

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.21.002

文章编号: 1005-8982 (2018) 21-0010-05

氯吡格雷对小鼠小肠黏膜的损伤及其机制研究*

黎敏, 丁瑞峰, 马晓莹, 刘宇超

(包头医学院第一附属医院 消化科, 内蒙古 包头 014010)

摘要: **目的** 初探氯吡格雷对小鼠小肠黏膜的损伤及可能的机制。**方法** 20 只无特定病原体 (SPF) 级 BALB/c 雄性小鼠, 随机分为 2 组: 空白对照组、氯吡格雷组, 空白对照组灌服生理盐水, 氯吡格雷组灌服氯吡格雷, 2 周后处死小鼠, 观察小鼠小肠黏膜大体变化及组织学变化, 免疫组织化学 (简称免疫组化) 法检测小肠黏膜组织中 Occludin 蛋白的表达情况。**结果** 氯吡格雷组小鼠小肠黏膜大体损伤、组织病理学损伤高于空白对照组 ($P < 0.05$); 免疫组化测得氯吡格雷组小鼠小肠黏膜 Occludin 蛋白表达低于空白对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 氯吡格雷可造成小鼠小肠黏膜损伤; 可能通过降低 Occludin 蛋白表达造成小肠黏膜损伤。

关键词: 氯吡格雷; Occludin 蛋白; 小肠黏膜; 损伤

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Intestinal mucosal injury induced by Clopidogrel in mice and its mechanism*

Min Li, Rui-feng Ding, Xiao-ying Ma, Yu-chao Liu

(Department of Gastroenterology, the First Hospital Affiliated of General Hospital of Baotou Medical College, Baotou, Neimenggu 014010, China)

Abstract: Objective To investigate intestinal mucosal injury induced by Clopidogrel in mice and potential molecular mechanism. **Method** Twenty SPF grade BALB/C male mice were randomly divided into control group and Clopidogrel group. Mice in Clopidogrel group were treated with Clopidogrel while mice in control group was fed with normal saline. Mice were sacrificed after 2 weeks. Macroscopic and histological changes of the small intestinal mucosa in the two groups were recorded. Expression of Occludin in small intestinal mucosa was determined by immunohistochemistry. **Results** The macroscopic damage and the histopathologic damage of small intestinal mucosa in Clopidogrel group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). The expression of Occludin protein in small intestinal mucosa was decreased significantly with treatment of Clopidogrel compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Clopidogrel induces small intestinal mucosa damage through reduction of Occludin expression and inhibition of the repair of small intestinal mucosal injury.

Keywords: Clopidogrel; Occludin protein; small intestinal mucosal; injury

心血管疾病在全球死因中居首位, 全球每年约 1.73 亿人死于心血管疾病^[1]。而作为治疗心血管疾病的一线用药氯吡格雷与阿司匹林联合双重抗血小板则在临床中广泛应用, 大量研究已经证实, 抗血小板

治疗在血栓栓塞性疾病一级和二级预防中发挥重要作用, 但在使患者获益的同时, 其消化道不良事件也日益增多^[2]。临床医师对非甾体抗炎药引起胃黏膜的损伤研究比较多^[3], 氯吡格雷为新型抗血小板药物, 是

收稿日期: 2017-11-01

* 基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金 (No: 2015MS0861)

[通信作者] 丁瑞峰, E-mail: rfding721115@163.com

血小板表面二磷酸腺苷受体拮抗剂,其活性代谢产物发挥抗血小板聚集作用,可抑制血小板释放具有内皮增生和加速修复溃疡的血管内皮生长因子,从而导致新生血管形成障碍,使胃黏膜修复受阻^[4],而氯吡格雷是否可以引起小肠黏膜损伤及损伤机制,目前尚不明确,国内报道较少,笔者通过动物模型,评价氯吡格雷对小鼠小肠黏膜的损伤情况,探讨其对小肠黏膜损伤的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及制作动物模型

20 只无特定病原体 (SPF) 级 6 ~ 8 周龄 BALB/c 雄性小鼠 (购自北京维通利华公司,实验动物合格证号: 11400700148334), 体重 (18 ± 2) g, 室温 (20 ± 2) °C, 湿度 50% ~ 60%, 适应性饲养 3 d, 随机分为 2 组: 空白对照组、氯吡格雷组。氯吡格雷组以氯吡格雷混悬液 (按标准体重成人临床剂量 75 mg/d 换算成小鼠剂量为 11.38 mg/kg) 0.5 ml/只, 灌胃; 空白对照组以生理盐水 0.5 ml/只, 灌胃。均每天 1 次, 连续 2 周, 造模期间小鼠均正常饮食饮水。

