

# CYP2C8, GPIIIa 和 P2Y12 变异体之间的相互作用增加了缺血性脑卒中的易感性

何妮 易兴阳

**【摘要】 目的** 探讨 15 种基因变异型与缺血性脑卒中(Ischemic stroke, IS)易感性的关系。**方法** 检测缺血性脑卒中患者和正常人群细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP) 3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19、血小板膜受体(Platelet membrane receptor, P)2Y12, P2Y1 和糖蛋白 IIIa(Glycoprotein IIIa, GPIIIa) 基因的 15 个变异型,通过广义多因子降维法(Generalized multi factor dimensionality reduction meehod, GMDR)分析基因-基因的相互作用。**结果** 单基因分析方法显示 15 种变异型在 IS 患者和对照组之间没有明显差异( $P>0.05$ )。GMDR 分析发现 rs17110453A>C, rs2317676A>G 和 rs16863323C>T 基因之间有显著的相互协同作用,交叉验证一致性 10 分,符号测试 9 分( $P=0.016$ )。逻辑回归分析显示校正年龄、高血压病、糖尿病和糖化血红蛋白 A1C(Glycosylated hemoglobin A1C, A1C)等因素后含有 rs17110453A>C, rs2317676A>G 和 rs16863323C>T 变异型的个体是预测 IS 发病的独立危险因素( $OR=2.24$ , 95%  $CI=1.17\sim5.62$ ,  $P=0.005$ )。**结论** rs17110453A>C, rs2317676A>G 和 rs16863323C>T 3 个基因位点的相互作用可能导致 IS 的发生风险更高。

**【关键词】** 缺血性脑卒中 基因多态性 细胞色素 P450 血小板膜受体 糖蛋白

**【中图分类号】** R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2022)04-0359-07

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.04.011

脑卒中已被认为是 1 个全球性的健康问题,并正在成为导致老年人群死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。通常认为脑卒中是由环境风险因素和遗传因素引起的多因素和异质性疾病<sup>[2]</sup>。尽管发病机制尚不清楚,但遗传因素被认为是这种疾病发病机制中的关键因素之一<sup>[3]</sup>。

我们之前的研究表明,在中国人群中细胞色素 P450(CYP)、血小板膜受体(P2Y12, P2Y1)和糖蛋白 IIIa(GPIIIa)基因的遗传变异与氯吡格雷对缺血性脑卒中(Ischemic stroke, IS)患者的干预效果及患者的多种临床事件存在相关性<sup>[4-5]</sup>。然而,尚不清楚这些遗传变异是否也参与 IS 的发病机制。CYP2 和 CYP3A 基因家族主要是编码环氧化物酶,环氧化物酶主要存在于血管内皮细胞和心脏组织中,可以将花生四烯酸(Arachidonic acid, AA)转化为环氧二十碳三烯酸(Epoxy eicosatrienoic acid, EETs)<sup>[6]</sup>。我们之前的另 1 个研究表明,血浆 CYP 的代谢物水平(包括 EETs)和缺血性脑卒中相关<sup>[7-9]</sup>。血小板活化在 IS 发生过程中扮演关键角色<sup>[10]</sup>。血小板膜受体(P2Y12, P2Y1)被认为在血小

板聚集过程和动脉栓塞中扮演关键角色<sup>[11-12]</sup>。纤维蛋白原受体由糖蛋白 IIb(Glycoprotein IIb, GPIIb)和糖蛋白 IIIa(GPIIIa)2 个亚基构成,很可能是血小板激活、粘附和聚集的共同信号通路<sup>[13]</sup>。越来越多的证据表明 P2Y12, P2Y1 和 GPIIb/GPIIIa 基因中的单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism, SNPs)可能会影响抗血小板聚集药物的反应性<sup>[14-15]</sup>。然而,这些基因多态性与 IS 相关的可能作用尚未获得广泛的关注。

IS 似乎是一种不遵循孟德尔遗传模式的疾病,这表明单基因位点分析可能并不适合研究 IS 的遗传风险因素。单基因位点分析可能检测不到显著的变异,反之这些变异可能通过与其他多个基因位点变异的协同相互作用来共同参与 IS 的发病<sup>[16]</sup>。因此,通过替代分析方法彻底研究基因-基因相互作用如广义多因素降维(GMDR)方法,可以显著增强与 IS 相关的基因变异的搜索<sup>[17]</sup>。然而,这些基因-基因相互作用和 IS 之间的关系还没有得到很好的解决。

尽管之前一些研究表明, CYP3A, CYP2, P2Y12, P2Y1 和 GPIIb/IIIa 基因的遗传变异与氯吡格雷疗效和对 IS 患者的多种临床事件相关,但目

