

含二氧化钍的稀土混合矿尘体外诱发金 黄地鼠胚胎细胞的恶性转化

高凤鸣

(卫生部工业卫生实验所, 北京)

摘要 本文用天然钍体外诱发了金黄地鼠胚胎细胞恶性转化。其组成成分为等量的 ^{228}Th 及 ^{232}Th , 培养液内最终浓度为3及6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 放射性活度分别为0.01065和0.02120 Bq, 每个细胞平均累积吸收剂量分别为 4.24×10^{-12} 和 $3.38 \times 10^{-9} \text{mGy}$ 。自加入钍后15 d细胞发生形态学转化灶, 细胞发生突变[Oua^R(+)反应], 细胞最大饱和密度增加, 为对照组的4.4倍, 刀豆蛋白A凝集试验(+)反应, SEM观察细胞表面微绒毛增多、粗细不一, 并有疱状突起, 于33 d时细胞能在软琼脂培养基内形成细胞集落。上述结果表明钍在体外可直接诱发金黄地鼠胚胎细胞的恶性转化。

关键词 胚胎细胞, 金黄地鼠, 二氧化钍, 恶性转化

我国含钍稀土矿藏十分丰富, 在开采、冶炼过程中, 工作人员可能吸入, 甚至食入含有天然钍的稀土粉尘, 它被吸入肺是否有致癌作用, 目前尚缺乏令人信服的流行病学资料^[1]。动物实验已证明吸入^[2]、腹腔注射^[1]或静脉注射^[3]钍均有致癌作用。在30年代至50年代国内外医疗单位曾用二氧化钍($^{232}\text{ThO}_2$)作为血管造影剂, 曾引起了人肝肿瘤、骨肿瘤、白血病以及肾癌等^[4], 但尚未见到用它在体外诱发哺乳动物细胞恶性转化的报道。这一体外实验对钍诱发肿瘤的机制、剂量-效应关系以及抑制或阻断其致癌作用等的研究是非常重要的。为此, 进行了本实验。

材 料 和 方 法

1. 粉尘来源

矿粉取自包头白云鄂博稀土铁矿粉尘, 由北京地质研究所研磨成细粉末, 直径 $<5 \mu\text{m}$ 的粉末占95%, 生理盐水稀释, 原液浓度为5 mg/ml 。该矿物的成分含量(%)为: Fe_2O_3 37.08, FeO 8.88, CaO 10.92, SiO_2 10.57, MgO 2.48, MnO 2.04, CO_2 3.70, SO_3 2.62, Na_2O 0.44, Al_2O_3 0.80, P_2O_5 1.20, K_2O 0.76, TiO_2 0.39, H_2O^+ 0.72, H_2O^- 0.14, La 0.48, Ce 1.38, Pr 0.16, Nd 0.63, Sm 0.06, Eu 0.01, Cd 0.01, Tb <0.01 , Dy 0.07, Ho 0.01, Er 0.03, Tm <0.01 , Yb <0.01 , Lu <0.01 , Y 0.02, U <0.01 , Th 0.04等。

天然钍粉末购自上海跃龙化工厂, 生理盐水配制成浓度为1.8 mg/ml 的原液, 粉末直径 $<5 \mu\text{m}$ 的占95%。矿粉加天然钍, 配制的原液浓度两者依次为4.1和0.9 mg/ml 生理盐水。

2. 鼠胚细胞来源

取妊娠13 d的叙利亚金黄地鼠2只(生物制品检定所动物房提供), 无菌操作下取出胎鼠14只。去头及内脏, 将躯干及四肢剪碎, 用0.125%胰酶室温下消化10 min。经100目铜网过滤, 网上滤块再次消化5 min, 过滤, 弃去未过网的组织块。向收集的细胞悬液中加入少量小牛血清。1000 rpm离心10 min, 去上清液, 沉淀物用RPMI-1640培养液加15%小牛血清, 稀释成230 ml,

混匀。接种于 30 ml 玻璃培养瓶, 每瓶 6 ml, 共 37 瓶。第 2 d 弃去未贴壁的细胞, 更换新配制的含 20% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液, 充 10% CO₂ 空气, 37℃ 温箱培养。每周传代 1 次, 1 瓶传 3 瓶。本次实验用第 1 代细胞, 接种细胞量为 3×10^6 细胞/瓶。培养 48 h 后取 14 瓶供实验用, 其余用于其它实验或液氮冷冻保存。

