DOI:10.16016/j.2097-0927.202310094

食品添加剂羧甲基纤维素钠通过破坏肠内环境加剧辐射对小鼠肠道的损伤

刘绍庭[1],李忠俊[2],陈 立[2],向 阳[2],相丽欣[2],张薇薇[2],冉 茜[2],王 建[1] 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院:营养科[1],输血科[2]

[摘要] **目的** 探究食品添加剂羧甲基纤维素钠(CMC-Na)的长期摄入对小鼠辐射耐受性的影响及其机制研究。**方法** 通过饲饮水中添加不同浓度 CMC-Na(对照组,0.25%低剂量组,1%高剂量组)对小鼠进行饮食干预,而后建立辐射损伤模型(7 Gy,Co^{60} γ 射线)。在辐射干预前后,每周称量小鼠体质量变化,记录各组小鼠的死亡情况;干预 8 周后,检测血生化指标;ELISA、RT-qPCR 和 Western blot 技术检测肠道相关细胞因子和蛋白变化情况;HE、免疫荧光及免疫组化染色切片观察肠道组织细胞形态的改变并进行病理评分;流式细胞术检测肠道干细胞比例。**结果** 通过流式细胞术检测发现,与对照组比较,两组饮食干预组的肠道干细胞比例均出现下降($P<0.05$),下降程度与饮水中添加剂浓度呈正相关,且干细胞下降趋势在受到辐射损伤后持续存在。其中高剂量组死亡率显著升高($P<0.05$),体质量大幅下降($P<0.000\ 1$)。进一步实验发现肠道屏障功能受损,抑炎因子白介素-10(IL-10)含量下降。同时,高剂量组小鼠肠道中出现了 TLR4、NF-κB、TNF-α 以及 IL-1β 等炎症因子的高表达($P<0.05$),并且在辐射损伤后进一步加剧;低剂量组小鼠部分炎症因子(NF-κB、TNF-α 以及 IL-1β)相较于对照组表达增高($P<0.05$),但低于高剂量组。**结论** 长期摄入含有 CMC-Na 添加剂的饮食,会降低肠道内干细胞群的比例,加剧了辐射对肠道的损伤,降低了小鼠对辐射耐受性。

[关键词] 羧甲基纤维素钠;辐射;肠道屏障;肠道干细胞;炎症
[中图法分类号] R322.45; R339.57; TS202.3 [文献标志码] A

Food additive sodium carboxymethyl cellulose aggravates radiation-induced intestinal damage in mice by disrupting intestinal homeostasis

LIU Shaoting[1], LI Zhongjun[2], CHEN li[2], XIANG Yang[2], XIANG Lixin[2], ZHANG Weiwei[2], RAN Qian[2], WANG Jian[1]
[1]Department of Nutrition, [2]Department of Blood Transfusion, Second Affiliated Hospital, Amy Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] Objective To explore the effect and underlying mechanism of long-term intake of sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na), a food additive, on radiation tolerance in mice. Methods Dietary intervention was performed on the mice by adding different concentrations of CMC-Na to drinking water at a dose of 0, 0.25% and 1%, respectively (Control and low- and high-dose groups) for 8 weeks, and then the mice were given a lethal radiation of 7 Gy ^{60}Co gamma rays to establish a radiation damage model. Before and after the radiation intervention, the body weight was measured weekly in every mice, and death was observed and recorded in each group. After an 8-week intervention, the blood biochemical indicators of mice were assessed. ELISA, Qrt-Pcr, and Western blotting techniques to investigate changes in intestinal-related cytokines and proteins. What's more, HE staining, immunofluorescence assay and immunohistochemical staining were used to observe the changes of intestinal tissue morphology for pathological scores. Flow cytometry was employed to detect the proportion of intestinal stem cells. Results Flow cytometry showed that

[基金项目] 重庆市杰出青年基金(CSTC2021jcyj-jqx0004);国家自然科学基金面上项目(81972973)
[通信作者] 王 建, E-mail: wangjian_1996@aliyun.com
冉 茜, E-mail: louise-r-q@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the proportion of intestinal stem cells was decreased in both dietary intervention groups when compared with the control group ($P<0.05$), and the decrease was positively correlated with the dose of CMC-Na in drinking water and persisted after radiation damage. Higher death rate ($P<0.05$) and obvious weight loss ($P<0.0001$) were observed in the high-dose intervention group, and impaired intestinal barrier function and a decrease in the content of the anti-inflammatory factor IL-10 were found in further research. Meanwhile, the expression levels of inflammatory factors such as TLR4, NF-κB, TNF-α and IL-1β were higher in the high-dose intervention group ($P<0.05$), and the contents were further increased after radiation damage. The expression of certain inflammatory factors (NF-κB, TNF-α, and IL-1β) in the low-dose group exhibited a statistically significant increase compared to the control group ($P<0.05$), yet remained lower than that observed in the high-dose group. **Conclusion** Long-term consumption of foods containing CMC-Na reduces the proportion of colonic stem cells in the intestinal tract, aggravates the radiation damage to the intestine, and reduces the radiation tolerance of mice.

[**Key words**] sodium carboxymethylcellulose, radiation, intestinal barrier, intestinal stem cells, inflammation

Supported by the Chongqing Outstanding Youth Fund (cstc2021jcyj-jqX0004) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (81972973). Corresponding author: WANG Jian, E-mail: wangjian_1996@aliyun.com; RAN Qian, E-mail: louise-r-q@163.com

随着科技的发展和进步,核放射技术尤其是γ射线的应用,由最初的军用逐渐走向民用,在医疗的诊断和治疗方法被广泛用于临床[1-3],例如钴-60(Co^{60})或铱-192(IR^{192})已被广泛用于肿瘤的临床放射治疗。但在受益的同时,由辐射暴露引发的急、慢性放射综合征会对机体的造血、消化、神经等系统产生巨大损害[4-5],诸如腹泻、呕吐、便血、肠道定植菌移位感染等副作用。

乳化剂是现代食品工业中一类重要的食品添加剂,广泛用于各种食品加工[6],如烘焙类、糖果、黄油和酥油,以及各类酱料、低度酒饮(酒精度<15%)和乳制品当中[7]。

已有多篇文献报道,乳化剂的摄入会对肠道生理功能产生各种影响。聚山梨酯-80(P80),通过上调CXCL1、CXCL8、CXCL10、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)等促炎因子破坏肠上皮完整性[8],同时还可以通过破坏肠道微生物群的组成,降低了胃肠道对放射的耐受能力[9-11];麦芽糊精可以增强肠内有害微生物群的运动能力,造成肠道内生态失调和损伤[12-13],还能上调肠道中杯状细胞内质网应激传感器蛋白1β,降低黏蛋白-2(Muc-2)分泌,从而破坏肠道的粘液屏障,使肠内定植菌能够更加轻易的与肠粘膜直接接触[14]。

羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethylcellulose, CMC-Na)作为一款被普遍认为是“安全可靠”的乳化剂,于1946年投入食品加工产业至今[15]。在联合国粮食和农业组织以及世界卫生组织联合制定的《国际食品标准食品添加剂通用法典标准》中[16],将其列为了无使用上限规定的安全可靠的食品添加剂,在我国食品添加剂使用标准[17]中同样也未设置使用上限。但已有报道指出其在炎症性肠病发病当中的重要影响,包括改变肠内微生物组丰度破坏肠道内环境的稳态[11, 18-19],减少大肠杆菌、放线菌等不良菌群与肠道上皮的间距[20]和增强其自身的侵袭能力[21-22],以及诱导Ⅱ型细胞因子(如IL-4、IL-5和IL-13)表达从而增加肠道内炎症反应[23]。但其对放射综合征的影响尚未有明确和深入的研究,尤其是不同浓度CMC-Na的添加所产生的影响效能是否一致尚不清楚。本研究采取人工饲饮水干预的方式,确定其对辐射耐受性的影响,并探究其原因和机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

C57BL/6雄鼠,4~6周龄,体质量约为21~24 g,采购于北京华阜康生物科技股份有限公司,饲养于陆军军医大学第二附属医院呼吸科研究所动物中心。本研究实验过程中,遵循实验动物伦理规定。

1.2 主要试剂

羧甲基纤维素钠,黏度:1 000~1 400 mpa.s,USP级(中国阿拉丁生化科技股份有限公司);重组Anti-Zo蛋白抗体(ab276131),重组Anti-Lgr5抗体(ab75850),Anti-Ki67抗体(英国,ab15580)(Abcam);重组Occludin抗体(#91131),β-Actin(8H10D10) Mouse mAb(#3700S)(美国,Cell Signaling Technology公司);TLR4抗体(25)(sc-293072),NF-κB p65抗体(F-6)(sc-8008)(美国,Santa Cruz Biotechnology公司);Lipopolysaccharide Core mAb WN1 222-5(#HM6011)(荷兰,Hycult Biotech公司);7-AAD Viability Staining

