·临床研究·

中国患者华法林抗凝治疗剂量的药物基因组学相关性及药物基因组学方程的比较分析

王红娟，刘 瑜，杨 洁，徐 斌，李 泱，尹 彤

（中国人民解放军总医院老年心血管病研究所，北京 100853）

【摘 要】目的 药物基因组学方程对华法林剂量的预测作用的重要性日益受到重视。但是，其准确性仍受到种族和包括华法林剂量在内的多种临床因素的影响。本文旨在接受低剂量华法林抗凝治疗的中国患者中，验证遗传因素对华法林治疗剂量的影响，并分析药物基因组学方程对华法林不同剂量范围的预测效果。**方法** 在接受低强度华法林抗凝治疗（目标 INR 为 1.6～2.5）的中国患者队列（$n = 282$）人群中，检测 CYP2C9*3、VKORC1-1639 A/G 和 CYP4F2*3 基因多态性与华法林稳定治疗剂量的关系。根据华法林剂量将患者分为低剂量组（≤1.5mg/d），中间剂量组（1.5～4.5mg/d）和高剂量组（≥4.5 mg/d），分别评估 8 个药物基因组学方程在各组患者中的预测效果。预测效果评估指标包括，剂量预测值位于实际值 20%界限内的患者比例（20%内患者比例），预测值与实际值之间绝对误差的平均值（MAE）。**结果** 华法林的稳定治疗剂量在各个基因的变异基因型携带者和野生基因型携带者之间均存在显著差异（CYP2C9*3：$P < 0.001$；VKORC1-1639 A/G：$P < 0.001$；CYP4F2*3：$P = 0.025$）。来自白种人群和混合人群的药物基因组学方程在华法林高剂量组中预测效果最好，而来自亚洲人群的方程在中间剂量组中的预测效果更好。所有方程对低剂量患者的剂量预测效果均不佳。**结论** CYP2C9*3、VKORC1-1639 A/G 和 CYP4F2*3 基因多态性均与中国人群华法林稳定治疗剂量相关。已有的药物基因组学方程尚不能有效的预测华法林各个剂量组患者的稳定治疗剂量。

【关键词】华法林；药物基因组学程；基因多态性

【中图分类号】 R972; R96 **【文献标识码】** A **【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2012.00135

Pharmacogenetic association and predictive accuracy of pharmacogenetic algorithms in Chinese patients under warfarin anticoagulation

WANG Hongjuan, LIU Yu, YANG Jie, XU Bin, LI Yang, YIN Tong

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

【Abstract】 Objective The importance of pharmacogenetic algorithms in warfarin dose prediction has drawn more attention. However, their performance has still been influenced by race and multiple clinical factors including warfarin dosage. The aim of this study was to evaluate the relationship of warfarin dosage with polymorphisms of CYP2C9*3, VKORC1-1639 A/G and CYP4F2*3, and the accuracy of pharmacogenetic algorithms. **Methods** We detected the polymorphisms of CYP2C9*3,VKORC1-1639 A/G and CYP4F2*3 in a cohort of Chinese patients ($n = 282$) under low intensity warfarin anticoagulation with target international normalized ratio (INR) ranging from 1.6 to 2.5, and evaluated the relationship between warfarin dosage and these polymorphisms. Then, the patients were stratified to 3 groups according to the dose range: higher dose group (≥4.5 mg/d), intermediate dose group (1.5～4.5 mg/d), and lower dose group (≤1.5 mg/d). We evaluated the performances of 8 eligible pharmacogenetic algorithms in different dose range. The performance of each algorithm was evaluated by calculating the percentage of patients whose predicted dose fell within 20% of their actual therapeutic dose (percentage within 20%), and the mean absolute error (MAE) between each predicted dose and actual stable dose. **Results** In the entire cohort, warfarin doses differed significantly across genotypes for CYP2C9*3 ($P < 0.001$), VKORC1-1639 A/G ($P < 0.001$), and CYP4F2*3 ($P = 0.025$). The algorithms from Caucasian and racially mixed populations tended to perform better in higher dose group, and algorithms from Asian populations performed better in intermediate dose group. None of the algorithms performed well in lower dose group. **Conclusions** Polymorphisms of CYP2C9*3, VKORC1-1639 A/G and CYP4F2*3 associate with stable warfarin dose in Chinese patients. No eligible pharmacogenetic algorithm could perform

