论著

文章编号:1000-5404(2009)23-2370-04

重庆地区人工机械瓣膜置换术后患者 VKORC1-1639A/G 遗传基因多态性与华法林剂量调整的研究

顾 强,陈柏成,郝 嘉,王学锋,肖颖彬 (第三军医大学新桥医院全军心血管外科中心,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨重庆地区人工机械瓣膜置换术后患者 VKORC1-1639A/G 基因多态性与华法林剂量和抗凝效果的关系。**方法** 采用 PCR-RFLP 技术对 100 例重庆地区汉族人工机械瓣膜置换术后抗凝治疗患者 VKORC1-1639A/G 多态性位点进行检测,计算其基因型和等位基因频率,同时记录患者服药期间的用药剂量。**结果** 100 例重庆地区汉族人工机械瓣膜置换术后抗凝治疗患者中共筛选到 2 种等位基因:A 和 G。等位基因频率分别为 92% 和 8%。同时 VKORC1-1639A/G 基因多态性共检测到 3 种基因型,以 AA 基因型常见,基因型频率 86%,其次为 AG 和 GG 型,分别为 12% 和 2%。在达到抗凝指标(1.5~2.0)后,含有等位基因 G 的患者需要的华法林维持剂量[(5.27±0.55)mg]明显高于基因型为 AA 患者的华法林维持剂量[(2.41±0.75)mg]。100 例重庆地区汉族人工机械瓣膜置换术后抗凝治疗患者 VKORC1-1639A/G 基因多态性与相应的患者的口服剂量有相关。**结论** VKORC1 基因多态性与术后抗凝治疗患者华法林维持剂量有关系。

关键词: 人工机械瓣膜置换术后;抗凝稳定状态;重庆地区;VKORC1-1639A/G;基因多态性;个体剂量差异
中图法分类号: R394;R654.2;R973.2 **文献标识码:** A

Effect of VKORC1-1639A/G genetic polymorphisms on warfarin dosage requirements and anticoagulation in patients with mechanical heart valve prostheses in Chongqing region

GU Qiang, CHENG Bai-cheng, HAO Jia, WANG Xue-feng, XIAO Ying-bin (Cardiovascular Surgery Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the polymorphism of Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1-1639A/G) in patients with mechanical heart valve prostheses as well as the possible relationship between the individual warfarin dosage requirements and this genetic polymorphism in Chinese patients in Chongqing region. **Methods** The polymorphism of VKORC1-1639A/G in 100 patients with mechanical heart valve prostheses operated in our department from September 1987 to October 2007 was detected by using PCR-RFLP and restriction enzyme digestion. The genotype and allelic frequencies were calculated and the individual warfarin dosage requirements were analyzed. **Results** In this group of patients VKORC1-1639A allele and VKORC1-1639G were detected, The frequency of A allele and G allele was 92% and 8% respectively. Three genotypes were detected too. AA was the most common genotype, with the frequency of 86%. The frequency of AG was 12% and the frequency of GG was less than 2% in these 100 patients. To achieve similar target INR range (1.5 to 2.5), variant VKORC1-1639G homozygotes or heterozygotes required higher daily mean maintain doses (5.27±0.55 mg) than wild-type VKORC1-1639AA patients did (2.41±0.75 mg). VKORC1-1639A/G polymorphism is associated with warfarin dose requirements in 100 patients with mechanical heart valve prostheses receiving long-term therapy and showing stable control of anticoagulation in Chongqing region. **Conclusion** Polymorphism of VKORC1-1639A/G is dominant factor causing difference of individual warfarin dosage requirements ($P<0.01$).

