

小肠 RNA 对受 ^{60}Co γ 射线照射后小鼠肠粘膜屏障的保护作用

苏晓明¹ 曾桂英¹ 任东青¹ 田锐锋² 周晓光¹ 赵涛¹
王爽³ 杨家骥³ 徐修礼⁴

¹ (第四军医大学军事预防医学系放射医学教研室 西安 710032)

² (第四军医大学校直干休所 西安 710032)

³ (第四军医大学基础部电镜中心 西安 710032)

⁴ (第四军医大学西京医院检验科 西安 710033)

摘要 以 BALB/c 小鼠为研究对象, 用 ^{60}Co γ 射线进行 11.5Gy 的腹部一次照射, 照后 1—3h 采用局部肠腔扩张注入法给小鼠空肠肠腔内注入正常大鼠小肠核糖核酸 (Ribonucleic acid, RNA), 照后 1、3、5d 取全小肠, 制备肠粘液, 测定免疫球蛋白分泌型免疫球蛋白 A (Secreted immunoglobulin A, sIgA) 含量; 取空肠段, 观察肠绒毛形态变化; 取血, 测定内毒素含量; 取肠系膜淋巴结, 测定细菌移位率。探讨小肠 RNA 对 γ 射线照射后小鼠肠粘膜屏障的保护作用。结果表明, 小肠 RNA 可明显提高受照后小鼠肠粘液中免疫球蛋白 sIgA 的含量 ($p < 0.01$), 减轻肠绒毛的萎缩及塌陷, 改善肠粘膜形态结构, 降低肠系膜淋巴结细菌移位率和血中内毒素含量。以上结果显示, 小肠 RNA 对 γ 线照射后的小鼠肠粘膜屏障有明显的保护作用, 能抑制肠道细菌移位和肠内内毒素的吸收。

关键词 小肠核糖核酸, γ 射线, 分泌型免疫球蛋白 A, 内毒素, 细菌移位

中图分类号 R818.05, Q691.5, R332

肠道是电离辐射的敏感器官, 其中尤以小肠最为敏感。较大剂量的 γ 射线照射可引起肠粘膜屏障的损伤, 增加细菌入侵的机率, 继发肠源性感染。研究已证实, 小肠 RNA 可通过调节细胞周期和某些基因的表达, 促进受 γ 射线照射小鼠肠上皮细胞的修复, 提高肠腺存活率, 加快肠道辐射损伤的恢复^[1-4]。但此时肠粘膜屏障的损伤是否也得到修复, 肠道细菌的移位和血中内毒素含量是否也发生变化, 值得关注。本工作以 BALB/c 小鼠为实验对象, 观察小肠 RNA 对受 ^{60}Co γ 射线照射后的小鼠肠粘膜屏障以及肠道细菌移位的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性二级 BALB/c 小鼠, 鼠龄 8—10 周, 质量 (26 $\pm$ 2) g; 雄性二级多大鼠 (Sprague-dawley rats, SD) 大鼠, 鼠龄 6—7 周, 质量 (190 $\pm$ 10) g, 均

由本校实验动物中心提供。

1.2 试剂和仪器

免疫球蛋白 IgA 检测试剂盒 (上海荣盛生物技术有限公司); 显色基质鲎试剂盒 (厦门鲎试剂厂); ^{60}Co 源 (本校辐照中心), 细菌培养箱 (Dugbox 厌氧工作站, Ruskinn 公司); 紫外分光光度计 (SmartSpecTM3000, Bio-RAD 公司); S-502 型扫描电镜 (SEM, Hitachi 公司)。

1.3 RNA 的提取和鉴定

SD 大鼠处死后解剖, 取全小肠, 用生理盐水冲净肠内容物, 滤纸吸干, 置于载玻片上, 剪碎并称重后用盐酸胍-苯酚-氯仿抽提, 异丙醇沉淀 RNA, 75%乙醇洗涤法提取 RNA^[1]。提取的 RNA 用消毒的焦碳酸二乙酯 (Diethylpyrocarbonate, DEPC) 水溶解, 用紫外法进行纯度和浓度测定, 按下列公式计算样品浓度:

国家自然科学基金 (30370440) 资助

第一作者: 苏晓明, 男, 1980 年 11 月出生, 2003 年毕业于第四军医大学临床医学专业, 现为第四军医大学军事预防医学系放射医学教研室硕士研究生, 从事肠道辐射损伤修复研究

通讯联系人: 曾桂英

收稿日期: 初稿 2006-04-10, 修回 2006-06-05

样品浓度 (g/L) = $40 \times A_{260\text{nm}} \times \text{稀释倍数} / 1000$ 。

1.4 分组和照射

雄性 BALB/c 小鼠 144 只, 实验前 1 周领回实验室常规饲养, 以适应环境。实验前 1d 称重后按完全随机法分为正常对照组、照射对照组和小肠 RNA 组, 取 1、3、5d 共 3 个时间点。共 9 组, 每组各 16 只。照射当日将小鼠麻醉后固定于有机玻璃照射盒内(侧卧位), 放置在与照射源同高的照射台上, 使照射源至动物中心的距离为 1m。用 ^{60}Co γ 射线进行腹部一次照射, 剂量率为 2.49Gy/min, 剂量为 11.5Gy。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。

1.5 小肠 RNA 的注入

采用局部肠腔注入法注入小肠 RNA, 即小鼠接受腹部照射后 1—3h 内固定于手术板上, 腹正中切口暴露小肠, 在距 Treitz 韧带远端 3—4cm 处长约 4cm 的空肠腔内注入含有小肠 RNA 的生理盐水注入液 0.4mL (含小肠 RNA 40 μg), 使肠腔中度扩张约 10s 后, 用丝线穿过肠系膜打结作为注入处的标记, 并缝合腹壁, 称为小肠 RNA 组; 照射对照组小鼠按同样方法只在肠腔内注入等量无菌生理盐水。

1.6 肠粘液制备和免疫球蛋白 sIgA 测定

麻醉后解剖小鼠, 取完整小肠, 平铺于冰面滤纸上纵行剖开, 用磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate buffered solution, PBS) 反复冲洗肠腔面, 以除去杂质。用玻片轻刮肠腔表面, 滴管定量吸取刮取物 0.1mL, 加入 1.5mL PBS 充分混匀, 反复低温离心, 转速 10000r/min, 取上清, 按试剂盒说明书操作步骤进行 sIgA 含量的测定。

1.7 扫描电镜标本的制备

麻醉后解剖小鼠, 在距 Treitz 韧带远端 3—4cm 处, 取约 2cm 长的空肠段, 用生理盐水冲净肠内容物, 用 3%戊二醛固定, 蒸馏水冲洗, 乙腈梯度脱水, 真空冷冻干燥, 离子溅射仪喷金处理, SEM 观察小鼠空肠绒毛的形态。

1.8 血浆内毒素测定

麻醉后解剖小鼠, 采集腹主动脉血约 0.5mL, 放入含有肝素钠抗凝剂的试管中, 混匀, 冰浴条件

下 30min 后 3000r/min 离心 15min, 取血浆, -20 $^{\circ}\text{C}$ 低温保存。采用偶氮基质显色法测定血浆内毒素含量 (按试剂盒说明书)。

1.9 肠系膜淋巴结细菌定量培养

按文献[5]的方法, 将小鼠麻醉后解剖, 无菌采集肠系膜淋巴结 (Mesenteric Lymph Node, MLN), 电子天平称质量后按 1:100 (kg/L) 比例加入无菌生理盐水, 匀浆后取 0.1mL 组织匀浆接种至厌氧血琼脂培养板, 置于厌氧培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24—48h, 计数细菌落数。组织细菌菌量 (CFU/g) = 菌落数 $\times 1000$ 。如超过 100 个/g, 即为阳性^[6]。

