

# 核酸前体对小鼠肠腺辐射损伤的恢复作用

周元恺 刘爱平 曾桂英

(第四军医大学防原医学教研室, 西安 710032)

**摘要** 小鼠经 980 cGy  $\gamma$  射线腹部照射后, 用局部肠腔扩张注入法, 将被测试剂注入空肠肠腔内。于照射后第 4 d 活杀小鼠, 测定注入肠段和对照肠段的肠腺存活率。结果表明: 单独一种嘌呤类或嘧啶类核苷酸、核苷和碱基, 同小牛胸腺 DNA 一样, 具有提高照射后肠腺存活率的作用。这一事实提示, 外源核酸对辐射损伤细胞或机体的恢复效应, 并非由于其高聚状态, 而是其酶解产物作用所致。

**关键词** 电离辐射, 核酸组分, 肠腺存活率

小鼠受  $\gamma$  射线腹部照射后, 注入核酸 (DNA, RNA) 能提高其肠腺存活率<sup>[1-2]</sup>。本研究表明核酸前体嘌呤类或嘧啶类核苷酸、核苷和碱基也具有同样的作用。

## 1 材料与 方法

### 1.1 试剂

脱氧胸苷、脱氧胞苷、脱氧腺苷酸及尿酸为 Sigma 产品; 腺苷酸及次黄嘌呤为 BDH 产品; 腺苷为 EMK 产品; 胞苷、脱氧鸟苷、胸腺嘧啶及胞嘧啶为 Fluka 产品; 脱氧腺苷三磷酸、脱氧胞苷三磷酸、脱氧胸苷三磷酸、脱氧鸟苷三磷酸及小牛胸腺 DNA 由华美生物工程公司提供; 其它试剂分别为中科院生物化学研究所、上海试剂二厂及上海长阳制药厂产品。

### 1.2 动物

BALB/c 小鼠, 10—12 周龄, 体重 18—22 g。各次实验所用动物的性别不拘。每实验点用 4—6 只小鼠。

### 1.3 照射

小鼠以 0.5% 戊巴比妥钠麻醉, 用 <sup>60</sup>Co  $\gamma$  射线照射腹部 1 次, 剂量为 980 cGy, 剂量率为 69.6—75.2 cGy/min。除腹部外, 躯体的其余部分被 5 cm 厚的铅块屏蔽。照射源至动物中心的距离为 1.7 m。

### 1.4 试剂的注入方式

采用局部肠腔扩张注入法<sup>[3]</sup>。即小鼠于接受照射后 3 h 内, 麻醉固定于手术板上, 腹正中切口, 找出距 Treitz 韧带远端 3—4 cm 处长约 3 cm 的空肠, 用小动脉夹夹紧近端, 远端用手指固定, 在此肠段内注入 0.4 ml 含有被测试剂的磷酸缓冲液 (pH 7.4), 使肠腔中度扩张, 约数秒钟后松夹, 其目的是让溶液随肠腔内压力增加得以通过扩大的肠腺开口而进入肠腺腔内, 然后用丝线穿过肠系膜打结作为注入处的标记, 最后缝合腹壁。照射对照组不作手术处理, 因为预实验已经证实, 照射后施行手术并注入空白对照液组同单纯照射组的肠腺存活率无显著差别。在本实验

国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 初稿 1992-11-23, 修改稿 1993-09-29

中, 注入局部肠腔内的浓度均为 0.4 ml 磷酸缓冲液内含 2.5  $\mu\text{g}$  被测试剂。

### 1.5 肠腺存活率测定

于照射后第 4 d 活杀小鼠, 取实验组小鼠的注入肠段和照射对照组小鼠的相应肠段, 用单位面积法测定肠腺存活率<sup>[4]</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 结 果

照射后注入单独一种嘌呤类或嘧啶类核苷酸、核苷和碱基对小鼠肠腺存活率的影响结果列于表 1—4。每批实验除设照射对照组外, 还设小牛胸腺 DNA 组作比较。由表可见, 同照射对

Tab 1. Effect of mononucleotides on the intestinal crypt survival in mice after 980 cGy abdominal  $\gamma$ -irradiation

Reagent	Crypt survival/%	Reagent	Crypt survival/%	Reagent	Crypt survival/%
AMP	74.1 $\pm$ 5.0	dAMP	76.1 $\pm$ 1.6	dATP	84.1 $\pm$ 1.0
GMP	72.9 $\pm$ 2.9	dGMP	81.2 $\pm$ 3.4	dGTP	82.0 $\pm$ 1.5
CMP	72.1 $\pm$ 3.6	dCMP	79.7 $\pm$ 5.3	dCTP	84.4 $\pm$ 2.0
UMP	74.2 $\pm$ 3.8	Calf thymus DNA	74.7 $\pm$ 4.3	dTTP	80.9 $\pm$ 4.3
Calf thymus DNA	71.5 $\pm$ 3.0			ATP	87.7 $\pm$ 1.5
Irradiated control	47.3 $\pm$ 0.9	Irradiated control	55.3 $\pm$ 2.4	Calf thymus DNA	83.5 $\pm$ 3.2
				Irradiated control	57.4 $\pm$ 2.6