1.1.1 氯吡格雷混悬液的配制 硫酸氯吡格雷 (波立维), 产自赛诺菲 (杭州) 制药有限公司, 75 mg/片, 用研钵将氯吡格雷片 150 mg 捣碎备用, 按成人临床剂量 75 mg/d (70 kg 正常体重) 换算成小鼠给药剂量为 11.38 mg/kg, 加生理盐水配制 0.5 ml 灌胃, 每次灌胃前配制, 即用即配。

1.2 采集标本

末次灌胃后小鼠禁食不禁水 12 h, 每只小鼠采用脱颈椎法处死 (经伦理委员会审批通过), 取空肠及回肠组织后, 一部分应用 Reuter 评分进行大体评分, 评估小肠黏膜损伤情况, 并固定于 10% 中性甲醛, 余小肠组织置于液氮罐中存放待用。

1.3 Reuter 评分

溃疡评分标准: 未见明显损伤为 0 分, 局灶性充血, 但未见溃疡形成为 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 处及以上为 4 分; 穿孔为 5 分; 粘连评分标准: 肠管无粘连为 0 分; 轻度粘连为 1 分; 明显粘连为 2 分。损伤总分为溃疡评分和粘连评分之和。

1.3.1 HE 染色 小肠组织置于 10% 中性甲醛固定 6 h, 低浓度到高浓度酒精梯度脱水, 再将组织块置于

透明剂二甲苯中透明, 以二甲苯替换出组织块中的酒精, 浸蜡包埋。将包埋好的蜡块固定于切片机上, 切成 4 μm 薄片, 贴到载玻片上, 置于 45 °C 恒温箱中烘干。经由高浓度到低浓度酒精脱蜡, 染色, 苏木精水溶液中染色 5 ~ 10 min, 1% 盐酸水及 1% 氨水中分色 5 ~ 10 s, 流水冲洗 1 h 后入蒸馏水片刻, 入 70% 和 90% 酒精中脱水各 10 min, 入酒精伊红染色液染色 2 ~ 3 min。染色后的切片经纯酒精脱水, 再经二甲苯使切片透明, 中性树胶封固。

1.3.2 免疫组织化学 (简称免疫组化) 检测小肠黏膜组织中 Occludin 蛋白的表达 按以下步骤实施: 取材, 固定, 脱水浸蜡, 包埋, 切片, 捞片, 烤片, 脱蜡复水, 微波炉抗原修复, 滴加 5% BS 封闭液, 室温 20 min, 滴加适当稀释的一抗, 置于 4 °C 冰箱中过夜, PBS (pH=7.4) 洗 2 min × 3 次, 滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 室温 20 min, PBS (pH=7.2 ~ 7.6) 洗 2 min × 3 次, 滴加试剂 SABC, 室温 20 min, PBS (pH=7.4) 洗 5 min × 4 次, DAB 显色, 苏木素轻度复染, 自来水冲洗, 系列酒精梯度脱水, 在通风橱中晾干后, 中性树胶封片, 显微拍照。

阳性细胞数量计分标准: 阳性细胞数 < 10%, 计 0 分; 阳性细胞数达 10% ~ 25%, 计 1 分; 阳性细胞数达 25% ~ 50%, 计 2 分; 阳性细胞数达 50% ~ 75%, 计 3 分; 阳性细胞数 ≥ 75%, 计 4 分; 依据细胞着色强度计分, 无色为 0 分; 淡黄色为 1 分; 棕黄为 2 分; 棕褐色为 3 分; 细胞阳性数量和着色强度两项得分相加: 0 ~ 1 分为阴性; 2 ~ 3 分为弱阳性 (+); 4 ~ 5 分为阳性 (++) ; 6 ~ 7 分为强阳性 (+++)。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验; 等级计数资料用例 (%) 表示, 比较采用秩和检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

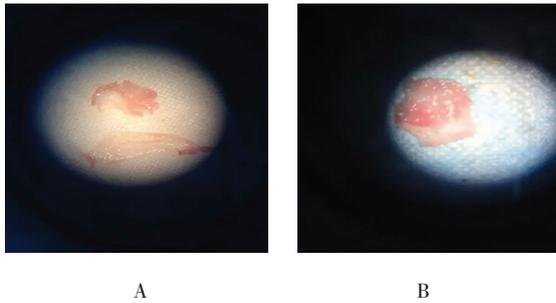
2 结果

2.1 小肠黏膜大体表现

沿肠系膜对侧切开小肠, PBS 液冲洗干净, 于显微镜下观察, 空白对照组小鼠小肠黏膜未见明显损伤, 氯吡格雷组见肠管轻度粘连水肿, 黏膜点状糜烂及小溃疡形成。分析结果显示, 氯吡格雷组空肠黏膜损伤评分、回肠黏膜损伤评分均高于空白对照组, 两组差异有统计学意义 (P < 0.05)。见表 1 和图 1。

