

基础研究

奥美拉唑对人脐静脉内皮细胞全基因表达谱的影响及机制分析

刘先锋^{1,2}, 卢学春¹, 范利¹, 高燕¹, 马聪¹, 罗芸³解放军总医院¹南楼血液科,³老年病研究所细胞生物学研究室,北京 100853;²解放军第401医院干部病房三科,山东青岛 266071

摘要:目的 研究奥美拉唑对体外培养人脐静脉内皮细胞(EA.hy926)基因表达谱的影响,探讨奥美拉唑对内皮细胞作用的分子机制。方法 10^{-5} mol/L 奥美拉唑与人脐静脉内皮细胞株共培养 48 h,运用 Affymetrix U133 plus 2.0 全基因组表达芯片,检测奥美拉唑对人脐静脉内皮细胞基因表达谱的影响,分子注释系统 MAS3.0 软件进行聚类分析。RT-PCR 验证基因表达谱结果,Western blotting 验证相关蛋白水平的变化。结果 奥美拉唑作用内皮细胞 48 h 后,基因芯片分析筛选出差表达大于 1.5 倍的基因 282 个,其中上调基因 236 个,下调基因 46 个,包括转录调节、炎症反应、免疫反应、细胞粘附、抗凋亡、信号转导等相关基因,RT-PCR 和 Western blotting 结果与基因芯片结果一致。结论 奥美拉唑在基因水平通过多条通路调节内皮功能。

关键词:奥美拉唑;内皮细胞;生物信息学;基因表达

中图分类号:R975.6; R34 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)04-0472-05

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.04.007 <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120406.1030.001.html>

Effect of omeprazole on gene expression profile of human umbilical vein endothelial cell line and bioinformatics analysis

LIU Xianfeng^{1,2}, LU Xuechun¹, FAN Li¹, GAO Yan¹, MA Cong¹, LUO Yun³¹Department of Geriatric Hematology, ³Laboratory of Cell Biology, Institute of Gerontology and Geriatrics, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; ²401 Hospital of PLA, Qingdao 266071, China

Abstract: Objective To characterize the effect of omeprazole on the spectrum of gene expression in the cultured human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) line (EA.hy926), and explore the underlying molecular mechanism. **Methods** Affymetrix U133 plus2.0 oligonucleotide microarray was used to detect the alteration in the gene expression profiles induced by 1×10^{-5} mol/L omeprazole in HUVECs. Real-time PCR was employed to verify the results of selected differentially expressed genes, and Western blotting was performed to test the expression levels of the related proteins. **Results** A total of 282 genes were found to show at least 1.5-fold changes in EA.hy926 cells after treatment with omeprazole for 48 h, including 236 up-regulated and 46 down-regulated ones. These genes were involved in the regulation of transcription, inflammatory response, immune response, cell adherence, anti-apoptosis, and signal transduction. **Conclusion** Omeprazole modulates the function of endothelial cells by regulating the gene expression profiles of multiple pathways.

Key words: omeprazole; endothelial cells; gene expression profile; bioinformatics

奥美拉唑作为质子泵抑制剂(PPIs)的代表,广泛用于消化道溃疡、反流性食管炎等酸相关性十二指肠疾病的治疗,也被用于预防抗血小板药物引起的消化道出血,后者由于奥美拉唑可能与某些抗血小板如氯吡格雷产生相互作用而受到关注。在分析奥美拉唑对心肌梗死患者预后影响的研究中,有作者发现PPIs增加了心血管事件的发生,与氯吡格雷无关,具体机制不明确^[1]。我们假设氯吡格雷对血管内皮细胞的基因表达产生影响,

进而影响了血管内皮功能。以往奥美拉唑对基因影响的研究,集中在胃粘膜上皮细胞等消化道细胞^[2-3],缺少对血管内皮细胞的研究,个别研究也只针对单个基因表达的影响^[4],缺乏奥美拉唑对血管内皮细胞全基因表达谱的研究。本研究拟采用人类全基因表达谱芯片来检测奥美拉唑作用后人脐静脉细胞基因表达的改变,并通过进一步的筛选和分析,初步探索奥美拉唑对血管内皮细胞作用的分子机制。

收稿日期:2012-02-14

基金项目:国家科技支撑计划项目(2009BAI86B04)

Supported by National plan for Science and Technology Research (2009BAI 86B04).

