

# 煤尘抽提物诱发 BALB/3T3 A31-1-13 细胞系形态学转化的研究\*

吴中亮 陈家堃 翁炯满\* 黄文溶\*

广州医学院化学致癌研究所

\* 美国国家职业安全与卫生研究所

**摘要** 本文用 BALB/3T3 A31-1-13 细胞系研究了煤尘抽提物的转化活性。亚硝化和未亚硝化的煤尘抽提物都能诱发细胞发生转化且有剂量反应关系。但亚硝化煤尘抽提物的转化活性比未亚硝化者高。从转化集落分离出来的细胞具有赘生转化的一些特征,如细胞生长迅速、接触抑制消失和停泊不依赖性生长等。本文结果看来支持煤矿工胃癌高发的原因的煤尘假说。

**关键词** 煤尘抽提物; BALB/3T3 A31-1-13 细胞系; 细胞转化

不少流行病学资料表明,煤矿工人胃癌死亡率较高<sup>1-3</sup>,其原因尚不清楚。有人提出职业接触可能是煤矿工人胃癌增加的危险因素<sup>4</sup>。Vacobsen 发现煤尘接触与胃癌的发生有密切的联系,因煤尘接触而引起的尘肺的发生与胃癌死亡率间存在着正相关关系<sup>5</sup>。

最近翁氏等提出了一个假说去解释煤矿工人胃癌发病率增高的原因<sup>6</sup>。按照这一假说,吸入的煤尘通过粘液纤毛功能由肺和气管支气管树清除的过程中咽入胃内,由煤尘带入的有机或无机物在胃内进行亚硝化或与来自非吸烟烟草、食物等外源性物质发生反应,生成致癌性的化合物,引起胃粘膜的癌前损害,最终可导致胃癌的发生。

黄氏的研究发现,煤尘的有机溶剂抽提物在 Ames 试验系统中没有诱变性或者诱变性很弱,但是抽提物在酸性环境中进行亚硝化后,其诱变性则变得很强<sup>7</sup>。亚硝化的煤尘抽提物可引起细菌和哺乳类细胞的基因突变,哺乳类细胞的姐妹染色体交换、微核形成和染色体畸变<sup>8-11</sup>。

尽管煤尘抽提物在一些短期试验中显示出遗传毒性,但是否具有致癌性则仍属未知。一般认为细胞转化试验与体内致癌性关系比其他短期试验更直接<sup>12</sup>,因此有必要确定煤尘抽提物是否会引起哺乳类细胞在体外发生转化。

## 材料和方法

1. 化学试剂与培养基 青一链霉素、胰酶、胎牛血清和 Eagle 基本培养基购自 GIBCO 公司。庆大霉素、基本维生素合剂购自 Whittaker 生物制品公司。二甲基亚砜(DMSO)和亚硝酸钠为 Mallinckrodt 公司产品。苯并(a)芘(B(a)P)则以 Sigma 公司购得。

## 2. 样品的抽提和亚硝化

样品的抽提与亚硝化过程按原有方法进行<sup>7</sup>。100 克取自美国新墨西哥州的次烟煤煤尘先用二氯甲烷提取,继用甲醇丙酮混合液抽,提两种滤液分别蒸发至 0.5ml 左右,各加入 20ml DMSO 溶解,再用氮气将其中残余的抽提液吹净。两种 DMSO 溶液以等量的比例混合,取部分混合液加入等量的亚硝酸钠溶液(30mg/ml),用 12NHCl 调 PH 至 3.0,在 37℃ 中振荡 3 小时后,置 -20℃ 中贮存

