DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.03.008

氯吡格雷对大鼠肝药物酶 CYP3A4 和 CYP1A2 表达的影响 *

王 艳[1] 刘明远[2] 杨光远[1△] 王立波[1] 李 娟[1] 高伟勤[1] 董天崴[1]

(1 佳木斯大学附属第一医院循环一科 黑龙江 佳木斯 154003;2 佳木斯大学基础医学院药理教研室 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要 目的:氯吡格雷主要由 CYP3A4 催化使其激活,CYP1A2 也参与氯吡格雷活化。关于氯吡格雷对肝微粒体酶的影响国内外文献报道不多,因此本实验通过检测肝细胞色素氧化酶 CYP3A4 和 CYP1A2 的表达,探讨氯吡格雷对大鼠肝药物酶的影响。**方法:**生理盐水为对照组,氯吡格雷设高、中、低三个剂量组(27,13.5,6.75mg/kg/d),雄性健康大鼠连续灌胃给药 7 天,脱白处死,取肝组织,通过 western blot 法检测大鼠肝脏 CYP3A4 和 CYP1A2 蛋白表达情况。**结果:**1)、氯吡格雷抑制大鼠 CYP3A4 蛋白表达,氯吡格雷高中低剂量组分别比生理盐水组大鼠 CYP3A4 蛋白表达量降低(P<0.05);氯吡格雷低中高剂量组间进行比较,大鼠 CYP3A4 蛋白表达量呈梯度减少(P<0.05);2)、氯吡格雷抑制大鼠 CYP1A2 蛋白表达,氯吡格雷高中低剂量组分别比生理盐水组大鼠 CYP1A2 蛋白表达量降低(P<0.05),氯吡格雷低中高剂量组间进行比较,大鼠 CYP1A2 蛋白表达量呈梯度减少(P<0.05)。**结论:**氯吡格雷使肝细胞色素氧化酶 CYP3A4 和 CYP1A2 的表达量减少,因此氯吡格雷高、中、低 3 个剂量组均不同程度的抑制大鼠肝脏 CYP3A4 和 CYP1A2 的表达,提示当氯吡格雷与某些主要经 CYP3A4 和 CYP1A2 代谢的药物合用时,发生代谢性相关作用的可能性大。

关键词:氯吡格雷;CYP3A4;CYP1A2;抑制

中图分类号:Q95-3,Q593.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)03-429-04

Effects of Clopidogrel on Cytochrome Oxidase Enzyme CYP3A4 and CYP1A2 of Rat Liver*

WANG Yan[1], LIU Ming-yuan[2], YANG Guang-yuan[1△], WANG Li-bo[1], LI Juan[1], GAO Wei-qin[1], DONG Tian-wei[1]

(1 Department of Cardiology, first affiliated hospital of Jiamusi university, Jiamusi, Heilongjiang, 154003, China;

2 Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, jiamusi university, Jiamusi, Heilongjiang, 154007, China)

ABSTRACT Objective: Clopidogrel is metabolically activated by CYP3A4 including CYP1A2, the effects of clopidogrel on cytochrome p450 enzymes of rat liver was investigated by detecting the expression of cytochrome oxidase enzyme CYP3A4 and CYP1A2. **Methods:** 30 male rats were randomly divided into 5 groups. taking normal sodium as control group, 3 groups rats were given 27, 13.5, 6.75 mg/kg/d clopidogre for 7 days respectively, to detect the expression of CYP3A4 and CYP1A2 by Western blot **Results:** 1. Clopidogrel inhibited the expression of CYP3A4. Compared with normal saline group, expression of CYP3A4 were decreased in 5 group.(P<0.05); Among the three groups, expression of CYP3A4 were gradiently decreased (P<0.05). 2. Clopidogrel inhibited the expression of CYP1A2. Compared with normal saline group, expression of CYP1A2 were decreased in 5 group.(P<0.05); Among the three groups, expression of CYP3A4 were gradiently decreased (P<0.05). **Conclusion:** Clopidogrel made expression of CYP3A4 decrease, so clopidogrel inhibited the expression of CYP3A4 and CYP1A2 in three group. when clopidogrel be used in combination with drug via CYP1A2 and CYP3A4 metabolism, The probability of a metabolic interaction occurring is big.

