

人胃癌细胞系分裂行为在加温与辐射后的不同 变化——M 期细胞超微结构的动态观察*

周 宁 新

(北京 解放军总医院普外科)

朱光明 侯 宁

(病理科电镜室)

高温与辐射并用能提高对肿瘤细胞的杀伤力,是较有潜力的治癌方法^[1,2]。近些年的实验表明,高温与辐射损害均能不同程度地阻滞细胞的分裂行为,然而其作用机理至今尚未弄清。为了探讨高温与辐射损伤对分裂细胞的不同作用机理,我们采用选择性M期细胞的电镜取材新方法^[4],着重观察M期细胞染色体与分裂器在加温与辐射后的动态超微结构变化。

材 料 和 方 法

胃低分化腺癌细胞系(SGC-7901),上海第六人民医院建立^[3],在我科实验室已传代培养两年多。取呈对数生长期细胞,等量接种于25 ml瓶内培养三天,细胞均匀贴壁覆盖满瓶壁时进行实验。实验分四组:加温组,辐射组,加温合并辐射组,空白对照组。加温采用水浴加温法(国产小型三用水浴箱),将培养瓶底浸没在热水中,随时调控温度,使温差波动 $<0.5^{\circ}\text{C}$,剂量为 43°C ,30分钟;辐射用日本岛津BTI-25型感应加速器8 mVX线照射,剂量率为 130 rad/分 ,培养瓶均匀平放于聚线筒下,室温下照射 500 rad ;加温与辐射合并组剂量同前,先加温后照射,间隔时间不超过30分钟。同时设空白对照组。细胞分组处理后1小时,36小时,72小时,96小时和120小时取电镜样品,采用洗涤法选择M期细胞^[4],使电镜样品中M期细胞所占比例比常规取材提高10倍。按常规法制片,日立H-600型透射电镜观察。

结 果

1. 空白对照组

M期细胞进入早前期时核膜消失,染色体聚集排列呈致密的团块样结构,胞浆内以浓密

的游离核糖体颗粒为主。在不同时相的每个M期细胞均可查见微管,呈直径 25 nm 左右的管状结构,同向排列,长短不一。如正好与分裂轴向在同一平面的切片,可看到纺锤体的完整结构,见大量纺锤丝(微管)一端与染色体连接,一端向中心体呈放射样会聚(图1)。中心体含有一对垂直排列的圆柱形结构,即中心粒,它们也由多组微管组成,但在超薄切片条件下不如其它微管那样容易查见。在细胞分裂的终末期,子细胞在连接体还未分离之前已形成核膜,细胞核位于分裂极的一侧,连接体内可见大量微管结构。

2. 加温组

加温后1小时分裂细胞明显减少,几乎看不到染色体呈赤道板排列的典型中期相。染色体结构由原先排列紧密、边界清楚的浓密团块变成松散紊乱、边界模糊的团块状结构(图2)。注意查找M期细胞的微管结构,除个别细胞可见少数残留微管外,绝大部分M期细胞微管结构完全消失(图3)。在个别间期或早期分裂细胞内仍可见中心体结构,未见异常变化。

36小时后空泡样变性与死细胞残骸增多,但存活细胞也开始恢复,M期细胞内重新出现微管结构,染色体结构与各时相形态也趋于正常。72—120小时M期细胞各时相已恢复正常形态,但巨细胞或多核细胞逐渐增多,120小

* 本研究承蒙中国医学科学院潘琼婧教授,军事医学科学院陈德慧教授的指导与复查,表示衷心感谢。

时可见许多与辐射后72小时类似的巨型细胞。

3. 辐射组

辐射后1小时细胞亚显微结构的改变不明显，M期细胞各时相染色体与微管结构如常(图4)，36小时后与对照组仍无明显差异。

72小时后细胞出现明显的形态变异，主要表现为微核细胞、巨型细胞或多核细胞增多，M期细胞多极分裂增多。96—120小时巨型细胞增多明显，细胞表面伪足增多，同时核固缩、胞浆萎缩的死细胞增多。M期细胞内微管与染色体形态始终无明显改变。

