

朱孝穎教授  
訪華報告、講座專輯

中國科學院遺傳研究所

情報圖書室

1979.5.

# 朱孝颢教授访华报告、讲座专辑

## 目 录

### 一、大会报告

- (一) 体细胞遗传学简介 - - - - - 1
- (二) 培养仓鼠体细胞的糖代谢突变体 - - - - - 39
- (三) 从突变角度研究癌变机理 - - - - - 62

### 二、细胞遗传学讲座

- (一) 哺乳动物细胞遗传学 - - - - - 82
- (二) 癌的细胞遗传学 - - - - - 90
- (三) 电离辐射的细胞遗传学效应 - - - - - 94

### 三、座谈会 - - - - - 100

## (一) 体细胞遗传学简介

生物·细胞学家很少从细胞方面研究生物的各种影响。所谓分子的机理与功能 (molecular mechanism and function), 都是从真菌, 从原核生物得来的, 理由是因为它们生长期短, 数目很多, 而且做实验方便。说到人类遗传, 人传一代要 20-30 年, 而且子代只有一、二个, 没有十个、几十个之多, 尤其是不能用人类自己做实验。所以细胞遗传学家说: 为什么不把人的细胞培养出来, 所有的基因单位都在每个体细胞里, 每个体细胞就是一个生命单位, 把体细胞放在玻璃皿和试管里培养以后, 能不能跟细菌遗传实验的做法一样, 如能这样做, 那末我们进步就快了。这种意见并不稀奇, 因为体外培养动物细胞, 从 1908 年哈里逊在耶鲁大学就开始, 到现在已有 70 年了, 大家都有经验。然而做遗传实验相当困难, 还有很多问题。近些年来, 尤其是近 10 年来, 技术上有很多进步, 好像用体细胞也可以做遗传学研究了, 只是没有交配的过程, 有个名词叫无性过程 (parasexual)。这方面技术的进步大致可分以下几类:

1. 从单细胞挑出一种叫克隆 (clone) 的体系, 即所谓的纯种, 从一个细胞可繁殖到几十万。搞遗传学研究一定要纯种。现在就可以像细菌一样一个个地取出来, 组成一个个菌落。这很有用, 可作统计学研究, 现在已可以在培养皿里作定量统计工作。

2. 加化学或物理诱变剂, 可以引起突变, 在理论上讲, DNA 就是 DNA, 为什么要加诱变剂, 过去做都不成功, 直到十年前, 我们的实验室和 Puck 实验室开始搞化学诱变。从这以后, 可以人为增加不少变化, 即所谓的遗传变异性 (gen-

etic variability)，搞遗传学研究需要这种变化。

3. 最近可以看见，真核生物细胞里的染色体是一项重要技术进展，这要感谢谈先生的学生之一、美籍华人徐道觉，是他把染色体放在水多的培养基里，即低渗（Hypotonic）培养基里偶然发现的。我讲个小故事。徐道觉实验室有个助手一次做了一个实验，徐先生一看，惊奇地说：“啊！这么好看，把染色体都分开了，你到底做了什么事啊！”于是助手去查他的记录，原来是配方标错了。有个教训，做实验常常做错，但记录要记得很考究，有错就可以查出。记得1934年有人也曾发现类似的情况，不过当时不曾利用，这次徐先生利用了。过去认为人细胞的染色体有48个，现在才晓得只有46个，错了那么多年都没有做对，这是技术上的问题。现在有了这种新发现，染色体上的条纹都能看出来，即所谓分带技术（banding），染色体上一段一段都可以看出来，甚至能定位基因。

4. 技术上的又一项进展是细胞融合（Cell fusion），两个同种或不同属不同种的细胞放在一起成为一个多核的大细胞，成为有异型核（Heterokaryote）的细胞。有时两个核可以放在一起形成杂种，即杂种细胞（Cell hybrid）。1965年英国的哈里斯发现了这种现象，但他并不是第一个发现的人，早在1958年以前，日本的冈田就发现了，不过哈里斯利用这一技术进行很多遗传学研究。有了技术一定要利用，不能看看就标了，不能只当作稀奇的东西。

有了上述四种主要的技术发展，加上其他大大小小的进展，这几年细胞遗传学发展很快，希望很大。不过仍有许多不晓得的问题，和许多困难，所以有继续开发的余地。把细胞融合在一起不仅可以做遗传学分析，研究基因的影响、显性、隐性，还可以进行生化、病毒、免疫方面的研究。

