

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00651

N-乙酰半胱氨酸对大鼠小肠辐射损伤的防护作用

王 瑜^{1△}, 张再重^{1△}, 陈少全¹, 王 烈^{1*}, 郑国华²

1. 南京军区福州总医院普通外科, 南京军区普通外科研究所, 福州 350025
2. 福建中医学院护理学系, 福州 350000

[摘要] 目的:探讨N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)对小肠辐射损伤的防护作用及其作用机制。方法:60只雄性SD大鼠随机分为5组,单纯照射组($n=12$)仅接受单次腹部照射;高、中、低剂量NAC给药组($n=12$)均接受10 Gy X线单次腹部照射并分别给予腹腔注射NAC 300、200、50 mg/kg,连续7 d;正常对照组($n=12$)给予腹腔注射1 ml 0.9% NaCl溶液,连续7 d。NAC在单次腹部照射前3 d开始经腹腔注射给药,至照射后第3日结束。照射后第3日,禁食12 h后处死大鼠,取血与末端回肠标本。光镜下观察并计算单位面积肠片上的肠腺存活率和绒毛数,测定血浆中D-乳酸含量和二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)活性,检测小肠组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量。结果:照射后大鼠末端回肠肠黏膜结构受到破坏,血浆中D-乳酸、DAO含量显著升高,小肠组织中SOD活性、GSH含量显著降低,MDA含量显著升高($P<0.01$)。不同剂量NAC给药处理后可不同程度地降低小肠黏膜绒毛数减少并提高肠腺存活率($P<0.05$, $P<0.01$),抑制血浆中D-乳酸、DAO含量升高,提高小肠组织中SOD、GSH含量并减少脂质过氧化产物MDA的生成($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:NAC通过增强机体抗氧化能力、减轻肠屏障功能障碍的严重程度,维护机体内氧化还原平衡以及小肠黏膜结构和功能的完整性,对小肠辐射损伤起到有效的防护作用。

[关键词] N-乙酰半胱氨酸;小肠;辐射损伤;辐射防护;放射性肠炎;肠屏障功能障碍

[中图分类号] R 818.85 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)06-0651-04

Protective effect of N-acetylcysteine on small intestine of male rats after irradiation

WANG Yu^{1△}, ZHANG Zai-zhong^{1△}, CHEN Shao-quan¹, WANG Lie^{1*}, ZHENG Guo-hua²

1. Research Institute of General Surgery, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China
2. Department of Nursing, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350000

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the protective effect of N-acetylcysteine(NAC) on the small intestine of male rats after X ray irradiation of the whole abdominal region. **Methods:** Sixty male Sprague-Dawley rats were divided in normal control group ($n=12$), irradiation group($n=12$), and NAC groups(50, 200, and 300 mg/kg, $n=12$). Irradiation injury was induced with X ray at a single dose of 1 000 cGy(source-to-skin distance 80 cm) for the abdominal regions after the animals had been anesthetized with sodium thiopental(40 mg/kg, i. p.). NAC was started 3 days before irradiation and administered for 3 more days after irradiation, and then rats were euthanized after 12 h fasting. The terminal ileum samples were collected for crypt survival assay and counting in ileal villi. The blood samples were collected for examination of superoxide dismutase(SOD) activity, and the contents of malondialdehyde(MDA) and glutathione hormone(GSH) in the small intestine. The plasma levels of D-lactate and diamine oxidase(DAO) were also measured. **Results:** The mucosal structure of the terminal ileum was damaged after irradiation. The plasma levels of D-lactate, DAO and the content of MDA were significantly increased; the activity of SOD and the content of GSH were significantly decreased($P<0.01$). NAC at different dosages increased crypt survival rates and the number of ileal villi in the terminal ileum($P<0.05$, $P<0.01$), enhanced the activities of SOD and content of GSH($P<0.05$, $P<0.01$), and decreased the concentrations of D-lactate, DAO and MDA ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** NAC may protect the small intestine from irradiation-induced injury by protecting the intestinal mucosal barrier, eliminating oxygen free radicals, and maintaining the internal oxidative balance and the structure and function of intestinal mucous.

[收稿日期] 2007-11-17 **[接受日期]** 2008-03-17

[基金项目] 南京军区“十五”医药卫生科研基金(02MA009). Supported by Key Medical Program of the “10th Five-Year Plan” of PLA Nanjing Military Area Command(02MA009).