作者简介:刘先锋,在读博士研究生,E-mail: liuxianfeng1970@163.com

通讯作者:范利,博士,教授,电话:010-66939866

1 材料和方法

1.1 奥美拉唑母液配制

奥美拉唑标准品(中国药品生物制品检定所)溶于二甲基亚砜(DMSO, Sigma),配成浓度为 10^{-2} mol/L 的母液,4℃保存,实验前用DMEM培养液稀释至工作浓度。

1.2 人脐静脉内皮细胞培养

人脐静脉内皮细胞株 EA.hy926(中国科学院细胞库), ATCC 配方的 DMEM 培养基[含 10%胎牛血清(Giboco), 100 U/ml 青霉素(华北制药)和 100 mg/ml 链霉素(大连美罗)]贴壁培养, 细胞接种密度为 0.5×10^6 /ml, 条件为 37 °C、5% CO₂, 每 2 d 更换培养液, 细胞传至 4~5 代用于实验。细胞融合达 60% 时更换培养液, 加入药物, 试验组培养液中加入 1×10^{-5} mol/L 奥美拉唑, 对照组培养液中加入 DMSO, 培养液中 DMSO 终浓度 0.01 mol/L。细胞培养 48 h 后收获, 用于实验。所有试验分组均在随机时间点重复 3 次。

1.3 DNA 样品准备及芯片检测

收集试验组和对照组培养 48 h 后的 EAhy.926 细胞, 用 TRIZOL (Invitrogen Life Technologies) 提取总 RNA。先经过 TEST 测试芯片进行标记样品的质控, 再进行 Affymetric Human Genome U133 plus 2.0 芯片(Affymetrix)的检测, 按照 Affymetrix 的基因表达芯片操作指南进行, 由北京博奥生物有限公司(博奥生物有限公司暨生物芯片北京国家工程研究中心)提供技术支持。简要操作过程如下: 纯化 RNA (RNeasy MiniKit, Qiagen) 并定量检测总 RNA 浓度和 D₂₆₀/D₂₈₀ 值, 以 5 µg 左右等量总 RNA 为模板合成纯化 cDNA (Affymetrix one-cycle cDNA Synthesis Kit; Affymetrix GeneChip Sample Cleanup Module), 以 cDNA 为模板合成 cRNA

(GeneChip IVT Labeling Kit) 并纯化, 定量检测后与芯片杂交(Affymetrix Hybridization Oven 640)。芯片在清洗工作站(GeneChip Fluidics Station450, Affymetrix)洗脱后, 用 Gene Array Scanner3000 7G(Affymetrix)扫描检测信号。试验组和对照组分别进行 3 次生物学重复, 取 3 张芯片均表达的基因的交集进行下一步数据分析。

1.4 实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)

为了进一步验证芯片杂交结果的可信性, 选取原癌基因 FOS、早期生长反应因子-1(EGR1)、血小板反应蛋白 1 (THBS1)、域和金属蛋白酶域蛋白 1 (ADAMTS-1) 和趋化因子配体 2 (CXCL2) 进行 RT-PCR 验证。简要操作步骤如下: 用 TRIZOL 提取对照组和试验组细胞的总 RNA (R6934, Omega), 紫外分光光度仪 (GeneQuan Pro, GE) 定量。取 2 µg 总 RNA 进行 DNaseI 处理 (EN0521, Fermentas), 然后反转录为 cDNA (K1622, Fermentas), 同时扩增 β-actin 作为内参照, 所有引物均参照 Genebank 提供的序列, 由北京信诺金达公司合成(各引物序列见表 1)。qPCR 反应体系按照 10 µl qPCR Mix (K0222, Fermentas), 0.4 µl 上游/下游引物 (5 µmol/L), 1 µl cDNA 和 8.2 µl ddH₂O 进行配置, 在定量 PCR 仪上进行反应 (Applied Biosystems ABI PRISM® 7300)。通过标准曲线对样品中目的基因和内参进行定量, 然后求得相对表达量, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算实验原始数据, 得到统计的表达量变化大于 1 为表达量上调, 小于 1 为表达量下调。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab.1 Primers used for RT-PCR

基因	正义	反义	Gene-bank 号
EGR1	GCGGCAGAAGGACAAGAAAGCAGA	GGGACGGGTAAAGAGGTAGCA	NM_001964
ADAMTS1	CACCAACATCGAAGTGAAACAGC	TGCTCTAAGGTGGACAAAAGTG	NM_006988
FOS	CCGAGCGCAGAGCATTGGCA	CCGCTTGGAGTGATCAGTCAG	NM_005252
CXCL2	CATCCAAAGTGTGAAGGTGAA	GGTTGAGACAAGCTTTCTGCC	NM_002089
THBS1	CTGGACTCGCTGTAGGTTATGA	GGACTGGTAGCCAAAGACAAATC	NM_003246

