

·论著·

# KGF 对电离辐射后十二指肠中 *CTGF* 和 *Bcl-2* 基因表达的影响

原雅艺 任越 张睿凤 刘红艳 董娟聪 张忠新 左雅慧

030006 太原, 中国辐射防护研究院放射医学与环境医学所

通信作者: 左雅慧, Email: yahuiz@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2017.02.006

**【摘要】** 目的 观察角质细胞生长因子(KGF)对电离辐射后十二指肠结缔组织生长因子(*CTGF*)、凋亡相关基因 *Bcl-2* 表达的影响, 初步探讨 KGF 在肠道损伤中的分子机制。方法 将昆明小鼠按随机数表法分为对照组、照射组、治疗组, 每组 10 只。对照组不给予照射, 照射组与治疗组给予剂量率为 0.678 Gy/min、吸收剂量 8 Gy 的腹腔  $\gamma$  射线照射; 治疗组在照射前 2 d 及照射后 3 d 均腹腔注射 KGF, 给药量为 6 mg/kg。照射后第 15 天处死小鼠, 取十二指肠组织做病理切片并观察病理表现; 采用荧光定量 PCR 方法检测十二指肠组织中 *KGF*、*CTGF* 及 *Bcl-2* 基因的表达水平。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示; 两组间差异采用独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。**结果** 对照组十二指肠肠绒毛、隐窝结构完整, 排列整齐; 照射组十二指肠出现绒毛萎缩、变短或脱落, 部分腺窝和绒毛处可见少量凋亡细胞; 治疗组肠绒毛组织结构完整, 腺窝可见少量凋亡细胞。照射组十二指肠组织中 *KGF*、*CTGF*、*Bcl-2* 基因表达量上调, 与对照组相比差异具有统计学意义( $t = -125.55$ 、 $-6.55$ 、 $-6.69$ , 均  $P < 0.05$ )。与照射组相比, 治疗组 *CTGF* 基因表达量显著下调、*Bcl-2* 基因表达量显著上调, 差异均有统计学意义( $t = 4.89$ 、 $-20.96$ , 均  $P < 0.05$ )。**结论** KGF 可能通过下调 *CTGF* 基因修复电离辐射造成的损伤, 并且可能通过调节 *Bcl-2* 凋亡相关基因的表达水平来降低细胞凋亡。

**【关键词】** 辐射, 电离; 基因, *bcl-2*; 结缔组织生长因子; 角质细胞生长因子; 放射性肠损伤

基金项目: 太原市小店区科技项目(201401S08)

The influence of KGF on *CTGF* and *Bcl-2* gene in duodenal tissue induced by radiation Yuan

Yayi, Ren Yue, Zhang Ruifeng, Liu Hongyan, Dong Juancong, Zhang Zhongxin, Zuo Yahui

Department of Radiological and Environmental, China Institute for Radiation Protection, Taiyuan 030006, China

Corresponding author: Zuo Yahui, Email: yahuiz@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of keratinocyte growth factor(KGF) on connective tissue growth factor(*CTGF*) and B-cell lymphoma 2(*Bcl-2*) gene expressions in radiation-induced duodenal tissue, and to investigate the molecular mechanism of KGF in radiation-induced intestinal injuries. **Methods** Using the stochastic indicator method, Kunming mice were randomly divided into control, radiation, and treatment groups, each with 10 mice. The control group did not undergo the radiation process. The radiation group and treatment group underwent abdominal cavity irradiation with a dose rate of 0.678 Gy/min and an absorbed dose of 8 Gy with  $\gamma$ -ray. For 2 d before and 3 d after irradiation, KGF with a dose of 6 mg/kg was administered via intraperitoneal injection to the KGF treatment group. All mice were executed 15 d after irradiation, after which the duodenal tissue pathological slices were captured. Quantitative polymerase chain reaction was used to detect the *KGF*, *CTGF*, and *Bcl-2* gene relative expressions in duodenal tissue. The measurement data were  $\bar{x} \pm s$ . The two groups were compared using independent samples *t*-test, and  $P < 0.05$  indicated that the difference was statistically significant. **Results** For the control group, the duodenum intestinal villus and crypt structure were complete. For the radiation group, villi atrophy was shorter or fell off, and parts of the crypt and villi were observed in few apoptotic cells. For the treatment group, the organizational structure was complete, and a small amount of crypt can

