

细胞杂交

[英] H. 海利斯 著

43

科学出版社

内 容 简 介

细胞的人工融合是研究细胞遗传学、细胞化学、细胞免疫学、细胞结构与功能的一项新技术。采用这种技术研究细胞的遗传和病理,特别是对肿瘤细胞的免疫取得了一定的成就。

本书内容包括:“杂交细胞的形成和特性”,“基因活性和分化”以及“遗传信息的表达”,系统地介绍了近十年来在细胞人工融合研究方面所取得的主要进展。可供细胞学、遗传学、微生物学和医务工作者参考。

H. Harris

CELL FUSION

Clarendon Press, Oxford, 1970

细 胞 杂 交

[英] H. 海利斯 著

严绍颐 陆德裕 史瀛仙 译

*

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1975 年 1 月第 一 版	开本: 787×1092 1/32
1975 年 1 月第一次印刷	印张: 3 3/16
印数: 0001—8,050	字数: 71,000

统一书号: 13031·313

本社书号: 483·13—10

定价: 0.35 元

译 者 的 话

细胞融合(即细胞杂交)是二十世纪六十年代细胞学出现的一种新技术,它用人工的方法把属于不同种的两个或两个以上的细胞融合成一个细胞。通过细胞融合方法,有可能证明细胞核和细胞质的相互作用,还可以研究构成细胞的物质,如蛋白质和核酸等,是如何合成的,它们分别起什么样的作用,以及起作用时需要什么样的条件,等等。融合细胞的研究对培育动植物新品种、修补细胞、探索各种疾病的病毒病因,特别是对肿瘤细胞的免疫和病毒病因等的研究,具有广阔的前景。

在批林批孔运动深入发展的大好形势下,我国细胞学工作者和医学工作者意气风发,斗志昂扬,正在广泛进行动物细胞、植物细胞、动植物细胞的融合研究,以及各种疾病病因的探索。我们遵照伟大领袖毛主席关于“洋为中用”的教导,把本书翻译出来供有关的科学工作者和医务工作者参考。

本书内容共分三章,系统介绍了近十年来细胞融合研究的主要成就,着重于理论上的阐述,而实际方法则介绍较少。

由于我们水平有限,译文难免有不妥之处,希望广大读者批评指正。

1974 年 5 月

目 录

第一章	杂交细胞的形成和特性	1
第二章	基因活性和分化	33
第三章	遗传信息的表达	66

第一章 杂交细胞的形成和特性

研 究 史

1965年2月13日 J. F. Watkins 和我作了关于灭活病毒可以用来融合不同种动物细胞的报告, 并指出由此产生的杂交细胞可以存活^[1]。世界报刊很快就对这一发现在生物学上的重要性作出了评价。当然, 科学取得如此进展是不容易的。我们的实验同所有其他的工作一样, 是有其历史根源的, 前人作过很久的工作, 没有这些工作, 我们既不可能, 也不能想象会作出如此贡献。过去的历史并不是没有意义的。

脊椎动物的多核细胞是 Müller^[2, 3] 首先报导的, 是他在肿瘤中观察到的。Robin^[4] 在骨髓中发现它们。Rokitansky^[5] 在肺结核组织内见到, 而 Virchow^[6] 则在各种正常组织和发炎及坏死部位见到。当 Langhans^[7, 8] 撰写关于多核细胞的经典论文时, 关于融合细胞已有大量的文献。根据 de Bary^[9] 的工作提出了一种看法, 认为某些这样的细胞是由单核细胞融合而成的, 他发现在某些粘菌的生活史中有从单个细胞融合产生多核质体 (Multinucleated plasmodia) 的情况。可能是 Lange^[10] 首先在脊椎动物中描述了这一融合的过程。Lange 看到了青蛙血液中产生的变形细胞的融合; 不久之后, Cienkowski^[11]、Buck^[12] 和 Geddes^[13] 在无脊椎动物中也有同样的发现。Metchnikoff^[14] 认为, 吞噬细胞融合形成多核质体是脊椎动物和无脊椎动物所特有的一种细胞防御机制。

