

· 综 述 ·

华法林出血并发症相关药物基因组学研究进展

刘 佳, 杨 洁, 尹 彤*

(解放军总医院心血管内科, 北京 100853)

【摘 要】 华法林作为一线口服抗凝药广泛应用于血栓栓塞性疾病的预防与治疗中, 但如何安全有效地应用华法林并达到最佳抗凝效果, 一直是临床上亟待解决的难题。近年对华法林药物基因组学的研究表明, 华法林代谢和作用相关基因(*CYP2C9*、*VKORC1*、*CYP4F2*)的变异很大程度上影响华法林的治疗剂量, 还可能与华法林的出血并发症密切相关。本文对上述基因变异与华法林的过度抗凝及出血的相关研究作一综述, 以期为临床华法林的个体化抗凝治疗提供参考依据。

【关键词】 华法林; 药物基因组学; 出血; 过度抗凝

【中图分类号】 R96

【文献标识码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2016.09.169

Warfarin related bleeding complications: progress in pharmacogenetic studies

LIU Jia, YANG Jie, YIN Tong*

(Department of Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Warfarin is widely used in the prevention and treatment of thromboembolic diseases. But, there still remain challenges for its safe and effective application and for how to obtain its best anticoagulation in clinical practice. In recent years, warfarin pharmacogenetics studies showed that the genetic variants of the genes (*CYP2C9*, *VKORC1* and *CYP4F2*) related to the pathway of warfarin metabolism and function could affect the therapeutic dose of warfarin dramatically, as well as the risks for bleeding complications. In this review, we focused on the studies concerning on the correlation of above genetic variants with warfarin related over-anticoagulation and bleeding complications, so as to provide clinical reference for individualized anticoagulation therapy.

【Key words】 warfarin; pharmacogenetics; bleeding complications; over-anticoagulation

This work was supported by the General Program of Natural Science Foundation of Beijing (7152129) and the Clinical Supporting Foundation of Chinese PLA General Hospital (2015FC-ZHCG-2002).

Corresponding author: YIN Tong, E-mail: yintong2000@yahoo.com

华法林(warfarin)作为临床一线口服抗凝药物, 广泛应用于非瓣膜性房颤、静脉血栓、肺栓塞及心脏瓣膜置换术后等血栓栓塞性疾病的预防与治疗, 但由于安全治疗范围狭窄、需要长期监测凝血指标, 并且存在严重和致命性出血并发症的风险, 其临床应用受到限制^[1]。尽管新一代口服抗凝药(凝血酶抑制剂和凝血因子Xa抑制剂)具有见效快、出血风险低和无需监测的优点, 但它们缺乏可靠的拮抗剂并且价格相对昂贵, 另外在人工心脏瓣膜置换术后及严重肾功能不全患者中的应用尚缺乏足够的证据^[2]。因此, 华法林在临床中仍然处于一线口服抗凝药的地位^[1,3]。出血是华法林最常见和最致命的并发症, 一直是人们关注的焦点, 严重影响患者的预

后, 是导致患者治疗中断、永久性致残甚至死亡的主要原因之一^[4]。华法林出血并发症发生的影响因素包括年龄、性别、抗凝强度、凝血指标监测情况、合并疾病以及合并用药等。研究结果表明, 华法林抗凝治疗过程中, 主要出血事件发生率高达3.36%^[5]。近年华法林药物基因组研究结果表明, 华法林代谢和作用相关基因的变异常能解释近50%的华法林剂量个体之间的差异^[6], 另外该变异还与华法林的出血并发症密切相关^[7]。本文将侧重对华法林出血并发症相关联的药物基因研究作一综述。

1 华法林代谢和作用通路及候选基因

华法林是R型和S型两种不同活性的消旋异

收稿日期: 2016-03-25; 修回日期: 2016-05-06

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目(7152129); 解放军总医院临床扶持基金(2015FC-ZHCG-2002)