be seen in apoptotic cells. Compared with the control group, *KGF*, *CTGF*, and *Bcl-2* gene expressions significantly increased after irradiation ( $t=-125.55, -6.55, -6.69$ , all  $P<0.05$ ). Compared with the radiation group, the gene expression of *CTGF* was significantly down-regulated ( $t=4.89, P<0.05$ ), and that of *Bcl-2* was significantly up-regulated in the treatment group ( $t=-20.96, P<0.05$ ). **Conclusions** The model of acute radioactive duodenitis was successfully established. *KGF* repair damage was caused by ionizing radiation through down-regulating *CTGF* gene, and reduce apoptosis was caused by the regulation of the expression levels of the apoptosis-related *Bcl-2* gene.

**【Key words】** Radiation, ionizing; Gene, *bcl-2*; Connective tissue growth factor; Keratinocyte growth factor; Radiation enteritis

**Fund program:** Taiyuan-xiaodian Technology Projects(201401S08)

放射性肠损伤(radiation enteritis, RE)是盆腔、腹腔等肿瘤进行放疗后常见的并发症,肠道正常组织对射线的耐受性较肿瘤组织差,放疗可造成正常组织的放射性损伤,形成RE,其发生率可达5%~17%<sup>[1-2]</sup>。RE的发病机制复杂,目前仍无有效的临床治疗手段。角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)从属于成纤维细胞生长因子家族(FGFs),参与组织器官发育、促进细胞分化、增殖及创伤愈合<sup>[3]</sup>,具有抗凋亡作用,在肿瘤的发生、发展中起重要作用<sup>[4]</sup>。研究表明,KGF预防给药可以明显降低辐射引起的小肠组织损伤<sup>[5]</sup>。而关于电离辐射作用后对小鼠十二指肠组织*KGF*基因是否有影响以及*KGF*对十二指肠放射损伤修复的分子机制还需进一步研究。我们通过研究电离辐射作用后小鼠十二指肠组织*KGF*表达的变化及其对电离辐射作用后结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)基因和凋亡相关基因*Bcl-2*表达的影响,进一步揭示*KGF*在防治RE中的分子机制,为其预防及治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

*KGF* (重庆富进生物医药有限公司);动物组织总RNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);Prime Scrip™ RT reagent Kit 和 SYBR® Premix Ex Taq™ II 实时荧光定量PCR试剂(大连宝生物工程有限公司)。<sup>60</sup>Co治疗机(GWGP-80,中国核动力研究院)。

### 1.2 实验动物分组及处理

SPF级昆明小鼠,雌雄各半,6~8周龄,体重26~28 g,购于中国食品药品检定研究院国家啮齿类实验动物种子中心,生产许可证号:SCXK(京)2014-0013,饲养于中国辐射防护研究院GLP

中心动物实验室。

将实验动物按照随机数表法分为对照组、照射组和治疗组,每组10只,雌雄各半。治疗组于照射前2 d及照射后3 d腹腔注射*KGF*,给药剂量为6 mg/kg,对照组和照射组仅注射生理盐水。

### 1.3 动物照射

对照组不给予照射,照射组与治疗组均接受腹腔8 Gy照射。照射源为<sup>60</sup>Co治疗机,照射野为全腹(胸骨剑突至耻骨联合),源皮距80 cm,剂量率为0.678 Gy/min。

### 1.4 病理切片的制作

照射后第15天,将各实验组小鼠空腹12 h后颈椎脱臼处死,解剖小鼠取出完整的十二指肠组织,4%甲醛溶液固定1周后,经无水乙醇脱水、石蜡包埋后制作RE病理切片,苏木精-伊红染色法进行染色。