上个世纪,在某些发炎损伤中所观察到的多核细胞很可能是由病毒引起的。当然,这些情况下的病毒病原学直到很晚还没有被人们所认识。可能是 Luginbühl^[15] 和 Weigert^[16, 17] 最早报导了损伤中的多核细胞肯定是由病毒引起的,他们描述了天花脓疱周围的这类细胞。Unna^[18] 在鸡痘的皮肤损伤处观察到多核细胞,而 Warthin^[19] 则在麻疹病人的扁桃体中发现有多核细胞。

自 Harrison^[20] 介绍了组织培养方法之后,在动物组织的培养中,对细胞融合作了许多观察。最早可能是 Lambert^[21], 15 年之后, Lewis^[22] 列出了 21 篇描述这类观察的参考文献。Warthin 的发现^[19] 立即提示 Enders 和 Peebles^[23] 去研究组织培养中的麻疹病毒的效应。这些文章的作者们发现,在组织培养中这种病毒诱导细胞融合在一起,形成多核合胞体 (multinucleated syncytia)。Henle、Deinhardt 和 Girardi^[24] 用流行性腮腺炎病毒, Chanock^[25] 用婴儿哮喘病毒, Marston^[26] 用副流感类病毒也作了同样的观察。有关这一现象的其他一些例子也已有过大量的描述。Okada^[27, 28] 证明利用高浓度的 HVJ 病毒(日本血凝病毒,即另外一族副流感病毒)能使悬液中的动物肿瘤细胞很快融合起来,形成多核巨细胞。

在病理损伤处所发现的各种类型的多核细胞究竟能不能再增殖,到今天仍是一个没有完全解决而有争论的问题。但是早在 1916 年, Macklin^[29] 已经观察到鸡胚组织培养中的双核细胞能进行有丝分裂,它有时能产生两个单核子细胞。Macklin 描述了在这种情况下来自两个核的染色体如何沿着一个赤道板排列成行,并通过正常的细胞分裂被分配到两个子细胞中去。Macklin 还观察了双核细胞中各种形式的不规则有丝分裂,包括三极有丝分裂。Fell 和 Hughes^[30] 叙述了培养的小白鼠双核细胞中基本上与此类似的过程。在这种情

况下，两个核的同步有丝分裂又把所有的染色体集中到一个赤道板上排列起来，并通过细胞分裂产生了含有一个不正常大核的单核子细胞，它们的染色体明显为正常数目的两倍。以后到 1960 年就弄清楚了，培养的细胞既能彼此自然融合，也能通过一些病毒随意诱导它们融合。这种双核细胞能产生单核子细胞，它们的染色体是同时从原来双核细胞的两个核承袭来的，这时被包含在一个单核内。

1960 年 Barski, Sorieul 和 Cornefert^[31] 指出，当两个不同的小白鼠细胞株放在培养中一起生长时，最后会出现一种新的细胞类型，它有一个内含双亲细胞染色体组的细胞核。Barski 和 Belehraddek^[32] 认为这些杂交细胞可能是通过细胞间一种核的交换过程而产生的，并提出了一些电影记录来证明这一论点。虽然，以后的观察发现，这些细胞带有 SV5 病毒（这是一种很强的细胞融合诱导物），但由病毒诱导细胞融合而得到杂交细胞的想法，在当时还没有被证实^[33]。Sorieul 和 Ephrussi^[34,35]，以后还有 Ephrussi 和几个其他的合作者^[36] 对 Barski 等^[31] 的观察作了补充，并从一些不同小白鼠细胞株的混合培养中得到了几种新的杂交细胞。Ephrussi 及其同事们对这些小白鼠杂交细胞进行了大量细胞核的研究，并指出它们有丢失染色体的倾向，不过这种丢失进行得很慢而且无法预测。Littlefield^[37] 利用在生化方面具有不同缺损的双亲细胞，设计出一种方法可用来选出这些双亲细胞在混合培养条件下自然地融合在一起所产生的杂交细胞。在 Harris 和 Watkins 的实验^[1] 发表之前，只是在小白鼠细胞的不同株之间观察到这种杂交现象。我们的贡献有三方面：（1）证明了灭活的病毒可作为一般的方法用来在控制条件下融合动物细胞。（2）证明了很不相同的动物种之间的细胞可以被诱导融合。（3）证明了这种融合细胞是可以存活的。对于我们的实