Key words: heart value prostheses; anticoagulants; Chongqing region; VKORC1-1639A/G; genetic polymorphism; individual warfarin dosage requirements

华法林是目前应用最广泛的口服抗凝药,用于静脉血栓、肺栓塞、心脏瓣膜术及房颤导致的血栓形成的预防和治疗。华法林用药剂量个体差异较大,有人日剂量 0.5 mg 即可达到治疗效果,有人却要用 60 mg 才可达到相同治疗效果[1]。

华法林通过结合维生素 K 环氧化物还原酶的亚单位 1 (Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1,

作者简介:顾 强,男,安徽省蚌埠市人,博士研究生,医师,主要从事心脏机械瓣膜置换术后抗凝方面的研究。E-mail: qiang.gu@hotmail.com

收稿日期:2009-05-13;修回日期:2009-07-07

VKORC1),阻止其催化体内维生素 K 还原反应,进而使含有 γ-谷氨酸残基的凝血因子前体不能被持续羧化为有活性的凝血因子。VKORC1 作为华法林作用的靶酶[2,3],目前国内外研究发现 VKORC1 启动子区(E-box)(CANNTG)的第 2 个核甘酸的 $A\text{-}_{1639}G$ 突变会引起启动子的活性改变、VKORC1 酶 mRNA 表达水平改变,从而导致及酶的活性发生改变[4]。在含有 G 等位基因的突变体中启动子的基因活性比 A 等位基因的突变体高 44%[4,5]。

目前关于 VKORC1-1639A/G 基因多态性对抗凝稳态患者的华法林维持剂量差异所起作用的研究,国内少见有关报道,本研究通过对 100 例重庆地区汉族人工机械瓣膜置换术后抗凝治疗达到稳定状态的患者的 VKORC1 -1639A/G 基因遗传多态性进行临床筛选,从而探讨 VKORC1-1639A/G 基因多态性在术后患者华法林剂量差异中的作用。

1　资料与方法

1.1　病例资料

筛选第三军医大学新桥医院心血管外科 1987 年 9 月至 2007 年 10 月人工机械瓣膜置换手术病例 100 例,登记一般资料。手术采用中低温体外循环心肌保护,采用鼓泡氧合器或膜肺,不同患者分别采用国产机械碟瓣,ST Jude 双叶瓣,ATS 双叶瓣,Carbomedics 双叶瓣。术后 24 ~ 48 h 撤除呼吸机,服用华法林,初始剂量为 2.5mg,定时复查凝血酶原时间(prothrombin time,PT),国际标准化比率(International standard ratio,INR),根据 INR 调整剂量药物。

入选标准为:①心脏瓣膜置换术后患者,②最少 3 个月的抗凝治疗后,肝功能复查正常,③术后患者达到抗凝指标稳态的时间不同,约为 2 周至 1 月范围内,达到抗凝稳态后,再次连续 2 次门诊复查 PT,INR 均达到抗凝标准 INR(1.5 - 2.0),无需调整药物剂量,以其口服每日口服华法林剂量为维持剂量。④无出血及栓塞等并发症,⑤术后复查心脏超声检查未见人工瓣膜异常。

入选患者男性 34 例(34.00%),女性 66 例(66.00%);达到稳定抗凝剂量,需要的最短时间为 3 个月,目前收集的病例最长口服药物达 228 个月;年龄 16 ~ 66(41.73 ± 12.37)岁,30 ~ 50 岁发病 71 例,占 71.00%,术前诊断风心病 96 例(96.00%),先心病 4 例(4.00%),合并房颤 52 例(52.00%)。手术方式:二尖瓣置换术(MVR)74 例(74.00%);主动脉瓣及二尖瓣置换术(DVR)16 例(16.00%);主动脉瓣置换术(AVR)8 例(8.00%);带主动脉瓣人工血管升主动脉替换术(Bentall)2 例(2.00%)。应用国产机械碟瓣 7 例,占 7.00%,ST Jude 双叶瓣 63 例,占 63.00%,ATS 双叶瓣 20 例,占 20.00%,Carbomedics 双叶瓣 10 例,占 10.00%。同期随机选取重庆地区 3 代内无血缘关系的汉族人 133 例,其中男性 66 例,女性 67 例,年龄 19 ~ 69(42.08 ± 8.87)岁。均为新桥医院体检健康者,各项临床和试验室检查指标均正常。

