

小鼠各种組織細胞对 N-甲酰溶肉瘤素敏感性的比較——病理形态和細胞計数的研究

甄永苏 陈惠民 李学湯

(中国医学科学院药物研究所药理学系,北京)

提要 本实验使用形态学方法在切片上计算细胞数以比较 N-甲酰溶肉瘤素对小鼠各种器官所引起病变的发展过程,并从数量上去衡量各种细胞对药物的敏感性。结果发现小鼠腹腔内注射 N-甲酰溶肉瘤素 150 毫克/公斤后,病变主要见于骨髓、胸腺、淋巴结、脾脏、小肠、大肠和睾丸。各种组织的病变发展过程不同,一般在给药后 2—4 天最为严重。在敏感的器官中,不同类型组织细胞对 N-甲的敏感性有很大差别,最敏感的是睾丸的精原细胞和骨髓的嗜酸性粒细胞。

N-甲酰溶肉瘤素(简称 N-甲)是临床上对精原细胞瘤及恶性淋巴瘤有肯定疗效的药物。关于 N-甲的实验治疗、临床应用、作用机制和代谢的研究,已有报导^[1-9]。为了进一步了解 N-甲的毒性作用,使用 N-甲的毒性剂量,观察动物各器官的病理变化及其发展过程,并用计数方法比较各种组织对 N-甲损害作用的敏感性。兹将结果报告如下。

材 料 和 方 法

N-甲是我所药物化学系合成,使用时以 2.5% 的淀粉糊与药物制成悬液作腹腔内注射,对照组动物只给以等体积的淀粉糊。先后用昆明种小白鼠进行三批实验:实验 I,用体重 18—22 克的小鼠,雌雄各半,一次腹腔内注射 N-甲 150 毫克/公斤(相当于 LD₅₀),注射后 4、8、24 小时,2、3、5、7、14、21 和 42 天分别用乙醚处死 4 只动物,另外处死 4 只对照动物。取下列器官检查:股骨、脾、胸腺、腋窝淋巴结、心、肺、气管、食管、胃、小肠、大肠、肝、胰、颌下腺、肾、肾上腺、膀胱、睾丸、卵巢、垂体、甲状腺、子宫、皮肤、角膜、脑、脊髓。实验 II,用体重 25—27 克的雄性小鼠,一次腹腔内注射 N-甲 150 毫克/公斤,注射后 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14 和 21 天分别处死 5 只动物(另有 5 只对照动物),取股骨、胸腺、小肠(距幽门 1 厘米)和睾丸进行检查。实验 III,用体重 24—27 克的雄性小鼠 25 只,均分为 5 组。前 4 组一次腹腔内注射 N-甲的剂量分别为 37.5、75、150 和 300 毫克/公斤,第 5 组为对照。给药后 48 小时处死动物,检查的器官同实验 II。上述三次实验的睾丸固定于 Bouin 液,其他组织固定于 Zenker-甲醛溶液。石蜡包埋切片,切片厚度为 5 微米,用苏木精-伊红染色。股骨切片则用苏木精-天青 II-伊红染色。

1. 骨髓细胞的计数方法 使用双筒显微镜,放大倍数为 $90 \times 1.5 \times 10$ 。于接目镜内

放入一块刻有大、小方格的玻片。根据用物镜测微器检查结果,玻片上一个大方格所包括的视野相当于 75×75 平方微米,占整个视野的大部分。每例动物在股骨骨干部的骨髓检查 5 个大方格,记录其细胞总数,以及嗜中性、嗜酸性粒细胞和红系统(不同成熟阶段的有核红细胞)的细胞数。另外检查 50 个大方格,记录其中的巨核细胞数。

