

CYP4F2基因多态性对心脏机械瓣膜置换术后患者华法林初始剂量的影响

王莽原^{1,2}, 朱涛², 俞国军², 霍强², 杨毅宁^{3△}

1. 新疆医科大学第一附属医院 临床医学博士后科研流动站(乌鲁木齐 830054);

2. 新疆医科大学第一附属医院 心外科(乌鲁木齐 830054); 3. 新疆医科大学第一附属医院 心内科(乌鲁木齐 830054)

【摘要】目的 研究细胞色素P-450 4F2(CYP4F2)基因多态性对心脏机械瓣膜置换术后患者华法林初始剂量的影响。**方法** 收集2013年1月-2015年12月期间于我院心脏外科接受心脏机械瓣膜置换术后需服用华法林的患者350例,华法林剂量术后初始阶段国际标准化比值(INR) ≥ 2 的患者称为达标组,INR < 2 的患者称为非达标组。留取血样标本检测每位患者的CYP4F2基因型,分析CYP4F2基因多态性对心脏机械瓣膜置换术后华法林初始剂量(心脏机械瓣膜术后5~10 d患者住院期间的平均每日剂量)的影响。**结果** 本研究发现在所有患者人群中,不同CYP4F2基因型患者间华法林的初始剂量差异无统计学意义;但在INR达标组的患者中,CYP4F2 TT基因型患者的华法林初始剂量高于CYP4F2 CC基因型患者[(3.37 $\pm$ 0.68) mg vs. (2.94 $\pm$ 0.74) mg, $P < 0.05$];同基因型患者,INR未达标组CYP4F2 CC[(4.02 $\pm$ 0.58) mg vs. (2.94 $\pm$ 0.74) mg]和CYP4F2 CT基因型[(4.15 $\pm$ 0.88) mg vs. (3.18 $\pm$ 0.82) mg]患者华法林的初始剂量大于INR达标组患者($P < 0.05$)。纳入性别,年龄,体质指数(BMI),合并疾病(高血压,糖尿病,冠心病,房颤),细胞色素P-450 2C9(CYP2C9)、CYP4F2和维生素K过氧化物还原酶复合体1(VKORC1)基因多态性以及INR达标与否等因素进行多元线性回归分析,回归方程为:华法林初始剂量(mg)=-8.634+0.352 $\times$ BMI(kg/m²)+1.102 $\times$ CYP4F2基因型(CC或CT取值1,TT取值2)+2.147 $\times$ VKORC1(AA或AG取值1,GG取值2)+1.325 $\times$ INR(达标取值0,不达标取值1),回归方程的决定系数 $R^2=0.431$ ($P < 0.05$)。**结论** CYP4F2基因多态性对心脏机械瓣膜置换术后患者的华法林初始剂量有影响,同时该作用也受机体特征和其他因素的影响。

【关键词】 华法林 CYP4F2 基因多态性 心脏瓣膜置换

The Effect of CYP4F2 Polymorphism on Initial Warfarin Dose in Patients with Heart Valve Replacement WANG Mang-yuan^{1,2}, ZHU Tao², YU GUO-jun², HUO Qiang², YANG Yi-ning^{3△}. 1. Clinical Medicine Postdoctoral Research Station, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Department of Cardiac Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 3. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