收稿日期：2012-06-04；**修回日期：**2012-07-01

基金项目：国家自然科学基金面上项目（30971259）；解放军总医院科技创新苗圃基金（09KMM23）

通讯作者：尹 彤，Tel：010-66936782, E-mail: yintong2000@yahoo.com

satisfactorily for all dosing range in the Chinese patients.

【Key words】 warfarin; pharmacogenetic algorithms; polymorphisms

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (30971259) *and Innovative Foundation of Scientific and Technological Research of Young Talents of Chinese PLA General Hospital* (09KMM23)

华法林是防治血栓栓塞性疾病最常用的口服抗凝剂，但是其临床有效剂量存在很大的个体差异。随着遗传药理学的发展，现已证实编码华法林代谢和药效相关酶的基因的遗传多态性在很大程度上解释了华法林的个体差异和种族差异，包括细胞色素氧化酶 P450（CYP）2C9、维生素 K 环氧化物还原酶复合体 1（VKORCl）以及 CYP4F2[1-3]。以遗传药理为基础的华法林药物基因组学剂量预测方程得到越来越多的关注，2007 年美国食品与药品监督管理局更新华法林的处方，推荐用药前患者接受相关基因型检测[4]。但是，目前为止药物基因组学方程的验证全部都是在接受传统强度抗凝治疗（目标 INR 为 2 至 3）的患者中进行，而大多数的中国患者常规接受低强度华法林治疗[5]。研究显示，除种族因素外，方程的预测效果同样受华法林剂量影响[6]。因此，本研究在一个接受低强度治疗的中国患者队列中评估遗传因素和药物基因组学方程的预测效果与华法林剂量的相关性。

1 对象与方法

1.1 对象

中国人民解放军总医院自 2008 年 1 月至 2011 年 7 月连续收治的 282 例中国患者。男性 140 例（49.6%），女性 142 例（50.4%），平均年龄（56.36±15.70）岁。接受抗凝治疗的主要原因分别为房颤（85 例，30.1%）、瓣膜置换术后（138 例，48.9%）、深静脉血栓形成/肺栓塞（45 例，16%）以及其他（14 例，5%）。入选标准包括因各种原因目前正在接受稳定剂量华法林抗凝治疗，目标 INR 为 1.6～2.5，且初次用药日期明确。稳定华法林剂量定义为连续 3 次（每次间隔至少一周）实验室检查证实 INR 维持目标范围的剂量。临床信息收集自住院和门诊病历记录。患者存在严重肾脏、肝脏、血液系统疾病，恶性肿瘤，医疗信息不全，目标 INR 在 1.6～2.5 之外，血压超过 180/110 mmHg，以及妊娠或哺乳期均排除。根据实际华法林使用量人群分为三个不同剂量组。包括低剂量（≤1.5 mg/d），中间剂量（≥1.5 mg/d，且≤4.5 mg/d）和高剂量（≥4.5 mg/d）。所有患者于参加研究前均需签署知情同意书。研究方案经伦理委员会批准。所有患者于参加研究前均需签署知情同意书。研究方案经伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 基因型测定 采集外周血提取基因组 DNA。多重 SNaPshot SNP 分型技术检测 CYP2C9*3 (rs1057910)、VKORC1-1639 G/A (rs9923231)以及 CYP4F2*3 (rs2108622)基因多态性。主要仪器包括东胜•龙（EDC-810）PCR 仪（北京东胜创新生物科技有限公司），ABI 3730 自动测序仪（美国 ABI 公司）。主要试剂包括 *Taq* 酶、*SAP* 酶和 *Exo*I 酶（均为 Fermentas 公司），Snapshot mix（美国 ABI 公司）。每个变异位点的上下游引物和延伸引物分别为（1）CYP2C9*3，上游引物：5′ TCAGCTAAAGTCCAG-GAAGAG 3′，下游引物：5′ AACATGGAGTTGCAG-TGTAGG 3′，延伸引物：5′ TTTTTTTTTTTTTTTTT-TTTTTTTTTTTGCACGAGGTCCAGAGATAC3′；（2）VKORC1-1639 G > A，上游引物：5′GCTTGTC-TTAAACTCC 3′，下游引物：5′TGAGAAACAGCAT-CTGGAGAG 3′，延伸引物：5′TTTTTAGGCGT-GAGCCACCGCACC3′；（3）CYP4F2*3，上游引物：5′ GAGACCAAGAAGGGTTGTTG 3′，下游引物：5′ TCTGCCTCATCAGTGTTTTCG 3′，延伸引物：5′TTTTTTTTTTTTTTTTTACCTCAGGGTCCGGCCA CA3′。参照序列为来自 GenBank 的 CYP2C9、VKORC1 和 CYP4F2 基因组序列（NC_000010.8，NC_000016.9 和 NC_000019.9 分别为）。所有参与研究的患者均签署遗传分析同意书。