### 1.5 实时荧光定量PCR检测

完整的十二指肠组织加入裂解液研磨,提取总RNA,反转录cDNA,利用实时荧光定量PCR分析*KGF*对*CTGF*、*Bcl-2*基因mRNA表达水平的影响。对照组基因表达量为1,以 $\Delta\Delta Ct$ 法进行相对定量分析各个基因mRNA水平。

### 1.6 统计学处理

实验数据采用统计学分析软件IBM SPSS Statistics V21.0进行分析。计量资料符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示;两组间差异采用独立样本*t*检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 病理结果

光镜下观察,对照组十二指肠肠绒毛、隐窝结构完整,排列整齐(图1中A);照射组十二指肠病



图1 电离辐射诱导小鼠肠道损伤的十二指肠病理切片图(苏木精-伊红染色,  $\times 200$ ) 图中, A: 对照组; B: 照射组; C: 治疗组  
Fig.1 Pathological section of duodenal injury induced by ionizing radiation in mice (hematoxylin-eosin staining,  $\times 200$ )

理结果出现绒毛萎缩、变短或脱落, 肠腔内充满坏死脱落的组织, 腺窝可见较多凋亡细胞(图1中B); 治疗组肠绒毛组织结构完整, 腺窝可见少量凋亡细胞(图1中C), 这表明 KGF 能够有效减少放射性损伤。

## 2.2 电离辐射对小鼠自身 KGF 基因 mRNA 表达水平的影响

KGF 有修复受损黏膜的功能, 我们利用 8 Gy  $\gamma$  射线照射小鼠腹腔后, 十二指肠组织中 KGF 基因表达量显著增高, 是对照组的 38 倍(图2), 差异有统计学意义( $t=-125.55$ ,  $P<0.05$ ), 这表明机体通过 KGF 的高表达来修复电离辐射造成的损伤。

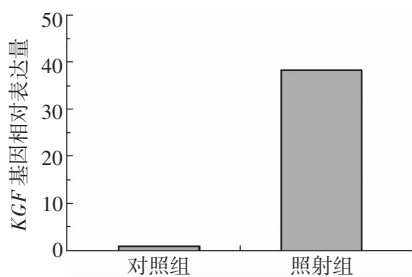


图2  $\gamma$  射线照射对小鼠十二指肠组织 KGF 基因 mRNA 表达水平的影响( $n=10$ ) 图中, 照射组与对照组比较,  $t=-125.55$ ,  $P<0.05$ ; KGF: 角质细胞生长因子。

Fig.2 Effect of KGF mRNA expression levels in duodenal injury induced by  $\gamma$ -ray ( $n=10$ )

## 2.3 KGF 对小鼠十二指肠 CTGF 基因的影响

电离辐射可进一步通过炎性相关因子引起肠上皮细胞的损伤, 治疗组 CTGF 基因表达与照射组相比显著下调, 差异有统计学意义( $t=4.89$ ,  $P<0.05$ ); 但照射组、治疗组中 CTGF 基因表达量均高于对照组, 差异有统计学意义( $t=-6.55$ ,  $-3.10$ , 均  $P<0.05$ ), 结果见图3。

## 2.4 KGF 对小鼠十二指肠 Bcl-2 基因的影响

利用荧光定量 PCR 检测凋亡相关基因 Bcl-2, 结果显示, KGF 给药后凋亡相关基因 Bcl-2 表达量与照

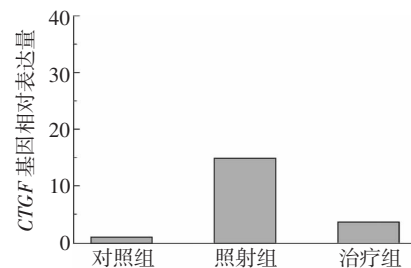


图3 KGF 对小鼠十二指肠 CTGF 基因 mRNA 表达水平的影响( $n=10$ ) 图中, 治疗组与照射组比较,  $t=4.89$ ,  $P<0.05$ ; 照射组、治疗组分别与对照组比较,  $t=-6.55$ ,  $-3.10$ , 均  $P<0.05$ ; KGF: 角质细胞生长因子; CTGF: 结缔组织生长因子。

