

胰岛素受体底物-1 基因 rs1078533 单核苷酸多态性与 2 型糖尿病合并冠心病患者氯吡格雷抵抗的相关性研究

张丁予^{1,2}, 韩雅玲², 张效林², 刘腾飞^{1,2}, 蔡文芝^{1,2}, 刘丹²

¹ 辽宁医学院 心血管内科, 辽宁锦州 121001; ² 沈阳军区总医院 心血管内科, 辽宁沈阳 110016

摘要: **目的** 探讨胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1) 基因 rs1078533 单核苷酸多态性与 2 型糖尿病合并冠心病患者氯吡格雷抵抗 (clopidogrel resistance, CR) 发生的相关性。**方法** 入选 2012 年 4 月 - 2013 年 4 月沈阳军区总医院 2 型糖尿病合并冠心病住院患者 325 例, 采用光学比浊法测定 20 μ mol/L 二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 诱导的残余血小板聚集率 (residual platelet agglutination, RPA), 当 RPA \geq 70% 时定义为 CR。所有入选患者根据 RPA 分为 CR 组 (n=142) 和非氯吡格雷抵抗 (NCR) 组 (n=183)。采用聚合酶链式反应结合直接测序法测定 IRS-1 基因 rs1078533 位点在 CR 组和 NCR 组的基因型及等位基因分布频率。**结果** IRS-1 基因 rs1078533 多态位点在 CR 组和 NCR 组基因型分布频率符合 Hardy-Weinberg 平衡。三种基因型 (AA、AC 和 CC) 在两组的分布频率分别为 1.4%、16.8%、81.8% 和 1.6%、19.8%、78.6%。基因型 (AA、AC 和 CC) 及等位基因 (A 和 C) 分布频率在 CR 组和 NCR 组间均无统计学差异 ($P = 0.786$, $P = 0.524$)。Logistic 回归分析校正性别、年龄、体质指数、吸烟和高血压等冠心病和糖尿病易患因素后, IRS-1 基因 rs1078533 单核苷酸多态性仍与 2 型糖尿病合并冠心病患者 CR 的发生无相关性。**结论** IRS-1 基因 rs1078533 单核苷酸多态性与 2 型糖尿病合并冠心病患者 CR 的发生无相关性。

关键词: 氯吡格雷抵抗; 胰岛素受体底物-1; 2 型糖尿病合并冠心病; 单核苷酸多态性

中图分类号: R 587.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-5227(2014)01-0074-04 DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2014.01.024

网络出版时间: 2013-09-03 09:35

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20130903.0935.002.html>

Relation between rs1078533 polymorphism of IRS-1 gene and clopidogrel resistance in patients with type 2 diabetes mellitus accompanying coronary artery disease

ZHANG Ding-yu^{1,2}, HAN Ya-ling², ZHANG Xiao-lin², LIU Teng-fei^{1,2}, CAI Wen-zhi^{1,2}, LIU Dan²

¹Department of Cardiology, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; ²Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Military Area Command, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Corresponding author: HAN Ya-ling. Email: hanyl126@126.com

Abstract: Objective To study the relation between rs1078533 polymorphism of IRS-1 gene and clopidogrel resistance (CR) in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus (DM) accompanying coronary artery disease (CAD). **Methods** Three hundred and twenty-five patients with type 2 DM accompanying CAD admitted to General Hospital of Shenyang Military Area Command from April 2012 to April 2013 were enrolled in this study. Their residual platelet aggregation rate (RPA) induced by 20 μ mol/L adenosine diphosphate (ADP) was measured by optical nephelometry. The CR was defined when the RPA was \geq 70%. The patients were divided into CR group (n=142) and non-CR group (n=183) according to their RPA. The genotypes and allele frequencies at rs1078533 of IRS-1 gene in two groups were detected by PCR and pyrophosphate sequencing, respectively. **Results** The genotype frequencies at rs1078533 of IRS-1 gene conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium in two groups. The frequency of genotypes (AA, AC and CC) was 1.4%, 16.8%, 81.8%, respectively, in CR group and 1.6%, 19.8%, 78.6%, respectively, in non-CR group. No significant difference was observed in genotypes and allele frequencies between the two groups ($P = 0.786$ and $P = 0.524$). Logistic regression analysis revealed that the rs1078533 polymorphism was not related with the CR after adjustment of risk factors including age, gender, BMI, smoking and hypertension in patients with type 2 DM accompanying CAD. **Conclusion** The rs1078533 polymorphism of IRS-1 gene is not related with the CR in patients with type 2 DM accompanying CAD.

