

• 综 述 •

华法林抗凝治疗剂量的药物基因组学研究——理论和应用前景

尹 彤,徐 斌 综述 王士雯 审校

【摘要】 华法林作为最常用的口服抗凝药物,广泛应用于慢性心房颤动、静脉血栓、肺栓塞,及心脏瓣膜置换术后等的抗凝治疗中。然而,由于华法林有效治疗剂量的范围狭窄和在个体间差异显著,加之剂量过高会导致严重出血的危险,华法林在临床上的应用受到了极大地限制。如何安全有效地应用华法林,使之达到最佳治疗效果,一直是心血管领域研究的热点和亟待解决的难题。近年来,对华法林的药物基因组学研究发现,决定华法林代谢和作用的两个主要候选基因 CYP2C9 和 VKORC1 的遗传变异型,很大程度上决定了华法林有效抗凝治疗剂量的个体间差异。本文总结了 CYP2C9 和 VKORC1 的基因变异型对华法林剂量的影响,还对近年来通过结合基因和临床因素建立的华法林剂量计算模型对预测有效华法林剂量和副作用的意义进行了综述。

【关键词】 华法林; 基因组学; CYP2C9; VKORC1; 剂量

【中图分类号】 R966

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2010)05-0473-04

基因多态性能够影响个体对药物的反应,药物基因组学(Pharmacogenomics)的研究目的在于寻找个体基因型对药物反应的作用,继而帮助优化药效并减少药物的副作用。当前许多药物基因组学的信息是基于基因多态性的相关性研究,这些基因编码药物代谢酶、运载体、受体,以及与药物信号途径相关的蛋白质等。在目前的临床工作中,药物基因组学的检测仅仅针对几种药物,其中华法林是重要的候选药物之一。

华法林作为香豆素的衍生物,广泛应用于慢性心房颤动、静脉血栓、肺栓塞,及心脏瓣膜置换术后等的抗凝治疗中。但是华法林有效治疗窗很窄,且不同个体的稳定治疗剂量有着很大的差异。剂量不足将无法预防血栓栓塞,剂量过高则会导致出血的危险。目前主要通过检测(PT-INR)前凝血酶原时间国际标准化比率来对华法林在不同患者中的抗凝程度和剂量进行调整。应用华法林的挑战在于,在治疗的早期阶段需要明确患者的安全与有效维持剂量,维持剂量的高低还需要通过结合患者的体重、饮食、病情、合并用药以及基因因素进行调整。传统华法林的应用主要依靠给予初次用量后,通过反复监测 INR 值进行定量,但是没有考虑到个体基因因素和临床因素对华法林剂量的影响,达到华法林稳定治疗的时间常常需要数周。通过整合药物基因组学、种族和临床等因素建立的华法林剂量估计模型来弥补上述传统方法的不足,将能够更精确地评估华法林剂量,降低药物过量所致严重出血的危险,并且减少华法林剂量调整的时间。

1 华法林的抗凝作用机制

华法林是维生素 K 环氧化还原酶(VKOR)的特异性抑制剂,VKOR 由维生素 K 环氧化还原酶复合亚单位 1 (VKORC1)基因所编码。还原型维生素 K 是 γ -谷氨酰基羧化酶(GGCX)的辅助因子,能够催化维生素 K 依赖的凝血因子 II、VII、IX 和 X 的翻译后 γ -谷氨酰基羧化作用(图 1)。华法林通过抑制 VKOR 阻断环氧化型维生素 K 向还原型维生素 K 的转化,导致维生素 K 依赖的凝血因子翻译后 γ -谷氨酰基羧化作用丧失,从而达到抗凝目的。

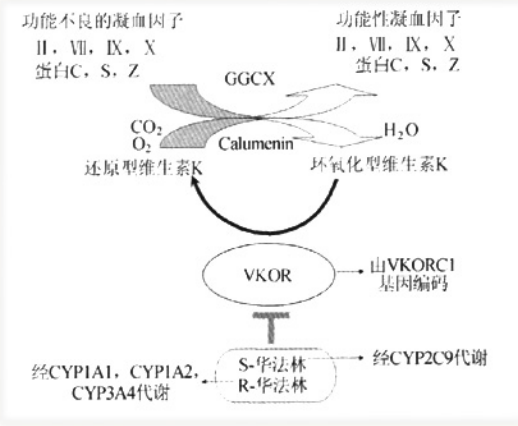


图 1 华法林代谢和作用的主要途径

2 华法林剂量与 CYP2C9 基因变异型的相关性

华法林是 R-和 S-对映异构物外消旋混合物,其中 S-华法林拮抗维生素 K 的能力是 R-华法林的 5 倍,在稳定状态下,S-华法林能够发挥 60%~70% 的抗凝作用,并主要经 CYP2C9 酶代谢。人类

