

以 NS-83 涂沫芥菜叶片,分别于 6,12,24 和 48 h 后摘取叶片并移到琼脂培养基上,将无翅蚜置于叶表,用双目解剖镜观察蚜虫的探食行为。总计观察 120 头蚜虫,记录第一次探食持续时间、口针由第一次拔出到第二次刺入的间隔时间和第二次探食持续时间。结果表明,在 NS-83 处理过的叶片上,蚜虫的探食持续时间和取食习性发生了变化,即两次探食间隔时间显著延长,而两次取食持续时间均缩短,NS-83 的作用随处理后时间的延长而降低^[1]。

根据迄今为止试验获得的结果可以推论,NS-83 对蚜虫传毒可能作用于以下几个方面:①直接钝化蚜虫口针上的病毒;②干扰蚜虫由毒源植物获得病毒或③处理后植物细胞生理活性的改变而影响蚜虫的传播效率。当然尚需更全面的研究以进一步阐明 NS-83 的这种作用机制。

自 1980 年以来,温室和田间的大量试验结果都说明 NS-83 是一个相当理想的防治植物病毒病的制剂,这不仅因为它能增强植物对多种病毒的抗耐病性,而且还能促进植物生长,提高植物的品质和产量。此外,必须指出,NS-83 是一个无毒、无污染、经济、实用的生物调节剂。

参考文献

- [1] 裴维蕃. 中国农学通报, 1991, 7(2): 13~16
- [2] 雷新云, 李怀方, 裴维蕃. 中国农业科学, 1987, 20(4): 1~6
- [3] 雷新云, 李怀方, 裴维蕃. 生物防治通报, 1985, 1(4): 22~24
- [4] 雷新云, 李怀方, 裴维蕃. 北京农业大学学报, 1990, 16(3): 241~248
- [5] Li Huai-fang, White, R. F., Antoniw, J. F., J. Phytopathology, 1990, 128: 299~305
- [6] Li Huai-fang, Chiu Wei fan, Scientia Sinica (Series B), 1986, 29(6): 626~633
- [7] 阎文昭, 裴维蕃. 植物病理学报, 1985, 15(4): 193~198
- [8] 李怀方, 雷新云, 裴维蕃. 植物病理学报, 1987, 17(3): 147, 152
- [9] 杨普云, 雷新云, 李怀方等. 植物病理学报, 1991, 21(3): 210~233

(原载《自然科学进展》1994 年第 2 期)

哺乳类红细胞分化去核因子对细胞分化 及骨髓瘤细胞恶性调控的研究

薛社普

肿瘤发生是一个多因素、多阶段(诱癌和促癌)和多种基因(原癌基因、癌基因、抗癌基因及分化基因等)作用的过程。正常细胞可在致癌物、病毒和辐射等因素作用下,引起内在遗传物质结构或基因表达程式/功能上的改变,而发生细胞转化和癌变。因此肿瘤实质上是一种细胞增殖失控和分化异常(终末分化受抑)的疾病。大量涉及癌变的肿瘤细胞生物学资料表明,肿瘤细胞或表现为特定染色体的丢失^[1],特异部位的易位、重排、缺失和位点断裂等遗传物质的明显缺陷^[2~4],或表现为基因功能失常^[5,6],异常地表达非本身组织特异的癌胚抗原、胚胎性同工酶和异位激素等产物。无论是遗传物质缺失或基因表达异常,均可通过细胞工程技术、基因补偿或用多种诱导剂进行基因表达调控和促进终末分化等方法,以降减恶性增生、逆转恶性表现和使之进行正常分化(表达正常分化产物)。大部分造血系肿瘤细胞,如小鼠 Friend 红白血病细胞(MEL)、人红白血病 K562 细胞、人早幼粒白血病 HL-60 细胞及单核白血病 U937 细胞等,已证明可通过诱导剂促进其终末分化产物表达^[6~7]。小鼠畸胎瘤细胞在移植至胚胎系统的胚泡腔后,可被诱导恢复正常分化而衍生为正常组织,表明已失活的分化基因可通过诱导调节而恢复其活性,逆转其恶性表现^[8]。这方面已形成从基因水平进行肿瘤恶性逆转调控的一个方兴未艾的研究领域。目前许多探索真核细胞分化、去分化、再分化的基因表达调控的细胞工程工作,运用细胞融合、胞质体杂交、DNA 重组及基因转移等技术,进行肿瘤细胞恶性调控的研究正在国际范围内展开。资料表明,利用诱导分化物质或细胞工程技术,可纠正遗传物质缺陷及基因表达异常状态,使失控的癌细胞增殖和基因异常活动向正常方向转化,这就为肿瘤防治提供了新的前景。近年来,我们实验室选择终末分化期出现自然去核独特特征的哺乳类红细胞,作为研究细胞分化及恶性调控的对象,用自建细胞杂交系统对造血系肿瘤细胞进行恶性调控的研究(国家“七五”及“八五”重点科技攻关项目),本文介绍承担该课题的研究思路及进展情况。

1 哺乳类红细胞发育过程中自然排核的物质基础及排核机理的工作假说

红细胞在种系发生中有一个特点,即进化至哺乳类之后,在其发生的晚幼成红细胞期丧失细胞核分裂活动,继而核固缩和出现自然排核,形成网织红细胞。当癌变时(如小鼠红白血病 MEL 及人类红白血病 K562 等),这一终末分化过程特征(包括珠蛋白基因表达血红蛋白)受抑,细胞核增殖活动失控而演变为癌细胞,其机理未明,但这些特点涉及细胞分化和癌变机理二大领域,正是研究它们的规律及其机理的理想模型,具有重要理论和实践意义。有趣的是红细胞终末分化期排核过程只发生于哺乳类,在其以下的脊椎动物红细胞并无此现象。什么是自动排核的物质基础?进化上是否有某种遗传物质发生了改变,或在种系发生过程中出现排核的调控因子导致从非排核物种演变至哺乳类的红细胞排核?文献上已有报道在红系造血过程中出现与造血有关的因子如 EPO, SCF, CSF-E, BPF, IL-3, 6, 9 以及激活素 A/EDF 等,大多主要作用于造血干细胞、

