

三氟柳胶囊单剂量与多剂量人体药动学研究^Δ

彭莉*, 丁莉坤, 贾艳艳, 王茂湖, 文爱东[#](第四军医大学第一附属医院药剂科, 西安 710032)

中图分类号 R969.1;R973 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)35-4934-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.35.13

摘要 目的:研究三氟柳胶囊在健康人体内的药动学特征。方法:采用单中心随机试验设计,将36名健康受试者分为3组,分别单剂量口服三氟柳胶囊低、中、高剂量(300、600、900 mg),qd,给药当天进行单剂量人体药动学研究;中剂量组继续给药13 d,进行多剂量人体药动学研究。采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定三氟柳血药浓度,色谱柱为Zorbax SB-C₁₈,流动相为甲醇-0.2%甲酸水溶液(80:20, V/V),流速为0.2 ml/min;采用电喷雾离子源(ESI),以多反应监测(MRM)模式扫描,负离子方式检测,用于定量分析的离子对分别为 m/z 247.1→161.1(三氟柳)、 m/z 294.0→250.0(内标,双氯芬酸钠)。采用WinNonlin 6.2软件计算药动学参数,并比较其差异。结果:三氟柳血药浓度在0.05~20.0 μg/ml范围内线性关系良好。单剂量低、中、高剂量组 $t_{1/2}$ 分别为(0.45±0.20)、(0.47±0.10)、(0.43±0.20)h, t_{max} 分别为(0.56±0.20)、(0.60±0.20)、(0.47±0.40)h, c_{max} 分别为(3.30±0.98)、(10.65±3.26)、(13.96±4.88)μg/ml, AUC_{0-8h} 分别为(3.99±0.93)、(13.29±1.72)、(19.62±6.78)μg·h/ml,300~900 mg剂量范围内, c_{max} 、 AUC_{0-8h} 与剂量呈线性关系(R_2 分别为0.954、0.986)。多剂量给药达稳态时,平均血药浓度为(0.71±0.20)μg/ml, AUC_{ss} 为(17.10±4.82)μg·h/ml, $t_{1/2}$ 为(0.49±0.10)h, t_{max} 为(0.85±0.62)h, c_{max} 为(11.58±3.99)μg/ml, AUC_{0-8h} 为(16.99±4.84)μg·h/ml, $AUC_{0-∞}$ 为(17.08±4.81)μg·h/ml,蓄积因子为(1.28±0.40)。单剂量给药与多剂量给药的 t_{max} 和 $t_{1/2}$ 相近。结论:LC-MS/MS法能快速、准确地测定三氟柳在人体血浆中的浓度。三氟柳胶囊在健康受试者体内存在蓄积现象,且具线性药动学特征。

关键词 三氟柳;剂量;液相色谱-串联质谱法;血药浓度;药动学

Pharmacokinetic Study on Single Dose and Multiple Dose of Triflusal Capsule in Healthy Volunteers