1.10 统计学处理

所有数据均采用 SPSS11.0 (Statistical Package for Social Science 11.0, 社会科学统计软件包 11.0 版) 统计分析软件进行处理, 采用方差分析及 χ^2 检验 (fisher 确切概率法), 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $p < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 小肠 RNA 的纯度和浓度

小肠 RNA 经无菌生理盐水稀释后, 用 SmartSpecTM3000 紫外分光光度计测定吸光度, 呈典型的核酸吸收光谱, 在 260nm 处有最大吸收峰, 测得 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} = 2.03$ (表明所提取的小肠 RNA 不含蛋白质和 DNA), 求出小肠 RNA 原液浓度为 2.16g/L。

2.2 免疫球蛋白 sIgA 含量的变化

照后 1、3、5d 照射对照组和小肠 RNA 组小鼠肠粘液中免疫球蛋白 sIgA 含量均明显低于正常对照组 ($p < 0.01$), 且小肠 RNA 组明显高于照射对照组 ($p < 0.01$), 即使照后 3d 处于最低值时, 小肠 RNA 组仍明显高于照射对照组 ($p < 0.01$, 见表 1)。

2.3 扫描电镜的变化

正常对照组小鼠空肠绒毛排列整齐、规则, 形状和大小一致, 未见萎缩、塌陷 (见图 1(a)); 照射对照组照后 1d 小鼠空肠绒毛形态结构变化不明显, 照后 3d 出现绒毛排列极不规则、形状和大小均不一致等差异, 绒毛变小、萎缩, 顶端可见塌陷的小孔, 照后 5d 绒毛形态结构未见明显改善 (见图 1(b), 1(d),

