



汕頭大學

SHANTOU UNIVERSITY

硕士学位论文

题目 CYP2C19, ABCB1, PON1 基因多态性及吸烟
与氯吡格雷抗血小板效果的关联研究

英文题目 Association between CYP2C19, ABCB1, PON1
polymorphisms, cigarette smoking and the anti-platelet
effect of clopidogrel

姓名 袁圆 学号 11120094

所在学院 医学院 导师姓名 王兴宇 教授

专业 内科学

入学日期 2011年9月 答辩日期 2014年5月

学位论文原创性声明

本论文是我个人在导师指导下进行的工作研究及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外，不包含其他人或其它机构已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在论文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

作者签名： 袁国 日期： 2014年5月28日

学位论文使用授权声明

本人授权汕头大学保存本学位论文的电子和纸质文档，允许论文被查阅和借阅；学校可将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存和汇编论文；学校可以向国家有关部门或机构送交论文并授权其保存、借阅或上网公布本学位论文的全部或部分内容。对于保密的论文，按照保密的有关规定和程序处理。

作者签名： 袁国 导师签名： 王兴平
日期： 2014年5月28日 日期： 2014年5月28日

陈兰英 梁岩 卢孝洲

学位论文知识产权声明

本人郑重声明：我所提交答辩的学位论文，是本人在导师指导下完成的成果，该成果属于汕头大学医学院，受国家知识产权法保护。本人在毕业离校前会将有关的研究资料和结果全部上交导师，离校后使用与学位论文相关的数据资料参加学术会议、公开报告、发表论文和申请基金等，须征得导师及导师所在单位的同意。不得擅自对外披露本论文尚未公开的研究成果。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

注：保密的学位论文在解密后适用本声明。

研究生签名： 袁圆 日期： 2014 年 5 月 28 日
导师签名： 李学军 日期： 2014 年 5 月 28 日

汕头大学

硕士学位论文

CYP2C19, ABCB1, PON1 基因多态性及吸烟与氯吡格雷抗血小板效果的关联研究

Association between CYP2C19, ABCB1, PON1 polymorphisms, cigarette smoking and the anti-platelet effect of clopidogrel

学位申请人：袁圆

指导老师：王兴宇 教授

专业方向：内科学

研究方向：心血管内科

资助项目：863 计划项目

答辩主席：陈兰英 教授

答辩委员：梁岩 卢喜烈

答辩秘书：朱清英

汕头大学医学院

2014 年 5 月 中国 汕头

中文摘要

背景

双联抗血小板疗法（阿司匹林+氯吡格雷）已经成为经皮冠状动脉介入术（PCI）后和/或急性冠脉综合症（ACS）的金标准疗法。氯吡格雷所抑制的由二磷酸腺苷（ADP）介导的 P2Y₁₂ 受体在抗血小板的作用越来越引起人们的注意。而在诸多影响氯吡格雷抗血小板效果因素中，介导氯吡格雷在人体内生物转化的细胞色素 P450s 具有重要的作用，而影响其酶活性的相关基因 CYP2C19 的基因多态性与之紧密相关。失功能基因突变（主要是*2 等位基因）在由基因介导的氯吡格雷生物转化通路中占主导作用。文献表明，三磷酸腺苷结合转运蛋白 B1（ABCB1）和对氧磷脂酶 1（PON1）可能对氯吡格雷的生物转化也有一定的作用。观察性研究表明，吸烟可以增加氯吡格雷的药物反应性，降低氯吡格雷治疗中血小板反应性（OPR），从而增加其药物效果。而介导吸烟与氯吡格雷药物效果的机制目前尚不清楚但可能与 CYP1A2 相关。

目的

在中国人群中验证 CYP2C19，ABCB1，PON1 的基因多态性与氯吡格雷的抗血小板效果之间是否相关，以及吸烟对氯吡格雷效果的影响。

方法

在北京市石景山医院心内科住院部收取经皮冠脉支架术后以及急性冠脉综合症常规服用氯吡格雷的患者的临床病历资料以及血栓弹力描记仪（TEG）检测的 ADP 诱导的血小板抑制率，按照入选标准入选患者 730 人并采集外周静脉血约 5ml 分离白细胞并进行 DNA 提取，采用实时定量 PCR 技术(TaqMan-PCR)对 CYP2C19*2，*3，*17，ABCB1，PON1，CYP1A2 进行基因分型。

结果

CYP2C19 几种基因型中，弱代谢型（poor mediate type）与 ADP 抑制率紧密相关

($P=0.007$, $OR=1.92$, $95\%CI [1.20, 3.08]$); ABCB1, PON1, CYP1A2 在三种模型下与 ADP 抑制率都不相关; 吸烟在 ADP 诱导的氯吡格雷抑制率中起保护作用 ($P<0.0001$, $OR=0.65$, $95\%CI [0.55,0.77]$); 相对于不吸烟和戒烟者, 当前吸烟与氯吡格雷抑制率紧密相关 ($P=0.0018$, $OR=0.51$, $95\%CI [0.34,0.78]$), 吸烟时长也与 ADP 抑制率紧密相关 ($P<0.0001$, $OR=0.80$, $95\%CI [0.69, 0.93]$); 相比年轻组, 在年老组吸烟以及各相关变量与 ADP 抑制率的相关性更为明显。

基因频率

CYP2C19*2 三种基因型 GG、GA、AA 的频率分别为 46.2%、45.5%、9.7%; CYP2C19*3 三种基因型 GG、GA、AA 的频率分别为 88.1%、11.8%、0.1%; CYP2C19*17 三种基因型 GG、GA、AA 的频率分别为 96.4%、3.0%、0.1%; PON1 的三种基因型 GG、GA、AA 的频率分别为 40.7%、46.2%、13.2%; ABCB1 的三种基因型 CC、CT、TT 的频率分别为 38.9%、45.8%、15.2%; CYP1A2 的三种基因型 CC、CA、AA 的频率分别为 16.6%、50.5%、32.6%。

统计分析

利用卡方检验 (chi-square test) 计算各基因型分布是否符合哈温平衡, 各个 SNP 的基线数据也是利用卡方检验进行计算; 计算各个基因型与 ADP 之间的关系以及计算吸烟和相关变量对 ADP 的影响是利用非条件 logistic regression 进行分析。

结论

各个基因型分布符合哈温平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium); CYP2C19 基因中, 弱代谢型 (*2/*2, *2/*3, *3/*3) 与 ADP 抑制率显著相关 ($P=0.007$); ABCB1, PON1, CYP1A2 各个基因与 ADP 抑制率无相关性; 吸烟是 ADP 诱导的氯吡格雷对血小板的抑制中的保护因素, 而与吸烟相关的各因素如烟龄, 烟量等与 ADP 抑制率也有相关作用。

关键词

氯吡格雷; 抗血小板效果; 血栓弹力图; 基因多态性; 吸烟

ABSTRACT

Background

Dual antiplatelet therapy (DAPT) with aspirin and clopidogrel has been the gold standard therapy for patients undergoing percutaneous coronary interventions (PCI) and/or acute coronary syndrome (ACS). Clopidogrel, an irreversible inhibitor of the ADP P2Y₁₂ receptor, plays a pivotal role in platelet inhibition. Among the factors affecting the antiplatelet effect of clopidogrel, it is central that clopidogrel has to be converted into an active metabolite via the hepatic cytochrome P450 enzyme system before it irreversibly binds to P2Y₁₂ adenosine diphosphate receptors. It was reported that there was a significant association between antiplatelet effect of clopidogrel and genetic polymorphism of CYP2C19 affects cytochrome P450 enzymes activation. Loss-of-function variants in the cytochrome 2C19 (mainly *2 allele) have been found to be the predominant genetic mediators of clopidogrel response. Several studies have reported that ABCB1 and PON1 may affect clopidogrel response.

Observational studies have shown that cigarette smoking could enhance response to clopidogrel and decrease clopidogrel on-treatment platelet reactivity (OPR). It remains unclear that how cigarette smoking interacts clopidogrel efficacy but may be mediated by CYP1A2.

Objective

This study was aimed to find the association between polymorphisms of CYP2C19, ABCB1, PON1 and cigarette smoking and antiplatelet effect of clopidogrel in Chinese population.

Methods

Patients were collected from Beijing Shijingshan Hospital who underwent percutaneous coronary interventions (PCI) and/or after acute coronary syndrome (ACS). Meanwhile, we collected patients' medical records and ADP inhibition tested by thrombelastogram (TEG). A total of 730 Chinese patients were recruited. DNA was extracted from white blood cells, and CYP2C19*2, *3, *17, ABCB1, PON1, CYP1A2 genotypes were detected by TaqMan-PCR

technology.

Results

Among SNPs of CYP2C19, poor mediate type was associated with clopidogrel antiplatelet effect induced by ADP significantly ($P=0.007$, $OR=1.92$, $95\%CI [1.20, 3.08]$); In these models (additive model, dominant model, recessive model), ABCB1, PON1 and CYP1A2 were not associated with ADP inhibition; Cigarette smoking was associated with ADP inhibition significantly ($P<0.0001$, $OR=0.65$, $95\%CI [0.55, 0.77]$); Comparing with never smoking and ever smoking, current smoking was associated with ADP inhibition ($P=0.0018$, $OR=0.51$, $95\%CI [0.34, 0.78]$); There were much more significance among several variables referring to smoking in old group than in young group.

Genotypes and allele frequencies

The frequencies of the CYP2C19*2 GG, GA and AA genotypes were 46.2%, 45.5% and 9.7% respectively. The frequencies of CYP2C19*3 GG, GA and AA genotypes were 88.1%, 11.8% and 0.1% respectively. The frequencies of CYP2C19*17 GG, GA and AA genotypes were 96.4%, 3.0% and 0.1% respectively. The frequencies of PON1 GG, GA and AA genotypes were 40.7%, 46.2%, and 13.2% respectively. The allele frequencies of ABCB1 CC, CT, TT genotypes were 38.9%, 45.8% and 15.2% respectively. The frequencies of CYP1A2 CC, CA, AA genotypes were 16.6%, 50.5%, 32.6% respectively.

Statistics analysis

We used Chi-square test to assess Hardy–Weinberg equilibrium of the SNPs' genotype distribution. Categorical variables were expressed as frequencies and percentages and were compared with a chi-square test or Fisher exact test. We used non-conditional logistic regression to assess the association between the genotypes, cigarette smoking and other variables referring to smoking and clopidogrel biotransformation induced by ADP according to TEG.

Conclusions

The distributions of genotypes of CYP2C19, ABCB1, PON1 and CYP1A2 were in Hardy–Weinberg equilibrium. In CYP2C19, poor mediate types (*2/*2, *2/*3, *3/*3) were significantly associated with antiplatelet effect of clopidogrel induced by ADP ($P=0.007$). Other

SNPs such as ABCB1, PON1 and CYP1A2 were not associated with antiplatelet effect of clopidogrel induced by ADP. Meanwhile, cigarette smoking enhanced antiplatelet effect of clopidogrel, and variants about smoking such as smoking time, numbers of cigarettes consumed per day also affected clopidogrel effect measured by TEG.

