

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)05-0435-05

^{60}Co γ 射线诱发人支气管上皮细胞恶性转化模型的建立

高 福¹, 蔡建明^{1*}, 崔建国¹, 黄定德², 李百龙¹, 杨 平¹, 闵 锐¹, 倪 瑾¹, 孙 顶¹(1. 第二军医大学 海军医学系 放射医学教研室, 上海 200433; 2. 第三军医大学 西南医院 核医学科, 重庆 400038)

[摘 要] 目的: 建立 γ 射线辐射诱导支气管上皮细胞恶性转化模型。方法: 永生化人支气管上皮细胞 BEAS-2B 经总剂量 22 Gy ^{60}Co γ 射线分 3 次照射后进行传代培养, 应用平板克隆实验、血清抗性实验、细胞软琼脂集落实验检测该细胞系恶性程度; 裸鼠皮下种植辐射细胞检测其成瘤能力, 成瘤组织 H-E 染色及免疫组化进行病理学观察。结果: (1) 平板克隆实验表明照射细胞培养至 35 代后其增殖能力明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 血清抗性实验显示照射组细胞在第 45 代后克隆形成增加($P < 0.01$), 而在照射后 50 代细胞软琼脂集落的形成能力明显增加($P < 0.01$), 显示 BEAS-2B 细胞经辐射后出现了恶性转化。(2) 皮下种植 22 Gy 50 代细胞的 8 只裸鼠 50 d 后 1 只成瘤, 种植 22 Gy 60 代辐射细胞的 8 只裸鼠中有 4 只成瘤; 成瘤组织病理检测及免疫组化证实为上皮细胞癌。结论: 成功地建立了 ^{60}Co γ 射线诱导的支气管上皮细胞恶性转化模型。

[关键词] 辐射; 恶性转化; 人支气管上皮细胞; 上皮细胞癌

[中图分类号] R730.231

[文献标志码] A

^{60}Co γ -ray irradiation induced malignant transformation model of human bronchus epithelium cell

GAO Fu¹, CAI Jian-ming^{1*}, CUI Jian-guo¹, HUANG Ding-de², LI Bai-long¹, YANG Ping¹, MIN Rui¹, NI Jin¹, SUN Ding¹(1. Department of Radiological Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Nuclear Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** : To establish a malignant transformation model of human bronchus epithelium cells (BEAS-2B) by ^{60}Co γ -ray irradiation. **Methods** : Immortalized BEAS-2B cells were subjected to a irradiation with ^{60}Co γ -ray for three times, with a total dose of 22 Gy. Then the cells were cultured and subjected to colony-forming test, serum antibody experiment, and colony formation experiment in soft agar to detect the level of cellular malignant transformation. Nude mice were implanted subcutaneously with radiated cells to examine the tumor-forming ability of the irradiated cells; the formed tumor tissues were stained with H-E and immunohistochemistry methods for pathology observation. **Results** : (1) Colony-forming test showed that the proliferation ability of the cells was significantly increased after the 35th passage after 22 Gy radiation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); serum antibody experiment demonstrated that the colony forming ability was increased at the 45th passage after irradiation($P < 0.01$); and in the soft agar colony formaing experiment, colony forming ability of the 50th passage cells was increased significantly($P < 0.01$). All the above 3 test indicated the malignant transformation of BEAS-2B cells after irradiation. (2) Eight nude mice were implanted with the 50th passage cells after irradiation, and one mice had tumor formed at the nape 50 days after implantation; another 8 nude mice were implanted with 60th passage cells and 4 mice had tumor formed. Pathological observation indicated the formed tumor was epithelial cell carcinoma. **Conclusion** : We have successfully established the malignant transformation model of human bronchus epithelium cells (BEAS-2B) by ^{60}Co γ -ray irradiation.