1(f)); 而小肠 RNA 组在照后 1、3、5d 小鼠空肠绒毛排列均较照射对照组整齐、规则, 未见明显缩短,

绒毛较粗大, 形状不一致, 绒毛萎缩、塌陷少 (见图 1(c), 1(e), 1(g))。

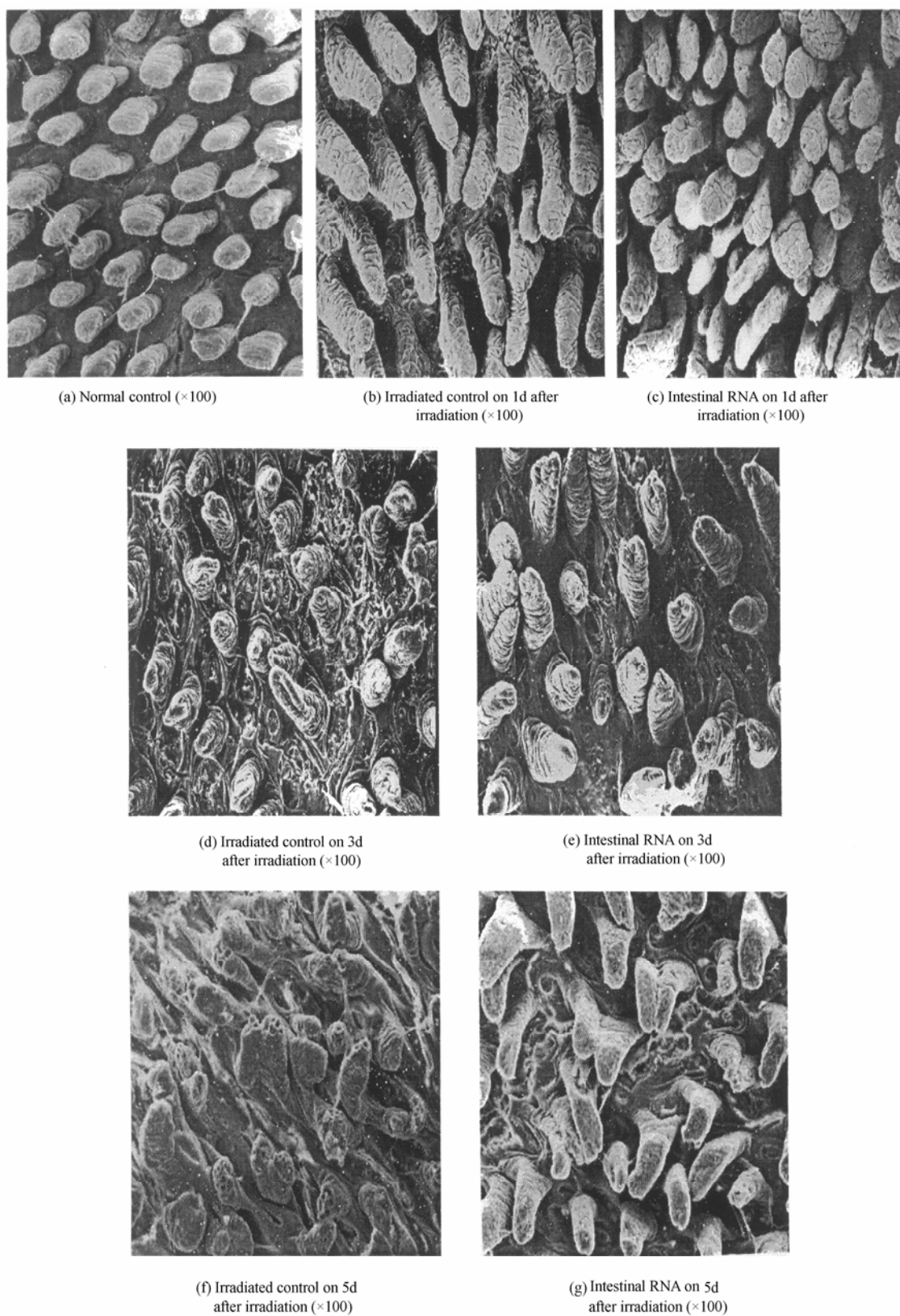


Fig.1 Scanning electron micrograph results of jejunal villus in mice after abdominal irradiated with 11.50Gy ^{60}Co γ -ray

Table 1 Changes of sIgA in small intestinal mucilage in mice after abdominal γ -irradiation (D_{λ} , $\bar{x} \pm s$, $n=16$)

Group	Time after irradiation		
	1d	3d	5d
Normal control	0.50 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.02
Irradiated control	0.29 $\pm$ 0.01 ^a	0.16 $\pm$ 0.03, ^{a,c}	0.18 $\pm$ 0.05 ^{a,b}
Intestinal RNA	0.39 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.22 $\pm$ 0.02 ^{a,b,c}	0.24 $\pm$ 0.01 ^{a,b,c}

^a $p<0.01$ vs normal control; ^b $p<0.01$ vs irradiated control at the same time; ^c $p<0.01$ vs the same group on 1d after irradiation

2.4 血中内毒素含量的变化

照射对照组小鼠血中内毒素含量在照后 1d 即显著高于正常对照组 ($p<0.05$), 照后 3d 和 5d 持续升高, 约为照后 1d 时的 1.9—2.4 倍。小肠 RNA 组小鼠血浆内毒素含量在照后 1d 虽高于正常组, 但无显著性差异, 照后 3d 和 5d 虽也逐渐升高, 但仅为照射对照组的 0.72—0.66 倍, 明显低于照射对照组 ($p<0.01$, 见图 2)。

2.5 肠系膜淋巴结细菌移位率的变化

照射对照组小鼠肠系膜淋巴结细菌移位率在照后 1d 即显著高于正常对照组 ($p<0.01$), 且随着时间的延长明显升高, 至照后 5d 时升至 93.8%。而小肠 RNA 组肠系膜淋巴结细菌移位率从照后 1d 起一直低于照射对照组, 至照后 5d 明显低于照射对照组 ($p<0.05$, 见表 2)。

Table 2 Changes of positive rate of mice MLN bacterial culture after abdominal γ -irradiation

(%, Positive number/Total number)

Group	Time after irradiation		
	1d	3d	5d
Normal control	0.0(0/16)	0.0(0/16)	0.0(0/16)
Irradiated control	50.0(8/16) ^a	75.0(12/16) ^a	93.8(15/16) ^{a,b}
Intestinal RNA	28.6(4/16)	50.0(8/16) ^a	62.5(10/16) ^{a,b,c}