前很少有研究探讨这些基因变异和这些基因间相互作用与 IS 风险的关系。我们假设这些变异的相互作用可能比 1 个基因中的单基因位点变异导致 IS 发生的风险更高。本研究探讨了 CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, P2Y12, P2Y1 和 GPIIIa 基因的 15 个变异体与 IS 风险的关联性。此外,本研究还探讨这些基因间的相互作用是否增加了 IS 的风险。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 本研究经德阳市人民医院伦理委员会和温州医学院附属第三医院审查通过。研究对象包括 396 例 IS 患者和 378 名健康对照者。每个参与者在参与本研究之前都提供了知情同意书。该研究在 <http://www.chictr.org/> 上注册,注册号为 ChiCTR-OCH-14004724。所有第 1 次脑卒中并入住上述两家医院的患者都参加了这项研究。IS 的诊断由脑部磁共振成像确认。纳入标准:(1)年龄 $\geq 40$ 岁;(2)根据改良急性脑卒中治疗低分子肝素试验(Trial of org 10172 in Acute Stroke Treatment, TOAST)标准,IS 被分为动脉粥样硬化性血栓形成(Atherothrombotic, AT)亚型或小动脉疾病(Small artery disease, SAD)亚型。排除标准:(1)心源性脑栓塞或其他确定或未确定的 IS 病因;(2)有脑卒中家族史或既往脑卒中或心梗病史;(3)脑出血。作为对照的健康志愿者是从没有脑卒中病史的门诊人群中选择的,这些人群已通过病史和体格检查以及实验室检查确认,他们没有脑卒中家族史,与 IS 患者没有遗传关系。所有受试者都没有遗传性疾病的治疗或家族史。参加本研究的参与者没有关节炎、感染、癌症、血液疾病、自身免疫疾病以及严重的心脏、肺、肝、肾或甲状腺疾病。IS 患者的总体受访响应率为 94%(396/421),对照组为 93%(378/406)。从每个参与者获得详细的病史和脑卒中危险因素包括年龄、性别、高血压病、糖尿病、吸烟、饮酒、总血浆胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(Low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和 A1C。糖尿病定义为当受试者在口服葡萄糖激发后 2h 或服用降血糖药物时的空腹血糖水平 $> 7.8$  mmol/L 或 $> 11.1$  mmol/L 时。高血压病被定义为 3 次独立测量血压平均值 $\geq 140/90$  mmHg 或正在服用降压药物。

**1.2 CYP 的 SNPs 的选择和基因型鉴定** 本研究

中从 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)中选出 CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, P2Y12, P2Y1 和 GPIIIa 基因中的 15 个 SNPs,选择基于以下标准:(1)以前研究评估过的 SNPs;(2)可导致氨基酸改变的 SNP。

**1.3 基因组分型** 根据我们以前的研究,使用基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱法对从外周血中提取的基因组 DNA 进行基因分型。使用 3.0.0.4 版的 MassARRAY RT 软件实时进行基因型调用,并使用 3.4 版的 MassARRAY Typer 软件(加利福尼亚州圣地亚哥的 Sequenom Inc.)进行分析。这些 SNP 的每个等位基因都按其已知功能的效果进行分类,对于每个基因,根据受试者是否拥有至少 1 个等位基因突变,将受试者分为 2 组。

**1.4 血小板聚集测试** 入院时从肘静脉抽取静脉血(3 mL)。通过透光凝集测量法(LTA)测量血小板聚集。程序和一致性测试按照我们以前的研究进行。记录血小板聚集作为光透射率的变化。光学血小板聚集测定值表示在用 BioData PAPS-4 血小板聚集计(Helena Laboratories, Beaumont, TX, USA)加入激动剂 0.5 mM AA 和 10  $\mu$ M ADP 5 min 后的透光率幅度。

**1.5 统计学处理** 基于检测基因-基因相互作用的推荐样本量要求,本研究预期 360 例患者和 360 名正常对照者的样本量将足以作为三种遗传模型计算获得 5%显著性水平提供 80%的检力:附加模型、主导模型和隐性模型。所有统计分析均使用 SPSS 16.0(SPSS Inc., Chicago, IL)。使用  $\chi^2$  检验分析基因型频率与 Hardy-Weinberg 平衡的偏差并比较基因型频率。使用  $t$  检验比较 IS 和正常对照者的连续变量。使用  $\chi^2$  检验比较离散变量或者当预期的细胞频率很小时进行 Fisher 精确测试。对于基因-基因相互作用分析,应用 GMDR 方法(Beta, 版本 0.7, [www.healthsystem.virginia.edu/internet/addiction-genomics/Software](http://www.healthsystem.virginia.edu/internet/addiction-genomics/Software))<sup>[17]</sup>。GMDR 计算了最大似然估计和无效假设下所有个体的得分。 $P$  值通过使用符号测试来确定,这是一种在 GMDR 软件中实现的强大的非参数测试。置换测试适用于多次测试校正。通过将观测数据的平均预测误差与平均预测误差的分布进行比较来确定统计显著性。置换测试(结合交叉验证)可以最大程度地减少由于多次测试而导致的假阳性。具有最小预测误差,最大交叉验证一致性得分以及  $P \leq 0.05$  (自动从 GMDR 软件中