Solution(420404),Pacific Blue™ Annexin V(640918),APC/Cyanine7 anti-mouse CD45 (157618), Alexa Fluor© 488 CD117 (C-kit) Antibody(135118)(美国,Biolegend 公司);CD44 Monoclonal A-ntibodyAlexa Fluor™ 700 (56-0441-82), CD24 Monoclonal AntibodyPE-Cyanine7(25-0242-82),CD166 Monoclonal Antibody PE(12-1661-82)(美国,Invitrogen 公司);反转录试剂盒和实时荧光定量核酸扩增试剂盒(日本,TaKaRa 公司);TRIZol(美国,Invitrogen 公司);HE 染色及免疫组化染色试剂盒(中国,中杉金桥公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与饮食干预模型建立 4~6 周龄 C57BL/6 雄鼠,无差别混合饲养 5 d 后,随机分为 3 组:对照组(Control 组,普通饲饮水,$n=30$),低剂量组(Low 组,饲饮水中添加 CMC-Na 浓度为 0.25%,$n=30$)和高剂量组(High 组,饲饮水中添加 CMC-Na 浓度为 1%,$n=30$)。饮食干预模型建立:在日常饮水中添加不同浓度 CMC-Na 进行干预。对照组:灭菌水;低剂量组:灭菌水+0.25%CMC-Na;高剂量组:灭菌水+1% CMC-Na,37 ℃磁力搅拌充分溶解,按分组置于饲养笼内,华阜康维持饲料饲养,以上食物和饮水均确保小鼠可随时充分获取,持续 8 周干预。

1.3.2 放射损伤干预模型建立 将小鼠置于小鼠固定舱内,7 Gy 放射剂量,放射源钴(Co^{60}),放射源剂量率 0.448 Gy/min。辐射后按照放射前分组,将小鼠置于原笼内。

1.3.3 组织取材和切片制备 选取辐射后第 0、7、14 和 21 天时间点,1%戊巴比妥钠注射液按照 50 mg/kg 对小鼠进行麻醉,眼眶静脉丛采血后断颈处死小鼠,自回盲部至肛门口分离全结肠,保持组织完整性。截取横结肠段作为实验材料,DPBS 清理肠内容物,取约 0.5 cm 横结肠两段,分别加入 4% 多聚甲醛固定和 OCT 包埋。肠组织经脱水和石蜡包埋后切片,OCT 包埋组织冰冻后切片,切片厚度均为 5 μm。

1.3.4 肠道组织 HE 染色 石蜡切片脱蜡,HE 染色后进行透明处理,中性树脂封片,光学显微镜下观察结肠组织病理形态学变化。根据 HAN 等[24]的评分标准,采用双盲法进行肠组织病理损伤评分。

1.3.5 免疫组化染色 石蜡切片脱蜡,梯度浓度乙醇和蒸馏水中进行复水,柠檬酸盐缓冲液(pH=6.0)进行抗原修复,阻断内源性过氧化物酶阻断 30 min 后,Ki67 一抗(1∶400 一抗稀释液稀释)覆盖组织,加盖防蒸发膜,4 ℃孵育过夜。PBS 冲洗后,反应增强液覆盖组织 20 min,二抗室温孵育 1 h。DAB 染色后苏木素复染,分化返蓝,梯度乙醇脱水,封片,光学显微镜拍摄。

1.3.6 免疫荧光染色 冰冻切片于 37 ℃温箱干燥处理,4%多聚甲醛固定组织,依次进行组织通透和蛋白封闭,抗原修复液进行抗原修复,ZO-1(1∶400 一抗稀释液稀释)一抗、Occludin 一抗(1∶400,一抗稀释液稀释)和 LPS 一抗(1∶200 稀释于 PBS 中)覆盖组织,加盖防蒸发膜,4 ℃孵育过夜。PBS 冲洗,二抗:羊抗鼠 IgG(H+L)高交叉吸附荧光, Alexa Fluor™ Plus 488;山羊抗兔 IgG(重链), Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 555, A27039;山羊抗兔 IgG(重链), Superclonal™ Recombinant Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647,(Invitrogen,美国)室温孵育 1 h,DAPI 染色 30 min,抗荧光淬灭封片液封片。试剂采购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3.7 荧光定量 PCR 结肠纵向剖开,DPBS 冲洗肠内容物,加液氮研磨至细粉状,TRIZol 法提取 Total RNA。两步法 PCR 扩增程序设定为:Stage1:95 ℃ 30 s(Reps 1);Stage2:95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s(Reps 40),引物序列见表 1。

1.3.8 酶联免疫吸附测定 小鼠新鲜横结肠组织,纵向剖开后 DPBS 清理内容物,吸去组织表面水分称重 0.1 g,加入 900 μL 预冷至 4 ℃ DPBS 中,使用手持匀浆机进行搅拌,将混悬液于-80 ℃和室温之间反复冻融 3 次,4 ℃,5 000 g,离心 10 min 取上清液,加入平底 96 孔板中,依次与生物素化抗体、酶结合工作液和底物(TMB)进行 37 ℃避光孵育,加入终止液后立即在 450 nm 波长处测定样本 *OD* 值,Logistic 曲线拟合(四参数)法绘制标准曲线方程,计算样本中待测因子浓度。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列
TLR4	F 链:5′-ATGGCATGGCTTACACCACC-3′
	R 链:5′-GAGGCCAATTTTGTCTCCACA-3′
NF-κB	F 链:5′-ATGGCAGACGATGATCCCTAC-3′
	R 链:5′-TGTTGACAGTGGTATTTCTGGTG-3′
TNF-α	F 链:5′-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3′
	R 链:5′-GCTACGACGTGGGCTACAG-3′
IL-1β	F 链:5′-GCAACTGTTCCTGAACTCAACT-3′
	R 链:5′-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3′
β-Actin	F 链:5′-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3′
	R 链:5′-CTCAGCTGTGGTGGTGAA-3′

1.3.9 免疫印迹检测法(Western blot) 取冻存的结肠组织,DPBS 冲洗肠内容物,加液氮研磨至细粉状,1∶1∶100 分别加入蛋白磷酸酶抑制剂混合物(All-in-one,100×)、苯甲基磺酰氟(PMSF,100×)和组织蛋白裂解液的混合液,4 ℃静置 30 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,BCA 试剂盒进行蛋白浓度定量。25 μg 总蛋白样品进行凝胶电泳,转至 0.22 μm PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 30 min,孵育一抗(ZO-1、Occludin 抗体稀释浓度 1∶1 000,TLR4、NF-κB 抗体稀

释浓度1∶500,β-Actin抗体稀释浓度1∶2 000),4 ℃孵育过夜,孵育二抗(稀释浓度为1∶2 000),ECL超敏发光液显影。试剂采购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3.10　肠道干细胞提取与流式细胞术检测

肠段纵向剖开,4 ℃预冷DPBS清洗肠内容物,剪成0.5 cm左右的碎块,加入含10%胎牛血清(美国,Sigma公司)的1 mmol/L乙二胺四乙酸四钠盐水合物(中国,阿拉丁公司)中,恒温摇床37 ℃,200 r/min,30 min分离肠上皮细胞后,回收肠道组织,4 ℃ DPBS清洗至完全无泡沫状,加入至含有1 mg/mL胶原酶Ⅱ(C2-28,Sgima,美国)的DPBS中,恒温摇床37 ℃,200 r/min,30 min消化肠固有层细胞。弃去肠道组织,将上皮细胞和固有层细胞混悬液混合,100 μm细胞滤网过滤,4 ℃,600 g,5 min离心。去上清液,100 μL DPBS冲悬细胞加入抗体1 μg,避光室温孵育30 min,DPBS清洗后4 ℃,1 200 r/min,3 min离心并去除上清液,300 μL DPBS冲悬细胞后上机检测。