PENG Li, DING Li-kun, JIA Yan-yan, WANG Mao-hu, WEN Ai-dong (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pharmacokinetic characteristics of triflusal capsule in healthy volunteers. METHODS: In randomized test, 36 healthy volunteers were randomly divided into 3 groups. They were given low-dose, medium-dose and high-dose of Triflusal capsule (300 mg, 600 mg and 900 mg), qd, for one day, and then pharmacokinetic study of single dose of Triflusal capsule was conducted; Triflusal capsule medium-dose group was continuously given medicine for 13 days, and then pharmacokinetic study of multiple dose of Triflusal capsule was conducted. The plasma concentration of triflusal was determined by LC-MS/MS, and Zorbax SB-C₁₈ column was used with methanol-0.2% formic acid (80:20, V/V) at the flow rate of 0.2 ml/min. ESI was adopted in MRM mode, negative ion detection was carried out, quantitative analysis m/z 247.1→161.1 (triflusal), m/z 294.0→250.0 (internal standard, diclofenac sodium). Pharmacokinetic parameters were calculated by using WinNonlin 6.2 software, and the difference of them were compared. RESULTS: The linear range of triflusal were 0.05-20 μg/ml. The main pharmacokinetic parameters of triflusal capsules high-dose, medium-dose and low-dose groups were as follows: $t_{1/2}$ were (0.45±0.20), (0.47±0.10), (0.43±0.20) h; t_{max} were (0.56±0.20), (0.60±0.20), (0.47±0.40)h; c_{max} were (3.30±0.98), (10.65±3.26), (13.96±4.88)μg/ml; AUC_{0-8h} were (3.99±0.93), (13.29±1.72), (19.62±6.78)μg·h/ml; within dose of 300-900 mg, linear relationship was found between c_{max} , AUC_{0-8h} and dose ($R^2=0.954, 0.986$). When reaching stable state of multiple dose, average blood concentration was (0.71±0.20)μg/ml; main pharmacokinetic parameters were as follows: AUC_{ss} (17.10±4.82)μg·h/ml, $t_{1/2}$ (0.49±0.10)h, t_{max} (0.85±0.62)h, c_{max} (11.58±3.99)μg/ml, AUC_{0-8h} (16.99±4.84)μg·h/ml, $AUC_{0-∞}$ (17.08±4.81)μg·h/ml; accumulation factor (1.28±0.40). t_{max} and $t_{1/2}$ of single dose were similar to those of multiple dose. CONCLUSIONS: LC-MS/MS can determine the content of triflusal in human plasma rapidly and accurately, and accumulation phenomena exist in healthy Chinese volunteers, which shows linear pharmacokinetic characteristics.

KEYWORDS Triflusal; Dose; LC-MS/MS; Plasma concentration; Pharmacokinetics

因子的表达[J].同济大学学报:医学版,2014,35(1):35.

[8] Zhang XQ, Wang ZW, Fan JW, *et al.* Impact of interleukin-10 gene polymorphisms on tacrolimus dosing requirements in Chinese liver transplant patients during the early

posttransplantation period[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011,67(8):803.

[9] Li CJ, Li L, Lin L, *et al.* Impact of the CYP3A5, CYP3A4, COMT, IL-10 and POR genetic polymorphisms on tacrolimus metabolism in Chinese renal transplant recipients [J]. *PLoS One*, 2014,21,9(1):e86 206.

[10] 丁俊.他克莫司的药理作用及临床应用研究概况[J].临床和实验医学杂志,2010,9(13):1 347.

Δ基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项项目(No.2012ZXJ09202-013)

* 硕士研究生。研究方向:药物临床试验。电话:029-84771794。E-mail:383613752@qq.com

通信作者:主任药师,博士生导师。研究方向:新药研发及临床药理学试验管理。电话:029-84773636。E-mail:adwen@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2015-06-02 修回日期:2015-08-03)

(编辑:李 劲)

三氟柳(Triflusal)由西班牙 Uriach 制药公司研制,是一种新型的抗血小板凝聚剂,现已在西班牙、墨西哥、意大利等十多个国家上市。三氟柳结构式为2-乙酰氧基-4-三氟甲基苯甲酸,其结构与水杨酸类似,可通过不可逆地抑制血小板环氧合酶^[1]、减少血栓的形成来发挥抗血小板聚集的作用^[2]。临床研究表明,三氟柳与阿司匹林预防中风和心肌梗死的疗效一致^[3],但其出血风险小于阿司匹林^[4],故于2008年被推荐为可替代阿司匹林预防中风的二级用药^[5-6],但我国尚未有相关试剂上市。本试验考察了西安新通药物研究有限公司研制的三氟柳胶囊单剂量与多剂量给药在健康人体内的药动学特征,为其剂量确定及Ⅱ期临床试验的给药方案提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 6410液相色谱(LC)-三重四极杆质谱(MS)联用仪(包括双高压泵、自动进样器、柱温箱、三重四极杆MS检测器)、MassHunter工作站(美国安捷伦公司);TDL-80-2B低速台式离心机(离心半径:15 cm,上海安亭科学仪器厂);H1650-W高速台式离心机(离心半径:20 cm,湖南湘仪实验室开发有限公司);Targin VX- II 多管涡旋混合仪(北京踏锦科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