1. 细胞在体外维持生长 (Sustained growth of cells in vitro), 有丝分裂, 继续分裂下去, 生长。

2. 在培养时可以看见在细胞水平和分子水平的各种表型 (phenotypic expression at cellular and molecular levels)。

3. 突变的引发 (mutagenesis)。

4. 细胞融合 (cell fusion)。

5. Heterokaryocytosis。

两个或三个核可以放在同一个细胞质里, 例如有很多实验, 这一个核可以影响到另一个核的遗传状态, 非但可以把细胞跟细胞放在一起, 还可以把细胞核取出来, 放在另一去核的原生质中, 以及把染色体分离出来, 把它纯化。如人有 23 对染色体, 最理想的情况是一支试管都是第一对染色体, 第二支试管都是第二对染色体, 等等。当然人的染色体比较麻烦, 有一种动物, 即有种印度鹿 (indian moujia) 染色体比较少。中国地鼠的染色体也可以这样做, 可以把取出来的染色体和细胞放在一起。假如有很好的遗传基因选择标记, 就可以知道染色体已经进去没有, 还可以晓得留下没有, 而且进一步可以晓得一代代继续传下去没有, 这叫基因的转移。还有所谓基因的重组, 有人已做过这种试验, 但不太成功。人类有一种疾病叫半乳糖血症 (galactosemia), 有一种叫  $\lambda$  和  $\lambda$  dg 的细菌病毒可以转导半乳糖的基因。希望将病毒放在这种病人的细胞上, 由病毒的基因改良这个人的细胞, 改良 galactosemia。

6. 动物  $\rightarrow$  细胞品系  $\rightarrow$  动物 (Animal  $\rightarrow$  cell strain  $\leftrightarrow$  animal)。从一个动物体上取出体细胞, 变成体细胞品系, 放上几个 (标记) 基因, 然后打针打到成胚细胞中 (developing embryo), 把体细胞的突变变成老鼠。

这类实验已经开始，最近已经成功。美国有位女科学叫 B. H. Smins，已将一个 HGPR 基因放入老鼠中。这种实验很有用，将来在动物方面可以把体细胞从有丝分裂变成减数分裂，减数分裂细胞就可以交配了。

下面，我想予料一下在这个问题上能得到什么知识呢？

1. 显性和隐性 (Dominance and Recessiveness)
2. 遗传互补 (genetic Complementation)
3. 细胞基因连锁及重新分配 (Synteny and Somatic reassortment)。
4. 基因作用的机理 (Mechanism of gene action)
5. 细胞群的突变率 (Frequency of mutation)，即自发突变率和诱发突变率。
6. 基因表现的调节 (Regulation of gene expression)。
7. 基因转移的机理 (Mechanism of gene transfer)。

最近几年做体细胞遗传研究有哪些内容呢？

1. 人体基因组的分析 (Analysis of human genome)。
2. 探测抑制分化的细胞功能的机理 (probe the mechanism for repression of specialized cell function)
3. 发展哺乳类线粒体遗传学 (Develop the genetics of mammalian mitochondria)
4. 增加细胞生物学的知识。
  - a. 生理学
  - b. 代谢的分子生物学

C. 调节.

5. 遗传病病理学

6. 剂量补偿 (Dosage Compensation)

7. 病毒学

8. 癌表型的遗传分析 (Genetic analysis of Cancer phenotype.)

9. 环境诱变剂和癌的发生 (Environmental mutagenesis and carcinogenesis).

10. 羊水穿刺诊断.

可以研究分化的细胞的作用, 如制造某种酶或制造胶原蛋白 (collagen), 研究为什么有这种分化作用, 也可以把成纤维细胞取出来, 这种细胞可以产生胶原。或者用肝或肝癌细胞, 制造白蛋白 (albumin), 或制造 TAT (tyrosine amino transferase) 把这两种细胞併合起来, 可以研究它是如何调节的。对于研究遗传病病理, 补偿男, 例如有两个 X 染色体, 一个 X 染色体的男性。研究病毒学, 体细胞在体外培养下测定环境污染, 诱变剂和癌的发生。用于产前诊断, 有羊水穿刺术等。

用体细胞遗传学研究人类生化病的分子机制, 例如:

1. 嘌呤代谢

2. 嘧啶代谢

3. 粘多糖代谢 (mucopolysaccharide metabolism).

