



数种小鼠实验性肿瘤细胞核仁的定量研究*

王祖武 戴志强 胥彬

(中国科学院上海药物研究所)

核仁系真核细胞核内的重要结构。近年来业已证明, rRNA 的前体分子在核仁合成并降解, 然后经过核孔转运至核糖体, 可见它与蛋白质合成密切相关。关于肿瘤细胞核仁的研究已有不少报道, 一般认为较大, 且形状不规则。曾有些作者把核仁对核的比例作为诊断恶性肿瘤的评价标准^(1,2)。由于增殖迅速的某些正常细胞或病毒感染的病理细胞核仁也较大, 而且过去的研究多根据光学显微镜下的观察, 其准确度受到很大限制⁽³⁾。为了进一步认识肿瘤细胞在蛋白合成速度及核仁超显微结构等方面的特征性表现, 有必要在电子显微镜下观察, 并定量分析它的体积变化以取得比较精确的资料。本文通过细胞形态定量分析法^(4,5)研究了数种小鼠实验性肿瘤细胞核仁的体积变化、数目多寡及超显微结构, 还观察了长春新碱对核仁的影响。

实验材料和方法

实验所用瘤株为腹水型小鼠肝癌和肉瘤180(6天)以及实体型肉瘤180(5—7天)和黑色素瘤(20—30天)。腹水瘤细胞取材后即加入多聚甲醛—戊二醛混合固定液, 混匀后离心3,000转/分共十分钟, 沉淀小块切成每边0.5毫米左右, 继续固定1小时。固体瘤则直接切成小块固定1 $\frac{1}{2}$ 小时。磷酸缓冲液浸洗后移至四氧化锇(2%)固定2小时。脱水包埋后, 用LKB I型或III型切片机切成600Å左右超薄切片, DXA4-10型电子显微镜观察并摄片。切片厚度与摄片倍数尽量一致, 照片范围

应包括整个细胞核。用据Weibel法设计的多能测试系统复罩在电子显微镜相片上(图1, 见封二)分别计数落在整个细胞核内及核仁内的随机投点数。根据Delesee原理, 对某一实体内所含有特定结构成份的相对体积比, 可在充分随机的情况下, 从相当数量均匀薄切片上测得其面积比而得到, 其精确度和机率符合于正态曲线的分布。因此, 在薄切片的厚度和电镜照片的放大倍数相近的条件下, 尽量随机取样, 测试一定数量的细胞核后, 可按下列数学模型运算, 以得到单位核体积中所含有的核仁体积(R_V)。运算结果进行统计学测验, 以确定其差别显著性^(4,5)。

$$R_V = P_{Nu}/P_N$$

R_V : 核仁体积/单位核体积(微米³/微米³)

P_{Nu} : 落在核仁区内的随机投点数

P_N : 落在核内的随机投点数(包括击中核膜的投点)

运算和统计学测验的数学模型均采用AL-GOL高级程序语言编排程序后与随机投点数据输入DJS6型通用电子计算机进行运算⁽⁶⁾。同时还计算每个细胞核内平均核仁数和作一般超显微结构形态学变化的观察。受试药物长春新碱1毫克/公斤腹腔注射于接种肉瘤180的小鼠, 6小时后取瘤作同样观察和分析。

实验结果

一、小鼠腹水型肝癌细胞与正常肝细胞 R_V 的比较:

* 本文曾在上海生理科学年会(1978)报告

由表 1 可见, 各取 11 只小鼠的正常肝脏细胞和腹水型肝癌细胞作 R_V 测量和计算, 其结果差异非常显著。肿瘤细胞核的单位核仁体积可四倍于正常肝细胞, 数值分别为 0.21 ± 0.01 和 0.05 ± 0.01 , P 值 < 0.001 。

表 1 腹水型肝癌细胞与小鼠正常肝细胞 R_V 的比较

细胞	鼠数	细胞数	$R_V \pm SE(\mu^3/\mu^3)$	P
正常肝	11	72	0.05 ± 0.01	
腹水型肝癌	11	75	0.21 ± 0.01	< 0.001

二、小鼠肉瘤 180 腹水型和实体型细胞 R_V 的比较:

由表 2 可见肉瘤 180 腹水型细胞 R_V 值为 0.19 ± 0.01 , 与肝癌腹水型细胞相近, 然而实体型肉瘤 180 细胞的 R_V 值却显著较小, 只有 0.14 ± 0.01 , 与前两者差别非常显著。

三、长春新碱对核仁 R_V 值的影响

将上述接种肉瘤 180 实体瘤 6 天后的小鼠给予腹腔注射长春新碱 1 毫克/公斤, 6 小时后解剖, 取瘤作定量分析, 发现 R_V 值显著较未给药的细胞高, 为 0.20 ± 0.01 , 而对照组仅 0.14 ± 0.01 。

四、Harding-passey 黑色素瘤细胞核仁 R_V 值:

由表 2 还可见到黑色素瘤细胞 R_V 值十分低, 仅为 0.05 ± 0.01 , 比起上述其它恶性肿瘤细胞相差非常显著。

表 2 几种小鼠实验性肿瘤的 R_V 比较

细胞	药物	鼠数	细胞数	$R_V \pm SE(\mu^3/\mu^3)$	P
肉瘤 180	—	6	68	0.14 ± 0.01	
肉瘤 180 (腹水型)	—	6	46	0.19 ± 0.01	< 0.01
肉瘤 180	长春新碱 1 毫克/公斤 × 6 小时	4	38	0.20 ± 0.01	< 0.01
黑色素瘤	—	4	32	0.05 ± 0.01	< 0.001

本表 p 值系与实体型肉瘤 180 作 t 测验比较所得。

五、超显微结构的一般性观察:

从电子显微图象的观察, 可以见到腹水型肝癌和肉瘤 180 以及实体型肉瘤 180 的核仁较大

而且形状不规则, 尽管这些实验性肿瘤细胞核的切片面积已占据整个细胞的大部分区域, 而核仁却占据了核内的较大部位。核仁内的细微结构如纤维部分和颗粒部分不是太分明, 比较紧密, 无定形区域较少, 有时可见到环形核仁。常有核仁边集现象 (Margination)。黑色素瘤的核仁较小而分散, 且变异较大, 有时可见到坏死区域。正常肝细胞核仁较小。图版显示肝癌腹水细胞核仁的超显微结构, 并与正常肝细胞相比较 (图 1, 2 见封二)。

六、正常肝细胞和各种实验性肿瘤细胞核内平均核仁数的比较:

从表 3 可见, 每个细胞核的平均核仁数目在正常肝细胞和各种实验性肿瘤之间无明显差别, 约在两个左右。黑色素瘤略低, 但统计学测验不显著。

表 3 小鼠正常肝细胞和几种实验性肿瘤的核仁数

细胞	鼠数	细胞数	核仁数/核	P
正常肝	11	72	1.76 ± 0.20	各组间 t 测验比较均不显著
腹水型肝癌	11	75	2.19 ± 0.25	
肉瘤 180	6	68	1.86 ± 0.09	
肉瘤 180 (腹水型)	6	46	1.64 ± 0.16	
黑色素瘤	4	32	1.45 ± 0.33	

讨 论

本实验结果定量地证明了了几种实验性肿瘤细胞核仁体积显著增大, 若以小鼠腹水型肝癌及其对应肝细胞比较, 癌细胞 R_V 值四倍于对应正常肝细胞, 并与超微结构的定性观察相符合。McGrew⁽¹⁾ 和 Foot⁽²⁾ 等曾从光学显微镜检下的形态定量研究资料提出核仁增大是恶性肿瘤的特征, 并建议以 R_V 值超 0.25 可作为诊断恶性细胞的评价标准。本实验结果由于从亚显微水平进行定量分析, 所以资料比较精确, 而且进一步分析了不同肿瘤细胞, 情况还不尽相同。一般生长较快的腹水瘤细胞 R_V 值在 0.20 左右, 实体瘤细胞略低, 如肉瘤 180 是 0.14, 而倍增速度很慢的肿瘤如黑色素瘤细胞, 虽然其恶

性程度很高, R_V 值却很低。因此, 若按规定的 R_V 值来诊断恶变细胞, 则对增殖速度快的肿瘤尚符合, 但对缓慢生长的就易于漏诊。由此可见, 核仁体积还与增殖状态密切相关。

