

• 临床检验研究论著 •

老年患者 *CYP4F2*(rs2108622) 基因多态性对华法林剂量的影响^{*}谭明娟, 崔薇薇, 陈 枫, 梅燕萍, 高应东[△]

(南京医科大学附属南京医院/南京市第一医院检验科, 江苏南京 210006)

摘要:目的 观察 *CYP4F2*(rs2108622) 基因多态性对房颤老年患者(65~75 岁)口服华法林剂量的影响。方法 选择 60 例老年房颤患者, 服用华法林后国际标准化比值(INR)维持在 1.6~2.5 之间 3 个月后, 用 PCR 检测 *CYP4F2*(rs2108622) 基因序列。结果 具有 *CYP4F2*(rs2108622)C/C 等位基因的患者服用华法林的剂量明显低于具有 C/T 和 T/T 变异体等位基因的患者($P<0.05$)。结论 *CYP4F2*(rs2108622) 基因的多态性影响老年患者口服华法林的剂量。

关键词: 华法林; *CYP4F2*; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)11-1400-03

The influence of *CYP4F2*(rs2108622) gene polymorphism on the warfarin dose in old patients^{*}Tan Mingjuan, Cui Weiwei, Chen Feng, Mei Yanping, Gao Yingdong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210006, China)

Abstract: Objective To observe the effect of *CYP4F2*(rs2108622) polymorphism on the dose of warfarin in old patients(65 to 75 years old) who were treated with atrial fibrillation. **Methods** Sixty cases of old patients with atrial fibrillation were enrolled in the study. All the subjects had taken warfarin for 3 months, and the international normalized ratio(INR) maintained between 1.6 and 2.5. And the *CYP4F2*(rs2108622) variant were detected by PCR. **Results** The patients with *CYP4F2*(rs2108622) allele C/C scored significantly lower warfarin dose than patients with variant allele C/T and T/T ($P<0.05$). **Conclusion** *CYP4F2*(rs2108622) gene polymorphism have been related with warfarin dose in old patients.

Key words: warfarin; *CYP4F2*; gene polymorphism

华法林是目前公认的用于预防房颤患者脑卒中, 预防人工瓣膜置换和心肌梗死患者静脉血栓和肺动脉血栓形成, 预防外科矫形术后或者具有动、静脉血栓病史的患者的肺动脉和深静脉血栓形成的一种抗凝药物。虽然华法林用于临床治疗已有 50 多年的历史, 但是由于该药物治疗的安全范围比较小以及个体之间的差异性大, 对于一定剂量的药物在一些患者中能达到较好的疗效, 而在另一些患者中则可能导致出血或者血栓形成。为了避免不良事件的发生, 临床医生通常根据临床经验选择一个起始剂量, 通过多次检测凝血酶原时间(PT)和相应国际标准化比值(INR)逐渐调整药物剂量, 直到 INR 达到满意的治疗范围^[1]。但是由于个体之间对该药物的耐受能力差异较大, 一些患者仍然存在出血的危险^[2]。

近年来研究表明, 华法林的疗效除与患者的年龄、药物间的相互作用、伴随疾病以及维生素 K 的摄入有一定关系外^[3], 主要与个体遗传因素中基因多态性有关^[4]。大量的研究资料均显示 *CYP2C9* 和 *VKORC1* 变异对华法林的剂量有影响, 最近有研究者又发现一个新的细色素 P450 氧化酶 4F2(*CYP4F2*) 基因变异体 rs2108622 在一些个体中影响华法林的剂量。然而一些研究者关于 *CYP4F2*(rs2108622) 基因序列对华法林剂量的影响持有不同的观点^[5-7]。本研究主要观察 *CYP4F2*(rs2108622) 基因多态性对冠状动脉支架介入治疗的老年患者(>60 岁)口服华法林剂量的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究所涉及的患者均来自南京市第一医院

