

论著·基础研究

*Tmprss6*基因对小鼠放射性肠损伤的影响

毛久昂¹, 翁震^{2*}, 钮晓音³, 何杨^{2,4}, 王振欣^{1*}

1. 苏州大学附属第一医院肿瘤科, 苏州 215006; 2. 苏州大学血液和血管疾病诊疗药物技术教育部工程研究中心, 苏州 215123; 3. 上海交通大学医学院, 上海市免疫学研究所, 上海 200025; 4. 江苏省血液研究所, 苏州大学附属第一医院, 苏州 215006

[摘要] **目的**·观察 *Tmprss6* 基因对小鼠放射性肠损伤的影响。**方法**·将 7~8 周龄雄性野生型 (WT) 小鼠和 *Tmprss6* 基因敲除 (*Tmprss6*^{-/-}) 小鼠各自随机分成未辐照组以及辐照后 6 h、24 h、3.5 d 和 7 d 组。其中, 辐照组采用 11.5 Gy X 射线全腹部照射, 建立放射肠损伤模型。通过 TUNEL 染色观察辐照后 6、24 h 不同肠段隐窝细胞凋亡情况; 通过苏木精-伊红染色观察辐照后 3.5 d 不同肠段病理损伤情况; 测量不同肠段辐照前和辐照后 3.5、7 d 的铁含量, 以及抗氧化指标包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、总抗氧化能力 (total antioxidant capacity, T-AOC) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA), 并对铁含量与各项抗氧化指标进行相关性分析。**结果**·在辐照后 3.5 d, *Tmprss6*^{-/-} 和 WT 小鼠十二指肠绒毛长度均缩短, 平均每毫米横截面隐窝计数均减少; *Tmprss6*^{-/-} 小鼠的十二指肠绒毛长度和隐窝计数低于 WT 小鼠 (均 $P<0.05$)。辐照后 6、24 h, *Tmprss6*^{-/-} 小鼠十二指肠段每隐窝 TUNEL 染色阳性细胞数相较于 WT 小鼠均显著增多 (均 $P<0.05$)。而回肠段则相反, 辐照后 *Tmprss6*^{-/-} 小鼠绒毛长度和隐窝计数显著增加, TUNEL 染色阳性细胞数显著减少 (均 $P<0.05$)。WT 和 *Tmprss6*^{-/-} 小鼠十二指肠部位铁含量在辐照后 7 d, 相较于辐照前均显著升高 (均 $P<0.05$); 并且 *Tmprss6*^{-/-} 小鼠辐照前后的十二指肠铁含量均显著高于同时时间点的 WT 小鼠 (均 $P<0.05$)。WT 和 *Tmprss6*^{-/-} 小鼠辐照后回肠段铁含量较辐照前均升高, 其中 WT 小鼠辐照后 3.5 d 与辐照前的差异有统计学意义, *Tmprss6*^{-/-} 小鼠辐照后 7 d 与辐照前的差异有统计学意义 (均 $P<0.05$)。辐照后, *Tmprss6*^{-/-} 小鼠十二指肠部位 SOD、GSH、T-AOC 含量均较 WT 小鼠低, 而 MDA 含量较高; 但只有在辐照后 3.5 d 的差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。与十二指肠段相反, 辐照后 *Tmprss6*^{-/-} 小鼠回肠部位 SOD、GSH、T-AOC 含量较 WT 小鼠高, 而 MDA 含量则较低; 但 T-AOC、GSH、MDA 含量在辐照后 3.5 d 的差异才具有统计学意义 (均 $P<0.05$), SOD 含量在辐照后 7 d 的差异具有统计学意义 ($P=0.031$)。相关性分析结果显示, 未辐照组的 MDA、GSH、SOD 和 T-AOC 水平与小肠铁含量均无相关性; 辐照后 WT 小鼠十二指肠 SOD 和 MDA 水平与其铁含量相关 ($r=0.639$, $r=-0.710$, 均 $P<0.05$), 回肠 T-AOC、MDA 和 GSH 与其铁含量相关 ($r=-0.817$, $r=-0.658$, $r=-0.726$, 均 $P<0.05$); 辐照后 *Tmprss6*^{-/-} 小鼠十二指肠段 MDA、SOD 和 T-AOC 水平与其铁含量相关 ($r=-0.606$, $r=0.771$, $r=-0.712$, 均 $P<0.05$), 回肠段各抗氧化指标与铁含量均无相关性。**结论**·小肠铁含量与辐照诱导的氧化应激具有相关性; *Tmprss6* 基因敲除小鼠表现为十二指肠铁累积和辐照诱导的氧化应激加剧; *Tmprss6* 基因缺失在十二指肠放射损伤中具有增敏作用。

[关键词] *Tmprss6*; 放射性肠损伤; 铁代谢; 氧化应激**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.09.007 **[中图分类号]** R818; R574 **[文献标志码]** A

Role of *Tmprss6* gene in radiation-induced intestinal injury of mice

MAO Jiu-ang¹, WENG Zhen^{2*}, NIU Xiao-yin³, HE Yang^{2,4}, WANG Zhen-xin^{1*}

1. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China; 2. MOE Engineering Center of Hematological Disease, Soochow University, Suzhou 215123, China; 3. Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China; 4. Jiangsu Institute of Hematology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

[Abstract] **Objective**·To explore the effect of *Tmprss6* gene on radiation-induced intestinal injury in mice. **Methods**·7–8 weeks old wild-type (WT) male mice and *Tmprss6* knockout (*Tmprss6*^{-/-}) mice were randomly divided into non-irradiated (IR) group and groups of 6 h, 24 h, 3.5 d and 7 d post-IR. The IR group received total abdominal X-ray irradiation (TAI) at a dose of 11.5 Gy to establish radiation intestine injury models. H-E staining was performed in the 3.5 d post-IR group, and TUNEL immunofluorescence was performed in the 6 h and 24 h post-IR groups to observe the pathological damage and apoptosis of different intestinal segments, respectively. The levels of iron of different intestinal segments were measured 0, 3.5 and 7 d after TAI, as well as superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), total antioxidant capacity (T-AOC) and malondialdehyde (MDA). The correlation analysis between iron and each antioxidant index was performed. **Results**·The length of duodenal villi and the number of crypts decreased significantly in both *Tmprss6*^{-/-} mice and WT mice 3.5 d after TAI. Meanwhile, the duodenal villi length and crypt count of *Tmprss6*^{-/-} mice were lower than those of WT mice (both $P<0.05$). The number of TUNEL-positive apoptotic cells per crypt in the duodenal segment of *Tmprss6*^{-/-} mice was significantly increased compared with that of WT mice 6 and 24 h after TAI (both $P<0.05$). On the contrary, the length of ileum villi and the count of crypts increased significantly, while the number of TUNEL-positive apoptotic cells decreased significantly in *Tmprss6*^{-/-} mice compared with that of WT mice (all $P<0.05$). The iron content in the duodenum