通信作者: 尹 彤, E-mail: yintong2000@yahoo.com

构体混合物,发挥主要抗凝作用的S型华法林通过细胞色素P450家族成员2C9(CYP2C9编码基因CYP2C9)代谢^[8]。华法林通过阻断肝维生素K循环中的维生素K环氧化物还原酶(VKOR,编码基因VKORC1),减少还原型维生素K的生成,继而抑制 γ -谷氨酰羧化酶(γ -glutamylcarboxylase,GGCX)介导的谷氨酸 γ 羧化反应,导致维生素K依赖性凝血因子(II, VII, IX, X)的活化减少,从而发挥抗凝作用。在维生素K循环中,环氧型维生素K首先经VKOR转变为维生素K,然后在VKOR的作用下,转化为还原型维生素K,参与维生素K依赖性凝血因子的羧化反应^[9]。其中维生素K还可被细胞色素P450家族成员4F2(CYP4F2,编码基因CYP4F2)氧化水解^[10](图1)。近年来研究发现,华法林代谢和作用通路上的相关基因多态性与华法林导致的过度抗凝和出血并发症密切相关^[11]。

2 华法林代谢相关基因CYP2C9与华法林出血并发症的药物基因组学研究

2.1 CYP2C9的基因多态性

CYP2C9是华法林的关键代谢酶,编码CYP2C9蛋白的基因位于10号染色体长臂(10q24.2),全长

约为55 kb。CYP2C9基因具有高度多态性,人类细胞色素P450等位基因命名委员会迄今已命名58种SNP(CYP2C9 * 1 ~ CYP2C9 * 58),其中野生型CYP2C9 * 1、突变型CYP2C9 * 2(Arg144Cys, C430T)和突变型CYP2C9 * 3(Ile 359 Leu, A1075C)是最常见的3种基因型。CYP2C9 * 2和CYP2C9 * 3等位基因频率在不同种族间分布存在显著差异,在白种人中,CYP2C9 * 2和CYP2C9 * 3等位基因频率分别为8%~20%和6%~10%^[12]。亚洲人群中最主要的突变型为CYP2C9 * 3,CYP2C9 * 2基因型携带者较罕见,中国人群中CYP2C9 * 3基因型携带者仅占4%^[12-15]。研究表明CYP2C9 * 2携带者对华法林的最大代谢速率仅为CYP2C9 * 1携带者的50%,而CYP2C9 * 3蛋白较高的KM值和较低的固有清除率导致其S-华法林羟基化下降约90%^[11]。由于携带这两种基因型的患者对华法林的代谢能力降低,华法林在体内的大量蓄积使其抗凝作用显著增强,继而可能引起出血事件的发生。