1.4　统计学分析

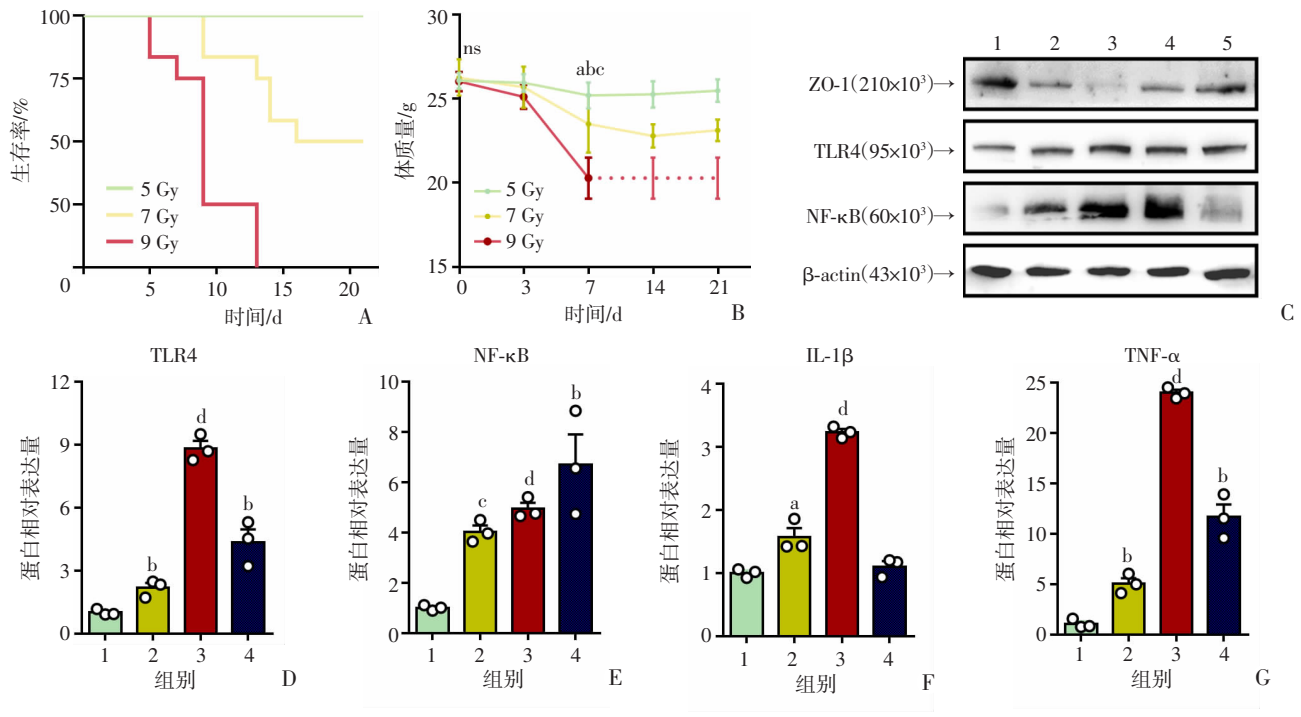
使用GraphPad Prism 9.3.0进行数据分析和统计绘图,并检验是否为正态分布,用T检验或单因素方差分析确定显著性。采用$M(P_{25},P_{75})$来描述非正态分布数据,并通过Kruskal-Wallis检验来确定差异。

2　结果

2.1　辐射导致小鼠肠道屏障功能破坏,引发炎性损伤

12-14周龄的雄鼠在受到5 Gy辐射剂量时,出现体质量轻度下降,但短期内恢复正常,无小鼠死亡;受到7 Gy辐射损伤的小鼠,第9天开始出现小鼠死亡,体质量持续下降至辐射后约14 d;而给予9 Gy辐射剂量损伤的小鼠,短期内体质量即出现急剧下降,并在辐射后13 d内全部死亡(图1A、B)。

为了探究小鼠的死亡与肠道是否存在关联,选择7 Gy辐射剂量下不同时间点,检测小鼠结肠屏障蛋白和炎症转录表达情况。在受到辐射损伤后,小鼠结肠组织屏障蛋白表达下降,辐射后14 d尤为明显,炎性相关蛋白Toll样受体4(TLR4)和核因子激活的B细胞的κ-轻链增强(NF-κB)在同一时间点表达增强(图1C),炎症相关转录因子也同时出现转录高峰。这与7 Gy辐射剂量下小鼠死亡高峰的出现时间相吻合(图1D-G)。



1:IR-0 d;2:IR-7 d;3:IR-14 d;4:IR-21 d;5:IR-28 d

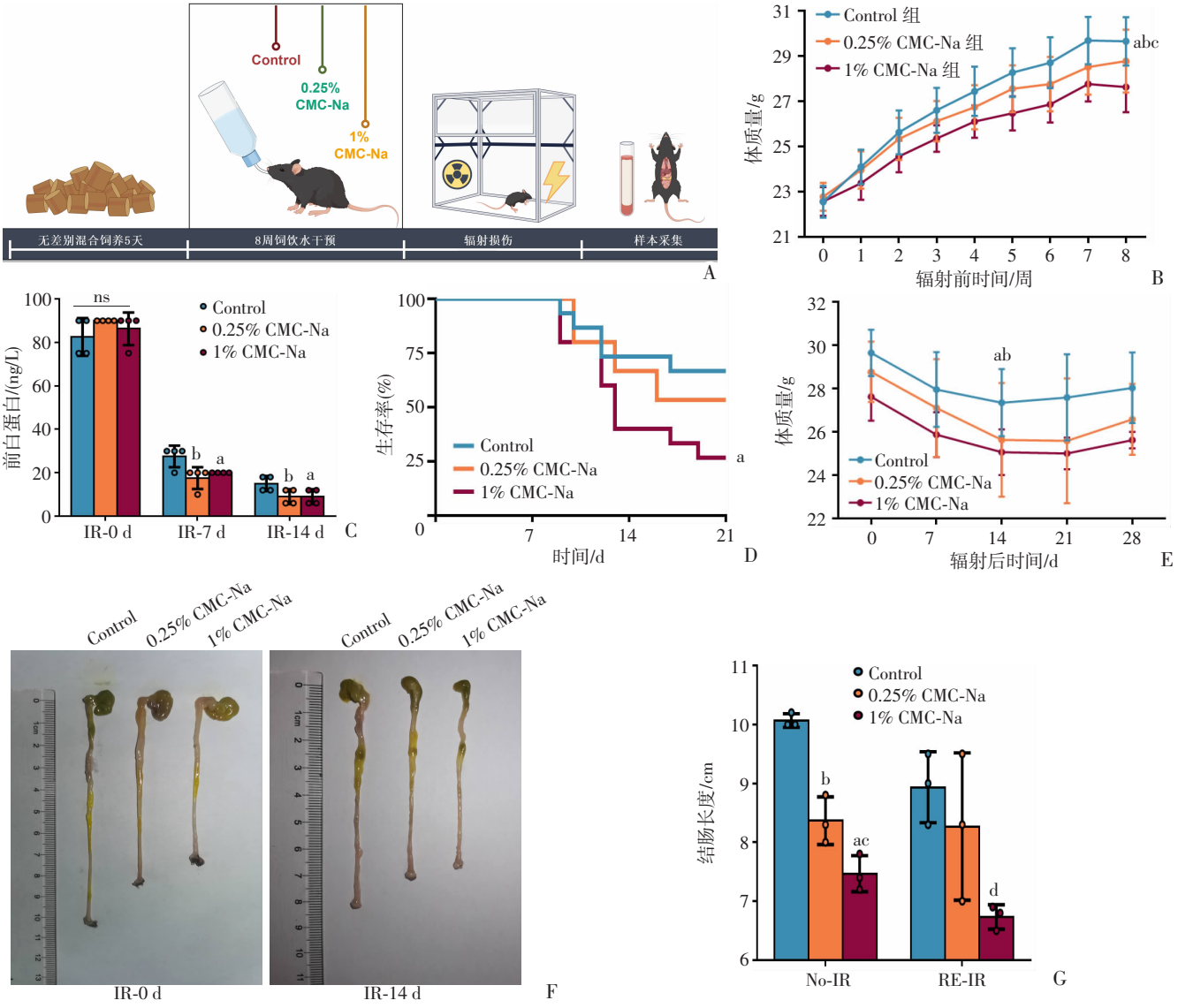
A:不同辐射剂量下小鼠生存率(n=10);B:不同辐射剂量下小鼠体质量变化情况,虚线段表示无小鼠存活　a:P<0.05,5 Gy与7 Gy相比,b:P<0.05,5 Gy与9 Gy相比,c:P<0.001,7 Gy与9 Gy相比;C:辐射后28 d内,不同时间点小鼠结肠中屏障蛋白和炎症蛋白表达情况;D-G:辐射后不同时间点炎症因子转录表达情况,b:P<0.01,d:P<0.001,均与IR-0 d相比

图1　不同辐射剂量对小鼠肠道屏障功能和炎症因子的影响

2.2 长期 CMC-Na 饮食会影响小鼠营养状况,降低其对辐射的耐受能力

为了确定 CMC-Na 的摄入对辐射耐受性的影响,通过饲饮水中添加不同浓度 CMC-Na 的方式,对小鼠进行 8 周干预后,给予单次 7 Gy 的辐射损伤(图 2A)。通过对其进行体质量检测,发现自干预起始阶段至辐射损伤前,高剂量干预组小鼠的体质量增长速度明显滞后于其他两组(图 2B),但前白蛋白在各组之间均差异无统计学意义(图 2C),提示在正常情况下,CMC-Na 对机体内的代谢和营养状况并无明显影响,但在一定程度上降低了小鼠的体质量增长。

辐射损伤后,相较于其他两组,高剂量干预组小鼠生存率明显降低(图 2D),体质量持续低于其他两组,辐射后 14 d 时各组均到达体质量最低点(图 2E)。同时,前白蛋白水平在两个干预组中均出现了下降(图 2C)。对比小鼠的结肠长度,辐照前后各组结肠长度与 CMC-Na 添加浓度呈负相关,并存在统计学意义(图 2F、G)。



