

硫酸镍体外诱导正常人胚鼻咽纤维 母细胞转化的研究

杨大俊* 区宝祥

(肿瘤研究所)

用体外细胞培养技术研究环境中各种致癌因子的致癌性及致癌机理,是一种比较理想的有效的方法。在体外可控制的条件下,可以使具有正常生长特性的细胞在致癌因子作用下逐步转化为具有恶性生长特性的细胞,既能深入研究从细胞到分子水平的细胞转化特点和癌变机制,也可用于检测环境中各种致癌物,并可对抑制转化的因子和恶性转化细胞逆转的途径等进行探讨。自1963年 Berwald 和 Sachs 首先用化学致癌物多环芳烃类成功地诱发叙利亚地鼠细胞恶性转化后,20多年来国外许多研究机构 and 学者采用各种来源的细胞,先后检测了几百种化学致癌物以及物理因素和生物因素的体外致癌性,并对致癌物的作用方式和细胞恶性转化后的生物学特性有了较充分的认识,初步建立起定量的、重复性好的哺乳细胞体外转化系统^[1]。自1978年 Kakunaga 首次成功地诱发正常人纤维母细胞恶性转化后^[2],近10年来,人体细胞体外转化研究进展迅速,国外许多研究机构和学者相继进行了大量的工作,但迄今仍未获得国际公认的成功。

病因流行病学调查显示微量元素镍与鼻咽癌死亡呈正相关。区宝祥等曾以二亚硝基呱嗪为致癌剂,用硫酸镍为促癌剂,成功地诱发了大鼠鼻咽癌和纤维肉瘤^[3],我室还发现硫酸镍能增高人淋巴细胞 SCE 率,并对紫外线诱导的人淋巴细胞 DNA 修复合成有明显阻抑作用^[3]。本实验旨在用硫酸镍体外诱导正常人胚鼻咽纤维母细胞转化,以研究人鼻咽纤维母细胞在体外培养条件下各种表型特征及转化过程中各种生物学特性改变,为镍在人鼻咽肿瘤发病中的作用提供进一步的证据。

材料与 方法

细胞制备 胎龄4~6月水囊引产的胚胎,无菌条件下分离鼻咽粘膜,漂洗、剪碎,按组织块培养法制成单层生长的鼻咽纤维母细胞。培养液用 Ham F10 或 199,使用时加上20%小牛血清,青链霉素各100u/ml和100mg/ml,胰岛素 2μg/ml,氢化可的松 0.5μg/ml, pH7.0~7.2。细胞每周换液2次,传代1~2次,用 TV 消化液(0.25%胰酶加等量的0.02%EDTA)消化。

致癌物处理 先用细胞相对存活率进行细胞毒性试验,毒性试验选用剂量为0、0.5、1、10、20μg/ml。根据毒性试验结果,选择生长良好的早代(2~3代)细胞,于消化后按每瓶 2×10^5 接种于25ml小方瓶中,24小时后进入对数生长期,选出分布均匀、含有较多圆亮细胞的瓶随机分为4组,每组3瓶,其中 HNF-A 组为空白对照组,硫酸镍三个组即 HNF-B、HNF-C、HNF-D 的相应浓度为1、5、10μg/ml。按此浓度相应地加入无血清 F10 培养液中,和细胞一起培养24小时后,换新的完全培养液。以后常规换液,传代。每次传代用0.25%胰酶处理。

形态与生长特性观察 致癌物处理后每天定期观察细胞形态改变,早期每代均取一个培养瓶弃培养液,生理盐水漂洗后甲醇固定,10%Giemsa 染色。必要时拍摄照片。生长曲线与饱和密度是细胞消化后,按 5×10^5 细胞数/瓶接种,隔天取3瓶细胞计数,取3瓶平均数绘制生长曲线。高温及低血清生长试验是

* 研究生

将细胞分别置于41℃恒温培养箱或仅含1%小牛血清或无血清条件下培养。

刀豆球蛋白(ConA)凝集试验 将 5×10^5 /瓶的细胞数置于含 $10 \mu\text{g/ml}$ ConA的无血清培养液中,轻轻振摇,37℃恒温箱培养15分钟后观察细胞凝集情况。

细胞表面扫描电镜观察 将生长在盖玻片上的细胞先用pH7.0的PBS漂洗,用戊二醛、锇酸固定,再用pH7.5的PBS冲洗3次,依次通过50%、60%、70%、90%、100%乙醇脱水,再用醋酸戊酯处理,CO₂临界点干燥,黄金真空喷镀制成标本,日本S-450扫描电镜观察,拍照。

