

结晶型硫化镍诱发 BALB/c - 3 T3 细胞恶性转化

刘云岗 陈家 吴中亮

广州医学院化学致癌研究所 广州 510182

摘要 采用细胞灶法测定结晶型硫化镍对 BALB/c - 3 T3 诱发细胞转化的活性,结果表明当硫化镍浓度 $0.25\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时转化率增高 ($P > 0.05$),且有剂量反应关系。各剂量组转化灶细胞共 6 份经软琼脂培养试验均获阳性结果,而对照细胞则为阴性,提示硫化镍诱发的转化细胞具有锚着不依赖性,即恶性特征。

关键词 结晶型硫化镍;BALB/c - 3 T3 细胞;细胞转化;恶性

MALIGNANT TRANSFORMATION IN BALB/c - 3 T3 CELLS INDUCED BY CRYSTALLINE NICKEL SULFIDE

Liu Yungang, Chen Jiakun, and Wu ZhongLiang

Institute of Chemical Carcinogenesis, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182

Abstract Focus system was used to assay the cell transforming activity of crystalline nickel sulfide (NiS) in BALB/c - 3 T3 cells. The results indicated that at the concentrations equal to or above $0.25\mu\text{g}/\text{cm}^2$, NiS induced increases in transformation frequency ($P < 0.05$), in a concentration-dependent manner. The transformed cells from 6 different foci all grew to colonies on soft agar ccultures while control cells appeared negative. This result showed the anchorage-independence of the transformed cells from various foci which is one of the features of malignancy.

Key words crystalline nickel sulfide; BALB/c-3 T3 cells; cell transformation; malignancy

镍化合物于 1987 年被国际癌症研究机构 (IARC) 确认为第一类致癌物⁽¹⁾,其致癌机制正在研讨中,细胞转化是一常用体外诱癌模型。已有叙利亚

地鼠胚胎(Syrian hamster embryo, SHE) 细胞等用于检测镍化合物诱发细胞转化的活性及其作用机制^(2,3),但镍化合物对 BALB/c - 3 T3 细胞的作用多

- spect, 1992;98:113
- 5 Pan JP, Chiang AN, Tai JJ, et al. Restriction fragment length polymorphisms of apolipoprotein B gene in Chinese population with coronary heart disease. *Clin Chem*, 1995;41:424
 - 6 Orita MS, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gelelectrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989;86:2766
 - 7 Linnet K and wiborg O. Steady-state serum concentrations of the neuroleptic perphenazine in relation to CYP2D6 genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther*, 1996;60:41

- 8 Hoelxel AR. Molecular genetic analysis of populations: A practical approach, 1st ed. New York: Oxford University Press, 1992:171
- 9 Hayashi SI, Watanabe J and Kaqajiri K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and mur class glutathione s-transferase gene. *Jpn J Cancer Res*, 1992;83:866
- 10 Kihara M, Kihara M, and Noda K. Lung cancer risk of GSTM1 null genotype is dependent on the extent of tobacco smoke exposure. *Carcinogenesis*, 1994;15:415

(1999 - 02 - 28 收稿;1999 - 03 - 12 接受)

年来无报道。最近我们观察到两种水溶性镍化物(硫酸镍和氯化镍)对后一种细胞具有较弱的诱发转化活性^(4,5)。为探明不溶性结晶型硫化镍对该细胞作用与前者有无差异,并为下一步关于其诱癌的分子机制研究提供相应的恶性转化细胞,本文拟观察结晶型硫化镍诱发 BALB/c - 3T3 细胞转化的活性,并对出现的转化灶细胞作软琼脂培养试验,以鉴定其锚着不依赖性。

材料与方法

1 试剂与细胞培养

结晶型硫化镍 nickel () sulfide 为 Johnson Matthey Catalong 公司出品,取一定量于玛瑙研钵并加入少量三蒸水,然后反复用力缓慢研磨,直至其分散度全部达到 < 2.5 μ m (显微镜下随机计数、测量 200 个 NiS 颗粒其直径均小于 2.5 μ m)。NiS 悬液在 70 $^{\circ}$ 中烘干后,称量,再以三蒸水制成系列浓度的混悬液。苯并(a)芘 B(a)P 为 Sigma 公司出品,临用前配制,以二甲基亚砷(DMSO)溶解, MEM 培养基稀释,染毒终浓度为 0.2 μ g/ml (含 DMSO 0.2mg/ml)。MEM 为 Gibco 实验室出品。BALB/c - 3T3 细胞由美国国家安全与卫生研究所提供。细胞培养用含小牛血清 10% (V/V) 的 MEM 培养液,在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 饱和湿度的环境中培养。