1.5 Western blot 检测部分蛋白表达

分别采用天然膜蛋白抽提试剂盒 (ProteoExtract™, MERCK) 和天然浆/核蛋白分离抽提试剂盒 (NucBuster™ Protein Exaction Kit, MERCK) 提取胞膜或胞浆/核蛋白, 按试剂操作说明操作。4 °C、1000 g 离心 5 min, 上清液作为内参。按照每泳道 20 µg 蛋白进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 将蛋白质条带转移至聚偏乙烯 (PVDF) 膜上; 5% 脱脂奶粉 PBS 溶液用于封闭和稀释一抗兔抗人多克隆抗体 (1: 1000, Alpha Diagnostic Intemational), 封闭 1 h 后, 一抗 (1: 2000) 4 °C 过夜; 用 1×PBST 溶液洗膜 3 次, 各 15 min。酶标二抗 (1: 10 000, Goat Anti Rabbit IgG/HRP, SCBT) 室温避光孵育 1 h, 1×PBST 溶液洗膜 3 次, 各 15 min。采用

Odyssey 双色红外激光成像系统进行扫描并计算条带的积分吸光度值, 以目的条带灰度值与对应 GAPDH 的灰度值之比作为目的蛋白表达强弱的指标。

1.6 统计学处理

1.6.1 差异表达基因筛选 采用图像分析软件 LuxScan3.0 (capitalbio) 对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号, 然后对芯片上的数据进行归一化处理; 每组样品均有 3 次生物学重复, 采用 SAM 软件进行差异表达基因的分析。筛选标准: $q \leq 5\%$, 同时差异倍数在 1.5 倍以上, 即 Fold Change ≥ 1.5 或 Fold Change ≤ 0.67 。

1.6.2 基因聚类分析 采用分子功能注释系统 3.0 (MAS3.0, capitalbio) 对差异表达基因进行聚类分析。

2 结果

2.1 细胞形态

在倒置相差显微镜下观察, 10^{-5} mol/L 奥美拉唑或

DMSO(0.01%)对细胞生长无明显影响, 48 h后, 两组细胞均呈梭形贴壁生长, 细胞边界清楚(图1)。

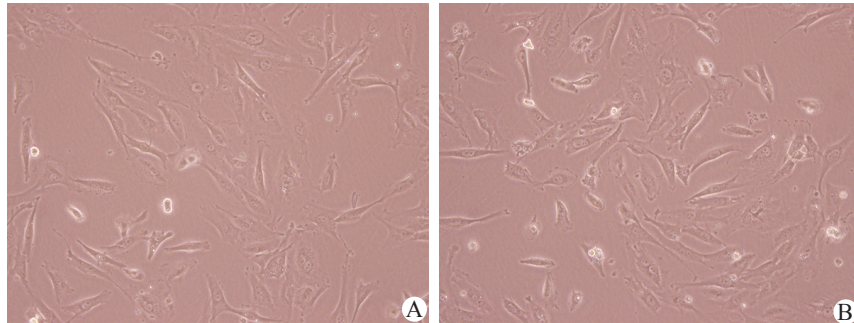


图1 HUVECs细胞形态

A: 试验组; B: 对照组

Fig.1 Morphology of HUVECs (Original magnification: $\times 20$).

2.2 基因芯片结果

SAM软件对Affimetrix U133 plus2.0全基因表达谱结果进行筛选发现, 与DMSO对照相比, 10^{-5} mol/L 奥美拉唑处理人脐静脉内皮细胞差异表达1.5倍以上基因282个, 其中上调236个, 下调46个。差异表达2倍以上基因(表2)。GO分析显示上调基因主要集中在细胞过程、生理过程、生物调节、生物过程调节、代谢、多细胞生物过程及结合、发育等方面发挥作用; 下调基因则主要集中在细胞过程、生理过程、生物调节、生物过程调节、细胞组成成分、结合及代谢等方面。进一步以分子注释系统(MAS)3.0对差异表达基因GO生物学过程富集分析显示, 高表达基因集中在依赖DNA的转录调节、炎症反应、转录、RNA聚合酶II启动子转录正调控、细胞增殖负调控、发育、细胞粘附、免疫反应、骨成型蛋白负调控和神经系统发育负调控等过程; 低表达基因集中在染色体修饰、转录、蛋白质分解、转录调节和抗凋亡等过程(表3)。KEGG Pathway分析显示上调基因集中在TGF- β 、细胞因子间受体相互作用、Jak-STAT、Toll样受体等信号通路, 下调基因则集中在细胞因子间受体相互作用、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等通路(表4)。

