

靠。结果氮—乙酰化酶多态慢型表型为 17.5%，与参比人群的 20.3% 相比，经卡方检验，卡方值为 0.0544， $P = 0.6668$ ，两者之间无显著差异，可以初步认为原发性支气管肺癌与氮—乙酰化酶多态之间无联系。

若将肺癌按病理种类分别统计，可以深入一步研究，但是因为本调研中有些病理类型数目太少，未能作分类分析。

目前已了解的致肺癌的病原物很多，如：香烟、石棉、煤焦油沥青逸散物、稠环芳烃、苯并芘等大气污染物、氯甲醚、铬、镍、铍、镉、芥子气、强酶雾及氩子体等等，它们在体内的代谢活化、致癌机制等有很大不同，涉及宿主遗传因素也会很多，涉及的代谢酶系也很多，而初步看来氮—乙酰化酶多态变异所起的作用不大。其他一些酶系如：P450 CYP1A1 (即 AHH)，谷胱甘肽转移酶 (CST) 则可能有更明显的作用。今后需在这方面作单项与综合

的酶多态的调研，找出与支气管肺癌最密切相关的酶多态。

### 参考文献

1. Knudson AG. The genetic predisposition to cancer. In Bloom AD, et al Genetic susceptibility to environmental mutagenesis and carcinogenesis N Y: A P, 1989: 15
2. 凌敏, 徐玉辉, 任俊霞, 等. 南京地区中学生氮—乙酰化酶多态现象和基因频率的研究. 遗传与疾病, 1991; 8(2): 113
3. Evans DA P. The association of The slow acetylator phenotypew ith bladder cancer. *J M ed Genet*, 1983; 20: 330 & 21: 243
4. 蒋松琪, 张爱平, 凌敏, 等. N—乙酰化酶多态现象与膀胱癌的关系研究. 职业医学, 1994; 21(2): 1
5. 凌敏, 文跃进, 徐玉辉, 等. 肝癌病人的氮—乙酰化酶多态性研究. 癌变·畸变·突变, 1994; 6(6): 1
6. 金进兴, 茅林海, 陈安天, 等. 启东肿瘤患者的氮—乙酰化酶多态现象的研究. 癌变·畸变·突变, 1994; 6(6): 4
7. 徐玉辉, 任俊霞, 凌敏, 等. 间接检测人体氮—乙酰化反应多态性方法探讨. 江苏职业卫生, 1990; 2(1): 30

## 氯化镉对 SHE 细胞的恶性转化作用及转化细胞<sup>3</sup>H- TdR 掺入的研究

吕中明<sup>1</sup> 张伟伟<sup>2</sup> 杨永年<sup>3</sup>

<sup>1</sup>江苏省卫生防疫站毒理教研室 <sup>2</sup>江苏省实验动物中心细胞室 <sup>3</sup>南京医科大学卫生毒理研究室 南京 210009

**摘要** 本研究用  $0.2 \sim 1.6 \mu\text{mol/L}$  的氯化镉溶液处理原代培养的叙利亚地鼠胚胎细胞 (SHE)，同时选择三蒸水和亚硝基胍 MNNG 作为阴性和阳性对照。结果表明：实验剂量范围内各组 SHE 细胞均出现转化集落，并且有剂量—反应关系，氯化镉具有较强的致癌能力。为了进一步研究转化细胞的 DNA 合成情况，我们又进行了<sup>3</sup>H- TdR 掺入研究。结果显示：转化细胞<sup>3</sup>H- TdR 的掺入量约为阴性对照组的 1.7~ 3.0 倍，但又略低于 L<sub>929</sub> 肿瘤细胞株<sup>3</sup>H- TdR 掺入量 (约为阴性对照组 4.4 倍)，从而说明转化细胞 DNA 合成非常旺盛，氯化镉具有引起 SHE 细胞恶性转化的能力，它可能是一种潜在的致癌剂。

