

阿司匹林对斑马鱼胃肠道的毒性研究

孙晨,何秋霞,韩利文,陈锡强,王希敏,楚杰,韩建,王荣春,侯海荣,刘可春*

(山东省科学院药物筛选技术重点实验室,山东省科学院生物研究所,山东 济南 250014)

摘要:以斑马鱼作为动物模型,通过胃肠道蠕动功能分析、胃肠道内皮细胞分泌功能检测和肠粘膜组织形态学观察等,对阿司匹林的胃肠道毒性做了初步分析。研究发现,阿司匹林浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可以加快斑马鱼胃肠道的蠕动;浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,虽然斑马鱼肠粘膜的组织形态未受损害,但是位于肠粘膜上的杯状细胞的分泌功能会受到影响。

关键词:阿司匹林;斑马鱼;胃肠道;毒性

中图分类号:R965.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-4026(2016)05-050-06

Toxicity of aspirin to gastrointestinal tract of zebrafish

SUN Chen, HE Qiu-xia, HAN Li-wen, CHEN Xi-qiang, WANG Xi-min, CHU Jie,
HAN Jian, WANG Rong-chun, HOU Hai-rong, LIU Ke-chun*

(Key Laboratory for Drug Screening Technology of Shandong Academy of Sciences,
Biology Institute, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China)

Abstract : We performed a preliminary analysis of gastrointestinal toxicity of aspirin through analysis of peristalsis, detection of secretion functionality of gastrointestinal endothelial cells and histomorphology of intestinal mucosa with zebrafish as animal model. We discover that aspirin concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ can improve the peristalsis. Aspirin concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ will impair secretion functionality of goblet cells on intestinal mucosa though routine HE staining among intestinal mucosa does not change.

Key words : aspirin; zebrafish; gastrointestinal tract; toxicity

阿司匹林(aspirin)又称乙酰水杨酸,是一类历史悠久的解热镇痛类非甾体抗炎药。1853年,Gerhardt首次使用水杨酸与乙酰酐合成了乙酰水杨酸。1898年,Hoffmann合成了稳定的乙酰水杨酸,并将其应用于风湿性关节炎的治疗。1899年,Dreiser将阿司匹林介绍到临床,并正式命名为 aspirin^[1-3]。1971年,Simth等^[4]发现,阿司匹林可以抑制血小板前列腺素的合成。1974年,Elwood等^[5]证实,阿司匹林在预防心脏病方面具有一定功效。目前在临床上,阿司匹林常被应用于抗风湿、消炎解热、预防血栓形成、防止冠心病和治疗老年性痴呆等^[3,6-8]。以小鼠或大鼠等多种模式生物作为实验对象的研究发现,阿司匹林可抑制化学诱导性癌症

收稿日期:2016-08-17

基金项目:山东省自主创新重大专项(2014ZZCX0214);山东省三院联合基金(ZR2015YL009);山东省科学院青年基金(2015QN011)。

作者简介:孙晨(1985—),女,博士,助理研究员,研究方向为基于斑马鱼模型的药物筛选技术。

* 通信作者,刘可春(1964—),男,博士,研究员,研究方向为药物筛选。E-mail:hliukch@sdas.org

的发生^[9-11]。该作用机制可能与阿司匹林的抗炎作用相关^[12]。Kopp等^[13-14]研究发现,阿司匹林可以通过抑制转录因子NF- κ B的活性来调控炎性细胞因子的产生,并最终抑制肠道肿瘤的生长。虽然阿司匹林作为临床上常用的抗炎药物,具有多种功效,但是其不良反应也较多。很多人服用阿司匹林后出现腹痛、腹胀、食欲差和泛酸等症状,胃肠道反应已成为阿司匹林最常见的不良反应之一^[15]。临床应用阿司匹林时,如何对其用药剂量和指征进行把握,避免大剂量、长时间用药,以及如何有效降低不良反应的发生已成为人们关注的焦点。

