

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.14.007

川东北地区 CYP2C9 基因多态性对华法林药代动力学的影响*

杨思芸, 刘涛, 苏强

(四川省南充市中心医院·川北医学院第二临床医学院·个体化药物治疗南充市重点实验室, 四川南充 637000)

摘要:目的 探讨川东北地区接受华法林抗凝治疗的患者群体中,CYP2C9 基因多态性对华法林药代动力学的影响。方法 在川东北地区随机选取 34 例行心脏瓣膜置换术并服用华法林的患者进行研究,采用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性技术检测患者 CYP2C9 基因型,应用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法监测华法林对映体血药浓度及尿排泄量。结果 R-华法林的血药浓度、尿排泄及主要药代动力学参数在 CYP2C9 不同基因型的患者间无显著差异。S-华法林在 CYP2C9 * 1/* 1, CYP2C9 * 1/* 3, CYP2C9 * 2/* 3 及 CYP2C9 * 3/* 3 基因型患者中血药浓度、尿排泄量及主要药代动力学参数存在显著差异,其中 CYP2C9 * 1/* 1 基因型患者体内华法林代谢最快,而 CYP2C9 * 3/* 3 基因型患者体内华法林代谢最慢。结论 R-华法林药代动力学过程不受 CYP2C9 基因多态性影响,而 CYP2C9 基因多态性能显著影响 S-华法林药代动力学过程。因此,在川东北地区进行 CYP2C9 基因型监测能促进临床合理用药。

关键词:华法林;CYP2C9 基因;基因多态性;药代动力学;合理用药

中图分类号:R969.1;R973+.2

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)14-0019-04

Effect of CYP2C9 Gene Polymorphism on Pharmacokinetics of Warfarin in Northeastern Sichuan

YANG Siyun, LIU Tao, SU Qiang

(Nanchong Central Hospital, The Second Clinical Medical College of North Sichuan Medical College, Municipal Key Laboratory for Individual Drug Treatment, Nanchong, Sichuan, China 637000)

Abstract: Objective To investigate the effect of CYP2C9 gene polymorphism on the pharmacokinetics of warfarin in the patients received warfarin anticoagulation therapy in northeastern Sichuan. **Methods** Totally 34 patients underwent heart valve replacement and treated with warfarin were randomly selected from northeastern Sichuan. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) was adopted to detect CYP2C9 genotype, liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS) was used to monitor the plasma concentration and urinary excretion of warfarin enantiomers. **Results** There were no significant differences in plasma concentration, urinary excretion and main pharmacokinetic parameters of R-warfarin in the patients with different CYP2C9 genotypes. However, there were significant differences in plasma concentration, urinary excretion and main pharmacokinetic parameters of S-warfarin in patients with CYP2C9 * 1/* 1, CYP2C9 * 1/* 3, CYP2C9 * 2/* 3 and CYP2C9 * 3/* 3 genotypes, among which the metabolism of warfarin in patients with CYP2C9 * 1/* 1 genotype was the fastest, while that in patients with CYP2C9 * 3/* 3 genotype was the slowest. **Conclusion** CYP2C9 gene polymorphism can't affect the pharmacokinetic process of R-warfarin, but it can significantly affect the pharmacokinetic process of S-warfarin. Therefore, monitoring CYP2C9 genotype in northeastern Sichuan can promote rational drug use in the clinic.

Key words: warfarin; CYP2C9 gene; gene polymorphism; pharmacokinetics; rational drug use

抗凝剂自 1950 年进入临床使用,其中,维生素 K 拮抗剂华法林一直是使用最广泛的口服抗凝剂。华法林能显著降低房颤患者发生中风的风险,同时也能降低心肌梗死患者的死亡率,但仍有证据表明其存在治疗风险^[1]。华法林为混合物,包括 R-华法林与 S-华法林 2 个对映体,均有药理活性(后者药理活性显著强于前者)。华法林的代谢过程涉及多种细胞色素 P450 酶,这些代谢酶催化华法林在体内转化为系列单羟化代谢物,而少数华法林原型药及绝大部分的代谢物经肾脏代谢至尿液排出体外。CYP2C9 是参与 S-华法林代谢的主要酶,超过 80% 的 S-华法林由该酶催化为主要的无活性代谢物 S-7-羟基华法林及 S-6-羟基华法林^[2]。但参与 R-华法林代谢的主要是 CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4,

