

文章编号 1006-8147(2014)01-0018-03

论著

对氧磷酶 1 基因 Gln/Arg192 多态性与氯吡格雷抵抗相关性初步研究

曹桂花¹, 王伟², 毛永敏³

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市胸科医院心内科, 天津 300050; 3. 天津市胸科医院心血管病研究所, 天津 300051)

摘要 目的:探索对氧磷酶 1(PON-1)基因 Gln/Arg192 多态性与氯吡格雷抵抗(CR)发生的相关性。方法:采用病例-对照研究的方法,共入选 260 例接受冠状动脉支架安置(PCI)术并服用氯吡格雷抗血小板治疗的冠心病患者作为研究对象,检测二磷酸腺苷(ADP)诱导的最大血小板聚集率,服用 300 mg 氯吡格雷 24 h 后最大血小板聚集较基线值下降<10%定义为氯吡格雷抵抗(CR)。根据血小板聚集率检测结果将入选人群分为 CR 组($n=54$)和非氯吡格雷抵抗(NCR)组($n=206$)。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法测定 PON-1 基因 Gln/Arg192 基因多态性,分析 PON-1 基因 Gln/Arg192 多态性与 CR 发生的相关性。结果:氯吡格雷抵抗发生率为 20.8%。PON-1 基因 Gln/Arg192 基因型分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。RR、QR、QQ 基因型频率在 CR 组分别为 38.9%、50.0%、11.1%,而在 NCR 组分别为 30.6%、57.3%、12.1%,基因型频率分布差异在两组间无统计学意义($P>0.05$);R、Q 等位基因频率在两组间分别为:69.4%、65.3%和 30.6%、34.7%,等位基因频率分布差异在两组间亦无统计学意义($P>0.05$)。结论:PON-1 基因 Gln/Arg192 多态性与 CR 的发生无相关性。

关键词 氯吡格雷抵抗;对氧磷酶 1;Gln/Arg192;基因多态性

中图分类号 R541.4

文献标志码 A

Studies on the correlation between Paraoxonase-1 gene Gln/Arg192 polymorphism and clopidogrel resistance

CAO Gui-hua¹, WANG Wei², MAO Yong-min³

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Cardiology, Chest Hospital of Tianjin, Tianjin 300050, China; 3. Cardiovascular Disease Institute of Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300051, China)

Abstract Objective: To investigate the correlation between PON-1 (Paraoxonase-1) gene Gln/Arg192 polymorphism to the occurrence and clopidogrel resistance (CR). **Methods:** A case-control method was employed. A total of 260 cases of thoracic receiving clopidogrel antithrombotic treatment from coronary heart disease (CHD) from Tianjin hospital for PCI were enrolled. The difference between baseline and maximum platelet aggregation below 10% after the use of clopidogrel 300 mg after 24 h was defined as CR. Accordingly, all the enrolled 260 patients were then divided into CR group ($n=54$) and non-CR (NCR) group ($n=206$). PCR-RFLP was executed to determine the genotypes and the allele frequencies of PON-1 gene Gln/Arg192. **Results:** The incidence of clopidogrel resistance was 20.8%. The genotype frequencies in Gln/Arg192 of PON-1 gene conformed well to the Hardy-Weinberg equilibrium in both CR group and NCR group. Three frequencies of genotype RR, QR and QQ were 38.9%, 50.0%, 11.1% in CR group, and 30.6%, 57.3%, 12.1% in NCR groups, respectively. No significant difference in genotype and allele frequency was found between CR group and NCR group ($P=0.507$ and $P=0.208$, respectively). **Conclusion:** This research shows no correlation exists between PON-1 gene Gln/Arg192 polymorphism and clopidogrel resistance in patients with CHD.

