

外源 RNA 促进小鼠肠腺 辐射损伤恢复的研究

曾桂英 韩士臣 刘爱平 谢学军 周元恺

(第四军医大学防原医学教研室, 西安 710032)

摘要 BALB/c 小鼠接受 1040 cGy ^{60}Co γ 射线腹部照射后, 采用不同来源的 RNA、不同的注入剂量、途径、时间和次数等因素, 研究外源 RNA 对空肠肠腺存活率的影响。结果表明: (1) 不同来源的 RNA 均可明显提高受照小鼠的肠腺存活率。(2) 酵母 RNA 的注入剂量与肠腺存活率之间呈一钟形曲线, 局部肠腔注入的最适剂量为 40~60 μg /小鼠, 腹腔和肌肉注入时均为 80 μg /小鼠。(3) 采用从(静脉、腹腔、肌肉和皮下)不同途径注入酵母 RNA, 均可显著提高受照小鼠的肠腺存活率, 其中静脉注入效果最佳。(4) 照射后小鼠的肠腺存活率随注入酵母 RNA 时间的推迟而降低, 两者在半对数坐标上呈线性关系。(5) 小鼠于照射后 6 h 内 1 次注入 RNA, 即可生效, 多次注入并不增加其疗效。

关键词 外源 RNA, 电离辐射, 肠腺存活率, 辐射损伤

作者已实验证实, 将外源核酸(DNA、RNA)注入腹部受 γ 射线照射后的小鼠的局部肠腔, 可提高其肠腺存活率^[1], 也初步研究过影响外源 DNA 提高肠腺存活率的一些因素^[2]。本研究将外源 RNA 注入腹部受 γ 射线照射后的小鼠体内, 探讨 RNA 不同的来源、注入剂量、途径、时间和次数等对肠腺存活率的影响。

1 材料与 方法

1.1 RNA 的提取

取正常小鼠的小肠、肝、睾丸和新鲜猪肝, 用冷生理盐水洗净, 滤纸吸干, 称重, 按刘西平的方法稍加改变后提取 RNA^[3]。提取的 RNA 溶于 EDTA 溶液中 (1 mmol/L, pH 7.5), -20°C 保存, 实验时用生理盐水稀释。

1.2 酵母 RNA

购自华美生物工程公司, 实验时用生理盐水稀释。

1.3 动物和照射

选用 10~12 周龄的 BALB/c 雄性小鼠, 体重 22~25 g。用 0.5% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg 体重) 麻醉小鼠, 并将它固定于有机玻璃照射盒内, 以 ^{60}Co γ 射线 1 次照射胸骨剑突至髂骨上缘间的腹部, 躯体的其余部位用 5 cm 厚的铅块屏蔽。剂量为 1040 cGy, 剂量率 64.2~73.6 cGy/min, 照射源至动物中心距离为 1.7 m。

1.4 局部肠腔扩张注入法^[4]

小鼠于接受照射后的 1~3 h 内, 进行麻醉, 固定于手术板上, 腹正中切口, 找出距 Treitz

国家自然科学基金资助课题

收稿日期: 初稿 1994-10-12, 修改稿 1995-06-08

韧带远端 3~4 cm 处长约 3 cm 的空肠, 以小动脉夹夹紧近端, 远端用手指固定, 在此肠段内注入 0.4 ml 的 RNA 溶液, 使肠腔中度扩张约数秒钟后松夹, 目的是让注入的溶液随肠腔内压力的增加, 通过扩大的肠腺开口, 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, 缝合腹壁。

1.5 肠腺存活率的测定

按实验设计, 于照射后不同时间活杀小鼠, 取实验组的空肠段(注入肠段)和照射对照组的相应肠段, 用单位面积肠腺计数法在低倍显微镜下计数肠腺和绒毛, 按下式计算肠腺存活率^[6]。

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

1.6 实验分组

实验分批进行, 每批均设实验组(照射后注入 RNA 溶液)和照射对照组(照射后注入生理盐水)。预实验表明, 小鼠受照射后注入 EDTA 生理盐水组的实验结果与照射后仅注入生理盐水的对照组无显著差别。

