

放射性肠损伤模型及其评价研究进展

王津晗 徐畅 王彦 刘强

300192, 北京协和医学院中国医学科学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室

通信作者: 刘强, Email: liuqiang@irm-cams.ac.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2017.01.007

【摘要】 辐射诱导的肠损伤是放疗造成的严重不良影响之一, 可导致肠道局部缺血、纤维化、溃疡、肠狭窄和下消化道出血等。放疗引起的肠损伤的复杂性导致放射性肠损伤模型和研究评价指标也多种多样。笔者综述了近年来的放射性肠损伤模型及对放射性肠损伤的评价标准和研究方案, 为今后的科学研究提供可靠的参考依据。

【关键词】 肠; 辐射损伤; 模型, 动物; 评价研究

基金项目: 国家自然科学基金(31670859); 中国医学科学院基本科研业务费项目(2016RC310017、2016ZX310068)

Progress on the evaluating and establishing methods of radiation-induced intestinal injuries animal model

Wang Jinhan, Xu Chang, Wang Yan, Liu Qiang

Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Liu Qiang, Email: liuqiang@irm-cams.ac.cn

【Abstract】 Radiation-induced intestinal injuries, a devastating adverse effect of radiation therapy, can lead to local ischemia and fibrosis with the development of ulcers, strictures and lower gastrointestinal bleeding. As the complex causes of radiation-induced intestinal injuries, diverse evaluating methods and animal model had been established. In this context, the present review will focus on the evaluating and establishing methods of radiation-induced intestinal injuries animal model, what would provide ideas for related basic research.

【Key words】 Intestines; Radiation injuries; Models, animal; Evaluation studies

Fund programs: National Natural Science Foundation of China(31670859); Fundamental Research Funds for CAMS&PUMC(2016RC310017, 2016ZX310068)

1895年, 德国物理学家伦琴发现X射线后, 开启了癌症治疗的新时代。1896年, X射线即被用于癌症治疗, 仅1年后便出现了对抗疗引起的肠道损伤这种不良反应的报道^[1]。放疗引起的胃肠道损伤也一直是放疗过程中面临的挑战之一^[2]。

肠道充斥在所有的腹腔、腹膜后和盆腔肿瘤的治疗区域中。放射性肠病被定义为在照射骨盆、腹部后出现的一种渐进的局部缺血以及纤维化(促纤维化)进程。临床研究中将放疗期间或放疗后任何进展的新胃肠道综合征定义为胃肠道毒性。胃肠道毒性是一个多因素的问题, 不仅仅与电离辐射的方式和剂量有关, 还与组织和细胞损伤的内在进程有关。

在科学研究中, 放疗引起的肠损伤的复杂性, 导致放射性肠损伤模型和研究评价指标也多种多样, 笔者综述了近年来的放射性肠损伤模型和对放射性肠损伤的评价标准和研究方案, 为今后的科学研究提供可靠的参考依据。

1 放射性肠损伤模型

在体外实验中, 实验对象较为单一, 常用正常的肠道细胞, 如人源正常小肠 FHs 74 Int 细胞、大鼠正常肠上皮 IEC-6 细胞作为模型。除了正常的肠上皮细胞外, 还采用可永生化的类人结肠癌 Caco-2 细胞, 通过在培养皿中构建致密的单层细胞模型来

表 1 放射引起的肠道损伤动物模型建立方法

Table 1 Establishing methods of radiation-induced intestinal injuries animal model