表 1 两组 Reuter 评分比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	空肠黏膜损伤评分	回肠黏膜损伤评分
空白对照组	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
氯吡格雷组	2.000 ± 1.054	1.500 ± 0.707
t 值	6.000	6.709
P 值	0.000	0.000



A: 小鼠空肠黏膜充血、水肿、浅溃疡形成; B: 小鼠回肠黏膜充血、炎症水肿

图 1 纤维镜下小肠黏膜大体表现 (×1.6 倍)

2.2 小肠黏膜组织学表现

空白对照组小肠黏膜层次结构清楚, 上皮结构完整, 腺体排列整齐, 腺腔内整洁, 损伤程度为 0 级; 实验组小肠黏膜上皮脱落、坏死, 可见炎细胞浸润, 评分越高, 代表黏膜损伤程度越重。两组空肠黏膜组织学损伤评分比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 两组回肠黏膜组织学损伤评分比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、3 和图 2。

2.3 两组 Occludin 蛋白表达

Occludin 蛋白主要表达于胞浆, 空白对照组 Occludin 蛋白的表达主要呈强阳性 (+++), 阳性 (++) 也有表达; 氯吡格雷组 Occludin 蛋白表达主要呈阴性或弱阳性 (+), 提示黏膜上皮损伤严重, 紧密连接蛋白被大量破坏。空白对照组 Occludin 高表达, 实验组低表达。见图 3。

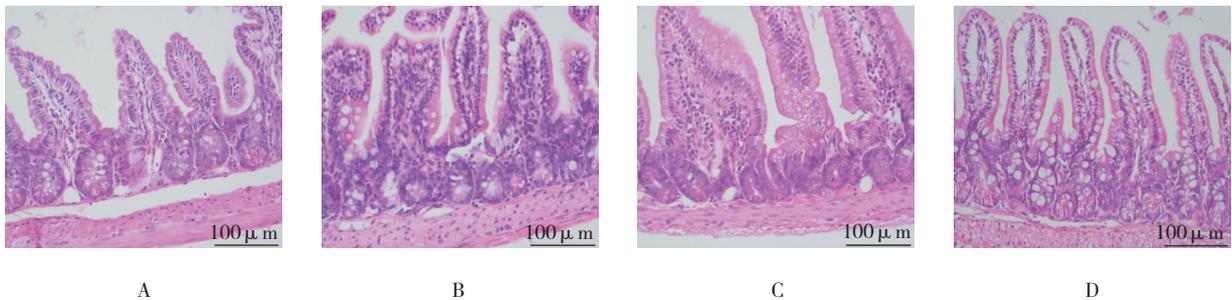
氯吡格雷组空肠 Occludin 表达阴性率为 90.0%, 弱阳性表达率为 10.0%, 阳性表达率低于空白对照

表 2 两组空肠黏膜组织学损伤评分比较 [n=10, 例 (%)]

组别	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	5 分
空白对照组	9 (90.0)	1 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
氯吡格雷组	0 (0.0)	2 (20.0)	2 (20.0)	2 (20.0)	1 (10.0)	3 (30.0)
Z 值			-3.900			
P 值			0.000			

表 3 两组回肠黏膜组织学损伤评分比较 [n=10, 例 (%)]

组别	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分	5 分
空白对照组	10 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
氯吡格雷组	0 (0.0)	5 (50.0)	2 (20.0)	2 (20.0)	0 (0.0)	1 (10.0)
Z 值			-4.077			
P 值			0.000			

