

· 基础论著 ·

角质细胞生长因子对小鼠放射性肠损伤的治疗作用

李佳 王月英 胡斌 邢志伟 于程程 姜恩海

【摘要】 目的 本文研究角质细胞生长因子(KGF)对急性放射病小鼠肠损伤的治疗作用。方法 将C57BL/6小鼠随机分为空白对照组、照射对照组、KGF低(1 mg/kg)、中(2 mg/kg)、高(4 mg/kg)剂量组5组,空白对照组给予假照射,其他4组给予全身一次性¹³⁷Cs-γ射线7.2 Gy照射,通过观察小鼠大体情况、检测小鼠肠组织蛋白浓度和NO含量及肠组织病理分析,探讨KGF对小鼠肠损伤的保护作用。结果 KGF给药组较照射对照组,体重恢复较快;KGF低、中、高剂量组较照射对照组肠组织蛋白浓度明显升高($P < 0.05$),KGF中、高剂量组较照射对照组NO浓度显著降低($P < 0.05$);肠组织病理情况较好。结论 KGF对小鼠放射性肠损伤有明显的治疗作用。

【关键词】 辐射; 小鼠; 角质细胞生长因子

Keratinocyte growth factor treatment prevents radiation-induced intestinal damage in a mouse model LI Jia, WANG Yue-ying, HU Bin, XING Zhi-wei, YU Cheng-cheng, JIANG En-hai. Institute of Radiation Medicine Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China
Corresponding author: JIANG En-hai, Email: 1147330797@qq.com

【Abstract】 Objective To study protective effect of keratinocyte growth factor (KGF) in radiation-induced intestinal injury in a mouse model. **Methods** The C57BL/6J mice were randomly divided into five groups: control group, radiation group and low, middle, high dose groups of KGF (1, 2, 4 mg/kg). The control group were sham-irradiated, other groups were given a single whole body irradiation at the dose of 7.2 Gy with ¹³⁷Cs-γ rays. Then body weight were measured, protein, NO concentrations and pathology were observed in intestinal. **Results** Compared with simple IR group, KGF treatment groups showed better status in body weight and pathology of intestinal, KGF low, middle dose groups with protein concentrations had statistically significant ($P < 0.05$), KGF high dose group with protein concentrations had statistically significant ($P < 0.01$), KGF middle, high dose groups with NO concentrations had statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** KGF treatment could improve radiation-induced intestinal injury in a mouse model.

【Key words】 Radiation; Mice; Keratinocyte growth factor

外照射急性放射病依据临床特点及病理改变不同分为骨髓型、肠型、脑型三型。其中肠型放射病发病急、病程短、临床分期不明显、且尚无有效治疗药物,因此死亡率高而成为世界性的难题。近年来,研究表明角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)可有效防治辐射损伤,且作用迅速、高效,有望成为新的辐射防护细胞因子。目前关于KGF对放射性肠损伤的

保护作用的研究多为照射前给药,本文以¹³⁷Cs-γ射线照射小鼠建立放射性肠损伤模型,照射后腹腔注射KGF于给药组小鼠,通过观察各组小鼠大体情况、检测小鼠肠组织蛋白浓度和NO含量及肠组织病理分析,探讨KGF对小鼠肠损伤的保护作用,旨在为放射性肠损伤的治疗寻求新的解决办法。

材料与方法

1. 仪器和试剂:KGF购自上海朗月生物科技有限公司,批号:121229。考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、NO试剂盒购于南京建成生物工程研究所。酶标仪购于美国BioTek公司,型号:Synergy HT。

2. 实验动物分组及处理:C57BL/6J小鼠50只,雌雄各半,SPF级,8~10周龄,体重20~22 g,购于中国

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.13.049

基金项目:卫生部行业基金(201002009);中国医学科学院放射医学研究所探索基金(1315)

作者单位:300192 天津,中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所临床室(李佳、邢志伟、于程程、姜恩海),生化室(王月英);承德市疾病预防控制中心预防医学门诊部(胡斌)

通讯作者:姜恩海,Email:1147330797@qq.com

食品药品检定研究院国家啮齿类实验动物种子中心,合格证号:SCXK京2009-0004,饲养于天津市实验动物中心。将实验动物随机分为5组,每组10只,雌雄各半。空白对照组给予假照射,其他四组均给予¹³⁷CS-γ射线一次性全身照射7.2 Gy。3个给药组照射后开始给药,连续7 d分别给予腹腔注射1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg的KGF, 1次/d。同时照射对照组腹腔注射PBS。

3. 实验方法:照射前将小鼠随机分组,并开始观察体重、毛发、活动度等大体情况。照射后第9天,将各实验组小鼠空腹8 h后脱颈椎处死,70%酒精浸泡后,解剖小鼠取出完整小肠组织。将小肠从中间截断分为两段,靠近十二指肠一段用10%甲醛溶液冲洗并浸泡,常规病理固定,石蜡包埋切片,HE染色,光镜下观察;靠近回肠一段(取0.2 g/只)用9%生理盐水冲洗后研磨组织匀浆,依据考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒和NO试剂盒(硝酸还原酶法)步骤操作。

