

质子泵抑制剂对大鼠体内氯吡格雷抗血小板作用和代谢的影响

叶良英, 梁淑贞, 何瑞荣, 胡润凯, 韩伟超, 丁少波* (南方医科大学附属东莞人民医院药学部, 广东 东莞 523059)

摘要: 目的 研究各种质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPIs)对大鼠体内氯吡格雷抗血小板作用和代谢的影响。方法 将40只SD♂大鼠随机分为氯吡格雷组、氯吡格雷+雷贝拉唑组、氯吡格雷+泮托拉唑组、氯吡格雷+兰索拉唑组和氯吡格雷+奥美拉唑组, 每组8只。氯吡格雷、雷贝拉唑、泮托拉唑、兰索拉唑和奥美拉唑的给药剂量分别为6.25, 1.8, 3.6, 2.7, 3.6 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续给药7d。分别使用光学比浊法和血管扩张刺激磷酸蛋白检测法检测最大血小板聚集率(maximum platelet aggregation rate, MPA)和血小板反应指数(platelet response index, PRI), 并通过LC-MS/MS检测氯吡格雷及其活性代谢物H4的血药浓度。结果 氯吡格雷+雷贝拉唑组、氯吡格雷+兰索拉唑组和氯吡格雷+奥美拉唑组的MPA和PRI均显著高于氯吡格雷组, 氯吡格雷+泮托拉唑组的MPA和PRI显著低于氯吡格雷+奥美拉唑组($P<0.05$)。与氯吡格雷组比较, 氯吡格雷+雷贝拉唑组、氯吡格雷+兰索拉唑组和氯吡格雷+奥美拉唑组的氯吡格雷血药浓度升高, H4血药浓度降低, 但差异无统计学意义。结论 联用雷贝拉唑、兰索拉唑及奥美拉唑均会减弱氯吡格雷的抗血小板作用, 其中泮托拉唑的抑制作用最弱, 奥美拉唑的抑制作用最强。

关键词: 质子泵抑制剂; 大鼠; 氯吡格雷; 抗血小板; 代谢

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)03-0314-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.03.010

引用本文: 叶良英, 梁淑贞, 何瑞荣, 等. 质子泵抑制剂对大鼠体内氯吡格雷抗血小板作用和代谢的影响[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(3): 314-317.

Effects of Proton Pump Inhibitors on the Antiplatelet Activity and Metabolism of Clopidogrel in Rats

YE Genying, LIANG Shuzhen, HE Ruirong, HU Runkai, HAN Weichao, DING Shaobo* (Department of Pharmacy, Affiliated Dongguan People's Hospital, Southern Medical University, Dongguan 523059, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effects of different proton pump inhibitors(PPIs) on the antiplatelet activity and metabolism of clopidogrel in rats. **METHODS** Forty SD male rats were randomly divided into clopidogrel group, clopidogrel+rabeprazole group, clopidogrel+pantoprazole group, clopidogrel+lansoprazole group, and clopidogrel+omeprazole group, with 8 rats in each group. The doses of clopidogrel, rabeprazole, pantoprazole, lansoprazole, and omeprazole were 6.25, 1.8, 3.6, 2.7, 3.6 mg·kg⁻¹·d⁻¹, respectively. Continuous administration for 7 d. The maximum platelet aggregation rate(MPA) and platelet response index(PRI) were detected by optical heterometry method and vasodilator stimulated phosphoprotein assays, respectively. The plasma concentrations of clopidogrel and its active metabolite H4 in rats were detected by LC-MS/MS. **RESULTS** The MPA and PRI of clopidogrel+rabeprazole group, clopidogrel+lansoprazole group, and clopidogrel+omeprazole group were significantly higher than those of clopidogrel group($P<0.05$). The MPA and PRI of clopidogrel+pantoprazole group were significantly lower than those of clopidogrel+omeprazole group($P<0.05$). Compared with clopidogrel group, the plasma concentrations of clopidogrel were increased and the plasma concentrations of H4 were decreased in clopidogrel+rabeprazole group, clopidogrel+lansoprazole group, and clopidogrel+omeprazole group, but the changes were not significant. **CONCLUSION** Rabeprazole, lansoprazole, and omeprazole attenuated the antiplatelet effect of clopidogrel. Among these PPIs, pantoprazole has the weakest inhibitory effect and omeprazole has the strongest inhibitory effect on antiplatelet effect of clopidogrel.