2.2 CYP2C9基因多态性与华法林过度抗凝的关联性研究

通过国际标准化比值(international normalized ratio, INR)界定的过度抗凝被证实是华法林出血事

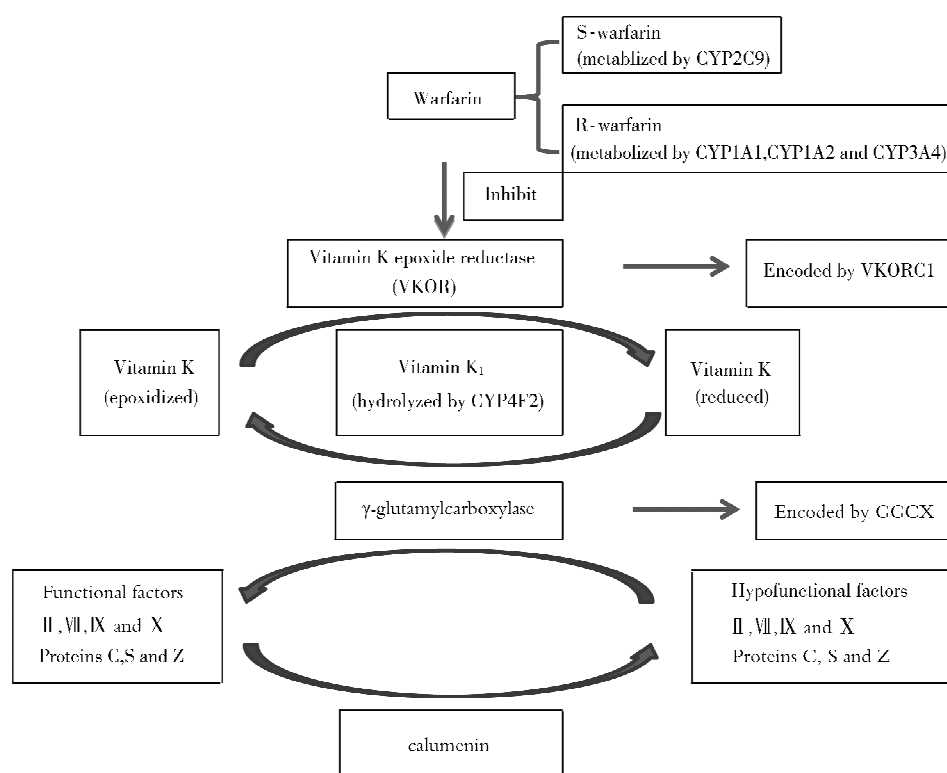


图1 华法林代谢和作用通路

Figure 1 Warfarin metabolism and function pathways

件重要且独立的危险因素之一。尽管过度抗凝并不总是与出血事件密切相关(患者 INR < 2.0 时仍然可能发生出血事件),但其依然是抗凝相关出血的主要影响因素^[16]。相对于 INR 在 2 ~ 3 的患者, INR > 4.5 的患者发生出血事件概率显著增加。另外,有研究发现,华法林抗凝治疗的患者 INR 值控制在 2.2 时,发生死亡的风险最低。当 INR 值 > 2.5 时,INR 每增加 1 个单位,出血风险增加 2 倍^[17]。

针对西方人群的一项小规模研究^[18]分析了 *CYP2C9* 基因型与过度抗凝 (INR > 4) 之间的相关性后,首先表明与 *CYP2C9* 野生型携带者相比, *CYP2C9* * 2 以及 *CYP2C9* * 3 功能缺失性等位基因 (LOF) 突变型携带者更易发生过度抗凝,其原因与 *CYP2C9* LOF 基因突变携带者代谢华法林的能力降低、进而导致华法林在体内蓄积、抗凝作用增强有关。随后 Voora 等^[19]的研究进一步证实了这一发现,但 Taube 等^[20]的研究未发现两者之间明显的相关性。出现上述研究结果差异的原因可能与不同研究纳入人群的差异,以及过度抗凝的判断标准不同有关,另外各研究纳入的病例数差距较大。我们课题组前期对以上研究进行了荟萃分析,结果发现,相对于 *CYP2C9* 野生型携带者, *CYP2C9* * 2 和 *CYP2C9* * 3 变异型携带者发生过度抗凝的风险均明显增高,而 *CYP2C9* * 3 变异型携带者发生过度抗凝的风险更高 (*CYP2C9* * 2: HR 1.52, 95% CI 1.11 ~ 2.09, $P = 0.01$; *CYP2C9* * 3: HR 2.37, 95% CI 1.46 ~ 3.83, $P = 0.001$)^[7]。

2.3 *CYP2C9* 基因多态性与华法林出血并发症的关联性研究

早在 1999 年, Ogg 等^[21]就对 *CYP2C9* 基因型与华法林出血并发症的相关性进行了研究,遗憾的是未发现明显相关性。随后 Higashi 等^[18]在对 185 例白种人患者的研究中证实,与野生型 *CYP2C9* * 1 相比, *CYP2C9* * 2 以及 *CYP2C9* * 3 突变型携带者发生出血事件的风险明显升高。我们课题组前期对 13 项相关研究进行荟萃分析后发现^[7],华法林总出血事件的发生率高达 23.0%, *CYP2C9* * 2 以及 *CYP2C9* * 3 基因型均与总出血事件的发生有关。与野生型 *CYP2C9* * 1 / * 1 携带者相比, *CYP2C9* * 3 / * 3 突变型携带者与华法林总出血事件的相关性最强 (*CYP2C9* * 3 / * 3: HR 4.87, 95% CI 1.38 ~ 17.14, $P = 0.01$),然而该荟萃分析并未发现 *CYP2C9* * 1 / * 2, * 2 / * 2, * 2 / * 3 突变型携带者与总出血事件的相关性。

