

放线菌素 K 和石蒜碱内铵盐诱导肿瘤细胞核仁的分离

王祖武 舒荣生 胥彬 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 通过定量电子显微镜技术和染色质漂白等方法研究了 Act K 和 AT-1840 二种抗癌药物诱导小鼠 HepA 及其宿主肝细胞等的核仁分离现象(NuS). Act K 能引起明显的 NuS, HepA 在给药后 4 h 为高峰 ($19.5 \pm 1.4\%$); 肝细胞则 8 h 为高峰 ($13.6 \pm 1.3\%$), NuS 以大分离为主, 偶有小分离现象. 在分离的核仁丝中 F:G \approx 2:1. AT-1840 主要引起 EAC 的 Nu 小分离现象. 并观察到 VCR, OPT 及 MMC 等三种抗癌药物能抑制 Act K 诱导的 NuS.

关键词 核仁分离; 放线菌素 K; 石蒜碱内铵盐; 肝癌细胞

放线菌素 D、阿霉素、柔红霉素、和一些大环类抗菌素⁽¹⁻³⁾ 能引起核仁分离现象 (nucleolus segregation, NuS), 使核仁中的纤维 (F)、颗粒 (G)、及无定形 (P) 等三部分明显分开. 我们研究了一些从中国草药中分离出来的有效抗癌成份及从中国土壤中分离制备而得的抗癌抗菌素, 证明放线菌素 K (actinomycin K Act K) 和石蒜碱内铵盐 (AT-1840, lycobetaine) 能够诱导 Nu 产生 NuS, 而且还采用

了定量电子显微镜方法分析了 NuS 的组成及时间对应的数据.

材料与 方法

药物 Act K 由我所抗菌素研究室制备. AT-1840 和羟基喜树碱 (OPT) 系上海第十制药厂生产. 长春新碱 (VCR) 杭州制药厂出产. 丝裂霉素 (MMC) 系日本协和制药株式会社出品. 小鼠 ip 上述药物 2-16 h 后抽取腹水瘤细胞或肝细胞供电镜观察.

电子显微镜观察 抽取小鼠艾氏腹水瘤细胞 (EAC) 与肝癌细胞 (HepA), 立即加入等量 5% 戊二醛 (GAD) 固定, 经离心 $1000 \times g$ 10 min 后将沉淀物切成每边 0.5 mm 的小块, 再经 GAD 固定 2 h 后转入缓冲液过夜. 肝脏则

1981年3月12日收稿 1981年5月26日修回
1980年10月中国电子显微镜学会成立大会学术会议上交流. 唐建芳(上海农业科学院)参加部分技术工作.