Key Words

Clopidogrel; -Antiplatelet; -TEG; Genetic polymorphisms; Cigarette smoking

英文缩写

英文缩写	英文全称	中文全称
PCI	Percutaneous coronary intervention	经皮冠状动脉介入术
ACS	Acute coronary syndrome	急性冠脉综合症
ADP	Adenosine diphosphate	二磷酸腺苷
P2Y12	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12	嘌呤受体 P2Y, G 蛋白偶联, 12
SNP	Single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
CYP2C19	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	细胞色素 P450, 家族 2, 亚家族 C, 多肽 19
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	ATP 结合盒, 亚家族 B(MDR/ TAP), 成员 1
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PON1	Paraoxonase 1	对氧磷酶 1
OPR	On-treatment platelet reactivity	治疗中血小板反应性
TEG	Thrombelastogram	血栓弹力描记仪
DAPT	Dual antiplatelet therapy	双联抗血小板疗法
OR	Odds ratio	危险比
CI	Confidence interval	可信区间

目 录

中文摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
英文缩写.....	VI
目 录.....	VII
第一章 前言.....	1
第二章 材料与amp;方法.....	4
2.1 研究对象.....	4
2.2 研究项目和指标.....	4
2.3 伦理学.....	10
第三章 结果.....	12
3.1 入选对象的基线特征.....	12
3.2 各基因与ADP的关系.....	14
3.3 吸烟变量和ADP抑制率危险比.....	15
第四章 讨论.....	22
4.1 各基因型及等位基因频率分布.....	22
4.2 各基因与氯吡格雷药物效果之间的联系.....	22
4.3 吸烟与氯吡格雷药物效果之间的关系.....	24
第五章 结论.....	27
5.1 各基因对氯吡格雷药物效果的影响.....	27
5.2 吸烟对氯吡格雷药物效果的影响.....	27
第六章 局限性及展望.....	28
参考文献.....	29
综 述.....	32
附录：个人简历.....	42
致 谢.....	43

第一章 前言

氯吡格雷常规用于患有急性冠脉综合症（ACS）和/或经皮冠状动脉介入术（PCI）后以预防缺血性事件的复发。血小板对氯吡格雷药物反应受损被认为是再发缺血性事件的一个重要危险因素。而血小板对氯吡格雷的药物反应性是高度遗传的（73%）^{【1】}。氯吡格雷作为一种前体药物，经口服后进入人体在血液中 85%转化为非活性的氯吡格雷酸并被代谢掉，仅余下 15%在肝脏中通过细胞色素 P450 酶的催化转化为活性代谢物，然后选择性地、不可逆地与血小板上 P2Y₁₂ 受体结合从而抑制血小板的聚集。

在氯吡格雷转化为活性代谢物的过程中，细胞色素 P450 酶系起着非常重要的作用。细胞色素 P450 酶（CYP）是人类肝中一种重要的药物代谢酶系统，能代谢临床常用药物及一些重要的内源性物质及前致癌物，主要包括三个超家族：CYP1、CYP2、CYP3。CYP2C 亚家族是目前研究最广泛、最深入的 CYP 亚家族之一，主要由 CYP2C8、CYP2C9、CYP2C17、CYP2C18 和 CYP2C19 等组成。细胞色素 P450 在单加氧酶家族中属于高度多态性的酶系，基因多态性与酶的活性紧密相关，而其中 CYP2C19（主要是*2）在基因介导的氯吡格雷反应中占主导作用。影响氯吡格雷药物反应的 CYP2C19 基因很多，诸如 CYP2C19*2, CYP2C19*3, *4, *5, *6, *7, *8, *17 等等，而亚洲人群中*4-*8 等基因型突变非常少见，最常见的当属失功能基因(loss-of-function)CYP2C19*2(rs4244285)^{【2】}。在不同种族之间，CYP2C19 失功能基因的基因型和分布也不尽相同。在高加索人和非洲人中，CYP2C19 失功能基因的携带率分别为 35%-45%和 25%-35%；在西欧人中 CYP2C19*2 的接近 30%^{【3】}；在亚洲人中则高达 55%-70%，而且除了携带有 CYP2C19*2，还有 10%-20%的亚洲人携带有另外一种失功能基因 CYP2C19*3^{【4】}。另一种名为 gain-of-function 的基因 CYP2C19*17，携带这种突变的基因可增加 CYP450s 酶的活性。常把 CYP2C19 的常见几种突变综合分类：携带者若为*1/*1 为正常代谢型；携带者若为*1/*2 或*1/*3 则为中间代谢型；携带者若为*2/*2 或*2/*3 或*3/*3 则为弱代谢型；而携带有*1/*17 或*17/*17 可归为强代谢型，但此种携带者较少；既携带有弱代谢基因如*2 或*3 又携带有强代谢基因*17 为不明代谢型。Mega JL 和 Hulot JS 等人在两个较大的荟萃分析中^{【5, 6】}阐明含有一个 CYP2C19*2 等位基因突变可增加主要的不利心血管缺血事件（MACE）的风险（HR 值为 1.55）^{【5】}和支架血栓的风险（HR 值为 2.67）^{【6】}。这一发现直接导致美国 FDA 发布了关于氯吡格雷药物包装上的盒装警告^{【7】}，其内容包括：

通过检测药物基因型以明确患者氯吡格雷的代谢变化，患者不良反应的风险，基因多态性对氯吡格雷的代谢及临床影响。其目的是让医生能针对患者的个体因素作出治疗决策，在使用氯吡格雷前是否对患者进行 CYP2C19 基因型检测，让临床医生意识到需对患者个体化治疗。

CYP2C19 作为影响氯吡格雷代谢最重要的基因，除此之外，一些文献报道，ABCB1（也成为 MDR1，位于 7 号染色体上）在氯吡格雷药物转化中其编码的一种名为流出泵 P-糖蛋白的关键蛋白参与噻氯吡啶类（氯吡格雷）药物的吸收。P-糖蛋白是一种依赖 ADP 的外排泵可通过胞内膜和胞外膜转运各种分子物质的蛋白，它可在其他部分如肠上皮细胞上表达，表达的增加导致功能加强从而影响药物的生物利用度。以前的研究表明，当使用氯吡格雷药物时，个体若携带有 ABCB1 的基因突变（尤其是携带 3435C—T 的 TT 纯合子突变）时会降低药物的活性代谢物浓度^[9]且增加不利临床事件的发生率^[3]。

与上述的候选基因相比，Bouman 等人假设提出了一种新的基因 PON1，其突变可能也是影响氯吡格雷效果的决定因素^[9]。在氯吡格雷的第二步生物转化中 PON1 酯酶可能是限速酶。携带有 PON1 基因 192Q/Q 突变的个体和正常个体相比其血浆中活性代谢物浓度更低，对血小板聚集的抑制率也更低，PCI 术后不利的缺血事件发生率更高。但没有发现 PON1 各基因型之间的血小板反应性和临床事件发生率具有差异性，这与最近的一些研究结果相一致从而驳斥了 Bouman 等人的假设^[10, 11]。

药物相关基因的多态性对氯吡格雷的生物转化起着重要作用，此外，最近一些文献报道了吸烟在氯吡格雷的代谢和治疗中血小板的高反应性有潜在的作用。药代动力学研究和临床试验研究表明吸烟和氯吡格雷治疗效果之前存在一定的联系。吸烟介导氯吡格雷药物效果的具体机制尚不清楚但是可能是由 CYP1A2 所介导的。研究表明吸烟能增强 ACS 病人或/和 PCI 术后服用氯吡格雷病人的药物反应性^[12, 13]。CYP1A2 能影响酶的诱导性，在一些诱导剂（吸烟、奥美拉唑、咖啡因）的作用下能增加酶的活性^[14]。

而以上诸多基因多态性以及吸烟对氯吡格雷药物代谢的影响指标是检测 ACS 和/或 PCI 术后患者服用氯吡格雷后采集外周静脉血以血栓弹力描记仪来检测凝血指标，主要有血栓形成最大振幅（MA），以 ADP 诱导的氯吡格雷对血小板的抑制率和以花生四烯酸诱导的阿司匹林对血小板的抑制率，以此作为血小板反应性或氯吡格雷药物效果的指标。

血栓弹力图作为一种新型应用于心血管病中抗血小板治疗的临床床边检测工具，还没有普遍得到推行。而 FDA 发布的关于氯吡格雷的药物盒装警告中建议服用氯吡格雷的患者可进行临床血小板检测以了解患者对药物的反应度，一般应用于临床最多的当属

VerifyNow 这一检测手段，而 TEG 应用的不是很多。为了了解 TEG 能否很好的反映药物的抗血小板效果，以及相关基因型对药物代谢的影响，我们拟验证以上相关基因多态性和氯吡格雷药物抗血小板效果之间的联系并研究吸烟在氯吡格雷药物转化中的作用。

第二章 材料与方法

2.1.研究对象

2.1.1 入选标准

从北京市石景山医院心内科入选 730 名急性冠脉综合症（ACS）和/或经皮冠脉支架术（PCI）后服用氯吡格雷药物的病人。同时临床资料证实无其他预期会影响研究的疾病。

2.2.研究项目和指标

2.2.1 一般监测

病人在发病后一般急性期内入院后先口服 300mg 氯吡格雷的负载量（loading dose），3-4 小时后抽取外周静脉血 5ml 进行血栓弹力图检测凝血指标。并在服药后第 7 天和第 30 天根据患者自身意愿随机进行重复检测。记录的检测指标有血栓最大振幅（MA），由花生四烯酸诱导的阿司匹林对血小板的抑制率（AA%）和由 ADP 诱导的氯吡格雷对血小板的抑制率（ADP%）。口服负载量后 3-4 小时的检测值分别记为 MA0、AA0%、ADP0%；第 7 天检测值分别记为 MA7、AA7%、ADP7%；第 30 天的检测值分别记为 MA30、AA30%、ADP30%。

此外，另采集一份患者外周静脉血于 EDTK2 管中，并当天离心分离出血浆白细胞冻存于-80° C 超低温冰箱中用于后续 DNA 提取。还需收取病人的住院病历以及临床检查资料，临床需要采集的病人信息主要有年龄、性别、身高、体重、有无糖尿病、高血压、高血脂、吸烟、饮酒等一系列的临床指标以及用药情况（具体见下调查表）。

氯吡格雷研究临床资料记录表

基本信息:

病历号

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

标本 ID

--	--	--	--

姓名性别__ (1. 男 2. 女) 年龄__岁 民族__ (1. 汉 2. 其他)

电话____ 身高__CM 体重__KG BMI____

个人史:

伴发糖尿病__ (0. 否 1. I 型糖尿病 2. II 型糖尿病) 患病时间年____

伴发高血压__ (0. 否 1. 高血压 1 级 2. 高血压 2 级 3. 高血压 3 级) 患病时间年____

伴发高血脂__ (0. 否 1. 是) 患病时间年____

是否吸烟__ (0. 否 1. 曾经吸烟已戒 2. 当前吸烟) 烟龄__年 每日__支

是否饮酒__ (0. 否 1. 曾经饮酒已戒 2. 当前饮酒)

女性病人:

月经初潮__岁 绝经年龄__岁 育有子女__ (1. 1 个 2. 2 个 3. 2 个以上)

现病史:

ST 段抬高 MI (STEMI) __ (0. 否 1. 是) 非 ST 段抬高 MI (NSTEMI) __ (0. 否 1. 是) UA (0. 否 1. 是)

脑血管疾病__ (0. 否 1. 是) 心功能分级 (NYHA) __ (I. II. III. IV) Killip 分级__ (I. II. III. IV)

植入支架数目__ (0, 1, 2, 2 以上) 心律失常__ (0. 否 1. 是) 慢性胃炎__ (0. 否 1. 是)

消化道溃疡__ (0. 否 1. 是) 慢性支气管炎__ (0. 否 1. 是)

家族史:

高血压病史__ (0. 否 1. 是) CAD__ (0. 否 1. 是) 糖尿病__ (0. 否 1. 是) Stroke__ (0. 否 1. 是)

既往史:

既往支架术__ (0. 否 1. 是) 既往 CAD__ (0. 否 1. 是)

既往心梗__ (0. 否 1. 是) 既往卒中__ (0. 否 1. 是)

临床用药:

阿司匹林__ (0. 否 1. 是) 他汀类__ (0. 否 1. 是) 钙通道阻滞剂__ (0. 否 1. 是)

β 受体阻滞剂__ (0. 否 1. 是) 硝酸酯类__ (0. 否 1. 是) 低分子肝素__ (0. 否 1. 是)

血管紧张素受体阻滞剂__ (0. 否 1. 是) 降糖药__ (0. 否 1. 是) PPI__ (0. 否 1. 是)

实验室检查:

心肌酶三项: CK-MB__ng/ml MYO__ng/ml TNI__ng/ml

BNP __ pg/L

生化检查：空腹血糖__mmol/L 肌酐__umol/L 尿酸__umol/L

谷丙转氨酶__u/L 谷草转氨酶__u/L

总胆固醇__mmol/L HDL-C__mmol/L LDL-C__mmol/L

甘油三酯__mmol/L 糖化 HbA1C__%

血栓弹力图：

0 day MA₀__mm AA₀__% ADP₀__%

7day MA₇__mm AA₇__% ADP₇__%

30day MA₃₀__mm AA₃₀__% ADP₃₀__%

冠脉造影检查：

射血分数 (EF) __%

冠脉血管狭窄支数____ (0, 1, 2, 2 以上)

目前情况

死亡__ (0. 否 1. 是)

再梗__ (0. 否 1. 是)

MACE__ (0. 否 1. 是)

缓解程度____

2.2.2 观测指标

2.2.2.1 样本收集

1 病例：接受 PCI 术后和 ACS 患者服用氯吡格雷后血药达到稳态的患者都将进入研究，所有入选病例均为自愿参加本研究。在准确理解并签署知情同意后由专业人员抽血，并填写病例调查表。血样的采集、标记、运输全部由经过培训的专业人员负责。

