

细胞分化及肿瘤恶性调控研究的进展

薛社普 中国医学科学院基础医学研究所细胞生物室主任 教授

一、前言

细胞分化的主要标志是合成功能性的特异性蛋白质, 出现组织或细胞类型性的功能特征, 停止或失去细胞分裂活动功能, 同时进行该细胞表型的形态结构的分化。早期细胞分化的研究着重在胚胎诱导。胚胎细胞在发育过程中, 从早期的高度可塑性和未分化状态向定型的细胞或组织类型分化, 都以出现特异性蛋白质的合成开始, 随之以有可测的功能和形态表型的表现。鸡胚胚盘外胚层细胞在脊索中胚层的诱导下, 经过神经板、管、脑脊区野等初级分化阶段, 逐渐向特异类型神经原的方向分化, 出现嗜银性蛋白质和伸出轴突和树突而分化为典型的神经细胞。包含脊索中胚层的胚盘原结, 本身可自我分化为脊索和肌节等中胚层衍生组织, 另一方面可起“组织者”的作用, 诱导与其接触的外胚层定向分化为相应区的神经组织, 诱导其下方的内胚层分化为原始消化道组织。在移植至异位的情况下, 可在移植区组织形成一个第二胚胎(薛社普等, 1963)。先天含有亲代全套遗传基因的胚胎细胞, 在胚胎正常发育情况下, 受遗传和胚胎整体性的调控, 按一定的时间和空间关系, 有顺序地表达所选择或决定的基因, 进行不同类型细胞的分化。在实验情况下(改变胚层关系或细胞之间的微环境条件), 胚胎细胞可受基因外因素(epigenetic factor)的影响, 而改变其原有的分化方向。胚层反应系统可按专一性诱导物质(如中胚层诱导物M和神经诱导物N……等)的性质及其相互作用, 而定向地分化为预定类型的细胞或组织(王亚辉等, 1963)。成体细胞可在化学致癌物、病毒或辐射等因素作用下, 出现细胞转

化、癌变、和恶性生长, 事实上是导致细胞的异常分化。因此可以认为肿瘤是一种细胞分化异常的疾病。

细胞分化的分子遗传学基础是基因的选择性激活、转录和转译, 在这一基因表达过程中, 任何环节或其正常基因功能错误编码, 甚至只是一个核苷酸的改变即可引起突变, 这就是基因突变致癌、异常分化和许多遗传性疾病发生的物质基础。在某种情况下, 也可因成体细胞特异基因表达被抑制而代之以胚胎性基因的重现, 导致发生癌变。肝癌中胎甲球蛋白就是这种胚胎性基因产物, 目前被用来作为早期诊断肝癌的敏感指标(孙宗棠, 1980)。

目前许多探索真核细胞基因表达调控的细胞工程正在国际范围内展开。分子胚胎学家和实验肿瘤学家在核移植工作基础上, 分别着手于真核细胞基因(包括癌基因)或其一级产物mRNA的分离提取和鉴定, 并把这些基因片段或特异性mRNA来诱致细胞的分化、转化和恶性变。不少工作在试用从正常脏器提取的基因片段或mRNA进行使癌细胞向正常方向逆转的尝试。我国科学工作者已利用核移植技术在鱼类进行了不同科目间的交互移植, 获得杂交品种(童第周等, 1961)。从鲫鱼或鲤鱼卵母细胞中提取的mRNA或DNA注入金鱼受精卵内诱致金鱼产生遗传变异(童第周等, 1981)。此外, 用化学致癌物对体外培养的正常细胞引致恶性转化的实验; 用化学诱导因素对体外培养的肿瘤细胞进行诱导分化和筛选调节基因表达药物的研究; 分离“癌基因”对正常细胞进行转化活性的分析, 和运用细胞融合及胞质体杂交等技术对细胞分化的基因表

