替格瑞洛与感染风险的关联：一项基于GWAS数据库的两样本孟德尔随机化研究Δ

许桂锋[1,2*]，吴永麟[2,3]，郭龚杰[1,2]，黄俊鸿[4]，谢志鹏[1,2]，罗文威[2]，钟诗龙[2,5]，赖伟华[1,2#]（1.华南理工大学医学院，广州 510006；2.南方医科大学附属广东省人民医院/广东省医学科学院药学部，广州 510080；3.南方医科大学药学院，广州 510515；4.华南理工大学生物科学与工程学院，广州 510006；5.南方医科大学附属广东省人民医院/广东省医学科学院冠心病防治研究重点实验室，广州 510080）

中图分类号 R972；R969.3　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408（2023）07-0859-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.07.17

摘　要　目的 探讨替格瑞洛与感染风险的因果关联。**方法** 采用两样本孟德尔随机化方法。基于迄今为止最大规模的替格瑞洛及其主要活性代谢物AR-C124910XX体内暴露量的全基因组关联分析结果选取遗传工具变量。通过逆方差加权法孟德尔随机化模型分析替格瑞洛及其主要活性代谢物AR-C124910XX与药物适应证（冠状动脉疾病、不稳定型心绞痛、心肌梗死、卒中和缺血性卒中）的因果关系，作为遗传工具变量的阳性控制内容。进一步使用该方法分析替格瑞洛与细菌感染、急性下呼吸道感染、细菌性肺炎、肺炎、急性上呼吸道感染、脓毒症的因果关系，并用异质性检验、水平基因多效性检验来评估结果的稳健性。**结果** 遗传代理的替格瑞洛稳态药时曲线下面积（AUCss）增加可以显著降低冠状动脉疾病、心肌梗死、不稳定型心绞痛的发生风险（$P<0.001$），而其主要活性代谢物AR-C124910XX的AUCss遗传工具变量未能通过阳性控制。进一步分析显示，遗传代理的替格瑞洛AUCss的增加可以潜在地降低细菌感染[OR（95%CI）=0.80（0.65，0.99），$P=0.040$]和脓毒症[OR（95%CI）=0.84（0.73，0.98），$P=0.023$]的发生风险。异质性检验结果表明，遗传代理的替格瑞洛AUCss与细菌感染、脓毒症的因果关联不存在异质性（$P>0.05$）。水平基因多效性检验结果表明，遗传代理的替格瑞洛AUCss与细菌感染、脓毒症的因果关联不存在水平基因多效性的影响（$P>0.05$）。**结论** 替格瑞洛具有潜在的降低脓毒症和细菌感染风险的作用。

关键词 替格瑞洛；感染；孟德尔随机化；全基因组关联分析；因果推断；脓毒症

Association of ticagrelor with risk of infection: a two-sample Mendelian randomization study based on the GWAS database

XU Guifeng[1,2], WU Yonglin[2,3], GUO Gongjie[1,2], HUANG Junhong[4], XIE Zhipeng[1,2], LUO Wenwei[2], ZHONG Shilong[2,5], LAI Weihua[1,2]（1. School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Dept. of Pharmacy, Guangdong Provincial People's Hospital/Guangdong Academy of Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510080, China; 3. College of Pharmacy, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 4. School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 5. Key Laboratory of Coronary Heart Disease Prevention and Treatment, Guangdong Provincial People's Hospital/Guangdong Academy of Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510080, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the causal association between ticagrelor and risk of infection **METHODS** Two-sample Mendelian randomization was adopted. Genetic instrumental variables were selected based on the results of the largest genome-wide association analysis to *in vivo* exposure of ticagrelor and its major active metabolite AR-C124910XX. The causal associations of ticagrelor and its major active metabolite AR-C124910XX with drug indications (coronary artery disease, unstable angina pectoris, myocardial infarction, stroke and ischemic stroke)were analyzed by inverse variance weighted Mendelian randomization model as a positive control for genetic instrumental variables. The causal relationship between ticagrelor and bacterial infection, acute lower respiratory infection, bacterial pneumoniae, pneumoniae, acute upper respiratory infection and sepsis were further analyzed by using this method, and the robustness of the results was assessed by using heterogeneity tests and horizontal pleiotropy tests. **RESULTS** The increase of area under the curve at steady state (AUCss) of the genetic surrogated ticagrelor significantly reduced the risk of coronary artery disease, myocardial infarction and unstable angina pectoris

