

# 氯吡格雷在老年缺血性脑卒中患者的应用及 CYP2C19 基因多态性对预后的影响

余芬, 何静

(武汉市第三医院神经内科, 湖北 武汉 430060)

**摘要:目的** 探讨氯吡格雷在老年缺血性脑卒中患者中的应用及细胞色素 P450C19 (CYP2C19) 基因多态性对预后的影响。**方法** 选取收治的老年缺血性脑卒中患者 144 例, 依据氯吡格雷抵抗情况将这些患者分为抵抗组 ( $n = 45$ ) 和非抵抗组 ( $n = 99$ ) 两组, 测定两组患者的小血小板聚集功能并检测其基因型, 然后对 2 个单核苷酸多态性 (SNPs) 的等位基因频率及基因型频率、两组患者的 2 个 SNPs 分布情况进行统计分析。**结果** CYP2C19 (636G > A, rs4986893) (681G > A, rs4244285) 等位基因及基因频率均和 Hardy-Weinberg 相符 ( $P > 0.05$ ); 抵抗组患者的 CYP2C19 \* 2 (rs4244285) GG 型分布率显著低于非抵抗组 ( $P < 0.05$ ), GA + AA 型分布率显著高于非抵抗组 ( $P < 0.05$ ), 且 GA + AA 型分布率显著高于 GG 型 ( $P < 0.05$ ), 但两组患者的 CYP2C19 \* 3 (rs4986893) GG 型、AG + AA 型分布率之间均差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** 老年缺血性脑卒中患者的氯吡格雷抵抗和 CYP2C19 \* 2 (rs4244285) GA + AA 型关系密切, 检测该基因型能够为氯吡格雷的临床科学应用提供有效指导, 值得临床充分重视。

**关键词:** 氯吡格雷; 老年缺血性脑卒中; CYP2C19 基因多态性

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2017.11.033

## Application of clopidogrel in elderly patients with ischemic stroke and influence of CYP2C19 gene polymorphism in prognosis

YU Fen, HE Jing

(Department of Neurology, Wuhan Third Hospital, Wuhan, Hubei 430060, China)

**Abstract: Objective** To investigate the application of clopidogrel in elderly patients with ischemic stroke and influence of CYP2C19 gene polymorphism in prognosis. **Methods** One hundred and forty-four cases of elderly patients with ischemic stroke in department of neurology, Wuhan Third Hospital from May 2014 to May 2016 were selected. These patients were assigned into resistance group ( $n = 45$ ) and non-resistance group ( $n = 99$ ), according to the situation of clopidogrel resistance. The platelet aggregation of the two groups were measured and the genotype were detected. then the 2 SNPs allele frequency distribution, genotype frequency of 2 SNPs of the two groups were statistically analyzed. **Results** CYP2C19 (636G > A, rs4986893) (681G > A, rs4244285) allele and gene frequency were consistent with Hardy-Weinberg ( $P > 0.05$ ). The CYP2C19 \* 2 (rs4244285) GG distribution rate of the resistance group was significantly lower than the non-resistance group ( $P < 0.05$ ), the GA + AA distribution rate was significantly higher than the non-resistance group ( $P < 0.05$ ), and the GA + AA distribution rate was significantly higher than the GG ( $P < 0.05$ ). However, the differences of the CYP2C19 \* 3 (rs4986893) GG type and AG + AA type distribution rates between the two groups were not significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** The relationship between clopidogrel resistance and GA + AA (rs4244285) CYP2C19 \* 2 of the elderly patients with ischemic stroke is close, the detection of the genotype can provide an effective guidance for the clinical application of clopidogrel, which is worthy of the clinical full attention.