而并非 CYP2C9,这 3 个代谢酶可分别将 R-华法林催化为 R-6-羟基华法林、R-8-羟基华法林及 R-10-羟基华法林^[2-3]。华法林的这些单羟化代谢物还可通过葡萄糖醛酸转移酶进一步代谢^[4]。

鉴于 CYP2C9 基因多态性且与活性更强的 S-华法林的代谢清除相关,在接受华法林治疗前应明确特定患者的 CYP2C9 基因型。CYP2C9 * 3 等位基因(Ile359Leu)是其最常见的功能受损的变异基因型,体外试验提示其能降低 90% S-华法林的代谢^[5-9]。当 CYP2C9 * 3 纯合子患者接受常规剂量华法林治疗时,往往面临着非常高的过度抗凝风险,除非将华法林剂量下调 70%^[6]。因此,CYP2C9 基因型是华法林与其他药物相互作用的一个重要决定因素。

*基金项目:四川省科技计划项目[2016JY0192];四川省南充市科技计划项目[16YFZJ0030]。

第一作者:杨思芸,女,大学本科,主任药师,研究方向为临床药学,(电话)0817-2258096(电子邮箱)413305344@qq.com。

尽管华法林的相关研究已持续了许多年,但在川东北地区 CYP2C9 基因多态性的患者群体中,华法林的药代动力学研究尚未见报道。同时,目前尚不清楚川东北地区患者体内华法林代谢是否会因 CYP2C9 基因的多态性而改变,从而涉及其他途径或酶,这可能会影响临床对华法林与其他药物相互作用的评估与预测。为此,本研究中对川东北地区 CYP2C9 基因型患者体内华法林对映体的药代动力学进行了考察,旨在明确 CYP2C9 基因多态性对华法林代谢过程的影响,为华法林的临床合理应用提供参考。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);TSQ 型量子三重四极质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。华法林钠片(上海上药信谊药厂有限公司,国药准字 H31022123,规格为每片 2.5 mg);R-华法林(批号为 113027,纯度为 98%),S-华法林(批号为 114249,纯度为 98%),均购自美国 Sigma 公司;甲氯噻嗪(吉林敖东洮南药业股份有限公司,纯度为 99.6%);试验所用试剂均为色谱纯,水为超纯水。

1.2 研究对象

纳入标准:川东北地区本地居民;年龄 18~61 岁;肝肾功能正常;心脏瓣膜置换术后服用华法林进行抗凝治疗;无吸烟史。本研究经医院医学伦理委员会批准,患者签署知情同意书。

排除标准:对本研究拟用药物过敏;住院期间使用过阿司匹林、巴比妥及奎尼丁等药物;有出血倾向;住院期间使用过 CYP2C9 或 CYP3A4 的底物、抑制剂、诱导剂或激活剂类药物。

1.3 方法

DNA 分离和基因型测定:收集患者血液,室温下从全血中提取 DNA。采用基因型应用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性技术检测 CYP2C9 基因型。

试验设计:根据基因检测结果,选取 11 例 CYP2C9 * 1/* 1 基因型,8 例 CYP2C9 * 1/* 3 基因型,6 例 CYP2C9 * 2/* 3 基因型,9 例 CYP2C9 * 3/* 3 基因型患者。给予华法林钠片,前 3 天每日剂量为 3 mg,随后每日维持剂量为 4 mg。连续给药 30 d,末次给药后,检测华法林对映体在血液及尿液中的质量浓度。试验前 6 d 至研究结束期间避免使用任何已知 CYP2C9 或 CYP3A4 的底物、抑制剂、诱导剂或激活剂,同时避免摄入咖啡因。

生物样品收集与处理:末次给药后 2,6,24,48,72,96,120,144,168,216,264,312,360 h 时取血液样品各 2 mL,置肝素化离心管,3 000 r/min 离心 20 min,取血浆贮存于 -20 °C 待测。末次给药后,分别于 0,72,

144,216 h 收集 24 h 的排尿量,并冷藏贮存。在每个间隔,记录尿总量,并取 20 mL 置 -20 °C 贮存待测。取血浆或尿液样品 200 μ L,加入 500 ng/mL 甲氯噻嗪(内标)50 μ L,随后依次加入甲醇-水(50:50, V/V)50 μ L,0.2 mol/L 磷酸溶液 100 μ L,水 300 μ L,混合;涡流 1 min 后,加入乙醚-二氯甲烷(3:2, V/V)3 mL,涡旋 5 min,3 500 r/min 离心 5 min,取全部上清液,氮气吹干,最终以 5 mmol/L 醋酸铵溶液(pH 4.0)-乙腈(72:28, V/V)300 μ L 复溶。