1.2.2 文献检索和方程选择 检索 PubMed 自 2004 年 1 月至 2011 年 9 月报道华法林剂量预测方程的研究或综述。采用的 MeSH 包括：“warfarin”，“genetic polymorphism”，“CYP2C9”，“VKORC1”，“CYP4F-2”，“pharmacogenetics”，“pharmacogenomics”以及“single nucleotide polymorphisms”。所选的方程必须同时包括临床因素和遗传因素，而后者必须涉及 CYP2C9 和 VKORC1 这两个基因。排除建立于少于 100 人的队列的方程，以及包括一些在本研究队列中未予评估的因素（如血白细胞计数、维生素 K 摄

入情况）和本研究中未分型的基因（或其等位基因）多态性的方程。

1.2.3 预测效果评估 预测效果评估指标包括平均绝对误差（MAE）和计算预测剂量在实际稳定剂量20%范围内的患者比例（20%界限内的比例）。MAE定义为方程计算值与实际值间绝对差异的均数。而后者为其他研究中使用过的具有临床意义的范围[6]。分别采用各方程计算每位患者的预测剂量。如果方程包含一个非-1639G/A 的 VKORC1 多态性，但是与-1639G/A 呈强连锁不平衡，则使用-1639G/A。鉴于CYP2C9 变异（如 CYP2C9*2 或*11）在亚洲人群中不存在或非常罕见，在相关方程中均定义为CYP2C9*1。

1.3 统计学处理

定量资料以均数 ± 标准差表示，定性资料用百分率表示。采用卡方检验评估每个基因的Hardy-Weinberg 平衡偏离度。平均治疗剂量与基因型的关系采用单向 ANOVA 检测评估。统计分析采用 SPSS 19.0 软件。

2 结 果

2.1 基因型分析

全部队列患者中 CYP2C9*3 基因*1/*1 型 251 例（89%），*1/*3 型 29 例（10.3%），*3/*3 型 2 例（0.7%）；VKORC1-1639 基因 AA 型 239 例（84.8%），AG 型 40 例（14.1%），GG 型 3 例（1.1%）；CYP4F2*3 基因 CC 型为 156 例（55.3%），CT 型 109 例（38.7%），TT 型 17 例（6.0%）。

2.2 基因组与华法林剂量的相关性

全部队列的实际华法林剂量为（3.00 ± 1.09）mg/d。各基因的多态性均达到 Hardy-Weinberg 平衡（$P > 0.05$），样本具有群体代表性。华法林剂量在各基因的变异基因型中均具有统计学意义的差异（CYP2C9*3：$P < 0.001$；VKORC1-1639 A/G：$P < 0.001$；CYP4F2*3：$P = 0.025$；图 1）。