\* 本文由美国国家研究委员会提供经费,曾参加 1989 年 7 月在美国召开的第 5 届国际环境诱变剂学术会议。

Mutat Res. 1990 待发表。

仅用。

3. 细胞培养 液氮冻存的 BALB/3T3 A31—1—13 细胞迅速解冻后, 用含 10% 胎牛血清, 2mM 谷酰胺, 1% (V/V) 基本维生素混合液和适量抗菌素的 Eagle 基本培养液进行培养, 培养环境为 37℃、5% CO<sub>2</sub> 和饱和湿度。每周传代 2 次, 取 10~12 代细胞用于细胞毒性和转化试验。用于转化试验的培养液所含胎牛血清浓度为 7.5%, 不含青霉素。

4. 相对克隆形成率分析 将 200 个细胞接种于 60mm 的培养皿中, 每种浓度用 5 个平行皿, 24 小时后, 用不同浓度的煤尘抽提物处理 72 小时, 弃去处理培养液, 用 pH7.2 的磷酸盐缓冲液洗涤细胞后换以新鲜培养液, 再培养 6 天, 甲醇固定后, 0.2% 龙胆紫液染色, 解剖镜下计算克隆数。

5. 细胞转化试验 细胞转化试验和转化集落的记录按国际癌症研究中心等机构推荐的标准方法进行<sup>13</sup>。对数生长期的细胞以  $2 \times 10^4$  细胞/瓶的浓度接种于 25cm<sup>2</sup> 的培养瓶内, 每组 20 瓶, 48 小时后加入煤尘抽提物、B(a)P (阳性对照) 或 DMSO (溶剂对照) 处理 72 小时, 然后弃去处理培养液, 用磷酸盐缓冲液洗涤细胞, 再加入新鲜培养液。细胞继续培养 4 周, 每周换液两次, 最后将细胞固定、染色、解剖镜下记录转化集落数。

6. 软琼脂克隆分析 按 Freshney 介绍的方法制备软琼脂悬浮培养基<sup>14</sup>。将含有 0.33% Difco Noble 琼脂、20.8% 胎牛血清和 111~1000 个细胞的 F12 培养基倒入 60mm 培养皿中, 每组 6 个平行皿, 置 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的培养箱中培养 3 周, 解剖镜下计数克隆。

### 结果

煤尘抽提物的细胞毒性通过相对克隆形成率进行分析, 结果见图 1。亚硝化与未亚硝化煤尘抽提物的毒性相近, 有一定的剂量

反应关系, 两种抽提物使克隆形成率降低 50% 的浓度均在 2.08mg/ml 左右。

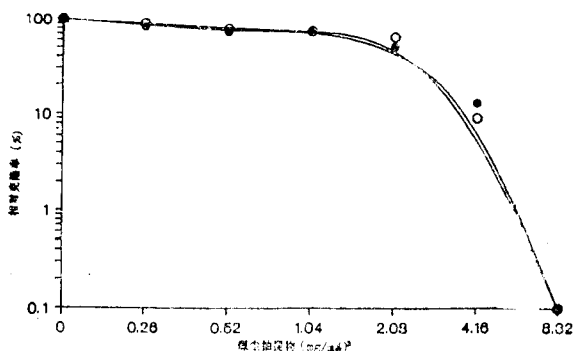


图 1 煤尘抽提物处理 BALB/3T3 细胞的相对克隆形成率  
 ●——亚硝化抽提物  
 ○——未亚硝化抽提物  
 每点为 5 个平行皿的均值

亚硝化与未亚硝化煤尘抽提物可使 BALB/3T3 细胞发生形态学转化。煤尘抽提物处理细胞的转化集落数明显高于正常细胞、溶剂对照细胞和单纯亚硝酸钠处理细胞, 转化集落数随浓度的增高而增多。亚硝化煤尘抽提物的转化活性高于未亚硝化者, 同一浓度的平均转化集落数前者比后者高 1.4 到 2.3 倍, 浓度愈高, 差别愈明显(表 1、图 2)