达、异常分化机理以及胞质因子调控恶性表达等课题,亦正在我国陆续开展。

二、癌变的性质及胞质因子对肿瘤细胞恶性调控的研究

癌变是一种异常分化现象,已证实是正常细胞的遗传程式或基因结构与表达出现差错的结果。不少人类肿瘤的恶性可反映在染色体数量和结构畸变上,即染色体特异部位具有的正常分化所需的基因的丢失会导致出现恶性。另一方面,有些肿瘤并未呈现染色体畸变而出现胚性抗原、异位激素及同工酶改变等细胞去分化特征,被认为可能是基因表达功能失常的结果。因为将这种肿瘤移植至胚胎系统的胚泡腔后,又可调整回复正常。病毒致癌往往是病毒基因整合到人染色体上形成“肿瘤基因”的结果。整合至人类第7号或17号染色体上的SV40病毒,在引起细胞呈现恶性的同时,并出现SV40病毒的特异肿瘤抗原,是肿瘤基因的产物。对动物中四大类肿瘤(淋巴瘤、肉瘤、色素瘤及乳腺癌)的恶性进行的分析,亦发现恶性与特定染色体的遗传缺陷或抑制性染色体(4号或15号)的丢失有关。可以通过与非恶性细胞融合以补偿缺陷,从而降低其恶性或使之去恶化。然而由于杂交细胞的性状表现是二种核和二种胞质交互作用的结果,其因果关系难以分析。采用人工去核的正常细胞胞质体与肿瘤细胞进行胞质杂交(Cybrid),或将游离的肿瘤细胞核与正常去核的胞质体杂交,可避免上述的复杂性而突出单核与胞质因子之间的相互作用,有利于问题的分析。但人工去核会造成损伤,而且所得结果还可因胞质体类型的不同而难以作出明确判断。

胞质因子调节细胞基因功能活动的可能性在胚胎系统中已得到证实。除上面提到的恶性畸胎瘤移植至胚泡腔后分化为正常组织外,移植已经停止分裂活动的蛙成体脑细胞核至去核的受精卵后,这些核能重新合成DNA和获得分裂的能力。移植已分化的爪

蟾肠上皮细胞核至去核的卵质中后,可被激活进行全能性的基因活动,分化发育出一定比例的正常蝌蚪或成体。将恶性的豹蛙肾腺癌细胞核作同样移植后,亦得到类似的结果。表明卵质中含有一种去分化和促进基因活动的因素,可以改变已分化或恶变细胞核的基因表达状态。注射珠蛋白mRNA至卵母细胞胞质后,可以正常转译合成血红蛋白,故卵质已被证明具备基因表达的物质条件。这种卵质因子的性质及作用机理虽然目前还未完全清楚,但已启发了利用体细胞胞质因子调节恶性肿瘤细胞使之向正常细胞方向逆转(去恶化)的研究,现已成为日益受到重视的国际性课题。

近年来基础医学研究所细胞生物室选择自然去核而富含珠蛋白mRNA和血红素的正常小鼠网织红细胞与骨髓瘤系中的淋巴瘤(BW-胸腺淋巴瘤细胞,NS-1浆细胞瘤及P₃淋巴瘤细胞)进行杂交(以PEG为促融剂),创建了一个研究调控肿瘤基因表达和癌细胞去恶性的实验模型。藉以分析肿瘤细胞在添加富含基因产物的外源胞质后的恶性表达状态。选用网织红细胞作为“胞质体”,除了因为它自然去核和含有丰富的基因产物(珠蛋白mRNA)可作为遗传标志外,还因为它本身是HGPRT(次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转化酶)阳性,与阴性的骨髓瘤细胞融合后,便于用HAT选择液纯化杂交细胞。这一模型已初步显示其优越性,证明网织红细胞“胞质因子”具有类似于上述卵质因子的作用,可以改变骨髓瘤细胞的恶性状态,并在杂交细胞长期传代中,持续表现血红蛋白的遗传特征(薛社普等,1982)。其中BW-胸腺淋巴瘤细胞与网织红细胞杂交的胞质杂交细胞(BW-R)经HAT液选择培养后,已在体外维持一年半,传45代以上,呈现与亲代瘤细胞不同的下列一些独特的生物学特性:

1. 保持亲本淋巴瘤细胞外部基本形态特



图1 BW-胸腺淋巴瘤细胞扫描电镜图。示细胞呈不规则形，表面布以发达的叶状突起和较丰富的微绒毛，偶见泡状突起。 $\times 16,000$

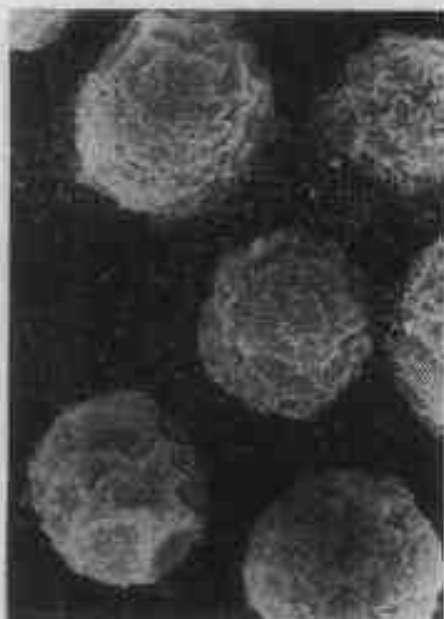


图2 BW-胸腺淋巴瘤细胞扫描电镜图。示细胞呈圆球形，叶状突起和微绒毛减少，几无微绒毛。 $\times 12,000$

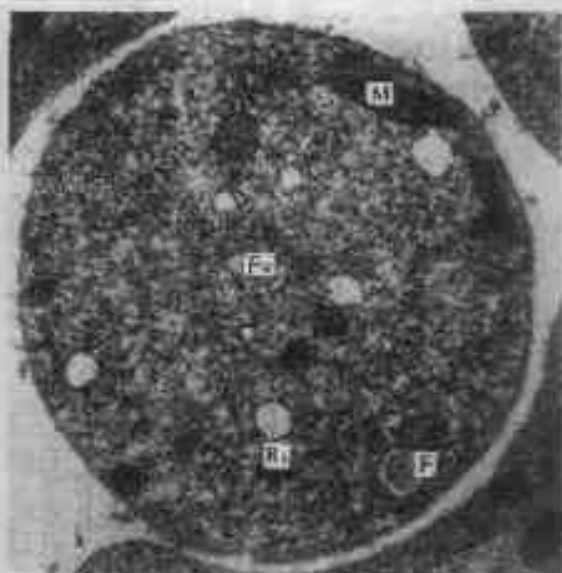


图3 小鼠胸腺淋巴瘤细胞电镜图，无核，可见残体的线粒体(M)、多核糖体(R)和含铁蛋白小泡(FV)或团块(F)等。 $\times 30,000$

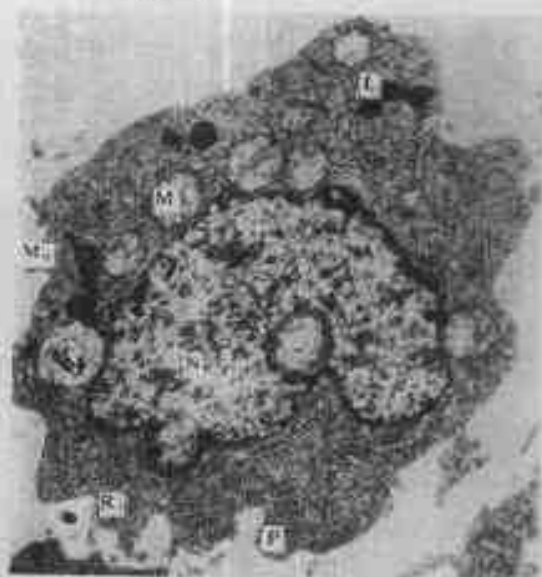


图4 小鼠BW-胸腺淋巴瘤细胞电镜图。示细胞呈多形性，表面或边缘不规则，指状突起明显，微绒毛长短不一，核不规则。L.溶酶体，M.线粒体，Mv.微绒毛，N.细胞核，P.伪足突，R.核糖体。 $\times 30,000$

征和悬浮生长方式,但出现细胞表面突起和微绒毛数量减少等超微结构改变(图1,2);细胞质中出现较多的核糖体和含铁蛋白的团粒和小泡;核内不活跃的异染色质比例增大(图3~5刘裕等1982);