KEYWORDS: proton pump inhibitors; rat; clopidogrel; antiplatelet; metabolism

目前中国心血管病患者率及死亡率仍在不断上升, 推算现有心血管病患者数约达2.9亿, 其中冠心病患者1100万, 心血管病死亡率占居民疾病死亡构成比的40%以上^[1]。氯吡格雷作为一线抗血小板药物广泛应用于临床, 而氯吡格雷与阿司匹

林的双联抗血小板治疗是急性冠脉综合征和经皮冠状动脉介入治疗术患者的标准治疗方案^[2-3]。为预防和减轻双抗血小板治疗引起的胃肠黏膜损伤和胃肠道出血, 临床上常推荐加用质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPIs)^[4]。但是由于氯吡格

基金项目: 东莞市社会发展重点项目(201950715001206)

作者简介: 叶良英, 女, 副主任药师 Tel: 13652531933 E-mail: 158780433@qq.com *通信作者: 丁少波, 女, 主任药师 Tel: 13532649318 E-mail: 943098759@qq.com

雷主要经肝药酶 CYP2C19 和 CYP3A4 催化生成活性硫醇代谢物^[5], 而多数 PPIs 也通过 CYP2C19 和 CYP3A4 代谢且对 CYP2C19 有不同程度的抑制作用^[6], 因此联用氯吡格雷和 PPIs 可能抑制氯吡格雷代谢和导致氯吡格雷的疗效下降。目前大部分研究只针对 1 或 2 种 PPIs 进行研究和比较, 本研究拟同时探究雷贝拉唑、泮托拉唑、兰索拉唑和奥美拉唑对大鼠体内氯吡格雷抗血小板作用和代谢的影响, 以期为临床合理用药提供一定参考。

1 材料

1.1 动物

SPF 级♂SD 大鼠 40 只, 体质量(200±20)g, 购自南方医科大学实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK(粤)2016-0041; 实验动物合格证号: 44002100020278。

1.2 仪器

LC-20AB 高效液相色谱仪(日本岛津公司), 色谱柱为 Shim-pack XR-ODS II (150 mm×2.0 mm, 2.2 μm); API4000 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); Model 700 血小板聚集分析仪(美国 Chrono-Log 公司); 5180R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); FCSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 试剂及药品

氯吡格雷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100819-201102; 含量: 99.5%); 氯吡格雷活性代谢物 H4 衍生物对照品(加拿大 Toronto Research Chemicals 公司, 批号: 5-MNZ-188-22; 含量: 99.9%); 硫酸氢氯吡格雷片(乐普药业股份有限公司, 批号: B190407A2; 规格: 每片 75 mg); 雷贝拉唑钠肠溶片(晋城海斯制药有限公司, 批号: 20190401; 规格: 每片 20 mg); 泮托拉唑钠肠溶片(湖南九典制药股份有限公司, 批号: 20190403; 规格: 每片 20 mg); 兰索拉唑肠溶片(上海新黄河制药有限公司, 批号: 11419002; 规格: 每片 30 mg); 奥美拉唑钠肠溶片(苏州中化药品工业有限公司, 批号: 56219002; 规格: 每片 10 mg); VASP/P2Y12 试剂盒(法国 STAGO 公司, 批号: 111604); 醋酸铵(色谱纯)、甲酸(色谱纯)、2-溴-3'-甲氧基苯乙酮(2-bromo-3'-methoxyacetophenone, MPB, 批号: 151910100; 含量≥97%)、卡马西平对照品(批号: 106H0899; 含量≥99.9%)、二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP, 批号: A2754;

含量≥95%)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 乙腈(德国默克公司, 色谱纯); 水为超纯水。