Key words clopidogrel resistance; paraoxonase-1; Gln/Arg192; gene polymorphism

氯吡格雷(clopidogrel)是继阿司匹林之后一个重要的噻吩并吡啶类抗血小板药物,也是目前经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)后的常规用药,阿司匹林和氯吡格雷双抗治疗是减轻 PCI 过程中血小板聚集的金标准^[1],且可明显降低术后心血管不良事件的再发率^[2],但临

床中应用氯吡格雷时仍有 4%~30%的患者在常规剂量治疗中达不到预期的抗血小板作用,严重者会导致血栓、再次心肌梗死、死亡等心血管不良事件,称为氯吡格雷抵抗(clopidogrel resistance, CR)^[3],CR 的发病机制目前尚不十分明确,基因的多态性是引起氯吡格雷抵抗的重要因素之一。本研究对天津市部分人群 PON-1 基因 Gln/Arg192 多态性进行分析,探索 PON-1 基因 Gln/Arg192 多态性与 PCI 术

作者简介 曹桂花(1988-),女,硕士在读,研究方向:冠心病药物治疗;通信作者:王伟, E-mail: greatwhlm@yahoo.com。

后 CR 发生的相关性,以为早期预测 CR 及 CR 患者个体化治疗提供帮助。

1 资料和方法

1.1 研究对象 本研究所选的对象为 2010 年 11 月–2013 年 5 月在天津市胸科医院心内科接受住院治疗并行 PCI 手术的冠心病患者,共 260 例。入选标准:年满 20 岁;经冠脉造影诊断为冠心病;给予标准双联抗血小板治疗(阿司匹林和氯吡格雷),口服阿司匹林(300 mg)及氯吡格雷(300 mg)24 h 以上或口服阿司匹林(每日 100 mg)及氯吡格雷(每日 75 mg)4 d 以上。排除标准:2 周内服用氯吡格雷或噻氯匹啶者;具有对阿司匹林及氯吡格雷过敏者;对阿司匹林及氯吡格雷有禁忌证者;凝血功能障碍者;患慢性血液系统疾病或血小板计数 <10 万;6 个月内有卒中或出血性疾病病史者;伴有严重的肝肾功能损害或合并感染、肿瘤或免疫系统疾病;近期拟行外科手术者。

1.2 分组 使用氯吡格雷后最大血小板聚集与基线值的差值 $<10\%$ 定义为 CR,据此将 PCI 手术治疗的冠心病患者分为 CR 组和非氯吡格雷抵抗(NCR)组。

1.3 冠心病易患因素采集及生化指标的测定 所有受试者住院时记录性别、年龄、体质量、吸烟史、饮酒史、糖尿病史及高血压病病史。采集空腹 12 h 后的静脉血 5 mL,应用德国 MERCK 全自动生化分析仪测定 TC、TG、HDL C 及 LDL C 水平。

1.4 PON-1 基因 Gln/Arg192 多态性测定 采集空腹 12 h 的静脉血 5 mL,EDTA 抗凝,以低溶血法提取细胞基因组 DNA, -20°C 冰箱保存。PCR 引物:由上海生物工程技术服务有限公司合成,上游:5'-TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G-3',下游:5'-CAC ATA CTT GCC ATC GGG TAG A-3';PCR 反应体系为:25 μL 反应体系:模板 DNA 0.5 μL 、dNTP0.5 μL 、BufferC 5 μL 、Taq 聚合酶 0.25 μL 、Primers P1 0.5 μL 、Primers P₂ 0.5 μL 、H₂O 17.75 μL ,混匀、离心。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,三步循环;变性 96 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 7 min。扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳 40 min,EB 染色,紫外灯下可见扩增得到的 199 bp 片段。PCR 产物 12 μL ,限制性内切酶 *Hinf* I 1 μL ,10 \times BufferR1.8 μL ,H₂O 3.2 μL ,混匀后离心 30 s,37 $^{\circ}\text{C}$ 电热恒温水浴箱孵育过夜,3%琼脂糖凝胶电泳 50 min,EB 染色,紫外线灯下判断基因型:RR 纯合子(77 bp 和 34 bp),QR 杂合子(111 bp、77 bp 和 34 bp),QQ 纯合子(34 bp)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件处

理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;基因型、等位基因频率和组间计数资料的比较采用 χ^2 检验;基因与事件关联强度以比值(*OR*)及 95%可信区间(95%*CI*)表示; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料 实验室检查结果符合 CR 诊断标准者共 54 例(20.8%)。研究对象基本资料见表 1。两组患者的性别、年龄、体质量指数等一般资料差异无统计学意义($P>0.05$),常规实验室检查结果差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 CR 组和 NCR 组临床基本资料比较