[作者简介] 王 瑜, 博士, 副教授. E-mail: flyfish@hotmail.com; 张再重, 硕士生. E-mail: zaizhongzhang@yahoo.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0591-24937077, E-mail: fzpkwk@21cn.com

[KEY WORDS] N-acetylcysteine; small intestine; radiation injuries; radiation protection; radiation enteritis; intestine barrier functional disturbance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(6): 651-654]

接受放射治疗,特别是腹部直接接受照射的肿瘤患者,常并发急性放射性肠炎^[1]。严重的放射性肠损伤多发生在照射总量超过 50 Gy 时,其发生率约为 2.5%~25.0%,由于放射性损伤是作用于细胞复制过程,故同时接受肿瘤化疗的患者,即使照射总量不到 50 Gy,亦可致病^[2]。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)为硫醇类化合物,是天然氨基酸 L-半胱氨酸与谷胱甘肽(glutathione, GSH)的前体,是一种强有力的抗氧化剂,对多种疾病引起的 GSH 减少、氧化应激水平升高均有较好的防治效果。近年来,国内外研究发现 NAC 对多种器官组织的辐射损伤具有很好的防护作用^[3],但是 NAC 对小肠辐射损伤防护作用的详细机制仍未完全清楚。本实验通过建立大鼠小肠辐射损伤模型, NAC 腹腔注射给药处理,进而探讨 NAC 对大鼠小肠辐射损伤的防护作用及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物、试剂和仪器 雄性近交系成年 Sprague-Dawley 大鼠 60 只,体质量 250~300 g,由南京军区福州总医院动物实验中心提供。NAC(批准文号:国药准字 H20051788,生产批号:0603101)购自杭州民生药业集团有限公司,超氧化物歧化酶(SOD,生产批号:20070419)、GSH(生产批号:20070419)、丙二醛(MDA,生产批号:20070421)、考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒(生产批号:20070420)由南京建成生物工程研究所提供,医用电子直线加速器, TL-16G 型高速冷冻离心机。

1.2 动物分组 60 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组,每组 12 只;单纯照射组仅接受单次腹部照射;高剂量 NAC 给药组接受单次腹部照射并给予腹腔注射 NAC 300 mg/kg,连续 7 d;中剂量 NAC 给药组接受单次腹部照射并给予腹腔注射 NAC 200 mg/kg,连续 7 d;低剂量 NAC 给药组接受单次腹部照射并给予腹腔注射 NAC 50 mg/kg,连续 7 d;正常对照组给予腹腔注射 1 ml 0.9% NaCl 溶液,连续 7 d。NAC 在单次腹部照射前 3 d 开始经腹腔注射给药,至照射后第 3 日结束。

1.3 大鼠急性放射性肠炎模型制备 将大鼠以戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,固定在有机玻璃板上。用 6-MV 直线加速器进行 X 线照射,射

野 5 cm×7 cm,源皮距为 80 cm,覆盖头部、胸部及肢体,全腹(上至胸骨剑突下至耻骨联合)照射 1 次。在 3.20 Gy/min 的剂量率下照射,总照射剂量为 10 Gy,制作出急性放射性肠炎的动物模型^[4]。

1.4 肠屏障功能障碍指标测定 照射后第 3 日,所有大鼠禁食 12 h 后注射致死剂量的戊巴比妥钠(200 mg/kg)安乐处死。右心室穿刺取血 5 ml,4℃ 2 500×g 离心 10 min 分离血浆,收集血浆置 -70℃ 冰箱保存。参照文献^[5]测定血中 D-乳酸含量,反映肠黏膜损伤程度和肠通透性变化等肠屏障功能障碍。参照黎君友等^[6]建立的分光光度法测定血浆二胺氧化酶(DAO)活性来反映肠通透性变化等肠屏障功能障碍。

1.5 小肠组织形态学观察 在严格无菌条件下迅速打开腹腔,取出小肠并用预冷的 0.9% NaCl 溶液冲洗。取末端回肠标本 2 cm,40 g/L 甲醛溶液固定,修剪、脱脂、石蜡包埋和切片, H-E 染色,光镜下计数单位面积肠片上的肠腺数和绒毛数,并计算肠腺存活率(以肠腺存活百分率表示)。另取末端回肠组织 0.5 cm,立即用 2% 的戊二醛固定以备电镜制片,观察小肠形态学改变。