[Key word] irradiation; malignant transformation; human bronchus epithelium cell (BEAS-2B); epithelial cell carcinoma

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(5): 435-439]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30370359). Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30370359)

[作者简介] 高 福(1974-), 男, 辽宁沈阳人, 博士, 讲师, 主要从事放射生物学及辐射致癌机制的研究; E-mail: gaofu_2002@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: cjm882003@yahoo.com.cn

能引起细胞癌变的因素包括物理、化学、生物以及遗传因素。电离辐射是最常见的物理致癌因素之一,人类群体所遭受的辐射来自天然辐射和人工辐射。随着核能在经济和军事领域中的应用越来越广泛,电离辐射对人类的潜在危害也不断增加。以我国 24 个省和直辖市 1950~1980 年间在医院放射科工作过的 X 射线工作者 27 011 人作为观察组,以医院同时期从未从事过放射诊治的医务人员 25 782 人作为对照组,观察组和对照组的肿瘤粗发病率分别为 120.3/10 万、113.6/10 万,其中观察组中白血病、皮肤癌、肺癌、食道癌等发病明显增加^[1]。

辐射致癌是对机体影响最大的电离辐射远后效应之一,其分子机制是肿瘤学、放射生物学、辐射防护学与预防医学共同探讨的热点。辐射诱导人的肿瘤样本在确认及获取上都存在相当难度,因此辐射诱导致癌的动物模型和细胞模型是进行辐射致癌研究的基础^[2]。辐射致癌动物模型工作本室已经在 2004 年完成^[3]。但是动物模型与细胞模型相比存在个体差异较大,实验结果重复性较差,不能动态地观察辐射致癌发生过程中不同阶段癌变的过程,不利于致癌的细胞分子机制研究等缺点。因此,建立辐射诱导细胞模型在辐射致癌研究中显得十分重要。由于高传能线密度(LET)射线(如带电粒子)照射容易诱导细胞恶性转化,过去的细胞恶变模型大多由高 LET 射线照射制备^[4-6];而由低 LET 的 γ 射线诱导人支气管上皮细胞恶性转化模型尚未见报道。本研究以⁶⁰Co 作为辐射源,建立 γ 射线诱发的人支气管上皮细胞恶性转化的细胞模型,以期对辐射致癌机制研究提供重要的研究工具。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

永生化的人支气管上皮细胞系 BEAS-2B 由第二军医大学基础医学部毒理学教研室印木泉教授惠赠,其染色体核型为近二倍体,细胞为正常人支气管上皮细胞,经腺病毒 12/SV40 杂交病毒(adenovirus 12/SV40 hybrid virus preparation)转染永生化。BEAS-2B 细胞采用不含血清的 LHC-8 完全培养液,以 1×10^5 个/25 cm² 培养瓶底的细胞密度进行传代培养。

1.2 细胞照射

BEAS-2B 细胞分 3 次行⁶⁰Co γ 射线照射,第 1 次在细胞贴壁后 48 h 照射,吸收剂量为 6 Gy;传代培养至第 9 代时进行第 2 次 γ 射线照射,吸收剂量为 8 Gy;继续传代培养至第 9 代时行第 3 次 γ 射线

照射,吸收剂量为 8 Gy。3 次 γ 射线照射总剂量为 22 Gy,记为 22 Gy 1 代。另设对照组:细胞未经任何处理,常规条件下与照射组同步培养。

1.3 细胞恶性程度的鉴定

1.3.1 平板克隆形成实验 参照文献[7]方法。将处于对数生长期的 BEAS-2B 细胞用胰酶消化,以 500 个/孔的细胞密度接种于 24 孔培养板中(同时作 5 个平行孔),加入 LHC-8 无血清培养液 0.5 ml,置于细胞培养箱中常规培养 7~10 d,弃去培养液,用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)小心浸洗 2 次。甲醇固定 15 min,适量姬姆萨应用液染色 10~30 min,显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数。按下式计算克隆形成率:克隆形成率(%) = 形成的克隆数/接种的细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3.2 血清抗性实验 接种细胞数为 200 个/孔(同时作 5 个平行孔)。实验步骤及染色方法同平板克隆形成实验,只是在 LHC-8 无血清培养液中加入胎牛血清,使胎牛血清终体积分数为 10%,7 d 后姬姆萨染色,显微镜下计数大于 30 个细胞的克隆数,计算克隆形成率,公式同上。

