

小鼠肠腺剂量存活曲线的一种测定方法

——单位面积肠腺计数

周元恺 沈世仁

(第四军医大学医学防护教研室)

小肠上皮是一个细胞更新系统,它的干细胞在肠腺部位。经电离辐射作用后,肠腺内的干细胞受到破坏,引起小肠上皮细胞更新系统动态平衡的紊乱。经超致死剂量照射后小肠上皮脱落,绒毛裸露,引起典型的肠型放射病,小鼠于3—5天死亡(Quastler, H. 1956年; Bond, V. P. 1965)。因此,肠腺的辐射敏感性是一个值得研究的问题。本实验提出受照射小鼠肠腺的剂量存活曲线的一种测定方法。

一、材料和方法

1. 实验动物

杂种小鼠,雌雄都有,约六周龄,体重22—28克。观察一周后进行实验。

2. 照射方法

以钴-60 丙线全身照射,剂量率为100拉德/分,剂量范围为850—1750拉德。照射时钴源以每分钟16次的速率自转,使得得到一均匀的辐照场。

3. 肠腺存活率的观察

小鼠于照射后第三天活杀。取出回肠末端,约1厘米。纵行剪开肠腔,平铺于纸片上,粘膜面朝上。置于醋酸酒精溶液(冰醋酸1份加无水酒精3份)中固定24小时,然后将肠片贮存在70%酒精溶液中,以便染色检查。

(1) 染色方法 采用孚尔根染色法。取出保存于70%酒精溶液中的肠片,浸于蒸馏水内10分钟,在冷的1N HCl内略洗后,放入60℃1N HCl内水解7分钟。再分别用冷的1N HCl、蒸馏水略洗后,移至Schiff试剂内染色10分钟。

最后放在新配的亚硫酸水溶液内。

(2) 标本制备 取出亚硫酸水溶液内的肠片,放在滴有数滴45%醋酸溶液的载玻片上,粘膜面朝下。用眼科镊子剥去纸片后,在解剖显微镜下用针灸针仔细剥去浆膜层和肌肉层,盖上盖玻片,即可在低倍显微镜下行肠腺计数。

(3) 肠腺存活率计数

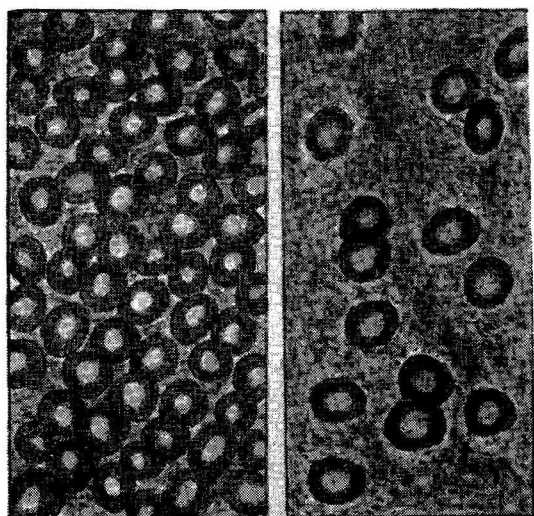
以上述方法制备的标本,在低倍显微镜下,可见肠腺呈圆形或卵圆形,大小均匀,肠腺的细胞核呈紫红色,排列整齐[图1(1)]。经一定剂量丙线照射后第三天,有的肠腺结构已消失,但在此背景上,仍散在地分布着同正常形态相同的肠腺。凡肠腺的细胞核呈紫红色,成圈排列,或接近于成圈者,均作为成活的肠腺计算[图1(2)]。在目镜中置测微网¹⁾,在低倍显微镜下数出每0.143平方毫米面积上的肠腺数目,称为照射后“表观的肠腺数目/0.143毫米”。

此实验的每个剂量组多数为六只动物,在每只动物的肠片上数出十个不同部位的肠腺数目。

4. 照射后肠粘膜面积的变化

在上述肠片染色标本中,于肠腺计数完毕后揭开盖玻片,将肠片翻转,使粘膜面朝上,再盖上盖玻片,在低倍显微镜下计数每0.281平方毫米面积上的绒毛数目,即可计算照射后肠粘膜面积的变化值。“表观的肠腺数目/0.143

