

云南汉族人群 VKORC1 1173C/T 基因多态性与华法林抗凝治疗维持剂量的相关性研究

刘建兴¹⁾, 陈智豫²⁾, 李云萍³⁾, 王 通¹⁾, 吴春婷¹⁾, 李 贺¹⁾, 许冰莹¹⁾

(1) 昆明医科大学法医学院, 云南昆明 650500; 2) 昆明医科大学附属延安医院, 云南昆明 650051;
3) 四川省公安厅刑侦局, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 研究云南汉族人群维生素 K 环氧化物还原酶复合体亚单位 1 基因 VKORC1 1173C/T 多态性分布及与其他群体间的差异, 并探讨其与华法林抗凝维持剂量的分子遗传关系. **方法** 采集 300 名心脏机械瓣膜置换术后服用华法林抗凝已达稳定剂量、凝血酶原时间国际标准化比值在目的范围 (1.5~3.0) 病人的外周血, 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 分析技术, 检测 VKORC1 1173C/T 基因位点的基因型和等位基因频率, 探讨华法林抗凝维持剂量与该基因多态性的关系. **结果** 在所有的样本中, VKORC1 1173C/T 基因共检出 C (10%) 和 T (90%) 2 种等位基因, 纯合子 TT (80%) 和杂合子 CT (20%) 两种基因型, 云南汉族人群中 VKORC1 1173C/T 基因多态性分布在性别和年龄上无差异; CT 基因型病人所需华法林维持剂量最高 (3.62 ± 1.35) mg/d, 其次是 TT 基因型病人 (3.12 ± 1.17) mg/d. **结论** 与其他群体相比, 云南汉族人群 VKORC1 1173C/T 基因位点具有自己的遗传多态性, 其基因型在华法林抗凝治疗中具有非常重要的意义.

[关键词] 云南地区; 汉族; 华法林; VKORC1; 基因多态性

[中图分类号] R969.3; R973.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 06-0013-05

Relationship between Genetic Polymorphism of VKORC1 1173C/T and Warfarin Dose Requirments in Yunnan Han Population

LIU Jian-xing¹⁾, CHEN Zhi-yu²⁾, LI Yun-ping³⁾, WANG Tong¹⁾, WU Chun-ting¹⁾, LI He¹⁾,
XU Bing-ying¹⁾

(1) College of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Affiliated Yan'an Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650051; 3) Criminal Investigation Bureau, Sichuan Provincial Department of Public Security, Chengdu Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the polymorphism distribution and characteristics of VKORC1 1173C/T, as well as the relationship between the polymorphism and warfarin dose requirments in Han population in Yunnan. **Methods** Blood samples were collected from 300 patients with stable warfarin dose requirements, PCR-RFLP techniques were used to detect genes and genotypes of VKORC1 1173C/T, and international normalized ratio (INR) of the prothrombin time within the target range (1.5-3.0), polymorphisms for VKORC1 1173C/T were also analyzed. **Results** We obtained two alleles of C and T, with the frequencies of 10% and 90%, respectively. The genotypes showed that 80% patients were homozygous TT; and 20% were heterozygous CT. No differences were found between age and gender. Patients with CT genotypes required higher warfarin dose ($3.62 \pm$

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30860339), 云南省社会发展科技计划项目 (2009ZC155M)

[作者简介] 刘建兴 (1971~), 男, 山东临沂市人, 医学硕士, 讲师, 主要从事法医分子遗传学研究. 刘建兴和陈智豫对本文有同等贡献.

[通讯作者] 许冰莹. E-mail:bingying_xu@126.com

1.35 mg/day) than those with TT (3.12 ± 1.17 mg/day; CT:TT $p = 0.007$). **Conclusion** VKORC1 1173C/T gene distribution in Yunnan Han is different from those in other populations, and some suggestions are given for individual use of warfarin in Yunan Han population.

