

早熟染色体凝集

— 在基础、临床和变异研究中的应用

——王永潮 王端顺 编译

北京师范大学出版社

早熟染色体凝集

——在基础、临床和变异研究中的应用

美. Potu N. Rao

英. Robert T. Johnson 主编

西德. Karl Sperling

王永潮 王瑞顺 编译

北京师范大学出版社

编译者的话

1970年, Johnson和Rao在灭活的仙台病毒介导下获得的融合细胞中,发现了早熟染色体凝集(PCC)这一重要现象。通过十几年的辛勤工作,进一步发现了这一现象的普遍性。不同种类的动物之间、植物之间,甚至动、植物之间的细胞融合,均发现有丝分裂细胞可以诱导间期细胞产生早熟凝集染色体,而且,PCC的形态与细胞融合时间期细胞在细胞周期中所处的阶段有关。尽管前人的工作中也曾发现这一现象,但对其本质不甚了解,不能给予确切的解释。Rao的研究组进一步从HeLa的有丝分裂细胞中提取出有丝分裂因子,将其注入非洲爪蟾卵母细胞中,可以诱导染色质凝集和胚泡崩解(GVBD),并且确定,有丝分裂因子是一种蛋白质,其分子量大约10万。他们研究了诱导GVBD活性的各种条件,并取得了单克隆抗体。

PCC现象的发现,所开辟的细胞生物学一个新的领域,使过去用一般方法不能进行的一些研究工作得到了开展。例如,根据间期细胞的PCC形态,可以进行细胞周期的分析,确定药物或诱变剂对于间期细胞染色体的损伤;可以进行染色质的结构和包装的研究以及染色体的精细分带,进行白血病病人化疗的病情预测和化疗的个体化等工作。

本书总结了十年来许多研究室有关早熟染色体凝集方面的工作,为未来的研究指出了灿烂的前景。我们希望这一领域将会在我国生物学、医学和农业科学研究中得到开拓和应用,为我国的四化建设服务。

我本人于1982年到1983年在美国M.D.安德逊医院和肿瘤研

究所工作，和本书主编之一Rao教授有密切联系，在编译本书中，得到了他的支持和鼓励；同时，有机会和本书其他撰写者Hittelman教授、Adlahka博士等，进行了一些有益的讨论，在此，对他们均表示深切的谢意。

1983年，Rao的研究室发现了有丝分裂因子抑制物，从而阐明了染色体在细胞周期中的凝集与去凝集现象的机理。我本人也参加了一部分工作，感到有必要介绍这部分内容，因而撰写了第十五章：有丝分裂因子抑制物。回国后因工作繁忙，请我室王端顺同志翻译了第六章至第十章。

在编译此书的过程中，汪堃仁教授给予我们大力支持和热心帮助，我室常虹同志协助拍照了全部图片，我们均表示衷心地感谢。

由于我们的水平有限，文中不免有错误和不恰当之处，请读者予以批评指正。

王永潮 于北京师范大学生物系

1984年10月

序 言

自从六十年代以来,借助于仙台病毒,最近一些时期又借助于聚乙二醇在不同细胞之间进行有控制的融合,为生物学家们提供了强有力的武器,可以用它去探讨以前一般难以解决的许多基本问题。其中的领域之一是细胞周期,特别是DNA合成和有丝分裂的调节,融合,使得现有的细胞结构含有一些来自一定的和不同的周期阶段的成分,并且,直接使人能够观察和了解间期染色质凝集是和细胞中的非同步相联系的。利用细胞周期阶段,可以解释凝集的间期结构不同的性质,而且,这一知识有助于阐明早些时期由广泛的生物材料所获得的结果,早熟染色体凝集这一术语即用来描述此种现象。

由于证明了早熟染色体凝集是一个硕果累累的领域,它把不同学科的工作者结合在一起。因而决定了在国际抗癌协会的支持下,召开一次不仅仅关系到癌的科学讨论会,以总结研究现状和探讨可能的发展前途。1980年9月6日,在柏林弗雷耶大学人类遗传学研究所召开的科学讨论会,为写成此书起了促进作用,本书详细综述了一系列在不同研究领域中对早熟染色体凝集研究所获得的成果。我们希望本书将引起新的研究者的兴趣,并把他们吸引到这一领域中来。

我们希望,无论是从事基础工作的、应用研究的或者教学工作的读者们,将会象参加这次会议的科学家一样感到振奋。因为,这一实验途径将使细胞遗传学家有可能在细胞生活的任何阶段中看到作为分离结构的染色体,而且由此可以对细胞周期中染色体的构造和它有规律的结构和功能的变化,有更深入的了解;