1.3.3 软琼脂克隆形成实验 制备 0.5% LHC-8 培养液底层琼脂,置室温凝固备用;将 BEAS-2B 细胞加入到含 LHC-8 培养液的琼脂中,终体积分数为 0.3%,浇入铺有底层琼脂的 24 孔培养板中,每孔加入 0.8 ml 琼脂,含细胞总数 1 000 个(同时作 5 个平行孔)。培养 2 周,倒置显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆,并计算克隆形成率。

1.4 裸鼠致瘤实验

将处于对数生长期的 BEAS-2B 细胞用 0.25% 胰酶消化并计数,400 $\times g$ 离心 5 min 收集细胞,用 LHC-8 培养液将细胞调整为适当密度,以 5×10^7 /ml 注射量为 0.2 ml 的细胞数将 22 Gy 35 代、22 Gy 45 代、22 Gy 50 代、22 Gy 60 代及对照细胞注入到裸鼠颈背部皮肤,SPF 级喂养,连续观察 30 d 以上。

1.5 病理切片及免疫组化

瘤组织石蜡包埋蜡块切成 4 μm 厚的切片 2 张,1 张做 H-E 染色,光镜下观察细胞癌变类型;另 1 张用 Envision 法做细胞角蛋白免疫组化染色。角蛋白一抗系鼠抗人单克隆抗体,二抗系兔抗鼠抗体,连同 Envision 二步法试剂盒等均购自 DAKO 公司。按照 Envision 试剂盒说明进行实验操作。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SARS 8.0 软件进行 *t* 检验。

2 结 果

2.1 照射后 BEAS-2B 细胞平板克隆形成能力增强

各对照细胞在连续传代培养过程中分裂增殖能力未发生明显改变。而在经过 22 Gy 照射的细胞培养至 35 代后,其增殖能力明显增加,平板克隆率由 23.33% 增加至 30.30% ($P < 0.05$);在 22 Gy 50 代时克隆形成率达到 40.46%,增殖分裂能力明显高于对照组 ($P < 0.01$,表 1)。

表 1 BEAS-2B 细胞照射后平板克隆形成能力的变化(%)

Tab. 1 Changes of cloning forming ability of BEAS-2B cells induced by irradiation(%)

Groups	Passage after irradiation				
	10	25	35	45	50
Control	20.60 ± 4.53	21.41 ± 5.80	23.33 ± 8.41	18.15 ± 7.60	20.77 ± 5.28
Irradiated cells	21.67 ± 7.57	22.49 ± 8.69	30.30 ± 6.46*	36.27 ± 10.36**	40.46 ± 10.34**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

表 2 BEAS-2B 细胞照射后血清中克隆形成率的增加(%)

Tab. 2 Increase of cloning forming ability of BEAS-2B cells induced by irradiation in serum resistance test(%)

Groups	Passage after irradiation				
	10	25	35	45	50
Control	4.55 ± 2.70	5.25 ± 2.80	4.30 ± 2.75	5.33 ± 2.68	6.15 ± 2.46
Irradiated cells	4.30 ± 1.89	5.56 ± 2.35	5.83 ± 2.99	6.90 ± 2.99	10.48 ± 4.05**

** $P < 0.01$ vs control group

2.3 BEAS-2B 细胞受到照射后软琼脂集落形成能力的增加

在正常情况下,细胞在软琼脂中形成集落的能力特别弱。在照射后 45 Gy 组中集落的形成明显增加,由对照组的 0.21% 增加至 0.85%;到了 50 代集落的形成能力进一步增加,由对照的 0.29% 增加到 1.31% ($P < 0.01$,图 1)。

2.4 BEAS-2B 细胞受照射后裸鼠皮下种植成瘤

种植 22 Gy 35 代、22 Gy 45 代细胞的裸鼠(分别为 6 只、8 只)直到自然死亡也未观察到肿瘤的形成。而在种植 22 Gy 50 代的 8 只裸鼠中,经过 50 d 的潜伏期后观察到 1 只裸鼠的颈背部形成肿瘤;种植 22 Gy 60 代细胞的 8 只裸鼠中,有 4 只裸鼠在注射 1~2 个月后观察到肿瘤出现,其中 1 只在肿瘤形成 4 周后不明原因衰竭死亡。

2.5 裸鼠种植瘤组织病理观察和免疫组化结果

照射后 BEAS-2B 细胞裸鼠皮下移植瘤组织切片,经 H-E 染色,可见细胞呈多角形,少数呈梭形;