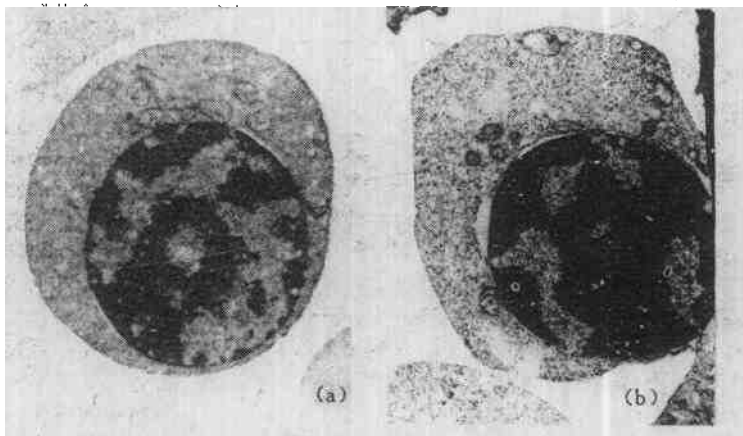


图1 晚幼成红细胞的超微形态。示核异染色质浓缩,核偏位(图1a)和开始排出(图1b)。注意线粒体等细胞器团集于核的向心侧周围×10 000

原红及早幼成红细胞阶段(已知早幼成红细胞是依赖 Epo 的最后阶段),而自该阶段以后的终末分化、排核和成熟由何种因子调控,尚无确切报道。为了阐明排核前后的细胞形态分化变化及其物质基础,我们进行了下列的实验观察:

(1)扫描及透射电镜观察^[9]。以盐酸苯胍诱发小鼠(BALB/C)贫血,取股骨髓按常规制备电镜标本,分别进行扫描电镜(日立 S-450)及透射电镜(JEM-2600EX)下的观察。结果见图1,晚幼成红细胞出现核偏位或细胞核偏向一方,线粒体等细胞器聚集于偏位核后方。核排出时并不完全裸露,排核后的胞质体(网织红细胞)迅速由不规则状变为圆盘状。

(2)红系祖细胞体外培养排核的观察^[10]取 BALB/C 小鼠股骨髓制备祖细胞悬液,分别以 IMDM-甲基纤维素进行 CFU-E 及 BFU-E 体系的培养。倒置相差显微镜下活细胞追踪观察或染色后观察。结果见图2,在培养 36~48 h 左右可见明显的联苯胺阳性细胞集落;培养 48~60 h 可见集落细胞中出现不少排核图象和散在的细胞核残物,提示排核是红细胞终末分化的一种自主活动。

(3)排核前后红细胞内核酸、酶、细胞骨架和血红蛋白

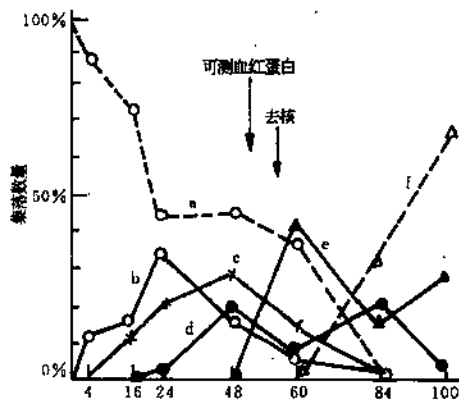


图2 CFU-E 体外培养骨髓单细胞悬液过程中集落细胞生长曲线图。示血红蛋白及排核的出现开始期
······ 单细胞, ·——· 2 细胞, ×——×, 4 细胞, ·——· 8 细胞集落, ▲——▲, 16 细胞集落, △——△, 32 细胞集落

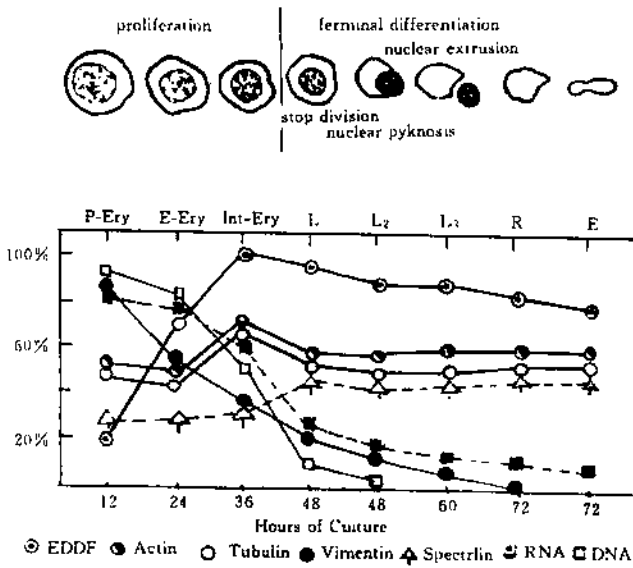


图3 红细胞发生过程中核酸(DNA、RNA)以及一些特异蛋白质(骨架蛋白、波形纤维蛋白、红细胞分化去核蛋白(EDDF)在定量上的改变与细胞增殖、分化及自然排核的关系示意图
E. 成熟红细胞; E-ery. 早幼成红细胞; Int-ery. 中幼成红细胞; L₁、L₂、L₃, 晚幼成红细胞分期, 分别示停止分裂、核固缩和排核阶段; P-Ery 红细干细胞, R. 网织红细胞

锚定细胞核位置的波形纤维蛋白(图4)在晚幼成红细胞早期突然下降和降解(图3), 导致细胞核偏位(图5); 微管和微丝蛋白及其纤维则随细胞核外突排出过程而密集在缢痕区(图5), 这为排核的二个阶段细胞骨架系的作用规律提供了证据。

基于哺乳类红细胞终末分化期细胞核停止分裂、呈现核固缩、自然排核和表达珠蛋白基因产物等特征, 以及根据我们上述实验所积累的资料, 尤其在排核前可观察到的特异活性蛋白质高峰和骨架等相关物质代谢的急剧变化, 我们提出了哺乳类红细胞在种系发生过程中可能出现“去(排)核调节因子(Erythroid Denucleation Regulatory Factor, EDRF)”, 后改称“红细胞分化一去核因子(Erythroid Differentiation-Denucleation Factor, EDDF)”的工作假说。设想这一因子是导致自然去核和始动细胞由增殖期转向终末分化期的调节物质(图6)。为验证进化上在种系发

以外的活性蛋白质动态变化的分析, 分别采用细胞组化、免疫荧光组化、电泳及分离提纯等方法对上述物质的动态变化进行了比较观察。发现排核期间上述物质均出现一系列与形态改变互为相应的可测变化(图3): 核酸(DNA、RNA)、LDH 同工酶^[12]、波形纤维蛋白(Vimentin)等在排核前急剧降低; 相反酸性磷酸酶、血红蛋白、膜收缩蛋白(Spectrin)α及β亚基、微管蛋白、微丝蛋白以及血红蛋白除去后的胞质活性蛋白等则迅速上升达高峰^[12, 31, 33]。这些变化均以晚幼红细胞期为转折点, 而且似与细胞核的存活状态及排核过程密切相关, 提示哺乳类红细胞在终末分化期出现去核物质, 并可能导致排核期间物质代谢上的剧烈改变。以 FVA 感染的小鼠离体培养 12~72 h 的脾红细胞为材料, 提纯活性蛋白质, 对 MEL 红白血病细胞生长抑制率进行生物学活性的动态分析, 发现该活性蛋白在早幼成红细胞期已经出现, 在中幼成红细胞期含量达高峰(图3), 与排核及细胞骨架蛋白等物质代谢呈正相关^[31, 33]。用间接免疫荧光法处理上述各期脾红细胞的微管、微丝、波形纤维蛋白等骨架系统在激光共聚焦显微镜下观察, 可见作为