△ Corresponding author, E-mail: yangyn5126@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect of cytochrome P-450 4F2 (CYP4F2) gene polymorphism on the initial dose of warfarin in patients after mechanical heart valve replacement. **Methods** We collected 350 patients receiving warfarin after mechanical heart valve replacement from January 2013 to December 2015 in our hospital. According to the international standardized ratio (INR) ≥ 2 at the initial stage after surgery, the patients were divided into two groups: INR ≥ 2 group and INR < 2 group. We selected the blood samples of all the 350 patients with testing the CYP4F2 gene type of each patient, and analyzed the effect of CYP4F2 gene polymorphism on the initial dose of warfarin after mechanical heart valve replacement (the average daily dose during hospitalization of patients 5-10 days after mechanical heart valve replacement). **Results** There was no statistical significance in the initial dose of warfarin among patients with different CYP4F2 genotypes. However, warfarin dose was higher in CYP4F2 TT genotype than in CYP4F2 CC carriers ((3.37 $\pm$ 0.68) mg vs. (2.94 $\pm$ 0.74) mg, $P < 0.05$) in INR ≥ 2 group; In patients with the same genotype, the initial dose of warfarin in the CYP4F2 CC ((4.02 $\pm$ 0.58) mg vs. (2.94 $\pm$ 0.74) mg) and CYP4F2 CT genotypes ((4.15 $\pm$ 0.88) mg vs. (3.18 $\pm$ 0.82) mg) of INR < 2 group was higher than that in INR ≥ 2 group ($P < 0.05$). Gender, age, body mass index (BMI), comorbidities (hypertension, diabetes mellitus, coronary heart disease, atrial fibrillation), cytopigment P-450 2C9 (CYP2C9), CYP4F2 and vitamin K peroxide-reductase complex 1 (VKORC1) gene polymorphism and INR compliance were included in multiple linear regression analysis. The regression equation was as follows: warfarin initial dose (mg)=-8.634+0.352 $\times$ BMI (kg/m²)+1.102 $\times$ CYP4F2 genotype (CC or CT values 1, TT values 2)+2.147 $\times$ VKORC1 (AA or AG values 1, GG values 2)+1.325 $\times$ INR (INR ≥ 2 values 0, INR < 2 values 1). The coefficient of determination (R^2) of regression equation was 0.431 ($P < 0.05$). **Conclusion** CYP4F2 gene polymorphism may affect the initial dose of warfarin in patients after heart valve

replacement, and this effect is also affected by body characteristics and other factors.

【Key words】 Warfarin CYP4F2 Gene polymorphism Heart valve replacement

华法林是一种口服抗凝药,因其便宜有效而在临床广泛应用,其通过作用于维生素K(vitamin K, VK)过氧化物还原酶复合体1(VKORC1)影响机体VK的水平,从而影响VK依赖的凝血因子进而发挥抗凝作用。尽管目前新型口服抗凝药在临床上发挥着越来越重要的作用,但华法林在心脏机械瓣膜置换患者术后的抗凝地位依然难以被替代。既往研究显示,患者的人口学特征[如年龄、体质量指数(BMI)]、疾病状态(如糖尿病、心功能不全)、饮食习惯(高VK饮食)、用药(如胺碘酮、他汀)等多种情况能显著影响华法林的治疗剂量和抗凝效果^[1-4]。此外,基因组学研究发现, VKORC1 和华法林的代谢酶细胞色素P-450 2C9(CYP2C9)以及VK的代谢酶细胞色素P-450 4F2(CYP4F2)的基因多态性亦能显著影响华法林的剂量^[4-7]。通常临床上将华法林剂量分为应用初始阶段国际标准化比值(INR)未达到稳态的初始剂量和目标INR达到稳态后的稳定剂量。目前有关CYP4F2基因多态性对华法林剂量的影响主要集中在稳定剂量,而有关其对华法林初始剂量影响的研究较少,故本研究拟分析CYP4F2基因多态性对心脏机械瓣膜置换术后患者华法林初始剂量的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集2013年1月-2015年12月期间于我院心脏外科接受心脏机械瓣膜置换术的患者,入选患者年龄大于18岁小于70岁。排除标准:严重的肝肾功能异常、严重的心功能不全、术后出现可疑感染、INR>4.0和华法林应用小于3 d以及个人信息不完善。本研究定义华法林初始剂量为心脏机械瓣膜术后5~10 d患者住院期间的平均每日剂量。INR的治疗目标为2.0~3.0,术后初始阶段INR≥2的患者称为达标组,INR<2的患者称为非达标组。记录每位患者的性别、年龄、身高、BMI、合并疾病以及主要用药情况等。本研究经由我院伦理委员会批准(伦理批号为:K201906-13)。

1.2 基因检测

所有入选患者利用EDTA抗凝管留取血样4 mL保存于低温冰箱备用。根据试剂说明书利用TIANamp Genomic DNA Kit(Tiangen Biotech, Beijing, China)提取患者DNA样品。利用Taqman SNP Genotyping assay(C₁₆₁₇₉ 493_40, Applied Biosystems)在ABI 7500 Real Time-Polymerase chain reaction(RT-PCR)System(Applied

