

## 高三尖杉酯碱对小鼠 P388 白血病细胞超微结构的影响

周金煦 周佩琴 戴志强 胥彬 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

**提要** 小鼠 P388 白血病 ip HH 1 或 1.5 mg/kg 后 1 h, 即见部分细胞胞浆中游离核糖体明显减少, 多聚核糖体解聚, 髓样结构增多, 部分线粒体明显肿胀、

破损和变空, 内质网扩张, 空泡增多、增大等与蛋白质合成有关细胞器的损伤。此外, 还见病毒颗粒减少, 核染色质凝集成斑片状位于核周边。给药后 5 h 上述改变已大部恢复。

1983年7月22日收稿 1984年2月10日修回  
1982年9月在全国细胞生物学会超微结构专题讨论会(苏州)上报告

**关键词** 近交 DBA 小鼠; 白血病 P388; 高三尖杉酯碱; 电子显微镜检查; 细胞培养

高三尖杉酯碱(homoharringtonine, HH)是从我国三尖杉科(*Cephalotaxaceae*)三尖杉属(*Cephalotaxus*)中三尖杉(*C. fortunei* Hook f)乔木植物<sup>(1)</sup>中提取分离出来的一种有效抗癌成分,对多种动物肿瘤均有明显的抑制作用<sup>(2)</sup>,可延长小鼠P 388白血病的生存时间达一倍<sup>(3)</sup>。临床试验也证明对急性白血病有效,尤其是急性单核细胞白血病<sup>(4)</sup>。HH可选择性抑制蛋白质合成的起始阶段,较三尖杉酯碱(harringtonine, H)的作用为强<sup>(5)</sup>。为了阐明其作用原理,我们研究了HH对P 388白血病细胞超微结构的影响。

### 材 料 和 方 法

用接种P 388白血病细胞6-8 d的小鼠,分别ip HH 1或1.5 mg/kg后1, 5, 和24 h,抽取腹腔内细胞2-4 ml,经1000 × g离心5 min,以磷酸缓冲液洗涤沉淀2次,除掉部分血性沉淀物。用二甲胍酸钠缓冲的2.5%戊二醛固定并切成1 mm小块,6 h后换缓冲液过夜。次日经锶酸固定1-2 h后,丙酮系列浓度脱水,醋酸铀块染, Epon 812包埋、LKB 3型或5型超薄切片机切制成60 nm左右薄片,柠檬酸铅片染,在DXA 4-10型电镜下摄片。另设一组于HH 1 mg/kg后1 h抽取白血病细胞,经Hank's液洗涤残药后加RPMI-1640培液温浴5 h。经缓冲液洗涤后,按上述制备作电镜观察。实验均经2次以上重复,每组至少3鼠,并分别与给生理盐水的对照组相比较。

### 实 验 结 果

**对照组 P 388 白血病细胞的超微结构特点**  
P 388为淋巴细胞性白血病,含有不典型的血母细胞,外形多为圆形或椭圆形,表面有较长短不一的微绒毛突起,细胞核呈多形性,常见深浅不一的凹陷和内含胞浆成分的假内含体,多叶核十分普遍,核叶间常有线状膜连结(图A)。核内以常染色质为主,核质内容较稀疏,有少量染色质间颗粒散在分布,紧贴核内

膜有少量异染色质,核仁常见1-4个,位于核周边居多。环形核仁常见,其外圈为电子密度较深的原纤维成分,内圈是电子密度较浅的圆形颗粒成分,结构与胞浆核糖体相类似(图B)。胞浆内含有较多的线粒体,其大小不一,多为椭圆形,内嵴肿胀排列不规则,游离核糖体致密分布,其间有散在的多聚核糖体(图1 A, B)。内质网较少,部分细胞可见少量管状粗面内质网,囊泡相间的高尔基体和环状板(annulate lamellae)结构常见(图1, 3)。此外还可见单个的髓样板层结构及少数纤维小体, A型病毒颗粒亦常出现(图1 A, C),其外周为电子密度致密的双层膜,中央为低电子密度区域,但偶尔也可见中央为高电子密度的C型病毒。

