

阿司匹林对肠上皮细胞的损伤作用及机制

安敏, 张振玉

安敏, 张振玉, 南京医科大学附属南京第一医院消化科 江苏省南京市 210006

作者贡献分布: 实验操作、实验数据搜集及数据的统计分析由安敏完成; 资金提供、课题申请由张振玉完成; 实验设计、论文修改由安敏和张振玉共同完成。

通讯作者: 张振玉, 210006, 江苏省南京市, 南京医科大学附属南京第一医院消化科. anmin157@163.com

收稿日期: 2009-01-12 修回日期: 2009-04-01

接受日期: 2009-04-08 在线出版日期: 2009-05-08

Effects and mechanism of aspirin on enterocyte injury

Min An, Zhen-Yu Zhang

Min An, Zhen-Yu Zhang, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Zhen-Yu Zhang, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. anmin157@163.com

Received: 2009-01-12 Revised: 2009-04-01

Accepted: 2009-04-08 Published online: 2009-05-08

Abstract

AIM: To investigate the effect and mechanism of aspirin on proliferation of enterocytes.

METHODS: After co-culture of aspirin solution with Caco-2 cells for 24 h and 48 h, the proliferation of Caco-2 cells in each group was examined using MTT. Caco-2 monolayer cells model was established. After treatment with different concentrations of aspirin, Transepithelial resistance (TER) of cells was measured by EVOM volttohmmeter.

RESULTS: After 24 h, the cell survival rates were $96.67\% \pm 1.13\%$, $84.32\% \pm 1.29\%$, $62.33\% \pm 2.02\%$ and $42.99\% \pm 2.09\%$ in groups with aspirin of 0, 0.1, 1, 10 mmol/L, respectively; after 48 h, the cell survival rates were respectively $96.45\% \pm 1.21\%$, $76.89\% \pm 2.28\%$, $50.28\% \pm 0.98\%$ and $32.66\% \pm 1.99\%$. The TER in the group with aspirin of 10 mmol/L was reduced to 50.1% after 72 h. Multiple factors chi square test showed that the influence of aspirin on the proliferation of Caco-2 cells and the epithelial barrier was dose-dependent and time-dependent.

CONCLUSION: Aspirin could inhibit the prolifer-

ation of enterocyte and affect the epithelial barrier, in a dose-dependent and time-dependent manner.

Key Words: Aspirin; Tight junction; Transepithelial resistance; Caco-2 cells

An M, Zhang ZY. Effects and mechanism of aspirin on enterocyte injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(13): 1355-1358

摘要

目的: 探讨阿司匹林对肠上皮细胞增殖的影响及作用机制。

方法: 将不同浓度的阿司匹林溶液与肠上皮细胞株Caco-2细胞共同培养24 h及48 h, 采用MTT法检测阿司匹林对Caco-2细胞的增殖作用。建立Caco-2单层细胞模型, 采用不同浓度阿司匹林溶液处理后, 用EVOM电压电阻仪测定细胞跨膜电阻抗(TER)变化。

结果: 在不同浓度的阿司匹林(0、0.1、1、10 mmol/L)作用下, 24 h细胞存活率分别为 $96.67\% \pm 1.13\%$ 、 $84.32\% \pm 1.29\%$ 、 $62.33\% \pm 2.02\%$ 和 $42.99\% \pm 2.09\%$; 48 h细胞存活率分别为 $96.45\% \pm 1.21\%$ 、 $76.89\% \pm 2.28\%$ 、 $50.28\% \pm 0.98\%$ 和 $32.66\% \pm 1.99\%$, 阿司匹林对Caco-2细胞的增殖作用呈现剂量-时间依赖性 ($P < 0.05$)。与对照组相比, 阿司匹林作用组TER明显降低, 至10 mmol/L组作用72 h时, TER值降低至50.1%。

结论: 阿司匹林可抑制肠上皮细胞的增殖, 同时损伤细胞屏障功能, 损伤紧密连接, 且以上两种作用呈剂量和时间依赖性。

关键词: 阿司匹林; 紧密连接; 跨膜电阻抗; Caco-2细胞

安敏, 张振玉. 阿司匹林对肠上皮细胞的损伤作用及机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17(13): 1355-1358

