

# 小鼠小肠 RNA 对受<sup>60</sup>Co γ 射线照射同系 小鼠小肠损伤的恢复

曾桂英<sup>1</sup> 田芙蓉<sup>1</sup> 陈永斌<sup>1</sup> 任东青<sup>1</sup> 崔大祥<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(第四军医大学放射医学教研室 西安 710032)

<sup>2</sup>(第四军医大学全军基因诊断技术研究所 西安 710032)

**摘要** 用不同剂量的<sup>60</sup>Co γ射线照射 BALB/c 小鼠的全身或腹部,于照射后 1—3h 内注入同系正常小鼠小肠 RNA,通过肠腺存活率的测定,观察小肠 RNA 显效时间和照射方式对其修复作用的影响。结果表明,(1)小鼠受照射后 6h 空肠肠腺存活率即开始降低,4d 时降至最低值;(2)受腹部照射小鼠在小肠 RNA 注入后 6h 肠腺存活率比照射对照组提高 21.40%;(3)正常小鼠小肠 RNA 在促进受全身照射小鼠十二指肠、空肠和回肠恢复时的 DMF(Dose Modifying Factor)分别为 1.17、1.12、1.10。结果说明,小肠 RNA 不仅可提高受腹部照射同系小鼠空肠肠腺存活率,而且也可提高受全身照射同系小鼠十二指肠、空肠和回肠的肠腺存活率,并在注入后 6h 即可表现出来。

**关键词** 小肠 RNA, γ射线, 小鼠, 肠腺存活率

**中图分类号** R818.05

外源核酸(DNA、RNA)及其前体对受照射小鼠 4d 后肠腺的恢复作用文献[1—5]已报道。本工作采用全身和腹部照射法,探讨小肠 RNA 对小鼠受<sup>60</sup>Co γ射线照射后 4d 内小鼠小肠损伤修复作用的显效时间和照射方式对其修复作用的影响,并与照射后 8d 作比较。

## 1 材 料 和 方 法

### 1.1 小肠 RNA 的提取和鉴定

取正常 BALB/c 小鼠的小肠,按文献[1]的方法提取小肠 RNA,溶于经灭菌处理的 0.1% DEPC 水中, -20℃ 保存,用光密度扫描和生化法进行浓度和纯度的测定。注入时用注射用生理盐水稀释至所需浓度。

### 1.2 动物

实验分批进行。选用 BALB/c 雄性小鼠,10—12 周龄,体重 22—26g,按体重进行随机分组。同一剂量和同一时间点照射对照组和小肠 RNA 组动物数见表 1 和表 2。

### 1.3 照射条件

小鼠以 0.5% 戊巴比妥钠(40mg·kg<sup>-1</sup>体重)腹腔注射麻醉后,固定于有机玻璃照射盒内,放置在与源同高的照射台上,用<sup>60</sup>Co γ射线进行一次全身或腹部照射。全身照射时的剂量率为 65.46—64.21cGy·min<sup>-1</sup>,腹部照射时的剂量率为 96.659—95.59cGy·min<sup>-1</sup>;照射源至动物中心距离为 1.7m,照射总时间的一半后将动物进行翻身照射,以求得照射剂量的均匀。在进行腹部照射时,除小鼠胸骨剑突至髂骨上缘间(称为腹部)外,躯体的其余部位用 5cm 厚的铅块屏蔽。

学校“211”工程经费(98X207)资助

第一作者:曾桂英,女,1945年12月出生,1970年毕业于华西医科大学,教授,放射生物学专业

收稿日期:初稿 2000-05-09, 修回 2000-09-30

Tab.1 Number of died mice within 4.5d after whole body  $\gamma$  ray irradiation

Irradiated doses /cGy	Number of irradiated mice		Number of died mice	
	Intestinal RNA group	Irradiated control	Intestinal RNA group	Irradiated control
1100	8	8	3	3
1050	8	8	2	3
1000	8	8	2	3
950	7	7	0	2
900	7	7	0	1

Tab.2 Number of died mice within 8d after abdominal  $\gamma$  ray irradiation

Time after irradiation/h	Number of irradiated mice		Number of died mice	
	Intestinal RNA group	Irradiated control	Intestinal RNA group	Irradiated control
6	10	10	0	0
12	8	8	0	0
24	10	10	0	0
48	8	8	0	0
72	8	8	0	0
96	10	10	0	3
192	10	10	2	3