A:实验流程图;B:体质量称量记录数值 a:$P<0.000\ 1$,对照组与高剂量组,b:$P<0.05$,对照组与低剂量组比较,c:$P<0.001$,低剂量组与高剂量组比较;C:辐射损伤后不同时间点血清中前白蛋白含量($n=4$) a:$P<0.05$,对照组与高剂量组比较,b:$P<0.05$,对照组与低剂量组比较;D:辐射损伤后各组小鼠生存率($n=15$),a:$P<0.05$,对照组与高剂量组比较;E:辐射损伤后各组小鼠体质量变化情况 a:$P<0.000\ 1$,对照组组与高剂量组比较,b:$P<0.05$,对照组与低剂量组比较;F:辐射前/后各组小鼠结肠长度实体组织图;G:辐射前/后各组小鼠结肠长度统计图($n=3$),a:$P<0.001$,对照组与高剂量组比较,b:$P<0.01$,对照组与低剂量组比较,c:$P<0.05$,低剂量组与高剂量组比较,d:$P<0.05$,对照组与高剂量组比较

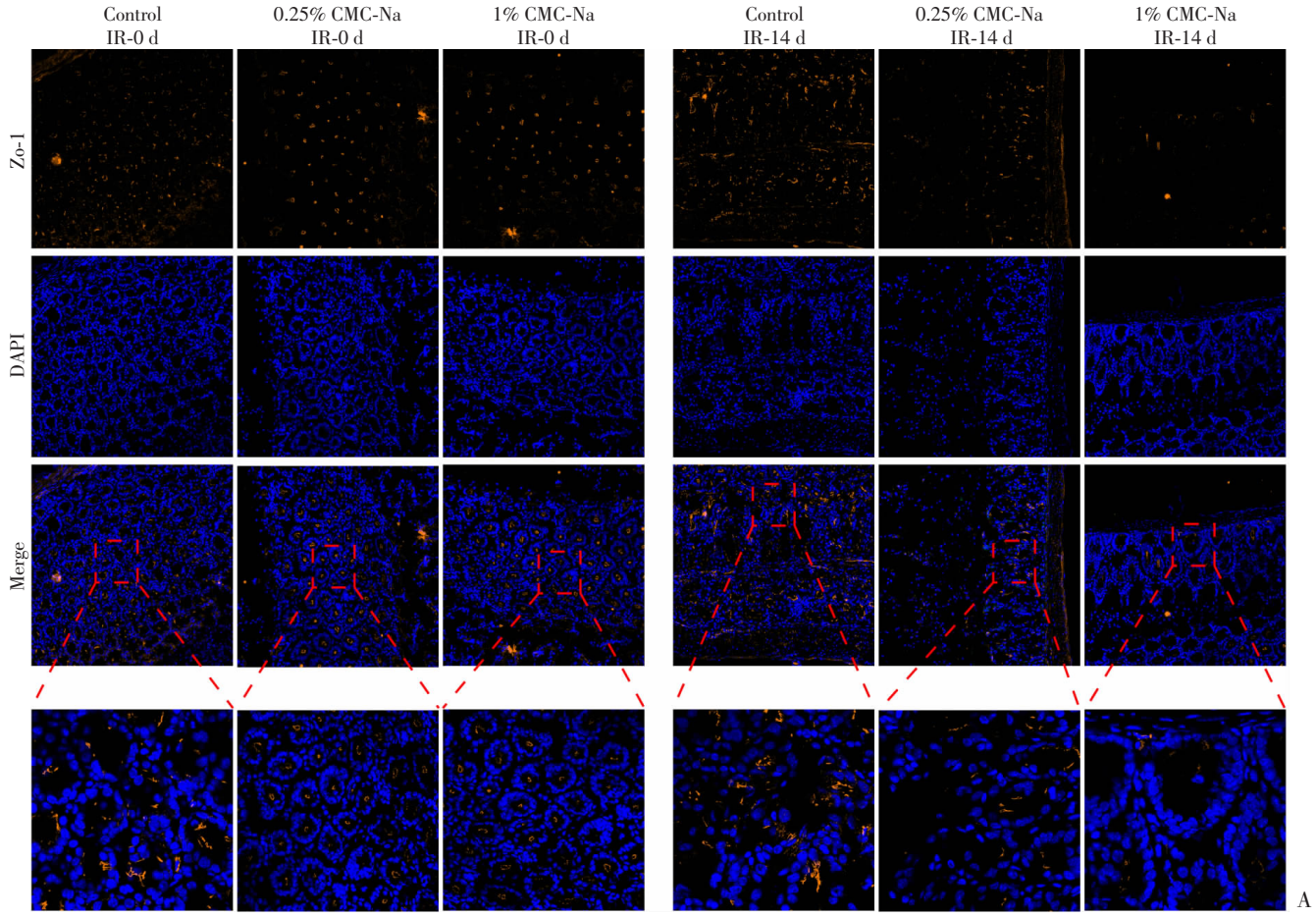
图 2 CMC-Na 饮食对小鼠营养状况及辐射耐受能力的影响

2.3 长期摄入 CMC-Na 造成小鼠肠屏障功能受损加重,破坏肠道内环境

结肠作为人体最大的微生物贮藏器官,其内部有大量细菌定植,它们在维护肠道屏障功能、影响肠道疾病的发生以及迁移性菌血症等方面起着至关重要的作用[25],但在一些特殊情况下,肠内定植菌可以进入血液,引发菌血症。如图 1 所示,辐射会导致肠道内环境破坏,我们推测这与 CMC-Na 饮食干预后对辐射耐受性下降相关。为了验证猜想,进行了紧密连接蛋白 1(Zonula Occludens-1,ZO-1)的免疫荧光检测,发现在辐射前,对照组与低剂量干预组 ZO-1 蛋白表达无明显差异,高剂量组相对较低,且部分隐窝腔内存在表达不连续或缺失;在辐射后第 14 天,两组饮食干预组的 ZO-1 表达较之对照组均出现了明显降低,与 CMC-Na 添加量具有相关性(图 3)。同样的,作为屏障蛋白组成成分的另一个重要紧密连接蛋白 Occludin,其变化情况与 ZO-1 相似。为了确定肠道屏障与炎性浸润的关系,我们将脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)与 Occludin 进行了免疫共染色,发现 LPS 与肠道屏障蛋白的表达呈负相关(图 3)。Western blot 检测结果趋势与免疫荧光相同,证明了 CMC-Na 会破坏肠屏障功能,降低了肠道的防御功能。

2.4 长期 CMC-Na 饮食造成的肠道干细胞下降及加剧辐射对其的影响

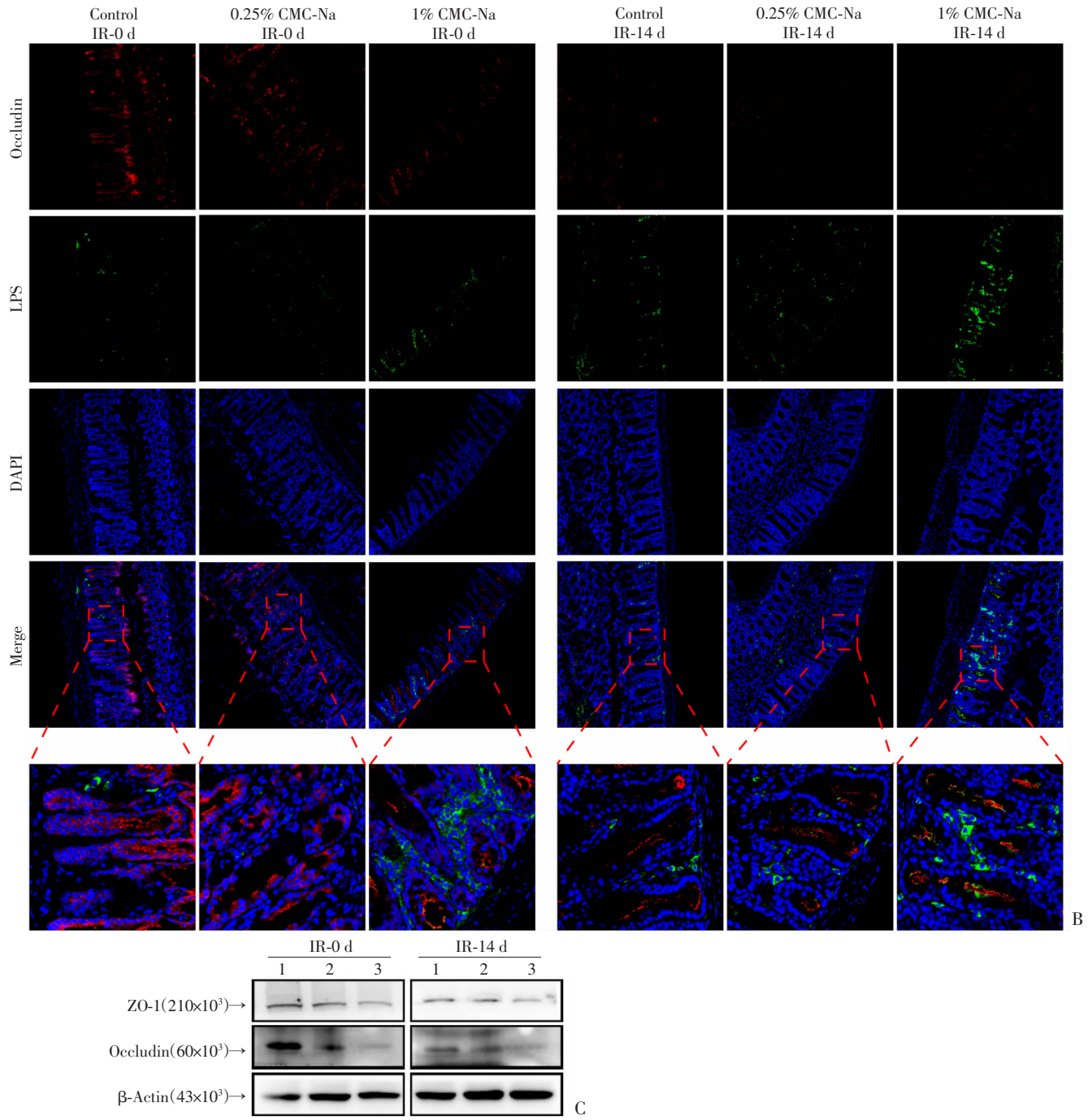
肠道内由多种细胞组成,包括上皮细胞、杯状细胞、簇状细胞等,大多数成熟细胞只能够存活 3~5 d,在不断地凋亡和更新循环当中,保持一种动态平衡[26-27]。肠道能够保持如此高效的周转率,得益于肠道内的干细胞群,他们通过不断增殖分化确保了肠道内环境的稳定。为进一步确定肠道屏障受损的原因,对结肠进行了 Ki67 免疫组化检测。饮食干预组中的 Ki67 在辐照前已出现了明显的表达降低(图 4A),辐照加剧了此现象,其表达强度与 CMC-Na 添加剂量呈负相关(图4B)。根据WANG等[28]报道的结肠干细胞



