

# 砷酸钠与亚砷酸钠致 NIH3T3 细胞转化的比较研究

杜金荣 刘家仁 吴永会 卢卓扬 张忠义

**摘要** 目的 探讨五价砷和三价砷的细胞转化活性的异同。方法 应用细胞转化试验和软琼脂培养技术,以 NIH3T3 为靶细胞。结果 在所设剂量下,两种受试物均可诱发细胞转化,并有一定的剂量依存趋势。两种受试物比较,亚砷酸钠的致细胞转化作用较砷酸钠强。软琼脂试验显示,两种受试物的各个剂量,均诱发了阳性反应,与细胞转化试验结果相一致。结论 因进入体内的五价砷可以还原成三价,对工业生产中接触的五价砷的致癌危险性不容忽视。

**关键词** 砷酸钠 亚砷酸钠 细胞转化 软琼脂试验

**Comparative Investigation Cell Transformation Activity of Sodium Arsenite and Sodium Arsenate on NIH3T3 Cells.** Du Jinrong\*, Liu Jiaren, Wu Yonghui, et al. \*Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086

**Abstract Objective** To investigate the difference of cell transformation activity between pentavalent arsenate and trivalent arsenite. **Methods** Cell morphological transformation test and soft agar assay were used, and NIH3T3 cell line was chosen as the target cell. **Results** Showed that the two compounds exhibited positive effects at the designed doses in a dose-dependent manner; the trivalent arsenite was more potent than that of the pentavalent arsenate. The positive result of the two compounds in soft agar assay showed a consistency with that seen in the transformation test. **Conclusion** Seems that as the pentavalent arsenic can be reduced to trivalent arsenic in human body, it should not ignore the risk of exposure to pentavalent arsenic in working environment.

**Key words** Sodium arsenate, Sodium arsenite, Cell transformation, Soft agar assay

在体外试验,对三价砷的致癌活性目前已经比较肯定,但对五价砷的致癌活性其结论还不一致。张忠义等<sup>[1]</sup>曾用叙利亚地鼠胚胎细胞检测砷酸钠(五价)的细胞转化作用为阴性。已有的研究还指出,五价砷化合物本身无致癌性,如果有致癌性,也是由于部分五价砷在体内还原为三价所致<sup>[2]</sup>。本文在以往工作的基础上,同时以砷酸钠和亚砷酸钠(三价)为受试物,探讨了它们对小鼠成纤维细胞系 NIH3T3 的转化作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 靶细胞

NIH3T3 细胞为小鼠成纤维细胞系,由北京市肿瘤研究所遗传室提供,放液氮中冻存,临用前复苏。

### 1.2 受试物

五价砷选砷酸钠,三价砷选亚砷酸钠,二者均为国产分析纯化学试剂。先配制含量为 1.0mg/ml 的储备液,临用前稀释至所需浓度,稀释液和阴性对照物为 RPMI1640 培养液。阳性对照物为 Sigma 产甲基硝基亚硝基胍(MNNG),由哈医大营养与食品卫生教研

室崔鸿斌教授馈赠。

### 1.3 分组

砷酸钠和亚砷酸钠各设 3 个剂量组,在培养液的终浓度分别为 0.5、1.0 和 2.0 $\mu$ g/ml,阳性对照组 MNNG 在培养液的终浓度为 1.5 $\mu$ g/ml。

### 1.4 细胞转化试验

将冻存细胞复苏,在含青链霉素和 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液中 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 下培养,待细胞增殖至一定量后,用 EDTA/胰蛋白酶液消化获取细胞。在 25ml 培养瓶中接种含 1.7 $\times$ 10<sup>3</sup>~2.4 $\times$ 10<sup>3</sup> 个细胞的培养液 3ml,每剂量组接种 10 瓶(其中两瓶用于软琼脂培养)。培养 24 小时后,按设计的剂量加入受试物,染毒持续 24 小时。去除含受试物的培养液,以磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,重新加入等量培养液,以后每 3 天换液一次,至 21 天终止培养。去除培养液,以甲醇固定细胞层,Giensa 染色,观察计数细胞灶。转化灶参照李申德<sup>[3]</sup>和黄幸纾等<sup>[4]</sup>提出的标准,由二人共同认定。

