

丁酸钠对大鼠放射性肠损伤的保护作用

全 佳, 胡楚旋, 林壮民, 李穗华

广东省第二人民医院 药学部, 广东 广州 510000

摘要: **目的** 构建放射性肠损伤大鼠模型, 观察丁酸钠对肠损伤的保护作用。**方法** SPF级成年SD大鼠90只, 分为对照组、模型组和丁酸钠组, 每组各30只。除对照组外, 造模大鼠暴露腹部上至胸骨剑突下至耻骨联合, VarianClinic600直线加速器6MV高能X射线定位照射, 其余部位用5 cm厚铅砖屏蔽, 单次照射, 总吸收剂量10 Gy。造模前3 d, 丁酸钠组SD大鼠ig 40 mg/kg 丁酸钠, 1次/d, 照射后继续给药3 d, 对照组和模型组ig生理盐水。多普勒血流仪检测肠黏膜血流量; FITC荧光标记的葡聚糖检测肠黏膜血管通透性; ELISA法检测外周血浆二胺氧化酶(DAO)活性和肠组织一氧化氮(NO)水平; 肠黏膜组织切片HE染色, 显微镜下测量肠黏膜绒毛高度、黏膜厚度。**结果** 丁酸钠组造模成功率为83.3%, 显著低于模型组的100% ($P < 0.05$)。模型组和丁酸钠组肠黏膜血流量、黏膜绒毛高度和黏膜厚度显著低于对照组 ($P < 0.05$ 、0.01), 丁酸钠组肠黏膜血流量、黏膜绒毛高度和黏膜厚度显著高于模型组 ($P < 0.05$)。模型组和丁酸钠组肠黏膜葡聚糖、DAO和NO显著高于对照组 ($P < 0.05$), 丁酸钠组肠黏膜葡聚糖、DAO和NO显著低于模型组 ($P < 0.05$)。**结论** 丁酸钠可以增加放射性肠损伤大鼠肠黏膜血流量, 降低NO表达, 发挥肠黏膜保护作用。

关键词: 丁酸钠; 放射性肠损伤; 血流动力学; 一氧化氮; 二胺氧化酶; 肠黏膜绒毛高度; 黏膜厚度

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2018) 12-2206-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.12.013

Experimental study of protective effect of sodium butyrate on intestinal injury induced by radiation

QUAN Jia, HU Chuxuan, LIN Zhuangming, LI Suihua

Department of Pharmacy, The Second People's Hospital of Guangdong, Guangzhou 570000, China

Abstract: Objective To establish radiation-induced intestinal injury rat model and study the protective effect of sodium butyrate on intestinal injury. **Methods** Totally 90 adult SPF SD rats were divided into control group, model group, and sodium butyrate group, with 30 rats in each group. Except for the control group, the model rats were exposed to 6MV high energy X-ray localization irradiation from abdomen to sternal xiphoid process and pubic symphysis. The rest parts were shielded with 5 cm thick lead brick, single irradiation, and the total absorbed dose was 10 Gy. SD rats in the sodium butyrate group were ig administrated with sodium butyrate (40 mg/kg, once daily) for 3 d. The control group and model group were given normal saline. The intestinal mucosal blood flow was detected by Doppler blood flow meter. The intestinal mucosal vascular permeability was detected by FITC labeled dextran. DAO and NO in peripheral blood were detected by ELISA analysis. Intestinal mucosal tissue sections were treated with HE staining, and the villus height and mucosal thickness of intestinal mucosa were measured under microscope. **Results** The success rate of modeling in sodium butyrate group was 83.3%, which was significantly lower than that of 100% in model group ($P < 0.05$). In the model and intervention group, the intestinal mucosal blood flow, villous height and thickness of mucous membrane were significantly lower than that in control group ($P < 0.05$ or 0.01), but the intestinal mucosal blood flow, villus height and the thickness of the mucosa in intervention group were significantly higher than that in model group ($P < 0.05$). In the model and intervention group, the dextran, DAO, and NO were significantly higher than that in control group ($P < 0.05$), but the dextran, DAO, and NO in intervention group were significantly lower than that in model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Sodium butyrate can increase the intestinal mucosal blood flow, reduce the expression of NO, and protect intestinal mucosa in rats with intestinal injury induced by radiation.