**HH对P 388白血病细胞超微结构的影响**  
给药1 h后,部分细胞胞浆内游离核糖体减少(图D),多聚核糖体部分解聚,粗面内质网膜旁核糖体有脱粒现象(图E),环状板消失,病毒颗粒减少。空泡明显增多增大,部分线粒体膜融合基质电子密度增高、内嵴破损溶解,结构模糊不清以至消失,形如空泡(图F-G)。偶见线粒体明显肿大,但界膜及内嵴仍较完整。胞核内多见髓样(myelinoid)板层结构,单个或数个连成串状(图G)。细胞核的变化主要为核质密度降低,染色质边集成斑片状团块(图H),核仁数目有减少趋势,其颗粒成分也变得较稀疏。ip后5 h,胞浆改变大部恢复正常,可见致密分布的游离核糖体和散在的多聚核糖体相嵌,线粒体丰富但内嵴仍模糊并稍有肿胀,少部分内嵴排列紊乱,但空泡仍较多较大(图I),溶酶体也增多,并常见到髓样板层结构,有些还出现在细胞膜外,胞核改变也基本恢复正常,但偶见胞核裂解为数个浓集的染色质团块,分散于胞浆中,与细胞凋落(apoptosis)的变化相似。ip 24 h后,细胞基本恢复正常,胞浆中核糖体致密和多聚核糖体散在分布,线粒体丰富,并常见环状板和A型病毒颗粒(图J),少数细胞有较多小空泡,但溶酶体仍较多,部分细胞核仁增大,其颗粒成分区域也稍扩大。

