

文章编号: 1672-3384 (2009) -03-0042-09

## VKORC1 基因多态性对汉族静脉血栓栓塞 患者服用华法林剂量的影响

【作者】 唐雪峰<sup>1</sup> 张微<sup>2</sup> 张伟娟<sup>2</sup> 孔繁翠<sup>2</sup> 祝锦<sup>2</sup> 王鹤尧<sup>2</sup> 郑文婕<sup>1\*</sup> 王辰<sup>2\*\*</sup>

1 北京理工大学 (北京 100081)

2 首都医科大学附属北京朝阳医院 (北京 100020)

【摘要】 目的 探讨 *VKORC1* 1173C>T 和 3730G>A 基因多态性与静脉血栓栓塞患者服用华法林剂量的关系。方法 应用扩增受阻突变体系聚合酶链式反应技术 (ARMS-PCR) 对 205 例华法林治疗达标患者 (INR 2-3) 的 *VKORC1* 的 1173C>T 和 3730G>A 位点进行基因分型。结果 205 例患者中, 在 *VKORC1* 1173 位点, CC 型患者 2 例 (1.0%), CT 型 25 例 (12.2%), TT 型 178 例 (86.8%); C 等位基因频率 7.1%, T 等位基因频率 92.9%。在 *VKORC1* 3730 位点, AA 型 2 例 (1.0%), GA 型 26 例 (12.7%), GG 型 177 例 (86.3%); G 和 A 的基因频率分别为 7.3% 和 92.7%。*VKORC1* 1173 位点和 3730 位点存在着强烈连锁不平衡关系 ( $D' = 0.77$ ,  $r^2 = 0.58$ )。*VKORC1* 的基因型差异与华法林维持剂量相关, *VKORC1* 1173 的 CC、CT 和 TT 型患者的华法林维持剂量分别为  $(8.13 \pm 0.88) \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $(5.33 \pm 2.03) \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $(3.86 \pm 1.52) \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。*VKORC1* 3070 的 AA、GA 和 GG 型患者的华法林维持剂量分别为  $(8.13 \pm 0.88) \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $(5.48 \pm 2.05) \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $(3.83 \pm 1.49) \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。单因素方差分析的结果显示, *VKORC1* 两位点基因型对华法林维持剂量具有显著相关性 ( $P$  均小于 0.0001)。结论 *VKORC1* 1173 和 3730 位点对 VTE 患者服用华法林剂量有明显的影

【关键词】 *VKORC1*; 基因多态性; 华法林; 剂量; 静脉血栓

【中图分类号】 R203; R944.11

【文献标识码】 A

## Effects of *VKORC1* gene polymorphisms on warfarin doses in Han Chinese patients with venous thromboembolism

【Writer】 Tang Xue-feng<sup>1</sup> Zhang Wei<sup>2</sup> Zhang Wei-juan<sup>2</sup> Kong Fan-cui<sup>2</sup> Zhu Jin<sup>2</sup>

Wang He-yao<sup>2</sup> Zheng Wen-jie<sup>1</sup> Wang Chen<sup>2</sup>

1 Beijing Institute of Technology (Beijing 100081)

2 Beijing Chao-Yang Hospital affiliated to Capital Medical University (Beijing 100020)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of *VKORC1* 1173C>T and 3730G>A polymorphisms on warfarin dose in Han Chinese patients with venous thromboembolism (VTE). Method Amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR) was used to do genotype of the 1173C>T and 3730G>A polymorphisms of 205 oral warfarin patients (INR 2-3). Results Among the patients with gene locus in *VKORC1* 1173, CC genotype cases account for 1.0% (2), CT genotype cases ac-

\* 通讯作者: 郑文婕, 讲师, 北京理工大学

\*\* 通讯作者: 王辰, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院

count for 12.2% (25), TT genotype cases account for 86.8% (178); C allele frequencies is 7.1%, T allele frequencies is 92.9%. At the site of *VKORC1* 3730, AA genotype cases account for 1.0% (2), GA genotype cases account for 12.7% (26), GG genotype cases account for 86.3% (177), the gene frequency rates of G and A are 7.3% and 92.7% respectively. Strong linkage disequilibrium was observed between 1173C > T polymorphism and 3730G > A polymorphism ( $D' = 0.77$ ,  $r^2 = 0.58$ ). Regardless of the presence of confounding variables, mean warfarin dose differed significantly among the *VKORC1* genotypes ( $P < 0.001$ ): the patients carrying *VKORC1* 1173CC genotype had a higher mean warfarin dose ( $8.13 \pm 0.88$ )  $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$  compared with those carrying CT genotype ( $5.33 \pm 2.03$ )  $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ , and the mean warfarin dose of those with TT genotype was the lowest ( $3.86 \pm 1.52$ )  $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ . The mean warfarin dose of *VKORC1* 3730AA, 3730GA, 3730GG are ( $8.13 \pm 0.88$ )  $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ , ( $5.48 \pm 2.05$ )  $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$  and ( $3.83 \pm 1.49$ )  $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ , respectively. Conclusion *VKORC1* polymorphisms significantly influence warfarin dose among Han Chinese patients VTE.