受试制剂:三氟柳胶囊(规格:300 mg/粒,批号:13102801)、三氟柳对照品(批号:2013072402,纯度:99.5%)均购自西安新通药物研究有限公司;双氯芬酸钠对照品(内标,中国食品药品检定研究院,批号:100334-200302,纯度:100.0%);甲醇、甲酸、乙酸乙酯均为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈(100 mm×2.1 mm,3.5 μm);流动相:甲醇-0.2%甲酸水溶液(80:20, V/V);流速:0.2 ml/min;柱温:40 ℃;进样量:1 μl。

电喷雾离子源(ESI),以多反应监测(MRM)模式扫描,负离子方式检测;用于定量分析的离子对分别为 m/z 247.1 → 161.1(三氟柳,裂解电压:60 V,碰撞能:20 eV)、 m/z 294.0 → 250.0(内标,裂解电压:80 V,碰撞能:4 eV);干燥器温度:350 ℃;雾化气流速:10 L/min;干燥气压力:40 psi;毛细管压力:4 kV。

2.2 溶液的配制

精密称取三氟柳对照品10.05 mg,置于10 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,得质量浓度1.005 mg/ml的三氟柳标准溶液,备用。

精密称取双氯芬酸钠对照品10.32 mg,置于100 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,得质量浓度为103.2 μg/ml的内标溶液,备用。

2.3 血浆样品处理

取含药血浆样品(含1 mol/ml盐酸水溶液20 μl,在血样采集阶段已加入)0.22 ml,加入内标溶液30 μl,涡旋混匀,加入乙酸乙酯2 ml,涡旋3 min,4 000 r/min离心10 min,取上清液至另一离心管中,于30 ℃水浴中用氮气流吹干。加入流动相120 μl复溶,16 000 r/min离心3 min,取上清液100 μl,加入1 mol/ml盐酸水溶液20 μl,混匀,进样分析。血浆样品处理需在避光环境下进行。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验 在“2.1”项条件下,内源性杂质对待测物无干扰,三氟柳和内标(双氯芬酸钠)峰形良好,分离完全,保留时间分别约为2.6、4.2 min。LC图见图1。

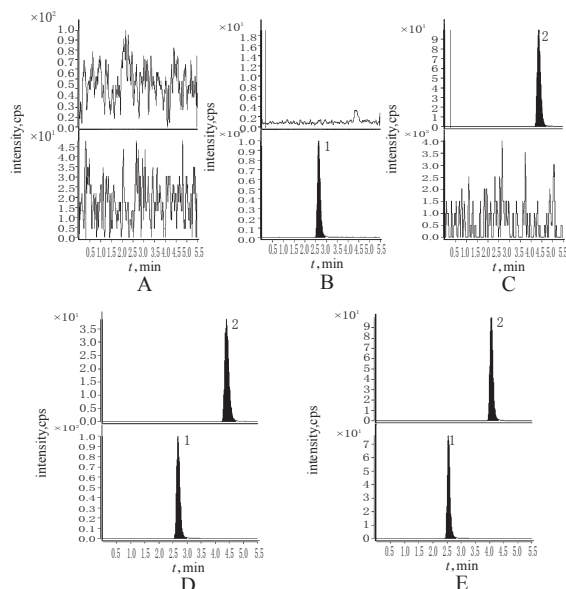


图1 LC图

A.空白血浆;B.空白血浆+三氟柳标准溶液;C.空白血浆+内标溶液;D.空白血浆+混合对照品溶液;E.低剂量组受试者口服三氟柳(300 mg) 0.5 h的血浆样品+内标溶液;1.三氟柳;2.内标

Fig 1 LC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma + triflusal; C. blank plasma + internal standard; D. blank plasma + mixed control; E. plasma sample 0.5 h after p.o.(300 mg) + internal standard; 1. triflusal; 2. internal standard

2.4.2 标准曲线的绘制及定量下限的考察 精密吸取三氟柳标准溶液适量,配制成质量浓度分别为0.05、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 μg/ml的血浆样品,按“2.3”项下方法处理,进样测定,记录色谱图。以待测物质量浓度(c)为横坐标、待测物与内标峰面积的比值(f)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $f=0.1209c-0.000229$ ($r=0.9912$)。结果表明,三氟柳血药浓度在0.05~20.0 μg/ml范围内线性关系良好,其定量下限为0.05 μg/ml, $RSD < 20\%$,符合生物样品的测定要求^[7]。