[**Key words**] Yunnan; Han; Warfarin; VKORC1; Genetic polymorphism

华法林是双香豆素类衍生物抗凝剂, 由于其价格低廉、效果明显, 因而广泛应用于深静脉血栓、动脉硬化和心瓣膜置换等病人的抗凝治疗中. 但因为华法林的治疗窗很窄, 治疗剂量很接近耐受剂量, 投施不当极易导致出血或血栓等严重并发症的发生. 近年来, 遗传因素对华法林抗凝维持剂量个体差异的影响愈来愈受重视, 较早的是针对细胞色素 P450 (CYP) 2C9 代谢酶基因单核苷酸多态性与华法林代谢关系的研究报道^[1], 结果表明, 该基因的两个 SNP CYP2C9*2 和 CYP2C9*3 与华法林抗凝维持剂量关系密切.

另有其他研究也发现^[2,3], 携带此两种基因的个体所需华法林剂量相对较低, 并且出现出血并发症的可能性更大. 最近, 编码华法林靶蛋白的维生素 K 环氧化物酶复合体亚单位 1 (VKORC1) 基因被成功分离^[4], 并对其与华法林代谢的关系加以研究. 结果发现, VKORC1 基因的 VKORC1 -1639A/G、3730A/G 和 VKORC1 -1173C/T 位点对华法林抗凝剂量的影响比 CYP2C9 更为重要^[5]. 国外已有诸多有针对性的研究, 本课题组已对云南汉族人群中 VKORC1 -1639G/A 和 3730A/G 与华法林抗凝维持剂量关系进行了研究并得到了客观结果, 国内也有学者^[6]对中国人群 VKORC1 -1639G/A 和 VKORC1 1173C/T SNP 与华法林剂量关系进行了研究, 但是针对云南汉族群体 VKORC1 1173C/T SNP 的报道并不多见. 而且, 云南境内居住着汉族以及 25 个少数民族, 其中佤族、布朗族、拉祜族等 15 个群体为云南省特有少数民族, 他们大杂居、小聚居的居住特点导致了与汉族之间基因交流较为普遍, 本课题组在对云南汉族群体 VKORC1 -1639G/A 和 3730A/G SNP 与华法林剂量关系研究的基础上, 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 分析技术, 检测 VKORC1 1173C/T 基因位点的基因型和等位基因频率, 分析华法林抗凝维持剂量与 VKORC1 1173C/T 位点基因多态性的关系, 以期为临床华法林治疗的个体化用药提供依据.

1 材料与方法

1.1 研究对象

按照准入标准选择 2008 年 8 月至 2009 年 8 月 2 a 来昆明医科大学附属延安医院行心脏机械瓣膜置换术的病人 300 例, 其中男 138 例, 女 162 例.

1.1.1 样本入选标准 (1) 经患者同意并签定知情同意书; (2) 年龄 ≥ 18 岁; (3) 回顾性病例中, 患者已获得稳定剂量超过 1 个月; (4) 目的凝血酶原国际标准化比值 (INR) 1.5 ~ 3.0.

华法林稳定剂量是指在服用相同剂量下, 患者连续 2 次 INR 值在 1.5 ~ 3.0 之间, 两次相隔时间至少 7 d 以上.

1.1.2 样本排除标准 (1) 既往或现在有肝脏疾患, 或血清转氨酶大于正常 1.5 倍; (2) 肾功能受损, 血清肌酐 $>120 \mu\text{mol/L}$; (3) 前瞻性病例中, 3 个月内服用过华法林者; (4) 正在使用影响华法林代谢的药物; (5) 基础 INR 值 >1.4 ; (6) 不适合华法林治疗者.

1.2 研究方法

1.2.1 引物的设计与合成 从 PubMed 上查找到目的基因序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物和相关参数, 利用 Vector NTI Suite 6 软件与设计的引物进行比对, 确定引物序列, 由赛百盛基因技术有限公司合成. 上游引物序列为 5'-GGTCTAAGAT-GAAAAGGAGGG-3', 下游引物序列为 5'-GCT-GTTGGATTGATTGAGGAT-3'.

1.2.2 PCR 扩增 反应体系 20 μL , 10 \times PCR 缓冲液 2.0 μL , dNTP (2 mmol/L) 2.0 μL , 基因组 DNA 0.2 μg , 上下游引物各 0.5 μL , Taq 聚合酶 (5 U/ μL) 0.2 μL , 余下容积用 pH8.2 的双蒸水补齐. 反应条件: 97 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 80 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 自 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 到 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 共 35 个循环.

