphism; cardiovascular diseases

基金项目: 昆明市卫生科研课题项目 (2021-11-01-006)。

DOI: 10.12346/pmr.v4i4.7113

1 引言

心血管疾病是造成人类死亡的主要原因之一, 严重威胁人类健康。目前抗血小板药物、调脂药物等药物得到了广泛应用, 明显降低了患者不良心血管事件风险并改善患者预后。但不同心血管疾病患者个体基因型不同, 对上述药物疗效和安全性存在较大的个体差异。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF) 是美国食品药品

监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的痕量核酸检测系统, 具有快速、准确、低成本等特点^[1]。

本研究通过使用 MALDI-TOF 检测抗血小板药物: 氯吡格雷安全用药基因 CYP2C19 和阿司匹林抵抗相关基因 PTGS1、LTC4S 和 GP1BA; 调脂药物: 他汀类药物基因 SLCO1B1 和 APOE, 在心血管疾病患者血液中的多态性, 统计其在心血管疾病患者中突变率和联合突变率, 并与健康对照组基因型突变率进行比较, 分析基因型与心血管疾病患

【作者简介】陈欣 (1986-), 女, 中国河南濮阳人, 硕士, 主管技师, 从事肿瘤和药物研究。

【通讯作者】李媛, 本科, 主治医师。

病率的易感关系,为临床个体化用药提供实验依据。

2 资料与方法

2.1 研究对象

病例组:选择2021年1月至2022年8月期间在昆明金域医学检验所接受心血管安全用药基因检测的心脑血管疾病患者样本300例,患者平均年龄(65 ± 15)岁,其中男性171例,女性129例。对照组:选取同期送检的健康体检样本100例作为对照组。

2.2 仪器和试剂

飞行时间质谱检测系统/DR MassARRAY(生产商:Agena Bioscience); Complete iPLEX® Pro Genotyping Reagent Set 10x384(生产商:Agena Bioscience);血液基因组DNA提取试剂盒(天根生化科技有限公司);引物由ThermoFisher合成。

2.3 方法

2.3.1 DNA的提取

空腹抽取受检者EDTA抗凝外周血,颠倒混匀后采用血液基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA(按试剂盒说明书顺序操作)。使用NANODROP2000(厂家ThermoFisher)测定提取的DNA浓度和纯度,要求DNA的浓度在 $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$, A260/A280比值在1.8~2.0,提取的DNA在 -20°C 保存。

2.3.2 采用MALDI-TOF检测SNP位点

DNA模板经过多重聚合酶链式反应扩增后,使用虾碱性磷酸酶(shrimp alkaline phosphatase, SAP)去除残留的脱氧核糖核苷三磷酸,再采用双脱氧核苷三磷酸、与待测位点的前模板匹配的特异性单碱基延伸引物进行待测位点单个碱基的延伸反应,根据延伸产物分子质量区分待测位点的碱基类型^[2]。心血管药物及其对应的基因位点见表1。

2.3.3 统计学方法

采用SPSS 26.0软件进行统计分析,采用 χ^2 检验分析各SNP位点等位基因分布是否符合Hardy-Weinberg遗传平衡;计数资料以例数和百分数表示,组间采用 $R \times C$ 列表的 χ^2 检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 MALDI-TOF基因型检测结果

MALDI-TOF检测基因型经典图谱见图1。

3.2 氯吡格雷安全用药基因CYP2C19基因型分布情况

根据对药物代谢能力的差异将人群分为四种类型^[3]:快代谢型*17/*17、*1/*17,正常代谢型*1/*1,中间代谢型*1/*2、*1/*3、*2/*17、*3/*17,慢代谢型*2/*2、*2/*3、*3/*3。本研究检测到CYP2C19在两组受试者各基因频率均符合Hardy - Winberg平衡($P > 0.05$),具有群体代表性。CYP2C19基因型分布组间比较无显著性差异($P > 0.05$),见表2。