3. 分组 共 4 组, 每组 3 瓶

(1) 矿粉加天然钍组 每瓶培养液内加 1 滴(1/50 ml)原液, 两者的最终浓度分别为 13.7 和 3.0 μg/ml 培养液, 轻摇匀。天然钍的放射性活度每瓶为 0.01065 Bq, 持续作用 7 d。根据钍 α 粒子内照射剂量公式 $D = \frac{E(1.6 \times 10^{-8})}{100 \text{ m}} \text{ cGy}^{[5,6]}$, 其中 E 用一次 Th 衰变细胞吸收的总能量 (MeV)^[7] 代入。本文天然钍由等量的 ²³²Th 和 ²²⁸Th 构成。估算累积剂量, 每瓶为 $7.56 \times 10^{-3} \text{ mGy}$ 。以下各组累积剂量计算公式同上。

(2) 天然钍组(ThO₂) 每瓶培养液内加入 1 滴原液, ThO₂ 的最终浓度为 6.0 μg/ml 培养液, 放射性活度每瓶为 0.0212 Bq, 作用 7 d, 累积剂量每瓶为 $1.52 \times 10^{-2} \text{ mGy}$ 。

(3) 矿粉组(MP) 培养液内加入 1 滴原液, 最终浓度为 17.0 μg/ml 培养液, 钍放射性活度为 $0.027 \times 10^{-3} \text{ Bq}$, 作用 7 d, 累积剂量每瓶为 $1.91 \times 10^{-5} \text{ mGy}$, 每个细胞平均吸收剂量为 $4.24 \times 10^{-12} \text{ mGy}$ 。

(4) 对照组(C) 培养液内加入 1 滴生理盐水。

上述各组每瓶充入 10% CO₂ 空气, 密封瓶口, 37℃ 温箱培养 7 d, 弃去各瓶培养液和 MP 和/或 ThO₂, PBS 洗 2 次, 更换新配制的培养液, 继续培养。另 2 瓶于加粉尘时, 计细胞数, 平均为 4.5×10^4 细胞/瓶(两瓶细胞数分别为 4 和 5×10^4 细胞/瓶)。一般每周传代或换液(细胞生长、增殖不良时) 1 次。

4. 观察指标

(1) 细胞形态学改变 自加 MP 和/或 ThO₂, 下简称粉尘后, 每天相差镜观察 1 次细胞形态学改变及出现复层交叉转化灶的时间。

(2) 细胞突变测定 于开始加粉尘后第 18 d(简称第 18 d, 下同, 第 4 代细胞)取 MP 加 ThO₂ 组 2 瓶, 分别加入鸟本苷(Ouabain, Ona)或 6-硫代鸟嘌呤(6-Thioguanine, 6-TG), 最终浓度分别为 1 mmol/L 和 40 μmol/L, 持续作用 14 d。同时取对照组 2 瓶, 处理同上。

(3) 扫描电镜观察 第 21 d, 取铺满细胞的 MP 加 ThO₂ 组 1 瓶和对照组 2 瓶, 弃去上清液, PBS 洗 2 次, 70% 酒精固定。用橡皮擦刮下细胞, 1000 rpm 离心, 10 min 细胞团块用常规丙酮脱水, 1% 锇酸固定、染色。日立 Giko IB-3 型临界点干燥机干燥和喷金, 日立 S-450 型扫描电镜观察。

(4) 细胞最大饱和密度 取第 35 d 已铺满瓶壁的 MP 加 ThO₂ 组及对照组细胞各 3 瓶(第 7 代细胞), 胰酶消化成单细胞悬液, 计数每瓶细胞数, 并换算成每单位面积(cm²)的细胞数。

(5) 刀豆蛋白 A 凝集试验 取第 35 d 已铺满瓶壁的 MP 加 ThO₂ 组、ThO₂ 组及对照组细胞各 25 瓶, 消化成单细胞悬液, 细胞最终浓度分别为 7.5×10^6 、 6.5×10^6 和 12×10^6 细胞/ml。前两组各取 3 滴细胞悬液加等量的浓度为 100 μg/ml 刀豆蛋白 A 溶液。对照组取 2 滴细胞悬液加刀豆蛋白 A 溶液 4 滴。于表玻璃盘凸窝内分别混匀, 室温下(约 28℃)凝集, 相差镜下观察细胞开始发生凝集时间及达最大凝集时间, 持续观察 30 min。