[基金项目] 国家自然科学基金 (81773356, 81871269); 上海市卫生和计划生育委员会科研课题 (201640137)。**[作者简介]** 毛久昂 (1994—), 女, 硕士生; 电子信箱: maojiuanguang@163.com。**[通信作者]** 王振欣, 电子信箱: zhenxw316@163.com。翁震, 电子信箱: zhwen@suda.edu.cn。*为共同通信作者。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81773356, 81871269); Research Program of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (201640137)。**[Corresponding Author]** WANG Zhen-xin, E-mail: zhenxw316@163.com. WENG Zhen, E-mail: zhwen@suda.edu.cn. *Co-corresponding authors.

of WT and *Tmprss6*^{-/-} mice 7 d after TAI was significantly increased compared with that of non-irradiated mice (both $P<0.05$). And the iron content of the duodenum in the *Tmprss6*^{-/-} mice before and after TAI was significantly higher than that of WT mice at the same time points (all $P<0.05$). The iron content of the ileum in WT and *Tmprss6*^{-/-} mice also increased after TAI. And the increase was statistically significant at 3.5 d post-IR in the WT mice, so was at 7 d post-IR in the *Tmprss6*^{-/-} mice (both $P<0.05$). In addition, the SOD, GSH and T-AOC levels in the duodenum of *Tmprss6*^{-/-} mice were lower than those in the WT mice after TAI, while the content of MDA was higher. Among them, the difference of SOD, GSH, MDA and T-AOC levels were statistically significant 3.5 d after TAI (all $P<0.05$). Contrary to the duodenum, the contents of SOD, GSH, and T-AOC in the ileum of *Tmprss6*^{-/-} mice were higher than those in the WT mice, while the content of MDA was lower. Among them, the content of T-AOC, GSH and MDA had a statistically significant difference 3.5 d after TAI (all $P<0.05$), and the content of SOD had a statistically significant difference 7 d after TAI ($P=0.031$). The results of correlation analysis showed that there was no significant correlation between the MDA, GSH, SOD and T-AOC levels and the iron content of the small intestine in the non-IR group. The levels of SOD and MDA in the duodenum ($r=0.639$, $r=-0.710$, both $P<0.05$), and T-AOC, MDA and GSH in the ileum ($r=-0.817$, $r=-0.658$, $r=-0.726$, all $P<0.05$) of WT mice were significantly correlated with their respective iron content after TAI. The levels of MDA, SOD and T-AOC in the duodenum of *Tmprss6*^{-/-} mice were significantly correlated with the iron content after TAI ($r=-0.606$, $r=0.771$, $r=-0.712$, all $P<0.05$), and all the antioxidant indexes of the ileum were not significantly correlated with the iron content. **Conclusion** The iron level in the small intestine is significantly correlated with the oxidative stress response after irradiation. *Tmprss6* gene-deficient mice show increased duodenal iron accumulation and irradiation-induced oxidative stress, and *Tmprss6* gene deletion exacerbates duodenal radiation damage.

[Key words] *Tmprss6*; radiation-induced intestinal injury; iron metabolism; oxidative stress

小肠上皮持续、快速更新的特点决定了其对电离辐射具有高度敏感性^[1]。目前,放射治疗(放疗)是癌症的一线治疗手段,但辐射引起的肠损伤严重影响肿瘤患者生存质量,是放疗应用领域亟待解决的问题^[2]。纠正肠道氧化应激状态是治疗放射性肠损伤的重要手段^[3]。有证据^[4-5]表明,高铁会增加辐照后细胞清除活性氧的负担,从而增强细胞对放射的敏感性并加重放射损伤。小肠是铁吸收的主要器官,但其不同部位铁代谢特点与放射性肠损伤的关系仍不明确。

Tmprss6 基因编码的 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶 Matriptase2 是肝脏表达的膜锚定蛋白,通过结合并抑制铁调素调节蛋白抑制铁调素表达,从而参与调控铁代谢^[6]。铁调素是肝脏分泌的一种肽类激素,结合并降解肠上皮细胞和巨噬细胞膜上的膜铁转运蛋白 1 (ferroportin 1, FPN1) 阻断细胞内铁向血液中输出,可在维持哺乳动物系统性铁稳态中起核心作用。机体铁缺乏和炎症状态可以诱导铁调素的表达增加^[7]。本研究旨在观察 *Tmprss6* 基因在放射性肠损伤中的作用并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H-E)染料、蛋白酶K、抗荧光淬灭封片剂(含DAPI)均购自上海碧云天生物技术有限公司;Triton X-100购自Sigma Aldrich(中国),TUNEL 荧光染色法细胞凋亡检测试剂盒和柠檬酸钠溶液购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

正置光学显微镜(DM3000,德国徕卡),共聚焦荧光显微镜(FV3000,日本奥林巴斯),电感耦合等离子体质谱仪(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS,美国赛默飞),生物学X射线辐照仪(X-

RAD320ix,美国PXi)。

1.2 实验动物

雄性7~8周龄野生型(wild type, WT)和 *Tmprss6* 基因敲除(*Tmprss6*^{-/-}) C57BL/6 小鼠(体质量20~22 g)购自北京维通利华公司。以C57BL/6为背景的 *Tmprss6*^{-/-} 小鼠为赛业(苏州)科技有限公司构建。动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0001,使用许可证号为SYXK(苏)2017-0043。小鼠均饲养于苏州大学实验动物中心SPF级动物房。本实验方案通过苏州大学实验动物伦理委员会审查(审批号201810A530)。

