

小剂量氯吡格雷联合丹皮酚抗血小板聚集研究

孙爱华^{1,2}, 周碧蓉¹

摘要 目的 考察小剂量氯吡格雷联合丹皮酚给药抗血小板聚集活性。方法 利用二磷酸腺苷体外诱导血小板聚集,大鼠动-静脉旁路血栓重量和小鼠出血时间等指标评价联合给药抗血小板聚集活性。结果 联合给药能显著抑制大鼠血小板最大聚集率、降低大鼠动-静脉旁路血栓重量并延长小鼠出血时间;且其抑制血小板聚集活性明显强于氯吡格雷和丹皮酚。结论 小剂量氯吡格雷联合丹皮酚给药的抗血小板聚集活性明显强于氯吡格雷组,具有一定的临床应用前景。

关键词 氯吡格雷;丹皮酚;血小板;血栓

中图分类号 R 543; R 969.2; R 969.3; R 972.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)06-0777-04

氯吡格雷是血小板聚集抑制剂,被广泛用于血栓和动脉粥样硬化等心脑血管疾病的治疗^[1]。临床资料^[2]表明:氯吡格雷可以明显降低血栓发生率,减少动脉粥样硬化的发生,但其在肠道吸收受P-糖蛋白干扰^[3],治疗给药存在一定抵抗现象,疗效不稳定;同时常规用药所致胃肠道出血和肝肾功能损伤等不良反应发生频率较高^[4],且严重程度往往呈现出一定剂量依耐性^[5],从而限制其临床应用。丹皮酚是牡丹干燥根皮的活性成分,可抑制血小板聚集^[6],也可抑制P-糖蛋白^[7]活性,提示氯吡格雷和丹皮酚联合给药可能具有协同效应。故该研究初步考察小剂量氯吡格雷联合丹皮酚给药抗血小板聚集作用是否优于单用氯吡格雷,旨在为二者临床联合给药提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 硫酸氯吡格雷片 25 mg/片,深圳信立泰药业,批号:20090312;丹皮酚(宣城百草植物工贸有限公司,纯度99%,批号:100321);氯吡格

雷和丹皮酚临用前均用0.5%羧甲基纤维素钠溶解;二磷酸腺苷二钠(adenosine diphosphate, ADP),上海伯奥生物技术有限公司,批号:20100430。

1.2 实验仪器 GL20A 高速冷冻离心机:湖南仪器仪表总厂离心机厂;PHS-2C 酸度计:上海理达仪器厂;AA-200DS 电子分析天平:Denver 仪器公司;LBY-NJ2 血小板凝聚仪:北京普利生公司; -80℃超低温冰箱:美国 Advantage 公司;SYS-MEX XT-1800i 全自动血液自动分析装置:日本 KOBE 公司。

1.3 实验动物与分组 SD 大鼠,雄性,体重(240±20)g,清洁级;昆明种小鼠,雄性,体重(20±2)g;实验动物均由安徽医科大学实验动物中心提供。实验大鼠随机分为5组,分别为正常组、丹皮酚组(50 mg/kg)、小剂量氯吡格雷组(3 mg/kg)、氯吡格雷常规剂量组(6 mg/kg)和氯吡格雷(3 mg/kg)+丹皮酚(50 mg/kg)联合给药组;实验小鼠随机分为5组,分别为正常组、丹皮酚组(70 mg/kg)、小剂量氯吡格雷组(4.5 mg/kg)、氯吡格雷常规剂量组(9 mg/kg)和氯吡格雷(4.5 mg/kg)+丹皮酚(70 mg/kg)联合给药组。各给药组每天灌胃1次,连续给药1周,正常组大鼠和小鼠给予等体积溶媒。

1.4 实验方法^[8]

1.4.1 大鼠血小板聚集抑制率 SD 大鼠40只随机分为5组,实验前12 h 禁食不禁水。各给药组末次给药2 h 后,腹主动脉取血,枸橼酸钠溶液(3.8%)与血液按照1:9混合,800 r/min 离心10 min,获得富含血小板血浆;3 000 r/min 离心10 min 制备贫血小板血浆。调整富含血小板血浆中血小板浓度为(600~700)×10⁹个/L,按照比浊法,应用血小板聚集仪,贫血小板血浆调零后,在搅拌情况下,加入血小板诱导剂ADP,测定血小板最大聚集率,并计算各组的血小板聚集抑制率,血小板聚集抑制率=(正常组聚集率-给药组聚集率)×100%/正常组聚集率。