**Key words:** Clopidogrel; Elderly patients with ischemic stroke; CYP2C19 gene polymorphism

缺血性脑卒中是目前临床上常见的多发病, 在老年人群中发病率较高, 已成为我国第一位的自残和死亡原因, 且发病率逐年增多, 给家庭和社会带来了极大的负担。长期服用抗血小板药物是治疗缺血性脑卒中的主要方法, 可以有效降低缺血性卒中事件发生率, 相关研究已经证实了抗血小板聚集药物在治疗缺血性脑卒中中的价值, 并将其列入缺

血性脑卒中治疗指南<sup>[1]</sup>。氯吡格雷是目前临床常用的抗血小板聚集药物, 治疗缺血性脑卒中疗效显著, 但是随着临床应用的增多, 氯吡格雷的疗效呈现出不稳定性, 一些患者在规律服用氯吡格雷后并没有产生抗血小板作用, 即氯吡格雷抵抗。现阶段, 相关学者认为<sup>[2]</sup>诱发氯吡格雷抵抗的关键因素为体内相关过程蛋白基因多态性。氯吡格雷属于前体药物, 自身不具备抗血小板作用, 需经过细胞色素 P450 (CYP450) 将其转化为活性代谢产物才能

实现其血小板抑制效应,CYP450同工酶家族中的细胞色素 P450 2C19(CYP2C19)参与了氯吡格雷代谢过程,其基因多态性影响氯吡格雷的反应<sup>[3,4]</sup>。有相关研究报道<sup>[5]</sup>在亚洲人群中,CYP2C19 \* 2、\* 3位点具有较高的突变频率,与氯吡格雷抵抗的发生密切相关。本研究以老年缺血性卒中患者为研究对象,探讨氯吡格雷抵抗与 CYP2C19 基因多态性的相关性,为及时调整缺血性脑卒中的二级预防方案提供一定指导。现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取武汉市第三医院 2014 年 5 月—2016 年 5 月收治的老年缺血性脑卒中患者 144 例,所有患者均符合 2014 年《中国急性缺血性脑卒中诊治指南》<sup>[1]</sup>中的急性脑梗死诊断标准为诊断依据,均经头颅 CT 或磁共振成像(MRI)证实,发病 2 周内。本研究经武汉市第三医院医学伦理委员会批准,患者均签署知情同意书。将伴恶性肿瘤、胶原病、肝肾功能异常、近期接受过较大外科手术治疗、近 1 个月内服用过双嘧达莫、阿司匹林等其他抗凝药或抗血小板药物等患者排除在外。依据氯吡格雷抵抗情况将这些患者分为抵抗组( $n=45$ )和非抵抗组( $n=99$ )两组。

## 1.2 方法

**1.2.1 测定血小板聚集功能** 让两组患者口服至少 1 周的  $75 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$  的常规剂量的氯吡格雷(每片  $75 \text{ mg}$ ,赛诺菲制药有限公司,批号:20140214),于用药后第 8 天晨起空腹抽取静脉血  $3 \text{ mL}$ ,在乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝真空管中放置,3 h 内检测其血小板聚集功能。运用光比浊法进行血小板聚集试验(PAgT),将  $2.7 \text{ mL}$  的 1:9 的 EDTA 抗凝血取出,对其进行离心,速率和时长分别为  $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  和  $5 \text{ min}$ ,将富血小板血浆(PRP)提取出来,然后对其进行离心,速率和时长分别为  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  和  $15 \text{ min}$ ,将贫血小板血浆(PPP)提取出来,血小板计数为  $(10 \sim 20) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ,调整 PRP 到  $(200 \sim 300) \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ ,在此过程中将 PPP 充分利用起来,将空白对照设定为 PPP,在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  的温度下进行  $3 \text{ min}$  的预热,将诱导剂设定为  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的二磷酸腺苷(ADP)(美国 Sigma 公司),采用北京普利生仪器有

限公司生产的 LBY-NJ44 全自动血小板聚集仪对患者的血小板聚集率(PAR)进行测定。

氯吡格雷抵抗的评价标准:用  $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ADP 诱导的 PAR 在口服氯吡格雷前后的一定时间后(1 d 以上)的变化值在  $\leq 10\%$ ,则评定为氯吡格雷抵抗<sup>[6]</sup>,PAR 的变化值  $> 90\%$  的,则评定为非抵抗。