Fig.3 Effects of KGF on expression of CTGF gene mRNA in duodenum ( $n=10$ )

射组相比显著上调, 差异有统计学意义( $t=-20.96$ ,  $P<0.05$ ), 且照射组与治疗组中 Bcl-2 基因表达量均显著高于对照组( $t=-6.69$ ,  $-40.65$ , 均  $P<0.05$ ), 这表明 KGF 对细胞凋亡起到了抑制作用, 结果见图4。

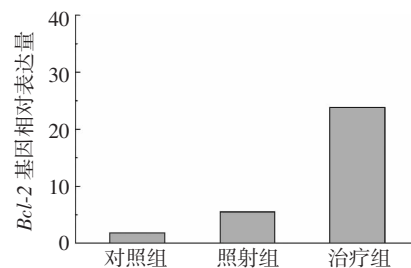


图4 KGF 对小鼠十二指肠 Bcl-2 基因 mRNA 表达水平的影响( $n=10$ ) 图中, 治疗组与照射组比较,  $t=-20.96$ ,  $P<0.05$ ; 照射组、治疗组分别与对照组比较,  $t=-6.69$ ,  $-40.65$ , 均  $P<0.05$ ; KGF: 角质细胞生长因子; Bcl-2: 凋亡相关基因。

Fig.4 Effects of KGF on expression of Bcl-2 gene mRNA in duodenum ( $n=10$ )

## 3 讨论

KGF 从属于成纤维细胞生长因子(FGFs)家族, 又称 FGF-7, 参与组织器官发育、促进上皮细胞生

长增殖及创伤愈合、具有抗凋亡作用,在肿瘤的发生、发展中起重要作用<sup>[3-4]</sup>。通常 KGF 在损伤修复过程中大量表达,外用能有效地促进创面再上皮化<sup>[6]</sup>。我们检测了电离辐射照射后小鼠十二指肠组织中 KGF 基因 mRNA 表达水平,结果显示,电离辐射能够诱导实验动物自身 KGF 基因表达水平显著升高,这是因为在辐射刺激下,成纤维细胞通过分泌 KGF 促进细胞的增殖、迁移以及黏膜上皮细胞的再生,以减轻放射损伤。Krishnan 等<sup>[7]</sup>给予葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的肠道损伤小鼠 KGF 治疗,显微镜下也观察到隐窝完整、上皮轻度缺损以及炎症浸润减轻,说明 KGF 具有改善和缓解溃疡,减轻损伤的功效。同时,我们通过病理切片能够观察到,给予 KGF 的治疗组肠绒毛组织结构完整,而照射组肠绒毛萎缩、变短、脱落明显,这也说明 KGF 能够有效降低放射性损伤,进一步揭示 KGF 在放射性十二指肠损伤防护作用中的分子机制。

CTGF 通过激活 Ras/Raf/ERK 等信号通路进一步促进成纤维细胞分裂增殖及胶原沉积,最终促进纤维化的发生与发展<sup>[8]</sup>。CTGF 同时具有诱导凋亡的作用,还可以专一介导转化因子  $\beta 1$  的促纤维化作用<sup>[9-10]</sup>。有文献报道,CTGF 作为介导转化因子  $\beta 1$  的下游效应介质,在生理状态下几乎不表达,而在肺纤维化过程中表达明显升高,且与肺纤维化程度呈正相关<sup>[11]</sup>。同时 CTGF 还可以通过自分泌的方式增强肠道肌纤维母细胞的活化,引起辐射剂量依赖的胶原合成增加促进纤维化<sup>[12]</sup>。从研究结果发现,电离辐射能够诱导 CTGF 基因相对表达量升高,而 KGF 治疗组与照射组相比,CTGF 基因表达显著下调,说明 KGF 能够有效抑制肠损伤的纤维化进程,对 RE 起到有效的防护作用。刘小菁等<sup>[13]</sup>利用 RNA 干扰技术来抑制 CTGF 基因的表达,发现能够明显抑制人肺成纤维细胞的增殖及表型转化。通常在生理状态下,CTGF 几乎不表达,而在纤维化过程中其表达水平明显增高,且与纤维化程度呈正相关<sup>[11,14]</sup>,而抑制 CTGF 的表达能阻止纤维化系列反应进程<sup>[15-16]</sup>。因此,CTGF 的表达水平能够有效地反映 KGF 对肠损伤的修复情况。