2.3 RT-PCR验证基因芯片结果

验证的5个基因均有差异表达, 分别是FOS(4.81)、EGR1(19.52)、ADAMTS1(2.35)、THBS1(3.16)、CXCL2(1.36), 与芯片结果一致, 表明芯片结果可靠。

2.4 Western blotting结果

图2示: 试验组EGR1、FOS蛋白表达上调, 而APC表达下调, GAPDH为内参。

3 讨论

血管内皮在调节血管张力、维持血管正常功能等方面起着重要作用, 内皮功能失常被认为是动脉硬化形成、

表2 差异表达2倍以上基因列表

Tab.2 List of genes with over 2-fold changes

探针号	差异表达倍数	基因
202672_s_at	2.5312	ATF3
201531_at	2.4033	ZFP36
215033_at	2.3368	TM4SF1
204926_at	2.2769	INHBA
216248_s_at	2.2714	NR4A2
222486_s_at	2.2215	ADAMTS1
209189_at	2.1646	FOS
227404_s_at	2.1389	EGR1
231513_at	2.1305	EST
1553106_at	2.1095	C5orf24
230333_at	2.1011	EST
240798_at	2.0829	EST
206765_at	2.0763	KCNJ2
242450_at	2.031	RGMB
235419_at	2.0307	EST
209774_x_at	2.0252	CXCL2
1554966_a_at	2.0248	FILIP1L
201694_s_at	2.0004	EGR1
221496_s_at	0.4955	TOB2
1558048_x_at	0.4829	EST
1553313_s_at	0.4808	SLC5A3
214079_at	0.4566	DHRS2

斑块进展及动脉硬化并发症发生的早期重要征象^[5]。本实验采用Affymetrix Gene Chip U133 plus 2.0芯片检测人脐静脉内皮细胞系EA.hy926细胞在奥美拉唑作用下全基因表达谱的变化, 发现奥美拉唑作用于HUVECs 48 h后, 差异表达基因涉及多个生物过程和多条通路, 其中包括转化生长因子(TGF- β)通路和炎症反应过程。

表3 GO生物学过程富集分析

Tab.3 GO biological process analysis (Change fold>1.5)

生物学过程分类	基因数	P值	差异表达基因
上调基因			
依赖DNA的转录调节	18	3.7e-17	ATF3, EGR1, NR4A2, FOSB, ZBTB24, HES1, SMAD9, SMAD6, SMAD7等
炎症反应	10	4.2e-16	FOS, CXCL2, IL6, CXCL1, CCL2, TLR4, S1PR3, ANXA1, AOX1, IL8
转录	15	8.8e-13	NR4A2, ZBTB24, SMAD9, MORF4L2, KLF4, SMAD6, SMAD7, NFKBIZ等
RNA聚合酶II启动子转录正调控	7	2.2e-11	INHBA, FOS, EGR1, IL6, HES1, KLF4, LIF
细胞增殖负调控	7	6.2e-11	ADAMTS1, PTGS2, IL6, CXCL1, MDM2, KLF4, IL8
发育	13	8.5e-11	FOSB, SPRY2, EMP1, ATOH8, FMN2, MGP, PLXNA2, SPRY4, TRERF1等
细胞粘附	8	2.5e-9	RGMB, THBS1, COL4A6, HES1, COL5A1, CCL2, PCDH10, NID1
免疫反应	8	7.2e-9	CXCL2, THBS1, CXCL1, IL7R, SMAD6, GEM, IL8, LIF
骨成型蛋白负调控	3	3.0e-8	SMAD6, SMAD7, SMURF1
神经系统发育负调控	7	1.0e-7	INHBA, FOS, CXCL1, ZEB2_HUMAN, ATOH8, RAPGEF5, TPP1等
下调基因			
染色质修饰	3	0.0000015	CHD4, BANP, TBL1XR1
转录	5	0.0000067	SOX4, BANP, PPP1R10, C14orf43, TBL1XR1
蛋白质分解	3	0.000027	UBA6, TBL1XR1, WSB1
依赖DNA的转录调节	4	0.00010	NFAT5, BANP, C14orf43, TBL1XR1
抗凋亡	2	0.00018	HSPA1B, HSP90B1