Key words: Clopidogrel; CYP3A4; CYP1A2; Inhibition

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q593.1 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2014)03-429-04

前言

细胞色素 P450(cytochrome P450,CYP450)是由许多同工酶组成的超大家族,主要位于肝微粒体中,参与生物体许多内源性和外源性物质的生物转化,在调节机体与外界环境的相互作用以及保持机体内环境稳定中起重要作用[1]。氯吡格雷是目前临床上常用的抗血小板药物,它属噻吩吡啶类衍生物,是一种没有活性的前体药物。通过肝细胞色素氧化酶 P450 转化为有活性的产物方能起作用。氯吡格雷主要由 CYP3A4 催化使其激活,CYP1A2、CYP2C6、CYP2C9 及 CYP2C1 也参与氯吡格雷活化。Lau 等[2,3] 继续研究发现,健康人服用氯吡格雷后,血小板聚集率与 CYP3A4 活性成反比,这与基因多态性相关,Angiolil-

* 基金项目:黑龙江省教育厅面上项目资助(12511571)

作者简介:王艳,女,硕士研究生,主要研究方向:冠心病的基础与临床研究,电话:15164512136,E-mail:yezi4422@126.com

△通讯作者:杨光远,E-mail:ygy665@126.com

(收稿日期:2013-05-23 接受日期:2013-06-18)

lo 等[4]报道,CYP3A4 IVS10 +12G>A 多态性,减弱了氯吡格雷抗血小板作用。亚洲人群研究发现[5,6],CYP2C19*2 或 *3 突变携带者,体内氯吡格雷前体药物,高于野生纯合子个体,代谢产物量低于野生纯合子,并且代谢产物的多少与血小板活性抑制率成正比,*2 和 *3 等位基因伴随着较低的血小板抑制率。同时与 CYP450 酶的活化程度相关。LAU 等[7]发现 CYP3A4 诱导剂增加了 CYP3A4 对氯吡格雷的代谢,使氯吡格雷抑制血小板聚集作用增强。本实验主要通过免疫印迹的方法研究氯吡格雷对肝药物酶 CYP3A4 和 CYP1A2 表达的影响，提示 CYP3A4 和 CYP1A2 参与氯吡格雷的代谢,本文的主旨是进一步研究和探讨氯吡格雷对肝药物酶 CYP450 的作用和机制,为临床上安全联合用药,减少由于药物的相互作用产生的不良反应提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Wistar,大鼠清洁级,雄性,180～250 g(购于佳木斯大学实验动物中心)

1.1.2 试剂 氯吡格雷

购自国家食品药品检定研究院;

CYP1A2(D1tkt5)、CYP3A(L-14)购自美国 SANTA CRUZ;

辣根酶标记兔抗山羊 lgG 购自北京中杉金桥;

PMouse Anti-β -Actin 和 Goat Anti-Mouse lgG 购自武汉 Boster;

Tris-base、SDS、Glycine、Albumin Bovine V、AP、丙烯酰胺、亚甲双丙烯酰胺购自美国 Amresco;

PMSF、RIPA、5× SDS 上样 buffer 购自碧云天。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药 取 30 只健康 Wistar 大鼠,雄性,按随机分组原则分为 5 组每组 6 只。对照组生理盐水组、氯吡格雷高剂量组(27 mg/kg/d)、氯吡格雷中剂量组(13.5 mg/kg/d)、氯吡格雷低剂量组(6.75 mg/kg/d)、苯巴比妥诱导组(75 mg/kg/d)、各药物组按上述剂量连续灌胃给药 7 d，禁食 24 h 后脱臼处死大鼠,取大鼠肝脏,称重后 -80 ℃保存。

1.2.2 制备样品:

(1)分别从 -80 ℃的冰箱中取各组样本 100mg,把组织剪碎。

(2)与 RIPA 裂解液混匀,并在组织匀浆前数分钟内加入 PMSF。

(3)使 PMSF 与组织、RIPA 混合均匀,按照 100∶10∶1 的比例添加 RIPA、组织和 PMSF 。

(4)用玻璃匀浆器在冰上进行研磨,充分裂解后,离心取上清备用。

(5)然后用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量,按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B (50∶1) 配制适量 BCA 工作液,充分混匀。

(6) 各孔加入 200 μLBCA 工作液,37 ℃的恒温箱中放置 30 分钟。

(7)根据标准曲线计算出蛋白浓度。

1.2.3 Western blot 检测 CYP3A 和 CYP1A 蛋白表达

(1) 取等量总蛋白上样于 10 % SDS- 聚丙烯酰胺凝胶中泳,80 V、30 min 和 120 V、90 min 。

(2)后经 270 mA ,110 min 将蛋白从凝胶上转印到经甲醇激活的 PVDF 膜上。

(3)用 1× TBST 洗 3 次,每次 5 min。后用 1× TBST 配制 5% 脱脂奶粉封闭液，将转印后的膜浸入其中，室温静置 60 min。

(4)加入用封闭液稀释的一抗(CYP3A4、CYP1A2 羊抗血清 1∶500,β-actin 鼠抗血清为内参照,1∶1000) 严封杂交袋,在 4℃下孵育过夜后。

(5)剪开杂交袋,取出滤膜,用 1 × TBST 洗 3 次,每次 10 min。

(6)加入用封闭液稀释的二抗辣根过氧化物酶标记的抗羊 IgG(1∶5000),严封杂交袋,在 37 ℃下作用 1 h,去除二抗,1× TBST 浸洗 3 次,每次 10 min。

(7)ECL 试剂 A 和 ECL 试剂 B 按 1∶1 比例配制进行显影,检测蛋白在细胞内的表达效果。

(8)凝胶成像系统来分析蛋白样品的灰度值与 β-actin 灰度值的比值。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 统计分析软件进行数据处理，采用独立样本 t 检验对数据进行比较,P<0.05 具有统计学意义。

2 结果

氯吡格雷对大鼠 CYP3A4 蛋白表达的影响:氯吡格雷抑制大鼠 CYP3A4 蛋白表达,氯吡格雷高中低剂量组分别比生理盐水组大鼠 CYP3A4 蛋白表达量降低,90.6%,62.5%,32.8%(P<0.05);氯吡格雷各剂量组间进行比较，中剂量组与低剂量组之间比较,中剂量组比低剂量组大鼠 CYP3A4 蛋白的表达减少 44.2%(P<0.05);高剂量组与低剂量组之间比较,高剂量组比低剂量组大鼠 CYP3A4 蛋白的表达减少 86 %(P<0.05)；高剂量组与中剂量组之间比较,高剂量组比中剂量组大鼠 CYP3A4 蛋白的表达减少 75 %(P<0.05)；苯巴比妥组与生理盐水比较，大鼠 CYP3A4 蛋白的表达升高(P<0.05),有统计学意义。

氯吡格雷对大鼠 CYP1A2 蛋白表达的影响:氯吡格雷抑制大鼠 CYP1A2 蛋白表达,氯吡格雷高中低剂量组分别比生理盐水组大鼠 CYP1A2 蛋白表达量降低,77.2%,57.9%,32.4%(P<0.05);氯吡格雷各剂量组间进行比较，中剂量组与低剂量组之间比较,中剂量组比低剂量组大鼠 CYP1A2 蛋白的表达减少 60.6%(P<0.05);高剂量组与低剂量组之间比较,高剂量组比低剂量组大鼠 CYP1A2 蛋白的表达减少 68.4 %(P<0.05);高剂量组与中剂量组之间比较,高剂量组比中剂量组大鼠 CYP1A2 蛋白的表达减少 45.9 %(P<0.05);苯巴比妥组与生理盐水比较,大鼠 CYP1A2 蛋白的表达升高(P<0.05),有统计学意义。结果见图 1。