2 对照：本实验无需对照

2.2.2.2 实验室步骤

在所有入选者充分了解试验内容目的，并签署知情同意后，每位参加者进行一次采血；在监测血栓弹力图时采血标本 2 管，一管作为血栓弹力图监测用，另一管分离血浆，白细胞，粘贴统一条形码，由实验室人员抽提 DNA。后续服药第 7 天和第 30 天按患者自己意愿进行检测。本实验经过北京高血压联盟研究所和北京市石景山医院伦理委员会的批准。

2.2.2.3 标签和编码

病例调查表和采血管贴统一标签，标签含下列信息：

- 标签名称：血栓弹力图
- 研究名称：TEG
- 病例号编码：AG0001-AG0730

2.2.2.4 中心标本操作

将血液标本在离心机中 3000rpm 离心 10 分钟，待血样分层，分离血浆和白细胞。上层血浆转移到洁净的 1.5ml 离心管内，每份血浆分装成两份；中间灰白色的白细胞层，转移到洁净的 1.5ml 离心管内。血浆和白细胞均保存在-80℃。血浆和白细胞的分离、分装、保存、标记、以及血浆、细胞保存管由北京高血压联盟研究所提供。

2.2.2.5 标本运输

标本分离好后直接储存于北京高血压联盟研究所内超低温冰箱，不存在运输问题。

2.2.2.6 实验材料

DNA 抽提所用的试剂盒为德国 Qiagen Blood Minikit 试剂盒（编号 51106），恒温水浴箱（Heto Holten, Denmark），台式冷冻离心机（Sigma 3-18K, USA），TaqMan probe 从 ABI 公司购买，实时荧光定量 PCR 仪（ABI Prism 7900HT），Goldstar TaqMan Mixture 和 RNase-Free Water 从北京三博远志生物技术有限责任公司购买，其它化学试剂如 TE、EDTA、无水乙醇等均为分析纯试剂。

2.2.2.6 DNA 的抽提

DNA 抽提由北京高血压联盟研究所实验室完成。样本分型之前必须提取 DNA，为了得到高质量的 DNA，推荐使用商业试剂盒。每次抽提 DNA 要详细记录时间、地点及操作者，抽提完毕要进行定量分析，以追踪样本质量。抽提 DNA 试剂盒：试剂盒采用的是 Blood DNA MiniKit 试剂盒，包括以下试剂和材料：Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, AE, 蛋白酶 K, 离心柱，收集管。

DNA 抽提方法(离心柱法)：

- (1) 取新的灭菌离心管，用移液枪加蛋白酶 K 20ul；

- (2) 加白细胞 200ul, 不足用 PBS 补足;
- (3) 加 Buffer AL 200ul, 震荡 30 秒, 56℃ 恒温水浴 10 分钟;
- (4) 水浴后快速离心, 8000 rpm 离心 30 秒;
- (5) 加无水乙醇 200ul, 震荡 30 秒, 8000 rpm 离心 30 秒;
- (6) 将管中的液体转到离心柱中, 不要超过 700 ul;
- (7) 10000 rpm 离心 2 分钟, 将离心柱转入新的收集管中;
- (8) 加 Buffer AW1 500ul, 10000rpm 离心 2 分钟;
- (9) 将离心柱转入新的收集管中, 加 Buffer AW2 500ul, 10000rpm 离心 5 分钟;
- (10) 将离心柱转入新的收集管中, 10000rpm 离心 3 分钟;
- (11) 将离心柱放入新的 Eppendorf 管, 加 AE 200ul;
- (12) 静置 5 分钟后 10000rpm 离心 2 分钟, 去离心柱, 将溶解的 DNA 4℃ 储存备用。

2.2.2.7 基因分型和分析

实验中所有的备选基因 CYP2C19*2 (rs4244285G>A)、CYP2C19*3 (rs4986893G>A)、CYP2C19*17 (12248560G>A)、ABCB1 (rs1045642C>T)、PON1 (rs662A>G) 以及 CYP1A2*1F (rs762551C>A) 都采用实时荧光定量 PCR 技术进行基因分型, 具体如下:

CYP2C19*2 (rs4244285G>A) 基因分型 (实时荧光定量 PCR):

PCR 反应体系 5 μ L, RNase-Free Water 0.4375ul, Goldstar TaqMan Mixture 2.5ul, TaqMan probe (Assay ID :AHKAZE3, rs4244285, 80x)0.0625ul, 5ng/ul DNA 标本 2ul。前后引物序列分别为:

Forward Primer Sequence: 5' TGTTTTCTCTTAGATATGCAATAATTTTCCCACTA 3'

Reverse Primer Sequence: 5' CCAAAATATCACTTTCCATAAAAAGCAAGGT 3'

PCR 反应条件: 95℃ 预变性 10 分钟, 95℃ 变性 15 秒; 60℃ 退火 1 分钟, 40 个循环。

CYP2C19*3 (rs4986893G>A) 基因分型 (实时荧光定量 PCR):

PCR 反应体系 5 μ L, RNase-Free Water 0.375ul, Goldstar TaqMan Mixture 2.5ul, TaqMan probe (Assay ID : AHMSVRJ, rs4986893, 40x)0.125ul, 5ng/ul DNA 标本 2ul。前后引物序列分别为:

Forward Primer Sequence: 5' AAATTGAATGAAAACATCAGGATTGTAAGCA 3'

Reverse Primer Sequence: 5' TGTAAGTGGTTTCTCAGGAAGCAAA 3'

PCR 反应条件: 95°C 预变性 10 分钟, 95°C 变性 15 秒; 60°C 退火 1 分钟, 40 个循环。

CYP2C19*17 (12248560G>A) 基因分型 (实时荧光定量 PCR):

PCR 反应体系 5 μ L, RNase-Free Water 0.375ul, Goldstar TaqMan Mixture 2.5ul, TaqMan probe (Assay ID : AHN1TXR, rs12248560, 40x)0.125ul, 5ng/ul DNA 标本 2ul。前后引物序列分别为:

Forward Primer Sequence: 5' GTTTGGAAGTTGTTTTGTTTTGCTAAAACA 3'

Reverse Primer Sequence: 5' CCATCGTGGCGCATTATCTCTT 3'

PCR 反应条件: 95°C 预变性 10 分钟, 95°C 变性 15 秒; 60°C 退火 1 分钟, 40 个循环。

ABCB1 (rs1045642C>T) 基因分型 (实时荧光定量 PCR):

PCR 反应体系 5 μ L, RNase-Free Water 0.4375ul, Goldstar TaqMan Mixture 2.5ul, TaqMan probe (Assay ID : AHI108V, rs1045642, 80x)0.0625ul, 5ng/ul DNA 标本 2ul。前后引物序列分别为:

Forward Primer Sequence: 5' GCCGGGTGGTGCACA 3'

Reverse Primer Sequence: 5' ATGTATGTTGGCCTCCTTGCT 3'

PCR 反应条件: 95°C 预变性 10 分钟, 95°C 变性 15 秒; 60°C 退火 1 分钟, 40 个循环。

PON1 (rs662A>G) 基因分型 (实时荧光定量 PCR):

PCR 反应体系 5 μ L, RNase-Free Water 0.375ul, Goldstar TaqMan Mixture 2.5ul, TaqMan probe (Assay ID : AHPAR3Z, rs662, 40x)0.125ul, 5ng/ul DNA 标本 2ul。前后引物序列分别为:

Forward Primer Sequence: 5' CTGAGCACTTTTATGGCACAAATGA 3'

Reverse Primer Sequence: 5' ACCACGCTAAACCCAAATACATCTC 3'

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 分钟, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 秒; 60 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 40 个循环。

CYP1A2*1F (rs762551C>A) 基因分型 (实时荧光定量 PCR):

PCR 反应体系 5 μ L, RNase-Free Water 0.375ul, Goldstar TaqMan Mixture 2.5ul, TaqMan probe (Assay ID : AHQJP97, rs762551, 40x)0.125ul, 5ng/ul DNA 标本 2ul。前后引物序列分别为:

Forward Primer Sequence: 5' GCTCTCAGATTCTGTGATGCTCAA 3'

Reverse Primer Sequence: 5' CAGAAAGACTAAGCTCCATCTACCAT 3'

PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 分钟, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 秒; 60 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 40 个循环。

2.2.3 统计学及数据处理

利用卡方检验 (chi-square test) 计算各基因型分布是否符合哈温平衡, 各个 SNP 的基线数据也是利用卡方检验进行计算; 计算各个基因型与 ADP 之间的关系以及计算吸烟和相关变量对 ADP 的影响是利用非条件 logistic regression 进行分析。P<0.05 被视为具有统计学意义, 统计软件使用 SAS9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)。

2.3 伦理学

2.3.1 独立的伦理委员会

为确保试验的完整性及参加者安全, 研究方案实施之前, 经由石景山医院伦理委员会 (IRB) 批准, 严格按照 IRB 报告要求, 并保存好所有 IRB 文件或记录。

2.3.2 患者知情同意书

研究人有责任向所有参加者提供详尽的口头及书面说明,解释参加本研究将会带来的益处和危害,给患者充足的时间考虑是否参加本研究。本研究对患者的治疗以及保健不采取任何干预措施。在患者出于完全的自愿签署知情同意书之后方能进行抽血和收集病历资料。

2.3.3 保密性

在标本进入实验室之前,所有患者个人信息将会被编码。患者信息保存在医院病案室。在 DNA 抽提、数据处理、统计分型中不会泄漏患者的任何基本个人信息,包括姓名、身份证、出生地。患者的基因型不会发放给本人、相关医生和任何利益相关与否的个人以及机构。

第三章 结果

3.1 入选对象的基线特征

3.1.1 研究对象的各基因分布

Distributions of SNPs' genotypes

Gene	SNP No.	Genotype			Minor allele	MAF [†]	H-W*P
CYP2C19*2	rs4244285(G>A)	GG(337)	GA(322)	AA(71)	A	0.325	0.7097
CYP2C19*3	rs4986893(G>A)	GG(643)	GA(86)	AA(1)	A	0.060	0.5584
CYP2C19*17	rs12248560(G>A)	GG(704)	GA(22)	AA(1)	A	0.017	0.1867
PON1	rs662(A>G)	AA(96)	AG(337)	GG(297)	A	0.362	0.9997
ABCB ₁	rs1045642(G>A)	GG(284)	GA(334)	AA(111)	A	0.381	0.7361
CYP1A2	rs762551(C>A)	CC(121)	CA(369)	AA(238)	C	0.419	0.5486

*H-W, Hardy-Weinberg equilibrium.

[†]MAF, minor allele frequency.

