

地都在变化之中的开放系统。在庄先生的关心下,之后生物系一年级就开设了生物课,并安排了野外实习课,使学生有机会到大自然中去学习生物和自然的关系。这一措施奠定了科大生物系蒸蒸日上的基础。

当知道教“细胞学”的师资不足时,庄先生便动员了细胞所各主要课题负责人,由他自己带头每人承担一部份细胞学的讲课任务。这些专家都有着丰富的研究经验,备课认真。这样的“示范教学”不仅学生受益匪浅,而且持续两年的讲课,也带出了科大的老师。按照“示范教学”的思路和方法,老师们编出了科大生物系细胞生物学教材(据我知道这份教材是很受欢迎的),就这样,科大生物系日趋成熟,培养的学生基础知识和动手能力都有了长足的进步,无论在国内或是国外都是被认可的,这和庄先生当初的关心是分不开的。

同样在我近十几年的研究道路中,体会也是极深。因为常常提醒自己要有“生物思想”,所以无论在选题、设计实验方案和研究路线,一直到分析实验结果都避免了误入“歧途”。无论在研究各种磁场对细胞分裂的影响还是原生动物的棘尾虫中类神经肽的研究,我都能比较清楚自己研究对象的位置,生活范围以及与其它生物之间的关系,于是研究进展比较顺利,而且不会盲目的扩大或片面地对待自己的实验结果。当然庄先生对我的关心不仅仅限于此,还常常在关键时刻给予我信心。记得1992年我刚刚发现原生动物的棘尾虫中有类神经肽阳性物质反应时,由于实验只是初步,不少专家提出疑问,我自己也因经费不足而在迟疑之中,庄先生知道后,十分严肃认真地对我说:“一定要坚持下去,千万不要放弃”。庄先生从来话语不多,我深知这话的份量,顿时信心倍增,克服重重困难,把研究工作继续了下去。时至今日,棘尾虫类神经肽的研究工作又向前迈了一大步,我永远不会忘记庄先生的鼓励和支持。

有人认为庄先生十分严肃,轻易不露笑容,也不敢接近他。其实,先生心地十分善良,对年青人关心有加,要求极其严格。他从不隐瞒自己的观点,并用比较严肃的方式表达出来。记得我刚刚决定调到深圳大学去时,庄先生曾不高兴地对我说:“你也要到深圳去赚钱?!”,但后来当他知道我在深圳这个商海中仍然坚持搞应用基础理论研究时,他又满腔热情地鼓励我,为我出主意,提醒我尽快为自己的产品申请专利,以及如何和企业联合生产等等。尽管是80多岁的老人,他依然思路敏捷,头脑清楚,完全能适应90年代改革的大潮流。但是无情的病魔带走了他,从此我失去了一位时时关心和支撑我的慈祥的长者,细胞生物学界失去了一位权威,年青人失去了一位严格的导师。但是他的精神和学术思想将永远影响着我们这一代人,并将在我们这一代人的科研成果中不断地体现出来。

专论与综述

细胞谱系研究中的一种标记基因——lacZ 基因

何 维 吴鹤龄

(北京大学生命科学学院 100871)

细胞谱系在决定细胞表型中起重要作用,细胞谱系的知识对于理解执行发育选择的机制是十分必要的。80年代中期以前在揭示几种无脊椎动物的细胞谱系类型方面取得了重大进

展,在哺乳动物方面的研究过去主要依靠嵌合体动物的使用。近年来,人们使用特殊染料注射进入单个胚胎细胞的细胞质中,该染料在多次细胞分裂后仍能检测到,用这种方法观察了

细胞之间亲缘关系,从而补充了哺乳动物细胞谱系方面的工作。在上述方法中,细胞都是在发育的原肠形成前期阶段被标记的,在早期细胞谱系方面研究者们得到了较成功的实验结果,这些结果是经得起验证的。但是用这种方法对哺乳动物胚胎在体内后期发育中的细胞谱系研究就比较困难,如单一组织内细胞家族关系的决定^[1]。

为了研究原肠期和早期器官发生期间细胞的分布,有一种可用于观察细胞命运的原位细胞标记(*in situ cell marker*)是十分必要的。由于 *lacZ* 基因的表达易于检测和观察,表达产物对哺乳动物细胞无毒性, *lacZ* 基因做为一个很好的细胞标记已被应用于各方面的研究^[1-3]。

1986年, Sanes 等人^[1]构建了一个重组的缺陷逆转录病毒,它是由 *E. coli* 的 *lacZ* 基因插入到莫氏小鼠白血病病毒(*Muloney murine leukemia virus*)的基因组中构成的。病毒感染培养细胞的结果表明, *lacZ* 基因对细胞生活力和生长无可测到的有害影响。将该病毒通过子宫壁注入到子宫内的胚胎中,在注射后2—8天期间将胚胎和胚外膜解离下来,固定染色,在皮肤、头骨、脑膜、大脑、内脏卵黄囊、羊膜中均探测到 *lacZ* 阳性克隆。在内脏卵黄囊和皮肤中,他们鉴定出含有 *lacZ* 阳性克隆的细胞类型,从而得知标记细胞的谱系关系。但是该方法有许多缺陷,有些细胞对于感染可能是免疫的或 *lacZ* 基因不能在这些细胞中表达,这就需要构建新的病毒;另外无法将一个感染细胞的后代和其他感染细胞的后代区分开等等。用这种方法仅仅是研究了某一发育阶段的细胞谱系。