3 讨论

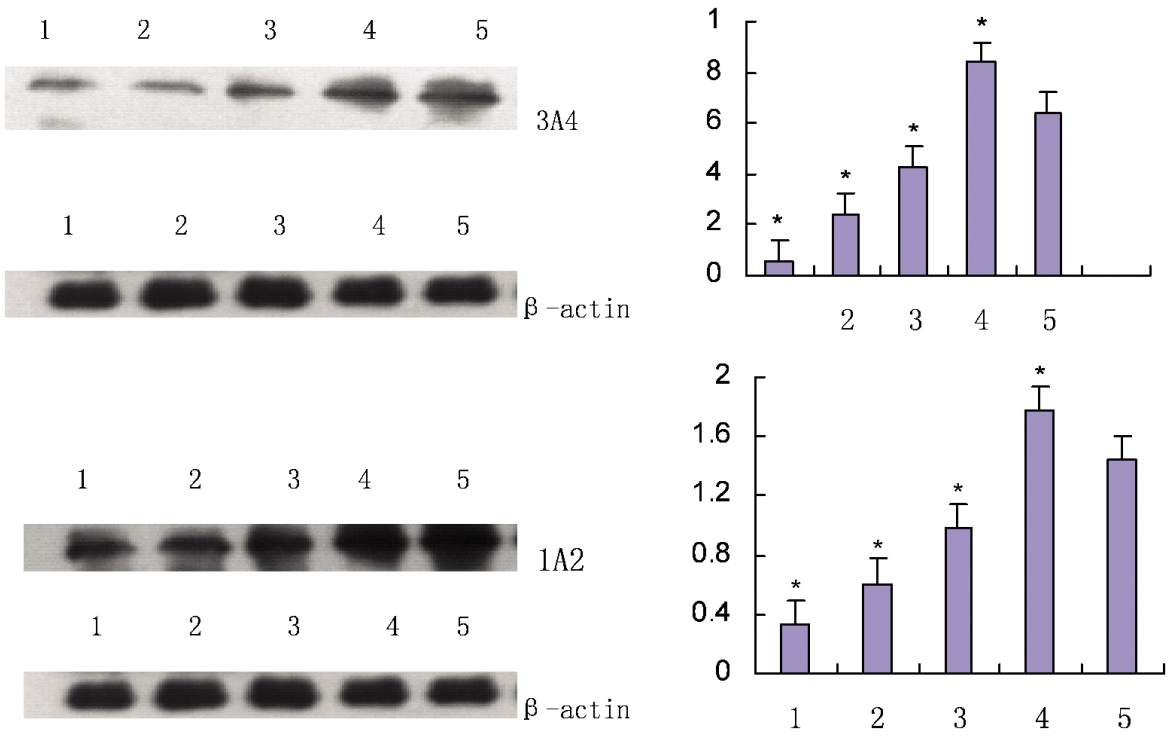

图 1 氯吡格雷对大鼠 CYP3A4,CYP1A2 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$,n=3)

1 为氯吡格雷高剂量组;2 为氯吡格雷中剂量组;3 为氯吡格雷低剂量组;4 为苯巴比妥组;5 为生理盐水组;(与对照组生理盐水组比较:*P<0.05)

Fig. 1 Effects of clopidogrel on cytochrome oxidase enzyme CYP3A4 and CYP1A2 of rat liver -($\bar{x}\pm s$,n=3)

1 27mg/kg/d clopidogrel group 2 13.5mg/kg/d clopidogrel group 3 6.75mg/kg/d clopidogrel group 4 phenobarbital group

5 sodium group (normal sodium as control group:*P<0.05)