Key words: clopidogrel resistance; insulin receptor substrate 1; type 2 diabetes mellitus complicated by coronary artery disease; single nucleotide polymorphism

收稿日期: 2013-07-16

基金项目: 国家十二五科技支撑课题 (2011BAI11B07); 军队临床高新技术重大项目 (2012GXJS001)

Supported by the National 12th Five Years Scientific Plan program (2011BAI11B07); Military Clinical High-tech Major Projects (2012GXJS001)

作者简介: 张丁予, 女, 硕士。研究方向: 冠心病的诊断与治疗。Email: xiaolei217@sina.cn

通信作者: 韩雅玲, 女, 博士, 教授, 副院长。Email: hanyl126@126.com

氯吡格雷和阿司匹林联用抗血小板治疗已经被证实可以显著降低经皮冠状动脉介入(percutaneous coronary intervention, PCI)术后血栓事件的发生率^[1-3],但部分患者在服用常规剂量的氯吡格雷后仍会发生血栓事件,这种现象临床上称之为氯吡格雷抵抗(clopidogrel resistance, CR)。导致氯吡格雷药效存在较大个体差异的机制尚不完全清楚,遗传因素在CR的发生中起很大作用。近来研究发现,2型糖尿病合并冠心病患者更容易发生CR,其PCI术后血栓事件发生率是不合并糖尿病患者的2~4倍^[4-7]。Angiolillo等^[8]研究发现在高加索人中,胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)基因单核苷酸多态性与2型糖尿病合并冠心病患者血小板活性增高、服用抗血小板药物疗效差有关,考虑可能是由于IRS-1基因突变导致胰岛素对血小板活性的抑制作用减弱,使血小板反应性增高,进而引起该人群对氯吡格雷不敏感^[9]。本研究对IRS-1基因单核苷酸多态性进行分析,探索IRS-1基因rs1078533单核苷酸多态性与CR发生的相关性,为早期预测CR,减少缺血性心血管事件的发生提供理论依据。

对象和方法

1 研究对象 入选2012年3月-2013年4月在沈阳军区总医院心内科接受治疗的2型糖尿病合并冠心病患者325例。入选标准:年龄18~75岁,经冠状动脉造影确诊为冠心病并且接受标准双联抗血小板治疗;符合WHO(1999年)制定的2型糖尿病诊断标准。排除标准:对阿司匹林或氯吡格雷过敏或不能耐受者;ST段抬高型心肌梗死及行急诊介入治疗的患者;半年内有卒中或内脏出血疾病病史者;严重肝肾疾病和(或)凝血功能异常者;具有抗血小板禁忌证或近期拟行手术者;糖耐量异常和空腹血糖调节受损,妊娠糖尿病和暂时性血糖增高者;合并其他终末期疾病者。

2 分组 采外周静脉血5 ml,以光学比浊法测定20 μmol/L二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)诱导的残余血小板聚集率(residual platelet agglutination, RPA)作为评价血小板功能的标准。定义PRA ≥ 70%为CR,据此把患者分为CR组和非氯吡格雷抵抗(non-clopidogrel resistance, NCR)组。

3 测定RPA 使用PACK-4多通道血小板聚集仪(Helena, USA)测定RPA。取外周静脉血标本37℃下离心(800 r/min)10 min,吸取上层富血小板血浆(platelet-rich plasma, PRP)。将已吸取富血小板血

浆的血标本,离心(4 000 r/min)10 min,吸取上层无血小板血浆制备为乏血小板血浆(platelet-poor plasma, PPP),调零备用。调整富血小板血浆中血小板计数后置于比色管中,加入20 μmol/L ADP后测定RPA。

