

环氧化酶基因多态性的相互作用与缺血性脑卒中患者阿司匹林抵抗的关系

官瑞磊, 孙俊梅, 贺彩红, 胥丽霞, 杨改清

作者单位: 450000 河南, 郑州大学附属郑州中心医院神经内科

作者简介: 官瑞磊(1984-), 女, 医学硕士, 住院医师, 研究方向: 神经内科疾病的诊治。E-mail: guanruilei@163.com

通讯作者: 杨改清(1966-), 女, 医学硕士, 主任医师, 研究方向: 脑血管病、帕金森及癫痫疾病的诊治。E-mail: zxyyygq@163.com

[摘要] **目的** 探讨环氧化酶(cyclooxygenase, COX)基因多态性的相互作用与缺血性脑卒中患者阿司匹林抵抗的关系, 为缺血性脑卒中的防治提供参考。**方法** 收集 2015-06~2016-05 住院治疗的首次发病的缺血性脑卒中患者 719 例, 均给予阿司匹林治疗, 采用光学比浊法检测血小板聚集率, 收集患者的临床资料, 用 PCR 法测定 COX-1、COX-2 基因多态性, 对存在阿司匹林抵抗与对阿司匹林敏感患者的临床资料进行单因素分析, 并分析 COX-1、COX-2 基因多态性及其相互作用与阿司匹林抵抗的关系。**结果** 阿司匹林抵抗组 176 例, 阿司匹林敏感组 543 例。阿司匹林抵抗组患者女性比例、糖尿病比例、低密度脂蛋白、空腹血糖明显高于阿司匹林敏感组($P < 0.05$)。两组患者在 COX-1、COX-2 基因各位点基因型分布方面比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。糖尿病和 rs3842787、rs20417 相互作用是阿司匹林抵抗的危险因素($P < 0.05$)。**结论** COX 两个或多个位点基因相互作用可能会增加阿司匹林抵抗的风险。

[关键词] 环氧化酶基因多态性; 缺血性脑卒中; 阿司匹林抵抗

[中图分类号] R 741 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2017)07-0623-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2017.07.08

The relationship between interaction of cyclooxygenase gene polymorphism and aspirin resistance in patients with ischemic stroke GUAN Rui-lei, SUN Jun-mei, HE Cai-hong, et al. Department of Neurology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Henan 450000, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between interaction of cyclooxygenase (COX) gene polymorphism and aspirin resistance in patients with ischemic stroke. **Methods** 719 patients with the first onset of ischemic stroke were treated in our hospital from June 2015 to May 2016, and they were treated with aspirin. The platelet aggregation rate was determined by optical turbidimetry. The clinical data were collected, and the COX-1, COX-2 gene polymorphisms were determined. The clinical data of the patients with aspirin resistance or aspirin sensitive were studied by means of single factor analysis, and the relationship between COX-1, COX-2 gene polymorphisms, their interaction and aspirin resistance was analyzed. **Results** 176 cases were included in the aspirin resistance group and 543 cases in the aspirin sensitive group. The proportion of women, diabetes, the levels of low density lipoprotein and fasting blood glucose in the aspirin resistance group were significantly higher than those in the aspirin sensitive group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the genotype distributions of COX-1 and COX-2 between the two groups ($P > 0.05$). Diabetes, interactions between rs3842787 and rs20417 were the risk factors of aspirin resistance ($P < 0.05$). **Conclusion** The interactions of COX between two or among three multi-locus genotypes or more may increase the risk of aspirin resistance.

[Key words] Cyclooxygenase (COX) gene polymorphism; Ischemic stroke; Aspirin resistance