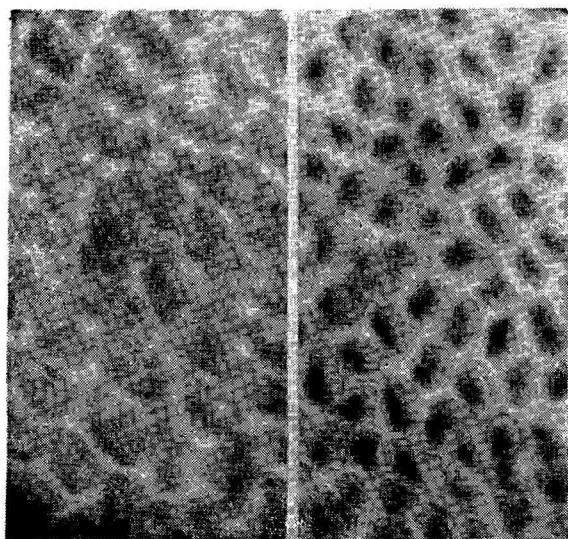
1) 测微网系一刻有小方格(共64个)的圆形玻璃,可置于目镜中,利用测微尺量出测微网中某一正方形的边长,从而可以算出该正方形的面积。文中所述的0.143及0.281等就是这样得到的。



(1) (2)

图1 按本实验方法制备的小鼠回肠末端肠腺
(1), (2) 仿低倍显微镜下图象绘制)

(1) 正常肠腺 (2) 经 1600 拉德照射后, 大多数
肠腺已崩溃, 仅有少数肠腺存活



(1) (2)

图2 照射后回肠末端绒毛的变化(低倍显微镜象)

(1) 正常的绒毛 (2) 经 1600 拉德照射后绒毛
变得圆而小, 且单位面积上的绒毛数目增加

毫米²”需经肠粘膜面积变化校正后, 才能得出
照射后“真正的肠腺数目/0.143 毫米²”(见结
果)。

5. 半胱氨酸预防注射对肠腺存活百分数的影响

每只小鼠于照射前 15 分钟于腹腔内注射

半胱氨酸 15 毫克(调节 pH 值至 7.0)。动物数
目和肠腺计数方法同前。照射剂量在 1300—
1750 拉德范围内, 共分四组。

6. 照射小鼠平均存活时间的观察

在照射剂量为 800—1750 拉德范围内, 分
为八个剂量组, 每组一般为六只小鼠, 照射后记
录其存活时间。

二、结 果

1. 照射后肠粘膜面积的变化

当以 850 拉德照射后, 每 0.281 平方毫米面
积肠片上绒毛的数目稍有减少; 照射剂量超过
1000 拉德时, 每 0.281 平方毫米面积上绒毛的
数目随剂量的增加而较快地增加; 至 1300 拉德
以上时增加减慢。在我们制备的标本中, 当照
射剂量较大时, 绒毛的形态由宽大变为圆小, 但
一定面积上绒毛数目的增加实际上表示肠粘膜
的收缩(图 2)。

设 A 为正常肠片上的绒毛数目/0.281 毫
米² = 14.5; B 为经照射肠片上的绒毛数目/
0.281 毫米²; f 为肠粘膜面积校正系数, 我们定
义

$$f = \frac{A}{B} = \frac{14.5}{B}$$

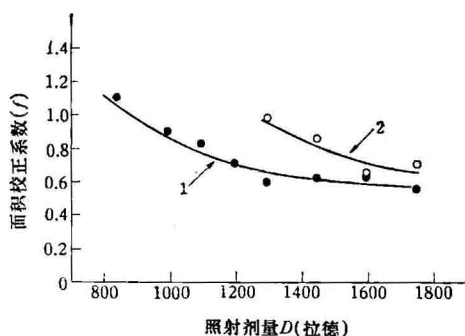


图3 面积校正系数 f 与照射剂量 D 间的关系

曲线 1 为单纯照射组, 曲线方程为 $D'/f = -14.927$
 $+ 2.658D'$, 其中 $D' = D/100$ 曲线 2 为半胱氨酸
预防组, 曲线方程为 $D'/f = -24.686 + 2.951D'$,
其中 $D' = D/100$

表 1 和图 3 表示 f 值同照射剂量间的关
系。图中曲线也表示肠粘膜面积随照射剂量增
加而收缩的情况(850 拉德组除外)。

表 1 单纯照射组与半胱氨酸预防组的肠粘膜面积校正系数

组别	照射剂量 (拉德)	绒毛数目的 平均数 $\pm SE/0.281$ 毫米 ²	面积校正系数 f	
			实 验 得	曲线方程 所得
照 射 组	0	14.5 $\pm$ 0.28	—	—
	850	13.2 $\pm$ 0.46	1.098	1.108
	1000	16.3 $\pm$ 0.38	0.890	0.858
	1100	17.7 $\pm$ 0.50	0.819	0.768
	1200	20.6 $\pm$ 0.51	0.704	0.707
	1300	24.4 $\pm$ 0.72	0.594	0.662
	1450	23.8 $\pm$ 1.46	0.609	0.614
	1600	23.1 $\pm$ 0.53	0.623	0.580
	1750	26.7 $\pm$ 0.82	0.543	0.554
预 防 组	1300	15.0 $\pm$ 0.27	0.967	0.951
	1450	17.2 $\pm$ 0.41	0.843	0.801
	1600	22.7 $\pm$ 1.12	0.639	0.710
	1750	21.2 $\pm$ 0.66	0.684	0.651