2.细胞分裂指数和增殖率明显下降,平

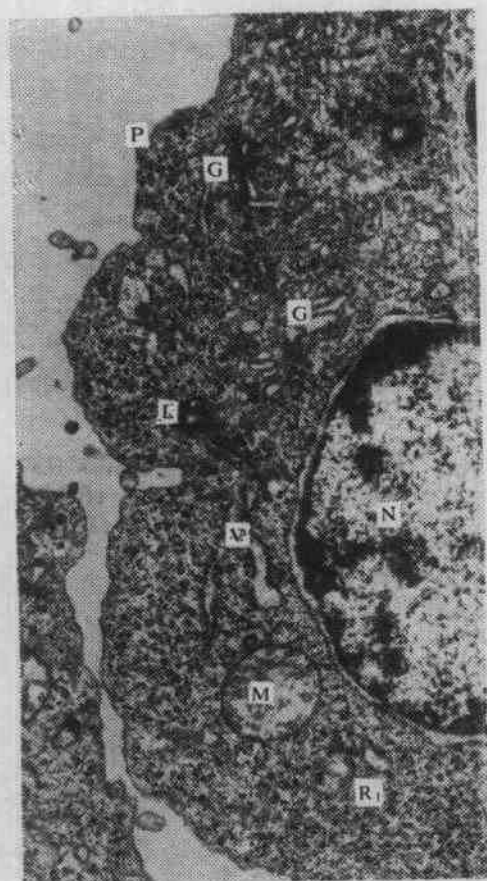


图5 BW-R胞质杂交细胞电镜图。示细胞表面较规则,微绒毛明显减少,细胞体积增大,核糖体增多。G.高尔基复合体;L.溶酶体;M.线粒体;N.细胞核;P.伪足突;Ri.核糖体;V.内质网囊泡。 $\times 20,000$

均分裂指数由原来瘤细胞的138%下降至13%,生长曲线显示细胞增殖率减缓(图6,李宝莲等1982);

3.杂交细胞对 ^3H -胸腺嘧啶核苷的并合率成倍下降,亲本瘤细胞与胞质杂交细胞的平均并合率之比为7623:3013cpm/ 10^5 细胞(梁德才等1982);

4.染色体数量明显减少,众数值由原来亲本瘤细胞的40~49降减至30~39,部分细胞甚至减至20以下(图7,8),表明DNA合成活动发生了一定程度的改变(李宝莲等