门诊, 年龄 65~75 岁的老年患者(60 例), 所有患者均签署知情同意书。所选择患者的基本情况如下: (1) 房颤患者通过调节口服华法林的剂量使 INR 维持在 1.6~2.5 之间满 3 个月以上; (2) 无其他系统伴随疾病; (3) 在治疗期间避免服用维生素 K、胺碘酮、氟康唑、西咪替丁、复方磺胺甲噁唑、红霉素、甲硝唑、保泰松、水合氯醛、阿司匹林、肝素等影响华法林代谢的药物。记录患者如下信息: 姓名、性别、年龄、体质量、身高; INR 在 1.6~2.5 之间的华法林剂量。

1.2 标本收集

在服药 12 h 内收集每个患者的血标本 3 mL 于枸橼酸钠抗凝管中, 在 2 h 内检测 PT-INR 值。剩余血标本在室温下 4 000 r/min 离心 30 min, 弃上清液留细胞成分于 -80 ℃ 保存, 用于检测 DNA 序列。

1.3 检测 PT-INR 值

血标本 1 500 r/min 离心 15 min, 将血浆分离后用 Sysmex CA-7000(日本)全自动凝血仪检测 PT-INR 值。

1.4 DAN 序列的检测

NaI 提取法抽提 DNA: 取外周抗凝血(全血) 100 μL 于 Eppendorf 管中, 12 000 r/min 离心 12 min, 弃上清液, 加双蒸水 200 μL 溶解, 摇匀 20 s; 混匀后加 6 mol/L NaI 溶液 200 μL, 摇匀 20 s; 加入氯仿/异戊醇(24:1) 400 μL, 边加边摇, 摇匀 20 s, 12 000 r/min 离心 12 min; 取上层液 350 μL, 加入另一新 Eppendorf 管中, 加 0.6 倍体积异丙醇, 摇匀 20 s, 室温放置 15 min, 静置后的反应体系 15 000 r/min 离心 12 min, 使沉淀紧贴 Eppendorf 管壁; 弃异丙醇, 加 70% 乙醇 1 mL(不振动), 以 15 000 r/min 离心 12 min; 弃乙

^{*} 基金项目: 南京医科大学科技发展基金资助项目(2010NJMU063)。 作者简介: 谭明娟, 女, 主管技师, 主要从事临床检验研究。

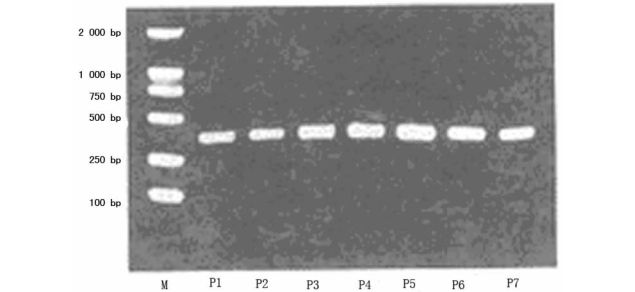
[△] 通讯作者, E-mail: 27303456@qq.com。

醇, 敞开 Eppendorf 管盖, 烘干(37 ℃ 恒温箱)后, 加 1×TE 溶液 30 μL, 溶解 DNA 12 h 以上, 制成的 DNA 液-20 ℃ 冰箱保存备用^[6]。DNA 扩增 PCR 反应体系: 5 μL 10×PCR 扩增缓冲液, 1 μL dTNPs, 2 μL DNA 模板, 2 μL rs2108622 引物, 1 μL Taq DNA 聚合酶, 2 μL rs2108622-R(10 μmol/L), 2 μL rs2108622-F(10 μmol/L), 加 ddH₂O 补足总体积 50 μL。PCR 引物序列: rs2108622-F 5'-CCA GCC TTG GAG AGA CAG AC-3'; rs2108622-R 5'-TGC CAC AGT GCC ACA CTA TT-3'。PCR 反应条件: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 25 s, 59 ℃ 20 s, 72 ℃ 50 s(循环 25 次); 终产物维持在 72 ℃ 10 min, 冷却到 4 ℃, 用 3% 的琼脂糖凝胶, 电压 110 V、电泳 20 min 分析。PCR 产物应用 ABI BigDyeTerminator 测序试剂盒和 ABI 3130xl 基因测序仪进行序列检测。用 BioEdit 7.0.9.0 软件进行序列多态性分析。