4. 加温与辐射合并组

细胞1小时后损害严重，大量细胞呈空泡样变性，核染色质凝聚，细胞皱缩，死亡细胞增多。M期细胞明显减少，与加温组相似可见染色体松散紊乱，微管结构消失。36小时后除仍可见较多变性坏死细胞外，存活细胞开始恢复，M期细胞内可见染色体与微管结构恢复正常。

72小时后与辐射组相似出现大量多核巨细胞，胞浆内常见大、小空泡样变性，固缩的死细胞残骸较多。同时发现一多核巨细胞的末期分裂相，两子细胞为多核，核靠近细胞分裂极一侧，核膜已形成，其连接体内清晰可见微管结构(见图5、6)，与对照组M期细胞末期相类同。96~120小时与辐射组一样巨型细胞逐渐增多，细胞表面可见许多大小伪足，空泡样变性与死细胞明显增多。

讨 论

Dewey在第四届国际肿瘤热疗会议上总结发言时指出：热的杀伤作用可能归因于对细胞膜，细胞骨架，分裂行为(包括染色体蛋白和修复酶)的直接作用；或者可能与对细胞膜通透性的继发性影响有关，如Na、K、Ca、谷胱甘肽、ATP、多胺等，然而怎样影响杀伤细胞的机理还未弄清。潘琼婧(1981)^[5]从加温后染色体不能移向赤道板和染色体互相凝聚的现象，推测高温损害分裂细胞的作用之一可能是

破坏纺锤体，也就是破坏微管蛋白。辐射对细胞分裂行为的阻滞作用也被认为与染色体损伤、基因丢失有关，其中包括合成有丝分裂必需的特异性蛋白质的基因^[9]。然而过去常规取材法不便在电镜下大量观察M期细胞的亚微结构，进而从亚显微结构的变化上证明M期细胞的损害特征。

本实验采用选择性M期细胞的电镜取材新方法，获得了电镜下对M期细胞进行定点观察的机会，通过比较加温与辐射后的动态超微结构变化，除了发现与以往作者报告相似的结果，即热损害以早期细胞的直接损害为特征，而辐射则以后期形态变化和增殖死亡为特征外^[6,8]，我们还发现加温后1小时M期细胞染色体结构松散、紊乱，微管消失；而辐射后1小时细胞有丝分裂相基本正常。说明高温可导致染色体蛋白与微管蛋白解聚或破坏其空间构型，而辐射500 rad则不直接引起染色体蛋白与微管蛋白的可见性损害。36小时后热损害所致的这类改变可自行恢复，在以后连续5天的观察中未见染色体与微管结构的变异或消失。当细胞暴露在高压、低温或秋水仙素等可与微管蛋白结合的药物中，微管可发生可逆性的裂解^[13]。酶的热变性试验可使蛋白质分子多肽链的空间排列紊乱，只能改变其蛋白质的四级、三级和二级结构，却不能改变分子的一级结构^[12,13]。因此，热损害可能首先是在蛋白质构型的较高级水平，其损害能够自行恢复。我们将实验后七天的细胞进行再次传代观察，发现加温组细胞传代培养后完全恢复正常，与对照组无差异；而辐射组和加温合并辐射组细胞形态变异加剧，巨型细胞和死亡细胞增多，呈典型的增殖死亡表现，细胞日渐减少，以致完全消失或死亡。由此可见热与辐射对细胞的损害特征或靶位显然是不同的。

我们在实验中也同时观察了加温与辐射后细胞生长曲线、集落形成率、分裂指数和光镜的形态变化，发现加温43℃、30分钟对细胞的杀伤能力低于辐射500 rad，但其对细胞分

裂的阻滞作用却明显强于辐射；加温后持续三天细胞分裂指数处在较低值，后期或末期分裂相消失，而辐射组细胞分裂指数第二天就出现峰值，后、末期分裂相始终可见。说明热效应有较强的细胞分裂阻滞和部分同步化作用，而其相应的杀伤能力却低于辐射。以往就曾有人利用加温(热休克)进行细胞同步培养，这便给我们一个启示：能否利用所谓热的同步效应来提高辐射或化疗对肿瘤细胞的杀伤能力。

