

VKORC1-1639 G/A、CYP2C9*3 基因多态性对华法林使用剂量的影响

皮婷, 向盈盈, 夏洪颖, 梁月琴(昆明医科大学附属延安医院, 昆明 650051)

摘要: 目的 基于 VKORC1-1639 G/A 及 CYP2C9*3 的基因多态性初步探讨华法林的使用剂量。方法 收集 2016 年 10 月—2018 年 2 月进行华法林用药指导相关基因检测的 100 例患者, 记录患者基本信息(身高、体重等)。采用数字荧光分子杂交检测 VKORC1-1639 G/A, CYP2C9*3 的基因型分布, 并结合患者年龄、身高、体重等, 根据国际华法林药物基因组学联合会(IWPC)公式计算患者华法林理论剂量。结果 VKORC1-1639 G/A AA、AG、GG 基因型实际频率分别为 84%, 15%, 1%; 等位基因 A, G 频率分别为 91.5%, 8.5%。CYP2C9*3 AA 型、AC 型、CC 型实际频数分别为 91%, 9%, 0%; 等位基因 A, C 频率分别为 95.5%, 4.5%。不同 VKORC1-1639 G/A, CYP2C9*3 基因型华法林理论用量不同, VKORC1-1639 G/A AA 型并 CYP2C9*3 AA 型和 VKORC1-1639 G/A AG 型并 CYP2C9*3 AA 型患者华法林剂量均高于 VKORC1-1639 G/A AA 型并 CYP2C9*3 AC 型患者; VKORC1-1639 G/A AG 型并 CYP2C9*3 AA 型患者华法林用量高于 VKORC1-1639 G/A AA 型并 CYP2C9*3 AA 型患者, 3 组间两两比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 华法林代谢相关基因的基因多态性为 VKORC1-1639 G/A AA 及 CYP2C9*3 AA 型占多数, 表明 VKORC1-1639 G/A 基因突变率高, CYP2C9*3 基因突变率较低, 且两者多态性影响个体间华法林的理论剂量。

关键词: 华法林; 血栓疾病; 维生素 K 环氧化物还原酶复合物 1; 细胞色素 P450 酶 2C9; 基因多态性; 个体差异; 药学服务

中图分类号: R969.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2019)20-2580-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.20.019

引用本文: 皮婷, 向盈盈, 夏洪颖, 等. VKORC1-1639 G/A、CYP2C9*3 基因多态性对华法林使用剂量的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2580-2583.

Influence of VKORC1-1639 G/A, CYP2C9*3 Polymorphism on Warfarin Dose

PI Ting, XIANG Yingying, XIA Hongying, LIANG Yueqin(Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650051, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the use of warfarin on the basis of gene polymorphisms of VKORC1-1639 G/A and CYP2C9*3. **METHODS** The 100 patients from October 2016 to February 2018 for warfarin guidelines related to genetic testing were collected, recorded patients basic information (height, weight, etc.). The genotype distribution of VKORC1-1639 G/A and CYP2C9*3 was detected by digital fluorescent molecular hybridization(DFMH1), and the initial dose of warfarin was calculated according to the formula of international warfarin pharmacogenomics federation (IWPC) combined with the patient's age, height and weight. **RESULTS** The actual frequencies of VKORC1-1639 G/A AA, AG and GG genotypes were 84%, 15% and 1% respectively, frequencies of allele A and G were 91.5% and 8.5%. The actual frequencies of CYP2C9*3 AA, AC and CC were 91%, 9% and 0% respectively, frequencies of allele A and C were 95.5% and 4.5%. Different VKORC1-1639G/A, CYP2C9*3 genotype warfarin dosage was different, warfarin dosage was higher in the two group of VKORC1-1639G/A AA & CYP2C9*3 AA and VKORC1-1639G/A AG & CYP2C9*3 AA, than VKORC1-1639 G/A AA & CYP2C9*3 AC group. Warfarin dosage was higher in the group of VKORC1-1639 G/A AA & CYP2C9*3 AA, than VKORC1-1639 G/A AG & CYP2C9*1/*1 group, and the differences were statistically significant($P < 0.05$). **CONCLUSION** The majority of warfarin metabolic related genes are VKORC1-1639 G/A AA & CYP2C9*3 AA group, indicating high mutation rate of VKORC1-1639 G/A. The mutation rate of CYP2C9*3 is low, and its polymorphism affects the dose of warfarin among individuals.