Δ**基金项目** 国家自然科学基金资助项目（No.81872934）；广东省重点领域研发计划项目（No.2019B020229003）；广东省基础与应用基础研究基金项目（No.2021A1515220031）；广州市科技计划项目（No.202002030415）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：心血管药理学。E-mail：xuguifeng_mark@163.com

＃**通信作者** 主任药师，硕士生导师，硕士。研究方向：心血管药理学。电话：020-83827812-60249。E-mail：laiweihuax@163.com

($P<0.001$). AUCss genetic instrument variables of its main active metabolite AR-C124910XX failed to pass positive control. Further analysis showed that the increase of the genetic surrogated ticagrelor exposure suggestively reduced the risk of bacterial infection [OR(95%CI)=0.80(0.65,0.99),$P=0.040$] and sepsis [OR (95%CI)=0.84(0.73, 0.98), $P=0.023$]. The results of the heterogeneity tests showed that there was no heterogeneity in the causal association of the genetic surrogated ticagrelor AUCss with bacterial infection and sepsis ($P>0.05$). The results of horizontal pleiotropy tests showed that the causal association of genetic surrogated ticagrelor AUCss with bacterial infection and sepsis had no effects on horizontal pleiotropy ($P>0.05$). **CONCLUSIONS** Ticagrelor has a potential role in reducing the risk of sepsis and bacterial infections.

KEYWORDS ticagrelor; infection; Mendelian randomization; genome-wide association analysis; causal inference; sepsis

冠心病是严重危害人类健康的心血管疾病，斑块破裂、血小板异常激活是冠心病发病过程中的关键环节，抗血小板治疗是冠心病治疗的重要手段[1]。为改善患者预后，国内外指南均建议采用P2Y12受体抑制剂联合阿司匹林作为急性冠状动脉综合征（acute coronary syndrome，ACS）或冠心病患者经皮冠状动脉介入治疗（percutaneous coronary intervention，PCI）后的双联抗血小板治疗方案。而在P2Y12受体抑制剂中，相比氯吡格雷，经替格瑞洛治疗后患者的心血管结局更好，但出血风险更高[2]。目前，P2Y12受体抑制剂的选用主要基于心血管结局和出血风险，而感染结局如脓毒症、肺炎亦对患者的生命健康有着重要影响[3-5]，但目前已有的研究鲜少将感染结局纳入考虑。

一项考察替格瑞洛治疗ACS患者疗效和安全性的大型多中心、随机双盲试验（PLATO试验）显示，与氯吡格雷比较，在替格瑞洛治疗期间，ACS患者发生肺炎和因肺炎、脓毒症而死亡的风险更低[3]。另有试验表明，与氯吡格雷比较，替格瑞洛能降低患者PCI术后肺炎、金黄色葡萄球菌菌血症和脓毒症的发生风险[4]。也有研究显示，与单用阿司匹林比较，冠状动脉搭桥手术前采用阿司匹林联合氯吡格雷会增加患者术后感染风险[5]，而替格瑞洛是否也有同样的作用不得而知。总体而言，目前替格瑞洛改善感染结局的临床效用并未明确。

孟德尔随机化利用遗传变异作为工具变量，可用来评估暴露与结局之间的因果关系，其中两样本孟德尔随机化中的暴露文件和结局文件来自2个不同的队列[6]。孟德尔随机化与药物基因组学联用，即利用可以预测药物药动学或药效学参数的遗传变异作为工具变量，将有助于药物的再利用和药物副作用的预测[7]。以往的研究均局限于替格瑞洛和氯吡格雷治疗心血管疾病时感染结局的对比，且以回顾性分析为主[3-4]，本研究通过两样本孟德尔随机化来预测替格瑞洛在临床上是否具有改善感染结局的效用，为临床P2Y12受体抑制剂的选用及替格瑞洛的药物再利用提供依据。