年龄或体重	模式动物	照射条件	剂量/Gy	剂量率	照射源	照射后取样时间	主要研究内容	存活率或致死率	参考文献
20周龄、体重25 g	雌性 B6D2F1/J 小鼠	全身照射	8.5~10.0	0.4 Gy/min	⁶⁰ Co	1、2、3、7 d	炎症	LD50/30=9.65 Gy	[3]
10周龄	雄性 BALB/C 小鼠	全身照射	3~7	1.05 Gy/min	¹³⁷ Cs	1~42 d	炎症与细菌转移	7 Gy 全身照射后存活率为 10%	[4]
6~8周龄	雄性 C57BL/6 小鼠	全身照射	14	0.8 Gy/min	¹³⁷ Cs	1、3.5、7 d	肠干细胞	14 Gy 照射后平均存活 5~6 d	[5]
8~10周龄	雄性 C57BL/6 小鼠	腹部局部照射, 暴露骨髓 5%	15.69	1.47 Gy/min	¹³⁷ Cs	3.5、4.5 d	DNA 损伤与细胞凋亡	LD70/30=15.69 Gy	[6]
8~10周龄	雄性 C57BL/6 小鼠	局部照射, 暴露骨髓 40%	14	70 cGy/min	X 射线	4、10 d	肠道功能及肠隐窝细胞的存活情况	存活率为 70%	[7]
8~10周龄	雄性 C57BL/6 小鼠	腹部局部照射, 暴露骨髓 5%	16	79.5 cGy/min	X 射线	10 d	存活率	致死剂量为 16 Gy, 照射后 10 d, 无存活	[7]
10~12周龄	雄性 C57BL/6 小鼠	全身照射	15	3.8 Gy/min	¹³⁷ Cs	3.5 d	肠隐窝细胞的存活和增殖	无数据	[8]
6~7周龄、体重22~25 g	雄性 C57BL/6 小鼠	全身照射	8~10	1.35 Gy/min	¹³⁷ Cs	4、6、8、10 d	肠道完整性	LD50/10=9.44 Gy	[9]
未提及	雄性 C57BL/6 小鼠	全身照射	2.0~10.4	236 cGy/min	¹³⁷ Cs	6 h, 1、3、5、10、20、25 d	肝脏、血浆标志物	无数据	[10]
6~8周龄	雄性 CD2F1 小鼠	全身照射	11	0.6 Gy/min	⁶⁰ Co	1、2、4、24 h	DNA 损伤、细胞凋亡和增殖	无数据	[11]
6~7周龄、体重22~25 g	雄性 CD2F1 小鼠	全身照射	9	1.35 Gy/min	¹³⁷ Cs	3.5、7、14 d	肠道完整性	LD50/30=9Gy	[12]
6~8周龄	雄性 CD2F1 小鼠	全身照射	11	0.6 Gy/min	⁶⁰ Co	3、13、14、17 d	细菌分类	LD50/30=9.2Gy	[13]
12~14周龄	雄性 CD2F1 小鼠	全身照射	10~12	0.6 Gy/min	⁶⁰ Co	12、24 h, 3.5、10、11 d	炎症、凋亡、菌群易位	致死剂量为10.5 Gy, 10 Gy 照射后存活 30%	[14]
12~13周龄	雄性 ICR 小鼠	全身照射	9	458 cGy/min	¹³⁷ Cs	2、5、9 d	凋亡、增殖、肠干细胞特性	致死剂量为9 Gy, 照射后 20 d, 无存活	[15]
6~12周龄	ICR nu/nu 小鼠	腹腔中移除肠	30	1.9 Gy/min	X 射线	13、27 d	溃疡和纤维化	无数据	[16]
未提及	NIH nu/nu	全身照射	10	7 Gy/min	¹³⁷ Cs	3 d	凋亡、增殖和抗氧化	无数据	[17]
体重 140~180 g	雄性 Wistar 大鼠	全身照射	6	0.46 Gy/min	¹³⁷ Cs	2、5 d	肠道完整性	无数据	[18]
8~12周龄、体重200~230 g	雄性 Wistar 大鼠	全腹照射	20	2.01 Gy/min	X 射线	14 d	菌群易位	无数据	[19]
体重 280~350 g	SD 大鼠	全腹照射	14	300 cGy/min	X 射线	1、3、5、7、14 d	炎症	无数据	[20]
体重 400~450 g	SD 大鼠	局部照射, 剑突下 5 cm×5 cm	15	1.75 Gy/min	X 射线	3、10、21 d	纤维化、肠干细胞	致死剂量为 15 Gy, 照射后 16d, 无存活	[21]
4.0~6.2 年龄、体重 4~7 kg	恒河猴	全身照射	6.7~7.4	60 cGy/min	⁶⁰ Co	4、7、12 d	肠上皮紧密连接	无数据	[22]

注: 表中, ICR: 美国癌症研究所; NIH: 美国国立卫生研究院; LD50/30、LD70/30、LD50/10 分别表示 30 d 内半数致死剂量、30 d 内 70%致死剂量、10 d 内半数致死剂量。

模拟肠道上皮细胞屏障, 以观察受照后的影响。

在体内实验中, 由于存在照射野、照射源和动物种类的差异, 不同的放射性损伤动物模型亦存在差异, 表 1 对部分放射引起的肠道损伤模型进行了总结。

2 放射性肠损伤的评价

2.1 一般健康状况观察

放射引起的急性胃肠道反应包括体重流失、腹泻, 严重的甚至导致脱水, 由于肠黏膜屏障受损最

终发展成为溃疡使其更容易受到感染。在一般健康状况的观察中,除了基本的生存率以外,体重和腹泻程度的观察是一般健康状况监控中需要密切关注的。从实验开始到结束,对所有的动物称重,体重流失超过15%,则被认为是病态的,若1d内体重减轻20%或表现出濒死的迹象,则给予安乐死。对于小鼠来说,濒死迹象的判断标准是:退回行为,体温降低,弓背,翘毛脱毛等。照射后的4~5d是发生腹泻的高峰期,24h内应多次检查小鼠状态^[7]。美国食品与药品监督管理局指出的除了生存率的指标外,另一个重要的观测指标是腹泻的严重程度,可采用腹泻评分来判断:0为正常粪便,1为失去形状的粪便,2为明显的痢疾,并伴有肛周的污秽,3为严重的痢疾或血便,伴有大量的尾部的污秽。在照射后4~10d的腹泻高峰期中,每天需进行两次腹泻评分,以保证对粪便的粘稠度评价的一致性^[23]。

2.2 肠道病理和纤维化观察

由于细胞凋亡和增殖抑制,在受照射几小时后,肠腔中的隐窝细胞出现死亡,隐窝和绒毛缩短。因此,病理学检测肠道样本中的隐窝数量和绒毛高度是放射性肠损伤评价中不可或缺的部分。小肠的横截面中具有强苏木精-伊红染色的隐窝细胞(不含潘氏细胞)数大于10个时,定义为一个幸存的隐窝,并以此记录存活的隐窝数量^[7]。幸存隐窝由于大小的多样性,可能受截面大小不同的影响。因此基于隐窝的宽度,引入尺寸校正因子以减小误差^[24]。一般参考以下公式:校正后的隐窝数量=(对照组隐窝宽度/照射组隐窝宽度)×存活的隐窝数量。