表4 KEGG pathway富集分析结果

Tab.4 KEGG pathway (Change fold>1.5)

通路分类	基因数	P值	差异表达基因
上调基因			
TGF-β 信号通路	6	9.9e-8	INHBA, THBS1, SMAD9, SMAD6, SMAD7, SMURF1
细胞因子间受体相互作用	8	3.8e-7	INHBA, IL6, CXCL2, CXCL1, IL7R, CCL2, IL8, LIF
Jak-STAT信号通路	6	0.0000030	SOCS3, IL6, SPRY2, IL7R, SPRY4, LIF
Toll样受体信号通路	4	0.00014	FOS, IL6, TLR4, IL8
膀胱癌	3	0.00017	THBS1, MDM2, IL8
泛素介导蛋白水解	4	0.00045	SOCS3, HERC4, MDM2, SMURF1
幽门螺杆菌感染上皮细胞信号传导	3	0.00077	CXCL1, HBEGF, IL8
粘多糖降解	2	0.0011	ARSB, IDS
细胞外基质-受体相互作用	3	0.0013	THBS1, COL4A6, COL5A1
硫酸软骨素生物合成	2	0.0014	CSGALNACT2, CHST11
下调基因			
细胞因子间受体相互作用	3	0.00039	MET, PDGFA, ACVR2B
丝裂原活化蛋白激酶信号通路	3	0.00045	PDGFA, HSPA1A, HSPA1B
黑色素瘤	2	0.00069	MET, PDGFA
前列腺癌	2	0.0011	PDGFA, HSP90B1
抗原处理和提呈	2	0.0011	HSPA1A, HSPA1B

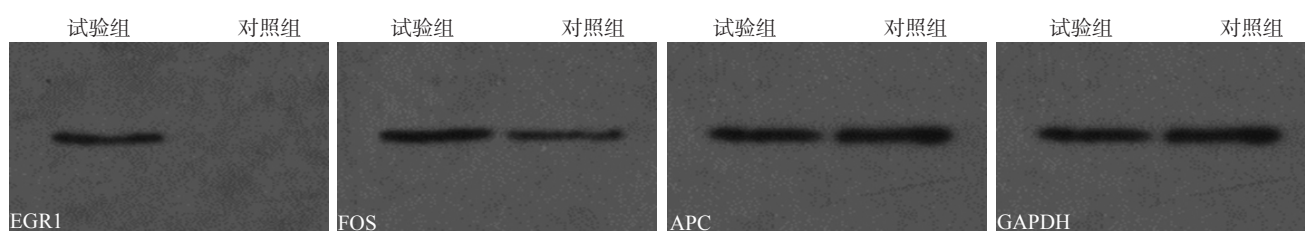


图2 Western blot检测EGR1、FOS和APC蛋白表达

Fig.2 Western blotting of EGR1, FOS and APC.

TGF- β 通路:TGF- β 介导损伤修复、细胞增殖和免疫反应,作为一种免疫调节因子和重要的致纤维化因子在动脉粥样硬化中的作用引起了人们的广泛关注,目前普遍认为TGF- β 1是动脉粥样硬化的保护因子^[6]。THBS1是TGF β 1主要的激活因子^[7]。通过激活TGF- β 1,THBS1能抑制心肌梗死边缘炎症的扩展^[8]。除了激活TGF- β 1外,THBS1还能高度抑制血管新生,它能阻断生长因子诱导的毛细血管内皮细胞的增殖、移动和管腔形成,同时加强PDGF诱导的平滑肌细胞的增殖和迁移^[9]。奥美拉唑对TGF- β 通路的影响需要关注。

炎症反应:以往研究发现,奥美拉唑在幽门螺杆菌感染时可能减少中性粒细胞和内皮细胞粘附^[10],具有抗炎等作用^[11-12],然而在本研究中,我们发现与体内血药浓度相当的奥美拉唑在体外能引起内皮细胞炎症性因子表达增加。结果差异可能是由于本研究细胞处于正常状态,而上述研究细胞处于炎症状态。合用奥美拉唑和氯吡格雷的患者心血管风险增高已多有报道^[13-16],对此多从药代动力学角度解释两者之间的相互作用。但有作者发现,接受双联抗血小板治疗的PCI患者,同时服用奥美拉唑者血IL-6水平明显高于未服奥美拉唑者,12个月随访期内前者非致死性心血管事件也高于后者,提示奥美拉唑增加了患者的炎症反应,作者推测药物相互作用降低了氯吡格雷的抗炎作用^[17]。最近的研究更发现,PPIs增加了服用阿司匹林的心梗病人的心血管事件风险^[18]。丹麦的一项全国范围队列研究发现,奥美拉唑等PPIs在不使用氯吡格雷的情况下也能增加心血管风险^[1]。本研究中发现奥美拉唑引起血管内皮细胞炎症因子的上调,与这一临床研究相互印证,从而揭示奥美拉唑作用于心血管系统的可能存在新的分子机制,为进一步研究提供了试验基础。