阿司匹林为缺血性脑卒中急性期治疗和二级预防的常用药物, 它可有效减少心脑血管事件和死亡的发生^[1]。但在长期使用阿司匹林过程中, 一些患

者存在阿司匹林抵抗现象, 表现为使用阿司匹林后不能有效抑制血小板的聚集程度并引起缺血事件发生。阿司匹林抵抗与缺血脑卒中复发及其他相关血

管事件密切相关。目前,许多研究报道,阿司匹林抵抗与环氧化酶(cyclooxygenase, COX)基因多态性有关,但主要集中在各基因位点的是否存在作用方面^[2,3],而有关基因-基因相互作用对阿司匹林抵抗的影响鲜有报道。为此,本研究从 COX-1、COX-2 基因多态性及其相互作用方面进行研究,以探讨阿司匹林抵抗与缺血性脑卒中的关系,为缺血性脑卒中的二级预防提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015-06 ~ 2016-05 在我院住院治疗首次发病的缺血性脑卒中患者 719 例,其中男 376 例,女 343 例;年龄 41 ~ 82 (70.1 ± 10.5) 岁。诊断均符合 2014 年中国急性缺血性脑卒中诊治指南中的诊断标准^[4],且经头颅 CT 或 MRI 证实。患者纳入标准:(1)首次发病,入院时间 < 72 h;(2)病因分型包括粥样硬化血栓形成型和小动脉病变;(3)患者血小板计数 (PLT) 在 $100 \times 10^9/L \sim 450 \times 10^9/L$ 之间,血红蛋白 (Hb) $\geq 90 g/L$;(4)入院前未使用过阿司匹林;(5)患者知情同意。排除标准:(1)对阿司匹林禁忌者;(2)病因分型不明及心源性脑栓塞;(3)入院前半个月有使用低分子肝素、华法林、非阿司匹林抗血小板药物及接受溶栓治疗者;(4) $PLT < 100 \times 10^9/L$ 或 $> 450 \times 10^9/L$;(5)有家族或个人出血疾病史;(6)有骨髓增生异常综合征及其他血液系统疾病者;(7)伴严重心、肝、肾功能不全者;(8)既往有心梗和脑卒中病史者;(9)同时使用其他抗血小板药物者;(10)近期有严重外伤史或手术创伤者。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有患者接受脑卒中常规方法治疗,入院当日开始口服阿司匹林(拜耳医药保健有限公司,100 mg/片,批号:J20130078)200 mg/d,晚上睡前顿服,连续使用 15 d 后改为 100 mg/d 维持治疗。记录患者性别、年龄、病史、个人史、吸烟、酗酒等情况。入院次日采集患者空腹静脉血,进行血常规、凝血常规、肝功能、肾功能、血脂等检查,同时取 3 ml 血标本,以 EDTA2 抗凝,置于 $-80^\circ C$ 保存用于基因多态性测定。

1.2.2 阿司匹林抵抗的判断 根据相关资料^[5]对阿司匹林进行判断:服用阿司匹林后第 7 ~ 10 天,血小板最大聚集率在 0.5 mg/ml 花生四烯酸作用下 $\geq 20\%$,且在 $10 \mu mol/L$ 二磷酸腺苷作用下 $\geq 70\%$,即可判断为阿司匹林抵抗。其中一项符合者为阿司匹林半反应,2 项不符合者为阿司匹林敏感。血小板聚集

率采用光学比浊法检测,具体方法:服用阿司匹林后第 7 ~ 10 天采集 6 ml 空腹静脉血,加入含 660 ml 3.8% 枸橼酸钠的试管中,以 223.6 g 离心 5 ~ 10 min,获得富含血小板血浆,余下血液以 894.4 g 离心 5 ~ 10 min,获得乏血小板血浆作为空白对照,进行 $10 \mu mol/L$ 二磷酸腺苷和 0.5 mg/ml 花生四烯酸血小板聚集实验,并记录最大血小板聚集率^[6]。

1.2.3 COX-1、COX-2 基因多态性的测定 搜索 NCBI 数据库获得最新登记的各基因人类单核苷酸多态性 (SNP) 中的 COX 基因,并确定本研究的基因位点,即 COX-1 的 2 个位点 rs1236913、rs3842787 和 COX-2 的 2 个位点 rs689466、rs20417。取上述 3 ml EDTA2 抗凝血,采用低渗溶血、酚氯仿法提取 DNA。用 Assay Design Suite 设计的引物,SNP 的 rs1236913、rs3842787、rs689466、rs20417 的 PCR 引物分别为 F: 5'-ACGTTGGATGAGCAGGAGCAGGAACAGCA-3', R: 5'-ACGTTGGATGTCCTGCTGGAGCCTTGAATG-3'; F: 5'-GGTGCCCGGTGGGGAATTTTC-3', R: 5'-GAGGG-GAAAGGAGGGGGTTG-3'; F: 5'-ACGTTGGATGCCT-GAGCACTACCCATGATA-3', R: 5'-ACGTTGGATGG-GAATTAATTAGATGGAAGGG-3'; F: 5'-CCGCTTCCT-TTGTCATCAG-3', R: 5'-GGCTGTATATCTGCTCTAT-ATGC-3'。延伸引物分别为 E: 5'-GCAGGAACAGCA-AGAACC-3', E: 5'-TTTAGAATTTTAGTTCT-3', E: 5'-CCAAAAGCAAAGATGAAATTGCA-3', E: 5'-AGGAG-ATTTGGTGCTGCA-3'。