的符号测试导出)的该模型被认为是最佳模型。此外,进行多元逻辑回归分析以调整协变量风险因素,用来评估基因-基因相互作用对 IS 风险的独立贡献。基因型的相对风险和 IS 的发病率用比值比(Odds ratios,*OR*)和 95%置信区间(Confidence interval,*CI*)表示。计算假阳性率(False-positive report probability,*FPRP*)以评估有意义的发现。本研究将0.2设置为*FPRP* 阈值,并指定先验概率为0.1,以检测与基因型相关的比值比(*OR*)为0.67/1.50(保护/风险效应)。只有*FPRP* 值<0.2才被认为是值得注意的发现。以  $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 研究对象的临床特征 IS 患者和正常对照者的基线特征见表 1。和正常对照者比较,IS 患者年龄更大( $P<0.001$ ),具有更高的高血压病( $P<0.001$ )和糖尿病概率( $P=0.032$ )以及更高的糖化血红蛋白水平( $P<0.001$ )。然而,2 组传统危险因素包括吸烟、饮酒、低密度脂蛋白胆固醇(Low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)、总血浆胆固醇(Total cholesterol,TC)、甘油三酯(Triglycerides,TG)、同型半胱氨酸水平和体质量指数均没有显著差异( $P>0.05$ )。

表 1 2 组的临床特征

临床特征	IS 组 ( <i>n</i> = 396)	正常对照组 ( <i>n</i> = 378)	<i>P</i>
年龄( $\bar{x} \pm s$ ,岁)	68.79 $\pm$ 11.11	64.98 $\pm$ 10.29	<0.001
男[ <i>n</i> (%)]	235(59.34)	222(58.73)	0.924
高血压病[ <i>n</i> (%)]	302(76.26)	99(26.19)	<0.001
糖尿病[ <i>n</i> (%)]	138(34.85)	97(25.66)	0.032
体质量指数( $\bar{x} \pm s$ ,kg/m <sup>2</sup> )	24.10 $\pm$ 2.33	23.90 $\pm$ 2.62	0.221
吸烟[ <i>n</i> (%)]	165(41.67)	159(42.06)	0.942
饮酒[ <i>n</i> (%)]	184(46.46)	170(44.97)	0.694
TG( $\bar{x} \pm s$ ,mM)	1.96 $\pm$ 1.12	1.83 $\pm$ 1.02	0.182
TC( $\bar{x} \pm s$ ,mM)	5.54 $\pm$ 1.36	5.36 $\pm$ 1.21	0.061
LDL-C( $\bar{x} \pm s$ ,mM)	3.15 $\pm$ 1.27	2.99 $\pm$ 1.19	0.376
HDL-C( $\bar{x} \pm s$ ,mM)	1.23 $\pm$ 0.38	1.26 $\pm$ 0.42	0.223
同型半胱氨酸(Homocysteine) ( $\bar{x} \pm s$ ,mM)	12.73 $\pm$ 4.24	12.49 $\pm$ 4.36	0.462
A1C( $\bar{x} \pm s$ ,%)	6.62 $\pm$ 1.62	6.02 $\pm$ 1.64	<0.001
治疗史(Previous treatment)[ <i>n</i> (%)]			
降压药(Antihypertensive drugs) [ <i>n</i> (%)]	117(29.5)	89(23.5)	0.071
降糖药(Hypoglycemic drugs)[ <i>n</i> (%)]	113(28.5)	85(22.5)	0.059
他汀类药物(Statins)[ <i>n</i> (%)]	48(12.1)	44(11.6)	0.912
阿司匹林(Aspirin)[ <i>n</i> (%)]	51(12.9)	45(11.9)	0.823

2.2 比较 IS 患者和正常对照者之间的基因型分布

本研究检测的 15 种变异的基因型分布与 Hardy-Weinberg 平衡模型一致( $P>0.05$ )。15 种变异发生的基因型频率在 IS 患者和正常对照者之间没有显著差异( $P>0.05$ )(表 2)。此外,动脉粥样硬化性血栓形成(Atherothrombotic,AT)和小动脉疾病(Small artery disease,SAD)患者之间的基因型频率没有显著差异( $P>0.05$ )。

表 2 2 组之间的基因型比较 [ *n*(%) ]