此外,该研究还对 *CYP2C9* 基因型与主要出血

事件的相关性进行了荟萃分析。结果发现,主要出血的发生率为 9.9%, *CYP2C9* * 2 以及 *CYP2C9* * 3 突变型携带者较野生型 *CYP2C9* * 1 携带者发生主要出血事件的风险均显著升高 (*CYP2C9* * 2: HR 1.80, 95% CI 1.09 ~ 2.97, $P = 0.01$; *CYP2C9* * 3: HR 1.95, 95% CI 1.38 ~ 2.78, $P = 0.001$)^[7]。

2.4 *VKORC1* 基因变异

VKORC1 是编码 VKOR 蛋白的基因,位于 16 号染色体短臂 (16p11.2),全长约 4100 bp。华法林通过抑制 VKOR 酶的活性,减少还原型维生素 K 的生成,继而抑制谷氨酸 γ 羧化反应,导致维生素 K 依赖性凝血因子 (II, VII, IX, X) 的活化减少。

VKORC1-1639G > A (rs9923231) 是 *VKORC1* 基因目前研究最多的位点,位于 *VKORC1* 基因的启动子区,与处在第一个内含子区的 *VKORC1*-1173C > T 呈连锁不平衡。发生在该位点的突变影响了 *VKORC1* 的转录水平,继而影响 VKOR 的生成以及华法林药效动力学过程。*VKORC1*-1639G > A 突变基因分布频率存在明显的种族差异,在亚洲人、白种人和黑种人群中突变频率分别为 91.17%、38.79% 和 10.81%^[22]。*VKORC1*-1639A 等位基因频率在中国人群中高达 90%。大量研究表明,这一高突变频率是导致中国人华法林平均稳定剂量低于白种人的主要原因^[14,15]。

2.5 *VKORC1* 基因变异与过度抗凝相关研究

Limdi 等^[23]分析 *VKORC1*-1639G > A 基因型与华法林出血事件的相关性,发现与 *VKORC1*-1639 野生型相比, *VKORC1*-1639 AA 和 GA 携带者更易发生过度抗凝 (HR 3.63, 95% CI 2.45 ~ 5.36, $P < 0.001$)。Lund 等^[24]进一步研究发现,在华法林治疗起始 30 d 内, AA 型较 GA 型携带者与过度抗凝的相关性更显著 (*VKORC1*-1639 AA: HR 7.80, 95% CI 3.70 ~ 16.45, $P < 0.001$; *VKORC1*-1639 GA: HR 2.34, 95% CI 1.18 ~ 4.65, $P = 0.013$)。此后陆续有研究证实这一相关性,但是也有研究得出相反的结论^[25],我们课题组对以上研究荟萃分析后发现, *VKORC1*-1639 AA 和 GA 携带者较 *VKORC1*-1639 野生型更易发生过度抗凝 (HR 1.93, 95% CI 1.24 ~ 2.99, $P = 0.003$)^[7]。分层分析后发现,此相关性在华法林治疗起始 30 d 内尤为显著 ($P < 0.001$),但在治疗 30 d 后的研究中未发现明显相关性。这表明在华法林治疗早期 *VKORC1*-1639G > A 基因型与 *CYP2C9* 基因型相比虽更易过度抗凝,但是在治疗 30 d 以后 *CYP2C9* 基因型与过度抗凝的相关性更强^[7]。这可能由于 *VKORC1* 编码的是华法林作用

的靶蛋白,患者根据 INR 值及时做出剂量调整以后消除了 *VKORC1* 基因影响,而 *CYP2C9* 基因编码的蛋白与华法林代谢有关,剂量的调整对其影响较小。

2.6 *VKORC1* 基因变异与出血相关研究

在针对 *VKORC1* 基因型与华法林出血事件的相关性研究中,大部分研究并未发现基因型与出血事件的明显相关性,仅 1 项针对长期服用华法林抗凝治疗的小规模白种人群患者研究表明, *VKORC1*-1639G > A 突变型携带者与总出血事件仅呈微弱相关性^[26]。另外有研究还对 *VKORC1*-1639G > A 基因型与主要出血事件的相关性进行了分析,但是并未发现明确的相关性^[26-28],这可能是由于 *VKORC1*-1639G > A 是华法林剂量敏感相关基因型,携带该基因型的患者早期可能已通过 INR 值做出的剂量调整,降低了 *VKORC1* 基因型对出血事件的影响。