1.3 统计学方法 应用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 t 检验,计数资料用百分比 (%) 表示,采用 χ^2 检验,阿司匹林抵抗的危险因素采用 Logistic 多因素分析,多基因位点相互作用采用广义多因子降维法 (generalized multifactor dimensionality reduction, GMDR) Beta 0.7 版软件进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 719 例缺血性脑卒中患者阿司匹林抵抗的单因素分析结果 719 例缺血性脑卒中患者中,有阿司匹林抵抗者 146 例 (占 20.3%),有阿司匹林半反应者 30 例 (占 4.2%),由于有阿司匹林半反应病例较少,且危险因素和预后与阿司匹林抵抗相同,故均纳入阿司匹林抵抗组共 176 例,余下 543 例纳入阿司匹林敏感组。对两组患者的临床特征进行单因素分析,结果显示阿司匹林抵抗组患者女性比例、糖尿病比例、低密度脂蛋白、空腹血糖明显高于阿司匹林

敏感组 ($P < 0.05$), 两组的年龄、体质量指数、胆固醇、三酰甘油、高密度脂蛋白水平、入院时 NIHSS 评分、高血压比例、吸烟比例及病因分型分布比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 719 例缺血性脑卒中患者阿司匹林抵抗的单因素分析结果 [$n(\%)$, ($\bar{x} \pm s$)]

组 别	例数	性别		年龄 (岁)	体质量指数 (kg/m ²)	胆固醇 (mmol/L)	三酰甘油 (mmol/L)	高密度脂蛋白 (mmol/L)	低密度脂蛋白 (mmol/L)
		男	女						
阿司匹林敏感组	543	298	245	69.1 ± 9.8	24.1 ± 4.5	4.9 ± 1.8	1.8 ± 0.8	1.3 ± 0.4	2.9 ± 0.8
阿司匹林抵抗组	176	78	98	69.7 ± 10.0	23.9 ± 3.7	5.0 ± 1.6	1.8 ± 0.9	1.3 ± 0.4	3.1 ± 0.8
t/χ^2	—	5.944		0.702	0.534	0.658	0.000	0.000	2.882
P	—	0.015		0.759	0.862	0.715	1.000	1.000	0.000

组 别	例数	空腹血糖 (mmol/L)	高血压	糖尿病	吸烟	入院时 NIHSS 评分 (分)	病因分型	
							粥样硬化血栓形成型	小动脉病变
阿司匹林敏感组	543	6.8 ± 2.1	358 (65.9)	75 (16.7)	144 (26.5)	12.2 ± 2.4	342 (63.0)	201 (37.0)
阿司匹林抵抗组	176	7.8 ± 2.4	121 (68.8)	69 (39.2)	53 (29.5)	12.2 ± 2.6	112 (63.6)	64 (36.4)
t/χ^2	—	5.296	0.475	53.508	0.863	0.000	0.024	
P	—	0.000	0.491	0.000	0.353	1.000	0.876	

2.2 719 例缺血性脑卒中患者 COX-1、COX-2 基因多态性与阿司匹林抵抗的关系 两组患者在 COX-1、COX-2 基因各位点基因型分布方面比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 719 例缺血性脑卒中患者 COX-1、COX-2 基因多态性与阿司匹林抵抗的关系 [$n(\%)$]

组 别	例数	COX-1 rs1236913			rs3842787			COX-2rs689466			rs20417		
		CC	CT	TT	CC	CT	TT	AA	AG	GG	GG	GC	CC
阿司匹林敏感组	543	533(98.2)	10(1.8)	0(0.0)	512(94.3)	30(5.5)	1(0.2)	132(24.3)	268(49.4)	143(26.3)	378(69.6)	134(24.7)	31(5.7)
阿司匹林抵抗组	176	173(98.3)	3(1.7)	0(0.0)	165(93.7)	11(6.3)	0(0.0)	52(29.5)	87(49.4)	37(21.0)	123(69.9)	42(23.8)	11(6.3)
χ^2	—	0.014			0.451			2.923			0.104		
P	—	0.906			0.798			0.232			0.949		