1.3 放射性肠损伤模型建立及分组

将 *Tmprss6*^{-/-} 小鼠和WT小鼠各自随机分为未辐照组以及辐照后6 h、24 h、3.5 d、7 d组,每组各10只。辐照组小鼠于辐照前腹腔注射5%水合氯醛麻醉,随后将全腹部暴露于X射线源下,照射距离50 mm,剂量率1.5 Gy/min,吸收剂量为11.5 Gy。未辐照组给予相同剂量5%水合氯醛且不予辐照。通过TUNEL法检测未辐照及辐照后6、24 h小鼠十二指肠、回肠隐窝细胞凋亡情况;通过H-E染色观察未辐照及辐照后3.5 d小鼠十二指肠、回肠组织学变化;对未辐照及辐照后3.5、7 d小鼠的十二指肠、回肠组织进行铁含量和抗氧化指标检测。

1.4 组织学和形态分析

于11.5 Gy全腹部照射(total abdominal X-ray irradiation, TAI)后第3.5日处死小鼠。自胃窦下缘5 mm切取1 cm肠段为十二指肠,盲肠袋上缘5 mm切取1 cm肠段为回肠,4%甲醛溶液固定24 h后石蜡包埋,制成4 μ m薄片,常规流程脱蜡、水合并进行H-E染色。光学显微镜下采集图像,并以盲法将图像数字编码。使用ImageJ 1.52

软件测量绒毛长度,计算每1 mm周长隐窝个数。

1.5 小肠隐窝细胞凋亡检测

取TAI后6、24 h小鼠十二指肠及回肠,制作组织切片。组织切片脱蜡、水合,滴加20 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶K,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min后磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)浸润清洗3次,每次5 min;滴加适量0.1% Triton X-100/0.1% 柠檬酸钠破膜液覆盖组织,室温孵育20 min后PBS浸润清洗3次,每次5 min。采用TUNEL荧光染色法,依照产品说明书处理组织切片,最后使用抗荧光淬灭封片剂(含DAPI)进行封片。采用共聚焦荧光显微镜检测小肠凋亡细胞,200倍视野下采集隐窝图像,ImageJ 1.52软件统计每个隐窝凋亡细胞数。

1.6 铁含量及氧化应激指标的测量

将辐照后0、3.5、7 d的小鼠十二指肠和回肠组织冻干,取3 mg小肠组织在65%的浓硝酸中消化过夜。加热除去硝酸后,加入1%硝酸将体积定容到1 mL,ICP-MS测定组织中铁浓度。各组小肠组织超氧化物歧化酶

(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量由南京建成生物工程研究所检测。

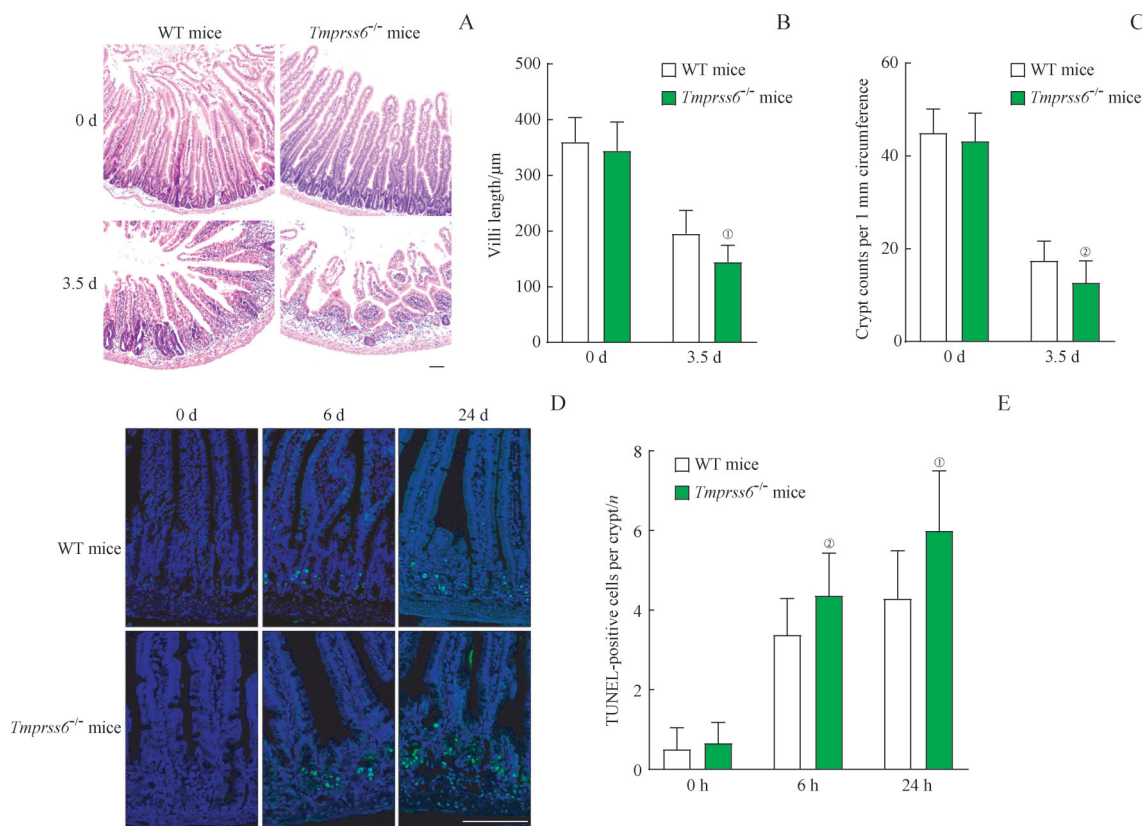
1.7 统计学方法

采用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。2组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。相关性分析采用Spearman相关性检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠十二指肠损伤及细胞凋亡

辐照前的Tmprss6^{-/-}小鼠与WT小鼠十二指肠绒毛长度、平均每毫米横截面隐窝计数比较,差异均无统计学意义。在辐照后3.5 d, Tmprss6^{-/-}和WT小鼠十二指肠绒毛长度均缩短,平均每毫米横截面隐窝计数均减少;Tmprss6^{-/-}小鼠的十二指肠绒毛长度和隐窝计数低于WT小鼠(均 $P<0.05$) (图1A~C)。



Note: A. Duodenum sections of WT and Tmprss6^{-/-} mice after TAI (H-E staining, scale bar=50 μm). B/C. Quantitative results of villus length (B) and crypts count (C). D. Immunofluorescence images for TUNEL in the duodenum tissues at the indicated time points after TAI (scale bar=75 μm). E. The number of TUNEL-positive cells per crypt at the indicated time points after TAI. ① $P=0.000$, ② $P=0.001$, compared with WT mice.