验来说,唯一真正值得注意的一件事,就是以前没有做成功这种实验。

细胞融合机制

在我们的工作中, Watkins 和我选用了仙台病毒 (Sendai virus), 现在它已成了诱导细胞融合的标准试剂。并不是说它一定是最好的试剂, 而令人奇怪的是对其他病毒的效力和作用范围没有广泛地探索。仙台病毒是属于粘液病毒中副流感病毒族中的一种, 它与 HVJ 病毒(日本血凝病毒)非常相似(即使不完全相同的话)。Watkins 和我之所以选择仙台病毒是因为 Okada^[27,28] 早已证明, 动物肿瘤细胞在悬液中能被这种高浓度的病毒很快融合在一起, 而且 Okada 和 Tadokoro^[38] 还证明这种病毒融合细胞的能力对用来破坏它感染力的紫外光强度有相对的抗性。后一发现表明这种灭活病毒可被用作细胞的融合剂, 这样就可以避免由于使用感染病毒而引起的那些复杂情况。

仙台病毒的形状是多样的, 但一般都是圆形的颗粒, 中央是核酸 (RNA), 外面包着脂蛋白外壳^[39,40] (图 1.1)。这种病毒的融合能力是在它的外壳, 而不是其中的核酸。核酸可被大剂量的紫外光灭活^[41] 也可与 β -丙炔内脂 (β -propiolactone) 作用而被破坏^[41], 从而使核酸失效, 但并不会严重损害这种病毒融合细胞的能力, 甚至用超声波破坏病毒后所得到的病毒外壳的碎片, 也在一定程度上保留着诱导细胞融合的能力^[42]。另一方面, 用乙醚处理病毒的外壳以去掉其上的类脂, 可以完全破坏它的融合能力^[43]。至于新城鸡瘟病毒 (New-castle Disease virus) 融合细胞的能力则已证明对磷酸酯酶的作用是敏感的^[44]。这些观察说明, 融合作用需要完整的病毒外壳

结构,但也有一些初步试验证明,有可能从“仙台”病毒中提取一种蛋白质,它也具有诱导细胞融合的能力^[45]。

当细胞悬液用足够大剂量的病毒处理保证使每个细胞周围布满大量病毒颗粒,则细胞便聚集在一起。在一定限度内细胞聚集成团的大小与所加入的病毒量成正比。究竟在细胞表面发生了哪些变化才使细胞的粘着性这么增大还不清楚。细胞在 4℃ 下几秒钟之内就能集聚,所以细胞表面所发生的那些变化不大可能是由酶作用所引起。由病毒聚集起来的细胞的电镜照片证明,病毒颗粒嵌在相邻细胞的细胞膜之间或者埋在很多细胞表面所能看到的那种微绒毛内(图 1.2)。病

毒颗粒本身可能就起着一种粘合剂的作用,它把两个相接触的细胞膜有力地粘着在一起。目前要对最初的聚集反应作更精细的分析是办不到的,因为很难测量细胞和病毒颗粒之间的碰撞机会^[46]。尽管细胞在 4℃ 时能集聚,但如果不提高温度则细胞融合是不会开始的。Okada, Murayama 和 Yamada^[47]提出证据支持这样的观点,即认为细胞融合是一种需能的反应,它可以被干扰细胞内氧化磷酸化作用的那些条件所抑止。看来钙离子对于细胞融合也是不可缺少的^[48]。由于实际上在厌氧条件下增殖的细胞能够借助病毒融合,因此,融合反应似