2.3 不同剂量患者中药物基因组学方程的预测效果

选取了 8 个符合条件的药物基因组学方程（表 1）。各方程对不同剂量范围患者的预测效果存在差异（表 2）。来自白种人群和混合人群的方程在高剂量（≥4.5 mg/d）人群中预测效果更好（20%界限内的比例：46.4%～57.1%）。而来自亚洲人群的方程则在中间剂量（1.5～4.5mg/d）患者中预测效果更好。入选的方程在低剂量患者中预测效果均不佳，20%界限内的比例均低于 10.0%。

3 讨 论

本研究在一个 282 例接受低强度稳定剂量华法林抗凝治疗的中国患者队列中，证实 CYP2C9*3、VKORC1-1639 A/G 和 CYP4F2*3 基因的多态性均与华法林剂量相关，已发表的药物基因组学方程对华法林剂量预测的准确性因患者实际华法林剂量不同而存在差异。来自白种人群和混合人群的方程对高剂量（≥4.5mg/d）患者的预测效果更好，而目前尚无方程可以很好的预测低剂量（≤1.5mg/d）患者的剂量。

本研究与既往在中国患者中进行的研究一致，均证实 CYP2C9 和 VKORC1 基因多态性与华法林剂量相关。其中华法林剂量在 CYP2C9 1*/1*个体中最高、而 3*/3*最低，而华法林维持剂量在 VKORC1 基因 GG 型最高、而 AA 型最低。白种人群的研究显示，VKORCl 的多态性可以解释华法林用药剂量三分之一的遗传因素影响，联合 CYP2C9 可以用来解释半数患者之间的个体差异[5]。但与白种人群相比，亚洲人群中 VKORC1 和 CYP2C9 对华法林剂量差异的贡献相对较小。CYP4F2*3（rs2108622）为

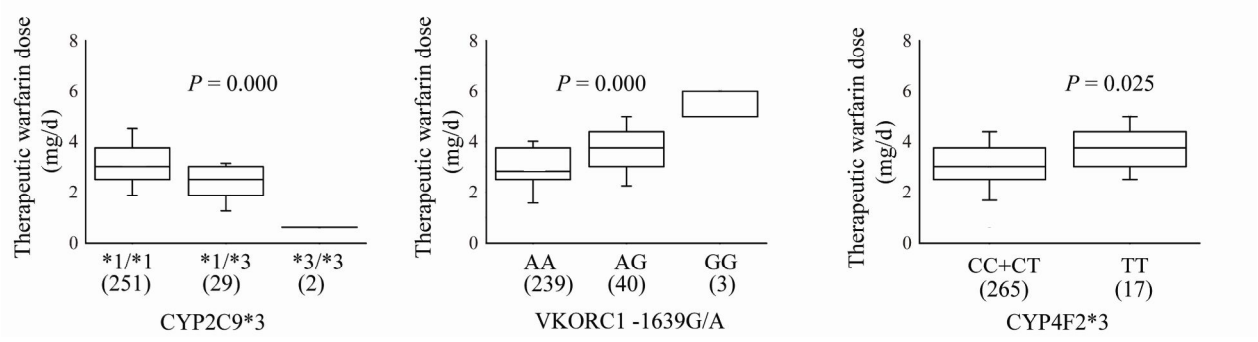

图1 CYP2C9*3, VKORC1-1639 A/G和CYP4F2*3与华法林治疗剂量的关系

Figure 1 Correlationship of CYP2C9*3, VKORC1-1639 A/G and CYP4F2*3 with warfarin dose