【Key words】 *VKORC1*, polymorphisms, warfarin, dose, venous thromboembolism

华法林是临床上广泛应用的香豆素类口服抗凝药,多用于深静脉血栓(VTE)、肺栓塞、复发性的脑卒中、人工瓣膜置换和慢性房颤的治疗。但其有效治疗范围较窄且不同个体之间维持剂量存在较大差异(相差10倍左右),使患者在治疗中面临较大风险。在使用华法林抗凝治疗初期,由于无法调节到准确剂量,剂量不足容易导致血栓发生,剂量过高则极易导致严重的出血并发症<sup>[1,2]</sup>。近年来的许多研究表明,某些基因的遗传变异可能是造成个体间华法林维持剂量差异的主要原因<sup>[3]</sup>。其中影响最为明显是维生素K环氧化物还原酶复合物亚基1(*VKORC1*)的基因。*VKORC1*是维生素K循环中的关键酶,华法林因抑制该酶而阻断了维生素K以辅因子的形式参与羧化酶的催化反应,抑制了凝血因子II、VII、IX、X的功能活性,从而产生抗凝作用。*VKORC1*基因的对华法林剂量有影响的单核苷酸多态性位点主要有:启动子区-1639位置G > A、第一个内含子1173位置C > T和3'端非编码区3730位置G > A。目前研究已经证实-1639G > A和1173C > T两个位点是完全连锁的<sup>[4]</sup>。国内外都有报道关于*VKORC1*基因多态性对华法林维持剂量的影响,但这些研究的对象是房颤和人工瓣膜置换等

的患者。尚未见*VKORC1*基因多态性对特定的静脉血栓栓塞患者服用华法林剂量影响的报道,也未见针对中国汉族静脉血栓栓塞患者影响的报道。本研究旨在探讨*VKORC1*基因多态性对中国汉族静脉血栓栓塞患者服用华法林剂量的影响。

## 1. 材料与方法

### 1.1 研究对象

选择2008年3月到2008年12月,在首都医科大学附属北京朝阳医院经影像学确诊的静脉血栓栓塞患者。个体间无血缘关系,汉族。排除标准:不使用华法林抗凝治疗的静脉血栓栓塞患者;参加其他抗凝治疗试验的患者。本研究经首都医科大学附属北京朝阳医院医学伦理委员会批准,患者知情同意。最终人选205例,其中男性108例,女性97例,年龄( $60.1 \pm 13.8$ )岁,体重( $70.8 \pm 11.9$ )kg,身高( $166.3 \pm 8.3$ )cm。

### 1.2 试剂及仪器

1.2.1 试剂 硅胶, ZCXII, 200-300目, 青岛海洋化工厂; 异硫氰酸胍, 华美公司; 热启动 Taq 酶, 天根公司; 普通 DNA 纯化试剂盒, 天根公司; EcoT14 I 限制性内切酶, 大连宝生物公司; 引物均由北京奥科公司合成。

1.2.2 仪器 PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; 电泳槽及电泳仪, 北京六一仪器厂; 凝胶成像分析系统, 上海小源科技公司; 微量高速离心机, Sigma 公司。

### 1.3 标本收集与 DNA 提取

从每名患者抽取 2ml 的静脉血于枸橼酸钠抗凝管中。用改进的 Boom 等<sup>[5]</sup>所建立的异硫氰酸胍-硅胶法提取基因组 DNA。取上述抗凝血 500 $\mu$ L, 加 1 mL STMT (80g $\cdot$ L<sup>-1</sup>蔗糖、10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl、5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、1% Triton X-100) 混匀, 每分钟 12 000 转离心 1 min, 弃上清, 加入 1 ml 9g $\cdot$ L<sup>-1</sup> NaCl 洗涤, 同上离心弃上清加入 100 $\mu$ L 10% (V/V) Triton X-100 迅速混匀, 加入 1mL DNA 结合液 (4 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> GuSCN、50 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> pH6.5 Tris-HCl、50 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 硅胶), 在 37 $^{\circ}$ C 保温 10~15min, 不时颠倒混匀, 每分钟 12 000 转离心 30 秒, 弃上清; 加入 1 mL 洗涤液 (含 20 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> pH7.4 Tris-HCL、1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> EDTA、0.1 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> NaCl, 临用时与无水乙醇 1:1 混合) 混匀, 每分钟 12 000 转离心 30 秒, 弃上清, 重复 3 次, 最后 1 次 1 min; 然后 65 $^{\circ}$ C 干燥 10 min, 加入 TE (10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris-HCl、1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> EDTA, pH8.0) 300 $\mu$ L, 在 55 $^{\circ}$ C 保温 10 min 后, 每分钟 12 000 转离心 2 min, 吸取上清转移至另一离心管中。