3.1.2 研究对象的基线数据

Baseline characteristics of SNPs' genotypes

Variables	Total (N=716)	Extensive	CYP2C19			GG	ABCB1			PON1			CYP1A2	
			Inter	Poor	Strong		GA	AA	AA	AG	GG	CC	CA	AA
Age (yrs)	286(39.9)	105 (36.7)	129(45.1)	49(17.1)	3(1.1)	117(41.1)	127(44.6)	41(14.4)	34(11.9)	141(49.3)	111(38.8)	55(19.3)	130(45.6)	100(35.1)
Male, n (%)	474(66.2)	182(38.4)	221(46.6)	61(12.9)	10(2.1)	188(39.7)	219(46.2)	67(14.1)	66(13.9)	211(44.5)	197(41.6)	72(15.13)	229(48.5)	171(36.2)
BMI, kg/m ²	426(59.5)	160(37.6)	200(47.0)	61(14.3)	5(1.2)	174(40.9)	198(46.6)	53(12.5)	51(12.0)	207(48.6)	168(39.4)	79(18.5)	208(48.8)	139(32.6)
DM	264(36.9)	98(37.1)	119(45.1)	41(15.5)	6(2.3)	97(36.7)	121(45.8)	46(47.4)	28(10.6)	127(48.1)	109(41.3)	42(16.0)	137(52.1)	84(31.9)
Hypertension	525(73.3)	190(36.2)	248(47.2)	77(14.7)	10(1.9)	194(37.0)	249(47.5)	81(15.5)	70(13.3)	233(44.4)	222(42.3)	95(18.1)	264(50.4)	165(31.5)
HCL	553(77.2)	210(38.0)	261(47.2)	73(13.2)	9(1.6)	213(38.6)	250(45.3)	89(16.1)	70(12.7)	257(46.5)	226(40.9)	98(17.8)	283(51.3)	171(31.0)
CurrentSmoking	302(42.2)	121(40.1)	138(45.7)	35(11.6)	8(2.7)	122(40.4)	134(44.4)	46(15.2)	44(14.6)	133(44.0)	125(41.4)	52(17.3)	142(47.2)	107(35.6)
CurrentAlcohol	210(29.3)	79(37.6)	99(47.1)	28(13.3)	4(1.9)	87(41.4)	91(43.3)	32(15.2)	26(12.4)	96(45.7)	88(41.9)	36(17.1)	111(52.9)	63(30.0)
CHD FH	164(22.9)	63(38.4)	74(45.1)	24(14.6)	3(1.8)	61(37.2)	81(49.4)	22(13.4)	24(14.6)	80(47.8)	60(36.6)	28(17.2)	74(45.4)	61(37.4)
Previous MI	100(14.0)	38(38.0)	41(41.0)	19(19.0)	2(2.0)	39(39.0)	46(46.0)	15(15.0)	15(15.0)	46(46.0)	39(39.0)	19(19.0)	46(46.0)	35(35.0)
Previous PCI	180(25.1)	67(37.2)	85(47.2)	25(13.9)	3(1.7)	70(38.9)	81(45.0)	29(16.1)	30(16.7)	79(43.9)	71(39.4)	31(17.2)	88(48.9)	61(33.9)
Statin	702(98.0)	262(37.3)	328(46.7)	100(14.3)	12(1.7)	271(38.7)	326(46.5)	104(14.8)	93(13.3)	322(45.9)	287(40.9)	118(16.7)	356(50.9)	226(32.3)
β-blocker	597(83.4)	224(37.5)	275(46.1)	87(14.6)	11(1.8)	231(38.8)	272(45.6)	93(15.6)	78(13.1)	275(46.1)	244(40.9)	102(17.1)	309(51.9)	184(30.9)
ACEI/ARB	487(68.0)	180(37.0)	227(46.6)	69(14.2)	11(2.3)	187(38.5)	224(46.1)	75(15.4)	72(14.8)	218(44.8)	197(40.5)	85(17.5)	248(51.0)	153(31.5)
CCB	380(53.1)	144(37.9)	170(44.7)	60(15.8)	6(1.6)	148(39.0)	176(46.3)	56(14.7)	46(12.1)	176(46.3)	158(41.6)	69(18.2)	188(49.6)	122(32.2)
PPI	103(16.7)	33(32.0)	53(51.5)	15(14.6)	2(1.9)	32(31.1)	51(49.5)	20(19.4)	11(10.7)	52(50.5)	40(38.8)	14(13.7)	54(52.9)	34(33.3)
Aspirin	710(99.2)	267(37.6)	331(46.6)	100(14.1)	12(1.7)	275(38.8)	327(46.1)	107(15.1)	93(13.1)	327(46.1)	290(40.9)	120(17.0)	357(50.4)	231(32.6)
LMWH	690(96.4)	256(37.1)	325(47.1)	97(14.1)	12(1.7)	264(38.3)	320(46.4)	105(15.2)	91(13.2)	317(45.9)	282(40.9)	116(16.9)	351(51.0)	221(32.1)

BMI, body mass index; DM, diabetes mellitus; HCL, hypercholesterolemia; CHD FH, cardiac heart disease family history; MI, myocardial infarction; PCI, percutaneous coronary intervention; ACEI, angiotensin antagonist inhibitor; CCB, calcium channel blocker; PPI, proton pump inhibitor; Normal, normal mediate type(*1/*1); Middle, middle mediate type(*1/*2, *1/*3); Poor, poor mediate type(*2/*2, *2/*3, *3/*3); Strong, strong mediate type(*1/*17, *17/*17); BMI<24 as cutoff; Age>65 as cutoff; Total (N=716): 14 undetermined genotypes were excluded; LMWH: low molecular weight heparin.

3.2 各基因与 ADP 的关系

3.2.1 ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标, ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组, ADP 抑制率≥75%作为效果较好一组。CYP2C19*2, *3, *17 综合分型为正常组(Extensive): *1/*1; 强代谢组 (Strong): *1/*17, *17/*17; 中间代谢组 (Intermediate): *1/*2, *1/*3; 弱代谢组 (Poor): *2/*2, *2/*3, *3/*3。

Association between CYP2C19 and ADP inhibition

CYP2C19	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Extensive	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference	Reference
Strong	0.86	0.27, 2.76	0.793	0.96	0.30, 3.15	0.951
Intermediate	1.11	0.81, 1.54	0.513	1.10	0.80, 1.53	0.560
Poor	2.02	1.26, 3.22	0.003	1.92	1.20, 3.08	0.007*

Adjusted for age and gender.

3.2.2 ABCB1, PON1 和 CYP1A2 在 additive, dominant 和 recessive 模型下与 ADP 的关系

仍以 ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标, ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组, ADP 抑制率≥75%作为效果较好一组。ABCB1 (G>A) 三种基因型分别为 GG, GA 和 AA; PON1 (A>G) 三种基因型分别为 AA, AG 和 GG; CYP1A2 (C>A) 三种基因型分别为 CC, CA 和 AA。

Model	SNPs	Unadjusted			Adjusted		
		OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Additive	ABCB1	1.19	0.96, 1.47	0.108	1.18	0.95, 1.46	0.129
	PON1	0.97	0.78, 1.21	0.798	0.97	0.78, 1.20	0.754
	CYP1A2	0.98	0.79, 1.21	0.837	1.02	0.82, 1.27	0.850
Dominant	ABCB1	1.14	0.84, 1.54	0.399	1.13	0.83, 1.54	0.428
	PON1	0.94	0.61, 1.45	0.776	0.90	0.58, 1.39	0.621
	CYP1A2	1.23	0.84, 1.87	0.289	1.29	0.87, 1.93	0.211
Recessive	ABCB1	1.51	1.00, 2.28	0.049	1.49	0.98, 2.26	0.063
	PON1	0.98	0.73, 1.32	0.874	0.99	0.73, 1.33	0.924
	CYP1A2	0.84	0.62, 1.15	0.286	0.89	0.65, 1.22	0.468

Adjusted for age and gender.

3.3 吸烟变量和 ADP 抑制率危险比

3.3.1 吸烟与 ADP

仍以 ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标，ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组，ADP 抑制率≥75%作为效果较好一组。

	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
smoking	0.65	0.55, 0.77	<0.0001	0.71	0.58, 0.88	0.0013

Adjusted for age and gender.

3.3.2 吸烟状态与 ADP

吸烟状态按不吸烟 (Never smoking), 曾经吸烟 (Ever smoking) 和当前吸烟 (Current smoking) 分为三组, 不吸烟组 (Never) 作为 reference, ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标, ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组, ADP 抑制率≥75%作为效果较好一组。

smoking	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Never	Reference	-	-	-	-	-
Ever	0.65	0.42, 0.99	0.043	0.77	0.47, 1.25	0.285
Current	0.42	0.30, 0.59	<0.0001	0.51	0.34, 0.78	0.0018

Adjusted for age and gender.

3.3.3 烟龄与 ADP

以 ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标, ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组, ADP 抑制率≥75%作为效果较好一组。

	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Smt	0.74	0.65, 0.84	<0.0001	0.80	0.69, 0.93	0.0036

Adjusted for age and gender.

3.3.4 烟龄分层与 ADP

以 ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标，ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组，ADP 抑制率>=75%作为效果较好一组。按吸烟时长（烟龄）将分为不吸烟组（Never）为 group0, 烟龄>0 且<25 年为 group1, 烟龄>=25 年且<36 年为 group2, 烟龄>=36 年为 group3。

	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Group0	Reference	-	-	-	-	-
Group1	0.56	0.37, 0.85	0.007	0.76	0.46,1.24	0.269
Group2	0.47	0.31, 0.71	0.0003	0.66	0.40,1.08	0.098
Group3	0.43	0.28, 0.65	<0.0001	0.49	0.31,0.80	0.004

Adjusted for age and gender.

3.3.5 日均吸烟量与 ADP

以 ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标，ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组，ADP 抑制率>=75%作为效果较好一组。每日吸烟支数为 0 支（不吸烟者）为 0 组作为 reference, 每日吸烟支数<=20 支为 1 组，每日吸烟支数>=21 且<=30 为 2 组，每日吸烟支数>=31 支为 3 组。

	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Smn	0.72	0.60, 0.86	0.0004	0.87	0.70, 1.07	0.181

Adjusted for age and gender.

日均吸烟量分层与 ADP

	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
0	Reference	-	-	-	-	-
1	0.50	0.36, 0.68	<0.0001	0.63	0.42, 0.95	0.027
2	0.46	0.23, 0.91	0.027	0.61	0.29, 1.30	0.202
3	0.50	0.28, 0.89	0.020	0.69	0.36, 1.32	0.262

Adjusted for age and gender.

3.3.6 按照性别分类吸烟对 ADP 影响的亚组分析

3.3.6.1 在男性患者中，吸烟与否对 ADP 的影响

	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Male	0.66	0.52, 0.84	0.0007	0.79	0.65, 0.92	0.0023

Adjusted for age.

3.3.6.2 在男性患者中，分析吸烟状态与 ADP 之间的关系，吸烟状态按不吸烟（Never smoking），曾经吸烟（Ever smoking）和当前吸烟（Current smoking）分为三组，不吸烟组（Never）作为 reference，ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标，ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组，ADP 抑制率≥75%作为效果较好一组。

Male smoking	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Never	Reference	-	-	-	-	-
Ever	0.84	0.47, 1.50	0.560	0.85	0.47, 1.52	0.578
Current	0.47	0.29, 0.76	0.002	0.47	0.28, 0.79	0.004

Adjusted for age.

3.3.6.3 在男性患者中，分析吸烟时长（烟龄）和 ADP 抑制率之间的关系

	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Male smt	0.78	0.66, 0.93	0.005	0.78	0.66, 0.93	0.005

Adjusted for age.

3.3.6.4 在男性患者中，分析吸烟时长（烟龄）分层与 ADP 之间的关系，以 ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标，ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组，ADP 抑制率>=75%作为效果较好一组。按吸烟时长（烟龄）将分为不吸烟组（Never）为 group0，烟龄>0 且<25 年为 group1，烟龄>=25 年且<36 年为 group2，烟龄>=36 年为 group3。

Male smoker	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Group0	Reference	-	-	-	-	-
Group1	0.65	0.37, 1.14	0.131	0.74	0.41, 1.34	0.317
Group2	0.57	0.33, 0.98	0.042	0.66	0.37, 1.18	0.156
Group3	0.45	0.26, 0.78	0.005	0.45	0.26, 0.79	0.006

Adjusted for age.

3.3.6.5 在男性患者中，分析日均吸烟量和 ADP 抑制率的关系

Male Smn	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
	0.84	0.67, 1.05	0.129	0.86	0.69, 1.09	0.228

Adjusted for age.

3.3.6.6 在男性患者中，分析吸烟量分层与 ADP 的关系，以 ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标，ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组，ADP 抑制率>=75%作为效果较好一

组。每日吸烟支数为 0 支（不吸烟者）为 0 组作为 reference，每日吸烟支数≤20 支为 1 组，每日吸烟支数≥21 且≤30 为 2 组，每日吸烟支数≥31 支为 3 组。

Male smn	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
0	Reference	-	-	-	-	-
1	0.55	0.34, 0.89	0.015	0.57	0.35, 0.94	0.028
2	0.49	0.22, 1.09	0.081	0.52	0.23, 1.17	0.114
3	0.59	0.29, 1.18	0.136	0.63	0.31, 1.31	0.216

Adjusted for age.

3.3.6.7 在女性患者中，吸烟对 ADP 抑制率的影响

Female	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
	0.80	0.54, 1.18	0.261	0.80	0.53, 1.20	0.279

Adjusted for age.

3.3.6.8 在女性患者中，分析吸烟状态与 ADP 之间的关系，吸烟状态按不吸烟（Never smoking），曾经吸烟（Ever smoking）和当前吸烟（Current smoking）分为三组，不吸烟组（Never）作为 reference，ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标，ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组，ADP 抑制率≥75%作为效果较好一组。

Female smoking	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Never	Reference	-	-	-	-	-
Ever	0.87	0.27, 2.85	0.823	0.84	0.25, 2.80	0.773
Current	0.62	0.28, 1.42	0.259	0.64	0.28, 1.46	0.286

Adjusted for age.

3.3.6.9 在女性患者中，分析吸烟时长（烟龄）和 ADP 抑制率之间的关系

Femalesmt	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
	0.89	0.64, 1.22	0.454	0.86	0.62, 1.19	0.355

Adjusted for age.

