

· 论 著 ·

北方地区老年患者 *VKORC1*、*CYP2C9*、*CYP4F2* 基因多态性对华法林抗凝效果的影响^{*}

刘锐¹, 石鑫森², 潘晓冬³, 董然^{1*}

(1. 北京市心肺血管疾病研究所, 首都医科大学附属北京安贞医院 心脏外科, 北京 100029, 清华大学第一附属医院 心脏外科, 北京 100016; 2. 北京大学第一医院 儿科, 北京 100034; 3. 北京市心肺血管疾病研究所, 首都医科大学附属北京安贞医院 实验中心, 北京 100029)

【摘要】目的: 观察 *VKORC1*、*CYP2C9*、*CYP4F2* 基因多态性对北方地区机械瓣膜置换术后老年患者 (60 ~ 75 岁) 华法林抗凝作用的影响。**方法:** 研究纳入 68 例在北京安贞医院接受机械瓣膜置换术后华法林抗凝治疗的北方地区老年患者, 同期入组 68 例接受瓣膜置换术后中青年患者 (18 ~ 59 岁), 用 Illumina SNP GoldenGate 芯片技术检测患者 *VKORC1*、*CYP2C9*、*CYP4F2* 单核苷酸多态位点, 随机抽取 20% 样本用 Sanger 法直接测序验证, 统计分析各组患者华法林抗凝指标差异和老年组患者 3 种基因位点多态性与华法林稳定剂量的相关性。**结果:** 136 例患者 *VKORC1* rs9923231、*CYP2C9* rs1057910、*CYP4F2* rs2108622 基因分布符合遗传平衡, 老年组患者华法林日均稳定剂量 (2.89 ± 1.00) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 显著低于中青年组 (3.29 ± 0.90) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ($P < 0.05$)。老年患者携带 *VKORC1* rs9923231 CT 突变型患者华法林稳定剂量 (3.56 ± 0.89) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 显著高于 TT 纯合型患者 (2.72 ± 0.96) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ($P < 0.01$)。老年组 *CYP2C9*、*CYP4F2* 各基因型组间华法林剂量无统计学差异 ($P > 0.05$) **结论:** 老年患者服用华法林剂量明显减低, 建议老年患者服用华法林时考虑检测 *VKORC1* 基因。

【关键词】 华法林; 老年; 芯片技术; 基因多态性; 抗凝

【中图分类号】 R956

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-3384(2017)03-0014-05

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2017.03.004

Effect of *VKORC1*, *CYP2C9* and *CYP4F2* Polymorphisms on Warfarin Anticoagulant in Northern Chinese Elderly Patients

LIU Rui¹, SHI Xin-miao², PAN Xiao-dong³, DONG Ran^{1*}

(1. Department of Cardiac Surgery, Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Disease, Beijing 100029, China; Heart center, The First Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China; 2. Depart of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; 3. Experiment Center, Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Disease, Beijing 100029, China)

【Abstract】Objective: To observe the effect of *VKORC1*, *CYP2C9* and *CYP4F2* polymorphisms on warfarin anticoagulant in northern Chinese elderly patients (from 60 to 75 years old) with mechanical heart valve replacement (MHVR). **Methods:** The study recruited 68 elderly MHVR patients from our hospital and 68 patients of young and middle-age adults at the same time. SNP genotyping was performed using Illumina SNP GoldenGate method and 20% samples were randomly selected to be confirmed by direct Sanger sequencing. Differences in anticoagulant indicators between the Elderly group and the Middle-young-aged group, and the correlations between warfarin maintenance dosage of elderly patients and three gene polymorphisms were statistical analyzed. **Results:** Genetic distributions of *VKORC1* rs9923231, *CYP2C9* rs1057910 and *CYP4F2* rs2108622 polymorphisms in 136 patients met Hardy-Weinberg equilibrium balance. Warfarin

[收稿日期] 2016-03-24

[基金项目] 国家自然科学基金 “机械瓣膜置换术后华法林抗凝治疗个体化差异的药物基因组学研究” (项目编号: 81270300)

[作者简介] 刘锐, 男, 硕士; 研究方向: 机械瓣膜置换术后华法林个体化治疗; Tel: (010)64456411; E-mail: liurui20141224@163.com

[通讯作者] *董然, 男, 硕士研究生导师; 研究方向: 危重冠心病、瓣膜病的外科治疗; Tel: (010)64456160; E-mail: dongrandocor@163.com

daily maintenance dosage in Elderly group (2.89 ± 1.00) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ was significantly lower than dosage in Middle-young aged group (3.29 ± 0.90) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ($P < 0.05$). The elderly patients who carried *VKORC1* rs9923231 CT mutation (3.56 ± 0.89) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ require significantly higher warfarin dose than TT homozygous (2.72 ± 0.96) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ($P < 0.01$). There was no difference observed between warfarin maintenance dose and *CYP2C9* or *CYP4F2* gene polymorphisms in the elderly patients (all $P > 0.05$). **Conclusion:** The elderly patients require lower warfarin dosage than other patients. It is suggested that *VKORC1* polymorphism should be tested for elderly patients when starting warfarin therapy.