基因型	IS 组 ( <i>n</i> = 396)	正常对照组 ( <i>n</i> = 378)	<i>P</i>
CYP2C8(rs17110453)			
AA	180(45.45)	180(47.62)	0.796
AC + CC	216(54.55)	198(52.38)	
CYP2C8(rs1934980)			
CC	57(14.39)	55(14.55)	0.892
CT + TT	339(85.61)	323(85.45)	
CYP2C9 * 2(rs1799853)			
CC	396(100)	378(100)	—
CYP2C9 * 3(rs1057910)			
AA	360(90.91)	349(92.33)	0.824
AC + CC	36(9.09)	29(7.67)	
CYP3A5(rs776746)			
AA	45(11.36)	40(10.58)	0.682
AG + GG	351(88.64)	338(89.41)	
CYP2C19 * 2(rs4244285)			
GG	198(50.0)	182(48.1)	0.836
AG + AA	198(50.0)	196(51.9)	
CYP2C19 * 3(rs4986893)			
GG	361(91.2)	355(93.9)	0.468
AG	35(8.8)	23(6.1)	
P2Y1(rs701265)			
AA	213(53.8)	219(57.9)	0.325
AG + GG	183(46.2)	159(42.1)	
P2Y1(rs1371097)			
CC	204(51.5)	221(58.5)	0.206
TT + CT	192(48.5)	157(41.5)	
P2Y1(rs1439010)			
AA	206(52.0)	219(57.9)	0.213
AG + GG	190(48.0)	159(42.1)	
P2Y12(rs16863323)			
CC	88(22.2)	95(25.1)	0.522
TT + CT	308(77.8)	283(74.9)	
P2Y12(rs9859538)			
GG	304(76.8)	280(74.1)	0.563
AG + AA	92(23.2)	98(25.9)	
GPIIIa(rs2317676)			
AA	233(58.8)	242(64.0)	0.284
AG + GG	163(41.2)	136(36.0)	
GPIIIa(rs11871251)			
AA	141(35.6)	121(32.0)	0.431
AG + GG	255(64.4)	257(68.0)	
CYP3A4(rs2242480)			
CC	214(54.0)	200(52.9)	0.942
TT + CT	182(46.0)	178(47.1)	

2.3 IS 患者以及正常对照者中的基因-基因间相互作用 本研究使用 GMDR 方法研究了 SNPs 与 IS 的协同相互作用的关联,发现有着显著的基因-基因相互作用。调整协变量后 IS 的最佳模型是 rs17110453A>C,rs2317676A>G 和 rs16863323C>T,交叉验证一致性得分为 10 分(满分 10 分),符号测试得分为 9 分(满分 10 分)( $P=0.016$ )(表 3)。此外,本研究还为每个变体计算了单基因位点模型,GMDR 对单基因位点模型的预测精度分别为 0.523、0.614 和 0.546(分别为 rs17110453A>C,rs2317676A>G 和 rs16863323C>T),最小  $P$  值为 0.923。置换测试进一步证实了这种相互作用的显著性( $P=0.014$ ),即这 3 个遗传变异在 IS 的发生中存在显著的协同作用,而不是仅由于单独的 1 个基因位点变异所导致的。

表 3 最佳模型的比较、预测精度、交叉验证一致性和广义多因素降维分析确定的  $P$  值

最佳模型 (Best model) *	训练平衡精度 (Training balanced accuracy)	测试平衡精度 (Testing balanced accuracy)	交叉一致性验证 (Cross-validation consistency)	Sign test ( $P$ )
15	0.513	0.523	8/10	7 (0.179)
1,2	0.524	0.519	9/10	8 (0.324)
1,2,3	0.572	0.543	10/10	9 (0.016)
1,2,3,4	0.568	0.604	7/10	7 (0.514)
1,2,3,4,5	0.612	0.518	10/10	8 (0.642)
1,2,3,4,5,6	0.587	0.476	8/10	6 (0.687)
1,2,3,4,5,6,7	0.626	0.524	7/10	4 (0.817)
1,2,3,4,5,6,7,8	0.641	0.524	8/10	5 (0.347)
1,2,3,4,5,6,7,8,9	0.662	0.528	5/10	6 (0.832)
1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	0.586	0.554	7/10	5 (0.644)
1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11	0.519	0.476	6/10	6(0.368)
1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12	0.474	0.513	4/10	5 (0.724)
1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13	0.638	0.543	8/10	4(0.375)
1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14	0.576	0.617	7/10	7 (0.247)
1,2,3,4,5,6,7,8,9, 10,11,12,13,14,15	0.552	0.514	8/10	5 (0.267)

注: \* 为 Numbers 1-15 represent rs17110453, rs2317676, rs16863323, rs4244285, rs11871251, rs776746, rs1371097, rs701265, rs1439010, rs2242480, rs9859538, rs4986893, rs1934980, rs1799853, and rs1057910, respectively

表 4 显示了与野生型基因型 rs17110453AA,rs2317676AA 和 rs16863323CC 比较,IS 与基因型的不同组合之间的关联。rs17110453CC,rs2317676GG 和 rs16863323TT 之间的 3 个交互作用对该模型做出了巨大贡献。与拥有 rs17110453AA,rs2317676AA 和 rs16863323CC 的