4. 胆固醇 (cholesterol) 代谢

5. 核酸修复, 如着色性干皮症等, 我们并不知道这些病的分子原因, 至少现在已开始做了。

最后, 还有很多限制, 即生物的限制。

1. 细胞的衰老老化。人的皮肤或成纤维细胞在体外培养时，过了50代就不再生长。当然，有的细胞已变为异常，像HeLa细胞，可以活下去，但不正常，这是个大问题。反过来讲为什么不可以用这种细胞研究衰老现象呢？

2. 细胞不稳定。可以研究不稳定的原因。

3. 不是细胞里所有的基因都表现出来。简单地说，一个人的细胞中如有10个基因，并不是每个基因都表现，在试管里，只表现几个基因。如鼠肝癌细胞在试管里只产生5-6种蛋白质，有很多基因并不表现出来，这是分化的结果。

4. 污染，生物污染。培养人类细胞，假如细菌钻进来，把实验弄坏，不是很不高兴吗？

现在用几分钟讲讲细胞培养。人类的细胞可以做体外培养已经很久、很久了。做过很多研究。要注意培养基、温度、CO<sub>2</sub>。各种细胞，如成纤维细胞、表皮细胞、淋巴细胞都可以生长。所谓细胞外形的形状，像成纤维细胞、表皮细胞，这些都不太靠得住，因为在人体中长成的成纤维细胞，放在玻璃皿上加上不同血清，形态可以改变。

用不同的技术可以把细胞融合起来，如加合成剂聚乙二醇 (polyethyleneglycol)，或仙台病毒（日本有个仙台城）。该病毒属于付流感病毒一类，可使细胞融合起来。有了这种体外培养技术，第一个问题是：细胞经体外培养后，到底有哪几种表型可以看出来，哪几种表型能留下。一般说来，体外培养时的表型很少可以看出来。为什么有各种分化，如肝、肠、皮肤、肌肉等细胞，这种称为分化作用是比较长期形成的，不太会倒转过来，即已经很固定了不会再回复。另一种人体或高等动物细胞有调节机制，可用酶诱导，这是短期的，可回复的，如Tyrosine amino transferase可以诱导而提高。微生物也有这种例子。大肠杆菌（E.

coli) 放在葡萄籽中生长得很好, 放在乳粉中就要经过诱导, 诱导具操纵子表现。人的细胞中到底有没有操纵子 (operator)? 不太清楚, 到现在为止还没有发现。不过有些情形证明, 这种短期调节多得很。长期调节, 做胶原、血红蛋白、淀粉酶, 像红血球制造血红蛋白这是分化。不过像酪氨酸 (tyrosine) 水平和胰岛素 (insulin) 水平等都是短期调节的。

有了这种知识后, 假如有人患了遗传病, 到底有几种可以诊断出来? 到目前为止, 大约有 50—60 种人类的分子病可用人的体细胞检验出来, 这些都是先天性代谢缺陷疾病。但并不是每种都可以在细胞上找出来。现在知道, 在 100 多种这类遗传病中, 只有 50 多种可以在细胞上看出来。有几种不能只看一个细胞, 需要看很多细胞, 才可以研究它的酶。同时还有这种现象, 即我们刚刚提到的剂量补偿 (dosage compensation)。假如这个基因刚好定位在 X 染色体上, 那么在体细胞上可以把它分出来。假如刚好有一个女病人是 X 连锁的杂合子, 它的身体上就会有两大类细胞, 各不相同, 如一种酶是 HGPRT, 另一种酶为 G-6PD, 这两种酶都在 X 染色体上, 可以区别, 一种是正的, 另一种是负的。

当然, 为了得到突变种 (mutants) 细胞, 可以来自人类自发的变化 (疾病), 但第一, 现在还有很多困难和限制; 第二, 人类细胞在体外生长时间不长即发生衰老现象; 第三, 接种率很低, 如把人的皮肤细胞取出来, 放在玻璃皿中生长, 长几代后收一收, 收它 100 个成纤维细胞, 放 100 个细胞, 运气最好只能长 50 个, 通常只长 20 个, 事倍功半; 第四, 人类遗传病常很罕见, 像 G6PD 症很多, 但 Orotic aciduria 症全世界只有三例。另外, 观察一个基因不够, 最好能多看几个, 看看它们的连锁关系。做重组实验, 当然有好处, 即这种来源

