

文章编号 1006-8147(2014)05-0350-04

论 著

## 双联抗血小板药物对大鼠小肠的损伤及其机制

田珺琪<sup>1</sup>, 张志广<sup>1</sup>, 李 熳<sup>1</sup>, 刘 霞<sup>1</sup>, 张雪莲<sup>1</sup>, 陆 伟<sup>2</sup>

(1.天津医科大学第二医院消化科, 天津 300211; 2.天津市第二人民医院消化科, 天津 300192)

**摘要** 目的:探讨双联抗血小板药物对大鼠小肠的损伤及其机制。方法:SD大鼠80只随机分为4组,每组20只:阴性对照组、阿司匹林组、氯吡格雷组、阿司匹林联合氯吡格雷组(双抗组),分别予生理盐水、阿司匹林(10.41 mg/kg)、氯吡格雷(7.81 mg/kg)、阿司匹林(10.41 mg/kg)联合氯吡格雷(7.81 mg/kg)灌胃1次/d,共14 d。所有大鼠于末次给药后手术,观察小肠的损伤情况;免疫组化法测定小肠黏膜细胞肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的表达水平。结果:(1)各实验组大鼠小肠的损伤程度均高于对照组( $P<0.01$ ),且阿司匹林组高于氯吡格雷组( $P<0.01$ ),双抗组最高( $P<0.01$ );(2)各实验组大鼠小肠黏膜TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 较对照组均呈明显高水平表达( $P<0.05$ ),且阿司匹林组高于氯吡格雷组( $P<0.05$ ),双抗组最高( $P<0.05$ )。结论:常规剂量抗血小板药物可造成大鼠小肠损伤,且联合用药较单一用药损伤程度重,同时其TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 表达增强,提示这种变化可能参与了小肠损伤。

**关键词** 抗血小板药物;阿司匹林;氯吡格雷;小肠损伤;TNF- $\alpha$ ;IL-1 $\beta$ ;大鼠

中图分类号 R574.5

文献标志码 A

### Dual antiplatelet drugs-induced small intestinal injury and its possible mechanism in rats

TIAN Jun-qi<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-guang<sup>1</sup>, LI Man<sup>1</sup>, LIU Xia<sup>1</sup>, ZHANG Xue-lian<sup>1</sup>, LU Wei<sup>2</sup>

(1.Department of Gastroenterology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2.Department of Gastroenterology, Tianjin Second Peoples' Hospital, Tianjin 300192, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate dual antiplatelet drugs-induced small intestinal injury and its possible mechanism in rats. **Methods:** Eighty SD rats were randomly divided into four groups, with  $n=20$  in each group: negative control group, aspirin group, clopidogrel group and clopidogrel combined aspirin group. Four groups were given normal saline, aspirin (10.41 mg/kg), clopidogrel (7.81 mg/kg) and clopidogrel (7.81 mg/kg) combined aspirin (10.41 mg/kg) respectively as intragastric administration once a day for 14 days. All rats received operation after the final intragastric administration, then small intestinal lesions were observed, and the expression level of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in small intestinal mucosal cells was detected by immunohistochemistry method. **Results:** (1) Small intestinal lesions in rats of experiment groups were more serious than the control group ( $P<0.01$ ), the aspirin group was more serious than the clopidogrel group ( $P<0.01$ ), and the double antiplatelet group had the most serious damage ( $P<0.01$ ); (2) The expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  on small intestinal mucosa in all experiment group rats were higher than those in the control group ( $P<0.05$ ), the aspirin group was higher than the clopidogrel group ( $P<0.05$ ), and the double antiplatelet group had the highest levels ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Routine dose of antiplatelet drugs can cause small intestinal injury in rats, and drug combination aggravates the small intestinal injury compared with that of single drug. Furthermore, the expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are higher, which may lead to small intestinal mucosal injury.

**Key words** antiplatelet drugs; aspirin; clopidogrel; small intestinal injury; TNF- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ ; rat

抗血小板药物目前广泛用于预防及治疗心血管疾病,已经逐渐成为临床上用于治疗血栓、栓塞的基石<sup>[1-3]</sup>。大量临床研究已证实抗血小板治疗对血栓栓塞性疾病一级和二级预防的益处<sup>[4]</sup>。但由于抗血小板药物的广泛应用,其消化道不良事件也日益增多<sup>[5-7]</sup>。近年来,随着胶囊内镜和双气囊小肠镜检查的普及,越来越多的研究不再局限于其对胃的损伤,而开始关注并已证实抗血小板药物所致小肠损