1.4.2 大鼠动-静脉旁路血栓 SD 大鼠40只随机分为5组。各组末次给药2 h 后,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠(30 mg/kg),仰卧位固定。分离右颈总动脉和左颈外静脉,用肝素钠生理盐水溶液(50 U/ml)灌注聚乙烯插管,聚乙烯插管(内置手术

2014-02-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81300223)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

²安徽医科大学附属合肥医院(合肥市第二人民医院)急救内1科,合肥 230011

作者简介:孙爱华,男,硕士研究生;

周碧蓉,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhoubirongl@hotmail.com

线,长6 cm)一段插入左颈外静脉,另一端插入右颈总动脉,打开动脉夹,开放血流并记录时间,血流从动脉流经聚乙烯管回到静脉,等15 min血栓形成后阻断血流,迅速取出手术线,称量血栓湿重(总重量减去手术线重量即为湿重),血栓在室温下干燥后测量干重。

1.4.3 小鼠血常规、出血和凝血时间 昆明种小鼠50只随机分为5组,实验前12 h禁食不禁水。各组末次给药2 h后,将小鼠尾尖部剪断5 mm并将尾巴放入含有10 ml生理盐水的试管中(37℃水浴保温),保持尾尖端在液面下1.5 cm,记录停止出血时间,小鼠腹主动脉抽血300 ml测定血常规,拔出针头,使血液自动流出,用棉球轻轻拭去第一滴血,再分别滴血于清洁载玻片的两端,血滴直径为0.5~1.0 cm,开始用秒表计时,2 min后,每隔30 s用洁净的注射剂针头自血滴边缘向里轻轻挑动1次,到针头能挑起纤维白丝为止,记录所需时间,即为凝血时间。

1.5 统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异比较采用单因素方差分析,两两比较采用Dunnett's C检验。

2 结果

2.1 小剂量氯吡格雷联合丹皮酚给药对大鼠血小板聚集的影响 各组连续7 d给药后能够明显降低大鼠最大血小板聚集率($P < 0.01$);小剂量氯吡格雷抗血小板聚集活性明显强于丹皮酚组($P < 0.05$),联合给药组抑制大鼠血小板聚集作用明显强于氯吡格雷常规剂量组(6 mg/kg)和丹皮酚组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图1A。

2.2 小剂量氯吡格雷联合丹皮酚给药对大鼠动-静脉旁路血栓形成影响 与正常组比较,各给药组能明显减少大鼠血栓湿重和干重($P < 0.01$);小剂量氯吡格雷组对血栓形成的抑制能力明显强于丹皮酚组($P < 0.05$),联合给药组抗血栓作用明显强于氯吡格雷小剂量组(3 mg/kg)、氯吡格雷常规剂量

组(6 mg/kg)和丹皮酚组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图1B、表1。

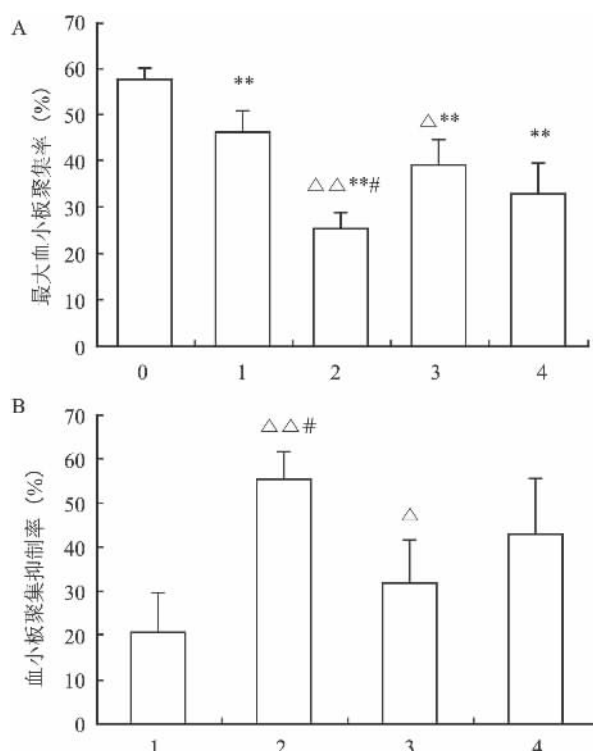


图1 小剂量氯吡格雷联合丹皮酚给药对大鼠血小板聚集影响 ($n = 8 \bar{x} \pm s$)

