

论著·基础研究

重庆地区 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性与华法令药物敏感性的相关研究*

刘 玲¹, 陈 敏¹, 黄恒柳¹, 何建维¹, 杜金艳¹, 唱 凯¹, 皮 燕^{2△}

(陆军军医大学大坪医院野战外科研究所: 1. 检验科; 2. 神经内科, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨重庆地区 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性频率分布及与华法令药物敏感性的相关性。方法 收集陆军军医大学大坪医院 2017 年 2 月至 2018 年 12 月 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性检测患者 657 例作为研究对象, 采用基因芯片杂交法检测 CYP2C9 及 VKORC1 基因多态性。结果 (1) 重庆地区共检测出 8 种基因型, 主要以 *1/*1 AA 为主, 频率为 73.52%; (2) 重庆地区人群以华法令敏感型(*1/*1 AA、*1/*3 GA、*1/*2 AA、*1/*2 GA、*1/*3 GG) 为主, 频率为 74.73%, 华法令建议起始剂量 3.0~4.0 mg; (3) CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性分布在性别、疾病间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 重庆地区 CYP2C9 和 VKORC1 基因型以 *1/*1 AA 为主, 其中华法令敏感型占 74.73%, 建议华法令用药前进行 CYP2C9 和 VKORC1 基因检测便于指导华法令用药。

关键词: 华法令; VKORC1; CYP2C9; 基因多态性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.001

中图法分类号: R969.3

文章编号: 1673-4130(2019)21-2561-04

文献标识码: A

Association of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms with warfarin sensitivity in Chongqing*

LIU Ling¹, CHEN Min¹, HUANG Hengliu¹, HE Jianwei¹, DU Jinyan¹, CHANG Kai¹, PI Yan^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Internal Medicine-Neurology, Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the frequency distribution of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms and their correlation with warfarin sensitivity in Chongqing. **Methods** A total of 657 patients with CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms were collected from Daping Hospital of Military Medical University from February 2017 to December 2018. CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms were detected by gene chip hybridization. **Results** (1) Eight genotypes were detected in Chongqing, mainly *1/*1 AA, with a frequency of 73.52%; (2) warfarin-sensitive genotypes(*1/*1 AA, *1/*3 GA, *1/*2 AA, *1/*2 GA, *1/*3 GG) were predominant in Chongqing, with a frequency of 74.73%, warfarin recommended initial dose of 3.0—4.0 mg; (3) CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms were not statistically different between sexes and diseases($P>0.05$). **Conclusion** The genotypes of CYP2C9 and VKORC1 in Chongqing are mainly *1/*1 AA, and warfarin sensitive genotypes account for 74.73%. It is suggested that CYP2C9 and VKORC1 genes be detected before warfarin is used to guide warfarin use.

Key words: warfarin; VKORC1; CYP2C9; gene polymorphism

华法令是目前临床广泛使用的香豆素类口服抗凝药物, 主要应用于深静脉血栓、肺栓塞、心房颤动、左心室血栓等疾病的治疗^[1]。路航等^[2]对 2014 年房颤指南解读中提及, 据 GLORIATM-AF 登记的全球性

研究数据显示, 中国患者华法令使用率最低, 仅为 20.3%, 欧洲高达 63.9%。大量国内外研究表明^[3-6], 细胞色素 P450 超家族(CYP)中的 CYP2C9, 维生素 K 环氧化物还原酶复合体亚单位 1(VKORC1)的基

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81400967); 重庆市基础科学与前沿技术研究资助项目(CSTC2017JCYJAX0286); 重庆市科卫联合医学科研项目(2018QNXM049)。

作者简介: 刘玲, 女, 检验技师, 主要从事分子生物方面的研究。△ 通信作者, E-mail: piyan861105@sina.com。

本文引用格式: 刘玲, 陈敏, 黄恒柳, 等. 重庆地区 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性与华法令药物敏感性的相关研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(21): 2561-2563.

因多态性与华法令用药剂量的个体差异密切相关。

目前研究表明,华法令治疗窗窄,不同民族、个体间使用剂量存在明显差异^[7]。临床上超剂量用药有出血风险,而华法令用药剂量不足将导致血栓形成。遗传因素是影响华法令用药的根本因素,而遗传因素中影响华法令剂量及代谢最主要的是 VKORC1、CYP2C9 基因多态性,可解释高达 40%~60% 华法令剂量个体差异^[8-10]。本文就重庆地区人群 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性的分布进行研究,旨在为重庆地区华法令用药提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 2 月至 2018 年 12 月陆军军医大学大坪医院检验科检测了 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性的患者 657 例,其中男 357 例,女 300 例,采用乙二胺四乙酸二钾抗凝管采集外周血 2~3 mL。所有患者为无血缘关系的重庆汉族人。