图1 Tmprss6^{-/-}小鼠与WT小鼠行TAI后十二指肠损伤和细胞凋亡情况的比较

Fig 1 Comparison of duodenal injury and apoptosis between Tmprss6^{-/-} mice and WT mice after TAI

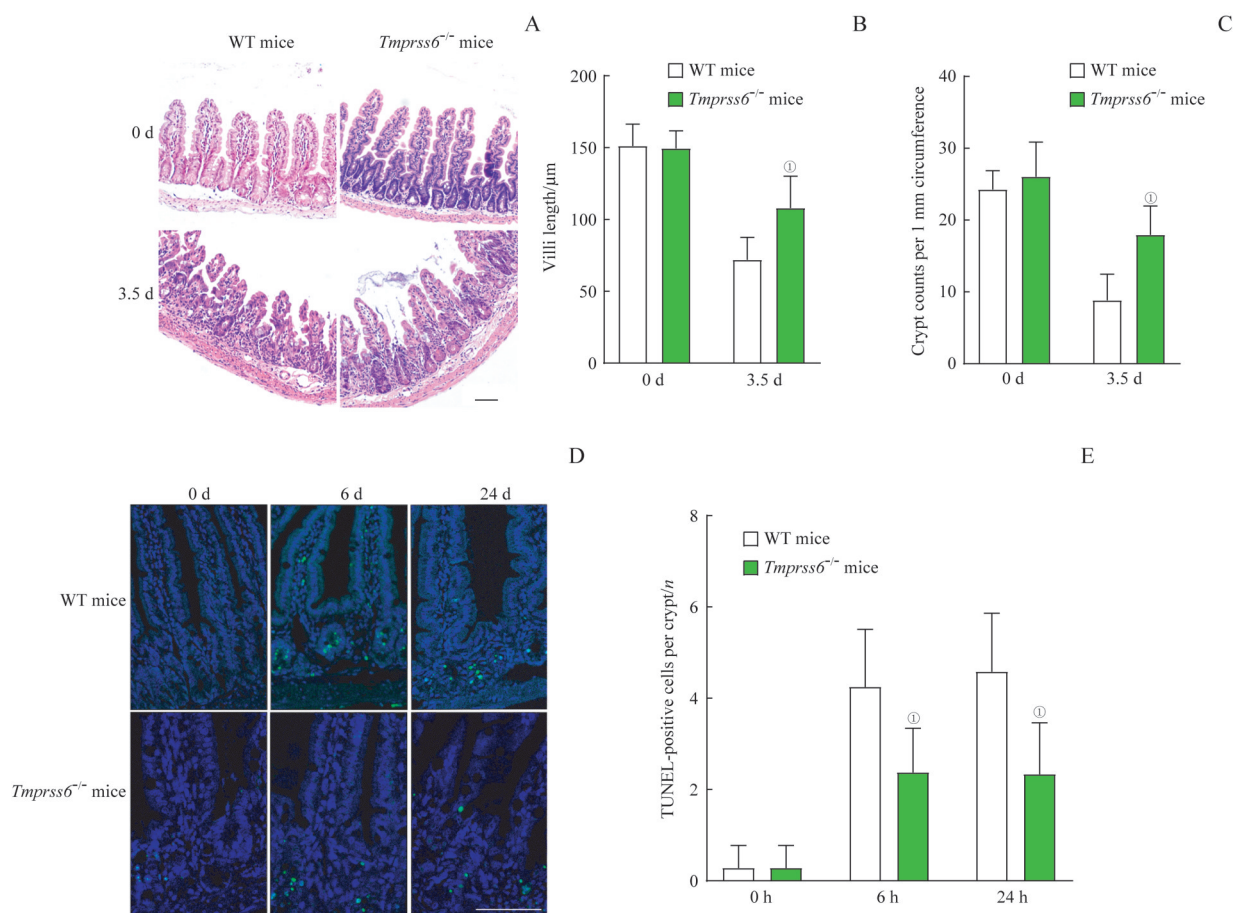
辐照后 6 和 24 h, *Tmprss6*^{-/-} 小鼠十二指肠段每隐窝 TUNEL 染色阳性细胞数相较于 WT 小鼠显著增多 (均 $P < 0.05$) (图 1D、E)。

2.2 小鼠回肠损伤及细胞凋亡情况

辐照前的 *Tmprss6*^{-/-} 与 WT 小鼠回肠绒毛长度及平均

每毫米横截面隐窝计数比较, 差异均无统计学意义。辐照后 3.5 d, *Tmprss6*^{-/-} 小鼠回肠绒毛长度和隐窝计数相较于 WT 小鼠均显著升高 (均 $P < 0.05$) (图 2A~C)。

辐照后 6 和 24 h, *Tmprss6*^{-/-} 小鼠回肠段每隐窝 TUNEL 染色阳性细胞数相较于 WT 小鼠显著减少 (均 $P < 0.05$) (图 2D、E)。



Note: A. Ileum sections of WT and *Tmprss6*^{-/-} mice after TAI (H-E staining, scale bar=50 μ m). B/C. Quantitative results of villus length (B) and crypts count (C). D. Immunofluorescence images for TUNEL in the ileum tissues at the indicated time points after TAI (scale bar=75 μ m). E. The number of TUNEL-positive cells per crypt at the indicated time points after TAI. ^① $P=0.000$, compared with WT mice.