伤也不在少数。已有研究发现在使用非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)患者中,NSAIDs相关的小肠损伤程度甚至超过了胃损伤<sup>[8]</sup>。本实验旨在大鼠体内研究抗血小板药物对小肠的损伤,并探讨可能机制,以期为临床的预防及治疗提供实验室依据。

### 1 材料与方法

1.1 材料 健康SD大鼠80只(天津医科大学药学院动物房提供);阿司匹林肠溶片(拜耳医药保健有限公司);氯吡格雷片(天津腾麟发展有限公司);即用型SP免疫组化通用试剂盒(天津市津脉基因测

基金项目 天津市卫生局科技基金资助项目(07KG8)

作者简介 田珺琪(1988-),女,硕士在读,研究方向:消化系统疾病;  
通信作者:陆伟, E-mail: Luwei1966@126.com。

绘技术有限公司);兔抗大鼠多克隆抗体 TNF- $\alpha$  抗体、兔抗大鼠多克隆抗体 IL-1 $\beta$  抗体(武汉博士得生物工程有限公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 动物分组 将 80 只大鼠随机分为 4 组,每组 20 只。A 组:阴性对照组;B 组:阿司匹林组;C 组:氯吡格雷组;D 组:阿司匹林联合氯吡格雷组。

1.2.2 动物造模 4 组分别予以生理盐水、阿司匹林 10.41 mg/kg、氯吡格雷 7.81 mg/kg、阿司匹林 10.41 mg/kg 联合氯吡格雷 7.81 mg/kg 灌胃,1 次/d,连续 14 d,以上所有大鼠每次灌胃液体量均按 10 mL/kg 计算。造模期间大鼠均正常饮食饮水。

1.2.3 标本制备 末次灌胃后所有大鼠禁食不禁水 18 h,以 10%水合氯醛 3 mL/kg 行腹腔注射麻醉,分离全段肠系膜,沿肠系膜对侧剖开全部小肠,PBS 冲洗干净,观察大鼠腹腔粘连情况及小肠损伤情况;于距回盲部 40 cm 处取近侧端空肠 1 cm,PBS 冲洗干净后,置 4%甲醛液中固定,常规石蜡包埋,切片厚度 4  $\mu$ m,行免疫组化检测肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )的表达。

## 1.2.4 检测指标

1.2.4.1 小肠黏膜大体观察及损伤评分:沿肠系膜对侧切开小肠,PBS 冲洗干净后,于解剖显微镜下观察,按照修改后的 Reuter 方法进行小肠损伤情况评分。溃疡评分标准:未见明显损伤为 0 分;局灶性充血,但未见溃疡形成 1 分;有溃疡形成,但无充血及肠管增厚为 2 分;溃疡形成伴炎症反应(1 处)为 3 分;溃疡形成伴炎症反应(2 处及 2 处以上)为 4 分;出现穿孔为 5 分。粘连评分标准:肠管无粘连计 0 分,轻度粘连(易解除)计 1 分,明显粘连计 2 分。损伤总分为溃疡评分与粘连评分之和。

1.2.4.2 免疫组化法检测小肠黏膜 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达:采用 SABC 法(按试剂盒说明书)。主要步骤:石蜡切片常规脱蜡至水、枸橼酸盐缓冲液中,于微波炉中低火修复抗原,3% $H_2O_2$  封闭内源性过氧化物酶 15 min,滴加一抗(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  均为 1:200 稀释),4  $^{\circ}$ C 过夜,37  $^{\circ}$ C 复温 1 h,滴加生物素标记二抗工作液,37  $^{\circ}$ C 温箱中孵育 30 min,PBS 冲洗,DAB 显色 3~4 min,镜下控制显色时间,苏木精复染、脱水、透明、中性树胶封片。用 PBS 代替一抗作为空白对照。定性判定:(1)依据阳性细胞数量计分:阳性细胞数<10%,计 0 分;阳性细胞数 10%~25%,计 1 分;阳性细胞数为 26%~50%,计 2 分;阳性细胞数为 51%~75%,计 3 分;阳性细胞数>75%,计 4 分;(2)依

