

血栓通与阿司匹林对 ITGB3 基因多态性药物抵抗患者治疗作用的研究

杨承志, 李再利, 孟新颜

(徐州市中心医院神经内科, 江苏 徐州 221009)

摘要:目的 探讨中药制剂血栓通及阿司匹林抗血小板治疗脑卒中以及 ITGB3 基因多态性对治疗效果的相关性。方法 收集了 192 例脑梗死患者, 随机分为 4 组(阿司匹林组、血栓通组、血栓通+阿司匹林组、阿司匹林+氯吡格雷组)进行治疗, 通过一般资料及测定生化指标和血栓弹力图, 同时提取静脉血全基因组 DNA, 采用 Snapshot 方法检测 ITGB3 基因型, 分析 4 组患者的血小板抑制情况, 比较各组结果。结果 整体水平上, 各组经药物治疗后, 血小板抑制率显著提高, 血栓通治疗对 3 种 ITGB3 基因型 AA、AG、GG 患者血小板抑制率显著高于阿司匹林组, 且组间没有显著性差异。结论 中药制剂血栓通可以抑制血小板聚集发挥药效, 并且突变型 ITGB3 基因 AA 及 GG 不会对血栓通产生抵抗。

关键词: ITGB3; 阿司匹林; 血栓通; 基因多态性

中图分类号: R255.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2017)05-0493-04

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2017.0493

Therapeutical Effects of Aspirin and XueShuanTong on Patients with the Drug Resistance of ITGB3 Genes Polymorphism

YANG Cheng-zhi, LI Zai-li, MENG Xin-yan

(Department of Neurology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou, 221009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the relationship between ITGB3 gene polymorphism and therapeutic effects of XueShuanTong and aspirin on cerebral infarction with anti-platelet. **METHODS** 192 patients with cerebral infarction were collected and randomly divided into 4 groups. According to patients general information, biomedical index and thromboelastogram, DNA genome were extracted from venous blood and detected by using Snapshot method, and then analyzed the situations of anti-platelet and compared the results of 4 groups. **RESULTS** Generally, the inhibitory ratio of platelet increased obviously after the patients were treated with drugs. Compared with aspirin group, the inhibitory ratio of platelet increased obviously in patients with ITGB3 genes(AA, AG, GG) treated by XueShuanTong pharmaceuticals, and no significant difference appeared among these 3 groups. **CONCLUSION** XueShuanTong pharmaceuticals can inhibit platelet aggregation, which will prevent the drug resistance in patients with mutant ITGB3 genes(AA and GG).

KEY WORDS: ITGB3; aspirin; XueShuanTong; genes polymorphism

随着人口老龄化及饮食结构方式的改变, 脑卒中发生率逐年上升, 为我国首位致死性疾病, 其特点是高发病率、高复发率和高死亡率, 也给社会发展带来沉重的负担。脑梗死约占脑卒中的 60%~80%, 其特点是反复发作, 给患者的神经系统造成严重功能残疾, 降低患者的生活质量, 对患者及家庭造成了巨大的痛苦。阿司匹林通过抑制血小板聚集, 在心血管防治中起关键作用, 临床上可有效地抑制血小板活化及聚集, 预防血栓形成, 常用于心脑血管病的一级和二级防治^[1-2]。但在规律服用治疗剂量的阿司匹林前提下, 仍有部分患者脑梗死复发, 临床上将

这类患者定义为阿司匹林抵抗 (Aspirin resistance, AR)^[3]。

众多研究显示, 阿司匹林抗血小板效应存在明显的个体差异, 遗传背景差异是个体产生阿司匹林抗血小板抵抗的重要预测因素^[4]。血小板致血栓形成过程中, 糖蛋白 III a (ITGB3) 为血小板显微蛋白原受体, 发挥着重要作用^[5]。国外有研究显示, ITGB3 基因 rs5918 (P1A) 单核苷酸多态性 SNP 与阿司匹林抵抗有相关性^[6], 其突变后, 阿司匹林用药效果显著下降, 甚至无应答, 因而临床上也通过检测患者的 ITGB3 基因型来降低患者对阿司匹林抵抗的