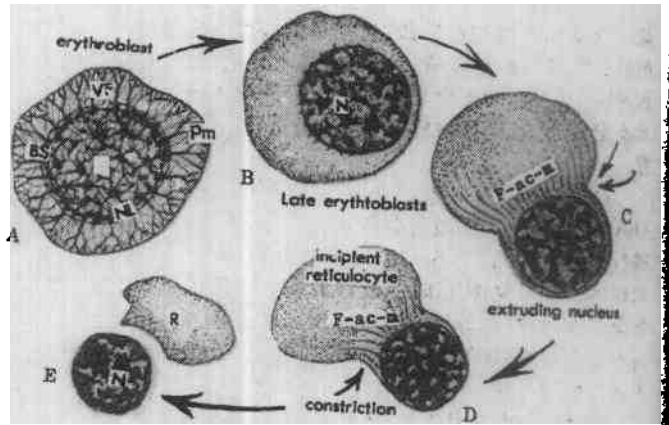


图5 哺乳类红细胞排核过程中细胞骨架系的作用规律示意图
A. 成红细胞(erythroblast)波形蛋白纤维与核纤层(NL)连结(结合位点BS)后向外延伸与质膜(PM)相连, 从而将细胞核位置锚定; B. 示晚幼成红细胞(late erythroblast)波形蛋白纤维降解, 导致核固缩和偏位的排核初期相; C、D、E. 排核二期相示微丝(F-actin)、微管(m)纤维随细胞核外突排出过程而密集在初期网织红细胞(incipient reticulocyte)和缢痕(Constriction)区。extruding nucleus, 外突核; F-act-m, 微丝微管束; R. 网织红细胞

生过程中是否出现 PDZP 物质,我们采用了显示核骨架-核纤丝中可(液形)纤维的技术,比较了小鼠(哺乳类)和鸡(鸟类)的细胞骨架系在此化上从非非核至非核之间的差异。当 PD 可见小鼠幼成红细胞在核前汁液中间纤维主要成分波形纤维蛋白(Vimentin)降解、再建、断裂、核纤丝常带图像,与鸟类相应结构之核纤丝呈明显对比^[1]。这些差异为从进化上的非去核鸟类空壳至去核的哺乳类红细胞初步提供了可能的证据,间接表明在种类发生过程中核物质 PDZP 是符合逻辑的设想。本研究的核心问题是验证这一因子是否存在,并拟利用这一因子来抑制骨髓细胞核的增殖分裂活动,调节分化基因表达,促进细胞终末分化,为骨髓增殖理论提供依据。

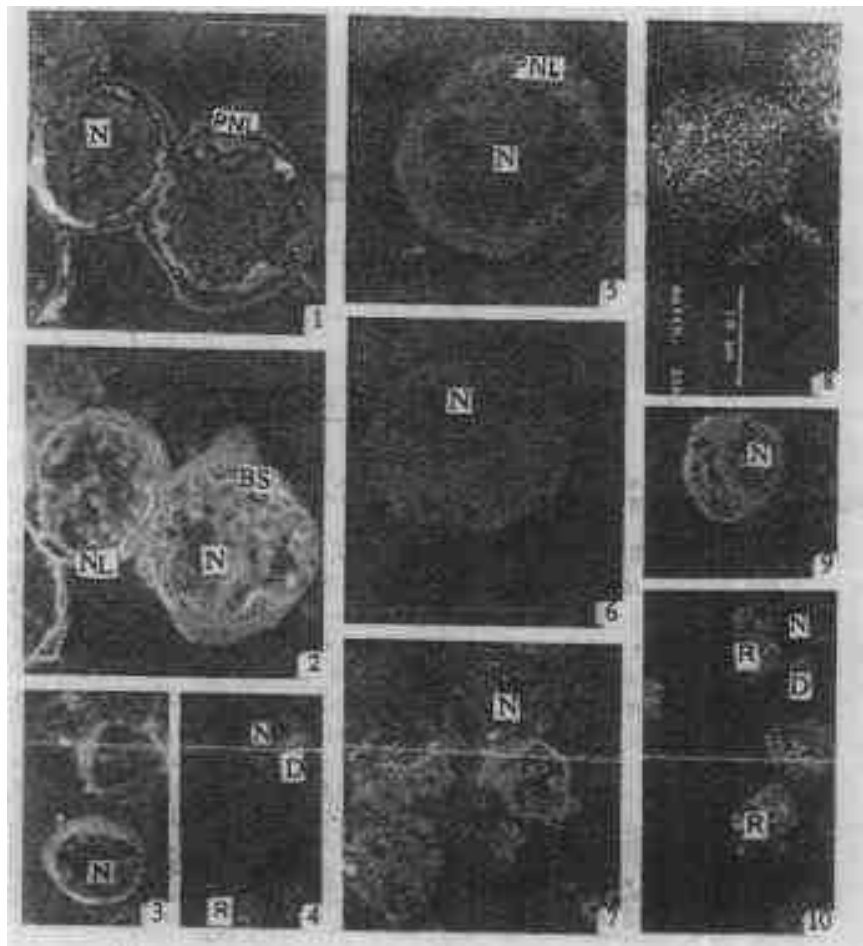


图 4 激光共聚焦显微镜下小鼠红细胞培养不同时期(2, 24, 36, 48 h)

示二种不同蛋白的免疫荧光分布的动态变化

1, 2. 培养 24~24 h 后的成红细胞示波形蛋白呈球壳层的核周层(PNL)和并入核膜下与核纤丝(NL)相透的结合位点(BS); 3. 示核蛋白(培养 36 h); 4. 排核期(培养 48 h); 5. 示核蛋白核周层荧光层(培养 12 h); 6. 核周层(48 h); 7. 排核期(48 h); 8. 示微丝蛋白中初网组织区域; 9. 示微丝蛋白呈纤维状及球状束(24 h); 10. 排核期(48 h); 微丝蛋白增稠和集中在初网组织区域; N 为核膜; D, 致密体; R, 初网组织。