为了观察转化细胞的某些生长特性, 从转化集落中挑出部分细胞, 将之分散在 5ml 培养液中并接种于 25cm<sup>2</sup> 的培养瓶内, 每周传代 2 次, 取第 9、19 和 27 代细胞进行研究。转化细胞的生长速度高于正常或对照细胞, 但未达到差异具有显著性的地步。转化细胞的饱和生长为密度  $13.9 \times 10^4$  细胞/cm<sup>2</sup>, 正常对照组细胞为  $5.17 \times 10^3$  细胞/cm<sup>2</sup>, 二者相差 2.7 倍。

转化细胞的停泊不依赖性生长特征通过琼脂上的克隆形成率进行测定。转化细胞在软琼脂培养基中能分裂繁殖并形成克隆, 其克隆形成率在 8.8~11.3% 之间, 而正常对照细胞的克隆形成率在 1% 以下, 接近于

表 1 煤尘抽提物对 BALB/3T3 细胞的转化作用

处 理 物	浓 度 (mg/ml) <sup>a</sup>	相对克隆 形成率(%)	转化频率 <sup>d</sup>	平均转化集 落数/瓶
煤尘抽提物, 未亚硝化	0	100	5/5/20	0.19 ± 0.13
	2.08	65	39/15/20	1.53 ± 0.28*
	4.16	9.2	53/20/20	2.28 ± 0.21*
	8.32	0	63/18/20	2.65 ± 0.26*
煤尘抽提物, 已亚硝化	0	100	5/5/20	0.19 ± 0.13
	1.04	76.9	23/9/20	0.72 ± 0.29
	2.08	51.5	59/17/20	2.28 ± 0.29*
	4.16	13.4	85/19/20	3.54 ± 0.26**
	8.32	0	128/20/20	6.03 ± 0.15**
二甲亚砷	5.0 <sup>bc</sup>	-	7/7/20	0.28 ± 0.15
亚硫酸钠	0.05 <sup>c</sup>	92.8	3/3/20	0.11 ± 0.11
苯并(a)砷	0.0002	-	180/20/20	8.33 ± 0.19**