2. 胸腺的淋巴细胞计数方法 每例在胸腺皮质靠近包膜处检查 5 个大方格(视野的面积同 1),记录其中的淋巴细胞数。

3. 小肠的计数方法 显微镜的放大倍数为 $90 \times 1.5 \times 7$,上述接目镜内玻片上一个大方格所包括的视野大小为 100×100 平方微米。每例在肠腺处连续检查 20 个大方格,记录其中的核分裂数、Paneth 细胞数和核固缩碎裂细胞数。另外找 10 个纵切的肠腺,每一肠腺各检查长度为 100 微米的一段(从腺底部开始),记录其中的肠腺细胞数。

4. 睾丸精原细胞的计数方法 按 Roosen-Runge^[10] 的方法将睾丸的细精管分成 8 个相(phase)。每组检查 200 个横切的细精管,分别计算各相细精管的 A 型和 B 型精原细胞数。

实 验 结 果

(一) 注射 N-甲后各器官的形态学改变

在实验 I,注射 N-甲 150 毫克/公斤后,各器官的形态改变分述如下:

1. 股骨骨髓 注射后 4 小时,除充血外未见其他改变;8 小时,可见相当数量的核碎片;24 小时,造血细胞显著减少,充血较前更为明显,但核碎裂较前为少;48—72 小时,造血细胞的减少最为严重,累及红、白系列细胞,巨核细胞仍存在,网织内皮细胞未见明显改变。第 5 天,造血细胞增加,其中多数为幼稚的粒细胞,核分裂多见,充血已较前为轻;7 天,骨髓内造血细胞的密度已和对照动物无明显差别,但其中绝大多数为嗜中性粒细胞。嗜酸性粒细胞和红系统细胞(不同成熟阶段的有核红细胞)仍少见;14 天,与对照动物已无明显差别。

2. 胸腺 病变主要见于皮质。注射后 4 小时即可见淋巴细胞核碎裂,在网织细胞内有大量核碎片;24 小时,皮质淋巴细胞显著减少,但髓质无明显改变;48 小时至 5 天,胸腺极度萎缩,皮质内淋巴细胞几乎完全消失,只残留网织细胞;14 天,胸腺基本上恢复正常。

3. 淋巴结(腋窝) 注射后 4 小时,可见淋巴细胞呈核碎裂;24 小时,淋巴细胞显著减少,滤泡的生发中心消失;48 小时至 5 天,淋巴结处于萎缩状态;7 天,皮质内出现相当多的大淋巴细胞和中等淋巴细胞,核分裂多见;14 天恢复正常。

4. 脾脏 骨髓的变化和淋巴结相似。红髓内造血细胞(包括红、白系列细胞)在给药后 24 小时显著减少,巨核细胞无明显减少;3 天开始出现少数的粒细胞造血灶;7 天,红髓内有大量的不同成熟阶段的粒细胞,但红系统细胞仍少见;14 天,脾脏与对照动物无差别。

5. 小肠 注射后 4—8 小时肠腺细胞呈核碎裂;24 小时,肠腺细胞的排列较稀疏,极向消失;核显著肿胀,染色淡,核仁亦肿大;核分裂亦见减少。此时,绒毛顶部的上皮细胞未见改变;48—72 小时,绒毛的上皮细胞排列不整,核肿大;5 天,小肠与对照动物无明显差别。

6. 大肠 病变与小肠相似,即肠腺及上皮细胞核肿大及核碎裂,但程度较轻。

7. 睾丸 注射后 48 小时,精原细胞极度减少,但精母细胞、精子细胞及精子未见形态改变。14 天,精母细胞消失;21 天,精子细胞消失,同时亦见精原细胞与精母细胞再生。Sertoli 支持细胞和 Leydig 间细胞均未见改变。

此外,部分动物的肝脏在给药后 24 小时呈脂肪变性;胰腺在 24—48 小时可见外分泌部细胞的胞浆内有大量酶元颗粒堆积;肾上腺未发现形态改变。其他的器官或组织均未发现形态改变。