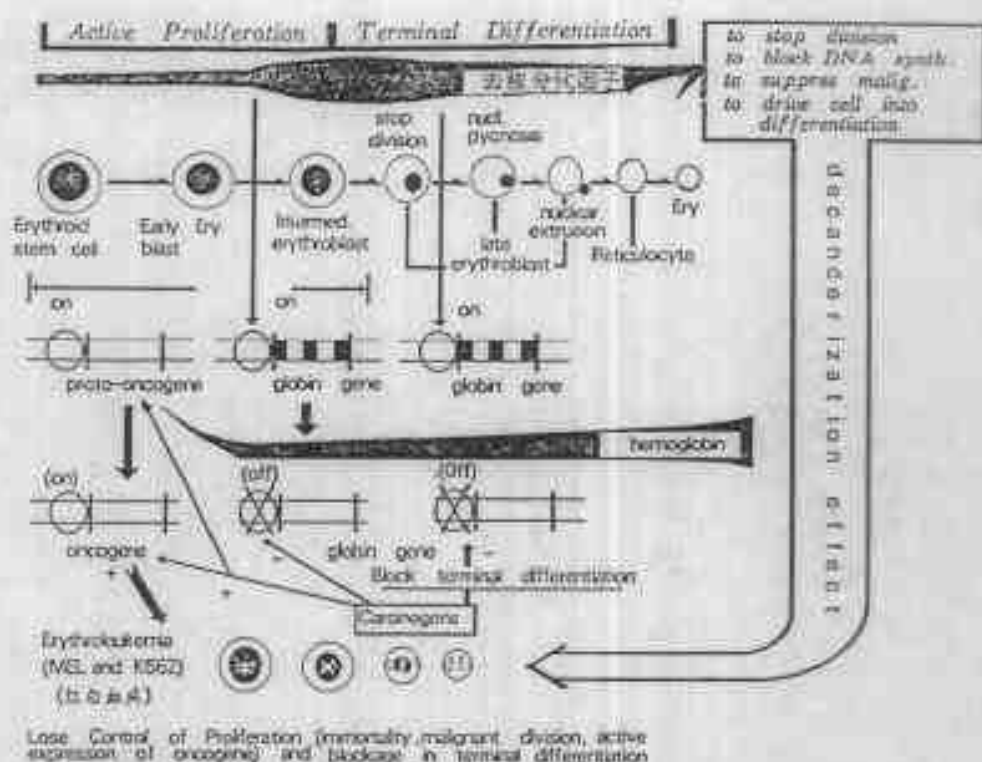


图6 哺乳类红细胞自然选择的去核因子(红细胞分化因子)假说示意图。左侧示红细胞发育,中期幼红细胞活跃增殖,有明显的细胞分裂周期,如此时受致癌物作用,可激活癌基因形成增殖失控的肿瘤细胞(红白血病和 MEL 及 K562),终末分化受阻。右侧示终末分化期二个主要种红细胞中去核分化因子的逐渐增多而启动了珠蛋白基因转录合成血红蛋白,导致幼红细胞分裂停止,核固缩,达高峰时引起核裂,假想去核分化因子 EDO 是主导自然选择和启动细胞增殖周期终末分化期的调节物质,具有停止细胞分裂,中断 DNA 合成,抑制恶性增殖和细胞分化作用



图7 (a)成鸡晚幼红细胞中间纤维—核纤层—核骨架体系整装电镜图。中间纤维(IF)纤丝,由核纤层发出,穿过胞质与质膜相连,注意核纤层厚度变化;图7 (b),牦牛小鼠胚胎中幼红细胞中间纤维—核纤层—核骨架体系整装电镜图。示中间纤维网络,网络同理义,核纤层特厚与图7a 的高电势对照差异明显 IF 中间纤维;L 核纤层;MS 核骨架;NM 核膜

2 红细胞胞质体杂交模型的建立和对红白血病及非红系骨髓瘤细胞的诱导作用

为了验证上述假说,我们自 1980 年以来,选用自然去核而富含珠蛋白 mRNA 和次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)阳性的正常小鼠或兔的网织红细胞,与小鼠和人类红白血病细胞(MEL 及 K562)和非红系的恶性骨髓瘤细胞进行杂交,创建了同种和异种细胞胞质体杂交模型。选用网织红细胞作为“胞质体”,除了因为它自然去核后的胞质体和含有丰富的基因物质(珠蛋白基因 mRNA)可作为遗传标志外,还因为它本身是 HGPRT 强阳性,便于在与缺失此酶的骨髓瘤细胞融合后用 HAT 选择液来纯化杂种细胞。创建这种胞质体杂种细胞模型的主要目的,是验证哺乳类红细胞胞质中是否存在对肿瘤细胞核活动起限制作用、抑制肿瘤细胞恶性分裂和重排基因表达活动的因子,并企图利用这一因子诱导细胞终末分化。表 1 为我们近年来建立的同种(小鼠-小鼠)和异种(小鼠-兔,小鼠-人)的胞质体杂种细胞(cybrid cells)和用大鼠有核红细胞与小鼠浆细胞瘤杂交建成的杂交细胞(hybrid cells)及其表型特征^[13-16,29]。表中 1~8 为非红系骨髓瘤,9 为红系肿瘤红白血病。

表 1 红系细胞×肿瘤细胞的同种和异种杂交细胞系的建立及其表型特征

红系细胞	恶性细胞系 (骨髓瘤)	胞质杂交细胞 (cybrid)	表型特征	作者文献
1. 小鼠网织红细胞(R)	小鼠 BW5147 胸腺淋巴肉瘤细胞(BW)	BW-R	* 恶性逆转,表达小鼠型血红蛋白	[13]
2. 小鼠网织红细胞(R)	小鼠浆细胞瘤 NS-1(NS)	NS-R	* 恶性逆转,表达小鼠型血红蛋白	[13]
3. 小鼠网织红细胞(R)	小鼠 SP2/0 浆细胞瘤(SP)	SP-R	* 恶性逆转,表达小鼠型血红蛋白	[15]
4. 小鼠网织红细胞(R)	人 HL-60-AR 早幼粒白血病突变株细胞(HL)	HL-R	* 恶性逆转,表达人型及小鼠型血红蛋白	[14]
5. 小鼠网织红细胞(R)	人 HMy-2 浆细胞瘤(HMy)	HMy-R	* 恶性逆转,表达人型及小鼠型血红蛋白	[32]
6. 兔网织红细胞(RR)	小鼠 BW5147 胸腺淋巴肉瘤(BW)	BW-RR	* 恶性逆转,表达小鼠和兔型血红蛋白	[15]
7. 兔网织红细胞(RR)	小鼠 SP2/0 浆细胞瘤(SP)	SP-RR	* 恶性逆转,表达小鼠和兔型血红蛋白	[15] [26]
8. 大鼠中、晚幼红细胞(RNR)	小鼠 SP2/0 浆细胞瘤(SP)	SP-RNR	* 恶性逆转,表达大、小鼠二型血红蛋白	[16]
9. neo 标记的兔网织红细胞(RRneo)	人红白血病 K562 细胞(K)	K-RRneo	* 恶性逆转,液型蛋白基因表达受抑,表达人型血红蛋白	[29] [30]
10. 非红系对照-小鼠 B 淋巴细胞	小鼠 SP210 或 NS-1, BW 等	淋巴杂交瘤	各型恶性淋巴瘤,产生抗体	[13] [15] [16]

