

· 论著与基础研究 ·

[文章编号] 1006-2440(2020)01-0001-04

[引文格式] 李鹏, 朱庆丽, 宁亮, 等. Slug 敲除促进 γ -射线照射小鼠肠上皮细胞损伤的体内研究[J]. 交通医学, 2020, 34(1): 1-3, 7.Slug 敲除促进 γ -射线照射小鼠肠上皮细胞损伤的体内研究*李 鹏^{1**}, 朱庆丽², 宁 亮³, 焦学龙³, 陈 栋³, 宫兴基⁴, 贺东勇⁴(青岛大学附属医院¹ 内分泌科; ² 甲状腺外科; ³ 普外科; ⁴ 急诊内科, 山东 266003)

[摘要] 目的: 观察 γ 射线照射对 Slug 敲除 C57BL/6 小鼠肠粘膜上皮细胞损伤的影响及机制。方法: Slug 敲除 C57BL/6 小鼠和非 Slug 敲除 C57BL/6 小鼠各 12 只, 以 8Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身一次性照射制作动物模型, 分别在照射后第 1、3、8 天处死小鼠, 取小肠组织 4% 多聚甲醛液固定作病理学检查; 取非 Slug 基因敲除小鼠和 Slug 基因敲除小鼠各 24 只, 予以 8Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身一次性照射, 分别在照射后第 2、4 和 24 h 处死, 采用免疫组化法检测肠道细胞 PUMA 表达, TUNEL 染色检测细胞凋亡。结果: 8Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射后, Slug 基因敲除小鼠死亡率 91.67%, 明显高于非基因敲除小鼠的 25.00%, 差异有统计学意义 ($P=0.004$)。Slug 敲除小鼠肠道细胞凋亡指数、PUMA 阳性表达细胞数以及肠道损伤的严重程度均明显高于非敲除组。结论: Slug 基因敲除加重 γ 射线引起的放射性肠道损伤。

[关键词] 放射性肠道损伤; Slug 基因; PUMA 蛋白; 基因敲除; 细胞凋亡

[中图分类号] R574.5

[文献标志码] A

[DOI] 10.19767/j.cnki.32-1412.2020.01.001

Slug knockout promotes γ -ray induced intestinal epithelial cell injury in mice in vivoLI Peng¹, ZHU Qingli², NING Liang³, JIAO Xuelong³, CHEN Dong³, GONG Xingji⁴, HE Dongyong⁴(Department of Endocrinology; ²Department of thyroid surgery; ³Department of General Surgery;⁴Department of Emergency Internal Medicine, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong 266003)

[Abstract] **Objective:** To observe the role and mechanisms of gamma ray (γ) irradiation on intestinal mucosa epithelial cells in C57BL/6 mice with Slug knockout. **Methods:** A total of 12 Slug knockout C57BL/6 mice and 12 non-Slug knockout C57BL/6 mice were selected. The mice were exposed to 8Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ one-time to produce animal model, which was weighed and put to death at 1st day, 3th day and 8th day, respectively. The jejunum and ileum was fixed in 4% paraformaldehyde fluid, paraffin embedding and sectioning. The histopathological changes were observed after HE staining. Expression of PUMA in intestinal mucosa epithelial cell was detected with immunohistochemical method. Cell apoptosis was detected by TUNEL staining. **Results:** 8Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ irradiation causes mice to lose spirit and reduces food intake. Two, four and five Slug knockout mice died at 1st day, 3th day and 8th day, respectively, and zero, one and two non-Slug knockout C57BL/6 mice died at 1st day, 3th day and 8th day, respectively ($P=0.004$). The intestinal cell apoptosis index, PUMA expression and severity of intestinal injury in Slug knockout mice with 8Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ were significantly higher compared to non-Slug knockout mice. **Conclusions:** Slug knockout increases radioactive intestinal injury caused by γ rays.