发生率,然而国内脑梗死患者作为亚洲人种,该基因的突变情况研究不足,开展相关研究对指导我国脑梗死临床合理运用阿司匹林及降低风险有重大意义。

中药制剂血栓通在临床上常用于治疗心肌缺血及脑血栓,对于防治血液黏稠具有很好的效果,并且患者个体差异小。然而血栓通如何发挥药效的作用机理并不清楚,可能也与其具有抗血小板作用和抗凝作用有关,并且临床疗效与 ITGB3 基因型的相关性也缺乏临床研究。本研究通过测定脑梗死患者的基因型及血栓弹力图等指标,研究阿司匹林及血栓通疗效与 ITGB3 基因的相关性,进一步优化 ITGB3 基因突变型脑梗死患者的治疗方案,以及初步探讨中药制剂与 ITGB3 基因突变的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

研究 2016—2017 年在院的急性脑梗死患者 192 例。所有患者均在发病后 24 h 内入院,符合全国第四届脑血管病会议修正急性脑梗死诊断标准,并随后经头 CT 或/和 MRI 证实。

1.2 研究方法

根据初入院时血栓弹力图检测结果和抗血小板治疗方案将脑梗死患者分为 4 组:阿司匹林组给予阿司匹林(拜耳公司,100 mg/片,批号:20160322) 100 mg/d,血栓通组给予血栓通(珍宝制药,400 mg/瓶,批号:1672478) 400 mg/d,血栓通+阿司匹林组给予阿司匹林 100 mg/d 和血栓通 400 mg/d,阿司匹林+氯吡格雷组给予阿司匹林 100 mg/d+氯吡格雷(赛诺菲,100 mg/片,批号:SN3768) 75 mg/d 为治疗对照组,每组各 48 人。阿司匹林和氯吡格雷均为片剂,每日早晨口服 1 次,每次 1 片;血栓通为注射剂型,每次 1 瓶。各组入院时常规进行肝肾功能、血常规、颈动脉椎动脉彩超检查。进行头颅 MRI 检查记录梗死部位及大小。同时常规进行入院时 NIHSS 评分和治疗 10 d 后 NIHSS 评分。正常对照组进行同样检查和检验。各组均进行 CYP2C19 基因型检测。

1.3 血栓弹力图的测定

使用 5000 型 TEG 凝血分析仪(美国 Haemoscope 公司),试剂包括高岭土含 1% Kadin 液激活剂,花生四烯酸和二磷酸腺苷。所有患者于给药后 3 d 晨起时空腹抽取静脉血置于含 3.13% 枸橼酸钠和肝素钾的采血管内,并于 2 h 内应用 TEG 凝血分

析仪进行测试,以测量凝血酶诱导的血小板激活的全部血凝块强度(MA_{th}),缺少凝血酶和血小板激活的状态下的纤维蛋白网的强度(MA_{fb})和被激活剂激活的血小板所形成的血凝块的强度(MA_{ADP}),运用公式计算血小板抑制率,血小板抑制率 = $[(MA_{ADP} - MA_{fb}) / (MA_{th} - MA_{fb})] \times 100\%$ 。阿司匹林抵抗定义为服用阿司匹林后血小板聚集的抑制较基线值下降幅度 $< 30\%$ 。