A: 最大血小板聚集率; B: 血小板聚集抑制率; 0: 正常组; 1: 丹皮酚(50 mg/kg)组; 2: 氯吡格雷(3 mg/kg) + 丹皮酚(50 mg/kg)组; 3: 氯吡格雷(3 mg/kg)组; 4: 氯吡格雷(6 mg/kg)组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与氯吡格雷(6 mg/kg)组比较: # $P < 0.05$; 与丹皮酚组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.3 小剂量氯吡格雷联合丹皮酚给药对小鼠出血、凝血时间和血常规影响 各给药组均能明显延长小鼠出血时间($P < 0.01$),但对凝血时间没有明显影响;小剂量氯吡格雷(4.5 mg/kg)组出血时间明显长于丹皮酚组($P < 0.01$),联合给药组延长出血时间作用明显强于氯吡格雷(9 mg/kg)组和丹皮酚组($P < 0.05$, $P < 0.01$);此外,和其他各组相似,联合给药组对小鼠血常规无明显影响,提示联合给药对小鼠血液系统影响较小,安全性较高。见表2。

表1 小剂量氯吡格雷联合丹皮酚给药对大鼠动-静脉旁路血栓形成影响 ($n = 8 \bar{x} \pm s$)

项目	正常组	丹皮酚组	小剂量氯吡格雷组	氯吡格雷常规剂量组	氯吡格雷 + 丹皮酚组	F 值
给药剂量 (mg/kg)	-	50	3	6	3 + 50	
血栓干重 (mg)	8.6 ± 0.6	6.6 ± 0.5**	5.8 ± 0.7** Δ	5.1 ± 0.8**	4.2 ± 0.5** Δ # $\Delta\Delta$	34.136
血栓湿重 (mg)	35.5 ± 3.0	28.3 ± 2.3**	25.2 ± 2.1** Δ	23.9 ± 3.1**	18.9 ± 2.5** Δ # $\Delta\Delta$	24.030

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与氯吡格雷(3 mg/kg)组比较: ** $P < 0.01$; 与氯吡格雷(6 mg/kg)组比较: # $P < 0.05$; 与丹皮酚组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表2 小剂量氯吡格雷联合丹皮酚给药对小鼠出血、凝血时间和血常规影响($n=10 \bar{x} \pm s$)

项目	正常组	丹皮酚组	小剂量氯吡格雷组	氯吡格雷常规剂量组	氯吡格雷+丹皮酚组	F 值
给药剂量(mg/kg)	—	70	4.5	9	4.5+70	
出血时间(min)	4.3 ± 0.5	20.1 ± 3.8**	54.6 ± 1.7**△△	68.8 ± 3.8**	75.9 ± 6.3**#△△	442.855
凝血时间(s)	222 ± 48	234 ± 36	240 ± 30	261 ± 41	276 ± 43	1.784
红细胞(10^{12} 个/L)	7.3 ± 1.2	7.5 ± 0.9	7.5 ± 1.5	7.1 ± 0.8	6.9 ± 1.6	0.331
血红蛋白(g/L)	115.5 ± 15.3	117.1 ± 18.3	112.5 ± 24.9	114.5 ± 12.5	106.8 ± 9.9	0.256
白细胞(10^9 个/L)	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.5	0.8 ± 0.6	1.0 ± 0.3	1.462
血小板(10^{10} 个/L)	78.9 ± 17.1	80.2 ± 21.5	79.7 ± 14.8	76.4 ± 23.4	75.9 ± 19.4	2.043

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与氯吡格雷(9 mg/kg)组比较: # $P < 0.05$; 与丹皮酚组比较: △△ $P < 0.01$