临床疾病诊疗常需同时口服多种药物,当两种或两种以上药物同时或先后应用时,药物之间就会相互影响,一种药物原有的理化性质、体内过程以及机体对药物的敏感性改变时,就会使药物的药理效应和毒理效应发生变化。肝脏是药物体内代谢的主要器官,肝脏微粒体的细胞色素 P450 酶系统是促进药物代谢的主要酶系统,该酶系可被底物诱导或抑制并加速或减缓底物和其他物质代谢,这是构成了药物体内过程和交互作用的物质基础。

氯吡格雷治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的常用药,是一种强效的血小板聚集抑制剂,本身不具有抗血小板活性,它需经过细胞色素氧化酶氧化才能成为有代谢活性的抗血小板物质,具有依赖剂量性,负荷量 300 mg 后 2 h 即达到稳定的抑制血小板聚集作用[8],具有迅速、连续的抗血栓作用,IS-AR-CHOICE[9]的研究指出在应用氯吡格雷 300 mg、600 mg、900 mg 时,通过 ADP 所诱导的血小板聚集的抑制作用,高剂量组作用效果强于常规剂量组 300 mg。但 600 mg 和 900 mg 之间无显著性差异[10]。Muller 等[11]认为:氯吡格雷对由 ADP 所产生的抗血小板聚集作用是依赖剂量性的[12],认为在应用 600 mg 的负荷量后给予的 75 mg/d 明显提高了氯吡格雷抑制血小板聚集的效果。近些年国际上有研究[13,14]指出氯吡格雷与 PPI 联用会提高心血管不良事件的发生率,机制可能与影响 P450 酶表达有关。Lau[15]等报道阿托伐他汀与氯吡格雷合用时,氯吡格雷的抗血小板聚集的能力减弱,且这一作用具有剂量依赖性,Clarke 和 Waskell[16]亦认为阿托伐他汀可抑制氯吡格雷的代谢。因此为了改善上述情况的发生,相应的改变增加氯吡格雷的给药剂量,BONELLO 等[17,18]首次利用 VASP 指数来调整氯吡格雷负荷剂量。

细胞色素 P450 参与药物在肝内降解的反应。据估计普通处方中的 60 %药物需要通过细胞色素 P450 系统进行代谢[19],其中 CYP3A4 使肝脏含量最为丰富的细胞色素氧化酶(约 40 %)[20],能够催化 50 %以上的现用常见药物的反应。CYP1A2 在人类肝脏中存在广泛,平均占全部肝肝药物酶总量的 12.7 %。运动身体、摄食烤糊的食肉或十字花科蔬菜等都能增强 CYP1A2 活性,质子泵抑制剂可增强体内和原代单层培养的人肝细胞中 1A2 的活性[21]。

本实验结果显示,与生理盐水组比较,氯吡格雷使 CYP3A4、CYP1A2 蛋白表达量减少,说明氯吡格雷对大鼠 CYP3A4、CYP1A2 表达有抑制作用;氯吡格雷低中高剂量组分别进行比较时,氯吡格雷低中高剂量组使 CYP3A4、CYP1A2 蛋白表达量呈梯度减少,说明氯吡格雷对 CYP3A4、CYP1A2 蛋白表达的抑制作用成剂量依赖性,提示当氯吡格雷与某些主要经 CYP3A4、CYP1A2 代谢的药物合用时,发生代谢性药物相互作用的可能性较大。研究氯吡格雷对细胞色素氧化酶 P450 的影响,为防止和减轻由于药物的相互作用所产生的不良反应提供依据,可以最大程度的提高药物的有效性和安全性。目前,有几种亚型药物代谢酶参加氯吡格雷的代谢,氯吡格

雷通过何种环节影响肝药物酶,如何预测细胞色素酶代谢物介导的毒性。解决这些问题将有助于我们进一明确氯吡格雷与其他药物的相互作用,指导临床用药。

参 考 文 献(References)

[1] 王广基. 药物代谢动力学 [M]. 北京: 北京化学工业出版社, 2005: 40-441

Wang Guang-ji. Pharmacokinetic [M]. Beijing: chemical industry press, 2005: 40-441

[2] LauWC, Gurbel PA, Watkins PB, et al. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopi-dogrel resistance[J]. Circulation, 2004, 109(2): 166-171