这一系统也使细胞生物学家们对动、植物中大量和有丝分裂及减数分裂相联系的事态，有一个较深入的了解；生物化学家们可以利用这一系统去探讨控制这些过程的基本生理过程和分子机理，在从事变异研究领域中的研究者们，将能在诱导DNA损伤后迅速分析染色体，不仅在 G_1 、 G_2 或 G_0 期，而且也可在通常不分裂的分化细胞中追踪染色体的修复过程，并且从中得到收益。这一途径也可以用来确定肿瘤病人的化疗效率。令人十分感到意外的是，它发展了预测白血病人临床过程的最有价值的方法，成为制定个体治疗方案的基础。因此，早熟染色体凝集成为从事人类肿瘤临床医生的另一工具。

我们对主要由日内瓦“国际癌研究科学讨论会程序”(ICR-EW)为这一科学讨论会提供的资助，以及柏林弗雷耶大学的大力支持表示衷心地感谢，我们非常感谢人类遗传学研究所的同仁们对这一讨论会的具体安排。我们特别要感谢这些撰稿的作者们热情地、主动地总结他们的工作。我们十分感谢Walter J. Pagel对编辑本书所给予的帮助。

Potu N. Rao

Robert T. Johnson

Karl Sperling

目 录

序 言	1
第一章 早熟染色体凝集的现象	1
I 引 言	1
II 早熟染色体凝集的现象	2
1. 有丝分裂因子无种族特异性	7
2. 分化细胞染色体的显现	7
3. 概括	7
III 历史背景	10
IV 早熟凝集染色体 (PCC) 的结构	12
1. G_1 PCC	12
2. S PCC	14
3. G_2 PCC	18
V 早熟染色体凝集的命运和后果	20
1. 早熟凝集染色体的模板活性	20
2. G_1 PCC 中 DNA 合成的启动	21
3. 杂种细胞中早熟凝集染色体的整合及排出	23
4. 间期成分对中期染色体的效应	29
VI 参与早熟染色体凝集诱导的因子	29
1. 正、负离子对早熟凝集染色体的诱导	30
2. 在早熟染色体凝集中蛋白质的参与	31
VII 早熟凝集染色体和中期染色体之间的差异	36
VIII 小 结	37
文 献	38

第二章 细胞周期和染色体周期：形态和功能方面	48
I 引 言	48
II 间期染色体的取向和排列	52
III 在细胞周期过程中PCC的结构变化	56
1. G_1 期染色体长度	58
2. S期染色体长度	60
3. G_2 期染色体的长度	62
4. G_1 和 G_2 染色体的结构变化	62
IV PCC的RNA合成位点	68
1. 方法问题	68
2. 印度黄麝细胞RNA合成的染色体位点	74
V 结 论	80
文 献	81
第三章 与早熟染色体凝集相联系的纺锤体形成和染色体分离	90
I 引 言	90
II 方法学	91
III 有丝分裂中的PCC	94
1. 前期	94
2. 中期	94
3. 后期	102
4. 染色体的空间关系和纺锤体构型	104
IV 第二次细胞周期中PCC的命运	106
V 结 论	107
文 献	108
第四章 生精细胞的早熟凝集染色体	114
I 引 言	114
II 睾丸细胞	114

III	融合程序	115
IV	生精细胞的PCC	117
	PCC的带型	118
V	X线对生殖细胞断裂效应的评价	123
VI	小 结	125
	文 献	126
第五章	微核中的早熟染色体凝集	129
I	引 言	129
II	MN和MN-PCC的实验证据	133
	1. 哺乳类细胞	133
	2. 植物细胞	140
III	结 论	142
	文 献	143
第六章	早熟凝集染色体的带型和染色体的基本结构	151
I	引 言	151
II	PCC和有丝分裂染色体的带型	151
	1. 印度黄麝染色体延长后的G带	152
	2. 异染色质中的C带	159
III	凝集和分带的结构基础	161
	1. 在PCC中染色质纤维和螺旋化	161
	2. G带、染色体及凝集过程	167
IV	染色体模型的意义	171
V	小 结	173
	文 献	175
第七章	在早熟凝集染色体上核仁组织区活动性的细胞学评 价	185
I	引 言	185
II	在早熟染色体凝集中核仁的命运	186

III NOR与遗传活性之间的相关性	188
IV RNA合成抑制的细胞中的银染	193
V 结 论	195
文 献	197
第八章 以早熟染色体凝集作温度敏感突变株的细胞周期分 析	201
I 引 言	201
II 用于分析温度敏感性(ts)细胞周期突变株的细胞周期 事态和最终表型的技术	203
1. 流式显微荧光计(FMF)技术	203
2. 二盐酸喹啉因(QDH)技术	203
3. 早熟染色体凝集技术	203
4. FMF、QDH和早熟染色体凝集方法的优缺点	205
III 早熟染色体凝集和ts细胞周期突变株的研究	207
1. ts突变株细胞的生长	207
2. 有丝分裂的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的制备	208
3. 仙台病毒	208
4. 细胞融合与早熟染色体凝集	208
5. 早熟染色体凝集使细胞周期形象化	209
IV 用早熟染色体凝集和FMF法对特异的ts细胞周期突变 株的分析	209
1. 阻断于G ₁ 的ts细胞周期突变株	211
2. 阻断于S期的ts细胞周期突变株	214
3. 阻断于G ₂ 的ts细胞周期突变株	219
V 结 论	221
文 献	222
第九章 温度敏感突变株和G ₂ —有丝分裂过渡的性质	229
I 引 言	229