2.4.3 精密度与准确度试验 精密吸取三氟柳标准溶液适量,配制成低、中、高浓度(0.1、2.0、15.0 μg/ml)的血浆样品,按“2.3”项下方法处理,进样测定,计算精密度和准确度。结果显示,各浓度血浆样品的日内RSD分别为3.0%、5.0%、9.0%,日间RSD分别为5.3%、7.0%、8.3%,准确度为93.6%~106.5%,精密度及准确度均符合生物样品分析要求^[8]。

2.4.4 介质效应 取空白血浆0.22 ml,按“2.3”项下方法处理,离心取上清液加入三氟柳标准溶液及内标溶液适量,配制成低、中、高浓度(0.1、2.0、15.0 μg/ml)的血浆样品,每浓度取5样本分析,获得相应峰面积(A_s)。另取同体积低、中、高浓度所需的标准溶液和内标溶液以氮气流吹干,用流动相溶解,使终浓度与前者浓度相对应,每浓度取5样本分析,获得相应峰面积(A_s)。按公式:介质效应(%)= $A_s/A_s \times 100\%$ 计算。结果显示,各浓度血浆样品的介质效应分别为(100.3 ± 4.6)%、(101.5 ± 0.8)%、(101.4 ± 0.7)%,内标的介质效应为(100.4 ± 0.7)%,均

在85%~115%范围内,表明介质效应不影响三氟柳的血药浓度测定^[7]。

2.4.5 提取回收率试验 分别配制低、中、高浓度(0.1、2.0、15.0 μg/ml)的血浆样品,以经提取所得的色谱峰面积与未经提取直接进样所得的色谱峰面积的比值来考察样品的提取回收率。结果显示,各浓度血浆样品的提取回收率分别为(93.5±7.6)%、(96.5±4.7)%、(98.6±6.0)%,内标的提取回收率为(78.1±3.4)%,符合生物样品分析要求^[7]。

2.4.6 稳定性试验 分别配制低、高浓度(0.1、15.0 μg/ml)的血浆样品,考察其在室温放置7 h、进样器内放置7 h、反复冻融3次及-80℃冰冻保存30 d等条件下的稳定性,计算各样品测得浓度与实际浓度的百分偏差(RE)。结果显示,各样品的测定结果为一7.1%<RE<11.4%,表明三氟柳血浆样品在上述条件下均稳定^[7]。

2.5 药动学研究

2.5.1 研究对象 36名健康受试者,男女各半,体质量55~68 kg,年龄30~40岁,无烟、酒嗜好,肝、肾功能正常,心电图正常,无既往病史和药物过敏史,试验前2周及整个试验期间未服用其他任何药物,最近3个月未参加其他药物试验,非妊娠及哺乳期妇女。试验期间禁止吸烟和饮用含药物、酒精的饮料等,服药后禁止剧烈活动,医护人员在场并监测可能出现的不良反应。本试验方案经第四军医大学第一附属医院伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。

2.5.2 单剂量药动学研究^[8-11] 本试验采用单中心、开放、随机试验设计,将36名健康受试者分为低、中、高剂量(300、600、900 mg)组,每组12人,男女各半。受试者于早上8点空腹单剂量口服各剂量三氟柳胶囊,用250 ml温水送服,给药后2 h内不饮水,4 h后统一进食标准餐。于口服药物前及服药后5、10、20、30、45 min和1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0 h分别静脉采血4 ml,置于无菌肝素抗凝试管中,4 000 r/min冷冻离心5 min,定量分离血浆2 ml,加入1 mol/ml盐酸水溶液200 μl,于-80℃保存,备测。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用WinNonlin 6.2软件计算主要药动学参数,并绘制平均药-时曲线;分别以 c_{max} 、 AUC_{0-8h} 为纵坐标、剂量为横坐标绘制关系图,考察 c_{max} 、 AUC_{0-8h} 与剂量的相关性。各组主要药动学参数见表1;单剂量给药平均药-时曲线见图2; c_{max} 、 AUC_{0-8h} 与剂量的关系图见图3。

