文章编号：1000-5404(2010)19-2089-05

论著

重庆地区人工机械瓣膜置换术后患者 *CYP2C9* ＊1 和 ＊3 变异与华法林剂量调整的研究

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

【摘要】 目的 探讨重庆地区人工机械瓣膜置换术后华法林抗凝治疗患者 *CYP2C9* ＊1 和 ＊3 基因型与华法林口服剂量及稳定华法林血药浓度的关系。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 *CYP2C9* ＊1 和 ＊3 基因突变位点进行检测，计算其基因型和等位基因频率；采用高效液相色谱法（HPLC）测定患者血浆中华法林浓度，同时记录患者相关临床指标。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筛选到 2 种基因型：*CYP2C9* ＊1/＊1 及 *CYP2C9* ＊1/＊3，基因型频率分别为 95% 和 5%，未发现 *CYP2C9* ＊2 基因型及 *CYP2C9* ＊3/＊3 型纯合子患者。在达到抗凝指标 INR（1.5～2.0）后，*CYP2C9* ＊1/＊3 型患者需要的华法林维持剂量（2.67±0.95）mg 与 *CYP2C9* ＊3/＊3 型患者需要的华法林维持剂量（2.67±1.10）mg 相比无明显差别（$P>0.05$），而前者稳定华法林血药浓度（1640.95±287.89）ng/ml 与后者（805.50±329.77）ng/ml 相比有明显差别（$P<0.01$）。结论 100 例重庆地区汉族人工机械瓣膜置换术后抗凝治疗患者 *CYP2C9* ＊1 和 ＊3 基因型与相应的患者的华法林口服剂量个体差别无相关。*CYP2C9* ＊1 和 ＊3 基因型与术后抗凝治疗患者达到抗凝稳定状态后的华法林血药浓度个体差异相关，*CYP2C9* ＊1 和 ＊3 基因型筛查对监测华法林药物抗凝并发症有重要意义。

【关键词】 人工机械瓣膜置换术；*CYP2C9* ＊1；CYP2C9 ＊3；华法林
【中图法分类号】 R654.2；R973.2；R195.4 【文献标志码】 A

Correlation between *CYP2C9* ＊1 and ＊3 mutations and Warfarin dosage in patients after replacement of mechanical heart valve in Chongqing area

Gu Qiang, Cheng Baicheng, Hao Jia, Xiao Yingbin (Institute of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【Abstract】 Objective To study the correlation between *CYP2C9* ＊1 and ＊3 mutations and Warfarin dosage in patients after replacement of mechanical heart valve in Chongqing area. Methods *CYP2C9* ＊1 and ＊3 mutations were detected in 100 patients after replacement of mechanical heart valve by PCR-RFLP. Mutation frequencies of *CYP2C9* ＊1 and ＊3 genes and allelic genes were calculated. Two Warfarin concentrations were measured in the patients by HPLC with related clinical parameters recorded. Results Two genotypes, *CYP2C9* ＊1/＊1 and *CYP2C9* ＊1/＊3, were detected in the patients after treatment with Warfarin in Chongqing area, with a frequency of 95% and 5%, respectively. No *CYP2C9* ＊2 and *CYP2C9* ＊3/＊3 were detected. After INR reached 1.5－2.5, the patients with *CYP2C9* ＊1/＊3 and *CYP2C9* ＊3/＊3 were treated with Warfarin at maintenance dose of (2.67±0.95) mg and (2.67±1.10) mg, respectively ($P>0.05$). The stable Warfarin concentration was (1 640.95±287.89) ng/ml for patients with *CYP2C9* ＊1/＊3 and (805.50±329.77) ng/ml for those with *CYP2C9* ＊3/＊3 ($P<0.01$). Conclusion The dose of Warfarin is not related with *CYP2C9* ＊1 and ＊3 mutations in patients after replacement of mechanical heart valve. However, the stable Warfarin concentration is related with *CYP2C9* ＊1 and ＊3 mutations in patients after replacement of mechanical heart valve. Detection of *CYP2C9* ＊1 and ＊3 mutations is of great importance in predicting the complications of anticoagulation treatment with Warfarin.