试验方案得到了第三军医大学新桥医院伦理委员会的批准。参加本试验之前,所有受试者均填写了知情同意书。

1.2　方法

1.2.1　基因组 DNA 的提取　采集换瓣患者及体检健康者静脉血 3 ml,枸橼酸管抗凝,-20 ℃保存。使用 Biospin 全血基因组抽提试剂盒快速提取基因组 DNA,-20 ℃保存,试剂盒购自杭州博日科技有限公司。

1.2.2　引物设计与合成　根据 VKORC1-1639A/G 位点多态性和已知的 DNA 序列,参照文献[6]设计 PCR 引物,由上海英骏生物工程技术服务有限公司合成,基因片断为 290 bp,上游引物:5′-GCCAGCAGGAGAGGGAAATA-3′;下游引物:5′-AGTTTGGACTACAGGTGCCT-3′。

1.2.3　PCR 反应条件　反应体系总体积 20 μl,含模板 DNA(100 ng/μl)2.0 μl,空白对照组未加模板 DNA。上下游引物(100 μmol/L)各 0.25 μl(上海英骏生物工程技术服务有限公司),10 × PCR buffer 2.0 μl,$MgCl_2$(10 mmol/L)2 μl,dNTP(2.5 mmol/L)2 μl,*Taq* DNA 聚合酶(10 U/μl)0.15 μl(天根生物工程公司),不足体积用灭菌双蒸水补充至 20 μl。PCR 反应参数为:95 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,59 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,35 个循环,最后 72 ℃再延伸 10 min。以上反应均在 BIO-RAD 基因扩增器上完成。

1.2.4　限制性内切酶酶切　PCR 扩增产物 10 μl,MSP Ⅰ(10 U/μl)0.2 μl,10 × Buffer 3 μl,双蒸水补足至 30 μl,37 ℃水浴至少 16 h 进行酶切反应。

1.2.5　电泳判断基因型:酶切产物点样 10 μl 至含溴乙啶的 3% 琼脂糖凝胶,电压 10 V/cm 电泳 10 min,紫外灯下检测照相,经 BIO-RAD 的 GelDoc XR 凝胶成像系统观察电泳图。

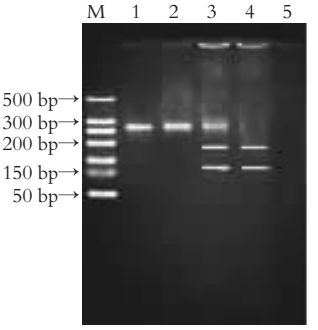
1.3　统计学方法

计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以频数表示。研究对象 Hardy-weinberg 遗传平衡的符合程度、组间基因型和等位基因频率的比较用 χ^2 检验;不同基因组之间的年龄、华法林维持剂量、体质量、体质量指数、不同性别组间的华法林维持剂量(mg)/体质量的指标均用非参数 Mann-Whitney 检测;统计在 SPSS 13. 0 软件包上完成。

2　结果

2.1　基因扩增片断

VKORC1-1639A/G 扩增产物片断大小为 290 bp,经 MSP Ⅰ酶切成 122 bp 和 168 bp 两条带,据此判断 3 种基因型:AA 基因型 290 bp;AG 基因型 270 bp,122 bp 和 168 bp;GG 基因型 122 bp 及 168 bp,电泳结果见图 1。



M:标准;1:PCR 产物 2:基因型为 AA 的酶切产物后的片断;3:基因型为 AG 酶切产物后的片断;4:基因型为 GG 酶切产物后的片断;5:空白对照

图 1　VKORC1-1639A/G 基因扩增产物及酶切片段电泳结果

2.2 VKORC1-1639A/G 等位基因和基因频率分布情况

通过对 100 例患者及 133 例健康体检者的 VKORC1-1639A/G 等位基因和其基因频率的筛选,我们明确了在重庆地区人群中 VKORC1-1639A/G 基因频率的分布情况,见表 1。

表 1 换瓣人群和健康人群中 VKORC1-1639A/G 等位基因和基因型频率的分布[例(%)]