### 1.4 扩增受阻突变体系聚合酶链式反应 (ARMS-PCR) 基因分型

采用扩增受阻突变体系聚合酶链式反应技术 (ARMS-PCR)<sup>[6]</sup>对 *VKORC1* 的 1173C>T 和 3730G>A 两个位点进行 SNP 分析。ARMS-PCR 用于检测 *VKORC1* 1173C>T 和 3730G>A 位点引物序列, 如表 1 (本研究所用的引物序列均根据 Gene-Bank AY587020 序列设计, 由北京奥科生物技术有限公司合成)。

1.4.1 PCR 反应体系 20 $\mu$ L 10 $\times$  buffer 2 $\mu$ L,

10mM dNTP 0.4 $\mu$ L, 基因组 DNA 0.5 $\mu$ L, 10 $\mu$ M 正反向引物各 0.5 $\mu$ L, 2.5U $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup> hot start taq polymerase 0.3 $\mu$ L, 双蒸水 15.8 $\mu$ L。反应条件 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 退火 65 $^{\circ}$ C 30 秒, 延伸 40 秒, 共 35 个循环, 最后延伸 7min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

1.4.2 ARMS-PCR 方法的建立 以一个 DNA 标本为模板, 测定 OD260 和 OD280, 以确定 DNA 含量, 用双蒸水按 10 倍依次稀释成原液的 0.1、0.01、0.001、0.0001 倍。每种浓度分别取 5 L 各加到 20 L 的 PCR 体系中去, 进行 PCR, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物; 将退火温度设为 53 $^{\circ}$ C 至 70 $^{\circ}$ C 等梯度, 进行 PCR 分析, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

表 1 ARMS-PCR 的引物序列

SNP	引物名称	序列 (5' -3')	产物大小 (bp)
1173C>T	1173 F-pub	GACGGAATACAGAGG AGCGGACTGAGTG	568
	1173R-C	CCCCGACCTCCGATCC TACTCCAATG	
	1173R-T	CCCCGACCTCCGATC CTAGTCCAATA	
3730G>A	3730R-pub	GCTTGGGAATGGTCGAT AAGGCAACTGG	536
	3730F-G	GATTACCCCTCCTCC TGCCATACACG	
	3730F-A	GATTACCCCTCCTCC TGCCATACACA	

注: 红色标记为人引入的错配

1.4.3 ARMS-PCR 的特异性与重复性试验 选取各基因型的 DNA 模板, 按照以上建立的 ARMS-PCR 方法进行检测, 并且重复 3 次实验, 以验证该方法的稳定性与重复性。

### 1.5 PCR-RFLP 或直接测序验证 ARMS-PCR 检测结果

两个位点各选取经 15 个标本对 ARMS-PCR 的检测结果进行验证。普通 PCR 的引物序列, 如表 2。

1.5.1 1173C>T 位点采用 PCR-RFLP 的方法采用 EcoT14 I 限制性内切酶, 其特异的识别位点是 CCTTGG。1173CC 基因型, 在 1173 位点存在

CCTTGG 序列能被内切酶切开, PCR 产物经酶切后, 得到 544bp 和 62bp 长度的产物。而 1173TT 基因型, 在 1173 位点序列是 TCTTGG, 不被内切酶切开, 最终只有 602bp 大小的产物。1173CT 基因型, 最终产物含有三种片段 602bp、544bp 和 602bp。而 3730G > A 位点, 采用 PCR-直接测序的方法进行验证。

表 2 普通 PCR 引物序列

SNP	引物名称	序列 (5' -3')	产物大小 (bp)
1173C > T	1173 F	GATAATCTGCCCCCG	606
		ACTCCCA	
	1173R	CCTGCCCGAGAAAGG	
3730G > A	3730F	GTGCGTAAGCCACCA	1044
		CATCTGCCCT	
	3730R	TTCACAACCTGGCCC	
		TGACCT	

1.5.2 PCR 反应体系 50μL 10 × buffer 5μL, 10mM dNTP 1μL, 基因组 DNA1μL, 10μM 正反向引物各 0.5μL, 2.5U/μL hot start taq polymerase 1μL, 双蒸水 41μL。反应条件: 95℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 30 秒, 退火 64℃ 30 秒, 延伸 40 秒, 共 35 个循环, 最后延伸 7min。

采用 DNA 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化。1173C > T, 对纯化产物进行酶切分型。

1.5.3 酶切反应体系 20μL 10 × buffer 2μL, PCR 产物 10μL, 双蒸水 7μL, EcoT14 I 1μL。37℃ 水浴过夜。2.5% 琼脂糖凝胶电泳分析酶切产物。