**关键词** 氯化镉; SHE; 细胞恶性转化; <sup>3</sup>H- TdR

# CdCl<sub>2</sub> AND <sup>3</sup>H- TdR INCORPORATION WITH SHE CELLS

Lu Zhongming, Zhang Weiku, Yang Yongnian

Jiangsu Provincial Sanitary and Anti-epidemic station, Nanjing 210009

**Abstract** Primary SHE cells cultured with DMEM (Gibco) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) were exposed to 0.2~1.6μM cadmium chloride solution, distilled water and MNG (Sigma) were served as negative and positive control. All of the treated groups within the range of given concentration appeared cells transformation. Dose-dependent effects were noticed with concentration from 0.2 to 1.6μM. Further study on the DNA synthesis of such transformed cells, <sup>3</sup>H- TdR incorporation method was adopted. The results showed that the <sup>3</sup>H- TdR incorporated into transformed SHE cells was about 1.7~3.0 folds as much as that of control cells, but slightly lower than that of L<sub>929</sub> tumor line cells, which sentended 4.4 folds as much as that of the control. It can be inferred that cadmium chloride was able to induce SHE cells malignant transformation.

**Key words** CdCl<sub>2</sub>; Cell transformation; <sup>3</sup>H- TdR incorporation; SHE cells

人群流行病学和动物实验都有报道认为镉化合物与肿瘤之间有一定的相关关系,随着工业生产的迅速发展,镉对环境污染越来越严重,它直接或间接地威胁着人类健康。细胞体外恶性转化试验是以细胞的恶性转化为检测终点,它和动物致癌试验之间有很高的符合率,被认为是体内化学致癌过程最直接的体外模拟,而且转化细胞与肿瘤细胞有许多相似的性质,其最主要特征是“失去控制地无限制增殖”,有关镉化合物诱导的转化集落细胞DNA合成情况的报道不多,本文拟通过体外细胞恶性转化试验和<sup>3</sup>H- TdR掺入方法研究其DNA合成情况,从而为正确评价氯化镉的致癌性提供依据。

## 材料和方法

### 1. 试剂

氯化镉,分析纯,天津化学试剂批发部产品, MNG (N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍) 为 Sigma 公司产品,用三蒸水配成所需浓度。DMEM 培养液, Gibco 产品,胎牛血清(FBS)为上海浦东开发区高桥兽医站生产,胰蛋白酶是 Difco 进口分装。

### 2. 同位素标记物

氚化胸腺嘧啶脱氧核苷(<sup>3</sup>H- TdR), 0.5mCi/ml, 中国上海原子能研究所生产。

### 3. SHE 细胞制备<sup>(1)</sup>

取怀孕 12~14d 的叙利亚金黄地鼠(中英合资上海西普尔—必凯实验动物有限公司购得),按文献报道的方法进行制备,用第一次传代细胞作细胞毒性和恶性转化试验。

### 4. 细胞毒性试验<sup>(2)</sup>。

细胞毒性的大小直接影响细胞转化结果,可以用相对克隆率(RCE)和克隆形成率(CFE)来确定其毒性效应。取第二代 SHE 细胞,将 5000 个细胞接种至 25cm<sup>2</sup> 培养瓶中,24h 后加入不同浓度的氯化镉溶液,阳性对照组加入 MNG,使其终浓度达 1μg/ml,每个剂量组作三个平行瓶,培养 72h 后,弃旧培养液,用 Hanks 液冲洗三次,加入新鲜培养液,再继续培养 4d 后终止,经甲醇固定,10% Giemsa 染色,计数克隆并按下式确定其 RCE 和 CFE。