KEYWORDS: warfarin; thrombotic disease; vitamin K epoxide reductase complex 1; cytochrome P450 enzyme 2C9; gene polymorphism; individual differences; pharmaceutical care

华法林是一种双香豆素衍生物, 主要用于静脉血栓栓塞病的一级和二级预防, 心房颤动血栓栓塞的预防, 瓣膜病, 人工瓣膜置换术等疾病, 通过抑制维生素 K 及其 2,3-环氧化物(维生素 K 环

氧化物)的相互转化而发挥抗凝作用。华法林有着严格的治疗窗, 剂量不足时难以达到预期抗凝效果, 而剂量过大则可引起出血。造成华法林个体差异性大的原因主要是遗传因素和非遗传因素影

作者简介: 皮婷, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0871)63211135

E-mail: 308720051@qq.com

• 2580 • Chin J Mod Appl Pharm, 2019 October, Vol.36 No.20

中国现代应用药学 2019 年 10 月第 36 卷第 20 期

响^[1],其中细胞色素 P450 酶 2C9(cytochrome P-450 2C9, CYP2C9)多态性及维生素 K 环氧化物还原酶复合物 1 基因(vitamin K epoxidoreductase complex subunit, VKORC1)是近年来遗传因素方面的研究重点^[2]。随着临床药学的发展,国内外许多医院开始建立药师主导的抗凝门诊,临床药师也积极开展华法林抗凝评价相关的科研工作,如华法林抗凝强度影响因素的探讨^[3-4],华法林用药监护模型的探索^[5-6],很大程度上促进了华法林的临床合理应用。本课题组通过对华法林相关代谢基因检测的情况进行回顾性调查分析,并重点探讨 VKORC1-1639 G/A、CYP2C9*3 基因多态性分布特点及对华法林理论应用剂量的影响,为下一步开展个体化药学服务及临床药师干预和药学监护奠定基础,以更好地发挥华法林的治疗作用,减少其不良反应的发生。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2016 年 10 月—2018 年 2 月昆明医科大学附属延安医院所有进行华法林代谢相关基因检测的 100 例患者,其中男性 49 例,女性 51 例。记录患者基本信息,包括性别、年龄、身高、体质量等。

1.2 试剂与仪器

检测 VKORC1-1639 G/A、CYP2C9*3 基因多态性的核酸纯化试剂及测序反应通用试剂由北京华夏时代有限公司生产。TDZ5-WS 离心机(湘仪离心机仪器有限公司)。RT-Cycler436/TL998A 荧光检测仪(博奥生物科技有限公司/西安天隆科技有限公司),运行软件系统为荧光检测仪 V2.0.713/V1.0.28。

1.3 检测方法

采用数字荧光分子杂交(digital fluorescent molecular hybridization, DFMH1)检测 VKORC1-1639 G/A、CYP2C9*3 的基因型。

方法如下:①全血中加入 10×NH₄Cl 预处理液,裂解红细胞。②通过对血液样本反复上下颠倒、静置、离心,可得到沉淀在离心管底的丰富的白细胞。向其加入耀金保,反复吹打混匀。室温静置 20~30 min,期间颠倒混匀 2 次,待检测。③上样。根据需要检测的基因位点,取出相应耀金分试剂,向其加入 1.5 μL 处理后的白细胞样本(加样时应再次混匀,枪头在管内液体中间吸足

1.5 μL 的样本,加入量过少会直接影响结果)后短暂离心,准备上机检测。④根据荧光检测仪说明书进行检测操作,利用个体化药学服务平台 V1.0.3 进行结果分析判读。

1.4 统计学处理

所有数据采用 SPSS 统计软件对所有数据进行统计分析。群体代表性检验采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,由基因型频率计算等位基因频率;计量资料数据 $\bar{x} \pm s$ 表示;不同基因型间华法林剂量比较均先进行 Levene 方差齐性检验;2 组间均数比较采用 *t* 检验;多组间均数比较采用方差分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 平衡分析

对 VKORC1-1639G/A、CYP2C9*3 基因多态性分别进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,结果 χ^2 分别为 0.027(*P*>0.05)和 0.217 (*P*>0.05),见表 1~2。检验结果均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡,说明该样本具有该区域群体代表性。

表 1 VKORC1-1639G/A 基因的 Hardy-Weinberg 平衡分析(*n*=100)

Tab. 1 Hardy-Weinberg genetic balance analysis of the gene VKORC1-1639G/A(*n*=100) 例(%)