3.3.7.0 在女性患者中，分析吸烟时长（烟龄）分层与 ADP 之间的关系，以 ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标，ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组，ADP 抑制率>=75%作为效果较好一组。按吸烟时长（烟龄）将分为不吸烟组（Never）为 group0，烟龄>0 且<25 年为 group1，烟龄>=25 年且<36 年为 group2，烟龄>=36 年为 group3。

female smoker	OR	Unadjusted		OR	Adjusted	
		95%CI	P		95%CI	P
Group0	Reference	-	-	-	-	-
Group1	0.80	0.29,2.24	0.674	0.95	0.33,2.76	0.930
Group2	0.21	0.04,1.06	0.058	0.19	0.04,0.98	0.047
Group3	1.12	0.36,3.47	0.840	0.97	0.31,3.05	0.956

Adjusted for age.

3.3.7.1 在女性患者中，分析日均吸烟量和 ADP 抑制率的关系

female smn	OR	Unadjusted		OR	Adjusted	
		95%CI	P		95%CI	P
	0.75	0.44, 1.26	0.275	0.74	0.43, 1.27	0.275

Adjusted for age.

3.3.7.2 在女性患者中，分析吸烟量分层与 ADP 的关系，以 ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标，ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组，ADP 抑制率>=75%作为效果较好一组。每日吸烟支数为 0 支（不吸烟者）为 0 组作为 reference，每日吸烟支数<=20 支为 1 组，每日吸烟支数>=21 且<=30 为 2 组，每日吸烟支数>=31 支为 3 组。

female smn	Unadjusted			Adjusted		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
0	Reference	-	-	-	-	-
1	0.70	0.34, 1.46	0.342	0.71	0.34, 1.49	0.358
2	-	-, -	0.991	-	-, -	0.991
3	0.31	0.03, 3.50	0.345	0.31	0.03, 3.63	0.351

Adjusted for age.

3.3.7.3 按照年龄分类, 年轻组 (Young Group) (男性<55岁, 女性<65岁), 年老组 (Old Group) (男性>=55岁, 女性>=65岁); ADP 作为反应氯吡格雷药物抗血小板效果的指标, ADP 抑制率<75%作为效果稍差一组, ADP 抑制率>=75%作为效果较好一组; 吸烟状态按不吸烟 (Never smoking), 曾经吸烟 (Ever smoking) 和当前吸烟 (Current smoking) 分为三组, 不吸烟组 (Never) 作为 reference; 吸烟时长 (烟龄) 将分为不吸烟组 (Never) 为 group0, 烟龄>0 且<25年为 group1, 烟龄>=25年且<36年为 group2, 烟龄>=36年为 group3; 每日吸烟支数为 0 支 (不吸烟者) 为 0 组作为 reference, 每日吸烟支数<=20 支为 1 组, 每日吸烟支数>=21 且<=30 为 2 组, 每日吸烟支数>=31 支为 3 组。

Group	Young Group			Old Group		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
Smoking	0.74	0.57, 0.96	0.023	0.60	0.48, 0.74	<0.0001
Never	Reference	-	-	-	-	-
Ever	0.65	0.26, 1.64	0.365	0.73	0.43, 1.22	0.224
Current	0.54	0.32, 0.92	0.023	0.35	0.23, 0.54	<0.0001
Smt	0.66	0.51, 0.87	0.003	0.76	0.65, 0.88	0.0003
Group0	Reference	-	-	-	-	-
Group1	0.76	0.40, 1.42	0.389	0.49	0.28, 0.87	0.014
Group2	0.54	0.29, 0.99	0.046	0.44	0.26, 0.76	0.003
Group3	0.13	0.03, 0.61	0.010	0.44	0.28, 0.71	0.001
smn	0.80	0.61, 1.04	0.100	0.67	0.52, 0.85	0.001
0	Reference	-	-	-	-	-
1	0.54	0.31, 0.93	0.027	0.47	0.31, 0.70	0.0002
2	0.78	0.26, 2.39	0.668	0.32	0.13, 0.80	0.015
3	0.54	0.23, 1.27	0.157	0.48	0.21, 1.10	0.082

第四章 讨论

4.1 各基因型及等位基因频率分布

根据以前的相关文献报道,我们选取了可能与氯吡格雷代谢差异性相关的6个单核苷酸基因多态性位点(SNPs):CYP2C19*2(rs4244285),CYP2C19*3(rs4986893),CYP2C19*17(rs12248560),ABCB1(rs1045642)和PON1(rs662)。而根据Nihar等人的报道,吸烟与氯吡格雷的药物反应之间存在着联系,其中相关的候选基因是CYP1A2(rs762551)^[15]。

CYP2C19*2三种基因型GG、GA、AA的频率分别为46.2%、45.5%、9.7%;CYP2C19*3三种基因型GG、GA、AA的频率分别为88.1%、11.8%、0.1%;CYP2C19*17三种基因型GG、GA、AA的频率分别为96.4%、3.0%、0.1%;PON1的三种基因型GG、GA、AA的频率分别为40.7%、46.2%、13.2%;ABCB1的三种基因型CC、CT、TT的频率分别为38.9%、45.8%、15.2%;CYP1A2的三种基因型CC、CA、AA的频率分别为16.6%、50.5%、32.6%。根据文献中的报道得知,失功能基因(LOF)的携带率在高加索人中约为35%–45%,在黑人中约为25%–35%,在亚洲人中约为55%–70%^[4]。在此研究中我们只纳入了CYP2C19*2和CYP2C19*3两个失功能基因,在此人群样本中失功能基因的携带率达60.9%,CYP2C19*3基因型的携带率为11.9%,与文献中报道的结果相符。

在本研究选取的六个SNPs中,计算的各个SNP的哈-温平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)的P值均大于0.05,符合哈-温平衡。

4.2 各基因与氯吡格雷药物效果之间的联系

我们将CYP2C19*2,*3,*17三种基因型综合在一起,基因型为*1/*1为正常代谢型(extensive),基因型为*1/*2或*1/*3为中间代谢型(Intermediate),基因型为*2/*2,*2/*3或*3/*3为弱代谢型(Poor),基因型为*1/*17或*17/*17为强代谢型(Strong),其他既携带有失功能基因(LOF)又携带有GOF基因的携带者为不明代谢型共11个被剔除。将正常代谢型作为reference组,统计分析经过校正年龄(age)和性别(gender)后,发现在此人群中,强代谢组(Strong)和中间代谢组(Intermediate)与氯吡格雷对血小

板的抑制率之间没有相关性,校正后强代谢组 ($P=0.951$, $OR=0.96[0.30, 3.15]$), 中间代谢组 ($P=0.560$, $OR=1.10[0.80, 1.53]$), 而弱代谢组 (Poor) 对氯吡格雷对血小板的抑制率来说是一个危险因素 ($P=0.007$, $OR=1.92[1.20, 3.08]$)。Price MJ 等人的 GRAVITAS 研究显示携带有 1 个或 2 个 CYP2C19*2 型失功能基因在使用剂量更高的氯吡格雷 (150mg/d) 时药物效果并没有提高^[16], 表明 CYP2C19*2 型携带者使用氯吡格雷时发生了抵抗。而在另一个研究中 Bouman 等人并没有发现 CYP2C19*2 型基因突变和服用氯吡格雷发生支架后血栓之间有任何联系^[17]。

在氯吡格雷的药物转化过程中, CYP2C19 酶参与了氯吡格雷两步氧化过程最终转化为活性代谢物, 可知 CYP2C19 一直贯穿于药物转化过程的始终。它在两步氧化过程中分别起到的作用为 45% 和 21%^[18]。而在我们的研究中只有携带 2 个失功能基因的患者在服用氯吡格雷时药物反应会出现下降, 携带有 1 个失功能基因对氯吡格雷的抑制率没有显著的影响。

其他几个报道中的候选基因 ABCB1, PON1, CYP1A2 经三种遗传模型下统计分析, 与氯吡格雷对血小板的抑制率都没有直接的联系。在这些基因中, ABCB1 基因编码 P-糖蛋白外排转运体, 氯吡格雷是 P-糖蛋白的基质, 抑制 P-糖蛋白会影响氯吡格雷的生物利用度^[19]。ABCB1 基因的 3435C>T 的突变是众多药物遗传学研究中最受关注的基因之一, 和几种药物的性质改变有着密切的关系^[20]。Taubert D^[19] 等人表示, 3435 TT 基因型携带者的 P-糖蛋白表达量较高, 而可能由 P-糖蛋白介导的肠道外排量会增加。另一个不同于 ABCB1 的基因突变 Q192R 其基因编码对氧磷酶-1 (PON1), 据最近的一些研究报道与氯吡格雷的生物转化, 氯吡格雷治疗的药物反应以及氯吡格雷治疗的患者的临床结果有联系^[9]。但是这些结果因其在一些后续的研究中不能被验证仍然在讨论中^[21-22]。Bouman 等人认为 PON1 酯酶在影响氯吡格雷的第二步生物转化中诸多因素中起到了一定比例的作用^[17]。和 PON1 其他基因型携带者相比, 192Q/Q 的携带者血浆中活性代谢物的浓度较低, 血小板的抑制率较低, 而 PCI 术后不利的缺血性事件的风险则更高。这一结果与很多最近的一些相关的研究的结论相一致^[21-22]。尽管一些与其不一致的结果需要进行验证, 但是现有的数据已经可以供我们对 PON1 在调控氯吡格雷的生物转化中是否起重要作用进行验证。Bouman 等人将 192Q/Q 和 Q/R 基因型归为危险基因型, 但是将近 90% 的患者 (在其研究中 88%, 在我们研究中为 88.1%) 属于危险基因型。如果 90% 的患者在 PCI 术后服用氯吡格雷有缺血事件的风险的话, 氯吡格雷可能就不是一种治疗血栓性疾病的有效药物。而且 PON1 通过抑制低密度脂蛋白 (LDL) 的氧化在动脉粥样硬化中起非常重要的作用, 观察到的基因型之间临床差别可能跟机制相关而与氯吡格雷完全不相关^[23]。据之前的研究报道在吸烟人群中

CYP1A2 的突变会导致 CYP1A2 代谢活性增加, Sachse 等人认为在非吸烟人群中 CYP1A2 代谢活性和基因型之间没有联系, 而在携带 AA 突变纯合子的吸烟者和其他基因型的吸烟者相比 CYP1A2 的代谢活性要高 1.5 倍^{【24】}。CYP1A2 占肝脏细胞色素 P450 酶系的 10%, 其先由芳香烃受体调控并通过芳香烃受体介导转录然后进行配体结合和核易位^{【25】}。CYP1A2 也可能不是唯一受烟草影响的肝药酶, CYP2C19 在研究日本工厂工人中幽门螺杆菌根除治疗报道与也会受吸烟的影响, 这些工人中吸烟占有很大的比例, 吸烟是使用 PPI (质子泵抑制剂) 治疗失效的独立危险因素, 而吸烟对 CYP2C19 酶活性也有影响^{【26】}。除了上述遗传因素外, 可能也有其他的因素影响患者使用氯吡格雷的效果。这些因素包括患者的依从性, 伴随的疾病状态, 用药情况, 生活方式, 年龄和其他更多的因素^{【27】}。患者的依从性应强调无论是刚刚开始服药还是已经服药多年都具有重要性。患者在服用氯吡格雷同时服用其他药物所导致的药物之间的相互干预也是影响氯吡格雷药效的一个重要方面, 现在已经知道的有质子泵抑制剂可能对氯吡格雷药效有干预作用, 一些附加药物也可能干预氯吡格雷药物的效果, 如圣约翰草、他汀类和钙通道阻滞剂^{【18, 27】}。

4.3 吸烟与氯吡格雷药物效果之间的关系

我们在此研究中探讨了吸烟对氯吡格雷药物效果的影响, 在此发现吸烟可促进氯吡格雷药物的抗血小板效果 0.71, 0.58-0.88, $P=0.0013$; 探讨吸烟状态和氯吡格雷药物效果之间的联系非吸烟组作为对照组, 曾经吸烟已戒烟组 0.77, 0.47-1.25, $P=0.285$, 当前吸烟组 0.51, 0.34-0.78, $P=0.0018$; 烟龄与氯吡格雷药物效果之间的关系 0.80, 0.69-0.93, $P=0.0036$, 将烟龄分层分析非吸烟组作为对照组, 烟龄 <25 yr组 0.76, 0.46-1.24, $P=0.269$, 烟龄 ≥ 25 yr <36 yr组 0.66, 0.40-1.09, $P=0.098$, 烟龄 ≥ 36 yr组 0.50, 0.31-0.80, $P=0.004$; 日均吸烟量与氯吡格雷药物效果之间的关系 0.87, 0.70-1.07, $P=0.181$, 日均吸烟量分层将非吸烟组(0支/d)作为对照组, 每日吸烟支数 ≤ 20 支为1组 0.63, 0.42-0.95, $P=0.027$, 每日吸烟支数 ≥ 21 且 ≤ 30 为2组 0.61, 0.29-1.30, $P=0.202$, 每日吸烟支数 ≥ 31 支为3组 0.69, 0.36-1.32, $P=0.262$; 按照性别分组研究吸烟与氯吡格雷效果的亚组分析, 在男性患者中吸烟对氯吡格雷药物的影响 0.66, 0.52-0.84, $P=0.0007$; 吸烟状态分层非吸烟组作为对照组, 曾经吸烟已戒烟组 0.85, 0.47-1.52, $P=0.577$, 当前吸烟组 0.47, 0.28-0.79, $P=0.004$; 男性患者中烟龄与氯吡格雷效果的关系 0.78, 0.66-0.93, $P=0.005$; 男性患者中烟龄按照分层三组的 OR 值, 95%CI 和 P 值分别为 0.74, 0.41-1.34, $P=0.317$; 0.66, 0.37-1.17, $P=0.156$; 0.45, 0.26-0.79, $P=0.006$; 男性患者日均吸烟支数与氯吡

