

## 阿司匹林联合华法林对 HepG2 细胞中 CYP3A4 酶的抑制作用

陈力, 吴娟, 李静

成都医学院第一附属医院 药剂科, 四川 成都 610041

**摘要:** 目的 研究阿司匹林联用华法林对肝药物代谢酶 CYP3A4 活性的影响及其机制。方法 不同质量浓度的阿司匹林、华法林及联合用药处理 HepG2 细胞 48 h, 采用 MTT 法检测细胞存活率; 通过荧光素酶报告基因技术检测各组对 PXR 转录酶活性和酶 CYP3A4 活性的影响; 采用荧光定量 PCR 法和 Western blotting 法检测 HepG2 细胞的酶 CYP3A4 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果 与对照组比较, 阿司匹林组、联合用药组细胞的孕烷 X 受体 (PXR) 转录酶活性、酶 CYP3A4 活性均显著降低 ( $P < 0.01$ ), CYP3A4 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 华法林组均无显著差异。结论 阿司匹林联用华法林能够抑制药物代谢酶 CYP3A4 活性, 其机制可能是通过抑制 PXR 受体的 mRNA 和蛋白表达实现的。

**关键词:** 阿司匹林; 华法林; HepG2 细胞; CYP3A4; PXR

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)10-1819-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.10.002

## Inhibition of warfarin combined with aspirin on CYP3A4 in HepG2 cells

CHEN Li, WU Juan, LI Jing

Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610041, China

**Abstract: Objective** To study the effects of aspirin combined with warfarin on CYP3A4 and its mechanism. **Methods** HepG2 cells were treated with different concentrations of aspirin, warfarin and its combine for 48 h. cell survival rate was determined by MTT method. The transcriptional activation of PXR and activities of CYP3A4 were detected by luciferase reporter gene technique. The expressions of CYP3A4 mRNA and protein in HepG2 cells were detected by PCR and Western blotting method. **Results** Compared with the control group, the transcriptional activation of PXR and activity of CYP3A4 in aspirin group and combined groups were significant decreased ( $P < 0.01$ ), and the expressions of CYP3A4 mRNA and protein in HepG2 cells were significant decreased ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ), but there were no differences in warfarin group. **Conclusion** Aspirin combined with warfarin can inhibit the activity of drug metabolizing enzyme CYP3A4, which may be related to inhibition of the expressions of mRNA receptor PXR and protein.

**Key words:** aspirin; warfarin; HepG2 cell; CYP3A4; PXR

华法林是临床上常用的抗凝药, 主要用于防治血栓形成, 如心脏瓣膜置换术后血栓、肺血栓以及深静脉血栓等<sup>[1]</sup>。然而华法林因各种因素如个体差异等, 造成其用药范围较为狭窄, 可能导致使用时抗凝不足或抗凝过度引起出血等不良反应。因此, 在应用华法林治疗血栓时需要检测其血药浓度<sup>[2]</sup>。临床上常常使用阿司匹林与药物联合使用治疗一些疾病, 增加疗效<sup>[3-4]</sup>。近年来国内外研究表明, 华法林和阿司匹林联用对于治疗血栓具有互补的作用, 且两者在体内作用机制具有较大差异<sup>[5]</sup>。但两药合用增加治疗作用的同时也增加了出血的风险<sup>[6]</sup>。王夏芹等<sup>[7]</sup>研究表明, 华法林和阿司匹林联合使用时,

阿司匹林会增加华法林在体内的暴露, 会引起出血等不良反应, 提示阿司匹林对华法林的代谢有较强作用, 然而其相关机制未见相关报道研究。CYP3A4 是细胞色素 P450 家族的一种亚型, 主要调控药物的代谢过程。临床上大部分药物通过细胞色素 P450 酶系代谢, 华法林就是其中一种, 主要由其亚型 CYP3A4 代谢。因此能抑制该酶的活性即可导致华法林代谢减慢, 从而增强其抗凝作用。研究表明, 阿司匹林能增加华法林暴露, 同时两者合用时的抗凝作用增强<sup>[7-8]</sup>。因此本实验研究阿司匹林联用华法林对肝药物代谢酶 CYP3A4 的影响, 探讨其作用机制, 为两者合用代谢机制和临床安全用药提供参考。