分析项	VKORC1-1639G/A			等位基因	
	AA	GA	GG	A	G
实际频数	84(84)	15(15)	1(1)	183/200	17/200
理论频数	83.7(83.7)	15.6(15.6)	0.7(0.7)	(91.5)	(8.5)

表 2 CYP2C9*3 基因的 Hardy-Weinberg 平衡分析(*n*=100)

Tab. 2 Hardy-Weinberg genetic balance analysis of the gene CYP2C9*3(*n*=100) 例(%)

分析项	CYP2C9*3			等位基因	
	AA	CA	CC	A	G
实际频数	91(91)	9(9)	0(0.0)	191/200	9/200
理论频数	91.2(91.2)	8.6(8.6)	0.2(0.2)	(95.5)	(4.5)

2.2 VKORC1-1639 G/A 基因多态性华法林理论剂量比较

本研究结果显示 VKORC1-1639 G/A GA 型患者的华法林理论剂量远高于 AA 型,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 3。

2.3 CYP2C9*3 基因多态性华法林理论剂量比较

本研究结果显示 CYP2C9*3 AA 型患者的华法林剂量高于 CA 型,且差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 4。

表3 不同 *VKORC1-1639 G/A* 基因型间华法林的使用剂量分析($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Comparison with warfarin dosage between *VKORC1-1639 G/A* polymorphism($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数/例	年龄/岁	身高/cm	体质量/kg	华法林剂量/mg·d ⁻¹
AA	83	61.05±14.32	163.02±7.86	60.46±10.69	2.80±0.66
GA	16	61.38±16.74	160.88±5.89	66.55±13.01	4.10±0.68
<i>F</i>		0.764	0.538	1.333	18.59
<i>P</i>		0.552	0.708	0.263	0.000

表4 不同 *CYP2C9*3* 基因型间华法林的使用剂量分析($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison with warfarin dosage between *CYP2C9*3* polymorphism($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数/例	年龄/岁	身高/cm	体质量/kg	华法林剂量/mg·d ⁻¹
AA	91	61.63±15.01	162.59±7.80	61.43±11.40	3.13±0.85
CA	9	53.56±8.75	163.00±4.95	60.67±9.85	2.12±0.48
<i>F</i>		2.502	0.023	0.038	12.38
<i>P</i>		0.117	0.879	0.846	0.001

2.4 不同 *VKORC1-1639 G/A*、*CYP2C9*3* 基因型华法林理论剂量比较

不同 *VKORC1-1639 G/A*、*CYP2C9*3* 基因型患者华法林理论剂量不同, *VKORC1-1639 G/A* AA 型并 *CYP2C9*3* AA 型和 *VKORC1-1639 G/A* AG 型合并 *CYP2C9*3* AA 型患者华法林理论剂量均高于 *VKORC1-1639 G/A* AA 型并 *CYP2C9*3* CA 型, *VKORC1-1639 G/A* AG 型并 *CYP2C9*3* AA 型患者华法林理论剂量又高于 *VKORC1-1639 G/A* AA 型并 *CYP2C9*3* AA 型患者, 为这 3 组中华法林理论剂量最高, 且 3 组之间两两比较, 差异有统计

学意义($P<0.05$)。结果见表 5。

表5 不同 *VKORC1-1639 G/A* 并 *CYP2C9*3* 基因型间华法林使用剂量分析($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Compared with warfarin dosage between different *VKORC1-1639 G/A* and *CYP2C9*3* genotypes($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数	华法林剂量/mg·d ⁻¹
<i>VKORC1-1639 G/A</i> AA 并 <i>CYP2C9*3</i> AA	75	2.89±0.63
<i>VKORC1-1639 G/A</i> AA 并 <i>CYP2C9*3</i> CA	8	2.04±0.44 ¹⁾
<i>VKORC1-1639 G/A</i> AG 并 <i>CYP2C9*3</i> AA	15	4.19±0.60 ¹⁾²⁾

注: 与 *VKORC1-1639 G/A* AA 并 *CYP2C9*3* AA 组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 *VKORC1-1639 G/A* AA 并 *CYP2C9*3* CA 组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with *VKORC1-1639 G/A* AA and *CYP2C9*3* AA, ¹⁾ $P<0.05$; compared with *VKORC1-1639 G/A* AA and *CYP2C9*3* CA, ²⁾ $P<0.05$ 。