2 细胞毒性试验

采用直径为 60mm 的培养皿,以克隆形成率 (colony formation efficiency, CFE) 作为细胞毒性的指标,每皿接种 200 个细胞,参照过去报道的方法⁽⁵⁾。

3 细胞转化试验

按照过去报道的方法进行⁽⁶⁾。转化率 (transformation frequency, TF) 计算公式为: TF‰ = 转化灶数 / (接种细胞数 \times CFE) \times 1000‰, 各组间 TF 值的比较采用 χ^2 检验进行统计处理。

4 转化细胞锚着不依赖性鉴定

在硫化镍各剂量组均挑取一定数量形态较大而典型的转化灶的细胞,常规培养、传代 5 次后用于软琼脂培养试验以鉴定其锚着不依赖性。对照细胞为转化试验中阴性对照组未出现转化灶的平皿中的细胞经同样传代而成。软琼脂培养的方法参照过去报道⁽⁵⁾,采用 60mm 平皿,每皿加入 5ml 底琼脂 (0.6% 琼 - MEM 完全培养基),顶琼脂则为 2ml 含待测细胞 1 000 个的 0.3% 琼脂 - MEM 完全培养基,每种细胞设 6 个平皿。培养 3 ~ 4wk 后计数每皿细胞克

隆数,计算每种细胞的克隆形成率。

结 果

1 硫化镍诱发细胞毒性作用

由表 1 可见,当硫化镍剂量为 0.125 - 1 μ g/cm² 时相对克隆形成率为 95.1 - 17.3%, 故选这一剂量范围作细胞转化试验。

表 1 硫化镍对 BALB/c - 3T3 细胞克隆形成率的影响

硫化镍 (μ g/cm ²)	克隆形成率 %	相对克隆形成率 %
0	48.6 \pm 4.3	100
0.031	49.7 \pm 5.1	105.8
0.062	47.8 \pm 4.4	98.4
0.125	46.2 \pm 3.0	95.1
0.25	38.1 \pm 3.7	78.4
0.5	21.1 \pm 2.6	44.4
0.1	8.4 \pm 1.6	17.3
B(a)P 0.2 μ g/ml	47.7 \pm 6.0	98.1

$\bar{x} \pm s$, 每组 5 个平行样。

表 2 硫化镍诱发 BALB/c - 3T3 细胞转化作用

硫化镍 (μ g/cm ²)	培养皿数	有转化灶培养皿数	转化灶数	转化率 %
0	20	4	4	0.041
0.125	20	7	7	0.076
0.25	20	11	12	0.157 *
0.5	20	14	17	0.403 * * *
1	20	11	13	0.774 * * *
B(a)P	20	17	23	0.241 * * *

苯并(a)芘浓度为 0.2 μ g/ml; * $P < 0.05$, * * * $P < 0.001$, 与阴性对照相比较。

2 硫化镍诱发细胞转化作用

转化灶的判断标准为 型转化灶,即细胞为梭形,多层、交叉排列,深染且呈现嗜碱性,转化灶边缘随机取向。由表 2 可见,阴性对照组每皿转化灶数为 4/20 (0.2/皿),符合 BALB/c - 3T3 细胞转化试验程序的要求 (< 0.3/皿)⁽⁶⁾;阳性对照组每皿转化灶数为 1.15 (23/20),其阳性反应培养皿所占比例 (17/20) 比阴性对照组 (4/20) 显著增高 (χ^2 检验, $P < 0.001$),故认为本试验系统是有效的。硫化镍在 0.25 μ g/cm² 剂量以上 TF 值均比阴性对照组增高 ($P < 0.05$),且有剂量反应关系。在 0.125 - 0.5 μ g/cm²

剂量范围相邻剂量组之间 TF 呈 2 倍或 2 倍以上增高,符合公认阳性反应标准中的 b 条⁽⁶⁾。故认为硫化镍可诱发 BALB/c - 3T3 细胞转化。

3 转化灶细胞的锚着不依赖性鉴定

从 0.25 - 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 剂量范围的硫化镍各处理组共取 6 个转化灶的细胞进行软琼脂培养试验,结果如表 3 所示,对照细胞克隆形成率为 0,各转化灶细胞均可在软琼脂中生长,其克隆形成率介于 1.1 - 11.0% 之间。说明硫化镍诱发的转化灶细胞具有不依赖性,提示为恶性转化细胞。

