

佛波醇酯和人外周血促 α 照射致细胞 恶性转化频率增加的研究

龚 诒 芬

(北京放射医学研究所 北京 100850)

K. Peters C. Schippel L. Hieber

(GSF-Institut Für Strahlbiologie Munchen-Neuherberg, Germany)

摘要 旨在观察佛波醇酯(PMA)和人血多形核白细胞(PMN)产生的氧自由基对 α 粒子致细胞转化频率(TF)的增加效应。C3H10T 1/2细胞经0.5、1.0和1.5 Gy α 粒子照射后加入PMA及PMA刺激的人血,测定存活分数和TF,由1250个皿的实验所得初步结果看出,PMA能刺激照射的C3H10T 1/2细胞增殖,并依赖于接种细胞密度和照射剂量,PMA使0.5 Gy照射的细胞TF增高2.1倍,PMA刺激的人血增加2.8倍。

关键词 佛波醇酯,人血多形核白细胞,自由基, α 粒子,细胞转化

α 粒子致体外细胞转化危险度的研究已越来越受重视。体外研究促进 α 照射诱发细胞转化的因素,如石棉或香烟凝结物,可能为解释肿瘤流行病学调查的不确定性提供参考^[1,2]。佛波醇酯(phorbol myristate acetate, PMA)能够促进紫外线、X射线和中子诱发的体外细胞转化,其机理可能是由于PMA能诱发自由基的生成^[3~7]。自由基在辐射诱发细胞转化中的作用早已被认识,抑癌剂和抑促癌剂均能清除自由基的研究提供了这方面的证据^[8~12],此外,人外周血的中性粒细胞和单核细胞在加入或不加入PMA的条件下,能诱发C3H+鼠纤维母细胞(C3H10T 1/2细胞)形态转化,给裸鼠皮下接种这些细胞,能诱发肿瘤^[13]。

曾观察到吸入钷诱发肺炎与肺癌之间有某些联系,在大鼠吸入二氧化钷引起的慢性炎症时,肺泡腔有中性粒细胞和肺泡巨噬细胞的聚积,癌性病灶往往发生于慢性炎症之后,并处于邻近纤维化的部位,这可能提示吸入二氧化钷诱发肺癌的过程中,也涉及吞噬细胞释放自由基^[14]。

本研究的目的是:为了获得PMA或人血细胞主要是多形核白细胞(PMN)释放的自由基,可能增加C3H10T 1/2细胞转化频率(Transformation Frequency, TF)的证据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与照射

C3H10T 1/2细胞(Hall和Muller赠)用含10%胎牛血清(Sigma)和25 ng/ml庆大霉素的Eagle's培养液培养,接种于55 cm²塑料培养瓶(Falcon)内,置于湿度为95%、CO₂浓度为5%的37℃培养箱内。 α 粒子照射前24 h,细胞接种于带有2 μ m厚薄膜(Hostaphan, Kalle Chemie, Wiesbaden),且底的直径为5 cm的玻璃皿内的中心区,待贴壁后(3 h),再加4.5 ml培养液。 α

国家自然科学基金资助课题

收稿日期:初稿1995-08-21,修回1995-11-27

粒子照射详见 Roos 和 Kellerer 的报告^[15], 用 ^{241}Am 源(0.18 GBq), 剂量率为 0.1 Gy/min。通过底部薄膜后, α 粒子释出能量为 2.7 MeV, 平均 LET 为 147 keV/mm。

1.2 PMA 和人血

PMA(Sigma)溶于 DMSO(Sigma), 配成 1 mg/ml 的浓度, 并贮存于 -20°C 。使用前用无钙、镁的磷酸缓冲液稀释到 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$, 在 α 粒子照射后 2 d, 加入到细胞体系中, 培养体系中 PMA 的终浓度为 100 ng/ml , DMSO 的浓度为 0.01%, 培养维持 12 d。