1.5 统计学处理 用方差分析进行组间比较, 采用 Bonferro-ni 校正。协方差分析受试者性别、年龄、体质量对药物剂量的影响。应用 SPSS15.0 软件进行数据分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

根据检测的 PT-INR 值选择 65~75 岁之间的门诊老年患者 60 例, PT-INR 值维持在 1.6~2.5 之间 3 个月以上。患者的年龄、性别、体质量、服药剂量以及 PT-INR 值见表 1。PCR 产物的 3% 琼脂糖凝胶电泳图, 见图 1。将患者按照 CYP4F2(rs2108622) 基因型分成 3 组, 33 例患者具有 C/C 等位基因(55%), 19 例患者具有 C/T 基因型(32%), 8 例患者具有 T/T 基因型(13%)。具有 C/T 基因型和 T/T 基因型的患者口服华法林的剂量分别为(3.29±0.62)、(3.34±0.61)mg/d, 二者的剂量之间无统计学差异($P>0.05$), PT-INR 值维持在 2.1±0.2 和 2.0±0.4。而具有 C/C 等位基因的患者口服华法林的剂量为(2.91±0.56)mg/d, 与 C/T 基因型和 T/T 基因型的患者口服华法林的剂量比较差异有统计学意义($P<0.05$), 由图 2 可见, 该组患者的 PT-INR 值维持在 1.9±0.3。在本研究中未发现患者的年龄、性别、体质量对华法林的剂量产生影响。

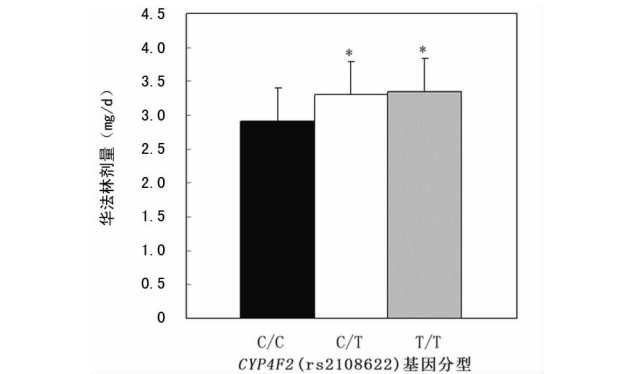


M: DNA 标记物; P1~P7: 样本 PCR 产物。

图 1 PCR 产物的 3% 琼脂糖凝胶电泳图

表 1 根据 CYP4F2(rs2108622) 基因型统计患者信息 ($\bar{x}\pm s$)			
项目	C/C	C/T	T/T
n	33	19	8
性别比(男/女, n)	21/12	13/6	5/3
年龄(岁)	68.5	71.2	70.5
体质量(kg)	61.7±5.3	57.9±6.8	67.1±6.3
药物剂量(mg/d)	2.91±0.56*	3.29±0.62*	3.34±0.61*
PT-INR 值	1.9±0.3	2.1±0.2	2.0±0.4

*: $P<0.05$, 与 C/C 基因型患者比较。



*: $P<0.05$, 与 C/C 基因型患者口服华法林的剂量比较。

图 2 CYP4F2(rs2108622) 基因分型与华法林剂量的关系

3 讨 论

自从 Caldwell 等^[5]报道了 CYP4F2 基因的作用以来, 一些研究表明 CYP4F2 基因变异体影响患者口服华法林的维持量。携带 CYP4F2 等位基因 C/C 的患者对华法林的敏感性明显高于具有 C/T 和 T/T 基因的患者^[7], 并且 CYP4F2 基因型与华法林的维持量有关。在中国汉族人的研究中存在不同的观点, Lee 等^[8]的研究表明 CYP4F2(rs2108622) 基因型对汉族人口服华法林的剂量未产生重要的影响, 而 Cen 等^[9]的研究结果则相反。本研究中的 60 例老年患者中, 有 33 例患者具有 C/C 等位基因(55%), 19 例患者具有 C/T 基因型(32%), 8 例患者具有 T/T 基因型(13%), 携带 C/C 等位基因的患者口服华法林的剂量明显低于携带 C/T 基因型和 T/T 基因型的患者, 表明 CYP4F2(rs2108622) 基因的多态性影响老年患者口服华法林的剂量, 与 Cen 等^[9]在研究心脏瓣膜置换的患者中 CYP4F2(rs2108622) 基因对华法林剂量的影响相一致。在高加索人和亚洲人的研究中均显示 CYP4F2(rs2108622) 基因多态性对口服华法林的剂量有显著影响。在本研究中未发现携带不同 CYP4F2(rs2108622) 基因型患者年龄、性别、体质量对华法林的剂量产生影响, 产生这样的结果可能是由于样本量较小。