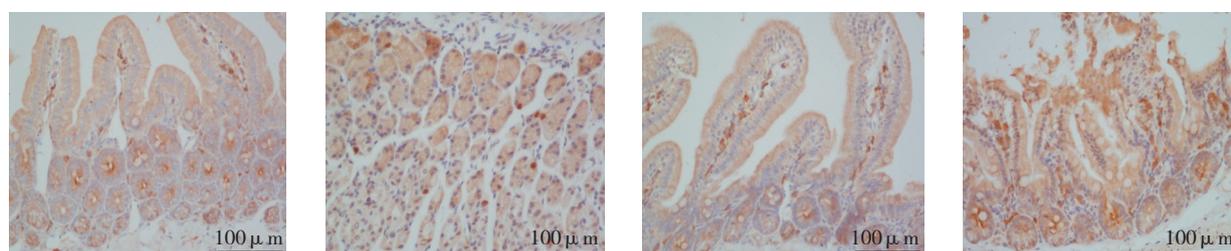


A: 回肠空白对照组, 回肠黏膜腺体, 结构完整, 层次清楚, 腺体排列整齐, 腺腔整洁无损伤; B: 回肠氯吡格雷组, 回肠黏膜上皮细胞损伤、脱落, 胞质有空泡、肿胀; C: 空肠空白对照组, 空肠黏膜腺体, 结构完整, 层次清楚, 腺体排列整齐, 腺腔整洁无损伤; D: 空肠氯吡格雷组, 空肠黏膜腺体部分受损, 部分黏膜上皮细胞损伤、脱落, 胞质有空泡、肿胀

图 2 各组小鼠小肠黏膜组织学表现 (HE × 200)

组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。氯吡格雷组回肠 Occludin 表达阴性率为 100.0%, 阳性表达率为 0.0%,

阳性表达率低于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4、5。



A 回肠空白对照组

B 回肠氯吡格雷组

C 空肠空白对照组

D 空肠氯吡格雷组

图 3 小鼠小肠黏膜组织学表现 (Occludin 抗体) (免疫组化)

表 4 两组空肠 Occludin 蛋白表达情况比较

[$n = 10$, 例 (%)]

组别	阴性 (-/+)	弱阳性 (+)	阳性 (++)	强阳性 (+++)
空白对照组	1 (10.0)	8 (80.0)	1 (10.0)	0 (0.0)
氯吡格雷组	9 (90.0)	1 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Z 值	-3.454			
P 值	0.001			

表 5 两组回肠 Occludin 蛋白表达的比较 [$n = 10$, 例 (%)]

组别	阴性 (-/+)	弱阳性 (+)	阳性 (++)	强阳性 (+++)
空白对照组	2 (20.0)	7 (70.0)	1 (10.0)	0 (0.0)
氯吡格雷组	10 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Z 值	-3.508			
P 值	0.000			

3 讨论

氯吡格雷在肝脏通过 CYP2C19 途径代谢, 其代谢产物与血小板 P2Y12 的二磷酸腺苷 (ADP) 受体结合, 其抑制血小板聚集作用表现为抑制 ADP 介导的糖蛋白 GP II b/ III a 复合物的活化, 对血小板 ADP 受体的作用是不可逆的。一项回顾性队列研究显示, 口服氯吡格雷 75 mg/d 胃肠道出血风险 ($\hat{R}R=2.8$, 95%CI : 1.9, 4.2) 与使用阿司匹林 100 mg/d 出血风险 ($\hat{R}R=2.7$, 95%CI : 2.0, 3.6) 相当^[5]。尽管氯吡格雷可能不是胃十二指肠溃疡的直接原因, 但他们的抗血管生长作用可能抑制了胃糜烂和其他药物或者 Hp 感染所致的小溃疡的愈合。在酸存在的情况下, 这可能会导致一些较轻的没有临床症状的胃黏膜损害延迟愈合, 甚至会加重成为有明显临床症状的溃疡和出血^[4]。有研究证

实, 氯吡格雷对人胃黏膜上皮细胞株 GES-1 具有直接损伤作用, 诱导细胞发生凋亡, 并且呈现剂量依赖性; 透射电镜下显示氯吡格雷作用后细胞形态发生损伤性改变^[6]。NSAIDs 药物不良反应严重性早已被人们意识到, 但早期的研究主要集中在胃黏膜方面^[7]。近期研究表明, 双氯芬酸等 NSAIDs 药物的消化道不良反应不仅出现在胃部, 在小肠、结肠等部位也可见到严重的副作用。甚至有学者提出 NSAIDs 不良反应主要在小肠而不是在胃及十二指肠。NSAIDs 肠病根据症状有无亦分为两类: 无症状型 NSAIDs 肠病和有临床表现的 NSAIDs 肠病两类。无症状型 NSAIDs 肠病主要表现为黏膜通透性增加, 黏膜炎症等, 一般不引起明显的消化道症状。有临床表现的 NSAIDs 肠病, 则表现为蛋白丢失, 出血和缺铁性贫血, 吸收障碍, 小肠溃疡, 狭窄和穿孔等, 都是严重的并发症, 其中小肠溃疡的发生率相当高。本研究发现, 空白对照组小鼠小肠黏膜层次结构清楚, 上皮结构完整, 腺体排列整齐, 腺腔内整洁; 氯吡格雷组小鼠小肠肠管轻度粘连水肿, 黏膜点状糜烂及小溃疡形成, 小肠黏膜上皮脱落、坏死, 可见炎细胞浸润。提示氯吡格雷可以造成小鼠小肠黏膜损伤。