人血由健康志愿者提供, 白细胞数为 7.0×10^9 个/L, 含 PMN 约 70%。 α 粒子照射靶细胞(3 H 10 T 1/2)后 30 min, 加入人血(1 ml 血/皿, 浓度为 10%)。分加 PMA (100 ng/ml) 和 不加 PMA 两组, 估计每皿加入的 PMN 为 5×10^6 个, 皿内的靶细胞数为 $(1\sim 2)\times 10^5$ 个, PMN 与靶细胞数之比为 (25~50) 比 1。37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 0.5 h 后, 除去培养液, 靶细胞用磷酸缓冲液(含葡萄糖)洗至显微镜观察不到血细胞为止。

1.3 存活分数(Surviving Fraction, SF)和转化频率(TF)测定

细胞经 α 粒子照射后, 胰酶消化, 计数, 测定 SF(S/S_0 = 照后细胞数/照前细胞数)。细胞接种(60~100 个/皿)后, 培养 10 d, 甲醇固定, Giemsa 染色和计数(大于 50 个细胞的克隆), 测定 SF。细胞接种(200~300 个/皿)后, 培养 6 周(第 2、3、4、5 周后换液), 除去培养液, 用含葡萄糖的磷酸缓冲液洗涤, 甲醇固定和 Giemsa 染色后, 按 Rezhikoff 确定的转化灶标准, 计数 II 和 III 型转化灶, 测定 TF(转化灶数/ 10^4 细胞)。

2 结果与讨论

2.1 α 粒子照射后加与不加 PMA 的存活分数(SF)

2.1.1 接种不同密度的细胞, 经 α 粒子照射后, 加 PMA 与不加 PMA 的 SF 接种不同密度的细胞($100\sim 200$ 个/ 55 cm^2), 经 α 粒子照射后, 测定其 SF。结果显示, 细胞密度对接种效率和 SF 没有明显的影响, 但 PMA 能够刺激细胞增殖, 在照射组 PMA 刺激效应更明显, 而且这种效应与照射剂量有关, 加 PMA 与不加 PMA 的照射细胞 SF 比值随细胞密度降低而增高(见图 1)。

2.1.2 不同剂量的 α 粒子照射对细胞 SF 的影响 选择接种低细胞密度的条件, 观察 PMA 刺激细胞增殖与照射剂量的依赖性, 加入 PMA 的照射细胞 SF 明显高于不加 PMA 的照射细胞, 两者的 SF 比值随照射剂量增高而增高(见表 1)。

PMA 对细胞增殖的刺激作用在文献上报道的结果不尽相同^[4~7], Kennedy 证实, 当 PMA 在照射后立即和 48 h 后加入时, 对 X 射线照射的细胞有促增殖作用, 而其它作者未观察到 PMA 对未照射和照射的 C3 H 10 T 1/2 和

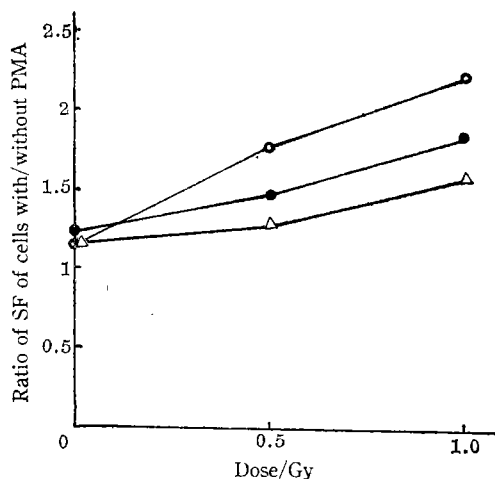


Fig 1. Dependence of cell density on the survival of C3H10T1/2 cells exposed to alpha particles with dose of 0.5 and 1.0 Gy with and without PMA
(○) low cell density
(●) intermediate density
(△) high cell density

Tab 1. Alpha-particle dose dependence of the ratios of surviving fractions of cells with and without PMA