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1355.asp>

0 引言

阿司匹林是最用的非甾体类抗炎药(non-

■背景资料

阿司匹林是最用的非甾体类抗炎药(NSAIDs)之一。随着阿司匹林的临床应用的日趋广泛, 其消化系统不良反应也日益受到关注。长期以来人们比较注意其引起的胃损伤。

■同行评议者

王志刚, 副主任医师, 上海市第六人民医院普外科

■ 研究前沿

近年来随着胶囊内镜、双气囊小肠镜等检查方式在临床的逐渐普及,发现NSAIDs引起的肠道不良反应作用并不低,其可以引起小肠出血、蛋白丢失性肠病、回肠吸收功能障碍、肠通透性升高及结肠出血、穿孔等。所以,对于长期服用阿司匹林的安全性应予以足够的重视。

steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)之一。一般短期使用常用于缓解各种疼痛,退热及手术期的镇痛;长期则主要用于治疗类风湿性关节炎,骨性关节炎等风湿性疾病,而且近来常采用低剂量阿司匹林来临床用于预防心肌梗死、动脉血栓、动脉粥样硬化等心血管疾病。近年研究证实阿司匹林还可预防结肠癌^[1]。随着阿司匹林的临床应用的日趋广泛,其消化系不良反应也日益受到关注^[2]。长期以来人们比较注意其引起的胃损伤,但是近年来随着胶囊内镜、双气囊小肠镜等检查方式在临床的逐渐普及,发现NSAIDs引起的肠道不良反应作用并不低,可以引起小肠出血、蛋白丢失性肠病、回肠吸收功能障碍、肠通透性升高及结肠出血、穿孔等^[3-5]。所以,对于长期服用阿司匹林的安全性应予以足够的重视。本研究采用Caco-2细胞与阿司匹林共培养,通过MTT法及Caco-2单层细胞跨膜电阻抗的测定,研究阿司匹林对Caco-2细胞增殖的影响以及对细胞紧密连接屏障的作用,探讨阿司匹林引起肠道损伤的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Caco-2细胞细胞株由中国人民解放军南京军区总院普外科惠赠。DMEM高糖培养液为美国Hyclone公司生产。新生小牛血清为杭州四季青公司生产。阿司匹林购自山东新华制药股份有限公司,批号为0702285。噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:将Caco-2细胞置于细胞培养瓶内,以DMEM(dulbecco's modified eagle's medium)为培养液:含4.5 g/L D-葡萄糖、L-谷氨酰胺,不含丙酮酸钠和碳酸氢钠、 1×10^5 U/L青霉素、100 mg/L链霉素、100 mL/L小牛血清,pH值为7.2。在37℃、50 mL/L CO₂培养箱中进行培养,隔天更换培养液,每3 d按1:3比例传代,实验时取对数生长期细胞。

1.2.2 MTT比色实验:将处于对数生长期的细胞,用2.5胰蛋白酶消化后,以每孔 2×10^4 加入96孔培养板中,每孔体积200 μL,置于37℃,50 mL/L CO₂的培养箱中培养24 h后换上含不同浓度阿司匹林的培养液(0.1、1、10 mmol/L)180 μL,每种浓度设6孔重复,以不含阿司匹林的培养液180 μL为阴性对照,分组继续培养24、48 h后,每孔加入MTT 20 μL(5 g/L),温浴4 h,弃上清液,每孔加入DMSO 150 μL,室温避光摇床上充分振荡

表1 各浓度组阿司匹林作用于Caco-2细胞后的细胞存活率(% , mean ± SD)

分组	24 h	48 h
对照组	96.67 ± 1.13	96.45 ± 1.21
阿司匹林(mmol/L)		
0.1	84.32 ± 1.29 ^{ac}	76.89 ± 2.28 ^{acg}
1.0	62.33 ± 2.02 ^{ae}	50.28 ± 0.98 ^{aeq}
10.0	42.99 ± 2.09 ^a	32.66 ± 1.99 ^{ag}

^a*P*<0.05 vs 对照组; ^c*P*<0.05 vs 1.0, 10.0 mmol/L阿司匹林组; ^e*P*<0.05 vs 10.0 mmol/L阿司匹林组; ^g*P*<0.05 vs 24 h。

20 min,混匀后以空白孔调零,在酶标仪上检测490 nm波长吸光度值(A)。按下列公式计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = (1-实验组A值/对照组A值) × 100%。经换算成细胞存活率。每次实验重复3次。

1.2.3 跨膜电阻抗(TER)的测定:用STX2双杆电极EVOM电压电阻仪测定单层细胞的跨膜电阻抗。Caco-2细胞以 1×10^5 /cm²接种于涂明胶的多聚碳膜Transwell培养板的顶层小室微孔膜上(直径6.5 mm,孔径大小0.4 μm)培养。当测定的TER值达到稳定后4 d,进行实验处理。处理分为4组,即对照组,0.1、1、10 mmol/L的阿司匹林处理组。每个处理组取3个孔,重复实验,计算其平均值。测定的TER结果,用最初测定结果的百分比表示。