染色体分析 细胞传代接种于75ml大方瓶,40~48小时后加秋水仙素 $0.05 \mu\text{g/ml}$ 或 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 作用2~4小时,0.25%胰酶消化细胞,按本室常规方法制得染色体标本。定期、动态地观察分析染色体结果,每次分析至少50个分散良好的中期分裂相,必要时拍摄照片。

双层半固体琼脂生长试验 Bacto琼脂,底层为0.5%,顶层为0.33%,以 5×10^5 个细胞接种,双倍199培养液培养3周,观察集落生长情况,拍摄照片。

结 果

细胞生长与细胞毒性 组织块存活率一般在70%以上,与组织块大小、翻瓶时间等有较大关系,一般在接种后2~4天即可见细胞从组织块边缘长出,2~3周即可铺满瓶底。硫酸镍对人胚鼻咽纤维母细胞的毒性反应有一定的相关性,其剂量反应曲线见图1。

形态转化 正常对照组细胞在体外连续培养中,主要呈长梭形,排列有一定方向性,彼此平行相靠,为单层生长,核较少,胞浆均匀,染色浅(见图4)。

加药5~7天,HNF-D组出现有胞质肿胀,核固缩,细胞内颗粒增多等细胞毒性反应现象,但不久便消失。加药后30~35天左右,细胞出现明显的形态学改变,细胞形态由长梭形变为短梭形、多角形,核浆比例增大,细胞

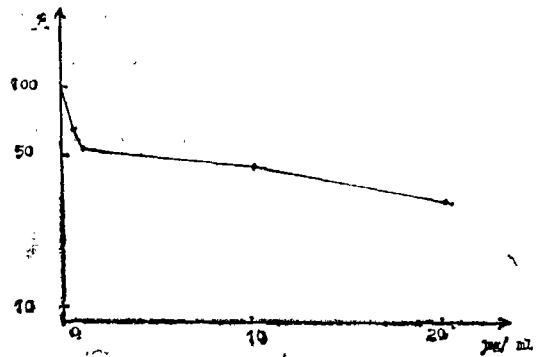


图1 硫酸镍的细胞毒性

嗜碱性增强,染色加深,细胞和细胞核的异形性明显,细胞接触抑制消失,堆集成多层的交叉生长,细胞排列无方向性。在HNF-D组,常可见到一些典型的转化灶形成,并在传代过程中逐渐占优势生长,见图5。但在HNF-B、HNF-C组则少见到这种转化灶,传代至20代左右时,细胞逐渐衰老、死亡。

生长特性改变 对照组第5代(30天)细胞与加药的HNF-D组第20代(126天)细胞生长曲线(见图2)处理细胞的倍增时间短,饱和密度增加。

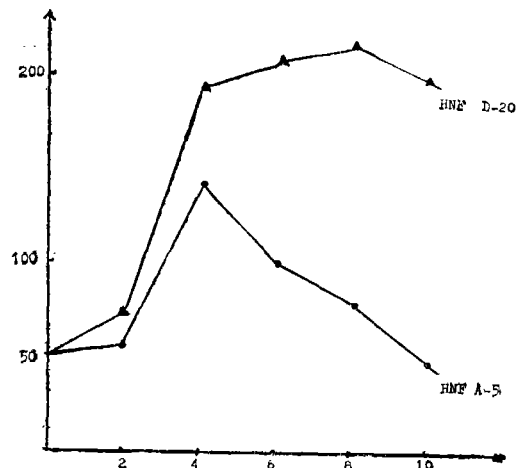


图2 正常与转化细胞生长曲线

低血清条件下,正常对照组细胞生长缓慢,7天左右基本脱落、死亡。处理组细胞能保持生长,3周后消化细胞仍能存活。

41℃高温条件下,正常与处理组细胞存活

均较差。

Con A 凝集试验 对照组第 8 代细胞凝集试验阴性，同代的处理组细胞则为阳性。

细胞表面 正常细胞表面及侧面仅有少量鼓泡状突起与小微绒毛。而处理组细胞则有较多的、大小不一的鼓泡状结构，微绒毛较多，大小分布很不一致，见图 6。

染色体分析 对照组和各处理组细胞均在一定的间隔时间内进行染色体分析，各组染色体数目变化及趋势见图 3。正常组染色体数目变化范围在 42~95 之间， $2n = 46$ 的均在 70% 以上，在近倍体中以丢失或增加 1~2 条染色体