2.5 不同年龄阶段 *VKORC1-1639 G/A*、*CYP2C9*3* 基因型华法林理论剂量比较

不同年龄阶段, 不同 *VKORC1-1639 G/A*、*CYP2C9*3* 基因型患者华法林理论剂量不同, 且不同 *VKORC1-1639 G/A*、*CYP2C9*3* 组型情况下, ≥ 60 岁组华法林理论剂量最小。结果显示不同年龄阶段或者相同 *VKORC1-1639 G/A*、*CYP2C9*3* 组型情况下, 两两比较, 均有统计学差异($P<0.05$)。结果见表 6。

3 讨论

华法林是价格低廉、疗效好的国际常用长效抗凝剂, 作为最古老的口服抗凝药物, 仍然是长期需要抗凝治疗患者的常用药物。但其服用剂量在不同的个体之间有明显差异, 且治疗窗窄、个体间剂量差异性大, 使得临床不易掌握华法林剂量。近年来, 药物基因组学的研究明确了基因多

表6 不同年龄阶段 *VKORC1-1639 G/A* 并 *CYP2C9*3* 基因型间华法林使用剂量分析($\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Compared with warfarin dosage between different *VKORC1-1639 G/A* and *CYP2C9*3* genotypes when different age($\bar{x} \pm s$)

年龄/岁	基因型	例数/例	华法林剂量/mg·d ⁻¹	<i>F</i>	<i>P</i>
20~39	<i>VKORC1-1639 G/A</i> AA 并 <i>CYP2C9*3</i> AA	8	4.20±0.34	14.22	0.002
	<i>VKORC1-1639 G/A</i> AG 并 <i>CYP2C9*3</i> AA	2	5.05±0.07		
40~59	<i>VKORC1-1639 G/A</i> AA 并 <i>CYP2C9*3</i> AA	21	3.11±0.48 ¹⁾	26.49	0.000
	<i>VKORC1-1639 G/A</i> AG 并 <i>CYP2C9*3</i> AA	4	4.50±0.27 ²⁾		
	<i>VKORC1-1639 G/A</i> AA 并 <i>CYP2C9*3</i> CA	4	2.00±0.26		
≥ 60	<i>VKORC1-1639 G/A</i> AA 并 <i>CYP2C9*3</i> AA	46	2.54±0.30 ¹⁾	70.99	0.000
	<i>VKORC1-1639 G/A</i> AG 并 <i>CYP2C9*3</i> AA	9	3.86±0.50 ²⁾		
	<i>VKORC1-1639 G/A</i> AA 并 <i>CYP2C9*3</i> CA	3	1.77±0.06 ³⁾		

注: 与 20~39 岁组 *VKORC1-1639 G/A* AA 并 *CYP2C9*3* AA 比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 20~39 岁组 *VKORC1-1639 G/A* AG 并 *CYP2C9*3* AA 组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与 40~59 岁组 *VKORC1-1639 G/A* AA 并 *CYP2C9*3* CA 组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with *VKORC1-1639 G/A* AA and *CYP2C9*3* AA in 20~39 years old group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with *VKORC1-1639 G/A* AG and *CYP2C9*3* AA in 20~39 years old group, ²⁾ $P<0.05$; compared with *VKORC1-1639 G/A* AA and *CYP2C9*3* CA in 40~59 years old group, ³⁾ $P<0.05$ 。

态性对华法林剂量差异的影响,主要取决于 2 个关键的靶点:华法林发挥效应的 *VKORC1* 及经肝脏代谢的 *CYP2C9*,且其抗凝效果也主要取决于 *VKORC1* 及 *CYP2C9* 的活性。*VKORC1* 及 *CYP2C9* 的活性在人群中呈遗传多态性分布,且这种遗传多态性具有明显的种族及地域差异。*CYP2C9**2 和 *CYP2C9**3 等位基因频率在高加索人群中分别是 8%~20%和 6%~10%;*CYP2C9**2 基因型亚洲人中占 1%~4%,在非裔美国人中占 1%~2%^[7-8],而中国人无 *CYP2C9**2 基因型^[9]。本研究结果显示,服用华法林患者 *VKORC1*-1639G/A 基因型 AA(84%)、GA(15%)、GG(1%),与 Yuan 等^[10]研究中国人的基因分布情况相一致。而 *CYP2C9**3 AA 型、AC 型、CC 型实际频数分别为 91%, 9%, 0%;等位基因频率 A(95.5%)、C(4.5%),数据表明 AA 占多数,由于本研究数据的局限性没有发现 CC 型。

