

中国人群 *CYP4F2* 基因多态性对华法林抗凝作用的影响^{*}

张亚同¹ 梁欣^{1,2} 董凡¹ 郑子恢¹ 胡欣¹ 李可欣¹ 杨莉萍¹

1 卫生部北京医院药学部 (北京 100730)

2 北京通州潞河医院药剂科 (北京 101149)

【摘要】 目的: 研究中国人群中 *CYP4F2* 基因多态性对华法林抗凝作用的影响。方法: 本研究纳入我院应用华法林进行抗凝治疗的患者, 对患者 *CYP4F2* 基因多态性位点用连接酶检测反应进行检测, 以国际标准化比值 (INR) 作为监测指标, 统计学分析基因位点的多态性与华法林用药剂量个体间差异的相关性。结果: 207 例样品中, *CYP4F2* 基因突变率为 22.2%, 其中杂合子分型为 35.7%, 且达到遗传平衡。不同基因分型组间的华法林剂量未见显著性差异, 但是携带 T 的患者华法林稳定剂量有逐步升高的趋势。结论: *CYP4F2* 基因多态性对华法林稳定剂量有影响但不显著。

【关键词】 华法林; 连接酶检测反应; *CYP4F2*; 国际标准化比值; 基因多态性

【中图分类号】 R97

【文献标志码】 A

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2014.01.009

Effect of *CYP4F2* Polymorphism on Warfarin Anticoagulant in Chinese Population

ZHANG Ya-tong, LIANG Xin, DONG Fan, ZHENG Zi-hui, HU Xin, LI Ke-xin, YANG Li-ping. 1

Department of Pharmacy, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China; 2 Beijing Luhe Hospital, Beijing 101149, China

【Abstract】 **Objective:** To study *CYP4F2* polymorphisms on the anticoagulant effect of warfarin in Chinese population. **Method:** Patients undergoing warfarin anticoagulation therapy in Beijing hospital were included whose *CYP4F2* gene polymorphisms were detected with LDR (ligase detection reaction) and INR (international normalized ratio) were monitored. Relationship between *CYP4F2* gene polymorphisms and warfarin stable dose was statistically analyzed. **Result:** 207 patients were included in which *CYP4F2* gene mutation rate was 22.2% and heterozygous type was 35.7%, meeting Hardy-Weinberg equilibrium balance. Warfarin dose in different genotype groups was no significantly different but there was an increasing trend in the T carriers. **Conclusion:** There is no significant effect of *CYP4F2* polymorphism on stable dosage of warfarin.

【Key words】 Warfarin; LDR; *CYP4F2*; INR; Gene polymorphism

华法林系双香豆素类抗凝药, 是临床上应用最多的口服抗凝药物, 但是本药治疗窗窄。一旦剂量过大, 就会出现出血等严重不良反应, 剂量不够导致抗凝不足。而且华法林的稳定剂量个体间差异很大, 用药剂量可以相差几十倍^[1]。有很多因素可以影响华法林的代谢以

及抗凝效果, 除了年龄、体重、性别、环境、吸烟史、饮食习惯、疾病状态、药物相互作用等非遗传因素以外, 参与华法林药动学或药效学的遗传因素是重要的影响因素。影响华法林的药效学和药动学相关的基因超过 30 余种^[2], *VKORC1* 和 *CYP2C9* 目前研究比较深入, 是对

^{*} 基金项目: 卫生行业科研专项基金“药物使用安全与输血安全相关技术与标准”(200902008-03); 国家科技部“十一五”重大新药创制“心脑血管疾病新药临床评价技术平台研究”(008ZX09312-005)