1.4 ITGB3 基因多态性检测

抽取静脉血 2 mL,加至 EDTA 抗凝管中抗凝并充分混匀, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,按照试剂盒说明书抽提血液样本 DNA,并对 DNA 样本进行电泳检测,稀释至工作浓度。引物设计、合成及基因型检测等主要工作由苏州泓讯生物科技有限公司完成,ITGB3 基因引物序列:上游 5'-TAGGCGCCTGACCTACCGT-3',下游:5'-GAACGCGGTTACTGCCTAGCTA-3'。采用单碱基延伸(Snapshot)方法对 ITGB3 基因 rs11871251 和 rs2317676 两个 SNP 位点进行分型检测(分型成功率分别为 98% 和 97%),并对分型结果进行双盲样本质控。PCR 反应条件:变性($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,循环 1 次。之后 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,共循环 45 次);退火(温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为 30 s,共循环 45 次);溶解($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 溶解曲线 30 s,循环 1 次, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 溶解曲线 30 s,循环 1 次,再 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 溶解曲线 30 s,循环 1 次)。根据表达量判断 CYP2C19 的基因型。

1.5 统计学方法

采用 SPSS15.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,血栓弹力图采用多因素方差分析,基因频率采用卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床资料与生化指标

192 例患者符合全国第四届脑血管病会议修正的急性脑梗死诊断标准,将患者随机分为 4 组,测定患者的生化指标,用 SPSS 软件统计分析患者的一般资料及生化指标。

4 组患者在年龄、性别及体质量指数方面没有显著性差异(表 1),说明各组之间无显著性差异,具有可比性。只是高血压史方面,阿司匹林组、血栓通+阿司匹林组稍高于血栓通组、阿司匹林+氯吡格雷组,但不影响抗血小板治疗。另外,各组生化指标肌酸磷酸激酶同工酶(CKMB)、谷氨酸丙酮酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)没有显著

性差异,说明各组患者身体指征较为统一。另外,在血脂方面胆固醇含量、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)和白蛋白(Alb)差异也不明显,且

处于同一水平,说明各组脑梗死患者在生化指标水平的一致性,其分组是科学合理的,各组进行实验具有参照性,见表 1。

表 1 各组一般临床资料与生化指标比较($\bar{x} \pm s, n=48$)

组别	年龄	女性数/ %	体质量指数/ ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	高血压史/%	CKMB/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	ALT/ ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
阿司匹林组	67.98±6.54	17 (35.4%)	21.41±2.21	37 (77.14%)	15.0±1.2	17.0±3.3
血栓通组	69.15±7.15	19 (39.6%)	22.91±3.03	33 (68.7%)	13.0±2.8	14.0±2.7
血栓通+阿司匹林组	70.23±5.89	16 (33.3%)	21.98±2.09	35 (72.9%)	14.0±2.4	15.0±2.5
阿司匹林+氯吡格雷组	69.22±6.12	19 (39.6%)	23.04±4.21	32 (66.7%)	12.0±1.8	18.0±3.4

组别	ST/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	胆固醇含量/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	HDL/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	LDL/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Alb/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
阿司匹林组	22.0±5.6	3.89±0.16	1.29±0.25	2.86±0.19	35.91±3.66
血栓通组	17.0±4.6	4.02±0.23	1.43±0.12	2.95±0.21	37.88±4.11
血栓通+阿司匹林组	24.0±4.1	3.95±0.41	1.34±0.09	3.03±0.22	39.31±3.22
阿司匹林+氯吡格雷组	21.0±3.7	3.74±0.26	1.38±0.33	3.18±0.36	36.97±4.35

2.2 NIHSS 评分

美国国立卫生研究院卒中量表(National institute of health stroke scale)简称 NIHSS 评分,是判断脑卒中病情轻重及预后的重要指标^[7]。临床工作中往往认为 NIHSS 评分较低、无明显症状的脑卒中患者病情较轻。从表 2 表明,4 组经阿司匹林、血栓通以及联用后 NIHSS 的评分显著降低,说明从整体水平上,用药后,血小板抑制率效果明显。

表 2 各组给药前后患者 NIHSS 评分

组别	例数	治疗前	治疗后
阿司匹林组	48	6.22±0.67	3.06±0.55*
血栓通组	48	6.56±0.91	2.84±0.43**
血栓通+阿司匹林组	48	7.05±0.94	2.19±0.31**#
阿司匹林+氯吡格雷组	48	5.97±0.65	3.07±0.31*