CYP2C9 基因定位于染色体的 10q24.2 区域,长约 55kb,其最常见的等位基因被命名为 CYP2C9 * 1,被认为是该基因的野生基因型。目前大约有 24 个 CYP2C9 的非同义变异体已经被识别^[1],其中对 CYP2C9 * 2 (Arg144Cys) 和 CYP2C9 * 3 (Ile359Leu) 的功能研究最为深入,CYP2C9 * 2 蛋白的最大代谢率大约是野生型蛋白的 50%,该变异蛋白对华法林的转换率下降 30%至 50%。CYP2C9 * 3 蛋白具有明显升高的 K_m 值和较低的内在清除率,可使 S-华法林 7-羟基化作用减少大约 90%^[2-4]。CYP2C9 * 2 和 CYP2C9 * 3 的等位基因频率在不同的种族中具有相当大的差别,在亚洲人群中几乎不存在 CYP2C9 * 2 (除了部分东南亚人群),CYP2C9 * 3 则存在于 1%~4%的亚洲人中^[5,6]。

自从 2002 年 Higashi 等^[7]首先报道了 CYP2C9 的基因型与华法林抗凝状态或者出血状态之间的直接联系以来,CYP2C9 * 2 (rs1799853) 和 CYP2C9 * 3 (rs1057910) 两种变异型已被大量研究证实与华法林的较低治疗剂量和出血副作用相关。荟萃分析表明,携带 CYP2C9 * 2 或 CYP2C9 * 3 变异型的患者需要相对较低的华法林维持剂量,对于携带 CYP2C9 * 3 基因型的患者,华法林治疗剂量的减少更为显著(剂量减少 30%)^[8],出血副反应在携带 CYP2C9 * 2 和(或)CYP2C9 * 3 等位基因的患者中几乎加倍。新近对华法林药物基因组学的最大规模的($n=1496$)前瞻性研究发现,在治疗起始阶段,CYP2C9 * 3 纯合变异型携带者发生过度抗凝(INR 大于 4)的危险明显增加,危险比率为 21.84 (95% CI 9.46; 50.42)。CYP2C9 * 3/*3 携带者在接受华法林治疗的第一个月内发生出血的危险性为 12.5%,而非携带者仅为 0.27%^[9]。Schwarz 等^[10]的较小规模($n=297$)的前瞻性研究也得出了相似的结论。

3 华法林剂量与 VKORC1 基因变异型的相关性

VKORC1 是华法林的作用靶酶——VKOR 的编码基因,位于染色体 16p11.2,长约 4kb。由 VKORC1 先天性缺陷所致的出血表现型,称为维生素 K 依赖性凝血因子 II 缺乏症,在该疾病的患者中能够检测到 VKORC1 基因的错义突变 Arg98Trp^[11]。其他 VKORC1 的罕见错义突变(如 Val45Ala, Arg58Gly, Leu128Arg, Asp36Tyr, 和 Val66Met)可见于对华法林抵抗的患者中^[11-13],这些错义突变能够影响 VKORC1 的酶功能,继而导致患者对华法林的无反应性。

除了上述罕见功能性变异型外,VKORC1 的常见遗传多态性也被证实与华法林的治疗剂量相关。位于启动子区的-1639 G>A (rs9923231),内含子 1

的 1173 C>T(rs9934438)和 3'-未翻译区的 3730G>A (rs7294),均被证实会对华法林剂量的个体差异产生影响。其中,-1639 G>A 和 1173 C>T,以及内含子 2 的 2255 C>T (rs2359612)被证实呈完全的连锁不平衡(linkage disequilibrium, LD)。在排除混杂因素干扰的情况下,携带 VKORC1 1173CC 基因型的患者(6.2 mg/d)比携带 CT(4.8 mg/d; $P=0.002$)或者 TT(3.5 mg/d; $P<0.001$)基因型的患者的平均华法林剂量要更高一些^[14]。携带至少一个 T 等位基因的患者相对于 CC 基因型个体而言,出血的危险增加(粗略优势比=1.7, 95%置信区间: 1.1~2.5)^[15]。单体型分析(haplotype analysis)进一步确定了 VKORC1 对华法林剂量个体差异的重要作用^[16]。在低剂量单体型组(A)和高剂量单体型组(B)的三个组合之间,A/A 组的华法林平均剂量是(2.7±0.2) mg/d, A/B 组是(4.9±0.2) mg/d, B/B 组是(6.2±0.3) mg/d ($P<0.001$)。因此, VKORC1 单体型很大程度上解释了华法林剂量的个体间差异。