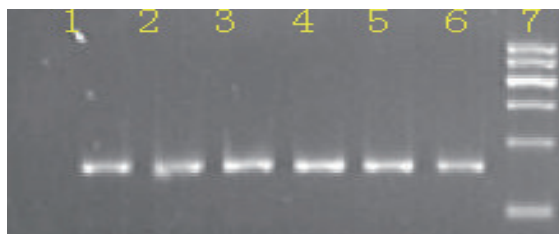


图 1 PCR 扩增产物电泳图

注: 1~6 泳道为扩增产物, 7 泳道为 DNA 标记

作为连接反应的模板。连接反应混合液 (10 μ L 体系): 在 1.5mL eppendorf 离心管中分别加入 100 μ L 缓冲液 (10 \times), 100 μ L 探针混合液, 5 μ L 连接酶, 695 μ L 去离子水。在 PCR 仪上设置如下程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 2min, 35 个循环, 每个循环有 2 个温度 94 $^{\circ}$ C 30s, 50 $^{\circ}$ C 2min。将 PCR 反应管放入 PCR 仪进行连接反应。各取 1 μ L LDR 连接产物与 1 μ L LABI GS-500 ROX 荧光标记分子量标准和 1 μ L 去离子甲酰胺上样液混合, 95 $^{\circ}$ C 加热变性 2min, 冰中骤冷, 于 5% 聚丙烯酰胺和 5mol/L 尿素中 3000V 电泳 2.5h, 应用 GENESCANTM 672 软件进行数据收集、泳道线校正、迁移片段大小测量和校正内在分子量标准, 应用 Genemapper 软件 (美国 ABI 公司) 进行数据分析和基因分型。挑选不同基因型结果 2~3 例进行 377 测序电泳验证。Genemapper 进行数据分析: 位点的分型截图如下 (图 2)。

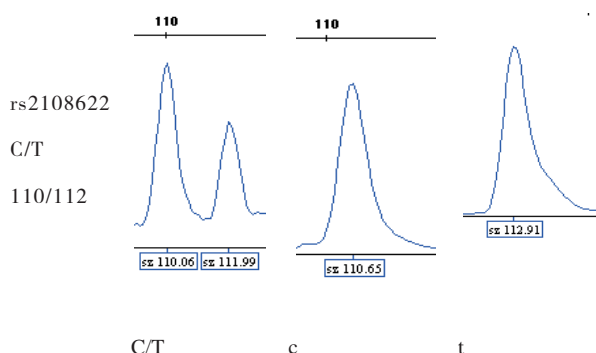


图 2 rs2108622 位点不同基因型截图

表 2 华法林相关位点统计分析

基因位点	等位基因	基因型	预期值	实际值 (%)	χ^2	Pearson P
rs2108622	C	C/C	161.0 (P2*207)	124 (59.9)	0.33	0.56
	T	C/T	71.6 (2pq*207)	74 (35.75)		
		T/T	10.2 (q2*207)	9 (4.35)		

2.4 统计学处理

本研究采用统计学分析软件 SPSS18.0 (SPSS Inc.) 进行统计分析 (包括描述统计) 和作图。Hardy-Weinberg 平衡应用 χ^2 检验, 其他多组间比较用方差分析。

3 实验结果

根据 Hardy-Weinberg 平衡原理对 207 例患者相关基因位点进行分析, T 分布频率 22.2%, $P > 0.05$, 说明群体基因遗传平衡, 数据来自同一蒙德尔群体 (表 2)。

纳入分析的 207 例华法林使用患者中男性 106 例, 女性 101 例, 男女比例约 1:1, 平均年龄 62.8 ± 14.4 (12 ~ 90) 岁, 体重指数 24.67 ± 3.85 (15.76 ~ 36.32) kg/m^2 。对入选的 207 例患者的基本资料进行统计 (表 3)。

207 例患者的 *CYP4F2* 基因 rs2108622 位点各基因分型所对应的华法林稳定剂量见图 3。图中可见有突变发生, 患者的华法林稳定剂量未见显著降低。对患者使用华法林的相关基因相对应的稳定剂量进行分析, 见表 4。表中可见稳定剂量的 INR 相对一致。稳定剂量及稳定剂量所对应的 INR 值未见显著性统计学差异。但是携带 T 突变的患者稳定期华法林剂量有增加的趋势, INR 值有降低的趋势。

4 讨论

CYP4F2 属于 CYP 家族, 基因位于染色体 19p13.11, 表达产物 *CYP4F2* 酶分布在肝脏、心脏、肺、肾脏和白细胞, 最早的功能学研究发现 *CYP4F2* 酶参与花生四烯酸及白三烯 B4 的 ω -羟化反应, 因此认为该酶在炎症反应中有一定的作用^[7]。2008 年 Caldwell 等^[5]研究发现 *CYP4F2* 突变位点 *CYP4F2**3(rs2108622) 对华法林的个体差异有统