注:与治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与阿司匹林组比较,# $P<0.05$ 。

2.3 血栓弹力图分析

表 3 表明,对各组患者在治疗前后均进行了血栓弹力图的测定分析,结果发现各组经阿司匹林、血栓通治疗后,血小板抑制率显著增加,均达到 60% 以上,特别是阿司匹林联用血栓通组或氯吡格雷组,其抑制率达到 77% 以上。且血栓通+阿司匹林组和阿司匹林+氯吡格雷组 2 组间效果没有统计学差异,但血栓通组显著低于其它各组,说明血栓通与阿司匹林联用能达到氯吡格雷与阿司匹林联用抑制血小板聚集的疗效,并且也进一步说明中药制剂血栓通也对血小板具有显著的抑制效果^[8]。

2.4 ITGB3 基因多态性与疗效分析

在此次 192 例脑梗死的患者中,各组均有部分患者对阿司匹林治疗效果不明显,主要是 ITGB3 基因突变所导致的阿司匹林抵抗。对 192 例患者均进行了 ITGB3 基因位点突变的分析,并根据突变为 AA 或 GG 来统计各组对血小板抑制率。如表 3 所示,4 组均具有 27.1%~35.4% 的突变型患者,其中位点突变为 AA 的概率高于 GG。未突变野生型 AG 患者给予药物治疗后,其血小板抑制率均显著改善达到 67.8% 以上。然而阿司匹林组突变型 AA 和 GG 只给予阿司匹林治疗后发现,其血小板抑制率低于 35%,对阿司匹林产生了明显的抵抗。血栓通组治疗后,突变型 AA 和 GG 其血小板抑制率达到 55.42% 和 49.98%,显著高于阿司匹林组($P<0.05$)。说明中药制剂血栓通可以通过抑制血小板来改善脑梗死的状况,且与 ITGB3 基因突变没有直接相关性。血栓通+阿司匹林组结果说明血栓通与阿司匹林联用效果会提升,其血小板抑制率与治疗对照组接近。见表 4。

表 3 各组给药前后患者血小板抑制率比较

组别	例数	治疗前/%	治疗后/%
阿司匹林组	48	34.06±7.31	70.23±9.58*
血栓通组	48	36.15±3.27	62.11±5.89**
血栓通+阿司匹林组	48	35.65±4.88	75.86±6.31**
阿司匹林+氯吡格雷组	48	39.51±6.73	77.52±7.15**

注:与治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与阿司匹林组比较,# $P<0.05$ 。

表 4 各组 ITGB3 基因多态性与疗效分析

组别	ITGB3 野生型 AG		ITGB3 突变型 AA		ITGB3 突变型 GG	
	例数	抑制率/%	例数	抑制率/%	例数	抑制率/%
阿司匹林组	33	76.89±6.69	9	35.43±3.66	6	31.22±4.42
血栓通组	35	67.88±8.43	10	55.42±4.09*	3	49.98±6.33*
血栓通+阿司匹林组	33	77.12±8.14	11	59.27±4.47*	4	45.61±5.14*
阿司匹林+氯吡格雷组	31	80.33±7.73	9	60.21±6.55*	8	50.38±7.12*

注:与阿司匹林组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

国内外研究表明,血小板表面有大量糖蛋白(整合素)受体,在血小板粘附和聚集中发挥关键性作用,其中糖蛋白Ⅲa受体分布最为丰富。当血小板受活化刺激后,GPⅡb/Ⅲa复合物发生空间构型的改变,从而暴露纤维蛋白原受体结合部位,促进血小板聚集反应。GPⅡb/Ⅲa受体通路激活是血小板血栓形成的最终共同通路。然而不同个体血小板表面受体的表达、功能存在一定差异,特别是ITGB3基因,在其序列中,容易发生rs11871251和rs2317676这2个SNP位点的突变,分别突变为AA和GG^[9]。因此,测定这2个点的突变情况,评估对阿司匹林的抵抗效果,指导临床运用意义重大。