VKORC1 的多态性分布存在很大的种群间差异,-1639G>A 的 AA 基因型在中国人群中的发生频率(82%)要远远高于白种人(14%),但与日本人群的频率(82%)相当。与华法林的低治疗剂量相关的 VKORC1 单体型 A 在亚洲人群中的分布最高(89%),而单倍体 B 在白种人的分布最高(58%)^[16,18]。因此,VKORC1 多态性的种族间分布差异能够解释华法林平均治疗维持剂量在亚洲人和白种人之间的差异。

体外功能分析发现,VKORC1 的单体型与 mRNA 表达水平的差异相关^[16,18],VKORC1 的 mRNA 的不同表达水平可能造成了华法林剂量的个体间差异。最近的研究也证实了 VKORC1 启动子区的-1639G 等位基因与活性染色质的关系更为密切^[19],这与 mRNA 表达水平的增强相一致。

4 基于药物基因组学和临床因素对华法林剂量预测模型的建立

通过大规模的观察性和随机临床试验,CYP2C9 和 VKORC1 的基因型对华法林剂量的影响已经在各个种族的人群中得到一致的证实。CYP2C9 和 VKORC1 的基因变异型分别能够解释 12%(4%~20%)和 27%(15%~34%)的华法林剂量个体间差异,上述两个变异型结合临床相关因素(如年龄、性别、体重、身高、合并治疗的药物和治疗的效果)能够使大约 60%的华法林治疗剂量个体间差异得到合理的解释^[9,20-24]。一系列大规模临床试验的研究结果强有力地证实了利用药物基因组学信息和临床环境相关因素建立的华法林剂量运算预测模型,能够更准确地估计华法林的剂量,降低

治疗引导阶段华法林过量的风险,并缩短华法林达到稳定治疗的时间^[9, 17, 20, 23-25]。

5 基于全基因组相关性分析的华法林治疗遗传决定因素的研究

尽管目前已知影响华法林剂量的因素包括药物基因组学和临床环境因素,但是仍有大约 40% 华法林个体间剂量的差异用已知的基因因素和非基因因素无法解释。一系列研究结果表明,单纯应用华法林代谢通路上候选基因的常见变异型,无法完全解释华法林剂量的个体间差异^[9, 26, 27]。利用全基因组相关性分析(genome-wide association study)技术能够实现在全基因组范围内寻找可能与华法林稳定治疗剂量相关的其他常见基因变异型。在对 181 例和另外 2 个独立患者人群中的 374 例经华法林稳定治疗的白种人群患者分别进行的全基因组相关性分析发现,除了 VKORC1 和 CYP2C9 对华法林的稳定治疗剂量具有明显的效应以外(VKORC1 占 25%, CYP2C9 占 9%),其他基因中的常见变异型对华法林的有效治疗剂量产生的效应均较小(< 1%),该研究还证实了先前发现的 CYP4F2 变异型仅对华法林的剂量差异产生 1%~2% 的效应^[28, 29],因此,基于 CYP2C9 和 VKORC1 基因分型的华法林有效治疗剂量的随机临床试验具有广泛的应用价值^[30]。

6 华法林药物基因组学的临床应用前景

目前对华法林剂量个体间差异影响因素的认识已经取得了巨大的进步,CYP2C9 和 VKORC1 的遗传变异型和华法林的治疗剂量之间的关系在统计学和生物学上都具有非常显著的意义。基于药物基因组学和临床信息的华法林剂量预测模型的使用,并不能免除检测 PT-INR 值的必要性,但是应用剂量预测计算模型有可能预防由华法林过量所致的出血副作用的发生。据此,2007 年 8 月,美国食品与药物管理局(FDA)在华法林使用说明中增加了对于携带 CYP2C9 和 VKORC1 变异型的患者需要较低的华法林起始治疗剂量的预警。尽管如此,CYP2C9 和 VKORC1 基因分型,以及上述建立的药物基因组学剂量预测模型的大规模临床应用的前景,尚有待于在大规模的前瞻性随机对照临床试验中进一步证实。除此之外,还有必要对华法林治疗期间 CYP2C9 和 VKORC1 基因分型所带来的成本效益进行深入的分析。

【参考文献】

[1] Sundberg MI, Daly AK, Nebert DW. Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee Home Page [EB/OL]. (2006-02-20) [2009-08-26].

[Http://www.imm.ki.se/CYPalleles](http://www.imm.ki.se/CYPalleles).