组别	VKORC1-1639A/G 位点基因型			VKORC1-1639A/G 位点基因型	
	AA	AG	GG	A	G
换瓣人群	86(86.00)	12(12.00)	2(2.00)	92(92.00)	8(8.00)
健康对照人群	112(84.21)	19(14.29)	2(1.50)	241(91.35)	25(8.65)

术后患者以 AA 基因型最为多见,基因型频率高达 86.00%。其次为 AG 基因型,基因型频率为 12.00%。GG 基因型仅检测到 2 例, 基因型频率为 2.00%;等位基因以 A 型最为常见,等位基因频率 92.00%,等位基因以 G 型等位基因频率 8.00%;健康人群以 AA 基因型最为多见,基因型频率 84.21%。其次为 AG 基因型,基因型频率为 14.29%。GG 基因型频率为 1.50%;等位基因以 A 型最为常见,等位基因频率 91.35%,等位基因以 G 型等位基因频率 8.65%; 为更好的明确我们筛选的基因 VKORC1-1639A/G 的基因型及等位基因频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,对基因频率进行 χ^2 检验。

χ^2 检验表明健康人群和心脏瓣膜置换术人群 VKORC1-1639A/G 位点基因型及等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律,表明其基因频率已达到遗传平衡,具有群体代表性。VKORC1-1639A/G 等位基因和基因型频率在换瓣组和健康对照组之间没有差异($P>0.05$)。

2.3 不同性别的换瓣术后患者 VKORC1-1639A/G 基因型的分布情况及华法林维持剂量分布情况

在重庆地区心脏机械瓣膜置换术后患者中,性别的不同对华法林华法林维持稳定剂量是无影响的,不同性别分组间的华法林维持稳定剂量是无差别的($P>0.05$);患者的华法林维持稳定剂量的不同仅在不同基因组间有差别($P<0.05$),见表 2。

表 2 不同性别组间的换瓣术后患者 VKORC1-1639A/G 基因型的分布情况及华法林维持剂量分布情况

性别	VKORC1 - 1639A /G 位点基因型	例(%)	华法林维持剂量[$\bar{x}\pm s$,剂量/体质量]	PT($\bar{x}\pm s$,s)	INR($\bar{x}\pm s$)
男	AA	26(26)	0.04 ±0.01	20.33 ±0.34	1.66 ±0.30
	AG	4(4)	0.07 ±0.03[a]	21.07 ±0.25	1.71 ±0.32
	GG	0	0	0	0
女	AA	60(60)	0.05 ±0.02	21.06 ±0.21	1.78 ±0.30
	AG	8(8)	0.11 ±0.01[a]	22.07 ±.0.30	1.67 ±0.17
	GG	2(2)	0.13 ±0.05	20.33 ±0.19	1.71 ±0.21

a: $P<0.05$, 与 AA 基因型组比较

2.4 换瓣术后患者华法林维持剂量在不同 VKORC1-1639A/G 基因型的分布

在重庆地区心脏机械瓣膜置换术后患者中,患者所需的华法林维持稳定剂量在不同基因型组之间的分布是不同的,在含有 G 基因型的患者组中,华法林的维持剂量(5.27 ±0.55)mg/d 明显高于基因型为 AA 型的纯合子组维持剂量(2.41 ±0.75)mg/d,2 组之间有明显差异($P<0.05$),具体剂量分布见表 3。

