DOI:10.16016/j.1000-5404.1985.01.004

^{60}Co-γ线照射对大鼠小肠粘膜γ-谷氨酰转移酶、亮氨酸氨肽酶及三磷酸腺苷酶活性的影响

肖卢媛 王德青 金晓琳 张国斌

（生化教研室）

提 要

大鼠经^{60}Co-γ线800rad全身照射后1、2、4、7和10天，分别测定小肠粘膜γ-谷氨酰转移酶（γ-GT）、亮氨酸氨肽酶（LAP）和三磷酸腺苷酶（ATP酶）的活性以及对照组的酶活性。结果发现：LAP活性于第1天较对照组升高非常显著，第2天即显著下降，并持续下降至第7天。ATP酶活性于第2天上升非常显著，第7天稍有下降。γ-GT活性于第1、2天都升高非常显著，第4天即趋于正常水平。提示这三种膜酶对射线均敏感。照射后LAP活性显著下降且持续时间较长，可能是辐射引起小肠对氨基酸吸收障碍的机理之一。照射后ATP酶及γ-GT活性的变化与小肠对氨基酸吸收机能间的联系，尚待进一步研究。

肠为辐射敏感的器官，受辐射损伤后肠粘膜刷状缘的消化酶活性发生改变，对葡萄糖和氨基酸的吸收功能也发生障碍[1][2]。Becciolini报道大鼠经8戈瑞γ-线全身照射，或以800rad腹部照射，小肠刷状缘酶如海藻糖酶、乳糖酶、麦芽糖酶和亮氨酸氨基肽酶(LAP)的活性均有变化[3][4]。Дашюк等报导大鼠经10戈瑞X-线照射后，十二指肠粘膜ATP酶活性也有改变[5]。

肠γ-谷氨酰转移酶(γ-GT, EC2.3.2.2)和LAP(EC3.4.1.1)都是位于刷状缘内的酶，而肠ATP酶(EC3.6.1.3)中的Na^+-K^+ ATP酶则位于上皮细胞浆膜面上。辐射对肠γ-GT活性的影响如何未见报导。我们测定辐射后小肠中γ-GT、LAP和ATP酶活性，目的有二：一是比较这三种膜酶对辐射的敏感性，二是由于这三种膜酶的生理功能都与氨基酸的吸收有关[6][17]。因此辐射后这三种膜酶活性的改变，可能为放射损伤肠时氨基酸吸收障碍的机理，提供某些参考资料。

方法与材料

大鼠体重200—270g，雄雌各半分为两组，照射组动物分批经^{60}Co-γ线800rad全身照射，剂量率125.39rad/分，在照射后1、2、4、7、10天活杀，取小肠一段(约1g)剪开、洗净，加入Tris-HCl缓冲液(pHT7.4)磨成匀浆，控制匀浆器旋转速度与时间（600转/分，1分钟），磨后的小肠组织，经组织切片、镜检证实：磨碎粘膜及粘膜下层，肌层破碎很少。测定小肠匀浆中γ-GT、LAP和ATP酶活性，以及蛋白质含量。对照组除不经照射外，余皆同照射组。

γ-GT测定基本按Szasz等方法[7]，以L-γ-谷氨酰对硝基苯胺及甘氨酰甘氨酸为底物，甘氨酰甘氨酸作为γ-谷氨酰基的受体，形成γ-谷氨酰基双甘肽及对硝基苯胺，后者

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为黄色可直接在410nm处，用721分光光度计（四川分析仪器厂产品），酶单位以产生1nm对硝基苯胺为1毫国际单位，本法酶单位表示为：毫国际单位/分/mg蛋白质。

LAP测定按Bauer方法[8]，以L-亮氨酰-β-萘胺为底物，LAP作用于底物使之水解释出β-萘胺，后者与萘乙烯二胺反应生成一种紫色的偶氮化合物，用721型分光光度计在570nm处比色测定。酶单位定义为：37℃保温产生1μmβ-萘胺为1国际单位。本法酶单位表示：国际单位/分/mg蛋白质。