Key words: sodium butyrate; radiation-induced intestinal injury; hemodynamics; NO; diamine oxidase; villus height of intestinal mucosa; mucosal thickness

收稿日期: 2018-04-27

第一作者: 全 佳(1984—), 女, 大学本科, 主管药师 Tel: 13580470156; E-mail: m13580470156@163.com

放疗是肿瘤患者常用的治疗方法,肠上皮细胞分裂增殖旺盛,对放射敏感,放射性肠损伤是盆腔和腹腔肿瘤放疗后常见的并发症,接受腹盆腔放疗的患者5%~10%可进展成放射性肠损伤,损伤诱发的消化道临床症状严重影响患者的生活质量,严重者可出现肠坏死、肠穿孔,甚至直接导致死亡的发生^[1]。目前临床上对放射性肠损伤尚无有效的防治措施^[2],丁酸钠是一种组蛋白去乙酰化抑制剂,具有抗炎、抗氧化的作用^[3],近年来已有研究显示,丁酸钠对受损的肠黏膜可以发挥保护作用^[4],本研究构建放射性肠损伤大鼠模型,在此基础上观察丁酸钠对放射性肠损伤大鼠模型肠损伤的保护作用。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级成年SD大鼠90只,购自上海斯莱克实验动物公司,雌雄各半,体质量190~210 g,饲养于本院动物实验中心,无菌饮水和饲料适应性喂养3 d后,随机分为对照组、模型组和丁酸钠组,每组各30只。

1.2 药物及主要试剂

丁酸钠(批号20171204,规格10 mg),购自美国Sigma公司;戊巴比妥钠注射液(批号20171122,规格0.25 g),购自上海新亚药业有限公司;FITC荧光标记的葡聚糖(批号20171211),购自杭州新乔生物科技有限公司;二胺氧化酶(DAO)ELISA检测试剂盒(批号20180112),购自南京建成科技有限公司;一氧化氮(NO)ELISA检测试剂盒(批号20180111),北京碧云天生物试剂公司。

1.3 主要仪器

VarianClinic600直线加速器6MV高能X射线机,购自美国瓦里安公司;BV-520型多普勒探测仪,购自上海寰熙医疗器械有限公司;Med550酶标仪,购自美国Bio-Rad公司;CLARIOstar全波长荧光扫描酶标仪,购自德国BMG LABTECH公司。

2 方法

2.1 放射性肠损伤模型的制备

30只模型组和30只丁酸钠组SD大鼠进行造模处理,参照林雪等^[3]的药物剂量,造模前3 d丁酸钠组ig给予40 mg/kg丁酸钠,1次/d,照射后继续给药3 d,对照组和模型组ig生理盐水。造模大鼠暴露腹部上至胸骨剑突,下至耻骨联合,VarianClinic600直线加速器6MV高能X射线定位照射,其余部位用5 cm厚铅砖屏蔽,单次照射,总吸收剂量10 Gy^[5],3 d内大鼠出现

腹泻、黏液血便记为造模成功^[6]。

2.2 肠黏膜血流量测定

多普勒血流仪检测肠黏膜血流量。单次照射3 d后,戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉大鼠,开腹后,暴露肠黏膜,多普勒血流仪红外探头检测肠黏膜血流量,45 s仪器自动输出读数,以数码信号BPU间接表示血流量值。

2.3 肠黏膜血管通透性测定

单次照射3 d后,所有大鼠iv FITC荧光标记的葡聚糖(2 mg/kg),完成肠黏膜血流量检测后,处死大鼠,取1 cm小肠组织,反复灌洗去除血液,组织充分匀浆后,3 000×g离心20 min,取上清,荧光酶标仪540 nm处检测上清的吸光度(A)值,再根据标准曲线,计算出组织间隙中FITC荧光标记葡聚糖的浓度。

2.4 血浆DAO活性和肠组织NO的测定

单次照射3 d后,采集大鼠静脉血0.5 mL,1 000×g离心10 min,取上层血浆,ELISA法检测DAO;处死大鼠后取0.5 cm小肠组织,充分匀浆后,3 000×g离心20 min,取上清,ELISA法检测NO;严格按照试剂盒说明书操作,显色后酶标仪570 nm处检测吸光度(A)值,再根据标准曲线,计算出DAO和NO的浓度。

2.5 肠黏膜形态学指标的检测

单次照射3 d后,处死大鼠取0.5 cm小肠组织,4%福尔马林液固定组织,交由病理科制作组织切片,常规HE染色,显微镜下测量绒毛高度、黏膜厚度。

2.6 统计学处理

所有数据输入SPSS 16.0软件进行统计分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态性分布,两组独立样本均数比较使用 t 检验,多组间比较使用方差分析,组间相互比较使用LSD检验,计数资料使用 χ^2 分析。