(二) 几个敏感器官病变的发展过程

在实验 II,为了更确切地了解给药后病变的发展过程,对病变比较显著的骨髓、胸腺、小肠和睾丸的某些细胞进行了数量的检查。以对照的细胞数作为 100,其他各组的细胞数以相当于对照的百分数表示。百分数愈小,表示细胞的减少愈严重。

1. 骨髓 5 个大方格内的骨髓细胞总数在对照组为 540 ± 15.6 个,给药后 24 小时细胞数减到 74%;48 小时减到最低,为 59% ($P < 0.05$);6 天,细胞数恢复到 96%。将骨髓内各系列细胞分别进行比较,结果见图 1。

图 1 表明,嗜中性粒细胞的减少较不明显,给药后 48 小时最低,为 85%;以后迅速增加,给药后 6 天达 159% ($P < 0.01$);以后又逐渐下降。嗜酸性粒细胞的减少最为严重,恢复也较慢,给药后 48 小时减到 28% ($P < 0.01$);4 天达最低,为 5% ($P < 0.001$);以后逐渐增加,至第 12 天达最高峰,为 268% ($P < 0.05$)。红系统细胞减少的程度介于上述两种细胞之间,给药后 48 小时最低,为 20% ($P < 0.001$);第 8 天接近正常。在本实验中,巨核细胞无明显改变(未列入图 1)。

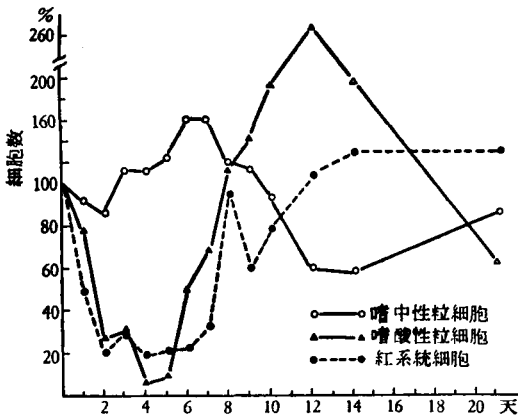


图 1 注射 N-乙酰溶肉瘤素后各种造血细胞的数量改变

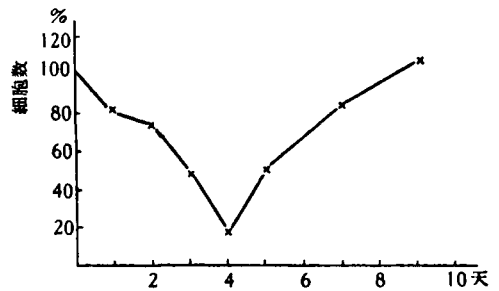


图 2 注射 N-乙酰溶肉瘤素后胸腺淋巴细胞数的改变

2. 胸腺 5 个大方格内的淋巴细胞数在对照组为 845 ± 80.6 个。淋巴细胞数的减少以给药后 4 天最严重,为 19% ($P < 0.001$);给药后 9 天,细胞数与对照无明显差别(图 2)。应该指出,图中曲线只代表胸腺皮质内淋巴细胞密度的变化,与此同时,给药后胸腺亦显著缩小,在给药后 4 天其重量为对照的 20%,因此,胸腺内淋巴细胞总数的减少显然比曲线所示变化为严重。

3. 小肠 在对照组,肠腺的核分裂数为 66 ± 2.9 个,肠腺细胞数为 159 ± 41.1 个, Paneth 细胞数为 34 ± 2 个。给药后 24 小时,核分裂显著减少,相当于对照的 35% ($P < 0.001$);48 小时核分裂明显增加,为对照的 118% ($P > 0.05$)。肠腺细胞在给药后 48 小时减至

69% ($P < 0.001$), 但给药后 3 天, 即恢复到 90% (图 3)。肠腺的核固缩碎裂细胞, 在对照动物甚少见, 20 个大方格内平均只有 4 个; 给药后 24 小时达 123 个, 以后迅速减少, 48 小时为 23 个; 给药后 3 天减至 7 个。Paneth 细胞数在给药后无明显改变。