1.2 仪器与试剂 血液基因组 DNA 提取试剂盒(购自中国北京天根有限公司);CYP2C9、VKORC1 基因多态性检测试剂盒、生物芯片杂交仪、生物芯片识读仪均购自中国上海百傲有限公司;PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 乙二胺四乙酸二钾抗凝管采集患者外周血 2~3 mL,充分混匀,及时送分子室检测。

1.3.2 DNA 提取 静脉血按照全血 DNA 提取试剂盒说明书操作提取 DNA。DNA 样品-20℃ 保存,反复冻融不超过 3 次。

1.3.3 PCR 扩增 取出提前分装好的 CYP2C9 和 VKORC1 扩增液,扩增反应体系 25 μL:CYP2C9 和 VKORC1 扩增液 22 μL、反应液 1 μL、DNA 模板 2 μL。扩增条件:94℃ 预变性 10 min;94℃ 30 s, 59℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 5 min 终止反应。扩增产物于 2~8℃ 保存。

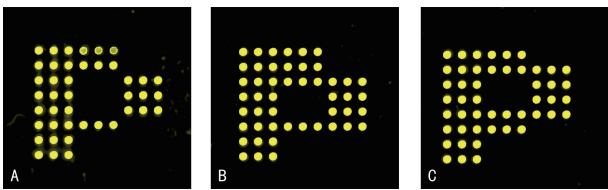
1.3.4 杂交显色 (1)杂交试剂准备:按照说明书配制杂交反应液、抗体使用液,加入试管架对应孔内。(2)CYP2C9 和 VKORC1 基因芯片做好标记,放入杂交仪片架中。(3)杂交反应液中加入 10 μL 扩增产物,混匀,将试管架放入杂交仪,运行杂交程序。(4)

取出芯片,放入生物芯片识读仪中,用百傲基因芯片图像分析软件进行图像扫描和数据分析,输出检测结果。

1.4 统计学处理 用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。用频数计数法计算各基因型及等位基因频率,用 χ^2 检验比较基因型多态性在不同性别及疾病人群间的差异, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CYP2C9 和 VKORC1 基因型检测 CYP2C9 和 VKORC1 扩增产物经基因芯片分析后的基因型生物芯片识别图,见图 1。



注:A 表示 *1/*1 AA;B 表示 *1/*1 GA;C 表示 *1/*3 AA

图 1 CYP2C9 和 VKORC1 基因芯片检测结果

2.2 CYP2C9 和 VKORC1 基因型频率及等位基因频率 本研究中 *1/*1 型 594 例(90.41%),*1/*2 型 3 例(0.46%),CYP2C9 *1/*3 型 60 例(9.13%),其中 *1 等位基因频率为 95.21%,*2 等位基因频率为 0.23%,*3 等位基因频率为 4.56%。AA 型 542 例(82.50%),GA 型 112 例(17.04%),GG 型 3 例(0.46%),其中 A 等位基因频率为 91.02%,G 等位基因频率为 8.98%。各基因型及等位基因分布在男女之间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.3 不同基因型人群的华法令使用剂量 本研究中检测出 8 种基因型:*1/*1 AA 型 483 例(73.52%),*1/*1 GA 型 106 例(16.13%),*1/*1 GG 型 3 例(0.46%),*1/*2 AA 型 1 例(0.15%),*1/*2 GA 型 1 例(0.15%),*1/*3 AA 型 57 例(8.68%),*1/*3 GA 型 5 例(0.76%),*1/*3 GG 型 1 例(0.15%),未检测出 *1/*2 GG 型。各基因型分布比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。其中需要使用高剂量华法令(5.0~7.0 mg)占 16.59%,中等剂量(3.0~4.0 mg)占 74.73%,低剂量(0.5~2.0 mg)占 8.68%。见表 2。

表 1 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性分布(n)

性别	n	CYP2C9 基因型			VKORC1 基因型			等位基因				
		*1/*1	*1/*2	*1/*3	AA	AG	GG	*1	*2	*3	A	G
男	357	320	0	37	295	60	2	677	0	37	650	64
女	300	274	3	23	247	52	1	574	3	23	546	54
P		>0.05			>0.05			>0.05				

表 2 不同 CYP2C9 和 VKORC1 基因型人群的分布及 FDA 推荐华法令使用剂量[n(%)]

VKORC1 基因型	CYP2C9 基因型					
	* 1/ * 1	* 1/ * 2	* 1/ * 3	* 2/ * 2	* 2/ * 3	* 3/ * 3
AA	483(73.52) ^b	1(0.15) ^b	57(8.68) ^a	0(0.00) ^a	0(0.00) ^a	0(0.00) ^a
GA	106(16.13) ^c	1(0.15) ^b	5(0.76) ^b	0(0.00) ^b	0(0.00) ^a	0(0.00) ^a
GG	3(0.46) ^c	0(0.00) ^c	1(0.15) ^b	0(0.00) ^b	0(0.00) ^b	0(0.00) ^a