据细胞着色强度计分:无色为 0 分;淡黄色为 1 分;棕黄色为 2 分;褐色为 3 分;(3)阳性细胞数量和着色强度两项得分相加即为最后得分。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示,因各组样本含量相等,故多组间比较采用方差分析,两组间比较采用独立样本  $t$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠小肠黏膜大体表现及损伤评分 对照组大鼠小肠组织未见明显损伤;阿司匹林组可见肠管粘连、水肿,黏膜充血、糜烂、溃疡;氯吡格雷组肠管粘连、水肿不明显,黏膜可见少量散在点状糜烂及小溃疡;双抗组肠管粘连、水肿、扩张明显,黏膜可见多处散在充血、糜烂及片状溃疡。各实验组损伤评分明显高于对照组( $P<0.01$ );阿司匹林组较氯吡格雷组损伤评分高( $P<0.01$ ),双抗组较阿司匹林组和氯吡格雷组损伤评分均明显升高( $P<0.01$ )(表 1)。

表 1 各组大鼠小肠黏膜损伤评分( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=20$ )

Tab 1 The injury scores of rats' small intestinal mucosa in each group( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=20$ )

分组	小肠黏膜损伤评分
对照组	0.20 $\pm$ 0.45
阿司匹林组	2.80 $\pm$ 0.44
氯吡格雷组	1.60 $\pm$ 0.89
双抗组	5.20 $\pm$ 0.84

4 组之间两两比较,差异均有统计学意义( $P<0.01$ )

2.2 小肠黏膜 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  蛋白免疫组织化学染色 根据免疫组织化学染色结果,TNF- $\alpha$  表达于细胞浆,呈黄色或棕黄色;IL-1 $\beta$  主要表达于细胞浆,呈黄色或棕黄色(图 1)。

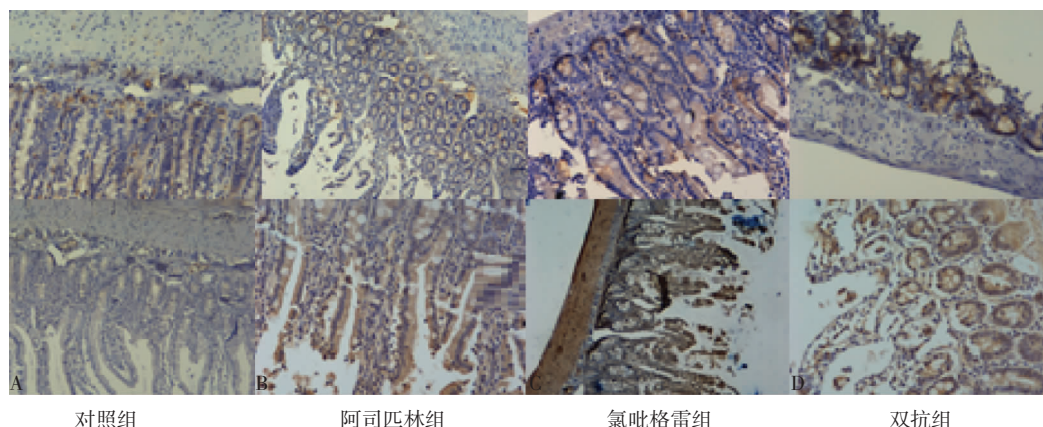
2.3 小肠黏膜 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的表达水平 各实验组小肠黏膜中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  均较对照组呈显著高水平表达( $P<0.05$ ),且阿司匹林组与氯吡格雷组相比呈高水平表达( $P<0.05$ ),双抗组较单用阿司匹林、单用氯吡格雷亦呈明显高水平表达( $P<0.05$ )(表 2)。

表 2 各组大鼠小肠黏膜 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达水平( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=20$ )

Tab 2 The expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in rats' small intestinal mucosa of each group( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=20$ )

分组	TNF- $\alpha$ (分数)	IL-1 $\beta$ (分数)
对照组	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
阿司匹林组	5.30 $\pm$ 1.45	5.05 $\pm$ 1.54
氯吡格雷组	2.95 $\pm$ 1.39	2.80 $\pm$ 1.40
双抗组	6.30 $\pm$ 1.03	6.00 $\pm$ 1.30

4 组之间分别两两比较 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达水平,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )



对照组

阿司匹林组

氯吡格雷组

双抗组

A: TNF- $\alpha$  阴性表达(IHC,  $\times 200$ ), IL-1 $\beta$  阴性表达(IHC,  $\times 100$ ); B: TNF- $\alpha$  弱阳性表达(IHC,  $\times 100$ ), IL-1 $\beta$  阳性表达(IHC,  $\times 200$ ); C: TNF- $\alpha$  阳性表达(IHC,  $\times 200$ ), IL-1 $\beta$  弱阳性表达(IHC,  $\times 100$ ); D: TNF- $\alpha$  阳性表达(IHC,  $\times 100$ ), IL-1 $\beta$  阳性表达(IHC,  $\times 200$ )

