

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)09-0860-03

# 小肠 RNA 对受<sup>60</sup>Co $\gamma$ 射线照射后小鼠肠系膜淋巴结细菌移位和血中内毒素含量的影响

苏晓明<sup>1</sup>, 曾桂英<sup>1</sup>, 任东青<sup>1</sup>, 周晓光<sup>1</sup>, 方恒虎<sup>1</sup>, 赵涛<sup>1</sup>, 金成<sup>1</sup>, 徐修礼<sup>2</sup>(第四军医大学<sup>1</sup>: 预防医学系放射医学教研室; <sup>2</sup> 西京医院检验科 陕西 西安 710033)

## Effects of intestinal RNA on MLN bacterial translocation and endotoxin in blood of mice after abdominal <sup>60</sup>Co $\gamma$ -irradiation

SU Xiao-Ming<sup>1</sup>, ZENG Gui-Ying<sup>1</sup>, REN Dong-Qing<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-Guang<sup>1</sup>, FANG Heng-Hu<sup>1</sup>, ZHAO Tao<sup>1</sup>, JIN Cheng<sup>1</sup>, XU Xiu-Li<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Irradiation Medicine, School of Preventive Medicine, <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】** AIM: To explore the effects of intestinal RNA on MLN bacterial translocation and endotoxin in blood of mice after abdominal <sup>60</sup>Co $\gamma$ -irradiation. METHODS: The 144 BALB/c male mice were abdominally irradiated with 1150 cGy <sup>60</sup>Co $\gamma$ -ray in 1-3 h, and then they were injected intestinal RNA from normal rats on jejunum. On day 1, 3 and 5 after irradiation, the mice were sacrificed after anesthesia for determining endotoxin in blood and bacterial metathetic rate, and intestinal crypt survival rate. RESULTS: Intestinal RNA can decrease MLN bacterial metathetic rate and the level of endotoxin in blood. Intestinal RNA can significantly increase the crypt survival rate of jejunum ( $P < 0.01$ ). CONCLUSION: Intestinal RNA can improve intestinal mucosal mechanical barrier and decrease intestinal bacterial metathetic rate in irradiated mice.

**【Keywords】** intestinal; RNA;  $\gamma$ -ray; endotoxin; bacterial translocation; cell survival

**【摘要】**目的: 探讨小肠 RNA 对受<sup>60</sup>Co $\gamma$ 线照后小鼠肠系膜淋巴结细菌移位和血中内毒素含量的影响。方法: 选用 BALB/c 雄性小鼠 144 只, 用 1150 cGy <sup>60</sup>Co $\gamma$  射线进行腹部一次照射, 于照后 1~3 h 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 RNA, 分别于照后 1, 3, 5 d 麻醉后

收稿日期 2005-12-23; 接受日期 2006-01-20

基金项目 国家自然科学基金(30370440)

通讯作者: 曾桂英. Tel (029)8474876 Ext. 16 Email: gzyeng@fmmu.edu.cn

作者简介 苏晓明. 硕士生(导师曾桂英). Tel (029)8474876 Ext. 18

Email: smallcat@fmmu.edu.cn

解剖, 取血, 测定内毒素含量, 取肠系膜淋巴结, 测定细菌移位率, 取空肠段, 计数肠腺存活率。结果: 小肠 RNA 可降低受照小鼠肠系膜淋巴结细菌移位率和血中内毒素含量, 明显提高受腹部照射小鼠空肠的肠腺存活率( $P < 0.01$ )。结论: 小肠 RNA 可改善受照小鼠肠黏膜机械屏障功能, 减少细菌移位。