注：^a 表示华法令高度敏感型，使用剂量为 0.5~2.0 mg；^b 表示华法令敏感型，使用剂量为 3.0~4.0 mg；^c 表示华法令不敏感型，使用剂量为 5.0~7.0 mg

2.4 CYP2C9 和 VKORC1 各基因型分布在不同疾病患者间的比较 本研究收集冠心病患者 376 例、房颤患者 117 例、支架术后患者 28 例、静脉血栓患者 26 例、其他心血管疾病患者 93 例、其他 17 例，其中冠心病患者最多。共检测出 8 种基因型，其中 * 1/ * 1 AA 型最多。各基因型分布在不同疾病患者间比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 不同疾病患者 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性比较(n)

基因型	冠心病	房颤	支架术后	静脉血栓	其他心血管疾病	其他	合计
* 1/ * 1 AA	277	85	21	22	67	11	483
* 1/ * 1 GA	59	16	6	4	15	6	106
* 1/ * 1 GG	1	2	0	0	0	0	3
* 1/ * 2 AA	0	0	0	0	1	0	1
* 1/ * 2 GA	1	0	0	0	0	0	1
* 1/ * 3 AA	34	14	1	0	8	0	57
* 1/ * 3 GA	3	0	0	0	2	0	5
* 1/ * 3 GG	1	0	0	0	0	0	1

3 讨 论

华法令是由 R-和 S-对映体组成的外消旋混合物，起抗凝作用的主要是 S-华法令，有研究表明，S-华法令抗凝作用比 R-华法令高 3~5 倍^[11]。细胞色素 CYP2C9 是一类主要存在于肝脏、肠道中的单加氧酶，华法令在肝脏中经 CYP2C9 代谢为非活性产物。CYP2C9 基因位于染色体 10q24.2，全长约 55 kb^[12]。目前已发现多种突变等位基因，其中以 CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 突变型最为常见。CYP2C9 基因突变导致酶活性降低，机体对华法令代谢减缓，华法令在体内堆积，出血风险增加，因此 CYP2C9 基因突变者华法令剂量应减少。VKORC1 为维生素 K 循环中 1 个关键酶，可抑制依赖维生素 K 凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ活性，华法令通过抑制 VKORC1 发挥抗凝作用。VKORC1 基因位于染色体 16p11.2，全长约 11 kb^[12]。VKORC1 存在基因多态性，尤其是-1639G>A，VKORC1 基因突变后会导致酶活性降低，对华法令敏感程度增强，出血风险增加，故 VKORC1 基因突变者华法令使用剂量也应减少。

本研究结果显示，重庆地区 CYP2C9 和 VKORC1 基因型以 * 1/ * 1 型和 AA 型为主，频率分别为 90.41%、82.50%，这与文献报道的中国汉族人群 CYP2C9、VKORC1 多态性一致^[13]。CYP2C9 基因突变在男女之间差异无统计学意义，这与文献报道不一致^[14]。本研究结果显示，重庆地区使用高剂量华法令(5.0~7.0 mg)比例为 16.59%，中等剂量(3.0~4.0 mg)比例为 74.73%，低剂量(0.5~2.0 mg)比例为 8.68%。随着分子生物学的发展，个体化用药已经成为了研究热点，CYP2C9、VKORC1 基因检测开始受临床医生重视，但大多数医生使用华法令抗凝依旧采用经验剂量给药，对本该需要使用高剂量华法令抗凝患者使用普通剂量华法令，抗凝效果减弱，甚至有出血风险。对华法令低剂量基因型患者使用普通剂量华法令，则可能导致抗凝过度，甚至出现血栓。研究表明，与未进行基因检测患者相比，根据 CYP2C9 和 VKORC1 基因检测结果用药的患者出血及血栓发生风险降低 29%，总住院率减少 31%^[15]。

4 结 论

重庆地区 CYP2C9 和 VKORC1 基因型以 * 1/ * 1 AA 为主，人群以华法令敏感型为主，敏感型人群建议华法令起始剂量 3.0~4.0 mg。华法令用药前建议进行 CYP2C9 和 VKORC1 基因检测从而提高华法令使用的安全性及有效性。

参考文献

[1] LEE M T, KLEIN T E. Pharmacogenetics of warfarin: challenges and opportunities [J]. J Hum Genet, 2013, 58 (6): 334-338.

[2] 路航, 余欣, 牡丹, 等. 2014 AHA/ACC/HRS 房颤指南对我国抗凝治疗的提示[J]. 实用医学杂志, 2015, 31 (6): 869-871.