斑马鱼(*zebrafish, Daniorerio*)是生命科学领域三大常用模式生物之一,既具哺乳动物类似的生理生化特征,又具有饲养成本低,繁殖周期短,体外受精、体外发育、胚胎透明和发育快速等特点^[16]。斑马鱼的胃肠道在细胞功能和解剖学方面均与人类相似,由内皮细胞、结缔组织、外纵肌和环状肌组成。胚胎发育至26~126 hpf(hours post fertilization,受精后小时),斑马鱼胃肠道的管腔形成并不断生长,形成有功能的肠道上皮。在未喂食情况下,斑马鱼胚胎受精约72 hpf,肠道首次出现不稳定的自发收缩。伴随着发育的进行,第120~144 hpf,斑马鱼大部分的卵黄囊被吸收,肠道自发的蠕动及摄食能力增强^[17-18]。

基于上述独特优势,本实验选择斑马鱼作为模式动物,通过胃肠道蠕动功能分析、胃肠道内皮细胞分泌功能检测和肠粘膜组织形态学观察等,对阿司匹林的胃肠道毒性做了初步研究,为后续进一步的毒性机制研究提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验采用受精120 hpf的野生AB系斑马鱼,由山东省科学院药物筛选技术重点实验室提供。斑马鱼的饲养和繁殖参照文献^[19]。雌雄斑马鱼在28℃,14 h光照/10 h黑暗条件下分开养殖,每日于9:30和16:30分别喂食两次丰年虫。交配取卵时,于前日将健康成熟斑马鱼按雌雄比1:1或1:2的比例放入交配缸内,中间放置隔板,置于黑暗环境中,次日亮灯前抽去隔板,光照刺激使其排卵。排卵后半小时内将成鱼捞出,使排卵时间控制在半小时内,以降低胚胎间发育时间的差异。收集受精卵,并对其进行消毒和清洗。随后将受精卵置于28℃培养箱内,保持14 h光照/10 h黑暗周期培养,并及时吸出死亡胚胎。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂

阿司匹林标准品(中国食品药品检定研究院);多潘立酮标准品(加拿大TRC公司)。以上两种标准品均用二甲基亚砜(中国国药集团)溶解后,配制成10 mg/mL的储备液。三卡因(Sigma-Aldrich公司)使用去离子水配制成1 mg/mL的储备液。钙黄绿素(Sigma-Aldrich公司)用培养水(NaCl 5 mmol/L, KCl 0.17 mmol/L, CaCl₂ 0.4 mmol/L, MgSO₄ 0.16 mmol/L, 去离子水配制)溶解后,配制成质量分数1%的储备液。上述储备液均置于4℃冰箱备用。阿尔新蓝(Sigma-Aldrich公司)使用体积分数80%的乙醇和体积分数20%的冰醋酸溶解,并配制成质量分数0.1%的工作液,置于4℃冰箱备用。无水乙醇和盐酸(中国国药集团)使用去离子水配置成体积分数1%的盐酸酒精。质量分数4%多聚甲醛(PFA)、PBS和HE染液(北京鼎国昌盛生物技术有限公司)。

1.2.2 仪器

体视荧光显微镜SZX16(日本Olympus);DP2-BSW图像软件(日本Olympus);斑马鱼饲养繁殖系统(北京爱生科技有限公司);311型水套式二氧化碳培养箱(美国ThermoForma);智能生物图像导航仪FSX100(日本Olympus),石蜡切片机HM325(美国Thermo)。

1.3 加药处理

将受精后120 h斑马鱼胚胎置于显微镜下,选取发育正常的胚胎,置于6孔板中,每孔20尾,分别设置5个组:溶剂(体积分数0.5%二甲基亚砜)对照组、阳性药物(50 μg/mL多潘立酮)对照组、30 μg/mL待试药

物(阿司匹林)剂量组、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 待试药物(阿司匹林)剂量组和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 待试药物(阿司匹林)剂量组,每组 3 个平行孔。移除 6 孔板中培养水,二甲基亚砜对照组加入 6 mL 0.5% 二甲基亚砜培养水溶液;多潘立酮对照组加入 6 mL 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的多潘立酮培养水溶液;3 个阿司匹林实验组分别在 6 mL 培养水中加入终浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的阿司匹林溶液。将以上各实验组斑马鱼胚胎分别放入 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中,14 h 光照/10 h 黑暗周期下培养 24 h。