【Key words】 mechanical heart valve replacement; *CYP2C9* ＊1 and ＊3; warfarin

Corresponding author: Xiao Yingbin, Tel: 86-23-68755607, E-mail: ybxiao7@yahoo.com

目前常用于临床的口服抗凝剂中有香豆素类和茚满酮类，其中以香豆素类多用，包括华法林、双香豆素、新抗凝等，其中华法林是心脏机械瓣膜置换术后最常用的口服抗凝剂[1]。华法林药物代谢都要通过肝微粒体酶的细胞色素 P450，而遗传因素或环境因素都可造成不同个体 P450 基因变异，从而引起 P450 酶活性

【通信作者】 肖颖彬，电话：(023)68755607，E-mail：ybxiao7@yahoo.com

差异[1]。目前国内外对于华法林的药物基因组学的研究表明：*CYP2C9* * 2（Arg144Cys）和 *CYP2C9* * 3（Ile359Leu）的基因突变跟华法林的口服剂量的个体化不同有很大的关系[2,3]；*CYP2C9* * 2 酶对华法林的最大清除率（V_{max}）大约仅仅占 *CYP2C9* * 1 的 50%。药代动力学研究表明 *CYP2C9* * 3 携带者有较高的米氏常数（Km）和比较低的最大清除率（V_{max}），对 S-华法林最大清除率（V_{max}）仅占 *CYP2C9* * 1 携带者的 90%[4]。Yamazaki 等[5]研究发现携带 *CYP2C9* * 3 或 *CYP2C9* * 2 患者需要较少的华法林维持剂量，特别是具有 *CYP2C9* * 3 的患者维持剂量降低了 30%，同时携带 *CYP2C9* * 2 和 *CYP2C9* * 3 等位基因的个体抗凝治疗过程中出血的危险性提高 2 倍[6]。在进行华法林诱导及剂量调整的过程中，具有较高的出血事件发生的可能性[7]。考虑到华法林维持剂量及与出血的危险性与 *CYP2C9* 基因多态性有关，有必要将 *CYP2C9* 基因多态性的基因筛查作为心脏机械瓣膜置换术后患者华法林首次给药剂量和维持剂量调整的指导依据。

目前关于 *CYP2C9* 基因多态性对抗凝稳态患者的华法林维持剂量差异及患者出血事件发生不同所起作用的研究，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 *CYP2C9* 基因遗传多态性进行临床筛选，探讨 *CYP2C9* 基因多态性在术后的分布情况，及其在华法林剂量及华法林血药浓度个体差异中起的作用。

1 资料与方法

1.1 病例及资料

收集本科 1987 年 9 月至 2008 年 11 月人工机械瓣膜置换手术病例资料。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，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 撤出呼吸机，并在拔管后每天 17：00 准时给予口服华法林钠片（上海医药集团有限公司信谊制药总厂，2.5 mg/ 片）抗凝，初始剂量为 2.5 mg，定时复查凝血酶原时间（PT）及国际标准化比率（INR），根据 INR 调整剂量药物。及时宣教华法林抗凝的必要性、方法及注意事项。

入选标准：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 个月，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。排除标准：①出血或栓塞并发症；②3 个月内有手术史或穿刺检查史；③3 个月内有外伤史；④出血性疾病或具有出血性倾向；⑤血小板计数 $<120\times10^9$/L；⑥心衰或者心功能 NYHA Ⅲ级或以上患者；⑦肝肾功能异常；⑧合并其他疾病如胸腺疾病、肿瘤等。入选 100 例换瓣患者，在其达到抗凝稳态后，门诊复查，提取静脉血标本。随机选取同期重庆地区 3 代内无血缘关系的汉族人 167 例（健康对照组），均为新桥医院体检健康者，各项临床和实验室检查指标正常，同样提取静脉血标本。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。受试者均填写了知情同意书。

本组 100 例中男性 34 例，女性 66 例，年龄（43.3 ± 17.6）岁，同时搜集了体质量、身高、体表面积、体质量指数、合并房颤、手术方式、术前诊断、瓣膜的厂家、每周华法林剂量以及最后 3 次测得稳定 PT 及 INR 值。患者及健康对照基本资料间无明显差别（$P>0.05$），见表 1。