ATP酶测定基本按Guellaen的方法[9]，略有修改。50nM Tris-HCl缓冲液(pHT7.4)，含150mM NaCl，20mM KCl，20mM $MgCl_2$，0.5mM ATP(二钠盐纯度90%以上，中国科学院上海生化研究所产品) 加入50μl。小肠匀浆(约含蛋白质1.29mg)，反应液总体积为200μl。在37℃水浴保温10分钟，立即加入15%三氯醋酸，对照管则在加入三氯醋酸后再加小肠匀浆，然后以3000转/分，离心10分钟，取上清液按Fiske和Subbarow法测定无机磷。酶活性表示为：nM/分/mg 蛋白质。

表1 两组大鼠小肠 LAP 活性比较

	对照组	照射组				
		1天	2天	4天	7天	10天
国际单位/分/mg蛋白	19.68±2.96	26.41±5.84	12.55±6.01	12.33±4.71	10.57±2.16	15.98±4.32
	(43)	(19)	(12)	(15)	(14)	(9)
P		<0.005	<0.01	<0.001	<0.001	>0.05

括号内数字为动物数，或分批照射的动物数

表2 两组大鼠小肠 ATP 酶活性比较

	对照组	照射组				
		1天	2天	4天	7天	10天
nm/分/mg蛋白	16.64±1.53	16.87±3.86	27.20±5.66	16.84±7.15	14.20±4.25	16.72±3.50
	(26)	(12)	(7)	(10)	(16)	(10)
P		>0.05	<0.005	>0.05	>0.05	>0.05

括号内数字为动物数，或分批照射的动物数

表3 两组大鼠小肠 γ-GT 活性比较

	对照组	照射组				
		1天	2天	4天	7天	10天
毫国际单位/分/mg蛋白	8.41±0.95	15.99±6.22	14.32±4.76	8.74±2.48	9.90±2.75	8.83±1.84
	(48)	(38)	(13)	(17)	(17)	(10)
P		<0.001	<0.005	>0.05	>0.05	>0.05

括号内数字为动物数，或分批照射的动物数

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结　果

照射组在照射后1、2、4、7、10天小肠LAP、ATP 酶和γ-GT的活性，以及对照组上述三种酶的活性分别见表1，2，3。

从表 1 可知照射后第一天LAP活性升高非常显著，2、4、7天显著下降，第10天趋于恢复正常水平。表 2 说明照射后第二天ATP酶活性升高非常显著，第四天恢复正常水平，第七天稍有降低但无统计学上显著性差别，第十天基本恢复至正常水平。表 3 说明照射后第一、二天，γ-GT活性非常显著地增高，以后趋于恢复正常对照组水平。照射组这三种酶的动态变化曲线见图 1，2，3。