表 3 207 例患者临床特征

变量	数值
年龄 / 岁	62.8 ± 14.4
女性 /n(%)	101 (48.79)
身高 /cm	166.70 ± 7.48
体重 /kg	69.17 ± 12.47
体表面积 /m ²	1.74 ± 0.19
吸烟 /n(%)	108 (52.17)
合并症	
糖尿病 /n(%)	49 (23.7)
高血压 /n(%)	109 (53.6)
血脂异常 /n(%)	58 (28.0)
华法林适应证	
换机械瓣 /n(%)	40 (19.3)

表 4 CYP4F2 不同基因型分组 INR 和华法林剂量的比较

基因位点	SNP 位点	基因型	<i>n</i> (%)	稳定剂量 mg/d	INR
CYP4F2:V433M	rs2108622	C/C	124(59.90)	2.55 ± 0.91	1.92 ± 0.59
		C/T	74(35.75)	2.60 ± 1.07	1.85 ± 0.69
		T/T	9(4.35)	2.86 ± 0.90	1.73 ± 0.46
<i>P</i>				0.631	0.577

计学影响。*CYP4F2**3(rs2108622)，位于 11 号外显子，单核苷酸 C 突变为 T，造成表达产物中蛋氨酸替代缬氨酸。进一步研究发现 *CYP4F2* 表达产物在肝微粒体中华法林对维生素 K 的氧化还原活性有影响，其中纯合突变的微粒体代谢能力下降 75% 左右，杂合子介于中间^[8]。关于 *CYP4F2**3 参与华法林剂量调整的研究层出不穷，但是各研究结果有差异^[9-10]。Liang 等^[11]的 Meta 分析显示 *CYP4F2**3 对华法林稳定剂量有影响但是不显著，特别是纳入华法林剂量预测公式的意义仍然存疑。

不同人种中，基因的突变率不同，根据 Ross 等^[12]的数据，大洋洲最高 (61.3%)，其次中东 (40.3%)，南亚 (35%)，欧洲 (29.7%)，东亚 (29.2%)，和非洲 (7%)。本研究 207 例患者 *CYP4F2**3 基因位点 T 分布频率 22.2%，且达到遗传平衡。本研究未发现不同基因分型之间的统计学差异，但可以看到，携带 T 突变的患者稳定期华法林剂量有增加的趋势，同时伴

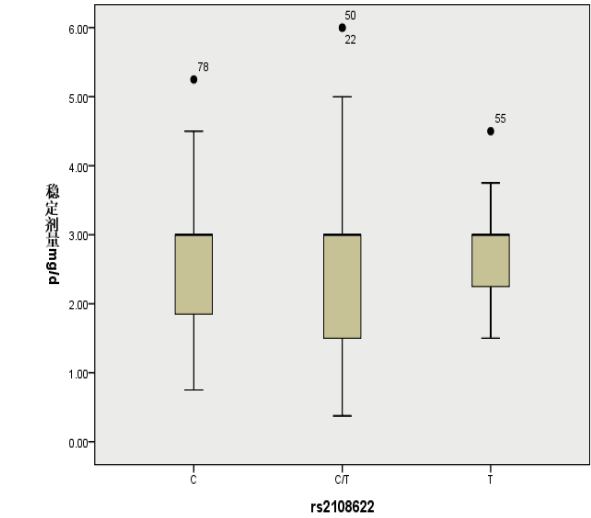


图 3 华法林稳定剂量: rs 2108622 位点箱图

有 INR 有降低的趋势。因此在临床环境中检测 rs2108622 有一定的临床意义，但是临床价值远远弱于 *CYP2C9* 和 *VKORC1* 多态位点。

【参考文献】

[1] Scott AK. Warfarin usage: can safety be improved [J]. Pharmacol Ther, 1989, 42(3):429-457.

[2] Wadelius M, Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges[J]. The Pharmacogenomics J, 2006, 9(19):1-13.

[3] Sconce EA, Khan TI, Wynne HA. 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.

[4] Limdi NA, Wiener H, Goldstein JA, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 on warfarin response during initiation of therapy[J]. Blood Cells Mol Dis, 2009, 43(1):119-128.

[5] Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose[J]. Blood, 2008, 111(8):4106-4112.