在遗传上没问题，可以查一查他的谱系，看看父母有没有这种病，就可以知道是X染色体连锁或者是常染色体的，这是好办法，不过还有不足之处。

另一个办法是先把动物细胞、人的细胞取出来培养，即使有些改变也好，这些细胞可以活很久，接种率达100%。普通人体细胞每24—48小时传一代，这种细胞7—8小时传一代，实验可以快一点，正确一点。研究遗传学原理，用动物细胞还不是和人的细胞一样吗？遗传现象都一样。所以总结起来，有两种办法，即活体（in vivo）和离体（in vitro）两条途径，即将已经是突变体的人或动物的细胞取出来培养和在已经长成的细胞株上引起突变。

这两种办法并不是做了这种就不能做那种，但活体途径除了先天性代谢缺陷病G6PD和乳血症外，另外还有几种病可在细胞形态上加以区别（不过这类例子很少），如果化病（melanism）的细胞可以产生黑色素，另一种是产生粘多糖，

I Cell病（I为Inclusion），在显微镜下一看就可以看出来。总之形态上的标记不太多。化学上的已经说过了，血清上的标记如HLA也是一种。最后还可以研究放射性或紫外线特别敏感问题。如着色性干皮病患者的细胞对阳光敏感，除此之外，在皮肤上又长了很多癌，所以患者寿命比较短，除皮肤外别的地方也可以长。用体细胞就可以研究照射的敏感性。后面我还要讲DNA修复对突变的影响。

第二个方法，在体外培养后能长出很多细胞，从中可挑选新的变种，新的突变型。怎么做法呢？先确定材料，用Hela细胞，老鼠的L细胞，还是用中国地鼠的细胞？人家会问为什么要用中国地鼠做材料呢？理由是（如讲得不对，请大家更正）：

大约在二十世纪头十年，二十年代和三十年代这段时间里，

首都医院做了很多医学研究，有人觉得奇怪，为什么一定要用瑞士的老鼠，为什么不从这里的田间抓几个老鼠来做呢？从前的协和医院已经用中国地鼠做实验发表文章，包括生理、病理和发癌方面的，后来中国地鼠搬到苏联去了，但现在苏联也没有用，他们还是用 gold hamster 等。gold hamster 染色体为 44 对，中国地鼠的染色体为 22 对。有个俄国人叫高其，尤盖宁把中国地鼠引到英国，五十年代我们开始做体外培养我们那时的兴趣是做放射线的影响。我们查了一下，Hela、L-cell 的染色体太多了，有 70-80 几个，做起来不太容易，而且放射生物学研究要有很高的接种率，虽然中国地鼠细胞株的染色体也变了，已不是 22 对，不过有点好处即接种率很高，所以 Puck 用，我们也用。现在则已经变成标准了，大家都用它，与中国地鼠没有多大关系。我讲这段历史，想使大家晓得现在国外有很多人用中国地鼠作为材料，这是从研究放射生物学来的。

下面用一些图片介绍细胞离体生长的情况和用细胞培养方法测出的一部分人类遗传病。

Table 1. *In vivo* genetic variants detectable in cell culture

| Variant                                                                    | Reference                          |
|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Acatalsin (Japanese variant)                                               | KROOTH et al., 1962                |
| Acatalsia (Swiss variant)                                                  | AEBI et al., 1964                  |
| Glucose-6-phosphate dehydrogenase changes                                  |                                    |
| Electrophoretic variation                                                  | DAVIDSON et al., 1963              |
| Mediterranean variant                                                      | GARTLER et al., 1962               |
| Familial nonspherocytic hemolytic anemia                                   | GARTLER, 1961                      |
| Galactosemia                                                               | KROOTH and WEINBERG, 1961          |
| Maple syrup urine disease                                                  | DANCIS et al., 1963; GARTLER, 1964 |
| (Deficiency branched chain amino acid<br>oxidative decarboxylase activity) |                                    |
| Orotic aciduria                                                            | KROOTH, 1964                       |
| Phosphoglucomutase electrophoretic variation                               | SPENCER et al., 1964               |
| 6-phosphogluconic dehydrogenase electrophoretic<br>variation               | DAVIDSON et al., 1965              |
| Lactic dehydrogenase electrophoretic variation                             | DAVIDSON et al., 1965              |
| Hurler's disease                                                           | DANES and BEARN, 1966              |
| Mouse surface antigens (H-2 system)                                        | CANN and HERZENBERG, 1963          |

