

# 水中痕量有机污染物对细胞的转化效应

陆寿珍 冯 霄\*

(复旦大学生理学及生物物理学系)

王爱玲 王文基

(复旦大学物理二系)

用化学成分明确的致癌物或前致癌物,如 MNNG、MCA、DMBA、B(a)P、DMBA、ENU 等在哺乳动物体内、外进行癌变研究的报道很多。60 年代后常用离体细胞转化实验研究癌变及对癌变机理进行探讨。Berwald 和 Sachs (1965)<sup>[1]</sup>首先发现甲基胆蒽或 3,4-苯基(a)芘作用于离体仓鼠或小鼠细胞后形成转化灶, Dipaolo 和 Donovan (1967)<sup>[2]</sup>用苯基(a)芘或甲基胆蒽作用仓鼠原代细胞后获得转化细胞系,表明上述化学药物对细胞的诱变转化作用。随后几十年,国内外许多学者用离体细胞在有或无生物酶系统的激活下,研究化学物的致癌、促癌作用,报道了大量资料<sup>[3-6]</sup>。我们也曾用 ENU 处理人胎儿原代胃、肾细胞获得成功<sup>[6]</sup>。然而,环境中存在着众多的化学污染物,甚至在饮用水中,由于污染也可检测到不少具有诱变能力的有机化学毒物<sup>[7]</sup>。研究这些化学物的综合作用对人类产生的潜在危险更具有实际意义。据美国 EMIC 机构报道,目前国际上已建立了 30 多种短期生物遗传毒性检测方法,用以确定某一化合物的诱变性,但认为其中细胞转化实验的可信度最高<sup>[8]</sup>。

本文以黄浦江的原水与自来水的有机富集物为试样,诱导中国仓鼠卵巢细胞(CHO)进行转化,研究比较了转化作用与污染物的剂量响应关系,使近代环境化学分离分析与细胞转化研究有机结合,有效地测出了水源中诱变性致癌物,为估价饮用水的安全性提供科学依据和研究经验。

## 材料与 方法

### 1. 水样制备及分析

黄浦江下游按卫生学标准采水样 60 升,用非极性的 402 树脂(上海试剂一厂产),一种二乙烯苯与乙基苯乙烯的共聚物,柱式吸附,紫外分光光度计监视吸附效果,乙醚介吸、脱水、KD 浓缩器浓缩后,一部分作色、质分析,另一部分将乙醚挥发,有机物转入 DMSO 相各作细胞转化。

水中有机物由 GC/MS/COM 联用仪(美 Sinnigan Mat 4510 型)分析,以氮气为载体,汽化温度 200℃,进样条件:全进样,无分流,样品在 60℃保温 3 分钟,尔后以 10℃/分的速度升温。有机物经毛细管气相色谱分离和所联接的质谱仪分析,获得再现离子流图。

### 2. 细胞

选用中国仓鼠卵巢细胞(日本大阪大学蛋白质研究所馈赠),该细胞生长呈单层(图版图 1),对瓶壁及细胞间粘附力强,具有高度接触抑制能力,对各种化学诱变物较为敏感。培养基为 Eagle MEM 附加 10% 小牛血清及抗生素。细胞以  $1 \times 10^5$  个/ml 接种,约 4—5 天传代 1 次。

### 3. 细胞染毒试验

细胞接种,37℃解箱培养,次日加入经 SOS 显色诱变<sup>[9,10]</sup>实验为阳性的水样有机富集物,对照组不加,溶剂对照组加入 DMSO,各处理均设 3 个平行样,连续观察 5 天后,弃原液, Hank's 液洗涤,更换新鲜培

\* 系遗传所研究生。

本研究得到上海市环保局资助。陈中孚、王兆霖、郭兰萍、常正、林万敏、陈仲宜同志在实验中给予支持,在此一并致谢。

养液再培养,并观察比较细胞形态。

#### 4. 细胞转化及转化灶的分离和克隆

细胞接种,37℃孵箱培养,次日分别以各种水样有机富集物定量加入培养液中,对照组不加,溶剂对照组加入 DMSO,使与细胞充分接触。次日弃培养液,洗涤后更换新鲜培养液,再培养 1—2 天传代,待长满层后分瓶扩大培养,并连续传代,倒置显微镜观察形态变化,监视转化灶的形成。

