

中国汉族人群 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性对华法林用药的影响*

王欣俞¹, 王德辉¹, 刘淑娟², 黄 丹³ (1. 黑龙江省监狱管理局中心医院检验科, 哈尔滨 150009;
2. 大庆市第二医院检验科, 黑龙江大庆 163461; 3. 自贡市妇幼保健院检验科, 四川自贡 643000)

摘要:目的 探讨中国汉族人群细胞色素氧化酶 P450 2C9(CYP2C9)基因以及维生素 K 环氧化物还原酶复合体 1 (VKORC1)基因多态性对华法林用药的影响。方法 首先抽取无抗凝障碍的汉族人群受试者 200 例利用基因测序法进行 CYP2C9 和 VKORC1 基因分型(正常对照组)。并收集临床使用华法林稳定维持剂量的汉族人群患者 114 例(服用华法林药物组),记录患者年龄、性别、身高、体质量以及体表面积等,检测基因型并结合体征差异及临床稳定剂量进行分析。结果 正常对照组的 CYP2C9 基因型检测有 CYP2C9 * 1 / * 1 型 186 例(93%),未发现 CYP2C9 * 1 / * 2 型, CYP2C9 * 1 / * 3 型 14 例(7%); VKORC1-1639A/G 基因型: AA 型 179 例(89.5%), GA 型 21 例(10.5%), 未发现 GG 型(0.0%); 服用华法林药物组的 CYP2C9 * 1 / * 1 型 104 例(91.2%), CYP2C9 * 1 / * 3 型 10 例(8.8%), CYP2C9 * 1 / * 1 型患者华法林平均维持剂量高于 CYP2C9 * 1 / * 3 型患者[(2.13±0.83)mg/d vs (1.61±1.17)mg/d, $P<0.05$]。VKORC1(-1639G>A)基因型检测有 102 例患者为突变纯合子 AA 型(89.5%), 12 例患者为杂合子 GA 型(10.5%), 未发现纯合子 GG 型患者, GA 型患者华法林平均维持剂量明显高于 AA 型[(3.34±1.07)mg/d vs (1.63±0.45)mg/d, $P<0.01$]。正常人群组与服用华法林药物组基因型在 CYP2C9 * 3(1075C/A) ($P=0.926$)和 VKORC1 -1639A/G 突变上的差异无统计学意义($P=0.812$)。结论 中国汉族人群存在 CYP2C9 * 3 A/C 和 VKORC1-1639G/A 的基因多态性,且不同基因型患者间华法林用量存在差异。

关键词:中国汉族人群;华法林;基因多态性;细胞色素氧化酶 P450 2C9(CYP2C9);维生素 K 环氧化物还原酶复合体 1(VKORC1)

中图分类号:Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)04-028-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.04.007

华法林是临床上常用的口服抗凝血药,但华法林的有效治疗剂量的范围狭窄且个体间差异显著。在缺乏基因类型和临床因素等信息的情况下预测患者所需的华法林剂量,初始剂量太低会有血栓风险,而过高则会导致过度抗凝和严重出血的危险。华法林抗凝治疗剂量的药物基因组学研究发现,决定华法林代谢和作用的两个主要基因细胞色素氧化酶 P450 2C9 (CYP2C9, 最为常见多态性 CYP2C9 * 1, CYP2C9 * 2 及 CYP2C9 * 3), 和维生素 K 环氧化物还原酶复合体 1(VKORC1, 最为常见多态性-1639A/G)的遗传变异型,很大程度上决定了华法林有效抗凝剂量的个体间差异^[1~7]。近年来,国内也有不少报道 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性和华法林剂量的关系,但是在整个中国人群中关于华法林给药方案的研究报道甚少。本研究旨在探讨中国汉族人群 CYP2C9 基因以及 VKORC1 基因多态性对华法林用药的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集黑龙江省监狱管理局中心医院检验科汉族人群 200 例无抗凝障碍受试者外周静脉血各 5 ml(EDTA 抗凝)。选取心内科、心外

科稳定服用华法林大于 3 个月的汉族人群患者 114 例,目标国际标准化比值(INR)为 1.5~3.0。排除标准:明确的出血性疾病,如活动性溃疡、支气管扩张等;肝肾功能不全;血液病、凝血系统障碍。血标本置于-4℃冰箱保存。