4 选择标签单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP) 在IRS-1基因及其上游2 kb、下游1 kb的区域中,从人类基因组数据库HapMap中选择中国汉族人群进行配置,设定 $r^2 = 0.8$, MAF > 0.05,筛选出标签SNP rs1078533。此位点位于IRS-1基因的内含子区,为A/C多态。

5 基因组DNA提取及基因型测定 取外周静脉血3 ml,采用基因组DNA提取试剂盒(天根,北京)提取基因组DNA, -20℃冰箱储存备用。以聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增含有目的位点的基因片段。引物设计采用软件Primer Primer5.0完成,序列为:上游: CACATTTCTCCTC TGCCA, 下游: GTCGAAGTTGAAACGTGAA(生工,上海)。PCR反应体系包括基因组DNA 2 μl,正反链引物各2 μl, 2×Taq MasterMix 25 μl, 加去离子水至50 μl。扩增反应在PCR热循环仪(Bio-Rad, 美国)中完成,PCR扩增条件为:94℃预变性4 min; 94℃ 30 s、57℃ 30 s、72℃ 30 s,重复30个循环,终末延伸72℃ 7 min。扩增的PCR产物长度为309 bp,取5 μl PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定,溴化乙锭染色,150 V电压下电泳30 min,凝胶成像系统检测PCR扩增产物质量,将目的DNA片段送上海生工生物工程有限公司进行测序。

6 统计学分析 统计学处理均由SPSS19.0软件完成。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料及Hardy-Weinberg平衡符合程度采用四格表的 χ^2 检验;基因与事件关联强度以比值比(OR)及95%置信区间(95% CI)表示;采用Logistic回归进行多因素分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 基本资料 两组患者的性别、年龄和体质量指数等一般资料在CR和NCR组间未见统计学差异($P > 0.05$)。常规实验室检查结果及基线药物治疗亦无统计学差异。见表1。

2 SNP基因分型 IRS-1基因rs1078533位点PCR扩增产物片段长度为309 bp。测序结果显示IRS-1基因rs1078533为A/C多态,存在三种基因型:AA型、AC型和CC型,见图1。

表1 CR组和NCR组的临床基本资料

Tab. 1 Baseline clinical and laboratory data about CR group and NCR group(n, %)

	CR(n=142)	NCR(n=183)	P
Age(yrs)	63.28 ± 10.21	61.69 ± 8.43	0.242
Female	76(53.5)	111(60.7)	0.214
BMI(kg/m ²)	26.43 ± 3.39	25.91 ± 4.20	0.375
Active smoker	40(46.0)	57(50.4)	0.570
Hypertension	69(79.3)	78(69.0)	0.109
Glycemic(mmol/L)	9.04 ± 3.45	9.22 ± 3.59	0.718
Total cholesterol(mmol/L)	4.25 ± 1.35	4.51 ± 1.40	0.182
Platelet count(× 10 ⁹ /L)	201.45 ± 44.81	197.56 ± 51.47	0.576
β-blocker	85(59.6)	114(62.3)	0.731
ACE inhibitor	103(72.5)	124(67.8)	0.394
Stains	90(63.4)	111(60.7)	0.646