患者比较,含 rs17110453CC,rs2317676GG 和 rs16863323TT 的个体患 IS 的估计风险明显更高( $OR=2.46,95\%CI=1.18\sim 5.96,P=0.004$ )。即多基因的相互作用比任何独立的单基因变异给 IS 带来更高的风险。

表 4 IS 与基因型组合之间的关联

rs17110453	rs16863323	rs2317676	OR	95%CI	P
AA	CC	AA	1 *	—	—
CC	TT	GG	2.46	1.18—5.96	0.004
CC	TT	AA,GG	1.97	1.02—3.95	0.037
CC	CT	AG	2.23	1.08—4.17	0.021
AC	CT	AG	1.07	0.85—2.07	0.317
CC,AC	TT	GG	1.14	0.71—1.85	0.284
CC	TT,CT	GG	1.08	0.66—2.14	0.476
CC,AC	TT,CT	GG,AC	1.12	0.72—1.94	0.603

注: \* 为 Non-risk genotype for each genetic factor was used as the reference OR

对于 0.1 的先验概率,假设特定基因型的 OR 为 0.67/1.50(保护/风险),统计功效为 0.986,则 rs17110453A>C,rs2317676A>G 和 rs16863323C>T 之间的高风险交互基因型关联的假阳性报告概率(False-positive report probability, $FPRP$ )值为 0.173,所有个体中 IS 的风险增加。由于假阳性的可能性<20%,因此 rs17110453A>C,rs2317676A>G 和 rs16863323C>T 3 个基因型与 IS 风险之间的相互作用呈正相关,被认为是值得注意的发现。

2.4 IS 风险因子的逻辑回归分析 将 3 个变异体组合在一起所产生的相对风险作为计算相互作用的变量因子。rs17110453CC,rs2317676GG 和 rs16863323TT;rs17110453CC,rs2317676GG/AG 和 rs16863323TT;rs17110453CC,rs2317676AG 和 rs16863323CT 被认为是高风险的交互变量,赋值为 1;rs17110453A>C,rs2317676A>G 和 rs16863323C>T 的组合作为低风险交互变量,赋值为 0。Logit 模型分析显示,在调整年龄、高血压病、糖尿病或 A1C 等因素后 rs17110453A C,rs2317676A G 和 rs16863323C T 变异体的个体发生 IS 的风险显著增高(表 5)。

表 5 IS 主要危险因素的多元回归分析

危险因素	Wald	OR	95% CI	P
年龄	5.23	1.24	1.08—2.36	0.014
高血压病(Hypertension)	14.23	5.22	2.4—11.8	<0.001
糖尿病(Diabetes mellitus)	0.85	0.82	0.72—1.36	0.128
高风险基因型(High-risk interactive genotypes)	8.8	2.24	1.17—5.62	0.005
A1C	0.92	0.94	0.86—1.77	0.243

2.5 IS 患者中高风险交互基因型对血小板聚集活性的影响 住院期间的血小板聚集活性在 15 种变异型中无显著性差异。然而,携带高风险交互基因型的患者血小板聚集-无论是花生四烯酸(Arachidonic acid,AA)诱导的还是二磷酸腺苷(Adenosine diphosphate,ADP)诱导的-显着高于入院时未携带高风险交互基因型的患者(表 6)。

表 6 高风险交互基因型对 IS 患者血小板聚集活性的影响

组别	血小板聚集率(Platelet aggregation)(%)	
	花生四烯酸诱发型 (AA-induced)	二磷酸腺苷诱发型 (ADP-induced)
非高风险交互基因型(High-risk interactive genotypes)(n=284)	87.3±13.6	88.2±14.2
高风险交互基因型(High-risk interactive genotypes)(n=112)	91.7±10.6*	92.3±11.7△

注:与非高风险交互基因型比较,\*P<0.001,△P<0.004

3 讨 论

CYP,P2Y12,P2Y1 和 GPIIb/IIIa 基因的基因变异在 IS 易感性或预后中的可能机制尚无深入研究。本研究的目的是探讨这些变异与中国人群中 IS 之间的潜在关联。本研究发现 CYP,P2Y12,P2Y1 和 GPIIb/IIIa 基因中的 15 种变异在 IS 患者和正常对照者之间并无显著差异。然而,GMDR 分析则揭示 rs17110453A>C,rs2317676A>G 和 rs16863323C>T 具有增加 IS 风险的协同效应。

CYP2 和 CYP3A 基因家族主要编码环氧化酶,这些变异在 IS 的发生和预后中扮演的角色仍不清楚。Suh 等<sup>[18]</sup>人揭示了 CYP3A5 的不表达基因型(CYP3A5\*3)与冠状动脉成形术后 6 个月内的动脉血栓形成事件频率增加有关,而其他研究未证实 CYP3A5 的基因变异和氯吡格雷的抗血小板聚集作用有关<sup>[19]</sup>。Yi 等<sup>[20]</sup>人报道 ALOX5AP 和 CYP3A5 的基因多态性增加了 IS 的易感性,并与 IS 患者的动脉血栓形成事件有关。在日本人群中 CYP3A4 和 CYP3A5 的基因型与 IS 无关,但 CYP3A4 可能与脑出血和蛛网膜下腔出血有关<sup>[21]</sup>。我们以前的研究表明,CYP2C8 rs17110453 和可溶性环氧化物酶 2(Soluble epoxidase 2,EPHX2)rs751141 两个基因位点的相互作用导致 IS 发生的风险显著增加<sup>[22]</sup>。然而,Marciante 等<sup>[23]</sup>人揭示 CYP2C8 或 CYP2C9 的变异与心肌梗死或 IS 之间没有关联。