表 1 重庆地区机械瓣膜置换术后患者和健康对照组基本资料

指标	患者（$n=100$）	健康对照组（$n=167$）
性别[例(%)]		
男性	34(34.0)	80(47.9)
女性	66(66.0)	87(52.1)
年龄（岁）	43.3 ± 17.6(30 ~ 66)	39.6 ± 10.2(26 ~ 45)
体质量（kg）	60.6 ± 11.3(40.0 ~ 85.0)	58.6 ± 11.1(39.0 ~ 76.0)
身高（cm）	169.5 ± 4.5(159 ~ 188)	176.5 ± 4.6(159 ~ 189)
体表面积 BSA（m^2）	1.7 ± 0.3(1.1 ~ 2.8)	1.5 ± 0. 7(1.4 ~ 3.0)
体重指数 BMI（kg/m^2）	20.5 ± 1.2(19.6 ~ 24.8)	26.3 ± 2.6(18.7 ~ 26.3)
服药时间（月）	6 ~ 288	
合并房颤[例(%)]		
有	23(23.0)	
无	77(77.0)	
手术方式[例 (%)]		
MVR	74(74.0)	
DVR	16(16.0)	
AVR	8(8.0)	
Bentall	2(2.0)	
术前诊断[例(%)]		
风心病	96(96.0)	
先心病	4(4.0)	
瓣膜生产厂家[例 (%)]		
国产机械碟瓣	7(7.0)	
ST Jude 双叶瓣	63(63.0)	
ATS 双叶瓣	20(20.0)	
Carbomedics 双叶瓣	10(10.0)	

MVR：二尖瓣膜置换术；DVR：二尖瓣及主动脉瓣膜置换术；AVR：主动脉瓣膜置换术；Bentall：升主动脉及主动脉瓣替换加冠状动脉移植术

1.2 研究方法

1.2.1 分离血浆及基因组 DNA 的提取 患者于服药后 15 h 内采集静脉血 5 ml，置含 0.13 mol/ L 枸橼酸钠的试管中送医院检验科测定 INR 及 PT。采用全自动血凝仪（ACL27000）测 INR。INR 是由 PTR 经 ISI 校正所得。其中 2 m1 用于测定 PT 及 INR 值，剩余全血 3000 r/min 离心 10 min，吸取上层血浆，分装，-70 ℃ 冻存，用于测定华法林血药浓度；沉淀细胞使用 Biospin 全血基因组抽提试剂盒快速提取全基因组 DNA，-20 ℃保存，试剂盒购自杭州博目科技有限公司。

1.2.2 引物设计与合成 通过 GenBank 数据库，查找人 *CYP2C9* 基因碱基序列，根据 *CYP2C9* * 2 及 *CYP2C9* * 3 基因位点多态性和已知的 DNA 序列，参照文献[8]设计 PCR 引物，由上海英骏生物工程技术服务有限公司合成。*CYP2C9* * 2 基因

突变序列所在片段(chr10:96691513 – 96692202)690 bp,上游引物 5′-TACAAATACAATGAAAATATCATG-3′,下游引物:5′-CTAACAACCAGGACTCATAAT- 3′。*CYP2C9* * 3 的基因突变序列:片段 159 bp,上游引物 5′-TGGTGCACGAGGTCCAGAGA-3′,下游引物:5′-GATACTATGAATTTGGGGACTTCGA-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 μl,上下游引物(100 μmol/L)各 0.25 μl,10 × PCR buffer 2 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。PCR 反应参数: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,Ava Ⅱ酶或 *Nsi* Ⅰ酶 (Promega 生物工程有限公司(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 5% 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。