**1.2.2 基因型检测方法** 两组患者均抽取肘静脉血  $1 \text{ mL}$ ,在 EDTA 真空抗凝管中放置,保存在  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  的环境下,用于 DNA 的提取和检测。按 DNA 抽取试剂盒(德国 GIAGEN 公司)说明提取基因组的 DNA。应用 Sequenom MassARRAY iPLEX 基因型分析(分析仪器为美国 Sequenom 公司质谱仪 MassARRAY 及 MassARRAY Typer 软件系统版本号 3.4)技术检测 CYP2C19(rs4986893,rs4244285),应使用美国 ABI 公司 9700 型 PCR 扩增仪扩增 CYP2C19 \* 2 和 \* 3 位点所在的 DNA 片段。使用在线软件 Assay Design Suite(美国 Sequenom 公司)设计所有引物,具体见表 1。

**1.3 统计学方法** 应用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计分析。将老年缺血性脑卒中患者各检测位点基因型频率及等位基因计算出来,采用  $\chi^2$  检验判断多态性位点的基因型是否符合 Hardy-Weinberg 平衡, $P > 0.05$  为符合 Hardy-Weinberg 平衡, $P < 0.05$  为不符合 Hardy-Weinberg 平衡。正态分布:计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料用方差分析。偏态分布:用中位数表示,计数资料用 Chi-square 检验,计量资料用秩和检验。用 Fisher 确切概率法或 Chi-square 检验两组患者基因型分布差异。检验标准  $\alpha = 0.05$ , $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组患者的一般资料比较** 两组患者的一般资料比较均差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),具体见表 2。

**2.2 SNPs 的等位基因频率及基因型频率** CYP2C19(636G > A,rs4986893)(681G > A,rs4244285)等位基因及基因频率均和 Hardy-Weinberg 相符( $P > 0.05$ ),具体见表 3。

**2.3 两组患者的 SNPs 分布情况比较** 抵抗组患者的 CYP2C19 \* 2(rs4244285)GG 型分布率显著低

表 1 引物序列表

SNP	PCR 引物	延伸引物
rs4986893	F:5'-ACGTTGGATGAACATCAGGATTCGTAAGCAC-3' R:5'-ACGTTGGATGGACTGTAAGTGGTTTCTCAG-3'	E:5'-tcTGGCCTTACCTGGAT-3'
rs4244285	F:5'-ACGTTGGATGGCAATAATTTCCCACTATC-3' R:5'-ACGTTGGATGACTTTCTCCAAAATATCAC-3'	E:5'-AGTAATTTGTTATGGGTTCC-3'

表 2 两组患者的一般资料比较

组别	例数	性别/例(%)		年龄/ (岁, $\bar{x} \pm s$ )	合并症/例(%)			吸烟史/ 例(%)	饮酒史/ 例(%)
		男性	女性		高血压	糖尿病	高脂血症		
抵抗组	45	27(60.00)	18(40.00)	73.2 ± 8.2	36(80.00)	6(13.33)	15(33.33)	20(44.44)	10(22.22)
非抵抗组	99	66(66.67)	33(33.33)	75.2 ± 10.3	75(75.76)	10(10.10)	36(36.36)	40(40.40)	24(24.24)
$\chi^2(t)$ 值		0.601		(1.242)	0.315	0.327	0.124	0.208	0.070
<i>P</i> 值		0.438		0.215	0.572	0.567	0.725	0.649	0.791

表 3 两个 SNPs 的等位基因频率及基因型频率

突变位点(SNP rs#)	等位基因分布频率	基因型分布频率
CYP2C19 * 3(rs4986893)	G(0.95); A(0.05)	GG(0.90); AG(0.10); AA(0.00)
CYP2C19 * 2(rs4244285)	A(0.26); G(0.74)	AA(0.09); AG(0.33); GG(0.58)

表 4 两组患者的 SNPs 分布情况比较/例(%)

突变位点(rs#)	分类	抵抗组( <i>n</i> = 45)	非抵抗组( <i>n</i> = 99)	$\chi^2$ 值	<i>P</i> 值
CYP2C19 * 3(rs4986893)	GG	39(86.7)	90(90.9)	3.366	0.067
	AG + AA	6(13.3)	9(9.1)		
CYP2C19 * 2(rs4244285)	GG	15(33.3)	54(54.5)	5.578	0.018
	GA + AA	30(66.7)	45(45.5)		

