

小鼠肠腺辐射损伤后存活干细胞数的概率分布

周元恺

胡琳

(第四军医大学医学防护教研室) (第四军医大学医用统计组)

小肠上皮是一个细胞更新系统,它的干细胞位于肠腺内。目前,对正常肠腺内干细胞的形态、数量及其在肠腺内的部位尚未取得一致的意见^[1]。以大剂量射线照射后,当部分肠腺出现死亡时,可在 Withers 及 Elkind^[2] 提出三点假设的基础上,根据实测的肠腺存活率计算单个肠腺内平均存活的干细胞数目。这三点假设为:(1)细胞的存活彼此独立。(2)只要肠腺内有一个干细胞存活,该肠腺即可再生。(3)单个肠腺内存活干细胞的数目呈泊松分布。对这三点假设直接实验证明颇为困难。Hagemann, R.F. (1971)曾对此讨论过。本文试图作进一步探讨。

一、材料和方法

1. 实验动物 LACA 小鼠,10—12 周龄,雌性。

2. 照射方法 以 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线全身照射,剂量率为 144.4 拉德/分。将动物分成 8 组,每组 5 只。照射剂量分别为 100, 300, 500, 700, 900, 1100, 1300, 1500 拉德。对照组 5 只不照射。

照射后 72 小时以颈椎脱臼法处死,取标本检查。

3. 肠腺存活率的测定 用单位面积肠腺计数法^[3]测出回肠末端肠粘膜单位面积上的绒毛数和肠腺数。由此可计算肠腺绒毛比(即平均每绒毛所含肠腺数)。肠腺存活率可由下式计算。

肠腺存活率 =

$$\frac{\text{照射肠片上的肠腺绒毛比}}{\text{正常肠片上的肠腺绒毛比}} \times 100\%$$

4. 单个肠腺内细胞数及有丝分裂细胞数的测定 用 Wimber, D.E 等 (1960) 的肠腺压片法计数单个肠腺内的细胞数及有丝分裂细胞数,方法上我们又略作改进。每个实验组共测 300 个肠腺。

二、结 果

1. 肠腺存活率 照射后 72 小时, 100, 300, 500 及 700 拉德组的肠腺数目在正常水平;而 900, 1100, 1300 及 1500 拉德组有肠腺死亡,其肠腺存活率分别为 67.1%、50.7%、11.5% 及 2.5%,在半对数坐标上呈直线下降。

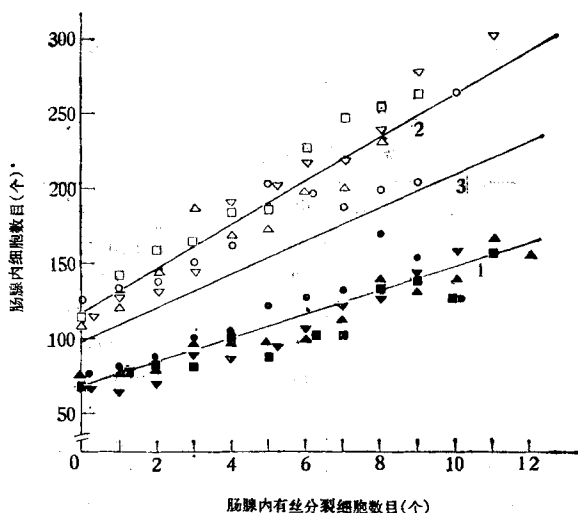


图 1 单个肠腺内有丝分裂细胞数同细胞数的关系

△△: 100 拉德 ▲▲ 900 拉德
□□: 300 拉德 ■■ 1100 拉德
○○: 500 拉德 ●● 1300 拉德
▽▽: 700 拉德 ▼▼ 1500 拉德

每实验组测定 300 个肠腺

直线 1 的方程式为 $Y=67.0+7.76X$

直线 2 的方程式为 $Y=119+13.9X$

直线 3 系对照组,方程式为 $Y=96.0+11.3X$

2. 单个肠腺内有丝分裂细胞数目同细胞数目的关系 由图 1 可以看出, 正常肠腺内及照射后 72 小时每一剂量组肠腺内的有丝分裂细胞数目同细胞数之间呈直线关系。有趣的是, 900、1100、1300 及 1500 拉德组的数据分布比较集中, 可用方程 1 表示, 而 100、300、500 及 700 拉德组的数据分布比较集中, 可用方程 2 表示。