收稿日期: 2017-05-05

作者简介: 陈力 (1982-), 男, 硕士, 主管药师, 从事天然药物有效成分的药效学研究。Tel: (028)83016070 E-mail: chenccc3@sohu.com

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

NU-4750 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 NUAIRE 公司), HD2-BCN-1360B 生物洁净工作台(北京东联哈尔公司); TDZ4-WS 台式离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司), PCR 仪(美国 AB 公司); AE31EF 型倒置显微镜(Motic 公司); DU-600 紫外分光光度计(Beckman 公司); Caretium 酶标仪(深圳市凯特生物医疗电子科技有限公司); SHZ-82 恒温振荡器(常州国华电器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

阿司匹林(中国食品药品检定研究院, 质量分数 99.99%, 批号 100106-201104), 华法林(加拿大 TRC 公司, 质量分数 98.0%, 批号 3-MMH-145-3), 利福平(美国 Sigma 公司, 质量分数 99.0%, 批号 087K1875), MTT(美国 Amreso 公司), 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司, 批号 SLBC7668), 胎牛血清(美国 Gibco 公司, 批号 NXA0644), BCA 蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号 201608), Western blot 试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号 201608), 荧光素酶报告基因检测试剂盒(碧云天生物技术研究所, 批号 201608); qPCR 试剂盒及相关试剂(美国 AB 公司)。

### 1.3 细胞

人肝癌细胞系 HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

HepG2 细胞于 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 2.2 MTT 法检测阿司匹林和华法林的细胞毒性

取对数生长期的 HepG2 细胞, 调至 5.0×10<sup>4</sup> 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL。于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后, 弃培养液, 加入终质量浓度分别为 90、180、360 mg/mL 阿司匹林、20 mg/mL 华法林或两种药物联合的培养液, 每组设置 6 个复

孔。同时设定对照孔(以等量血清培养)和调零孔(不加任何物质)。培养 48 h 后, 加入 0.5% 的 MTT 溶液 10 μL, 再孵育 4 h 后, 弃去培养液, 加入 DMSO 100 μL, 于 37 °C 中震荡 10 min, 使用酶标仪在 492 nm 波长下测定吸光度(A)值, 计算各组细胞的存活率。

$$\text{存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

### 2.3 荧光素酶报告基因检测法和 CYP3A4 的酶活性检测阿司匹林联用华法林对 PXR 转录酶和 CYP3A4 活性的影响

HepG2 细胞接种于 96 孔板中培养, 将细胞调整为 5.0×10<sup>4</sup> 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 培养 24 h 后, 弃培养液, 加入 180 mg/mL 阿司匹林、20 mg/ml 华法林、两药联合用药的培养液和 10 μmol/L 利福平(对照组), 每组设置 6 个复孔。给药 48 h 后, 按照试剂盒的说明裂解细胞, 取上清用于测定。样品中加入荧光素酶检测试剂混匀, 使用酶标仪测定每孔化学发光值, 计算诱导倍数<sup>[9-10]</sup>。

诱导倍数 = 给药组荧光素酶检测值 / 对照荧光素酶检测值

细胞培养和处理同上, 培养 48 h 后, 弃去培养液, 参照文献报道方法<sup>[11]</sup>, 每孔加入 5 μmol/L 底物 Luciferin-IPA 50 μL, 孵育 45 min 后, 每孔加入 Luciferin Detection Reagent, 混匀; 取 50 μL, 孵育 15 min, 使用酶标仪测定每孔化学发光值, 计算荧光素酶活性值。

$$\text{荧光素酶活性值} = \text{荧光素酶检测值} / \text{空白酶检测值}$$

### 2.4 荧光定量 PCR (QRT-PCR) 检测阿司匹林联用华法林对 CYP3A4 mRNA 表达的影响

用阿司匹林、华法林及联合用药处理细胞, 处理方法同 2.3 项, 培养 48 h 后, 弃去培养基。采用 TRIZOL 对各组细胞总 RNA 进行抽提, 参照试剂盒说明进行反转录和 QRT-PCR 反应。以 β-action 为内参, 推荐条件: 50 °C、2 min, 95 °C、10 min, 95 °C、5 s, 共循环 40 次后, 60 °C、1 min。引物序列见表 1。