A:结肠 Zo-1(橙色)单染色免疫荧光染色共聚焦图

图 3 摄入 CMC-Na 对小鼠肠屏障功能的影响

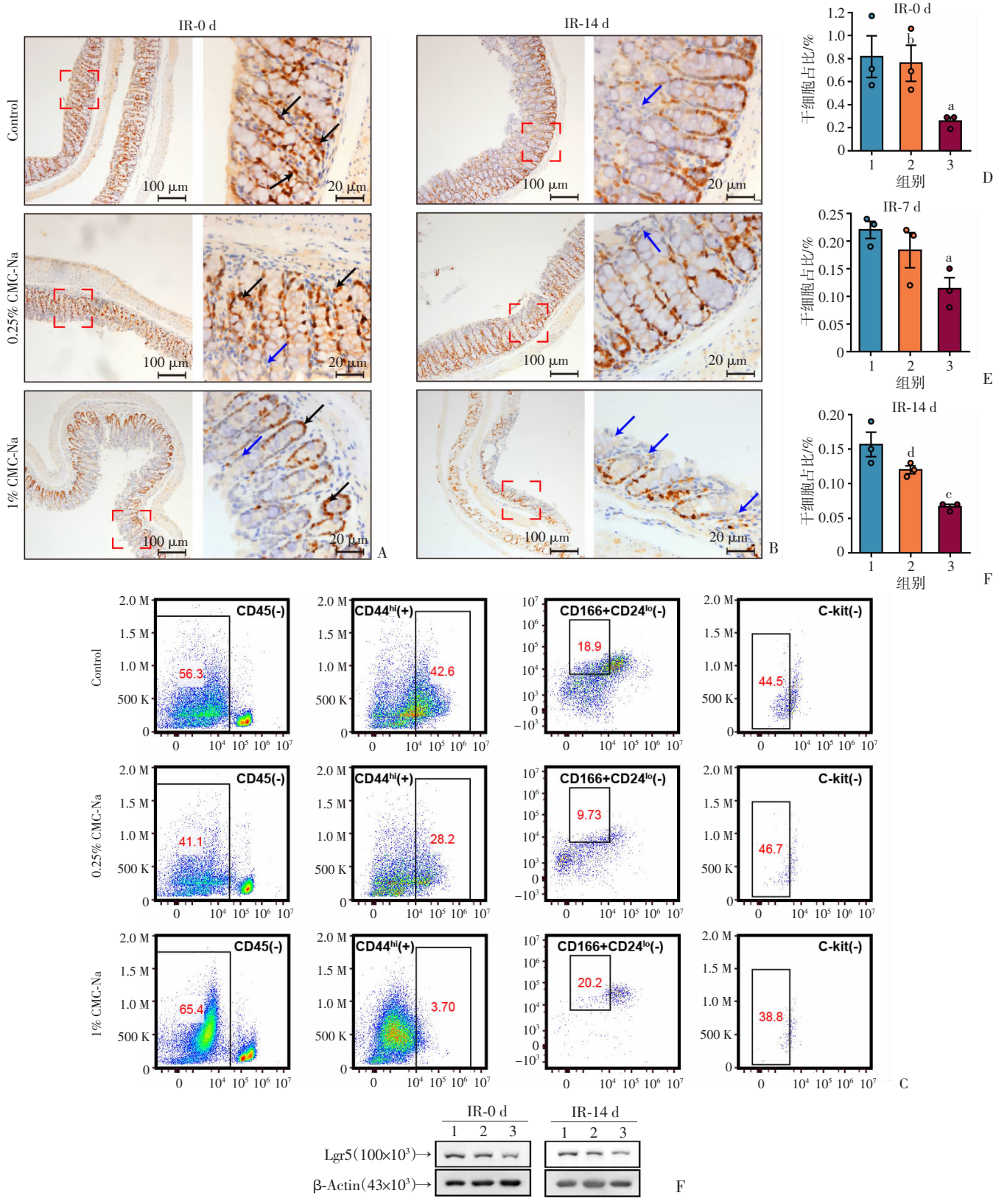
(图 3B、C 续下页)



B:结肠 Occludin(红色)和 LPS(绿色)复合染色免疫荧光共聚焦图; C: Western blot 检测辐射前后结肠 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达情况;1:Control; 2: 0.25% CMC-Na; 3: 1% CMC-Na

续图 3 摄入 CMC-Na 对小鼠肠屏障功能的影响

表面 Marker(图 4C),运用流式细胞术检测肠道干细胞数比例,在辐照前高剂量组的干细胞比例较之其他两组已有明显下降(图 4D),至辐射第 7 天和第 14 天,高剂量饮食干预组的肠道干细胞比例持续处于低水平状态。低剂量饮食干预组较之对照组也出现了比例下降,但稍高于高剂量饮食组(图 4E、F)。富含亮氨酸的重复 G 蛋白偶联受体 5(Lgr5)是肠道干细胞群表面标记物,Lgr5+隐窝基底柱状细胞通过维持肠道内各类组织细胞的更新,确保肠道内部环境的稳定。Western blot 结果发现 Lgr5 与 Ki67 和流式细胞术结果趋势相一致(图 4G)。