2.7 *CYP4F2* 基因变异与出血相关研究

近年研究发现,细胞色素 P450 家族的成员 *CYP4F2* 通过羟基化维生素 K 苯基侧链导致体内还原型维生素 K 浓度下降。*CYP4F2* 基因位于 19 号染色体短臂(19p13.12),全长约 20 kb。突变以后对维生素 K 的代谢能力改变,造成维生素 K 蓄积或减少,由于肝脏维生素 K 水平和经由维生素 K 循环进行的凝血因子 γ 羧化反应的改变是导致华法林出血并发症的直接影响因素,因此认为 *CYP4F2* 基因变异型可能与华法林出血并发症相关。Roth 等^[29]研究发现,与华法林剂量仅有微弱相关性的 *CYP4F2* rs2108622 变异型携带者发生华法林出血并发症的风险较非携带者降低 38% (OR 7.61, 95% CI 0.43 ~ 0.91)。*CYP4F2* rs2108622 分布频率有明显的种族差异,*CYP4F2* rs2108622 CC 基因型在亚洲人、非裔美国人和白种人群中分布频率分别是 66.9%、84.0% 和 46.0%; CT 基因型分布频率分别是 31.5%、16.0% 和 42.0%; TT 基因型分布频率分别是 1.6%、0.0% 和 12.0%。中国人群中 *CYP4F2* rs2108622 突变频率约 32.9% ~ 48.0%^[14,15,22]。*CYP4F2* rs2108622 C > T 突变后导致该酶活性下降,氧化还原型维生素 K 能力降低,使体内还原型维生素 K 浓度升高,凝血作用增强,可能是导致出血事件降低的主要原因。但是 Kawai 等^[30]的研究 ($n=509$) 未发现该位点基因突变与出血事件具有明显相关性。上述两个研究纳入病例较少,且未涵盖所有人群,结论需要通过大规模临床试验进一步验证。

另一个与华法林出血相关的位点 *CYP4F2* rs3093168 位于 *CYP4F2* 基因第 9 个内含子区,野生

型 CC 基因型在中国汉族、日本、白种人和非洲人群分布频率分别为 30%、13%、47% 和 43%。我们课题组前期在对 312 例使用华法林抗凝治疗的中国汉族患者研究后发现 *CYP4F2* rs3093168 CT 和 TT 基因型携带者较未携带者更易发生主要出血事件 (HR 7.61, 95% CI 1.26 ~ 45.83, $P=0.03$)^[31]。但造成此差异的具体机制尚不清楚,可能与突变后对维生素 K 的代谢能力增加有关。

3 结 论

综上所述, *CYP2C9* 与 *VKORC1* 基因变异型均与华法林治疗期间过度抗凝相关,并且在治疗早期, *VKORC1*-1639G > A 与过度抗凝的相关性更显著。*CYP2C9* *2 和 *CYP2C9* *3 基因型携带者服用华法林时更易发生出血事件,其中 *CYP2C9* *3 较 *CYP2C9* *2 与出血的相关性更强。尽管 *VKORC1*-1639 A 等位基因携带者更易发生过度抗凝,但是并未导致出血事件的显著增加。关于 *CYP4F2* 基因变异与华法林过度抗凝和出血并发症的相关性尚有待于更多的研究证实。

【参考文献】

- [1] January CT, Wann LS, Alpert JS, et al. 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society [J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 64 (21): e1 - e76.
- [2] De Caterina R, Husted S, Wallentin L, et al. New oral anti-coagulants in atrial fibrillation and acute coronary syndromes: ESC Working Group on Thrombosis-Task Force on Anticoagulants in Heart Disease position paper [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 59(16): 1413 - 1425.
- [3] Chen CH, Chen MC, Gibbs H, et al. Antithrombotic treatment for stroke prevention in atrial fibrillation: The Asian agenda [J]. Int J Cardiol, 2015, 191: 244 - 253.
- [4] Giugliano RP, Ruff CT, Wiviott SD, et al. Mortality in patients with atrial fibrillation randomized to edoxaban or warfarin: insights from the ENGAGE AF-TIMI 48 trial [J]. Am J Med, 2016, 129(8): 850 - 857.
- [5] Ziff OJ, Camm AJ. Individualized approaches to thromboprophylaxis in atrial fibrillation [J]. Am Heart J, 2016, 173: 143 - 158.
- [6] 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.
- [7] Yang J, Chen Y, Li X, et al. Influence of *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes on the risk of hemorrhagic complications in warfarin-