统计学处理 实验所得数据,用Stata 9.0统计软件分析,采用多因素卡方检验,*P*<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 阿司匹林对Caco-2细胞的生长抑制作用 随着阿司匹林作用浓度的增加及作用时间的延长,Caco-2细胞的生长抑制率逐渐升高,即细胞存活率越来越低,且这种作用呈现剂量-时间依赖性(表1,*P*<0.05)。

2.2 阿司匹林对Caco-2细胞的屏障功能的作用 为了确定阿司匹林是否对Caco-2细胞的屏障功能有直接的破坏作用,本实验观察了阿司匹林对培养的Caco-2细胞的作用。测定不同浓度阿司匹林作用不同时间的跨膜电阻抗(TER)变化(图1)。

3 讨论

近年来,大量的研究证实阿司匹林可以引起较多的不良反应^[6],尤其是胃肠道损害较为突出,主要表现为黏膜糜烂和溃疡,严重者可以发生

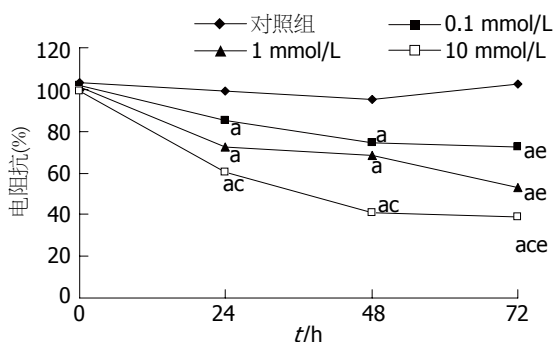


图 1 不同浓度阿司匹林引起的跨膜电阻抗时间变化曲线图. ^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^{ac} $P < 0.05$ vs 其他浓度组; ^{ace} $P < 0.05$ vs 其他时间组.

出血或者穿孔. 但是阿司匹林对肠道的不良反应则研究较少^[7]. 阿司匹林引起肠道损伤的可能机制有以下几点: (1)阿司匹林对肠黏膜有直接的化学刺激作用, 而且由于其肠肝循环特点, 从而延长了其与肠黏膜的接触时间. 肠腔内容物如细菌、胆盐、食物等可以进一步诱导损伤, 其中细菌可能是主要的侵袭因素. (2)阿司匹林选择性抑制环氧合酶COX尤其是COX-1的活性^[8-9], 减少了内源性前列腺素的合成与释放, 破坏肠上皮黏膜的屏障作用, 引起肠内细菌及侵袭因子的侵入, 从而诱发新的炎症病灶的产生, 诱发旧的溃疡病灶复发. (3)阿司匹林可以诱导中性粒细胞在肠黏膜受损的部位聚集, 浸润, 从而加重受损部位的免疫损伤. (4)阿司匹林还可以促进一些炎性介质, 如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和白三烯(leukotriene, LT)的释放. 超过生理限度的TNF及LTB可以引起前列腺素释放减少, 内皮素释放增加, 而内皮素则是强烈的缩血管因子. 二者比例失调, 可以影响受损黏膜的修复.

Caco-2细胞来源于人结肠癌细胞株, 以普通的培养条件培养成熟的Caco-2细胞可形成与小肠上皮细胞相同的细胞极性和致密的单细胞层组织, 其形态与人体的肠上皮细胞相似, 并且可以分泌与人体相同的酶类及转化因子等^[10], 且与被动吸收的营养物质有较好的相关性, 临床常用于建立体外肠屏障模型^[11].

本研究利用MTT比色方法了解阿司匹林对Caco-2细胞的剂量及时间毒性情况. MTT还原物甲瓩是能量代谢的反映, 其生成量随着细胞数的增多而增加^[12-13]. 由本研究可以看出, 阿司匹林在实验给定浓度(0.1、1、10 mmol/L)条件下, 对Caco-2细胞的生长有显著的抑制作用, 且这种抑制作用随着作用时间和作用浓度的增加

越来越明显. 这说明阿司匹林可以直接作用于肠上皮细胞, 引起肠上皮细胞的损伤. 此外本实验进一步测定Caco-2细胞单层细胞的跨膜电阻抗, 实验结果表明阿司匹林可以使TER值明显降低, 说明单层细胞的通透性升高, 即提示上皮细胞完整性可能已经遭到破坏. 肠黏膜屏障是肠道最重要的一道屏障, 由完整的肠上皮细胞和紧密连接构成. 阿司匹林对细胞屏障功能的破坏可能是由于破坏了细胞间的紧密连接而引起^[14-15]. 这种可能的机制将在今后的实验中进一步证实.

本实验证明, 阿司匹林对肠上皮细胞有直接的杀伤作用, 且可以破坏上皮细胞屏障功能, 为进一步研究阿司匹林损伤肠上皮细胞屏障功能及其机制奠定了一定的实验基础.