II	ts85细胞株的分离和生长特性	230
III	在染色体凝集中组蛋白H1磷酸化的参与	230
IV	除H1激酶外的因子	233
V	早熟染色体凝集和ts85	236
文 献		239
第十章 参与前期化和末期化的因子		243
I	引 言	243
II	前期化	245
1.	细胞融合与前期化	245
2.	前期化的超微结构研究	247
III	末期化	251
1.	在融合细胞中, 中期染色体上的核膜形成	251
2.	末期化机制	251
3.	在异核体中的末期化	254
IV	参与前期化和末期化的调节因子	257
V	细胞融合实验的前景	260
VI	在前期化和末期化中钙、镁离子的参与	260
VII	有丝分裂中染色体凝集的现代模型	265
文 献		266
第十一章 哺乳类细胞染色体凝集因子的特征		278
I	引 言	278
II	在作为染色体凝集因子测定的两栖类卵母细胞中减数 分裂成熟的诱导	279
III	来自有丝分裂HeLa细胞染色体凝集因子的特征	282
1.	有丝分裂因子的性质	283
2.	放线菌酮对有丝分裂因子的成熟促进活动的效应	283
3.	Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对有丝分裂因子的成熟促进活动的效应	283
4.	有丝分裂因子的热敏感性	283

5. 抽提液的透析和pH对有丝分裂因子的效应	284
6. 有丝分裂因子的分子大小	285
7. 有丝分裂因子的DEAE-纤维素柱层析	285
IV 来自CHO有丝分裂细胞的染色体凝集因子	286
V 有丝分裂因子在中期染色体上的定位	287
VI 有丝分裂因子的稳定性	294
VII 哺乳类细胞和两栖类卵母细胞MPA的比较	294
VIII 结 论	295
文 献	296
第十二章 早熟凝集染色体与DNA及染色体损伤的分析	299
I 引 言	299
II 各种DNA损伤剂对DNA, PCC和中期染色体的效应	302
1. 病毒与细胞融合	302
2. X和Y辐射损伤	304
3. 博莱霉素	311
4. 紫外线	315
5. 烷化剂和有关的抑癌药物	319
6. 插入剂阿霉素	327
III DNA修复及其抑制: 涉及染色体的完整性	329
IV 在DNA和染色体修复中蛋白合成的参与	336
V 间期染色体修复: PCC结构的恢复	337
1. X和Y辐射	338
2. 博莱霉素	342
3. 紫外线	343
4. 烷化剂及其有关化合物	348
VI 结 论	350
文 献	352
第十三章 在恶性肿瘤诊断中的早熟染色体凝集	377

I	引 言	377
II	染色体凝集周期的显现	379
1.	周期细胞中的染色质变化	379
2.	受激细胞中的染色质变化	381
3.	G ₁ 期染色质变化的分子基础	387
III	与细胞转化相联系的染色质变化	389
1.	处于静止态的正常和转化细胞PCC形态上的差异	390
2.	体内正常细胞和肿瘤细胞PCC的差异	394
IV	白血病人治疗前早熟染色体凝集的研究	397
V	在诱导缓解治疗中PCC的改变	404
VI	人类白血病复发的预告	410
1.	早熟染色体凝集技术在预告复发中(早期研究)的应用	410
2.	晚期强化治疗后的预告复发	412
3.	预告疾病过程的临床意义	417
VII	早熟染色体凝集研究所提出的生物学问题	418
1.	问题和两种可能的假说的介绍	418
2.	骨髓各种分部组分早熟染色体凝集的研究	422
3.	离体白血病细胞的研究	424
4.	临床细节	424
VIII	结 论	426
文 献		426
第十四章	在植物细胞中的早熟染色体凝集及其在遗传操作 中的潜在应用	440
I	引 言	440
II	细胞培养和原生质体融合	441
1.	细胞系和培养液	441
2.	有丝分裂小麦细胞的积累	441
3.	原生质体的分离	443