表1 各组主要药动学参数($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Main pharmacokinetic parameters of triflusal in each group($\bar{x} \pm s$)

参数	单剂量(n=36)			多剂量(n=12)
	低剂量组	中剂量组	高剂量组	
c_{max} , μg/ml	3.30±0.98	10.65±3.26	13.96±4.88	11.58±3.99
t_{max} , h	0.56±0.20	0.60±0.20	0.47±0.40	0.85±0.62
$t_{1/2}$, h	0.45±0.20	0.47±0.10	0.43±0.20	0.49±0.10
AUC_{0-8h} , μg·h/ml	3.99±0.93	13.29±1.72	19.62±6.78	16.99±4.84
$AUC_{0-\infty}$, μg·h/ml	4.09±0.85	13.40±1.75	19.76±6.72	17.08±4.81

由图3可见,单剂量给药在300~900 mg剂量范围内,三氟柳 c_{max} 、 AUC_{0-8h} 均与剂量呈线性关系(R^2 分别为0.954、0.986),表明三氟柳在健康人体内具线性药动学特征。

2.5.3 多剂量药动学研究^[8-11] 中剂量组受试者在单剂量给药结束后,继续给药,每天1次,连续给药13 d。于口服药物前及

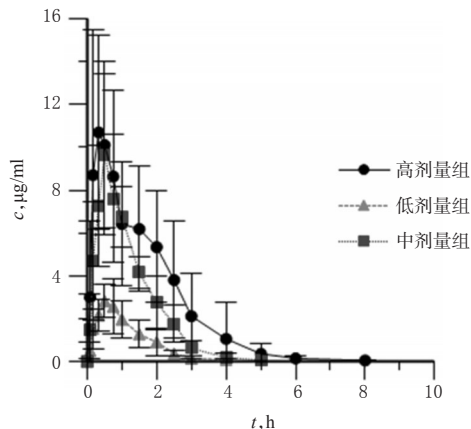


图2 单剂量给药的平均药-时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of triflusal after single administration

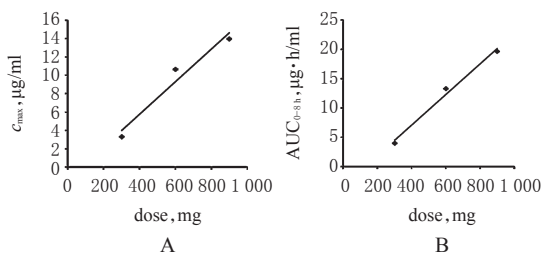


图3 c_{max} 、 AUC_{0-8h} 与剂量的关系图

A. c_{max} -剂量; B. AUC_{0-8h} -剂量

Fig 3 The relationship of c_{max} and AUC_{0-8h} with the dose of triflusal

A. c_{max} -dose; B. AUC_{0-8h} -dose

服药后5、10、20、30、45 min和1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0 h分别静脉采血4 ml,置于无菌肝素抗凝试管中,4 000 r/min冷冻离心5 min,定量分离血浆2 ml,加入1 mol/ml盐酸水溶液200 μl,于-80℃保存,备测。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用WinNonlin 6.2软件计算主要药动学参数,并绘制平均药-时曲线。结果显示,三氟柳在第10天达到稳态浓度,其相关药动学参数:平均血药浓度为(0.71±0.20)μg/ml, AUC_{ss} 为(17.10±4.82)μg·h/ml。其余药动学参数见表1;平均药-时曲线见图4。

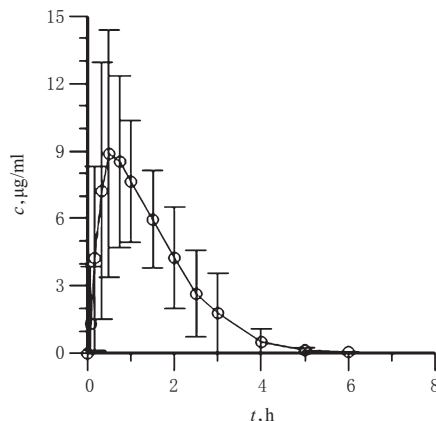


图4 多剂量给药的平均药-时曲线

Fig 4 Mean plasma concentration-time curve of triflusal after multiple administration