4. 统计学分析:应用SPSS 13.0统计软件对肠组织蛋白浓度和NO含量进行统计处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素ANOVA方差分析,组间两两比较采用LSD法, $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

结 果

1. 体重观察:照射后,空白对照组因没有受到辐射正常生长,毛发光泽好,饮水、饮食、活动度正常;其他四组均出现不同程度的毛发散乱、光泽性减低、精神萎靡、活动度下降、饮食和饮水量下降,给药组较照射对照组小鼠情况较好。

各实验组受照后体重变化趋势见图1。结果显示,照射前,各组小鼠体重平均值差异小于0.6 g。照射后,空白对照组保持体重增长的趋势,其他四组均于照射后第1天开始出现体重的明显下降,三个给药组于照射后第4天出现体重最低值,后逐渐恢复,照射对照组体重下降明显于第7天达到最低值,后恢复不明显。

2. 肠组织蛋白浓度及NO含量结果:各实验组肠组织蛋白浓度及NO含量见表1。结果显示,小鼠接受γ射线一次性全身7.2 Gy照射后,照射对照组与空白对照组相比蛋白浓度明显降低($P < 0.01$)、NO含量明显升高($P < 0.05$),差异有统计学意义。各给药组与照射对照组比较,蛋白浓度均明显升高,其中高剂量给药组差异显著($P < 0.01$);中、高剂量给药组NO含量明显降低($P < 0.05$)。

3. 肠组织病理观察:各组肠组织病理见图2~6,分析以上各组图中小肠组织绒毛、隐窝等病理组织形态

可见,空白对照组小肠绒毛、隐窝完整,无明显组织学改变。照射对照组小肠组织病变较重,小肠黏膜结构发生破坏,可见多处片状出血,黏膜水肿,部分绒毛变性、脱落,病变处隐窝破坏。低剂量给药组小肠组织黏膜水肿,绒毛、隐窝完整,无出血坏死等其他改变。中剂量给药组小肠组织黏膜轻度水肿,绒毛、隐窝完整,无出血坏死等其他改变。高剂量给药组小肠组织绒毛整齐、完整,隐窝完整,未见明显改变。

表1 不同给药组对辐射损伤小鼠肠组织蛋白浓度及NO含量影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	蛋白浓度(g/L)	NO含量(μmol/g prot)
空白对照组	10	0.68 ± 0.12	8.29 ± 5.84
照射对照组	10	0.39 ± 0.28 ^b	25.73 ± 12.55 ^a
1 mg/kg KGF	10	0.60 ± 0.47 ^c	12.41 ± 6.39
2 mg/kg KGF	10	0.62 ± 0.68 ^c	10.95 ± 5.14 ^c
4 mg/kg KGF	10	0.72 ± 0.11 ^d	8.66 ± 5.70 ^c

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与照射对照组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

讨 论

急性外照射放射病中肠型放射病以发病急、病程短、临床分期不明显,死亡率高为特点,患者多因多器官功能衰竭或其他并发症而死亡,因至今尚无有效的临床治疗手段而成为世界性的难题。腹部恶性肿瘤的放射治疗也因此受到制约。因此对放射性肠损伤防治的研究是紧迫而意义重大的。KGF是成纤维细胞生长因子家族中的一员,最初在肺成纤维细胞的培养液中发现^[1]。KGF由间质细胞产生,特异的作用于上皮细胞表面的FGFR2b。并且参与细胞分化、增殖、DNA修复、清除活性氧等诸多生物学过程。研究表明,KGF预防给药可以明显降低辐射引起的肠组织损伤,提高受照小鼠的存活率^[2]。其作用机制可能为KGF直接作用于肠隐窝干细胞,增加肠隐窝的存活数目,进而减轻辐射引起的肠损伤^[3]。但KGF对放射性肠损伤的治疗作用少有研究,本实验旨在探究其对放射性肠损伤的治疗作用。

NO是一种重要的黏膜炎症递质,具有细胞保护和细胞毒性双重作用,过量的NO可激活和放大免疫、炎症反应。Hsueh等^[4]发现NO与坏死性小肠结肠炎的发生密切相关。白爱平等^[5]发现炎症性肠病活动期患者病变肠段NO含量显著高于正常对照组,推测NO可能参与肠炎急性期损伤。研究发现,急性反射性直肠炎的肠组织匀浆中NO含量明显高于正常,提示NO测定在放射性肠炎早期诊断中有一定的应用价值^[6]。本研究中,照射对照组小鼠肠组织NO含量明显升高,在