表 2 单纯照射组与半胱氨酸预防组的肠腺存活百分数

组别	照射剂量 (拉德)	表观的肠腺 数目平均数 $\pm SE/0.143$ 毫米 ²	真正的肠腺 数目平均数 $\pm SE/0.143$ 毫米 ²	肠 腺 存 活 百分数 $\pm SE$
照 射 组	0	43.7 $\pm$ 0.30	43.7 $\pm$ 0.30	100.0
	850	39.2 $\pm$ 0.75	43.4 $\pm$ 0.83	99.3 $\pm$ 1.90
	1000	39.4 $\pm$ 0.58	33.8 $\pm$ 0.50	77.3 $\pm$ 1.14
	1100	33.4 $\pm$ 0.75	25.7 $\pm$ 0.58	58.8 $\pm$ 1.33
	1200	26.1 $\pm$ 0.75	18.5 $\pm$ 0.53	42.3 $\pm$ 1.21
	1300	22.3 $\pm$ 0.67	14.8 $\pm$ 0.44	33.9 $\pm$ 1.01
	1450	21.0 $\pm$ 0.97	12.9 $\pm$ 0.60	29.5 $\pm$ 1.37
	1600	8.1 $\pm$ 0.58	4.7 $\pm$ 0.34	10.8 $\pm$ 0.79
	1750	8.0 $\pm$ 0.42	4.4 $\pm$ 0.23	10.1 $\pm$ 0.53
预 防 组	1300	39.3 $\pm$ 0.65	37.4 $\pm$ 0.62	85.6 $\pm$ 1.42
	1450	38.1 $\pm$ 0.98	30.5 $\pm$ 0.78	69.8 $\pm$ 1.78
	1600	41.8 $\pm$ 0.72	29.7 $\pm$ 0.51	68.0 $\pm$ 1.17
	1750	30.5 $\pm$ 0.88	19.9 $\pm$ 0.57	45.5 $\pm$ 1.30

2. 单纯照射组与半胱氨酸预防组的肠腺存活百分数

正常小鼠回肠末端每 0.143 平方毫米面积上肠腺的数目为 43.7 ± 0.3 个。照射后肠腺数目减少 [图 1(2)]。设 C 为照射后表观的肠腺数目/0.143 毫米², E 为照射后真正的肠腺数目/0.143 毫米², 则

$$E = C \times f$$

$$\text{肠腺存活百分数} = \frac{E}{43.7} \times 100\% = \frac{C \times f}{43.7}$$

$\times 100\%$

由表 2 及图 4 的曲线 1 可见, 照射剂量在 800 拉德以下时, 肠腺数目没有改变, 在 1000 拉德以上时, 肠腺存活率在半对数坐标上呈直线下降。可算出肠腺的 D_0 值为 356 拉德, 其 95% 可信限为 337—376 拉德; D_q 值为 911 拉德; n 值为 12.7, 其 95% 可信限为 8.4—19.1。

半胱氨酸预防组的肠腺存活百分数较单纯照射组者显著增加 (图 4 曲线 3)。

3. 照射小鼠的平均存活时间

小鼠在 850 拉德以上剂量照射后, 其平均存活时间在半对数坐标上呈直线下降 (表 3 及图 2 曲线 2)。可算出 $LD_{50(5)}$ 为 1247 拉德, 其 95% 可信限为 1132—1373 拉德。至照射剂量接近 1600 拉德以上时, 曲线变为平坦, 平均存