* 恶性逆转包括生长曲线、分裂指数、³H-TdR 掺入率下降,在软琼脂中失去集落形成及在裸鼠体内丧失致瘤能力等,部分标本测了癌基因探针的 Northern blot,表明癌基因 C-myc 等被抑制

表 1 中 1~3 为小鼠网织红细胞(R)与小鼠骨髓瘤细胞(BW5147 胸腺淋巴肉瘤、NS-1 及 SP2/0 浆细胞瘤)分别进行同种杂交所建成的 3 种胞质体杂种细胞(cybrid cells)。BW-R、NS-R 及 SP-R 均呈现恶性逆转的表型特征(包括生长曲线、分裂指数、³H-TdR 掺入率下降,失去集落形成和在裸鼠体内的致瘤能力等)和表达小鼠型的血红蛋白等分化特征。表 1 中 4,5 为小鼠网织红细胞与人类早幼粒白血病突变株细胞(HL-60-AR)及人类浆细胞瘤细胞(HMy-2)分别进行异种杂交建成的 HL-R 及 HMy-R 胞质体杂种细胞系,除呈现恶性表型逆转(包括癌基因表达受抑)外,并表达了人型血红蛋白。表中 6,7 为兔网织红细胞(RR)与小鼠 BW 及 SP2/0 二种骨髓瘤细胞分别异种杂交,所建立的 BW-RR 及 SP-RR 两种胞质体杂种细胞。同样出现恶性表型逆转,而且同时表达了小鼠和兔型血红蛋白。8 为用大鼠有核红细胞(RNR)与小鼠浆细胞瘤(SP2/0)杂交建成的 SP-RNR 杂交细胞(hybrid cells),在恶性逆转的同时,表达了大、小鼠型血红蛋白。表中 9 为

兔网织红细胞与人 K562 红白血病细胞异种杂交的胞质杂种细胞。呈现恶性表型逆转和表达人型血红蛋白。对照实验均以小鼠淋巴细胞与上述部分相应肿瘤细胞进行同条件下融合作为比较,它们均形成众所周知的淋巴杂交瘤细胞,并未逆转肿瘤恶性。

表中 4,在杂交前先用 MNNG-8Ag 处理,将人早幼粒白血病细胞(HL-60)变成缺失 HGPRT 的突变株(HL-60-AR),然后与网织红细胞杂交;另将此突变株异种移植至裸鼠皮下,建成了在体内传代的裸鼠人白血病细胞系(HL-60-AR/NU)。实验证明,这二种突变细胞在诱导分化药物维甲酸(RA)和二甲基亚砷(DM-SO)等作用下,与胞质体杂交的结果一致,可以向正常方向分化。细胞形态、功能、膜受体、酶活性、增殖能力、致癌性以及 7 种癌基因表达(C-myc,H-ras, fos, sis, abl,erb-B 及 V-Ki-ras)等均发生了改变、分化性状具有遗传稳定性^[17]。

3 红细胞胞质“分化去核因子”对红白血病及骨髓瘤细胞恶性表型和基因表达的调控作用

对上述 9 种同种和异种胞质杂种细胞,进行多项有关生长和基因表达指标的观察,证明它们均规律地呈现恶性生长明显降低,丧失致癌性并表达红系细胞终末分化产物等特征^[13-16,26,29,30,32]。

(1)细胞形态改变(表面膜突起及微绒毛减少,核糖体、含铁蛋白团粒及异染色质比例增多)及组化染色反应明显改变(联苯胺阳性,cAMP 增高,磷酸二酯酶活性下降等)。

(2)分裂指数、³H-TdR 参入率及生长曲线(增殖率)明显下降。

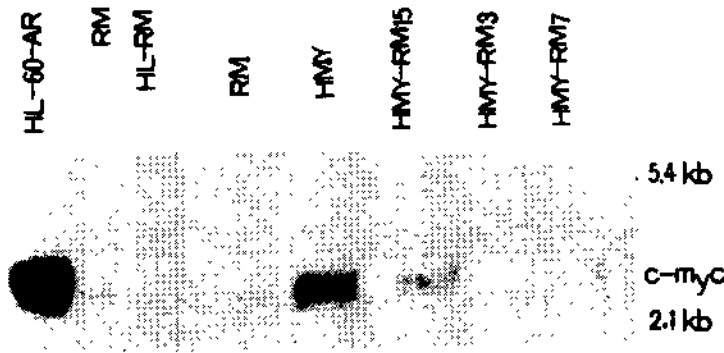


图 8 ³²P-C-myc 癌基因探针与从亲代人浆细胞瘤(HMy)、人 HL-60-AR 早幼粒白血病突变株细胞(HL),小鼠网织红细胞(RM),及胞质杂种细胞(HMY-RM)(HL-RM)提取的总 RNA(每一样品含 18μg)的 Northern 印迹分子杂交图。注意杂种细胞 RNA 中未见有 C-myc 癌基因转录条带。HL-RM、HMY-RM 3、7、15 为杂种细胞,数字为传代代数

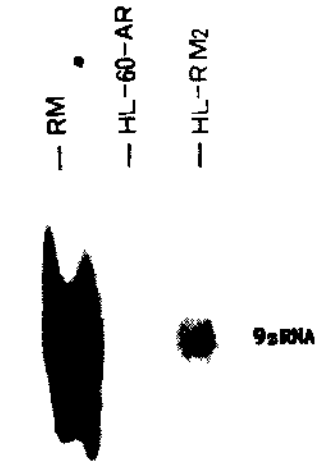


图 9 ³²P 标记人及小鼠珠蛋白探针与从亲代人 HL-60-AR 早幼粒白血病突变株细胞(HL)、小鼠网织红细胞(RM)提取的总 RNA 的 Northern 印迹分子杂交图。注意在非红系杂种细胞 RNA 中,出现与相应探针杂交的珠蛋白基因转录产物 9S-RNA 条带,与亲代肿瘤细胞缺此条带呈明显对照

(3)在软琼脂培养中失去形成集落能力。

(4)刀豆球蛋白(Con A)凝集反应阴性。

(5)抗原性改变:Thy-1 抗体的细胞毒试验及荧光抗体染色反应由亲本的阴性反应转变为中等阳性。

(6)异种移植至先天免疫缺陷的无胸腺裸鼠体内,失去致癌性。

(7)染色体数量在传代过程中呈现动态变化,众数值下降,呈现异源胞质体对宿主核物质及染色体构建具有明显作用的细胞遗传改变^[28]。

(8)用癌基因探针(C-myc,H-ras 等)进行 Northern 印迹分子杂交,证明在各型杂交细胞中均未见相应癌基因转录条带(图 8),表明转录活动受到明显抑制。