1：Control；2：0.25% CMC-Na；3：1% CMC-Na

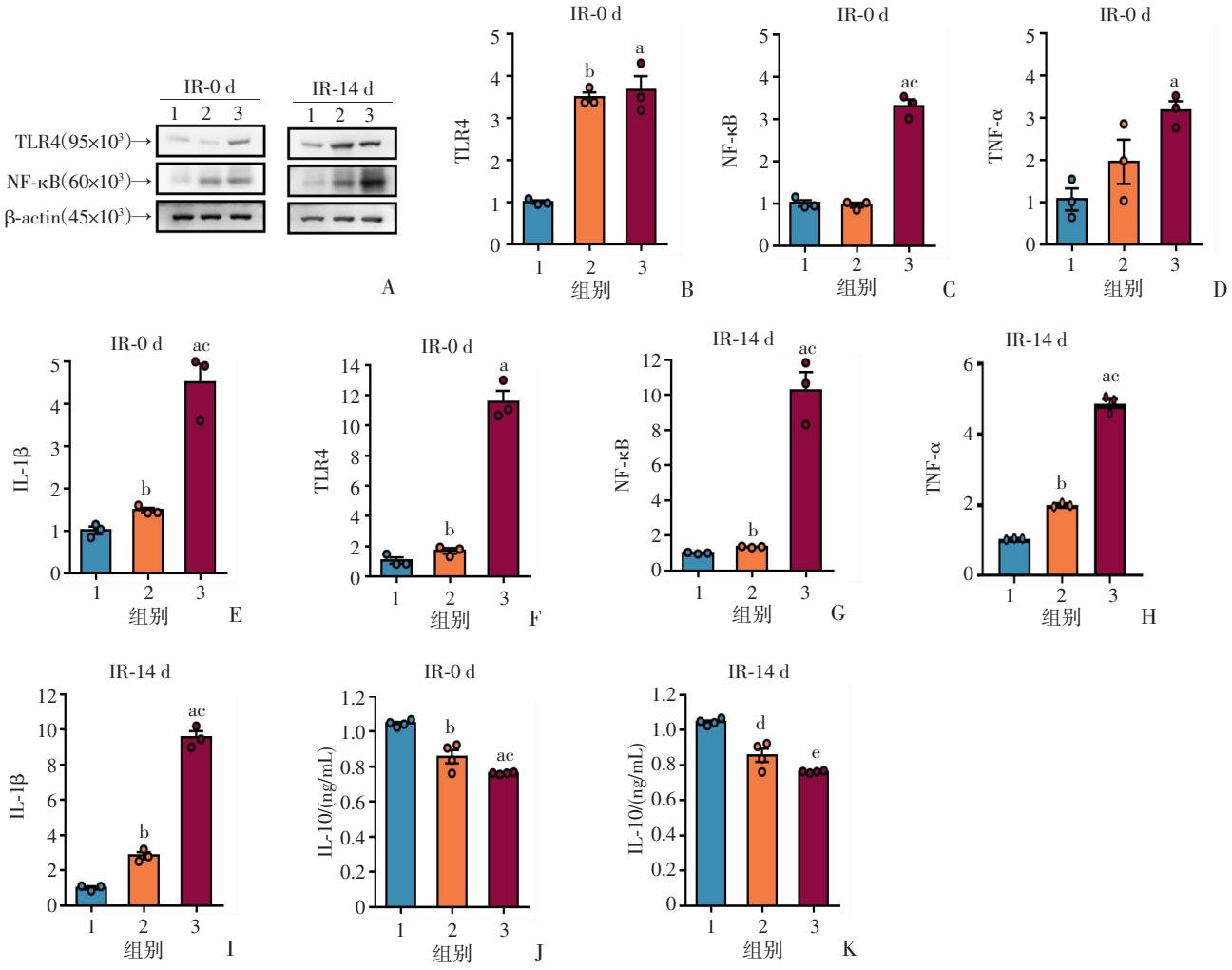
A:辐射前结肠组织 Ki67 免疫组化染色　黑色:免疫染色表达,蓝色:免疫染色未表达；B:辐射后第 14 天结肠组织 Ki67 免疫组化染色；C:结肠干细胞流式表型鉴定图；D-F:辐射前后不同时间点肠道干细胞数比例统计图　a：$P<0.05$，与对照组比较,b：$P<0.05$,与高剂量组比较,c：$P<0.01$,与对照组比较,d：$P<0.01$,与高剂量组比较;G：Western Blot 辐射前后结肠 Lgr5 蛋白表达情况

图 4　CMC-Na 饮食对小鼠肠道干细胞的影响

2.5 长期 CMC-Na 饮食引发肠道内环境破坏并造成肠道炎症反应增强

通过 Western blot 检测结果发现,在辐射损伤前,与对照组相比,高剂量饮食干预组中炎性蛋白的表达已出现升高,各炎症相关因子的转录表达明显增强;辐射损伤后,高剂量干预组结肠的炎症蛋白表达较其他两组差异明显增强(图 5A)。对比辐射前后各组结肠组织中炎症因子转录表达就可以看出,在未受辐射损伤前,饮食干预组中即出现了炎症转录表达升高(图 5B~E),并在受到辐射后进一步增强(图 5F、I),其程度与饲饮水中 CMC-Na 浓度成正相关。而通过 ELISA 检测发现,炎症抑制因子白介素-10(IL-10),辐射前后在两组饮食干预组中均出现了含量减低(图 5J、K),这可能与之前讨论的肠道干细胞数量减少造成的肠道内环境破坏,导致的各类细胞修复增值能力减弱有关。

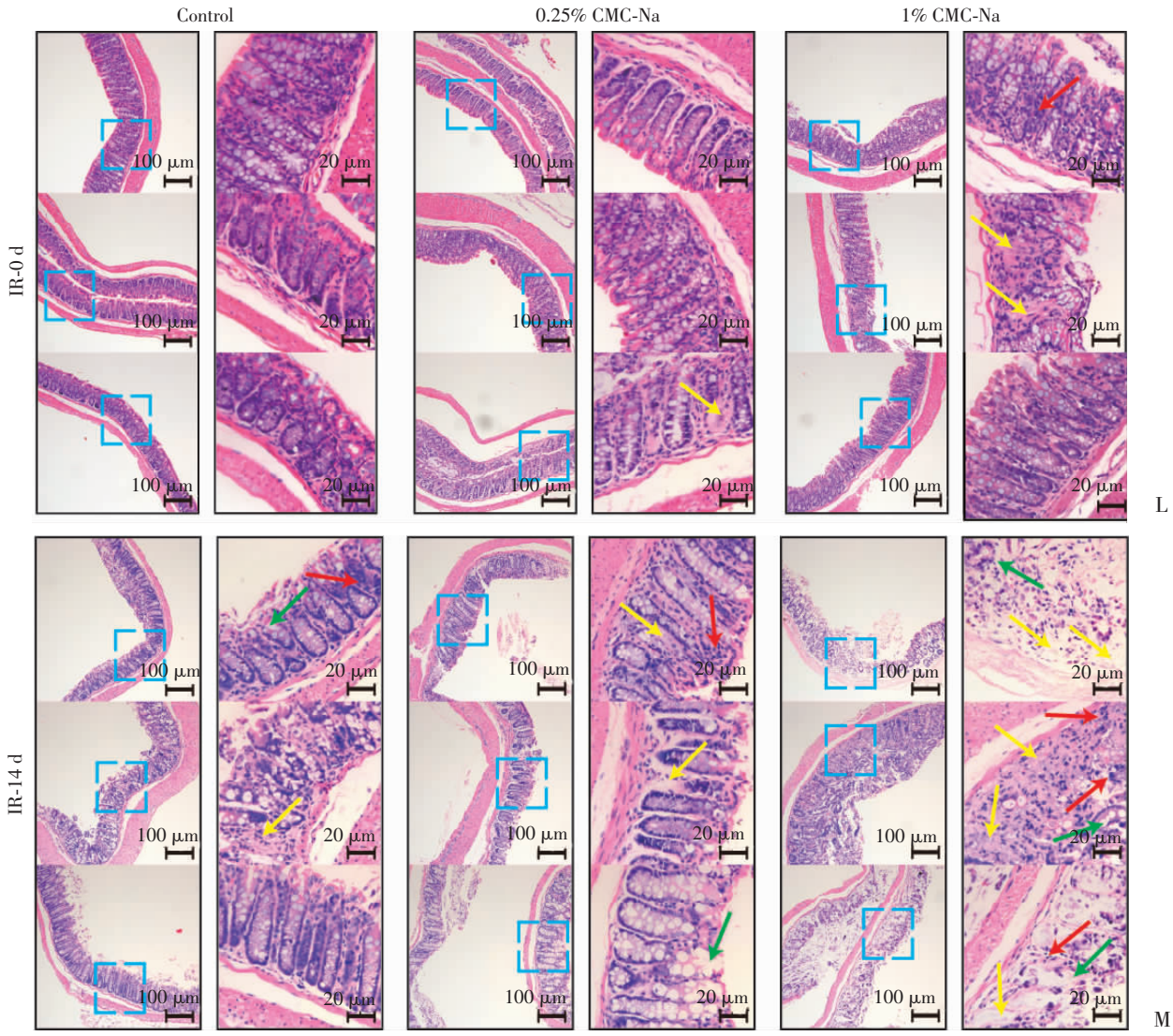
比较辐射前后结肠 HE 发现,辐照前高剂量组中部分肠段已出现缺损,并伴有少量炎症细胞浸润(图 5L),但通过双盲法进行肠道炎症组织评分(图 5N),各组间无统计学差异(图 5O)。而在辐射后,高剂量饮食干预组中肠腺出现了明显的结构扭曲和以及隐窝分支改变,并伴有大量的炎症细胞浸润(图 5M),高剂量饮食干预组评分显著高于其他两组(图 5P),这种损伤的情况,极大可能是由于肠干细胞比例下降导致的损伤修复能力滞后,以及炎症浸润加剧的双重影响加持下的结果。



1: control; 2: 0.25% CMC-Na 组;3: 1% CMC-Na 组

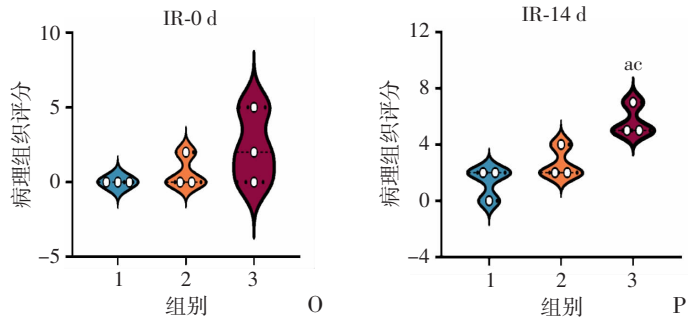
A:Western blot 检测辐射前后结肠 TLR4 和 NF-κB 蛋白表达情况; B-I:辐射前后结肠组织炎症因子转录表达情况; J、K:辐射前后结肠组织中 IL-10 含量 a: $P<0.000\ 1$, b: $P<0.01$, 与对照组比较,c: $P<0.05$,与低剂量组比较; d: $P<0.000\ 1$,与对照组比较,e: $P<0.001$,与低剂量组比较