1.6 小肠组织氧化还原酶活性测定 取末端回肠组织 4 cm,用预冷的 0.9% NaCl 溶液再次冲洗,滤纸吸干称量,加入 9 倍体积的 0.9% NaCl 溶液,冷水浴中用眼科剪尽快剪碎,并在玻璃匀浆管中手工匀浆,制成 10% 小肠匀浆,高速冷冻离心机 4℃ 先用 600×g 离心 10 min 后,取上清液于 10 000×g 离心 20 min,最后再取上清液 -70℃ 低温保存,测 SOD、MDA、GSH 等氧化还原标志酶活性,按照试剂盒说明书进行。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数比较采用完全随机设计资料的方差分析。

2 结果

2.1 小肠组织形态学改变 光学显微镜下,与正常对照组比较,各照射组大鼠末端回肠黏膜绒毛数量减少,小肠上皮结构完整性遭到破坏,末端回肠肠腺存活率均有不同程度的降低,且差异显著($P < 0.01$);给予不同剂量 NAC 后,可不同程度地使得大鼠小肠肠腺数和绒毛数增多,维护小肠结构的完整性,并提高肠腺存活率($P < 0.05$, $P < 0.01$),且

NAC的作用呈现一定剂量效应关系,其中高、中剂量 NAC 给药组作用显著($P<0.01$)。见表 1。

表 1 NAC 对小肠肠腺存活率及绒毛数量的影响

Tab 1 Effects of NAC on crypt survival rate and number of villi in the small intestine

($n=12, \bar{x} \pm s$)

Group	Crypt survival rate (%)	Number of villi (mm ⁻¹)
Irridation	51.08±3.10 ^{△△}	3.45±0.37 ^{△△}
Irridation+NAC		
300 mg/kg	75.42±4.76 ^{**△△}	8.68±0.20 ^{**△△}
200 mg/kg	63.56±5.12 ^{**△△}	6.29±0.44 ^{**△△}
50 mg/kg	54.48±4.35 ^{*△△}	3.74±0.36 ^{*△△}
Normal control	97.07±1.03	9.46±0.17

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs irradiation group; ^{△△} $P<0.01$ vs normal control group

2.2 肠屏障功能障碍指标测定结果 照射后第 3 日,与正常对照组比较,单纯照射组、低剂量 NAC 给

药组与中剂量 NAC 给药组大鼠血浆 D-乳酸及 DAO 含量均显著升高($P<0.01$),高剂量 NAC 给药组大鼠血浆 D-乳酸及 DAO 含量与正常对照组相比无差异($P>0.05$);与单纯照射组相比,不同剂量 NAC 给药组大鼠血浆中 D-乳酸及 DAO 含量均显著降低($P<0.01$),3 组之间两两比较均具有显著性差异($P<0.01$)。见表 2。

2.3 小肠组织氧化还原酶活性测定结果 与正常对照组比较,单纯照射组大鼠末端回肠组织中受检的 SOD、GSH 与 MDA 3 种氧化还原酶活性或含量均有显著变化,受照后大鼠末端回肠组织中 SOD 活性与 GSH 含量显著降低、MDA 含量显著升高($P<0.01$);与单纯照射组比较,不同剂量 NAC 给药(50、200、300 mg/kg)均能够抑制大鼠末端回肠组织中 SOD 活性与 GSH 含量降低,抑制 MDA 含量升高($P<0.05, P<0.01$),且高、中剂量 NAC 给药组作用显著($P<0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血浆 D-乳酸与 DAO 含量及小肠组织氧化还原酶活性测定结果

Tab 2 Comparison of plasma D-lactate and DAO levels, intestinal SOD activities and MDA, GSH levels between irradiated and non-irradiated SD rats

($n=12, \bar{x} \pm s$)

Group	D-lactate $\rho_B/(\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	DAO $\varepsilon_B/(\text{U} \cdot \text{ml}^{-1})$	SOD $\text{mU} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	GSH $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$
Irridation	9.82±0.62 ^{△△}	0.74±0.14 ^{△△}	162.69±23.08 ^{△△}	2.68±0.40 ^{△△}	15.84±2.32 ^{△△}
Irridation+NAC					
300 mg/kg	3.62±0.31 ^{**}	0.32±0.12 ^{**}	246.58±30.94 ^{**△}	1.86±0.30 ^{**}	22.62±3.87 ^{**△△}
200 mg/kg	6.87±0.58 ^{**△△}	0.48±0.11 ^{**△△}	214.52±26.94 ^{**△△}	2.22±0.15 ^{*△△}	19.73±2.52 ^{**△△}
50 mg/kg	8.68±0.49 ^{**△△}	0.56±0.08 ^{**△△}	185.74±26.56 ^{*△△}	2.28±0.19 ^{*△△}	18.79±1.74 ^{*△△}
Normal control	3.44±0.11	0.29±0.06	268.35±40.28	1.62±0.16	31.98±2.21