3730G > A, 将纯化产物送往奥科公司进行测序分析。将测序结果与 GeneBank AY587020 序列进行比较。

1.6 统计分析

用 SPSS 13.0 统计软件分析处理, 计数资料用  $\chi^2$  检验, 计量资料用  $t$  检验, 数据描述用均数 ± 标准差表示。应用 SHEsis 软件分析处理基因型与等位基因分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡, 以及两个位点的连锁不平衡关系。以  $P < 0.05$  为

差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 ARMS-PCR 方法的建立

提取的 DNA 按 10 倍稀释依次成原液的 0.1、0.01、0.001、0.0001 倍。每种浓度分别取 5 L 各加到 20 L 的 PCR 体系中去。结果如图 1。



图 1 模板浓度梯度 PCR

注: 基因型 3730GG ARMS-PCR 扩增结果 泳道 1, 3, 5, 7, 9 为与模板错配引物; 泳道 2, 4, 6, 8, 10 为与模板配对的引物。泳道 1, 2 反应体系中的模板量为所提取的原液加 5μL; 泳道 3, 4 模板量为 0.5μL 原液; 泳道 5, 6 模板量为原液稀释 10 倍后加 0.5μL; 泳道 7, 8 模板量为原液稀释 100 倍后加 0.5μL; 泳道 9, 10 模板量为原液稀释 1000 倍后加 0.5μL;

从结果可以看出, 当模板量为 5μL 原液时, 电泳结果有上涂抹带, 出现非特异扩增; 当模板浓度为原液稀释 100 倍后加 0.5μL 到体系中时, 目的条带变弱; 当模板浓度为原液 1000 倍加 0.5μL 体系中时, 无目的条带; 当模板浓度为原液稀释 10 倍后加 0.5μL 到体系中, 或加 0.5μL 到体系中时, 目的条带清晰且没有假阳性。最终确定, 反应体系中加 0.5μL 原液作为 ARMS-PCR 的模板。

退火温度从 53℃ 至 70℃, VKORC1 3730GG 基因型的 ARMS-PCR 扩增结果见图 2。

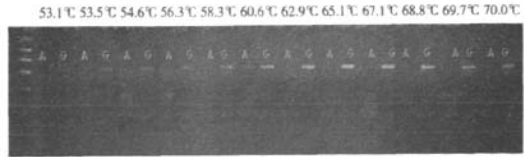


图 2 退火温度梯度 PCR

从结果可以看出, 当退火温度低于 60℃, 出现非特异扩增以及假阳性情况; 当退火温度在 60 ~ 70℃ 范围内时, 出现单一的明亮的条带, 且能

够很好地区分基因型。

用建立的 ARMS-PCR 的方法能够很好的检测出各基因型 (如图 3、4), 在检测过程中不会出现假阳性和假阴性的结果。该方法对各种 DNA 标本均能检测出, 特异性强。用建立的 ARMS-PCR 的方法, 在不同时间对样品重复检测 3 次, 结果一致。

## 2.2 ARMS-PCR 对基因型的鉴定电泳结果

应用 ARMS-PCR 技术对 *VKORC1* 的 1173C > T 和 3730G > A 进行基因分型。通过条件摸索, 我们成功建立起来了 ARMS-PCR 对两个位点进行基因分型的反应体系及反应条件。ARMS-PCR 检测 *VKORC1* 1173C > T (见图 3), ARMS-PCR 检测 3730G > A (见图 4)。



图 3 ARMS-PCR 检测 1173C > T 电泳图

注: 1、3、5、7、9 和 11 是引物 1173R-T 与 1173F 扩增的产物, 2、4、6、8、10 和 12 为引物 1173R-C 和 1173F 扩增的产物。从图中可看出, 标本号为 27、46、64 和 81 的基因型为 TT, 82 号标本的基因型为 CT, 173 号标本为 CC。



图 4 ARMS-PCR 检测 3730G > A 电泳图

注: 1、3、5、7、9 和 11 是引物 3730F-A 与 1173R 扩增的产物, 2、4、6、8、10 和 12 为引物 1173F-G 和 1173R 扩增的产物。从图中可看出, 标本号为 65、66、67 和 68 的基因型为 GG, 69 号标本的基因型为 AA, 70 号标本为 GA。

## 2.3 PCR-RFLP 或直接测序结果验证

在 1173 C > T 位点: 在 15 个样本中, 直接检测出 1173CT 2 个, 1173TT 13 个, 与 ARMS-PCR 检测的结果一致。1173 CC 基因型, 在 1173 位点存在 CCTTGG 序列能被内切酶 *EcoT14 I* 切开, PCR 产物经酶切后, 得到 544bp 和 62bp 长度的产