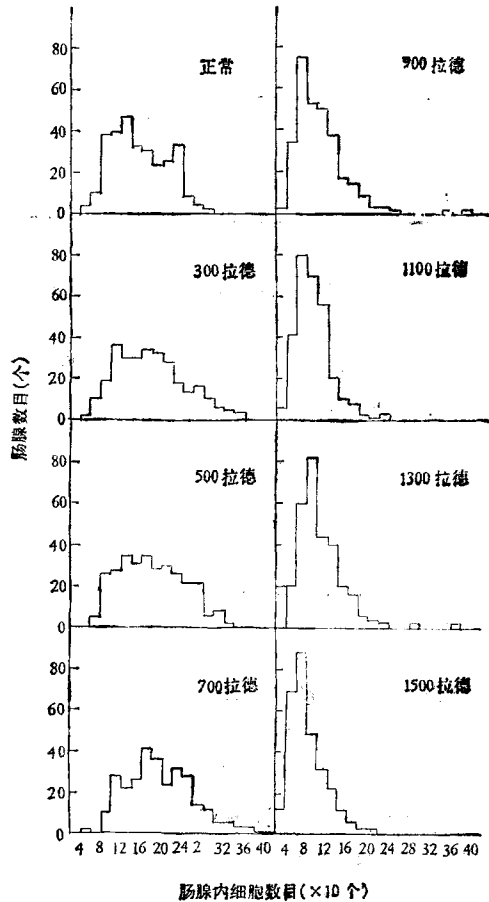


图 2 不同剂量照射后单个肠腺内细胞数目的分布

3. 单个肠腺内细胞数目的分布 正常组及 100、300、500 及 700 拉德照射组肠腺内的细胞数目呈较为对称的分布, 而 900、1100、1300 及 1500 拉德照射组肠腺内的细胞数目呈正偏态分布, 即细胞数较少的肠腺数目相对增多。

由图 1、2 可以看出, 100、300、500 及 700 拉德照射组同 900 拉德以上各组的情况不同,

而这种差别恰出现在照射后肠腺存活率的转折点上, 即照射后肠腺无死亡到有死亡的转折点上。

三、讨 论

较大剂量的射线照射后, 肠腺内的增殖细胞经历了一个破坏、修复和恢复的过程。照射后由存活的干细胞增殖形成的细胞群不断扩大, 而照射时处于肠腺成熟区内的细胞仍不断向绒毛上皮推移, 因此, 照射后 72 小时形成的是再生肠腺^[4]。图 2 表明, 再生肠腺内的细胞数同有丝分裂细胞数目呈正比。因为有丝分裂细胞的多少, 反映了再生肠腺增殖能力的大小, 因而肠腺内细胞数目的多少也反映了再生肠腺增殖能力的大小。当以 900、1100、1300 及 1500 拉德剂量照射后, 部分肠腺死亡, 即这些肠腺内的干细胞数为零。因此, 尚能再生的肠腺, 应当是照后单个肠腺内一个以上存活的干细胞增殖所形成的肠腺。据此也可以解释为什么这四种剂量照射后, 肠腺内的细胞数同有丝分裂细胞数之间线性关系的数据分布比较集中 (图 2)。经 100、300、500 及 700 拉德照射后, 肠腺内的细胞数同有丝分裂细胞数的线性关系处于另一水平 (图 1 直线 2)。因此, 应当认为, 这种肠腺是照射后单个肠腺内两个以上存活干细胞增殖所形成。