Tab 1 Comparison on basic clinical data of both CR and NCR groups

分组	<i>n</i>	年龄/ 岁	男/ <i>n</i> (%)	质量指数/ (kg/m^2)	高血压病/ <i>n</i> (%)	糖尿病/ <i>n</i> (%)	吸烟/ <i>n</i> (%)
CR	54	61.7 \pm 9.1	36(66.7)	26.12 \pm 3.15	40(74.1)	25(46.3)	30(55.6)
NCR	206	62.4 \pm 9.6	134(65.0)	26.45 \pm 3.44	152(73.8)	82(39.8)	114(55.3)
<i>P</i>	–	0.655	0.873	0.530	1.000	0.438	1.000
分组	<i>n</i>	饮酒/ <i>n</i> (%)	总胆固醇/ (mmol/L)	血小板/ ($10^9/\text{L}$)	左室射血/ %	病变血管/ 支	支架/ 枚
CR	54	19(35.2)	4.8 \pm 1.2	222 \pm 67	60.3 \pm 7.6	1.75 \pm 0.99	2.13 \pm 2.70
NCR	206	55(26.7)	4.8 \pm 1.3	215 \pm 49	59.2 \pm 9.7	1.52 \pm 0.94	1.54 \pm 1.88
<i>P</i>	–	0.238	0.712	0.402	0.454	0.130	0.065

2.2 PON-1 基因 Gln/Arg192 等位基因及基因型的分布 PON-1 基因 Gln/Arg 192 等位基因分布为:Q 等位基因频率在 CR 组与 NCR 组分别 30.6%及 34.7%;R 等位基因频率在两组间分别为 69.4%及 65.3%,基因型分布见表 2。

表 2 PON-1 基因 Gln/Arg192 位点基因型及等位基因频率分布
[*n*(%)]

Tab 2 The genotype and allele frequency of PON-1 gene Gln/Arg192 in CR group and NCR group[*n*(%)]

分组	<i>n</i>	基因型			等位基因频率	
		RR	QR	QQ	R	Q
CR	54	21(38.9)	27(50.0)	6(11.1)	75(69.4)	33(30.6)
NCR	206	63(30.6)	118(57.3)	25(12.1)	269(65.3)	143(34.7)
χ^2	–	1.358			1.588	
<i>P</i>	–	0.507			0.208	

统计分析显示,两组人群 PON-1 基因 Gln/Arg192 位点基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。各基因型在 CR 组和 NCR 组间分布频率差异无统计学意义($\chi^2=1.358,P=0.507$);R、Q 等位基因在 CR 组及 NCR 组间差异也无统计学意义($\chi^2=1.588,P=0.208$)。分析校正基因型 RR/QR(*OR*=0.674,95%

$CI = 0.346 \sim 1.313, P = 0.246$) 及 RR/QQ ($OR = 0.762, 95\%CI = 0.236 \sim 1.911, P = 0.456$) 差异无统计学意义后,发现 PON-1 基因 Gln/Arg 192 位点基因多态性与冠心病患者 CR 的发生无相关关系。

3 讨论

血小板激活在急性冠脉综合征(ACS)的发病中起着重要的作用^[5],抗血小板治疗抑制血小板的粘附、聚集和释放,从而阻止血栓形成。氯吡格雷是一种新型噻吩并吡啶类衍生物,是通过体内代谢才能产生具有抗凝血活性代谢物的前体药物^[6],氯吡格雷的活性代谢产物选择性的、不可逆的与血小板膜表面一种 ADP 受体(P2Y₁₂受体)结合,阻断 ADP 对腺苷酸环化酶的抑制作用,起到抑制血小板聚集的作用^[7],与阿司匹林联用,可使 ACS 的危险性大大减低,还可以有效减少 PCI 术后的支架内血栓形成。目前,CR 机制尚不完全清楚,大量研究证实,CR 与遗传基因多态性、药物动力学和血小板特性等有关,ACS 时剂量不足和药物相互作用以及人体质量指数等也与 CR 相关^[8-9],除这些因素,CR 还和糖尿病、年龄、肥胖、性别(女性)相关^[10];Wiviott 等认为分子遗传学机制在 CR 的内因中起着很重要的作用。关于 CR 的研究多集中在 CYP450 酶系^[11-12]及 P2Y₁₂ 基因多态性^[13],而 Bouman 等^[4]在欧美人群中利用体外代谢谱技术,发现 PON-1 基因是氯吡格雷生物活化的一种关键酶,PON-1 基因定位于染色体 7q21.3~q22.1 区,由 355 个氨基酸残基组成,PON-1 基因有近 200 个 SNP 位点^[14],其中两个位于编码区的重要多态位点分别是第 55 位点的 Leu-Met 和第 192 位点的 Gln-Arg^[15]。在国外,Bouman 等^[4]实验结果表明:PON-1QQ192 纯合子个体相比 RR192 纯合子个体有较高支架内血栓形成的风险、较低的活性代谢产物浓度和较低的血小板抑制,从而认为 PON-1 基因 Gln/Arg192 多态性是影响氯吡格雷生物活化和临床活性的主要因素;随后,Sibbing 等^[16]通过对 1 524 例经 PCI 治疗患者的研究认为:PON-1 基因 Gln/Arg192 多态性与氯吡格雷的疗效无相关。在国内,关于 PON-1 基因 Gln/Arg192 多态性与患者 PCI 术后 CR 发生相关性研究罕见报道,因此我们选取 PON-1 基因 Gln/Arg192 多态性进行研究,探讨天津市部分人群 PON-1 基因 Gln/Arg192 多态性是否与冠心病患者 PCI 术后 CR 发生存在相关性,为早期预测 CR 提供可能性。本研究发现,CR 组和 NCR 组中 PON-1 基因 Gln/Arg192 基因型频率和等位基因分布频率在两组间分布无统计学差异($P > 0.05$)。结果提示天津市部分人群 PON-1 基因