长春新碱是专一抑制纺锤体微管蛋白的生物活性物质⁽⁷⁾, 本结果显示, 它能促进肉瘤180核仁的增大, 比对照组增加43%。这可能是由于抑制了胞质中的蛋白质合成后引起的反馈作用使核仁代偿性增大。曾有报告认为硫代乙酰胺的核仁刺激作用是由于抑制了核糖体蛋白合成而导致同样的反馈作用⁽⁸⁾。我们对另一种蛋白质合成抑制剂高三尖杉脂碱的研究也观察到类似的刺激作用⁽⁹⁾, 这种刺激作用属于核糖体水平蛋白质合成抑制的反馈性作用, 因此认为是一种间接的结果, 不同于增殖旺盛所引起的核仁增大现象, 相反导致增殖的抑制。

虽有报道肿瘤细胞因为核仁相互融合而导致数目减少⁽¹⁰⁾, 但从本实验情况来看, 定性观察虽也可见到这样的趋势, 但未能得到定量证明, 可能由于变异较大的缘故。

摘 要

本文报道了对小鼠正常肝细胞和几种小鼠实验性肿瘤细胞核仁超显微结构研究的结果:

1. 用细胞形态定量法测得核仁对核体积比 (R_V) 在增殖能力强的实验肿瘤如腹水型肝癌和肉瘤180较高, 在0.20左右, 而对照组正常肝细胞则很低, 只有0.05。增殖略慢的实体型肉瘤180 R_V 稍低, 为0.14。而黑色素瘤的生长最缓慢, R_V 值仅为0.05。

2. 长春新碱1毫克/公斤腹腔注射给肉瘤180实体瘤小鼠后6小时, 肿瘤细胞核仁可明显增大, R_V 值从0.14增至0.20, 提高43%左右, 这可能与它们对蛋白质合成的抑制所产生的反馈性刺激作用有关。

3. 超微结构的定性观察也与上述结果相符, 并观察到核仁不规则、紧密、环形和边集等恶性细胞的特点。

4. 对每个细胞核中核仁数的测定, 无论在正常肝细胞及各种肿瘤细胞, 核仁数均相近而无明显差别。

参 考 文 献

- (1) McGrew, E. A. (Criteria for the recognition of malignant cells in circulating blood.): *Acta Cytol.*, **9**, 58, 1965.
- (2) Foot, N. C. (The identification of neoplastic cells in serous effusions.): *Am. J. Pathol.*, **32**, 961, 1956.
- (3) Busch, H. (The nucleolus of the cancer cell. A review.): *Cancer Res.*, **23**, 313, 1963.
- (4) Weibel, E. R. (Practical stereological methods for morphometric cytology.): *J. Cell Biol.*, **30**, 23, 1966.
- (5) 王祖武、戴志强、胥彬: (核膜的研究 I. 数种实验性肿瘤细胞核膜超显微结构的定量分析.) *生物化学和生物物理学报*. (1), 73, 1979.
- (6) 北京工业大学计算站: <算法语言>, 北京计算中心印, 1976.
- (7) Creasey, W. A. and Markiw, M. E. (Biochemical effects of the vinca alkaloids I. A comparison of the effects of colchicine, Vinblastine and vincristine on the synthesis of ribonucleic acids in Ehrlich ascites carcinoma cells.): *Biochim. Biophys. Acta.*, **87**, 601, 1964.
- (8) Chakravorty, A. K. and Busch, H. (Effect of thiocetamide on the activity of alkline ribonuclease and ribonuclease inhibitor in rat liver.): *Biochem. Pharmacol.* **16**, 1711, 1967.
- (9) 王祖武等: 高三尖杉脂碱对肝细胞核仁的影响及心肌毒性的定量电子显微镜研究, 全国白血病会议资料, No. 177, 1978.
- (10) Unuma, T., Morris, H. P. and Busch, H. (Comparative studies of the nucleoli of Morris hepatomas, embryonic liver and aflatoxin B1 treated liver of rats.): *Cancer Res.*, **27**, 2221, 1957.