2 结 果

小鼠腹部接受 1040 cGy γ 射线照射后, 注入 RNA, 分别研究下列诸因素对肠腺存活率的影响。

2.1 不同来源的 RNA

小鼠于照射后 1~3 h 内, 采用局部肠腔扩张注入法, 将不同来源的 RNA 分别注入空肠肠腔内。按实验设计, 于照射后不同时间活杀小鼠, 取实验组的注入肠段和照射对照组的相应肠段, 测定肠腺存活率。结果见表 1 和图 1。

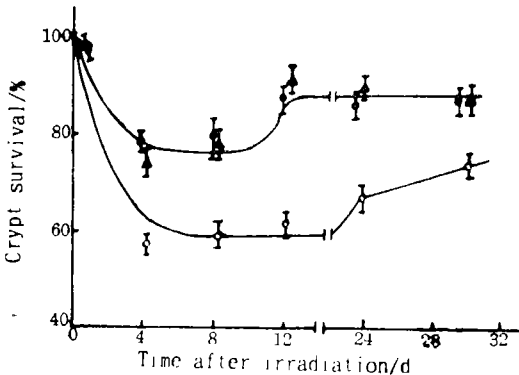


Fig 1. Effect of two different RNAs on the crypt survival in mice 30 days after abdominal γ -irradiation
 (●) Intestinal RNA (mouse)
 (▲) Yeast RNA (○) Irradiated control
 40 μ g/mouse RNA was administered to the regional intestinal lumen 1~3 h after 1040 cGy abdominal γ -irradiation, $n=5\sim 10$, $p<0.01$ as compared with the irradiated control, whilst statistically insignificant between the experimental groups

Tab 1. Effect of different RNAs on the jejunal crypt survival in mice after abdominal γ -irradiation

| Source of RNA | Crypt survival/% |
|-------------------------|------------------|
| Small intestine (mouse) | 85.1 \pm 1.6 |
| Testis (mouse) | 76.3 \pm 2.3 |
| Liver (mouse) | 83.7 \pm 2.3 |
| Liver (hog) | 80.0 \pm 2.3 |
| Yeast | 86.3 \pm 1.1 |
| Irradiated control | 62.0 \pm 2.4 |

40 μ g/mouse RNA was administered to the regional intestinal lumen 1~3 h after 1040 cGy abdominal γ -irradiation. Crypt counting was assayed by sacrificing the mice at 6 th day after irradiation, $n=4\sim 6$. The data are expressed as $\bar{X}\pm\text{SEM}$ in this and following tables and figures $p<0.01$ as compared with the irradiated control, whilst statistically insignificant among the experimental groups

Tab 2. Effect of different routes of RNA administration on the crypt survival in mice after abdominal γ -irradiation

| Route of administration | Crypt survival/% |
|-------------------------|------------------|
| Intravenous | 90.2±2.7 |
| Intramuscular | 76.9±2.7 |
| Hypodermic | 80.5±1.6 |
| Intraperitoneal | 73.9±2.4 |
| Irradiated control | 60.1±2.6 |

80 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ yeast RNA was administered 1~3 h after 1040 cGy abdominal γ -irradiation, $n=5\sim6$ $p<0.01$ as compared with the irradiated control $p<0.01$ when the intravenous group is compared with other experimental groups which are mutually statistically insignificant

2.2 不同注入剂量和途径

小鼠接受 1040 cGy γ 射线腹部照射后 1~3 h 内, 分别从肠腔、腹腔和肌肉等途径引入不同剂量的酵母 RNA, 照射后第 6 d 活杀, 测定肠腺存活率。结果见图 2 和图 3。

图 2 和图 3 表明, 从不同途径给予酵母 RNA, 注入剂量同肠腺存活率之间均呈钟形曲线, 即有一最适剂量值, 局部肠腔注入时为 40~60 $\mu\text{g}/\text{小鼠}$ (见图 2), 腹腔和肌肉注入时均为 80 $\mu\text{g}/\text{小鼠}$ (见图 3)。