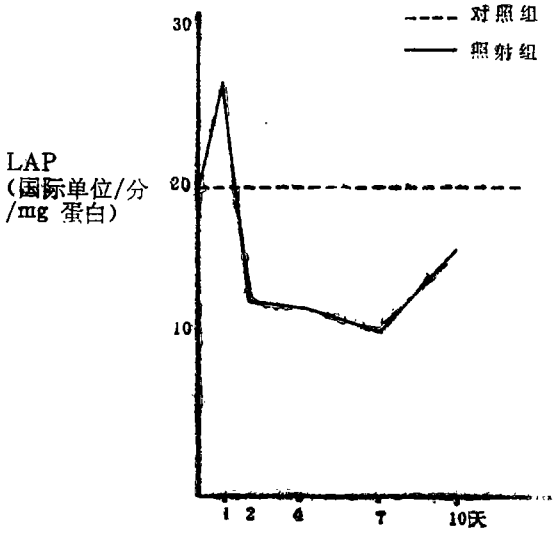


图 1　照射后不同时期LAP活性的变化

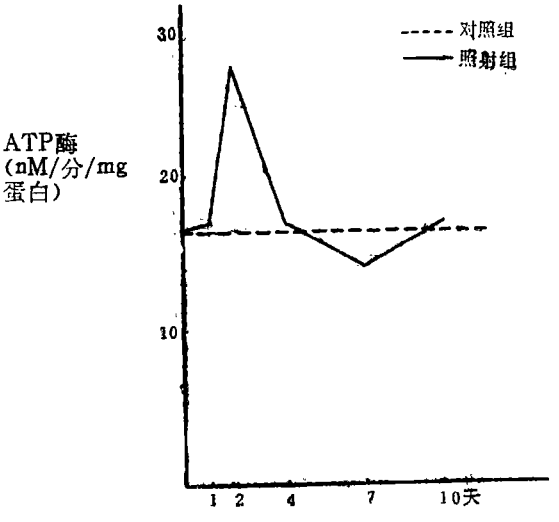


图 2　照射后不同时期ATP酶活性的变化

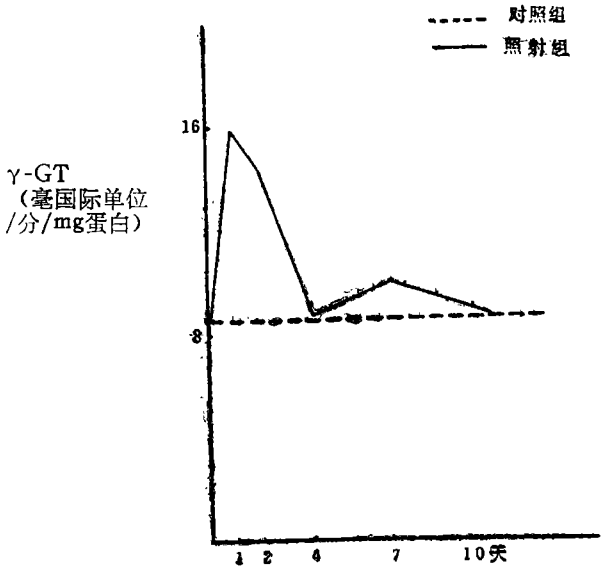


图 3　照射后不同时期γ-GT活性的变化

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

讨　论

大鼠照射后小肠LAP活性于第一天即非常显著地升高，2、4、7天下降非常显著，10天趋向恢复正常水平，但仍低于正常（图1）。此变化情况基本上与Becciolini等报导的相近[4]。Tsubouchi等报导小鼠以X-线1000rad全身照射后，第一、二天小肠LAP活性升高，第三天酶活性降低，第五天恢复至正常水平[11]。以上结果表明：大鼠经800rad全身照射后小肠LAP活性变化大致可分为3个时相。第一时相照射后24小时，在此期间ALP活性明显增高，可能由于射线直接作用于膜酶使之激活。第二时相为照射后2—7天，在此期间LAP活性显著下降，可能由于射线的间接作用产生HO·和O^-_2·等自由基造成膜损伤。或由于O^-_2·等自由基破坏LAP活性部位的必需基团所致[12]。也有可能系射线破坏肠隐窝干细胞的增殖，致使细胞数减少，酶的合成量减少[13]。第三时相为照射后第十天，此时期酶活性开始上升恢复正常水平。可能由于自由基被体内清除，消除了破坏酶活性的因素。或由于肠隐窝干细胞损伤修复，细胞增殖恢复，细胞数增多，酶合成增加之故[13][14]。

照射后ATP酶活性变化曲线（图2），第一天变化不明显，第二天则非常显著地升高，第四天开始降低至正常水平。与文献结果比较稍有不同。Дацюк报导大鼠以10戈瑞X-线全身照射，十二指肠粘膜ATP酶活性于1～6小时后即显著增高，以后渐降低。4至9天酶活性稍低于正常对照组[5]。因此，他们的结果ATP酶活性上升出现得早（照射后1—6小时），而我们的结果是第二天才出现ATP酶活性显著上升。这可能与照射剂量、所取样品的部位以及匀浆制备等不同有关。4至9天后ATP酶活性稍低于正常水平是基本一致的。

照射后小肠γ-GT活性变化曲线(图3)，第一、二天酶活性都有非常显著地升高，第四天即恢复正常水平，未见酶活性降低。

此三种酶对放射敏感性上看，它们都对射线敏感，照射后酶活性均有变化，一致都有活性增高的表现。除γ-GT外，LAP和ATP酶还有酶活性降低，特别是LAP降低非常显著且持续时间长。

LAP、ATP酶和γ-GT这三种酶都与肠道中氨基酸的吸收有密切联系。LAP可能参与短链肽或二肽的细胞外或细胞内的消化作用[15]。目前所知转运20种氨基酸的载体系统主要有5个[16][17]，这5个系统的转运过程大多数都是Na^+-依赖的，即氨基酸转运时伴有Na^+的同向转运，因此Na^+-K^+ATP酶也参与氨基酸的吸收，Na^+-不依赖的中性氨基酸转运系统，其机理可能与γ-GT的作用有关[18]。