图2 *Tmprss6*^{-/-}小鼠与WT小鼠行TAI后回肠损伤和细胞凋亡情况的比较

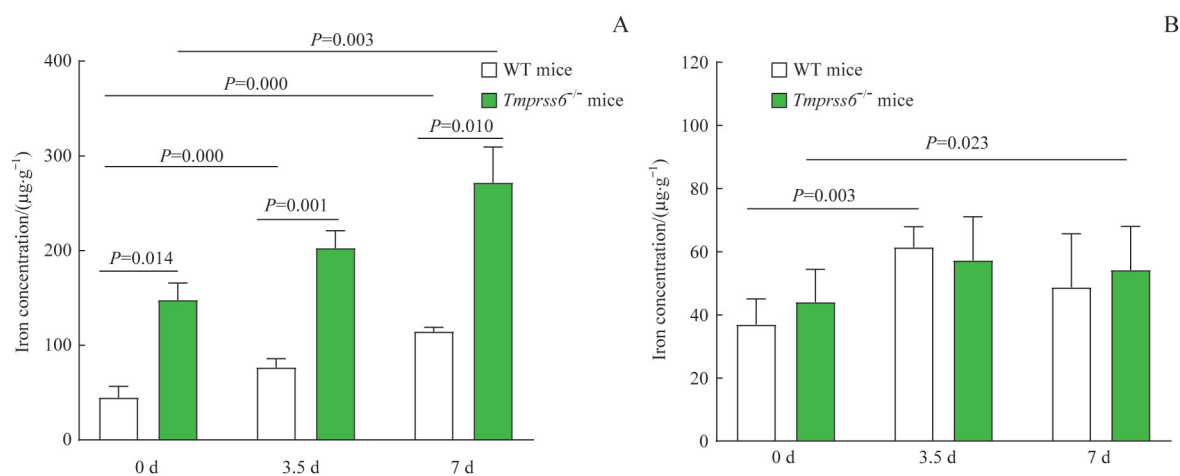
Fig 2 Comparison of ileum injury and apoptosis between *Tmprss6*^{-/-} mice and WT mice after TAI

2.3 小鼠辐照后不同肠段铁含量的变化

辐照后, 2种基因型小鼠十二指肠和回肠铁含量均增加; 其中WT小鼠辐照后 3.5 d与辐照前的差异有统计学意义, *Tmprss6*^{-/-}小鼠辐照后 7 d与辐照前的差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3)。辐照前后, *Tmprss6*^{-/-}小鼠十二指肠铁含量均显著高于同时时间点的WT小鼠 (均 $P < 0.05$) (图 3A)。辐照前及辐照后 3.5、7 d时, *Tmprss6*^{-/-}小鼠回肠部位的铁含量与WT小鼠比较, 差异均无统计学意义 (图 3B)。

2.4 小鼠辐照后不同肠段抗氧化相关指标的变化

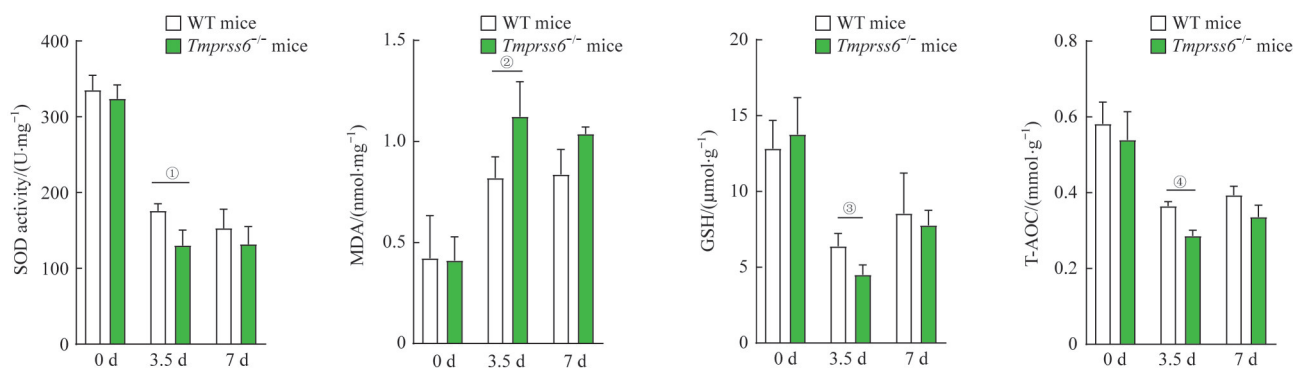
辐照后 3.5 d和 7 d, *Tmprss6*^{-/-}小鼠十二指肠部位SOD、GSH、T-AOC水平相较于WT小鼠均下降, 而MDA水平则升高; 在辐照后 3.5 d, SOD、GSH、T-AOC和MDA的差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 4)。辐照后 3.5 d和 7 d, *Tmprss6*^{-/-}小鼠回肠段SOD、GSH和T-AOC水平相较于WT小鼠均升高, MDA则降低; 在辐照后 3.5 d, GSH、T-AOC和MDA水平的差异具有统计学意义; 在辐照后 7 d, SOD水平的差异才具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 5)。



Note: A. Duodenum section. B. Ileum section.

图3 WT和*Tmprss6*^{-/-}小鼠行TAI后不同肠段铁含量的变化

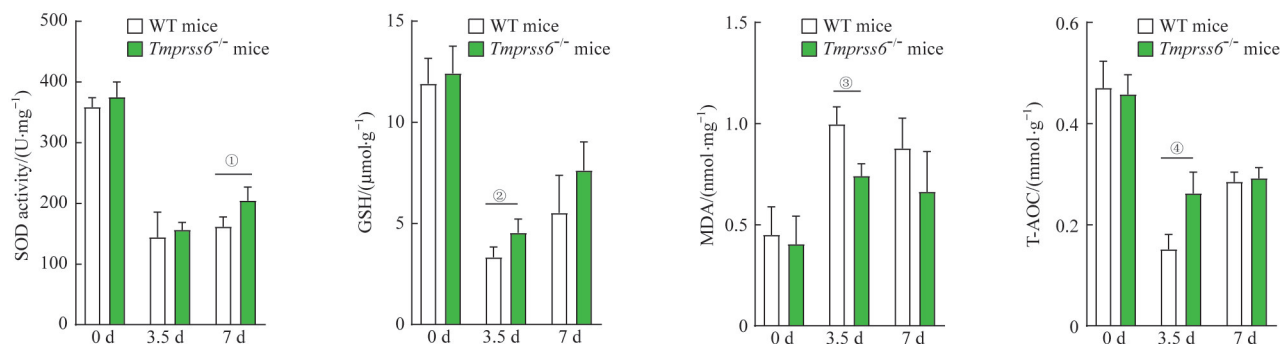
Fig 3 Iron concentration of different intestine segments in WT and *Tmprss6*^{-/-} mice after TAI



Note: ①*P*=0.041, ②*P*=0.046, ③*P*=0.044, ④*P*=0.007, compared with WT mice.