1 资料与方法

1.1 数据来源

本研究采用的暴露数据为ACS患者使用替格瑞洛后药物及其主要活性代谢物AR-C124910XX的稳态药时曲线下面积（area under the curve at steady state，AUCss）的全基因组关联研究（genome-wide association study，GWAS）结果[8]。该研究纳入了3 753例患者（以欧洲人为主），校正协变量包括：前4个遗传主成分、性别、年龄、体质量、吸烟、高血压、慢性肾脏疾病、CABG手术史、指数事件的最终诊断、联合使用中度CYP3A诱导剂、联合使用中度CYP3A抑制剂。该研究共鉴定出6个与替格瑞洛的AUCss、2个与AR-C124910XX的AUCss全基因组显著相关的基因突变位点作为遗传工具变量（表1）。结局文件主要包括替格瑞洛适应证及感染相关疾病的GWAS汇总数据，主要来源于欧洲的大型生物银行如UK biobank、Fingen，这些生物银行中的样本均多达数十万例，具有丰富的表型信息且招募的参与者均以欧洲人群为主。结局文件的主要信息如GWAS汇总数据在数据库中的编号、样本量、病例数、对照例数及感染相关表型的定义[以国际疾病分类第10版（International Classification of Diseases 10th edition，ICD-10）编码或相关描述表征]及GWAS中的其他信息等，见表2。

1.2 遗传工具变量的阳性控制

AUCss代表用药后的吸收总量，反映药物的吸收程度，与药效密切相关。因此，理论上药物的AUCss遗传工具变量具有预测药物治疗效果的潜力。为了验证所

表1 替格瑞洛及其主要活性代谢物AR-C124910XX的AUCss遗传工具变量

染色体	单核苷酸多态性位点	碱基位置	基因	参考等位基因	替代等位基因	次等位基因频率	样本例数	效应值	标准误	P	表型
7	rs62471956	99421085	*CYP3A43*	G	A	0.034	3 751	−0.211	0.027	1.07×10^{-14}	替格瑞洛的AUCss
7	rs188845491	99286639	*CYP3A7-CYP3A51P*	C	T	0.007	3 751	−0.495	0.071	3.16×10^{-12}	替格瑞洛的AUCss
7	rs147642358	98932759	*ARPC1A*	G	A	0.022	3 751	−0.250	0.036	5.51×10^{-12}	替格瑞洛的AUCss
7	rs140607780	100103523	*NYAP1*、*AGFG2*	G	A	0.016	3 751	−0.273	0.041	3.47×10^{-11}	替格瑞洛的AUCss
7	rs140104968	99543627	*GJC3*、*AZGP1*	C	T	0.019	3 751	−0.224	0.036	4.35×10^{-10}	替格瑞洛的AUCss
7	rs117038461	99841354	*GATS*	C	T	0.017	3 751	−0.232	0.038	9.40×10^{-10}	替格瑞洛的AUCss
4	rs61361928	69962375	*UGT2B7*	T	C	0.005	3 752	−0.385	0.051	7.70×10^{-14}	AR-C124910XX的AUCss
12	rs113681054	21402979	*SLCO1B1*、*SLCO1A2*	T	C	0.184	3 752	−0.062	0.009	3.63×10^{-13}	AR-C124910XX的AUCss