(6) 细胞相对 DNA 含量测定 用荧光细胞分选仪(FACS-420 型, Becton-Dickinson, Sunney-

vale, CA, USA)测细胞相对DNA含量,包括MP加ThO₂组3瓶、MP组1瓶和对照组2瓶,细胞处理同作者以前的方法^[8],FACS-420型带Consort 30型微机程序处理。

(7) 细胞集落计数 第22和33 d(分别为第5代和第7代细胞)的MP加ThO₂组和对照组细胞各1瓶,胰酶消化成单细胞后接种于含0.3%琼脂的培养基内,每33 mm玻璃皿接种1 ml含 4×10^4 细胞的细胞悬液,每组4皿。于饱和湿度下37℃ 10% CO₂空气中培养7 d,相差镜($\times 50$, $\times 100$)观察,计细胞集落数(≥ 40 个细胞为细胞集落)。

结果 及 分析

(1) 形态学改变 自加入粉尘后1 d相差镜观察发现吞噬粉尘颗粒(见图1),细胞肿胀、空泡变性,部分细胞明显变性、坏死,脱落,3~4 d时以上现象最明显。对第15 d,MP加ThO₂组、ThO₂组和MP组各瓶均出现有复层交叉灶,周边细胞呈十字交叉,失去接触性抑制和极性,说明细胞已发生形态学转化(Ⅱ及Ⅲ型灶)。对照组细胞呈梭型,平行排列,呈单层生长、增殖。

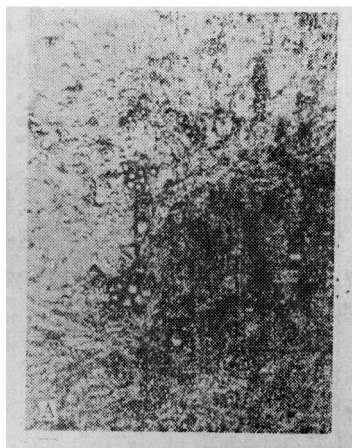


Fig 1. Some embryo cells have phagocytized mineral dust granules and vacuolar degeneration (Left upper) Phase contrast, $\times 50$

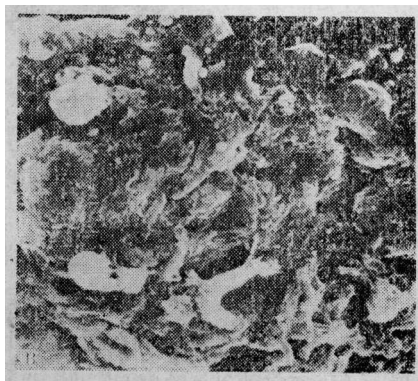


Fig 2. Increase of microvilli on cell surface with various length, thickness and with blebs and ruffles SEM, $\times 1000$

(2) 细胞突变测定 MP加ThO₂组细胞Oua^R(+)反应,即细胞增殖不受乌本苷的抑制,在它的存在下,细胞能持续增殖,形成许多复层交叉转化灶,且相互连结成片,说明细胞膜Na⁺/K⁺ATP酶位点发生了突变。6-TG^R(-)反应,即细胞不能抗6-TG对它生长、增殖的抑制作用,细胞发生变性、坏死,以致最后细胞全部死亡,说明转化细胞没有X性染色体上的HGPRT酶位点的突变。

(3) 细胞表面结构改变 转化细胞大小不一,呈多层性交义生长,表面有许多粗细不一、长短不等的微绒毛,并有疱状膨大和皱褶形成(见图2)。对照组细胞呈梭形,排列较稀疏,表面较光滑,微绒毛较少。

(4) 细胞最大饱和密度 MP加ThO₂组和对照组细胞最大饱和密度分别为 $(13.20 \pm 1.60) \times 10^5$ 细胞/瓶和 $(3.00 \pm 1.00) \times 10^5$ 细胞/瓶,即 $(0.87 \pm 0.12) \times 10^5$ 细胞/cm²和 $(0.20 \pm 0.07) \times 10^5$ 细胞/cm²,前者为后者的4.4倍。

(5) 刀豆蛋白A凝集试验 MP加ThO₂组、ThO₂组细胞分别于加刀豆蛋白A后1 min、3 min开始凝集,于10 min时最甚,数百个细胞凝集成大的团块。对照组细胞,30 min时尚未见凝集。