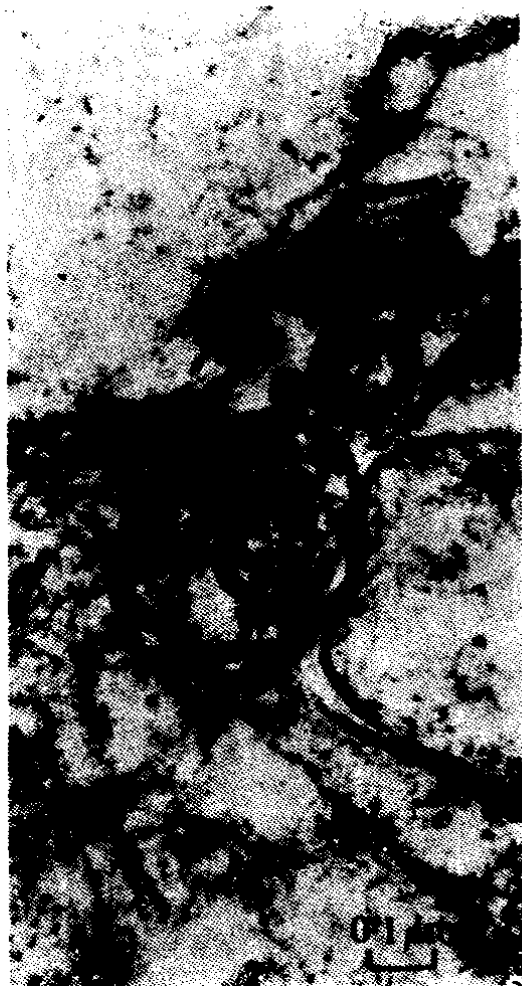


图 1.1 粘着在细胞表面的一个仙台病毒颗粒。显示它的一个明显外壳和包在其内的核蛋白的螺旋结构。



图 1.2 相邻的二个细胞,箭头指埋藏在细胞表面微绒毛之间的病毒颗粒。

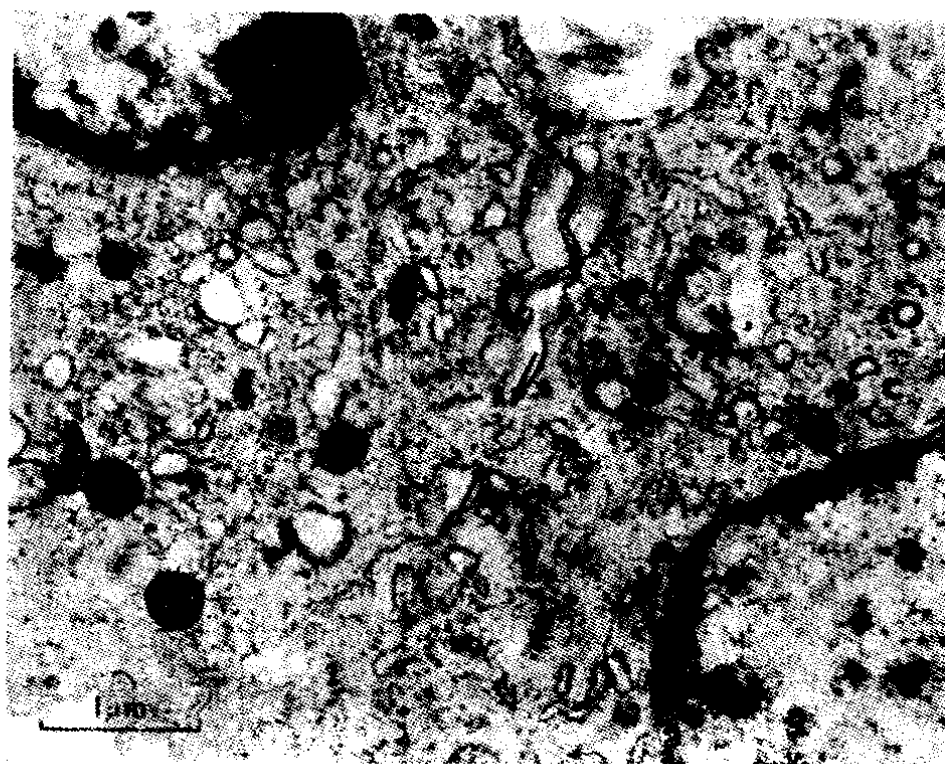


图 1.3 相邻的二个细胞,显示细胞之间产生的小细胞质桥。



图 1.4 二个细胞融合过程中的细胞界面。

乎不大可能与氧化磷酸化作用本身直接偶联。Okada 等^[47,48]认为病毒使细胞膜产生一些断裂，当两个细胞表面上的这些断裂接合时它们就融合在一起。迄今电子显微镜检术并未能解决这种融合的确切的结构基础。Hosaka 和 Koshi^[49]认为病毒颗粒本身在两个相邻的细胞之间形成了最初的桥。根据对粘液病毒外壳形成的方式和对这些病毒进入细胞的机制的了解，这种说法似乎有点道理。看来粘液病毒是在穿出细胞膜时获得它的外壳的^[50,51]，而当病毒再次进入细胞时，病毒外壳又重新同细胞膜融合，从而使病毒的 RNA 进入了细胞^[52,53]。于是，有理由推测，只要二个细胞的表面紧密接触，则病毒颗粒的外壳就能同时与这两个细胞的表面合并从而形成一种细胞间桥。用电子显微镜观察到的细胞融合的最初标志是，在相接触的相邻细胞表面之间确实产生了一些微小的细胞质桥（图 1.3）。但是并没有证据证明病毒颗粒本身就是所有的细胞质桥的基本组成^[39]。随着时间的推移，细胞质桥的数量和每个桥的体积也在增加。最后，相邻细胞的细胞质就结合在一起（图 1.4）。有时在这种融合的细胞质中可以见到一些小空泡，它们就是在这种细胞结合过程中被包在里面的一些细胞膜碎片。不同类型细胞的融合速度不同；利用很敏感的细胞在 37℃ 下，融合过程不用 5 分钟就可以完成。

仙台病毒作用的范围

虽说 Okada 及其同事们^[27,28]已经明确证明仙台病毒有融合同类癌细胞的能力，但在 Watkins 和我^[1]的研究发表前还不知道这种病毒能否融合不同种的细胞。也不知道这种病毒究竟对正常的双倍体细胞或已分化的细胞有没有作用。事实上，Okada 和 Tadokoro^[54]最初的一些工作是想证明病毒对