【Key words】 Warfarin; The Elderly; Chip Technology; Gene polymorphism; Anticoagulation

华法林 (warfarin) 是目前应用广泛的口服抗凝药, 主要用于房颤、脑卒中、深静脉血栓、肺栓塞和心脏瓣膜置换术后患者。华法林治疗窗窄、个体间剂量差异大, 临床上过分抗凝有出血危险, 而抗凝不足则致血栓形成, 以上限制了它的临床应用价值。许多因素影响华法林的抗凝效果, 包括性别、年龄、体表面积、维生素 K 摄入量、疾病状态、合并用药以及参与华法林药代学、药动学通路相关基因多态性等。研究表明, 基因多态性 (*VKORC1*、*CYP2C9* 等) 是影响华法林剂量差异的最主要因素, 可解释高达 40%~60% 华法林剂量个体差异^[1-2]。

研究表明, 与国外患者群体相比, 中国人群对华法林更加敏感^[3]。另外, 随年龄增长, 人体对华法林的代谢能力减低, 华法林使用剂量应相应减少; 同时, 老年患者肝合成凝血因子的能力下降; 且饮食相对较少, 摄入和吸收的维生素 K 含量减少^[4], 以上均提示老年患者对华法林剂量可能更加敏感, 是华法林治疗期间抗凝相关并发症发生的高危人群。本研究用 Illumina SNP GoldenGate 芯片技术检测我国北方地区老年 (60~75 岁) 机械瓣膜置换术后患者 *VKORC1*、*CYP2C9*、*CYP4F2* 这 3 种基因多态性, 结合患者临床资料, 对这几种基因位点检测在老年群体中的临床应用价值做进一步探讨。

1 对象与方法

1.1 对象

在首都医科大学附属北京安贞医院心脏外科接受机械瓣膜置换手术的我国北方地区 (北京、山东、山西、河南、河北、黑龙江、吉林、辽宁、内蒙) 汉族老年患者。

1.2 方法

1.2.1 抽样方法 患者均随机选取自 2012 年 4 月至 2015 年 9 月在北京安贞医院心脏外科接受机械瓣膜置换手术的患者人群。研究纳入老年患者 (60~75 岁) 68 例, 同期入组中青年患者 (18~59 岁) 68 例。

入选标准: ①所有研究对象相互间无血缘关系及异族通婚史; ②机械瓣膜置换术后接受华法林长期抗凝治疗 3 个月以上; ③心功能Ⅲ级以下 (NYHA 分级); ④肝肾功能指标正常; ⑤未服用胺碘酮等显著影响华法林剂量的药物; ⑥无出血性疾病病史; 血小板 $> 120 \times 10^9/\text{L}$; ⑦无感染、自身免疫性疾病、恶性肿瘤病史。⑧无华法林过敏史; ⑨无酗酒史、药物滥用史。本研究经安贞医院伦理委员会批准, 入选患者签署知情同意书。

1.2.2 临床资料采集方法 通过电话随访、门诊复查、查阅医院病历记录 (安贞医院 His 系统) 的方式采集患者临床资料。主要包括随访年龄、手术年龄、性别、身高、体重、手术方式、瓣膜型号、到达稳定剂量时 INR 值、合并疾病史、长期合并用药史、吸烟史、饮酒史、空腹血糖、血肌酐、尿素氮、C-反应蛋白等。

1.2.3 基因测定方法 患者签署知情同意书后, 晨起空腹状态用 EDTA 抗凝管采取患者 2mL 静脉血液。①DNA 质检: 样本 DNA 浓度 $\geq 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{d}^{-1}$ (总量 $\geq 10 \mu\text{L}$, DNA 提取用康为世纪生物科技有限公司 (北京) 血液基因组 DNA 提取试剂盒)。琼脂糖凝胶 (北京康为世纪生物有限公司生产) 电泳质检, Marker 为 DL5 000, 上样总量 4 μL ; 样本上样总量为 2 μL , 110V 电泳 20min。②基因分型: 使用 Illumina SNP GoldenGate 芯片 (Illumina 公司, 圣地亚哥, 美国) 对所选位点进行基因分型。按照说明书要求, 先将 250ng 基因组 DNA 在 37℃ 下扩增 20h, 使扩增的 DNA 形成碎片并沉淀。将干的固相微珠与芯片进行杂交, 芯片的微珠上连接有地址序列的互补序列, 通过地址序列完成杂交。杂交后的芯片在 48℃ 下孵育 20h, 洗脱, 并单个碱基进行延伸。之后将芯片染色, 清洗, 晾干, 通过 Illumina BeadArray Reader 软件对芯片结果进行判读。最后, 随机抽取 20% 样本再次分型, 99.8% 的结果与初次判读结果一致。不一致的数据在后续分