a. 每毫升的煤尘量    b.  $\mu\text{l/ml}$     c. 相当于抽提物最高浓度组中二甲亚砷或亚硫酸钠的浓度

d. 转化集落/含转化集落的细胞瓶数/细胞总并数

\*  $P < 0.05$     \*\*  $P < 0.01$

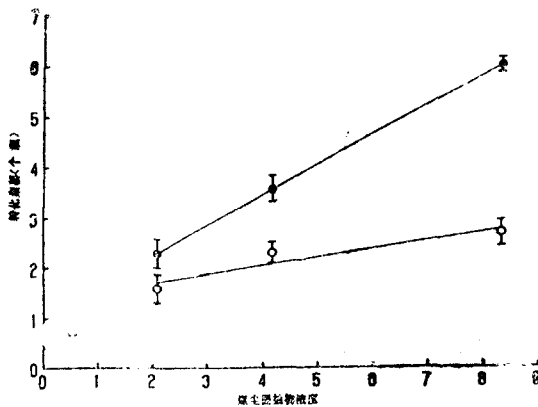


图 2 两种煤尘抽提物对 BALB/3T3

转化作用的比较

• 亚硝化抽提物

○——未亚硝化抽提物

每点代表 20 个瓶中转化集落的平均值

零。接种不同细胞数的克隆形成率大致相同，即克隆形成率的高低与起始接种的细胞数关系不大(表2)。

### 讨 论

煤尘抽提物不管亚硝化还是没有亚硝化者均能诱发 BALB/3T3 细胞发生形态学转

化并且有剂量反应效应，但亚硝化的煤尘抽提物的转化频率明显高于未亚硝化者，即亚硝化后煤尘抽提物的转化活性较高，这与细菌回复突变试验的结果相符。

煤尘抽提物未经代谢活化也显示转化作用，在其诱变性与细胞遗传作用方面也见到类似情况。在没有代谢激活的情况下，亚硝化煤尘抽提物可引起基因突变、姐妹染色单体交换和染色体畸变<sup>7-9</sup>。有人曾证明，纯煤蒸馏液用亚硝酸盐处理后能生成直接作用的诱变剂<sup>5</sup>，故推测亚硝酸盐处理煤尘抽提物所形成的亚硝基化合物可能也具有直接作用，不需代谢激活便有致突变性<sup>7</sup>。亚硝化煤尘抽提物中显示转化活性的化学物质可能也属于直接作用一类。此外，BALB/3T3 细胞本身具有将前致癌物代谢活化为终致癌物的能力<sup>10</sup>，故不能排除煤尘抽提物尤其是未经亚硝化的煤尘抽提物的转化活性来自非直接作用化合物的可能。

从转化集落分离出来的细胞生长迅速，饱和密度增高，获得锚独立性，能在软琼脂

表 2 转化细胞在软琼脂上的生长情况

细 胞	接 种 密 度 (个)						
	1000		333		111		
	克隆数	克隆形成率(%)	克隆数	克隆形成率(%)	克隆数	克隆形成率(%)	
正常3T3细胞,	P <sub>5a</sub>	4.25 ± 1.26	0.43	2.0 ± 0.82	0.6	0.25 ± 0.5	0.23
	P <sub>5b</sub>	-	-	2.0 ± 0	0.6	0	0
亚硝化煤尘抽提物转化细胞	P <sub>9</sub>	87.0 ± 12.8	8.7	29.25 ± 11.35	8.78	9.75 ± 2.26	8.78
	P <sub>19</sub>	-	-	37.5 ± 6.36	11.26	12.5 ± 2.12	11.26
苯并(a) 转化细胞	P <sub>9</sub>	96.75 ± 11.47	9.68	48.5 ± 6.76	4.56	21.0 ± 3.92	18.92
	P <sub>19</sub>	-	-	56.5 ± 7.52	16.97	22.0 ± 4.24	19.82

P<sub>n</sub>——细胞代数

中生长,这些特性与致癌性有一定联系。有资料表明, BALB/3T3 转化细胞的饱和密度与其致癌性密切相关,转化细胞生长饱和密度高以及在软琼脂培养基中克隆形成率高者接种裸鼠后易诱发肿瘤<sup>17,18</sup>。本研究虽仅以形态学转化作为判别终点,未进行裸鼠接种试验,但根据以上资料可以认为,煤尘抽提物诱发形态学转化的细胞已获得了恶性转化的一些特征。因此,煤尘的接触与吞咽可能是煤矿工人胃癌高发的危险因素之一。

## 参 考 文 献

1. Stocks P, On the death rates from cancer of the stomach and respiratory diseases in 1940-53 among coal miners and other male residents in counties of England and Wales. *Brit. J. Cancer* 1962; 16: 592
2. Matolo NM, et al, High incidence of gastric carcinoma in a coal mining region. *Cancer*, 1972; 29: 733
3. Rockette HE, Cause specific mortality of coal miners. *J. Occ. i Med.* 1973; 19: 795
4. Ames RG, Gastric cancer among coal miners: some hypothesis for investigation. *J. Soc. Occ. Med.* 1982; 32: 73
5. Jacobsen M, Dtus exposure, lung disease, and coal miner's mortality. PH. D. Dissertation, Univ. of Edinburgh (Scotland); 1976.
6. Ong T, et al, Gastric cancer in coal miners: an hypothesis of coal mine dust causation. *Med. Hypothesis*, 1983; 12: 159
7. Whong W-Z, et al, Role of nitrosation in the mutagenic activity of coal dust: A hypothesis postulation for a gastric carcinogenesis in miners. *Environ. Res.* 1983; 32: 298
8. Tucker JD, et al, Genotoxic activity of nitrosated coal dust extract in mammalian systems. *Environ. Res.* 1984; 35: 171
9. Tucker JD, et al, Induction of sister chromatid exchanges by coal dust and tobacco snuff extracts in human peripheral lymphocytes. *Environ. Res.* 1985; 7: 313
10. Ong T, et al, Genotoxicity studies of rodents exposed to coal dust and diesel emission particulates. *Environ. Res.* 1985; 37: 399
11. Krishna G, et al, In vivo induction of sister chromatid exchanges in mice by nitrosated coal dust extract. *Environ. Res.* 1987; 42: 106
12. Heidelberg C, et al, Cell transformation by chemical agents—a review and analysis of the literature. A report of the United States Environmental Protection Agency. *Mutat. Res.* 1983; 114: 233
13. Kakunaga T. and Yamasaki H, Recommended protocol for the BALB/c 3T3 cell transformation assay. In: Kaku naga T,