多见，染色体数目变化不大。

而硫酸镍处理过的细胞染色体数目变化发生早，分布广泛，从 35 条至 200 多条，和对照组相比，有非常显著性差异 ($P < 0.001$)。染色体数目的丢失或增加一般在 2~5 条，各组均可发生，但 D、G、B、A 组染色体丢失较多见，而 C、E、F 组染色体增加多见，尤以 C 组增加明显。同时，在连续传代过程中，HNF-B 和 HNF-C 组 (NiSO_4 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 与 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的二倍体与异倍体细胞数的百分比变化不大，而 HNF-D 组 (NiSO_4 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组的二倍体数逐渐减少，异倍体细胞数逐渐增加；在数目分

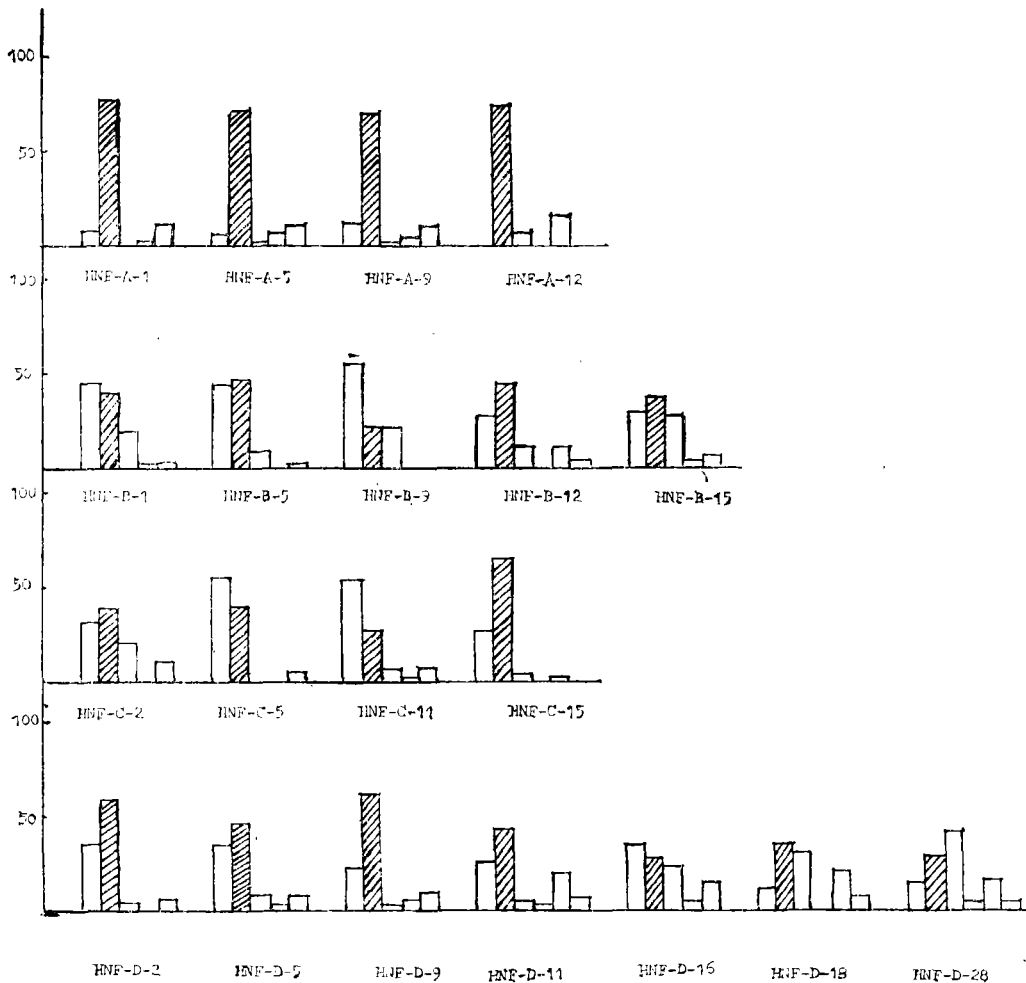


图 3 正常与各处理组染色体数目变化动态柱状图

从左至右染色体数目依次为 35~45; 46; 47~57; 58~80; 81~103; >103

布方面, HNF-B 和 HNF-C 组, 始终以低二倍体为主, 而 HNF-D 组的超二倍体细胞和四倍体范围的细胞数逐渐增加。

染毒后的细胞染色体结构畸变率较高, 形式多种多样, 但以断裂为主, 断裂常发生在 B 组和 C 组染色体上, 次为 A 组, 见图 7-A、7-D。在 HNF-D 组, 结构畸变率在连续传代过程中有逐渐增加的趋势, 见表 1。另外, 还可见一标记染色体——巨大双着丝粒染色体 (图 7-C)。多在第 10 代以后的三组细胞核型中, 对照组无。

双层半固体琼脂生长试验 对照组细胞不能在软琼脂培养中生长成集落, 而 HNF-D 组第 25 代细胞则能长出大于 25 个细胞的集落。

细胞寿命 在本实验条件下, 正常对照组细胞传至 15 代, 存活共 92 天; HNF-B 和 HNF-C 组传至 24~25 代, 存活 151 天和 156 天; HNF-D 组传至 38 代因严重污染而死亡, 共存活 301 天。

讨 论