Biosystems)上检测CYP4F2的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)。10 μL PCR反应体系: 95 ℃ 2 min, (95 ℃ 15 s, 60 ℃ 30 s, 68 ℃ 30 s)×30 cycles, 68 ℃ 10 min, 4 ℃ forever。除此之外,我们还检测了所有患者的CYP2C9(rs1799853, rs1057910)和VKORC1-1639(rs9923231)的基因型,方法同上(PCR反应条件除退火温度外均相同),具体引物(引物合成公司为Thermo Fisher Scientific)和退火温度参考表1。

表 1 引物序列信息
Table 1 Information of primer sequences

Gene type	Primer sequence	Annealing temperature
VKORC1-1639 (rs9923231)	F: GTGTCACCAAGACGCTAGAC	57 ℃
	R: GTGAGAAACAGCATCTGGAG	
CYP2C9*2 (rs1799853)	F: ATGGATATGAAGCAGTGAAGG	56 ℃
	R: ATGAGCTAACACCAGGACT	
CYP2C9*3 (rs1057910)	F: TTTCTGGTTGTTTGTGGAC	56 ℃
	R: ACATGGAGTTGCAGTGTAGG	
CYP4F2 (rs2108622)	F: CCGTCCCCACCTCAGACAC	60 ℃
	R: GGTCATCTCCCGCCATGT	

CYP2C9: Cytochrome P-450 2C9; VKORC1: Vitamin K epoxide reductase complex1; CYP4F2: Cytochrome P-450 4F2.

1.3 统计学方法

所有数据用例数(%)或 $\bar{x} \pm s$ 表示。利用Chi-squared goodness of fit test检测CYP4F2基因的Hardy-Weinberg平衡。利用Fisher确切概率法、t检验比较患者基线特征。利用one way ANOVA或t检验比较不同CYP4F2基因型患者华法林初始剂量的差异;利用多元线性回归模型分析影响华法林初始剂量的影响因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

本研究共入选350例患者;其中男性162人(46.3%),女性188人(53.7%),平均年龄(53.01±13.46)岁;BMI(23.90±3.56) kg/m²;携带CYP2C9*1*1基因型的患者308例(88.0%),携带CYP2C9*1*2或*1*3基因型的患者33例(9.4%),携带CYP2C9*2*3或*3*3基因型的患者9例(9.4%);携带VKORC1 GG基因型的患者4例(1.1%),携带VKORC1 GA基因型的患者70例(20.0%),携带VKORC1 AA基因型的患者276例(78.9%);携带CYP4F2 CC基因型

的患者 194 例 (55.4%), 携带 CYP4F2 CT 基因型的患者 125 例 (35.7%), 携带 CYP4F2 TT 基因型的患者 31 例 (8.9%); 其中二尖瓣置换 207 例 (59.1%), 主动脉瓣置换 143 例 (40.9%); 合并高血压 174 例 (49.7%)、冠心病 116 例 (33.1%)、糖尿病 42 例 (12.0%)、房颤 78 例 (22.3%)。本研究中, CYP4F2 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P>0.05$)。不同 CYP4F2 基因型患者基线资料差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

2.2 CYP4F2 基因多态性对华法林初始剂量的影响

如图 1 所示, 在本研究所有患者群体中, CYP4F2 CC、CYP4F2 CT 和 CYP4F2 TT 基因型患者的华法林初始剂量分别为 (3.18 ± 0.88) mg、 (3.38 ± 1.00) mg 和 (3.47 ± 0.74) mg, 差异无统计学意义。在 INR 达标组, CYP4F2 CC、CYP4F2 CT 和 CYP4F2 TT 基因型患者的华法林初始剂量分别为 (2.94 ± 0.74) mg、 (3.18 ± 0.82) mg 和 $(3.37\pm$

$0.68)$ mg, CYP4F2 TT 基因型患者的华法林初始剂量高于 CYP4F2 CC 基因型患者 ($P<0.05$)。在 INR 未达标组, CYP4F2 CC、CYP4F2 CT 和 CYP4F2 TT 基因型患者的华法林初始剂量分别为 (4.02 ± 0.58) mg、 (4.15 ± 0.88) mg 和 (3.87 ± 0.72) mg, 组间差异无统计学意义。同基因型患者相比较, 未达标组 CYP4F2 CC 和 CYP4F2 CT 基因型患者华法林的初始剂量大于 INR 达标组患者 ($P<0.05$)。