2.3 COX 基因多态性相互作用与缺血性脑卒中患者阿司匹林抵抗的关系 GMDR 分析结果提示, COX-1、COX-2 基因分型相互作用后, rs3842787 与 rs20417 相互作用后影响最显著 ($P < 0.05$), 见表 3。与阿司匹林抵抗关系最密切的基因型组合为 rs38-42787CT + rs20417CC 和 rs3842787CT + rs20417GC。

2.4 719 例缺血性脑卒中患者阿司匹林抵抗发生的危险因素分析 将结果 2.1 中单因素分析有统计学意义的因素及 rs3842787、rs20417 相互作用高风险作为自变量, 阿司匹林抵抗作为应变量进行多因素 Logistic 回归分析, 发现糖尿病和 rs3842787、rs20417 相互作用是阿司匹林抵抗的危险因素 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 3 COX 基因多态性相互作用与缺血性脑卒中患者阿司匹林抵抗的关系

基因分型	检验准确度	交叉检验一致性	P
1-2	0.347	5/10	0.764
1-3	0.428	6/10	0.458
1-4	0.547	7/10	0.391
2-3	0.517	5/10	0.647
2-4	0.602	10/10	0.016
3-4	0.457	3/10	0.914
1-2-3	0.512	6/10	0.738
1-2-4	0.347	9/10	0.618
1-2-3-4	0.476	6/10	0.867

注: 1~4 依次代表 rs1236913, rs3842787, rs689466, rs20417

表 4 719 例缺血性脑卒中患者阿司匹林抵抗发生的危险因素分析

因 素	β	标准误	Wald χ^2	P	OR (95% CI)
性别	0.681	0.192	1.873	0.361	0.968 (0.731 ~ 1.628)
糖尿病	0.947	0.397	9.644	0.013	2.154 (1.376 ~ 4.982)
低密度脂蛋白	0.571	0.126	1.484	0.627	0.614 (0.418 ~ 1.625)
空腹血糖	0.607	0.384	1.742	0.465	1.065 (0.745 ~ 1.828)
rs3842787、rs20417 相互作用	0.980	0.472	12.934	0.004	2.649 (1.864 ~ 5.985)

3 讨论

3.1 调查结果显示, 阿司匹林抵抗发生率各报道存

在较大差异,在 5% ~ 65% 之间,其与人种有关,在欧美人群中较低,而在亚裔人群中较高^[7]。另外,对阿司匹林抵抗的评估方法也是引起这种差异存在的原因,血小板功能分析仪-100 评估所得的阿司匹林抵抗率为 59.5%,光学比浊法为 10.3% ~ 51.7%,尿血栓素 B₂ 评估法为 23.0%^[8]。本研究采用光学比浊法检测,结果显示 719 例缺血性脑卒中患者中,176 例存在阿司匹林抵抗(其中 30 例为阿司匹林半反应),发生率为 24.5%(阿司匹林抵抗 20.3% + 阿司匹林半反应 4.2%),与上述报道一致。单因素分析结果显示,患者有糖尿病史、低密度脂蛋白水平升高与其阿司匹林抵抗有关。这一结果与林慈宽等^[9]的研究报道相符。持续血糖、低密度脂蛋白升高会加速血小板和单核细胞活化,使得血小板和单核细胞间的黏附能力增加,从而引起阿司匹林抵抗的发生^[10]。故对急性脑卒中患者的治疗在进行常规治疗同时,应重视糖尿病和高脂血症等相关危险因素,积极控制以降低阿司匹林抵抗的发生风险。