(9)传代过程中,持续出现红细胞正常分化的珠蛋白基因产物血红蛋白的联苯胺阳性染色反应(BW-R 直至第 42 代仍有生化可测含量 1.56 μg/10⁶ 细胞)。

(10)用小鼠和人的 β-珠蛋白基因探针,进行对细胞全 RNA 的 Northern 印迹分子杂交,证明在同种和异

种杂交细胞中,均有珠蛋白基因转录活动产物出现。即在原来为非红细胞类型的肿瘤细胞中,表达与红细胞 9S-RNA 相对应答条带(图 9),证明红细胞胞质中存在反式调节因子(trans-acting regulatory factor)。

(11)聚丙烯酰胺-尿素凝胶电泳图谱显示,在传代的胞质体杂种细胞中,可单独或同时出现同种和异种杂交动物种属的珠蛋白转译产物血红蛋白的条带(图 10)。

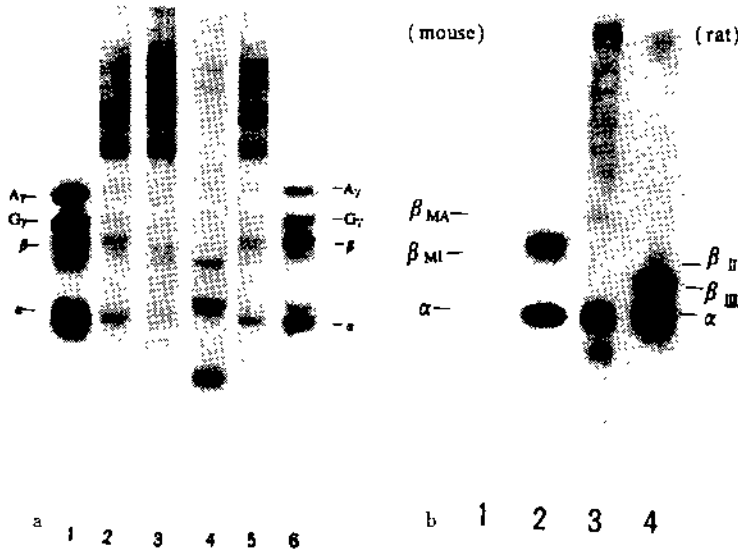


图 10 亲代肿瘤细胞、红细胞及杂交细胞珠蛋白基因在转译水平表达血红蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析。

细胞提取液经蛋白定量后按 Efremov 方法进行电泳

10a. 1, 6. 人新生(足月胎)儿红细胞提取液; 2, 5. 胞质杂种细胞 48 代细胞提取液; 3. HL-60-AR 肿瘤细胞提取液; 4. 小鼠网织红细胞提取液;
10b. 1. Sp2/0 小鼠浆细胞瘤提取液; 2. 成年小鼠红细胞提取液; 3. 杂种细胞 SP-RNR 细胞提取液; 4. 成年大鼠红细胞提取液

(12)用测定同位素标记催化产物的方法,在各型杂交细胞中均检测到 HGPRT 基因产物的持续表达^[26]。

上述同种和异种杂种细胞,均如我们所预期的呈现了细胞分裂和生长受到限制、出现恶性逆转和正常分化等特征。表明网织红细胞胞质中,存在着可传递的调节恶性分裂和促进细胞分化的红细胞分化去核因子(EDDF),验证了我们工作假说中的设想。值得注意的是,血红蛋白原是红细胞的分化产物,却在各型非红细胞类型的同种和异种骨髓瘤杂交细胞中出现,表明宿主瘤细胞中原来不活动的珠蛋白基因,在杂交后已为外源红细胞质中的 EDDF 因子组织特异地所激活。这种通过外来调节因子始动宿主珠蛋白基因表达的作用,通称为反式调节效应(transacting regulatory effect),而细胞杂交则是目前用以鉴别反式调节因子的重要方法之一。我们自 1984 年以来,连续报道小鼠和人类非红细胞类型骨髓瘤细胞与小鼠(或兔)网织红细胞杂交后,激活了宿主核中珠蛋白基因表达血红蛋白的实例^[13-16, 29, 30, 32],确证哺乳类网织红细胞胞质中存在可传递的反式调节因子。在此之前,文献上有关杂交细胞中珠蛋白基因表达调控的报道零散而结果互不一致^[18, 19, 20]。1986 年,Baron^[18]报道,经 DMSO 诱导的小鼠红白血病细胞(MEL)或人类红白血病 K562 细胞,与人成纤维细胞或 HeLa 细胞杂交 24 h 后,在二核体的杂种细胞中,出现人型 α 及 β 珠蛋白基因产物血红蛋白,得出和我们上述不谋而合的结论,即红细胞胞质中存在反式调节因子。目前文献上所有的调控研究,均在二个有核细胞之间的杂交中进行,由于二核细胞之间融合带来的复杂性,所得结果不如我们直接用胞质体杂交法更有说服力。HGPRT 基因产物在胞质体杂种细胞中的表达也是如此,也和文献报道中的人成纤维细胞与 HGPRT 缺失的大鼠肝癌细胞杂交后,激活了大鼠型 HGPRT 基因表达^[27]的结果一致。这些结果表明,已分化和癌变的细胞,珠蛋白和 HGPRT 基因并不是不可逆地受抑(封闭)或丢失。在适当的相应因子作用下,仍可重新被激活。Westin 等^[21]指出,HL-60 细胞被诱导进行分化时,C-myc 癌基因的表达率下降 80%~

90%，我们的胞质体杂交细胞中，C-myc 基因的表达活性也明显受抑，这为红细胞胞质因子(分化去核因子)调控肿瘤恶性提供了基因水平的证据。在我们的实验中，分化去核因子(EDDF)具有特异激活非红系细胞宿主核中珠蛋白基因表达和抑制(封闭)癌基因及起锚定细胞核位置作用的波形蛋白基因的活动，而呈“正-负”互为因果的“偶联”关系，准确地模拟了哺乳类红细胞终末分化期的

停止细胞分裂，转向细胞分化的自然现象，建立了细胞分化过程中“正-负”的基因开关调节模型，有可能为国际上长期未解决的细胞分化机理的探索，提供了参考线索。

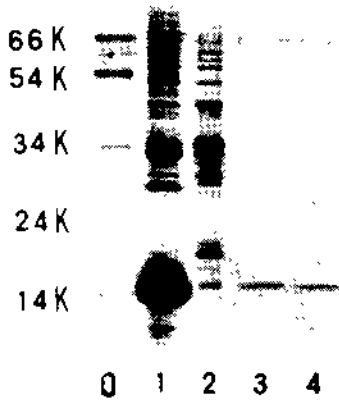


图 11 兔网织红细胞提纯活性物质的电泳图谱

1. 兔网织红细胞提取液；2. 经选择变性的标本；3. Sephadex G-100 样品；4. DEAE 纤维素及 CM 纤维素柱连续层析的洗脱液，在电泳上为单一条带

