

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.18.006

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*

楚明明, 王 强, 张 喆, 邹 朗, 雷 健, 张 蓉[△]

(陆军军医大学第二附属医院药剂科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨西南地区动脉粥样硬化性心血管疾病(ASCVD)患者阿司匹林抗血小板药效相关基因多态性的分布情况,为临床实践中基于患者个体差异调整阿司匹林给药方案提供依据。**方法** 收集医院心血管内科2018年4月至9月收治的ASCVD患者358例,以聚合酶链反应(PCR)荧光法对其阿司匹林抗血小板药效相关基因进行检测,计算基因多态性分布的频率。**结果** 358例患者中,GPⅢaPLA2(T>C)基因均为野生型,无突变;PEAR1(G>A)基因野生(GG)型111例,突变杂合(GA)型180例,突变纯合(AA)型67例,突变率68.99%;PTGS1(-842A>G)基因野生(AA)型356例,突变杂合(AG)型2例,突变率0.56%;GP1BA(5792C>T)基因野生(CC)型307例,突变杂合(CT)型48例,突变纯合(TT)型3例,突变率14.25%。**结论** 该地区ASCVD患者阿司匹林抗血小板药效相关基因型存在个体差异,应根据患者基因类型给予个体化阿司匹林治疗方案。

关键词:西南地区;抗血小板治疗;动脉粥样硬化性心血管疾病;阿司匹林;基因多态性;疗效

中图分类号:R965.2;R973+.2

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)18-0015-03

Analysis of Gene Polymorphisms Associated with Antiplatelet Efficacy of Aspirin in Patients with Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Southwest China

CHU Mingming, WANG Qiang, ZHANG Zhe, ZOU Lang, LEI Jian, ZHANG Rong

(Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing, China 400037)

Abstract: Objective To investigate the distribution of gene polymorphisms associated with antiplatelet efficacy of aspirin in patients with atherosclerotic cardiovascular disease(ASCVD) in Southwest China, and to provide evidence for adjusting aspirin administration regimens in the clinic based on individual differences in patients. **Methods** Totally 358 patients with ASCVD admitted to our hospital from April to September 2018 were collected. The gene related to the antiplatelet efficacy of aspirin was detected by polymerase chain reaction(PCR) fluorescence method. The frequency of gene polymorphism's distribution was calculated. **Results** Among 358 patients, GPⅢaPLA2(T>C) gene was all wild type without mutation, PEAR1(G>A) gene had 111 cases of wild(GG) type, 180 cases of heterozygosis mutations(GA) type, 67 cases of homozygosis mutations(AA) type and the mutation rate was 68.99%, PTGS1(-842A>G) gene

*基金项目:第三军医大学第二附属医院科研项目[2016YLC25]。

第一作者:楚明明,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为临床药学、药理学,(电子信箱)576958130@qq.com。

[△]通信作者:张蓉,女,博士研究生,副主任药师,研究方向为医院药事管理学、药理学、临床药学,(电子信箱)13883940949@163.com。

甲醇-水(30:70, V/V)、0.025 mol/L 磷酸溶液-乙腈(87:13, V/V)(用三乙胺调 pH 至 3.0±0.1)^{[2]580-581} 为流动相进行试验,结果以磷酸盐缓冲液(取磷酸氢二铵 2 g 溶于 1 000 mL 水中,用磷酸调 pH 至 4.0)-甲醇(68:32, V/V)为流动相时峰型好,且分离效果良好,故本研究中以此为流动相。

本研究结果显示,室温下乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液与注射用盐酸氨溴索配伍,24 h 内配伍液外观、pH 无变化,配伍液中左氧氟沙星、盐酸氨溴索含量在 24 h 内稳定,表明两药在临床可配伍应用。但本研究中仅考察了两药常规用法的配伍稳定性,后续仍需进一步研究两药在个体化剂量使用时的配伍稳定性。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2010:106-107.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2015:512.

[4] YBH00472014,国家食品药品监督管理总局标准[S].

[5] 陈子仙,马春美. 头孢匹胺与乳酸左氧氟沙星存在配伍禁忌[J]. 临床合理用药杂志,2013,6(11):56.

[6] 李 航,卢海波,魏志奇,等. 氟康唑注射液与乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液的配伍稳定性考察[J]. 中国药房,2012,23(2):133-134.

