

Malignant Transformation of Immortalized Human Bronchial Epithelial Cells BEAS-2B Induced by Tin Mine Dust in Yunnan Province

云锡矿粉诱导永生 生化人支气管上 皮细胞 BEAS-2B 恶性转化

周 莉¹/金克炜^{1*}/张天宝²

(1. 昆明医学院病理学教研室, 云南 昆明 650031; 2. 第二军医大学卫生毒理学教研室, 上海 200433)

ZHOU Li¹, JIN Ke-wei^{1*}, ZHANG Tian-bao²

(1. Department of Pathology Kunming Medical College, Yunnan Kunming 650031; 2. Department of Toxicology in Second Military Medical University, Shanghai 200433)

【摘要】背景与目的: 研究云锡矿粉对人支气管上皮细胞的致癌转化效应,以探讨云锡矿工肺癌病因及其机制。材料与方法: 采用永生生化人支气管上皮细胞 BEAS-2B 细胞,设 200 $\mu\text{g/ml}$ 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 剂量的 2 个氧化矿染毒组和 1 个溶剂对照组,细胞染毒 72 h 后,隔代染毒直至第 9 代。系统观察转化过程中细胞的生物学特性及血清抗性、锚着独立性生长能力等转化表型特征。结果: 第 20 代时各组细胞均未表现出血清抗性,第 25 代 200 $\mu\text{g/ml}$ 组细胞出现血清抗性和倍增时间增长、染色体畸变率增高;第 30 代时 200 $\mu\text{g/ml}$ 组细胞在软琼脂上可形成小的细胞集落,至第 40 代时,200 $\mu\text{g/ml}$ 及 50 $\mu\text{g/ml}$ 剂量组细胞均能在软琼脂上形成克隆。结论: 云锡矿粉能体外诱发人支气管上皮细胞恶性转化。

【关键词】永生生化人支气管上皮细胞; BEAS-2B; 矿粉; 恶性转化

中图分类号: R730.231

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)05-0367-03

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: To explore the malignant transformation effects of Yunnan tin mine dust on human bronchial epithelial cells, further investigate the cause and mechanism of lung cancer in Yunnan tin miners. MATERIAL AND METHODS: The immortalized human bronchial epithelial cells BEAS-2B were treated with tin mine dust at the concentrations of 200 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$ for 72 hours on every other generation and was stopped in the 9th generation, including a negative control group. The characteristics of the cellular biology and the malignant transformation phenotype of cells were identified through observing serum resistance, anchorage independent growth, etc. RESULTS: Each group of cells in the 20th generation didn't show serum resistance. For the high mine dust concentration group cells in the 25th generation, the multiplication time, the serum resistance and the aberration of chromosome were increased, with the formation of small cell colonies in soft agar in the 30th generation. The anchorage independent growth appeared in high and low concentration groups in the 40th generation. CONCLUSIONS: Tin mine dust in Yunnan province could induce malignant transformation of BEAS-2B cells. By passing generation and selection in soft agar medium we established the pre-cancerous transformation cells that could be cultured long term *in vitro*.

【KEY WORDS】 Human bronchial epithelial cells; BEAS-2B; Tin mine dust; Malignant transformation

云南个旧锡矿矿工职业性肺癌高发从 70 年代初起逐渐引起人们重视,病因学研究是其中的重点。主要的观点有 2 种:一些学者认为其病因是“氢砷复合,以氢为主”^[1],而另一些学者认为,肺癌的高发主要与作业环境

中长期高浓度的混合性粉尘有关,矿粉为其主要致病因素,提出了“多因素综合作用学说”^[2]。支气管上皮细胞是矿粉作用的主要靶细胞,且矿工肺癌类型也主要以鳞癌为主,因此,体外应用人支气管上皮细胞株研究矿粉

收稿日期: 2006-02-07; 修回日期: 2006-04-27

基金项目: 国家自然科学基金(NO.30560053); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20050678004)及云南省教育厅科学研究基金(03Z497C)项目资助。