格雷药物效果之间关系 0.87, 0.69-1.09, $P=0.228$; 男性患者日均吸烟支数分层三组的 OR 值, 95%CI 和 P 值分别为 0.57, 0.35-0.94, $P=0.028$; 0.52, 0.23-1.17, $P=0.114$; 0.63, 0.31-1.31, $P=0.216$; 在女性患者中吸烟对氯吡格雷药物的影响 0.80, 0.53-1.20, $P=0.279$; 吸烟状态分层非吸烟组作为对照组, 曾经吸烟已戒烟组 0.84, 0.25-2.80, $P=0.773$, 当前吸烟组 0.64, 0.28-1.46, $P=0.286$; 女性患者中烟龄与氯吡格雷效果的关系 0.86, 0.62-1.19, $P=0.355$; 女性患者中烟龄按照分层三组的 OR 值, 95%CI 和 P 值分别为 0.95, 0.33-2.76, $P=0.930$; 0.19, 0.04-0.98, $P=0.047$; 0.97, 0.31-3.05, $P=0.956$; 女性患者日均吸烟支数与氯吡格雷药物效果之间关系 0.74, 0.43-1.27, $P=0.275$; 女性患者日均吸烟支数分层三组的 OR 值, 95%CI 和 P 值分别为 0.71, 0.34-1.49, $P=0.358$; -, -, $P=0.991$; 0.31, 0.03-3.63, $P=0.351$; 按照年龄分组研究吸烟与氯吡格雷药物效果之间的关系将分为年轻组 (男 <55 yrs, 女 <65 yrs) 和年老组 (男 ≥ 55 yrs, 女 ≥ 65 yrs), 年轻组中吸烟与药物效果的关系 0.74, 0.57-0.96, $P=0.023$; 年轻组中吸烟状态分层非吸烟组作为对照组, 曾经吸烟已戒烟组 0.65, 0.26-1.64, $P=0.365$, 当前吸烟组 0.54, 0.32-0.92, $P=0.023$; 年轻组中烟龄与氯吡格雷效果的关系 0.66, 0.51-0.87, $P=0.003$; 年轻组中烟龄按照分层三组的 OR 值, 95%CI 和 P 值分别为 0.76, 0.40-1.42, $P=0.389$; 0.54, 0.29-0.99, $P=0.046$; 0.13, 0.03-0.61, $P=0.010$; 年轻组日均吸烟支数与氯吡格雷药物效果之间关系 0.80, 0.61-1.04, $P=0.100$; 年轻组日均吸烟支数分层三组的 OR 值, 95%CI 和 P 值分别为 0.54, 0.31-0.93, $P=0.027$; 0.78, 0.26-2.39, $P=0.668$; 0.54, 0.23-1.27, $P=0.157$; 年老组中吸烟与药物效果的关系 0.60, 0.48-0.74, $P<0.0001$; 年老组中吸烟状态分层非吸烟组作为对照组, 曾经吸烟已戒烟组 0.73, 0.43-1.22, $P=0.224$, 当前吸烟组 0.36, 0.23-0.54, $P<0.0001$; 年老组中烟龄与氯吡格雷效果的关系 0.76, 0.65-0.88, $P=0.0003$; 年老组中烟龄按照分层三组的 OR 值, 95%CI 和 P 值分别为 0.49, 0.28-0.87, $P=0.014$; 0.44, 0.26-0.76, $P=0.003$; 0.44, 0.28-0.71, $P=0.0006$; 年老组日均吸烟支数与氯吡格雷药物效果之间关系 0.67, 0.52-0.85, $P=0.001$; 年老组日均吸烟支数分层三组的 OR 值, 95%CI 和 P 值分别为 0.47, 0.31-0.70, $P=0.0002$; 0.32, 0.13-0.80, $P=0.015$; 0.48, 0.21-1.10, $P=0.082$ 。

依据以上的统计分析我们可以了解到吸烟在氯吡格雷药物转化过程中起到的促进作用, 跟非吸烟者相比吸烟者服用氯吡格雷药物后对血小板的抑制率较好, 这跟以前的研究结论基本一致。众所周知一般香烟烟雾特别是其中的多环芳香族烃可以诱导 CYP1A2^[28]。Vistisen 等人研究表明和非吸烟者相比, 每日吸烟量在 10 支或以上者其 CYP1A2 酶的活性可增加 66%^[29]。另外其他的几个研究中指出除了烟草外奥美拉唑 (PPI) 和咖啡因的摄入

也会增加酶的活性^{【30-32】}。许多研究报道 CYP1A2*1F (-163C>A) 基因多态性不会直接影响 CYP1A2 酶的活性^{【24, 33, 34】}，但是在一些诱导剂如吸烟和咖啡的作用下可影响 CYP1A2 酶的活性。许多非遗传因素可影响噻吩必定类药物的代谢已经被人们所知，如年龄，性别，吸烟，肥胖，饮食，过量饮酒，疾病和药物的干预^{【35】}。在我们的研究中我们可知吸烟，性别，年龄这些因素和氯吡格雷药物代谢相关，这些结论基本和之前的文献报道结果相一致，而吸烟相关的一些变量如烟龄，吸烟量，吸烟状态等对氯吡格雷药物代谢都有影响，这个目前还没有发现相关类似的报道。而本研究为观察性研究，所以本研究结果的可靠性仍然需要前瞻性的队列研究以及干预性的研究来予以证实。

第五章 结论

5.1 各基因对氯吡格雷药物效果的影响

对于 CYP2C19 基因, 我们的研究中发现只有携带 2 个失功能基因的患者在服用氯吡格雷时药物反应会出现下降, 携带有 1 个失功能基因却与氯吡格雷的抑制率没有直接的联系。

对于 ABCB1, PON1 和 CYP1A2 这些基因, 我们的研究中发现三种模型下统计分析, 与氯吡格雷对血小板的抑制率都没有直接的联系。

5.2 吸烟对氯吡格雷药物效果的影响

对于吸烟这一因素, 我们的研究发现吸烟在氯吡格雷药物转化过程中起到的促进作用, 跟非吸烟者相比吸烟者服用氯吡格雷药物后对血小板的抑制率较好。

对于吸烟相关的一些变量, 我们的研究中发现如吸烟状态, 烟龄, 日均吸烟量, 性别, 年龄这些变量对氯吡格雷药物代谢都有影响, 但仍然需要前瞻性的队列研究以及干预性的研究来予以证实。

第六章 局限性及展望

针对该研究论文结论的解释，需谨慎考虑其潜在的局限性：

1. 回顾性研究对暴露变量的定义存在一定程度的缺陷，譬如因为时间过长而对某些问题记忆混淆；
2. 在患者的病历资料收集中，记录反应氯吡格雷对血小板的抑制率是血栓弹力图检测的ADP的抑制率数据，由于技术性的原因限制，不能直接检测服药后血浆中药物活性成分，而血浆中药物活性代谢物更能直接反映氯吡格雷在体内的生物转化；
3. 在验证吸烟有关变量的亚组分析中，如分析不同性别下各吸烟变量对ADP抑制率的影响，有些分类变量组别中样本量过小，导致结果不太理想，应该对应增加样本量；
4. 本研究为观察性研究，所以本研究结果的可靠性仍然需要前瞻性的队列研究以及干预性的研究来予证实。

鉴于本课题验证了吸烟以及相关变量对氯吡格雷抗血小板作用过程中的促进作用（paradox study），可以进一步地研究烟草在氯吡格雷生物转化中的具体机制以及在临床中的个体化治疗。

参考文献

1. Thomas Cuisset, Pierre-Emmanuel Morange, Marie-Christine Alessi: Recent advances in the pharmacogenetics of clopidogrel. *Hum Genet* 2011.
2. Hochholzer W, Trenk D, Fromm MF, et al: Impact of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and of major demographic characteristics on residual platelet function after loading and maintenance treatment with clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55: 2427-34.
3. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al: Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009; 360: 363-75.
4. Xiao-Fang T, Jing W, Jia-Hui Zh, et al: Effect of the CYP2C19*2 and *3 genotypes, ABCB1 C3435T and PON1 Q192R alleles on the pharmacodynamics and adverse clinical events of clopidogrel in Chinese people after percutaneous coronary intervention. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69: 1103-1112.
5. Mega JL, Simon T, Collet JP, et al: Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA* 2010; 304: 1821-30.
6. Hulot JS, Collet JP, Silvain J, et al: Cardiovascular risk in clopidogrel-treated patients according to cytochrome P450 2C19*2 loss-of-function allele or proton pump inhibitor coadministration: a systematic meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 134-43.
7. US Food and Drug Administration. FDA drug safety communication: reduced effectiveness of plavix (clopidogrel) in patients who are poor metabolizers of the drug. March 12, 2010.
<http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/postmarketdrugsafetyinformationforpatientsandproviders/ucm203888.htm> (accessed Feb 18, 2012).
8. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, et al: Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80: 486-501.
9. Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhauser C, Waldmann C, Schmalz HG, ten Berg JM, Taubert D (2011) Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *NatMed* 17(1):110 - 116.
10. Sibbing D, Koch W, Massberg S, Byrne RA, Mehilli J, Schulz S, Mayer K, Bernlochner I, Schomig A, Kastrati A (2011) No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting. *Eur Heart J* 32(13):1605 - 1613.
11. Simon T, Steg PG, Becquemont L, Verstuyft C, Kotti S, Schiele F, Ferrari E, Drouet E, Grollier G, Danchin N (2011) Effect of paraoxonase-1 polymorphism on clinical outcomes in patients treated with clopidogrel after an acute myocardial infarction. *ClinPharmacol Ther* 90(4):561 - 567.
12. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, et al: Clopidogrel resistance is associated

- with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109: 3171-5.
13. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, et al: Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:2312-7.
 14. Pilgrim JL, Ruiz Y, Gesteira A, et al: Characterization of single nucleotide polymorphisms of cytochrome p450 in an Australian deceased sample. *Curr Drug Metab* 2012; 13:679-92.
 15. Nihar R. Desai, Jessica L. Mega, Songtao Jiang, et al: Interaction between cigarette smoking and clinical benefit of clopidogrel. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53:1273-8.
 16. Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, et al.; GRAVITAS Investigators. Standard-vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA* . 2011;305:1097 - 1105.
 17. Bouman HJ, Schömig E, van Werkum JW, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med*. 2011;17:110 - 116.
 18. Steinhubl SR. Genotyping, clopidogrel metabolism, and the search for the therapeutic window of thienopyridines. *Circulation*. 2010;121:481 - 483.
 19. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, et al: Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80:486-501.
 20. Zhou SF, Di YM, Chan E, et al: Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. *Curr Drug Metab* 2008;9:738-84.
 21. Sibbing D, Koch W, Massberg S, et al: No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting. *Eur Heart J* 32(13):1605-13.
 22. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, et al: Paraoxonase-1 Q192R polymorphism and antiplatelet effects of clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *Circ Cardiovasc Genet* 4(4):429-36.
 23. Bhattachayya T: Relationship of paraoxonase-1(PON1) gene polymorphisms and functional activity with systemic oxidation stress and cardiovascular risk. *JAMA* 299:1265-76.
 24. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, et al: Functional significance of a C>A polymorphism in intron 1 of cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;47:445-9.
 25. Zhou S, Yang L, Zhou Z, et al: Insights into the substrate specificity, inhibitors, regulation, and polymorphisms and the clinical impact of human cytochrome P450 1A2. *AAPS J*. 2009;11:481-94.
 26. Miyoshi M, Mizuno M: Comparison of proton pump inhibitors, omeprazole vs rabeprazole, in dual therapy for *Helicobacter pylori* infection in relation to CYP2C19 genetic polymorphism. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;723-8.
 27. Ahmad T, Voora D, Becker RC. The pharmacogenetics of antiplatelet agents: towards personalized therapy? *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:560 - 571.
 28. Zevin S, Benowitz NL: Drug interactions with tobacco smoking. An update. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36:425-38.