2.5.4 单剂量、多剂量给药的药动学参数比较 将单剂量(中

剂量组)、多剂量给药的 c_{\max} 、 AUC_{0-8h} 分别进行对数转换后,进行方差分析。结果显示,两者的 AUC_{0-8h} 差异有统计学意义($P=0.03$), c_{\max} 差异无统计学意义($P=0.19$)。单剂量与多剂量给药的 t_{\max} 、 $t_{1/2}$ 采用非参数检验进行比较。结果显示,两者的 t_{\max} 、 $t_{1/2}$ 相近,且差异无统计学意义(P 分别为0.49、0.37)。AUC的蓄积因子为 (1.28 ± 0.40) ,表明三氟柳在健康人体内存在一定的蓄积作用。

2.5.5 性别对药动学参数的影响 采用独立样本 t 检验比较男性和女性单剂量、多剂量口服三氟柳的药动学参数。结果表明,男、女受试者药动学参数之间的差异无统计学意义($P>0.05$),说明性别对三氟柳单剂量、多剂量给药的药动学参数无影响。

2.5.6 安全性评价 单剂量给药试验过程中所有受试者无不良反应发生,试验前后体检结果均正常;多剂量给药试验中有1例受试者出现反胃、恶心、乏力、多汗等症状,但程度轻微,并未给予特殊处理,试验结束后这些现象均自行消失。试验前后所有受试者的实验室检查结果均在正常范围内。表明三氟柳胶囊在中国健康人体内耐受性良好,安全性较高。

3 讨论

受试制剂的说明书中指出,成人建议剂量为600 mg/d,每天1次或多次;或900 mg/d,每天多次。因此,单剂量给药试验选择了300、600、900 mg 3个剂量,而多剂量给药选用了推荐剂量600 mg。试验结果显示,该给药方案不良反应发生率,在健康受试者中耐受性良好,可为三氟柳Ⅱ期临床试验及临床应用提供理论依据。

在色谱条件优化过程中,笔者考察了Agilent TC-C₁₈、Agilent Eclipse C₈、Agilent Zorbax SB-C₁₈ 3种色谱柱。结果显示,与其他色谱柱相比,Agilent Zorbax SB-C₁₈能得到较好的色谱峰形。在优化流动相时,比较了甲醇和乙腈对血药浓度测定的影响。乙腈虽然能够得到较好的峰形,但三氟柳会受到介质效应的干扰;甲醇除峰形较好外,还具有MS信号高、保留时间适当等特点,能提高色谱响应的稳定性,且无介质效应的干扰,故选择甲醇作为有机相。此外,还考察了不同体积分数甲酸水溶液(0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%)对血药浓度测定的影响。结果显示,0.2%甲酸水溶液可以得到较好的峰形,且响应值最大,故最终选择其作为水相。

在MS条件优化过程中,由于三氟柳中含有羧酸结构,对三氟柳母离子及子离子进行扫描,发现负离子模式的响应大于正离子模式,故选择负离子模式检测。同时优化裂解电压和碰撞能,发现响应稳定且信号强的离子对 m/z 为247.1→161.1,裂解电压为60 V,碰撞能为20 eV。在负离子模式下,测试了多种酸性化合物,最终确定双氯芬酸钠为内标,因在负离子模式下该化合物能产生很强的信号,同时与三氟柳可完全分离,且峰形良好,最终确定其离子对为 m/z 294.0→250.0,裂解电压为80 V,碰撞能为4 eV。进一步对MS其他条件进行优化,筛选最佳条件为:干燥器温度:350 ℃;雾化气流速:10 L/min;干燥气压力:40 psi;毛细管压力:4 kV。

在稳定性考察中发现,血浆样品中的三氟柳在5 h内降解50%,可能是由于血浆中的水解酶将其酯键水解所致。为了保证三氟柳的稳定性,分别考察了酸化血浆法和水解酶抑制剂法对血浆样品稳定性的影响。结果显示,当采用1 mol/ml盐酸水溶液酸化血浆可有效防止三氟柳的降解,且酸加入的比例越高,稳定性越好,但当酸化比例>10%时,血浆样品易形成胶团状,不利于后期处理。加入水解酶抑制剂时发现,样本