分化细胞不起作用；并认为肿瘤细胞在病毒作用下之所以有融合能力，是在某种程度上与它们的类坏死特性有关。Watkins 和我证实了这种病毒能将大量不同种的动物细胞融合；不久经过很快的筛选又证明有一些正常分化的双倍体细胞也能借助病毒融合^[55]。虽说这种病毒能够作用的细胞种类尚未完全探索清楚，但不同种间的细胞融合已在人类细胞、各种实验室动物的细胞，以及鸟类和蛙类细胞之间获得成功。由此可见，脊椎动物亚门的大多数动物都能进行种间细胞融合。鱼的细胞还没有试验过，但培养的昆虫细胞则对病毒不敏感^[56]。尽管不同类型的细胞融合的难易程度有很大区别，但即使是高度分化的细胞，在适当条件下也能融合。成纤维细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和有核的红血球细胞既能彼此融合，也能同其他细胞融合^[55, 57, 58]。细胞融合之成功在一定程度上同它表面的结构有关。凡是表面很不规则的细胞，特别是表面覆有致密微绒毛的细胞最容易融合，表面比较光滑而规则的细胞则较难融合。这可能就是肿瘤细胞和体外培养的细胞株比正常分化的细胞容易融合的原因：许多肿瘤细胞和在体外培养较久的细胞株的特征是细胞表面有大量微绒毛。细胞之间融合的好坏可能反映了相邻细胞表面之间接触的程度。凡是细胞表面的可塑性大，特别是有微绒毛犬牙交叉的地方，两个相邻细胞接触的有效面积肯定要比基本上是圆形而表面又光滑的两个细胞相接触的面积大得多。当然，对于细胞表面性质中更多人为的差别也是不能忽略的。

多 核 细 胞

Watkins 和我所介绍的那些实验包括了对 Okada 工作的继续（后者被证明对于细胞杂交的进一步发展是重要

的): 我们证明由病毒作用而产生的多核杂交细胞能够存活。在最初的实验中, 我们选择了 HeLa 细胞(这是一株在组织培养中保持了多年的人类细胞)和艾氏腹水癌细胞(这是生长在小白鼠腹腔液内的一种肿瘤细胞)作为亲本细胞。 我们之所以选择这些细胞有许多微小的技术原因, 但最主要的原因是因为它们有从形态上很容易区别的细胞核。我们认为这个特征一看就可以使我们知道被诱导融合的细胞中是否包含了这两种亲本细胞, 同时, 如果这些多核的杂交细胞确能存活的话, 我们也能判别其中每个亲本细胞核的活性。