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs irradiation group; [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs normal control group

3 讨论

肠道黏膜上皮是对辐射高度敏感的组织,电离辐射可以通过杀伤肠道黏膜上皮细胞和隐窝干细胞从而破坏肠道的吸收和屏障功能,致使绒毛上皮的更新缺乏来源,进而破坏其结构和功能的完整性,导致肠腺存活率降低^[7]。由于淋巴组织对放射线极度敏感,加上末端回肠位置比较固定,易受照射损害,特别是炎症或术后粘连使得肠襻固定,单位面积照射量增加,富含淋巴小结的末端回肠更易发生放射性肠炎。研究表明,隐窝上皮的直接损伤及随后的绒毛上皮结构破坏是辐射引起肠黏膜形态结构以及功能异常的主要原因^[8]。国外有学者主要通过对小肠组织病理形态学的观察研究后发现,NAC 连续 1 周胃内预处理给药,能够显著起到对全身接受 3.5

Gy γ 射线照射大鼠肠道的辐射防护作用^[9]。另有研究证实,NAC 通过发挥其抗氧化性,可对肠缺血再灌注、炎症性肠病、烧伤、热损伤、感染等多种疾病相关的肠屏障功能障碍起到有效的防治作用^[10]。但是 NAC 对于辐射损伤相关肠屏障功能障碍防护作用方面的研究并不多,同时又由于不同类型的放射线损伤机体的特点与机制不甚相同,NAC 防护小肠组织遭受 X 线损伤的相关作用机制值得进一步探讨。

本研究采用 6-MV 直线加速器进行总剂量为 10 Gy X 线单次腹部照射建立 SD 大鼠放射性肠炎模型后,观察发现末端回肠肠腺数和绒毛数显著减少,肠腺存活率显著降低,小肠黏膜形态结构受到严重破坏,同时检测到血浆 D-乳酸含量及 DAO 活性显著升高。D-乳酸是肠道固有菌群的代谢终产物,

由于哺乳动物机体内各种组织均不产生 D-乳酸,也没有快速代谢分解 D-乳酸的生物酶系统,因此血浆中的 D-乳酸基本上来源于肠道,其水平的变化与肠通透性密切相关,可较客观地反映出肠屏障功能障碍的严重程度^[11]。DAO 则是小肠黏膜上层绒毛中具有高度活性的细胞内酶,其他组织或细胞中几乎不存在,生理状态下血浆中 DAO 活性很低,当肠黏膜受到破坏时,细胞释放的 DAO 大量入血,使血中 DAO 含量升高,因此血中 DAO 含量是一种可反映肠黏膜结构完整性的较理想指标^[12]。因此,本研究不仅观察到辐射导致的小肠黏膜形态结构完整性破坏表现形式,亦从微观指标的检测上进一步证实了辐射导致了肠屏障功能障碍的发生。我们的实验还发现,不同剂量 NAC 给药组大鼠小肠组织辐射损伤均有不同程度的缓解,给予 NAC 能够显著降低放射性肠炎的发生率及严重程度,使肠腺数和绒毛数增多并提高肠腺存活率,显著保护肠黏膜形态结构和功能的完整性,减轻肠屏障功能障碍的严重程度。

辐射损伤属于辐射能量传递干扰体内抗氧化防御系统,破坏细胞内氧化还原平衡,基于氧化应激反应产生大量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS),吸收辐射能量进而损伤生物分子^[13]。小肠细胞内氧化还原平衡在维持其小肠细胞功能方面起着重要的作用,肠道具有一个预防或限制氧化应激的防护系统,SOD 等抗氧化物酶具有清除 ROS,防护肠道辐射损伤的功效^[14]。MDA 是脂质过氧化的最终产物,组织中 MDA 含量可直接客观地反映脂质过氧化的程度,并间接地反映出组织辐射损伤的程度^[15]。GSH 在清除 ROS、维持组织细胞的氧化还原平衡中有重要作用,辐射损伤常伴随着组织细胞 GSH 水平的下降,NAC 通过其抗氧化性直接清除 ROS,以及为合成具有清除 ROS 保护细胞作用的 GSH 提供半胱氨酸两种途径来发挥对辐射损伤细胞的防护作用^[16]。国外一些研究表明,大鼠接受 10 Gy X 线腹部单次照射后 3 d 小肠组织细胞内氧化还原酶平衡显著破坏,组织病理形态学观察表明此时小肠组织受损也最为严重^[14]。