(6) 细胞相对DNA含量测定 从细胞相对DNA含量组方图及计算出的G₁、S、G₂M期细胞比例看,MP加ThO₂组和MP组细胞与对照组细胞比较未见明显改变,转化细胞未见明显的非整倍体或多倍体细胞增加(见表1)。

Tab 1. Ratio of various phases of cells in different groups to cell population (%)

Group	G ₁ Phase	S Phase	G ₂ + M Phase
MP + ThO ₂	43	51	6
MP	44	53	3
Control	42	52	6

(7) 细胞集落形成率 MP加ThO₂组细胞在第22天第5代细胞培养未见细胞集落形成。经过两次传代后于第33d第7代细胞则有细胞集落形成,平均为 4.3 ± 1.5 个/ 4×10^4 细胞,即 1.06 ± 0.38 个/ 10^4 细胞。对照组细胞两次培养均未见细胞集落形成。

讨 论

1. 天然钍粉尘能体外直接诱发地鼠胚胎细胞的转化

钍是 α 辐射体,放射出 α 粒子,它有多种同位素。本文所用天然钍由²²⁸Th和²³²Th构成。其能量较大,分别为5.34—5.43 MeV和3.95—4.01 MeV;半衰期长,分别为1.9年和 1.4×10^{10} 年^[9]。本文诱发细胞转化的 α 粒子的细胞平均累积吸收剂量为 4.24×10^{-12} — 3.38×10^{-9} mGy,剂量很小,比X线的(0.3 cGy)和中子的(0.1 cGy)诱发细胞转化的阈剂量^[10]约小10—13个数量级,不过由于钍的颗粒被细胞吞噬,在细胞内浓集,某些细胞的实际吸收剂量比平均值大得多。

作者曾用³H-TdR 氚的内照射诱发了小鼠胚胎细胞恶性转化和 γ 线外照射诱发了小鼠骨髓细胞恶性转化。本文进一步用钍 α 辐射体成功地诱发了金黄地鼠胚胎细胞的恶性转化,尚未见国内外有这方面的研究报道,这将为钍的致癌机制和抑制其致癌作用的研究奠定哺乳动物细胞的实验模型。

2. 体外诱发细胞转化的优点

与整体动物实验比较,潜伏期短、核素用量少。如狗静脉注射²²⁸Th,剂量为 0.1117×10^4 Bq/kg,数年后才发生肿瘤。小鼠用²²⁷Th实验,剂量为 0.37 — 185×10^4 Bq/kg,肿瘤发生的潜伏期平均为17个月^[3]。本文用的²³²Th和²²⁸Th混合性钍核素每瓶的剂量为 2.690×10^{-5} — 2.135×10^{-2} Bq/6 ml培养基。细胞转化发生的时间(潜伏期)15—33 d。

3. 体外诱发细胞转化的生物学指标

细胞转化是个多阶段的过程。在形态学转化阶段的细胞,动物接种后肿瘤形成率约为50—85%^[11],进一步发展到恶性(生物学)转化阶段,此时将细胞接种给动物,肿瘤形成率才可达100%。这一阶段的重要标志是细胞能在软琼脂培养基中形成细胞集落^[12]。金黄地鼠胚胎细胞无自发性转化或转化率非常低($<10^{-6}$),故只要出现形态学转化灶,即可认为是致癌因子诱发的细胞转化^[11]。此外细胞膜Na⁺/K⁺ATP酶位点突变,刀豆蛋白A凝集试验(+),SEM细胞表面的