作者简介: 周莉(1978-),女,安徽省蚌埠市人,博士研究生,研究方向:肺癌分子病理。Tel:13122831186, E-mail: zlkmmc@sina.com

* Correspondence to: JIN Ke-wei, E-mail: jinkw@163.com

致癌机制、建立恶性转化细胞模型,对于云锡肺癌的病因学研究具有重要意义。本实验以永生化的支气管上皮细胞 (Immortalized human bronchial epithelial cells, BEAS-2B) 作为细胞模型,进行矿粉诱导的 BEAS-2B 细胞恶性转化的研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

氧化矿粉采用云锡矿井井下采掘作业面沉积尘,由云锡劳研所提供,经玛瑙研钵研磨,200 目筛过筛。胎牛血清 (杭州四季青), LHC-8 无血清培养基 (Biosource), 25 cm² 细胞培养瓶及 60 mm 培养皿 (Corning), 胰蛋白酶 (华美), 二甲亚砜 (DMSO, Sigma), 琼脂粉 (Sigma), 噻唑蓝 (MTT, Sigma)。BEAS-2B 细胞系由第二军医大学卫生毒理学教研室提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

BEAS-2B 细胞以 LHC-8 无血清培养液在 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,每周传代 1 次,传代后第 3 d 换液。

1.2.2 细胞毒性试验

于 BEAS-2B 细胞处于对数生长期时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,台盼蓝染色、计数,制成浓度为 10⁵/ml 的细胞悬液,以每孔 100 μl 的体积接种于 96 孔板,并设只加入培养液的空白对照,于 CO₂ 细胞培养箱内孵育 48 h 后,每孔加入不同浓度的氧化矿粉,使终浓度分别为 500、250、125、62.5、31.25 μg/ml,每个剂量设 5 个平行孔,于 CO₂ 细胞培养箱内共孵育 24 h。染毒结束后,每孔加入 20 μl 的 MTT (5 mg/ml) 溶液,于 CO₂ 细胞培养箱内再孵育 4 h。孵育结束后,弃上清,每孔加入 150 μl 的 DMSO,振荡,于酶标仪上读取 490 nm 处的各孔光吸收值,按下列公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{试验组光吸收值}}{\text{对照组光吸收值}} \times 100\%$$

再以细胞存活率为纵轴、以氧化矿粉剂量对数为横轴作图,按作图法求出半数细胞增殖抑制浓度 (IC₅₀)。

1.2.3 细胞转化试验

经细胞毒性试验,选择细胞存活率大于 85% 的高、低 2 个剂量组 (200 μg/ml 及 50 μg/ml) 诱导处于对数生长期的 BEAS-2B 细胞,氧化矿经消毒灭菌后以 LHC-8 培养基配制成所需浓度后使用。细胞以每瓶 (25 cm²) 1.5 × 10⁵ 密度接种,48 h 后细胞进入对数生长期时,以上述浓度的高、低 2 个剂量组氧化矿染毒细胞,染毒 72 h,隔代染毒直至第 9 代,然后继续常规传代培养。

1.2.4 血清抗性实验和倍增时间测定

将处于对数生长期的第 20 代及第 25 代各剂量组及对照组细胞按约 300 个细胞/皿接种于 60 mm 培养皿中,共 6 组,每组 6 皿。每组中有 3 皿每皿加入 10% 胎牛血清。6 d 后终止培养,经 PBS 洗涤、甲醇固定、Giemsa 染色后计数每皿克隆数,按下式计算接种效率:

$$\text{接种效率}(\%) = \frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

未加血清的各皿随机计数 10 个克隆的细胞数,按下式计算倍增时间:

$$\text{倍增时间}(\text{h}) = \frac{\text{接种后到计数时的间隔时间}(\text{h})}{\text{Log}_2(\text{克隆平均细胞数})}$$