表 1 扩增的特异性引物序列

Table 1 Sequence of specific amplification primer

Gene	Forward primer(5'→3')	Reverse primer(5'→3')
β-actin	GATCAAGATCATGCTCCTCCT	CGTCACTACTCCTGCTTGCTG
CYP3A4	CCTCCCTGAAAGATTCAGCA	ATGAGAGCAAACCTCATGCC

### 2.5 Western blotting 检测阿司匹林联用华法林对 CYP3A4 蛋白表达的影响

细胞培养和处理同 2.3 项, 培养 48 h 后, 吸去培养液, PBS 洗涤 2 次, 用 0.25%胰酶对各组细胞消化后, 离心 5 min, 吸去上清液, 加入 PBS, 轻轻吹打混匀, 离心 5 min, 弃去 PBS, 加入 200 μL 细胞裂解液, 于冰上裂解 30 min, 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 取上清于即全细胞裂解液。采用 BCA 法测定蛋白含量。样品经过 SDS-PADE 凝胶电泳、PVDF 转膜, 5% BSA 的封闭液 37 °C 封闭, 孵育一抗, 5% PBST 洗膜, 孵育二抗, 5% PBST 洗膜, 最后用化学发光凝胶图像仪成像, 结果采用 Image J 灰度分析软件分析条带灰度值。

### 2.6 统计学分析

通过 SPSS 20.0 软件统计, 采用单因素方差分析, 先进行正态性和方差齐性检验, 同时满足正态性和方差齐性时用 LSD 检验。

## 3 结果

### 3.1 阿司匹林联用华法林对 HepG2 细胞存活率的影响

阿司匹林高质量浓度(≥360 mg/mL)对 HepG2 细胞有一定毒性, 低质量浓度(90~180 mg/mL)对细胞的存活率影响较小, 细胞存活率大于 85%。20 mg/mL 华法林对细胞的存活率影响较小, 细胞存活率大于 85%。阿司匹林联合华法林用药时, 低质量浓度(90~180 mg/mL)阿司匹林对细胞的存活率影响也较小。因此, 选取质量浓度为 180 mg/mL 的阿司匹林作为后期联合用药组进行进一步的研究, 见表 2。

表 2 阿司匹林联用华法林对 HepG2 细胞存活率的影响  
Table 2 Effect of aspirin combined with warfarin on cell viability of HepG2

组别	质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	存活率/%
对照	—	99.82
阿司匹林	90	88.25
	180	87.32
	360	72.12
华法林	20	86.22
阿司匹林联合 华法林	90+20	86.11
	180+20	85.62
	360+20	70.11

### 3.2 阿司匹林联用华法林对 PXR 转录酶和 CYP3A4 活性的影响

与对照组比较, 利福平组细胞的 PXR 转录酶活性、酶 CYP3A4 活性显著增强 ( $P < 0.01$ ), 而阿司匹林组、联合用药组细胞的 PXR 转录酶活性、酶 CYP3A4 活性均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 华法林组无显著变化, 见表 3。

表 3 阿司匹林联用华法林对 PXR 转录酶和 CYP3A4 活性的影响  
Table 3 Effect of aspirin combined with warfarin on activities of PXR transactivation and enzyme CYP3A4

组别	质量浓度/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	PXR 转录酶 活性	CYP3A4 活性
对照	—	1.13 ± 0.25	2.13 ± 0.12
利福平	10 μmol·L <sup>-1</sup>	7.23 ± 0.17**	5.23 ± 0.32**
阿司匹林	180	0.43 ± 0.14**	1.43 ± 0.11**
华法林	20	1.02 ± 0.19	2.02 ± 0.33
联合用药	180+20	0.34 ± 0.24**	1.34 ± 0.16**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

### 3.3 阿司匹林联用华法林对 CYP3A4 mRNA 表达水平的影响

与对照组比较, 利福平组细胞的 CYP3A4 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而阿司匹林组、联合用药组的 CYP3A4 mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 华法林组无显著差异, 见表 4。

表 4 阿司匹林联用华法林对 HepG2 细胞 CYP3A4 mRNA 表达的影响  
Table 4 Effect of aspirin combined with warfarin on expression of CYP3A4 mRNA in HepG2 cells

组别	质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	CYP3A4 mRNA 表达
对照	—	2.06 ± 0.12
利福平	10 μmol·L <sup>-1</sup>	4.83 ± 0.32**
阿司匹林	180	1.31 ± 0.11*
华法林	20	1.86 ± 0.33
联合用药	180+20	1.24 ± 0.16**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