1.2 试剂与仪器 人血 DNA 提取试剂盒 DP318 (北京天根生化科技公司);所有引物均由上海生物工程技术有限公司合成;3130 基因测序分析系统配套试剂及仪器,基因分型 7300 型 PCR 扩增仪(ABI, 美国);DYY-8 型稳压稳流电泳仪(上海琪特分析仪器有限公司);Sorvall Legend Micro17 离心机(Thermo Electron Corporation);HH-W 211420 型电热恒温水箱(天津泰斯特仪器有限公司)。

1.3 方法 采集外周血的同时,收集以下数据:年龄、性别、身高、体质量、体表面积、华法林维持剂量以及最后 3 次测得的稳定 INR。

1.3.1 引物设计和合成: Primer5.0 设计引物 CYP2C9 * 1(野生型), CYP2C9 * 2(430 C>T), CYP2C9 * 3(1075 A>C)和 VKORC1-1639A/G。引物序列由上海英俊生物技术有限公司合成。PCR 扩增仪为 ABI 7300。

1.3.2 DNA 提取与 PCR 扩增

* 基金项目:中国科研用关键试剂联盟牛牛基因生物科技中心(2009BAK61B01)。

作者简介:王欣俞(1983—),女,本科,主管检验技师,从事分子生物学方向研究, Tel:18710037600, E-mail:532161952@qq.com。

1.3.2.1 DNA提取:收集到的血样,在1周内用TIANGEN血液基因组提取试剂盒(DP318)提取基因组DNA,置于-20℃冰箱保存,备用。

1.3.2.2 PCR扩增:PCR反应体系为25 μl, DNA 100 ng, 2×GC buffer 12.5 μl, 10 mmol/L dNTP 4 μl, 5 U/μl LA-Taq 酶 0.15 μl, 10 pmol/μl Primer F 和 Primer R 各 1 μl。PCR反应条件为95℃预变性 3 min, (95℃ 30 s, 57℃/54℃/58℃ 30 s, 72℃ 1 min)×30, cycles 72℃ 5 min, 4℃ hold。

1.3.3 DNA测序峰图识别及基因序列比对:DNA测序峰图使用识别软件 ChromasV1.5 进行分析,采用基因序列比对软件 BioEdit 7.2.1 进行序列比对分析。

1.4 统计学分析 所有数据用 SPSS 15.0 统计学软件处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用两样本 *t* 检验,华法林计量与年龄、体质量、身高、体表面积以及 INR 的关系用非参数 Spearman 等级相关分析。华法林剂量与其他变量之间的关系用多元线性回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本特征 本次试验共纳入了200例无抗凝障碍的中国汉族人群受试者及114例服用华法林抗凝的患者,正常对照组与服用华法林药物组之间的差异无统计学显著性意义,患者的基本情况见表1。

表1 患者基本情况

基本情况	样本(n=114)
年龄(岁)	58(17~89)
性别[n(%)]	
男性	50(43.9)
女性	64(56.1)
INR 比值[n(%)]	
1.5~2.0	87(76.3)
2.0~2.5	19(16.7)
2.5~3.0	8(7)
抗凝治疗指标[n(%)]	
瓣膜置换术后	90(78.9)
持续性心房颤动	18(15.8)
深静脉血栓	2(1.8)
肺栓塞	4(3.5)

2.2 基因型分布 经PCR扩增后ABI3130测序分析结果:200例无抗凝障碍受试者中CYP2C9 * 1/*1型186例(93%),未发现CYP2C9 * 1/*2

型和CYP2C9 * 1/*3型14例(7%)(图1)。VKORC1-1639A/G基因型:AA型179例(89.5%),GA型21例(10.5%)(图2),未发现GG型(0.0%)。性别和年龄分布的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

对于114例临床使用华法林的患者测序分析结果,CYP2C9基因型:*1/*1型104例(91.2%),*1/*3型10例(8.8%),未发现*2突变。VKORC1(-1639G>A)基因型检测有102例患者为突变纯合子AA型(89.5%),12例患者为杂合子GA型(10.5%),未发现纯合子GG型患者。正常人群组与服用华法林药物组基因型在CYP2C9 * 1/*3型($P = 0.926$)和VKORC1 -1639A/G($P = 0.812$)突变上的差异无统计学意义($P > 0.05$)。正常对照组与服用华法林药物组基因型分布见表2。