Dose/Gy	PMA	S/S ₀	Ratios of SF with/without PMA
0	-	1.00	
0	+	1.14±0.15	1.14
0.5	-	0.43±0.05	
0.5	+	0.52±0.08	1.38
1.0	-	0.19±0.02	
1.0	+	0.30±0.06	1.77
1.5	-	0.13±0.01	
1.5	+	0.26±0.04	2.00

Tab 2. Alterations of surviving fractions of the cells exposed to different doses of alpha-particles and treatment with blood or blood-stimulated by PMA

Dose/Gy	Blood	PMA	S/S ₀	Ratios of SF
0	-	-	1.00	
0	+	-	1.06	1.06
0	+	+	0.84	0.84
0.5	-	-	0.45(1)	
0.5	+	-	0.49(2)	(2)/(1)1.09
0.5	+	+	0.41(3)	(3)/(1)0.90
1.0	-	-	0.18(1)	
1.0	+	-	0.31(2)	(2)/(1)1.72
1.0	+	+	0.47(3)	(3)/(1)2.61

SHE 细胞具有促增殖作用，这些结果现在还难以解释。

2.1.3 α 粒子照射的细胞加入人血和 PMA 后的存活分数 表 2 结果表明，照射 1.0 Gy 的细胞与加入和不加入 PMA 的人血作用后，也出现 SF 增高。但在照射 0.5 Gy 的细胞时则不明显。在两种照射剂量的条件下出现不同的结果原因，还需要进一步的实验来说明。

2.2 PMA 对 α 粒子诱发细胞转化的促进作用

图 2 显示了 PMA 对 α 粒子诱发细胞恶性转化促进作用的初步结果。在 0.5、1.0 和 1.5 Gy α 粒子照射后，PMA 增加细胞 TF 的比值分别为 2.0、1.3 和 1.5，这与 Hall^[1] 报道的结果相符。

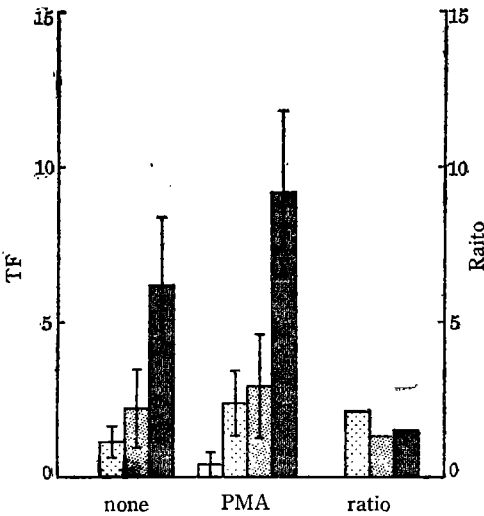


Fig 2. Promotion of alpha-particle induced cell transformation by PMA
Dose/Gy): (□) 0 (▤) 0.5
(▥) 1.0 (■) 1.5

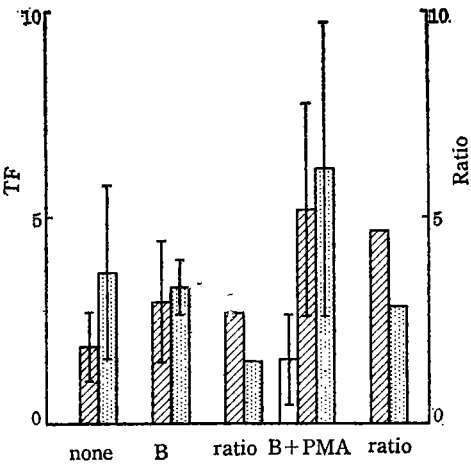


Fig 3. Additive effects of human blood (B) and blood stimulated by PMA (B+PMA) on cell transformation by alpha-particles
Dose (Gy): (□) 0 (▤) 0.5 (▥) 1.0

2.3 PMA 刺激的人血对 α 粒子诱发细胞转化的增加效应

人血和 PMA 刺激的人血，通过呼吸爆发能产生大量自由基^[10]，设想在 α 粒子照射细胞后，再附加自由基的作用，有可能使细胞 TF 增高。图 3 结果看出，在 α 粒子照射 0.5 和 1.0 Gy 后，