图 5 CMC-Na 饮食对小鼠肠道内环境肠道炎症反应的影响



评分	炎症	浸润深度	隐窝损伤程度	损伤占比(%)
0	无	无	无	无
1	轻度	局限于黏膜层	小于 1/3 基底部	0-25
2	中度	黏膜及黏膜下层	1/3-2/3 基底部	26-50
3	重度	透壁性	仅有上皮部完整	51-75
4			整个隐窝和上皮缺如	>75

N



1: control; 2: 0.25% CMC-Na 组;3: 1% CMC-Na 组

L、M:辐射前后结肠组织切片 HE 染色图 红色:炎症损伤,黄色:肠腺萎缩或缺如,绿色:肠腺畸形; N:结肠 HE 组织病理评分表; O:辐射前结肠组织病理评分统计图; P:辐射后结肠组织病理评分统计图 a: $P<0.05$,与对照组比较; c: $P<0.05$,与低剂量组比较

续图 5 CMC-Na 饮食对小鼠肠道内环境肠道炎症反应的影响

3 讨论

CMC-Na 由于其能够延长食物的货架期,稳定食物的性状,已经成为食品加工方面不可或缺的添加剂,其使用量占所有食品添加剂总量的 50%,是当今食品加工产业中使用量最多的添加剂类型[30]。尽管,在美国 FDA 以及世界卫生组织和世界粮农组织联合发布的《国际食品标准食品添加剂通用法典标准》中,明确

了该添加剂在食品加工环节须需设置 ADI 值(Acceptable Daily Intake,每日允许摄入量),我国的《食品添加剂使用标准》也参照了前者的规范内容,未设置其在食品生产中的使用限制。但已有多篇文献报道了其对于肠道内环境的破坏,包括提高了炎症性肠病的发病率[19,21]、降低了对外界化学和物理刺激的耐受能力[23]以及引发机体代谢综合征[9]等一系列问题。但对于辐射耐受性的影响,研究并不多见,尤其是不同添加剂量与辐射耐受能力的影响的相关性研究尚无报道。

通过实验发现,长期摄入高剂量 CMC-Na 食物,会导致小鼠对辐射耐受性的减低,主要表现在生存率的下降以及体重的丢失两方面。造成这一结果的原因,很可能是由于肠屏障蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达缺失,导致肠道防御功能下降。通过流式细胞术检测,我们发现饮食干预组中肠道干细胞比例较对照组出现下降,下降程度与添加剂的浓度呈正相关。鉴于受到辐射损伤后,机体会动员肠道干细胞分化为上皮、免疫、分泌等功能细胞[26,31],用以应对修复损伤的肠道组织。考虑到肠道内动态稳定的特性,我们有理由认为,长期 CMC-Na 饮食干预造成的小鼠对辐射耐受性下降,很有可能是由于干细胞群的减少引发的肠道内环境破坏。尽管低剂量组在生存率与体重维持能力方面,与对照组并无明显差异,但其肠道干细胞的比例在受到辐射后也出现了较为明显的下降,可能是由于自身的代偿能力,因而未对耐受性产生明显影响。

除干细胞群的比例下降之外,我们还要看到 CMC-Na 对于肠道炎症反应的增益效应。尤其是炎症通路的核心调控因子 NF-κB,即使未受到辐射损伤,在长期 CMC-Na 饮食的干预下,其表达也出现了明显增强。有诸多文献研究,均报道了 NF-κB 在炎症性结肠疾病当中的主导作用,其不仅能够增加组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎症因子的含量[32],同时在大肠癌的病患当中,还可以通过增强 CRC 细胞的黏附和转移能力,促进结直肠癌细胞的外溢转移和侵袭[33]。

然而,对于炎症反应与肠道干细胞变化之间的关系,目前的研究对此尚无因果关系的定论。有报道指出,通过抑制炎症通路的表达,可以稳定肠道内隐窝的状态并改善 Lgr5+干细胞的增殖能力[34-35],但也有部分学者指出,肠道干细胞功能和数量的稳定,是降低肠道中炎症反应的核心关键点[36-37]。综合此次实验研究数据分析来看,炎症表达增强和干细胞群比例下降的现象同时存在,但同时伴有 IL-10 的含量减少,这种致死性的炎症反应有极大可能是肠道内环境稳态失衡造成的免疫系统崩溃,剧烈的损伤刺激迫使肠道干细胞优先确保组织结构的完整性,这与生理状态下肠道的自我更新有着本质区别。当然,结合其他实验文献报道,我们也不能排除炎症与肠道干细胞之间存在着交互影响,关于二者之间的因果联系需要更进一步的实验和研究。

当然,作为一款被广泛应用的食品添加剂,CMC-Na 的使用安全性还是值得肯定的。综合之前的文献和此次研究结果来看,其产生的严重不良后果,多伴随有重度感染、免疫缺陷、基础疾病以及辐射损伤[13,20-21]等前提条件,并且实验小鼠在 CMC-Na 的摄入方式和摄入量上与人类的日常行为并不完全相同。但我们不能忽视的是,随着食品工业的发展和生活节奏的日益加快,预制菜、料理包以及深加工的零食糕点等预包装食品消费量处于上升趋势。近年来,这类食物的日均摄取比重已经变得越来越大[38],尤其是青少年和中青年群体已经成为该类食品添加剂的消费大户[39-40]。因为即便是在正常机体当中,仍有肠道菌群改变、肠内环境破坏以及肠道持续性炎症[8,11,19]等情况的存在。

综上所述,长期食用含有 CMC-Na 添加剂食物的饮食结构,会造成肠道内干细胞群比例的下降和持续性炎症,破坏了肠道生理和防御功能,进而加重了小鼠肠道放射后的损伤。在临床治疗应用过程中,绝大部分接受放化疗的病人都面临着不同表现形式的肠道副作用,因而对于此类人群更应该重视其日常的饮食结构,尽可能避免含有该类添加剂的食物,降低肠道损伤的可能。同时,对于 CMC-Na 在食品加工中的使用范围和含量限额,需要在今后的研究中进一步完善和明确。

参考文献:

[1] 李玉岭, 毛欣, 张元帅, 等. 辐射诱变技术在木本植物育种中的应用及展望[J]. 生物技术通报, 2023, 39(6): 12-30. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-1008.
LI Y L, MAO X, ZHANG Y S, *et al*. Applications and perspectives of radiation mutagenesis in woody plant breeding [J]. Biotechnol Bull, 2023, 39(6): 12-30. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-1008.

[2] 周信宏, 黄钢. PET-CT 多模态融合在图像语义分割的应用进展[J]. 中国医学物理学杂志, 2023, 40(6): 683-694. DOI: 10.3969/j.issn.1005-202X.2023.06.004.
ZHOU X H, HUANG G. Multimodal fusion of PET-CT for semantic image segmentation: a review[J]. Chin J Med Phys, 2023, 40(6): 683-694. DOI: 10.3969/j.issn.1005-202X.2023.06.004.

[3] 李珅, 辛军. PET/CT 预测非小细胞肺癌 EGFR 突变与靶

向治疗疗效的研究进展[J]. 中国临床医学影像杂志, 2023, 34(6): 437-440. DOI: 10.12117/jccmi.2023.06.012.
LI S, XIN J. Current progress for predicting EGFR mutations in patients with non-small cell lung cancer and exploring the efficacy of targeted therapy using of PET/CT images[J]. J China Clin Med Imag, 2023, 34(6): 437-440. DOI: 10.12117/jccmi.2023.06.012.

[4] SUZUKI K, YAMASHITA S. Radiation-induced bystander response: mechanism and clinical implications[J]. Adv Wound Care, 2014, 3(1): 16-24. DOI: 10.1089/wound.2013.0468.

[5] PARRISH J S, SEDA G. Disasters resulting from radiologic and nuclear events[J]. Crit Care Clin, 2019, 35(4): 619-631. DOI: 10.1016/j.ccc.2019.06.005.

[6] COX S, SANDALL A, SMITH L, *et al*. Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment[J]. Nutr Rev, 2021, 79(6): 726-741. DOI: 10.1093/nutrit/nuaa038.

[7] SHAH R, KOLANOS R, DINOVI M J, *et al*. Dietary exposures for the safety assessment of seven emulsifiers commonly added to foods in the United States and implications for safety[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2017, 34(6): 905-917. DOI: 10.1080/19440049.2017.1311420.

[8] OGULUR I, YAZICI D, PAT Y, *et al*. Mechanisms of gut epithelial barrier impairment caused by food emulsifiers polysorbate 20 and polysorbate 80[J]. Allergy, 2023, 78(9): 2441-2455. DOI: 10.1111/all.15825.