4. 辜丸 将 A 型精原细胞数(包括第 1—4, 6—8 相)和 B 型精原细胞数(包括第 6、7 相)分别比较, 结果(图 4)如下: A 型细胞在给药后 24 小时显著减少, 至 4—5 天最低, 约为 20%。B 型细胞的减少更为严重, 24 小时减至 40%, 4—5 天完全消失。

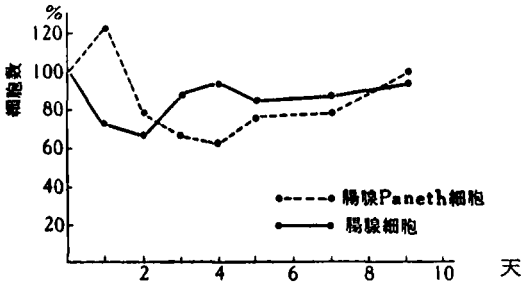


图 3 注射 N-甲基溶肉瘤素后肠腺细胞数的改变

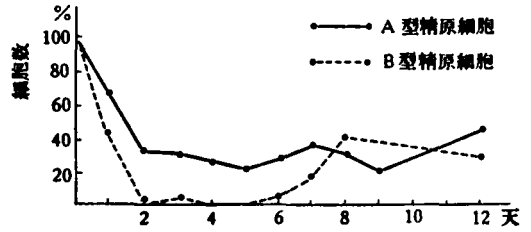


图 4 注射 N-甲基溶肉瘤素后各型精原细胞的数量改变

(三) 各种组织对 N-甲敏感性的比较

在实验 III, 观察了不同剂量的 N-甲对各种组织细胞的损害程度, 按下式计算各剂量对组织细胞的损害率:

$$\text{损害率} = \frac{\text{对照组细胞数} - \text{给药组细胞数}}{\text{对照组细胞数}} \times 100$$

同时参照计算半数效量(ED_{50})的方法^[11], 用简化机率单位法计算 N-甲对各种组织的半数损害量(ID_{50})。结果如表 1。

表 1 N-甲基溶肉瘤素对小鼠各种组织细胞的损害率和半数损害量

		各组 损害率, %				半数损害量(ID_{50}) 毫克/公斤
		I*	II	III	IV	
骨 髓	嗜中性粒细胞	0	5	59	80	167
	嗜酸性粒细胞	50	73	95	90	32.7
	红系统细胞	16	68	95	98	64
	巨核细胞	0	0	0	6	>300
胸 腺	淋巴细胞	7	3	42	92	151
小 肠	核 分 裂	0	7	55	91	151
	肠腺细胞	11	23	45	62	191
	Paneth 细胞	0	14	11	9	>300
辜 丸	A型精原细胞	52	68	68	77	25.2
	B型精原细胞	56	94	99	96	17.5

* I、II、III、IV 组的剂量分别为 37.5、75、150 和 300 毫克/公斤。

在骨髓的各类造血细胞中, 对 N-甲最为敏感的是嗜酸性粒细胞, 其次为红系统细胞, 再其次为嗜中性粒细胞; 巨核细胞对 N-甲最不敏感。小肠对 N-甲的敏感性一般较骨髓和胸腺的敏感性低, 在所检查的各类细胞中, 以肠腺细胞及其核分裂对 N-甲较为敏感。

小肠绒毛上皮细胞在本实验虽未进行计数,但从三次实验的小肠切片看到,绒毛上皮细胞的形态改变,显较肠腺细胞为轻。睾丸的 A 型和 B 型精原细胞对 N-甲极为敏感,以 B 型的敏感性更高,这与实验 II 的结果一致。