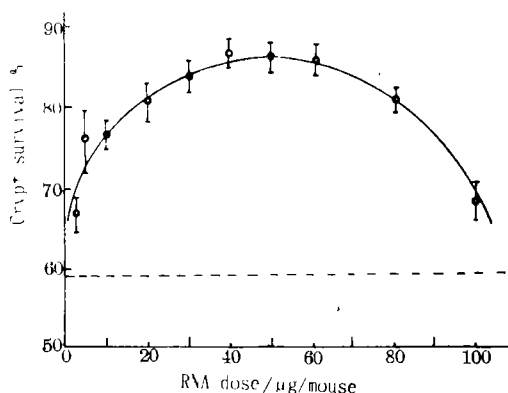


Fig 2. Crypt survival in mice as a function of RNA dose administered after abdominal γ -irradiation
 (●) Yeast RNA
 (.....) Irradiated control
 RNA was administered to the regional intestinal lumen 1~3h after 1040 cGy abdominal γ -irradiation, $n=5\sim6$

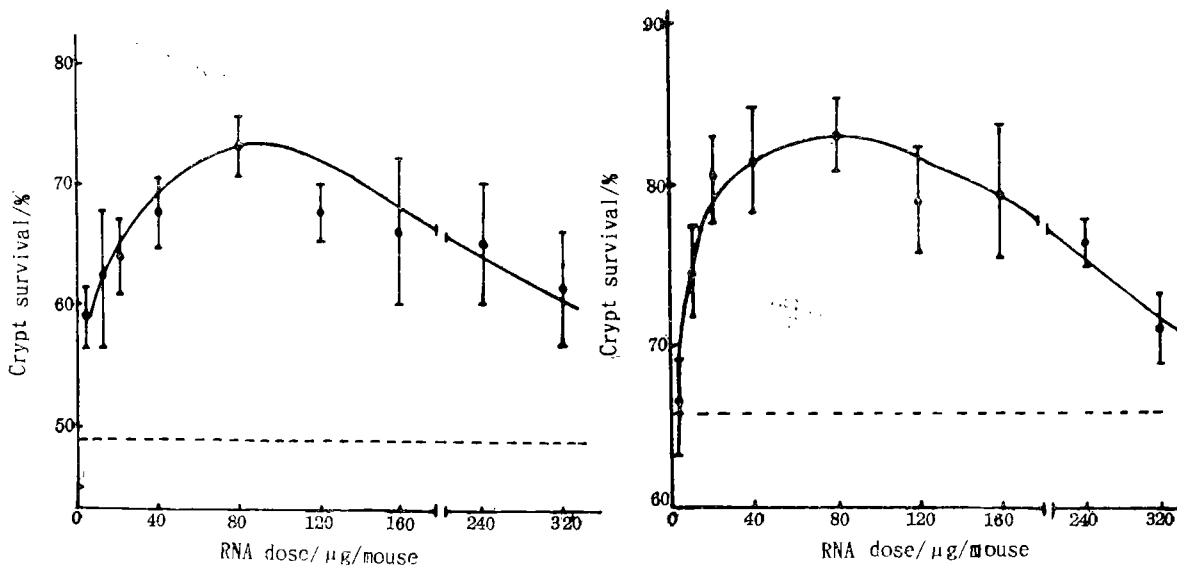


Fig 3. Crypt survival in mice as a function of RNA dose administered after abdominal γ -irradiation
 (●) Yeast RNA (.....) Irradiated control
 left curve, Intraperitoneal injection, right curves, Intramuscular injection
 RNA was administered 1~3 h after 1040 cGy abdominal γ -irradiation, $n=5\sim6$

另外,小鼠接受 1040 cGy γ 射线腹部照射后 1~3h 内从不同途径注入 80 μ g 酵母 RNA, 照后第 6 d 活杀, 各组肠腺存活率明显高于对照组, 而各组间差异不显著(表 2)。

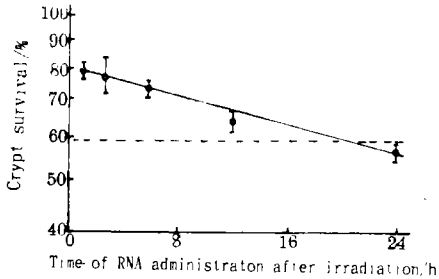


Fig 4. Crypt survival in mice as a function of time of RNA administration after abdominal γ -irradiation