放射诱导肠上皮和内皮细胞损伤后,最显著的变化是促进肠道纤维化病变^[25],肠道纤维化也是放射引起的晚期肠道综合征的典型症状^[26]。为了观察肠道纤维化,除了需要苏木精-伊红染色外,还采用Masson染色,后者是胶原纤维染色中的权威而经典的技术方法。通过对组织中的纤维进行染色,观察受到放射损伤后的小肠纤维状增厚区域^[16]。

3 小肠隐窝细胞的增殖、凋亡特性及干细胞特性研究方案

3.1 增殖特性研究

3.1.1 增殖标志物的检测

由于受照后细胞增殖受到抑制,常需要对肠

道样本细胞进行增殖的检测。通常采用免疫组化法检测Ki67、磷酸化的组蛋白3、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)这3种经典的增殖抗原。Ki67是一种增殖细胞相关的核抗原,常用来标记处于增殖周期中的细胞^[11]。而且小肠中Ki67阳性的细胞还与小肠干细胞同样位于肠隐窝底部向上数+4的位置,也就是肠隐窝干细胞的位置,表征肠隐窝干细胞的增殖情况^[27]。磷酸化的组蛋白3的第10位丝氨酸作为常用的有丝分裂的标志物^[28],在放射引起的肠道损伤中用于标记处于有丝分裂的细胞。另一种标志物PCNA是DNA聚合酶 δ 的辅助因子^[11],控制真核生物DNA的复制和修复。小鼠受到照射后,肠隐窝细胞的增殖能力减弱,PCNA的表达完全消失,5-溴-2-脱氧尿苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)阳性细胞的数量也同时降低,表征着受照射后隐窝中细胞增殖受到了抑制^[17]。

3.1.2 微克隆分析法

Withers和Elkind于1970年最早描述了微克隆分析法,该方法用来评价受照射后小肠干细胞功能,并在随后的研究中被不断改良^[24]。通过在处死前2h腹腔注射BrdU,分离肠组织并固定后,针对BrdU进行免疫染色,结果具有5个或更多的相邻的BrdU阳性细胞即为一个幸存的隐窝,以肠的横截面周长(约0.5~1.0cm)作为单位长度,记录在单位横截面内幸存的隐窝数^[5,8]。

3.1.3 DNA损伤修复的标志物

放射诱导的肠损伤还与抑制DNA损伤修复能力有关,其影响了细胞周期的变化,抑制了细胞的复制。如果DNA没有得到及时修复,将导致受损的肠道细胞凋亡。典型的辐射诱导DNA双链断裂的修复取决于DNA损伤应答的激活,包括组蛋白H2AX的磷酸化和p53的磷酸化。此外,肠道对辐射的敏感性还与DNA修复基因乳腺癌易感基因1(BRCA1)、乳腺癌易感基因2(BRCA2)^[29]以及DNA损伤应答基因TP53^[30]和B淋巴细胞蛋白6有关^[31]。同时与DNA修复相关的RAD51、DNA依赖蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)、MTG16等标志物^[32],也是常见的辐射诱导的肠损伤检测指标。对于DNA损伤修复的标志物的检测,通常需要先对组织或者细胞进行固定,采用免疫组织荧光的方法,观察标志物的焦点,如典型的 γ H2AX焦点、

RAD51 焦点和 DNA-PKcs 焦点等^[33-34]。

3.2 细胞凋亡评价

放射引起小肠细胞损伤后, 肠细胞受损的 DNA 得不到及时的修复, 便会凋亡。对于凋亡肠组织的检测, 除了经典的末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸切口末端标记(TUNEL)法阳性凋亡细胞核检测^[17], 近年来还出现了一款新的酶联免疫吸附测定试剂盒, 可以定量判断 DNA 断裂情况^[35]。此外, 针对不同的细胞凋亡通路中的关键蛋白, 可采用免疫组化方法观察 Bcl-2 相关蛋白 X (Bax)、半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)、聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)等凋亡标志物的活化情况^[36]。

3.3 肠干细胞特性评价

肠隐窝底部向上数+4 位置处细胞常被定义为肠道干细胞, 肠道干细胞往往对辐射特别敏感, 其通常被分为静息和活化的肠干细胞。活化的肠上皮干细胞表达 G 蛋白偶联受体 5(LGR5)、Olfactomedin 4(Olfm4)、盾片基因同源复合体 2(Ascl2)、多梳蛋白家族 1(Bmi1)、小鼠端粒酶逆转录酶(mTERT)以及富含亮氨酸的重复序列和免疫球蛋白样结构域 1(Lrig1)等干细胞标志物^[37]。评价受照射后肠干细胞的活化情况时可采用免疫组化和谱系追踪的方法, 检测以上标志物。此外, 维持干细胞相关的如 Notch1、Wnt、信号转导和转录激活因子 5(STAT5)等信号通路的活化水平也纳入到细胞干性的研究方案中^[5, 37-38]。