3 讨论

氯吡格雷属于前体药物,在肠道吸收后,约有85%被肝脏羧酸酯酶^[9]转化成无活性代谢物,剩下15%借助肝药酶 CYP1A2、CYP2C19 和 CYP2B6 代谢成中间体 2-氧化-氯吡格雷,该中间体被 CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 和 CYP3A5 等酶代谢成活性代谢物 R-130964。R-130964 可抑制血小板 ADP 受体与 ADP 结合,阻止 ADP 介导纤维蛋白原与糖蛋白 GP II b/III a 受体结合,从而抑制血小板相互聚集。

目前氯吡格雷已被广泛用于心脑血管疾病的治疗,但常规剂量^[2]存在较为突出的消化道不良反应和明显的抵抗现象^[4],主要表现在部分患者对药物敏感性低甚至无反应。Prabhakaran et al^[2]发现氯吡格雷标准剂量下给药,患者发生抵抗比例高达 51.9%,该现象与患者体内血小板聚集抑制率明显低于正常反应者有关^[10]。研究^[3]显示氯吡格雷抵抗现象除与肝药酶编码基因和 ADP 受体基因多态性、体内药物相互作用以及胰岛素抵抗等因素有关之外,还与其肠道吸收受 P-糖蛋白干扰有关。Taubert et al^[11]利用 Caco-2 细胞模型证实氯吡格雷是 P-糖蛋白作用底物,随后 Lee et al^[12]研究也发现 P-糖蛋白抑制剂环孢素 A 与氯吡格雷联合给药明显提高氯吡格雷在大鼠体内生物利用度,这些研究提示肠道上皮细胞吸收的氯吡格雷部分被 P-糖蛋白重新外排至肠腔,造成原型药进入肝脏代谢以及活性代谢物含量水平相应减少。

临床研究^[13]表明氯吡格雷负荷剂量从 300 mg 提高到 600 mg 可提高患者血浆中活性代谢物含量,部分改善抵抗现象,但当剂量增至 900 mg 时,体内活性代谢物含量以及抵抗现象与 600 mg 比较差异无显著性,提示单纯提高给药剂量并不能很好改善抵抗现象。另外,目前临床采用的氯吡格雷和阿司匹林联合给药虽然可以短期内提高疗效,但存在消化道不良反应发生频率升高危险。研究^[14]显示阿

司匹林长期应用可诱导多药耐药基因 MDR1 表达并抑制氯吡格雷在肠道吸收。丹皮酚来源于中药牡丹根皮,安全性高,具有抗血小板活性。已有研究^[6,15]表明丹皮酚抗血小板聚集的作用机制与氯吡格雷不同。一方面,丹皮酚抗血小板聚集活性与阻断血小板膜上 Ca^{2+} 通道,抑制 Ca^{2+} 内流并降低血小板内 Ca^{2+} 浓度水平有关;另一方面,丹皮酚抑制花生四烯酸代谢,降低血栓素 A2 含量,是其抗血小板聚集活性重要机制之一。此外,丹皮酚还可抑制 P-糖蛋白活性^[7]。因此该研究初步考察小剂量氯吡格雷和丹皮酚的协同效应。氯吡格雷治疗栓塞性心血管疾病临床推荐剂量为(75 mg/d),折算成大鼠和小鼠的等效剂量近似为 6 mg/kg 和 9 mg/kg。该研究显示丹皮酚抗血小板聚集活性弱于小剂量氯吡格雷,但两者联合给药的抗血小板聚集活性却明显强于氯吡格雷常规剂量组,提示联合给药组强大的抗血小板聚集活性可能主要与丹皮酚抑制肠道 P-糖蛋白表达,改变氯吡格雷在大鼠体内的吸收以及代谢过程有关,具体机制有待进一步研究阐明。

综上所述,小剂量氯吡格雷和丹皮酚联合给药抗血小板聚集活性明显强于氯吡格雷,两者联合给药具有良好的临床应用前景。

参考文献

- [1] 许克,余昌俊,余康敏,等. 下肢动脉硬化闭塞症药物治疗过程中 CD62P、CD63 的改变及其意义[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(7): 693-5.
- [2] Prabhakaran S, Wells K R, Lee V H, et al. Prevalence and risk factors for aspirin and clopidogrel resistance in cerebrovascular stenting[J]. AJNR Am J Neuroradiol 2008, 29(2): 281-5.
- [3] Luchessi A D, Silbiger V N, Cerda A, et al. Increased clopidogrel response is associated with ABCC3 expression: a pilot study[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(3-4): 417-21.
- [4] Leontiadis G I, Yuan Y, Howden C W. The interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel and upper gastrointestinal bleeding[J]. Gastrointest Endosc Clin N Am, 2011, 21(4): 637-56.