2 方法

2.1 动物试验

按照随机数字表法将 40 只♂SD 大鼠随机分为氯吡格雷组、氯吡格雷+雷贝拉唑组、氯吡格雷+泮托拉唑组、氯吡格雷+兰索拉唑组和氯吡格雷+奥美拉唑组, 每组 8 只。每日早上 10 点同时灌胃给予氯吡格雷及 PPIs, 按照 60 kg 成人氯吡格雷、雷贝拉唑、泮托拉唑、兰索拉唑和奥美拉唑常规剂量分别为 75, 20, 40, 30, 40 mg·d⁻¹, 人与大鼠的等效剂量比值为 0.018 进行换算, 大鼠氯吡格雷、雷贝拉唑、泮托拉唑、兰索拉唑和奥美拉唑的给药剂量分别为 6.25, 1.8, 3.6, 2.7, 3.6 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续给药 7 d。最后一次给药后 1 h, 从腹主动脉取血 1.8 mL 到含 0.2 mL 3.8%枸橼酸钠的抗凝管中, 共 2 管用于血小板功能检测, 另外取血 0.5 mL 到 EDTA 抗凝管中用于血药浓度检测。

2.2 血小板功能检测

将其中一管血分别制备为贫血小板血浆和富血小板血浆, 使用血小板聚集分析仪按照仪器操作说明测定 5 μmol·L⁻¹ ADP 诱导的最大血小板聚集率(maximum platelet aggregation rate, MPA); 另外一管血按照 VASP/P2Y12 试剂盒说明处理后, 使用流式细胞仪测定 VASP 磷酸化, 根据静息态和激活态时校正的平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)计算血小板反应指数(platelet response index, PRI)。PRI=[(MFI_{静息态}-MFI_{激活态})/MFI_{静息态}]×100%。

2.3 样本处理及血药浓度测定

迅速向 EDTA 抗凝管中加入 500 mmol·L⁻¹ MPB 溶液 5 μL 并轻微摇匀, 在 15 min 内于 4 °C 下以 4 000×g 离心 10 min, 分离血浆置于-80 °C 保存备用。血浆样品处理及 LC-MS/MS 方法参考已发表的相关文献并经过方法学验证^[7], 氯吡格雷和 H4 分别在 0.03~20 ng·mL⁻¹ 和 0.5~250 ng·mL⁻¹ 线性关系良好。

2.4 统计学分析

实验数据使用 SPSS 22.0 软件及 GraphPad Prism 7 进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 2 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各种 PPIs 对大鼠 MPA 和 PRI 的影响

氯吡格雷+雷贝拉唑组、氯吡格雷+兰索拉唑组和氯吡格雷+奥美拉唑组的 MPA 和 PRI 均显著高于氯吡格雷组, 氯吡格雷+泮托拉唑组的 MPA 和 PRI 显著低于氯吡格雷+奥美拉唑组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结果表明联用雷贝拉唑、兰索拉唑和奥美拉唑均能减弱氯吡格雷的抗血小板作用, 泮托拉唑对氯吡格雷的抗血小板作用无明显影响。结果见表 1。

表 1 各组大鼠的 MPA 和 PRI ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab. 1 MPA and PRI of rats in different groups($\bar{x} \pm s, n=8$) %

组别	MPA	PRI
氯吡格雷组	48.89±6.76	45.69±4.17
氯吡格雷+雷贝拉唑组	58.12±7.33 ¹⁾	53.31±5.82 ¹⁾
氯吡格雷+泮托拉唑组	52.80±7.19 ²⁾	48.95±5.23 ²⁾
氯吡格雷+兰索拉唑组	59.45±5.98 ¹⁾	53.93±4.89 ¹⁾
氯吡格雷+奥美拉唑组	63.94±5.62 ¹⁾	58.42±5.61 ¹⁾

注: 与氯吡格雷组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与氯吡格雷+奥美拉唑组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with clopidogrel group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with clopidogrel + omeprazole group, ²⁾ $P<0.05$ 。

3.2 各种 PPIs 对大鼠体内氯吡格雷及 H4 血药浓度的影响

氯吡格雷+雷贝拉唑组、氯吡格雷+兰索拉唑组和氯吡格雷+奥美拉唑组的氯吡格雷血药浓度较氯吡格雷组分别升高 11.4%, 24.2%和 29.4%, H4 血药浓度较氯吡格雷组分别降低 14.7%, 18.8%和 29.5%, 但各组间差异并无统计学意义。结果表明联用雷贝拉唑、兰索拉唑和奥美拉唑可能抑制氯吡格雷的代谢, 泮托拉唑对氯吡格雷的代谢影响最小。结果见表 2。