4 肠黏膜屏障

肠黏膜屏障是人体内部环境与外部环境之间的最大屏障。据报道, 无菌小鼠与常规小鼠相比具有一定的辐射抗性, 这一现象也揭示了环境微生物与辐射抗性的潜在联系^[39]。肠上皮屏障保护机体免受环境微生物的攻击, 如果环境微生物穿过屏障, 则会引起黏膜炎症^[40]。此外, 照射剂量低至 1~2 Gy 时, 便会致肠道通透性增加, 肠黏膜屏障功能受损, 继而引起炎症和免疫失衡^[41]。

4.1 肠道完整性检测

关于肠道通透性的测定, 常借助肠道完整性的检测方法来完成。在体内实验中, 采用有荧光特性的化合物异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)与葡聚糖偶联作为标记物对照射后的动物进行灌胃, 如果肠道完整性受到损伤, 该标记物在回

肠处被吸收并进一步输送到肠系膜淋巴结而进入血液。通过在荧光分光光度计上绘制 FITC-葡聚糖标准曲线, 检测动物血液样本的荧光强度, 来评价肠道的完整性^[42]。

4.2 跨上皮电阻(trans-epithelial electrical resistance, TEER)

TEER 是反映紧密连接完整性的一个重要指标, 而紧密连接又是肠道上皮细胞之间重要的连接方式之一。紧密连接的主要功能是只允许离子及小分子可溶性物质通过, 不允许毒性大分子及微生物通过, 紧密连接在肠道屏障这种特殊的生理功能的维护中起着举足轻重的作用, 是阻止外源毒素和病原微生物等进入机体组织的重要物理屏障。

体外研究中常采用检测 TEER 来模拟检测肠道完整性^[43]。首先在 Tranwell 小室的上层, 培养 Caco-2 细胞呈致密的单细胞层, 模拟肠道上皮的紧密连接, 通过评价照射后小室内外电阻值来模拟检测肠道完整性。TEER 值的降低与紧密连接的改变直接相关, 所以常用 TEER 值的变化来反映紧密连接的完整性。

4.3 紧密连接蛋白

黏膜屏障的完整性取决于细胞连接复合中紧密连接蛋白的表达和相互作用。紧密连接通常由不同的元件构成, 包括跨膜蛋白(紧密连接蛋白家族、Occludin 家族、IgG 样家族连接黏附分子和Tricellulin)和细胞质蛋白(Zonula occludens 和 Cingulin), 细胞质蛋白又与跨膜蛋白锚定连接构成结合前肌动蛋白骨架^[22]。在不同剂量照射后的不同时间段, 可通过 Western blot 和 RT-PCR 方法对上述蛋白家族进行蛋白水平和转录水平检测分析, 或在体外通过 Caco-2 细胞模拟肠上皮紧密连接的致密单细胞层模型中, 通过免疫荧光法观察上述蛋白在细胞间的相互作用和分布情况。

4.4 细菌菌群和细菌易位率

在经单次腹部照射 12 h 后, 即发现肠道内细菌转移至肠系膜淋巴结^[44], 甚至心脏、脾脏、肝脏等其他组织中^[13]。转移到组织内的细菌往往会引起机体感染。由于完整的肠上皮屏障的存在, 肠道内的细菌往往不会易位到其他组织中^[45], 因此细菌易位率也是肠上皮屏障的重要检测指标之一。

为了更好地分离培养照射后体内不同组织中的细菌, 常在培养基中添加 5%的绵羊血作为补充。

在分析照射后细菌易位率时常采用适合革兰氏阳性菌和阴性菌的绵羊血琼脂平板评价肠道细菌易位情况。由于实验要求的不同,可采用利于革兰氏阳性菌生长的粘菌素琼脂平板和利于革兰氏阴性菌生长的木糖赖氨酸脱氧胆盐琼脂平板,或采用多种培养基配方如巧克力血琼脂培养基、CLED琼脂培养基、沙氏琼脂培养基等,进一步对菌群进行鉴定^[7,13]。

由于并不是所有的细菌都可以在血平板培养基上生长为菌落,因此需要采用更为灵敏的RT-PCR的方法对细菌易位率进行检测。首先通过在16S rRNA基因的V6-V8可变序列上进行细菌的通用引物设计(序列为968-F: 5'-AACGCGAAGAACCT-TAC-3'和R-1401: 5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'),然后通过RT-PCR检测经梯度稀释的细菌基因组DNA,并对细菌数目或基因组DNA质量进行量化处理,绘制标准曲线,再对照射后的组织样本进行基因组DNA提取后,通过RT-PCR检测,参考标准曲线计算单位重量组织中细菌的数目或基因组DNA质量^[9,12,46]。

4.5 血清检测

照射后,肠黏膜屏障通透性增加,细菌从肠道进入血液中,并释放大量的内毒素,引起内毒素血症和菌血症^[26,47],因此血清中的内毒素便成为内毒素血症的标志物。菌血症的标志物“原降钙素”在正常情况下由甲状腺产生,在出现菌血症时被其他实质细胞产生和分泌^[48],因此原降钙素也作为照射引起的菌血症的标志物^[9]来评价肠黏膜屏障通透性的变化。另一种标志物瓜氨酸是一种非DNA编码的氨基酸,同时也是小肠细胞中谷氨酰胺的代谢终产物。血清中循环的瓜氨酸浓度与肠上皮细胞数目呈正比,因此,采用液相层析串联质谱(LC-MS/MS)检测血清中的瓜氨酸可作为一种辐射诱导肠上皮流失的评价标准^[49-50]。