表1 心血管药物及其对应的基因位点

药物名称	基因	检测位点	突变类型
氯吡格雷	CYP2C19	CYP2C19*2 rs4244285	(c.681G > A)
		CYP2C19*3 rs4986893	(c.636G > A)
		CYP2C19*17 rs12248560	(c.806C > T)
阿司匹林	GP1BA	rs6065	(c.482C > T)
	PTGS1	rs10306114	(c.842A > G)
	LTC4S	rs730012	(c.444A > C)
他汀类药物	SLCO1B1	SLCO1B1*1B rs2306283	(c.388A > G)
		SLCO1B1*5 rs4149056	(c.521T > C)
	ApoE	rs429358 rs7412	(c.526T > C) (c.388T > C)

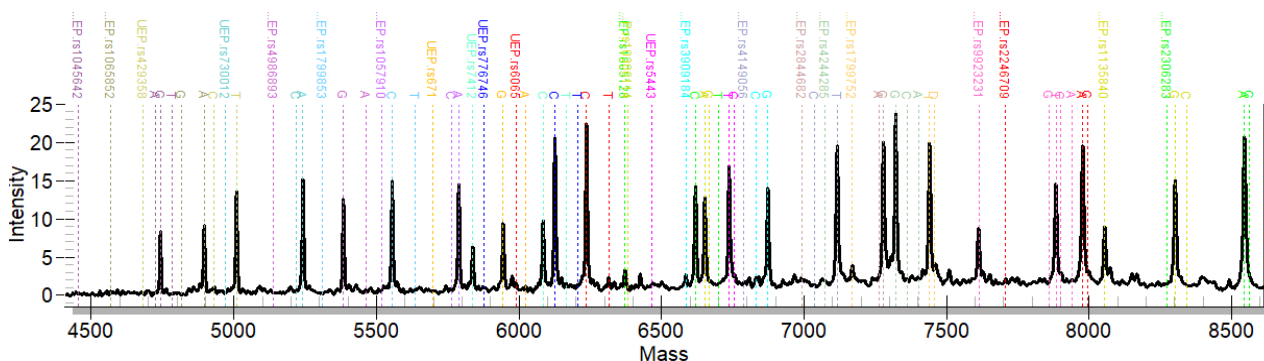


图1 MALDI-TOF质谱峰图

表 2 CYP2C19 基因型在心血管患者和健康人群中的分布及等位基因频率比较 (%)

项目	心血管组 (n=300)	对照组 (n=100)	χ^2 值	P 值		
CYP2C19 基因型						
快代谢型 *17/*17、*1/*17	94 (31.33)	34 (30)	2.716	0.154		
正常代谢型 *1/*1	104 (34.67)	34 (34)				
中间代谢型 *1/*2, *1/*3, *2/*17, *3/*17	69 (23)	23 (23)				
慢代谢型 *2/*2, *2/*3, *3/*3	33 (11)	9 (9)				
等位基因						
*2 rs4244285 (c.681G > A)	G (89.54)	A (10.46)	G (89.35)	A (10.65)	2.301	0.14
*3 rs4986893 (c.636G > A)	G (85.64)	A (14.36)	G (89.61)	A (10.39)	1.446	0.23
*17rs12248560 (c.806C > T)	C (80.45)	T (19.55)	C (79.54)	T (20.46)	0.173	0.68

3.3 阿司匹林抵抗相关基因检测

目前研究的阿司匹林疗效与不良反应的基因主要有 PTGS1、LTC4S 和 GP1BA^[4], 本研究检测到 PTGS1、LTC4S 和 GP1BA 在两组受试者中各基因频率均符合 Hardy - Winberg 平衡 ($P > 0.05$), 具有群体代表性。PTGS1 rs10306114 (c.842A > G) 基因型分布组间比较有显著性差异 ($\chi^2=7.688$, $P=0.021$), LTC4S 和 GP1BA 基因型分布组间比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 见表 3。

3.4 他汀类药物基因多态性分布情况

3.4.1 SLCO1B1和ApoE基因型Hardy-Winberg平衡检测

本研究检测到 SLCO1B1 388A > G 和 521T > C 在两组受试者中基因型分布符合 Hardy - Winberg 平衡 ($\chi^2=0.097$,