血小板膜受体和糖蛋白 IIIa 在血小板活化和动脉血栓形成中扮演重要角色。一些研究发现

P2Y12 基因多态性与不良血管病变有关,而对这些基因多态性的检测可能对患者出现复发缺血性事件的风险有预测价值<sup>[24]</sup>。然而,Zee 等<sup>[25]</sup>人发现 P2RY12 变异和单倍体 H2 与心肌梗死(Myocardial infarction,MI)或 IS 事件无相关性。一篇系统性的综述和 meta 分析显示携带 GPIIIa 的 P1A2 基因多态性是 IS 的危险因素,特别是心源性和大血管病变所引起的 IS<sup>[26]</sup>。在墨西哥个体中糖蛋白 IIIa 的 PIA1/A2 基因多态性是心肌梗死的危险因素,但不是 IS 的危险因素<sup>[27]</sup>。本研究还发现使用单位点分析法未能发现 P2Y12,P2Y1,GPIIIa 基因变异和 IS 存在着关联性。

以上这些研究彼此存在矛盾的结果可能有许多潜在的原因。第 1 个原因可能是被调查的 IS 患者存在种族上的差异;第 2 个原因可能是 IS 疾病本身的复杂性。事实上,IS 的发病机制很可能需要多种变异,每种变异都有轻微的影响和潜在的无法预测的效果<sup>[27]</sup>。

事实上,IS 的病理机制需要多个变化,每 1 个具有轻微的影响和可能无法检测的效果。因此,用于研究单基因疾病的连锁分析似乎并不适合 IS 的遗传学研究。此外,这些人群也存在着其他社会差异,这也可能会改变患者所处的环境因素。本研究最值得关注的发现是通过 GMDR 的方法获得的。尽管无法确定任何单个基因位点变异所产生的意义,但 GMDR 分析显示了基因变异之间存在着有趣的协同效应。GMDR 分析显示 rs17110453A>C,rs2317676A>G 和 rs16863323C>T 具有增加 IS 风险的组合效应。具体而言,携带 rs17110453A>C,rs2317676A>G 和 rs16863323C>T 基因型的高风险组合的个体的 IS 风险增加 2.24 倍,表明 3 个基因位点相互作用可能在 IS 的遗传易感性中起关键作用。

然而,3 个基因位点变异相互作用的机制仍不清楚。一种可能的解释是,3 个基因位点变异相互作用增强了血小板活化,后者在 IS 发病机制中起关键作用。CYP2 基因家族编码主要的 CYP 环氧化酶。EETs 发挥血管舒张作用,抑制血小板黏附<sup>[28]</sup>,并对心血管系统具有不同的保护作用<sup>[29]</sup>。CYP2C8 rs17110453 基因多态性降低了 CYP2C8 的活性,进而降低了循环的 EET 代谢物水平,因而增加了 IS 风险和 IS 相关损伤的风险。血小板膜受体和糖蛋白 IIIa 在血小板活化和动脉血栓形成中扮演重要角色。P2Y12 rs16863323 和 GPIIIa rs2317676 分别

编码血小板膜受体和糖蛋白 IIIa。Fontana 等<sup>[30]</sup>人发现二磷酸腺苷(Adenosine diphosphate, ADP)诱导的血小板聚集与 P2Y12 受体基因的单倍型有关。GPIIIa rs2317676 也对服用氯吡格雷的 IS 患者的 ADP 诱导的血小板聚集有影响。本研究结果表明,携带高风险交互式基因型的患者在住院期间的 AA 或 ADP 诱导的血小板聚集率明显高于不携带高风险交互式基因型的患者,故推断 rs17110453A>C, rs2317676A>G 和 rs16863323C>T 的相互作用可能为这些个体提供比没有这种特定的 3 个基因变异相互作用的个体更高的血小板聚集作用,从而增加了 IS 的风险。但是,需要进一步的研究来验证本研究的发现。

本研究有几个潜在的局限性。首先,由于本研究为双中心设计,样本量相对较小,本研究的结果可能存在偏差。尽管计算 *FPRP* 评估发现有意义的研究结果,但是这些结果必须在更大规模的多中心研究中得到验证;其次,尽管本研究对 CYP, P2Y12, P2Y1 和 GPIIIa 基因中的多个已知功能变异进行了基因分型,但在该人群中一些罕见的功能变异未被检测到;最后,这项研究仅调查了涉及 15 个变异基因间的相互作用,因此未来的研究仍需进行涉及更多的遗传变异,以阐明基因-基因相互作用对 IS 发病机制的全面影响。