^a $p<0.01$ vs normal control; ^b $p<0.05$ vs irradiated control at the same time; ^c $p<0.05$; ^d $p<0.01$ vs the same group on 1d after irradiation

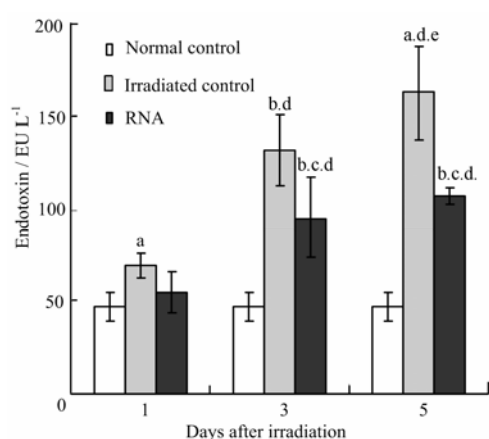


Fig.2 Changes of endotoxin in blood of mice after abdominal γ -irradiation. ^a $p<0.05$, ^b $p<0.01$ vs normal control; ^c $p<0.01$ vs irradiated control; ^d $p<0.01$ vs the same group on 1d after irradiation; ^e $p<0.01$ vs the same group on 3d after irradiation

3 讨论

人的肠道是一个有菌的环境, 细菌之所以能局限于肠内而不向肠外扩散, 是因为正常生理条件下的肠道存在一个较为完整的粘膜屏障。肠粘膜屏障是存在于肠道中的一个高效的选择性屏障系统, 主要包括机械屏障、免疫屏障和生物屏障等三大部分。机械屏障由肠粘膜上皮、上皮间紧密连接和菌膜三者构成。它被糖衣包被, 比较稳定, 能阻止其表层具有潜在治病性的需氧菌或外来菌直接粘附于肠粘膜细胞。免疫屏障由肠相关淋巴组织及其分泌的免疫球蛋白 sIgA 组成, 肠道的免疫功能主要由浆细胞分泌的 sIgA (占 80%) 完成。其主要作用是阻止细菌对肠上皮的粘附, 与补体和溶菌酶协同具有杀菌作用, 尤对革兰阴性杆菌具有特殊亲和力。生物屏障是指肠道菌群所形成的相互依赖又相互制约的微

生态平衡。一旦此平衡紊乱,优势繁殖的细菌(主要为需氧的革兰阴性杆菌)便可突破粘膜屏障而移位。

大剂量的电离辐射照射可使肠粘液中免疫球蛋白 sIgA 含量减少,其阻止细菌对肠上皮的粘附以及杀菌能力下降,加之肠腺干细胞的大量死亡,使肠上皮失去维持更新的源泉,因而出现绒毛变小、缩短和裸露,引起肠粘膜屏障功能和吸收功能的破坏,从而出现水盐代谢平衡失调,肠道内寄生的大量细菌和毒素通过破损的肠粘膜进入血液和淋巴液,导致细菌的移位,发生菌血症和毒血症,导致机体的死亡。而内毒素是细菌感染时致病的主要毒力因素,肠粘膜屏障损害可造成内毒素血症。内毒素能激活膜上腺苷酸环化酶,损伤溶酶体膜和线粒体膜,加重粘膜上皮细胞损害;激活血管活性物质,影响血管舒缩功能,引起肠道血液灌流不足,加重肠粘膜屏障功能损害。