表 3 硫化镍诱发的 6 个转化灶的细胞在软琼脂培养中的生长(克隆形成率)

细胞群编号	NiS 剂量组 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	有效皿数	克隆形成率 % ($\bar{x} \pm s$)
对照细胞	0	5	0.00 \pm 0.00
0.2A2	0.25	4	2.85 \pm 0.58
0.2C1	0.25	5	11.02 \pm 1.38
0.5C1	0.5	5	3.50 \pm 0.71
0.5D2	0.5	6	5.03 \pm 0.77
1B1	1	5	1.14 \pm 0.27

讨论

我们曾报道氯化镍和硫酸镍(均为可溶性镍化物)在中等毒性反应(克隆形成率为 50% 左右)的剂量水平以上可诱发 BALB/c - 3T3 细胞转化^(4,5),本研究显示结晶型硫化镍在较低毒性反应(克隆形成率为 78.4%)的剂量即可诱发该细胞恶性转化。这提示结晶型硫化镍对该种细胞诱发转化的活性强于可溶性镍化物。张桥等用多种镍化物诱发大鼠气管上皮细胞研究的结果,也是结晶型硫化镍的转化活性 > 无定型硫化镍 > 硫酸镍和氯化镍⁽³⁾。看来颗粒性镍化物诱发细胞转化的活性强于可溶性镍化物可能是一普遍现象,其原因可能是前者易被细胞吞噬。有人设想其进入细胞后释放出 Ni^{2+} , 然后进入细胞核以诱发细胞转化⁽⁷⁾ 而后者因在水相中以离子状态存在

故其生物利用度很低。

硫化镍的致癌机制,除了它在细胞核中可能直接作用于 DNA 外,也有报道它可促使细胞核中 H_2O_2 等氧化物的产生⁽⁸⁾,后者具有致突变作用;还有报道 Ni() 可诱导人肾上皮细胞 p⁵³ 基因的突变和表达异常⁽⁹⁾。总之镍化物可能通过多种机制诱发癌症或细胞转化。本研究中硫化镍诱发的 6 个转化灶的细胞经软琼脂培养试验,均有生长,但其克隆形成率最大与最小者相差近 10 倍,这种差别看来与硫化镍的剂量可能无关。不同的转化灶的细胞发生的遗传改变可能不尽相同。因此,不同转化灶的细胞在软琼脂中长出的细胞克隆可分别挑取出来增殖,以进一步探讨其恶性转化机制。

参考文献

- 1 仲来福. LARC 专家工作组最近确认的对人致病的物质. 国外医学卫生学分册, 1989; 16(2): 125
- 2 Gang B, Wang X, and Zhang Z. Combined effects of Nickel and benzo(a) pyrene on morphological transformation of SHE cells in vitro. *Arch Complex Environ Studies*, 1989; 1(1): 53
- 3 张桥. 镍化合物体外诱发细胞恶性转化的研究: 2 镍化合物诱导大鼠气管上皮细胞恶性转化. *卫生毒理学杂志*, 1989; 3(1): 33
- 4 刘云岗, 陈方. 硫酸镍诱发 BALB/c-3T3 细胞转化. *劳动医学*, 1997; 14(3): 135
- 5 刘云岗, 陈方. 吴中亮. 氯化镍诱发 BALB-3T3 细胞转化. *劳动医学*, 1997; 14(1): 9
- 6 Dunkel VC, Rogers C, Swierenga SH, et al. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: 3 cell transformation in C3H 10T1/2 mouse embryo cell, BALB/c-3T3 mouse fibroblast and Syrian hamster embryo cell cultures. *Mutat Res*, 1991; 246(2): 285
- 7 Costa M. Perspectives on the mechanism of nickel carcinogenesis gained from models of in vitro carcinogenesis. *Environ Health Perspectives*, 1989, 81(1): 73
- 8 Xi H, Klein CB, and Costa M. Crystalline Ni_3S_2 specifically enhances the formation of oxidants in the nuclei of CHO cells as detected by dichlorofluorescein. *Carcinogenesis*, 1994, 15(3): 545
- 9 Mahle L, Metcalf RA, Ryberg D, et al. Altered p⁵³ gene structure and expression in human epithelial cells after exposure to Nickel. *Cancer Res*, 1992; 52: 218

(1998 - 09 - 09 收稿; 1998 - 11 - 21 修回)