### 3.4 阿司匹林联用华法林对 CYP3A4 蛋白表达水平的影响

与对照组比较, 利福平组 CYP3A4 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 而阿司匹林组的 CYP3A4 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 提示阿司匹林

对 CYP3A4 具有抑制作用。联合用药组的 CYP3A4 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 表明联合用药对 CYP3A4 具有抑制作用, 且作用强于单用阿司匹林。华法林组的 CYP3A4 蛋白表达水平无显著差异, 见图 1、表 5。



图 1 阿司匹林联用华法林对 HepG2 细胞 CYP3A4 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of aspirin combined with warfarin on expression of CYP3A4 in HepG2 cells

表 5 阿司匹林联用华法林对 HepG2 细胞 CYP3A4 蛋白表达的影响

Table 5 Effect of aspirin combined with warfarin on expression of CYP3A4 in HepG2 cells

组别	质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	CYP3A4 蛋白表达
对照	—	2.68 ± 0.12
利福平	10 μmol·L <sup>-1</sup>	6.28 ± 0.32**
阿司匹林	180	1.70 ± 0.11*
华法林	20	2.41 ± 0.33
联合用药	180+20	1.61 ± 0.16**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

#### 4 讨论

联合用药常常会引起药物之间的相互作用, 从而产生一系列的不良反应, 其中因药物之间代谢导致的不良反应占 40% 以上, 因此临床用药应考虑代谢引起药物的相互作用, 从而避免事故的发生。美国针对药物相互作用的研究出台了指导性文件, 对此十分重视, 然而鉴于伦理等因素, 因此多在体外多采用培养细胞或体内多采用动物实验来考察药物之间的相互作用。

华法林是一种维生素 K 拮抗剂, 临床上多口服肠道吸收, 是一种常用的抗凝剂, 对于脑卒中等危险具有较好的疗效, 然而也有皮肤出血、胃肠道出血等不良反应, 这与机体 P450 细胞色素代谢酶基因差异有关<sup>[12-13]</sup>。近年来国内外研究表明, 华法林和阿司匹林联用对于治疗血栓具有互补作用, 且两者在体内作用机制有一定差异<sup>[5]</sup>。但是两药合用增

加治疗作用的同时也增加了出血的风险, 如脑出血等<sup>[6]</sup>。故本实验考察华法林和阿司匹林联合用药对药物代谢酶的影响, 以期推断两者合用机制。

本实验通过体外 HepG2 细胞的培养, 首先采用 MTT 法考察不同质量浓度的阿司匹林、华法林以及两者联合用药对细胞存活率影响, 结果表明低质量浓度阿司匹林、华法林及联合用药对细胞毒性较小, 细胞存活率达到 80% 以上。故选择该质量浓度阿司匹林进一步研究, 同时采用荧光素酶报告基因检测法考察各组对 PXR 转录激活活性的影响, 结果发现阿司匹林组及联合用药组对 PXR 转录激活活性均有显著抑制作用, 且联合用药组的作用强于阿司匹林组, 而华法林组无显著影响。孕烷 X 受体 (PXR) 是主要在肝细胞中表达的孤儿核受体, 在机体对外源物质防御过程具有重要作用, 研究表明, 它对 CYP3A4 基因表达起着关键的调控作用<sup>[14-15]</sup>。也有研究表明, CYP3A 转录表达的抑制也受 PXR 的调控, 具体过程为: 药物与 PXR 配体结合, PXR 激活活性被抑制, 再与 RXR 形成二聚体, 最终使 CYP3A 基因表达下调。

细胞色素 P450 是药物体内代谢的一种重要的代谢酶, 参与多数药物和内源性物质的转化和代谢。目前研究表明 CYP3A4 亚型是细胞色素 P450 含量较高的亚型, 调控大部分药物的代谢<sup>[16-17]</sup>。华法林在体内主要由 CYP 酶代谢。因此, 当 CYP 活性受到抑制时, 将会减慢华法林在体内代谢, 从而增强其抗凝作用, 反之, 则减弱。本实验酶 CYP3A4 活性检测结果表明阿司匹林能抑制酶 CYP3A4 活性, 同时发现阿司匹林和华法林联合用药作用强于单用阿司匹林, 该结果提示阿司匹林和华法林联用抗凝作用的增强可能是阿司匹林抑制酶 CYP3A4 活性产生的一个原因。