物。而 1173TT 基因型, 在 1173 位点序列是 TCT-TGG., 不被内切酶切开, 最终只有 602bp 大小的产物 (图 5)。

在 3730G > A 位点: 在 15 个样本中, 直接检测出 3730 GA 2 个, 3730GG 13 个, 与 ARMS-PCR 检测的结果一致。3730 GA 型和 GG 型的鉴定 (见图 6、图 7)。

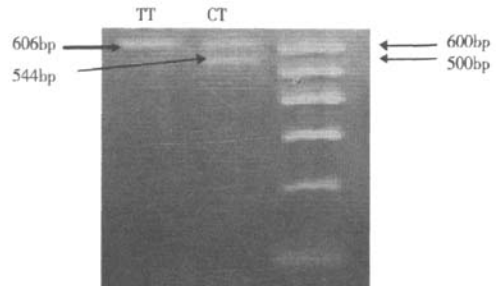


图 5 1173 TT 型和 CT 型的酶切鉴定电泳图

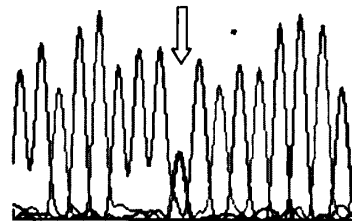


图 6 3730GA 型测序结果

注: 序列为 CCATACCCA (G) CACATGAC

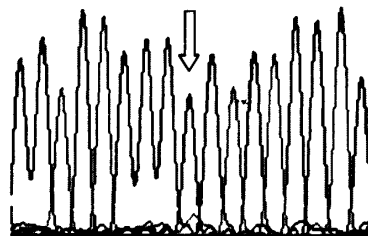


图 7 3730GG 型测序结果

注: 序列为 CCATACCCGCACATGAC

## 2.4 *VKORC1* 1173C > T 3730G > A 基因型及等位基因频率分布

*VKORC1* 1173C > T 3730G > A 基因型及等位基因频率如表 3 所示。1173C > T 等位基因 C 和 T 的频率分别为 7.1%、92.9%; 3730G > A 等位基因 G

和 A 的频率分别为 7.3% 和 92.7%。经 Hardy-Weinberg equilibrium 检验,  $P$  值分别为 0.30 和 0.35, 大于 0.05, 说明所研究的样本具有群体代表性。

经 SHEsis 软件连锁不平衡分析, 两个位点存在强烈的连锁不平衡关系 ( $D' = 0.77$ ,  $r^2 = 0.58$ )。

表 3 *VKORC1* 1173C > T 和 3730G > A 基因型频率、等位基因频率

SNP	等位基因	n (%)	基因型	n (%)
1173C > T	C	29 (7.1)	CC	2 (1.0)
	T	381 (92.9)	CT	25 (12.2)
			TT	178 (86.8)
3730G > A	G	380 (92.7)	GG	177 (86.3)
	A	30 (7.3)	GA	26 (12.7)
			AA	2 (1.0)

2.5 基因型与华法林维持剂量的统计分析

两个位点各基因型组间的性别、年龄、身高和体重的信息见表 4、5。经分析各组间无统计学显著性差异。

对华法林的维持剂量做变异数分析 (ANOVA), 1173CC 基因型华法林维持剂量为  $8.13 \pm 0.88 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ , 明显高于 1173CT 基因型 ( $5.33 \pm 2.03 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 而 1173CT 基因型的华法林剂量明显高于 1173TT 基因型 ( $3.86 \pm 1.52 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ )

(如表 5, 图 8)。对于 3730G > A, 基因型 AA 最高  $8.13 \pm 0.88 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ , GA 基因型居中 ( $5.48 \pm 2.06 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ), GG 基因型最低 ( $3.83 \pm 1.70 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$ ) (表 6, 图 8、9)。*VKORC1* 1173C > T 和 3730G > A 对华法林的维持剂量都有明显的影响 ( $P$  值均小于 0.001)。

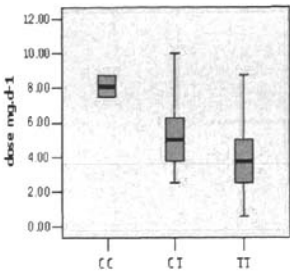


图 8 1173C > T ANOVA 分析结果

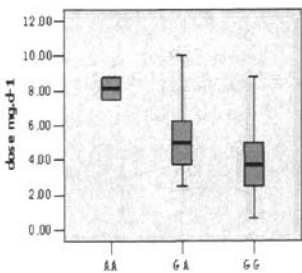


图 9 3730G > A ANOVA 分析结果

表 4 *VKORC1* 1173C > T 各基因型间临床资料比较

	CC (n=2)	CT (n=25)	TT (n=178)	差异显著性 (P)
性别 (男/女)	1/1	13/12	94/84	>0.05
年龄 (岁)	61.00 ± 5.66	64.80 ± 13.64	59 ± 13.80	>0.05
身高 (cm)	164.00 ± 11.31	165.76 ± 9.12	166.37 ± 8.15	>0.05
体重 (kg)	67.75 ± 10.96	69.16 ± 10.20	71.09 ± 12.20	>0.05
INR	2.42 ± 0.33	2.28 ± 0.25	2.36 ± 0.26	>0.05