有研究表明 CYP2C9 和 VKORC1 变异对稳定的华法林剂量产生很大影响。在 Schalekamp 等^[10]对 281 例白种人的研究中, 设计出了针对年龄、性别、CYP2C9 和 VKORC1(-1173C/T) 的直线回归模型和多元回归风险模型, 认为上述 4 种因素加上 CYP2C9 和 VKORC1 的交叉作用可以解释 54.7% 华法林的个体用药差异。在 Millican 等^[11]通过对 92 例盆骨或膝盖骨置换患者的研究, 设计出了一个华法林初始剂量的公式, 如果患者携带 CYP2C9 * 3 或 CYP2C9 * 2 基因, 每出现 1 对等位基因需要在华法林的初始剂量上减少 38% 或 17%。而患者携带的 VKORC1 基因如果出现 1 个 A 的单倍型, 则在初始剂量上减少 11%。如果目前为吸烟者, 则增加 20% 的剂量。在本研究中未检测 CYP2C9 和 VKORC1 变异对华法林剂量的影响。因此将进一步检测 CYP2C9、VKORC1 和 CYP4F2 基因变异体在口服华法林患者中的分布情况, 以及不同变异体对华法林用药剂量需求的影响。再结合患者的性别、年龄、体质量、吸烟史等因素, 确定这 3 种基因变异体对华法林剂量的影响, 从基因水平上分析影响华法林在个体之间用药需求量存在差异的原因, 为指导华法林临床合理治疗方案的制订和实施提供理论资料。

少的主要原因是 FT4 在血液中的转化 FT3 障碍,而不是甲状腺激素分泌减少所致^[7]。在冠心病心功能不全和急性心肌梗死患者中正常甲状腺内环境平衡发生改变出现甲状腺激素轴低下,表现为 T3 降低,反 T3 升高和 TSH 无变化。冠状动脉病变程度与 FT3 水平呈负相关,却与反 T3 呈正相关^[8]。

本研究表明,在冠心病合并不同糖代谢状态下甲状腺相关激素测定(包括 T3、T4、TSH、T3/T4、FT3、FT4 和 FT3/FT4)结果无明显差异。而且甲状腺激素与血糖水平及胰岛素抵抗无相关性。一方面有研究表明有类似结果:应用放射免疫学方法检测 TSH 浓度在糖尿病患者组与健康对照组差异无统计学意义($P>0.05$)^[9];另一方面,本研究所选的患者病情相对平稳,糖化血红蛋白均在 8%以下,代谢紊乱不严重,没有直接或间接影响到下丘脑垂体甲状腺轴系统的功能。曾荣辉等^[10]研究也发现在 T2DM 患者中随着血糖的有效控制,血糖水平的下降,FT3 水平逐渐恢复正常。目前有关甲状腺激素与胰岛素抵抗间的相关性研究结果不一致。祁瑞环等^[11]研究表明在 IGT 和 T2DM 中检测 FT3 和 FT4 均与 HOMA-IR 呈正相关。较早的研究在甲状腺功能正常的 T2DM 患者中,T3 水平与血糖水平及糖化血红蛋白水平呈负相关^[12]。通过观察稳定型冠心病合并不同糖代谢状态患者的甲状腺激素水平,为糖尿病病情的评估和控制提供一定的临床指导。但是本研究病例数偏少,因此甲状腺激素与胰岛素抵抗的因果关系尚需要进一步推断证实。

参考文献

[1] Roos A,Bakker SJL,Links TP,et al. Thyroid function is associated with components of the metabolic syndrome in euthyroid subjects[J]. J Clin Endocrinol Metab,2007,92(2):491-496.