## 1.4 小肠 RNA 的注入

分别采用肌肉注射法和局部肠腔扩张注入法给受照射小鼠体内注入小肠 RNA。

1.4.1 全身照射小鼠小肠 RNA 的注入 小鼠接受全身照射后 1~2h 内,给小肠 RNA 组每只小鼠后腿肌肉内注入含有小肠 RNA 的生理盐水注入液 0.2mL(含小肠 RNA 80 $\mu$ g);照射对照组在同样部位只注入 0.2mL 注射用生理盐水。

1.4.2 腹部照射小鼠小肠 RNA 的注入 采用局部肠腔扩张注入法注入小肠 RNA<sup>[6]</sup>,即小鼠接受腹部照射后 1~3h 内,在长约 3cm 的空肠内注入含有小肠 RNA 的生理盐水注入液 0.4mL(含小肠 RNA 40 $\mu$ g),称为小肠 RNA 组。照射对照组小鼠仅在后腿肌肉内注入 0.4mL 的注射用生理盐水。

## 1.5 肠段取材

按实验设计于照射后不同时间活杀小鼠,腹部照射小鼠取小肠 RNA 组注入肠段和照射对照组的相应肠段。全身照射小鼠活杀后,按文献[5]的取材标准分别取十二指肠、空肠和回肠标本,冲净肠内容物,制作肠腺计数标本。

## 1.6 肠腺存活率的测定

取小肠 RNA 组和照射对照组的十二指肠、空肠和回肠段,制作测定肠腺存活率的标本;在低倍镜下分别计数单位面积肠片上的肠腺数和绒毛数,按下列公式计算肠腺存活率<sup>[7]</sup>。

$$\text{肠腺存活率}(\%) = \frac{\text{照射肠片上的肠腺绒毛比}}{\text{正常肠片上的肠腺绒毛比}} \times 100\%$$

# 2 实验结果

## 2.1 小肠 RNA 的纯度和浓度

提取的小肠 RNA 用 UV-3000 双光束双波长分光光度计(日本岛津)进行光密度扫描,

呈典型的核酸吸收光谱,在 260nm 处有吸收峰,求得  $A_{260}$  与  $A_{280}$  的比值为 1.82~1.95;并由光密度值求出全身照射时所用小肠 RNA 原液浓度为  $4918\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,腹部照射时所用小肠 RNA 原液浓度为  $2360\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。经鉴定提取的小肠 RNA 中不含蛋白和 DNA。

## 2.2 动物的一般情况

全身照射和腹部照射小鼠在照射后 1—2d,小肠 RNA 组和照射对照组均有进食减少,但活动度和毛色与正常动物间无显著差异。小鼠接受 1100cGy γ 射线全身照射后第 3d,小肠 RNA 组和照射对照组小鼠均出现衰竭、鼠毛蓬乱、拒食,大便秘等症,且出现死亡。1000cGy 以下 γ 射线全身照射后,小肠 RNA 组小鼠鼠毛较光滑,光泽较好,大便较干,而照射对照组小鼠鼠毛蓬乱,光泽差,大便秘,上述症状随照射剂量的降低而减轻,第 4d 起开始出现小鼠死亡。除活杀外,其余小鼠在 4.5d 内全部死亡(见表 1)。腹部照射后小肠 RNA 组和照射对照组小鼠全身情况变化与受 1000cGy 以下 γ 射线全身照射变化相似,但程度较轻,第 4d 后才开始出现动物死亡(见表 2)。

## 2.3 小肠标本的肉眼观察

腹部照射后 6、12、24、48、72h 活杀时可见小肠 RNA 组小鼠小肠肠壁较厚,色红润,随着照射后时间的延长,个别动物肠壁出现轻微水肿;而照射对照组小鼠肠壁随照后时间的延长逐渐变薄,颜色逐渐变白,甚至出现严重水肿。照射后第 4d 活杀时,小肠 RNA 组小鼠小肠肠腔内充满食物,肠壁较厚、红润,个别动物肠壁有水肿;而照射对照组小鼠肠腔内充盈胆汁和积液,肠壁较薄,水肿发白。全身照射后第 4d 活杀时两组小鼠小肠的变化与腹部照射时相似,但随照射剂量增加而加重,特别是 1100cGy 全身照射后,两组动物肠壁均有严重水肿,肠腔内由胆汁样液体充盈。