正常肠上皮细胞存在凋亡现象,通过清除衰老细胞来维持上皮的完整性,是肠上皮细胞更新的生理过程<sup>[17]</sup>。Bcl-2 基因是重要的凋亡相关基因,能够抑制或阻断多种因素引起的细胞凋亡。本研究结

果显示, $\gamma$  射线照后 15 d 小鼠十二指肠组织 Bcl-2 基因表达显著升高,这可能是由于细胞进入恢复期,细胞凋亡逐渐降低导致的。病理结果也显示,照射组肠绒毛处可见凋亡细胞,通过高表达 Bcl-2 基因来抑制凋亡。KGF 具有抗凋亡的作用,可通过抑制凋亡相关因子的表达和增加 Bcl-2 的表达来减少细胞凋亡。Wildhaber 等<sup>[18]</sup>研究 KGF 对凋亡的作用,发现营养缺乏致肠上皮细胞凋亡的小鼠中,KGF 降低了细胞的凋亡,且上调了 Bcl-2 mRNA 的表达。同时我们发现,治疗组与照射组相比,Bcl-2 基因表达显著上调,同时,光镜下观察治疗组只可见少量凋亡细胞,这主要是由于 KGF 对凋亡的抑制作用造成的。

综上所述,KGF 能够有效降低生物放射性损伤,并可能通过下调 CTGF 基因修复电离辐射造成的损伤,通过调节凋亡相关基因 Bcl-2 的表达水平来降低细胞凋亡。我们认为 KGF 可减轻辐射引起的肠损伤,在 RE 防护中起到了一定作用,提示 KGF 有望成为新的放射防护药物,为 RE 的预防及治疗提供了实验依据,但深入的分子机制仍需进一步研究。

**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** 原雅艺负责主要实验的实施、数据分析及论文撰写、修订;任越、张睿凤负责病理实验;刘红艳、董娟聪、张忠新负责基因相关实验;左雅慧负责研究命题的提出、实验设计等。

## 参 考 文 献

- [1] 董凯,毕伟.放射性肠炎并发肠梗阻的外科治疗[J].中国临床实用医学,2008,2(11):35-36.  
Dong K, Bi W. Radioactive enteritis concurrent intestinal obstruction surgical treatment[J]. Chin Clin Prac Med, 2008, 2(11): 35-36.
- [2] Leadon SA. Repair of DNA Damage Produced by Ionizing Radiation: A Minireview[J]. Semin Radiat Oncol, 1996, 6(4): 295-305. DOI: 10.1053/SRA000600295.
- [3] 于程程,贾春娥,陈风华,等.细胞因子在急性放射病治疗中研究进展[J].中国职业医学,2012,39(5):437-439.  
Yu CC, Jia CE, Chen FH, et al. Study progress of cytokines in treatment of acute radiation sickness[J]. Chin Occupational Med, 2012, 39(5): 437-439.
- [4] 单菲. KGF 在成纤维细胞促进表皮细胞增殖作用中的研究[D]. 济南:山东大学,2011.  
Shan F. The study on fibroblasts promoting epidermis cells