稳定性时间较短(约10 d)。故本试验最终采用1 mol/ml盐酸水溶液酸化血浆,以保证血浆样品中三氟柳的稳定性,经考察,酸化后的血浆至少可常温保存30 d。

在样本处理过程中,笔者对比了蛋白沉淀法和液-液萃取法。发现酸化后的血浆样本采用沉淀方法处理,不能有效地去除蛋白,处理后的上清液仍会产生白色絮状物,易造成色谱柱堵塞。最终选择乙酸乙酯萃取法,该法不仅重现性好、内源性物质干扰少,且能得到较高的提取回收率,可满足生物样本检测的要求。

笔者对建立的LC-MS/MS法进行了方法学验证,由相关试验结果可知,三氟柳的线性范围为0.05~20.0 μg/ml,定量下限为0.05 μg/ml,精密度、提取回收率符合生物样品分析要求。与文献报道的高效液相色谱(HPLC)法^[12]比较,本试验建立的测定血浆中三氟柳浓度的LC-MS/MS法具有灵敏度高、分离时间短、分离效率高等特点,可用于血浆大量样品的测定及其药动学研究。

36名健康受试者分别单剂量口服三氟柳胶囊300、600、900 mg,各剂量组的 c_{\max} 和 AUC_{0-7} 与剂量间呈线性相关,表明在300~900 mg剂量范围内,三氟柳胶囊在健康人体内具有线性药动学特征,说明口服剂量的增加并不影响药物在体内吸收和消除过程。同等剂量下,三氟柳主要药动学参数与国内外文献中相应参数间差异无统计学意义^[8-11]。各剂量组药动学参数在男、女受试者间差异无统计学意义($P>0.05$),在临床给药过程中可根据疗效在该范围内调整给药剂量。

本试验仅初步考察了三氟柳胶囊在健康人体内的药动学特征,在后续试验中,笔者将进一步考察饮食对其药动学的影响及三氟柳代谢物的药动学特征,为三氟柳制剂的临床给药方案及不良反应监测等方面提供更多的参考依据。

参考文献

- [1] Whitehead SN, Bayona NA, Cheng G, et al. Effects of triflusal and aspirin in a rat model of cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 2007, 38(2): 381.
- [2] Park SM, Lee J, Seong SJ, et al. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of transformed binary effect data of triflusal in healthy Korean male volunteers: a randomized, open-label, multiple dose, crossover study[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2014, doi: 10.1186/2050-6511-15-75.
- [3] Alvarez-Sabín J, Penalba A, Quintana M, et al. Triflusal and aspirin have different effects on inflammatory biomarkers measured in patients with acute ischemic stroke [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2009, 28(4): 371.
- [4] Matías-Guiu J, Alvarez-Sabín J, Codina A. Comparative study of the effect of low-dosage acetylsalicylic acid and triflusal in the prevention of cardiovascular events among young adults with ischemic cerebrovascular disease[J]. *Rev Neurol*, 1997, 25(147): 1 669.
- [5] Alvarez-Sabín J, Quintana M, Santamarina E, et al. Triflusal and aspirin in the secondary prevention of atherothrombotic ischemic stroke: a very long-term follow-up [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2014, 37(3): 181.
- [6] Cruz-Fernández JM, López-Bescós L, García-Dorado D, et al. Randomized comparative trial of triflusal and aspirin following acute myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*,

MeDIP-Seq法检测冠心病患者全基因组甲基化谱^Δ

赖伟华^{1*}, 潘伟祥¹, 冯颖青², 余细勇³, 陈纪言², 钟诗龙^{2,3#}(1.广东省人民医院/广东省医学科学院药学部, 广州 510080, 2.广东省心血管病研究所心内科, 广州 510080, 3.广东省人民医院/广东省医学科学院医学研究部, 广州 510080)

中图分类号 R968 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)35-4938-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.35.14