### 1.5 软琼脂培养<sup>[5]</sup>

从细胞转化试验终止培养的各剂量组随机抽取 2 瓶进行软琼脂培养。具体做法为:用 6 孔塑料板,将含有 0.6% 琼脂的 RPMI1640 培养液 2ml 加入各孔为底层

作者单位:150086 哈尔滨医科大学第二临床医学院(杜金荣),哈尔滨医科大学公共卫生学院(刘家仁、吴永会、卢卓扬、张忠义)

琼脂，再加入含有待测细胞的0.3%琼脂的RPMI1640培养液（软琼脂）2ml为顶层琼脂，培养3~4周，观察有无克隆生长。每剂量各做6孔。

## 2 结果

在本试验条件下，MNNG、砷酸钠和亚砷酸钠各组均有转化灶发生，培养基对照组细胞生长良好，未观察到转化灶。培养基对照组正常细胞灶和各染毒组转化灶如图1~4所示。砷酸钠和亚砷酸钠两组低剂量下转化灶的发生率低，高剂量下增高，有剂量依存趋势（表1）。

在软琼脂试验中，MNNG、砷酸钠和亚砷酸钠各组各剂量下均为阳性（见图5~6），培养基对照组细胞在软琼脂中不生长。



图4 阴性对照组正常细胞灶 ×100

表1 砷酸钠和亚砷酸钠细胞转化作用比较

受试物	剂量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	培养瓶 (个)	接种 细胞数 (个)	存活 细胞灶 (个)	转化 细胞灶 (个)	转化率 (%)
砷酸钠	0.5	8	19 200	447	7	1.56
	1.0	8	19 200	560	18	3.21
	2.0	8	19 200	399	16	4.01
亚砷酸钠	0.5	7	16 800	401	7	1.74
	1.0	8	19 200	156	8	5.13
	2.0	6	14 440	332	16	4.82
MNNG	1.5	7	11 900	323	25	7.74
RPMI1640	—	8	13 600	523	—	—