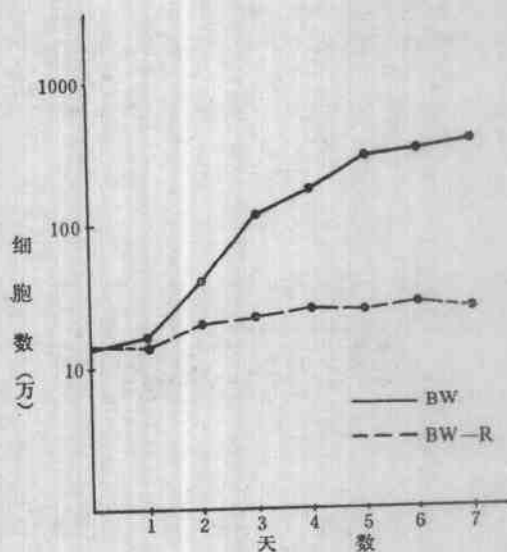


图6 BW胸腺淋巴瘤细胞株与其杂交细胞(BW-R5代)生长曲线的比较

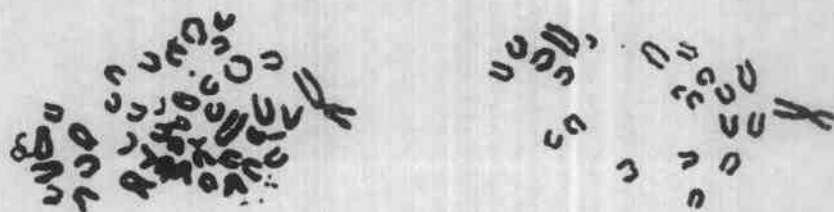


图7、8 BW-胸腺淋巴瘤细胞(图7)与BW-R杂交细胞(图8)染色体比较。Giemsa染色

1982)；

5. 抗原性改变：细胞毒 (Thy 1 抗体) 试验及荧光抗体染色反应，表明亲本BW-瘤细胞反应微弱或呈阴性反应，与乳鼠胸腺细胞的强阳性反应形成明显对照，BW-R杂交细胞呈现中等阳性反应，三者细胞毒反应指数之比依次为 5.12:92.31: 37.60% (梁德才等1982)；

6. 杂交细胞的刀豆球蛋白A (ConA) 凝集反应为阴性 (李宝莲等1982)；

7. 在软琼脂培养中不形成集落 (图9、10, 李宝莲等1982)；

8. 异种接种至裸鼠后，未见长成瘤块或引起腹水而亲代瘤细胞则 100% 长瘤 (梁德才等1982)；

9. 出现基因产物血红蛋白的联苯胺阳性反应，并在传代过程中持续出现。生化测定第三代细胞的血红蛋白含量为 $2.16\mu\text{g}/10^6$ 细胞，第42代为 $1.56\mu\text{g}/10^6$ 细胞 (李宝莲等1982)；

10. 胞质杂交细胞cAMP含量增高，而与之相关的cAMP-磷酸二酯酶的活性则相应减弱，提示细胞恶性程度与cAMP及磷酸

二酯酶的活性有一定相关 (方家椿, 1982)。

上述结果中第 (1)、(2)、(3)、(6)、(7) 及 (8) 项显示了细胞的去恶性特征，与卵质因子改变已分化的细胞核及恶性肿瘤细胞核的基因表达状态的结果一致；第 (9) 项出现血红蛋白，则证明杂交后的胞质与卵质类似，而同样具备了提供珠蛋白 mRNA 转译或诱导相应基因表达的条件。表明网织红细胞质中，可能含有类似于卵质因子中的去分化和促进基因活动的胞质因子。然而，不同于卵质的是，在胞质杂交细胞中，出现了文献尚未见报道的染色体数量丢失的现象。丢失原因可能与胞质不协调或其中含有排核因素有关。网织红细胞是自然排核后已失去分裂能力而频于成熟的红细胞，胞质中已丧失细胞分裂器 (中心体和微管等) 及分裂酶系。与肿瘤细胞杂交后，显然不利于细胞分裂的始动和染色体的复制，这可从胞质杂交细胞的分裂指数、增殖率以及并合 ^3H -胸腺嘧啶核苷复制 DNA 的比率下降而得到验证。在DNA合成过程中，任何环节受到干扰都可导致染色体的复制受阻或丢失。所丢失的染色体类型与恶性之间