表 2 各组大鼠体内氯吡格雷及 H4 的血药浓度($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab. 2 Plasma concentrations of clopidogrel and H4 in rats in different groups($\bar{x} \pm s, n=8$) ng·mL⁻¹

组别	氯吡格雷	H4
氯吡格雷组	2.89±1.16	211.83±77.60
氯吡格雷+雷贝拉唑组	3.22±1.03	180.62±85.93
氯吡格雷+泮托拉唑组	2.75±1.25	224.57±90.14
氯吡格雷+兰索拉唑组	3.59±1.58	172.04±70.65
氯吡格雷+奥美拉唑组	3.74±1.64	149.38±83.42

4 讨论

氯吡格雷为无活性的前体药物, 口服吸收后

约 85%经酯酶 CES1 水解成无活性的羧酸代谢物, 仅 15%经肝药酶的 2 步氧化转化为活性硫醇代谢物, 在此过程中 CYP2C19 和 CYP3A4 发挥着重要作用^[5-8]。近年的研究发现基因多态性及药物相互作用对氯吡格雷的代谢及疗效会产生显著影响^[9-10], 而临床上与氯吡格雷联用较多的 PPIs、他汀类药物和钙离子通道阻滞药等所引起的药物相互作用更是备受关注^[10-11]。联用 PPIs 可降低双抗血小板治疗中 50%的胃肠道出血风险^[12], 但有研究认为氯吡格雷联用 PPIs 会增加心血管不良事件的风险^[13], 该机制可能与 PPIs 竞争性抑制氯吡格雷的代谢有关。目前临床上常用的 PPIs 包括奥美拉唑、雷贝拉唑、泮托拉唑、兰索拉唑和埃索美拉唑, 大多数 PPIs 主要经 CYP2C19 和 CYP3A4 代谢, 在体外试验中对 CYP2C19 的抑制作用: 兰索拉唑>奥美拉唑>雷贝拉唑硫醚>埃索美拉唑>泮托拉唑>雷贝拉唑^[6], 综合药动学及药效学研究情况^[14-16], 目前认为奥美拉唑及埃索美拉唑对氯吡格雷的代谢及抗血小板作用影响较大, 雷贝拉唑及泮托拉唑对氯吡格雷的代谢及抗血小板作用影响较小, 兰索拉唑对氯吡格雷的影响仍有争议。

在临床实际中, 与氯吡格雷联用最多的是泮托拉唑及雷贝拉唑, 其次是兰索拉唑, 因此为了进一步比较雷贝拉唑和泮托拉唑对氯吡格雷影响的大小和探究兰索拉唑对氯吡格雷的影响, 本研究使用了光学比浊法、血管扩张刺激磷酸蛋白检测法和 LC-MS/MS 等检测方法同时探究了雷贝拉唑、泮托拉唑、兰索拉唑和奥美拉唑对大鼠体内氯吡格雷的抗血小板作用和代谢的影响。结果显示联用雷贝拉唑、兰索拉唑和奥美拉唑均会升高大鼠的 MPA 和 PRI, 各种 PPIs 对氯吡格雷抗血小板作用的影响大小: 奥美拉唑>兰索拉唑>雷贝拉唑>泮托拉唑。另外联用雷贝拉唑、兰索拉唑和奥美拉唑时, 氯吡格雷的血药浓度分别升高了 11.4%, 24.2%和 29.4%, H4 的血药浓度降低了 14.7%, 18.8%和 29.5%, 各种对氯吡格雷代谢的影响大小: 奥美拉唑>兰索拉唑>雷贝拉唑>泮托拉唑。综合上述结果, 与氯吡格雷联用时更适合首选泮托拉唑, 其次是雷贝拉唑。虽然雷贝拉唑主要经非酶途径代谢, 但其硫醚代谢物对 CYP2C19 有较强抑制作用, 这可能是雷贝拉唑对氯吡格雷影响大于泮托拉唑的原因之一。另外泮托拉唑与 CYP2C19 的结合能力较弱也可能是重要原因之一^[17]。

该研究仍存在以下局限：①因为取血量的限制未能检测氯吡格雷及 H4 的暴露量，仅以 1 个时间点的血药浓度数据探究对氯吡格雷代谢的影响不够全面；②大鼠与人的肝药酶具有种属差异，仍需进一步的临床研究对上述结果进行验证。