在研究分析 *VKORC1*-1639G/A 基因型对华法林剂量的影响时,结果显示 *VKORC1*-1639 G/A GA 型患者的华法林理论剂量为 $(4.10\pm0.68)\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$,而 AA 型的患者华法林理论剂量为 $(2.80\pm0.66)\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$,差异有统计学意义($P<0.05$),由于本研究数据的局限性,*VKORC1*-1639 G/A 野生纯合 GG 型只有 1 例患者,故并未对该基因型华法林理论剂量进行分析比较。同时,不同 *VKORC1*-1639 G/A、*CYP2C9**3 基因型患者华法林理论剂量不同,*VKORC1*-1639G/A AA 型并 *CYP2C9**3 AA 型、*VKORC1*-1639G/A AG 型并 *CYP2C9**3 AA 型及 *VKORC1*-1639G/A AA 型并 *CYP2C9**3 CA 组患者华法林理论剂量,两两相比较,统计学差异明显($P<0.05$),且 *VKORC1*-1639 G/A AG 型并 *CYP2C9**3 AA 型患者华法林理论剂量最高,达到 $(4.19\pm0.60)\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$,而 *VKORC1*-1639 G/A AA 型并 *CYP2C9**3 CA 组患者华法林理论剂量最小,只有 $(2.04\pm0.44)\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 。*VKORC1*-1639 G/A 及 *CYP2C9**3 基因型多态性影响华法林药物代谢动力学和药物效应动力学,从而影响个体用药差异,也可说明不同基因型组合间华法林理论剂量将差异明显。本研究纳入的 100 例患者不同基因型个体间华法林理论剂量从 $1.5\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 到 $6\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 不等,可进一

步提示华法林的稳定剂量也将体现为个体化差异大,给临床用药带来很大不便。

综上所述,代谢酶相关基因 *CYP2C9* 和作用靶点基因 *VKORC1* 的基因多态性造成了个体对华法林剂量的差异,影响了华法林的安全有效使用。因此通过华法林代谢相关基因检测,针对患者不同的检测结果,科学指导临床华法林抗凝治疗,在发挥华法林抗凝作用同时,降低华法林抗凝过量带来的出血风险,达到个体化用药,是提高药物疗效,减少不良反应发生的必要手段。

REFERENCES

- [1] 中华医学会心血管病学分会. 华法林抗凝治疗的中国专家共识[J]. 中华内科杂志, 2013, 52(1): 76-82.
- [2] KOU H J, DENG J, ZHU C Z, et al. Effect of *CYP2C9* and *VKORC1* gene polymorphism on warfarin steady-state therapeutic dose and individual anticoagulation efficacy [J]. J Shanxi Med Univ(山西医科大学学报), 2017, 48(11): 1102-1107.
- [3] ABDEL-AZIZ M I, ALI M A, HASSAN A K, et al. Factors influencing warfarin response in hospitalized patients [J]. Saudi Pharm J, 2015, 23(6): 642-649.
- [4] XIANG Q, SU H H, MU G Y, et al. Retrospective analysis on correlation of drug interactions and pathological factors with warfarin efficacy [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2014(9): 822-824.
- [5] ENTEZARI-MALEKI T, DOUSTI S, HAMISHEHKAR H, et al. A systematic review on comparing 2 common models for management of warfarin therapy; pharmacist-led service versus usual medical care [J]. J Clin Pharmacol, 2016, 56(1): 24-38.
- [6] XIAO X, ZHOU L, GAO X, et al. Drug factors in unusual change of international normalized ratio: a study of 41 cases of elderly patients taking warfarin [J]. Her Med(医院导报), 2018, 37(1): 107-109.
- [7] SUN Y H, HU D Y. The efficiency and safety of anticoagulation therapy in atrial fibrillation in Chinese [J]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 2004, 43(4): 258-260.
- [8] GAIKWAD T, GHOSH K, SHETTY S. *VKORC1* and *CYP2C9* genotype distribution in Asian countries [J]. Thromb Res, 2014, 134(3): 537-544.
- [9] LI B X, XU H, WEI Y H, et al. A case report: Analysis of warfarin resistance cause and pharmaceutical care [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(10): 1282-1284.
- [10] YUAN H Y, CHEN J J, LEE M T M, et al. A novel functional *vkorc1* promoter polymorphism is associated with inter-individual and interethnic differences in warfarin sensitivity [J]. Human Mol Gen, 2005, 14(13): 1745-1751.

收稿日期: 2018-12-17

(本文责编: 曹粤锋)