- treated patients: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(4): 4234–4243.
- [8] Lewis BC, Nair PC, Heran SS, *et al.* Warfarin resistance associated with genetic polymorphism of VKORC1: linking clinical response to molecular mechanism using computational modeling[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2016, 26(1): 44–50.
- [9] Stafford DW. The vitamin K cycle[J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(8): 1873–1878.
- [10] McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M. CYP4F2 is a vitamin K₁ oxidase; an explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant[J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(6): 1337–1346.
- [11] Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1—rationale and perspectives[J]. *Thromb Res*, 2007, 120(1): 1–10.
- [12] Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, *et al.* The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting[J]. *Blood*, 2009, 113(4): 784–792.
- [13] Zhu Y, Shennan M, Reynolds KK, *et al.* Estimation of warfarin maintenance dose based on VKORC1 (–1639 G > A) and CYP2C9 genotypes[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(7): 1199–1205.
- [14] Gen HJ, Zeng WT, Leng XY, *et al.* CYP4F2 rs2108622: a minor significant genetic factor of warfarin dose in Han Chinese patients with mechanical heart valve replacement[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2010, 70(2): 234–240.
- [15] 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.
- [16] Palareti G, Cosmi B. Bleeding with anticoagulation therapy—who is at risk, and how best to identify such patients[J]. *Thromb Haemost*, 2009, 102(2): 268–278.
- [17] Oden A, Fahlen M. Oral anticoagulation and risk of death: a medical record linkage study[J]. *BMJ*, 2002, 325(7372): 1073–1075.
- [18] Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, *et al.* Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy[J]. *JAMA*, 2002, 287(13): 1690–1698.
- [19] Voora D, McLeod HL, Eby C, *et al.* The pharmacogenetics of coumarin therapy[J]. *Pharmacogenetics*, 2005, 6(5): 503–513.
- [20] Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment[J]. *Blood*, 2000, 96(5): 1816–1819.
- [21] Ogg MS, Brennan P, Meade T, *et al.* CYP2C9 *3 allelic variant and bleeding complications[J]. *Lancet*, 1999, 354(9184): 1124.
- [22] Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, *et al.* Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups[J]. *Blood*, 2010, 115(18): 3827–3834.
- [23] Limdi NA, Wiener H, Goldstein JA, *et al.* Influence of CYP2C9 and VKORC1 on warfarin response during initiation of therapy[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2009, 43(1): 119–128.
- [24] 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.
- [25] Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, *et al.* Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(10): 999–1008.
- [26] Mandic D, Bozina N, Mandic S, *et al.* VKORC1 gene polymorphisms and adverse events in Croatian patients on warfarin therapy[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2015, 53(11): 905–913.
- [27] Ma C, Zhang Y, Xu Q, *et al.* Influence of warfarin dose-associated genotypes on the risk of hemorrhagic complications in Chinese patients on warfarin[J]. *Int J Hematol*, 2012, 96(6): 719–728.
- [28] Limdi NA, Arnett DK, Goldstein JA, *et al.* Influence of CYP2C9 and VKORC1 on warfarin dose, anticoagulation attainment and maintenance among European-Americans and African-Americans[J]. *Pharmacogenomics*, 2008, 9(5): 511–526.
- [29] Roth JA, Boudreau D, Fujii MM, *et al.* Genetic risk factors for major bleeding in patients treated with warfarin in a community setting[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 95(6): 636–643.
- [30] Kawai VK, Cunningham A, Vear SI, *et al.* Genotype and risk of major bleeding during warfarin treatment[J]. *Pharmacogenomics*, 2014, 15(16): 1973–1983.
- [31] Wang HJ, Ma C, Yang J, *et al.* CYP4F2 polymorphism as a genetic risk factor for major hemorrhagic complications in Chinese patients on warfarin therapy[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2012, 9(2): 209–210.

(编辑: 王彩霞)