于非抵抗组( $P < 0.05$ ), GA + AA 型分布率显著高于非抵抗组( $P < 0.05$ ), 且 GA + AA 型分布率显著高于 GG 型( $P < 0.05$ ), 但两组患者的 CYP2C19 \* 3(rs4986893) GG 型、AG + AA 型分布率之间的均差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 具体见表 4。

### 3 讨论

氯吡格雷属于前体药物, 本身不具备抗血小板活性, 在体内被吸收后经过 CYP450 代谢之后才能形成抗血小板活性的物质, 在氯吡格雷的转化过程中, CYP2C19 作为一个代谢酶占有极为重要的地位, 其基因多态性影响氯吡格雷的反应, 而几乎所有氯吡格雷弱代谢亚洲人群都属于编码 CYP450 酶基因位点突变。在亚洲人群中, 最常见的等位基因为 CYP2C19 \* 1, CYP2C19 \* 2 和 CYP2C19 \* 3, CYP2C19 \* 5 和 CYP2C19 \* 6, 其中 CYP2C19 \* 2 和 CYP2C19 \* 3 被证实为最主要的无功能等位基因, 携带其中任一等位基因人群均为慢代谢者, 其氯吡格雷的血药浓度较低, 血小板聚集率增加, 再发生缺血性卒中等脑血管不良事件的发生率明显增加<sup>[7]</sup>。美国食品和药物管理局(FDA)在 2010 年将黑框警告添加在氯吡格雷上, 内容为在氯吡格雷弱代谢型(\* 2 \* 3, \* 2 \* 2, \* 3 \* 3)患者体内, 该药物无法将作用充分发挥出来, 可通过测定 CYP2C19 基因型, 判断患者是否存在氯吡格雷代谢不良, 从而调整这类患者抗血小板治疗方案。

近年来, 很多相关医学研究均证实<sup>[8-9]</sup>, 氯吡格雷抵抗极易造成卒中复发。现阶段, 临床在二级预防缺血性脑卒中的过程中广泛应用了氯吡格雷,

但是个体不同, 其临床疗效就不同。血糖、药物相互作用等均对氯吡格雷抵抗的发生造成了一定程度的影响。相关医学研究表明, 氯吡格雷抵抗的发生率会在质子泵抑制剂的作用下提升。氯吡格雷的抗血小板效果减弱受到 CYP2C19 基因多态性改变的一定程度的影响。CYP2C19 在肝脏微粒体中存在, 组成成分为 490 个氨基酸残基, 其编码基因在染色体 10p24 上定位, 包括外显子和内含子, 数量分别为 9 个和 8 个, 相对分子质量为 56 kD 左右。终止密码会在 CYP2C19 \* 2 和 \* 3 基因型的外显子突变的情况下提前, 进而终止蛋白质合成, 使 CYP2C19 丧失活性, 从而减弱氯吡格雷对 ADP 诱导的血小板聚集的抑制作用<sup>[10-11]</sup>。本研究结果表明, CYP2C19 (636G > A, rs4986893) (681G > A, rs4244285) 等位基因及基因频率均和 Hardy-Weinberg 相符( $P > 0.05$ ); 抵抗组患者的 CYP2C19 \* 2(rs4244285) GG 型分布率显著低于非抵抗组( $P < 0.05$ ), GA + AA 型分布率显著高于非抵抗组( $P < 0.05$ ), 且 GA + AA 型分布率显著高于 GG 型( $P < 0.05$ ), 但两组患者的 CYP2C19 \* 3(rs4986893) GG 型、AG + AA 型分布率之间均差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 和上述相关医学研究结果一致, 说明氯吡格雷抵抗受到其代谢酶 CYP2C19 的 2 个 SNPs 的一定程度的影响, 诱发氯吡格雷抵抗的一个极为重要的危险因素就是 CYP2C19 \* 2 GA + AA 型, 这就将有效的参考依据提供给了临床在二级预防缺血性脑卒中的过程中调整氯吡格雷方案的工作, 切实有效地改善患者预后。