试验条件:使用液相色谱-串联质谱仪检测。色谱柱为 Astec Chirobiotic™ V 柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相为 5 mmol/L 醋酸铵溶液(pH 4.0)-乙腈(72:28, V/V);流速 1.5 mL/min(柱后分流,离子源-废液体积比为 1:2, V/V);进样量 5.0 μ L。上述操作均在医院基因检测实验室进行。

1.4 统计学处理

药-时曲线由 GraphPad 5.0 软件绘制;相关药代动力学参数由 DAS 2.0 软件分析。采用 SPSS 13.0 统计学软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行 *t* 检验;计数资料以率(%)表示,行 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对 R-华法林血药浓度及尿排泄的影响

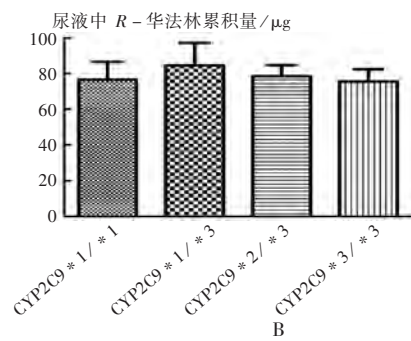
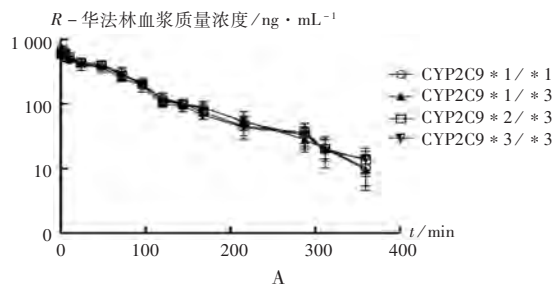
R-华法林的血药浓度及尿排泄在 CYP2C9 不同基因型患者间无显著差异,详见图 1。R-华法林药代动力学参数在 CYP2C9 不同基因型患者间无显著差异,详见表 1。结果表明,R-华法林药代动力学过程不受 CYP2C9 基因多态性影响。

2.2 对 S-华法林血药浓度及尿排泄的影响

CYP2C9 * 1/* 1 基因型患者体内 S-华法林的血药浓度及尿排泄量显著低于其他基因型,CYP2C9 * 1/* 3 和 CYP2C9 * 2/* 3 基因型次之,而 CYP2C9 * 3/* 3 基因型患者体内 S-华法林血药浓度及尿排泄量最高,详见图 2。CYP2C9 * 1/* 1 基因型患者体内 S-华法林半衰期($t_{1/2}$)显著小于其他基因型,清除率(CL)显著高于其他基因型;而 CYP2C9 * 3/* 3 基因型患者体内 S-华法林 $t_{1/2}$ 显著高于其他基因型,CL 显著低于其他基因型,详见表 2。结果表明,CYP2C9 * 1/* 1 基因型患者体内华法林代谢最快,而 CYP2C9 * 3/* 3 基因型患者体内华法林代谢最慢。

3 讨论

药物代谢酶是药代动力学过程中的重要调节因素,其直接参与药物在体内的转化过程。明确药物的代谢酶可规避临床潜在的不利于治疗目的的药物相互作用,进一步阐明代谢酶基因多态性对药物代谢的差异,能针对不同患者制订合理的个体化给药方案,从而提升临床药物治疗的安全性。



A. 血药浓度 B. 单日尿中含药量

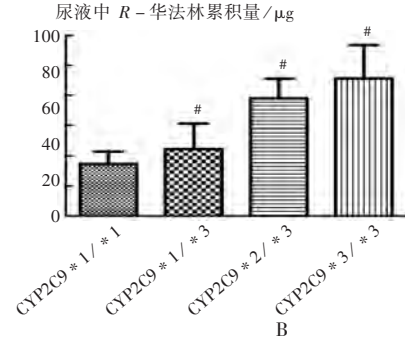
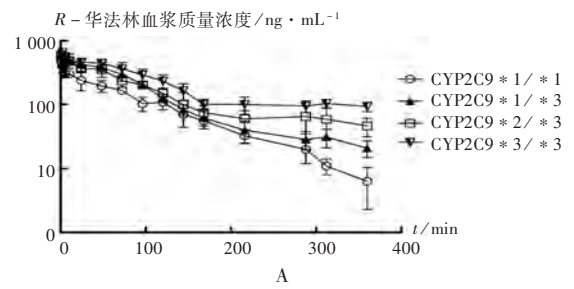
图1 口服华法林后 R-华法林在各基因型患者体内的血药浓度及单日尿中含药量