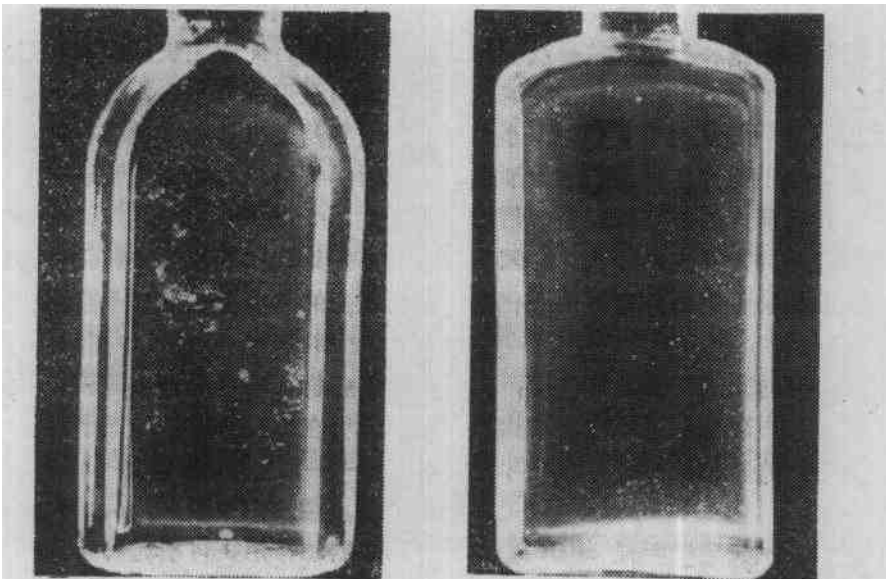


图9、10 BW-胸腺淋巴瘤细胞 (9) 及BW-R杂交细胞 (10) 在软琼脂培养20天后，形成细胞集落比较。Giemsa染色。原大

的关系,还将涉及到肿瘤基因定位问题,有待于进一步的分析。

BW-R胞质杂交细胞在长期传代中,持续表现血红蛋白,显然不能用带进去而只有一定寿命限度的珠蛋白mRNA的合成活动来解释。较大的可能是胞质因子诱导了血红蛋白的新合成。至于这种新合成是由于原来处于封闭状态的宿主细胞珠蛋白基因被激活?抑有其他途径?这将是今后用相应探针进行探索的一个重要课题。已有报道,用DMSO处理Friend's红白血病细胞后,可诱导血红蛋白的合成,而促进了细胞的正常分化。我们结果中的去恶化现象,是否也与珠蛋白mRNA调节血红蛋白的合成有关,是值得注意的问题。

三、体外培养细胞的转化

利用体外培养细胞研究化学致癌物诱发恶性转化的实验开始于1965年,实验证明化学致癌物如甲基胆蒽、苯并芘和甲基硝基亚硝基胍(MNNG)等可诱发金仓鼠(金黄地鼠)的二倍体细胞发生恶性转化。从小鼠胚细胞建立的3T3细胞株(Todaro & Green, 1963)在化学致癌物作用下可规律性地出现典型的转化,是目前进行体外恶性转化研究中最常用的细胞株。然而这一细胞株本身有非整倍体核型,而且在异种接种时偶而可形成肿瘤,故一般认为3T3和C₃H小鼠前列腺细胞株一样不能算作完全正常的细胞株。用作体外转化研究的细胞株应为二倍体核型,细胞成分均匀,能连续传代并有较高的集落形成的长期培养细胞,亦可用原代或次代培养细胞。

用以检查恶性转化的标准正常包括:

- 1.形态改变,出现微绒毛或泡状结构,出现多层重叠生长的转化灶;细胞排列紊乱,无方向性;
- 2.无限繁殖,生长速度明显高于对照组;
- 3.可被刀豆球蛋白凝集;

4.在半固体琼脂培养基上生长形成集落;

5.核型改变,出现非整倍体或假二倍体染色体以及染色体畸变;

6.异种接种可长成肿瘤。

医科院肿瘤所用上述方法,建立了MNNG(N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍)诱发金仓鼠肺细胞恶性转化的实验模型(李申德等1979)。用1~2毫克/毫升的剂量在60天内即可诱发产生上述恶性转化特征的4个转化细胞系。细胞倍增时间明显加快(转化细胞与未转化细胞之比为0.34/2.02天)。表明MNNG是一种不需经过体内代谢激活就有致癌性的直接致癌物。

用化学致癌物对培养的人类二倍体细胞进行诱发恶性转化的工作亦已开展,已有报道用4NQO(4-硝基喹啉-1-氧化物)及MNNG可诱发人类成纤维细胞恶性转化;用β-丙酸内酯,α-毒素(AF-B₁),丙烷磺内酯(propene sulfone)及4NQO等可诱发人类包皮原培养细胞恶性转化。我国1980年亦成功地报道以MNNG诱发原培养人食管成纤维细胞向恶性转化的结果(吴旻等,1980)。转化细胞呈现表面微绒毛增多,失去接触抑制,无限生长,出现非整倍体染色体,可被刀豆球蛋白A凝集,可在半固体琼脂培养基上生长和异种移植后可形成肿瘤等生物学特征。为研究食管癌癌变提供了模型。