表 5 *VKORC1* 3730G > A 各基因型间临床资料比较

	AA (n=2)	GA (n=26)	GG (n=177)	差异显著性 (P)
性别 (男/女)	1/1	15/11	92/85	>0.05
年龄 (岁)	61.00 ± 5.66	63.76 ± 14.17	59.60 ± 13.78	>0.05
身高 (cm)	164.00 ± 11.31	166.50 ± 8.26	166.27 ± 8.28	>0.05
体重 (kg)	67.75 ± 10.96	69.92 ± 11.13	71.00 ± 12.10	>0.05
INR	2.41 ± 0.33	2.29 ± 0.23	2.36 ± 0.26	>0.05

表6 VKORC1 各基因型间 ANOVA 分析结果

SNP	基因型	维持剂量 $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$	检验结果
1173C > T	CC (N=2)	8.13 $\pm$ 0.88	F=15.8
	CT (N=25)	5.33 $\pm$ 2.03	P<0.001
	TT (N=178)	3.86 $\pm$ 1.52	
3730G > A	AA (N=2)	8.13 $\pm$ 0.88	F=19.3
	GA (N=26)	5.48 $\pm$ 2.06	P<0.001
	GG (N=177)	3.83 $\pm$ 1.70	

由于两个位点存在连锁不平衡,故进一步分析了各基因型组合的用药剂量情况(表7)。

表7 VKORC1 1173 和 3070 各基因型组合的 ANOVA 分析结果

基因型 1173C > T	3730G > A	维持剂量 ( $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ )	检验结果
CC (n=2)	AA (n=2)	8.13 $\pm$ 0.88	F=10.0
	Total (n=2)	8.13 $\pm$ 0.88	P<0.001
CT (n=25)	GA (n=19)	5.69 $\pm$ 2.15	
	GG (n=6)	4.17 $\pm$ 1.02	
	Total (n=25)	5.33 $\pm$ 2.03	
TT (n=178)	GA (n=7)	4.91 $\pm$ 1.78	
	GG (n=171)	3.82 $\pm$ 1.50	
	Total (n=178)	3.86 $\pm$ 1.52	

## 2.6 多元线性回归分析

将样本分为两组,前165例样本作为一组进行多元线性回归分析,推算出华法林维持剂量的模型(表8),后40例样本为一组,验证模型的准确性。应用SPSS统计软件,运用成配对t检验,比较了40例患者的维持剂量预测值和实际的维持剂量检验预测值与实际值无显著性差异(表9)。

将患者的年龄、体重、VKORC1 1173C > T等因素作为自变量,维持剂量的平方根( $\sqrt{D}$ )为因变量(维持剂量=D,偏态分布,故进行平方根数据转换)做多元线性回归分析。 $\sqrt{D} = 1.856 - 0.007$ (年龄,岁) +  $0.007$ (体重,kg) +  $0.408$ (VKORC1 1173)其中,VKORC1 1173' CC' = 2,' TC' = 1,' TT' = 0。此回归模型中,判定系数的平方( $R^2$ ) = 0.238,回归

方程显著性检验(F检验)  $F = 16.7$ ,  $P < 0.001$ ,各自变量的回归系数的显著性检验(t检验)P值均小于0.05。

应用该预测模型方程,对后40例患者的维持剂量进行预测,得到各样本的维持剂量的预测值。应用SPSS统计软件,运用成配对t检验,比较了40例患者的维持剂量预测值和实际的维持剂量,配对t检验的统计量t为1.52,所对应的双侧P值为0.126,因为大于0.05,预测值与实际值无显著性差异。所以应用该模型所得的预测值与实际值具有一致性,一般低于实际值( $0.42 \pm 1.70$ )  $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

表8 多元线性回归分析结果

因素	回归模型	P	R <sup>2</sup>
年龄、体重、VKORC1 1173	$\sqrt{D} = 1.856 - 0.007$ (年龄,岁) + $0.007$ (体重,kg) + $0.408$ (VKORC1 1173)其中,VKORC1 1173' CC' = 2,' TC' = 1,' TT' = 0。	<0.001	0.238
年龄、体重、VKORC1 3730	$\sqrt{D} = 1.856 - 0.007$ (年龄,岁) + $0.007$ (体重,kg) + $0.444$ (VKORC1 3730)其中,VKORC1 37303' AA' = 2,' GA' = 1,' GG' = 0。	<0.001	0.270