- proliferation by KGF[D]. Jinan: Shandong University, 2011.
- [ 5 ] 李佳, 王月英, 胡斌, 等. 角质细胞生长因子对小鼠放射性肠损伤的治疗作用[J/OL]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(13): 5953-5955[2016-12-20]. <http://www.clinimed.net/upload/pdf/201308/20130828113119408.pdf>. DOI: 10.3969/cma.j.issn.1674-0785.2013.13.049.
- Li J, Wang YY, Hu B, et al. Keratinocyte growth factor treatment prevents radiation-induced intestinal damage in a mouse model [J/OL]. Chin J Clin(Electronic Edition), 2013, 7 (13): 5953-5955 [2016-12-20]. <http://www.clinimed.net/upload/pdf/201308/20130828113119408.pdf>.
- [ 6 ] Kim K, McBride WH. Modifying radiation damage[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(11): 1352-1365. DOI: 10.2174/1389450111009011352.
- [ 7 ] Krishnan K, Arnone B, Buchman A. Intestinal growth factors: potential use in the treatment of inflammatory bowel disease and their role in mucosal healing[J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(1): 410-422. DOI: 10.1002/ibd.21316.
- [ 8 ] Yarnold J, Brotons MC. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis[J]. Radiother Oncol, 2010, 97(1): 149-161. DOI: 10.1016/j.radonc.2010.09.002.
- [ 9 ] Silver FH, Devore D, Siperko LM. Invited review: role of mechanophysiology in aging of ECM: effects of changes in mechanochemical transduction[J]. J Appl Physiol(1985), 2003, 95(5): 2134-2141. DOI: 10.1152/japplphysiol.00429.2003.
- [ 10 ] Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGF beta signalling pathway in disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(10): 790-811. DOI: 10.1038/nrd3810.
- [ 11 ] Chen CM, Wang LF, Chou HC, et al. Up-regulation of connective tissue growth factor in hyperoxia-induced lung fibrosis[J]. Pediatr Res, 2007, 62(2):128-133. DOI: 10.1203/PDR.0b013e3180987202.
- [ 12 ] 邱啸臣, 张博, 李元新. 慢性放射性肠炎的研究进展[J]. 大连医科大学学报, 2015, 37(3): 306-310. DOI: 10.11724/jdmu.2015.03.25.
- Qiu XC, Zhang B, Li YX. Research progress in chronic radiation enteritis[J]. J Dalian Med Univ, 2015, 37(3): 306-310.
- [ 13 ] 刘小菁, 吴文超, 陈槐卿. CTGF 基因沉默对肺成纤维细胞增殖及表型转化的影响[J]. 生物医学工程学杂志, 2008, 25(2): 407-412. DOI: 10.3321/j.issn:1001-5515.2008.02.037.
- Liu XJ, Wu WC, Chen HQ. Effects of CTGF gene silencing on the proliferation and myofibroblast differentiation of human lung fibroblasts[J]. J Biomed Eng, 2008, 25(2): 407-412.
- [ 14 ] Westbury CB, Yarnold JR. Radiation fibrosis—current clinical and therapeutic perspectives[J]. Clin Oncol(R Coll Radiol), 2012, 24(10): 657-672. DOI: 10.1016/j.clon.2012.04.001.
- [ 15 ] Ikawa Y, Ng PS, Endo K, et al. Neutralizing monoclonal antibody to human connective tissue growth factor ameliorates transforming growth factor-beta-induced mouse fibrosis[J]. J Cell Physiol, 2008, 216(3): 680-687. DOI: 10.1002/jcp.21449.
- [ 16 ] Li G, Xie Q, Shi Y. Inhibition of connective tissue growth factor by siRNA prevents liver fibrosis in rats[J]. J Gene Med, 2006, 8(7): 889-900. DOI: 10.1002/jgm.894.
- [ 17 ] Ohmori S, Shiraki K, Sugimoto K, et al. High expression of CD34-positive sinusoidal endothelial cells is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with HCV-associated chronic liver diseases [J]. Hum Pathol, 2001, 32(12): 1363-1370. DOI: 10.1053/hupa.2001.29678.
- [ 18 ] Wildhaber BE, Yang H, Teitelbaum DH. Total parenteral nutrition-induced apoptosis in mouse intestinal epithelium: modulation by keratinocyte growth factor[J]. J Surg Res, 2003, 112(2): 144-151.

(收稿日期: 2016-12-26)