数据盒显示四分位水平区间，水平线显示中位值，垂直范围显示 5%与 95%分位值

表 1 入选进行效果评估的方程

Table 1 Pharmacogenetic algorithms selected for predictive accuracy evaluation

方程	来源/验证样本量(*n*)	人群	变量	R^2	参考文献
Huang, 2009	266	100%中国人	CYP2C9*3, VKORC1(rs9934438), 年龄, 体表面积(BSA)	0.54	[7]
Ohno, 2009	125	100%日本人	CYP2C9*3, VKORC1 (rs9923231) , 年龄, 体质量	0.55	[8]
Takahashi, 2006	165	100%高加索人	CYP2C9*2,*3,*11, VKORC1 (rs9934438), 年龄, 体质量	0.60	[9]
Sconce, 2005	297	100%高加索人	CYP2C9*2,*3, VKORC1 (rs9923231) ,年龄, 身高	0.55	[10]
Zambon, 2011	371	100%高加索人	CYP2C9*2,*3, CYP4F2*3, VKORC1 (rs9923231), 年龄, BSA	0.65	[11]
IWPC, 2009	4,043/1,009	56%高加索人/30%亚洲人/10%非洲裔美国人/5%其他	CYP2C9*2,*3, VKORC1 (rs9923231), 年龄, 身高, 体质量, 种族, 酶诱导剂, 乙胺碘呋酮使用情况	0.43	[6]
Gage, 2008	1,015/292	83%高加索人/15%非洲裔美国人/2%其他	CYP2C9*2,*3, VKORC1 (rs9923231), 年龄, 体表面积, 种族, 目标 INR, 吸烟, 深静脉血栓形成/肺栓塞, 乙胺碘呋酮使用情况	0.54	[12]
Lenzini, 2010	969/955	84%高加索人/10%非洲裔美国人/3%亚洲人/3%其他	CYP2C9*2,*3, VKORC1 (rs9923231), 年龄, ln (INR), 目标 INR, 体表面积, 种族, 脑卒中, 糖尿病, 乙胺碘呋酮, 相对 INR 测定前 2/3/4 天的华法林剂量	0.63	[2]

注: R^2: 实际剂量与预测剂量相比的确定系数; 酶诱导剂包括: 卡马西平, 苯妥英钠或利福平; ln (INR): 接受华法林抗凝治疗第 4 或 5 天 INR 值的自然对数

表 2 药物基因组学方程对不同剂量患者的预测效果

Table 2 Performance of pharmacogenetic algorithms in patients receiving different doss of warfarin

方程	≤1.5 mg/d(*n*=22)		1.5～4.5mg/d(*n*=232)		≥4.5mg/d (*n*=28)	
	20%界限内的比例(%)	MAE (95% CI) (mg/d)	20%界限内的比例(%)	MAE (95% CI) (mg/d)	20%界限内的比例(%)	MAE (95% CI) (mg/d)
Huang, 2009	9.0	1.05(0.83～1.28)	54.3	0.60(0.54～0.66)	32.1	1.58(1.21～1.96)
Ohno, 2009	0.0	1.46(1.24～1.68)	56.9	0.62(0.56～0.68)	32.1	1.40(1.08～1.76)
Takahashi, 2006	4.5	1.88(1.57～2.18)	28.0	1.12(1.02～1.21)	57.1	1.03(0.79～1.30)
Sconce, 2005	4.5	1.45(1.12～1.76)	42.2	0.89(0.80～0.99)	46.4	1.16(0.81～1.55)
Zambon, 2011	0.0	1.76(1.49～2.04)	37.1	0.98(0.88～1.07)	57.1	1.19(0.85～1.59)
IWPC, 2009	0.0	1.39(1.16～1.64)	48.3	0.70(0.63～0.77)	53.6	1.14(0.80～1.51)
Gage, 2008	0.0	1.41(1.21～1.62)	53.0	0.63(0.57～0.68)	57.1	1.13(0.83～1.48)
Lenzini, 2010	4.5	1.26(0.98～1.58)	56.9	0.62(0.56～0.69)	50.0	1.12(0.83～1.43)

注: MAE: 平均绝对误差; CI: 可信区间; IWPC: 国际华法林药物遗传学协会

华法林剂量的第三个预测基因，相关研究较少。本研究证实其多态性与华法林剂量也显著相关。既往一项中国患者队列的研究显示其可解释 4%的稳定华法林剂量差异[13]。由于亚洲人群中华法林剂量的差异很大程度上取决于人口次要等位基因上相关多态性的发生率，在这种情况下，CYP4F2*3 对亚洲患者华法林剂量的影响尽管较小，仍不应被忽视。