表2　两样本孟德尔随机化结局文件的主要信息

编号[a]	表型	ICD-10编码	样本例数	病例数	对照例数	PMID	其他
ebi-a-GCST005195	冠状动脉疾病	—	547 261	122 733	424 528	29212778	该研究属于跨种族Meta分析，详细信息可见原文献
ebi-a-GCST005843	缺血性卒中	—	440 328	34 217	406 111	29531354	该研究属于跨种族Meta分析，详细信息可见原文献
finn-b-I9_MI	心肌梗死	—	200 641	12 801	187 840	NA	纳入协变量为性别、年龄、前10个遗传主成分、基因分型批次
ebi-a-GCST006906	卒中	—	446 696	40 585	406 111	29531354	该研究属于跨种族Meta分析，详细信息可见原文献
finn-b-I9_UAP	不稳定型心绞痛	—	204 688	7 058	197 630	NA	纳入协变量为性别、年龄、前10个遗传主成分、基因分型批次
ieu-b-4980	脓毒症	A02、A39-A41	486 484	11 643	474 841	NA	纳入协变量为性别、年龄、前10个遗传主成分、芯片
Finn-b-J10_PNEUMOBACT	细菌性肺炎[b]	NA	196 855	7 987	188 868	NA	纳入协变量为性别、年龄、前10个遗传主成分、基因分型批次
finn-b-J10_UPPERINFEC	急性上呼吸道感染	J06	218 792	35 847	182 945	NA	纳入协变量为性别、年龄、前10个遗传主成分、基因分型批次
finn-b-AB1_BACTINF_NOS	细菌感染	A48-A49	218 637	20 977	197 660	NA	纳入协变量为性别、年龄、前10个遗传主成分、基因分型批次
finn-b-J10_ACUTELOWERNAS	急性下呼吸道感染	J22	210 961	2 272	208 689	NA	纳入协变量为性别、年龄、前10个遗传主成分、基因分型批次
finn-b-J10_PNEUMONIA	所有肺炎[c]	NA	218 792	27 370	191 422	NA	纳入协变量为性别、年龄、前10个遗传主成分、基因分型批次

a：GWAS汇总数据集在IEU OpenGWAS project数据库里的编号；PMID：PubMed唯一标识码；—：不适用；NA：不存在；b：由细菌感染引起的肺实质炎症；c：由细菌、病毒、真菌或支原体感染引起的肺实质炎症

选遗传工具变量的适用性，本研究以冠状动脉疾病、不稳定型心绞痛、心肌梗死、卒中、缺血性卒中作为结局指标进行阳性对照分析。ACS和缺血性卒中是替格瑞洛的主要适应证，其中ACS包含不稳定型心绞痛和心肌梗死，而无既往心肌梗死史和卒中史的冠状动脉疾病是替格瑞洛药品说明书上新增加的适应证。

1.3　统计学分析

本研究采用逆方差加权法孟德尔随机化模型分析暴露与结局的因果效应。孟德尔随机化中所用的遗传工具变量需要满足以下3个假设：(1)遗传工具变量与暴露相关；(2)遗传工具变量与混杂(即影响暴露与结局关联关系的变量)相互独立；(3)遗传工具变量只能通过暴露来影响结局。将选择的遗传工具变量与结局指标的GWAS汇总数据相匹配，调整暴露与结局所用遗传工具变量的效应等位基因至一致。本模型先采用系数比法(Wald法)计算各个遗传工具变量对应的因果效应值(遗传工具变量对结局、暴露的效应值之比)，然后用固定效应的逆方差加权法来整合每个遗传工具变量对应的因果效应值，计算出暴露与结局的最终因果效应值，并用森林图可视化最终的因果关联分析结果，而每个遗传工具变量对结局、暴露的效应值用散点图进行可视化。当所有的遗传工具变量均有效或者几乎不存在水平基因多效性时，采用逆方差加权法孟德尔随机化模型可以提供较小偏倚的因果估计值[9]。对于替格瑞洛是否改善感染结局采用Bonferroni校正法进行结果分析。将$P<0.008$的关联[$P=0.05/6$(6个结局指标)]定义为暴露与结局存在显著的因果关系，将$0.008\leqslant P<0.05$的关联定义为暴露与结局存在潜在的因果关系。为进一步评估孟德尔随机化分析结果的稳健性，对$P<0.05$的结果进行敏感性分析。采用全局Q检验分析是否存在异质性，采用MR-PRESSO全局检验、MR-Egger截距项检验来评估是否存在水平基因多效性[10—11]。以上分析均采用R 4.1.0软件中的TwoSampleMR软件包、MR-PRESSO软件包来完成。