本研究单基因变异分析显示 IS 患者和正常对照者之间 CYP, P2Y12, P2Y1 和 GPIIIa 基因的 15 种变体的基因型分布没有显著差异;然而 GMDR 分析显示 rs17110453A>C, rs2317676A>G 和 rs16863323C>T 之间存在显著的基因-基因相互作用,并且这种基因-基因相互作用可能增加普通人群对 IS 的易感性。本研究使用的组合分析为进一步了解 IS 的复杂发病机制提供了可能。

## 参 考 文 献

- [1] GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age- sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013; a systematic analysis for the global burden of disease study 2013 [J]. *Lancet*, 2015, 385(9963): 117-171.
- [2] Dichgans M. Genetics of ischaemic stroke[J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6(2): 149-161.
- [3] Guo JM, Liu AJ, Su DF. Genetics of stroke[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(9): 1055-1064.
- [4] Yi X, Lin J, Wang Y, et al. Association of cytochrome P450 genetic variants with clopidogrel resistance and outcomes in acute ischemic stroke[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(10): 1188-1200.
- [5] Yi X, Wang Y, Lin J, et al. Interaction of CYP2C19, P2Y12, and GPIIIa variants associates with efficacy of clopidogrel and adverse events on patients with ischemic stroke[J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2016, <https://doi.org/10.1177/1076029616648408>.
- [6] Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale[J]. *Biochimie*, 2009, 91(6): 791-795.
- [7] Ward NC, Croft KD, Blacker D, et al. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid are elevated in stroke patients compared with healthy controls[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 121(11): 501-507.
- [8] Yi X, Liao D, Wu L, et al. CYP genetic variants, CYP metabolite levels, and symptomatic carotid stenosis in ischemic stroke patients [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(5): 621-631.
- [9] Yi X, Wu L, Liao D, et al. Interactions among CYP2C8, EPHX2, and CYP4A11 variants and CYP plasma metabolite levels in ischemic stroke[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(11): 1286-1293.
- [10] Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis[J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1227-1234.
- [11] Storey RF. Biology and pharmacology of the platelet P2Y12 receptor[J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12: 1255-1259.
- [12] Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(3): 340-345.
- [13] Floyd C, Ferro A. The platelet fibrinogen receptor: from megakaryocyte to the mortuary[C]//doi:2012:012007.
- [14] Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. PLA polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation[J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2004, 15(1): 89-93.
- [15] Li Q, Chen BL, Ozdemir V, et al. Frequency of genetic polymorphisms of COX1, GPIIIa and P2Y1 in a Chinese population and association with attenuated response to aspirin[J]. *Pharmacogenomics*, 2007, 8(6): 577-586.
- [16] Culverhouse R, Suarez BK, Lin J, et al. A perspective on epistasis: limits of models displaying no main effect[J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(2): 461-471.
- [17] Lou XY, Chen GB, Yan L, et al. A generalized combinatorial approach for detecting gene-by-gene and gene-by-environment interactions with application to nicotine dependence[J]. *Am J Hum Genet*, 2007, 80(6): 1125-1137.
- [18] Suh JW, Koo BK, Zhang SY, et al. Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel[J]. *CMAJ*, 2006, 174(12): 1715-1722.
- [19] Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(4): 363-375.
- [20] Yi X, Zhang B, Wang C, et al. Genetic polymorphisms of ALOX5AP and CYP3A5 increase susceptibility to ischemic stroke and are associated with atherothrombotic events in stroke patients[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2015, 24(3): 521-529.

研究治疗方法还可能通过下调血清 NSE, ICAM-1 水平而保护患者脑组织。

综上所述,神经介入联合阿加曲班在 AIS 治疗中的应用,可有效下调血清 NSE, sICAM-1 水平,明显改善局部高凝状况,显著降低神经功能损伤程度,从而有利于患者获得良好预后。

参 考 文 献

[1] 梁永,唐红宇,王爱民,等. 桥接治疗急性缺血性脑卒中患者的血管再通率及远期神经功能恢复分析[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(1): 94-98.

[2] 陈付文,刘金朝,康孝理,等. Solumbra 技术在急性大动脉闭塞性脑梗死机械取栓中的初步应用观察[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28(6): 515-520.

[3] 方锋. 丁苯酞联合阿司匹林和氯吡格雷对神经介入手术治疗后老年脑血管疾病患者的疗效[J]. 中国合理用药探索, 2019, 16(7): 111-113, 117.

[4] 张国锋,徐耀铭,周文静,等. 阿加曲班和尤瑞克林治疗进展性脑梗死的比较研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(2): 229-233.

[5] 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 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 666-682.