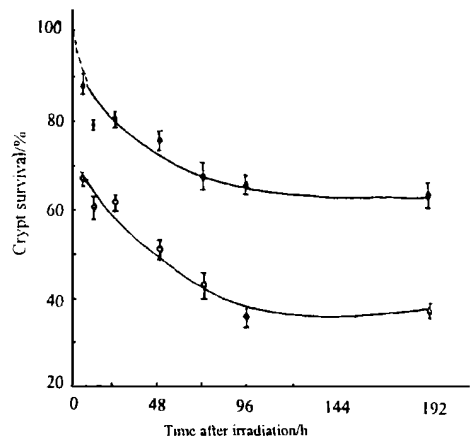
## 2.4 肠腺存活率的变化

在低倍镜下分别计数不同肠段单位面积肠片上的肠腺数和绒毛数,按公式计算出肠腺存活率。

### 2.4.1 腹部照射后小鼠空肠肠腺存活率的变化

小鼠接受 1150cGy γ 射线腹部照射后不同时间活杀,取空肠段,测定肠腺存活率,结果见图 1。从图 1 看到,小鼠在接受 1150cGy <sup>60</sup>Co γ 射线腹部照射后 6h,肠腺存活率即降至正常值的 67.17%;在照射后 1—3h 内注入小肠 RNA 可使空肠肠腺存活率维持在 88.63%,明显高于照射对照组 ( $p < 0.01$ )。随着照射后时间的推移,小肠 RNA 组和照射对照组肠腺存活率均下降,照射后第 4d 时,照射对照组已下降至 36.83%,而小肠 RNA 组仍维持在 66.35%,直到照射后第 8 天,仍继续维持在这一水平。在进行肠腺和绒毛计数时还见到小肠 RNA 注入组肠腺丰满,数量较多,绒毛较大;照射对照组从照射后 6h 起肠腺较稀疏,较扁平,绒毛逐渐变小,边界模糊,在照射后第 4 天时,小肠 RNA 组和照射对照组间的差别更加明显。

### 2.4.2 小鼠全身照射后第 4 天肠腺存活率的变化



**Fig. 1** Survival of mouse jejunum crypt as a function of time after abdominal γ ray irradiation  
40μg/mouse intestinal RNA was administered to the regional intestinal lumen 1—3h after 1150cGy abdominal γ ray irradiation in mice. The data are expressed as  $\bar{x} \pm s$   $n = 7 - 10$ ,  $p < 0.01$  as compared with the irradiated control.  
(●) Intestinal RNA (mouse),  
(○) Irradiated control.

小鼠接受 900、950、1000、1050、1100cGy  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  射线全身照射后采用肌肉注射法给小肠 RNA 组小鼠注射小肠 RNA，照射对照组注射生理盐水，于照射后第 4 天时活杀，分别测定小肠 RNA 注射组和照射对照组十二指肠、空肠和回肠肠腺存活率。结果见图 2。

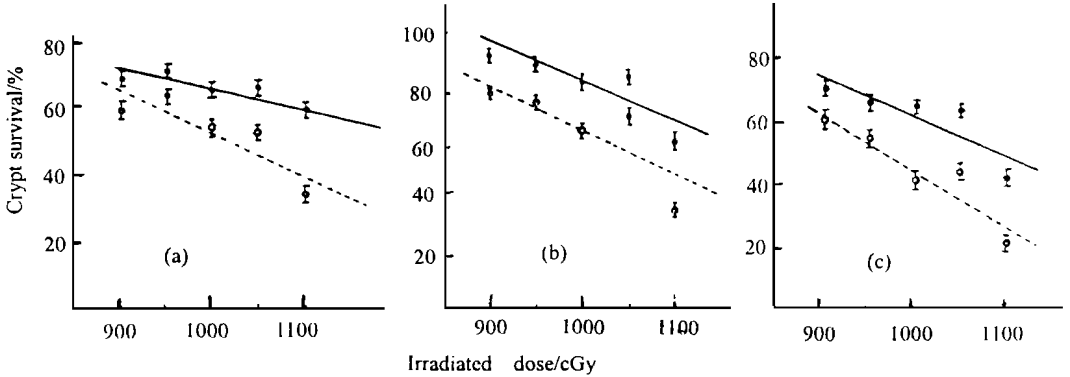


Fig. 2 Survival of mouse intestinal crypt as a function of doses of whole body  $\gamma$  irradiation  
(a) Duodenum, (b) Jejunum, (c) Ileum