除种族因素外，华法林剂量也影响药物基因组学方程的预测效果。有报道药物基因组学方程在接受低剂量（≤3mg/d）或高剂量（≥7mg/d）患者中预测效果最好[19]。本研究中来自白种人群和混合人群的方程在高剂量（≥4.5mg/d）患者中预测效果更好（达 20%界限的患者比例：46.4%～57.1%）。考虑白种人群中的平均剂量（5mg/d）高于亚洲人群（3mg/d）[4]，因此，来源于白种或混合人群的方程在高剂量人群中的预测效果优于来源于亚洲人群的方程也是合理的。在我们的研究中，来源于最广泛种族人群的国际华法林药物遗传学协会（IWPC）方程在中剂量（≤3mg/d）患者中达 20%界限的患者比例为 29.0%，而在≤2mg/d 患者中为 8.2% 。该结果与 IWPC 方程在其确认队列中的效果相当，≤3 mg/d 的患者中为 33.0%，2mg/d 的患者中为 15.4%[6]。数据显示药物基因组学方程对接受低剂量治疗的患者的预测准确性有限，可能为如下原因。首先，大多数已发表的药物基因组学方程均来源于目标 INR 为 2～3 的人群，因此这些方程无法对上述 INR 范围外的剂量给予清晰地预测[2,6,9-12]。其次，可能存在其他的遗传或非遗传因素以解释亚洲人群适合低剂量华法林治疗[14]。这也可能是本研究中即使是来自亚洲人群的方程，对低剂量组的预测效果也仍然不佳的原因。

我们的研究提示，目前没有一个符合条件的方程在采用低强度抗凝治疗的患者中于全部剂量范围表现最好的预测效果。因此，如何提高药物基因组学

方程在低剂量患者中的预测效果，仍需进一步研究。

【参考文献】

[1] Sagreiya H, Berube C, Wen A, *et al*. Extending and evaluating a warfarin dosing algorithm that includes CYP4F2 and pooled rare variants of CYP2C9[J]. Pharmacogenet Genomics, 2010, 20(7): 407-413.

[2] Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, *et al*. Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing[J]. Clin Phar macol Ther, 2010, 87(5): 572-578.

[3] Shin J, Cao D. Comparison of warfarin pharmacogenetic dosing algorithms in a racially diverse large cohort[J]. Pharmacogenomics, 2011, 12(1): 125-134.

[4] Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 andVKORC1——rationale and perspectives[J]. Thromb Res, 2007, 120(1): 1-10.

[5] Lubitz SA, Scott SA, Rothlauf EB, *et al*. Comparative performance of gene-based warfarin dosing algorithms in a multiethnic population[J]. J Thromb Haemost, 2010, 8(5): 1018-1026.

[6] 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.

[7] Huang SW, Chen HS,Wang XQ, *et al*. Validation of VKORC1 and CYP2C9 genotypes on interindividual warfarin maintenance dose: a prospective study in Chinese patients[J]. Pharmacogenet Genomics, 2009, 19(3): 226-234.

[8] Ohno M, Yamamoto A, Ono A, *et al*. Influence of clinical and genetic factors on warfarin dose requirements among Japanese patients[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2009, 65(11): 1097-1103.

[9] 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.

[10] 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): 2329-2333.

[11] Zambon CF, Pengo V, Padrini R, *et al*. VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic-based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study[J]. Pharmacogenomics, 2011, 12(1): 15-25.

[12] Gage BF, Eby C, Johnson JA, *et al*. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin[J]. Clin Pharmacol Ther, 2008, 84(3): 326-331.

[13] Cen 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.

[14] Gu Q, Kong Y, Schneede J, *et al*. VKORC1-1639G > A, CYP2C9, EPHX1691A > G genotype, body weight, and age are important predictors for warfarin maintenance doses in patients with mechanical heart valve prostheses in southwest China[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2010, 66(12): 1217-1227.

（编辑：王雪萍）