[7] 谭 璐,张广求,刘 文,等. 高效液相色谱法测定复方乳酸左氧氟沙星缓释滴鼻液中两组分含量[J]. 医药导报,2011,30(2):238-240.

[8] 周华晨,胡安新. 静脉联合用药中氨溴索的配伍禁忌[J]. 中外医学研究,2012,10(8):150-151.

(收稿日期:2019-01-24)

had 356 cases of wild(AA) type, 2 cases of heterozygosis mutations(AG) type and the mutation rate was 0.56%, GP1BA(5792C > T) gene had 307 cases of wild(CC) type, 48 cases of heterozygosis mutations(CT) type, 3 cases of homozygosis mutations(TT) type and the mutation rate was 14.25%. **Conclusion** There are individual differences in genotypes related to the antiplatelet efficacy of aspirin among ASCVD patients in this area. Individualized aspirin therapy regimens should be given according to the genotype of patients with ASCVD.

Key words: Southwest China; antiplatelet therapy; atherosclerotic cardiovascular disease; aspirin; gene polymorphism; efficacy

动脉粥样硬化性心血管疾病(ASCVD)被称为“发达国家居民健康的头号杀手”,在发展中国家的发病率也日趋增高^[1]。血小板的粘附、活化和聚集在ASCVD的病理生理过程中起重要作用。常用抗血小板聚集药物阿司匹林是防治ASCVD的基石。2006年,美国预防服务工作组将服用阿司匹林作为心血管疾病高危人群成本效益和临床价值较高的预防措施^[2]。但部分患者服药后出现阿司匹林抵抗(AR),发生率为5.5%~60%^[3]。AR受遗传、细胞和临床等多方面因素影响,目前有多种单核苷酸多态性(SNP)被报道与AR相关,如环氧合酶-1(COX-1)基因多态性、血小板糖蛋白(GP) IIb/IIIa基因多态性、二磷酸腺苷(ADP)受体P2Y₁基因多态性、血小板糖蛋白Ia/IIa受体基因多态性等^[4-5]。本研究通过分析GP IIIaPLA2, PEAR1, PTGS1, GP1BA 4个基因位点在西南地区人群中的突变情况,探讨阿司匹林抗血小板药效相关基因多态性的分布情况,为临床实施个体化的阿司匹林治疗方案提供依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取医院心血管内科2018年4月至9月收治的需口服阿司匹林治疗的ASCVD患者358例(年龄18~80岁,性别不限)。排除有阿司匹林禁忌证,3个月内发生过脑出血,1个月内进行过重大手术,以及严重感染、恶性肿瘤和免疫系统疾病患者。本研究经医院医学伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂

仪器:Fluotec 48E型微量荧光检测仪(西安天隆科技有限公司);Sorvall™ Legend™ Micro 17R型离心机(Thermo Scientific公司);LX-300型迷你离心机和Vortex-5漩涡混合器(海门其林贝尔仪器制作有限公司)。

试剂:阿司匹林肠溶片(Bayer Vital GmbH,进口药品注册证号H20130339,规格为每片100 mg)。测序反应通用试剂盒(北京华夏时代基因科技发展有限公司)。

1.3 阿司匹林抗血小板药效相关基因多态性检测

采集患者静脉血2 mL,置乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中,经裂解、结合、洗涤、洗脱、纯化,得样本DNA片段,然后经聚合酶链反应(PCR)进行扩增,通过焦磷酸测序法测定基因多态性。

1.4 统计学处理

采用SPSS 24.0统计学软件分析。正态分布的连续

性变量以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行双侧 t 检验;计数资料以百分率(%)表示,行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿司匹林抗血小板药效相关基因检测

358例患者中,GP IIIaPLA2(T > C)基因均为野生型,无突变;PEAR1(G > A)基因野生(GG)型111例,突变杂合(GA)型180例,突变纯合(AA)型67例,突变率68.99%;PTGS1(-842A > G)基因野生(AA)型356例,突变杂合(AG)型2例,突变率0.56%;GP1BA(5792C > T)基因野生(CC)型307例,突变杂合(CT)型48例,突变纯合(TT)型3例,突变率14.25%。详见表1。

表1 阿司匹林抗血小板药效相关基因检测结果[例(%)]