1.2.5 锚着独立性生长实验

用 LHC-8 无血清培养基配制 0.7% 琼脂糖,高压灭菌后,以 3 ml/皿加入到 60 mm 培养皿中,制成底琼脂,凝固后待用。将第 20 代、第 30 代及第 40 代的 200 μg/ml 及 50 μg/ml 剂量组和对照组细胞制成 10⁴/ml 细胞悬液,每 1ml 细胞悬液与 1ml 高压灭菌后的 0.7% 琼脂糖以 1:1 混匀,加到底琼脂上。待上层琼脂凝固后,加入 2 ml/皿 LHC-8 培养基,常规培养。每组设 3 个平行皿,每 3 d 换液 1 次,3 周后镜下计数细胞数多于 50 个的克隆数,按下式计算克隆形成率:

$$\text{克隆形成率}(\%) = \frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times 1000\%$$

1.2.6 数据分析

运用 SPSS 统计软件进行 χ^2 检验与方差分析。

2 结果

2.1 细胞毒性试验

氧化矿粉对体外培养的人支气管上皮细胞具有细胞毒性作用,可抑制其增殖活性。随受试物浓度增加,细胞增殖活性不断下降 (见表 1)。按作图法求得 IC₅₀ 值约为 837.0 μg/ml。

表 1 氧化矿粉对人支气管上皮细胞增殖活性的影响

Table 1 Effects of proliferative activities of BEAS-2B by tin mine dust

Concentration (μg/ml)	A490nm	Survival rate
500.0	0.140 ± 0.017	68%
250.0	0.169 ± 0.006	82%
125.0	0.174 ± 0.006	85%
62.5	0.177 ± 0.009	86%
31.25	0.188 ± 0.006	92%
0	0.205 ± 0.007	100%

2.2 血清抗性实验和倍增时间测定

第 20 代 200 μg/ml、50 μg/ml 剂量组及对照组细胞的血清抗性实验中,在有血清的条件下,各组细胞的生长均受到抑制,未表现出血清抗性。第 25 代细胞中,50 μg/ml 剂量组及正常对照组细胞的生长仍然受到血清抑制 ($P < 0.05$),而 200 μg/ml 剂量组细胞接种效率提

高 ($P < 0.05$), 抗血清促分化能力提高 ($P < 0.05$), 倍增时间增长, 表明此时细胞对环境的选择性和依赖性降低, 符合转化细胞的增殖动力学特性 (见表 2)。

表 2 第 25 代细胞血清抗性实验和倍增时间测定结果

Table 2 The results of the serum resistance and the multiplication time in 25th generation cells

Groups	Serum	Plating efficiency (%)	Multiplication time (h)
Negative control	-	19.5 ± 0.71	33.6
	+	5.5 ± 0.71*	
50 μg/ml group	-	22.5 ± 0.71	33.3
	+	11.0 ± 1.41*	
200 μg/ml group	-	26.0 ± 5.66**	35.7
	+	39.0 ± 1.41*	

* Compared with the same group that didn't have serum, $P < 0.05$.
** Compared with the negative control group, $P < 0.05$.

2.3 锚着独立性生长试验

第 20 代各组细胞均不能在软琼脂上形成克隆, 第 30 代时可见细胞以数十个左右聚集成团, 但生长缓慢, 不能进一步形成较大的克隆, 提示其在软琼脂中的三维生长能力尚不是很强。至第 40 代时, 200 μg/ml 及 50 μg/ml 剂量组细胞均能在软琼脂上形成克隆, 其克隆形成率明显高于对照组 ($P < 0.01$) (见表 3), 此时形成的细胞集落呈明显的立体三维空间生长状态 (见图 1), 从软琼脂上分离的单个集落细胞经体外扩增培养后建立了可长期传代的恶性转化细胞。

表 3 第 40 代细胞软琼脂克隆形成率试验结果

Table 3 The results of the cloning efficiency in soft agar in 40th generation cells

Groups	Concentration (μg/ml)	Cloning efficiency (%), $\bar{x} \pm s$
Negative control	0	0.28 ± 0.03
50 μg/ml group	50.0	13.30 ± 0.27*
200 μg/ml group	200.0	15.47 ± 0.06*

* Compared with the negative control group, $P < 0.01$.