肠上皮的跨膜结合蛋白 Occludin 是构成紧密连接 (tight junction, TJ) 的主要结构蛋白之一, 一旦发生变异、减少和缺失可引起肠上皮细胞间隙通透性增加^[8]。肠黏膜屏障由肠黏膜上皮细胞及其间的连接复合体组成, 其中最重要的是肠黏膜上皮细胞间的 TJ^[9], 哺乳动物细胞的 TJ 位于细胞侧壁的顶部, 分隔细胞顶面与基侧面, 防止上皮细胞间隙中的物质溢出和大分子在细胞间隔中穿行, 对肠道黏膜通透性起决定性作用。对屏障功能的维持和紧密连接的完整性具有重要作用^[10]。有研究表明, 缺乏 Occludin 蛋白的成纤

维细胞不能形成典型的 TJ 结构^[11]。对人、鼠、袋鼠、鸡和狗的闭锁蛋白 cDNA 进行测序发现,人、鼠、狗的闭锁蛋白 cDNA 序列约 90% 同源,表明哺乳动物的闭锁蛋白在进化上有一定的保守性。张烁等研究发现双氯芬酸钠可致大鼠小肠黏膜上皮细胞间 TJ 蛋白 Occludin 表达下降,其 mRNA 水平也呈下调趋势,导致小肠黏膜 TJ 受损,促使小肠细菌和内毒素易位,诱发肠源性内毒素血症的发生,加重小肠黏膜损伤^[12]。本研究发现,空白对照组小鼠小肠黏膜层次结构清楚,上皮结构完整,腺体排列整齐,腺腔内整洁;氯吡格雷组小鼠小肠肠管轻度粘连水肿,黏膜点状糜烂及小溃疡形成,小肠黏膜上皮脱落、坏死,可见炎症细胞浸润。提示氯吡格雷可能造成小鼠小肠黏膜损伤。本研究结果表明,Occludin 蛋白主要表达于胞浆,氯吡格雷组 Occludin 蛋白较空白对照组减低,提示氯吡格雷可能降低小肠黏膜 Occludin 蛋白表达,致使黏膜屏障破坏,造成小鼠小肠黏膜损伤。但是氯吡格雷造成小肠黏膜损伤的机制还有待于进一步的临床及基础研究,为临床安全用药提供依据。

参 考 文 献:

- [1] MOZAFFARIAN D, BENJAMIN E J, GO A S, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2015, 131(4): e29-322.
- [2] 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): 342-343.
- [3] 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): 358-360.
- [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] LANAS A, GARCÍA-RODRÍGUEZ L A, ARROYO T M, et al. Risk of upper gastrointestinal ulcer bleeding associated with selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations[J]. *Gut*, 2006, 55(12): 1731-1738.
- [6] 孙沂, 樊宏伟, 王书奎, 等. 氯吡格雷对人胃黏膜上皮细胞株 GES-1 增殖作用的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(4): 329-334.
- [7] UOTANI T, SUGIMOTO M, NISHINO M, et al. Ability of rabeprazole to prevent gastric mucosal damage from clopidogrel and low doses of aspirin depends on CYP2C19 genotype[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10(8): 879-885.
- [8] BERKES J, VISWANATHAN V K, SAVKOVIC S D, et al. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation[J]. *Gut*, 2003, 52(3): 439-451.
- [9] van ITALLIE C M, FANNING A S, HOLMES J, et al. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(16): 2844-2852.
- [10] HIRASE T, STADDON J M, SAITOU M, et al. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells[J]. *J Cell Sci*, 1997, 110(14): 1603-1613.
- [11] WROBLEWSKI L E, SHEN L, OGDEN S, et al. Helicobacter pylori dysregulation of gastric epithelial tight junctions by urease-mediated myosin II activation[J]. *Gastroenterology*, 2009, 136(1): 236-246.
- [12] 张烁, 吕宾, 陈方明, 等. 紧密连接分子 Occludin 在非甾体类抗炎药致小肠损害中的表达 [J]. *中华消化杂志*, 2009, 29(2): 130-131.

(王荣兵 编辑)