[6] 梁欣, 张亚同, 程刚, 等. 基于连接酶反应检测硫唑嘌呤基因多态性及应用 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009,

- 11(12):1281-1285.
- [7] Jin R, Koop DR, Raucy JL, et al. Role of human CYP4F2 in hepatic catabolism of the proinflammatory agent leukotriene B4[J]. Arch Biochem Biophys. 1998, 359(1):89-98.
- [8] McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, et al. CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant[J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(6): 1337-1346
- [9] Borgiani P, Ciccacci C, Forte V, et al. CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population[J]. Pharmacogenomics, 2009, 10(2):261-266.
- [10] Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assunção E, et al. Impact of CYP4F2 rs2108622 on the stable warfarin dose in an admixed patient cohort[J]. Clin Pharmacol Ther, 2010, 87(4):417-420.
- [11] Liang R, Wang C, Zhao H et al. Influence of CYP4F2 genotype on warfarin dose requirement—a systematic review and meta-analysis[J]. Thromb Res, 2012, 130(1):38-44.
- [12] Ross KA, Bigham AW, Edwards M, et al. Worldwide allele frequency distribution of four polymorphisms associated with warfarin dose requirements[J]. J Hum Genet, 2010, 55(9):582-589.

(上接 27 页)

- [14] Gibbs SDJ, Gillmore JD, Sattianayagam PT, et al. CTD versus Mel-Dex as upfront treatment in AL amyloidosis: a matched case-control study[J]. Amyloid, 2010, 17(Suppl 1):51.
- [15] Schechter G. A triple on AL amyloidosis, waiting for a home run[J]. Blood, 2007, 109(2): 391-392.
- [16] Santhorawala V, Finn KT, Fennessey S, et al. Durable haematologic complete responses can be achieved with lenalidomide in AL amyloidosis[J]. Amyloid, 2010, 17(Suppl 1):84.
- [17] Dispenzieri A, Gertz MA, Hayman SR, et al. Pomalidomide and dexamethasone for previously treated AL: a phase 2 study[J]. Amyloid, 2010, 17(Suppl 1): 87.
- [18] Comenzo RL, Hegenbart U, Santhorawala V, et al. High rates of overall and complete haematologic response in a prospective phase 1/2 study of weekly and twice-weekly bortezomib in relapsed AL amyloidosis[J]. Amyloid, 2010, 17(Suppl 1):83.
- [19] Kastritis E, Wechalekar AD, Dimopoulos MA, et al. Bortezomib with or without dexamethasone primary systemic (light chain) amyloidosis[J]. Clin Oncol, 2010, 28(6):1031-1037.
- [20] Landau H, Hassoun H, Bello C, et al. Ajuvant bortezomib and dexamethasone following risk-adapted melphalan and stem cell transplant in systemic AL amyloidosis[J]. Amyloid, 2010, 17(Suppl 1):80.
- [21] Landau H, Hassoun H, Bello C, Hoover E, Riedel ER, Nimer SD, Comenzo RL: Consolidation with bortezomib and dexamethasone following riskadapted melphalan and stem cell transplant in systemic AL amyloidosis[J]. Amyloid, 2011, 18(Suppl 1):130-131.
- [22] Zonder J, Santhorawala V, Snyder R, et al. Rapid haematologic and organ responses in patients with AL amyloid treated with bortezomib plus melphalan and dexamethasone[J]. Amyloid, 2010, 17(Suppl 1):86.
- [23] Bochtler T, Hegenbart U, Cremer FW, et al. Evaluation of the cytogenetic aberration pattern in amyloid light chain amyloidosis as compared with monoclonal gammopathy of undetermined significance reveals common pathways of karyotypic instability[J]. Blood, 2008, 111(9):4700-4705.
- [24] Bryce AH, Ketterling RP, Gertz MA, et al. Translocation t(11;14) and survival of patients with light chain (AL) amyloidosis[J]. Haematologica, 2009, 94(3):380-386

(上接 32 页)

- [18] Huo Y, Qin X, Wang J, et al. Efficacy of Folic Acid Supplementation in Stroke Prevention: New Insight from a Meta-analysis[J]. Int J Clin Pract, 2012, 66 (6):544-551.
- [19] Wang X, Qin X, Demirtas H, et al. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis[J]. Lancet, 2007, 369(9576): 1876-1882.
- [20] Albert CM, Cook NR, Gaziano JM, et al. Effect of folic acid and B vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease: a randomized trial[J]. JAMA, 2008, 299(17):2027-2036.