$80\mu\text{g}$ /mouse intestinal RNA was intramuscularly injected into mice 1–3h after whole body  $\gamma$  ray irradiation, The data are expressed as  $\bar{x} \pm s$   $n=5-7$ , other point in Fig. 2, except  $2p=0.015$ ,  $p < 0.01$ , as compared with the irradiated control,

(•) Intestinal RNA (group), (○) Irradiated control

在半对数坐标上，小肠 RNA 组和照射对照组各肠段肠腺存活率均随照射剂量的增加呈直线下降，小肠 RNA 组与照射对照组的直线方程分别为：十二指肠  $\lg y_1 = 2.3897 - 0.0006x$ ， $\lg y_2 = 3.0906 - 0.0014x$ ；空肠  $\lg y_3 = 3.1891 - 0.0014x$ ， $\lg y_4 = 3.4600 - 0.0018x$ ；回肠  $\lg y_5 = 3.0397 - 0.0013x$ ， $\lg y_6 = 3.5863 - 0.0021x$ ；分别求出各肠段、各组的  $D_{01}$  值， $LD_{50}$  (使肠腺存活率降至正常值的 50% 时所需的照射剂量) 和 DMF (小肠 RNA 组与照射对照组的  $LD_{50}$  的比值，见表 3)。

Tab. 3  $LD_{50}$   $D_{01}$  and DMF of different intestinal segments of mice after whole body  $\gamma$  ray irradiation

Mouse intestinal segment	Irradiated control/cGy		Intestinal RNA group/cGy		DMF
	$LD_{50}$	$D_{01}$	$LD_{50}$	$D_{01}$	
Duodenum	966.39	299.86	1126.02	585.73	1.17
jejunum	972.93	238.56	1087.66	315.19	1.12
Ileum	904.75	207.00	999.03	321.76	1.10

### 3 讨论

小肠是电离辐射的敏感组织，在较大剂量的  $\gamma$  射线照射后，由于小肠上皮干细胞的死亡，肠腺细胞的变性、坏死，导致绒毛上皮细胞来源短缺，出现绒毛裸露，引起严重的肠道损伤，甚至出现机体的死亡。在肿瘤 (特别是盆腔和腹部肿瘤) 的放射治疗和辐射事故情况下，这类病例尤为多见，但至今尚无理想的治疗措施。我们过去的研究已证实，外源核酸 (DNA、RNA) 及其前体可促进受照射小鼠肠腺存活率的提高，但核酸进入体内后多长时间起作用，尚未见文献报道。

本实验观察到：小鼠在接受 1150cGy  $\gamma$  射线腹部照射后 6h，空肠肠腺存活率即降低至正常值的 67.17%；在照射后 1–3h 内注入小肠 RNA 可使空肠肠腺存活率提高 21.46% (与照射

对照组相比,  $p < 0.01$ ); 随照射后时间的延迟, 两组肠腺存活率均有降低, 但小肠 RNA 组一直高于照射对照组 18.62%—29.52% ( $p < 0.001$ )。田芙蓉等另文发表观察到, 照射后 6h 时照射对照组空肠肠腺细胞凋亡数明显高于小肠 RNA 组 ( $p < 0.01$ ), p53 表达增加, 随照射后时间推移, 两组凋亡细胞数也减少, p53 表达减弱, 但照射对照组仍高于小肠 RNA 注入组。文献 [8] 用 mRNA 差异展示和消杂交基础上的 LD-PCR 技术也证明了给受照小鼠注入小肠 RNA 后 6h 即引起了小肠组织基因表达的变化, 并发现了 18 个与小肠 RNA 促肠道辐射损伤修复相关的新基因片段 (GeneBank 收录号 AF240164—240181); 因此, 我们认为大剂量电离辐射作用于肠腺细胞 (包括小肠上皮干细胞), 出现基因及其产物表达的变化, 引起细胞的变性、坏死和凋亡, 即细胞的死亡 (间期死亡和增殖死亡), 降低了肠腺存活率。小鼠受照射后引入外源小肠 RNA 可通过某些基因及其产物表达的变化, 调控细胞周期等增加肠腺细胞的存活, 提高肠腺存活率。

从不同剂量的  $\gamma$  射线全身照射实验结果看到, 小肠 RNA 可使受照小鼠十二指肠、空肠、回肠的肠腺存活率分别增加 11.33%—20.92% ( $p < 0.01$ ), 17.41%—23.01% ( $p < 0.01$ ) 和 12.46%—25.62% ( $p < 0.05$  和  $p < 0.01$ )。说明小肠 RNA 可以提高受全身照射小鼠小肠各段的肠腺存活率。