大量的动物实验证明, 镍化合物具有致癌、促癌和协同致癌的作用。在细胞转化方面, Rivedal 等对镍化合物的致癌、促癌作用作了大量的工作^[4], Lechner 等最近用硫酸镍等作用人气管上皮细胞发生了表型改变及染色体变化等^[5], 并有人做了镍化合物诱导的人皮肤纤维母细胞转化的工作^[6]。这些都说明镍化合物对人体细胞具有一定的致癌性。而本实验

表 1 正常与转化的人鼻咽纤维母细胞染色体结构畸变

组 别	传代数(天)	结 构 畸 变 类 型						畸变率%	P 值
		中 分 裂 相	裂 隙	断 裂	断 片	双 微 体	其 他		
HNF-A CONTROL	1(3)	50	1	0	0	0	0	2	
	5(27)	51	0	1	0	0	0	2	
	9(51)	53	0	0	0	0	0	0	
	12(70)	40	0	0	0	0	0	0	
HNF-B NiSO ₄ 1 μg/ml	1(3)	52	1	1	2	3	0	7.7	>0.5
	5(29)	50	2	3	2	0	缺失2	10	>0.5
	9(54)	23	0	3	0	0	0	8.7	>0.5
	12(75)	51	3	4	0	0	交换1	5.9	>0.5
HNF-C NiSO ₄ 5 μg/ml	15(91)	44	2	2	2	1	双着2 标记2	9.1	
	2(7)	34	1	3	0	0	交换1	8.8	>0.05
	5(29)	50	0	0	0	1	0	2	>0.05
	11(69)	51	1	1	2	0	标记2	3.9	>0.05
HNF-D NiSO ₄ 10 μg/ml	15(91)	50	0	2	0	0	双着1 标记1	6	
	2(7)	43	1	1	1	1	0	9.3	>0.05
	5(29)	52	1	4	0	0	0	7.7	>0.05
	9(54)	53	3	6	0	0	标记1	11.3	<0.05 >0.01
HNF-D NiSO ₄ 10 μg/ml	11(69)	51	1	1	0	2	0	3.9	>0.05
	16(96)	50	0	3	2	5	环1	16	
	18(106)	50	6	5	1	6	双着1	22	
	28(186)	50	10	6	1	6	0	24	

首次用三种浓度的硫酸镍作用于正常人胚鼻咽纤维母细胞,引起了形态转化、生长特性改变、染色体变化、软琼脂生长及生长寿命延长等生物学特性改变,尤其以高浓度组明显,为镍化合物在人鼻咽肿瘤发病中的作用提供了进一步的证据。