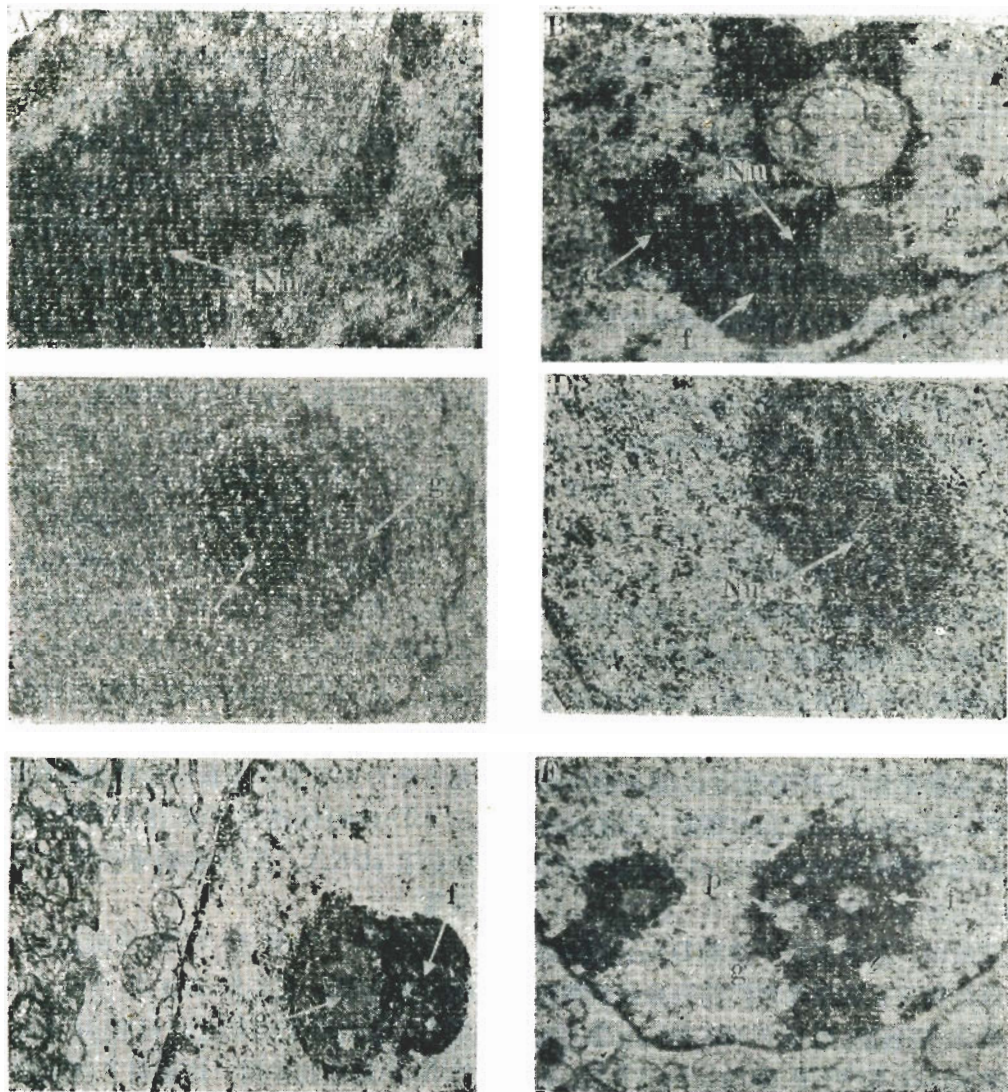


Fig 1. C = chromatin; F = fibrillar element; G = granular element; Nu = nucleolus; P = pars amorpha. A) HepA (6 d) $\times 16,000$. Control. B) HepA (6 d), Act K 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4 h NuS (MaS) $\times 25,000$. C) HepA (6 d), Act K 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4 h NuS (MaS) $\times 23,000$. D) Liver cell (control) $\times 17,000$. E) Liver cell, Act K 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4 h NuS (MaS) $\times 20,000$. F) EAC AT-1840, 40 mg/kg 4 h NuS (MiS) $\times 11,000$.

直接切成小块经 GAD 固定 2 h。次日在锍酸中固定 1.5 h，丙酮逐级脱水，醋酸铀块染后经环氧树脂 618 浸透，包埋聚合，用 LKBV 型切片机切成 60 nm 薄片，定量电子显微镜分析按前文方法⁽⁴⁾进行。部分实验用染色质漂白法⁽⁵⁾，即单用 GAD 固定样品，在染色时，先用醋酸铀常规染色，而后再用 0.2 M EDTA 退去染色质部分的染色，再用铅复染。如此，可以清楚地观察核结构，并较好地地区分核仁与其

相连的染色质成份。作定量分析时，每个剂量-时间组作了 3 次试验，每次 1 个小鼠，每小鼠取 3 个包埋块，每块切 3-5 个以上铜网的切片，共观察 300 个左右细胞。

实验结果

1. Act K 导致的 NuS 给接种 6 d 后的 HepA 小鼠 ip Act K 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，1-2 h 后可使 HepA 与肝细胞发生 NuS，主要分离形式为