[Key words] radiation intestinal injury; Slug gene; PUMA protein; gene knockout; apoptosis

本课题组前期研究发现, 靶向 Slug 通过上调 PUMA (p53 上调凋亡调控因子) 增加体外肠道上皮细胞 IEC6 对 γ -射线照射的敏感性, 而 Slug 过表达保护细胞免于 γ -射线照射引起的 IEC6 损伤^[1-2]。本研究旨在研究 γ -射线对 Slug 基因敲除小鼠模型肠

道上皮细胞的影响及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 以非 Slug 基因敲除雄性 C57BL/6 小鼠为对照组, Slug 基因敲除雄性 C57BL/6 小鼠为

* [基金项目] 山东省自然科学基金资助项目 (2014ZRB01198)。

** [作者简介] 李鹏, 男, 汉族, 山东枣庄人, 生于 1976 年 7 月, 硕士, 副主任医师。研究方向: 内分泌与代谢病。 通信作者: 贺东勇, E-Mail: hdy007a@163.com

实验组,小鼠年龄 4~6 周,体重 16~20 g。Slug 基因敲除小鼠[SCXK(粤)2016-0041]由南方生物模式研究中心完成,于青岛大学附属医院中心实验室饲养。受孕母鼠所生嵌合体小鼠可以成功将携带的 Slug 突变基因传代至杂合子。Slug 小鼠杂合子代符合孟德尔遗传定律,肉眼观察敲除小鼠无明显缺陷性表型,具有生育能力^[3]。本实验使用的是 Slug 基因敲除纯合子小鼠。

1.2 γ -射线照射 取非 Slug 基因敲除 C57BL/6 小鼠 12 只,Slug 基因敲除 C57BL/6 小鼠 12 只,予以 8Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身一次性照射,制作肠上皮细胞损伤小鼠模型。分别在照射后第 1、3、8 天处死,取小肠于 4%多聚甲醛液中固定,石蜡包埋,切片厚 4 μm ,常规 HE 染色后观察肠道组织病理学变化。取非 Slug 基因敲除 C57BL/6 小鼠 24 只,Slug 基因敲除 C57BL/6 小鼠 24 只,予以 8Gy $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身一次性照射,分别在照射后第 2、4 和 24 h 处死,检测细胞凋亡和 PUMA 表达变化。

1.3 PUMA 免疫组化检测 将组织切片脱蜡,通过一系列二甲苯和乙醇洗涤再水合。在柠檬酸盐缓冲液中进行抗原回收,用过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性。将载玻片与小鼠抗人 PUMA 单克隆抗体或正常小鼠 IgG1 以 1:2 000 浓度一起温育过夜。载玻片洗涤后与生物素化的马抗鼠二抗孵育,随后与抗生物素蛋白-生物素复合物孵育,采用 3,3'-二氨基联苯胺显色。阳性染色细胞 $\geq 10\%$ 为 PUMA 阳性表达,<10%为 PUMA 阴性表达。

1.4 TUNEL 检测 石蜡切片贴在涂有粘合剂的载玻片上,58 $^{\circ}\text{C}$ 烤 24 h,常规脱蜡至水。TUNEL 混合液 1 mL 加入 10 μL b-11-DUTP,10 μL TDT 进行孵育,37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h,室温 1 h,PBS 洗 3 min $\times 3$ 次。加 Strepta-

vidin-HRP 1:400,37 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 min,PBS 洗 3 min $\times 3$ 次。显色 10 min,流水洗,苏木精衬染 1min,盐酸乙醇分化,水洗,常规树脂封片。结果判断:显微镜下随机计数 5 个以上高倍视野,不少于 1 000 个细胞,褐色细胞为凋亡细胞。凋亡细胞数/总细胞数为凋亡指数(AI)。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 22.0 统计学软件分析数据。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异性比较采用 ANOVA 分析和 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 γ 射线照射对小鼠生存的影响 经 8Gy γ 射线照射后,小鼠精神不振,进食量减少,Slug 基因敲除小鼠症状更明显。在照射后第 1、3、5 天 12 只非 Slug 基因敲除小鼠分别死亡 0、1 和 2 只,12 只 Slug 基因敲除小鼠分别死亡 2、4 和 5 只,基因敲除小鼠死亡率 91.67%,明显高于非基因敲除小鼠的 25.00%,差异有统计学意义($P=0.004$)。

2.2 γ 射线照射对小鼠肠道组织病理的影响 非 Slug 基因敲除 C57BL/6 小鼠在照射后第 1 天肠道损伤较轻,照射后第 3 天肠道损伤明显,至第 8 天时损伤恢复。Slug 基因敲除 C57BL/6 小鼠在照射后第 1 天肠道损伤已明显,照射后第 8 天损伤还未恢复(图1)。