The concentration of reagents injected into the regional intestinal lumen all over the present study is 2.5  $\mu\text{g}/0.4\text{ ml}$  phosphate buffer solution. In this and following tables, the data are expressed as  $\bar{X} \pm \text{SEM}$ , and  $P < 0.01$  as compared with the irradiated control except the uric acid and 5-FU in table 4 where  $P > 0.05$

Tab 2. Effect of nucleosides on the intestinal crypt survival in mice after 980 cGy abdominal  $\gamma$ -irradiation

Reagent	Crypt survival/%	Reagent	Crypt survival/%
Adenosine	77.7 $\pm$ 2.2	Deoxyadenosine	80.4 $\pm$ 1.6
Guanosine	70.0 $\pm$ 4.2	Deoxyguanosine	77.7 $\pm$ 1.9
Cytidine	71.2 $\pm$ 3.2	Deoxycytidine	80.4 $\pm$ 1.6
Thymidine	70.5 $\pm$ 1.7	Deoxythymidine	77.4 $\pm$ 2.0
Calf thymus DNA	71.5 $\pm$ 3.1	Calf thymus DNA	78.4 $\pm$ 5.4
Irradiated control	47.3 $\pm$ 0.9	Irradiated control	49.7 $\pm$ 1.5

Tab 3. Effect of purine and pyrimidine bases on the intestinal crypt survival in mice after 980 cGy abdominal  $\gamma$ -irradiation

Reagent	Crypt survival/%
Adenine	69.5 $\pm$ 5.2
Guanine	82.2 $\pm$ 2.0
Cytosine	71.7 $\pm$ 5.7
Thymine	74.2 $\pm$ 4.1
Uracil	77.1 $\pm$ 1.6
Calf thymus DNA	74.1 $\pm$ 2.5
Irradiated control	46.7 $\pm$ 6.0

Tab 4. Effect of other purine and pyrimidine analogues on the intestinal crypt survival in mice after 980 cGy abdominal  $\gamma$ -irradiation

Reagent	Crypt Survival/%
Xanthine	78.0 $\pm$ 2.0
Hypoxanthine	78.6 $\pm$ 1.0
Inosine	80.0 $\pm$ 2.9
Uric acid	49.0 $\pm$ 8.8
5-FU	54.6 $\pm$ 4.2
Calf thymus DNA	78.4 $\pm$ 5.4
Irradiated control	49.7 $\pm$ 1.5

照组相比, 每种核苷酸、核苷和碱基平均增加肠腺存活率约 25%, 差别很显著( $P < 0.01$ ); 而同小牛胸腺 DNA 组相比, 其差别不甚显著。嘌呤和嘧啶类似物尿酸和 5-氟尿嘧啶不能提高肠腺存活率。

### 3 讨 论

Panjevac 等<sup>[5]</sup>报道, 外源同种高聚 DNA 经腹腔注射给照射后的大鼠, 可显著提高其存活率。Detre 等<sup>[6]</sup>证实, RNA 也具有此作用。随后, 关于核酸对辐射损伤的恢复作用, 曾从不同角度做过广泛研究, Petrovic<sup>[7]</sup>及陈家佩<sup>[8]</sup>已有详细的文献综述。

关于外源核酸的作用机制, 曾提出过两种主要的假设: (1) 一些实验(主要是整体动物实验)表明, 高聚 DNA 才有疗效, 且标记的 DNA 可进入细胞核内。因而提出, 当外源 DNA 进入体内后, 其相应组分可取代宿主 DNA 的受损部分, 使受照射细胞得以恢复。但这一假设并未得到直接的证明。而且, 也有实验并未观察到 DNA 聚合性同疗效的关系<sup>[7]</sup>。(2) Petrovic 等<sup>[7]</sup>以体外培养的 L-V 166 细胞作了详细研究, 并观察到当培养液中没有血清, 加入的 DNA 不被脱氧核糖核酸酶降解时, DNA 对 L-V 166 细胞辐射损伤的恢复效果就表现不出来, 这说明并非是 DNA 大分子所起的作用; 当培养液中存在血清时(含有降解核酸的酶), 则测出主要是降解产物脱氧核苷起的作用。实验还表明, 照射后于培养液中加入 4 种脱氧核苷(AdR、CdR、GdR 及 TdR)或 4 种脱氧核苷酸(dAMP、dCMP、dGMP 及 TMP)的混合物有效, 以前者的效果较好; 单独一种脱氧核苷或脱氧核苷酸无效。4 种嘌呤或嘧啶碱基的混合应用或单独应用也无效<sup>[10]</sup>。此实验表明, 外源 DNA 对细胞辐射损伤的恢复作用, 并非由于其高聚状态, 而是某些酶解产物作用所致。Araki<sup>[11]</sup>等以体外培养的大鼠胸腺细胞做了一系列实验, 将腺嘌呤加入照射后的培养液中, 可提高细胞存活率, 认为其作用机制主要是腺嘌呤抑止了细胞内 ATP 降解为次黄嘌呤, 从而提高 ATP 的含量。