2.3 影响华法林初始剂量的多因素分析结果

纳入性别, 年龄, BMI, 合并疾病 (高血压、糖尿病、冠心病、房颤), CYP2C9、CYP4F2 和 VKORC1 基因多态性以及 INR 达标与否等因素进行多元线性回归分析, 回归方程为: 华法林剂量 (mg) = $-8.634+0.352\times\text{BMI}(\text{kg}/\text{m}^2)+1.102\times\text{CYP4F2 基因型}(\text{CC 或 CT 取值 } 1, \text{TT 取值 } 2)+2.147\times\text{VKORC1}(\text{AA 或 AG 取值 } 1, \text{GG 取值 } 2)+1.325\times\text{INR}(\text{达标取值 } 0, \text{不达标取值 } 1)$, 回归方程的决定系数

表 2 不同 CYP4F2 基因型患者基线资料的比较

Table 2 Baseline characteristics of patients in different CYP4F2 genotypes

Variable	CYP4F2 CC (n=194)	CYP4F2 CT (n=125)	CYP4F2 TT (n=31)	P
Male/case (%)	96 (49.5)	51 (40.8)	15 (48.4)	0.577
Age/yr.	52.94±12.70	53.52±13.77	51.38±17.03	0.740
Height/cm	164.10±8.21	164.87±7.92	163.31±8.18	0.566
Body mass/kg	64.94±12.25	65.07±11.63	62.21±11.59	0.488
BMI/(kg/m ²)	24.02±3.60	23.86±3.48	23.25±3.63	0.558
MVR/case (%)	114 (58.8)	71 (56.8)	22 (71.0)	0.379
AVR/case (%)	80 (41.2)	54 (43.2)	9 (29.0)	0.672
Hypertension/case (%)	101 (52.1)	62 (49.6)	11 (35.5)	0.427
CHD/case (%)	63 (32.5)	45 (36.0)	8 (25.8)	0.671
Diabetes mellitus/case (%)	26 (13.4)	14 (11.2)	2 (6.5)	0.213
Atrial fibrillation/case (%)	49 (25.3)	24 (19.2)	5 (16.1)	0.332

CYP2C9: Cytochrome P-450 2C9; VKORC1: Vitamin K epoxide reductase complex 1; CYP4F2: Cytochrome P-450 4F2; BMI: Body mass index; MVR: Mitral valve replacement; AVR: Aortic valve replacement; CHD: Coronary heart disease.

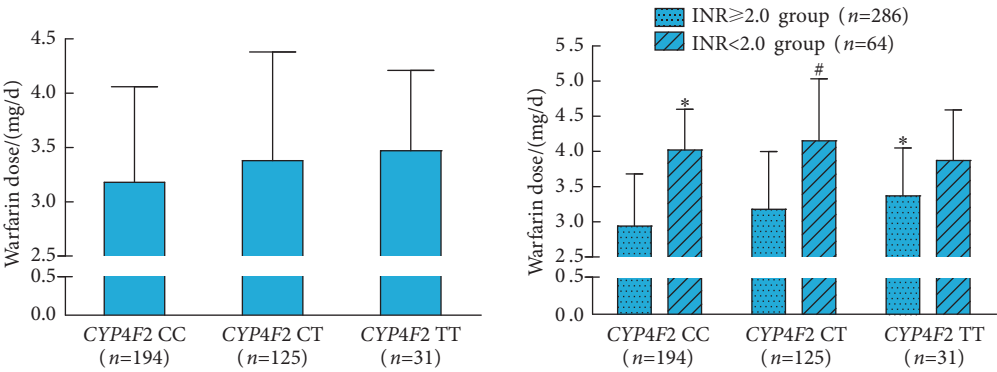


图 1 CYP4F2 基因多态性对华法林初始剂量的影响

Fig 1 The effect of CYP4F2 polymorphism on initial warfarin dose

INR: International normalized ratio. * $P<0.05$, vs. CYP4F2 CC of INR ≥ 2 group; # $P<0.05$, vs. CYP4F2 CT of INR ≥ 2 group.