2.3 γ 射线照射对小鼠肠道细胞 PUMA 表达和细胞凋亡的影响 免疫组化检测发现, γ 射线照射后 2 小时在两组 C57BL/6 小鼠肠道组织中 PUMA 表达开始增加,8 小时时 PUMA 表达最明显,24 小时后 PUMA 表达恢复正常。TUNEL 检测发现,Slug 基因敲除小鼠在 γ 射线照射后 2 小时细胞凋亡指数已明显增高,8 小时时凋亡指数最高,而非基因敲除小鼠在照射后 2 小时凋亡指数有所升高,8 小时时凋亡

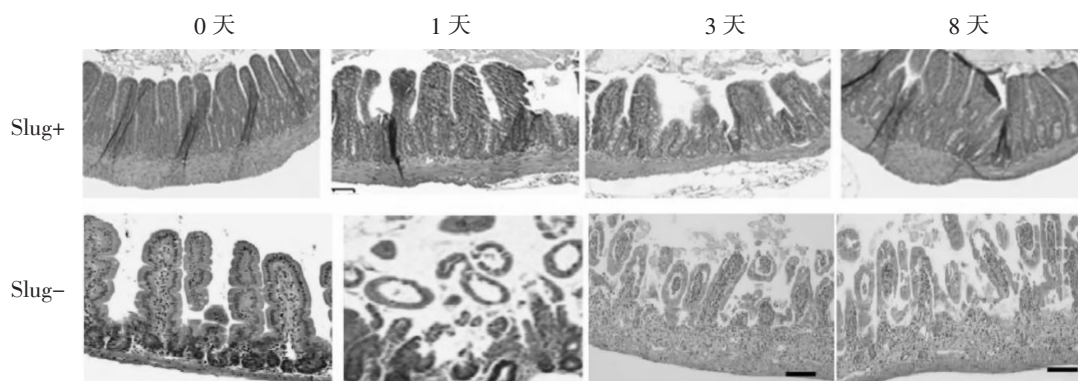
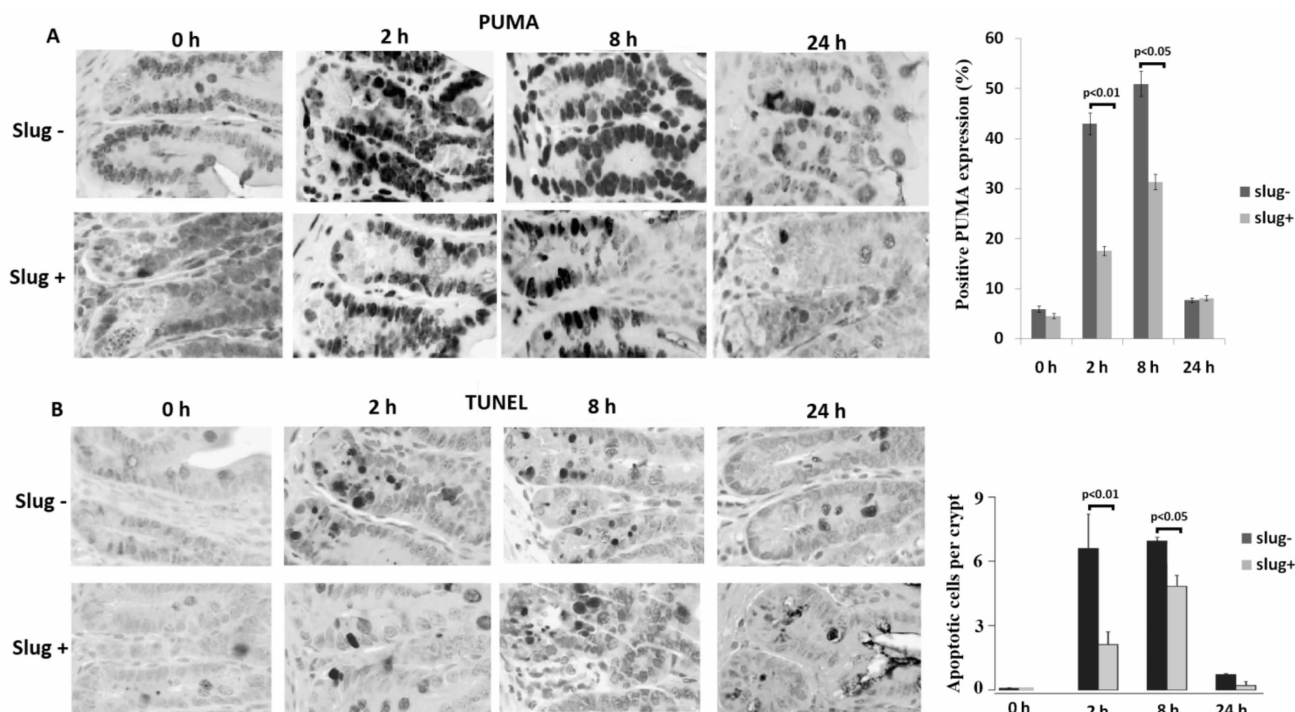