图 1 直线 1 同纵轴的交点是 67.0 个细胞, 是由一个存活干细胞增殖形成的肠腺细胞数下限的平均数, 其 95% 可信限为 30.6—103.5 个细胞。同理, 直线 2 同纵轴的交点为 119 个细胞, 是由两个存活干细胞增殖形成的肠腺细胞数下限的平均数, 其 95% 可信限为 95.1—142.1 个细胞。由两个存活干细胞增殖形成的肠腺细胞数的下限是由一个存活干细胞增殖形成的肠腺细胞数的上限, 因而我们规定细胞数小于 100 个的再生肠腺, 是由一个存活干细胞增殖形成的。此外, 由两个存活干细胞及一个存活干细胞增殖形成的肠腺细胞数的下限之差, 表示每增加一个干细胞所增殖的细胞数, 其数值为 $119 - 67.0 = 52$ 个细胞, 因而定出每增加一个干

表 1 泊松分布适合度检验 (一)

干细胞数目 (个/肠腺)	900 拉 德			1100 拉 德		
	实测肠腺数 A	理论肠腺数 T	$\frac{(A-T)^2}{T}$	实测肠腺数 A	理论肠腺数 T	$\frac{(A-T)^2}{T}$
0	147	150.70	0.0908	292	288.76	0.0364
1	165	163.85	0.0081	198	207.30	0.4172
2	98	89.07	0.8953	83	74.41	0.9916
3	28	32.28	0.5675	15	17.81	0.2973
4	7	8.77	0.3973	4	3.72	
5	0	1.91		21.53		
6	1	0.35				
7	1	0.07				
合 计	447	447	1.9590	592	592	1.7425
$df=5-2=3$ $\chi^2_{0.05}=7.81$ $p>0.50$ $df=4-2=2$ $\chi^2_{0.05}=5.99$ $p>0.25$						

表 2 泊松分布适合度检验 (二)

干细胞数目 (个/肠腺)	1300 拉 德			1500 拉 德		
	实测肠腺数 A	理论肠腺数 T	$\frac{(A-T)^2}{T}$	实测肠腺数 A	理论肠腺数 T	$\frac{(A-T)^2}{T}$
0	2309	2311.4	0.0025	11700	11697.9	0.0004
1	285	280.0	0.09	294	298.3	0.0620
2	13	16.9	4007	6	3.8	1.2737
3	2	0.7				
合 计	2609	2609	0.4942	12000	12000	1.3361
$df=3-2=1$ $\chi^2_{0.05}=3.841$ $p>0.1$						

细胞时肠腺内递增 50 个细胞, 综上所述, 细胞数小于 100 的肠腺由一个存活干细胞增殖形成, 细胞数为 100—149 个的肠腺由两个存活干细胞增殖形成, 150—199 个细胞的肠腺由三个存活干细胞增殖形成, 依次类推。综合分析所测实验数据, 对于 900 及 1100 拉德组我们做出以上推断。

至于 1300 及 1500 拉德照射组, 其肠腺存活率仅为 11.5% 及 2.5%。由于考虑到随照射剂量增加损伤加重, 因而存活的细胞加快增殖, 结果细胞周期缩短^[5,6], 因而我们规定小于 180 个细胞的再生肠腺是由一个存活干细胞增殖形成。因为前人已报道当照射剂量增加时, 肠腺增殖细胞的周期可由正常的 13.1 小时缩短至少于 7 小时^[7], 而一个干细胞增殖 6—7 次即可

形成 100($2^{6.6}$) 个细胞, 增殖 7—8 次即可形成 180($2^{7.5}$) 个细胞, 这与我们的推理基本相符合。此外还参照 100—900 拉德照射组的情况, 规定每增加一个存活干细胞递增 90 个肠腺细胞。

根据以上的推论及图 2 的数据, 可算出 900、1100、1300 及 1500 拉德各组所测的 300 个肠腺内, 存活的干细胞数目分别为 1、2、3…时所占的肠腺数目。

此外也可计算出存活干细胞为零的肠腺数。例如, 900 拉德照后, 肠腺存活率为 67.1%, 所以测定其 300 个存活肠腺时, 其死亡的肠腺数应为 $300 \times \frac{32.9}{67.1} = 147$ 个, 此即存活干细胞

为零的肠腺数。同理, 可算出其他剂量组的数目。

将 900、1100、1300 及 1500 拉德照射组肠腺内存活干细胞数为 0、1、2、3... 时肠腺数目的实测频数列于表 1, 2。据此可以算出肠腺内存活干细胞数的平均数。将此平均数代入泊松分布公式, 得到存活干细胞数为 0、1、2、3... 时肠腺数目的理论频数。统计学表明, 实测频数同理论频数无显著差异, 表 1, 2 示接受 900、1100、1300 及 1500 拉德照射后, 肠腺内存活干细胞的数目呈泊松分布。