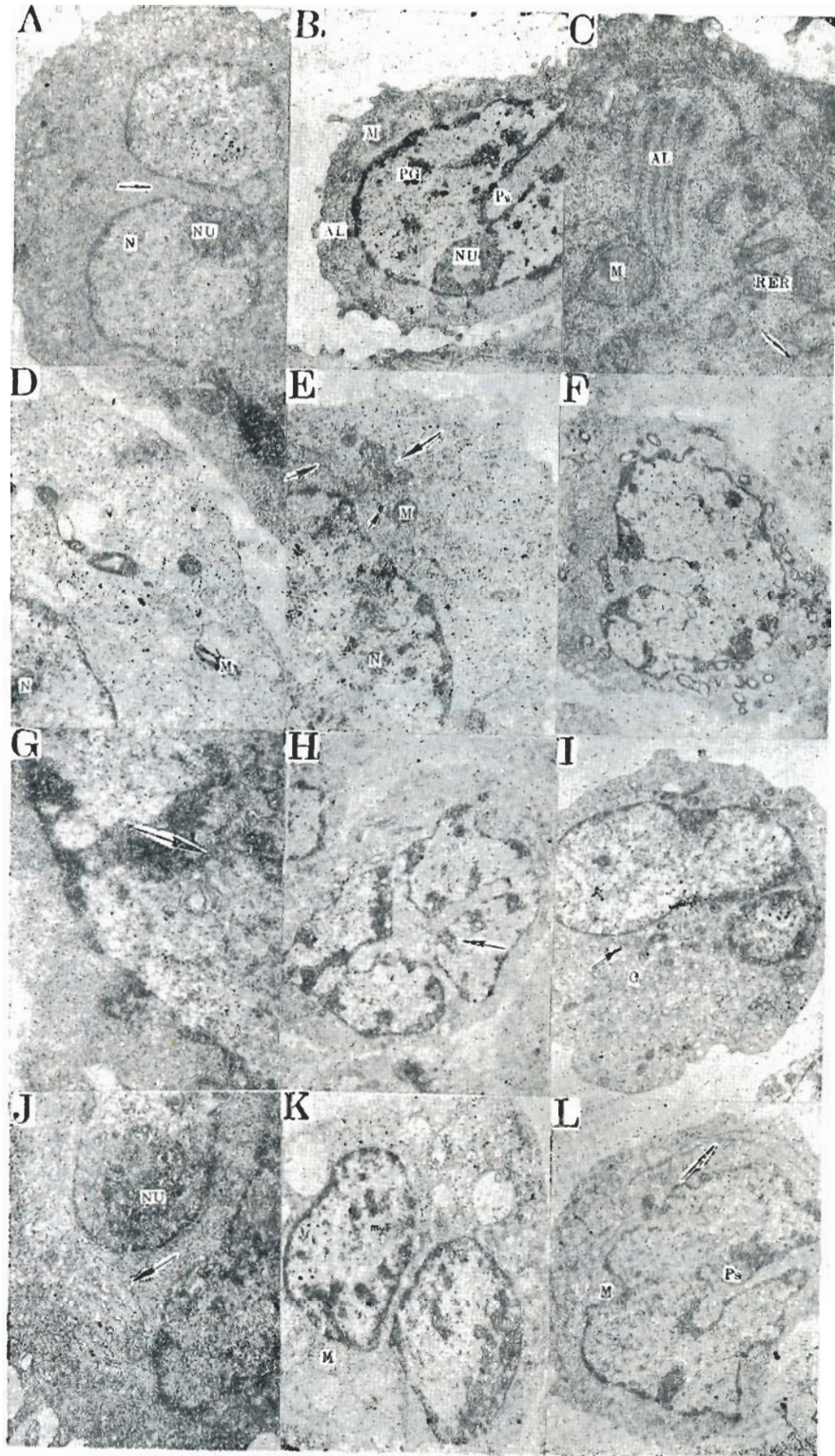


Fig 1. Leukemia P388 cells.

A-C, before medication. A. Pleomorphic nucleus, polyribosomes (arrows) and virus particles of "A" type  $\times 12,000$ . B. Nucleus with perichromatin granules (PG), annulate nucleolus (Nu) and pseudo-inclusion (Ps); cytoplasm with annulate lamellae (AL) and polyribosomes (arrows).  $\times 8,200$ . C. Cytoplasm with many mitochondria (M) and free ribosomes, rough endoplasmic reticulum (RER), AL and "A" virus (arrow).  $\times 20,000$ .

D-H, 1 h after ip homoharringtonine. D. Significant decrease of free ribosomes, disaggregation of polyribosome and ruptured or enlarged vacuoles (V).  $\times 20,000$ . E. Detachment of ribosomes from RER (arrows).  $\times 20,000$ . F. Mitochondria with obscurity or disappearance of cristae and increase of myelin figures (arrow).  $\times 10,600$ . G. Many myelin figures in pseudo-inclusion.  $\times 20,000$ . H. Aggregated patches of chromatin in nuclei.  $\times 10,000$ .

I. Increase of lysosome (arrow) and vacuoles at 5 h after ip.  $\times 10,000$ . J. AL, mitochondria and RER in cytoplasm at 24 h after ip.  $\times 20,000$ . K-L. Increase in vacuoles and RER after culture *in vitro* for 5 h.  $\times 8,400$ .



**HH对细胞超微结构作用的可逆性** HH ip 1 h后洗去药物再温育5 h组, 细胞超微结构变化大部恢复正常, ip 1 h后所发生的上述主要改变不再见到, 此时的超微结构与单独体外温育5 h对照组的改变类似, 均可见部分线粒体明显肿胀, 内嵴溶解变空, 并有明显的空泡增多和粗面内质网增生的现象(图K, L), 其他细胞器则无明显的改变, 胞核也无明显异常。由于P 388细胞单纯体外温育5 h的形态变化与给药组无明显区别, 所以这些改变不是药物的特异性作用。