LAP活性在照射后第二天就有明显降低，并持续至第七天。LAP活性降低可致短链肽的细胞外和细胞内的消化作用受到障碍，从而影响氨基酸的吸收。因此LAP活性降低可能系放射影响氨基酸吸收障碍的机理之一。

我们所测定的ATP酶包括了Mg^*-ATP酶和Na^+-K^+ATP酶，因此也能反映Na^+-K^+ATP酶活性。然而ATP酶活性在照射后第7天稍有降低，但不显著无统计学上意义，故难以说明在氨基酸转运中的障碍机理。γ-GT活性变化出现显著升高，酶活性也未见降低，所以要阐明辐射对氨基酸吸收障碍的机理，是否与Na^+依赖的和Na^+不依赖的转运有关，还需进一步的研究。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参 考 文 献

1. Nestereuko VS & Piskarev AV:Changes in the functional state of Small Intestine of mice after local fractional exposure. Radiobiologiya 1979; 19(6):912

2. Mohiuddin M, et al: Changes in absorption of glucose and proline following irradiation to the exteriorized ileum. Rad Res 1978;74,186

3. Becciolini A, et al: Modifications in the brush border enzymes of the Small Intestine after irradiation at different times of day. CA 1983; 98:139813 j

4. Becciolini A, et al: Effect of ionizing on the enzymes of the intestinal mucosa of rats at different time intervals after abdominal irradiation. Rad Res 1972; 49,213

5. Дацюк ЛА и др: Влияние рентгеновского облучения на атфазиую активность слизистой оболоки двенадцатиперстной кишки крыс. Рефку,70, Ради Биология 1982; 7,7067

6. Marous S, et al:The Aminopeptidase from Hog Intestinal brush border. BBA 1973; 321,282

7. Szasz G, et al: Reaction rate method for γ-GT actvity in serum. Clin Chem 1976; 22, 2051

8. Clin Lab Methods ed by Bauer JD et al. 8th ed. 1974; p. 486

9. Guellaen G, et al: Biochem Pharm 1978; 27,641

10. Lowry OH, et al:JBC 1951; 193,265

11. Tsubouchi S, et al: Recovery of function & Cell population in the intestine epithelium of x-irradiation mice. Rad Res 1973; 56, 345

12. Ewing D: Synergistic damage from H_2O_2 & OH radicals in radiated cells. Rad Res 1983; 94, 171

13. 杨素娟：电离辐射对小肠隐窝的影响。国外军事医学资料1983；2:68

14. 袁丽珍：辐射对小鼠空肠绒毛某些消化酶的影响。军事医学科学院院刊1983；1:21

15. Hirji KN, et al: Leucine aminopeptidase activity in the digestive tract of perch perca fluviatilis L. CA1983; 98:31720n

16. Shotwell MA, et al: The regulation of Neutral Amino acid transport by amino acid availability in animal cells. TIBS 1983; 8(9):314

17. Shotwell MA, et al: The regulation of Neutral Amino acid transport in mammalian cells. BBA 1983; 737(2):267

18. Alton Meister:On the enzymology of amino acid transport. Science 1973; 180,33

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Effect of ^{60}Co Irradiation on Activities of γ—glutamyl Transferase Leucine Aminopeptidase & Adenosine Triphosphatase in Rats

Shiao Luyuan et al

(Department of Biochemistry, Third Military Medical College)

The levels of activities of γ-glutamyl transferase(γ-GT), leucine aminopeptidase (LAP) and adenosine triphosphatase (ATP-ase) of the small intestinal mucosa of rats were determined on the 1st,2nd, 4th, 7th and 10th day after total body irradiation with 800 rad of ^{60}Co gamma rays. The results were as follows: After irradiation, the activity of LAP increased markedly on the 1st day and then decreased significantly on the 2nd day to the 7th day; the activity of ATP-ase increased markedly on the 2nd day and then slightly decreased on the 7th day; the activity of γ-GT increased markedly on the 1st and 2nd days and then returned to normal on the 4th day.

The results suggests that these three membranous enzymes are sensitive to gamma rays. The decrease of LAP activity may be due the disturbance of one of the mechanisms concerning the absorption of amino acids through the small intestines after gamma rays irradiation, while the relationship between the alterations of the activities of ATP-ase and γ-GT and the mechanisms of amino acid absorption remains to be investigated further.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net