(下转第 784 页)

with baseline values were significantly reduced ($P < 0.05$). However, the systolic and diastolic blood pressure difference between the two groups was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Early data analysis suggests that most of patients enrolled in this study are from high-risk population, and randomly assigned to two treatment groups. Amlodipine-based antihypertensive combination regimens achieves satisfactory blood pressure control rate. During the first year of treatment, the blood pressure control rate with the double combo of amlodipine and amiloride is much higher than the group with the double combo of amlodipine and aelmisartan.

Key words amlodipine; telmisartan; amiloride; essential hypertensive; drug therapy; combination

(上接第 779 页)

- [5] Lortie E, Girard F, Boudreault D, et al. Clopidogrel induces an acute hemostatic deficit and increases intra abdominal bleeding in rabbits [J]. *Thromb Res*, 2009, 123(6): 869–73.
- [6] Zhang J Y, Cao Y X, Weng W L, et al. Paeonol induces vasodilatation in rat mesenteric artery *via* inhibiting extracellular Ca^{2+} influx and intracellular Ca^{2+} release [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(7): 510–6.
- [7] 孙慧君, 王晓琦, 于丽敏, 等. 丹皮酚对 MDR 逆转作用的研究 [J]. *解剖科学进展* 2000 6(1): 59–62.
- [8] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理学实验方法学 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社 2010: 1068–71.
- [9] Hagihara K, Kazui M, Kurihara A, et al. A possible mechanism for the differences in efficiency and variability of active metabolite formation from thienopyridine antiplatelet agents, prasugrel and clopidogrel [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37(11): 2145–52.
- [10] 李磊, 褚俊. 不同剂量氯吡格雷对急性冠脉综合征患者的氯吡格雷抵抗及超敏 C 反应蛋白、P 选择素水平的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2012 47(5): 558–61.
- [11] Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 80(5): 486–501.
- [12] Lee J H, Shin Y J, Oh J H, et al. Pharmacokinetic interactions of clopidogrel with quercetin, telmisartan, and cyclosporine A in rats and dogs [J]. *Arch Pharm Res* 2012 35(10): 1831–7.
- [13] von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G, et al. Absorption, metabolism, 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 Clopidogrel Effect) Trial [J]. *Circulation*, 2005, 112(19): 2946–50.
- [14] Jung K H, Chu K, Lee S T, et al. Prolonged use of aspirin alters human and rat intestinal cells and thereby limits the absorption of clopidogrel [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 90(4): 612–9.
- [15] Lin H C, Ding H Y, Ko F N, et al. Aggregation inhibitory activity of minor acetophenones from *Paeonia* species [J]. *Planta Med*, 1999, 65(7): 595–9.

The study of antiplatelet aggregation activity of small dose clopidogrel combined with paeonol

Sun Aihua^{1,2}, Zhou Birong¹

(¹Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Internal Emergency Medicine, The Affiliated Hefei Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230011)

Abstract Objective To investigate the antiplatelet aggregation activity of clopidogrel (small dose) combined with paeonol. **Methods** Antiplatelet aggregation activity was evaluated by platelet aggregation induced by adenosine diphosphate *in vitro*, the weight of arteriovenous bypass thrombosis in rats and bleeding time in mice. **Results** The combination significantly inhibited platelet aggregation, and reduced formation of arteriovenous bypass thrombosis as well as prolonged the bleeding time. Moreover, the activity of combined group was more superior to clopidogrel and paeonol, respectively. **Conclusion** The antiplatelet aggregation activity of the combination is better than clopidogrel, which has bright prospects in clinical applications.

Key words clopidogrel; paeonol; platelet; thrombus