## 讨 论

HH治疗量1次ip后主要作用于细胞中与蛋白质合成有关的细胞器, 引起游离核糖体明显减少, 多聚核糖体解聚和粗面内质网膜旁核糖体脱粒, 这些都是蛋白质合成降低或休止的一个形态学标志。24 h后核仁代偿性增大, 也与其对心肌细胞超微结构的影响<sup>(6)</sup>一致。该药还可引起部分线粒体溶解破损, 环状板消失, 前者是细胞酶库所在地, 含有核糖体和t-RNA等自我复制所需的基本成分, 也是蛋白质合成和转运的重要场所。后者是内质网的特化组织, 与蛋白质的合成和转运密切相关, 而附着在环状板膜旁的核糖体, 也具有独立合成蛋白质的能力, 这些改变都意味着蛋白质合成的受阻。虽然HH对细胞核也有较明显的作用, 使染色质呈斑片状边集, 并偶见类似H对L 1210细胞核引起凋落退化<sup>(7)</sup>, 但此变化不像是HH的主要作用点。由于蛋白质合成和核酸代谢是互相制约和互为因果的, 在对两者都有一定影响的情况下, 探讨药物的主要作用机理, 则必

须追究其作用发生的起始部位, 一般可以发生变化的严重程度和出现时间早晚作出判断。由于HH对P 388细胞中与蛋白质合成有关细胞器破坏较广泛明显、出现较早, 这点与其迅速抑制网织红细胞珠蛋白的合成<sup>(8)</sup>相吻合, 可能是HH抗癌作用的主要机理, 但该药单剂使用的作用时间较短且是可逆的。体外培养P 388细胞可见空泡增多增大<sup>(9)</sup>, 此变化本文对照组细胞也可见到, 故是非特异性的变化, 可能与该细胞未能适应缺乏小牛血清的体外培育条件有关。

髓样结构是次级溶酶体的一种, 为一些未能代谢完全的膜性成分水化后形成, HH使此类溶酶体明显增多, 可能与该药和溶酶体内的膜性成分结合后选择性抑制其中的某些酶, 使膜性成分消化不全, 导致髓样板层大量出现, 也见于核假包含体内<sup>(10)</sup>。

## 参 考 文 献

- 1 郑万钧、傅立国、诚静容. 植物分类学报 1975; 13 (4):56
- 2 Xu B. *Trends Pharmacol Sci* 1981; 2:271
- 3 Douros J, Suffness M. *Cancer Chemother Pharmacol* 1978; 1:91
- 4 福建白血病协作组. 中华内科杂志 1978; 17:162
- 5 Tscherne JS, Pestka S. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 8:479
- 6 王祖武、晋彬. 生物化学与生物物理学报 1980; 12:231
- 7 司静懿、李昆、宋国兴, 等. 同上 1979; 11:333
- 8 Huang MT. *Mol Pharmacol* 1975; 11:511
- 9 Dawe CJ, Potter M. *Am J Pathol* 1957; 33:603
- 10 Ghadially FN, ed. *Ultrastructural pathology of the cell*. 2nd ed. London: Butterworths, 1977: 50-3

## INFLUENCE OF HOMOHARRINGTONINE ON ULTRASTRUCTURE OF MURINE LEUKEMIA P388 CELLS

ZHOU Jin-xu, ZHOU Pei-qin, DAI Zhi-qiang, XU Bin

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

**ABSTRACT** P388 is a lymphocytic leukemia, containing a number of atypical hemocytoblasts. The nuclei of P388 cell were pleomorphic and 1-4 nucleoli located nearby perinuclear membrane. Many mitochondria with slight swelling and free ribosomes were seen. In cytoplasm polyribosomes and rough endoplasmic reticulum (RER) scattered. Other organelles such as annulate lamellae, myelin figures and virus particles of "A" type were frequently seen.

The changes of P388 cells 1, 5 and 24 h after ip homoharringtonine (HH) 1 or 1.5 mg/kg were as follow.

1. Significant decrease of free ribosomes, disaggregation of polyribosomes and detachment of ribosomes from RER.

2. Increase of vacuoles, severe swelling of

mitochondria with fracture and obscurity and even disappearance of inner cristae.

3. Disappearance of annulate lamellae, decrease of virus particles and increase of myelin figures.

4. Appearance of aggregated patches of chromatin and a few apoptic lesions of nuclei.

The ultrastructural changes of P388 cells *in vitro* were recovered 5 h after washing the drug out of the culture medium.

It may be concluded that HH exerts a reversible effect on cell organelles related to protein synthesis.

**KEY WORDS** inbred DBA mice; leukemia P388; homoharringtonine; electron microscopy; cultured cells