Table 1. Nucleolus segregation (NuS) induced by actinomycin K. NuS % ($\bar{x} \pm SD$)

Cells	2 h	4 h	8 h	16 h
HepA	9.8±1.8	19.5±1.4	14.9±4.2	10.4±4.7
Liver	5.4±0.7	8.2±5.2	13.6±3.1	7.8±3.7

Nu 大分离(macroseggregation, MaS) F与G显然分开, 有时还有P, 清晰呈2-3个区域分布图象. 对照细胞均未看到典型的 NuS (图1A, D). 给药4 h后的 NuS 可以从图1B, C, E, F 中清晰显示. 从 Act K 所导致的 NuS 的时间对应的数据可见, HepA 在给药后 2 h NuS 迅速上升至 $9.8 \pm (SD) 1.8\%$, 4 h 为高峰, 有 $19.5 \pm 1.4\%$ 的 NuS, 8 h 为 $14.9 \pm 4.2\%$ 16 h 下降至 $10.4 \pm 4.7\%$. 肝脏细胞时间对应的数据也大抵相仿, 且分离少于 HepA, 8 h 到达高峰, 为 $13.6 \pm 3.1\%$, 16 h 后降至 $7.8 \pm 3.7\%$ (表1). 定量分析给药4 h后 NuS 的体积分布结果如下, F: $0.67 \pm 0.06 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3\text{Nu}$; G: $0.28 \pm 0.08 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3\text{Nu}$; P: $0.04 \pm 0.03 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3\text{Nu}$; V(空泡): $0.01 \pm 0.01 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3\text{Nu}$.

在实验中, 还用其它一些对 DNA, RNA 和蛋白质分别具有抑制作用的药物来对抗核仁分离现象. 结果表明, 给予 MMC 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 和 OPT 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 VCR 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4 h 后, 分别能使 Act K 导致的 NuS 从 $19.5 \pm 1.4\%$ 下降至 $11.3 \pm 0.1\%$ ($P > 0.05$), $6.6 \pm 1.2\%$ ($P < 0.01$) 和 $4.6 \pm 2.3\%$ ($P < 0.01$).

2. 石蒜碱内铵盐(AT-1840)导致的 NuS
6 d 艾氏腹水癌(EAC)小鼠 ip 给予 AT-1840 40 mg/kg, 4 h 后较易出现 NuS, 主要是 Nu 小分离(microseggregation, MiS). 从图1F 可见, NuS 中 F, G 与 P 呈现分离, 但与 Act K 导致的 NuS 不同, 这些 Nu 组分分离后各自在局部区域内呈团块状分布而非区域性分布.

讨 论

从上述实验结果表明, Act K 能显著地诱

导 HepA 及其宿主肝细胞发生 NuS, 而且以 MaS 为主, 从超微结构的表现证实它能抑制 RNA 转录^(6,7). 实验中进一步分析了它所导致的时间对应数据, HepA 的 NuS 在 ip 后 4 h 达到高峰, 近 20%; 说明 Act K 能在较低剂量下较快地引起 NuS, 其诱导作用比较明显. 肝细胞在 8 h 后达到高峰值, 并且低于 HepA, 仅 14%, 而在分离形式上雷同, 从 Act K 所导致的 NuS 组成的定量电子显微镜分析结果来看, F 所占比例较高, G 的比例较低, 不到 F 的一半, 更进一步证实了 Act K 能抑制从 rDNA 转录为 rRNA, 而造成含有 rRNA 及其降介产物的 G 组分较少.

在给药后 4 h, Act K 诱导的 NuS 以 MaS 为主, 偶有 MiS, 而 AT-1840 诱导的 NuS 基本上都是 MiS, 可见它们诱导 NuS 作用很不相同, 从 AT-1840 的其它超微结构的研究结果可见, 它对细胞核或线粒体的作用很明显, 尤其是常使后者产生囊泡状和髓鞘样结构, 提示 AT-1840 的诱导 NuS 作用可能主要在于它抑制了 rDNA, NuS 的诱导作用不如 Act K 显著.