【关键词】小肠 RNA;  $\gamma$  线; 内毒素; 细菌移位; 细胞存活

【中图分类号】R818.05

【文献标识码】A

## 0 引言

较大剂量的  $\gamma$  线照射可引起肠腺干细胞(即肠上皮干细胞)的死亡而导致肠道的损伤, 增加细菌入侵的机率, 继发肠源性感染。我们的研究已证实, 小肠 RNA 可通过调节细胞周期和某些基因的表达促进受  $\gamma$  线照射小鼠肠细胞的修复, 增加肠腺存活率, 加快肠道辐射损伤的恢复<sup>[1-3]</sup>, 此时, 肠道细菌的移位和血中内毒素含量是否也发生变化, 值得我们关注。我们观察 BALB/c 小鼠小肠 RNA 对受<sup>60</sup>Co $\gamma$  线照射小鼠肠道细菌移位和血中内毒素含量的影响, 以期放射损伤引起的内毒素血症和腹腔感染的治疗提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 显色基质鲎试剂盒(厦门鲎试剂厂), <sup>60</sup>Co  $\gamma$  线(第四军医大学辐照中心), 细菌培养箱(Dugbox 厌氧工作站, Ruskin 公司), 紫外分光光度计(SmartSpec<sup>TM</sup> 3000, Bio-RAD 公司)。健康雄性 BALB/c 小鼠, 体质量 24~28 g; 健康雄性 SD 大鼠, 体质量 180~200 g, 均由第四军医大学实验动物中心提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 RNA 提取和鉴定** 取正常 SD 大鼠的小肠, 剪碎并称质量后用盐酸胍-苯酚-氯仿抽提, 提取的 RNA 用消毒的 1 mL/L 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: 样品浓度(g/L) =  $40 \times A_{260\text{nm}} \times \text{稀释倍数} / 1000$ 。

**1.2.2 动物和照射** 选用健康雄性 BALB/c 小鼠 144 只, 实验前 1 wk 领回实验室常规饲养, 以适应环

境. 实验前 1 d 按体质量随机分为正常组、照射对照组和小肠 RNA 组. 取 1, 3, 5 d 共 3 个时间点(共 9 组, 每组各 16 只). 照射当日用 5 g/L 的戊巴比妥钠(40 mg/kg 体质量)腹腔注射麻醉后固定于带孔的双层有机玻璃照射盒内(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 1 m. 用<sup>60</sup>Co $\gamma$ 线进行腹部一次照射, 剂量率为 249.12 cGy/min, 剂量为 1150 cGy. 照射总时间的一半后将动物进行翻身照射, 以保证照射剂量的均匀.

1.2.3 小肠 RNA 的注入 小鼠接受腹部照射后 1~3 h 内固定于手术板上, 腹正中切口暴露小肠, 在距 Treitz 韧带远端 3~4 cm 处长约 4 cm 的空肠腔内注入含有小肠 RNA 的生理盐水注入液 0.4 mL(含小肠 RNA 40  $\mu$ g), 使肠腔中度扩张约 10 s 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. 照射对照组小鼠只在肠腔内注入 0.4 mL 无菌生理盐水.

1.2.4 血浆内毒素测定 采集腹主动脉血约 0.5 mL, 3000 r/min 离心 15 min, 取血浆, -20 $^{\circ}$ 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). 制定标准曲线, 即将已知内毒素工作品稀释至 1000, 600, 300, 100, 60, 30, 15 EU/L(EU 为内毒素活性单位), 使用紫外分光光度计测定各浓度点的  $A_{545\text{nm}}$  值, 订出标准曲线. 将 -20 $^{\circ}$ C 保存的血浆标本置恒温融化后, 70 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 取上清, 加反应试剂后测定其吸光度, 从标准曲线中求出相应的内毒素含量.

1.2.5 肠系膜淋巴结细菌定量培养 按文献 [4] 的方法, 无菌采集肠系膜淋巴结(mesenteric lymph node), 电子天平称质量后按 1:100(kg/L)的比例加入无菌生理盐水, 匀浆后取 0.1 mL 组织匀浆接种至厌氧血琼脂培养板, 用 L 型玻棒涂抹均匀后, 置于厌氧培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h, 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<sup>[5]</sup>.

1.2.6 标本制备和肠腺存活率测定 麻醉后解剖小鼠, 在距 Treitz 韧带远端 3~4 cm 处, 取约 2 cm 长的空肠段, 制备测定肠腺存活率标本. 肠腺存活率的测定: 取长约 2 cm 长空肠段, 卡诺氏液固定, 孚尔根染色, 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. 肠腺存活率(%) = 照射肠片上的肠腺绒毛比/正常肠片上的肠腺绒毛比  $\times$  100%. 正常肠片的肠腺存活率为 100%.