1.2.6 高效液相色谱法[9] (HPLC)测定患者华法林血浆浓度

华法林标准品及 6-甲氧基萘-2-乙酸 (6-MNA,测定华法林总浓度内标) 由 Sigma 试剂公司提供。应用 Waters 820 工作站、510 泵和可变波长紫外检测器(Waters, Manchester, UK) 以及不锈钢色谱柱(2.1 × 30 mm, ID) 。固定相为 YWGG8H37 (10 μm)、流动相为 115 % 醋酸: 乙腈(53: 47,体积比),流速 2 ml/min、紫外检测波长 308 nm,华法林保留时间(RT) 在第 6.01 分钟,最小检出浓度为 0.02 ng/ml。于日内及日间测定精密度差别小于 15%,为可接受范围。

1.2.7 血浆预处理 取空白血浆 200 μl 及华法林对照品溶液 100 μl (或取待测血浆 200 μl 及水 100 μl),加入内标工作液 100 μl (含 6-MNA 1 μg) 后,加 1 mol/L HCl 100 μl,混匀。用二氯甲烷:正己烷(1:9) 混旋萃取 10 min,3000 r/min 离心 5 min。分取有机相置 50 ℃水浴通氮气气流挥干。残渣加 50 μl 流动相溶解后进样 20 μl,在前述色谱条件下分离测定。

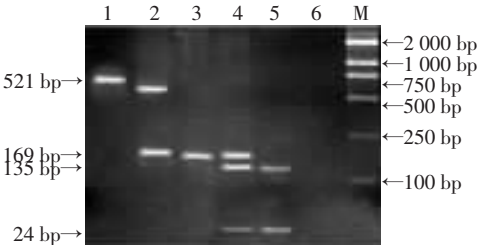
1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以频数表示。患者及健康对照基本资料之间比较采用 t 检验;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 *CYP2C9* 基因型患者华法林剂量及血药浓度分布用 χ^2 检验;不同基因组之间的年龄、血浆浓度、华法林维持剂量、体质量、体质量指数均用非参数 Mann-Whitney 检测。

2 结果

2.1 *CYP2C9* 基因扩增片段检测

CYP2C9 * 2 作为扩增模板的 PCR 产物大小为 690 bp,在该扩增片段酶切结果中,*CYP2C9* * 1 作为野生型可以被 *Ava* Ⅱ酶识别,被切为 521 bp 和 169 bp 大小,而 *CYP2C9* * 2 型片段因 cDNA 中的 430C > T 突变导致该基因序列不被识别,仍为 690 bp。*CYP2C9* * 3 作为扩增模板的 PCR 产物片段大小为 159 bp,在该扩增片段酶切结果中,*CYP2C9* * 1 型片段可被 Nsil 酶识别,被切成 24 bp 及 135 bp 大小,而 *CYP2C9* * 3 型片段因 cDNA 中的 1075A > C 的突变导致该基因序列不被识别,仍为 159 bp。见图 1。

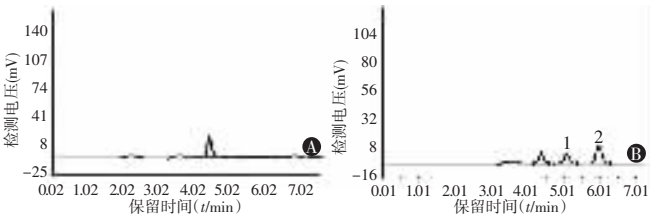


1:*CYP2C9* * 2 PCR 产物;2:*CYP2C9* * 2 基因型酶切产物;3:*CYP2C9* * 3 的 PCR 产物;4:*CYP2C9* * 1/ * 3 酶切产物;5:*CYP2C9* * 1/ * 1 酶切产物;6:空白对照;M:DNA 标准(DL 2000)

图 1 *CYP2C9* 的基因扩增产物及酶切片段电泳分析

2.2 华法林血药浓度色谱分析

在上述色谱条件下,华法林的保留时间 RT 为 6.01 min,内标 6-MNA 的保留时间 RT 为 5.02 min,且华法林与 6-MNA 分离良好,分离度大于 1.5,色谱柱的理论塔板数 n = 4800,色谱分析见图 2。



A:空白血浆 见5.01 min 及6.01 min 无杂质峰干扰测定;B:待测血浆见内标及华法林峰形尖锐且分离度良好,系统标示为 1 及 2,其保留时间分别为 5.01 min 及 6.01 min