出现转化灶后,机械剥离转化灶,消化,分散成单细胞悬液,接种于 96 孔板培养,选择单个转化细胞所形成的克隆消化,接种至培养瓶连续传代培养获得体外肿瘤性转化细胞系。

#### 5. 转化细胞的恶性度鉴定

##### (1) 光学显微镜及电子显微镜观察细胞形态

a. 倒置相差显微镜活体观察或固定后 Giemsa 染色观察细胞形态。

b. 细胞单层培养于小盖玻片,经戊二醛和锇酸固定,黄金真空喷涂,扫描电镜观察细胞表面。

##### (2) 软琼脂培养计数集落形成率

$3 \times 10^2$  个/ml 转化及对照细胞悬液各 1 ml,分别与 2 ml 0.3% 琼脂-培养基充分混匀,加入铺有 0.6% 琼脂-培养基的  $\phi 6$  cm 平皿上,5% CO<sub>2</sub> 孵箱通气培养两周,观察比较集落形成率。

##### (3) 染色体分析

细胞传代,收获前加入秋水仙素(终浓度 0.12  $\mu$ g/ml)阻断 4 小时,收获细胞,按常规法低渗、制片, Giemsa 染色,油镜下观察染色体畸变,分析核型。

##### (4) DNA 含量测定

细胞接种于放有盖玻片的平皿中,5% CO<sub>2</sub> 通气培养,固定、A. O 染色,在扫描显微分光光度计(西德 Opton 公司)上用蓝光激发细胞核的 DNA 荧光,由计算机随机标定测量 200 个细胞核的荧光强度,以标准铀玻片的荧光强度为 100%,比较 测算出被测细胞的 DNA 含量<sup>[11]</sup>。

##### (5) 异种接种

当日生昆明种乳鼠,经 1 GYX-射线辐照后,于前肢腋窝皮下注射细胞悬液,喂养 10 天,处死剖取瘤结节,固定、包埋、制作石蜡切片, H. E 染色后作组织学检查。

## 结 果

### 1. 水中有机物分析结果

用 GC/MS 定性分析水样,发现该江下游

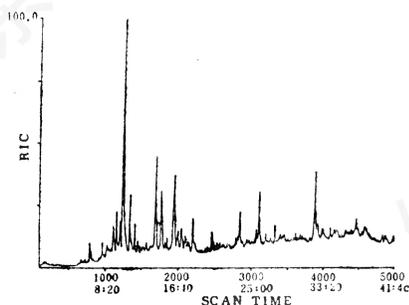


图 1 自来水再现、离子流图

及相应生产的自来水中含有几十种痕量有机化合物(图 1),其中有多种按 EMIC 确定为致癌或可疑致癌物<sup>[8]</sup>,如甲基苯、乙基苯、氯苯、1,2-二乙基苯、1,4-二乙基苯、反式十氢萘、1,2-苯二羧酸二丁脂、双(二氯乙基)醚、萘等。

### 2. 有机物对 CHO 细胞的毒性反应

实验表明阳性水的有机富集物以 0.15  $\mu$ l/ml—1  $\mu$ l/ml 作用于细胞可使细胞产生不同程度的毒性反应,如相继出现细胞漂浮,固缩、分裂延迟或不分裂等现象,随后胞浆内颗粒物增多,形成空泡或巨大细胞,高剂量组在 2—3 天内可使细胞全部死亡(图版图 2);低剂量组在更换培养液后能使上述毒性反应缓解,有些存活的细胞恢复分裂能力。

### 3. 细胞转化

在阳性水用 1.6  $\mu$ l/ml 剂量处理的细胞群体中,除部分细胞脱落、漂浮、固缩死亡外,存活细胞在传至第四代即出现转化灶(图版图 3)。而用阴性水, DMSO 及空白对照处理的细胞,连续传代后都未曾出现转化灶。我们还发现转化灶的形成与有机物的剂量、作用时间等有关。低剂量用较长时间,高剂量用较短时间去刺激也可诱发出转化灶(表 1)。由于工作量关系,我们仅挑选用 1.6  $\mu$ l/ml 剂量组诱发的转化细胞作恶性度鉴定。