无论加温或辐射均可见微核细胞、巨细胞或多核细胞明显增多。依照放射生物学学生殖死亡的定义，认为这类巨型细胞尽管存在代谢活动，但已丧失了分裂增殖能力，所以是生殖死亡细胞。其形成机理被认为是子代细胞融合，以及细胞质分裂永久抑制所造成。我们发现巨型细胞在空白对照组亦能查见，电镜下比较热与辐射后所致巨细胞的形态差异也无质的区别，只是数量上辐射后增多明显；然而在死亡细胞残骸中未发现巨型细胞，且这类细胞一般胞浆致密，细胞器发达，呈代谢比较旺盛的细胞特征。更有趣的是在加温合并辐射后三天，发现巨细胞的末期分裂相，结合光镜所见也有类似现象。Puck 和 Marcus(1956)^[10]对小鼠白血病 L 5178 细胞系辐射后也观察到个别处在有丝分裂阶段的巨型细胞。但由于没有电影摄像的连续观察，对这种现象暂无法做出连贯的描述，究竟是巨细胞的有丝分裂还是延迟的胞浆分裂还难下定义。

摘 要

为探讨高温与辐射损害导致细胞分裂行为改变的不同机理，应用体外培养细胞洗涤法选择 M 期细胞进行电镜观察。发现加温(43℃, 30 分钟) 1 小时后 M 期细胞染色体结构松散、紊乱，微管消失；而辐射(500 rad)后 1 小时细胞有丝分裂相基本正常。36 小时后热损害所致的这类改变可自行恢复；而辐射组细胞后期的形态变异加剧，多极分裂相或巨型细胞增多，细胞日渐减少。文中对热与辐射损害的不同特

征或靶位，以及巨型细胞的产生与转归进行了讨论。

图 版 说 明

- 图 1 SGC-7901 胃癌细胞系分裂中期细胞染色体与纺锤体的典型结构。×15,000
 图 2 加温 43℃, 30 分钟。1 小时后分裂早期细胞染色体松散紊乱，微管消失。×40,000
 图 3 辐射 500 rad。1 小时后，分裂中期细胞染色体与微管结构如常。×40,000
 图 4 加温 43℃, 30 分钟。1 小时后，细胞核内染色质旁小体增多。×40,000
 图 5 加温合并辐射后 72 小时发现一多核巨细胞仍有分裂行为，两子细胞还未完全分离。×6,000
 图 6 (同图 5) 巨细胞分裂末期两子细胞连接体内微管结构清晰可见。×30,000

参 考 文 献

- [1] Storm F K., 1983, *Hyperthermia in Cancer Therapy*, ed. by Storm F K. pp. 1-8, Gk Hall Medical Publishers Bosten, Massachusetts.
 [2] Hahn G M., 1982, *Hyperthermia and Cancer*. ed. by Hahn G M. PP. 1-24. Plenum Pres, New York and London.
 [3] Lin Cnao-Hong, et al., 1984, *Chinese Medical Journal.*, 97: 831-834.
 [4] 周宁新等, 1985, 细胞生物学杂志, 7(4): 177-179.
 [5] 潘琼婧, 1981, 解剖学报, 12(2): 179-186.
 [6] 宁爱兰和潘琼婧, 1980, 解剖学报, 11(4): 440-447.
 [7] Song C W., 1984, *Radiosensitization Newsletter*, 3(4): 7-9.
 [8] Overgaard J., 1976, *Cancer Res.*, 36: 983-989.
 [9] Rao A P, et al., 1976, *J. Nat Cancer Inst.*, 57: 1139-1143.
 [10] K. I. 奥尔特曼, 等著, 1980, 辐射生物化学, pp. 261, 原子能出版社。
 [11] W. 德威特., 1983, 细胞生物学, pp. 211, 科学出版社。
 [12] A. C. 吉斯., 1984, 细胞生理学, pp. 591, 科学出版社。
 [13] A. B. 诺维科夫, E. 霍茨曼著, 1985, 细胞与细胞器, pp. 106, pp. 193, 科学出版社。