MMC, OPT 和 VCR 三种作用机理不同的抗癌药物, 它们对 Act K 并无直接拮抗作用⁽⁸⁾, 实验结果表明它们都能对 Act K 诱导的 NuS 起抑制作用. 这说明了当给细胞内核酸与蛋白质代谢发生干扰后, 可以影响 Act K 的诱导作用. 特别是 MMC, 据报道它本身也具有 NuS 作用, 是属于非特异性作用, 而且需在给药后 9 h 才开始大量出现⁽⁹⁾. 本实验可见, 它在给药后 4 h, 只能引起 $5.8 \pm 1.4\%$ 的 NuS, 但作用较弱, 尚不能产生统计学意义的差别. 因此认为, 只能在细胞, 尤其是核内的其它代谢作用正常情况下, 依赖于 DNA 的 RNA 转录酶抑制物方能使核仁在超微结构上产生这一典型的 NuS 现象. 严格说, 只有 MaS 才能真正判定为特异性的 NuS, MiS 可以是 MaS 的早期表现或属于非特异性的核仁损伤.

本工作表明 Act K 引起的核仁超微结构

变化和文献中有关 Act D 的报道相似, 而我们作了 NuS 定量比较, 迄今还未见介绍。

参 考 文 献

- 1 Daskal Y, Woodard C, Crooke ST, Busch H. *Cancer Res* 1978 Feb; 38(2): 467
- 2 Bernhard W. Drug-induced changes in the interphase nucleus. In: Clementi F, Ceccarelli B, eds. *Advances in cytopharmacology*, vol 1. 1st ed. New York: Raven Press, 1971: 49-65
- 3 Smetana K, Busch H. The nucleus of the cancer cell. In: Busch H, ed. *The molecular biolo-*

gy of cancer. 1st ed. New York: Academic Press, 1974: 57-61

- 4 王祖武、戴志强、胥彬. 细胞生物学杂志 1979 年 9 月; 7(1): 26
- 5 Bernhard W. *J Ultrastruct Res* 1969 May; 27 (3-4): 250
- 6 Hsu B, Liu MC, Shen ML, Chen JT, Wang TY. *Sci Sin* 1963 Apr; 12(4): 537
- 7 Sobell HM. *Prog Nucleic Acid Res* 1973; 13: 153
- 8 Hollstein U. *Chem Rev* 1974 Dec; 74: 625
- 9 Lapis K, Bernhard W. *Cancer Res* 1965 Jun; 25 (5): 628

Acta Pharmacologica Sinica 1982 Mar; 3 (1): 48-51

NUCLEOLUS SEGREGATION OF TUMOR CELLS INDUCED BY ACTINOMYCIN K AND LYCOBETAINE

WANG Zu-wu, SHU Rong-sheng, XU Bin

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

ABSTRACT Actinomycin K significantly induced nucleolus segregation (NuS), mainly macrosegregation of both hepatoma cells and liver cells in mice. The peak of NuS was $19.6 \pm (\text{SD}) 1.4\%$ in hepatoma cells 4 h after ip 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and $13.6 \pm 1.3\%$ in liver cells 8 h after ip. In the segregated Nu the volume of fibrous portion was twice as that of granular portion. They were $0.67 \pm 0.06 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ Nu and

$0.28 \pm 0.08 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$ Nu, respectively. Vincristine, 10-hydroxycamptothecin and mitomycin inhibited the NuS induced by actinomycin K. Lycobetaine 40 mg/kg could also induce NuS in Ehrlich ascitic carcinoma, mainly microsegregation 4 h after ip.

KEY WORDS nucleolus segregation; actinomycin K; lycobetaine; hepatoma cells