图1 ^{137}Cs - γ 射线照射后小鼠体重的变化趋势 图2 空白对照组小肠组织病理学改变 (HE $\times 100$) 图3 照射对照组小肠组织病理学改变 (HE $\times 100$)

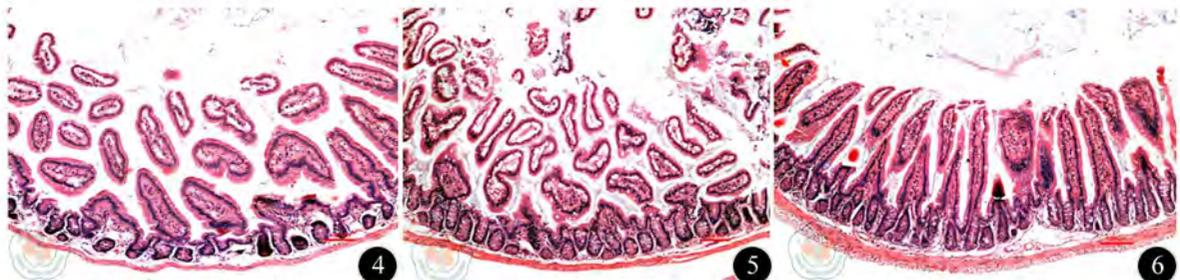


图4 1 mg/kg给药组小肠组织病理学改变 (HE $\times 100$) 图5 2 mg/kg给药组小肠组织病理学改变 (HE $\times 100$) 图6 4 mg/kg给药组小肠组织病理学改变 (HE $\times 100$)

剂量递增的给予 KGF 后,各个给药组的肠组织匀浆的 NO 含量显示出不同程度的降低,其中高剂量给药组 NO 含量接近空白对照组,提示 KGF 可通过抑制 NO 的异常增高从而保护肠组织。

辐射引起的肠组织损伤可导致肠组织的蛋白浓度降低^[7],其可能的原因包括肠组织绒毛变性、脱落、隐窝结构破坏导致的干细胞凋亡^[8]及紧密连接蛋白 (claudin-1、ZO-1) 的破坏^[9]。本研究中照射对照组肠组织蛋白浓度明显降低,在剂量递增的给予 KGF 后,各给药组蛋白浓度表现出不同程度的增高,可能与 KGF 对肠组织上皮细胞的促增殖能力,以及对黏蛋白、非黏性蛋白、紧密连接蛋白的促分泌作用有关,提示 KGF 可有效保护肠组织屏障结构及功能,促进放射性肠损伤的修复。

放射性肠损伤常见病理表现即绒毛脱落、隐窝破坏、出血、坏死,病变程度决定了肠组织干细胞的再生能力即肠组织的修复程度。本研究的病理结果表明,照射对照组肠组织病变明显,绒毛、隐窝损伤严重,有弥漫的片状出血,而 KGF 治疗给药组病变较轻,多为不同绒毛的水肿,无隐窝等其他病变,其中高剂量给药组表现基本正常,提示 KGF 有明显的治疗作用。

本研究旨在寻求新的放射性肠损伤的治疗药物,经实验证实,KGF 可有效减轻辐射引起的肠组织损伤,提示其有望成为新的放射防护药物,但其具体保护机

制尚不明确,需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Movsas B, Scott C, Langer C, et al. Randomized trial of amifostine in locally advanced non-small-cell lung cancer patients receiving chemotherapy and hyperfractionated radiation: radiation therapy oncology group trial 98-01. *J Clin Oncol*, 2005, 23:2145-2154.
- [2] Farrell CL, Bready JV, Rex KL, et al. Keratinocyte Growth Factor Protects Mice from Chemotherapy and Radiation-induced Gastrointestinal Injury and Mortality. *Cancer Res*, 1998, 58:933-939.
- [3] Liu CJ, Jin JD, Lv TD, et al. Keratinocyte growth factor gene therapy ameliorates ulcerative colitis in rats. *World J Gastroenterol*, 2011, 17: 2632-2640.
- [4] Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, et al. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol*, 2003, 6:6-23.
- [5] 白爱平, 罗莺, 沈志祥, 等. 一氧化氮与结肠炎模型急性期损伤. *世界华人消化杂志*, 1999, 7:900-901.
- [6] 姜恩海, 王桂林, 龚守良. 放射性疾病诊疗手册. 北京: 中国原子能出版社, 2012:160-164.
- [7] Farrell CL, Rex KL, Chen JN, et al. The effects of keratinocyte growth factor in preclinical models of mucositis. *Cell Prolif*, 2002, 35:78-85.
- [8] Potten CS, Grant HK. The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine. *Br J Cancer*, 1998, 78:993-1003.
- [9] Cai Y, Wang W, Liang H, et al. Keratinocyte growth factor pretreatment prevents radiation-induced intestinal damage in a mouse model. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48:419-426.

(收稿日期:2013-05-27)

(本文编辑:戚红丹)