- and Yamasaki H, eds, Transformation assay of established cell lines, mechanisms and application, Lyon, IARC Scientific Publication No. 67, 1985, 208-212
14. Freshney RI, Cultures of animal cells, a manual of basic technique, Alan R. Liss, New York, 1983, 133-136
  15. Pelroy RA, and Stewart DJ, The effect of nitrous acid on the mutagenicity of two coal liquids and their genetically active chemical fractions, *Mutat. Res.*, 1981, 90 : 297
  16. Cortesi E, and Dolara PJ, Neoplastic transformation of BALB/3T3 mouse embryo fibroblasts by the beef extract mutagen 2-Amino-3-methylimidazo (4, 5-d) quinoli *Cancer Lett* 1983; 20 : 43
  17. Aaronson SA, et al, Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro, *Science* 1968, 162 : 1024
  18. Freedman VH, and Shin S, Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium, *Cell* 3 : 355

(上接第 44 页)

期依次减弱, 本试验水样采集于冰封期。

污灌区土壤各剂量组呈阳性结果, 清灌区土壤呈阴性结果。污、清灌区土壤虽都长期受废弃物、农药和化学等污染, 但土壤对污染物有一定自净能力, 土壤微生物对污水致突物有一定降解作用, 但不完全。污灌区土壤存在致突变物质是长期使用污水灌溉、污水中致突物长期蓄积的结果。

本试验对污、清灌区 5 种蔬菜进行小鼠骨髓细胞微核试验结果表明: 污、清灌区蔬菜均呈现阴性结果, 且污、清灌区蔬菜各对应剂量组间差别均无统计学意义, 这表明天津市南排污河灌区和清灌区土壤中生长出的蔬菜本次对小鼠骨髓细胞微核未检出致突活性。

据近年来国内外一些文献<sup>[6][7]</sup>报导蔬菜具有抗诱变性。蔬菜中含有多种物质如类胡萝卜素、 $\gamma$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素、蕃茄红素、异硫氰酸脂类、2-当归内脂

等都对致癌剂有明显的抑制突变作用。作物包括蔬菜有从土壤中富集某些化学毒物的能力, 但不同品种富集能力不等。我们未检出污灌区蔬菜致突变作用, 这是否可以提示蔬菜富集某些致突化学毒物能力低或因蔬菜本身含有大量抗突变物质所致, 或兼而有之, 这些尚需做多系统多终点致突检测, 以全面评价污灌区蔬菜食用的安全性。

### 参 考 文 献

1. 马欣芳, 卫生研究 1988; (6) : 14-17
2. 黄辛纟, 等。《环境化学致突变、致畸、致癌试验方法》。浙江科学技术出版社, 1985; 228
3. Hopke PK, et al, *Environ Sci Technol* 1982; 16(3) : 104-147
4. 刘克明, 等。环境与健康杂志 1988; (1) : 34-36
5. 刘风贞, 等。天津医学院学报 1988; (3) : 1-6
6. Abranarn SK, et al, *Mutat Rer* 1986; 172(1) : 51
7. 冯宝健, 等。卫生毒理学杂志 1989; 3(1) : 44

Human Embryo Fibroblast (HEF) malignant transformation was induced by repeated N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG) treatment IN VITRO. Malignant biological changes were shown in treated cells, including morphological changes, increased growth rate, loss of contact inhibition, growth in low serum 1% medium and soft agar, active DNA synthesis, extended lifespan, and alterations of cell ultrastructure etc. The degree of altered growth pattern correlated with MNNG concentrations used and duration after treatment.