当已用病毒处理过的混合细胞悬液置于 37℃ 的培养槽内时, 融合细胞即分散附着在培养槽的底部。已固定和染色

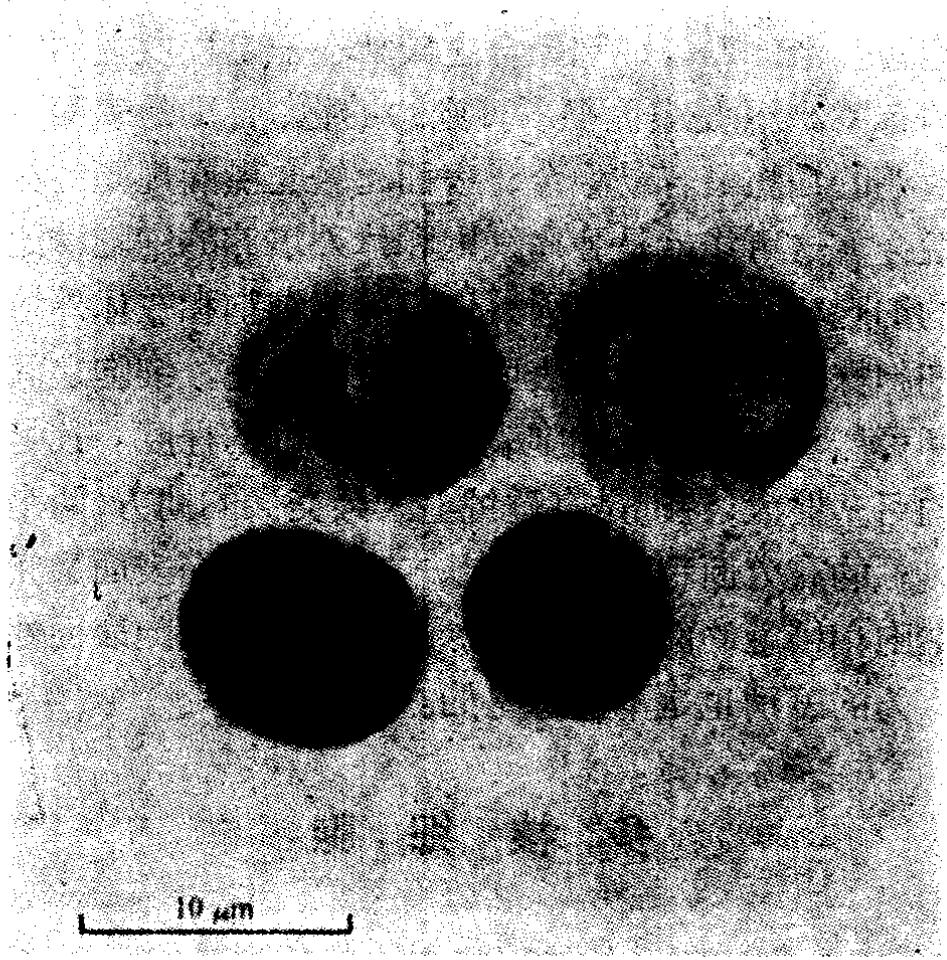


图 1.5 一个含有四个细胞核的细胞, 其中上面的二个是 HeLa 细胞的核, 下面的二个是艾氏腹水癌细胞的核。

的标本证明,在含有不同数量的细胞核的细胞中,有时在一个细胞内既可以看到 HeLa 细胞核,又有艾氏腹水癌细胞核(图 1.5)。因此可以肯定,来自两个不同种的细胞已经融合了。但是为了消除任何可能的疑点,又在 HeLa 细胞和艾氏腹水癌细胞之间做了融合实验,试验所用的 HeLa 细胞核预先用氘化胸腺嘧啶核苷标记,而艾氏腹水癌细胞则不作标记。用这种方法产生的多核细胞的放射自显影证明,在许多细胞中都有被标记的和未被标记的两种核(图 1.6),这就比原来由人和鼠的亲本细胞所形成的异型核细胞(heterokaryons)更明确了。在最后所得的融合细胞中,根据每个细胞中平均所