图 2 华法林血药浓度的高效液相色谱分析

2.3 *CYP2C9* 等位基因及其基因频率的分布情况

经 χ2 检验,换瓣人群与健康对照人群 *CYP2C9* 位点基因型及等位基因频率分布合 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。*CYP2C9* 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)。术后患者以 *CYP2C9* * 1/ * 1 基因型最为多见,共 95 例,*CYP2C9* * 1 等位基因频率高达 98.0%;*CYP2C9* * 1/ * 3 基因型仅检测到 5 例,*CYP2C9* * 3 等位基因频率为 2.5%。健康人群以 *CYP2C9* * 1/ * 1 基因型最为多见,共有 160 例,*CYP2C9* * 1 等位基因频率达 97.00%;仅检出携带 *CYP2C9* * 1/ * 3 基因型 7 例,*CYP2C9* * 3 的等位基因频率为 3.00%。患者及健康人群均未发现 *CYP2C9* * 3/ * 3 纯合子及 *CYP2C9* * 2 型基因型。见表 2。

2.4 换瓣术后患者华法林维持剂量及华法林血药浓度在不同 *CYP2C9* 基因频率基因型的分布情况

入选的 100 例中国汉族服华法林患者中,*CYP2C9* * 1/ * 3 突变型杂合子华法林剂量(2.67 ± 0.95) mg/d 与 *CYP2C9* * 1/ * 1 野生型纯合子剂量(2.68 ± 1.10) mg/d 相比较无明显差别(P > 0.05),可能与患者样本太少,不能较好的反映患者口服剂

量的分布情况有关,需要大规模的进行基因普查,以明确其患者的基因分布。100例中国汉族服华法林患者,*CYP2C9*＊1/＊3突变型杂合子华法林血药浓度(1640.95±287.89)ng/ml比*CYP2C9*＊1/＊1野生型纯合子华法林血药浓度(805.50±329.77)ng/ml明显增高($P<0.01$)。见表3。

3 讨论

华法林是R-华法林及S-华法林的混合体[10],S-华法林在抗凝效果上5倍于R-华法林。在稳定的抗凝状态下,S-华法林起到60%～70%的抗凝效果[11]。S-华法林主要被细胞色素P450代谢[12],其是一种末端加氧酶,从NAD(P)H获得电子后,催化单加氧反应,主要分布在内质网和线粒体内膜上,是广泛存在于生物体内的一类含血红素和巯基的蛋白。因其末端氧化功能而在碳同化、激素合成、外源物质降解、前致癌物的活化等方面起着重要作用,机体90%以上的药物代谢都要通过肝微粒体酶的细胞色素P450。编码*CYP2C9*基因大约55 kb长,在染色体10q 24.2上,大约存在24个单核苷酸多态性[13,14],在众多单核苷酸突变体中,*CYP2C9*＊1被认定为野生型,*CYP2C9*＊2(Arg144Cys)和*CYP2C9*＊3(Ile359Leu)[15,16]是目前报道跟华法林的口服剂量的个体化不同有关系的2种突变体。

我们已对重庆地区心脏机械瓣膜置换术后患者VKORC1-1639A/G基因多态性的分布情况进行筛查,明确了基因多态性在华法林个体剂量差异中起到的作用[17]。本实验为后续研究,通过对重庆地区心脏机械瓣膜置换术后患者*CYP2C9*基因多态性的分布情况的筛查,明确基因多态性在华法林个体剂量差异及华法林血药浓度中起到的作用。发现重庆地区心脏机械瓣膜置换术后患者,不同的*CYP2C9*基因型华法林稳定维持剂量间无差别,这与文献[18]报道不符,考虑可能有以下因素:(1)样本太少,不能较好的反映重庆地区汉族人群中*CYP2C9*基因多态性的分布情况及口服药物在不同基因型患者间的分布情况,仅筛选了*CYP2C9*＊2(Arg144Cys)和*CYP2C9*＊3(Ile359Leu)2种基因型,不能完整的反映*CYP2C9*突变家族(*CYP2C9*＊2～*CYP2C9*＊19)[19-21]对华法林个体药物维持剂量不同的影响。(2)试验设计主要将入选人群局限在低抗凝治疗人群中,在较低的抗凝指标INR(1.5～2.0)的标准中,选取对无华法林治疗相关并发症的患者进行基因筛选,可能对基因筛选的外界条件较苛刻,不能很好的反映华法林治疗的人群的广泛性。(3)忽略了其他基因多态性对华法林维持剂量的影响[22-27]。对华法林个体剂量差异的研究需从多基因多因素方面出发,同时需要考虑患者的其他临床指标的不同,才能很好的解释个体患者药物稳定剂量的不同的原因。