1.4 斑马鱼胃肠道蠕动功能分析

将加药处理 24 h 后的胚胎放入含有培养水的 EP 管中,加入质量分数为 0.2% 的钙黄绿素溶液,25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温避光孵育 10 min。孵育结束后使用培养水清洗胚胎。使用质量分数 0.02% 的三卡因将斑马鱼胚胎麻醉。在荧光显微镜下利用图像采集软件对标记的胃肠道部位进行影像采集,并统计 1 min 内斑马鱼胃肠道蠕动次数。

1.5 斑马鱼胃肠道内皮细胞分泌功能检测

药物处理 24 h 的胚胎在 4% PFA 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。使用 1% 盐酸酒精清洗固定胚胎。清洗后的胚胎置于阿尔新蓝染液中,室温放置 2 h,然后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。染色后胚胎使用 1% 盐酸酒精清洗,并置于体视显微镜下,采集胃肠道部位图像。

1.6 肠粘膜组织形态学检测

药物处理 24 h 的胚胎在 4% PFA 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。固定后胚胎使用 PBS 清洗,并置于酒精中梯度脱水。使用石蜡对胚胎整体进行包埋,并制成石蜡切片。将石蜡切片进行 HE 染色,然后在显微镜下对胃肠道部位的组织形态进行观察。

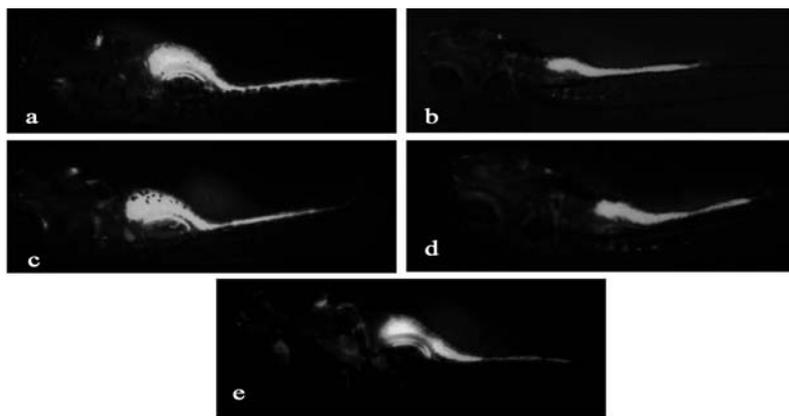
1.7 统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计学差异采用 ANOVA 进行分析,Tukey 检验做组间比较。 $P<0.05$ 为有显著性差异, $P<0.01$ 为有极显著性差异。

2 结果

2.1 阿司匹林对斑马鱼胃肠道蠕动能力的影响

钙黄绿素活体染色后,根据采集影像(图 1),在 1 min 内对溶剂对照组(0.5% 二甲基亚砜)、阳性对照组(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多潘立酮)和阿司匹林剂量组(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的斑马鱼胚胎的胃肠道蠕动次数进行计数。结果显示,溶剂对照组和阳性对照组的平均蠕动次数分别为 10.2 和 21 次。阿司匹林剂量组的平均蠕动次数分别为 11 ± 1.67 、 13.3 ± 2.16 和 11.2 ± 1.60 次,如表 1 所示。



a 溶剂对照组;b 阳性对照组;c 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿司匹林溶液处理组;
d 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿司匹林溶液处理组;e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿司匹林溶液处理组。

图 1 钙黄绿素活体标记斑马鱼胃肠道

Fig.1 Vitalstaining of gastrointestinal tract of zebrafish

表1 阿司匹林对斑马鱼胃肠道蠕动功能的影响($n=7$)Table 1 Impact of aspirin on zebrafish gastrointestinal peristalsis ($n=7$)