2.2 照射后 BEAS-2B 细胞血清抗性的产生

支气管上皮细胞 BEAS-2B 只有在无血清培养液中才能持续增殖、传代,但当细胞恶性转化后,其对血清的促分化作用产生抗性。本实验中,各正常组细胞在培养液中加入 10% 胎牛血清后,细胞明显呈梭形,增殖能力均明显下降。而照射组细胞在第 45 代后克隆形成增加,在 50 代时克隆形成率与对照组相比明显增加 ($P < 0.01$),表明照射组在传代到 50 代时获得了血清抗性(表 2)。

细胞核圆形、卵圆形,部分不规则;胞质淡红色;部分细胞处于有丝分裂状态。组织学形态显示:细胞成片状、卵巢状排列,周围有少量纤维组织,肿瘤周围未形成明显包膜,有部分肿瘤细胞侵袭入肌纤维中,

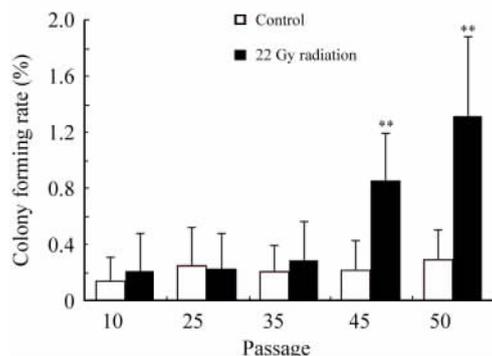


图 1 BEAS-2B 细胞受照射后软琼脂集落形成能力的增加
Fig. 1 Increase of colony forming ability of BEAS-2B cells after irradiation in soft agar

** $P < 0.01$ vs control group

有肌纤维萎缩现象;间质中有毛细血管,部分肿瘤组织坏死。免疫组化切片显示肿瘤细胞胞质呈棕黄色,提示瘤细胞来自上皮细胞(图2)。

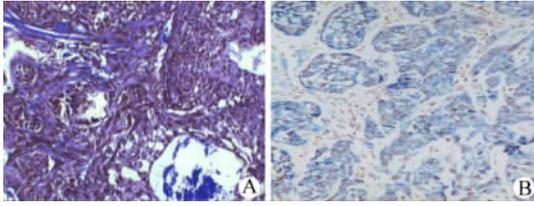


图2 22 Gy 60代细胞裸鼠移植瘤组织的病理观察

Fig. 2 Pathological observation of tumor tissues from 22 Gy 60 BEAS-2B cells implanted in nude mice

A: H-E staining, $\times 200$; B: immunohistochemistry with Envision staining, $\times 256$

3 讨论

辐射诱导细胞恶性转化实验已经有几十年历史。Borek等早在20世纪60年代首先利用SHE细胞进行了X射线诱发细胞转化研究。全世界先后成功应用于研究辐射恶性转化研究的有10余种细胞系:SHE、C3H10T1/2、BALB3T3、大鼠肺成纤维细胞等^[8]。在早期实验中用来进行转化研究的都是成纤维细胞,直到20世纪90年代初才成功地建立了辐射诱导的上皮细胞恶性转化模型^[9]。细胞恶性转化实验由动物细胞向人类细胞、成纤维细胞向上皮细胞转变是辐射诱导恶性转化细胞模型的两大跨越。

电离辐射按能量品质可分为高传能线密度(LET)射线和低LET射线。高LET辐射包括 α 粒子、重离子核,低LET射线包括X射线、 γ 射线等。辐射所致生物效应大小与LET值有重要关系。研究证实:高LET射线如带电粒子比低LET射线更容易诱导动物肿瘤及细胞恶性转化的发生^[4]。现有的辐射诱导上皮细胞恶性转化模型中以高LET辐射诱导居多^[5-6]。高LET辐射诱导肺癌细胞模型方面国内外也有成功报道:如Hei等^[10]将不同剂量 α 粒子照射BEP-2D细胞,将受不同剂量 α 粒子作用的细胞接种于13只裸鼠,有7只长出肿瘤。2001年,军事医学科学院利用 α 粒子照射HPV-18病毒诱导永生化的支气管上皮细胞BEP2D细胞,成功建立 α 粒子诱导癌变的人上皮细胞模型^[11]。但到目前为止,低LET γ 射线诱导的上皮细胞转化模型报道甚少,尚未见到有关 γ 射线诱导的支气管上皮细胞恶性转化模型。考虑到原子弹爆炸后早期核辐