4. 融合的诱导	443
III 植物原生质体中的早熟染色体凝集	444
1. 小麦异相同核体中的早熟染色体凝集	444
2. 属间异核体中的早熟染色体凝集	444
3. 界间异核体中核的交互作用	446
IV 应 用	448
V 结 论	449
文 献	449
第十五章 有丝分裂因子抑制物	454
I 引 言	454
II 实验方法及程序	455
III 有丝分裂因子抑制物(IMF)的发现	458
1. 有丝分裂向 G_1 期过渡时MF的命运	458
2. IMF抑制MF依赖于剂量	459
3. HeLa细胞S期中的 IMF	459
4. IMF在有丝分裂—— G_1 期过渡时的激活	460
5. IMF的初步特征	460
6. 蛋白酶和RNase的效应	461
7. 温度效应	461
8. pH值效应	462
IV 紫外线辐射诱导的IMF的释放	462
1. 紫外线辐射对有丝分裂细胞中期染色体结构的影响	462
2. 紫外线诱导的染色体去凝集和MF抑活相关联	462
3. 阳离子、多胺类化合物以及和未照射的有丝分裂细胞融合,可部分逆转UV诱导的效应	463
4. 静止的(G_0)WI-38人成纤维细胞IMF的激活	465
5. MF如何被UV辐射所抑活	465
V 小 结	466

文 献	167
英汉名词对照	
中文字首索引	
英文字头索引	

第一章 早熟染色体凝集的现象

Potu N. Rao

I 引 言

培养的哺乳类细胞容易被灭活的仙台病毒融合 (Okada等 1957; Harris 1965)。这一发现在细胞生物学中开辟了一个新的领域。利用细胞融合技术所获得的某些最突出的进展, 包括人类基因组图的标定, 杂交瘤技术的发展以及早熟染色体凝集现象的发现。本章的目的在于综述早熟染色体凝集现象发现、历史背景及其产物即早熟凝集染色体 (PCC) 的结构等方面。

在植物及动物细胞中, 作为一个能够看到的细胞学上的分离实体的染色体, 仅仅是在其生活周期中的一个极短的时期, 亦即有丝分裂或减数分裂时期。培养中的动物细胞染色体, 在整个间期的10到40小时之间在核内呈弥散状而不可见。DNA分子与组蛋白和非组蛋白结合进行几级螺旋化, 形成直径约为230 Å 的染色质纤维, 在间期或在分离的中期染色体中, 在电镜下可以辨认 (Ris, 1956; Gay, 1956; Abuelo 和 Moore, 1969; DuPraw, 1968)。此种纤维在细胞分裂时被紧密地包装而成染色体, 此过程便于遗传物质平均分配于两个子细胞之中。

自从第一次描述 (Flemming, 1880) 植物及动物细胞染色体周期以来, 已经有一个世纪了, 而一些关键性问题仍有待回答: (1) 一个可能是有序的但还是分散的间期染色体, 是如何组成一个密实的染色体的? (2) 触发核膜溶解和染色体凝集的细胞内信

号的性质是什么？因为染色体凝集总是和有丝分裂相关联，所以，对这一过程的了解可能会给我们一些有关正常的及癌细胞的细胞分裂调节的知识。

在本章中将讨论试验性地促进染色体凝集的实验，参与这一过程的某些因素，早熟染色体凝集的命运及后果，以及多胺、正离子和蛋白质在早熟染色体凝集的诱导中的作用。

II 早熟染色体凝集的现象

我们原拟用HeLa细胞研究S期细胞(预先用 $^3\text{HTdR}$ 标记)和非标记的 G_2 期细胞融合形成的双核细胞中有丝分裂积累的方式(Rao和Johnson, 1970)，我们意外地发现，在某些异期的双核细胞中，有正常的一套未标记的染色体和一套呈粉碎状的标记染色体相连系(图1)。相类似的染色体粉碎化例子早些时已有报道(Stubblefield, 1964; Sandberg等, 1966; Kato和Sandberg, 1967, 1968 a, b, c; Takagi等1969)。我们在S/ G_2 融合细胞中所看到的粉碎状染色体表明，先进入有丝分裂期的 G_2 期成分，可能在S期细胞核中引起了不正常的凝集。

这一观察导致我们完成了另一个实验，即用秋水仙酰胺阻断的有丝分裂细胞和同步化的 G_1 , S或 G_2 期细胞群体融合(Johnson和Rao, 1970)。用灭活的仙台病毒处理有丝分裂和间期细胞后，30分钟产生的细胞融合，在迅速导致染色体凝集的同时，核膜也发生溶解(图2)。由一个间期核急剧地诱导成染色体的现象，命名为早熟染色体凝集(Johnson和Rao, 1970)。早熟凝集染色体(PCC)的形态学，依融合时间期细胞在细胞周期中所处的不同阶段而变化(图3)。因而 G_1 期PCC非常长，为单个染色单体， G_2 PCC是长而窄的双染色单体，而S期PCC的特征为碎的片断状。

间期核的改变，几乎是在一个间期细胞和有丝分裂细胞融合