### 4. 转化细胞的恶性性状

#### (1) 细胞形态

对照 CHO 细胞为梭形、三角形,单层生长(图版图 1);转化后,细胞接触抑制消失,细

表1 有机富集物对 CHO 细胞的转化

样 品	富集物剂量 ml/ml	毒物与细胞 作用时间	细 胞 毒 性 反 应
自来水样 1 (SOS 检测 为阳性)	0.8	2 天	因管理不当,中途停止观察
	1.6	2 天	不少细胞漂浮死亡,存活细胞体积增大,细胞内颗粒物增多,去毒后有些细胞继续死亡,存活的细胞成网状交织生长,第四代成集落生长,第五代出现转化灶
	1.6	1 天	同上,第四代出现转化灶
自来水样 2 (SOS 检测 为阳性)	0.33	7 天	不少细胞漂浮,传代后存活细胞增殖,第三代出现转化灶
	0.8	1 天	漂浮细胞很多,传代后细胞展开并增殖,第五代出现转化灶
	1.6	1 天	同上,第六代出现转化灶
黄浦江下游 原水(SOS 检测为阳性)	0.33	7 天	1/3~2/3 细胞有异常反应,弃毒液传代后,存活细胞生长逐步正常,呈网状集落生长,第四代出现转化灶
	0.8	2 天	细胞变圆变大,漂浮很多,传代后细胞继续死亡
	1.6	2 天	细胞漂浮、固缩、未经传代即死亡
对照点原水 (SOS 检测 为阴性)	1.6	2 天	无异常反应,连续传代未见转化灶
	1.6	1 天	同上
	1.6	1 天	连续传代无异常反应,未见转化灶
DMSO	3.3	1 天	同上
空白对照	/	/	连续传代无异常反应,未见转化灶

胞形体变大(图版图 4),呈网状交叉生长,满层时重叠堆积,分裂相多见,可见三极、多极分裂及巨核细胞,核质比大,核仁多。扫描电镜可见转化细胞表面有丰富的微绒毛及丝状伪足(图版图 5)。而对照细胞表面多为泡状突起。

#### (2) 生长特点

转化细胞增殖迅速,以 1:6 传代,3 天即可长至满层,并在细胞群体中形成许多堆集的细胞集落,对血清的依赖性降低,即使在血清减至 2—3% 的培养液中连续传十几代,细胞仍能旺盛生长;同时 pH 易变酸,细胞对瓶壁的粘着力降低,如培养中可观察到较多的悬浮细胞,传代时细胞极易从瓶底被胰酶消化下来。

#### (3) 染色体分析

统计了 116 个转化细胞(56 代)的中期分裂相,发现染色体非整倍的异常增多,染色体

为 40 左右的细胞约占 55%,51—120 的细胞占 15%,而且有众多的染色体畸变,如断裂、缺失、易位、重接,双着丝点等(图版图 6);而镜检了 104 个对照细胞的中期分裂相未曾发现一例染色体畸变,染色体数在 20—22 条的细胞约占 71%。

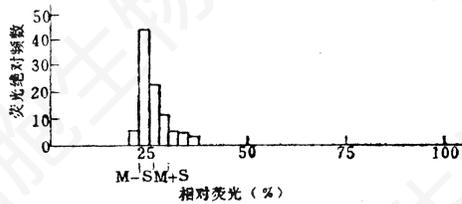
#### (4) DNA 含量

细胞核的 DNA 含量以直方图显示(图 2)。横座标为荧光强度,纵座标为细胞荧光强度的频数。对照细胞 DNA 量的主峰值为 24%,转化细胞在 47%,其次峰在 75—90% 之间。转化细胞主峰右移提示 DNA 含量异常增高,这些测量结果与核型分析结果相呼应。