射及放射性落下灰沾染中 γ 射线占有重要地位,且人类肺癌的绝大部分起源于支气管上皮细胞,故直接建立人的支气管上皮细胞癌变模型,具有其他生物研究体系如大鼠气管上皮、人成纤维细胞等所不可比拟的优势。

本研究以SV40病毒转染的人支气管上皮细胞BEAS-2B为研究对象,成功建立 γ 射线诱发的体外细胞恶性转化模型。血清抗性实验、平板克隆形成实验、软琼脂集落形成实验被认为是判断细胞是否发生恶性转化的重要指标,且软琼脂集落形成实验在三者中最重要。具有锚着独立性生长能力的细胞大多能在裸鼠体内成瘤^[10,12],被认为是仅次于成瘤实验的恶性转化判断标准。本研究的平板克隆形成实验结果显示,在经过22 Gy照射培养至35代后,细胞增殖分裂能力明显高于对照组,表明受照射细胞在经过一定代数的培养后,其增殖分裂速度加快,出现恶化趋势。支气管上皮细胞BEAS-2B只有在无血清培养基中才能持续增殖、传代,当加入血清后,在血清中某些成分的刺激下BEAS-2B发生分化,基本失去增殖能力,细胞形态变长、变大,呈梭形。但当细胞恶性转化后,其对血清的促分化作用产生抗性,能够不受血清影响而继续生长、增殖、传代。本实验照射组细胞在第45代后克隆形成增加,而在50代时克隆形成率与对照组相比明显增加($P < 0.01$),表明照射组在传代到50代时获得了血清抗性,并出现恶性转化的征兆。在正常情况下,细胞在软琼脂中形成集落的能力特别弱,甚至相当比例的培养孔中见不到集落的形成。本实验照射后45代组中集落的形成明显增加,与对照相比由0.21%增加至0.85%;到了50代集落的形成能力进一步增加,由对照的0.29%增加到1.31%($P < 0.01$)。以集落形成能力作为考量标准,则可以认为细胞在受到22 Gy照射后,在45代即发生恶性转化。

裸鼠皮下致瘤性是传统判断细胞恶性转化的“金标准”。一般只有完全恶变的细胞才能在裸鼠皮下成瘤,那些处于癌前改变阶段的细胞,则无法在裸鼠成瘤。在种植22 Gy 50代细胞的8只裸鼠中,经过50 d的潜伏期后观察到1只裸鼠的颈背部形成肿瘤;22 Gy 60代细胞的8只裸鼠中,有4只裸鼠在注射1~2个月后观察到肿瘤出现。裸鼠致瘤实验证明受到照射的细胞从50代起即发生了明确的恶性转化,并提示细胞恶性转化是个渐进的过程。

致癌的发展过程大致可划分为启动、促进、发展3个阶段,外源性因子诱发体外细胞恶性转化的研

究证实,它也是一个多阶段连续的发展过程。在启动、促进、发展过程中,当细胞受致癌物处理后早期可观察到克隆形态和生长方式的明显改变。在继续传代的过程中,形态改变的细胞逃逸了衰老变为永生化,并发展成具有锚着独立性生长能力的细胞,在连续培养和增殖后注射到合适的宿主体内可致瘤。BEAS-2B 细胞为 SV40 病毒转染的永生化的人支气管上皮细胞,BEAS-2B 细胞不具有锚着独立性生长能力及裸鼠内成瘤的能力。而在进一步受到辐射致癌因子作用传代培养一定代数后,BEAS-2B 细胞表型发生变化,获得了锚着独立性生长能力及裸鼠内成瘤的能力。体外转化可很好地模拟体内肿瘤发生的过程,本实验结果再一次证明了辐射诱导细胞恶变是一个多阶段连续的发展过程。

[参 考 文 献]