[3] QIU J X, ZHOU Z W, HE Z X, et al. Estimation of the binding modes with important human cytochrome P450 enzymes, drug interaction potential, pharmacokinetics, and hepato toxicity of ginger components using molecular docking, computational, and pharmacokinetic modeling studies[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 841-866.

[4] YANG Y, PETER I, SCOTT S A. Pharmacogenetics in Jewish populations [J]. Drug Metabol Drug Interact, 2014, 29(4): 221-233.

(下转第 2567 页)

- [3] TAKAHASHI J, ORCHOLSKI M, YUAN K, et al. PDGF-dependent β -catenin activation is associated with abnormal pulmonary artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension[J]. FEBS Lett, 2016, 590(1):101-109.
- [4] WANG S, HE B, HANG W, et al. Berberine alleviates tau hyperphosphorylation and axonopathy-associated with diabetic encephalopathy via restoring PI3K/Akt/GSK3 β pathway[J]. J Alzheimers Dis, 2018, 65(4):1385-1400.
- [5] HOFMANN C, DUNGER N, SCHÖLMEICH J, et al. Glycogen synthase kinase 3- β : a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation [J]. Inflamm Bowel Dis, 2010, 16(11):1850-1858.
- [6] MASVEKAR R R, EL-HAGE N, HAUSER K F, et al. GSK3 β -activation is a point of convergence for HIV-1 and opiate-mediated interactive neurotoxicity [J]. Mol Cell Neurosci, 2015, 65(3):11-20.
- [7] GARCÍA I, FALL Y, GÓMEZ G, et al. First computational chemistry multi-target model for anti-alzheimer, anti-parasitic, anti-fungi, and anti-bacterial activity of GSK-3 inhibitors in vitro, in vivo, and in different cellular lines[J]. Mol Divers, 2011, 15(2):561-567.
- [8] WANG H, BROWN J, MARTIN M. Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response[J]. Cytokine, 2011, 53(2):130-140.
- [9] MARTIN M, REHANI K, JOPE R S, et al. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3[J]. Nat Immunol, 2005, 6(8):777-784.
- [10] NOH K T, SON K H, JUNG I D, et al. Protein kinase C δ (PKC δ)-extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling cascade regulates glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibition-mediated interleukin-10 (IL-10) expression in lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxemia[J]. J Biol Chem, 2012, 287(17):14226-14233.
- [11] SHEN E, FAN J, PENG T. Glycogen synthase kinase-3 β suppresses tumor necrosis factor- α expression in cardiomyocytes during lipopolysaccharide stimulation [J]. J Cell Biochem, 2008, 104(1):329-338.
- [12] BEUREL E, MICHALEK S M, JOPE R S. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3) [J]. Trends Immunol, 2010, 31(1):24-31.

(收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-05-02)

(上接第 2563 页)

- [5] LUND K, GAFFNEY D, SPOONER R, et al. Polymorphisms in VKORC1 have more impact than CYP2C9 polymorphisms on early warfarin International Normalized Ratio control and bleeding rates [J]. Br J Haematol, 2012, 158(2):256-261.
- [6] HUANG S W, XIANG D K, HUANG L, et al. Influence of GG CX genotype on warfarin dose requirements in Chinese patients[J]. Thromb Res, 2011, 127(2):131-134.
- [7] LIMDI N A, BROWN T M, YAN Q, et al. Race influences warfarin dose changes associated with genetic factors [J]. Blood, 2015, 126(4):539-545.
- [8] LAM M P, CHEUNG B M. The pharmacogenetics of the response to warfarin in Chinese [J]. Br J Clin Pharmacol, 2012, 73(3):340-347.
- [9] GAIKWAD T, GHOSH K, SHETTY S. VKORC1 and CYP2C9 genotype distribution in Asian countries [J]. Thromb Res, 2014, 134(3):537-544.
- [10] WANG L, MCLEOD H L, WEINSHILBOUM R M. Genomics and drug response[J]. N Engl J Med, 2011, 364(12):1144-1153.
- [11] YU Z, DING Y L, LU F, et al. Warfarin dosage adjustment strategy in Chinese population[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(6):9904-9910.
- [12] 王启鑫, 任澎. 基因多态性对指导华法林应用的研究进展 [J]. 心血管病学进展, 2018, 39(6):479-482.
- [13] YE C, JIN H, ZHANG R, et al. Variability of warfarin dose response associated with CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms in Chinese patients[J]. J Int Med Res, 2014, 42(1):67-76.
- [14] 胡婧, 肖瞳瞳, 潘美晨, 等. 潮汕地区人群 CYP2C9 基因多态性研究 [J]. 检验医学与临床, 2017, 14(19):2864-2868.
- [15] 程智, 朱雪萍, 赵宁民, 等. 基因导向华法林个体化治疗 [J]. 中国医药科学, 2015, 5(17):34-37.

(收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-05-02)