$R^2 = 0.431 (P < 0.05)$ 。本研究发现影响华法林初始剂量的因素有CYP4F2和VKORC1基因多态性、INR达标与否和BMI, 上述4个变量可以解释约43.1%的华法林初始剂量的个体差异。

3 讨论

本研究中我们系统分析了CYP4F2基因多态性对心脏机械瓣膜置换术后患者华法林初始剂量的影响, 结果提示, 在华法林治疗的初始阶段, CYP4F2基因多态性对华法林的初始剂量有影响。

CYP4F2是一种VK代谢酶, 其基因变异可引起VK的氧化酶活性减低, 从而导致机体VK水平升高, 进一步引起VK依赖的凝血因子水平升高, 从而需要更高的华法林剂量来达到抗凝的目标^[8-9]。众多研究显示其多态性能影响华法林的稳定剂量^[10-14]。由于华法林的安全窗口小和出血风险高以及患者个体差异大, 华法林应用初始阶段的剂量调整非常复杂, 华法林应用的个体化指导一直是临床努力的方向。华法林应用的初始阶段普遍指华法林开始应用后INR未能稳定的一段时间, 大多研究选取华法林应用起始的1~2周^[15-20], 该时间段是华法林应用和调整的关键阶段, 也是INR达标的关键时间点。本研究根据患者心脏机械瓣膜置换术后不同患者华法林的应用和住院情况选取术后5~10 d为华法林应用的初始阶段。

本研究结果显示, 在华法林应用初始阶段的整体患者人群中, CYP4F2不同基因型间华法林初始剂量差异并无统计学意义。而考虑到本研究患者人群在术后住院观察期间INR并不能完全达标的情况, 我们对不同INR反应的人群进行了分层分析。结果发现, 对于INR达标的患者来说, CYP4F2基因多态性能够影响华法林的初始剂量, 该结果倾向于支持CYP4F2基因多态性影响华法林稳定剂量的研究^[11-14], 即在INR达标甚至稳定后CYP4F2基因多态性能显著影响华法林的剂量。该结果也支持理论上CYP4F2基因变异影响华法林的机制, 即CYP4F2 TT基因型患者需要更大剂量的华法林才能达到INR的治疗目标。而对于INR不能达标的患者, 我们发现CYP4F2基因多态性对华法林初始剂量的影响则并不明显, 该结果提示, 针对INR不能达标的患者, CYP4F2基因多态性可能并不能影响其华法林的初始剂量。但我们还发现, 在华法林治疗的初始阶段, 与INR达标的患者相比, INR未达标的患者使用了更高剂量的华法林。该现象提示可能有一些重要的未知因素影响着INR未达标患者的华法林初始剂量, 也可能是本研究整体上未能发现CYP4F2基因多态性影响华法林初始剂量的重要原因。这也和部分研究结

果相似, 比如, VKORC1基因多态性对华法林稳定剂量的影响显著大于CYP4F2和CYP2C9基因多态性因素^[4-5, 7], 鉴于INR的不达标和华法林剂量未能稳定, 其可能掩盖了CYP4F2基因多态性对华法林初始剂量的影响。

本研究中, 我们进一步行多元线性回归, 分析了CYP4F2基因多态性对华法林初始剂量的影响, 结果显示CYP4F2和VKORC1基因多态性、INR达标与否和BMI均能影响华法林的初始剂量。该现象进一步表明, CYP4F2基因多态性对华法林初始剂量的影响也受到其他个体因素或基因多态性的影响。根据本研究中多因素回归分析结果和此前的研究结果分析, VKORC1基因多态性、BMI等因素可能是这些未知因素的重要组成部分。因此, 关于华法林的个体化治疗, 仍需要更多的研究来加以补充和指导。

综上, CYP4F2基因多态性可影响心脏机械瓣膜置换术后患者华法林的初始剂量, 而这一作用也受到其他机体特征和基因多态性以及疾病因素的影响。因此, 在华法林个体化治疗的过程中, 我们在考虑CYP4F2基因多态性影响的同时还应考虑到患者个体因素和其他潜在因素的影响。