- [2] Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, *et al*. Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9[J]. *Pharmacogenetics*, 1994; 4(1):39-42.
- [3] Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, *et al*. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism [J]. *Pharmacogenetics*, 1996, 6(4):341-349.
- [4] Yamazaki H, Inoue K, Chiba K, *et al*. Comparative studies on the catalytic roles of cytochrome P450 2C9 and its Cys- and Leu-variants in the oxidation of warfarin, flurbiprofen, and diclofenac by human liver microsomes[J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 56(2):243-251.
- [5] Xie HG, Prasad HC, Kim RB, *et al*. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(10):1257-1270.
- [6] Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the *in vitro* and human data[J]. *Pharmacogenetics*, 2002, 12(3):251-263.
- [7] 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.
- [8] Sanderson S, Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGEnet systematic review and meta-analysis[J]. *Genet Med*, 2005, 7(2):97-104.
- [9] Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, *et al*. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood*, 2009, 113(4):784-792.
- [10] 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.
- [11] Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, *et al*. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2 [J]. *Nature*, 2004; 427(6974):537-541.
- [12] Harrington DJ, Underwood S, Morse C, *et al*. Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1[J]. *Thromb Haemost*, 2005, 93(1):23-26.
- [13] Bodin L, Horellou MH, Flaujac C, *et al*. A vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) mutation in a patient with vitamin K antagonist resistance[J]. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(7):1533-1535.
- [14] D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, *et al*. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-antico-

- agulant effect of warfarin[J]. *Blood*, 2005, 105(2): 645-649.
- [15] Reitsma PH, van der Heijden JF, Groot AP, *et al.* A C1173T dimorphism in the VKORC1 gene determines coumarin sensitivity and bleeding risk[J]. *PLoS Med*, 2005, 2(10):e312.
- [16] Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, *et al.* Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(22): 2285-2293.
- [17] Mushirola T, Ohnishi Y, Saito S, *et al.* Association of VKORC1 and CYP2C9 polymorphisms with warfarin dose requirements in Japanese patients[J]. *J Hum Genet*, 2006, 51(3):249-253.
- [18] Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, *et al.* A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity[J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(13):1745-1751.
- [19] Wang D, Chen H, Momary KM, *et al.* Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement[J]. *Blood*, 2008, 112(4):1013-1021.
- [20] Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, *et al.* The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen[J]. *Blood*, 2005, 106(7):3229-3233.
- [21] Wadelius M, Chen LY, Downes K, *et al.* Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose[J]. *Pharmacogenomics J*, 2005, 5(4): 262-270.
- [22] Veenstra DL, You JH, Rieder MJ, *et al.* Association of Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2005, 15(10):687-691.
- [23] Klein TE, Altman RB, Eriksson N, *et al.* Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(8): 753-764.
- [24] Wen MS, Lee M, Chen JJ, *et al.* Prospective study of warfarin dosage requirements based on CYP2C9 and VKORC1 genotypes[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2008, 84(1):83-89.
- [25] Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, *et al.* Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans[J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2006, 16(2):101-110.
- [26] Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, *et al.* Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism[J]. *Hum Genet*, 2007, 121(1): 23-34.
- [27] Yin T, Hanada H, Miyashita K, *et al.* No association between vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) and the variability of warfarin dose requirement in a Japanese patient population[J]. *Thromb Res*, 2007, 122(2):179-184.
- [28] Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, *et al.* CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose[J]. *Blood*, 2008, 111(8):4106-4112.
- [29] McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, *et al.* 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.
- [30] Cooper GM, Johnson JA, Langae TY, *et al.* A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose[J]. *Blood*, 2008, 112(4):1022-1027.

(收稿日期:2009-08-06;修回日期:2010-02-01)

(上接第469页)

因此,认为植入起搏器后,由于电极刺激二尖瓣,前后瓣叶收缩不同步而并发的二尖瓣反流是此患者发生胸闷、气短的主要原因。但是我们在实施治疗时注意到在发病时有D-dimer升高和血氧饱和度下降,并且肺通气-灌注显像证实多发肺栓塞,因此在起病早期不排除肺栓塞的影响。

【参考文献】

- [1] Martinez-Sellés M, Bueno H, Almendral J, *et al.* Pulmonary embolism after pacemaker implantation[J]. *Tex Heart Inst J*, 2001, 28(4): 318-319.
- [2] Kronik G. The European Cooperative Study on the clinical significance of right heart thrombi. European Working Group on Echocardiography[J]. *Eur Heart J*, 1989, 10(12):1046-1059.
- [3] 邹阳春,杨新春,田文庆,等.室房传导在起搏器综

合征发病中的意义及胺碘酮的干预研究[EB/OL]. (2007-02-07) [2009-06-04] http://www.365heart.com/tabloid/2007/02/temp_15902.shtml.

- [4] Sassone B, De Simone N, Parlangeli G, *et al.* Pacemaker-induced mitral regurgitation: prominent role of abnormal ventricular activation sequence versus altered atrioventricular synchrony[J]. *Ital Heart J*, 2001, 2(6):441-448.
- [5] Seki H, Fukui T, Shimokawa T, *et al.* Malpositioning of a pacemaker lead to the left ventricle accompanied by posterior mitral leaflet injury[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2009, 8(2):235-237.

(收稿日期:2009-04-23;修回日期:2010-02-22)