29. Vistisen K, Loft S, Poulsen HE: Cytochrome P450 1A2 activity in man measured by caffeine metabolism: effect of smoking, broccoli and exercise. *Adv Exp Med Biol* 1991; 283:407-11.
30. Han XM, Ouyang DS, Chen XP, et al: Inducibility of CYP1A2 by omeprazole in vivo related to the genetic polymorphism of CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol* 2002;54:540-3.
31. Djordjevic N, Ghotbi R, Jankovic S, et al: Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption is associated with the CYP1A2 -163C>A polymorphism. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:697-703.
32. Djordjevic N, Carrillo JA, Gervasini G, et al: In vivo evaluation of CYP2A6 and xanthine oxidase enzyme activities in the Serbian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:571-8.
33. Zhou SF, Wang B, Yang LP, et al: Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metab Rev* 2010;42:268-354.
34. Ba' geman E, Ingvar C, Rose C, et al: Coffee consumption and CYP1A2*1F genotype modify age at breast cancer diagnosis and estrogen receptor status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:895-901.
35. Obase Y, Shimoda T, Kawano T, et al: Polymorphisms in the CYP1A2 gene and theophylline metabolism in patients with asthma. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:468-74.

综述

氯吡格雷药物遗传学及其临床个体化治疗

摘要

氯吡格雷是一种广泛使用的抗血小板剂,其常用来治疗和预防多种动脉粥样硬化性疾病。经 FDA (美国食品和药物管理局) 的批准后的十多年,研究已越来越关注在药物转化为活性代谢物代谢受损的病人中可能会出现药物效果降低。

研究表明遗传变异的 CYP2C19 同工酶能部分影响机体中氯吡格雷药物的抗血小板的效果,具有 CYP2C19 遗传变异同工酶的患者由于氯吡格雷的疗效欠佳可能不良心血管事件的风险增加,但是这还没有得到明确证明。FDA (美国食品和药物管理局) 对于这种担忧已发出一个黑框警告。然而,有关基因检测和替代治疗策略的具体建议在目前还没有。通过检测携带有 CYP2C19 基因变异的病人的遗传检测在商业上是可行的,但基于这种检测结果来改变抗血小板疗法还没有进行充分的研究,因此,不清楚如何基于这样的基因检测的结果来调整抗血小板治疗。此外,除了与 CYP2C19 基因多态性以外还有其他很多可能影响氯吡格雷的抗血小板效果的因素存在。基于基因检测来调整抗血小板疗法这方面的研究将有望为如何合理地处理动脉粥样硬化患者提供更多的有用信息。

关键词

氯吡格雷, 基因多态性, CYP2C19, 基因变异

Abstract

Clopidogrel is a widely used anti-platelet agent used for the treatment and prevention of various atherosclerotic diseases. By the FDA's (U.S. Food and Drug Administration) approval after more than a decade, researchers have become increasingly concerned about that the effects of drugs in patients who have reduced response when use clopidogrel may appear drug resistance.

Studies have shown that patients with genetic variant CYP2C19 isozyme can affect the body portion clopidogrel antiplatelet drugs effects with CYP2C19 isozyme genetic variation because the possible adverse effect of clopidogrel increase the risk of cardiovascular events, but this has not been clearly demonstrated. FDA (U.S. Food and Drug Administration) has issued this concern for a black box warning. However, specific recommendations on genetic testing and alternative treatment strategies have not appeared. By detecting carrying the CYP2C19 gene mutation genetic testing of patients is commercially viable, but based on the results of this test to change antiplatelet therapy has not been adequately studied, therefore, it is not clear to adjust antiplatelet therapy based on such genetic testing results. Furthermore, besides the polymorphisms CYP2C19 there are many other factors which may affect the antiplatelet effect of the presence of clopidogrel. Research in this area based on genetic testing to adjust antiplatelet therapy will hopefully provide more useful information on how to reasonably deal with atherosclerosis patients.

Key Words:

clopidogrel, genetic polymorphisms, genetic variants, CYP2C19

氯吡格雷是一种口服的通过抑制血小板上 P2Y₁₂ 受体的抗血小板药物, 主要用来治疗动脉粥样硬化疾病。通常联合阿司匹林的双联疗法来预防和治疗如心肌梗死 (MI) 或者卒中 (stroke) 的血管性疾病, 也可以被用于急性冠脉综合症 (ACS) 或经皮冠脉支架术 (PCI) 后的病人¹⁻³。据美国心脏协会 (AHA) 初步估计, 在 2011 年美国有 785,000 人罹患冠脉血

管疾病，另约有 470,000 人将会有复发的心血管事件⁴。尽管使用了抗血小板疗法，但是心血管事件的复发率依然很高。许多研究都将目光集中到确定抗血小板治疗产生抵抗或者失败的原因，尤其是氯吡格雷（波立维）这种广泛使用的抗血小板药物的身上。

研究表明在肝脏中一些酶的基因多态性可能会影响氯吡格雷药物的反应性和效果⁵。氯吡格雷是一种前体药物，口服进入人体内需要经肝脏中大量的细胞色素 P450 同工酶参与进行两步生物转化为活性成分，而其中最重要的是 CYP2C19。研究表明携带有一个或者两个失功能等位基因的患者在服用氯吡格雷后相比于正常的病人其体内氯吡格雷转化为活性代谢物的比例会下降，血小板的抑制率也会相应降低，心血管事件的发生率会相应地增加⁶⁻¹⁰。因而 FDA 在 2010 年三月发布了一个氯吡格雷的盒装警告，意在提醒临床医生注意携带有失功能基因的患者可能会有更高的心血管事件复发率，建议对患者进行基因检测并对检测出的携带有失功能基因的患者考虑替代疗法^{11, 12}。由于盒装警告的发布，怎样将我们所了解的有关氯吡格雷的药物遗传学知识和临床实践结合起来便越来越引起人们的关注。针对哪些患者需要进行基因检测，对于携带失功能基因的患者怎样来调整治疗方案这些问题仍然没有明确的答案。因此对应用氯吡格雷的患者进行常规 CYP2C19 基因检测的有效性，合理性和限制性需要探讨。

氯吡格雷的生物转化过程和基因多态性

很多基因编码影响氯吡格雷吸收和代谢的酶，由于影响酶活性的基因突变，改变其中任何一个步骤都会影响药代动力学和药效^{13, 14}。许多研究检测了影响氯吡格雷药物代谢的基因突变。两步氧化代谢开始于噻吩环，以形成 2-氧化氯吡格雷。第二步是 2-氧化氯吡格雷继续氧化并水解形成活性代谢物并与 P2Y₁₂ 受体结合从而抑制依赖 ADP 激活的血小板聚集。参与第一部氯吡格雷氧化的酶主要有 CYP1A2, CYP2B6 和 CYP2C19，参与第二步氧化的酶主要有 CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9 和 CYP2C19，另外血清对氧酶-1 (PON1) 参与水解形成活性代谢物^{14, 15}。

CYP2C19 参与了两步氧化过程，在两步氧化过程中 CYP2C19 酶在其中氧化作用分别占 45%和 21%¹⁵。单核苷酸多态性 (SNPs) 可发生在编码这些酶的基因上，因此在药物激活过程中影响功能下降的基因突变会很大程度上改变氯吡格雷活性代谢物的水平^{6, 13, 15}。截至现在，CYP2C19 酶已经有 25 种 SNPs 被发现，包括*2, *3, *4, *5, *6, *7, *8 等突变和活性代谢物减少或消失有关^{15, 16}。和以上突变不同的是，CYP2C19*1 基因是野生型基因，携带这类基因着酶活性正常¹⁷。因此，携带有两个野生等位基因的纯合子 (*1/*1) 的患者

属于正常代谢者 (extensive metabolizer)¹⁷, 携带有一个正常基因和一个失功能基因的患者 (*1/*2, *1/*3) 属于中间代谢者, 而携带有两个失功能基因的 (*2/*2, *2/*3, *3/*3) 属于弱代谢者¹⁴。携带有两个失功能基因的人群比例在白人中约为 2%, 在黑人中约为 4%, 中国人约占 14%¹⁸。基于以上观点, 我们主要研究 CYP2C19*2 和*3 基因因为 90% 以上的弱代谢者都主要携带这两个等位基因。

有关基于基因检测指导治疗的临床试验

截至现在, 主要的一些关于支持或者反对在基因变异和心血管事件之间有无联系的资料一般来自于一些研究的基因亚组分析或者荟萃分析。为了了解基因突变对临床终点事件的影响, 已使用基于基因型检测来进行临床抗血小板治疗的前瞻性研究方法, 如 GIFT 实验 (Genotype Information and Functional Testing)^{21, 22}。在这个研究中, 1152 份样本进行了相关基因型的检测, 结果显示携带有一个或者两个 CYP2C19*2 基因的患者在使用更多剂量的氯吡格雷 (150mg) 时药物效果并没有增加。尤其值得注意的是, 跟携带野生型纯合子基因的患者相比, 携带有*2 型纯合子的患者在 30 天时检测持续性血小板高反应性的风险增加了 11 倍, 而携带了一个失功能基因的患者风险也增加了 62%。这些研究发现表明了更高的药物剂量对那些携带了 CYP2C19*2 型基因的患者可能不是很有有效的治疗方案²¹。

ELEVATE-TIMI 试验 (Escalating Clopidogrel by Involving A Genetic Strategy-Thrombolysis In Myocardial Infarction 56) 研究了与 247 个非失功能基因携带的患者对照 86 个携带有失功能基因的心血管疾病患者使用更高剂量的氯吡格雷 (150-300mg/d) 是否有效²³。与非携带者相比, *2 型携带者具有更高的血小板反应性 ($P < 0.001$) (采用血管扩张刺激磷蛋白血小板反应性指数和 VerifyNow 方法检测)。在 80 例携带有 2 个*2 型等位基因的患者中, 增加每日氯吡格雷的剂量至 225 到 300mg 血小板的抑制率才和非携带者使用 75mg/d 的剂量相当。携带者使用 150mg/d 的剂量的确能比使用 75mg/d 的剂量更能抑制血小板聚集, 但不及非携带者使用 75mg/d 的剂量所达到的水平。而且*2 型纯合子携带者对所有剂量的氯吡格雷都表现出血小板高反应性 (抵抗)。这个研究表明将日常剂量增加至 3 倍即 225mg/d 可能是携带有一个突变者的有效治疗剂量, 而对于携带纯合突变者则不同²³。

一些研究基于基因检测来估算个体化抗血小板治疗的效果。GIANT 研究 (Genotyping Infarct Patients to Adjust and Normalize Thienopyridine Treatment) 将对 PCI 术后 ST 段抬高心梗病人进行 CYP2C19*1 和*2 型基因检测, 医生将基于基因检测的结果选择

噻吩吡啶类药物治疗方案：常规剂量的氯吡格雷，调整剂量的氯吡格雷和普拉格雷。在一年的事件内记录诸如死亡，心肌梗死和支架血栓等主要临床终点事件^{14, 24}。另一个观察性的研究 GeCCO (Genotype Guided Comparison of Clopidogrel and Prasugrel Outcomes) 要研究对于携带正常基因型的 ACS 患者是否在使用氯吡格雷或普拉格雷做心血管防治时有无区别^{14, 25}。而在 RAPID-STEMI (Pharmacogenetic Approach to Anti-platelet Therapy for the Treatment of ST-segment Elevation Myocardial Infarction) 研究基于 CYP2C19 和 ABCB1 基因型检测来指导的临床抗血小板治疗的效果²⁶。如果基因检测确定一个患者是 CYP2C19*2 型携带者或者是 ABCB1 3435T 基因纯合子携带者的话，将要么接受普拉格雷一个月或者氯吡格雷负荷量 1 周接着标准剂量治疗。治疗中血小板反应性的主要临床终点事件或次要的终点事件（如心血管疾病死亡，非致死性心肌梗死，复发住院和出血风险）将会在一个月的时间作为事件截止时间。