$$RCE = \frac{\text{实验组每瓶克隆数}}{\text{阴性对照组每瓶克隆数}} \times 100\%$$

$$CFE = \frac{\text{每瓶克隆形成数}}{\text{每瓶接种细胞数}} \times 100\%$$

### 5. 细胞转化试验<sup>(3)</sup>

将 2 × 10<sup>4</sup> 个对数生长期细胞接种于

25cm<sup>2</sup> 培养瓶, 每瓶 5ml 含 10% FBS 的 DMEM, 5% CO<sub>2</sub> 条件下 37 培养 24h, 分别加入 0.1ml 不同浓度氯化镉溶液, 阳性对照组加入 0.1ml MNG, 终浓度为 1μg/ml, 每组作 6 只平行样。培养 72h 后, 用 Hanks 液冲洗三次, 加入新鲜培养液, 每 3~4d 换液一次, 2wk 后换以含 5% FBS 的 DMEM 培养液, 再继续培养 4wk, 取其中三瓶, 用 PH = 6.8 的 PBS 洗二次, 细胞经甲醇固定, Giemsa 染色, 计数 III 型转化灶。III 型转化灶的特征: 细胞呈多层重复堆积, 细胞相互交叉, 呈成纤维细胞型, 转化灶边缘不规则, 细胞嗜碱性, Giemsa 染成深蓝色, 周围常有交叉生长的成纤维细胞, 转化灶中心可出现坏死或液化。按下式计算细胞恶性转化率 (TE):

$$TE(\%) = \frac{\text{转化灶数}}{\text{接种细胞数} \times \text{CFE}} \times 100\%$$

#### 6 转化细胞<sup>3</sup>H-TdR 掺入<sup>(4)</sup>

将转化试验中另外三瓶细胞经 EDTA—胰酶消化下来, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液继续培养、传代。达一定数量

后制成  $7.5 \times 10^4/\text{ml}$  细胞悬液, 然后将其接种至 5ml 玻璃管内, 每管 1ml。实验分六组, 即阴性对照组 MNG 组, 3 组氯化镉染毒组 (因  $2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$  组细胞被污染而弃去) 和肿瘤细胞 L<sub>929</sub> 组。每组做三只平行管, 培养 24h 后, 弃旧培养液, 加入 1ml 新鲜培养液, 并分别加入 1μCi/管<sup>3</sup>H-TdR, 置 37 培养箱中培养 3h 后, 置冰浴中终止掺入反应, 每管加入定量的 0.5% 胰酶和 0.06% 的 EDTA 溶液, 吹打后用抽滤法将细胞收集在玻璃纤维滤膜上, 依次用冷生理盐水、5% 三氯醋酸和无水乙醇洗涤处理, 将膜片烘干 (70 ± 0.5h) 后放入闪烁液中 (内含 0.8% PPO 和 0.06% POPOP 的二甲苯溶液), 用液体闪烁计数器 (LKB 1219 型, Sweden) 测量 cpm 值, 实验重复一次, 资料进行方差统计学处理。

## 结果

### 1. 细胞毒性和转化试验: 结果见表 1。

Table 1. The toxicity and transformation of CdCl<sub>2</sub> with SHE cells

group	dosage (Mol/L)	CFE (%)	RCE (%)	No. of clone	transformed clone per plate	TE (%)
Control	0	2.31	100	4/3	1.33	0.288
I	$2 \times 10^{-7}$	2.28	98.72	11/3	3.67	0.805
II	$4 \times 10^{-7}$	2.17	94.01	30/3	10.00	2.304
III	$8 \times 10^{-7}$	1.98	85.62	38/3	12.67	3.199
IV	$1.6 \times 10^{-6}$	1.62	70.47	22/3	7.33	2.261
Positive	0.1μg/ml	1.71	74.03	66/3	22.00	6.432

从上表可以看出, 随着氯化镉浓度的增加, 细胞克隆形成率降低, 说明随着氯化镉浓度的增加, 细胞毒性也逐渐增加, 呈现一定的剂量—反应关系。

在细胞转化试验中, 各试验组均能形成典型的转化灶, 形态多为 III 型, 克隆中心为圆形无角细胞, 密集分布, 部分有坏死或液化, 周围有交错生长的成纤维细胞 (见照片)。从表 1 还可以看出细胞转化率 (TE) 随氯化镉浓度增加而增加, 各剂量组与阴性对照组相

比均有较强的诱导转化能力, 以 TE 值和相对应的氯化镉浓度作图 (见图 2), 可以明显看出其剂量—反应关系, 并且各浓度组的转化率均为阴性对照组的两倍以上, 根据细胞转化试验阳性结果的判断标准, 氯化镉在本试验浓度范围内均能诱发 SHE 细胞转化。