本文采用局部肠腔扩张注入法, 让被测试剂通过扩大的肠腺开口进入肠腺腔内, 在活体内研究小鼠肠腺细胞的辐射效应。文献[2]证实不同来源的 DNA 能提高受照射小鼠的肠腺存活率, 小至几百个碱基对(bp)的 DNA 片段仍保持着提高肠腺存活率的作用。本实验中将单一的嘌呤类或嘧啶类核苷酸、核苷和碱基于小鼠照射后引入肠腺腔内, 证明它们同小牛胸腺 DNA 一样, 都能提高肠腺存活率。也说明外源核酸对辐射损伤细胞的恢复作用机制, 可能并不是核酸大分子, 而是核酸经酶解后的小分子的作用。但本实验在活体肠腺细胞所得到的结果同 Petrovic<sup>[7]</sup>在培养的 L-V 166 细胞所得到的单独一种脱氧核苷、脱氧核苷酸或核酸碱基无效的结果不同, 其原因可能是培养细胞并不一定能反映活体细胞的代谢规律。另外, 所研究的细胞种类也不同。而另一些报道如腺嘌呤、ATP 能够提高受照射的培养胸腺细胞或整体动物的存活率等事实<sup>[11,12]</sup>, 则同本实验的结果相符。

电离辐射引起的能量代谢障碍而导致的 ATP 含量降低, 是引起细胞死亡的原因之一。本实验也证实外源 ATP 可使受照射肠腺的存活率增加, 而肠腺存活率增加意味着小肠干细胞的存活率增加。考虑到在机体内核苷酸、核苷和碱基在代谢上可以互相转化, ATP、CTP 和 GTP 之间也可以互相转化, 以满足机体的特殊要求。那么, 将单独一种嘌呤或嘧啶类核苷酸、核苷和碱基引入受照射的细胞后, 在细胞内进行转化和代谢调节, 最终促进 ATP 含量升高而有利于细胞存活, 是否可以解释本实验的结果, 或存在着其它的作用机制, 尚需进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 曾桂英, 陈滨复, 刘爱平. 辐射研究与辐射工艺学报, 1993, 11(1): 53
- 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
- 3 周元恺, 韩士臣, 曾桂英. 军事医学科学院院刊, 1987, 11(2): 88
- 4 周元恺, 沈世仁. 生物化学与生物物理进展, 1979, (2): 70
- 5 Panjevac B et al.. In: Proc. 2nd Intern. Conf. Peaceful Uses of Atomic Energy (United Nations, Geneva), 1958, 23: 64
- 6 Detre K D, Finch S C. Science, 1958, 128: 656
- 7 Petrovic D. In: Current Topics in Radiation Research, Ebert M ed. 1968, 4: 251
- 8 陈家佩. 国外军事医学资料, 1973: 2分册(2). 26
- 9 Evseeva N K, Uspenskaja M S, Radiobiol. Radiotherapie, 1971, 12: 335
- 10 Petrovic D, Ferle-Vidovic A, Habazin V et al., Int. J. Radiat. Biol., 1970, 18: 243
- 11 Araki K, Ohyama H, Yamada T. Int. J. Radiat. Biol., 1971, 20: 417
- 12 Wagner R, Silverman E C. Int. J. Radiat. Biol., 1967, 12: 101

## THE NUCLEIC ACID PRECURSORS CAN ENHANCE THE INTESTINAL CRYPT SURVIVAL IN MICE AFTER 980 cGy ABDOMINAL $\gamma$ -IRRADIATION

Zhou Yuankai    Liu Aiping    Zeng Gulying

(Department of Radiation Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

**ABSTRACT** The effect of a single post-irradiation intestinal lumen dilatation injection of one of mononucleotides, nucleosides or nucleic acid bases on intestinal crypt survival after 980 cGy abdominally  $\gamma$ -irradiated mice has been studied. The results showed that, any one of these nucleic acid components can produce the same enhancing effect of crypt survival as that did by polymerized calf thymus DNA. This fact suggests that, the radiorestorative effect of exogenous nucleic acids on the intestinal crypt cells depends not upon the action exerted by their highly polymerised state, but rather by their various enzymatic degradation products.

**KEYWORDS** Ionizing radiation, Nucleic acid component, Intestinal crypt survival