图4 WT和*Tmprss6*^{-/-}小鼠行TAI后十二指肠段抗氧化指标的变化

Fig 4 Antioxidant index changes of duodenum in WT and *Tmprss6*^{-/-} mice after TAI



Note: ①*P*=0.031, ②*P*=0.030, ③*P*=0.006, ④*P*=0.009, compared with WT mice.

图5 WT和*Tmprss6*^{-/-}小鼠行TAI后回肠段抗氧化指标的变化

Fig 5 Antioxidant index changes of ileum in WT and *Tmprss6*^{-/-} mice after TAI

2.5 铁含量与抗氧化指标的相关性

将所有小鼠辐照后各时间点不同肠段的铁含量与抗氧化指标进行相关性分析,结果显示:辐照后,小鼠肠段组织MDA和SOD水平与其铁含量相关,但在辐照前(0 d)无相关性(表1)。

小鼠十二指肠段MDA、SOD和T-AOC水平与其铁含量相关,回肠段GSH、SOD和T-AOC水平与其铁含量相关(图6)。

分别对照射后WT小鼠和*Tmprss6*^{-/-}小鼠进行相关性分析,结果显示:WT小鼠十二指肠段的MDA和SOD水

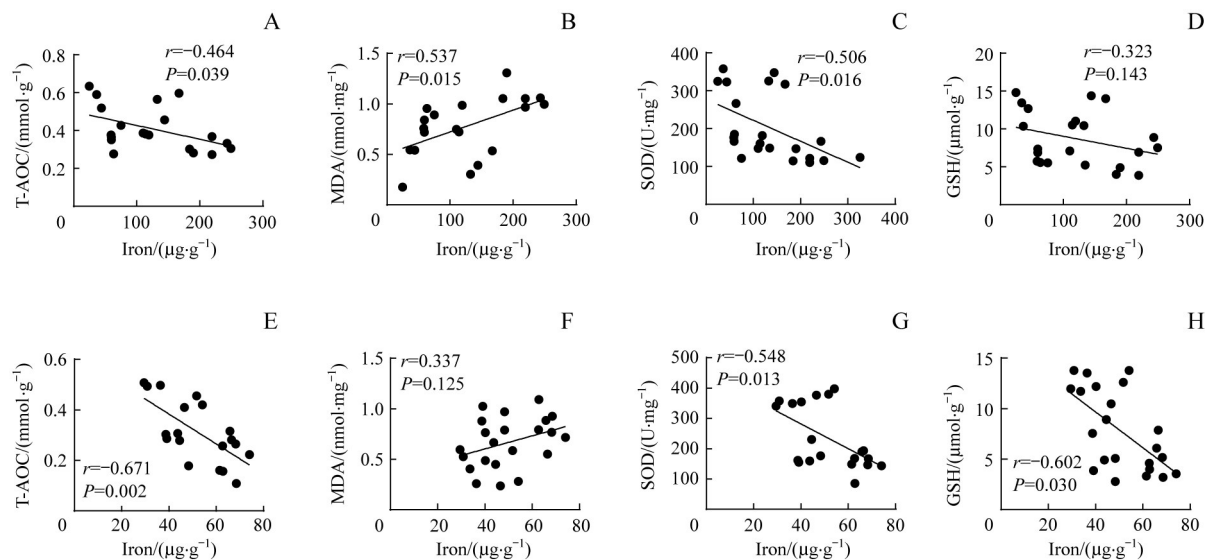
平与其铁含量相关, 回肠段 T-AOC、MDA 和 GSH 水平与其铁含量相关 (图7); *Tmprss6*^{-/-} 小鼠十二指肠段 MDA、

SOD 和 T-AOC 水平与其铁含量相关, 但回肠段各抗氧化指标与铁含量均无相关性 (图8)。

表1 辐照前后小肠 T-AOC、MDA、SOD 和 GSH 水平与铁含量的相关性分析

Tab 1 Correlation analysis of the levels of T-AOC, MDA, SOD and GSH and iron content in small intestines before and after irradiation

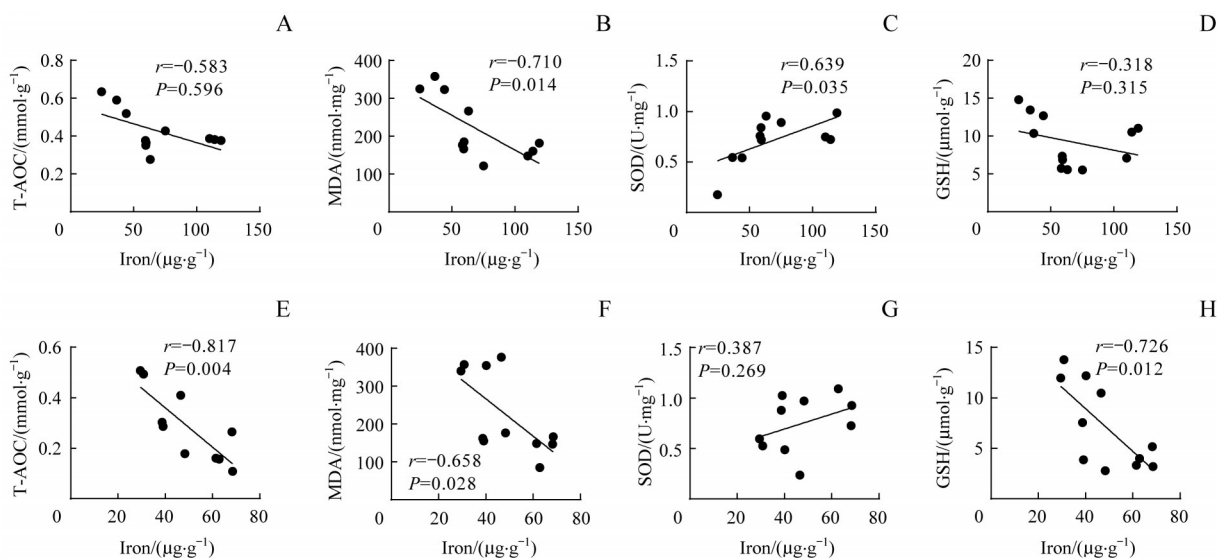
Item	Before irradiation		7 d after irradiation	
	<i>r</i> value	<i>P</i> value	<i>r</i> value	<i>P</i> value
T-AOC	0.135	0.675	0.233	0.243
MDA	0.019	0.948	0.511	0.006
SOD	-0.377	0.205	-0.461	0.012
GSH	0.114	0.687	0.200	0.299