5 氧化应激和炎症

在受照射的组织中,细胞活力降低是因为照射后电离水产生的过量活性氧类(reactive oxygen species, ROS)激活细胞死亡信号。ROS包括受照射后胞内和线粒体内被激发的水产生的过氧化氢和超氧自由基。ROS诱导肠组织中的细胞凋亡,凋亡的细胞分泌促炎因子招募白细胞到受损的肠组织,在短时间内清除死亡细胞^[51]。

5.1 氧化应激检测

在照射后肠道氧化应激检测中最常用的是二氢二氯荧光黄双乙酸钠(dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)法。DCFH-DA本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜,进入细胞后可以被酯酶水解生成二氢二氯荧光黄(DCFH),而DCFH不能穿透细胞膜。细胞内的ROS可以氧化无荧光的DCFH生成有荧光的二氯荧光黄(DCF)。通过DCF的荧光检测评价组织或细胞内的ROS水平^[52]。

对于ROS的氧化系统,细胞内还有一套完整的还原系统与之对应。尤其是大分子抗氧化酶类,包括超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、金属硫蛋白和硫氧还蛋白,实验中还通过检测上述酶类的活性、转录水平和蛋白水平来评价辐射对引起肠道氧化应激的影响^[17,53]。

5.2 炎症检测

经典的炎症检测主要是采用酶联免疫吸附测定法和RT-PCR法检测某些细胞和炎症因子,如TNF- α ^[23]、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、I型干扰素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)^[54-55]、IL-4、IL-5、IL-10^[56]、IL-12、IL-18^[57]、转化生长因子 β (TGF- β)^[58]、角质蛋白因子、成纤维因子。这些炎症因子的转录调控往往受促炎症信号通路中转录因子核因子活化B细胞 κ 轻链增强子(NF- κ B)、信号转导和转录激活因子3(STAT3)以及其他相关炎症小体的活化影响,因此,NF- κ B、STAT3以及NOD样受体蛋白3、Caspase-1等也被引入辐射所引起的肠道炎症的评价中^[3,59]。

6 展望

辐射对肠道的损伤可引起急性或慢性放射性肠炎,产生如腹胀、恶心、腹泻和直肠出血等症状,严重影响患者的生活质量。值得注意的是,任何的单一症状其病因都可能是多因素的,这些因素包括肠狭窄、肠痿、新的肿瘤、肿瘤复发、小肠细菌过度生长、胆盐吸收不良、脂肪或碳水化合物吸收不良、新炎症性肠病、胰腺功能不全和过敏性肠综合征等。

正是由于放射性肠损伤病因的复杂性,因此科学研究的重点主要集中在受照后肠干细胞死亡引起的肠黏膜功能受损、内皮细胞损伤引起的腹泻、氧化压力增加引发的炎症反应、失衡的肠道

菌群和组织损伤导致的纤维化病变,以及肠道中的神经免疫平衡等方面^[60]。这些放射性肠损伤的研究方案日益完善,有利于对放射性肠损伤治疗和药物筛选工作提供指导,如针对肠干细胞的基因治疗、抗辐射引起细胞凋亡的药物研发、恢复受照患者的肠道菌群等。

虽然辐射诱导肠损伤的现象和机制日渐明朗,可是这些肠道损伤现象也可由除电离辐射外的其他因素引起,截至目前仍没有客观的标志物来评价辐射引起的肠损伤,更加灵敏、特异性的指标仍有待进一步的探索和研究。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展,不涉及任何利益冲突。