析中被剔除。③直接测序：随机选取 20% 的 DNA 样本用 Sanger 法直接基因测序，用 primer premier 5.0 软件设计引物序列并合成引物（北京博森生物技术有限公司）。引物序列如表 1。用 C1000TM Thermal Cycler PCR 仪进行 PCR 扩增。30 μ L PCR 反应体系包括：15 μ L 的 PCR Master 混合液（2 \times ），2.4 μ L 的上游和下游引物序列（10 μ mol \cdot L⁻¹），11.4 μ L 的 ddH₂O，1.2 μ L 的基因组 DNA。

1.2.4 判定标准 患者华法林抗凝强度预设：主动瓣置换术患者国际标准化比值（international normalized ratio, INR）：1.6~2.0；二尖瓣置换术后患者 INR：1.8~2.5；双瓣膜置换术后患者 INR：1.8~2.5。患者到达华法林稳定剂量定义为接受华法林抗凝治疗大于 3 个月，且连续 1 个月多次测量患者 INR 指标都在预设强度内。

表 1 3 个检测基因 Sanger 法测序的 PCR 引物序列

检测基因	SNPs	引物序列（5'-3'）	片段长 度(bp)	退火温 度(℃)
<i>VKORC1</i>	rs9923231	TCTCCTGGGAAGTGGTGAGG TAGGGATTGAGGGCTTCAC	334	56
<i>CYP2C9</i>	rs1057910	CTCAGCCTCCCAAGTAGTTT GATTCAATGAGGGACATCTT	380	56
<i>CYP4F2</i>	rs2108622	GGAACACAACGGGACTTCTTG TAGGTGCCATTCTCGTCACAT	787	56

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS20.0 统计学软件进行统计分析（包括描述统计）和作图，Hardy-Weinberg 遗传平衡应用 χ^2 检验，其他多组间比较应用方差分析， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基因分型结果

共观察老年组（60~75 岁）患者 68 例，其中男 37 例，女 31 例；中青年组（18~59 岁）患者 68 例，男 38 例，女 30 例。患者基因型及等位基因频率分布结果见表 2，*VKORC1* rs9923231 TT 型、CT 型、CC 型频率分别为 80.9%、19.1%、0%；*CYP2C9* rs1057910 AA、AC 型频率分别为 89.0%、11.0%；*CYP4F2* rs2108622 CC、CT、TT 型频率分别为 55.9%、38.2%、5.9%。*VKORC1*、*CYP2C9*、*CYP4F2* 基因型和基因分布经 χ^2 检验符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡（ $P>0.05$ ）。

表 2 华法林相关 SNP 位点基因型和等位基因分布频率（ $n=136$ ）

基因	SNP 位点	等位 基因	数量 (%)	基因型	数量 (%)	χ^2 值	H-WP 值
<i>VKORC1</i>	rs9923231	T	246 (90.4)	TT	110 (80.9)	1.519	0.218
		C	26 (9.6)	CT	26 (19.1)		
				CC	0 (0)		
<i>CYP2C9</i>	rs1057910	A	257 (94.5)	AA	121 (89.0)	0.463	0.496
		C	15 (5.5)	AC	15 (11.0)		
				CC	0 (0)		
<i>CYP4F2</i>	rs2108622	C	204 (75.0)	CC	76 (55.9)	0.052	0.819
		T	68 (25.0)	CT	52 (38.2)		
				TT	8 (5.9)		