3 讨论

VKORC1 作为 VKOR 酶是一个很重要的组成因子,与华法林特异性的结合才能起到抗凝治疗的作用,编码 VKORC1 酶的基因 VKORC1,直到 2004 年才被识别[2,3]。(VKORC)并非单一蛋白,而是一个大复合体,最近已有学者成功分离出其中一个亚单位即 VKORC1[3], 研究表明 VKORC1 激活 VKORC,是维生素 K 依赖性凝血因子生成过程中的限速酶[7]。编码 VKOR1 的基因在染色体 16p 11.2 上,大小约为 4 kb 长,含有 3 个外显子,编码 163 个氨基酸序列[8]。VKORC1 蛋白是华法林作用的受体, VKORC1-1639A/G 变异引起受体表达量发生变化,要达到同样的抗凝强度时,不同 VKORC1-1639A/G 基因型的个体华法林剂量就出现了差异。最近已有多篇报道指出华法林维持剂量与 VKORC1 基因多个位点相关[9-12],使用华法林的个体依据 VKORC1 -1639A/G 多态性可分为低剂量人群(AA 型) 、中等剂量人群(AG 型)以及高剂量人群(GG 型)[13]。

目前,国内对于 VKORC1-1639A/G 多态性研究还没有较多报道,本研究应用 PCR-RFLP 方法检测了重庆地区人工机械瓣膜置换术后患者 VKORC1-1639A/G 基因多态性的分布情况及术后维持剂量的不同,结果显示,在所观察人群中, 对 VKORC1-1639A/G 基因多态性检测,以 AA 基因型常见,基因型频率为 86%,其次为 AG 和 GG 型,分别为 12% 和 2%。于其他文献报道的该基因在中国人群中的分布一致[14]。本试验发现含有等位基因 G 的患者需要的华法林维持剂量(5.27 ±0.55)mg 明显高于基因型为 AA 患者的华法林维持剂量(2.41 ±0.75)mg ($P<0.01$)。VKORC1-1639A/G 基因型不同个体的华法林维持剂量之间有差异。说明其基因多态性能部分解释个体间华法林维持剂量的差异。

但本试验是在我们对重庆地区心脏机械瓣膜置换术后患者稳定华法林抗凝剂量不同临床研究的后续研究[15],通过对重庆地区心脏机械瓣膜置换术后患者人群中 VKORC1-1639A/G 基因多态性的分布情况的筛查, 以明确基因多态性在华法林个体剂量差异中起到

表 3 换瓣术后患者华法林维持剂量在不同 VKORC1-1639A/G 基因型的分布

VKORC121639A /G 基因型	例数	性别比(男:女)	年龄($\bar{x}\pm s$,岁)华法林维持剂量($\bar{x}\pm s$,mg)	PT($\bar{x}\pm s$,s)	INR($\bar{x}\pm s$)	体质量($\bar{x}\pm s$,kg)	体质量指数($\bar{x}\pm s$)
AA	86	26:60	42.08 ±12.12	2.41 ±0.75	21.42 ±5.69	1.78 ±0.47	60. 62 ±14. 37	22.97 ±4.51
AG/ GG	12/2	4:8/0:2	45.97 ±7.93	5.27 ±0.55[a]	21.95 ±4.22	1.80 ±0.36	56. 50 ±11.65	24.97 ±5.64

a: $P<0.01$,与 AA 基因型比较

的作用。本试验还存在着一定的局限性,首先入选的样本量较少,只能部分反映 VKORC1-1639A/G 基因型对华法林维持剂量的影响,本试验仅仅在重庆地区汉族人群中进行了 VKORC1-1639A/G 基因型的筛选,得到的结论可能仅仅适合于重庆地区汉族人群,但在中国西南地区,分布着大量的少数民族,其基因型的分布情况,还没有相关报道,这对以后的抗凝治疗提出了挑战,在以后的研究过程中,首先需要增加样本量,在一个相对较大的样本中研究该基因型起到的作用,同时将扩大对少数民族的基因型筛查,在一个相对遗传保守的人群中研究基因型分布,对华法林的剂量调整更有意义;其次,目前的研究仅仅局限在单个基因突变位点 VKORC1-1639A/G 的基因型研究,与华法林功效及代谢相关的基因还包括多药抵抗因子 1(MDR1)的基因[16],维生素 K 依赖性凝血因子基因[17],编码 γ-谷氨酰基羧化酶编码基因 GGCX[18],钙结合蛋白基因(calumenin)[18],载脂蛋白 E 基因 (apolipoprotein E)[19]和微粒体环氧化物还原酶编码基因等 (microsomal epoxide hydrolase)(mEH)[19],它们可能也与华法林维持剂量的个体差异有关,以后研究将扩大对这些基因的筛选;另外,本试验仅进行了临床回顾性研究,对 VKORC1-1639A/G 基因型如何参与华法林抗凝治疗的起始至稳态的过程,还没有进行试验研究,在以后的研究中,我们将进行临床前瞻性研究,根据基因型的不同,给予不同的华法林起始剂量,研究治疗过程中基因型不同对患者药物反应的影响情况,更好的完善研究内容。