对不同的*CYP2C9*基因型患者华法林稳定血药浓度的研究发现,华法林在不同个体间同样存在明显的差异,这可以很好的解释患者在同样的抗凝指标下,有不同的抗凝危险性。入选的100例中国汉族服华法林患者中,*CYP2C9*＊1/＊3突变型杂合子华法林血药浓度(1640.95±287.89)ng/ml比*CYP2C9*＊1/＊1野生型纯合子华法林血药浓度(805.50±329.77)ng/ml明显增高。说明*CYP2C9*基因多态性对药物代谢有显著影响,与研究[7]报道一致。目前已经证明根据基因多态性来指导临床用药,可以明显提高疗效并减少药物不良反应。在重庆地区的汉族人群中*CYP2C9*＊3的基因分布同以往报道的中国汉族人的*CYP2C9*＊3基因型分布[16]是一致的,可以很好的解释同欧美人群相比,中国人在较低的抗凝指标下,仍然有较高的抗凝相关出血事件的发生率,但用单一的*CYP2C9*＊3的基因分布不同来解释抗凝相关出血事件的发生率个体不同还缺少理论依据,同样要考虑其他基因因素和非基因因素的影响。

目前的研究仅为单个基因突变位点*CYP2C9*和VKORC1-1639A/G研究,应扩大对其他华法林代谢及

表2 重庆地区机械瓣膜置换术后患者和健康对照*CYP2C9*等位基因和基因型频率的分布

组别	*CYP2C9*等位基因频率[例(%)]				*CYP2C9*基因型[例(%)]					
	CYP2C9＊2突变位点430C>T		*CYP2C9*＊3突变位点1075A>C		*CYP2C9*＊2突变位点430C>T			*CYP2C9*＊3突变位点1075A>C		
	CYP2C9＊1(C)	*CYP2C9*＊2(T)	*CYP2C9*＊1(A)	*CYP2C9*＊3(C)	*CYP2C9*＊1/＊1(CC)	*CYP2C9*＊1/＊2(CT)	*CYP2C9*＊2/＊2(TT)	*CYP2C9*＊1/＊1(AA)	*CYP2C9*＊1/＊3(AC)	*CYP2C9*＊3/＊3(CC)
术后患者	200(100.00)	0(0.00)	195(97.50)	5(2.50)	100(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	95(95.00)	5(5.00)	0(0.00)
健康对照组	334(100.00)	0(0.00)	247(97.00)	7(3.00)	167(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	160(94.00)	7(6.00)	0(0.00)

表3 机械瓣膜置换术后患者华法林维持剂量在不同*CYP2C9*基因频率基因型的分布

*CYP2C9*基因频率	*n*	性别比(男/女)	年龄(岁)	华法林维持剂量(mg/d)	血药浓度(ng/ml)	PT(s)	INR	体质量(kg)	体质量指数	体表面积(m^2)
CYP2C9＊1/＊1	95	28/67	41.73±11.83	2.68±0.95	805.50±329.77[a]	21.21±5.49	1.87±0.62	63.65±12.54	22.97±4.51	1.6±0.44
CYP2C9＊1/＊3	5	2/3	43.00±8.74	2.67±1.10	1640.95±287.89	21.68±7.53	1.76±0.45	60.42±10.63	24.97±5.42	1.5±0.56

a:$P<0.01$,与*CYP2C9*＊1/＊3基因型比较

功效相关基因的筛选,以完成在重庆地区华法林药物基因谱;另外,本试验仅进行了临床回顾性研究,对*CYP2C9*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,后续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。

通过对华法林功效及代谢过程中的2个重要基因*CYP2C9*和VKORC1的分析,可以在基因水平对术后华法林药量进行预测,尽可能的将华法林的过量抗凝的危险减到最少。为从基因水平进一步研究在低强度抗凝条件下将*CYP2C9*基因多态性的检测作为华法林首次给药剂量和华法林维持剂量的预测指标及降低华法林抗凝治疗出血危险性的指标提供了指导依据。

参考文献:

[1] Tan G M, Wu E, Lam Y Y, *et al*. Role of warfarin pharmacogenetic testing in clinical practice[J]. Pharmacogenomics, 2010, 11(3): 439-448.