2　结果

2.1　遗传工具变量的阳性控制分析结果

为了验证所选遗传工具变量的有效性，本研究首先对替格瑞洛及其主要活性代谢物AR-C124910XX的AUCss与药物适应证做了孟德尔随机化分析。遗传工具变量的阳性控制结果显示，遗传代理的替格瑞洛AUCss及其适应证的关联与临床实际基本相符(图1)，而其主要活性代谢物AR-C124910XX的AUCss遗传工具变量未能通过阳性控制，可能受限于遗传工具变量数量过少。具体而言，遗传代理的替格瑞洛AUCss增加可以显著降低冠状动脉疾病[OR(95%CI)=0.81(0.75，0.88)]，$P=1.41\times10^{-6}$)、心肌梗死[OR(95%CI)=0.60(0.45，0.81)，$P=8.07\times10^{-4}$]、不稳定型心绞痛[OR(95%CI)=0.38(0.26，0.55)，$P=5.77\times10^{-7}$]的发生风险，而遗传代理的替格瑞洛AUCss与卒中、缺血性卒中发生风险的关联并未达到显著水平($P>0.05$)，但效应方向与现有临床结论相一致。后续将只分析替格瑞洛AUCss与感染相关表型的因果关联。

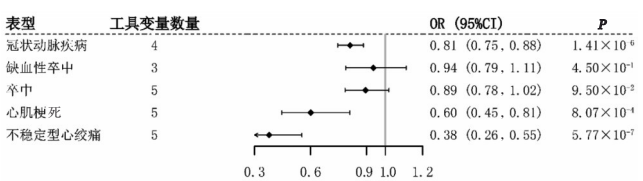


图1　替格瑞洛AUCss与其适应证的因果关系森林图

2.2　替格瑞洛改善感染结局的因果分析结果

两样本孟德尔随机化分析结果显示，遗传代理的替格瑞洛AUCss的增加可以潜在地降低细菌感染[OR(95%CI)=0.80(0.65，0.99)，$P=0.040$]和脓毒症[OR(95%CI)=0.84(0.73，0.98)，$P=0.023$]的发生风险，而遗传代理的替格瑞洛AUCss与其他感染表型不存在名义上的显著关联($P>0.05$)，见图2。对于上述存在提示性因果关联的结果，进一步用散点图对所用的每个遗传工

具变量对应的因果效应值进行可视化(图3)。为了进一步考察因果关联的稳健性,本研究进行了异质性检验和水平基因多效性检验。异质性检验结果表明,遗传代理的替格瑞洛AUCss与细菌感染(P=0.86)、脓毒症(P=0.77)的因果关联不存在异质性。分别用MR-Egger截距项检验和MR-PRESSO全局检验进行水平基因多效性检验,结果表明,遗传代理的替格瑞洛AUCss与细菌感染($P_{MR\text{-}Egger}$=0.42,$P_{MR\text{-}PRESSO}$=0.94)、脓毒症($P_{MR\text{-}Egger}$=0.37,$P_{MR\text{-}PRESSO}$=0.72)的因果关联不存在水平基因多效性的影响。

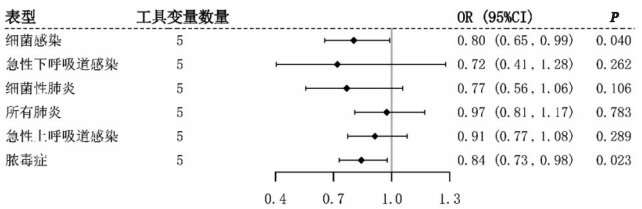


图2　替格瑞洛AUCss与感染相关表型的因果关系森林图

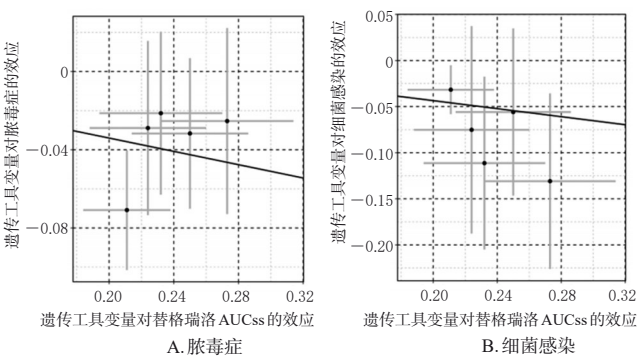


图3　替格瑞洛AUCss对脓毒症和细菌感染的因果效应散点图

3　讨论

本研究采用两样本孟德尔随机化探讨替格瑞洛与感染结局的因果关联,所得结果支持替格瑞洛具有潜在的降低细菌感染和脓毒症风险的作用,而该药与其他感染事件包括呼吸道感染和肺炎的关联仍需进一步研究。