(●) Yeast RNA

(.....) Irradiated Control

80 μ g/mouse yeast RNA was administered intraperitoneally at varying times after 1040 cGy abdominal γ -irradiation, $n = 5 \sim 10$

Tab 3. Relation between Crypt survival vs both time and frequency of RNA administration in mice after abdominal γ -irradiation

| Time of administration/h | Frequency of administration | crypt survival /% |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 1 | 1 | 79.1 ± 1.8 ⁽¹⁾ |
| 3 | 1 | 77.5 ± 7.0 ⁽¹⁾ |
| 6 | 1 | 73.3 ± 2.3 ⁽¹⁾ |
| 12 | 1 | 63.7 ± 3.3 ⁽²⁾ |
| 24 | 1 | 56.5 ± 1.7 ⁽²⁾ |
| 1,6 | 2 | 73.4 ± 4.1 ⁽¹⁾ |
| 1,12 | 2 | 75.0 ± 0.9 ⁽¹⁾ |
| 1,24 | 2 | 82.3 ± 2.6 ⁽¹⁾ |
| 6,12 | 2 | 83.5 ± 1.6 ⁽¹⁾ |
| 6,24 | 2 | 79.8 ± 4.0 ⁽¹⁾ |
| 12,24 | 2 | 64.8 ± 3.7 ⁽²⁾ |
| 6,12,24 | 3 | 79.8 ± 3.0 ⁽¹⁾ |
| irradiated control | | 58.8 ± 1.8 |

80 μ g/mouse yeast RNA was administered intraperitoneally each time after 1040 cGy abdominal γ -irradiation, $n = 5 \sim 10$, ⁽¹⁾ $p < 0.01$, ⁽²⁾ $p > 0.05$ as compared with the irradiated control

2.3 不同注入时间

分别于 1040 cGy γ 射线腹部照射后的 1、3、6、12 和 24 h, 给每只小鼠腹腔内 1 次注入 80 μ g/0.4 ml 酵母 RNA, 照后第 6 d 活杀, 测定肠腺存活率, 结果见图 4。从图 4 可见, 在半对数坐标上, 受照射小鼠空肠腺存活率随照后 RNA 注入时间的推迟呈直线下降, 直线方程式为 $\lg y = 1.9026 - 0.0066 x$, $r = -0.9842$, 表明照射后给药时间越早, 效果越好。经统计表明: 照后 6h 内各实验组的肠腺存活率比照射对照组提高 15%~20% ($p < 0.01$), 明显高于照射后 12h 和 24h 实验组 ($p < 0.01$)。照后 12h 和 24h 两实验组与照射对照组间差别不显著 ($p > 0.05$)。

2.4 不同注入次数

于照射后不同时间分 1 次、2 次或 3 次给小鼠腹腔内注入酵母 RNA, 每次剂量为 80 μ g/小鼠, 观察注入次数对肠腺存活率的影响, 结果见表 3。统计分析结果表明: 照后 12 h、24 h 1 次注入或 12 h、24 h 两次注入的实验组的肠腺存活率同照射对照组间差别不显著 ($p > 0.05$)。其它凡是照射后 6 h 内注入酵母 RNA 的实验组, 无论注入 1 次, 或注入多次, 都能显著提高受照射小鼠的肠腺存活率(同照射对照组比较 $p < 0.01$), 而各实验组间差别不显著 ($p > 0.05$)。表明小鼠在受照射后 6 h 内 1 次注入酵母 RNA 即可提高其肠腺存活率, 多次注入并不能增加其有效性。

3 讨 论

实验曾证实, 不同来源及不同分子大小的 DNA, 都能提高受照后小鼠的肠腺存活率^[2]。进一步的实验表明, 单独一种嘌呤类和嘧啶类核苷酸、核苷和碱基, 也具有同样的作用^[6]。以上事

实提示, 外源核酸对辐射损伤细胞的修复作用, 并非由于其高聚状态, 而是其酶解产物作用所致。因此, 本研究中不同来源的 RNA, 均能提高受照射小鼠肠腺存活率是可以理解的。