正常细胞发生恶性转化后,大都伴有染色体变化,包括染色体数目变化与结构畸变等。染色体变化对恶性转化发生发展有何作用,染色体变化的特征与规律,一直是人们关注的重点之一,因为对染色体变化的了解将有助于我们对癌变机制的认识,并为最终攻克癌症提供依据。早在1973年,Sachs实验室就认为染色体的改变对恶性的表现起着决定性的作用^[7]。但Dipaolo则认为染色体变化是随机发生的,继发的,不是细胞恶性转化的原因^[8]。近年,Tsutsui等认为染色体变化与细胞恶性转化有良好的平行关系^[9]。从本实验结果看,如果单从某一次染色体分析结果看,染色体改变也是无特异性的,这或许支持Dipaolo的理论。但若从细胞连续传代过程中的染色体变化趋势看,染色体数目变化有一定的规律性。即在转化细胞中,染色体从早期的丢失为主逐步转变为增加为主,从低二倍体为主发展为超二倍体、四倍体范围的染色体为主,整个异倍体数的比例越来越高。而且染色体变化与化合物浓度及体外培养传代时间有一定关系。虽然就目前的结果我们尚不能说染色体的非整倍体是恶性转化的原因或结果,但染色体数目变化的一些趋势,异常染色体及标记染色体的出现,说明染色体改变在致癌过程中是重要的。

难波提出细胞形态改变,无限繁殖和染色体变化是衡量人细胞癌变的三个标准^[10],而Milo认为半固体琼脂中生长,在裸鼠体内形成肿瘤和对鸡胚皮肤的浸润是彼此平行又可靠的恶变标准^[11],Kakunaga则把人体细胞分为能在动物接种产生肿瘤的完全恶性转化,及具有部分恶性表型的部分转化二种,后者又可分具有形态转化,和锚着不依赖但无致瘤性以及形态正常,锚着依赖但能无限生存且是非整倍

体核型二类^[12]。一般公认,衡量恶变的可靠指标是异体接种成功。根据实验组细胞与正常对照组各种生物学特性出现明显改变,尤其是形态转化,染色体改变及软琼脂生长和生长寿命延长等指标来看,本实验细胞已具有相当程度的恶性性状,可以说是不完全性恶性转化的细胞。我们在判断恶性转化时,应当结合多项指标综合分析,才能对具体的实验结果作出较客观的结论。(本文图4~7见84页)

参 考 文 献

- [1] Heidelberger C, et al. Cell transformation by chemical agents—a review and analysis of the literature, a report of the U.S. environmental protection agency genetoc program. *Mutat Res* 1983; 114:283.
- [2] Kakanaga T. Neoplastic transformation of human diploid fibroblast cells by chemical carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75(3):1334.
- [3] 区宝祥 曾毅. 鼻咽癌病因和发病学的研究. 北京. 人民卫生出版社 1985; 47.
- [4] Revidal E & Sanner J. Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C₃H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. *Cancer Res* 1973; 33:3239.
- [5] Lechner JF, et al. Effects of asbestosis and carcinogenic metals on cultured human bronchial epithelium. *Human Carcinogenesis*, Harris CC et al (eds), New York 1985.
- [6] Biederman K & Landolph JR. Induction of anchorage independence in diploid human foreskin fibroblasts by carcinogenic metal salts. *Cancer Res* 1986; 46:107
- [7] Yamamoto T, et al. Identification of the chromosomes that control malignancy. *Nature New Biol* 1973; 24:247.
- [8] Dipaolo JA, et al. Relationship of chromosome changes to neoplastic cells: trans-

formation. Am J Pathol 1976; 85:709.

[9] Tsutsui T, et al. Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: a possible chromosomal mechanisms in carcinogenesis. Cancer Res 1983; 43:3814.

[10] 难波正义. 人类体细胞培养致癌实验研究的现状与展望. 组织培养1983;9(2):26.

[11] Milo GE, et al. Characteristics of human cells transformation.

[12] Kakunaga T. Cellular and molecular mechanisms of neoplastic transformation of human cells. 13th international cancer congress, Biology of Cancer, New York 1983.

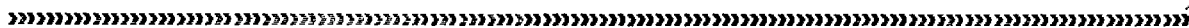
Transformation of Normal Human Nasopharyngeal Fibroblast Cells Induced by Nickel Sulfate in Vitro

Yang Dajun Ou Baoxiang

(Cancer Institute)

Abstract

It was firstly approved that the trace element nickel compounds, which have a positive correlation with the nasopharyngeal carcinoma mortality rate in Guangdong province, Can induce the transformation of normal human nasopharyngeal fibroblast cells in vitro. The fibroblast cells were treated with nickel sulfate at 1µg/ml, 5µg/ml and 10 µg/ml in serum free meium for 24 hours. The experimental results represented that the morphologic transformation, alteration of cell surface and growth pattern, chromosomal aberrations, colonies growed in soft agar and remarkably extended life span occured after treated with nickel sulfate. We have systematically observed the chromosomal changes in control and transformed cells at regular intervals in culture. Our results suggested that chromosomal aberrations can play an important role in induction and development of neoplastic transformation in human cells.