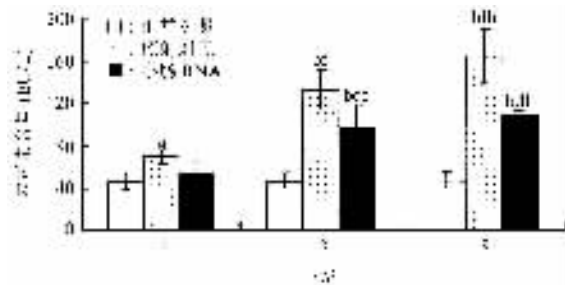
统计学处理: 所有数据均采用 SPSS 11.0 统计分析软件进行处理, 组间比较采用非参数秩和检验, 率

的比较采用 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, 进行吸光度测定, 呈典型的核酸吸收光谱, 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).

2.2 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 1 d 即显著高于正常组( $P < 0.05$ ), 照后 3 d 和 5 d 持续升高, 约为照后 1 d 时的 1.9~2.4 倍. 小肠 RNA 组小鼠血浆内毒素含量在照后 1 d 虽高于正常组, 但无显著性差异, 照后 3 d 和 5 d 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( $P < 0.01$ , 图 1).



\* $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 同一时间点照射对照; <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 照射后 1 d; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 照射后 3 d.

图 1  $\gamma$ 线腹部照射后小鼠血中内毒素含量的变化( $n = 16$ )

2.3 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 1 d 即显著高于正常对照组( $P < 0.01$ ), 且随时间的延长明显, 至照后 5 d 时升至 93.8%. 而小肠 RNA 组肠系膜淋巴结细菌移位率从照后 1 d 起一直低于照射对照组, 至照后 5 d 明显低于照射对照组( $P < 0.05$ , 表 1).

表 1  $\gamma$ 线腹部照射后小鼠肠系膜淋巴结细菌移位

[ $n = 16$ , % (阳性数/总数)]

组别	照射后时间		
	1 d	3 d	5 d
正常对照	0.0 (0/16)	0.0 (0/16)	0.0 (0/16)
照射对照	50.0 (8/16) <sup>b</sup>	75.0 (12/16) <sup>b</sup>	93.8 (15/16) <sup>d</sup>
小肠 RNA	28.6 (4/16)	50.0 (8/16) <sup>b</sup>	62.5 (10/16) <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照, <sup>d</sup> $P < 0.05$  vs 同一时间点照射对照, <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$  vs 照射后 1 d.

2.4 肠腺存活率的变化 照后 1 d 照射对照组和小肠 RNA 组小鼠肠腺存活率均明显降低, 但照射对照

组明显低于小肠 RNA 组。照后 3 d 照射对照组小鼠肠腺存活率下降到最低,照后 5 d 有所回升,但差异不显著。照后 3 d 小肠 RNA 组小鼠肠腺存活率虽也下降到最低,照后 5 d 有所回升,但与照射对照组相比仍处于较高水平( $P < 0.01$ , 表 2)。

表 2  $\gamma$  线腹部照射后小鼠空肠肠腺存活率( $n=16$ , %  $\bar{x} \pm s$ )

组别	照射后时间		
	1 d	3 d	5 d
照射对照	60.6 $\pm$ 2.6	34.2 $\pm$ 0.8d	38.1 $\pm$ 5.9 <sup>d</sup>
小肠 RNA	80.7 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>	53.3 $\pm$ 3.8 <sup>bd</sup>	58.1 $\pm$ 2.9 <sup>bd</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 同一时间点照射对照; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 照射后 1 d。