$P=0.775$); ApoE 388T > C 和 526C > T 在两组受试者中基因型分布符合 Hardy - Winberg 平衡 ($\chi^2=0.149$, $P=0.700$), 见表 4。表明本研究人群的上述四个位点基因型分布已达到遗传平衡, 具有群体代表性。

3.4.2 SLCO1B1 与 ApoE 基因型分布

根据服用他汀类药物后发生肌病或横纹肌溶解风险及他汀类药物耐受的剂量将 SLCO1B1 基因型划分为三类, 共 9 种表型^[5], 基因型分布组间比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 见表 5。依据发生动脉粥样硬化、心血管疾病和阿尔茨海默症等的风险及服用他汀类药物的疗效将其划分为三大类, 共 6 种表型^[6], 基因型分布组间比较有显著性差异 ($\chi^2=12.198$, $P=0.002$), 见表 5。

表 3 阿司匹林抵抗相关基因型在心血管患者和健康人群中的分布及等位基因频率比较 (%)

项目	心血管组 (n=300)	对照组 (n=100)	χ^2 值	P 值
GP1BA				
rs6065 (c.482C > T)				
CC	198 (66)	55 (55)	2.612	0.106
CT	44 (14.67)	24 (24)		
TT	58 (19.33)	21 (21)		
等位基因				
C	440 (73.33)	134 (67)	1.178	0.278
T	160 (26.67)	66 (33)		
PTGS1 基因型 rs10306114 (c.842A > G)				
AA	186 (62)	71 (71)	7.688	0.021
AG	54 (18)	21 (21)		
GG	60 (20)	8 (8)		
等位基因				
A	426 (71)	163 (81.5)	3.365	0.067
G	174 (29)	37 (18.5)		
LTC4S 基因型 rs730012 (c.444A > C)				
AA	213 (71)	78 (78)	3.078	0.215
AC	60 (20)	18 (18)		
CC	54 (9)	4 (4)		
等位基因				
A	486 (81)	174 (87)	1.339	0.247
C	168 (19)	26 (13)		

表4 SLCO1B1 和 ApoE 基因型 Hardy - Winberg 平衡检测

基因	SNP 位点 (n=300)	分组	基因型分布频率 (%)	等位基因分布频率 (%)	χ^2 值	P 值
SLCO1B1	388A > G rs2306283	心血管组 (n=300)	AA (45) AG (84) GG (171)	A (29) G (71)	0.097	0.775
		对照组 (n=100)	AA (16) AG (24) GG (60)	A (28) G (72)		
	521T > C rs4149056	心血管组 (n=300)	TT (216) TC (79) CC (5)	T (85.17) C (14.83)	0.149	0.700
		对照组 (n=100)	TT (69) TC (29) CC (2)	T (83.5) C (16.5)		
ApoE	388T > C rs429358	心血管组 (n=300)	TT (187) TC (108) CC (5)	T (80.33) C (19.67)	0.130	0.718
		对照组 (n=100)	TT (66) TC (31) CC (3)	T (81.5) C (18.5)		
	526C > T rs7412	心血管组 (n=300)	CC (201) CT (96) TT (3)	C (83) T (17)	0.149	0.700
		对照组 (n=100)	CC (72) CT (26) TT (2)	C (85) T (15)		

表5 SLCO1B1 与 ApoE 基因型在心血管患者和健康人群中的分布及等位基因频率比较 (%)

项目	心血管组 (n=300)	对照组 (n=100)	χ^2 值	P 值
SLCO1B1 基因型				
正常风险型: *1a/*1a、*1a/*1b、*1b/*1b	164 (54.7)	56 (56)	0.025	0.987
中度风险型: *1a/*5、*1a/*15、*1b/*15	93 (31)	30 (30)		
高度风险型: *5/*5、*5/*15、*15/*15	43 (14.3)	14 (14)		
APOE 基因型				
保护型基因型: E2/E2、E2/E3	104 (34.7)	40 (40)	2.198	0.002
普通型基因型: E2/E4、E3/E3	136 (45.3)	56 (56)		
风险型基因型: E3/E4、E4/E4	60 (20.0)	4 (4)		