图 1 γ 射线照射引起小鼠肠上皮细胞损害

指数最明显, 24 小时后两组小鼠凋亡指数明显下降。照射后 2 小时($P<0.01$)、8 小时($P<0.05$) Slug 基

因敲除组 PUMA 阳性细胞比例及凋亡指数明显高于非敲除组, 差异均有统计学意义(图 2)。



A: 免疫组化检测 PUMA 蛋白; B: TUNEL 染色检测细胞凋亡。

图 2 γ 射线照射对小鼠小肠窝细胞 PUMA 表达和细胞凋亡的影响

3 讨 论

放射治疗是控制盆腔和腹腔肿瘤生长的重要手段, 但会引起一些严重的副作用, 如放射性肠道损伤^[4], 如何减轻放射性肠道损伤是肿瘤放射治疗的重要课题。多项研究表明, 通过基因改变可抑制射线引起的细胞凋亡, 保护细胞和组织损伤^[5-8]。

Slug 基因是转录因子 Snail 家族中编码锌指结构蛋白的重要基因, 通常在背部神经管表达, 对神经胚胎形成具有至关重要的作用, 并参与神经干细胞的正常发育^[9]。本课题组前期研究发现, 靶向 Slug 增加放射引起的促凋亡蛋白 PUMA 上调, 导致细胞凋亡增加^[10]。以体外培养的大鼠小肠隐窝上皮细胞 ICE-6 为研究对象, 将转染 Slug siRNA 的细胞接受 X 射线照射处理 24 h, 发现靶向 Slug 诱导 PUMA 蛋白表达增加, 从而增强 ICE-6 细胞对 X 射线的敏感性, 而 Slug 过表达抑制 PUMA 蛋白表达, 降低 ICE-6 细胞对 X 射线的敏感性^[1-2]。为进一步验证射线照射对肠上皮细胞的作用, 我们建立了 Slug 基因敲除小鼠模型^[3]。本研究以 8Gy ^{60}Co 射线全身一次性照射 Slug 基因敲除 C57BL/6 小鼠, 以非 Slug 基因敲除

C57BL/6 小鼠作为对照, 结果发现靶向 Slug 小鼠在接受射线照射后肠上皮细胞损伤明显加重, 上皮细胞恢复时间明显延长, 小鼠死亡率明显增高, 提示靶向 Slug 促进肠上皮射线损伤。为进一步探究肠上皮照射损伤发生的机理, 本研究检测肠上皮细胞凋亡和 PUMA 蛋白表达。结果发现靶向 Slug 小鼠受到射线照射后, 凋亡细胞明显增多, PUMA 蛋白表达增多。

综上所述, 靶向 Slug 可能通过上调 PUMA 表达而加重射线引起的肠组织细胞损伤, Slug 过表达可减轻损伤, 这为放射性肠道损伤的治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] 迟绍云, 焦学龙, 王宝泉, 等. Slug 减轻照射鼠肠上皮细胞损伤及作用机制[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(2): 138-142.
- [2] 高清华, 张克君, 赵彬彬, 等. siRNA 干扰 slug 基因表达对 IEC-6 细胞放射线敏感性影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2017, 53(1): 35-38, 42.
- [3] 陈栋, 焦学龙, 高学军, 等. Slug 基因敲除小鼠模型的建立[J]. 医学前沿, 2012, (29): 133-134. (下转第 7 页)