1.2.3 RFLP 分析 用限制性内切酶 Hinf I 消化 VKORC1 基因 1173C/T PCR 扩增产物: 取 8.5 μL PCR 产物, 10 \times Buffer 1.0 μL , 内切酶 0.5 μL , 反应体系 10 μL , 混匀, 3 000 r/min 离心 20 s, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱 24 h 进行酶切, 采用 8% 的垂直非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及硝酸银染色观察结果.

1.2.4 DNA 序列分析 取 VKORC1 基因 1173C/T 位点的 PCR 产物和酶切产物进行 DNA 序列分析,

以检测获得的 PCR 产物和酶切产物是不是目的 DNA 片段. 测序结果与从基因 Bank 上查找的目的片段进行对比, 检测到 PCR 扩增的产物和酶切产物均为目的片段.

1.3 统计学处理

全部资料采用 SPSS 和 Arlequin 软件进行统计处理, 计算目的基因的基因型和等位基因频率, 进行 Hardy-Weinberg 定律的遗传平衡吻合度检验, 群体间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 基因型检测

所有样本共检出两种等位基因: 等位基因 C (10%) 和等位基因 T (90%); 两种基因型: 纯合子 TT 240 例 (80%) 和杂合子 CT 60 例 (20%), 未检测到 CC 基因型.

2.2 基因多态性及男女情况分析

所检测 300 例样本中, 男 138 例 (46.0%), 其中 CT 基因型 41 例 (13.7%), TT 97 例 (32.3%); C 等位基因频率为 6.8%, T 为 39.2%.

女性 162 例 (54.0%), 其中 CT 基因型 55 例 (18.3%), TT 基因型 107 (35.7); C 等位基因频率为 9.2%, T 为 44.8%. 经检验, 云南地区汉族人群 VKORC11173 基因型频率与期望值差异无统计学意义 ($P = 0.387$), 表明其符合 Hardy-Weinberg 平衡分布, 基因频率分布已达遗传平衡, 具有群体代表性. 男女之间基因多态性分布经检验, 差异无统计学意义 ($P = 0.470$). TT 基因型个体所需华法林维持剂量较低 (3.12 ± 1.17) mg/d, CT 基因型所需华法林维持剂量较高 (3.62 ± 1.35) mg/d, 见表 1.

2.3 不同民族、国家或地区间基因多态性分布情况比较

VKORC1 1173C/T 基因型与华法林维持剂量的关系, 见图 1.

本实验结果与高加索人、意大利人等国外 8 个人群^[7-12]基因多态性分布进行比较, 见表 2.

表 1 VKORC1 1173C/T 基因型频率分布、所需华法林剂量及比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of wafarin requiemment and VKORC1 1173C/T genotype distribution ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	CT	TT
每日剂量 (mg,M ± SD)		3.62 ± 1.35*	3.12 ± 1.17
年龄 (岁,M ± SD)		44.12 ± 12.22	45.23 ± 13.55
INR (M ± SD)		1.86 ± 0.89	1.94 ± 0.65
性别 [n(%)]			
男	138	41(13.7)	97(32.3)
女	162	55(18.3)	107(35.7)

与 TT 组每日剂量 (mg,M ± SD) 比较, * $P < 0.05$.

表 2 不同人群之间 VKORC1 1173C/T 基因多态性分布 (%)

Tab. 2 VKORC1 1173C/T genotype distribution of different populations (%)

人 群	基因型频率 (%)			等位基因频率 (%)	
	CC	CT	TT	C	T
云南汉族	0.0	20.0	80.0	10.0	90.0
江苏汉族	0.6	12.9	86.5	7.0	93.0
高加索人	37**	46.9**	16.3**	60.2**	39.8**
意大利人	29**	44.7**	26.4**	50.7**	49.3**
美国白人	37**	50.7**	12.7**	62.2**	37.8**
日本人	1.3	13.8*	85.0	8.1	91.9
印度人	70**	30.0*	0.0**	85.0**	15.0**
印度尼西亚人	0.0	39.5*	60.5**	19.8*	80.2*
菲律宾人	2.1	29.9*	68.0*	17.1*	82.9*
泰国人	1.9	37.1*	61.0*	20.4*	79.6*
越南人	2.0	26.0*	72.0*	15.0*	85.0*