4 EDFF(红细胞分化——去核因子)的分离、提纯、活性分析及基因克隆

上述的细胞杂交实验进一步证明红细胞胞质中存在终末分化和去核的调节因子。在这一基础上我们进行了从红细胞中分离纯化活性因子，定性、定量和活性作用分析的工作，为下一步的基因克隆及基因工程奠定基础。首先制备兔网织红细胞裂解物上清液，用 Sephadex G-100 进行柱层析后，按体积比例加到体外培养的转化小鼠成纤维细胞 L929 体系中。可见浓度达到占培养液终体积的 1.5% 时，L929 细胞的分裂活动及集落形成能力即明显受抑，表明兔网织红细胞裂解上清中含有该活性物质^[27]。进一步从盐酸苯胍诱发贫血的新西兰兔网织红细胞中(表 2)提纯活性物质，发现微量浓度(0.1~0.09 μg/ml)的提纯物即可达到完全抑制体外培养(L929 细胞及人鼻咽癌 KB 细胞株)的分裂及集落形成活动。提纯物在电泳上为单一条带(图 11)，分子量约 15KD。理化性质分析表明为蛋白质(在蛋白酶 K 处理后失活，耐热力达 100℃ 10 min 以上)^[23,24]。

表 2 红细胞分化(去核)调节因子的提纯及其生物学活性

提纯步骤	蛋白质含量	抑制浓度	纯化倍数	产率%
1. 兔网织红细胞裂解液	1 000 mg	3 mg	1	100.00
2. 选择性变性	13 mg	80~100 μg	33	43.20
3. Sephadex G-100 洗脱液	33 μg	0.5~1 μg	4 000	21.00
4. DEAE 纤维素洗脱液	5 μg	0.1~0.2 μg	20 000	10.10
5. CM 纤维素柱洗脱液	3 μg	0.05 μg	31 000	9.10

对体外培养细胞实验的活性分析表明：实验组(培养液中加入 0.1~0.2 μg/ml 提纯物)的生长曲线、分裂指数、生长抑制率、³H-TdR 掺入率、群体倍增率及集落形成率等指标均明显低于对照组(表 3)^[28]。取得了与细胞杂交类似的抑制肿瘤或转化细胞恶性生长的效果。

表 3 红细胞分化(去核)调节因子对 L929 及 KB 细胞生长的生物学活性分析

组别	生长抑制率*/%	群体倍增率/%	集落形成率/%	³ H-TdR 掺入率/CPM
L929 对照	0	8.67	13.125	1 377.00(1.5 h) 17 086.36(4 h)
0.1 μg/ml	41.87(1 d) 64.42(2 d)	-0.15	0	589.00(1.5 h) 5 360.00(4 h)
0.2 μg/ml	74.00(1 d) 89.05(2 d)	-0.74	0	328.00(1.5 h) 4 134.00(4 h)
KB 对照	0	6.63	-	10 631.00(1 h) 13 520.00(2 h)
0.15 μg/ml	25.37(1 d) 37.19(2 d)	3.64	-	4 080.00(1 h) 6 819.00(2 h)
0.3 μg/ml	40.00(1 d) 80.58(2 d)	2.19	-	3 546.00(1 h) 3 293.00(2 h)

*生长抑制率>50%者有效

采用硫酸铵盐析的分离、等电聚焦,正相和反相高压液相色谱等纯化手段,取感染 FVA (Friend 贫血病毒) BALB/C 小鼠的脾红细胞经培养不同发育期(12, 24, 36, 48, 60, 72 h)后,分别分离纯化取得 EDDF, 比较各期 EDDF 对 MEL 白血病细胞生长的抑制率^[24]。绘制分化各期细胞 EDDF 活性的动态曲线(图 3), 证明该活性蛋白确有诱导 MEL 细胞分化的作用。经反复纯化后的 8KD EDDF, 对 MEL 及 K562 细胞的有丝分裂抑制率更高。更有意义的是所有上述提纯的 EDDF 均能与 β -珠蛋白基因上游区的 HS₂ 增强子标记探针有特异结合活性。8KD EDDF 氨基酸序列分析, 表明为碱性蛋白, N 端 15 个氨基酸的序列为^[24]:

N¹-Leu-Arg-Ile-Arg-Gln-Thr-Ile-Lys-Val-Trp-X-Asp-Gln-Lys-Gln

(X 为未确定的氨基酸)

查询蛋白质数据库, 未发现同源序列。利用 RT-PCR 技术, 分别以小鼠脾和人胚胎肝红细胞 RNA 为模板克隆出 EDDF 的 cDNA 片段 600 bp, 并对其中人的片段进行了部分 DNA 序列测定, 其序列图如下:

5'端部分核苷酸序列为:

5'-ACTACACTAATAGGTTTCACGAGCTCCACAAAGTTCTCC...3'

靠近 3' 端的序列为:(N 为未确定核苷酸)

5'-ATAGCGGTCCAACTGCCCAAATACGATCGAT
 CCGCGCAATAAANTTTGNTCCTCTGTGTTGTCCTCAA
 CCGCTCCCATTTACTCCCGGACTCGATCACAGTAG
 AACATCCAAACTCGATTTTCGCGGCGCCACC-3'

以上查询 GenBank 未见有同源序列, 表明该克隆片段为一新的 cDNA 序列。进一步用免疫筛选法及采用基因捕捉选择系统从相应文库筛选 EDDF 全长序列基因的工作正在进行之中。

参考文献

- [1]Levan A. Some current problems of cancer cytogenetics. *Hereditas*, 1967, 57: 343
 - [2]Sandberg AA. In: Owens AH (ed). *Tumor Cell Heterogeneity Origins and Implications*, vol. 4. New York: Academic Press, 1984, 367
 - [3]Klein G. The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis. *Nature*, 1981, 294: 313
 - [4]Yunis JJ. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science*, 1983, 221: 227
 - [5]Harris H. The analysis of malignancy by cell fusion: The position in 1988. *Cancer Res*, 1988, 48: 3302
 - [6]Sachs L. In: Wahren B, et al ed. *Molecular Biology of Tumor Cells*. New York: Raven Press, 1983, 257
 - [7]Sager R. Genetic suppression of tumor formation: A new frontier in cancer research. *Cancer Res*, 1986, 46: 1573
 - [8]Mintz B, Illmensee K. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73: 549
 - [9]刘友华等. 哺乳类红细胞成熟过程中自然排核现象的观察. *电子显微镜学报* 1989, 8: 14
 - [10]张庆一等. 小鼠骨髓红系祖细胞体外培养细胞的形态学观察. *中国医学科学院学报* 1989, 11: 210
- 以下参考文献略。