图示用细胞培养法可检测的部分人类分子病。人类有 50—60 种分子病可以用体外培养的细胞测定，还可以了解到底分子上毛病出在什么地方。如一种是 Hunters 症，另一种是 Hurler's 症，一是 X 连锁的，一是常染色体的，临床症状一点都看不出来，它们的细胞长在一起可以产生某种酶，它们两个可以彼此帮忙，所以就可以找出一方法。在体外培养。

Some genetic markers developed in cultured mammalian cells that respond to selection

| Species         | Marker                               |
|-----------------|--------------------------------------|
| Human           | purine analog resistance             |
|                 | Aminopterin resistance               |
|                 | Virus resistance                     |
|                 | Glutamine dependence                 |
| Monkey          | Temperature sensitivity              |
| Mouse           | Purine, pyrimidine analog resistance |
|                 | Aminopterin resistance               |
|                 | Radiation resistance                 |
|                 | Asparagine independence              |
|                 | Temperature sensitivity              |
| Pig             | Purine analog resistance             |
|                 | Aminopterin resistance               |
| Rat             | Asparagine independence              |
| Chinese hamster | Purine, pyrimidine analog resistance |
|                 | Cytosine arabinoside resistance      |
|                 | Temperature sensitivity              |
|                 | Auxotrophy                           |