体外细胞诱发恶性转化过程中亦可观察到癌变的启动和促进二个阶段。以C₃H 10T 1/2细胞为实验材料,在培养液中先加小量致癌物(3-甲基胆蒽,MC)处理24小时,三天后在每次换液时均加小量促癌物TPA(12-O-四癸酰基-佛波-13-乙酸酯)连续处理。观察中发现,用0.1微克/毫升MC即可起启动作用,可引起姊妹染色单体交换率(SCE)明显增加,但这一剂量不能使细胞转化,只有在加入小量(0.1微克/毫升)促

癌剂TPA连续处理后,才能促使细胞出现恶性转化特征(程书钧,1983)。TPA的作用,可能是引起染色体基因重组和DNA合成,但其机理未完全清楚。

四、恶性细胞的体外诱导分化

与上述相反的研究途径是利用化学诱导物对体外培养的肿瘤细胞进行诱导分化和从中筛选具有调节基因表达的药物,这也是近年来国际上新开展的一个领域。目前被广泛选用作为体外实验模型的肿瘤细胞,主要为造血细胞系中的Friend红白血病细胞,小鼠骨髓白血病细胞和人类的HL-60细胞(人类前髓细胞白血病细胞)等。前二类细胞可为大量极性化合物及嘌呤等的诱导模型,使之在形态和功能上向正常红血球(产生血红蛋白)或成熟白血球(粒细胞及吞噬细胞)的方向分化。已筛选出二甲亚砜(DMSO)、乙基硫氨酸(L-ethionine)、氧化血红素、哇巴因、PEG、丁酸钠、次黄嘌呤、6-巯基鸟嘌呤、6-巯基嘌呤(6-MP)、皮质类固醇、X-射线及治疗肿瘤药物如放线菌素D等多种有效因素。人类HL-60细胞对极性化合物环六亚甲基双乙酰胺(HMBA)、次黄嘌呤、放线菌素D及被膜霉素(tunicamycin)等同样敏感,可经诱导而分化为成熟的粒细胞。但对上述其他因素及化合物,则作用微弱或无作用。这些化合物的诱导去恶化和促进成熟分化的作用,可为筛选抗癌药物提供了前景,但其机理未明。其中丁酸钠已知能可逆地抑制细胞增殖和诱导癌细胞(L₁₂₁₀及HeLa细胞)分化,主要是阻断细胞周期使之停留在G₁期,用多参数流式细胞光度术及早熟染色体凝集术(PCC)等进行检验均已得到证实(薛绍白等,1981、1982)。利用胚胎来源的小鼠畸胎瘤细胞作为实验模型,在维生素A酸(RA)的作用下,可使其中恶性顽固的F₉细胞系分化为内胚层样和神经样细胞。双丁酰环化腺苷酸亦有类似作用。上海细胞所用RA处理体外培

养的EC(胚瘤细胞)和F₉细胞,24~48小时后,可见胞质内碱性磷酸酶(AKPase)活性急增,但此后随细胞出现分化而明显下降(施渭康等,1982)。用HMBA处理F₉细胞,也可诱导分化和降减恶性生长速度,但效果似不如RA。

五、体内实验性致癌

除上述的体外致癌实验外,国内不少实验室还用各种致癌物或病毒对动物进行体内的实验性致癌,分析致癌过程中细胞形态、抗原性、增殖酶和分化酶系,染色质组分以及染色体核型等的改变状态,并对癌变原理进行探索。他们发现在实验性肝癌癌变过程中,与细胞分化有关的鸟氨酸甲酰转移酶(OCT)和氨甲酰磷酸酶I(CPS₁)活性持续降低,同时与增殖有关的天门冬氨酸氨甲酰转移酶(ACT)活性则持续上升(李士谔等,1977);染色质的非组蛋白组分含量及其与组蛋白的比值均随癌变而逐渐增加(何开玲等,1980);核中与重复顺序DNA互补的RNA有丢失,而rRNA转录加工后由核向细胞质转运的量则明显增加(张玉琨等,1980)。作者们讨论了细胞增殖、分化与癌变的关系,认为癌变是一种去分化现象,可能是在致癌因素作用下失去细胞增殖与分化特异功能之间的正常平衡关系,或导致基因表达水平失常的结果。