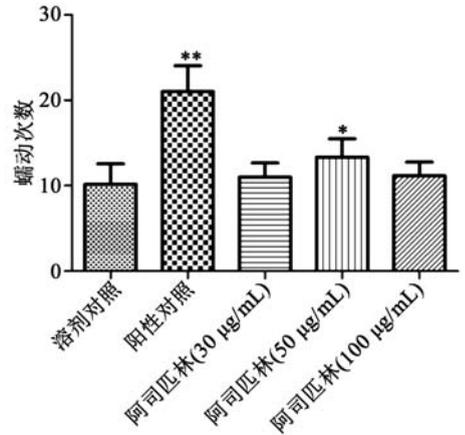
测试物	浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1 min 内斑马鱼肠道蠕动次数/次
二甲基亚砜(溶剂对照)	5	10.2±2.40
多潘立酮(阳性对照)	50	21±3.03 **
阿司匹林	30	11±1.67
	50	13.3±2.16 *
	100	11.2±1.60

注: * 表示 $P<0.05$, 与溶剂对照组之间的差异具有显著性意义; ** 表示 $P<0.01$, 与溶剂对照组之间的差异具有非常显著性意义。

由表1可以看出,当阿司匹林处理浓度为 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,斑马鱼的胃肠道蠕动能力未受明显影响。但是当阿司匹林处理浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,与溶剂对照组相比,斑马鱼的胃肠道蠕动能力增加,且差异具有统计学意义($P<0.05$),结果如图2所示。

2.2 阿司匹林对斑马鱼胃肠道内皮细胞分泌功能的影响

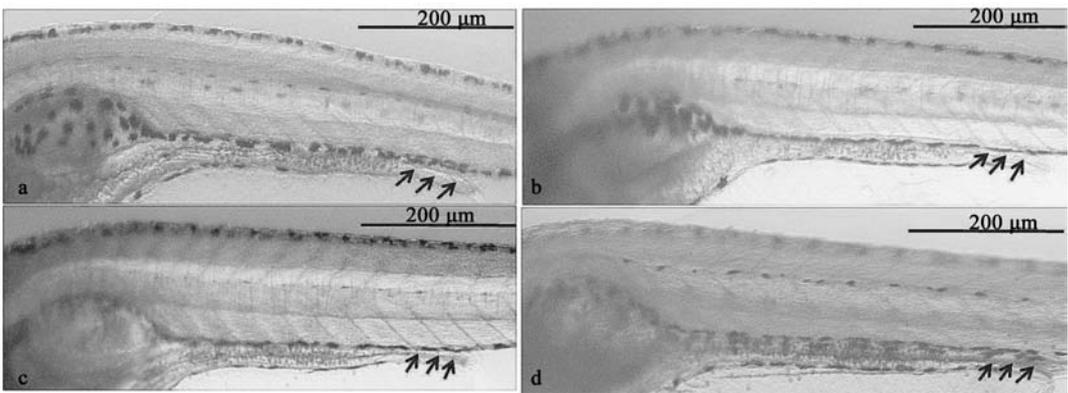
杯状细胞是胃肠道里一种特殊的内皮细胞,可分泌粘蛋白,如 MUC2^[18,20]。阿尔新蓝染料可以与粘蛋白进行特异的结合,因此通过阿尔新蓝染色,可对斑马鱼胃肠道内杯状细胞的分泌功能进行检测。如图3所示,与对溶剂对照组相比,阿司匹林处理浓度为 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,斑马鱼胃肠道内粘蛋白含量未有明显改变(图3b);但是当阿司匹林处理浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 或 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,斑马鱼近泄殖腔部位的胃肠道内,粘蛋白出现明显淤积(图3c,3d)。上述结果表明,浓度 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 或 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的阿司匹林可对斑马鱼杯状细胞的分泌功能造成影响,使其粘蛋白分泌量异常增加。