3 结果

3.1 3组大鼠一般情况

对照组大鼠存活良好,模型组大鼠进食、活动减少,毛发凌乱甚至脱毛,成功率100%,丁酸钠组由于药物作用,造模成功25例,成功率为83.3%,成功率显著低于模型组($P < 0.05$)。

3.2 对放射性肠损伤模型大鼠肠黏膜血流量和血管通透性的影响

如表1所示,模型组和丁酸钠组肠黏膜血流量显著低于对照组($P < 0.05$ 、 0.01),丁酸钠组肠黏膜

表1 三组大鼠肠黏膜血流量、葡聚糖水平和血浆DAO、肠组织NO水平比较

Table 1 Comparison of intestinal mucosal blood flow, and dextran level, and plasma DAO and intestinal tissue NO level

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	血流量/BPU	葡聚糖/(μg·mL ⁻¹)	DAO/(U·L ⁻¹)	NO/(μg·mL ⁻¹)
对照	—	30	114.26±23.41	3.52±0.74	22.14±3.62	4.34±0.82
模型	—	30	61.24±12.35**	5.71±1.13**	68.31±17.42**	15.26±3.22**
丁酸钠	40	25	84.12±15.43*#	4.36±0.82*#	46.83±9.15**#	10.13±2.41*#

与对照组比较:**P*<0.05 ***P*<0.01; 与模型组比较: #*P*<0.05**P*<0.05 ***P*<0.01 vs control group; #*P*<0.05 vs model group

血流量显著高于模型组(*P*<0.05);模型组和丁酸钠组肠黏膜葡聚糖水平显著高于对照组(*P*<0.05),丁酸钠组肠黏膜葡聚糖水平显著低于模型组(*P*<0.05)。

3.3 对放射性肠损伤模型大鼠血浆DAO和肠组织NO的影响

如表1所示,模型组和丁酸钠组DAO和NO显著高于对照组(*P*<0.05、0.01),丁酸钠组DAO和NO显著低于模型组(*P*<0.05)。

3.4 对放射性肠损伤模型大鼠肠黏膜形态学指标的影响

如图1和表2所示,模型组和丁酸钠组黏膜绒毛高度和黏膜厚度显著低于对照组(*P*<0.01),丁酸钠组黏膜绒毛高度和黏膜厚度显著高于模型组(*P*<0.01)。

4 讨论

肿瘤患者在接受放射治疗后会引一系列的放射性损伤,肠上皮细胞对放射敏感,放疗在杀死肿瘤细胞的同时也会破坏小肠隐窝的干细胞和肠绒毛结构,使肠黏膜屏障功能受损,食物中的水分、蛋白质等电解质营养物质吸收障碍,肠道菌群移位,严重者可威胁到患者的生存质量和生命^[7]。有效防治放射性肠损伤是放疗并发症中亟需要解决的问题,因此本研究建立放射性肠损伤动物模型,借此探讨相关的防治方法。

本研究使用丁酸钠干预,结果显示,丁酸钠组SD大鼠放疗后,放射性肠损伤动物模型成功率只有83.3%,显著低于模型组的100%成功率,提示丁酸钠有可能发挥保护肠黏膜的功能。赖衍宗等^[8]在结肠炎的小鼠模型中发现丁酸钠通过促进Th1/Th2/



图1 大鼠肠黏膜组织的形态学观察(×100)

Fig. 1 Morphological observation of intestinal mucosa in rats (×100)

表2 三组大鼠黏膜绒毛高度和黏膜厚度的比较

Table 2 Comparison of mucosal height and mucosal thickness

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	绒毛高度/μm	黏膜厚度/μm
对照	—	30	284.36±31.53	475.26±38.14
模型	—	30	106.25±14.83**	242.54±18.52**
丁酸钠	40	25	157.34±26.38***	323.07±30.62***

与对照组比较:***P*<0.01;与模型组比较:****P*<0.01***P*<0.01 vs control group; ****P*<0.01 vs model group

Th17类细胞因子平衡,减轻模型小鼠肠黏膜的损伤发挥治疗作用。本研究的肠黏膜形态学检测显示,丁酸钠组黏膜绒毛高度和黏膜厚度显著高于模型组,也证明丁酸钠可以保护放射治疗导致的肠损伤。