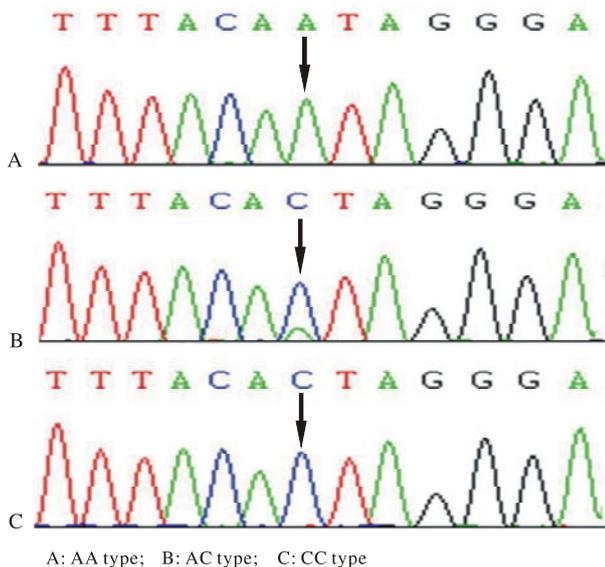


图1 IRS-1基因rs1078533单核苷酸多态性测序结果

Fig.1 Sequencing of rs1078533 polymorphism of IRS-1 gene

3 等位基因及基因型分析 IRS-1基因rs1078533位点的基因型和等位基因分布见表2。该位点经检验符合Hardy-weinberg平衡定律。CR组和NCR组间各基因型分布差异无统计学意义($P > 0.05$), 两组间等位基因差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。采用Logistic回归对性别、年龄、体质量指数、吸烟和高血压等冠心病和糖尿病易感因素进行校正

表2 CR组与NCR组IRS-1基因rs1078533位点基因型和等位基因分布频率

Tab. 2 Genotype and allele frequencies at rs1078533 of IRS-1 gene in CR group and NCR group (n, %)

rs1078533	CR(n=142)	NCR(n=183)	χ^2	OR(95% CI)	P
Genotype					
A/A	2(1.4)	3(1.6)			
A/C	24(16.8)	36(19.8)	0.528		0.768
C/C	117(81.8)	143(78.6)			
Allele					
A	28(9.7)	42(11.6)	0.590	0.821(0.495-1.360)	0.524
C	260(90.3)	320(88.4)			

后,发现rs1078533单核苷酸多态性仍与2型糖尿病合并冠心病患者CR的发生无相关性,见表3。

表3 经Logistic回归分析校正易感因素后rs1078533与CR发生的相关性分析

Tab. 3 Logistic regression analysis showing relation between rs1078533 and CR after adjustment of risk factors

Risk factor	Coefficient	S \bar{x}	OR	95% CI		P
				Lower	Upper	
Age	-0.003	0.025	0.997	0.948	1.047	0.895
Female	0.475	0.803	1.608	0.333	7.753	0.554
BMI	-0.031	0.036	0.969	0.903	1.040	0.388
Smokers	0.394	0.835	1.483	0.289	7.615	0.637
Hypertension	0.581	0.870	1.788	0.325	9.836	0.504
A/C	1.260	1.101	1.527	0.407	6.537	0.252

讨论

胰岛素有抑制血小板活化和聚集的作用。在健康人群中,胰岛素与血小板表面的胰岛素受体结合,使IRS-1磷酸化后与血小板P₂Y₁₂途径上的抑制性蛋白G_iα₂亚基结合形成复合物,干扰G_iα₂的活性,使P₂Y₁₂降低cAMP的功能减弱,引起血小板内钙离子浓度降低,使ADP和凝血酶等诱导的血小板聚集力下降^[10]。在2型糖尿病患者中胰岛素对血小板的抑制作用是减弱的,可能是由于胰岛素对P₂Y₁₂途径中G_iα₂抑制作用的缺陷引起的^[11]。但导致这种缺陷的机制尚未完全阐明,IRS-1功能异常有可能是一个原因^[12]。

IRS-1基因是引起胰岛素抵抗的重要基因,该基因位于染色体2q36-37,其编码产物IRS-1是分布于胰岛素敏感组织内的信号转导蛋白^[13]。IRS-1是位于胰岛素级联信号上的第一个受体底物,当IRS-1出现异常时,胰岛素信号传导发生改变,影响机体对胰岛素的利用,就会产生胰岛素抵抗^[14]。因此,当IRS-1基因突变影响其下游信号通路传导时,血小板聚集活动也受到相应的影响^[15]。

Dominick等研究发现在高加索人中IRS-1基因单核苷酸rs956115的C等位基因会增加血小板活性及不良心血管事件发生率。但在中国人群中尚未有IRS-1基因多态性与CR相关性的研究。由于IRS-1基因rs956115位点多态性存在种族差异,在高加索人中突变率为20%,中国人群突变率为10%,且CC型频率很低,基因型频率分布过于偏颇,因此我们从Hapmap数据库以r²=0.8, MAF > 0.05进行配置,从中筛选出标签SNP rs1078533位点进行IRS-1基因多态性与CR的相关分析,该