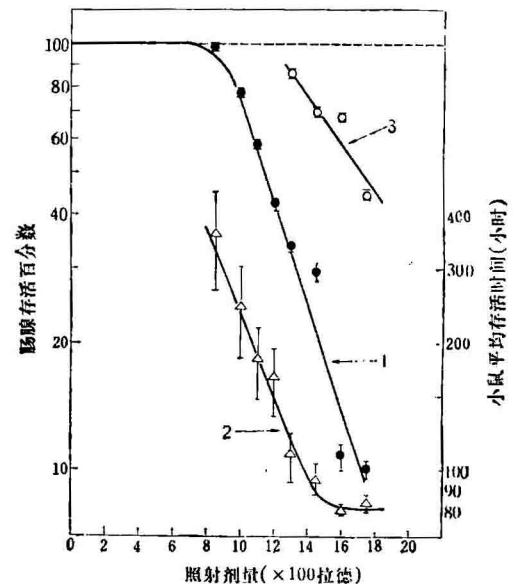


图 4 小鼠经钴-60 丙线照射后肠腺存活百分数(曲线 1)同小鼠平均存活时间(曲线 2)的关系及半胱氨酸预防(曲线 3)对肠腺存活的影响

曲线 1 直线部分的方程式为 $\log y = -0.001212x + 3.104$

曲线 2 直线部分的方程式为 $\log y = -0.000986x + 3.376$

曲线 3 的方程式为 $\log y = -0.000561x + 2.673$

活时间为 80 余小时, 即 3.5 天死亡。

三、讨 论

小鼠肠腺及其干细胞的剂量存活曲线的测定, 文献上已有报道。Wither 及 Elkind (1968, 1970) 曾先后建立了两种方法。第一种方法是

表3 钴-60 丙线照射后小鼠的平均存活时间

照射剂量(拉德)	平均存活时间 $\pm SE$ (小时)
850*	360.0 $\pm$ 96.3
1000	244.8 $\pm$ 59.4
1100	183.5 $\pm$ 35.1
1200	167.6 $\pm$ 27.8
1300	109.0 $\pm$ 14.5
1450	96.0 $\pm$ 8.2
1600	81.8 $\pm$ 1.9
1750	84.0 $\pm$ 3.8

* 本组有两只动物存活时间超过30天

照射小鼠的外置空肠,在照射后第12天以肉眼观察肠粘膜上再生的细胞团的数目作为干细胞存活的指标。第二种方法是将全身照射后3.5天的空肠切片染色,在显微镜下观察,以肠腺内含有10个以上嗜碱细胞作为该肠腺存活的指标。他们并在某些假设的基础上,作出肠腺内干细胞的剂量存活曲线。Hagemann等(1971)用 3H -胸腺嘧啶核苷示踪法测定小鼠单位重量空肠上的肠腺数目,并对照射后小肠重量的变化进行校正,作出肠腺的剂量存活曲线。我们将肠段行孚尔根染色,剥离浆膜层和肌肉层,在显微镜下直接数出单位面积上的肠腺数目,并对照射后肠粘膜面积的变化进行校正,作出肠腺的剂量存活曲线,此方法比较简单易行。Sigdestad及Hagemann(1972,1973)在一些实验中,用 3H 胸腺嘧啶核苷示踪法测得小鼠空肠肠腺的 D_0 值为375—377拉德, D_q 值为832拉

德, n 值为9.2—9.7,同在我们的实验条件下测得的回肠末端肠腺的 D_0 值为356拉德, D_q 值为911拉德, n 值为12.7相近。

半胱氨酸单独应用或与其它抗辐射药物合并应用对超致死量照射动物的预防作用已有过报道(Beliles, R. F.等1959; Maisin, J. R.等1968)。我们的实验方法也证明在1300—1750拉德范围内,半胱氨酸预防组的肠腺数目较单纯照射组者显著增加(t 测验差别非常显著)。

由图4曲线2可见,小鼠在850拉德以上剂量照射时,其平均存活时间在半对数坐标上呈直线下降,至接近1600拉德时呈典型肠型变化死亡,平均存活时间为3.5天。此曲线的直线下降部分,是由造血型放射病向肠型放射病的过渡阶段。从图4曲线1中可见,当照射剂量在1000拉德以上时,肠腺的存活率也呈直线下降,且同曲线2中直线下降部分相平行(两直线的回归系数差别不显著, P 值 >0.50)。这暗示从造血型放射病向肠型放射病的过渡,是同肠腺的减少密切相关的。此外,从图2也可以看出,当以1247拉德,即以 $LD_{50(5)}$ 的剂量照射时,肠腺的存活率降低至正常值的40%;当以接近1600拉德,即动物开始进入平均存活时间为3.5天死亡阶段的剂量照射时,肠腺的存活率降低至正常值的15%。

[本文于1977年8月17日收到]

肠腺分叉在照射后肠腺上皮修复过程中的意义

周元恺 沈世仁

(第四军医大学医学防护教研室)

小肠上皮是一个细胞更新系统,它的干细胞池及增殖分裂池在肠腺部位。电离辐射大剂量照射后肠腺的死亡同导致肠型放射病有着密切的关系^[1]。本文讨论部分肠腺受照射死亡后肠腺上皮的修复问题。

材 料 和 方 法

(1) 实验动物 杂种雄性小鼠,约三月龄,体重27—35克。动物领回后观察十天进行实验。

(2) 照射方法 以钴-60丙线腹部照射,鼠