参 考 文 献

- [1] GREENBLATT D J, VON MOLTKE L L. Interaction of warfarin with drugs, natural substances, and foods. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(2): 127-132.
- [2] DEMIRKAN K, STEPHENS M A, NEWMAN K P, *et al.* Response to warfarin and other oral anticoagulants: effects of disease states. *South Med J*, 2000, 93(5): 448-454.
- [3] KHAN T, WYNNE H, WOOD P, *et al.* Dietary vitamin K influences intra-individual variability in anticoagulant response to warfarin. *Br J Haematol*, 2004, 124(3): 348-354.
- [4] BISS T T, AVERY P J, BRANDÃO L R, *et al.* VKORC1 and CYP2C9 genotype and patient characteristics explain a large proportion of the variability in warfarin dose requirement among children. *Blood*, 2012, 119(3): 868-873.
- [5] SUN X, YU W Y, MA W L, *et al.* Impact of the CYP4F2 gene polymorphisms on the warfarin maintenance dose: a systematic review and meta-analysis. *Biomed Rep*, 2016, 4(4): 498-506.
- [6] ZHONG S L, LIU Y, YU X Y, *et al.* The influence of genetic polymorphisms and interacting drugs on initial response to warfarin in Chinese patients with heart valve replacement. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011, 67(6): 581-590.
- [7] GAGE B F, BASS A R, LIN H, *et al.* Effect of genotype-guided warfarin dosing on clinical events and anticoagulation control among patients undergoing hip or knee arthroplasty: the GIFT randomized clinical trial. *JAMA*, 2017, 318(12): 1115-1124.

- [8] MCDONALD M G, RIEDER M J, NAKANO M, *et al.* CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: an explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(6): 1337–1346.
- [9] CALDWELL M D, AWAD T, JOHNSON J A, *et al.* CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood*, 2008, 111(8): 4106–4112.
- [10] BORGIANI P, CICCACCI C, FORTE V, *et al.* CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population. *Pharmacogenomics*, 2009, 10(2): 261–266.
- [11] TAKEUCHI M, KOBAYASHI T, BISS T, *et al.* CYP2C9, VKORC1, and CYP4F2 polymorphisms and pediatric warfarin maintenance dose: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenom J*, 2020, 20(2): 306–319.
- [12] LEE K E, CHANG B C, KIM H O, *et al.* Effects of CYP4F2 gene polymorphisms on warfarin clearance and sensitivity in Korean patients with mechanical cardiac valves. *Ther Drug Monit*, 2012, 34(3): 275–282.
- [13] SINGH O, SANDANARAJ E, SUBRAMANIAN K, *et al.* Influence of CYP4F2 rs2108622 (V433M) on warfarin dose requirement in Asian patients. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 26(2): 130–136.
- [14] NAKAMURA K, OBAYASHI K, ARAKI T, *et al.* CYP4F2 gene polymorphism as a contributor to warfarin maintenance dose in Japanese subjects. *J Clin Pharm Ther*, 2012, 37(4): 481–485.
- [15] BURMESTER J K, BERG R L, YALE S H, *et al.* A randomized controlled trial of genotype-based Coumadin initiation. *Genet Med*, 2011, 13(6): 509–518.
- [16] WALLACE J L, REAVES A B, TOLLEY E A, *et al.* Comparison of initial warfarin response in obese patients versus non-obese patients. *J Thromb Thrombolysis*, 2013, 36(1): 96–101.
- [17] JOHNSON J A, CAUDLE K E, GONG L, *et al.* Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guideline for pharmacogenetics-guided warfarin dosing: 2017 update. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 102(3): 397–404.
- [18] HORNE B D, LENZINI P A, WADELIUS M, *et al.* Pharmacogenetic warfarin dose refinements remain significantly influenced by genetic factors after one week of therapy. *Thromb Haemost*, 2012, 107(2): 232–240.
- [19] 姜莹, 谢爽, 刘红, 等. CYP2C9 基因多态性对中国心脏机械瓣置换患者华法林初始抗凝效果的影响. *中国临床药理学杂志*, 2013, 29(1): 3–5.
- [20] ZHANG J E, JORGENSEN A L, ALFIREVIC A, *et al.* Effects of CYP4F2 genetic polymorphisms and haplotypes on clinical outcomes in patients initiated on warfarin therapy. *Pharmacogenet Genomics*, 2009, 19(10): 781–789.

(2020 – 12 – 16 收稿, 2021 – 01 – 10 修回)

编辑 余琳