位点与 IRS-1 基因中较多 SNP 位点呈强连锁不平衡, 能较好地代表一段基因的遗传信息。本研究发现, rs1078533 多态位点的基因型频率和等位基因频率在 CR 组和 NCR 组间分布差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 2 型糖尿病合并冠心病患者 IRS-1 基因 rs1078533 位点与 CR 的发生无明显相关性。产生这种结果的原因可能是 rs1078533 位点位于 IRS-1 基因内含子区域, 不参与编码蛋白, 对 IRS-1 的表达不产生直接影响, 同时内含子区域单一位点突变可能不足以解释抵抗现象的发生, 还需要从启动子区、外显子区和 3'UTR 区等区域选取 SNP 位点做进一步的基因型分析, 并对多个位点进行连锁不平衡的单体型分析。糖尿病患者血小板呈现高反应性不仅仅由于 IRS-1 异常引起的胰岛素对血小板抑制作用减弱有关, 还与糖尿病患者的脂类代谢异常等其他因素相关^[16], 因此 IRS-1 基因 rs1078533 位点突变可能不会对 CR 的产生起到决定性作用。

参考文献

- 1 Anderson JL, Adams CD, Antman EM, et al. 2012 ACCF/AHA focused update incorporated into the ACCF/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines [J]. *Circulation*, 2013, 127 (23): e663-e828.
- 2 Torabi A, Cleland JG, Khan NK, et al. The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29 (7): 859-870.
- 3 Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, et al. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354 (16): 1706-1717.
- 4 Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial [J]. *JAMA*, 2011, 305 (11): 1097-1105.
- 5 Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49 (14): 1505-1516.
- 6 Geisler T, Anders N, Paterok M, et al. Platelet response to clopidogrel is attenuated in diabetic patients undergoing coronary stent implantation [J]. *Diabetes Care*, 2007, 30 (2): 372-374.
- 7 Angiolillo DJ. Antiplatelet therapy in diabetes: efficacy and limitations of current treatment strategies and future directions [J]. *Diabetes Care*, 2009, 32 (4): 531-540.
- 8 Angiolillo DJ, Bernardo E, Zanoni M, et al. Impact of insulin receptor substrate-1 genotypes on platelet reactivity and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58 (1): 30-39.
- 9 Ferreira IA, Mocking AI, Feijge MA, et al. Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 (2): 417-422.
- 10 肖淳纯. 2 型糖尿病与血小板 P2Y₁₂ 受体 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2008, 28 (2): 153-156.
- 11 Angiolillo DJ, Capranzano P, Goto S, et al. A randomized study assessing the impact of cilostazol on platelet function profiles in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease on dual antiplatelet therapy: results of the OPTIMUS-2 study [J]. *Eur Heart J*, 2008, 29 (18): 2202-2211.
- 12 Lassarre C, Legay C, Karam M, et al. Platelet-derived growth factor negatively regulates the insulin-like growth factor signaling pathway through the coordinated action of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C beta I [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833 (6): 1367-1377.
- 13 Herschkovitz A, Liu YF, Ilan E, et al. Common inhibitory serine sites phosphorylated by IRS-1 kinases, triggered by insulin and inducers of insulin resistance [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (25): 18018-18027.
- 14 Hwang SL, Jeong YT, Hye Yang J, et al. Pinusolid improves high glucose-induced insulin resistance via activation of AMP-activated protein kinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 437 (3): 374-379.
- 15 Ferreiro JL, Gómez-Hospital JA, Angiolillo DJ. Platelet abnormalities in diabetes mellitus [J]. *Diab Vasc Dis Res*, 2010, 7 (4): 251-259.
- 16 Watala C, Boncler M, Gresner P. Blood platelet abnormalities and pharmacological modulation of platelet reactivity in patients with diabetes mellitus [J]. *Pharmacol Rep*, 2005, 57 Suppl: 42-58.