4 讨论

目前,在中国心血管病患病率处于上升阶段。有研究报道,心血管药物在使用时,其不良反应报告例数占总报告例数的7%~11%,仅次于抗感染药^[7]。心血管药物的有效性和安全性存在较大的个体差异,进行药物基因组学检测不仅可以避免严重的不良反应及毒副作用,更可以实现个性化用药,提高药效节省医疗资源。

CYP2C19 是细胞色素 P450 酶系的重要一员,与多种药物代谢密切相关。目前文献报道 CYP2C19 具有多个遗传多态性位点,不同位点的等位基因对药物的代谢作用强度不同,在东亚人群中最常见的是 *2, *3 以及 *17^[8]。其中, *2、*3 为功能缺失等位基因, *17 为功能增强等位基因。氯吡格雷经肝脏 CYP2C19 酶代谢为有效活性产物才能发挥药效,该酶的编码基因 CYP2C19 的多态性,可导致不同个体间酶活性的显著差异,从而引发不良心血管事件^[9]。对于考虑接受氯吡格雷用药治疗的患者,通过基因检测,可以提前知晓患者对氯吡格雷的代谢类型,指导临床合理选择。

阿司匹林 (Aspirin) 是一种水杨酸类非甾体抗炎药物,具有解热镇痛消炎作用,常用于心血管疾病的预防。阿司匹林抵抗 (Aspirin Resistance, AR) 即临床发现部分心血管疾病患者尽管长期低剂量服用阿司匹林仍不能有效抑制血小板的活性,发生率约为 0.4% -83%^[10]。阿司匹林为环氧酶抑制性药物,目前研究的阿司匹林疗效与不良反应的基因主要有 PTGS1、LTC4S 和 GP1BA。白三烯 C4 合酶 (LTC4S 编码) 参与阿司匹林加重性呼吸系统疾病的病理生理学过程。与 LTC4S AA 基因型相比, AC 和 CC 基因型患者对阿

司匹林的敏感性升高,患荨麻疹的风险升高^[11]。在服用阿司匹林的日本患者中研究发现,与阿司匹林耐受患者相比,在阿司匹林诱导的哮喘患者中 LTC4S C 等位基因的频率显著升高^[12]。因此, AC 和 CC 基因型患者服用阿司匹林时应注意药源性皮疹和哮喘的发生,若出现症状,停用阿司匹林,其他的环氧酶抑制剂类药物也应避免使用,换用其他药物。有荨麻疹、哮喘、慢性鼻炎、鼻息肉、鼻旁窦炎等患者应谨慎使用阿司匹林等环氧酶抑制性药物。目前可采用的阿司匹林“抵抗”处理策略有:控制患者其他相关危险因素;确保患者的依从性;排查同时使用的药物;选择阿司匹林的合适剂量;换用或加用其他抗血小板药物^[13]。

他汀类药物不仅能强效地降低总胆固醇 (TC) 和低密度脂蛋白 (LDL),而且能一定程度上降低三酰甘油 (TG),升高高密度脂蛋白 (HDL)^[14]。研究证实,不同个体对不同他汀类药物的反应存在巨大的差异,而导致差异的主要因素是他汀类药物在肝脏代谢和转运的遗传特性不同,主要由载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE), 以及阴离子转运多肽 (OATP1B1, SLCO1B1 基因编码) 的基因多态性决定^[15]。SLCO1B1: 他汀类药物从血液转运至肝脏发挥药效需要 SLCO1B1 基因编码的转运蛋白帮助, SLCO1B1 基因发生突变会增加药物的不良反应^[16]。ApoE: ApoE 属载脂蛋白家族,主要在肝脏和脑组织中表达,是影响血脂水平的重要因素,与动脉粥样硬化发生发展密切相关。ApoE 基因主要有两种单核苷酸多态性,形成 E2、E3、E4 三种单倍型。E3 为野生型,占人类的 78%,属于常见基因型; E4 型携带者的他汀药物疗效往往不佳,而 E2 携带者的降脂作用