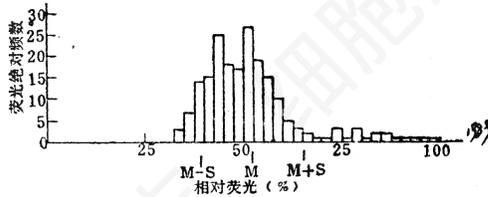
#### (5) 软琼脂中集落形成率

转化细胞集落形成率高达 41%,集落内细胞生长密集,在琼脂内形成肉眼可见的团块,对照细胞约有 6% 细胞可形成细小的集落。

#### (6) 异种接种



a. 对照细胞 DNA 含量直方分布图



b. 转比细胞 DNA 含量直方分布图

图 2 正常及转化细胞 DNA 含量比较

表 3 异种接种(60代)

细 胞	接种鼠数	长瘤鼠数	总瘤数	接种细胞数
对照细胞	3	0	0	2~3 × 10 <sup>6</sup>
转化细胞	8	7	10	2~3 × 10 <sup>6</sup>

异种接种 8 只昆明种乳鼠,解剖获得 10 只瘤块,瘤块直径为 0.3—0.5 mm<sup>2</sup>,质硬,病理切片检查为纤维肉瘤。所有接种对照细胞的小鼠均未见瘤块(图版图 7)。

综合以上生物学特性表明,实验组细胞已发生了肿瘤性转化。

### 讨 论

本研究用水中富集的痕量有机污染物转化细胞获得成功,并鉴定具有恶性性状;而在转化过程中未经酶系统激活,表明该类水中的有机物中可能存在某些直接致癌物。

从转化灶的形成过程中(表 1)可以发现,转化灶与有机物的作用剂量与作用时间有关。自来水样,用 1.6 μl/ml 剂量(相当于 1 升水的有机浓缩物),作用细胞 24 小时,在 4—6 代即可出现转化灶;剂量超过 1.6 μl/ml 及作用时间大于 48 小时的可致细胞死亡,多次重复结果一致。而用 0.8 μl/ml 剂量作用细胞 24—48

小时,及低剂量,如 0.33 μl/ml 作用细胞 5—7 天,在去毒后传至 3—6 代亦可出现不同程度的转化灶。由于工作量关系,对这类转化灶未建系。类似的转化也在 C<sub>3</sub>H 10 T 1/2 细胞中获得成功,但所用剂量不同,因此,剂量与作用时间是细胞转化成功的关键,这与文献报道相类似<sup>[12]</sup>。

本实验所用转化样品首先经 SOS 显色检测为阳性水样的有机富集物,表明该类有机化合物产生的遗传毒性已造成 DNA 损伤。在本研究中可以观察到转化细胞的中期分裂相中,由于染色体损伤产生的各种畸变,因而可以认为有机物中对细胞的遗传毒性,首先是作用于 DNA 引起突变,在 DNA 复制过程中,由于错误修复或基因失控进而发生染色体结构变化及数量变化,最后导致染色体倍数改变,或激活了癌基因的表达,从而促成细胞转化。

致突不一定致癌,有些化合物只具有致突变作用而无致癌性。在我们的研究(水质 GC/MS 分析、SOS、SCE 检测、细胞转化)中<sup>[7]</sup>,发现致突、致畸、致癌作用的相关性,表明这类有机富集物中不仅存在诱变物,同时还含有一定量的致癌物,或许某些污染物同时具有这两种作用。同时也不能排除几种化合物间的协同作用,致使细胞转化。本研究虽不能确切解答检测水样中究竟何种有机物对生物有致毒和遗传毒性作用,但它却如实地对水质作了客观评价。

本工作首次发现,水中痕量有机污染物可诱导哺乳动物细胞恶性转化,它与水质的化学分析相配合,对综合评价水质具有重要生物学和卫生学意义。

### 摘 要

本文研究由水中有机污染物引起的细胞转化。水中有机物通过高分子树脂 402 吸附得到富集,CHO 细胞经与 SOS 显色试验为阳性的有机富集物共孵育后,诱导出现转化灶。转化灶细胞经分离、克隆化和连续传代而建系的细