* 表示 $P<0.05$, 与溶剂对照组之间的差异具有显著性意义;
** 表示 $P<0.01$, 与溶剂对照组之间的差异具有非常显著性意义。

图2 单位时间内斑马鱼胃肠道蠕动次数统计的柱状图

Fig.2 Histogram of gastrointestinal peristalsis number in unit time



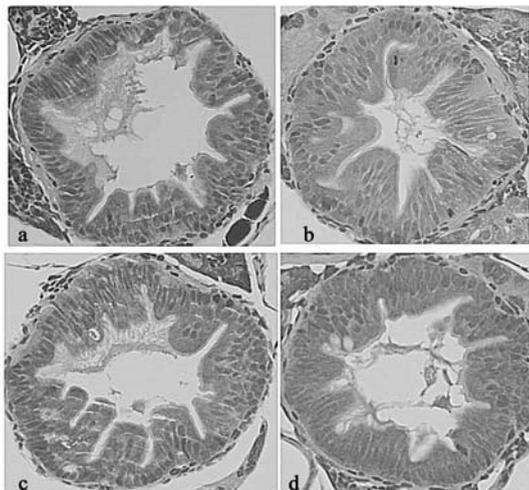
a 溶剂对照组; b $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 阿司匹林溶液处理组; c $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 阿司匹林溶液处理组(粘蛋白淤积于胃肠道后部,箭头所示); d $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 阿司匹林溶液处理组(粘蛋白淤积于胃肠道后部,箭头所示)。

图3 斑马鱼胃肠道阿尔新蓝染色

Fig.3 Alcian blue staining of gastrointestinal tract of zebrafish

2.3 阿司匹林对斑马鱼肠粘膜组织形态的影响

斑马鱼肠粘膜由上皮和固有层组成。粘膜上皮主要包括柱状上皮细胞、杯状细胞和淋巴细胞,柱状上皮细胞位于粘膜表面,排列整齐,细胞核呈椭圆形;杯状细胞多分散在柱状上皮细胞之间,且头部膨大;淋巴细胞则多分布在基底部。固有层主要由淋巴细胞和成纤维细胞组成^[21]。如图4所示,不同浓度阿司匹林处理组中,斑马鱼的肠粘膜均向肠腔内折叠,形成肠绒毛,且肠绒毛多呈指状或分枝状;粘膜表面的柱状上皮细胞排列整齐,细胞核呈椭圆形。与溶剂对照组相比,各阿司匹林处理组的斑马鱼肠粘膜组织形态无明显异常。



a 溶剂对照组;b 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿司匹林溶液处理组;c 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿司匹林溶液处理组;d 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 阿司匹林溶液处理组。

图4 斑马鱼胃肠道 HE 染色

Fig.4 HE staining of gastrointestinal tract of zebrafish

3 讨论

阿司匹林作为医药史上三大经典药物之一^[22],在临床上被广泛使用。但近年来的研究发现,若使用不当,阿司匹林常会带来明显副作用,严重时甚至造成生命危险^[23]。因此本研究以斑马鱼为模型,对阿司匹林的胃肠道毒性进行了初步分析检测。研究发现,当阿司匹林浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,可以加快斑马鱼胃肠道的蠕动。当阿司匹林浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,虽然斑马鱼肠粘膜的组织形态未受影响,但是位于肠粘膜的杯状细胞的分泌功能会发生改变。

胃肠运动功能是消化道最主要的功能之一,其调节机制非常复杂。近年来随着社会竞争的日趋激烈,人们生活节奏的加快和工作压力的增大而导致的胃肠动力障碍性疾病问题日趋普遍。截至目前为止,胃肠动力障碍性疾病已成为临床的常见病和多发病。由于胃肠动力障碍性疾病多属于功能性疾病,因此目前尚无特效治疗方法。我们发现一定浓度的阿司匹林可提高肠道的蠕动次数,该发现可为胃肠动力药物的研发提供新的思路。

肠道作为体内和外界相通的器官,是机体重要的免疫器官。肠粘膜上皮、肠粘液、肠道菌群、激素、肠道相关淋巴组织和胆盐等共同构成肠道屏障,可阻止肠内有害物质穿过肠粘膜进入机体其他组织器官或是血液循环系统^[24]。我们以斑马鱼为模型研究发现,阿司匹林在一定浓度下虽然可以不损坏肠粘膜结构的完整性,但是却可以扰乱肠道内粘蛋白的分泌。而粘蛋白又是肠粘液的重要成分,在肠道屏障中起着重要功能,可帮助机体维持平衡、免受机械损伤或病原体感染等。我们认为,阿司匹林可能通过扰乱粘蛋白的分泌,对肠道屏障起着潜在毒害作用,而这也是其造成胃肠道副作用的重要原因之一。