REFERENCES

- [1] HU S S, GAO R L, LIU L S, et al. Summary of the 2018 report on cardiovascular diseases in China[J]. *Chin Circ J(中国循环杂志)*, 2019, 34(3): 209-220.
- [2] MEMBERS A F, STEG P G, JAMES S K, et al. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC)[J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(20): 2569-2619.
- [3] 中华医学会心血管病学分会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 非 ST 段抬高型急性冠状动脉综合征诊断和治疗指南(2016)[J]. *中华心血管病杂志*, 2017, 45(5): 359-376.
- [4] BHATT D L, SCHEIMAN J, ABRAHAM N S, et al. ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use: A report of the American college of cardiology foundation task force on clinical expert consensus documents[J]. *Circulation*, 2008, 118(18): 1894-1909.
- [5] LIU G H, YANG S F, CAI D, et al. Effect of *CYP2C19* gene polymorphism on the recurrence rate of ischemic stroke patients treated with clopidogrel[J]. *Pharm Today(今日药学)*, 2019, 29(9): 636-639, 643.
- [6] LI X Q, ANDERSSON T B, AHLSTRÖM M, et al. Comparison of inhibitory effects of the proton pump-inhibiting drugs omeprazole, esomeprazole, lansoprazole, pantoprazole, and rabeprazole on human cytochrome p450 activities[J]. *Drug Metab Dispos*, 2004, 32(8): 821-827.
- [7] ZHANG Z J, CHEN Z, DAI Y, et al. Relationship between gene polymorphism and platelet reactivity in patients with coronary heart disease treated with clopidogrel post PCI[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2019, 28(4): 451-457.
- [8] SCOTT S A, SANGKUH K, STEIN C M, et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for *CYP2C19* genotype and clopidogrel therapy: 2013 update[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 94(3): 317-323.
- [9] XIAO F Y, ZHANG W, ZHOU H H, et al. Progress of genetic polymorphisms affecting the efficacy of clopidogrel[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2016, 33(3): 375-380.
- [10] CHEN X L, LI X S, DING Y L, et al. Research progress on non-genetic factors influencing the response to clopidogrel[J]. *Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志)*, 2018, 34(14): 1719-1722.
- [11] SONG H J, DU Y B, GUO C H, et al. Investigation and analysis of potential drug interaction of clopidogrel drug combination in outpatient prescriptions of our hospital[J]. *China Pharm(中国药房)*, 2018, 29(17): 2429-2432.
- [12] SILLER-MATULA J M, JILMA B, SCHRÖR K, et al. Effect of proton pump inhibitors on clinical outcome in patients treated with clopidogrel: A systematic review and meta-analysis[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(12): 2624-2641.
- [13] GOODMAN S G, CLARE R, PIEPER K S, et al. Association of proton pump inhibitor use on cardiovascular outcomes with clopidogrel and ticagrelor: Insights from the platelet inhibition and patient outcomes trial[J]. *Circulation*, 2012, 125(8): 978-986.
- [14] FRELINGER A L III, LEE R D, MULFORD D J, et al. A randomized, 2-period, crossover design study to assess the effects of dexlansoprazole, lansoprazole, esomeprazole, and omeprazole on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel in healthy volunteers[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(14): 1304-1311.
- [15] ANGIOLILLO D J, GIBSON C M, CHENG S, et al. Differential effects of omeprazole and pantoprazole on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of clopidogrel in healthy subjects: Randomized, placebo-controlled, crossover comparison studies[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 89(1): 65-74.
- [16] CHEN C H, YANG J C, UANG Y S, et al. Differential inhibitory effects of proton pump inhibitors on the metabolism and antiplatelet activities of clopidogrel and prasugrel[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2012, 33(5): 278-283.
- [17] OGILVIE B W, YERINO P, KAZMI F, et al. The proton pump inhibitor, omeprazole, but not lansoprazole or pantoprazole, is a metabolism-dependent inhibitor of *CYP2C19*: implications for coadministration with clopidogrel[J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(11): 2020-2033.

收稿日期: 2020-01-06
(本文责编: 李艳芳)