基因型	GP IIIaPLA2 (T > C)	PEAR1 (G > A)	PTGS1 (-842A > G)	GP1BA (5792C > T)
野生型	358(100.00)	111(31.01)	356(99.44)	307(85.75)
突变杂合型	0(0)	180(50.28)	2(0.56)	48(13.41)
突变纯合型	0(0)	67(18.72)	0(0)	3(0.84)

2.2 患者基因型一般资料

统计患者基因型时,排除2例PTGS1位点突变杂合型,基于GP IIIaPLA2和PTGS1均为野生基因型,依据PEAR1和GP1BA基因型分组。PEAR1基因野生型111例(31.18%),突变型245例(68.82%),GP1BA基因野生型305例(85.67%),突变型51例(14.33%)。纳入患者按基因型的不同分组,野生组与突变组患者一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。详见表2。

表2 患者基因型基线信息

项目	PEAR1			GP1BA		
	野生组($n=111$)	突变组($n=245$)	P 值	野生组($n=305$)	突变组($n=51$)	P 值
女性[例(%)]	34(30.63)	85(34.69)	0.528	108(35.41)	11(21.57)	0.075
BMI($\bar{X} \pm s, \text{kg/m}^2$)	23.75 $\pm$ 2.90	24.37 $\pm$ 3.27	0.084	24.14 $\pm$ 3.15	24.41 $\pm$ 3.27	0.577
年龄($\bar{X} \pm s$,岁)	66.04 $\pm$ 12.03	63.55 $\pm$ 12.77	0.084	66.98 $\pm$ 12.54	66.37 $\pm$ 12.73	0.209

注:BMI为体质指数。

3 讨论

阿司匹林是治疗和预防心脑血管疾病的主要药物,但部分患者即使规律服用阿司匹林仍会发生AR。目前,AR的发生机制尚未研究清楚,以往研究提示,抗血小板药物代谢及作用过程中涉及的相关基因多态性可能是重要因素。研究较多的阿司匹林代谢相关基因有COX、血小板膜糖蛋白、PEAR1及PTGS1等。

COX以COX-1和COX-2两种同工型存在,在前

列腺素合成过程中发挥关键作用。阿司匹林可使 COX-1 乙酰化失活,抑制血栓素 A₂ 的产生,阻止血小板聚集。MAREE 等^[6]的研究表明,携带 COX-1 突变体 842G 等位基因的患者更易出现 AR。LEPÄNTALO 等^[7]的研究发现,COX-1 基因 842 位点 G 等位基因在 AR 患者中的分布频率显著升高,血小板聚集和血栓素水平显著增加,故推断 G 等位基因与 AR 的发生相关。

血 GP 受体 GPⅢa 基因外显子 2 第 1 565 位基因突变后,GPⅢa 蛋白 33 位点亮氨酸(PLA1)被脯氨酸(PLA2)置换,影响血小板的最终激活。SZCZEKLIK 等^[8]监测了携带 PLA 等位基因的 80 名健康男性服用阿司匹林前后出血时间的改变,结果携带 PLA2 等位基因的人出血时间较携带 PLA1 等位基因者短,提示携带 PLA2 等位基因者更易发生 AR。GPIb 是由 GPIb α 和 GPIb β 2 个亚基构成,其表达减少会引发血小板的聚集和释放。FUJIWARA 等^[9]发现,在 110 例健康男性受试者中,血小板膜 GPIb α 多肽(GPIBA)基因型为 CC 或 CT 的,与基因型为 TT 的相比,AR 风险增加。

PEAR1 是表达在血小板和内皮细胞上的 1 型膜蛋白,该受体的磷酸化可能促进血小板脱颗粒,引起血小板之间不可逆的聚集反应。WÜRTZ 等^[10]的研究表明,携带 PEAR1 基因 rs12041331 位点 A 等位基因的患者服用阿司匹林时,发生心肌梗死及死亡的比例升高。LEWIS 等^[11]研究发现,PEAR1 基因 rs12041331 位点 A 等位基因携带者,在单用阿司匹林或联用氯吡格雷行抗血小板治疗时,心血管事件发生率及死亡率均显著升高。研究提示^[12],PEAR1 的野生 G 基因的基因频率为 0.61,突变 A 基因的基因频率为 0.39。石秀锦等^[13]的研究表明,中国人群中 PEAR1 的野生 G 基因的基因频率为 0.624,突变 A 基因的基因频率为 0.376,与本研究结论一致。本研究中,GP1BA 基因存在突变,突变率为 14.25%。GPⅢaPLA2 和 PTGS1 两个基因的突变率较低,与石秀锦等^[13]的研究结果接近。