实验中观察到全身照射时动物的全身反应比腹部照射时严重, 肠腺存活率降低严重, 动物死亡率也增高, 这可能是由于全身照射时造血损伤严重, 而严重的造血损伤加重了肠道损伤, 而肠道损伤又将加重造血损伤的缘故, 因此在治疗时, 应全面考虑综合处理, 才能提高急性放射病的治疗水平。

本实验结果表明, 小肠 RNA 不仅可提高受腹部照射小鼠空肠肠腺存活率, 也可提高受全身照射小鼠十二指肠、空肠和回肠肠腺存活率, 且在注入后 6h 即可表现出来。这些变化可能与注入小肠 RNA 引起的某些基因及其产物表达的变化以及新基因的出现等有关。而这些高表达的基因及其产物怎样调控肠上皮细胞的损伤修复有待进一步深入探讨。

## 参 考 文 献

- 1 曾桂英, 陈镜复, 刘爱平等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1993, **11**(1): 53—57  
ZENG G Y, CHEN B F, LIU A P *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 1993, **11**(1): 53—57
- 2 刘爱平, 曾桂英, 周元恺. 生物化学与生物物理进展, 1993, **20**(1): 66—68  
LIU A P, ZENG G Y, ZHOU Y K. Adv Biochem Biophys, 1993, **20**(1): 66—68
- 3 曾桂英, 韩士臣, 刘爱平等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1995, **13**(4): 233—238  
ZENG G Y, HAN S C, LIU A P *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 1995, **13**(4): 233—238
- 4 周元恺, 刘爱平, 曾桂英等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1994, **12**(2): 96—99  
ZHOU Y K, LIU A P, ZENG G Y *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 1994, **12**(2): 96—99
- 5 曾桂英, 谢学军, 田芙蓉等. 辐射研究与辐射工艺学报, 1998, **16**(4): 231—233  
ZENG G Y, XIE X J, TIAN F R *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 1998, **16**(4): 231—233
- 6 周元恺, 韩士臣, 曾桂英等. 军事医学科学院院刊, 1987, **11**(2): 88—92  
ZHOU Y K, HAN S C, ZENG G Y *et al.* Bull Acad Mil Med Sci, 1987, **11**(2): 88—92
- 7 周元恺, 沈世仁. 生物化学与生物物理进展, 1979, (2): 73—76  
ZHOU Y K, SHENG S R. Adv Biochem Biophys, 1979, (2): 73—76
- 8 崔大祥, 曾桂英, 王枫等. 辐射研究与辐射工艺学报, 2000, **18**(3): 203—207  
CUI D X, ZENG G Y, WANG F *et al.* J Radiat Res Radiat Process, 2000, **18**(3): 203—207

# THE RESTORATIVE EFFECT OF MOUSE INTESTINAL RNA ON THE SMALL INTESTINE OF MICE OF THE SAME STRAIN AFTER $\gamma$ RAY IRRADIATION

ZENG Guiying<sup>1</sup> TIAN Furong<sup>1</sup> CHEN Yongbin<sup>1</sup> REN Dongqing<sup>1</sup> CUI Daxiang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Department of Radiation Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

<sup>2</sup>(Chinese PLA Institute of Genetic Diagnosis, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

**ABSTRACT** Mouse intestinal RNA was injected into the mice of the same strain within 1—3h after different doses of abdominal or whole body  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  irradiation, so as to explore the initial effective time of mouse intestinal RNA and the affection of radiation condition on its restorative effect, by measuring the survival of mouse intestinal crypt. The results showed (1) A decrease in the survival of mouse intestinal crypt began 6h after the irradiation, and the lowest survival rate appeared on the fourth day. (2) The survival of mouse intestinal crypt of the abdominal irradiated mice increased 21.4% at 6h after intestinal RNA injection as compared with that of the irradiated control group. (3) The dose modifying factor (DMF) of normal mouse intestinal RNA in the promotion of the recovery of the duodenum, jejunum and ileum of mice after whole body irradiation 1.17, 1.12 and 1.10 respectively. The above results suggest that mouse intestinal RNA can raise not only the survival of jejunum crypt of the mice of the same strain after abdominal irradiation but also the survival of crypt of the duodenum, jejunum and ileum of the mouse after whole body irradiation, which may be observed 6h after the irradiation.

**KEYWORDS** Intestinal RNA,  $\gamma$  ray, Mouse, Survival of mouse crypt

**CLC** R818.05