参考文献:

- [1] JUCK D B. One hundred years of aspirin [J]. *Lancet*, 1997, 350(9075): 437-439.
- [2] 王斌. 阿司匹林抵抗的研究进展 [J]. *中国脑血管病杂志*, 2010, 7(10): 553-556.
- [3] 郭宗儒. 经久不衰的阿司匹林 [J]. *药学学报*, 2015, 50(4): 506-508.
- [4] SMITH J B, WILLIS A L. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets [J]. *Nat New Biol*, 1971, 231(25): 235-237.
- [5] ELOOD P C, COCHRANE A L, BURR M L, et al. A randomized controlled trial of acetyl salicylic acid in the secondary prevention of mortality from myocardial infarction [J]. *British Medical Journal*, 1974, 1(5905): 436-440.
- [6] KAUR G, KAUR J, MITTAL N, et al. The effect of prostaglandin synthase inhibitor, aspirin on the rat intestinal membrane structure and function [J]. *Nutr Hosp*, 2010, 25(2): 290-298.
- [7] PATEL P A, FLEISHER L A. Aspirin, clopidogrel, and the surgeon [J]. *Advances in Surgery*, 2014, 48(1): 211-222.
- [8] FAMENINI S, YOUNG L C. Aspirin use and melanoma risk: A review of the literature [J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2014, 70(1): 187-191.
- [9] DUPERRON C, CASONUOY A. Chemopreventive efficacies of aspirin and sulindac against lung tumorigenesis in A/J mice [J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(5): 1001-1006.
- [10] BARNES C J, LEES M. Determination of an optimal dosing regimen for aspirin chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats [J]. *British Journal of Cancer*, 1999, 79(11/12): 1646-1650.
- [11] MORI H, SUGIE S, RAHMAN W. Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine-induced mammary carcinogenesis in rats [J]. *Cancer*, 1999, 143(143): 195-198.
- [12] GWYN K, SINICROPE F A. Chemoprevention of colorectal cancer [J]. *Am J Gastroenterology*, 2002, 97(1): 13-21.
- [13] KOPP E, GHOSH S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin [J]. *Science*, 1994, 265(5274): 2017-2019.
- [14] TAK P P, FIRESTEIN G S. NF-kappa B: A key role in inflammatory diseases [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(1): 7-11.
- [15] 路国涛, 蓝宇, 阴英, 等. 小剂量阿司匹林所致消化道损伤防治状态调查 [J]. *中华内科杂志*, 2013, 52(3): 226-228.
- [16] MACRAE C A, PETERSON R T. Zebrafish as tools for drug discovery [J]. *Dressnature Reviews Drug Discovery*, 2015, 14(10): 721-731.
- [17] RICH A. A new high-content model system for studies of gastrointestinal transit: the zebrafish [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2009, 21(3): 225-228.
- [18] STEFAN H, OEHLERS M V F, CHRISTOPHER J H, et al. Chemically induced intestinal damage models in zebrafish larvae [J]. *Zebrafish*, 2013, 10(2): 184-193.
- [19] WESTERFIELD M. *The zebrafish book* [M]. Eugen, OR: Inst of Neuro Science, 1994.
- [20] HEAZLEWOOD C K, COOK M C, ERI R, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis [J]. *PLoS Med*, 2008, 5(3): e54.
- [21] 林金杏, 章琳俐, 姚一琳, 等. 斑马鱼肠道显微和超微结构的研究 [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2013, 45(3): 60-65.
- [22] 刘存义, 张维君, 康云鹏. 冠心病患者的福祉: 再谈阿司匹林 [J]. *药物与人*, 2010(3): 20-21.
- [23] 赵婷, 赵鸿昆, 李朝阳, 等. 阿司匹林致不良反应 136 例病例分析 [J]. *吉林医药学院学报*, 2014, 35(2): 84-87.
- [24] 陈忠龙, 吴小南. 肠黏膜屏障与胃肠疾病 [J]. *海峡预防医学杂志*, 2007, 13(2): 31-32.