2.2 老年组、中青年组患者抗凝指标的比较

老年组患者（ $n=68$ ）和青年组患者（ $n=68$ ）基线资料比较见表 3，老年组患者体质指数（body mass index, BMI）显著低于中青年组患者（ $P<0.05$ ），老年组患者合并糖尿病显著多于中青年组患者（ $P<0.05$ ），两年龄组间其他变量比较差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。68 例老年患者平均服用华法林（ 2.89 ± 1.00 ）mg \cdot d⁻¹，68 例中青年患者平均服用华法林（ 3.29 ± 0.90 ）mg \cdot d⁻¹，差异有统计学意义（ $F=6.058$ ， $P<0.05$ ）；老年患者平均 INR 值 2.06 ± 0.33 ，中青年患者平均 INR 值 2.07 ± 0.27 ，差异无统计学意义（ $F=0.016$ ， $P>0.05$ ）。华法林稳定剂量在研究患者中呈偏态分布，对其进行平方根转换，进一步统计分析年龄与华法林剂量之间具有显著相关性（ $F=10.196$ ， $P<0.05$ ， $R^2=0.071$ ），线性回归方程： $\sqrt{\text{患者华法林日均剂量(mg)}}=4.398-0.023 \times \text{年龄(年)}$ ，随年龄增长华法林剂量显著降低。

2.3 老年患者 *VKORC1*、*CYP2C9*、*CYP4F2* 基因多态性与华法林稳定剂量的关系

如表 4，老年组 *VKORC1* rs9923231 TT 型患者华法林稳定剂量显著高于 CT 型患者（ $P<0.01$ ）；老年组 *CYP2C9* rs1057910 AA 型患者华法林稳定剂

表3 老年组与中青年组患者基本资料比较

指标	老年组($n=68$)	中青年组($n=68$)	P 值
性别			0.863
男性	37	38	
女性	31	30	
年龄(岁)	65.60 ± 3.94	47.45 ± 8.30	<0.001
体质指数 BMI (kg/m ²)	23.59 ± 2.72	24.89 ± 3.16	0.012
华法林稳定剂量 (mg/d)	2.89 ± 1.00	3.29 ± 0.90	0.015
INR 测量值	2.06 ± 0.33	2.07 ± 0.27	0.899
合并疾病			
高血压	16	12	0.396
房颤	25	16	0.093
冠心病	11	4	0.055
高脂血症	9	6	0.412
糖尿病	13	1	0.001
合并用药			
倍他乐克	17	14	0.540
他汀类	7	5	0.545
胰岛素	7	1	0.062
ARB 类降压药	4	4	1.000
ACEI 类降压药	5	2	0.441
利尿剂	20	15	0.327
手术方式			0.558
AVR	21	21	
MVR	33	28	
DVR	14	19	

表4 老年患者($n=68$)所检测 SNP 位点各基因型与华法林稳定剂量的关系

基因	SNP 位点	基因型	患者数	平均华法林剂量 (mg·d ⁻¹)	P 值
VKORC1	rs9923231	TT	54	3.56 ± 0.89	0.003
		CT	14	2.72 ± 0.96	
CYP2C9	rs1057910	AA	60	2.96 ± 1.00	0.064
		AC	8	2.33 ± 0.92	
CYP4F2	rs2108622	CC	39	2.68 ± 0.94	0.053
		CT	23	3.27 ± 1.07	
		TT	6	2.81 ± 0.78	

量较 AC 型患者高 0.63mg, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); CYP4F2 rs2108622 各基因型患者间华法林稳定剂量无显著差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

心脏机械瓣膜置换术后患者需终生服用华法林抗凝治疗, 但临床上因华法林过量引发严重出血事件常有报道^[5-7]。国内外研究结果显示, 汉族人群

较白种人群对华法林剂量更加敏感^[1]; 并且相关文献报道, 老年患者由于机体原因, 对华法林治疗更加敏感^[4], 临床上应尤其重视老年患者人群的抗凝治疗。近年来随药物基因组学的发展, 华法林相关的基因检测 (如 VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 等) 以指导华法林用药成为临床研究的热点。目前国内相关研究多集中于普通患者群体, 仅谭明娟等^[14]报道了 CYP4F2 对我国苏南地区高龄患者华法林剂量的影响, 尚未见我国北方地区老年患者基因多态性对华法林影响的报道。

我们的研究结果显示老年患者华法林日均稳定剂量 (2.89 ± 1.00) mg·d⁻¹ 显著低于中青年患者 (3.29 ± 0.90) mg·d⁻¹, 这与胡广卉等人^[8]的报道结果相似。由从患者的基本资料看, 老年组患者合并高血压、房颤、高脂血症、糖尿病、脑卒中等基础病例数高于中青年组患者; 且老年患者瓣膜置换手术后由于机体因素, 遭受的手术打击更大, 华法林抗凝治疗期间一旦发生抗凝并发症, 对老年患者预后的影响更为显著。老年 VKORC1 rs9923231CT 突变型患者华法林用量显著高于 TT 纯合型患者, 提示该基因突变影响老年人华法林剂量差异。而与谭明娟等^[14]报道不同, 我们的研究未发现 CYP4F2 rs2108622 不同基因型患者用量差异, 可能与纳入人群不同 (北方地区与苏南地区)、研究人群例数过少等因素的影响。研究结果显示 CYP2C9 rs1057910 基因 AC 突变型患者用量低于 AA 纯合型患者 (2.33 ± 0.92) mg·d⁻¹ vs (2.96 ± 1.00) mg·d⁻¹, 但差异无统计学意义, 尚需扩大样本量做进一步探究, 以明确该基因在高龄患者群体的临床应用价值。