最强。ApoE 基因多态性还与阿尔茨海默病密切相关，携带有 ApoE4 的个体被认为具有较高的老年痴呆发病风险。同时，ApoE4 亦是脑外伤、脑出血和脑局部缺血的风险因子，与脑卒中密切相关^[17]。

本研究发现在心血管患者与正常健康人群比较中：氯吡格雷药物代谢 CYP2C19 基因多态性分布频率无显著性差异；而阿司匹林抵抗 PTGS1 rs10306114 (c.842A > G) 基因型分布组间比较有显著性差异 ($\chi^2=7.688$, $P=0.021$)，与报道^[11]在冠状动脉疾病患者接受阿司匹林治疗时，相比于 PTGS1 AA 基因型，携带 G 等位基因的患者出现治疗无响应的风险升高，发生心血管事件的风险升高相一致；他汀药物基因检测发现心血管患者 ApoE 风险型基因型 (E3/E4、E4/E4) 占比较对照组高，组间比较有显著性差异 ($\chi^2=12.198$, $P=0.002$)。但只研究在心血管患者基因的分布情况，各种基因型对心血管治疗药物作用的影响还需进一步研究。

参考文献

- [1] Nyasinga J, Kyany'A C, Okoth R, et al. A six-member SNP assay on the iPLEX MassARRAY platform provides a rapid and affordable alternative for typing major African *Staphylococcus aureus* types.[J]. *Access microbiology*, 2019,1(3):e000018.
- [2] 余艳芳. 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱在结核分枝杆菌耐药检测中的应用价值研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2021,29(10):7.
- [3] 钟诗等. 氯吡格雷抗血小板治疗个体化用药基因型检测指南解读[J]. *中国实用内科杂志*, 2015(1):38-41.
- [4] 彭文星, 冯频频, 石秀锦, 等. 阿司匹林抵抗的基因多态性及个体化治疗[J]. *中国药房*, 2016,27(23):3.
- [5] Guan Z, Wu K, Li R, et al. Pharmacogenetics of statins treatment: Efficacy and safety[J]. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2019,44(6).
- [6] Liu C C, Kanekiyo T, Xu H, et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy[D]. *NATURE PUBLISHING GROUP*, 2013.
- [7] 王丹, 任经天, 董铎, 等. 药品不良反应监测年度报告十年趋势分析[J]. *中国药物警戒*, 2020,17(5):276-283.
- [8] Chang M, et al. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2015,71(4):433-439.
- [9] Cresci S, et al. *Circulation Cardiovascular Genetics*, 2014,7(3):277.
- [10] USPSTF: Final Guidelines on Aspirin as CVD, Cancer Prevention. *Medscape*. April 11, 2016.
- [11] 阿司匹林在动脉硬化心血管疾病中的临床应用-中国专家共识(2005)[J]. *中国全科医学*, 2006,9(16):1339-1341.
- [12] *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 2004,113(4):771-775.
- [13] *Thrombosis & Haemostasis*, 2006,96(2):253-259.
- [14] Moran A, Gu D, Zhao D, et al. Future cardiovascular disease in china: markov model and risk factor scenario projections from the coronary heart disease policy model-china.[J]. *Circulation Cardiovascular Quality & Outcomes*, 2010,3(3):243.
- [15] 高辉, 王杨, 陈婉婷, 等. SLCO1B1 和 APOE 基因多态性与他汀类药物疗效的相关性[J]. *实用医学杂志*, 2019,35(14):2300-2303.
- [16] Generaux GT, Bonomo FM, Johnson M, et al. Impact of SLCO1B1 (OATP1B1) and ABCG2 (BCRP) genetic polymorphisms and inhibition on LDL-C lowering and myopathy of statins[J]. *Xenobiotica*, 2011, 41(8): 639-651.
- [17] Wang C, Yan W, Wang H, et al. APOE polymorphism is associated with blood lipid and serum uric acid metabolism in hypertension or coronary heart disease in a Chinese population[J]. *Pharmacogenomics*, 2019,20(14): 1021-1031.