3.2 COX 的活性部位有 529 个丝氨酸,阿司匹林正是通过不可逆乙酰化这些丝氨酸来抑制血栓素 A₂ (thromboxan A₂, TXA₂) 的生成,从而减少血小板的聚集^[11]。因此,近年来,陆续出现有关 COX 基因多态性与阿司匹林抵抗间关系的研究。高加索人群存在较高的 COX 基因突变率,而我国人群较低^[12]。COX 基因突变会直接影响阿司匹林的使用效果。有研究报道,COX 基因多态性与阿司匹林抵抗有关^[13]。但也有研究发现,COX 基因多态性与阿司匹林抵抗并无明显关系^[14]。本研究结果显示,阿司匹林敏感组和阿司匹林抵抗组患者的 COX-1、COX-2 的各点位基因分型分布并无明显差异,提示单一的基因分型对阿司匹林抵抗的影响有限,进一步用 GMDR 软件分析基因-基因间相互作用与阿司匹林抵抗间的关系后发现,rs3842787 和 rs20417 两个基因位点的相互作用对阿司匹林抵抗的发生有明显作用。Logistic 回归分析显示,这两个位点相互作用是阿司匹林抵抗的独立危险因素,说明尽管单一基因位点不会对阿司匹林抵抗产生明显影响,但 2 个或多个位点相互作用后可能会成为阿司匹林抵抗的主要因素。推测其原因可能是 rs3842787 和 rs20417 两个基因位点均在花生四烯酸 COX 通路的代谢过程。COX 可使花生四烯酸代谢产生 TXA₂,后者可促进血管收缩和血小板聚集^[15]。此两个基因位点相互作用可能降低了阿司匹林对 COX 的抑制作用,从而使其抗血小板聚集作用减弱。

总而言之,我国缺血性脑卒中患者存在较高的阿司匹林抵抗发生率,虽然单一的 COX-1、COX-2 基因分型与阿司匹林抵抗无明显相关性,但其两个或多个位点基因相互作用可能会增加阿司匹林抵抗的风险。但由于阿司匹林抵抗发生的基因机制复杂,其位点基因间的相互作用处于初步研究阶段,其与阿司匹林抵抗间的关系将可能成为研究的热点。

参考文献

- 1 张德华.阿司匹林联合氯吡格雷治疗进展性脑卒中的疗效及其机制探讨[J].山东医药,2013,53(8):51-53.
- 2 彭玲玲,蔡业峰,招远祺,等.环氧化酶 1 与 2 基因多态性与缺血性脑卒中患者阿司匹林抵抗的相关性研究[J].中国临床药理学杂志,2014,30(3):167-169.
- 3 苏永琴,陈化.阿司匹林抵抗与环氧化酶基因多态性研究进展[J].医学综述,2013,19(5):783-786.
- 4 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014[J].中华神经科杂志,2015,48(4):246-257.
- 5 Dretzke J, Riley RD, Lordkipanidze M, et al. The prognostic utility of tests of platelet function for the detection of aspirin resistance in patients with established cardiovascular or cerebrovascular disease: a systematic review and economic evaluation[J]. Health Technol Assess, 2015, 19(37):361-366.
- 6 于泽洋,何金婷,徐忠信.缺血性卒中患者血小板聚集率检测方法研究进展[J].中国实验诊断学,2016,20(1):152-154.
- 7 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.
- 8 苗建国.缺血性卒中妇女阿司匹林抵抗的影响因素研究[J].河北医学,2016,22(1):92-95.
- 9 林慈宽,周伯荣,廖剑锋.在脑梗死二级预防中阿司匹林抵抗的危险因素分析[J].中国实用神经疾病杂志,2016,19(21):3-5.
- 10 张仕娟,宋玉宁,李乃坤,等.急性脑梗死患者发生阿司匹林抵抗的危险因素[J].山东医药,2016,56(15):62-64.
- 11 Schrottmaier WC, Kral JB, Badnaya S, et al. Aspirin and P2Y12 Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes[J]. Thromb Haemost, 2015, 114(3):624-630.
- 12 Sharma V, Kaul S, Al-Hazzani A, et al. Association of COX-2 rs20417 with aspirin resistance[J]. J Thromb, 2013, 35(1):569-578.
- 13 Lordkipanidze M, Diodati JG, Palisaitis DA, et al. Genetic determinants of response to aspirin: appraisal of 4 candidate genes. [J]. Thromb Res, 2011, 128(1):1026-1034.
- 14 Cao L, Zhang Z, Sun W, et al. Impacts of COX-1 gene polymorphisms on vascular outcomes in patients with ischemic stroke and treated with aspirin[J]. Gene, 2014, 546(2):172-176.
- 15 Shao J, Yi Y, Yan W, et al. Thromboxane A(2) Receptor polymorphism in association with cerebral infarction and its regulation on platelet function[J]. Curr Neurovasc Res, 2015, 12(1):15-24.

[收稿日期 2017-02-03][本文编辑 黄晓红]