然而,针对亚洲人种对阿司匹林抗血小板反应的遗传机制方面的研究报道甚少。虽然对于ITGB3基因突变型患者,可能会选用氯吡格雷,然而CYP2C19基因型的差异也会引起氯吡格雷抵抗,并且长期服用氯吡格雷容易造成血管脆裂,出血性风险增加。而中药制剂当中,很多活血类中药,也有可能对血小板有一定的抑制作用,基因型不同是否会导致疗效差异还不清楚。

本研究针对以上关键问题,设计了4个实验组,通过分析血栓弹力图和NIHSS评分,发现从脑梗死患者的整体水平,给予血栓通均能够显著改善患者的血小板状态,效果与氯吡格雷相似。然而ITGB3基因SNP突变位点AA及GG的患者会对阿司匹林产生抵抗。但是给予血栓通治疗后,产生了显著的疗效,血小板抑制率显著提升,说明血栓通不仅可以作用于血小板,并且ITGB3基因的多态性不会显著影响其抑制血小板的效果,表明血栓通可能通过其他途径来影响血小板的聚集,其作用通路及机制需要进一步研究。

参考文献:

[1] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组缺血性脑卒中二级预防指

南撰写组. 中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南[J]. 中华神经科杂志, 2010, 43(2): 154-160.

Neurology Branch of Chinese Medical Association Cardiovascular Epidemiology Group. Ischemic stroke and transient ischemic attack China secondary prevention guide[J]. Chin J Neurol, 2010, 43(2): 154-160.

[2] 司全金,李开亮. 老年患者应用抗血小板药物的收益与风险[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2013, 15(8): 787-788.

SI QJ, LI KL. Elderly patients with use of antiplatelet drugs benefits and risks[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2013, 15(8): 787-788.

[3] 汪芳. 阿司匹林在心血管疾病一级预防中的研究进展与指南规范分析[J]. 中国全科医学, 2015, 18(29): 3519-3523.

WANG F. Research progress and guide standard of aspirin in the primary prevention of cardiovascular diseases[J]. Chin Gener Pract, 2015, 18(29): 3519-3523.

[4] HANKEY GJ, EIKELBOOM JW. Aspirin resistance[J]. Lancet, 2006, 367(9510): 606-617.

[5] PAPP E, HAVASI V, BENE J, et al. Glycoprotein IIIA gene (PIA) polymorphism and aspirin resistance is there any correlation [J]. Ann Pharmacother, 2005, 39(6): 1013-1018.

[6] KNOWLES JW, WANG H, ITAKURA H, et al. Association of polymorphisms in platelet and hemostasis system genes with acute myocardial infarction[J]. Am Heart J, 2007, 154(6): 1052-1058.

[7] 陈翔,袁小梅. 氯吡格雷联合氟伐他汀治疗脑梗死对患者 Barthel 指数及 NIHSS 评分的影响[J]. 中国药业, 2016, 25(22): 59-61.

CHEN X, YUAN XM. Effect of clopidogrel combined with fluvastatin on barthel index and NIHSS score of patients with cerebral infarction [J]. China Pharmaceut, 2016, 25(22): 59-61.

[8] 刘玲,侯华娟,刘亚红,等. 用血栓弹力图评价阿司匹林及氯吡格雷在缺血性卒中患者中血小板抑制效应的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2012, 29(5): 446-449.

LIU L, HOU HJ, LIU YH, et al. Evaluation inhibitory effects of different antiplatelet agents on platelets in ischemic cerebral vascular disease patients by thrombelastogram[J]. J Apopl Nerv Dis, 2012, 29(5): 446-449.

[9] SANTOSO S, KIEFEL V. Human platelet-specific alloantigens: update[J]. Vox Sang, 1998, 74(2): 249-253.

(编辑:董宇)