讨 论

本实验使用的计数方法是根据 N-甲在这些器官所引起的病变特征而制定的。观察的对象是各器官内对 N-甲最敏感部分的细胞,即骨髓的各类造血细胞;胸腺皮质内的淋巴细胞;小肠的肠腺;睾丸的精原细胞。由于这些部分的变化大都表现为数量的变化,因此,利用计数方法可以用数字来表示器官和组织的病变程度,并进行量的比较。

实验 I、II 的结果表明,在 LD₅₀ 剂量下,各种组织的病变发展过程是不同的。一般说来,给药后 24 小时变化已相当明显,给药后 2—4 天是病变最严重的时期,动物大多在此期间死亡。存活的动物,各种组织均可见到再生现象。小肠的恢复最快,给药后 5 天病变已经消失;骨髓、淋巴结和胸腺等在给药后 7—14 天恢复正常。值得指出的是,骨髓的嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞在再生过程中均出现一个超过对照细胞数的高峯,细胞数分别相当于对照的 159% 和 268%,高峯的出现时间显然不同,分别在给药后 6 天和 12 天。至于其他细胞,在恢复期间的增生较不明显。

实验 III 的结果表明,在检查过的几个敏感器官中,各种组织细胞对 N-甲的敏感性有很大差别。N-甲对小鼠的半数致死量(LD₅₀)为 150 毫克/公斤;而对于各种细胞的半数损害量(ID₅₀),有的远低于 LD₅₀,有的接近 LD₅₀,有的则高于 LD₅₀。从 ID₅₀ 的数值看来,对 N-甲最敏感的细胞为精原细胞和骨髓的嗜酸性粒细胞,其次为红系统细胞和淋巴细胞,最不敏感的是骨髓的巨核细胞和小肠的 Paneth 细胞。根据上述比较,可以进一步了解 N-甲对动物机体的毒性。

由于嗜酸性粒细胞的变化极为明显,使人联想到肾上腺皮质是否参与变化的过程。但据 Haus^[12]所综合的有关资料,肾上腺皮质激素的释放一般只引起末梢血中嗜酸性粒细胞减少,对骨髓的嗜酸性粒细胞没有明显影响。而且在本实验中,未发现肾上腺有形态变化。可见,给 N-甲后骨髓嗜酸性粒细胞的变化与肾上腺皮质可能没有关系。

宋振玉等^[9]用 C¹⁴ 标记的 N-甲酰溶肉瘤素研究了在大鼠各器官内的分布,发现 C¹⁴ 在肾脏的含量最高,肝、脾、肺等次之,而睾丸的含量很低。与本文报告的结果比较可以看出,器官是否出现病变与器官内 C¹⁴ 的含量无明显的相关性,即 C¹⁴ 含量高的器官并不一定是发生变化的器官。但是,不能因此得出各种组织细胞对 N-甲损害作用的敏感性不同与器官内 N-甲的含量无关的结论。因为,目前不能排除下述可能性,即就某一器官(例如睾丸)整体来说 C¹⁴ 的含量虽然很低,但其中某一种对 N-甲敏感的细胞(例如精原细胞)内 C¹⁴ 的含量可能相对的高。用组织放射自显影的方法将有助于解决这一问题。

致谢 本文承杨简教授、宋振玉教授、韩锐医师审阅指正;薛玉川同志参加技术工作,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] 韩锐、王振纲、何适、籍秀娟、刘耕陶、朱天锡、张慧云、范礼理: N-甲酰溶肉瘤素的抗肿瘤作用, 中华医学杂志, 1962, 48, 479—487.
- [2] Han, J., Wang, C. K., Ho, S., and Chu, T. S.: The Antitumour Effect of N-formylsarcolysin on