从图 1 看到, 给受腹部照射小鼠的局部肠腔内注入酵母 RNA, 可明显提高 30 d 观察期内肠腺存活率, 且用单位面积肠腺计数法, 于显微镜下计数肠腺和绒毛时, 观察到实验组空肠肠腺较照射对照组肠腺饱满、染色深、细胞数多, 绒毛上皮也较照射对照组完整, 实验组还见肠腺分叉。以上事实提示: 外源 RNA 不仅可使辐射损伤的肠腺细胞(包括小肠干细胞)得到恢复, 提高肠腺存活率, 并可加速存活肠腺的增殖, 修复损伤的肠上皮。文献[7、8]曾报道照射后存活小肠干细胞数目、肠腺分叉同肠腺存活率的关系。

本研究中, 外源 RNA 通过静脉直接注入血流, 或通过肌肉、皮下、腹腔注射被吸收入血, 按照药代动力学规律, 到达肠腺部位发挥作用; 在本设计的局部肠腔扩张注入法中, RNA 溶液可能主要是借肠腔内压力的增加, 通过扩张的肠腺开口直接进入肠腺腔内, 其次也要考虑被肠道吸收入血的问题。

细胞受一定剂量电离辐射照射后, 发生初级理化反应, 继而引起细胞内生化反应紊乱, 直至出现形态的改变。其损伤程度受所照剂量、剂量率、射线性质、细胞类型及细胞内自发修复机制等因素所制约, 严重时可导致细胞死亡, 这一过程的发生发展是渐进的。本研究中将外源修复因子酵母 RNA 在照射后不同时间注入受照射小鼠腹腔内, 其肠腺存活率随照射后注入时间的推迟而降低, 表明照射后时间越长, 肠腺损伤越严重, 可修复性也随之降低。求得小鼠在照射后注入酵母 RNA 时肠腺的半可修复时间为 9.3 h。照射后早期 1 次注入即可生效, 多次注入并不能增加它的有效性, 说明外源 RNA 可在早期纠正受损肠腺细胞(包括小肠干细胞)的某一特定分子病理过程, 使行将死亡的细胞得以恢复。在不同注入途径(静脉、腹腔、肌肉和皮下)实验中, 以静脉注入效果最佳, 提示外源 RNA 对辐射损伤肠腺细胞短时高浓度的作用, 能对细胞的修复创造较好的条件。

参 考 文 献

- 1 曾桂英, 陈镇复, 刘爱平等. 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 刘西平, 袁恬莹. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(1): 65
- 4 周元恺, 韩士臣, 曾桂英等. 军事医学科学院院刊, 1987, 11(2): 88
- 5 周元恺, 沈世仁. 生物化学与生物物理进展, 1979, (2): 70
- 6 周元恺, 刘爱平, 曾桂英. 辐射研究与辐射工艺学报, 1994, 12(2): 96
- 7 周元恺, 胡琳. 生物化学与生物物理进展, 1982, (2): 50
- 8 周元恺, 沈世仁. 生物化学与生物物理进展, 1979, (2): 73

RESTORATIVE EFFECT OF EXOGENOUS RNA ON THE INTESTINAL CRYPTS IN MICE AFTER ABDOMINAL γ -IRRADIATION

Zeng Guiying Han Shichen Liu Aiping Xie Xuejun Zhou Yuankai

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

ABSTRACT Our previous investigation revealed a restorative effect of exogenous nucleic acids on the intestinal crypt in mice after abdominal γ -irradiation. In this article, the factors influencing the restorative effect of exogenous RNA on the intestinal crypt in mice post-irradiation were studied. The results showed that: (a) RNAs from different sources all showed the crypt survival enhancement capability. (b) Bell-shaped curves correlating the crypt survival fraction and RNA doses were obtained, with the optimal doses for different routes of administration estimated. (c) Comparing the different routes of RNA administration, the intravenous injection seemed to be the most effective. (d) An exponential relationship between the crypt survival fraction and the post-irradiation time of RNA administration was found. The earlier the administration, the more effective it was. (e) Administration of RNA merely once within 6 h after irradiation, the increases of crypt survival fraction was statistically significant when compared with that of the irradiated control.

KEYWORDS Exogenous RNA, Ionizing radiation, Intestinal crypt survival, Radiation injury