与云南汉族群比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

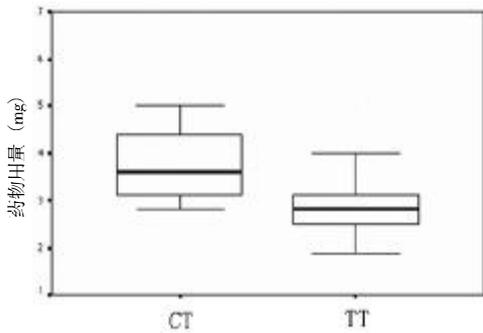


图 1 VKORC1 1173C/T 基因型与华法林维持剂量的关系
Fig. 1 Relationship between VKORC1 1173C/T genotypes and warfarin dose requirement

3 讨论

近年来,随着药物基因组学的研究进展和华法林药理作用分子机制的逐步阐明,遗传因素在华法林用量个体差异中的作用越来越受到重视.美国 FDA 建议,对接受华法林治疗的个体在服药前进行基因型检测,以估计其用量^[13].近来,已有研究表明,VKORC1 基因在华法林的代谢中起着重要作用^[9],比较常见的是 VKORC1 基因启动子区域 SNP (-1639G>A),该位置碱基由野生型 G 变异为突变型 A,编码蛋白质的氨基酸发生了变化,导致相应酶活性改变,进而影响了华法林的代谢.因此,VKORC1 -1639G/A 基因多态性导致了华法林维持剂量的个体差异.最近有研究还发现^[7],VKORC1 -1639G/A 多态性在华法林代谢中可以解释导致华法林维持剂量个体差异基因因素的 49.4%.本课题组以往的研究也发现,云南汉族人群中 VKORC1 -1639G/A 基因型以突变纯合子 AA 型最为常见(68%),其次为 AG 型(29%)和 GG 型(3%).而且在云南汉族人群中,AA 基因型个体与 AG、GG 相比所需华法林抗凝维持剂量(mg/d)最小,GG 基因型个体所需维持剂量最大,二者相比有统计学意义($P<0.05$).有学者通过研究^[14]发现,VKORC1-1639A/G 中,G 碱基可使该基因启动子活性增加近 50%,从而使得 VKORC1 mRNA 表达增加,VKORC1 蛋白因而相应增加,引起 VKORC1 活性增高,生成了更多的凝血因子,这就需要更大剂量的华法林来抵抗凝血作用,由于 VKORC1 蛋白是华法林作用靶点,所以,基因型为 AA 的个体对华法林敏感,而基因型为 AG 和 GG 的个体对华法林相对抵抗.

与 VKORC1-1639A/G 基因相比,VKORC1 1173C/T 是另一个对华法林代谢有较重要影响的

SNP,位于 VKORC1 基因 3' 端非编码区域,在第 1173 碱基位置上发生了碱基 C 和 T 的互换,编码蛋白质的氨基酸发生了改变,导致相应酶活性改变,进而影响了华法林的代谢.本课题研究发现,在云南汉族群体中,VKORC1 1173C/T SNP 共检出 C 和 T 2 种等位基因,纯合子 TT 和杂合子 CT 两种基因型,基因多态性分布在性别和年龄上无差异.本研究的云南汉族群体与其他群体比较发现,云南汉族 VKORC1 1173C/T CC、CT 和 TT 基因型分布与高加索人、意大利人、美国白人、印度人差异非常显著,而与日本人及东南亚国家人群如印度尼西亚人、菲律宾人、泰国人和越南人差异不很明显,与国内江苏汉族相比无差异.但是总体来说,云南汉族 VKORC1 1173C/T 有自己相对独特的基因多态性分布.本课题研究还发现,在云南汉族人群中,CT 基因型个体所需华法林抗凝维持剂量最高,其次是 TT 基因型个体,与国外针对高加索人、意大利人和美国人的研究结果相一致^[8-11].根据以上文献报道,在 VKORC1 1173C/T CC、CT 和 TT 3 种基因型个体中,CC 基因型个体所需华法林剂量最高,但本次实验未在云南汉族群体中检测到 CC 基因型个体,是否是由于云南地区少数民族众多、与汉族之间基因交流等所致也是本课题组目前正在针对国内其他地区汉族群体及云南少数民族从事的研究工作.