Note: A-D. Duodenum section. E-H. Ileum section.

图6 小鼠小肠组织铁含量与抗氧化指标的相关性分析

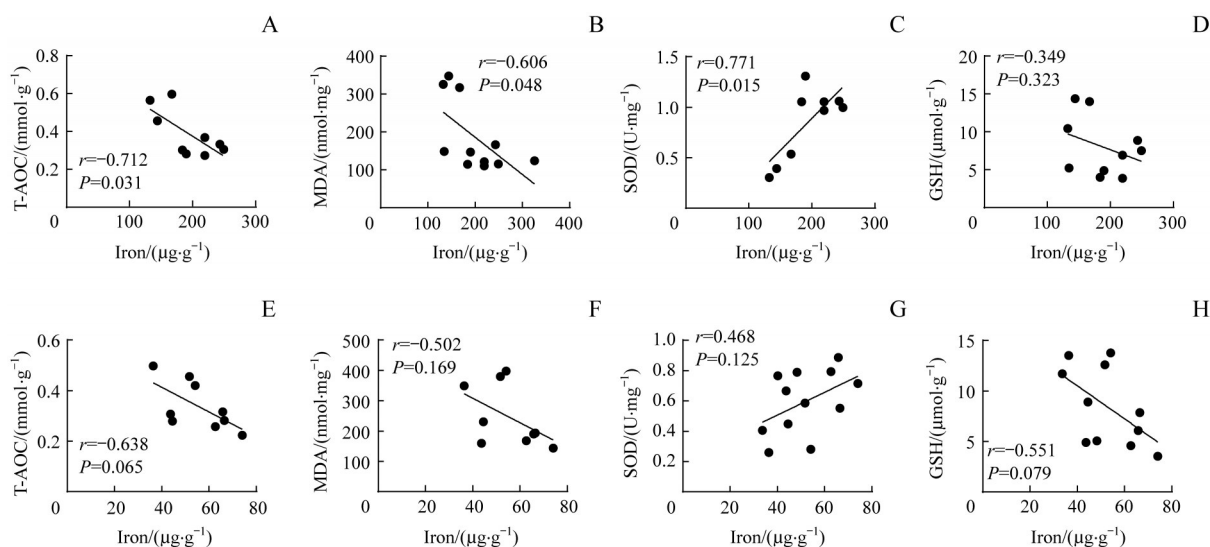
Fig 6 Correlation analysis of iron content and antioxidant indexes of mice intestines



Note: A-D. Duodenum section. E-H. Ileum section.

图7 WT小鼠小肠铁含量与抗氧化指标相关性分析

Fig 7 Correlation analysis of iron content and antioxidant indexes of intestines in WT mice



Note: A-D. Duodenum section. E-H. Ileum section.

图8 *Tmprss6*^{-/-}小鼠小肠铁含量与抗氧化指标相关性分析

Fig 8 Correlation analysis of iron content and antioxidant indexes of intestines in *Tmprss6*^{-/-} mice

3 讨论

放疗是癌症的主要治疗方式之一。在全球范围内,约有50%的癌症患者有放疗需求^[8]。小肠是盆腔部放疗最易受到影响的部位,盆腔部放疗可引起胃肠道症状,包括腹泻、直肠出血和大便失禁^[9],严重影响放疗患者的生存质量,也限制了放疗的应用。电离辐射诱导多种自由基产生,进一步导致氧化还原系统失衡,是早期和晚期放射性肠损伤的重要原因^[10]。因此,清除自由基是减轻放射性肠损伤重要的手段之一。本研究发现*Tmprss6*基因敲除导致十二指肠铁累积和电离辐射后氧化应激负担加重,加剧了十二指肠的放射损伤。同时,也在*Tmprss6*^{-/-}小鼠的回肠中观察到放射损伤缓解的现象。十二指肠和回肠段放射损伤情况的对比结果提示,*Tmprss6*基因在放射性肠损伤中发挥复杂的调控作用。

本研究中,TAI后小鼠十二指肠和回肠均出现不同程度的铁累积,并且在十二指肠更为显著,可能与十二指肠的铁吸收特性相关。有研究^[7]表明,与放射后肠道损伤相关的炎症反应诱导铁调素升高,可以促使铁螯合在细胞内部,进一步解释了辐照后肠道铁累积现象。*Tmprss6*基因编码的Matriptase2是铁调素的关键抑制剂^[6]。铁调素结合并降解巨噬细胞和十二指肠上皮细胞基底膜上的FPN1,抑制细胞内铁向血液中转运,可将铁螯合在细胞内^[11]。本研究观察到*Tmprss6*^{-/-}小鼠辐照前后十二指肠铁含量较WT小鼠均显著增高,这一现象与其铁调素基础水平高的特点相一致;然而,*Tmprss6*^{-/-}小鼠回