[6] Josephson SA, Hills NK, Johnston SC. NIH stroke scale reliability in ratings from a large sample of clinicians[J]. Cerebrovasc Dis, 2006, 22(5/6): 389-395.

[7] Quinn TJ, Dawson J, Walters MR, et al. Reliability of the modified Rankin Scale: a systematic review[J]. Stroke, 2009,

40(10): 3393-3395.

[8] 吕尤,张清秀,荣良群,等. 重组组织型纤溶酶原激活剂动脉溶栓联合血管内治疗对早期急性脑梗死的疗效观察[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(23): 66-71.

[9] 汪宁,张保朝,温昌明. 血管内介入治疗急性脑梗死的临床疗效及对患者血清神经元特异性烯醇化酶、脑钠肽及神经生长因子的影响[J]. 中国临床医生杂志, 2018, 46(7): 798-800.

[10] 陆小波,肖国栋,肖章红,等. 神经介入取栓术治疗脑梗死的疗效研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(10): 523-524.

[11] 石磊. 利伐沙班联合血管内机械取栓治疗房颤合并急性缺血性脑卒中患者的临床观察[J]. 国际医药卫生导报, 2020, 26(19): 2949-2952.

[12] 白如玉,郭晓贤,郝美美,等. 阿加曲班联合乌司他丁对急性缺血性脑卒中病人血清 Lp-PLA2 和 ADAMTS-1 水平的影响[J]. 实用老年医学, 2020, 34(5): 434-438.

[13] 屈征,王瑞,李艳玲,等. 小剂量阿加曲班联合阿司匹林治疗急性进展性卒中的临床研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2019, 36(6): 552-554.

[14] 涂秀,戴学庆. 凝血系统在急性脑卒中的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(3): 419-421.

[15] 任洁明. 丁苯酞联合阿司匹林和氯吡格雷治疗进展性缺血性脑梗死的临床疗效及安全性分析[J]. 中国民康医学, 2019, 31(2): 23-25.

[16] Onatsu J, Vanninen R, Jäkälä P, et al. Tau, S100B and NSE as blood biomarkers in acute cerebrovascular events[J]. In Vivo, 2020, 34(5): 2577-2586.

[17] 刘书芳,汪琳,彭聪,等. 急性脑梗死患者血清 sICAM-1、VS-2、D-二聚体水平的变化及意义[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(6): 1319-1321.

(2021-12-02 收稿)

(上接第 364 页)

[21] Yamada Y, Metoki N, Yoshida H, et al. Genetic factors for ischemic and hemorrhagic stroke in Japanese individuals[J]. Stroke, 2008, 39(8): 2211-2218.

[22] Yi X, Zhang B, Wang C, et al. CYP2C8 rs17110453 and EPHX2 rs751141 two-locus interaction increases susceptibility to ischemic stroke[J]. Gene, 2015, 565(1): 85-89.

[23] Marcianti KD, Totah RA, Heckbert SR, et al. Common variation in cytochrome P450 epoxigenase genes and the risk of incident nonfatal myocardial infarction and ischemic stroke[J]. Pharmacogenet Genomics, 2008, 18(6): 535-543.

[24] Li XQ, Ma N, Li XG, et al. Association of PON1, P2Y12 and COX1 with recurrent ischemic events in patients with extracranial or intracranial stenting[Z], 2016; e0148891.

[25] Zee RY, Michaud SE, Diehl KA, et al. Purinergic receptor P2Y<sub>12</sub>, G-protein coupled, 12 gene variants and risk of incident ischemic stroke, myocardial infarction, and venous thromboembolism[J]. Atherosclerosis, 2008, 197(2): 694-699.

[26] Floyd CN, Ellis BH, Ferro A. The PLA1/A2 polymorphism of

glycoprotein IIIa as a risk factor for stroke: a systematic review and meta-analysis[Z], 2014: 27.

[27] Larsen BT, Guterman DD, Hatoun O. Emerging role of epoxyeicosatrienoic acids in coronary vascular function[J]. Eur J Clin Invest, 2006, 36(5): 293-300.

[28] Han SW, Kim SH, Lee JY, et al. A new subtype classification of ischemic stroke based on treatment and etiologic mechanism[J]. Eur Neurol, 2007, 57(2): 96-102.

[29] Yi XY, Wang C, Liu P, et al. Antiplatelet drug resistance is associated with early neurological deterioration in acute minor ischemic stroke in the Chinese population[J]. J Neurol, 2016, 263(8): 1612-1619.

[30] Wang S, Zhao H. Sample size needed to detect gene-gene interactions using association designs [J]. Am J Epidemiol, 2003, 158(9): 899-914.

[31] He J, Wang MY, Qiu LX, et al. Genetic variations of mTORC1 genes and risk of gastric cancer in an eastern chinese population[J]. Mol Carcinog, 2013, 52(S1): E70-79.

(2021-11-23 收稿)