替格瑞洛是否改善感染结局在各研究中的结论并不统一[3-5,12],较少体内外实验证据的呈现及随机对照试验的缺乏使得替格瑞洛是否改善感染结局难以最终确定并在临床上得到应用。迄今为止,支持替格瑞洛改善感染结局的观察性研究主要是基于原有随机对照试验数据,且以与同类药物氯吡格雷比较为主。本研究运用证据等级介于随机对照试验和观察性研究之间的两样本孟德尔随机化方法,聚焦替格瑞洛本身是否可以改善感染结局,结果发现替格瑞洛具有潜在的降低脓毒症、细菌感染风险的作用。有动物实验表明,替格瑞洛对小鼠腹腔脓毒症模型具有改善作用[13]。脓毒症是机体对感染反应失调引起的威胁生命的器官功能障碍,其发生发展与免疫反应的平衡密切相关[14]。替格瑞洛可能有多种潜在机制介导了其降低脓毒症风险。首先,作为强效的P2Y12抑制剂,替格瑞洛可以降低试验性内毒素血症患者的炎症反应强度[15]。其次,替格瑞洛对细胞腺苷再摄取的抑制增强了腺苷对中性粒细胞趋化和吞噬的影响[16]。此外,替格瑞洛对革兰氏阳性菌的直接抗菌作用也被一些研究所证实[17]。替格瑞洛从直接的抗革兰氏阳性菌到可调节免疫反应的一系列研究,为其降低细菌感染和脓毒症发生风险提供了理论依据。

本研究的优势:(1)本研究基于两样本孟德尔随机化来分析替格瑞洛与感染风险的因果效应,可以有效避免观察性研究中难以避免的各种混杂因素(包括难以测量的混杂因素)对关联结果的影响,且分析结果的证据等级高于观察性研究(包括病例对照研究)。(2)本研究基于替格瑞洛AUCss的GWAS汇总数据来选择孟德尔随机化分析所需的遗传工具变量,能为替格瑞洛新适应证的识别提供可靠的依据。因为替格瑞洛在体内具有多种作用机制,其发挥改善感染结局的机制并不局限于对P2Y12受体抑制后的效果,因此用替格瑞洛的体内暴露量作为孟德尔随机化分析中的暴露数据才能更有效地识别其与改善感染结局的因果效应。(3)遗传工具变量的有效性是经过严格的阳性控制的,本研究先分析遗传代理的替格瑞洛AUCss与其各种适应证的关系,而结果也与临床实际相符合,这有力地支持了所用遗传工具变量的有效性,使后续分析得出的替格瑞洛AUCss与感染指标的因果关联结果更为可信。

本研究也存在一些局限:(1)所用的暴露人群和结局人群主要是欧洲人,相一致的人群在减少种族差异可能带来偏差的同时,也将结果的普适性更多地限制在了欧洲人群。(2)结局人群并非是均服用替格瑞洛的人群,在药物基因组学与孟德尔随机化的联用过程中,这可能会稀释因果效应。(3)尽管本研究采用迄今为止最大规模的替格瑞洛AUCss的暴露数据,后续研究仍然需要进一步扩大样本量为替格瑞洛AUCss的遗传影响提供更准确的评估。(4)该研究局限于单一的暴露和结局数据,需要进一步用其他GWAS汇总数据进一步验证所得结论。

综上所述,本研究通过两样本孟德尔随机化分析揭示了替格瑞洛具有潜在的降低细菌感染和脓毒症风险的作用,为替格瑞洛在改善感染结局方面的效用提供了新见解。

参考文献

[1] VIRANI S S, ALONSO A, BENJAMIN E J, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2020, 141(9): e139-e596.

[2] CAPODANNO D, ALFONSO F, LEVINE G N, et al. ACC/AHA versus ESC guidelines on dual antiplatelet therapy[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(23): 2915-2931.

[3] STOREY R F, JAMES S K, SIEGBAHN A, et al. Lower mortality following pulmonary adverse events and sepsis with ticagrelor compared to clopidogrel in the PLATO study[J]. Platelets, 2014, 25(7): 517-525.

（下转第867页）