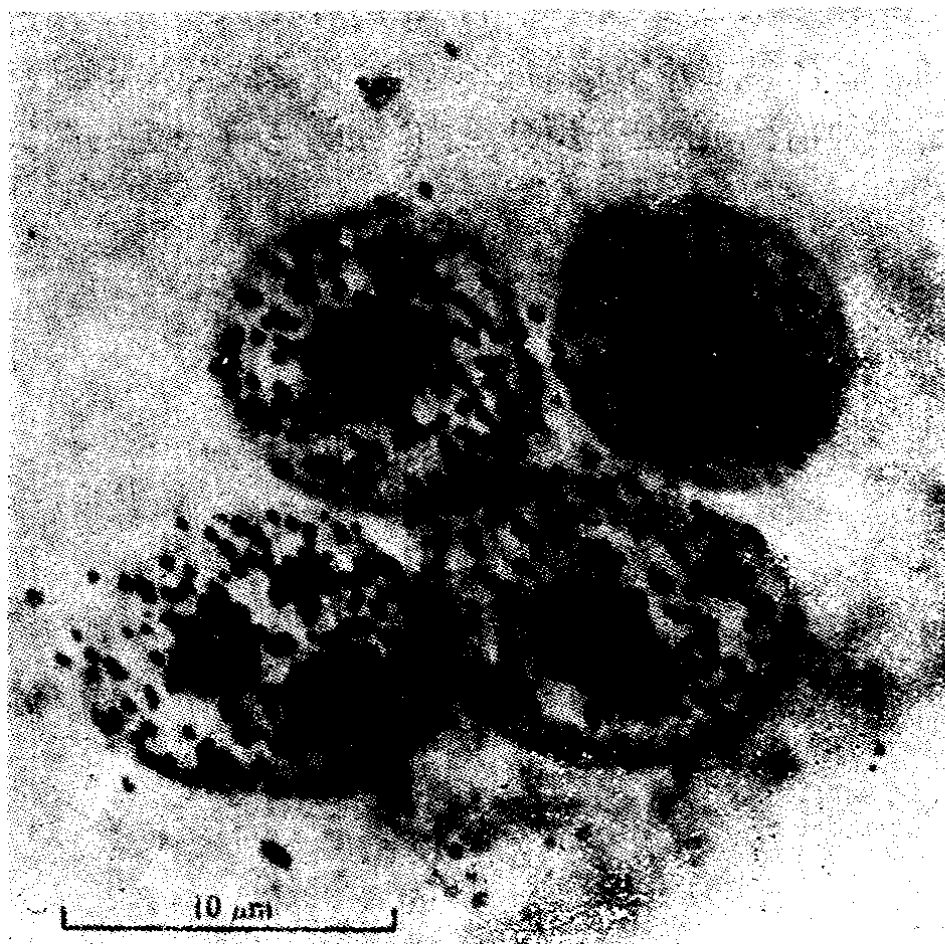


图 1.6 含有三个 HeLa 细胞核和一个艾氏腹水癌细胞核的四核细胞的自显影图。在形成异型核细胞之前,HeLa 细胞已在氘化的胸腺嘧啶中生长了一段时间。图中的 HeLa 细胞核已被标记,而艾氏腹水癌细胞则未被标记上。

含的细胞核数所应用的病毒浓度的滴度证明，细胞多核化的程度在一定范围内是受加在细胞悬液内的病毒的剂量所控制。多核细胞中所含每一种细胞核的比例也可借改变悬液中两种亲本细胞的比例而加以控制。由此可见，应用灭活病毒可以提供一种精密的方法，以便根据我们的愿望产生已知性质的种间异型核细胞。

常用的放射技术很快证明，这些异型核细胞能合成蛋白质和 RNA，而放射自显影也证明异型核细胞中所有的核都参与这种 RNA 的合成(图 1.7)。因此在这些异型核细胞中，小白鼠和人两者的基因都得到了转录。异型核细胞还合成 DNA，放射自显影方法也再一次证明，在两种核中都能发生 DNA 的复制。但在测定异型核细胞中每个核合成 DNA 的时机时，出现了一种情况，在进一步分析中，证明它有一定的意义。