Gln/Arg192 多态性与 CR 的发生并不存在明显相关性,表明 PON-1 基因 Gln/Arg192 分型尚不足以作为 CAD 患者 PCI 术后进行早期预测氯吡格雷抵抗的指标。本研究样本例数偏少,其结果能否证实 PON-1 基因 Gln/Arg192 分型与 CR 无相关仍需扩大样本量进一步证实。

参考文献:

- [1] Tantry U S, Bliden K P, Guibel P A. Resistance to antiplatelet drugs: current status and future research[J]. Expert Opin Pharmacother, 2005, 6(12): 2027
- [2] Sebatine M S, Cannon C P, Gibson C M, et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation[J]. N Engl J Med, 2005, 352(12): 1179
- [3] Sugunataj M S, Palaniswamy C, Selvaraj D R, et al. Clopidogrel resistance[J]. Am J Ther, 2010, 17(2): 210
- [4] Bouman H J, Schomig E, Werkum J W van, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy[J]. Nat Med, 2011, 17(1): 110
- [5] Massberg S, Sveltholm C, Gawaz M. Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome[J]. Semin Vasc Med, 2003, 3(2): 147
- [6] 伍前发, 张宜青, 林青. 冠状动脉介入治疗后血管再狭窄的药物防治进展[J]. 武警医学院学报, 2010, 19(9): 753
- [7] 张晶, 马依彤, 穆巴拉克. 氯吡格雷抵抗基因多态性的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2012, 33(1): 51
- [8] Guthikonda S, Lev E I, Kleiman N S. Resistance to antiplatelet therapy[J]. Curr Cardiol Rep, 2005, 7(4): 242
- [9] Nguyen T A, Diodati J G, Pharand C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(8): 1157
- [10] Osmancik P, Paulu P, Tousek P, et al. High leukocyte count and interleukin 10 predict high on-treatment-platelet-reactivity in patients treated with clopidogrel[J]. J Thromb Thrombolysis, 2012, 33(4): 349
- [11] Simon T, Verstuyt C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events[J]. N Engl J Med, 2009, 360(4): 363
- [12] Mega J L, Close S L, Wiviott S D, et al. Cytochrome P-450 polymorphisms and response to clopidogrel[J]. N Engl J Med, 2009, 360(4): 354
- [13] 唐晓芳, 袁晋青. 氯吡格雷抵抗基因多态性的研究现状[J]. 心血管病学进展, 2012, 31(2): 165
- [14] Richter R J, Jarvik G P, Furlong C E, et al. Paraoxonase 1 status as a risk factor for disease or exposure[J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 660: 29
- [15] Gupta N, Singh S, Maturu V N, et al. Paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms, haplotypes and activity in predicting CAD risk in North-West Indian Punjabis[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e17805
- [16] Sibbing D, Koch W, Massberg S, et al. No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting [J]. Eur Heart J, 2011, 32(13): 1605

(2013-07-04 收稿)