(上接10页)

274), 术后并发症有呼吸功能衰竭4例, 支气管胸膜瘘、脓胸伴肺炎各1例, 消化道大出血1例, 均抢救无效死亡。按术后30天内死亡作为手术死亡计。手术死亡率为3.2%(7/218)或2.6%(7/274)。

随访结果 随访日期截至1984年12月, 仅2例于术后1例失访(按死亡计算), 其余均获随访, 随访率为99.3%。全组病例5年生存率为29.9%(55/184); 切除病例5年生存率

为37.9%(55/145); 根治性切除5年生存率为43.4%(53/122); 姑息性切除5年生存率为8.7%(2/23)(生存的2例均作术后放射治疗)(表2)。剖胸检查56例, 绝大多数1年内死亡, 无3年生存率。

讨 论

肺癌的组织学类型与预后关系 肺癌的组织类型不同, 其生长发展速度、转移方式等生

(下转22页)

硫酸镍体外诱导正常人胚鼻咽纤维母细胞转化的研究 (正文见第11页)

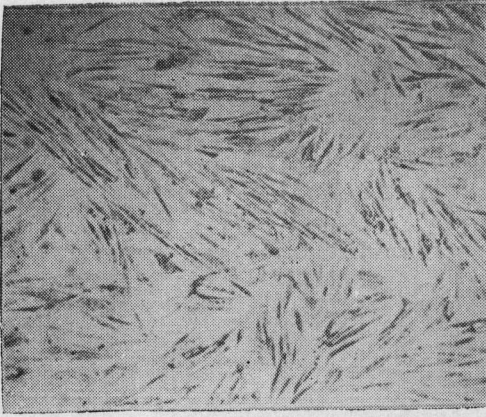


图4 HNF-A-1组, 示正常细胞第一代呈单层生长, 排列有方向性, 呈长梭形, 细胞和细胞核大小形态均一。 ×100

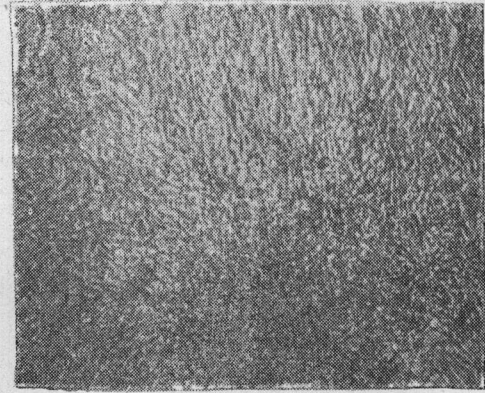


图5 HNF-D-7组, NiSO_4 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 第7代, 示细胞集落及其边缘细胞呈多角形, 染色深, 多层生长, 交叉排列。 ×100

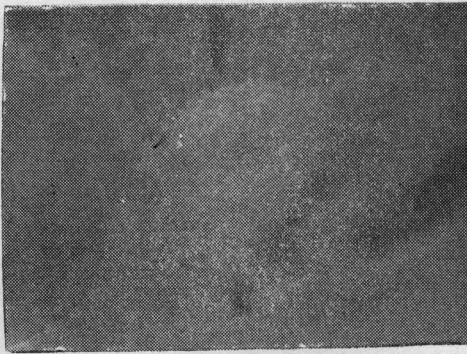


图6 HNF-D-2组, NiSO_4 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 第2代, 示细胞表面大小不一的微绒毛。 ×2,000

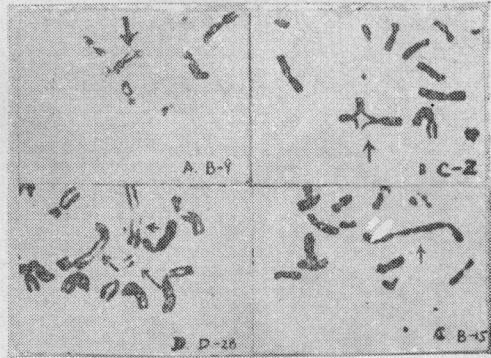


图7 A示HNF-B-9组染色体断裂; B示HNF-C-2组四射体; C示HNF-B-15组标记染色体——巨大双着丝粒染色体; D示HNF-D-26组染色体断裂, 断片与裂隙