本研究的不足之处在于只研究了单一浓度(10^{-5} mol/L)对正常状态下内皮细胞基因表达谱的影响,虽然药物浓度接近体内血药浓度,但体外研究未能完全模拟心血管疾病状态下的细胞状态。

总之,通过本研究发现,奥美拉唑通过多条途径对血管内皮细胞发挥作用,尤其是对TGF- β 通路和炎症因子的影响,可能与奥美拉唑对心血管系统的作用密切相关。

参考文献:

[1] Charlot M, Ahlehoff O, Norgaard ML, et al. Proton-pump inhibitors are associated with increased cardiovascular risk Independent of clopidogrel use: a nationwide cohort study [J]. *Ann Intern Med*, 2010, 153(6): 378-86.

[2] Nørsett KG, Laegreid A, Kusnierczyk W, et al. Changes in gene expression of gastric mucosa during therapeutic acid inhibition [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 20(7): 613-23.

[3] Carosino M, Procino G, Casavola V, et al. The cultured human gastric cells HGT-1 Express the principal transporters involved in

acid secretion [J]. *Pflugers Arch*, 2000, 440(6): 871-80.

- [4] Becker JC, Grosser N, Waltke C, et al. Beyond gastric acid reduction: proton pump inhibitors induce heme oxygenase-1 in gastric and endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(3): 1014-21.
- [5] Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(2): 168-75.
- [6] Cipollone F, Fazia M, Mincione G, et al. Increased expression of transforming growth factor-beta1 as a stabilizing factor in human atherosclerotic plaques [J]. *Stroke*, 2004, 35(10): 2253-7.
- [7] Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 *in vivo* [J]. *Cell*, 1998, 93(7): 1159-70.
- [8] Frangogiannis NG, Ren G, Dewald O, et al. Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts [J]. *Circulation*, 2005, 111(22): 2935-42.
- [9] Yamauchi M, Imajoh-Ohmi S, Shibuya M. Novel antiangiogenic pathway of thrombospondin-1 mediated by suppression of the cell cycle [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(9): 1491-7.
- [10] Suzuki M, Mori M, Fukumura D, et al. Omeprazole attenuates neutrophil-endothelial cell adhesive interaction induced by extracts of *Helicobacter pylori* [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1999, 14(1): 27-31.
- [11] Yoshida N, Yoshikawa T, Tanaka Y, et al. A new mechanism for anti-inflammatory actions of proton pump inhibitors--inhibitory effects on neutrophil-endothelial cell interactions [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000, (Suppl): 74-81.
- [12] Hashioka S, Klegeris A, McGeer PL. Proton pump inhibitors exert anti-inflammatory effects and decrease human microglial and monocytic THP-1 cell neurotoxicity [J]. *Exp Neurol*, 2009, 217(1): 177-83.
- [13] 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): 713-8.
- [14] Ho PM, Maddox TM, Wang L, et al. Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome [J]. *JAMA*, 2009, 301(9): 937-44.
- [15] Aubert R, Epstein RS, Teagarden JR, et al. Proton pump inhibitors effect on clopidogrel effectiveness: the Clopidogrel Medco Outcomes Study [J]. *Circulation*, 2008, 118: S815.
- [16] Pezalla E, Day D, Pulliathath I. Initial assessment of clinical impact of a drug interaction between clopidogrel and proton pump inhibitors [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52(12): 1038-9.
- [17] Hudzik B, Szkodzinski J, Danikiewicz A, et al. Effect of omeprazole on the concentration of interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 in patients receiving dual antiplatelet therapy after percutaneous coronary intervention [J]. *Eur Cytokine Netw*, 2010, 21(4): 257-63.
- [18] Charlot M, Grove EL, Hansen PR, et al. Proton pump inhibitor use and risk of adverse cardiovascular events in aspirin treated patients with first time myocardial infarction: nationwide propensity score matched study [J]. *BMJ*, 2011, 342: d2690.

(编辑:黄开颜)