六、结语

胚胎发育的重要事态之一是胚胎细胞的分化。整个发育过程事实上是一部反映含有双亲全套遗传基因(全能核)的胚胎细胞在胚胎整体调节下按照严格的时、空间顺序不断地选择和表达各自不同基因,分化为不同类型的细胞和组织的历史过程。已分化或恶性变的畸胎瘤细胞在注入高度整体调整性的胚泡腔后,可去恶化并参与胚胎正常组织器官的分化。已分化的体细胞核或肿瘤细胞核在移植至去核的卵母细胞质中后,可去分化并激活全能核基因的表达以进行正常胚胎发

育,这是调控细胞分化和改变肿瘤恶性变的理论基础。

在体外条件下,已证明可用致癌物诱发动物和人类的正常体细胞进行恶性转化,亦可用具有诱导细胞分化的物质,对离体培养的恶性肿瘤细胞株进行去恶化和使之向正常细胞方向分化。这两方面的工作在我国均已建立了良好的基础。

利用自然去核而富含血红蛋白的mRNA的正常小鼠网织红细胞与骨髓瘤细胞进行

胞质体杂交,作为调控肿瘤基因表达和瘤细胞去恶化的实验模型,已经在中国医学科学院创建,所获得的胞质杂交细胞在超微结构、抗原性、基因产物表现、核型、细胞分裂指数和恶性生长活力等方面,均发生了明显改变。表明肿瘤恶性这一异常分化状态在网织红细胞的胞质因子作用下可以改变,这为胞质因子调控细胞分化的可能性提供了证据。

细胞癌变研究的进展

顾健人 上海市肿瘤研究所生化与分子生物学研究室主任 副研究员

研究正常细胞如何发生癌变,是认识癌本质的重要研究课题。人们了解了癌变的原理后,就有可能合理地设计诊断和治疗的方法。近几年来,我国在细胞癌变的研究方面取得了一些进展,本文仅就有关癌变的几个方面作一介绍。

一、DNA和基因水平的工作

已知高等生物细胞DNA,可按顺序的重复程度分为高等重复、中等重复和单一顺序三类。重复顺序DNA的功能仍是当前重要课题之一。张玉砚等比较了大鼠正常肝和肝癌中各种DNA顺序和其互补核RNA,发现肝癌中能与正常肝细胞单一顺序DNA互补的核RNA显著增加,而与中度重复顺序互补的核RNA减少,在二乙亚硝胺引起癌的过程中,同样可看到与正常肝单一顺序互补的核RNA有所增加,与中度重复顺序互补的核RNA有所下降,由于正常和肝癌的各种DNA顺序的相对组成并无明显差别,因而认为核RNA的改变反映了单一顺序或中度重复顺序DNA的表达在癌变中发生了改变,大鼠胎肝细胞内的核RNA,与正常肝单一顺序DNA互补的复杂性则高于肝癌核RNA,更高于正常肝;而与正常肝中度

重复顺序的互补复杂性却界于正常与肝癌核RNA之间。上述变化反映了单一顺序和中度重复顺序DNA的转录在癌变中可能有改变,但基因的表达除转录外,还有转录后的加工和其它方面的调节,这提示了进一步开展DNA水平工作的重要性。

关于癌基因的研究,国内有几个单位开始进行这项工作。顾健人和郭婵等,于1982年起,用人肝癌、白血病的DNA对小鼠N-IH/3T3细胞系统进行了转染实验。经过两轮转化,已获得了第二代转化细胞株,证明了人的肝癌、白血病的DNA确存在转化正常细胞的活性,转化后的细胞除形态学改变外,可在新生小鼠中生长成肿瘤;通过第二代转化后,转化的效率增加10倍(从0.016灶/ μ gDNA增加至0.16灶/ μ gDNA)。应用人重复顺序DNA分子杂交,可显示出小鼠的转化细胞DNA中有人的DNA顺序的整合,但这些人的DNA的性质尚有待进一步鉴定。

二、染色质水平的研究

染色质的研究是观察细胞基因的转录及调控的重要方面,国内已有几个实验室开始了工作。李士谔等用大鼠肝癌、正常肝的染