- Biomed Res Int,2017,2017:9729107.
- [7] Francque S,Verrijken A,Caron S,et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis[J]. J Hepatol,2015,63(1):164-173.
- [8] Corrao S,Rinollo C,Scaglione R. Non-alcoholic fatty liver disease:severity of fibrosis and its relationships with clinical and biological variables[J]. J Hepatol,2015,62(5):1212-1213.
- [9] Wang XM,Abraham S,McKenzie JAG,et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signalling[J]. Nature,2013,499(7458):306-311.
- [10] Gauthier MS,Favier R,Lavoie JM. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats[J]. Br J Nutr,2006,95(2):273-281.
- [11] Zhang Y,Proenca R,Maffei M,et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature,1994,372(6505):425-432.
- [12] Mu YP,Ogawa T,Kawada N. Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic Reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet[J]. Lab Invest,2010,90(2):245-256.
- [13] Mahmoud AA,Bakir AS,Shabana SS. Serum TGF- β , Serum MMP-1, and HOMA-IR as non-invasive predictors of fibrosis in Egyptian patients with NAFLD[J]. Saudi J Gastroenterol,2012,18(5):327-333.
- [14] Dixon JB,Bhathal PS,Jonsson JR,et al. Pro-fibrotic polymorphisms predictive of advanced liver fibrosis in the severely obese[J]. J Hepatol,2003,39(6):967-971.
- [15] Yang L,Roh YS,Song JY,et al. Transforming growth factor Beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice[J]. Hepatology,2014,59(2):483-495.
- [16] Nakamura T,Sakata R,Ueno T,et al. Inhibition of transforming growth factor Beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats[J]. Hepatology,2000,32(2):247-255.
- [17] Wikström P,Stattin P,Franck-Lissbrant I,et al. Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer[J]. Prostate,1998,37(1):19-29.
- [18] Jiang Y,Chen X,Tian W,et al. The role of TGF- β 1-miR-21-ROS pathway in bystander responses induced by irradiated non-small-cell lung cancer cells[J]. Br J Cancer,2014,111(4):772-780.
- [19] Chen YM,Luo Q,Xiong ZB,et al. Telmisartan counteracts TGF- β 1 induced epithelial-to-mesenchymal transition via PPAR- γ in human proximal tubule epithelial cells[J]. Int J Clin Exp Pathol,2012,5(6):522-529.
- [20] Zhong D,He GX,Zhao SR,et al. LRG1 modulates invasion and migration of glioma cell lines through TGF- β signaling pathway[J]. Acta Histochem,2015,117(6):551-558.

[收稿日期] 2019-10-17

(上接第 3 页)

- [4] Wang ZD,Zhang XQ,Du J,et al. Continuous cytogenetic follow-up,over 5 years,of three individuals accidentally irradiated by a cobalt-60 source[J].Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen,2015,779:1-4.
- [5] Guo M,Dong Z,Qiao J,et al. Severe acute radiation syndrome:treatment of a lethally 60Co-source irradiated accident victim in China with HLA-mismatched peripheral blood stem cell transplantation and mesenchymal stem cells[J]. J Radiat Res,2014,55(2):205-209.
- [6] Igaki H,Nakagawa K,Uozaki H,et al. Pathological changes in the gastrointestinal tract of a heavily radiation-exposed worker at the Tokai-mura criticality accident[J]. J Radiat Res,2008,49(1):55-62.
- [7] Zhang Z,Liu Q,Zang H,et al. Oxymatrine protects against l-arginine-induced acute pancreatitis and intestine injury involving Th1/Th17 cytokines and MAPK/NF- κ B signalling[J]. Pharm Biol,2019,57(1):595-603.
- [8] Duhachek-Muggy S,Bhat K,Medina P,et al. Radiation mitigation of the intestinal acute radiation injury in mice by 1-[(4-Nitrophenyl) sulfonyl]-4-Phenylpiperazine [J]. Stem Cells Transl Med,2019,29:Epub ahead of print.
- [9] Díaz VM,de Herreros AG. F-box proteins:Keeping the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in check [J]. Semin Cancer Biol,2016,36:71-79.
- [10] Zhang K,Zhang B,Lu Y,et al. Slug inhibition upregulates radiation-induced PUMA activity leading to apoptosis in cholangiocarcinomas [J]. Med Oncol,2011,28 (Suppl 1): S301-S309.

[收稿日期] 2019-09-06