用 PMA 刺激与不刺激的人血处理后相比, 出现 TF 增高的趋势, 照射 0.5 Gy 的细胞更为明显。看来, 由 PMN 释放出的过量自由基, 可能是使 α 粒子诱发细胞 TF 增高的一种因素。如果所得到的初步结果能在今后实验中进一步证实, 它将对阐明辐射诱发的慢性炎症和癌变之间的关联有着重要意义。

致谢 本工作在德国慕尼黑辐射与环境研究中心放射生物研究所完成, 得到了德国国际学术交流中心-王宽诚基金、德国辐射与环境研究中心、慕尼黑大学和欧共体合同号为 FI 3 P-CT 92-0043 方面资助, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Nall E J, Hei T K and Piao C Q. Interaction with Asbestos and Modulation by Tumor Promoters. In "Cell Transformation and Radiation Induced Cancer", 1989, p 293~299 Edited by K H Chadwick, C Seymour and B Barnhart, Published under the Adam Hilger imprint by IOP Publishing LTD
- 2 Piao O Q and Hei T K. Carcinogenesis, 1993, 14(3): 497
- 3 Mondal S and Heidelberger C. Nature, 1976, 260: 710
- 4 Annedy A R, Mondal S, Heidelberg C and Little J B. Can. Res., 1978, 38: 439
- 5 Kennedy A R, Murphy G and Little J B. Can. Res., 1980, 40: 1915
- 6 Borek C and Troll W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80: 1304
- 7 Han A and Elkind M M. Can. Res., 1982, 42: 477
- 8 Slaga T J. In: Radioprotectors and Anticarcinogens, 1983, p 437~448
- 9 Slaga T J, Solanki V and Logani M. In: Radioprotectors and Anticarcinogens, 1983, p 471~485
- 10 Little J B, Kennedy A R and Nagasawa H. In: Radioprotectors and Anticarcinogens, 1983, p 487~493
- 11 Borek C. In: Radioprotectors and Anticarcinogens, 1983, p 495~513
- 12 Hall E J and Borek C. In: Radioprotectors and Anticarcinogens, 1983, p 515~525
- 13 Weitzman S A, Weitbeg A B, Clark E P and Stossel T P. Science, 1985, 227: 1231
- 14 Xie G L, Yan X S, Wu D C, Ye O Q, Guo L S, Gong Y F, Guan S R and Wang R Z. In: Proceedings of Conference on Radiation Protection Dubrovnik, 1989, p 157~162
- 15 Roos H and Kellerer A M. Phys. Med. Biol., 1989, 34(12): 1823
- 16 朱茂祥, 龚诒芬, 葛桂秀. 生物化学与生物物理学报, 1995, 27(1): 23

PMA AND HUMAN BLOOD ENHANCE CELL TRANSFORMATION INDUCED BY α -PARTICLES

Gong Yifen

(Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

K. Peters C. Schippel L. Hieber

(GSF-Institut Für Strahlbiologie Munchen-Neuherberg, Germany)

ABSTRACT The purpose of this study was to observe the enhancement of alpha particles induced transformed frequency (TF) of C3H10T 1/2 cells by phorbol myristate acetate (PMA) and active oxygen species released from polymorphonuclear neutrophile (PMN). 2 days and 30 min. after exposure to alpha particles of ^{241}Am PMA or PMA stimulated human blood were added to these cell cultures. 10 days and 6 weeks later the plate efficiency (PE) and TF were determined respectively. The preliminary results obtained from 1250 dishes indicated that PMA could stimulate cell proliferation, it depended on cell densities plated and doses exposed. The enhanced trend of TF in exposed cells by PMA and PMA stimulated PMN were observed, it seemed as if the exposed cells of 0.5 Gy: their TF increased 2.1 and 2.8 fold by PMA and PMA stimulated PMN respectively.

KEYWORDS Phorbol myristate acetate, Polymorphonuclear neutrophile (PMN), Active oxygen species, Alpha particles, Cell transformation