表9 理论值与实际值配对样本的t检验

模型	P	差值
$\sqrt{D} = 1.856 - 0.007$ (年龄,岁) + $0.007$ (体重,kg) + $0.408$ (VKORC1 1173)其中,VKORC1 1173' CC' = 2,' TC' = 1,' TT' = 0。	0.126	( $0.42 \pm 1.70$ ) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$
$\sqrt{D} = 1.856 - 0.007$ (年龄,岁) + $0.007$ (体重,kg) + $0.444$ (VKORC1 3730)其中,VKORC1 37303' AA' = 2,' GA' = 1,' GG' = 0。	0.106	( $0.44 \pm 1.70$ ) $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$

将患者的年龄、体重、*VKORC1* 3730G > A 等因素作为自变量, 维持剂量的平方根 ( $\sqrt{D}$ ) 为因变量做多元线性回归分析:  $\sqrt{D} = 1.856 - 0.007$  (年龄, 岁) +  $0.007$  (体重, kg) +  $0.444$  (*VKORC1* 3730) 其中, *VKORC1* 37303' AA' = 2, 'GA' = 1, 'GG' = 0。此回归模型中, 判定系数的平方 ( $R^2$ ) = 0.270, 回归方程显著性检验 (F 检验)  $F = 19.8$ ,  $P < 0.001$ , 各自变量的回归系数的显著性检验 ( $t$  检验)  $P$  均小于 0.05。

应用该预测模型方程, 对后 40 例患者的维持剂量进行预测, 得到各样本的维持剂量的预测值。应用 SPSS 统计软件, 运用成配对  $t$  检验, 比较了 40 例患者的维持剂量预测值和实际的维持剂量, 配对  $t$  检验的统计量  $t$  为 1.655, 所对应的双侧  $P$  值为 0.106, 因为大于 0.05, 预测值与实际值无显著性差异。所以应用该模型所得的预测值与实际值具有一致性, 一般低于实际值 ( $0.44 \pm 1.70$ )  $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

## 讨论

2007 年 8 月 16 日, 美国 FDA 批准修改华法林药品说明书, 要求在警示信息中标明人的遗传差异可能影响其对药物的反应, 但是关于中国人对华法林治疗的情况没有相应的数据。这份 FDA 发布的 COUMADIN 的说明书指出, 中国人对华法林的反应的主要由年龄来决定。本研究由于采用了年龄相近的人群, 基本除去了年龄差异的影响, 探讨了在汉族服用华法林的静脉血栓栓塞患者中 *VKORC1* 基因对服用华法林剂量的影响。结果显示, *VKORC1* 1173C > T、3730G > A 对华法林的维持剂量明显的影响 ( $P$  均小于 0.001)。

我们研究发现, 在汉族 VTE 患者中基因型 1173CC、CT、TT 和 3730AA、GA、GG 的频率分别为 1.0%、12.2%、86.8%、1.0%、12.7%、86.3%, 等位基因 1173C、T 和 3730A、G 的频率分别为 7.1%、92.9%、7.3%、92.7%。这与其

他文献报道<sup>[4,7]</sup>有关中国汉族服用华法林人群以及正常人群的基因型和等位基因频率无差异。但是, 无论是基因型还是等位基因频率分布, 与国外人群如马来西亚<sup>[8]</sup>、印度<sup>[8]</sup>、高加索<sup>[4,9]</sup>比较均有差异。我们还发现了 1173C > T 和 3730G > A 两个位点存在着强烈的连锁不平衡关系 ( $D' = 0.77$ ,  $r^2 = 0.58$ ), 这与台湾学者 Yuan 等<sup>[4]</sup>对汉族人群报道基本一致, 而与 D' Andrea 等<sup>[9]</sup>报道的有关高加索人群的研究结果不一致。综上所述, 不同种族间基因多态性的分布存在着一定的差异。

本实验研究显示在 205 名服用华法林的 VTE 患者 *VKORC1* 1173C > T、3730G > A 突变对华法林的稳定剂量会产生明显的影响 ( $P < 0.001$ ), 证实了 *VKORC1* 1173C > T、3730G > A 的突变会减少服用华法林的用量。这结果与此前文献有关汉族人群服用华法林的报道一致<sup>[4,7]</sup>。这也解释了不同民族间人群服用华法林剂量存在明显差异的原因。各民族间 *VKORC1* 1173C > T、3730G > A 的基因分布的较大差异, 引起了患者服用华法林剂量的差异。在亚洲人群中, 1173TT 居多, 1173CT 和 CC 较少, 西方高加索人群的 *VKORC1* 1173 基因型是以 CT 型为主, CC 型次之, TT 型最少<sup>[9]</sup>。因此, 西方高加索人群和华法林维持剂量普遍高于亚洲人群。