图1 亚砷酸钠(1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )组转化灶 ×100



图2 砷酸钠(1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )组转化灶 ×100



图3 MNNG(1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )组转化灶 ×100

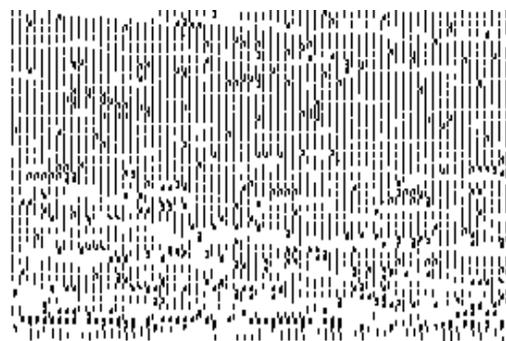


图5 亚砷酸钠(1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )组软琼脂试验阳性 ×100

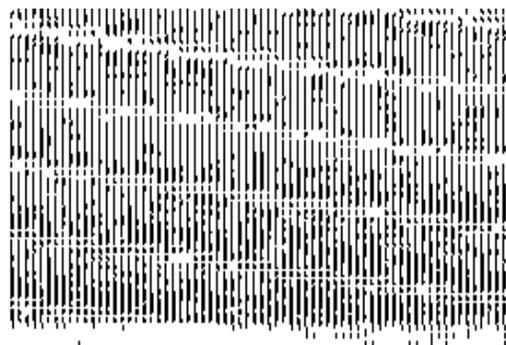


图6 砷酸钠(1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )组软琼脂试验阳性 ×100

### 3 讨论

国际癌症研究机构 (IARC) 根据流行病学资料和病例报告已将砷列为人类致癌物名单<sup>[6]</sup>。但至今为止, 砷的动物诱癌试验尚未获得阳性结果。因此探讨不同砷化合物有无致癌性和致癌机理多依赖于体外研究。砷化合物的种类很多, 且砷在这些化合物中的价态有三价和五价。三价砷的致癌性 (如三氧化二砷, 亚砷酸钠) 已在许多体外试验研究中得到证实, 但五价砷化合物曾被认为无致癌性<sup>[9]</sup>。我们既往用砷酸钠在 0.25 和 0.5 μg/ml 两个剂量下没有诱发叙利亚地鼠胚胎 (SHE) 细胞发生形态转化<sup>[6]</sup>。尽管如此, 砷酸钠可诱发细胞发生形态转化国内外均有报道: 崔明珍等人<sup>[7]</sup>以砷酸钠为阳性对照物探讨砷的致癌性, 在砷酸钠的浓度为  $2 \times 10^{-6}$  mol/L 时, 转化克隆的发生率为 1.6%。DiPaolo 等<sup>[8]</sup>采用转化克隆方法, 检测砷酸钠对 SHE 细胞的恶性转化作用时也获得了阳性结果。目前认为, 由五价砷诱发的转化作用是由于被细胞摄取的五价砷在细胞液内代谢还原为三价而引起的, 而细胞对三价砷的摄取能力又大于五价砷, 因此可导致这两种砷化合物转化程度上的差异<sup>[2,9]</sup>。最近的一项转化试验结果进一步证明, 砷酸钠和亚砷酸钠对牛乳头瘤病毒 DNA 所诱导细胞转化有增进作用, 在发生同样程度的转化效应下, 砷酸钠的剂量为 25 μmol/L, 而亚砷酸钠只需 5 μmol/L。本研究采用小鼠 NIH3T3 细胞同时检测砷酸钠和亚砷酸钠的转化作用, 均显示阳性结果, 但在相等的剂量下, 亚砷酸钠的转化活性大于砷酸钠, 这与上述学者的结论是一致的<sup>[10]</sup>。

锚着非依存性生长试验 (俗称软琼脂试验) 是当前检测转化细胞和肿瘤细胞最为常用的方法, 其结果与细胞的恶性程度具有很好的符合率。正常细胞具有

贴壁生长的特性, 而转化的细胞失去这一特性, 可在软琼脂中生长。本研究对砷酸钠、亚砷酸钠和 MNNG 组各剂量下的转化试验结果均用软琼脂试验检测其符合率, 结果与转化试验结果一致。

工业生产中工人接触的砷有三价也有五价, 但五价砷被细胞摄取后可还原成三价, 就此而言, 它的致癌潜力可能只是不如三价砷强, 然而对它的致癌危险性同样不应忽视。

### 4 参考文献

- 1 张忠义, 王秀铃, 刚葆琪. 砷酸氢二钠体外诱发 SHE 细胞形态转化的实验观察. 哈尔滨医科大学学报, 1991, 25 (6): 463~464
- 2 Bertolero F, Pozzi G, Sabbini E and Saffiotti U. Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. *Carcinogenesis* 1987, 8 (6): 803~808.
- 3 李申德. 细胞培养中正常细胞恶性转化的鉴定指标. 细胞生物学杂志, 1985, 2: 94
- 4 黄幸纾, 陈若星, 主编. 环境化学物致突变致畸致癌试验方法. 浙江科学技术出版社, 1985. 173~190
- 5 鄂征著. 组织培养和分子细胞学基础. 北京: 北京出版社, 1995. 157~158
- 6 IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. 1980 Vol. 23
- 7 崔明珍. 砷的致突变效应及细胞转化研究. 北京劳动卫生与职业病防治研究所年报 1986.
- 8 DiPaolo TA, et al. Quantitative studies of in vitro morphological transformation of Syrian hamster cells by inorganic metal salts. *Cancer Res* 1979, 39: 1008.
- 9 Saffiotti U and Bertolero F. Neoplastic transformation of BALB/3T3 cells by metals and the quest for induction of a metastatic phenotype. *Biol Trace Elem Res* 1989, 21: 475~482.
- 10 Kowalski LA, Tsang SS, Davison AJ. Arsenic and chromium enhance transformation of bovine papillomavirus DNA-transfected C3H/10T1/2 cells. *Cancer Lett* 1996, 103 (1): 65~69.

(收稿: 1998-07-20 修回: 1998-09-28)

## 征 稿 通 知

中华预防医学会职业病专业委员会根据 1999 年度学术活动计划, 拟于 1999 年 10~11 月在江苏省无锡市召开第十二次全国职业病学术交流会。尘肺影像、急性中毒救援、职业病康复、职业病与自由基化学、厂矿职业病防治、物理因素职业病、职业健康监护及职业医学信息等方面的论文都可参加交流。

请各地专业同道踊跃投寄文稿。论文请于 1999 年 7 月 31 日前, 连同单位介绍信及审稿费 20 元, 寄上海市杨浦区杭州路杨浦区中心医院职业病科, 邮编 200090。

中华预防医学会职业病专业委员会

1998 年 11 月