2 转化细胞的<sup>3</sup>H-TdR 掺入量: 结果见表 2。<sup>3</sup>H-TdR 掺入 DNA, 在未染毒细胞 (阴性对照组) 和转化细胞之间差异非常显著 ( $P < 0.01$ ), 转化细胞的<sup>3</sup>H-TdR 掺入量 (cpm)

约为阴性对照组的 1.7~3.0 倍,但又低于肿瘤细胞 L<sub>929</sub> (<sup>3</sup>H- TdR 掺入量约为阴性对照组的 4.4 倍),说明转化细胞 DNA 合成比

对照组细胞旺盛得多,转化细胞具有一定的恶性肿瘤细胞特性,即氯化镉具有诱导 SHE 细胞恶性转化的能力。

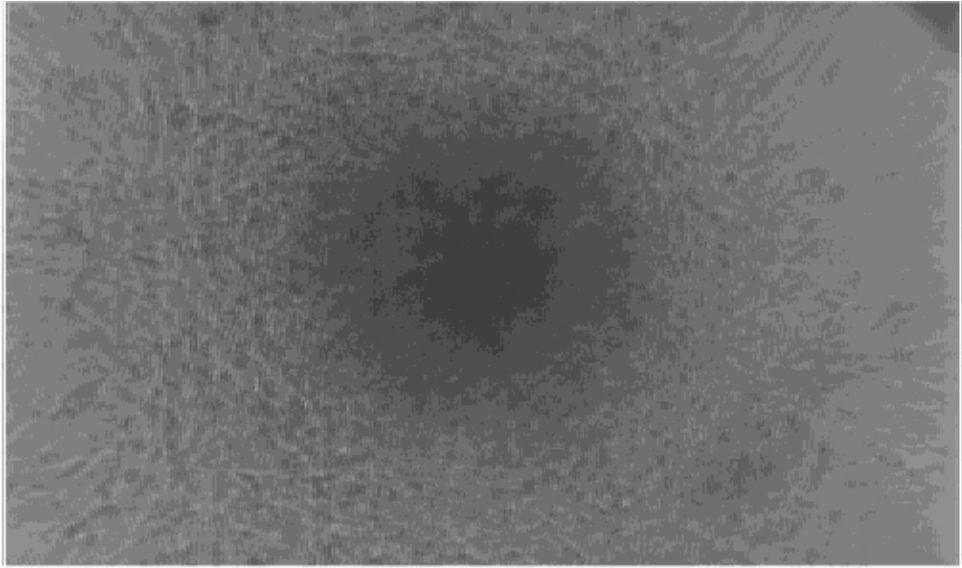


Figure 1. Clone of the SHE cell transformation (10 × 10)

Table 2 <sup>3</sup>H- TdR incorporation (cpm) of transformed SHE cells

group	No. of cells	<sup>3</sup> H- TdR incorporation (cpm)	Transformed/control	p <sup>Δ</sup>
Control	7.5 × 10 <sup>4</sup>	1223.7 ± 209.1	-	-
II	7.5 × 10 <sup>4</sup>	2066.9 ± 756.9	1.69	< 0.05
III	7.5 × 10 <sup>4</sup>	3645.2 ± 480.0	2.98	< 0.01
IV	7.5 × 10 <sup>4</sup>	3365.9 ± 519.3	2.75	< 0.01
Positive	7.5 × 10 <sup>4</sup>	2923.7 ± 470.3	2.39	< 0.01
L <sub>929</sub>	7.5 × 10 <sup>4</sup>	5352.4 ± 145.9	4.37	< 0.01

Δ Compared with the control

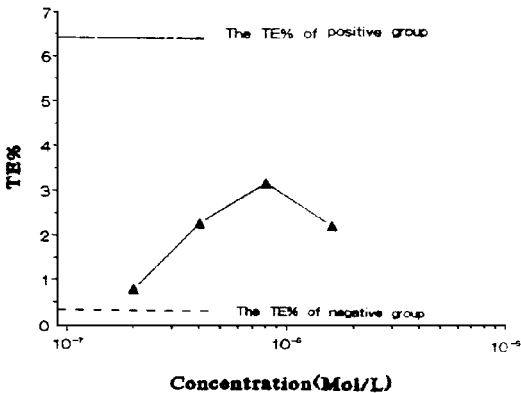


Figure 2 The relationship between TE% and the concentration of CdCl<sub>2</sub>

## 讨论

虽然 IARC1986 年就将镉列为可疑致癌物,但迄今为止,并没有直接确切证据。作为体内化学致癌过程的最直接体外模拟,转化试验鉴定致癌物质的符合率一般可达 90% 以上,结果已达到统计学所能接受的可信程度<sup>(5)</sup>。