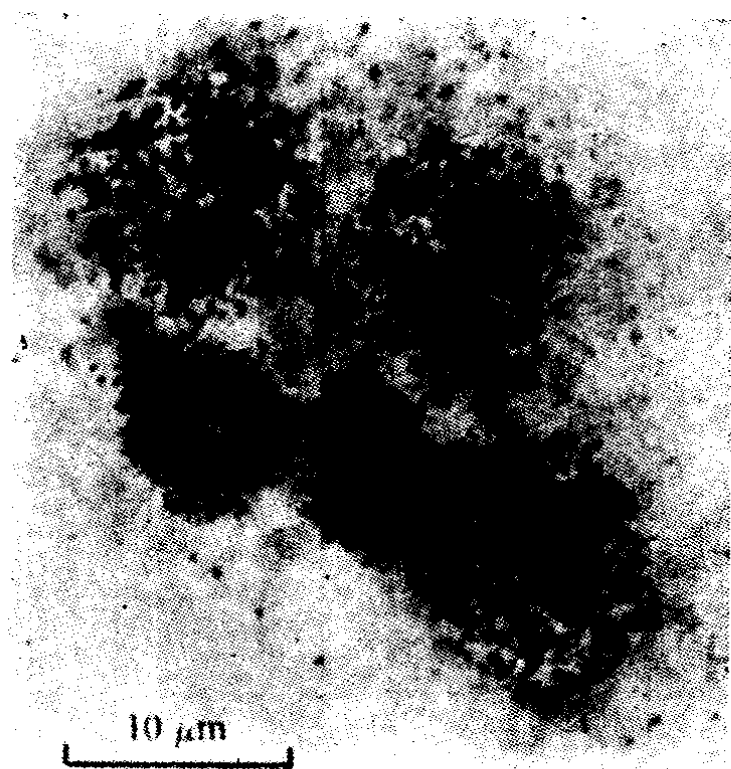


图 1.7 用一种放射性 RNA 前身物处理过 2 小时的，含有三个 HeLa 细胞核和二个艾氏腹水癌细胞核的一个异型核细胞的自显影图。其中的全部细胞核都在合成 RNA。

当正在自然生长的细胞融合时，多核细胞可由处于细胞周期中各个阶段的亲本细胞所产生。分析在融合前已经用氘化胸腺嘧啶核苷标记的一种细胞体系所产生的多核细胞中所含被标记的细胞核的各种比例证明了这一点^[59]。融合并不见得需要选择或排除细胞周期中的任何一个特殊阶段（如处于有丝分裂期则可能例外）。因此，在融合后不久，多核细胞内所含的细胞核可能有的尚未开始合成 DNA（G₁ 期的细胞），有的处于合成 DNA 的不同阶段（S 期的细胞），有的则已完成了它们 DNA 的复制（G₂ 期的细胞）。细胞融合后立即用氘化胸腺嘧啶核苷处理多核细胞，显示了一种基本上不规则的核标记图形。由两个或多个 HeLa 细胞融合而成的多核细胞中，常常很快就出现了 DNA 合成的同步作用^[59]。融合后 5 个小时内可以看到有一定程度的同步作用，而在 24 小时内，在所有这类多核细胞中约有 85% 的核在合成 DNA 方面都是同步的。支配这种同步性的主要因素可能是细胞融合时处于 S 期的细胞代谢显性。当这种细胞与 G₁ 期的细胞融合时，DNA 的合成就被强加于细胞中处于不活动的那些核。多核细胞中只要有一个核开始合成 DNA，其余的核在大多数情况下也很快跟着合成 DNA。对大约在 15% 的多核细胞中所观察到的 DNA 合成的持久不同步，尚未得到满意的解释。看来并不单单是由于在多核细胞内并入了 G₂ 期核的缘故。

当在一种已经用人工方法作了同步选择的细胞系统中诱导产生细胞融合时，在融合 24 小时后所得的多核细胞中所见到的那种协调程度，并不比同一时间在一种随意生长的细胞系统所产生的多核细胞中所见到的协调程度高^[59,60]。这说明用病毒诱导细胞融合不会损伤所产生的多核细胞协调核活动的的能力。不过所强加于它们的那种同步的程度和速度都受到多核细胞中细胞核数量的影响。大多数双核细胞中，这种