我们的实验发现,小鼠在受 γ 射线照后 1d 肠粘液中免疫球蛋白 sIgA 含量即出现了明显的降低,照后 3d 降至最低,仅为正常值的 32%,而肠系膜淋巴结的细菌移位率已达 75%,内毒素含量已高达 (131.8 ± 19.0) EU/L,此时扫描电镜示绒毛排列极不规则,形状和大小均不一致,差异大,绒毛变小、萎缩,顶端可见塌陷的小孔,这表明肠上皮的损伤已达到非常严重的程度,实际上此时小鼠已蜷缩在一起,出现稀便、拒食,说明病情非常严重,若不给予适当的治疗,将面临死亡,而此时动物已开始出现死亡。至照后 5d 时,小鼠肠粘液中免疫球蛋白 sIgA 含量虽有轻微的回升,小肠绒毛形态结构有所改善,但细菌移位率仍增至 93.8%,内毒素含量高达 (162.8 ± 25.4) EU/L,为照后 1d 时的 2.4 倍。这可能是受照小鼠血液和体液中的溶酶菌、备解素和补体系统含量仍处于较低水平,杀菌效应降低,清除细菌能力严重下降,使恢复较慢,值得进一步探讨。

由上可见, γ 线所致肠粘膜屏障损伤是一个极其复杂的过程,对它的治疗研究也已进行多年,但至今仍无有效的治疗措施。Nose 等^[7]实验研究表明,用 8Gy ^{60}Co γ 射线对小鼠进行全身照射,可引起肠粘膜损伤,并由此引起细菌移位,而 OK-432 联合 G-CSF 能预防小鼠全身照射后肠粘膜的病理损害,减少细菌移位的发生,降低动物死亡率。黄丙俭等^[8]则发现,低剂量丝裂霉素可以改善机体免疫功能,减轻辐射对机体免疫功能的损伤,加速修复损伤的

肠粘膜屏障,其机理可能与其诱导的适应性反应有关^[9],即低剂量丝裂霉素预先作用,激活了细胞的 DNA 修复系统,使 DNA 修复能力增强。此外,精氨酸、谷氨酰胺、生长激素、胰岛素样生长因子-1、表皮样生长因子、维生素 A、锌等也能修复损伤的肠粘膜屏障,减少细菌移位^[10-15]。但关于小肠 RNA 对辐射损伤后小鼠肠道粘膜屏障及细菌移位的影响,国内外还未见报道。

Kishibuchi 等^[16]的研究显示,添加了核苷酸混合物营养液的大鼠,较单纯静脉营养支持的大鼠经电镜、肠粘膜通透性、肠粘膜组织蛋白酶的指标测定发现,肠屏障功能得到了明显改善。本实验中的小肠 RNA 是用盐酸胍—氯仿—异戊醇抽提法得到的全小肠组织总 RNA,采用局部肠腔注入使其借助肠腔内压力的增加通过扩张的肠腺开口进入肠腺腔内来发挥作用。本实验观察到:小肠 RNA 可使受照小鼠肠粘液中免疫球蛋白 sIgA 含量(D_{λ} 值)比照射对照组提高 0.06—0.10 ($p < 0.01$)。而肠系膜淋巴结细菌移位率较照射对照组降低了 21.4%—31.3% ($p < 0.05$),内毒素含量较照射对照组降低了 (14.4—55.5) EU/L ($p < 0.01$),小鼠空肠绒毛排列较照射对照组整齐、规则,未见明显缩短,绒毛较粗大,形状不一致,绒毛萎缩、塌陷少见,至照后 5d 麻醉解剖前未见死亡,可见小鼠的肠粘膜屏障得到了较好的恢复,使细菌移位减少,内毒素含量有所降低,表明机体状况有所好转。

实验结果表明:小肠 RNA 可明显提高受腹部照射小鼠肠粘液中免疫球蛋白 sIgA 含量,减少细菌移位,对小鼠肠粘膜屏障起到很好的保护作用。小肠 RNA 促进肠粘膜屏障的修复除与免疫保护的增加以及移位细菌的减少有关外,是否与其他因素有关,有待进一步探讨。

参考文献

- 1 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 Guiying, HAN Shichen, LIU Aiping, et al. J Radiat Res Radiat Process, 1995, 13(4): 233-238
- 2 曾桂英,田芙蓉,陈永斌,等.辐射研究与辐射工艺学报,2001,19(1): 59-64
ZENG Guiying, TIAN Furong, CHEN Yongbin, et al. J Radiat Res Radiat Process, 2001, 19(1): 59-64
- 3 任东青,赵涛,曾桂英,等.实用预防医学,2001,8(3):