临床上影响氯吡格雷药效的其他因素

到现在研究 CYP2C19 基因多态性和氯吡格雷药物效果的关系的结论还不确定。许多研究发现氯吡格雷的药物效果会因 CYP2C19 基因多态性的改变而发生改变，但另外一些研究却不能证明其之间存在联系。这个差异可能是由于影响氯吡格雷药物效果的因素而不是 CYP2C19 基因多态性的原因。事实上，CYP2C19 的失功能基因只能解释氯吡格雷药物反应差异的 12%。这就显示大部分的反应差异还是由于其他的因素的影响，其中的一些到现在还没有发现²⁷。因为许多因素可能参与药物生物激活过程和最终的临床药物效果，独立使用 CYP2C19 基因检测作为知道治疗参考可能会有失偏差。

如早前所提及许多的酶参与到影响氯吡格雷药物激活的生物过程中，ABCB1 基因编码肠道外泵 MDR1 蛋白在氯吡格雷的吸收中扮演角色引起了大家的注意¹⁴。在 ABCB1 基因上的 Cys3435Thr 单核苷酸多态性被认为会影响药物的吸收和增加活性代谢物的外排从而导致临床效果的改变^{14, 20, 28}。一些研究里也阐述过这一基因多态性和药物效果存在联系^{20, 28}。

另一个让人感兴趣的酶就是 PON1，其为一种能转化氯吡格雷活性代谢物形式的酯酶¹⁴。Bouman 等人²⁹最近研究了在冠心病植入支架后的患者中 Q192R 的基因突变确定了编码 PON1 酶。以氯吡格雷治疗这些带有突变的患者体内活性代谢物水平降低而支架内血栓的风险显著增高。有趣的是这个研究没有发现 CYP2C19*2 基因突变和支架血栓之间有任何关联。而相对应的是 Sibbing 等人³⁰发现 CYP2C19*2 型基因与支架血栓有紧密的联系。

和 CYP2C19*2 型基因不同，CYP2C19*17 基因是一种获得功能型基因

(gain-of-function), 其可增加酶的活性而增加活性代谢物的水平, 同时可能会增加出血风险¹⁵。Pare 等人在 CURE 和 ACTIVE-A 研究中的低风险患者中发现了这一结论⁶。在 CURE 研究中携带有*17 基因的 ACS 患者服药后与非携带者比较药物效果增强且心血管事件发生率显著降低, 但是在 ACTIVE-A 中的合并有房颤的*17 携带者对缺血性事件的发生率并没有降低。增加出血风险的观点是在 PLATO 实验中*17 携带者中发现的²⁰。综合以上研究发现相对于非*17 基因携带者和失功能基因携带者, *17 基因携带者以氯吡格雷治疗时主要的出血风险会相对增加。

基因多态性在与氯吡格雷药物反应联系中的角色越来越引起大多研究者的兴趣, 未来可能会发现更多的与药物反应相关的基因突变和酶。因为针对氯吡格雷疗法的基因检测是一个相对较新的, 最近几个研究中刚提出的建议。当前可行的基因检测主要是针对 CYP2C19 突变, 大多是在*2, *3 突变中检测, 其他突变检测的比较少¹⁴。这种有限的检测方式可能排除了其他基因突变对药物反应的贡献度; 而且当前的基因检测费用较高(通常不包含在医保中), 费时较多(一般最快都要 5 天)¹⁴。现在可行的由几家供应商提供的不同的商业化基因检测可能会缺失方法学上的标准化而且可能会对结果带来未知的影响。

除了遗传因素外, 在患者中其他的因素也可影响氯吡格雷药物的反应。这些因素包括患者的依从性, 伴随的疾病状态, 用药情况, 生活方式, 年龄和其他更多的因素¹⁵。患者的依从性应强调无论是刚刚开始服药还是已经服药多年都具有重要性。患者在服用氯吡格雷同时服用其他药物所导致的药物之间的相互干预也是影响氯吡格雷药效的一个重要方面, 现在已经知道的有质子泵抑制剂可能对氯吡格雷药效有干预作用, 一些附加药物也可能干预氯吡格雷药物的效果, 如圣约翰草、他汀类和钙通道阻滞剂^{14, 15}。

结论和建议

在体内氯吡格雷的生物转化是一个复杂的过程, 需要体内很多酶参与其中并发挥功能。这些年很多研究将眼光集中于 CYP2C19 酶的身上, 因为它的突变会减少体内氯吡格雷活性代谢物成分并影响氯吡格雷抗血小板效果。这篇综述主要综合了当前主要一些关于氯吡格雷使用方面的基因检测数据结论。一些研究表明 CYP2C19 的基因突变在临床上带来的不利影响, 另外一些研究则未能证明其之间存在联系。正如 CURE, ACTIVE-A 等一些大型的实验中基因分析所见, 在中低风险的患者中, CYP2C19 突变和药物反应之间好像并无联系。相反, 在 PLATO, TRITON-TIMI38, 和 FAST-MI 基因亚组分析研究中, 高风险的 PCI 患者(CYP2C19 突变的患者)与不利的心血管终点事件之间存在着紧密的联系。CYP2C19 突变

最大的影响似乎表现在支架血栓上，尤其是发生于开始用氯吡格雷药物治疗过程不久。

尽管从一些研究中能够确定 CYP2C19 突变对氯吡格雷效果的影响，重要的是我们应该记住 CYP2C19 突变仅仅只能解释氯吡格雷药物反应差异的 12%。因此其他诸如其他基因突变、药物之间影响、病人依从性等影响氯吡格雷药物反应差异的因素也应该要考虑。基于当前的一些数据，ACC/AHA 指南都没有推荐对 ACS 患者进行常规的基因检测³¹。对于较可能出现支架血栓的高风险的 PCI 患者或者是使用氯吡格雷药物反应较差且复发心血管事件的患者推荐使用基因检测可能比较合适^{31, 32}。一些研究致力于发现基于 CYP2C19 基因检测的抗血小板治疗的优点。这些研究结果强调了基因检测的有效性并针对基因检测如何量身定制抗血小板疗法有很重要的意义。

References

1. The Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2001;345:494 - 502.
2. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, et al.; Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* . 2001;358:527 - 533.
3. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al.; Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2001;345:494 - 502.
4. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al.; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics - 2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* . 2011;123:e18 - e209.
5. Freedman JE, Hylek EM. Clopidogrel, genetics, and drug responsiveness. *N Engl J Med.* 2009;360:411 - 413.

6. Paré G, Mehta SR, Yusuf S, et al. Effects of CYP2C19 genotype on outcomes of clopidogrel treatment. *N Engl J Med.* 2010;363:1704 - 1714.
7. Collet JP, Hulot JS, Pena A, et al. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet* . 2009;373:309 - 317.
8. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med.* 2009;360:354 - 362.
9. Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopi -dogrel therapy. *JAMA* . 2009;302:849 - 857.
10. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, et al. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation.* 2010;121:512 - 518.
11. FDA Drug Safety Communication: Reduced effectiveness of Plavix (clopidogrel) in patients who are poor metabolizers of the drug. Food and DrugAdministrationWebsite. <http://www.fda.gov/drugs/drugsafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm203888.htm>. March 25, 2010. Accessed November 30, 2011.
12. Plavix[package insert]. Bridgewater, NJ: Bristol-Myers Squibb/Sanofi Pharmaceuticals Partnership; 2011.
13. Johnson JA, Cavallari LH, Beitelshes AL, et al. Pharmacogenomics: application to the management of cardiovascular disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90:519 - 531.
14. Ahmad T, Voora D, Becker RC. The pharmacogenetics of antiplatelet agents: towards personalized therapy? *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:560 - 571.
15. Steinhubl SR. Genotyping, clopidogrel metabolism, and the search for the therapeutic window of thienopyridines. *Circulation.* 2010;121:481 - 483.
16. Smock KJ, Saunders PJ, Rodgers JM, Johari V. Laboratory evaluation of clopi -dogrel responsiveness by platelet function and genetic methods. *Am J Hema -tol.*

2011;86:1032 - 1034.

17. Kubica A, Kozinski M, Grzesk G, et al. Genetic determinants of platelet response to clopidogrel. *J Thromb Thrombolysis*. 2011;32:459 - 466.

18. Mega JL, Simon T, Collet JP, et al. Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA* . 2010;304:1821 - 1830.

19. Wallentin L, James S, Storey RF, et al.; PLATO investigators. Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial. *Lancet* . 2010;376:1320 - 1328.

20. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al.; French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) Investigators. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2009;360:363 - 375.

21. Price M. ACC2011; April 5, 2011; New Orleans, LA.

22. Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, et al.; GRAVITAS Investigators. Standard-vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA* . 2011;305:1097 - 1105.

23. Mega JL, Hochholzer W, Frelinger AL 3rd, et al. Dosing clopidogrel based on CYP2C19 genotype and the effect on platelet reactivity in patients with stable cardiovascular disease. *JAMA* . 2011;306:2221 - 2228.

24. GIANT ongoing trial—US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov[online].<http://clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT01134380> (2010). Accessed November 10, 2011.

25. GeCCo ongoing trial—US National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov[online].<http://clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT00995514> (2009). Accessed November 10, 2011.

26. RAPID-STEMI ongoing trial—US National Library of Medicine. Clinical-Trials.gov[online].<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01452139>

(2011). Accessed January 3, 2012.

27. Paré G, Eikelboom JW, Sibbing D, et al. Testing should not be done in all patients treated with clopidogrel who are undergoing percutaneous coronary intervention. *Cir Cardiovasc Interv.* 2011;4:514 - 21; discussion 521.
28. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet* . 2010;376:1312 - 1319.
29. Bouman HJ, Schömig E, van Werkum JW, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med.* 2011;17:110 - 116.
30. Sibbing D, Koch W, Massberg S, et al. No association of paraoxonase-1 Q192R genotypes with platelet response to clopidogrel and risk of stent thrombosis after coronary stenting. *Eur Heart J* . 2011;32:1605 - 1613.
31. Wright RS, Anderson JL, Adams CD, et al. 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (Updating the 2007 Guideline) A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in Collaboration With the American College of Emergency Physicians, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57:1920 - 1959.
32. Sibbing D, Bernlochner I, Kastrati A, et al. Current evidence for genetic testing in clopidogrel-treated patients undergoing coronary stenting. *Circ Cardio-vasc Interv.* 2011;4:505 - 13; discussion 513.
33. Qureshi Z, Hobson AR. Clopidogrel “Resistance” : Where are we now? *Cardiovas Ther* . August 3, 2011. DOI: 10.1111/j/1755-5922.2011.00296.x.

附录：个人简历

1. 个人基本信息：

性别：男

籍贯：湖北黄冈

出生年月：1986年8月

高中：2002年9月-2005年6月，蕲春县第一高级中学

本科：2005年9月-2010年6月，咸宁学院医学院，临床医学

硕士：2011年9月-2014年6月，汕头大学医学院，心血管内科学

2. 在校期间发表的论文：

Yuan Y, Wang XY. Cigarette smoking is associated with clinical benefit of clopidogrel in Chinese population. (submitting)

Yuan Y, Wang XY. Association between polymorphisms of CYP2C19, PON1, ABCB1 and clinical clopidogrel antiplatelet effect in Chinese population. (submitting)

3. 学校奖励：

无

致 谢

本论文是在导师王兴宇教授的指导下完成的，感谢王老师在整个课题研究和论文撰写过程中所付出的心血；更感激王老师于这些年，为我提供了优越的学习和生活环境，给予悉心指导，使我得到锻炼。在读硕士研究生期间最大的收获，莫过于从王老师身上学到的书本外的宝贵经验与知识，使我在写论文、点评文章及培养科研思维等方面打下扎实的基础。没有王老师三年来的谆谆教导和无微不至的关怀，就没有我今天的成绩，在此，谨向王老师表示最崇高的敬意和最衷心的感谢！

感谢北京高血压联盟研究所刘丽荃教授、刘欣、沈玥、王泳钦、刘群、张薇、李健、李雅维、付倍莹、朱清英、刘伯仁、赵秀文、仁兵等各位老师和同事，阜外心血管医院陈兰英老师在课题进行过程中给予的悉心指导和帮助。

感谢吴碌华师姐、张永智师兄、何凌滨同学、周奕联同学对我课题进行时的帮助和指导及与我共同度过课题进行时的窘困生活。

特别感谢欧文静同学对我课题中所涉及的统计分析方面给予的无私帮助和指导。

感谢母校汕头大学医学院在我硕士在读三年来给我提供的优越条件和研究生科的老师对我的无私帮助和支持。

衷心感谢在我学习、生活等方面给予帮助而尚未提及的老师、同学和朋友们。

特别感谢我的父母、家人以及女朋友这么多年来求学过程中给予我最无私的关怀和支持。

2014年4月

于汕大医学院