- Experimental Tumours, *Acta Unio Intern, Contra Cancrum*, 1964, **20**, 144—146.
- [3] 吴恒兴、周际昌、孙 燕、冯慧英: N-甲酰溶肉瘤素治疗恶性肿瘤初步临床报告, 中华医学杂志, 1962, **48**, 488—494.
- [4] 朱景元: N-甲酰溶肉瘤素治疗恶性肿瘤临床疗效初步报告, 中华医学杂志, 1962, **48**, 495—497.
- [5] 王振纲、籍秀娟、韩 锐、范礼理: N-甲酰溶肉瘤素, 谷氨酰溶肉瘤素对动物移植性肿瘤及正常组织中核酸含量的影响, 生理学报, 1962, **25**, 263—271.
- [6] 韩 锐、何 适: 关于抗肿瘤药物的研究 VII. N-甲酰溶肉瘤素的抗瘤谱及毒性, 药学学报, 1964, **11**, 330—337.
- [7] 籍秀娟、王振纲、韩 锐: N-甲酰溶肉瘤素对 P^{32} 参入正常及肿瘤组织核酸的影响, 生理学报, 1963, **26**, 264—270.
- [8] 甄永苏、陈惠民: N-甲酰溶肉瘤素对大鼠吉田肉瘤及宿主器官影响的病理形态学研究, 天津医药杂志, 肿瘤学附刊, 1964, 148—152.
- [9] 宋振玉、朱秀媛: N- $[C^{14}]$ 甲酰溶肉瘤素在正常及肿瘤动物的生理处置, 生理学报, 1964, **27**, 11—17.
- [10] Roosen-Runge, E. C., and Giesel, L. O.: Quantitative Studies on Spermatogenesis in the Albino Rat, *Am. J. Anat.*, 1950, **87**, 1—30.
- [11] 顾汉颐: 生物检定讲义, 1958, 第 54 页, 上海科技卫生出版社.
- [12] Haus, E.: Endocrines System und Blut, *Handbuch den gesamten Haematologie*, 1959, **11** (1), 181—286.

A Comparison of the Susceptibility of Various Normal Tissue Cells in Mice to the Action of N-Formylsarcosylsin—A Pathological and Quantitative Histological Study

CHENG YUNG-SU, CH'EN HUI-MIN AND LI HSUEH-TANG

(Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking)

ABSTRACT

The pathological effects of N-formylsarcosylsin (N-F) in the mouse were investigated. At the dose level of 150 mg/kg (i.p.), lesions were found in the bone marrow, thymus, lymph nodes, spleen, intestine, and testis, while other organs including the heart, lungs, kidneys, brain, etc. remained unchanged morphologically. The changes of the above organs might appear in 4—8 hours after administration of N-F but did not become evident until 24 hours later, and then reached their maximum in 2—4 days. Regeneration began on the 5th to 7th day in survived animals.

For the purpose of comparing the susceptibility of various tissue cells to the destructive action of N-F, various dose levels of N-F were chosen, and the following kinds of tissue cells were counted in a given number of microscopic fields: neutrophil granulocytes, eosinophil granulocytes, erythropoietic cells, and megakaryocytes in the bone marrow; lymphocytes in the thymus; epithelial cells and Paneth cells in the crypts of Lieberkuehn of the small intestine; and spermatogonia of type A and B in the testis. According to the cell counts of various dosage groups, the 50 per cent injurious dose (ID_{50}) of N-F for different tissue cells was calculated.

It was found that the susceptibility of various tissue cells to the action of N-F was quite different. Type A spermatogonia, type B spermatogonia, and eosinophil granulocytes were most sensitive, and the ID_{50} was 25.2, 17.5, and 32.7 mg/kg, respectively. Erythropoietic cells and lymphocytes were also sensitive, the ID_{50} being 64 and 151 mg/kg, while epithelial cells of the Lieberkuehn's crypt and neutrophil granulocytes of the bone marrow were less sensitive. Megakaryocytes and Paneth cells were most resistant, the ID_{50} was higher than 300 mg/kg.

It appears that the quantitative histological method presented in this paper is useful in studying toxic effects of antitumour drugs.