实进一步对 CYP3A4 的 mRNA 和蛋白表达检测的结果表明, 阿司匹林组、联合用药组对 CYP3A4 的 mRNA 和蛋白表达均有显著抑制作用, 且联合用药组作用强于阿司匹林组, 而华法林组无显著影响, 该结果正好与前期 CYP3A4 酶活性检测结果相应。

综上所述, 本研究以体外培养 HepG2 细胞研究阿司匹林和华法林联合用药对细胞色素酶 CYP3A4 活性的影响, 结果提示阿司匹林和华法林联用能抑制药物代谢酶 CYP3A4, 其机制可能是通过抑制 PXR 受体的 mRNA 和蛋白表达, 该研究为以后临床用药提供参考和依据。

参考文献

- [1] Hirsh J, Dalen J, Anderson, D R, *et al.* Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range [J]. *Chest*, 2001, 119(1 Suppl): 8S-21S.
- [2] Siguret V, Pautas E, Gouin-Thibault I. Warfarin therapy: influence of pharmacogenetic and environmental factors on the anticoagulant response to warfarin [J]. *Vitam Horm*, 2008, 78: 247-264.
- [3] 于永才, 吴世政, 候 倩. 血栓通联合阿司匹林治疗老年急性脑梗死的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(7): 782-785.
- [4] 吕先光, 吴伯祥, 朱 茜, 等. 小剂量阿司匹林联合美托洛尔对老年慢性心力衰竭患者血液高凝和心功能的研究 [J]. 现代药物与临床. 2014(4): 393-396.
- [5] Douketis J D. Combination warfarin-ASA therapy: which patients should receive it, which patients should not, and why? [J]. *Thromb Res* 2011, 127(6): 513-517.
- [6] Warkentin A E, Donadini M P, Spencer F A, *et al.* Bleeding risk in randomized controlled trials comparing warfarin and aspirin: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(4): 512-520.
- [7] 王夏芹. 华法林和阿司匹林联用在大鼠体内的药代动力学研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2010.
- [8] 周 峰, 赵 青. 阿司匹林与华法林联用在大鼠体内的药效学研究 [J]. 中国科技纵横, 2016(22): 190-191.
- [9] 油文亭, 周 涛, 马增春, 等. 人皂苷F1通过激活孕烷 X 受体诱导 CYP3A4 的表达 [J]. 中国药理学通报. 2015, 31(11): 1536-1540.
- [10] 黄 凌, 邝少轶, 张 丽. 吴茱萸碱与吴茱萸次碱经 PXR、CAR 核受体通路影响 CYP3A4 表达的研究 [J]. 中国药房, 2013, 24(35): 3274-3279.
- [11] Yang J, Yan B. Photochemotherapeutic agent 8-methoxypsoralen induces cytochrome P450 3A4 and carboxylesterase HCE2: evidence on an involvement of the pregnane X receptor [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 95(1): 13-22.
- [12] 沈 鹏. 华法林联合低分子肝素治疗晚期肺癌急性非大面积肺栓塞的疗效观察 [J]. 现代药物与临床. 2016, 31(4): 431-434.
- [13] 王维亭, 郝春华, 赵专友, 等. 新型抗凝药物研发进展 [J]. 现代药物与临床. 2011, 26(1): 10-24.
- [14] Smith P, Bullock J M, Booker B M, *et al.* The influence of St. John's wort on the pharmacokinetics and protein binding of imatinib mesylate [J]. *Pharmacotherapy*, 2004, 24(11): 1508-1514.
- [15] Sarino L V, Dang K H, Dianat N, *et al.* Drug interaction between oral contraceptives and St. John's wort: appropriateness of advice received from community pharmacists and health food store clerks [J]. *J Am Pharm Assoc*, 2007, 47(1): 42-47.
- [16] Guengerich F P. Cytochrome P450 and chemical toxicology [J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(1): 70-83.
- [17] Zhou S, Gao Y, Jiang W, *et al.* Interactions of herbs with cytochrome P450 [J]. *Drug Metabolism Rev*, 2003, 35(1): 35-98.