作者贡献声明 王津哈负责收集文献、撰写初稿;徐畅、王彦负责论文撰写指导;刘强负责论文修改、最终版本修订。

参 考 文 献

- [1] Walsh D. Deep Tissue Traumatism from Roentgen Ray Exposure[J]. *H Br Med J*, 1897, 2(1909): 272-273.
- [2] Denham JW, Hauer-Jensen M, Peters LJ. Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 50(5): 1105-1106. DOI:10. 1016/S0360-3016(01)01556-5.
- [3] Kiang JG, Jiao W, Cary LH, et al. Wound trauma increases Radiation-Induced mortality by activation of iNOS pathway and elevation of cytokine concentrations and bacterial infection [J]. *Radiat Res*, 2010, 173(3): 319-332. DOI: 10. 1667/RR1892. 1.
- [4] Kobayashi M, Nakamura K, Cornforth M, et al. Role of M2b macrophages in the acceleration of bacterial translocation and subsequent sepsis in mice exposed to whole body [¹³⁷Cs] γ -irradiation [J]. *J Immunol*, 2012, 189(1): 296-303. DOI: 10.4049/jimmunol. 1200350.
- [5] Sureban SM, May R, Qu D, et al. Dietary Pectin Increases Intestinal Crypt Stem Cell Survival following Radiation Injury[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135561 [2016-11-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=26270561>. DOI: 10.1371/journal.pone. 0135561.
- [6] Patil R, Szabó E, Fells JI, et al. Combined mitigation of the gastrointestinal and hematopoietic acute radiation syndromes by an LPA2 receptor-specific nonlipid agonist[J]. *Chem Biol*, 2015, 22(2): 206-216. DOI: 10. 1016/j. chembiol. 2014. 12. 009.
- [7] Booth C, Tudor G, Tudor J, et al. Acute gastrointestinal syndrome in high-dose irradiated mice[J]. *Health Phys*, 2012, 103(4): 383-399.
- [8] George RJ, Sturmoski MA, May R, et al. Loss of p21Waf1/Cip1/Sdi1 enhances intestinal stem cell survival following radiation injury[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(2): G245-G254. DOI: 10. 1152/ajpgi. 00021. 2008.
- [9] Biju PG, Garg S, Wang W, et al. Procalcitonin as a predictive biomarker for total body irradiation-induced bacterial load and lethality in mice[J]. *Shock*, 2012, 38(2): 170-176. DOI: 10. 1097/SHK. 0b013e31825b2db3.
- [10] Ó Broin P, Vaitheesvaran B, Saha S, et al. Intestinal microbiota-derived metabolomic blood plasma markers for prior radiation injury[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2015, 91(2): 360-367. DOI: 10. 1016/j. ijrobp. 2014. 10. 023.
- [11] Singh VK, Singh PK, Wise SY, et al. Radioprotective properties of tocopherol succinate against ionizing radiation in mice[J]. *J Radiat Res*, 2013, 54(2): 210-220. DOI: 10. 1093/jrr/rrs088.
- [12] Burnett AF, Biju PG, Lui H, et al. Oral interleukin 11 as a countermeasure to lethal total-body irradiation in a murine model [J]. *Radiat Res*, 2013, 180(6): 595-602. DOI: 10. 1667/RR13330. 1.
- [13] Singh VK, Wise SY, Fatanmi OO, et al. Progenitors mobilized by gamma-tocotrienol as an effective radiation countermeasure[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e114078 [2016-11-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25423021>. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0114078.
- [14] Li XH, Ghosh SP, Ha CT, et al. Delta-tocotrienol protects mice from radiation-induced gastrointestinal injury[J]. *Radiat Res*, 2013, 180(6): 649-657. DOI: 10. 1667/RR13398. 1.
- [15] Kantara C, Moya SM, Houchen CW, et al. Novel regenerative peptide TP508 mitigates radiation-induced gastrointestinal damage by activating stem cells and preserving crypt integrity [J]. *Lab Invest*, 2015, 95(11): 1222-1233. DOI: 10. 1038/labinvest. 2015. 103.
- [16] Kudo K, Liu Y, Takahashi K, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to prevent radiation-induced intestinal injury in mice[J]. *J Radiat Res*, 2010, 51(1): 73-79. DOI: 10. 1269/jrr. 09091.
- [17] Medina VA, Croci M, Mohamad NA, et al. Mechanisms underlying the radioprotective effect of histamine on small intestine[J]. *Int J Radiat Biol*, 2007, 83(10): 653-663. DOI:10. 1080/09553000701570238.
- [18] El-Ghazaly MA, El-Hazek RM, Khayyal MT. Protective effect of the herbal preparation, STW 5, against intestinal damage induced by gamma radiation in rats[J]. *Int J Radiat Biol*, 2015, 91(2): 150-156. DOI: 10. 3109/09553002. 2014. 954059.
- [19] Seal M, Naito Y, Barreto R, et al. Experimental radiotherapy-induced enteritis: a probiotic interventional study[J]. *J Dig Dis*, 2007, 8(3): 143-147. DOI: 10. 1111/j. 1443-9573. 2007. 00301. x.
- [20] Chen H, Min XH, Wang QY, et al. Pre-activation of mesenchymal stem cells with TNF-alpha, IL-1beta and nitric oxide enhances its paracrine effects on radiation-induced intestinal injury[J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8718 [2016-11-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=25732721>. DOI: 10. 1038/srep08718.
- [21] Chang P, Qu Y, Liu Y, et al. Multi-therapeutic effects of human adipose-derived mesenchymal stem cells on radiation-induced intestinal injury[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e685 [2016-11-29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=23788042>. DOI: 10. 1038/cddis. 2013. 178.