血管性损伤也是放射性肠损伤一个主要发病机制,唐富波等^[9-10]的研究发现丁酸钠可以显著改善休克脏器的微循环,增加脏器的血流量和降低微血管通透性,本研究也观察到丁酸钠组肠黏膜血流量显著高于模型组。通过检测渗透到组织的荧光标记葡聚糖可以间接反映出微血管通透性,间质组织中葡聚糖越高说明微血管通透性也越高,血管损伤严重,本研究观察到丁酸钠组肠黏膜葡聚糖水平显著低于模型组,说明丁酸钠组的微血管通透性显著低于模型组,上述结果说明丁酸钠可以改善放射性肠损伤模型大鼠的肠微循环,发挥肠道保护功能。

DAO为肠绒毛上皮细胞内的标记物,细胞损伤时会释放入血,本研究检测到丁酸钠组DAO显著低于模型组,说明丁酸钠组肠绒毛细胞的损伤低于模型组。在肠道的炎性损伤中,NO是一个关键的作用分子,高浓度的NO可以刺激巨噬细胞、淋巴细胞释放致炎因子,与超氧阴离子O²⁻结合引发脂质过氧化反应,破坏细胞和组织,抑制肠道NO生成可以显著减低肠损伤^[11]。本研究检测到丁酸钠组NO显著低于模型组,这可能是丁酸钠发挥肠道保护作用的可能机制。另外还有研究显示,丁酸钠可以发挥抗肿瘤作用^[12],甚至可以致肿瘤干细胞凋亡,对于耐药的肿瘤细胞株也有效^[13],因此丁酸钠用于肿瘤患者放射性肠损伤的防治还可以杀灭放疗没有杀死的残留肿瘤细胞,发挥双重作用。

本研究显示,丁酸钠可以显著增加放射性肠损伤模型大鼠的肠黏膜血流量,降低NO表达,发挥肠黏膜保护作用。

参考文献

[1] 韩昌鹏.急性放射性肠炎中西医治疗研究进展[J].临床

医药文献电子杂志,2017,4(25):4946,4948.

- [2] Dickson I. Radiotherapy: Pharmacological quiescence for radiation-induced intestinal injury [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 13(12): 683-692.
- [3] 林雪,王帆,冯爵荣.丁酸钠对小鼠结肠炎性相关细胞因子平衡的影响[J].中国临床药理学杂志,2016,32(13):1198-1201
- [4] Zhou D, Pan Q, Xin F Z, et al. Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(1): 60-75.
- [5] 杜彬,原杰,任召祺,等.不同剂量辐射对NOD/SCID小鼠肠损伤的影响[J].中国医学科学院学报,2018,40(1):7-12.
- [6] 洪智攀,武寒飞,赵克,等.不同照射剂量下大鼠急性放射性肠炎模型的建立与比较[J].中华实验外科杂志,2012,29(11):2317-2320.
- [7] Kim C K, Yang V W, Bialkowska A B. The role of intestinal stem cells in epithelial regeneration following radiation-induced gut injury [J]. Curr Stem Cell Rep, 2017, 3(4): 320-332.
- [8] 赖衍宗,章颖,杨宏升,等.丁酸钠对TNBS结肠炎模型大鼠肠黏膜修复的影响[J].胃肠病学,2011,16(7):395-399.
- [9] 唐富波,郑金光,张文静,等.丁酸钠对严重烫伤大鼠小肠黏膜血流量和微血管通透性的影响[J].武警医学,2016,10(3):246-249.
- [10] 唐富波,何波,张文华.丁酸钠对严重烫伤后大鼠肝脏血流量及水肿的影响[J].中国现代医学杂志,2016,26(5):7-10
- [11] Chen G, Ran X, Li B, et al. Sodium butyrate inhibits inflammation and maintains epithelium barrier integrity in a TNBS-induced inflammatory bowel disease mice model [J]. EBioMedicine, 2018, 30(1): 317-325.
- [12] 徐亚文,郑少波,陈玢岫,等.苯丁酸钠对多烯紫杉醇耐药前列腺癌细胞株的增殖抑制和凋亡诱导作用[J].南方医科大学学报,2017,37(1):130-134.
- [13] 史红阳,纪玉强,张德信,等.丁酸钠联合肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体对肺癌干细胞生物学行为的影响[J].中国组织工程研究,2017,21(21):3326-3331.