本研究发现辐射造成大鼠小肠中 SOD 活性与 GSH 含量显著降低、MDA 含量显著升高,进一步证实辐射引起小肠组织内过氧化反应增加,细胞内氧化还原平衡破坏。不同剂量 NAC 连续 1 周腹腔注射给药后,能够减少小肠组织内 MDA 的含量,抑制过氧化反应增加,维护细胞内氧化还原平衡,进而降低小肠辐射损伤程度。同时亦能够通过提高小肠组

织内 SOD 活性和 GSH 含量,巩固小肠组织内抗氧化防御系统,清除辐射损伤所生成的 MDA,间接抑制 MDA 对小肠的损伤,增强机体自身的辐射防护能力。NAC 对大鼠肠道辐射防护作用呈现一定的剂量效应,NAC 300 mg/kg 连续 7 d 腹腔注射给药对大鼠肠道辐射损伤具有显著的防护作用。

[参考文献]

- [1] 蔡东联,李燕,袁静珏,陈小莉,胡同杰,曹翔,等.大豆蛋白治疗实验性急性放射性肠炎的效果[J].第二军医大学学报,2000,21:890-893.
- [2] 李宁.放射性肠炎[J].中国实用外科杂志,2001,21:712-714.
- [3] 张再重,王瑜,王烈.N-乙酰半胱氨酸对辐射损伤防护作用的研究进展[J].国际外科学杂志,2007,34:465-468.
- [4] Erbil Y,Oztecan S,Giris M,Barbaros U,Olgac V,Bilge H, et al. The effect of glutamine on radiation-induced organ damage [J]. Life Sci,2005,78:376-382.
- [5] 于勇,盛志勇,柴家科,黎君友,杨晓东,袁仕安,等.烧伤患者血浆 D-乳酸水平和肠道内 IgA 含量的变化[J].创伤外科杂志,2003,5:122-124.
- [6] 黎君友,于燕,郝军,晋华,许惠军.分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性[J].氨基酸和生物资源,1996,18:28-30.
- [7] Fowler J F,Leborgne F,Leborgne F,Leborgne J H. Acute radiation reactions in oral and pharyngeal mucosa: tolerable levels in altered fractionation schedules [J]. Radiother Oncol,2003,69:161-168.
- [8] Potten C S. A comprehensive study of the radiobiological response of the murine(BDF1) small intestine [J]. Int J Radiat Biol,1990,58:925-973.
- [9] Sridharan S,Shyamaladevi C S. Protective effect of N-acetylcysteine against gamma ray induced damages in rats—biochemical evaluations [J]. Indian J Exp Biol,2002,40:181-186.
- [10] 张再重,王瑜,王烈,林克荣.N-乙酰半胱氨酸对肠屏障功能障碍防治作用的研究现状[J].临床军医杂志,2007,35:756-759.
- [11] Ruan P,Gong Z,Zhang Q. Changes of plasma D(-)-lactate, diamine oxidase and endotoxin in patients with liver cirrhosis [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2004,3:58-61.
- [12] 黎君友,孙丹,吕艺,晋桦,胡森,盛志勇.肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响[J].世界华人消化杂志,2004,12:464-466.
- [13] Song L,Cai D,Yan H,Chen X,Li Y,Ma L, et al. Effects of soybean isoflavone on liver oxidative stress resulting from ⁶⁰Co-gamma rays [J]. Acad J Sec Mil Med Univ,2005,26:151-154.
- [14] Mutlu-Turkoglu U, Erbil Y, Oztecan S, Olgac V, Toker G, Uysal M. The effect of selenium and/or vitamin E treatments on radiation-induced intestinal injury in rats [J]. Life Sci,2000,66:1905-1913.
- [15] Olgac V, Erbil Y, Barbaros U, Oztecan S, Giris M, Kaya H, et al. The efficacy of octreotide in pancreatic and intestinal changes: radiation-induced enteritis in animals [J]. Dig Dis Sci,2006,51:227-232.
- [16] Morley N, Curnow A, Salter L, Campbell S, Gould D. N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts [J]. J Photochem Photobiol B,2003,72(1-3):55-60.