图1 各组大鼠小肠黏膜 TNF- $\alpha$ (上)、IL-1 $\beta$ (下)表达

Fig 1 The expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in rats' small intestinal mucosa of each group

### 3 讨论

近年来抗血小板药物在心脑血管疾病的治疗中发挥着越来越重要的作用,已成为心脑血管疾病的一级、二级预防药物。多项大规模研究的结果证实阿司匹林联合氯吡格雷的双联抗血小板治疗可降低患者近期和远期的心血管风险,同时也发现其会增加患者出血、尤其是胃肠道出血的风险<sup>[9-10]</sup>。有研究表明,长期服用阿司匹林的患者消化道溃疡的发生率约为1%~2%<sup>[11]</sup>;联合应用阿司匹林和氯吡格雷可使消化道出血的风险增加7~14倍<sup>[12-13]</sup>。虽然目前对NSAIDs引起上消化道不良反应的研究较多,但对阿司匹林和(或)氯吡格雷的双抗或单抗治疗与消化系统损伤的研究甚少,尤其是其所致的小肠损伤。

目前阿司匹林是临床应用最广泛的抗血小板药物,为NSAIDs的经典代表,其对消化道的可能损伤机制包括:(1)局部作用,即其对消化道黏膜有直接的刺激作用,可作用于胃黏膜的黏液-碳酸氢盐层,破坏胃黏膜的保护屏障;(2)全身作用,阿司匹林可使环氧合酶活性中心的丝氨酸乙酰化,抑制胃黏膜环氧合酶活性而使前列腺素(prostaglandin, PG)合成减少。而PG可以增加胃黏膜血流量,并刺激黏液和碳酸氢盐的合成及分泌,促进上皮细胞增生,从而对胃黏膜起保护作用。氯吡格雷为新型抗血小板药物,常与阿司匹林合用治疗心脑血管疾病,是血小板表面二磷酸腺苷(adenosinediphosphate, ADP)受体拮抗剂,为不具抗血小板活性的前体药物,其活性代谢产物发挥抗血小板聚集作用<sup>[14]</sup>,可抑制血小板释放促血管生长因子,如血管内皮生长因子,从而导致新生血管形成障碍,使胃肠受损

伤黏膜修复受阻<sup>[15]</sup>。因此,认为氯吡格雷不是溃疡产生的直接原因,而是通过抑制血小板聚集及新生血管形成而阻碍溃疡愈合,诱发已存在的无临床症状的溃疡出血。尚无确切证据表明氯吡格雷具有独立的损伤胃肠道黏膜的作用。

随着临床上胶囊内镜和双气囊小肠镜的广泛应用,抗血小板药物对小肠的损伤逐渐受到关注。Lanas等<sup>[16]</sup>认为NSAIDs所致的远端消化道损伤同样常见,甚至更加普遍。亦有研究发现外源性PGs并不能阻断NSAIDs诱导的小肠损伤<sup>[17]</sup>,因此认为NSAIDs相关小肠损伤的发生并不是单纯通过抑制PGs合成来实现的。

近年来炎症反应在小肠损伤中的作用逐渐受到广泛关注。TNF- $\alpha$ 是机体受内外环境刺激后产生的具有重要生物学功能的细胞调节蛋白,参与机体的免疫、炎症、抗感染等过程。单核细胞或巨噬细胞合成白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)前体,然后裂解产生成熟的具有生物活性的IL-1,按其结构分IL- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 两种,其中IL-1 $\beta$ 是重要的炎症介质,在机体的炎症反应中起重要作用。

我们用标准剂量阿司匹林、氯吡格雷灌服大鼠,免疫组化法测定TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 在大鼠小肠黏膜的表达,结果显示各实验组小肠黏膜中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 均较对照组呈显著高水平表达,且阿司匹林组与氯吡格雷组相比呈高水平表达,双抗组较单用阿司匹林、单用氯吡格雷组亦呈明显高水平表达,这提示炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 参与了小肠黏膜的损伤,并在其发病机制中有一定意义。

综上所述,笔者认为阿司匹林、氯吡格雷致小肠损伤的前期机制可能不同,阿司匹林可主动引起



溃疡形成,而氯吡格雷可能使血管形成受阻,导致已有溃疡难以愈合,两者最终均引起炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 不同程度地释放,导致小肠黏膜损伤。但本实验仅在一定程度上说明了炎症反应参与了抗血小板药物所致大鼠小肠的损伤,而是否与其他损伤机制共同作用导致小肠损伤还有待进一步研究。只有明确所有可能的损伤机制才有助于指导临床医师更好地应用抗血小板药物并预防和治疗相应的消化道损伤。