摘要 目的:探究冠心病(CHD)患者与健康志愿者全基因组甲基化的差异,从表观遗传学角度初步探讨DNA甲基化与CHD的相关性。方法:采用病例对照研究法,将受试者分为CHD组(CHD患者50例)和健康对照组(Health组,健康志愿者50例),采用甲基化DNA免疫共沉淀测序(MeDIP-Seq)法对两组受试者DNA进行测序,分析比较其全基因组甲基化的差异。结果:CHD组甲基化峰(Peak)的数量高于Health组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Peak主要分布在5'UTR、Intron基因功能元件上。CHD组APQ1、SHB等基因启动子区域内的reads数低于Health组,其甲基化水平降低;而GRK5基因及染色体chrX上多个基因启动子区域内的reads数则高于Health组,其甲基化水平增高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。结论:CHD患者全基因组甲基化水平高于健康志愿者,相关基因启动子甲基化水平的变化可能与CHD的发生有关。

关键词 冠心病;DNA甲基化;甲基化DNA免疫共沉淀测序

Genome-wide Analysis of DNA Methylation in Coronary Heart Disease Patients with MeDIP-Seq

LAI Wei-hua¹, PAN Wei-xiang¹, FENG Ying-qing², YU Xi-yong³, CHEN Ji-yan², ZHONG Shi-long^{2,3}(1. Dept. of Pharmacy, Guangdong General Hospital/Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Dept. of Cardiology, Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080, China; 3. Medical Research Center, Guangdong General Hospital/Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the genome-wide methylation differences between coronary heart disease (CHD) patients and healthy volunteers, and to investigate the relationship of DNA methylation with CHD from epigenetics. METHODS: In case-control study, subjects were divided into CHD group (50 cases) and health control group (50 cases). DNA of 2 groups were sequenced with methylated DNA immunoprecipitation sequencing technology. The genome-wide methylation differences were analyzed and compared between 2 groups. RESULTS: The number of methylation peak in CHD group was higher than health group, with statistical significance ($P<0.05$). The methylation peak mainly distributed in 5'UTR, Intron functional elements. The number of reads in AQP1, SHB and other gene promoters in CHD group were lower than health group, and its methylation level decreased. The number of reads in GRK5 and several gene promoters on chrX in CHD group were higher than health group, and its methylation level increased, with statistical significance ($P<0.01$). CONCLUSIONS: The genome-wide methylation level of CHD patients are higher than those of healthy volunteers. The occurrence of CHD is possibly associated with the change of methylation level of related gene promoters.

KEYWORDS Coronary heart disease; DNA methylation; Methylated DNA immunoprecipitation sequencing

2000,21(6):457.

[7] 国家食品药品监督管理局. 化学药物临床药代动力学研究技术指导原则[S]. 2005-03-18.

[8] Quetglas EG, Campanero MA, Sádaba B, et al. Bioequivalence of two oral formulations of triflusal capsules in healthy volunteers[J]. *Arzneimittelforschung*, 2008, 58(6):283.

[9] Cho HY, Jeong TJ, Lee YB. Stimulation determination of triflusal and its major active metabolite, 2-hydroxy-4-tri-

fluoromethyl benzoic acid, in rat and human plasma by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003, 798(2):257.

[10] Lee HW, Lim MS, Seong SJ, et al. A phase I study to characterize the multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of new enteric-coated triflusal formulation in healthy male volunteers[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2011, 7(12):1471.

[11] Izquierdo I, Borja J, Rovira S, et al. Comparative bioavailability study of triflusal oral solution vs. triflusal capsules in healthy subjects. A single, randomized, two-way crossover, open-label phase I study[J]. *Arzneimittelforschung*, 2010, 60(1):36.

[12] 郭海波, 郭旭光, 查岭, 等. HPLC法测定三氟柳的含量及有关物质[J]. *化学与生物工程*, 2011, 28(10):91.

(收稿日期:2015-04-11 修回日期:2015-10-23)

(编辑:张元媛)

Δ 基金项目:广东省科技计划项目(No.2012A03040062、No.2013B021800157);广东省医学科研基金立项课题(No.A2013039)

* 副主任药师, 硕士。研究方向:临床药学。电话:020-83827812-60249。E-mail:laiweihiuax@163.com

通信作者:研究员, 博士。研究方向:临床药理学、药物基因组学和药物代谢。电话:020-83827812-51157。E-mail:zhongsl@hotmail.com