(上接第 1401 页)

参考文献

[1] Linkins LA,Choi PT,Douketis JD. Clinical impact of bleeding in patients taking oral anticoagulant therapy for venous thromboembolism:a meta-analysis[J]. Ann Intern Med,2003,139(11):893-900.

[2] Higashi MK,Veenstra DL,Kondo LM,et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy[J]. JAMA,2002,287(13):1690-1698.

[3] Loebstein R,Yonath H,Peleg D,et al. Interindividual variability in sensitivity to warfarin-nature or nurture? [J]. Clin Pharmacol Ther,2001,70(2):159-164.

[4] Wadelius M,Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin:current status and future challenges[J]. Pharmacogenomics J,2007,7(2):99-111.

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

[6] 徐兆珍,宋丽婷,郭欣,等. 联合检测抗核抗体和抗双链 DNA 抗体在狼疮性肾炎诊断中的作用[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(3):287-289.

[2] 周淑红,刘文智,张哲梅. 冠心病合并不同糖代谢状态患者血 8-羟基脱氧鸟苷水平与胰岛素抵抗指数和糖化血红蛋白相关性[J]. 内科,2012,7(1):1-3.

[3] 刘文智,周淑红. 胰岛素抵抗和动态血压在 2 型糖尿病肾病中的作用[J]. 中国临床研究,2011,24(1):12-14.

[4] 张美英,秦淑兰,杨雅,等. 2 型糖尿病患者甲状腺功能状态的研究[J]. 南昌大学学报:医学版,2012,52(12):42-43.

[5] 俞利红,朱麒麟. 2 型糖尿病患者糖脂代谢与血清甲状腺激素相关性分析[J]. 中国糖尿病杂志,2012,20(5):363-366.

[6] Ochs N,Auer R,Bauer DC,et al. Meta-analysis:subclinical thyroid dysfunction and the risk for coronary heart disease and mortality[J]. Ann Intern Med,2008,148(11):832-845.

[7] 段立志,尚国爱,吴会玲,等. 2 型糖尿病患者甲状腺激素水平的临床分析[J]. 武警后勤学院学报:医学版,2013,22(2):97-99.

[8] 薛书峰,娄书花,张桂清,等. 不稳定型心绞痛患者甲状腺激素水平与冠状动脉病变的关系[J]. 中国心血管病研究杂志,2005,3(2):122-124.

[9] 唐浩熙,李介华,夏明凯,等. 超敏促甲状腺激素在糖尿病并发心肌梗死中的作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2005,3(4):306-307.

[10] 曾荣辉,李绪娴. 2 型糖尿病患者甲状腺激素临床分析[J]. 广东医学,2010,31(9):1122-1123.

[11] 祁瑞环,黄有媛,聂庆东. 早期 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗与甲状腺激素水平的关系研究[J]. 中国全科医学,2012,15(18):2023-2025.

[12] Schlienger JL,Anceau A,Chabrier G,et al. Effect of diabetic control on the level of circulating thyroid hormones[J]. Diabetologia,1982,22(6):486-488.

(收稿日期:2014-01-11)

[7] Kringen MK,Haug KB,Grimholt JL,et al. Genetic variant of VKORC1 and CYP4F2 genes related to warfarin maintenance dose in patients with myocardial infarction[J]. J Biomed Biotechnol,2011,15:739-751.

[8] Lee SC,Ng SS,Oldenburg J,et al. Interethnic variability of warfarin maintenance requirement is explained by VKORC1 genotype in an Asian population[J]. Clin Pharmacol Ther,2006,79(3):197-205.

[9] Cen HJ,Zeng WT,Leng XY,et al. CYP4F2 rs2108622:a minor significant genetic factor of warfarin dose in Han Chinese patients with mechanical heart valve replacement[J]. Br J Clin Pharmacol,2010,70(2):234-240.

[10] Schalekamp T,Brasse BP,Roijers JFM,et al. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and phenprocoumon anticoagulation status:interaction between both genotypes affects dose requirement[J]. Clin Pharmacol Ther,2007,81(2):185-193.

[11] Millican EA,Lenzini PA,Milligan PE,et al. Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy [J]. Blood,2007,110(5):1511-1515.

(收稿日期:2014-01-09)