*VKORC1* 是氢醌型维生素 K 的再生因子, 而氢醌型维生素 K 是维生素 K 依赖性凝血因子的合成的辅助因子。因此, *VKORC1* 多态性可能是血管疾病的发病诱因。法国学者 Lacut K 等<sup>[10]</sup>通过 439 名静脉血栓栓塞患者和 439 名健康对照的研究, 发现 *VKORC1* 1173C > T 是 VTE 的发病诱因 ( $OR = 0.62$ )。但是, 其他学者的研究结果否定了这一结论<sup>[11,12]</sup>。本研究报道的汉族静脉血栓栓塞患者中的 *VKORC1* 的 1173C > T 和 3730G > A 的基因型和等位基因频率与其他文献报道的汉族正常人群的无统计学差异, 提示 *VKORC1* 1173C > T 和



3730G > A 不是 VTE 的发病诱因。但是,要进一步探索 *VKORC1* 基因多态性与静脉血栓栓塞发病的关系,必须扩大的静脉血栓栓塞患者的样本量和进行增加相匹配的健康对照组的研究。

影响华法林剂量的因素还包括年龄、性别、身高、体重、CYP450 基因等,而本文只研究了 *VKORC1* 的 1173 和 3070 SNP 位点,本研究结果所显示的 *VKORC1* 基因多态性与华法林剂量的相关性,提示单独使用 *VKORC* 基因多态性分析,可以为服用华法林患者的剂量调整提供一个客观的参考,从而促进华法林的个体化治疗。

另外,本研究采用了 ARMS-PCR 技术对 *VKORC1* 的 1173C > T 和 3730G > A 成功进行基因分型,并用其他方法对结果进行了验证。ARMS-PCR 是根据已知的 SNP 位点设计两条特异引物和一条普通公共引物。两条特异性引物 3' 末端与分别与 SNP 位点的野生型和突变型碱基互补,当引物的 3' 末端碱基不能与模板互补时,延伸效率明显降低,当错配碱基的数目达到一定程度或者反应条件达到一定的程度时,延伸无法继续,反应终止,得不到特异长度的扩增条带。因此,可以根据是否扩增出特异性产物来判断 SNP。ARMS-PCR 技术与 AS-PCR 技术相比,由于引入了合适的错配碱基,具有更强的特异性、更加稳定可靠。ARMS-PCR 与其他 SNP 检测方法相比,具有很多优点,特别适合临床检测使用。①操作简便,只需要 2 次平行的 PCR 和一次凝胶电泳就可以确定基因型的 SNP。②检测成本低,只需合成引物的费用和 DNA 聚合酶的费用。③不需要昂贵的实验设备有一台普通的 PCR 仪和电泳仪就够了,一般的实验室都能够实现。

# 【参考文献】

[1] Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR, et al. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest*, 1998, 114: 445S-469S

- [2] Hylek EM, Skates SJ, Sheehan MA, et al. An analysis of the lowest effective intensity of prophylactic anticoagulation for patients with nonrheumatic atrial fibrillation. *N Engl J Med*, 1996, 124: 970-979
- [3] Wadelius M and Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. *Pharmacogenomics J*, 2006, 7: 99-111
- [4] YUAN HY, CHEN JJ, LEE MT, et al. A novel functional *VKORC1* promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic difference in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet*, 2005, 14 (13): 1745-1751
- [5] Boom R, Sol C J A, Salimans M M, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 1990, 28 (3): 495-503
- [6] Krausa P, Bodmer JG, Browning MJ, et al. Defining the common subtypes of HLA - A9, A10, A28, and A19 by use of ARMS/PCR. *Tissue antigens*, 1993, 42: 91-95
- [7] Wang T L, Li H L, Tjong W Y, et al. Genetic factors contribute to patient-specific warfarin dose for Han Chinese. *Clinica Chimica Acta*, 2008, 396: 76-79
- [8] Lee SC, Ng SS, Oldenburg J, et al. Interethnic variability of warfarin maintenance requirement is explained by *VKORC1* genotype in an Asian population. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 79 (3): 197-205
- [9] D' ANDREA G, D' AMBROSIO RL, D I PERNA P, et al. A polymorphism in the *VKORC1* gene is associated with an inter-individual variability in the dose anticoagulant effect of warfarin. *Blood*, 2005, 105 (2): 645-649
- [10] Lacut K, Larramendy - Gozalo C, Le Gal G, et al. Vitamin K epoxide reductase genetic polymorphism is associated with venous thromboembolism: results from the EDITH Study. *J Thromb Haemost*, 2007, 5: 2020-2024
- [11] Watzka M, Nebel A, El Mokhtari NE, et al. Functional promoter polymorphism in the *VKORC1* gene is no major genetic determinant for coronary heart disease in Northern Germans. *Thromb Haemost*, 2007, 97: 998-1002
- [12] Hindorf LA, Heckbert SR, Smith N, et al. Common *VKORC1* variants are not associated with arterial or venous thrombosis. *J Thromb Haemost*, 2007, 5: 2025 - 2027