表1 不同基因型患者体内 R-华法林主要药代动力学参数($\bar{X} \pm s$)

参数	CYP2C9*1/*1	CYP2C9*1/*3	CYP2C9*2/*3	CYP2C9*3/*3
$t_{max}(h)$	2.7±0.6	2.9±0.3	2.6±0.8	2.7±0.7
$C_{max}(ng/mL)$	601±122	621±132	581±107	631±152
$t_{1/2}(h)$	61±12	65±18	58±11	66±15
CL(mL/h)	138±48	118±68	121±55	141±39

明确川东北地区不同基因型患者体内华法林的药代动力学过程,结合药物基因检测及国际标准化比值(INR)进行精准给药,则能规避临床抗凝过度或不足,也能降低治疗过程中毒性反应的发生。S-华法林的药理活性显著强于 R-华法林,且其代谢主要经 CYP2C9 介导。因此,本研究中首先通过药物基因检测技术筛选接受华法林治疗患者的 CYP2C9 基因型,同时考察各基因型患者体内华法林对映体的质量浓度,从而评价 CYP2C9 基因多态性对华法林药代动力学的影响。

疾病可能会影响机体内转运体或代谢酶的表达,因此针对特定患者直接进行相关治疗药物药代动力学的临床意义可能优于正常志愿者的药代动力学。本研究中选取南充市中心医院 34 例心脏瓣膜置换术后接受华法林抗凝治疗的患者作为研究对象。为了排除研究中其他合用药物对华法林药代动力学的影响,筛选的患者在接受华法林治疗时均未使用其他 CYP2C9 代谢酶的诱导剂或抑制剂。鉴于抗凝治疗期间华法林通常是每天维持给药,为了能监测到华法林单次体内消除过程,于患者末次给药后检测 R-华法林、S-华法林及其代谢物,同时收集每天尿液,用于检测尿中药物含量。结果提



A. 血药浓度 B. 单日尿中含药量

注:与 CYP2C9*1/*1 基因型比较, # $P < 0.05$ 。

图2 口服华法林后 S-华法林在各基因型患者体内的血药浓度及单日尿中含药量

表2 不同基因型患者体内 S-华法林主要药代动力学参数($\bar{X} \pm s$)

参数	CYP2C9*1/*1	CYP2C9*1/*3	CYP2C9*2/*3	CYP2C9*3/*3
$t_{max}(h)$	2.3±0.5	2.1±0.6 [#]	2.6±0.6 [#]	2.7±0.3 [#]
$C_{max}(ng/mL)$	583±133	602±144	597±128	611±119
$t_{1/2}(h)$	69±15 [*]	85±22 [*]	97±17 [*]	136±31
CL(mL/h)	281±77 [*]	179±54 ^{#*}	88±13 ^{#*}	63±14 [#]

注:与 CYP2C9*1/*1 基因型比较, # $P < 0.05$; 与 CYP2C9*3/*3 基因型比较, * $P < 0.05$ 。

示,CYP2C9 基因多态性患者对 R-华法林的药代动力学无显著影响,而 CYP2C9*1/*1 基因型患者 S-华法林的血药浓度及尿排泄量最低,而 CYP2C9*1/*3 及 CYP2C9*2/*3 次之,CYP2C9*3/*3 基因型患者 S-华法林的血浆暴露及尿排泄量最高。这表明 CYP2C9*3/*3 基因型患者体内华法林的消除极慢,若不当调整剂量可能会导致过度抗凝,而 CYP2C9*1/*1 基因型患者则可能出现抗凝效果不佳的情况。鉴于华法林的抗凝效果往往也和 VKORC1 基因多态性有关联,且不同患者的生理条件及饮食习惯都不尽相同。因此,为了更加合理地调整华法林的剂量,临床医师及药师应进行代谢酶及结合位点的基因检测和血药浓度监测,并结合 INR,对不同的患者进行个体评估、调整。

参考文献:

- [1] LEI H, YU LT, WANG WN, et al. Warfarin and the Risk of Death, Stroke, and Major Bleeding in Patients With Atrial Fibrillation Receiving Hemodialysis: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1218.