[2] Jonas D E, McLeod H L. Genetic and clinical factors relating to warfarin dosing[J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(7): 375-386.

[3] Ngow H A, Wan-Khairina W M, Teh L K, *et al*. CYP2C9 polymorphism: prevalence in healthy and warfarin-treated Malay and Chinese in Malaysia[J]. Singapore Med J, 2009, 50(5): 490-493.

[4] Sullivan-Klose T H, Ghanayem B I, Bell DA, *et al*. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism[J]. Pharmacogenetics, 1996, 6(4): 341-349.

[5] 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.

[6] Higashi M K, Veenstra D L, Kondo L M, *et al*. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy[J]. JAMA, 2002, 287(13): 1690-1698.

[7] 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.

[8] Gage B F, Eby C S. Pharmacogenetics and anticoagulant therapy[J]. J Thromb Thrombolysis, 2003, 16(1/2): 73-78.

[9] Schalekamp T, Brasse B P, Roijers J F, *et al*. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: interaction between both genotypes affects overanticoagulation[J]. Clin Pharmacol Ther, 2006, 80(1): 13-22.

[10] Malakova J, Pavek P, Svecova L, *et al*. New high-performance liquid chromatography method for the determination of (R)-warfarin and (S)-warfarin using chiral separation on a glycopeptide-based stationary phase[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009, 877(27): 3226-3230.

[11] Hirsh J, Dalen J E, Anderson D R, *et al*. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range[J]. Chest, 2001, 119(1 Suppl): 8S-21S.

[12] Takahashi H, Echizen H. Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications[J]. Clin Pharmacokinet, 2001, 40(8): 587-603.

[13] Neve E P, Ingelman-Sundberg M. Cytochrome P450 proteins: retention and distribution from the endoplasmic reticulum[J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2010, 13(1): 78-85.

[14] Goldstein J A, de-Morais S M. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily[J]. Pharmacogenetics, 1994, 4(6): 285-299.

[15] Oscarson M, Ingelman-Sundberg M. CYPalleles: a web page for nomenclature of human cytochrome P450 alleles[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2002, 17(6): 491-495.

[16] Kirchheiner J, Ufer M, Walter E C, *et al*. Effects of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics of R- and S-phenprocoumon in healthy volunteers[J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(1): 19-26.

[17] 顾强, 陈柏成, 郝嘉, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(23): 2370-2373.

[18] 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.

[19] Ieiri I, Tainaka H, Morita T, *et al*. Catalytic activity of three variants (Ile, Leu, and Thr) at amino acid residue 359 in human CYP2C9 gene and simultaneous detection using single-strand conformation polymorphism analysis[J]. Ther Drug Monit, 2000, 22(2): 237-244.

[20] Dickmann L J, Rettie A E, Kneller M B, *et al*. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans[J]. Mol Pharmacol, 2001, 60(2): 382-387.

[21] Blaisdell J, Jorge-Nebert L F, Coulter S, *et al*. Discovery of new potentially defective alleles of human CYP2C9[J]. Pharmacogenetics, 2004, 14(8): 527-537.

[22] Tai G, Farin F, Rieder M J, *et al*. *In-vitro* and *in-vivo* effects of the CYP2C9*11 polymorphism on warfarin metabolism and dose[J]. Pharmacogenet Genomics, 2005, 15(7): 475-481.

[23] 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.

[24] 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.

[25] 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.

[26] 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.

[27] 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.

(收稿:2010-05-12 修回:2010-07-07)
(编辑 王 红)