- [22] Garg S, Zheng J, Wang J, et al. Segmental Differences in Radiation-Induced Alterations of Tight Junction-Related Proteins in Non-Human Primate Jejunum, Ileum and Colon[J]. *Radiat Res*, 2016, 185(1): 50–59. DOI: 10.1667/RR14157.1.
- [23] Tung D, Cheung PH, Wilson J, et al. Differential effects of cyclosporin and etanercept treatment on various pathologic parameters in a murine model of irradiation-induced mucositis[J]. *Curr Ther Res Clin Exp*, 2012, 73(4–5): 150–164. DOI: 10.1016/j.curtheres.2012.06.002.
- [24] Potten CS, Rezvani M, Hendry JH, et al. The correction of intestinal microcolony counts for variation in size[J]. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 1981, 40(3): 321–326.
- [25] Langberg CW, Sauer T, Reitan JB, et al. Relationship between intestinal fibrosis and histopathologic and morphometric changes in consequential and late radiation enteropathy[J]. *Acta Oncol*, 1996, 35(1): 81–87.
- [26] Ferreira MR, Muls A, Dearnaley DP, et al. Microbiota and radiation-induced bowel toxicity: lessons from inflammatory bowel disease for the radiation oncologist[J/OL]. *The Lancet Oncology*, 2014, 15 (3): e139–e147 [2016–11–29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24599929>. DOI: 10.1016/s1470-2045(13)70504-7.
- [27] van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium[J/OL]. *Annu Rev Physiol*, 2009, 71:241–260[2016–11–29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18808327>. DOI: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145.
- [28] Hans F, Dimitrov S. Histone H3 phosphorylation and cell division [J]. *Oncogene*, 2001, 20(24): 3021–3027.
- [29] Ernestos B, Nikolaos P, Koulis G, et al. Increased chromosomal radiosensitivity in women carrying BRCA1/BRCA2 mutations assessed with the G2 assay[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 76(4): 1199–1205. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.10.020.
- [30] Mazzatti DJ, Lee YJ, Helt CE, et al. p53 modulates radiation sensitivity independent of p21 transcriptional activation[J]. *Am J Clin Oncol*, 2005, 28(1): 43–50.
- [31] Margalit O, Amram H, Amariglio N, et al. BCL6 is regulated by p53 through a response element frequently disrupted in B-cell non-Hodgkin lymphoma[J]. *Blood*, 2006, 107(4): 1599–1607. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1629.
- [32] Poindexter SV, Reddy VK, Mittal MK, et al. Transcriptional corepressor MTG16 regulates small intestinal crypt proliferation and crypt regeneration after radiation-induced injury[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 308(6): G562–G571. DOI: 10.1152/ajpgi.00253.2014.
- [33] Hua G, Thin TH, Feldman R, et al. Crypt base columnar stem cells in small intestines of mice are radioresistant[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(5): 1266–1276. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.07.10.
- [34] Kim SB, Pandita RK, Eskiocak U, et al. Targeting of Nrf2 induces DNA damage signaling and protects colonic epithelial cells from ionizing radiation[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109 (43): E2949–E2955[2016–11–29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3491493/>. DOI: 10.1073/pnas.1207718109.
- [35] Li M, Gu Y, Ma YC, et al. Kruppel-Like Factor 5 Promotes Epithelial Proliferation and DNA Damage Repair in the Intestine of Irradiated Mice[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(12): 1458–1468. DOI: 10.7150/ijbs.13444.
- [36] Inagaki-Ohara K, Takamura N, Yada S, et al. Radiation-induced crypt intestinal epithelial cell apoptosis in vivo involves both caspase-3-dependent and -independent pathways[J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47(12): 2823–2830.
- [37] Gilbert S, Nivarthi H, Mayhew CN, et al. Activated STAT5 confers resistance to intestinal injury by increasing intestinal stem cell proliferation and regeneration[J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4(2): 209–225. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.12.004.
- [38] Tao S, Tang D, Morita Y, et al. Wnt activity and basal niche position sensitize intestinal stem and progenitor cells to DNA damage[J]. *EMBO J*, 2015, 34(5): 624–640. DOI: 10.15252/embj.201490700.
- [39] McLaughlin MM, Dacquoise MP, Jacobus DP, et al. Effects of the Germfree State on Responses of Mice to Whole-Body Irradiation[J]. *Radiat Res*, 1964, 23: 333–349.
- [40] Cario E. Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2[J]. *Mucosal Immunol*, 2008, 1 Suppl 1: S62–S66. DOI: 10.1038/mi.2008.47.
- [41] Barnett GC, West CM, Dunning AM, et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(2): 134–142. DOI: 10.1038/nrc2587.
- [42] Matthews MA, Watkins D, Darbyshire A, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor(HB-EGF) protects the intestines from radiation therapy-induced intestinal injury[J]. *J Pediatr Surg*, 2013, 48(6): 1316–1322. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2013.03.030.
- [43] Moyes SM, Killick EM, Morris JF, et al. Changes produced by external radiation in parameters influencing intestinal permeability and microparticle uptake in vitro[J]. *Int J Radiat Biol*, 2008, 84(6): 467–486. DOI: 10.1080/09553000802078388.
- [44] Guzman-Stein G, Bonsack M, Liberty J, et al. Abdominal radiation causes bacterial translocation[J]. *J Surg Res*, 1989, 46(2): 104–107.
- [45] Deitch EA, Berg R. Bacterial translocation from the gut: a mechanism of infection[J]. *J Burn Care Rehabil*, 1987, 8(6): 475–482.
- [46] van Minnen LP, Timmerman HM, Lutgendorff F, et al. Modification of intestinal flora with multispecies probiotics reduces bacterial translocation and improves clinical course in a rat model of acute pancreatitis[J]. *Surgery*, 2007, 141(4): 470–480. DOI: 10.1016/j.surg.2006.10.007.
- [47] Johannsen U, Koch F, Mehlhorn G, et al. Pathomorphology and pathogenesis of radiation sickness in calves and young cattle following whole body roentgen irradiation[J]. *Arch Exp Veterinarmed*, (下转第 44 页)