#### 参考文献:

- [1] 王海斌,邹阳春,郭敏. PCI术后双联抗血小板治疗致上消化道出血的预防与治疗[J]. 中国心血管病研究, 2010,8(1):72
- [2] 陈章强,洪浪,王洪,等. 雷尼替丁对冠心病患者介入术后双重抗血小板治疗所致消化道出血和血栓事件的影响[J]. 中国全科医学, 2010,13(32):3638
- [3] 马玉真. 冠心病患者抗血小板治疗致上消化道事件分析与对策[J]. 中国实用医药, 2012,7(25):91
- [4] 抗血小板药物消化道损伤的预防和治疗中国专家共识组. 抗血小板药物消化道损伤的预防和治疗中国专家共识 (2012 更新版)[J]. 中华内科杂志, 2013,52(3):264
- [5] 李熯,张志广,卢向东,等. 非甾体抗炎药相关上消化道出血 308 例临床特征分析[J]. 中华消化杂志, 2013,33(5):342
- [6] 张志广,陆伟,李熯,等. 非甾体抗炎药相关胃黏膜损伤机制的研究[J]. 中国综合临床, 2013,29(4):358
- [7] 姚玉霞,徐宝宏,李静,等. 双重抗血小板治疗并发上消化道出血 72 例[J]. 临床荟萃, 2012,27(3):224
- [8] Adebayo D, Bjarnason I. Is non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) enteropathy clinically more important than NSAID gastropathy[J]. Postgrad Med J, 2006,82(965):186
- [9] Potsis T Z, Katsouras C, Goudevenos J A. Avoiding and managing bleeding complications in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes[J]. Angiology, 2009,60(2):148
- [10] 秦素莲. 抗栓药治疗致上消化道出血的临床分析[J]. 吉林医学, 2013,34(6):1067
- [11] Khaliq S C, Cheng-Lai A. Drug interaction between clopidogrel and proton pump inhibitors[J]. Cardiol Rev, 2009,17(4):198
- [12] Moayyedi P, Sadowski D C. Proton pump inhibitors and clopidogrel - hazardous drug interaction or hazardous interpretation of data[J]. Can J Gastroenterol, 2009,23(4):251
- [13] Cryer B. Management of patients with high gastrointestinal risk on antiplatelet therapy [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2009,38 (2): 289
- [14] Mega J L, Close S L, Wiviott S D. Cytochrome P-450 polymorphisms and response to clopidogrel[J]. N Engl J Med, 2009,49 (4):1083
- [15] 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
- [16] Lanis A, Scarpignato C. Microbial flora in NSAID-induced intestinal damage: a role for antibiotics[J]. Digestion, 2006,73 (Suppl 1): 136
- [17] Playford R J, Floyd D N, Macdonald C E, et al. Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage [J]. Gut, 1999,44(5):653

(2014-03-26 收稿)

(上接第 345 页)

- [8] Sheridan C. First Axl inhibitor enters clinical trials[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9): 775
- [9] Loges S, Schmidt T, Tjwa M, et al. Malignant cells fuel tumor growth by educating infiltrating leukocytes to produce the mitogen Gas6[J]. Blood, 2010, 115(11): 2264
- [10] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation[J]. Nature, 2008, 454(7203): 436
- [11] 陈慧,姚阳. Gas6 与肿瘤增殖、侵袭和转移的关系[J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(11): 867
- [12] Buehler M, Tse B, Leboucq A, et al. Meta-analysis of microarray data identifies GAS6 expression as an independent predictor of poor survival in ovarian cancer[Z]. Biomed Res Int, 2013[Epub ahead of print]
- [13] Shiozawa Y, Pedersen E A, Patel L R, et al. GAS6/AXL axis regulates prostate cancer invasion, proliferation, and survival in the bone marrow niche[J]. Neoplasia, 2010, 12(2): 116
- [14] Sainaghi P P, Castello L, Bergamasco L, et al. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor[J]. J Cell Physiol, 2005, 204(1): 36
- [15] McCormack O, Chung W Y, Fitzpatrick P, et al. Growth arrest-specific gene 6 expression in human breast cancer[J]. Br J Cancer, 2008, 98(6): 1141
- [16] 孔北华, Zheng W X. 重视卵巢癌的二元论模型与卵巢外起源新说[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(10): 721

(2014-04-22 收稿)