4 参考文献

- 1 韩英, 李世荣. 非甾体类抗炎药物与食管、大肠癌的预防. *中华消化杂志* 1998; 18: 364
- 2 Takeuchi K, Hatazawa R, Tanigami M, Tanaka A, Ohno R, Yokota A. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats. *Life Sci* 2007; 80: 329-336
- 3 Thiéfin G, Beaugerie L. Toxic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the small bowel, colon, and rectum. *Joint Bone Spine* 2005; 72: 286-294
- 4 Bjarnason I, Takeuchi K, Simpson R. NSAIDs: the emperor's new dogma? *Gut* 2003; 52: 1376-1378
- 5 Hawkey CJ. NSAIDs, coxibs, and the intestine. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47 Suppl 1: S72-S75
- 6 Somasundaram S, Sigthorsson G, Simpson RJ, Watts J, Jacob M, Tavares IA, Rafi S, Roseth A, Foster R, Price AB, Wrigglesworth JM, Bjarnason I. Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAID-enteropathy in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 639-650
- 7 Goltsov A, Maryashkin A, Swat M, Kosinsky Y, Humphery-Smith I, Demin O, Goryanin I, Lebedeva G. Kinetic modelling of NSAID action on COX-1: focus on in vitro/in vivo aspects and drug combinations. *Eur J Pharm Sci* 2009; 36: 122-136
- 8 Yokomizo A, Moriwaki M. Transepithelial permeability of myricitrin and its degradation by simulated digestion in human intestinal Caco-2 cell monolayer. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 1774-1776
- 9 Cruz N, Qi L, Alvarez X, Berg RD, Deitch EA. The Caco-2 cell monolayer system as an in vitro model for studying bacterial-enterocyte interactions and bacterial translocation. *J Burn Care Rehabil* 1994; 15: 207-212
- 10 Adebayo D, Bjarnason I. Is non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) enteropathy clinically more important than NSAID gastropathy? *Postgrad Med J* 2006; 82: 186-191
- 11 张大真, 权正良, 李增烈. 长期服用小剂量肠溶型阿司匹林对胃十二指肠黏膜损害的病例对照研究. *胃肠病学* 2006; 11: 427-430
- 12 Czyzewski K, Styczynski J. Imatinib is a substrate

■创新盘点

本研究采用Caco-2细胞与阿司匹林共培养, 通过MTT法及Caco-2单层细胞跨膜电阻抗的测定, 研究阿司匹林对Caco-2细胞增殖的影响以及对细胞紧密连接屏障的作用, 探讨阿司匹林引起肠道损伤的机制.

■同行评价

本研究紧密结合临床,设计合理,技术可行,结果对临床工作具有一定的指导价值。

- for various multidrug resistance proteins. *Neoplasma* 2009; 56: 202-207
- 13 Motskin M, Wright DM, Muller K, Kyle N, Gard TG, Porter AE, Skepper JN. Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials* 2009 Mar 20. [Epub ahead of print]
- 14 Oshima T, Miwa H, Joh T. Aspirin induces gastric epithelial barrier dysfunction by activating p38 MAPK via claudin-7. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: C800-C806
- 15 Montalto M, Maggiano N, Ricci R, Curigliano V, Santoro L, Di Nicuolo F, Vecchio FM, Gasbarrini A, Gasbarrini G. Lactobacillus acidophilus protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. *Digestion* 2004; 69: 225-228

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知

本刊讯 由广东省中西医结合学会脾胃消化病专业委员会,广东省中医药学会消化病专业委员会主办的2009年脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班将于2009-09-25/27在广东省广州市召开,现将会议征文有关事项通知如下:

1 征稿内容

中西医结合、中医治疗消化系统疾病的基础理论研究、临床经验总结、诊治的新进展,名老中医、西医和中西医结合专家个人诊治特色总结。

2 征稿要求

论文资料务必真实可靠,书写规范,简明扼要,每篇以3000字以内为宜,并附800字左右的摘要1份;来稿请用电脑打印,用word软件编入,并附软盘,或发送电子邮件,文稿中请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码及联系电话。截稿日期:2009-07/30

3 交流方式

专题报告、论文宣读与讨论答疑相结合。入选论文并参会者给予记I类学分6分,另外将择优编入《现代消化及介入诊疗》杂志。参加继续教育研讨班者另给予国家级一类学分12分。

4 投稿地址

(1)E-mail: zhangwdcn@163.com; (2)全文、摘要并附软盘寄至广东省广州市广州大道北1838号南方医院消化编辑部罗永华同志(邮编: 510105); 并注明脾胃消化病学术会议投稿。无论文者也欢迎参会或报名参加研讨班。

5 联系方式

姚永莉, 510105, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医院消化内科, 电话: 13189096556