- [26] Hille A, Schmidberger H, Hermann RM, et al. A phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of misoprostol rectal suppositories to prevent acute radiation proctitis in patients with prostate cancer[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 63(5): 1488–1493. DOI:10. 1016/j. ijrobp. 2005. 05. 063.
- [27] O'Brien PC, Franklin CI, Dear KB, et al. A phase III double-blind randomised study of rectal sucralfate suspension in the prevention of acute radiation proctitis[J]. *Radiother Oncol*, 1997, 45(2): 117–123. DOI: 10.1016/S0167-8140(97)00146-1.
- [28] Hovdenak N, Sørbye H, Dahl O. Sucralfate does not ameliorate acute radiation proctitis: randomised study and meta-analysis[J]. *Clin Oncol(R Coll Radiol)*, 2005, 17(6): 485–491. DOI: 10. 1016/j. clon. 2005. 04. 011.
- [29] Kneebone A, Mameghan H, Bolin T, et al. Effect of oral sucralfate on late rectal injury associated with radiotherapy for prostate cancer:A double-blind, randomized trial[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 60(4): 1088–1097. DOI:10. 1016/j. ijrobp. 2004. 04. 033.
- [30] Reiff C, Kelly D. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy[J]. *Int J Med Microbiol*, 2010, 300(1): 25–33. DOI: 10. 1016/j. ijmm. 2009. 08. 004.
- [31] Fuccio L, Guido A, Eusebi LH, et al. Effects of probiotics for the prevention and treatment of radiation-induced diarrhea[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2009, 43(6): 506–513. DOI: 10. 1097/MCG. 0b013e3181a1f59c.
- [32] Fuccio L, Guido A, Andreyev HJ. Management of intestinal complications in patients with pelvic radiation disease[J/OL]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2012, 10(12): 1326–1334. e4[2016–10–20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22858731>. DOI: 10. 1016/j. cgh. 2012. 07. 017.

(收稿日期: 2016–10–29)

(上接第 39 页)

- 1978, 32(4): 623–654.
- [48] Nakamura A, Wada H, Ikejiri M, et al. Efficacy of procalcitonin in the early diagnosis of bacterial infections in a critical care unit[J]. *Shock*, 2009, 31(6): 586–591. DOI:10. 1097/SHK. 0b013e31819716fa.
- [49] Lutgens L, Lambin P. Biomarkers for radiation-induced small bowel epithelial damage:An emerging role for plasma Citrulline[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(22): 3033–3042. DOI: 10. 3748/wjg. v13. i22. 3033.
- [50] Jones JW, Scott AJ, Tudor G, et al. Identification and Quantitation of Biomarkers for Radiation-Induced Injury via Mass Spectrometry [J]. *Health phys*, 2014, 106(1): 106–119. DOI: 10. 1097/HP. 0b013e3182a4ed3b.
- [51] Johnson LB, Riaz AA, Adawi D, et al. Radiation enteropathy and leucocyte-endothelial cell reactions in a refined small bowel model [J/OL]. *BMC Surg*, 2004, 4: 10[2016–11–29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=15363103>. DOI: 10. 1186/1471-2482-4-10.
- [52] Hatoum OA, Binion DG, Phillips SA, et al. Radiation induced small bowel "web" formation is associated with acquired microvascular dysfunction[J]. *Gut*, 2005, 54(12): 1797–1800. DOI: 10. 1136/gut. 2005. 073734.
- [53] Haton C, François A, Vandamme M, et al. Imbalance of the antioxidant network of mouse small intestinal mucosa after radiation exposure[J]. *Radiat Res*, 2007, 167(4): 445–453. DOI:10. 1667/rr0581. 1.
- [54] Schaub D, Kachikwu EL, McBride WH. Cytokines in radiobiological responses: a review[J]. *Radiat Res*, 2012, 178(6): 505–523. DOI: 10. 1667/rr3031. 1.
- [55] Hao S, Baltimore D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3): 281–288. DOI:10. 1038/ni. 1699.
- [56] Han SK, Song JY, Yun YS, et al. Effect of gamma radiation on cytokine expression and cytokine-receptor mediated STAT activation [J]. *Int J Radiat Biol*, 2006, 82(9): 686–697. DOI: 10. 1080/09553000600930699.
- [57] Shan YX, Jin SZ, Liu XD, et al. Ionizing radiation stimulates secretion of pro-inflammatory cytokines:dose-response relationship, mechanisms and implications[J]. *Radiat Environ Biophys*, 2007, 46(1): 21–29. DOI: 10. 1007/s00411-006-0076-x.
- [58] Hneino M, François A, Buard V, et al. The TGF- β /Smad repressor TG-interacting factor 1(TGIF1) plays a role in radiation-induced intestinal injury independently of a Smad signaling pathway[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e35672[2016–11–29]. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0035672.
- [59] Ng GZ, Menheniott TR, Every AL, et al. The MUC1 mucin protects against *Helicobacter pylori* pathogenesis in mice by regulation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Gut*, 2016, 65(7): 1087–1099. DOI: 10. 1136/gutjnl-2014-307175.
- [60] Chang PY, Qu YQ, Wang J, et al. The potential of mesenchymal stem cells in the management of radiation enteropathy[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1840[2016–11–29]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247725>. DOI: 10. 1038/cddis. 2015. 189.

(收稿日期: 2016–11–29)