许多研究报道证实,叙利亚金黄地鼠的早期培养物可以被各种化学致癌物转化,而且形态转化和致癌活性有关。SHE 有许多优点,它在实验条件下很少出现自发转化现象,

因而在国际上该细胞与BALB/C3T3 C3H/10T1/2 被推荐为普遍接受的三种检测化学致癌物的细胞<sup>(6)</sup>。

<sup>3</sup>H- TdR 被广泛用作DNA 合成的示踪物,细胞DNA 合成的测定可反映细胞分裂、增殖情况,因而<sup>3</sup>H- TdR 掺入法是一种准确了解细胞DNA 合成的敏感方法。

转化细胞往往具有肿瘤细胞的一些特性,诸如形态改变,生长特性及表面超微结构改变等,其中最重要的特征之一是细胞失去控制地无限制生长,而细胞迅速分裂增殖必须有一定的物质基础,也就是说必须合成更多的DNA 方能适应细胞分裂增殖的需要。

本研究结果表明,在实验浓度范围内,氯化镉对哺乳动物细胞具有转化活性,可形成明显的转化灶,它不但具有转化细胞的主要特征——杂乱性生长和交叉重叠,可在低浓度胎牛血清的培养液中生长,而且转化细胞<sup>3</sup>H- TdR 掺入量高出对照组 1.7~ 3.0 倍,说明转化细胞的DNA 合成旺盛得多,但又略低于L<sub>929</sub>。可能一方面是转化集落的细胞中尚有部分未转化细胞,另一方面是转化集落中有部分坏死、液化细胞混杂所造成。氯

化镉诱导的SHE 转化细胞具有恶性肿瘤细胞的特征,从而说明氯化镉具有诱导哺乳动物细胞恶性转化的能力。但癌变过程是一复杂、多步骤变化过程<sup>(7)</sup>,其作用机理多种多样,有待于进一步深入研究和探讨。

## 参考文献

1. 李寿祺主编 卫生毒理学基本原理和方法 第一版,成都:四川科学技术出版社,1987:494—451.
2. 黄幸纾,陈星若主编 环境化学物致突变、致畸、致癌试验方法 第一版,杭州:浙江科学技术出版社,1985:175—182
3. 丁方兴,聂岚,朱惠刚 长江水质对SHE 细胞的恶性转化作用 中国公共卫生学报,1994;13(6):332
4. 张伟,唐竹萍 体外细胞培养技术评价实验动物笼具毒性的研究:IV 塑料笼器具浸出液对<sup>3</sup>H- TdR 掺入HeLa 细胞DNA 的影响 实验动物与动物实验,1993;10(2):6
5. 李军,王福林,刘春生等 氯化镉对人胚肺成纤维细胞转化作用的研究 解放军预防医学杂志,1991;9(2):92
6. Charles HB, Aron EF, Roman JP, 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*, 1993; 114: 283- 9.
7. IARC. Monographs on the cadmium and cadmium compounds 1993; 58: 188- 205.

## 沙棘汁的抗诱变研究

刘敏捷 解国梁 钱毅春 刘世亮 安秀伟 尹幸念 刘丽珍 赵金贵  
内蒙古卫生防疫站 呼和浩特 010020

**摘要** 本文采用Ames 实验及小鼠骨髓细胞微核实验,研究了沙棘汁对亚硝胺在体内外合成的阻断作用;并与同浓度的维生素C 做了比较,研究结果表明:沙棘汁有较好的抗诱变作用,而且这种作用明显优于同浓度的维生素C。这对沙棘汁进一步开发利用提供了生物学方面的科学依据。

**关键词** 沙棘汁;N—二甲基亚硝胺;抗诱变性