表2 正常对照组和服用华法林药物组基因型

基因型	n	基因频率(%)	等位基因频率	P
正常对照组 CYP2C9	200			
*1/*1	186	93	*1	0.931
*1/*2	0	0.0	*2	
*1/*3	14	7	*3	
服用华法林药物组	114			
*1/*1	104	91.2	*1	0.921
*1/*2	0	0.0	*2	
*1/*3	10	8.8	*3	
正常对照组 VKORC1H	200			
GG	0	0.0	G	0.812
GA	21	10.5	A	
AA	179	89.5		
服用华法林药物组	114			
GG	0	0.0	G	0.812
GA	12	10.5	A	
AA	102	89.5		

2.3 服用华法林计量与基因型比较 在114例患者中,女性的平均使用剂量为2.12 mg/d,男性的平均使用剂量为2.14 mg/d,两者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。非参数Spearman相关分析显示,华法林剂量与年龄呈显著的负相关($r = -0.27$; $P < 0.01$),与体质量、身高、体表面积呈正相关($r = 0.23, 0.19, 0.27$, 均 $P < 0.01$)。INR值与任一变量均不相关。CYP2C9 * 1/*3和VKORC1(-1639G>A)的不同基因型与所对应的年龄、性别比、体质量分布见表3。

表3 114例服用华法林患者不同基因型一般资料比较

基因型	n	男/女	年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	华法林用量($\bar{x} \pm s$,mg)	体质量($\bar{x} \pm s$,kg)	体表面积($\bar{x} \pm s$,m ²)
CYP2C9 * 1/*1	104	56/48	48.31±14.54	2.13±0.83	67.24±11.37	1.72±0.13
CYP2C9 * 1/*3	10	4/6	51.79±15.23	1.61±1.17	69.52±10.79	1.75±0.17
CYP2C9 * 3/*3	0	-	-	-	-	-
VKORC1 AA	102	53/49	50.47±14.18	1.63±0.45	65.38±12.61	1.69±0.18
VKORC1 GA	12	7/5	47.62±13.75	3.34±1.07	68.81±10.49	1.78±0.16
VKORC1 GG	0	-	-	-	-	-

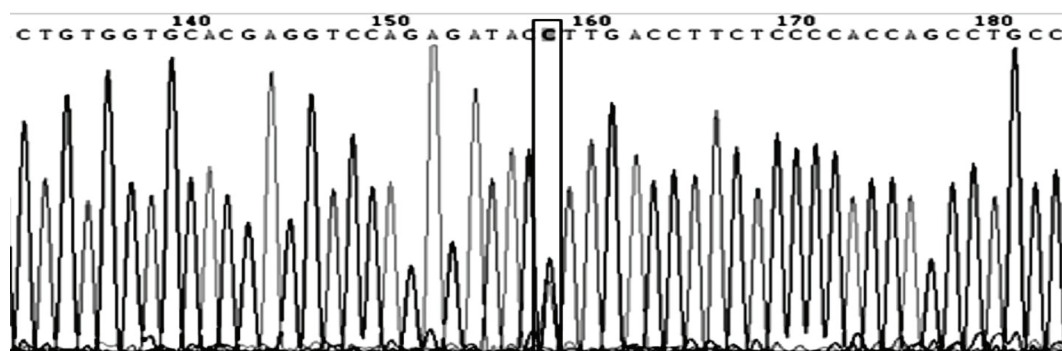


图1 CYP2C9 基因 *1/*3 杂合型

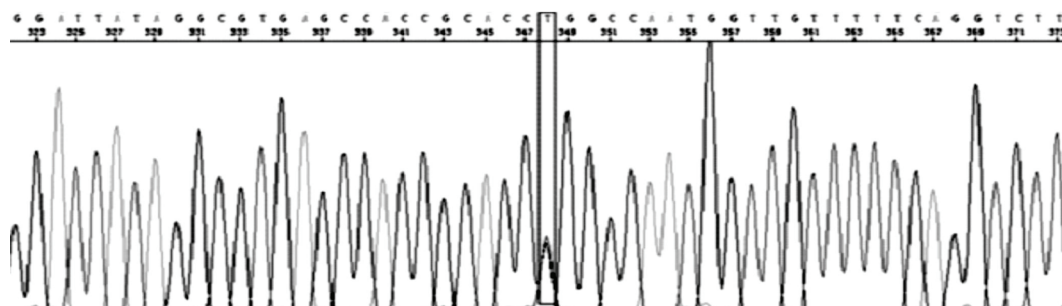


图2 VKORC1 基因 AG 型(反向互补序列)