变化等均有助于说明细胞具有肿瘤细胞特点^[10,13]。

4. 粉尘体外诱发细胞转化的机制

从辐射防护的角度考虑, 辐射致癌是随机无阈效应。但从动物实验和流行病学调查的结果看, 低 LET 射线小剂量外照射, 如 50 cGy 以下是很难看出有致癌作用的。至今体外辐射诱发哺乳动物细胞转化的最低有效剂量, X 线为 0.3 cGy, 中子为 0.1 cGy^[10]。而本文所用的 MP 中 α 粒子的累积平均吸收剂量为 4.24×10^{-12} mGy, 比中子的最低有效致癌剂量低约 9 个数量级, 似乎不能完全用辐射单一致癌因子来解释。粉尘颗粒本身, 如石棉纤维, 机械性干扰、破坏靶细胞的有丝核分裂的纺锤丝, 导致染色体在子代细胞中分布不均和结构上的破坏, 即可诱发细胞转化。所以尽管矿粉成分中除很少量的 Th(占 0.04%) 外未见致癌性金属存在, 如镍、镉、砷、铬、钼、锑、铈等^[14], 仍不能不考虑各种金属粉尘颗粒被细胞吞噬后在与辐射微小内照射剂量联合致癌效应中的重要作用。甚至致癌性金属镍盐也只有结晶有形成份(Ni_3S_2)被金黄地鼠胚胎细胞吞噬后才显示其致癌性, 无形的 NiS 不能被该细胞吞噬, 故无致癌性^[14]。金属颗粒在小剂量辐射致癌效应中的作用有待进一步深入研究, 这在放射性厂矿劳动卫生工作中很有实际意义。

本文为陈兴安教授“呼吸道吸入天然钍和稀土矿尘联合作用”的国家自然科学基金课题的一个分题。粉尘由肖慧娟同志提供。余璐、王文惠、胡刚等同志参加了实验工作。李占魁副研究员协助计算钍的剂量, 在此一并致谢!

参 考 文 献

- [1] 陈兴安, 核防护, (2), 60 (1978)。
- [2] ICRP, in "Biological Effects of Inhaled Radionuclides (ICRP Publication 31)", Pergamon Press, Oxford, 1979, P. 5.
- [3] 高凤鸣译, 附件 9, 见. 任灿军等译, 电离辐射源与效应(下册), 原子能出版社, 北京, 722 页, 1986 年。
- [4] G. Kaick, et al., in "Radiation Carcinogenesis: Epidemiology and Biological Significance", Eds. J. D. Boice, Raven Press, New York, 1984, P. 253.
- [5] 吉林医科大学, 放射医学, 上册, 吉林医科大学, 吉林, 1975, 60 页。
- [6] 吉林医科大学, 同上, 1975. 24 页。
- [7] C. M. Lederer, et al., in "Table of Isotopes", 6th Ed, John Wiley & Sons, New York, 1967, P. 399.
- [8] 高凤鸣等, 中华肿瘤杂志, 9, 10 (1987)。
- [9] Bureau of Radiological Health, in "Radiological Health Handbook", Government Printing Office, Washington, 1970, P. 229.
- [10] C. Borek, in "Mechanisms of Cellular Transformation by Carcinogenic Agents", Pergamon Press, New York, 1987, P. 151.
- [11] J. O. Rundell, in "Carcinogenesis and Mutagenesis Testing", Ee. J. F. Douglas, Humana Press, New Jersey, 1984, P. 287.
- [12] 高凤鸣等, 中华肿瘤杂志, 8, 93 (1986)。
- [13] 高凤鸣等, 癌症, 7, 184 (1988)。
- [14] M. Costa, in "Metal Carcinogenesis Testing", Ed. The Humana Press, New Jersey, 1980, P. 67

(稿件收到日期: 1989 年 11 月 21 日)

STUDIES ON THE MALIGNANT TRANSFORMATION OF GOLDEN HAMSTER EMBRYO CELLS INDUCED IN VITRO BY MIXED MINERAL DUST CONTAINED THORIUM DIOXIDE

Gao Fengming

(Laboratory of Industrial Hygiene, Ministry of Public Health, Beijing)

ABSTRACTS Malignant transformation of golden hamster embryo cells was induced by thorium dioxide consisted of ^{228}Th and ^{232}Th in equal quantity. The final concentration of thorium dioxide was 3 or 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ medium, special activities of radiation were 0.01065 or 0.0212 Bq and accumulative average absorbed dose for each cell was 4.24×10^{-12} — 3.38×10^{-9} mGy.

Morphological transformation foci appeared 15 days after thorium dioxide added. Cell mutation was observed in ouabain-resistant assay. Maximum saturation density of transformed cells was increase 4.4 times as comparing with control group. The transformed cells acquired the agglutinability following exposure to concanavalin A. Increase of the microvilli on the surface with various thickness and formation of blebs and ruffles were observed. The transformed cells gained the ability of forming colonies in soft-agar medium 33 days after exposure to thorium dioxide.

The above results indicated that malignant transformation of golden hamster embryo cells was directly induced by thorium dioxide in vitro.

KEYWORDS Embryo cells, Golden hamsters, Thorium dioxide, Malignant transformation