薛社普主要论著目录

1. 男用节育药棉酚的实验研究. 人民卫生出版社, 1983(与梁德才、刘裕合作)
2. Studies on the antifertility effect of gossypol, a new contraceptive for male. In: *Recent advances in fertility regulation*, IATAR S. A. Geneva, 1981
3. Gossypol contraception and mechanism of action. In: *Male fertility and its regulation*, Boston: MTP press limited, 1985
4. 兔网织红细胞胞质因子对小鼠骨髓瘤细胞恶性调控的研究. *中国医学科学院学报*, 1986, 8(5)(与章静波等合作)
5. 胞质因子对人早幼粒白血病细胞恶性表型和基因表达的调控作用. *中国科学(B辑)*, 1987(8)(与刘友华合作)
6. 大鼠有核红细胞与小鼠浆细胞瘤(SP2/0)细胞杂交后的细胞表型特性分析. *中国科学(B辑)*, 1988(10)(与张庆合作)
7. 哺乳类(兔)红细胞分化因子的纯化及特性分析. *生物化学杂志*, 1992, 8(1)(与费仁仁、孙论等合作)
8. 哺乳类红细胞分化调节因子对骨髓瘤细胞恶性调控的研究. *解剖学报*, 1991, 22(3): 225~234
9. 兔网织红细胞与 K562 细胞胞质杂交体(K-RRneo)核基质-中间纤维体系的研究. *实验生物学报*, 1993, 26(4): 377~387(与马文丽合作)
10. Growth and Differentiation Characteristics of Cybrid K-RRneo Cells. *Chinese Science Bulletin*, 1994, 39(39): 871~875(与马文丽合作)

11. The Role of Cytoskeletal Elements in the Two-phase Denucleation Process of Mammalian Erythroblasts in vitro Observed by Laser Confocal Scanning Microscope. Cellular and Molecular Biology, in press, 1997 (与张世巍等合作)
12. The neoformation of cells of preganglionic type in the cervical spinal cord of the chick embryo following its transplantation to the thoracic level, Journal of Experimental Zoology, 1951, 117(2)
13. 鸡胚发育期中细胞与卵黄对放射性硫(S^{35})-蛋氨酸摄取的对比研究。解剖学报, 1958, 3(2) (与蒲以森合作)
14. 移植小鼠纤维肉瘤在鸡胚内的生长及其对鸡胚神经组织分化的影响。实验生物学报, 1961, 7(3)
15. 抗髓质及抗皮质血清对鸡胚性腺分化的作用。实验生物学报, 1964, 9
16. 鸡胚早期胚盘卵内植入原结后的诱导作用研究。实验生物学报, 1963, 8
17. 中国医学百科全书《组织学与胚胎学》中《胚胎学》分册。上海: 上海科学技术出版社, 1986
18. 胚胎学与组织学基础。北京: 人民教育出版社, 1960
19. 人体胚胎学图谱。北京: 人民卫生出版社, 1965
20. 中国人胚胎发生发育实例图谱。北京: 北京医科大学及中国协和医人联合出版社, 1992 (与俞慧珠、叶百宽等合作)

腺病毒(adenovirus)DNA 的转录活性与 宿主细胞核骨架(nuclear matrix)的关系

翟中和* 陈枫 J. A. Nickerson S. Penman

自从 70 年代发现细胞核骨架 nuclear skeleton 或称为核基质 nuclear matrix 以来^[1], 人们对其形态、成分与功能等方面进行了广泛研究, 尤其是近年 Penman 实验室建立了温和的选择性抽提技术和包埋-去包埋剂电子显微镜技术^[2,3], 为此提供了更为有力的手段。核骨架不仅是维持细胞核形态的支架, 它与细胞内的许多重要生命活动密切相关, 在染色体的功能构建^[4]、DNA 复制^[5,6]、hnRNA 加工修饰^[7]以及拓扑酶和增强子的作用^[8]等方面均起着重要作用。

但是核骨架与真核基因表达的关系至今仍是不清楚和不肯定的^[9]。人们对哺乳动物和鸟类一些模式基因的表达进行分析, 发现有转录活性的基因只有与核骨架结合才能进行表达^[10,11], 这提示我们核骨架很可能在更高水平上对基因表达起着空间上的调控作用。

作为外源性基因组, 病毒可以成为研究真核细胞内基因表达的一种重要手段, 这是我们工作的主导思想。大量资料证明, 病毒代谢——基因复制、转录、翻译以及病毒装配并不是在宿主细胞的可溶性介质里进行的, 而都与细胞的骨架系统有关^[12]。腺病毒 adenovirus 2 是核内 DNA 病毒, 我们运用细胞分级抽提和 DGD 包埋-去包埋剂电子显微镜技术, 观察到 HeLa 细胞内腺病毒工厂是由核骨架纤维网架支撑的, 双向电泳分析表明腺病毒感染能导致核骨架蛋白成分的变化^[13,14]。进一步的研究发现腺病毒 mRNA 前体的合成及加工修饰是在核骨架上完成的^[15]。

本实验从腺病毒 adenovirus 2 感染 6h 的 HeLa 细胞中抽提核内游离 DNA 和与核骨架结合的 DNA, 用腺病毒 DNA 早期转录区(EI₁, EI₂)与晚期转录区(L₂)片段作探针, 进行 Southern 分子杂交, 结果说明腺病毒的正在活跃转录的基因片段紧密结合在核骨架上, 而非活性 DNA 片段则不是紧密结合的, 经限制性内切酶消化就游离到核池内, 从而认为腺病毒 DNA 的转录活性可能与核骨架有关系。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和病毒感染 本实验使用 HeLa 细胞悬浮培养株与单层贴壁培养株。培养基是含有 1% 谷氨酰胺和 10% 小牛血清的 MEM 培养液, pH 7.2。2 型腺病毒(adenovirus serotype 2)由美国麻省理工学院肿瘤研究中心的 Sharp 教授赠送, 在 HeLa 细胞上传代复壮, 以每个细胞为 20~50 PFU (0.5~1 TCID₅₀) 的感染剂量接种(每次实验的细胞量约为 $(2\sim4)\times 10^7$), 于 35~37°C 感作 60 min, 然后加入含 3% 小牛血清的 MEM 液培养, 对照组细胞不接病毒。

1.2 核骨架与 DNA 组分的提取 选取腺病毒感染后 6h 的 HeLa 细胞作为抽提材料, 先后采用两种实验设计方案, 分别叙述于下:

(1) 二组分提取法(图 1)。此方法是将与核骨架紧密结合的 DNA 与其他 DNA 按二组分提取。细胞经