肠铁含量与WT小鼠相比并无显著差异。该结果提示,十二指肠是*Tmprss6*基因调控小肠铁含量的主要部位。

细胞呼吸、氧气转运和DNA合成等基础生理过程都依赖于铁的氧化还原特性,但过量的铁可通过Fenton反应产生羟自由基($\cdot\text{OH}$)等活性氧诱导氧化应激,导致DNA损伤和细胞凋亡^[12]。高铁饮食是增加肠道氧化应激压力的独立因素^[13],同时有证据表明高铁饮食会增加辐照后细胞清除活性氧的负担,从而增强细胞放射敏感性,加重放射损伤^[4-5]。电离辐射通过分解细胞内的水,迅速产生 $\cdot\text{OH}$ 、电离水和超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)等多种活性氧,间接造成DNA、脂质、蛋白质等内源性细胞成分氧化损伤,是导致放射性损伤的主要原因^[10,14]。70%的DNA损伤归因于这种由活性氧介导的间接损伤效应,而 $\cdot\text{OH}$ 在其中发挥主要作用。30%的 $\cdot\text{OH}$ 可直接与DNA核糖部分或通过磷酸基反应诱导DNA单链或双链断裂。此外, $\cdot\text{OH}$ 可通过与多不饱和脂肪酸反应介导脂质过氧化。脂质过氧化产物分解产生含有反应性碳基的分子,如MDA,可作为脂质过氧化的标志物。细胞内氧化还原平衡由SOD、GSH等多种抗氧化酶和非酶类化合物调节,这些化合物在细胞内的水平可以反映其抗氧化活力^[15-16]。本研究对辐照前后小鼠小肠SOD、GSH、MDA和T-AOC与对应的小肠铁含量进行了相关性分析,结果发现,辐照后7d,小鼠小肠氧化应激水平与其铁含量显著相关。这一结果提示,小肠组织辐照后铁含量增加可能是放射性肠损伤的危险因素。*Tmprss6*^{-/-}小鼠十二指肠段铁含量的显著升高,可能是其放射性损伤加重的重要原因。

此外, 辐照后肠屏障功能低下, 细菌移位可以增加辐照后肠道并发症的风险。Bessman等^[17]研究发现, 肠道树突状细胞来源的铁调素作用于表达FPN1的巨噬细胞, 使其螯合肠腔内铁, 阻断了肠道有毒微生物的铁来源, 可以促进肠道黏膜修复。本研究结果显示, 回肠并非 *Tmprss6* 基因调控小肠铁含量的主要部位, 辐照前后 *Tmprss6*^{-/-} 小鼠回肠铁含量与 WT 小鼠并无显著差异。 *Tmprss6*^{-/-} 小鼠回肠段放射防护现象可能得益于其铁调素的高表达, 未来的研究有必要进一步探索铁调素在放射

相关的肠道炎症与菌群紊乱中的作用。

本研究使用放射肠损伤模型初步探讨了 *Tmprss6* 基因敲除在肠道放射损伤中的作用, 发现 *Tmprss6* 基因在不同肠段放射性肠损伤的调控中发挥不同的作用, 并揭示了小肠铁含量与辐照诱导的氧化应激的相关性, 为进一步探索铁或铁调素在放射性肠损伤中的作用提供参考。此外, 本研究尚存在一些局限性, 并未探讨血清铁水平对局部辐照肠损伤的影响, 并且电离辐射对肠道铁代谢的调节机制仍需进一步研究。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Santos AJM, Lo YH, Mah AT, et al. The intestinal stem cell niche: homeostasis and adaptations[J]. Trends Cell Biol, 2018, 28(12): 1062-1078.
- [2] Kumagai T, Rahman F, Smith AM. The microbiome and radiation induced-bowel injury: evidence for potential mechanistic role in disease pathogenesis[J]. Nutrients, 2018, 10(10): 1045-1060.
- [3] Khodamoradi E, Hoseini-Ghahfarokhi M, Amini P, et al. Targets for protection and mitigation of radiation injury[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(16): 3129-3159.
- [4] Theriot CA, Westby CM, Morgan JLL, et al. High dietary iron increases oxidative stress and radiosensitivity in the rat retina and vasculature after exposure to fractionated γ radiation[J]. NPJ Microgravity, 2016, 2: 16014.
- [5] Reelfs O, Abbate V, Hider RC, et al. A powerful mitochondria-targeted iron chelator affords high photoprotection against solar ultraviolet a radiation [J]. J Invest Dermatol, 2016, 136(8): 1692-1700.
- [6] Enns CA, Jue S, Zhang AS. The ectodomain of matriptase-2 plays an important nonproteolytic role in suppressing hepcidin expression in mice[J]. Blood, 2020, 136(8): 989-1001.
- [7] Camaschella C, Nai A, Silvestri L. Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era[J]. Haematologica, 2020, 105(2): 260-272.
- [8] Yap ML, Zubizarreta E, Bray F, et al. Global access to radiotherapy services: have we made progress during the past decade?[J]. J Glob Oncol, 2016, 2(4): 207-215.
- [9] Nicholas S, Chen L, Choflet A, et al. Pelvic radiation and normal tissue toxicity [J]. Semin Radiat Oncol, 2017, 27(4): 358-369.
- [10] Pouget JP, Georgakilas AG, Ravanat JL. Targeted and off-target (bystander and abscopal) effects of radiation therapy: redox mechanisms and risk/benefit analysis[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 29(15): 1447-1487.
- [11] Girelli D, Nemeth E, Swinkels DW. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders[J]. Blood, 2016, 127(23): 2809-2813.
- [12] Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: an intimate relationship[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2019, 1866(12): 118535.
- [13] Qi X, Zhang YX, Guo H, et al. Mechanism and intervention measures of iron side effects on the intestine[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2020, 60(12): 2113-2125.
- [14] Wei J, Wang B, Wang H, et al. Radiation-induced normal tissue damage: oxidative stress and epigenetic mechanisms[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 3010342.
- [15] Sebastià N, Olivares-González L, Montoro A, et al. Redox status, dose and antioxidant intake in healthcare workers occupationally exposed to ionizing radiation [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(9): 778-793.
- [16] Ahmad IM, Temme JB, Abdalla MY, et al. Redox status in workers occupationally exposed to long-term low levels of ionizing radiation: a pilot study[J]. Redox Rep, 2016, 21(3): 139-145.
- [17] Bessman NJ, Mathieu JRR, Renassia C, et al. Dendritic cell-derived hepcidin sequesters iron from the microbiota to promote mucosal healing[J]. Science, 2020, 368(6487): 186-189.

[收稿日期] 2021-02-24

[本文编辑] 吴 洋