- [1] 赵永成,王继先,张卫,等. 我国医用诊断 X 射线工作者 1950 ~ 1995 年肿瘤死亡危险分析[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2002, 24(4): 243-245.
- [2] 王玉民. 我国辐射致癌基础实验研究成果概述[J]. 山西医药杂志, 1999, 28(2): 91-97.
- [3] 韩玲,蔡建明,李百龙,等. ^{60}Co γ 射线体外诱发小鼠恶性肿瘤的实验研究[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(7): 745-748.
- [4] Yang TC, Georgy KA, Craise LM, *et al.* Initiation of oncogenic transformation in human mammary epithelial cells by charged particles[J]. Radiat Oncol Investig, 1997, 5(3): 134-138.
- [5] Hei TK, Zhao YL, Roy D, *et al.* Molecular alterations in tumorigenic human bronchial and breast epithelial cells induced by high LET radiation [J]. Adv Space Res, 2001, 27(2):411-419.
- [6] Yamada S, Yang TC, George K, *et al.* Microsatellite instability in human mammary epithelial cells transformed by heavy ions[J]. Adv Space Res, 1998, 22(12):1709-1717.
- [7] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版社, 1996. 183-186.
- [8] Roti JL, Malyapa RS, Bisht KS, *et al.* Neoplastic transformation in C3H 10T(1/2) cells after exposure to 835.62 MHz FDMA and 847.74 MHz CDMA radiations[J]. Radiat Res, 2001, 155(1): 239-247.
- [9] Rhim JS, Thraves P, Dritschilo A, *et al.* Radiation-induced neoplastic transformation of human cells [J]. Scanning Microsc, 1993, 7(1):209-215.
- [10] Hei TK, Piao CQ, Willey JC, *et al.* Malignant transformation of human bronchial epithelial cells by random-simulated α -particles[J]. Carcinogenesis, 1994, 15(3): 431-437.
- [11] 葛世丽,楼铁柱,项晓琼,等. α 粒子照射诱发 BEP2D 细胞恶性转化模型的建立[J]. 癌症, 2001, 20(9): 901-905.
- [12] Reddel RR, De Silva R, Duncan EL, *et al.* SV40-induced immortalization and ras-transformation of human bronchial epithelial cells [J]. Int J Cancer, 1995, 61(2): 199-205.
- [收稿日期] 2007 - 07 - 12 [修回日期] 2007 - 08 - 20
- [本文编辑] 郁晓路

· 简 讯 ·

《中国肿瘤生物治疗杂志》2008 年度征订启事

《中国肿瘤生物治疗杂志》是由中国免疫学会和中国抗癌协会联合主办的国家级医学学术期刊(刊号为 CN31-1725/R), 双月刊。本刊为中国科技论文统计源期刊、医学核心期刊, 已被《中国科技论文与引文数据库》、《中国科学引文数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国学术期刊文摘》、《中国医学文摘》及美国《化学文献》(CA)、波兰《哥白尼索引》(IC)等国内外多数权威数据库和文摘刊物收录。

本刊为中国肿瘤生物治疗领域唯一的高级学术刊物, 重点报道我国肿瘤生物治疗方面基础理论与临床的最新研究成果、新实验技术及其学术进展, 宣传我国肿瘤生物治疗的政策和发展策略。主要栏目有述评、专家论坛、论著、研究快报、学术争鸣、技术方法、文献综述、专题讲座、科技动态等。以肿瘤防治专业的中高级临床和科研工作者、医药院校师生及其他相关学科的科技人员为读者对象。

《中国肿瘤生物治疗杂志》每期定价 8.00 元, 全年定价 48.00 元, 邮发代号: 4-576, 请通过邮局订阅。若错过, 可从本刊编辑部补订, 请将 48.00 元(优惠免邮资) 寄本刊编辑部, 并注明详细通讯地址及邮政编码, 编辑部将负责如期寄至您手中。

联系地址: 上海市翔殷路 800 号第二军医大学免疫楼

《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部

联系人: 王莹, 韩丹

邮政编码: 200433

联系电话: 021-55620605 × 22; 021-25070316 × 22; 传真: 021-25074547

http: www. biother. org; E-mail: cjcb@biother. org