Withers 及 Elkind 所提三点假设是有一定根据的。考虑到小鼠照射后经骨髓细胞输注形成的脾结节, 是由一个多能造血干细胞 (CFUS) 增殖而来的事实。则照射后肠腺内只要有一个存活干细胞即可使该肠腺再生也是可能的。其次, 照射后肠腺死亡, 即部分肠腺内干细胞为零时, 尚能存活的肠腺干细胞也必为数甚少, 这种小概率事件很可能符合泊松分布。因为在分析以上实验结果时, 已用了“只要肠腺内有一个干细胞存活, 该肠腺即可再生的假设, 所以本实验

的结果可表达如下: 如果照射后肠腺内只要有一个干细胞存活即可使该肠腺再生的假设成立, 则本实验似乎支持这样的命题, 即当照射后肠腺出现死亡时, 肠腺内存活干细胞数目呈泊松分布。并可以认为, 照射后细胞的存活是彼此独立的假设也应当成立。

承郭祖超教授审阅全文, 谨此致谢。

参 考 文 献

[1] Yau, H. C. et al.: *Radiat. Res.*, 80, 92, 1979.
[2] Withers, H. R. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 17, 261, 1970.
[3] 周元恺等: 《生物化学与生物物理进展》1979年, 第二期, 第 70 页。
[4] Leshner, S. et al.: *Proceedings of a Symposium on the Effects of Radiation on Cellular Proliferation and Differentiation* 507, 1968.
[5] Denekamp, J.: *Proceedings of the Fifth International Congress of Radiation Research*, 810, 1975.
[6] Denekamp, J.: *Proceedings of the Association for Radiation Research* 261, 1979.

[本文于 1981 年 3 月 20 日收到]

学术动态

第 12 届国际生化会议将于今年 8 月在澳召开

第 12 届国际生化会议已定于 1982 年 8 月 15 日至 18 日在澳大利亚西部珀思 (Perth) 市举行。预定的学术活动如下:

一、全体大会学术报告七次, 已确定的六位报告人和讲题是:

报告人	主讲题目
M. D. Hatch (澳)	光合作用中碳同化途径
J. R. Knowles (美)	酶催化作用
S. Numa (日)	多激素前体及其基因
P. Leder (美)	活动基因
Y. A. Ovichinnikov (苏)	作为光感受器的膜蛋白
C. Weissmann (瑞士)	克隆的干扰素 α 基因原核及真核细胞中的表达

二、专题讨论会上报告学术论文 54 篇, 包括以下 12 个领域 基因组; 蛋白质合成和转录后的调控机理; 生长与分化; 免疫的生化; 代谢和调节; 激素; 植物生化; 膜; 生物能力学; 酶作用的机理与调节; 结构蛋白质和结合蛋白质 (包括收缩蛋白质) 的结构与功能; 神

经生化。

三、墙报形式的自由交流。

四、专家座谈会 为本届新增的内容。实际上是专业人员参加的小型讨论会, 每次约 90 分钟。每次由主持人组织四至六个重点发言, 然后进行讨论。座谈会按 13 个领域分别进行; 除上述 12 个, 再增设生物技术方面的座谈。重点发言选自参加会议的文摘。

五、外围讨论会 又称卫星讨论会。在正式会议前后 (7 月 28 日—8 月 15 日, 8 月 25 日—28 日) 举行, 内容有: 酶促催化反应的化学和调节; DNA 与配基的相互作用所引起的结合、损伤和修复; 真核基因的操纵与表达; 生物素酶; 蛋白质周转、生长和肌肉耗损; 神经失调的分子机理; 类脂在癌症中的作用; 肌动蛋白在肌肉和非肌肉细胞中的结构与功能; 健康与疾病状态中的结缔组织。

此外第 7 届澳大利亚化学学会全国会议将于 8 月 23—27 日在坎培拉召开。

(摘自《第 12 届国际生化学会日程》(编))