[3] SimonT, VerstuyftC, MaryKrauseM, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events [J]. N Engl J Med, 2009, 360 (4): 363-375

[4] Angiolillo DJ, Fernandez-OrtizA, Bernardo E, et al. Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clopidogrel[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(8): 1895-1900

[5] Kim KA, Park PW, Hong SJ, et al. The effect of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel A possible mechanism for clopidogrel resistance [J]. Clin Pharmacol Ther, 2008, 84(2): 236-242

[6] Umemura K, Furata T, Kondo K, et al. The common gene variants of CYP2C19 affect pharmacokinetics and pharmacodynamics in an activemetabolite of clopidogrel in healthy subjects [J]. J Thromb Haemost, 2008, 6(8): 1439-1441

[7] Lau WC, Urebel P A, Watkins P B, et al. Contribution of hepatic cytochrome P4503A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance[J]. Circulation, 2004, 109(2): 166-171

[8] 潘建强, 印鑫. 低分子肝素联合波立维治疗不稳定心绞痛疗效观查[J]. 苏州大学学报(医学版) ,2003, 23(5): 564-567

Pan Jian-qiang, Yin Xin. Curative effect observation about low molecular weight heparin and clopidogrel on treatment of unstable angina pectoris[J]. Journal of Suzhou university(Medicine), 2003, 23 (5): 564-567

[9] Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S, et al. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose [J]. ThrombHaemost, 2004, 92(2): 311-316

[10] Von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G, et al. Absorption, metabolization, and antiplatelet effects of 300-, 600-, and 900-mg loading doses of clopidogrel: results of the ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose Between 3 High Oral Doses for Immediate ClopidogrelEffect) Trial [J].Circulation, 2005, 112(19): 2946-2950

[11] Muller I, Seyfarth M, Rudiger S, et al. Effect of a high dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement[J]. Heart, 2001, 85(1): 92-93

[12] Von Beckeath N, Kastratia, Wieczorek A, et al. A double blind, randomized study on platelet aggregation in patients treated with a daily dose of 150 or 75 mg of clopidogrel for 30 days [J]. EurHeart J, 2007, 28(15): 1814-1819

[13] Mahabaleshwarkar RK, Yang Y, Datar MV, et al. Risk of adverse cardiovascular outcomes and all-cause mortality associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors in elderly patients[J]. Curr Med Res Opin, 2013, 29(4): 315-323

[14] Juurlink DN, Gomes T, Ko DT, et al. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel [J]. CMAJ, 2009, 180(7): 713-718

[15] Venkatakrishnan K, Von Moltke MLL, Greenblatt D J, et al. Human drug metabolism and the cytochromes P450:application and relevance of in vitro models[J]. J Clin Pharmacol, 2001, 41(11): 1149-1179

[16] Zahno A, Brecht K, Bodmer M, et al. Anja Zahno Effects of drug interactions on biotransformation and antiplatelet effect of clopidogrel in vitro[J]. Br J Pharmacol, 2010, 161(2): 393-404

[17] Diasz D, Fabre I, Daujat M, et al. Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450 [J]. Gastroenterology, 1990, 99(3): 737-747

[18] Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, et al. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study[J]. J AM Colldiol, 2008, 51(14): 1404-1411

[19] Saw J, Steinhubl SR, Berger PB, et al. Clopidogrel for the reduction of events during observation investigators. Lack of adverse clopidogrel-atorvastatin clinical interaction from secondary analysis of a randomized, placebo-controlled clopidogrel trial [J]. Circulation, 2003, 108(9): 921-924

[20] LauWC, WaskellLA, Watkins PB, et al. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction[J]. Circulation, 2003, 107(1): 32-37

[21] Dangas G, Mehran R, Guagliumi G, et al. Role of clopidogrel loading dose in patients with ST-segmentelevation myocardial infarction undergoing primaryangioplasty [J]. J Am CollCardiol, 2009, 54(10): 1438-1446