随着药物基因组学的发展, 应用基因检测技术指导临床个体化用药发展前景广阔^[15-16], 我们的研究结果提示, 老龄患者群体对华法林抗凝治疗更为敏感, 且老年人血管更加脆弱、合并心脑血管基础疾病增多, 临床上应尤其重视出血并发症的发生。研究显示 VKORC1 rs9923231 C 突变的高龄患者华法林用量明显减少, 今后在密切检测患者凝血指标的同时, 可通过检测 VKORC1 基因多态性, 指导高龄患者更有效、安全的抗凝治疗。

【参考文献】

- [1] Lam MP, Cheung BM. The pharmacogenetics of the response to

- warfarin in Chinese [J]. Br J Clin Pharmacol, 2012, 73(3):340-347.
- [2] Gaikwad T, Ghosh K, Shetty S. VKORC1 and CYP2C9 genotype distribution in Asian countries [J]. Thromb Res, 2014, 134(3): 537-544.
- [3] Haibo Z, Jinzhong L, Yan L, et al. Low-intensity international normalized ratio (INR) oral anticoagulation therapy in Chinese patients with mechanical heart valve prostheses [J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62(1): 147-151.
- [4] 马彩艳, 谢培怡, 张伟, 等. 高龄高出血风险心房颤动患者的超低强度华法林抗凝治疗分析 [J]. 心电与循环, 2015, 34(1):25-27.
- [5] 刘瑞生, 李波霞, 宋兵, 等. 瓣膜置换术后华法林相关出血 3 例及分析 [J]. 药品评价, 2015(10):38-40.
- [6] 王智伟, 林柏松. 心脏人工机械瓣膜置换术后出血原因分析 [J]. 吉林医学, 2011, 32(4):718-719.
- [7] 彭玮玮, 吴东凯, 陈胜喜, 等. 心脏机械瓣膜置换术后华法林抗凝出血的临床研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(12):1879-1880.
- [8] 胡广卉, 武云涛, 陈艳梅, 等. 高龄非瓣膜病性房颤患者长期应用华法林抗凝治疗的疗效与安全性 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2014, 6(6): 730-732.
- [9] 刘锐, 张魁, 潘晓冬, 等. 北方汉族人群 EPHX1 基因多态性与华法林稳定剂量的关系 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30(1): 31-34.
- [10] Wei M, Ye F, Xie D, et al. A new algorithm to predict warfarin dose from polymorphisms of CYP4F2, CYP2C9 and VKORC1 and clinical variables: derivation in Han Chinese patients with non valvular atrial fibrillation [J]. Thromb Haemost, 2012, 107(6): 1083-1091.
- [11] Chen J, Shao L, Gong L, et al. A pharmacogenetics-based warfarin maintenance dosing algorithm from Northern Chinese patients [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105250.
- [12] Liang Y, Chen Z, Guo G, et al. Association of genetic polymorphisms with warfarin dose requirements in Chinese patients [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2013, 17(12): 932-936.
- [13] Caldwell MD, Awad T, Johnson J, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose [J]. Blood, 2008, 111(8): 4106-4112.
- [14] 谭明娟, 崔薇薇, 陈枫. 老年患者 CYP4F2 (rs2108622) 基因多态性对华法林剂量的影响 [J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(11): 1400-1404.
- [15] 西娜. 基因分型指导下 1 例支架内再狭窄的个体化治疗 [J]. 临床药物治疗杂志, 2015, 13(4): 73-75.
- [16] 梅丹, 都丽萍, 刘昌伟. 基因多态性与华法林个体化用药 [J]. 中华外科杂志, 2016, 54(2): 144-147.

投稿方法及流程

本刊已开通网站及采编系统, 自 2015 年起由本刊网站统一收稿。请登录本刊网站 www.lcywzlzz.com, 点击左上角“作者在线投稿”, 按照系统提示注册为本刊作者(建议用常用邮箱名作为注册用户名, 以防遗忘), 提交个人信息及稿件信息, 完成投稿后会收到稿件编号及收稿回执信。

——摘自本刊 2017 年投稿须知