胞,具有恶性细胞的生物学特性。本文所介绍的方法为环境致癌研究提供了经验。

### 参 考 文 献

- [1] Berwald, Y. et al., 1965, *J. Nat. Cancer Inst.*, 35: 641—661.
- [2] Dipaolo, J. A, et al., 1967, *Exptl. Cell Res.*, 48: 361—377.
- [3] 李申德等, 1979, *实验生物学报*, 12(3).
- [4] 李申德等, 1981, *国外医学遗传分册*, 4: 177—180.
- [5] A. Sivak et al., 1968, *Exp. Cell Res.*, 49: 572—583.
- [6] 苏兆众等, 1987, *中国科学 B 辑*第 7 期.
- [7] Lu Shou-Zhen, et al., 1988, In "Pollution in the Urban Environment POLMET 88" Vol 2, p 520—525, Edited, by P. Hills, et al.
- [8] Maria Palajda, et al., 1985, *Mutation Res.*, 153: 79—134.
- [9] Philippe Quillardet, et al, 1985, *Mutation Res.*, 147: 65—78.
- [10] 陈中孚等, 1988, *微生物学报*, 28 (4): 313—318.
- [11] 陆寿珍等, 1988, *细胞生物学杂志*, 10(1): 33—38.
- [12] Reznikoff CA, et al., 1973, *Cancer Res.*, 33: 3239—4249.

## 抗 K 物质单克隆抗体的制备

王荣芳 王 珏 葛锡锐 姚 鑫

(中国科学院上海细胞生物研究所)

长期以来, P 物质一直被认为是唯一的存在于哺乳动物中的速激肽(tachykinin)<sup>[1]</sup>, 直至最近,由于几种新的属于速激肽族的肽——K 物质(substance K)和神经素B(neurokinin B)在猪的脊髓中被分离得到<sup>[2,3]</sup>以及 Neuropeptide K 的发现<sup>[4]</sup>, 这种观点才被打破。Nawa 等进而搞清了 K 物质的一级结构, 即: His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub><sup>[5]</sup>。对速激肽族中肽的一级结构的比较分析发现, 不论是存在于无脊椎动物中的速激肽, 还是存在于脊椎动物中的速激肽, 它们的一级结构都具有高度的同源性, 在 C-末端都含有: —Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> 这样的氨基酸序列<sup>[6]</sup>。进化过程中的高度保守性说明这一类肽在生命活动中具有不可替代的重要作用。一些研究表明, 这一类肽都能引起肠平滑肌收缩, 使血压下降<sup>[7]</sup>。已有证据表明 K 物质的分布可能与 P 物质的分布一样十分广泛<sup>[8-10]</sup>, 提示它可能具有另外的一些非常重要的生理功能, 至少可能起一个神经递质的作用<sup>[9]</sup>。最近的研究还表明

这类肽在免疫系统中充当着重要的角色<sup>[11,12]</sup>。许多关于神经肽的分布与功能研究都依赖于免疫学手段, 而应用单克隆抗体将为这一领域的研究带来广阔的前景。

由于 K 物质是一个仅由 10 个氨基酸组成的小肽, 免疫原性非常弱, 且速激肽族肽类具有高度的同源性, 给抗 K 物质的抗体制备带来了困难。本文报道建立产生抗 K 物质单克隆抗体的杂交瘤细胞系的建系情况。

### 材 料 和 方 法

#### 一、抗原及免疫

K 物质(Peninsula Laboratory, INC); 甲状腺球蛋白, 牛血清白蛋白均为 Sigma 公司产品; 碳二亚胺(水溶性)为 E. Merck 产品。

按碳二亚胺法<sup>[13,14]</sup>将每毫克 K 物质与 5 毫克甲状腺球蛋白偶联在一起作为免疫原。免疫原与福氏佐剂充分乳化后以 10—20 μg 的剂量反复分别免疫 Wistar 大鼠和 Balb/c 小鼠。每隔一月免疫 1 次, 计 5 次。最后一次免疫后 3 天放血处死, 取脾脏细胞用于融合。