总之,在云南汉族群体中,VKORC1 1173C/T TT 基因型频率最高,其次为 CT,未检测到 CC 基因型.TT 基因型个体华法林抗凝维持剂量最小,其次为 CT 基因型个体.目前课题组正在对 VKORC1、GGCX 和 CYP2C9 等与华法林的剂量关系密切的基因进行研究,同时对云南特有少数民族人群相关基因多态性进行检测,以期最终以基因和非基因因素为依据,制定华法林维持剂量参考量表,在测定患者基因信息基础上,为华法林的个体化用药提供可行依据.

[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: 717 - 719.
- [2] 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: 1 690 - 1 698.

- [3] NASU K, KUBOTA T, ISHIZAKI T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population [J]. *Pharmacogenetics*, 1997, 7: 405 - 409.
- [4] LI T, CHANG C Y, JIN D Y, et al. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase [J]. *Nature*, 2004, 427: 541 - 544.
- [5] LARISA H, CAVALLARIA, KATHRYN M, et al. Pharmacogenomics of Warfarin dose requirements in Hispanics [J]. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 2011, 46: 147 - 150
- [6] 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: 1 135 - 1 141.
- [7] YANG J, HUANG C, SHEN Z, et al. Contribution of 1173C > T polymorphism in the VKORC1 gene to warfarin dose requirements in Han Chinese patients receiving anticoagulation [J]. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2011, 49(1): 23 - 29.
- [8] GIOVANNA DANDREA, ROSA LUCIADAMBROSIO, PASQUALE DI PERNA, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin [J]. *Blood*, 2005, 105(2): 645 - 649.
- [9] PAOLA BORGIANI, CINZIA CICCACCI, VITTORIO FORTE, et al. Allelic variants in the CYP2C9 and VKORC1 loci and interindividual variability in the anticoagulant dose effect of warfarin in Italians [J]. *Pharmacogenomics*, 2007, 8(11): 1 545 - 1 550.
- [10] JOHN F, CARLQUIST, BENJAMIN D, et al. An evaluation of nine genetic variants related to metabolism and mechanism of action of warfarin as applied to stable dose prediction [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2010, 30: 358 - 364.
- [11] MISA YOSHIZAWA, HIDEKI HAYASHI, YOSHIO TASHIRO, et al. Effect of VKORC1 -1639 G/A polymorphism, body weight, age, and serum albumin alterations on warfarin response in Japanese patients [J]. *Thrombosis Research*, 2009, 124: 161 - 166.
- [12] MING T A MICHAEL LEE, CHIEN-HSIUN CHEN, HUI-PING CHUANG, et al. VKORC1 haplotypes in five East-Asian populations and Indians [J]. *Pharmacogenomics*, 2009, 10(10): 1 209 - 1 216.
- [13] SCHWARZ U I, RITCHIE M D, BRADFORD Y, et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation [J]. *N Eng J Med*, 2008, 358: 999 - 1 008.
- [14] YUAN H Y, CHEN J J, LEE M T, et al. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated within interindividual and interethnic differences in warfarin sensitivity [J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14: 1 745 - 1 751.

(2012-03-10 收稿)

征稿启事

为进一步支持和推动昆明医科大学学科建设的发展,使《昆明医科大学学报》的学术质量得到进一步的提升,《昆明医科大学学报》编辑部决定自2012年1月1日起,国家自然科学基金资助课题的综述可以在学报正刊发表,另外对国家自然科学基金资助课题、云南省自然科学基金资助课题及昆明医学院“十二五”省级、校级重点学科立项建设的论著,给予快审快发及优稿优酬的奖励机制。欢迎广大科研教学人员、硕士及博士研究生踊跃投稿。投稿邮箱: kmyxyxb@126.com, 电话: 0871-5936489, 0871-5933621, 0871-5333437。

昆明医科大学学报编辑部

2012年1月1日