PTGS1 位点突变在爱尔兰人群中频率为 6%,而本研究结果显示,其在中国人群中的频率较低,约为 0.56%,表明人种差异是遗传药理学研究的重要影响因素。

本研究结果表明,在患者服用阿司匹林之前,检测其阿司匹林抗血小板疗效相关基因突变情况,可预估其抗血小板治疗反应,从而为患者制订个体化的治疗方案,减少血栓栓塞事件发生。相较于服药后监测患者血小板聚集率及血栓弹力素等判定该药对患者是否有效,基因检测更方便、快捷,可提前预判患者是否会产生抵抗,最大限度地保障药物的有效性和安全性。本研究不足之处在于开展时间不长,样本量不足,且未获得患者的预后信息,下一步可继续扩大样本量,同时持续追踪

患者的预后信息进行研究,为临床合理使用阿司匹林提供更有力的循证依据。

参考文献:

- [1] 段春燕. 动脉粥样硬化性心脑血管疾病的中药应用规律研究[D]. 北京:北京中医药大学,2015.
- [2] MACIOSEK MV, COFFIELD AB, EDWARDS NM, et al. Priorities Among Effective Clinical Preventive Services: Results of a Systematic Review and Analysis[J]. American Journal of Preventive Medicine, 2006, 31(1): 97-98.
- [3] 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): 3172-3174.
- [4] VOORA D, HORTON J, SHAH SH, et al. Polymorphisms associated with in vitro aspirin resistance are not associated with clinical outcomes in patients with coronary artery disease who report regular aspirin use[J]. American Heart Journal, 2011, 162(1): 166-172.
- [5] POSTULA M, KAPLON - CIESLICKA A, ROSIAK M, et al. Genetic determinants of platelet reactivity during acetylsalicylic acid therapy in diabetic patients: evaluation of 27 polymorphisms within candidate genes[J]. Journal of Thrombosis & Haemostasis, 2011, 9(11): 2291-2301.
- [6] MAREE AO, CURTIN RJ, CHUBB A, et al. Cyclooxygenase - 1 haplotype modulates platelet response to aspirin[J]. Journal of Thrombosis & Haemostasis, 2010, 3(10): 2340-2345.
- [7] LEPÄNTALO A, MIKKELSSON J, RESÉNDIZ JC, et al. Polymorphisms of COX - 1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients[J]. Thrombosis & Haemostasis, 2006, 96(2): 253-259.
- [8] SZCZEKLIK A, UNDAS A, SANAK M, et al. Relationship between bleeding time, aspirin and the PLA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein III a[J]. British Journal of Haematology, 2015, 110(4): 965-967.
- [9] FUJIWARA T, IKEDA M, ESUMI K, et al. Exploratory aspirin resistance trial in healthy Japanese volunteers (J - ART) using platelet aggregation as a measure of thrombogenicity[J]. Pharmacogenomics Journal, 2007, 7(6): 395-403.
- [10] WÜRTZ M, NISSEN PH, GROVE EL, et al. Genetic determinants of on - aspirin platelet reactivity: focus on the influence of PEAR1[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e111816.
- [11] LEWIS JP, RYAN K, O'CONNELL JR, et al. Genetic Variation in PEAR1 is associated with platelet aggregation and cardiovascular outcomes[J]. Circulation: Cardiovascular Genetics, 2013, 6(2): 184-192.
- [12] PHARMGKB. Allele Frequencies. rs12041331 at chr1:156869714(hg38) in PEAR1[EB/OL]. (2015-05-04) [2018-12-23]. <http://www.pharmgkb.org/rsid/rs12041331>.
- [13] 石秀锦, 胡志旭, 彭文星, 等. GPⅢa PLA2/PEAR1/PTGS1 基因多态性与阿司匹林临床抗血栓疗效关联性研究[J]. 中国药物应用与监测, 2018, 15(1): 1-4.

(收稿日期:2019-01-29)