本次试验结果为今后研究 VKORC1-1639A/G 基因多态性与汉族心脏瓣膜置换术后患者服用华法林剂量的相关性研究提供了分子遗传学数据,并为从基因水平进一步研究在低强度抗凝条件下瓣膜置换术患者华法林剂量调整和 VKORC1-1639A/G 基因多态性的检测作为华法林首次给药剂量和维持剂量的预测提供了指导依据,为华法林药物基因组学的研究提供了新的开端。

参考文献:

[1] Aithal G P, Day C P, Kesteven P J, *et al*. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications [J]. Lancet, 1999, 353(9154): 717 – 719.

[2] 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.

[3] Li T, Chang C Y, Jin D Y, *et al*. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase[J]. Nature, 2004, 427(6974):541 – 544.

[4] Geisen C, Watzka M, Sittinger K, *et al*. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnical variability of oral anticoagulation[J]. Thromb Haemost, 2005,94(4):773 – 779.

[5] Bodin L, Verstuyft C, Tregouet D A, *et al*. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity[J]. Blood, 2005, 106(1): 135 – 140.

[6] Sconce E A, Khan T I, Wynne H A, *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.

[7] Rieder M J, Reiner A P, Gage B F, *et al*. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose[J]. N Engl J Med, 2005, 352(22):2285 – 2293.

[8] Oldenburg J, Bevans C G, Muller C R, *et al*. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle[J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(3 – 4): 347 – 353.

[9] Vecsler M, Loebstein R, Almog S, *et al*. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin [J]. Thromb Haemost, 2006, 95(2): 205 – 211.

[10] Aquilante C L, Langaee T Y, Lopez L M, *et al*. Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements [J]. Clin Pharmacol Ther, 2006, 79(4): 291 – 302.

[11] Takahashi H, Wilkinson G R, Nutescu E A, *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.

[12] Veenstra D L, You J H, Rieder M J, *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.

[13] Montes R, Ruiz-de-Gaona E, Martinez Gonzalez M A, *et al*. The c.-1639G > A polymorphism of the VKORC1 gene is a major determinant of the response to acenocoumarol in anticoagulated patients[J]. Br J Haematol, 2006, 133(2): 183 – 187.

[14] Miao L, Yang J, Huang C, *et al*. Contribution of age, body weight, and CYP2C9 and VKORC1 genotype to the anticoagulant response to warfarin: proposal for a new dosing regimen in Chinese patients[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2007,63(12):1135 – 1141.

[15] 顾　强,陈柏成,郝　嘉,等. 重庆地区心脏机械瓣膜置换术后稳定华法林抗凝剂量的探讨[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(7):647 – 649.

[16] Wadelius M, Sorlin K, Wallerman O, *et al*. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors[J]. Pharmacogenomics J, 2004, 4(1):40 – 48.

[17] Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S, *et al*. Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and gamma-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity[J]. Blood, 2004,103(7):2630 – 2635.

[18] Wajih N, Sane D C, Hutson S M, *et al*. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats [J]. J Biol Chem, 2004, 279(24):25276 – 25283.

[19] Loebstein R, Vecsler M, Kurnik D, *et al*. Common genetic variants of microsomal epoxide hydrolase affect warfarin dose requirements beyond the effect of cytochrome P450 2C9[J]. Clin Pharmacol Ther, 2005,77(5): 365 – 372.

(编辑　王　红)