图 1 软琼脂中生长的 BEAS-2B 矿粉转化细胞集落 (200 μg/ml 剂量组) (×400)

Figure 1 The foci of transformation cells of BEAS-2B induced by tin mine dust in soft agar (200 μg/ml group) (×400)

3 讨论

体外细胞恶性转化试验是癌变机制研究的重要方法之一, 以往所用的靶细胞绝大部分为啮齿类动物细胞或成纤维细胞, 而用人类上皮细胞的研究相对较少。BEAS-2B 由正常人支气管上皮细胞感染腺病毒 12 和 SV40 杂交病毒而永生, 细胞株保持上皮细胞的超微

结构特征, 染色体核型为近二倍体且在传代过程中保持稳定, 无裸鼠致瘤性, 是进行理化致癌物检测和致癌机制研究的适宜靶细胞。我们所用的矿粉进入机体后其主要作用细胞正是支气管上皮细胞, 矿工肺癌的类型也多为鳞状细胞癌, 因此本试验以 BEAS-2B 作为靶细胞。

以往学者对云锡矿尘的细胞学研究较少。黄润等^[2]在云锡矿工肺癌实验病因学系列研究中发现, 云锡矿粉动物诱癌试验阳性, 但 Ames 试验阴性, 而按矿粉中数种非放射性无机化学成分含量比例制成的混合尘, 其动物诱癌实验及 Ames 实验的结果均为阳性。项芒等^[3]用云锡矿尘、青石棉尘对大鼠体内染尘 15 d 后取其气管上皮细胞体外培养, 计数转化集落数均为阳性且与云锡矿尘有剂量反应关系。我们应用永生化人支气管上皮细胞为研究对象, 以采自井下作业面的云锡矿尘作为受试物, 采用细胞转化试验进行研究, 试验在体外条件下部分模拟了体内受矿粉作用的靶细胞向肿瘤细胞的演变过程, 可进一步明确云锡矿尘体外致细胞转化效应及其转化特征, 为矿粉致癌机制研究提供了重要的基础资料。

相对于其它种属细胞来说, 人类细胞能快速而有效的修复 DNA 损伤, 对于某些致癌剂经一次处理可能很难发生恶性转化^[4]。因此本试验采用了隔代多次给药的处理方法, 使细胞在受试物的反复多次打击下, 不能有效修复或发生错误修复, 促使细胞转化。本实验中, 不同剂量组细胞发生血清抗性增加的时间有所不同, 高剂量组早于低剂量组。高剂量组在第 25 代时血清抗性增加, 倍增时间增长, 同期实验表明此时染色体畸变率阳性, 癌基因和抑癌基因表达亦有相应改变 (另文发表), 但软琼脂克隆形成实验阴性, 因此高剂量组第 25 代细胞对于矿粉转化细胞来说可能是一个早期关键阶段。矿粉转化细胞在第 20 代时不能在软琼脂上形成克隆, 第 30 代时可见细胞聚集成团, 但集落很小, 小于每个集落细胞数大于 50 个的判定标准, 第 40 代时不同剂量组细胞均可形成克隆且其克隆形成率明显高于对照组 ($P < 0.01$), 克隆形态典型, 符合判定标准, 说明细胞此时已完成恶性转化。

参考文献:

- [1] 孙世荃, 尤占云, 乔友林, 等. 云锡矿工肺癌的病因学研究[J]. 辐射防护, 2001, 21(5):278-290
- [2] 云锡矿工肺癌实验病因学研究课题组. 云南锡矿矿工肺癌实验病因学系列研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 1995, 18(1):34-36
- [3] 项芒, 崔明珍, 程书钧. 云锡矿尘致大鼠气管上皮细胞转化的研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1994, 12(6):335-338.
- [4] 夏寿萱. 放射生物学 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998, 379-438.