### 3 讨论

肠腺干细胞的辐射敏感性很高,大剂量的电离辐射照射可使小肠上皮干细胞受到损伤乃至死亡。肠腺干细胞的损伤乃至死亡使肠上皮失去维持更新的源泉,而原有的上皮细胞仍以它固有的速度向绒毛表面移行、衰老、死亡,从顶端脱落,因而出现绒毛变小、缩短和裸露,引起肠道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黏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,肠黏膜屏障损害可造成内毒素血症。

我们的实验发现,小鼠在受  $\gamma$  线照后 1 d 即出现了肠腺存活率的明显降低,照后 3 d 降至最低,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 $\pm$ 19.0) EU/L,表明肠上皮的损伤已达到非常严重的程度,而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 5 d 时,小鼠空肠肠腺存活率虽有轻微的回升,但细菌移位率和内毒素含量仍未降低。这可能是受照小鼠血液和体液中的溶酶菌、备解素和补系统含量仍处于较低水平,杀菌效价降低,清除细菌能力严重下降,使恢复较慢,值得我们下一步探讨。

从上看出,  $\gamma$  线所致肠道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,但至今仍无有效治疗措施。Masakonose 等<sup>[6]</sup>实验研究表明,用 800 cGy  $^{60}\text{Co}$  线对小鼠进行全身照射,可引起肠黏膜损伤,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黏膜的病理损害,减少细菌移位的发生,降低动物死亡率。此外,生长激素、精氨

酸、谷氨酰胺等也能修复损伤的肠黏膜屏障,减少细菌移位<sup>[7-9]</sup>。但关于小肠 RNA 对辐射损伤后小鼠肠道细菌移位的影响,国内外还未见报道。

本实验观察到:小肠 RNA 可使受照小鼠空肠肠腺存活率比照射对照组提高 20% 左右( $P < 0.01$ )。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( $P < 0.01$ )。该组小鼠较照射对照组活跃,至照后 5 d 麻醉解剖前未见死亡,可见肠上皮的损伤得到了较好的修复,小肠的机械屏障作用得到了恢复,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。

我们的实验结果表明:小肠 RNA 可明显提高受腹部照射小鼠空肠的肠腺存活率,改善小鼠肠黏膜机械屏障,减少细菌移位。小肠 RNA 促进肠道肠系膜淋巴结细菌移位率的减少和血浆内毒素含量的降低除与肠黏膜机械屏障损伤的恢复有关外,是否与其免疫屏障的改变有关,有待我们进一步探讨。

### 【参考文献】

- [1] 曾桂英,田芙蓉,陈永斌,等. 小鼠小肠 RNA 对受 $^{60}\text{Co}$  射线照射同系小鼠小肠损伤的恢复[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2001, 19: 59-64.
- [2] 任东青,赵涛,曾桂英,等. 小鼠小肠 RNA 对人肠上皮细胞辐射损伤修复的研究[J]. 实用预防医学, 2001, 8: 161-163.
- [3] 崔大祥,曾桂英,王枫,等. 外源核酸促核辐射鼠肠腺细胞修复的基因分析[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28: 353-357.
- [4] Deitch EA, Bridges RM. Effect of stress and trauma on bacterial translocation from the gut[J]. J Surg Res, 1987, 42(5): 536-542.
- [5] Shou J, Lappin J, Minnard EA, et al. Total parenteral nutrition, bacterial translocation and host immune function[J]. Am J Surg, 1994, 167: 145-150.
- [6] Nose M, Uzawa A, Ogyu T, et al. OK-432 reduces mortality and bacterial translocation in irradiated and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) treated mice[J]. J Radiat Res (Tokyo), 2001, 42(2): 191-200.
- [7] Prieto I, Gomez de Segura IA, Garcia GA, et al. Growth hormone reduces bacterial translocation in radiation enteritis in the rat[J]. Rev Esp Enferm Dig, 1998, 90(5): 353-360.
- [8] Gurbuz AT, Kunzelman J, Ratzer EE. Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial clearance following radiation enteritis in rats[J]. J Surg Res, 1998, 74(2): 149-154.
- [9] Chun H, Sasaki M, Fujiyama Y, et al. Effect of enteral glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation after abdominal radiation injury in rats[J]. J Gastroenterol, 1997, 32(2): 189-195.