- 161-163
REN Dongqing, ZHAO Tao, ZENG Guiying, *et al.* J Pract Prev Med, 2001, **8**(3): 161-163
- 4 崔大祥, 曾桂英, 王枫, 等. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28**(3): 353-357
CUI Daxiang, ZENG Guiying, WANG Feng, *et al.* Process Biochem Biophys, 2001, **28**(3): 353-357
- 5 Deitch E A, Bridges R M. J Surg Res, 1987, **42**(5): 536-542
- 6 Shou J, Lappin J, Minnard EA, *et al.* Am J Surg, 1994, **167**(1): 145-150
- 7 Nose M, Uzawa A, Ogyu T, *et al.* J Radiat Res, 2001, **42**(2): 191-200
- 8 黄丙俭, 贺方学, 周仁祥. 中华放射医学与防护杂志, 2003, **23**(3): 176-177
HUANG Bingjian, He Fangxue, ZHOU Renxiang, *et al.* Chinese J Radiol Med Prot, 2003, **23**(3): 176-177
- 9 杨建征, 梁硕, 曲雅琴, 等. 中华放射医学与防护杂志, 2001, **21**(2): 100-102
YANG Jianzheng, LIANG Shuo, QU Yaqin, *et al.* Chinese J Radiol Med Prot, 2001, **21**(2): 100-102
- 10 Gurbuz A T, Kunzelman J, Ratzer E E. J Surg Res, 1998, **74**(2): 149-154
- 11 Chun H, Sasaki M, Fujiyama Y, *et al.* J Gastroenterol, 1997, **32**(2): 189-195
- 12 Prieto I, Gomez de Segura I A, Garcia Grande A, *et al.* Rev Esp Enferm Dig, 1998, **90**(5): 353-360
- 13 Chen K, Okuma T, Okamura K, *et al.* JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1995, **19**(2): 119-124
- 14 Warden R A, Noltorp R S, Francis J L, *et al.* J Nutr, 1997, **127**(5): 770-776
- 15 Blanchard R K, Moore J B, Green C L, *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98**(24): 13507-13513
- 16 Kishibuchi M, Tsujinaka T, Yano M, *et al.* JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1997, **21**(2): 104-111

Rotective effects of intestinal RNA on intestinal mucosal barrier in mice after abdominal γ -irradiation

SU Xiaoming¹ ZENG Guiying¹ REN Dongqing¹ TIAN Ruifeng² ZHOU Xiaoguang¹
ZHAO Tao¹ WANG Shuang³ YANG Jiaji³ XU Xiuli⁴

¹(Department of Irradiation Medicine, Faculty of Military Preventive Medicine,
Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

²(Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

³(Center of Electron Microscopy, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032)

⁴(District Retired Cadres Entertainment Center, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033)

ABSTRACT The work was aimed at exploring protective effects of intestinal RNA on intestinal mucosal barrier in mice after abdominal γ -irradiation. The BALB/c male mice were abdominally irradiated with 11.50Gy ^{60}Co γ -ray in 1—3h, and then they were injected intestinal RNA from normal on jejunum. On 1, 3 and 5d after irradiation, the mice were sacrificed after anesthesia for determining sIgA in small intestinal mucilage, endotoxin in blood and bacterial metathetic rate, and observing morphological changes of jejunal villus. The result showed that intestinal RNA can decrease MLN bacterial metathetic rate and the level of endotoxin in blood, and increase sIgA in small intestinal mucilage ($p<0.01$). In addition, it can improve intestinal mucosal morphology and reduce atrophy and collapse of jejunal villus. In conclusion, Intestinal RNA can improve intestinal mucosal barrier and inhibit intestinal bacterial translocation and absorption of intestinal endotoxin in irradiated mice.

KEYWORDS Intestinal RNA, γ -ray, sIgA, Endotoxin, Bacterial translocation

CLC R818.05, Q691.5, R332