VKORC1(-1639G>A)GA 组,华法林平均剂量明显高于 AA 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。CYP2C9 *1 野生型患者华法林平均剂量高于杂合子 *1/*3 型患者,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

多元线性回归分析提示:年龄、体质量以及 VKORC1 基因型分别解释了约 9.1%, 8.1%, 49.9% 的个体间剂量差异,而身高以及体表面积对华法林使用剂量影响差异无统计学意义($P > 0.05$),包括年龄、体质量、CYP2C9 以及 VKORC1 基因型的多变量模型能够很好地估计华法林剂量($r^2 = 0.679$; $P < 0.01$),其回归方程为 $D = 4.835 - 0.010 \times \text{年龄} + 0.021 \times \text{体质量} + 0.867 \times \text{CYP2C9} - 4.104 \times \text{VKORC1} - x_1 - 5.131 \times \text{VKORC1} - x_2$ 。

3 讨论 华法林作为广泛应用的口服抗凝药,抗凝治疗效果的差异往往是由于患者个体间差异导致的,治疗过程中容易出现抗凝不当,从而导致出血不良事件的发生^[1,3,7~8]。就与华法林药理学及药效学有关的遗传因素的研究及临床实验数据事实显示:CYP2C9 基因型解释了约 1.9% 的个体剂量差异,CYP2C9 *1/*1 型患者的华法林平均剂量高于杂合子 *1/*3 型患者($P < 0.05$),这可能由于 CYP2C9 不同基因型所引起的酶活性不一致有关^[9~11]。Yin 等^[12]认为,华法林的个体用药差异主要是由 VKORC1 的多态性所决定,是 CYP2C9 基因突变效应的 3 倍。

本研究结果显示:VKORC1(-1639)AA 基因型的患者所需华法林剂量显著低于 GA 型患者($P <$

0.01),CYP2C9 *1/*1 型患者华法林平均剂量高于杂合子 *1/*3 型患者($P < 0.05$)。进一步验证了杨剑等^[13,8]的 VKORC1-1639A/G 和 CYP2C9 的突变会明显影响服用华法林的用量。Bodin 等^[14]在健康志愿者中研究发现 VKORC1 基因型能够解释 37% 的华法林个体剂量差异。Wadelius 等^[15]的研究显示,VKORC1 基因型能够解释 29% ~ 30% 的华法林个体剂量差异。本研究提示 VKORC1 基因型能够解释约 52% 的个体剂量差异。与张亚楠等^[8,13]国内研究结果相似。

本研究提示患者的年龄、体质量、CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性解释了约 67% 的华法林剂量差异。在男性和女性患者中华法林剂量差异无统计学意义,性别对回归模型没有做出显著性的贡献($P = 0.735$)。都丽萍^[16]就 190 例临床使用华法林的患者研究结果明示患者的年龄、体质量、CYP2C9 及 VKORC1 基因型解释了约 55.9% 的个体用药剂量差异,而身高对华法林剂量影响的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

本研究结果发现,超过 33% 的个体剂量差异无法解释,在一定程度上可能与并发的疾病以及合并用药有关。也许与其他的一些遗传因素也有关,比如载脂蛋白 E 的基因多态性^[17~18]。多药耐药基因 MDR1^[19],编码维生素 K 依赖凝固因子的基因^[20],还有编码其他的 VKOR 复合体的基因,如 GGCX^[21],mEH^[22],CALU^[23],有待进一步研究。本研究提示用年龄、体质量、CYP2C9 和 VKORC1 基因型的多变量模型能够估计华法林的维持剂量,

都丽萍等^[16]亦提出包含遗传因素的华法林剂量预测模型比仅包含临床因素的模型预测效果更好,而这些因素在越来越多的给药方案中均列入考虑因素。这很明显的看出如能预计华法林用量,提前获得 INR 合适水平,将有利于临床治疗。

包括年龄、体质量、CYP2C9 以及 VKORC1 基因型的个体化给药方案需要得到进一步的临床研究。如果临床研究显示这种方案能够提高治疗的效果,那么成功的新的给药方案将会依赖于能够快速而简便的检测基因型。预测个体的华法林剂量,并配合抗凝药实践,可缩短达到稳定剂量的时间,帮助临床医生更好地合理应用华法林,从而减少出血不良事件的发生,具有积极的临床意义。

参考文献:

- [1] Tan GM, Wu E, Lam YY, et al. Role of warfarin pharmacogenetic testing in clinical practice[J]. Pharmacogenomics, 2010, 11(3): 439-448.
- [2] Mahajan P, Meyer KS, Wall GC, et al. Clinical applications of pharmacogenomics guided warfarin dosing [J]. Int J Clin Pharm, 2013, 35(3): 359-368.
- [3] Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing[J]. Clin Pharmacol Ther, 2011, 90(4): 625-629.
- [4] Food and Drug Administration. Coumadin Labeling. Updated January 22, 2010. Available at: FDA. Accessed October 2, 2011.
- [5] WarfarinDosing. org. Accessed October 2, 2011.
- [6] Gong IY, Tirone RG, Schwarz UI, et al. Prospective evaluation of a pharmacogenetics-guided warfarin loading and maintenance dose regimen for initiation of therapy[J]. Blood, 2011, 118(11): 3163-3171.
- [7] Burmester JK, Berg RL, Yale SH, et al. A randomized controlled trial of genotype-based coumadin initiation [J]. Genet Med, 2011, 13(6): 509-518.
- [8] 张亚楠, 崔 炜, 韩 梅, 等. 河北省汉族人群 CYP450 2C9 和 VKORC1 基因多态性与华法林剂量相关性研究[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(2): 218-222.
Zhang YN, Cui W, Han M, et al. Gene polymorphism of CYP450 2C9 and VKORC1 in Chinese population and their relationships to the maintaining dosage of warfarin[J]. Chin J Epidemiol, 2010, 31(2): 218-222.
- [9] Loebstein R, Yonath H, Peleg D, et al. Interindividual variability in sensitivity to warfarin-nature or nurture? [J]. Clin Pharmacol Ther, 2001, 70(2): 159-164.
- [10] Hillman MA, Wilke RA, Caldwell MD, et al. Relative impact of covariates in prescribing warfarin according to CYP2C9 genotype[J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(8): 539-547.
- [11] Kamali F, Khan TI, King BP, et al. Contribution of age, body size, and CYP2C9 genotype to anticoagulant response to warfarin[J]. Clin Pharmacol Ther, 2004, 75(3): 204-212.
- [12] Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1-rationale and perspectives[J]. Thromb Res, 2007, 120(1): 1-10.
- [13] 杨 剑, 缪丽燕, 黄晨蓉, 等. 细胞色素氧化酶 P450 2C9 以及维生素 K 环氧化物还原酶复合体 1 基因多态性对华法林抗凝疗效的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2008, 36(2): 137-140.
Yang J, Miao LY, Huang CR, et al. Association between CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and warfarin dose requirements[J]. Chin J Cardiol, 2008, 36(2): 137-140.
- [14] Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, et al. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotype as determinants of acenocoumarol sensitivity[J]. Blood, 2005, 106(1): 135-140.
- [15] Wadelius M, Chen LY, Downes K, et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose[J]. Pharmacogenomics J, 2005, 5(4): 262-270.
- [16] 都丽萍. 中国汉族人 CYP2C9 & VKORC1 基因多态性及其与华法林个体化治疗的相关性研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2009.
Du LP. The association of CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms and individualized warfarin therapy in population of han nationality in China[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2009.
- [17] Kohnke H, Sorlin K, Granath G, et al. Warfarin dose related to apolipoprotein E (APOE) genotype [J]. Eur J Clin Pharmacol, 2005, 61(5/6): 381-388.
- [18] Sconce EA, Daly AK, Khan TI, et al. APOE genotype makes a small contribution to warfarin dose requirements[J]. Pharmacogenet Genomics, 2006, 16(8): 609-611.
- [19] Wadelius M, Sorlin K, Wallerman O, et al. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors[J]. Pharmacogenomics J, 2004, 4(1): 40-48.
- [20] Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S, et al. Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X protein S and C and gamma-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity[J]. Blood, 2004, 103(7): 2630-2635.
- [21] Chen LY, Eriksson N, Gwillian R, et al. Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) microsatellite and warfarin dosing[J]. Blood, 2005, 106(10): 3673-3674.
- [22] Loebstein R, Vecsler M, Kurnik D, et al. Common genetic variants of microsomal epoxide hydrolase affect warfarin dose requirements beyond the effect of cytochrome P450 2C9 [J]. Clin Pharmacol Ther, 2005, 77(5): 365-372.
- [23] Vecsler M, Loebstein R, Almog S, et al. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin[J]. Thromb Haemost, 2006, 95(2): 205-211.