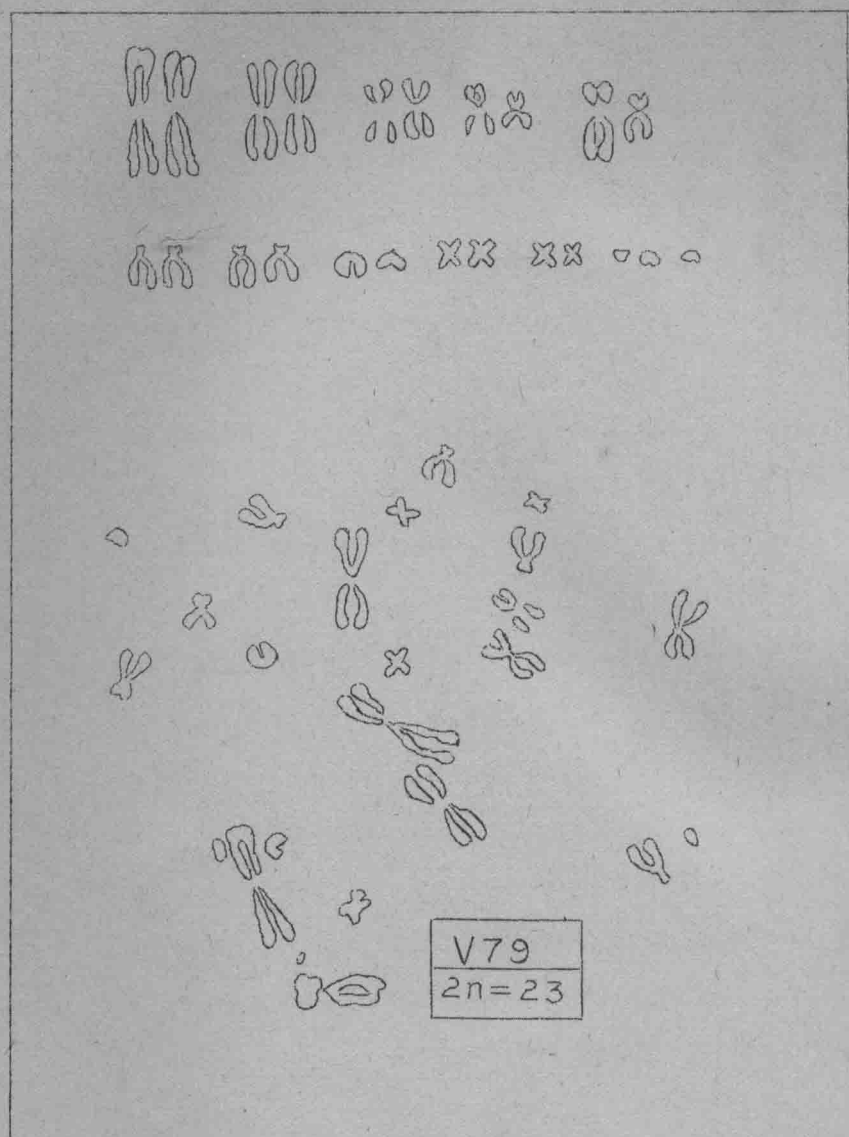
表中所示为培养的哺乳类细胞的遗传标记种类。

选择方法很重要，有很多自发的变异没法去挑选，遗传学家至少要有这种本事，要把野生种和突变种分别挑选出来。在田间挑选小麦穗子，一看就可以看出来，因为它有这种表型。但细胞的表型，像成纤维母细胞和上皮细胞上的表型就看不太清楚，究竟那几种表型可以被选上？这表并不完备，但人的、猴子的、老鼠的、猪的、大鼠的和中国地鼠的都有。另一个特点是哪几种表型，主要是抗药物性，抗病毒性，或营养方面的需要，温度敏感性。我顺便讲个营养问题。细菌自己能制造东西，大部分养料在培养基里可以看出，要加糖、加各种氨基酸、加维生素，加各种原料（source），留下來的东西实在不多了。先是氨基酸就有 20 种，其中 12 种是非加不可的，8 种主要的氨基酸是：脯氨酸、精氨酸……等。

培养细胞时，如温度降低，细胞生长率变慢。普通做实验在  $33^{\circ}\text{C}$ — $39^{\circ}\text{C}$  这一段， $33^{\circ}\text{C}$  生长率差不多正常。假如有某种办法能找到一个突变，在  $39^{\circ}\text{C}$  时死亡，在  $33^{\circ}\text{C}$  就活了，那么又多了一种方法，即温度敏感的方法。为什么高温下会死呢？理由很多，最大的理由是基因产物如酶发生了变化，比如有几个氨基酸被取代，它的热稳定性也会改变。生物物理构型改变，所以酶活性都可改变了。从理论上讲，很多基因都可以发生温度敏感突变，所以条件致死突变（温度敏感突变）是一个很有用的方法。在细菌病毒、噬菌体、大肠杆菌、果蝇都有这种条件致死突变型。现在发现人类很多细胞也有这种突变型，所以很有用处。现在用这个办法诱发遗传突变，在  $39^{\circ}\text{C}$  试一试，它死亡，另外一种条件之下，将试管放在  $33^{\circ}\text{C}$  继续培养，就可以收集到许许多多突变型，以后的任务是：看看是不是在某个位点上的突变。

前面说过了选择突变型的方法，大约有两大类。一种是非选择的方法，如有很多功夫，很大的耐心，可以把经诱变剂处理的细胞，长成许多的克隆，然后一个个取出测定。第二个办法是复制接种法 (Replica plating)，将所有的克隆搬到另外一个玻璃皿里，在这里处理一下，活了或死了，或对某种药物抗性没有了，或对放射线特别敏感了，或一放在  $39^{\circ}\text{C}$  下就死了，另外一个玻璃皿放在  $33^{\circ}\text{C}$ ，在同一地方把它取出，这种方法就叫复制接种法。这是 Lederberg 在 1950 年在细菌中早就做过的。即一个培养皿经过处理，另一培养皿放在那里根本不用，由于后者从来没有处理过，所以不是适应的结果。

讲到选择方法，也分几种，有的是直接选择，如在玻璃缸里有一大堆的细胞，把药倒进去，别的都杀死了，有几个活了，就把它取出来，简单明了，这就叫 Mass selection，或 direction selection。另一种办法比较间接，叫间接选择，如处理后有一个培养皿放在某一条件下，使突变型不死也不长，不死，就站着不动，而野生型大部分在这样环境下旺盛生长，而长了以后要被杀掉；突变的细胞则不动，活是活着，但不被杀掉，以后可以取出来，这就是间接选择法。



图示中国地鼠肺细胞 79 的染色体，其数目已经不是 22 而是 23。在长期培养下染色体多少有些改变，（所谓的 transform）但并不癌化（neoplastic），幸好没有变成 50 个，70 个或 100 多个染色体，当然也有可能。

## Kinds of Genetic Markers in Cultured Mammalian Cells

1. Morphological
2. Biochemical (including nutritional)
3. Serological
4. Conditional lethals

## Isolation Procedures

1. Random isolation of colonies
2. Replica plating
3. Mass selection
4. Lethal-growth method
5. Thymineless death method

表中所示为培养的哺乳类细胞中遗传标记的类型：

1. 形态的；
2. 生化的，包括营养方面的；
3. 血清的；
4. 条件致死的。

挑选的方法有：

1. 随机挑选；
2. 复制接种法；
3. Mass selection，就是像、药物抗性那样把它杀掉；