Aneuploid and uptake of hematoporphyrin derivative (H.P.D) have been systematically studied in control and transformed cells at regular intervals. The frequency of aneuploid was enhanced in treated cells in early stage (passage 7). The uptake of H.P.D by transformed cells was much more than that of control groups in successive culture and occurred in early stage (P5) of malignancy. The results suggest aneuploid and increased uptake of H.P.D. may be valuable biological markers in the early stage of human cell transformation.

## AN ANALYSIS BY CHEMICAL CLASS OF GENOTOXICITY TESTS TO PREDICT CARCINOGENS

Zhou Zongcan, et al.

Beijing Medical University, Dept of Toxicology

Using the IUPAC preferential ordering scheme, each compound of animal carcinogenicity data base was placed into 13 classes respectively. The validation of 17 genotoxicity tests as predictors of animal carcinogenicity for each chemical class was evaluated. The analysis showed the validation values varied with chemical class. The preferred choices of genotoxicity tests for specific chemical class were recommended.

## INDUCTION OF MORPHOLOGICAL TRANSFORMATION BY COAL DUST EXTRACT IN BALB/3T3 A31-1-13 CELL LINE

Wu zhongliang, Chen Jiakun

Institute for chemical Carcinogenesis, Guangzhou, China

Wu zhong wenzongg, Ong Tonman

Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown, U.S.A.

The transformation, activity of coal dust extracts was studied using BALB/

3T3 clone A31-1-13 cells. Coal dust extracts, both nitrosated and nonnitrosated, induced cell transformation in a dose response manner. However, the transformation frequency was higher with the nitrosated than with the nonnitrosated extract. All transformed cell lines derived from coal dust extract-induced foci showed biological characteristics of neoplastic transformation such as loss of contact inhibition and anchorage independent growth. These results appear to support the coal mine dust hypothesis for the causation of gastric cancer in coal miners.

## STUDIES ON TERATOGENICITY AND EMBRYOTOXICITY OF BHC AND LINDANE IN RATS

Zhu Yong-ping wang Min Huang xing-shu

Division of Toxicology, Zhejiang Medical University, Hangzhou

The teratogenicity and embryotoxicity of BHC and Lindane in Sprague-Dawley rats were investigated. BHC and Lindane were administered orally at 100, 50, 25 mg/kg or 13, 5, 2mg/kg respectively in rape oil on day 6-15 of the gestation. As compared to the solvent control, (rape oil) BHC and Lindane induced embryotoxicity, as measured by percentage of dead and absorbed fetuses. Mean fetal weight, length of body and of tail were significantly reduced after oral administration of BHC and Lindane, as compared to the solvent control. These studies conclude that BHC and Lindane are embryotoxic, but not teratogenic in Sprague-Dawley rats.

## STUDIES ON THE RADIOSENSITIVITY OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF NORMAL HUMAN IN VITRO

Li Xinlan,

Laboratory of Industrial Hygiene, Ministry of public Health, Beijing.

Nori Nakamura, director,

Radiation Effects Research Foundation, Hiroshima, Japan.

In this paper, radiosensitivity of human fresh lymphocytes was assayed in vitro by colony formation assay using PHA and recombinant interleukin-2. Peripheral blood lymphocytes from adult healthy individual were exposed to x rays with doses from 0 to 5Gy in vitro, and dose-survival curves were obtained. The  $D_{10}$  (dose required to kill 90% of the cells) was found to be about 3.56GX.

In the second method, cytokinesis was blocked by cytochalasin B. From the