[9] CHASSAING B, KOREN O, GOODRICH J K, *et al*. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome[J]. Nature, 2015, 519(7541): 92-96. DOI: 10.1038/nature14232.

[10] LI Y, XIAO H W, DONG J L, *et al*. Gut microbiota metabolite fights against dietary polysorbate 80-aggravated radiation enteritis[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1450. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01450.

[11] CHASSAING B, COMPHER C, BONHOMME B, *et al*. Randomized controlled-feeding study of dietary emulsifier carboxymethylcellulose reveals detrimental impacts on the gut microbiota and metabolome[J]. Gastroenterology, 2022, 162(3): 743-756. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.11.006.

[12] ZANGARA M T, PONTI A K, MILLER N D, *et al*. Maltodextrin consumption impairs the intestinal mucus barrier and accelerates colitis through direct actions on the epithelium[J]. Front Immunol, 2022, 13: 841188. DOI: 10.3389/fimmu.2022.841188.

[13] FURUHASHI H, HIGASHIYAMA M, OKADA Y, *et al*. Dietary emulsifier polysorbate-80-induced small-intestinal vulnerability to indomethacin-induced lesions via dysbiosis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2020, 35(1): 110-117. DOI: 10.1111/jgh.14808.

[14] LAUDISI F, DI FUSCO D, DINALLO V, *et al*. The food additive maltodextrin promotes endoplasmic reticulum stress-driven mucus depletion and exacerbates intestinal inflammation[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2019, 7(2): 457-473. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.09.002.

[15] 牛生洋, 郝峰鸽. 羧甲基纤维素钠的应用进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(15): 3574-3575. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2006.15.005.
NIU S Y, HAO F G. Application progress of sodium carboxymethyl cellulose[J]. J Anhui Agric Sci, 2006, 34(15): 3574-3575. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2006.15.005.

[16] Organization W H, Nations F A A O. The Codex General Standard for Food Additives[S]. Ccfa, 2019.

[17] China N H C O. National standards for food safety. Standards for the use of food additives[S]. China T C O S, 2015.

[18] KORDAHI M C, DELAROQUE C, BREDÈCHE M F, *et al*. Vaccination against microbiota motility protects mice from the detrimental impact of dietary emulsifier consumption[J]. PLoS Biol, 2023, 21(9): e3002289. DOI: 10.1371/journal.pbio.3002289.

[19] CHASSAING B, VAN DE WIELE T, DE BODT J, *et al*. Dietary emulsifiers directly alter human microbiota composition and gene expression *ex vivo* potentiating intestinal inflammation[J]. Gut, 2017, 66(8): 1414-1427. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-313099.

[20] ROBERTS C L, KEITA A V, DUNCAN S H, *et al*. Translocation of Crohn's disease *Escherichia coli* across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers[J]. Gut, 2010, 59(10): 1331-1339. DOI: 10.1136/gut.2009.195370.

[21] ROUSTA E, OKA A, LIU B, *et al*. The emulsifier carboxymethylcellulose induces more aggressive colitis in humanized mice with inflammatory bowel disease microbiota than polysorbate-80[J]. Nutrients, 2021, 13(10): 3565. DOI: 10.3390/nu13103565.

[22] VIENNOIS E, BRETIN A, DUBÉ P E, *et al*. Dietary emulsifiers directly impact adherent-invasive *E. coli* gene expression to drive chronic intestinal inflammation[J]. Cell Rep, 2020, 33(1): 108229. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108229.

[23] HARUSATO A, CHASSAING B, DAURIAT C J G, *et al*. Dietary emulsifiers exacerbate food allergy and colonic type 2 immune response through microbiota modulation[J]. Nutrients, 2022, 14(23): 4983. DOI: 10.3390/

nu14234983.

[24] HAN Y Y, LIU L Y, CHEN Y Q, *et al*. Qing *Hua* Chang Yin alleviates chronic colitis of mice by protecting intestinal barrier function and improving colonic microflora[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1176579. DOI: 10.3389/fphar.2023.1176579.

[25] ROLHION N, DARFEUILLE-MICHAUD A. Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease[J]. Inflamm Bowel Dis, 2007, 13(10): 1277-1283. DOI: 10.1002/ibd.20176.

[26] BEUMER J, CLEVERS H. Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(1): 39-53. DOI: 10.1038/s41580-020-0278-0.

[27] GEHART H, CLEVERS H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2019, 16(1): 19-34. DOI: 10.1038/s41575-018-0081-y.

[28] WANG F C, SCOVILLE D, HE X C, *et al*. Isolation and characterization of intestinal stem cells based on surface marker combinations and colony-formation assay[J]. Gastroenterology, 2013, 145(2): 383-395. e1-21. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.04.050.

[29] TAN S H, PHUAH P, TAN L T, *et al*. A constant pool of $Lgr5^+$ intestinal stem cells is required for intestinal homeostasis[J]. Cell Rep, 2021, 34(4): 108633. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108633.

[30] 徐宝财, 王瑞, 张桂菊, 等. 国内外食品乳化剂研究现状与发展趋势[J]. 食品科学技术学报, 2017, 35(4): 1-7. DOI: 10.3969/j.issn.2095-6002.2017.04.001.
XU B C, WANG R, ZHANG G J, *et al*. Research progress and prospect in food emulsifiers[J]. J Food Sci Technol, 2017, 35(4): 1-7. DOI: 10.3969/j.issn.2095-6002.2017.04.001.

[31] BARKER N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(1): 19-33. DOI: 10.1038/nrm3721.

[32] ZHU Y, CAI P J, DAI H C, *et al*. Black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) polyphenols attenuate obesity-induced colonic inflammation by regulating gut microbiota and the TLR4/NF-κB signaling pathway in high fat diet-fed rats[J]. Food Funct, 2023, 14(22): 10014-10030. DOI: 10.1039/d3fo02177g.

[33] ZHANG Y, ZHANG L, ZHENG S, *et al*. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer cells adhesion to endothelial cells and facilitates extravasation and metastasis by inducing ALPK1/NF-κB/ICAM1 axis[J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2038852. DOI: 10.1080/19490976.2022.2038852.

[34] FRICK A, KHARE V, JIMENEZ K, *et al*. A novel PAK1-Notch1 axis regulates crypt homeostasis in intestinal inflammation[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2021, 11(3): 892-907. e1. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2020.11.001.

[35] YAN S G, WANG P, WEI H L, *et al*. Treatment of ulcerative colitis with Wu-Mei-Wan by inhibiting intestinal inflammatory response and repairing damaged intestinal mucosa[J]. Phytomedicine, 2022, 105: 154362. DOI: 10.1016/j.phymed.2022.154362.

[36] SI X M, JIA H, LIU N, *et al*. Alpha-ketoglutarate attenuates colitis in mice by increasing *Lactobacillus* abundance and regulating stem cell proliferation via wnt-hippo signaling[J]. Mol Nutr Food Res, 2022, 66(10): e2100955. DOI: 10.1002/mnfr.202100955.

[37] ZHANG D S, TANG W J, NIU H T, *et al*. Monogenic deficiency in murine intestinal Cdc42 leads to mucosal inflammation that induces crypt dysplasia[J]. Genes Dis, 2023, 11(1): 413-429. DOI: 10.1016/j.gendis.2022.11.024.

[38] 张宇凤, 于冬梅, 赵丽云. 2010—2012年中国成年居民零食消费现状及影响因素[J]. 卫生研究, 2017, 46(2): 184-188. DOI: 10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2017.02.003.
ZHANG Y F, YU D M, ZHAO L Y. Snacking consumption and influencing factors among Chinese adults in 2010—2012[J]. J Hyg Res, 2017, 46(2): 184-188. DOI: 10.19813/j.cnki.weishengyanjiu.2017.02.003.

[39] 相林, 叶丽红, 张竞雯, 等. 中国六省份中小学生预包装食品购买行为及其影响因素分析[J]. 中华预防医学杂志, 2022, 56(11): 1604-1611. DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20211126-01090.
XIANG L, YE L H, ZHANG J W, *et al*. The purchase behavior of prepackaged food and its determinants among primary and middle school students in 6 provinces of China[J]. Chin J Prev Med, 2022, 56(11): 1604-1611. DOI: 10.3760/cma.j.cn112150-20211126-01090.

[40] 王秀丽, 张颢城, 祝超然, 等. 北京市初中学生全食物消费现状研究[J]. 中国食物与营养, 2023, 29(4): 33-39. DOI: 10.19870/j.cnki.11-3716/ts.20221114.001.
WANG X L, ZHANG H C, ZHU C R, *et al*. Study on the current situation of total food consumption of junior middle school students in Beijing city[J]. Food Nutr China, 2023, 29(4): 33-39. DOI: 10.19870/j.cnki.11-3716/ts.20221114.001.

(**收稿**:2023-10-25;**修回**:2024-01-18)

(编辑 邓强庭)