在整个发育阶段中利用 *lacZ* 基因来进行谱系研究是由 Beddington 等人^[4]首先进行尝试的。他们将大鼠中 β -肌动蛋白启动子(β -actin promoter)控制下的 *E. coli lacZ* 基因注入 PO 小鼠受精卵的原核中,获得了一个转基因小鼠品系。从转基因小鼠与 PO 小鼠交配得

到带有半合子的 ICM(*In ner Cell Mass*, 内细胞团)细胞,再通过显微注射导入 PO 小鼠来源的胚胎中,从而研究了在原肠形成和早期器官发生期间细胞的分布。 β -gal 活性表明, *lacZ* 基因的表达在第10天胚胎的所有外胚层衍生物中是普遍存在的。在滋养外胚层和原始内胚层中没有见到 β -gal 的酶活性。该实验中再一个重大不足是在注射前无法区分半合子和野生型的 ICM 细胞,这种无选择的注射使得工作量、时间、人力都大大增加。

1990年 Suemori 等人^[5]用 *C₅₇BL/6* 小鼠品系的囊胚建立的 ES 细胞系,通过电击法获得了7个表达 *lacZ* 基因的 ES 细胞系,他们选择其中一个 ES 细胞系(*MS 1-EL 4*),该细胞系在每个未分化的干细胞中均表现 β -gal 活性。将其注入胚胎后,可嵌合到各种组织中,并表现 β -gal 活性。这些组织不仅包括 ICM 的后代而且包括来源于滋养层的胚外外胚层。与 Suemori 同一研究小组的 Kadokwa 等人^[6]用上述细胞系在嵌合鼠中对表皮和血管的细胞谱系进行了分析。将这种细胞注入宿主胚泡通过恢复各发育阶段的嵌合胚胎,作者获得了一些很好的结果:发现原始外胚层的细胞和它衍生的表皮组织继续混合直至原条形成后期;在早期体节阶段,各种表皮细胞停止混合并产生小的紧密的细胞团;卵黄囊的血管是通过祖先细胞局部聚合形成的,而胚体的血管是通过少数血管形成细胞的增殖和生长而形成的。

lacZ 基因作为一种原位细胞标记在医学上的用途更是不可限量。在肿瘤发展(*tumor progression*)的研究中细菌 *lacZ* 基因作为一种表型标记具有高效性和敏感性。在病毒性肿瘤系统中,对于检查靶器官中微转移(*micrometastasis*)的形成以及肿瘤细胞与寄主器官微环境的联系, *lacZ* 基因在定性和定量方面均是一有力的工具。不仅可以追踪某种细胞迁移到那种组织中,还可以确定有多少细胞在该组织中。1990年, Lin 等人^[7]将 *lacZ* 基因引入人类 EJ *Ha-ras* 癌基因感染的 *BALb/c 3T3* 细胞中,

再将此细胞注入到无胸腺的裸鼠中,通过 X-Gal 染色,可以将肿瘤细胞同正常宿主细胞区别开。Southern blot 分析证明 lacZ 基因已经稳定整合入肿瘤细胞, X-Gal 染色可以敏感地测到含 lacZ 基因的肿瘤细胞,从而探测到在肺和其他包括脑和肾的器官中的微迁移灶。1992年, Lin 等人^[8]还用 lacZ 基因和碱性磷酸酶基因两种不同标记分别标记两类不同肿瘤细胞,研究两类细胞在肿瘤细胞微迁移过程中的相互作用。在基因治疗方面, lacZ 基因可用于许多应用领域的前期理论工作。遗传工程改变的成肌细胞可在体外合成和分泌高水平的人类生长激素(hGH),将此种细胞注入小鼠体内,在注射后至少3周内可在肌肉和血清中测到显著增加的hGH水平,那么,这种细胞用于稳定释放重组蛋白质的可行性如何?通过对表达 lacZ 基因的成肌细胞注入小鼠肌肉后的组化检查,发现许多注入的细胞已融合形成多核的肌管。从而肯定了上述方法的可行性^[9]。

lacZ 基因还可用来测定 ES 细胞在早期胚胎中的嵌合程度。Wood 等人^[10]用表达 lacZ 基因的 ES 细胞来分析 ES 细胞在早期胚胎中的嵌合情况,发现 ES 细胞在形态正常的胚胎中的嵌合程度在 40%—80%之间,在形态不正常的胚胎中的嵌合程度总是大于 90%。

在脊椎动物神经系统谱系方面,也有学者利用 lacZ 基因做了一定的工作^[11]。Arnold 等人^[12]近年来建立了一种新的方法,将颗粒轰击转染(particle-bombardment transfection)方法同器官类型切片培养(organotypic slice culture)技术相结合,对正在发育的中枢神经系

统的转录调控进行较精确的分析。揭示了大脑脂类结合蛋白基因的细胞特定调节区在伯格曼(Bergmann)神经胶质细胞,星形胶质细胞中。

总之,在哺乳动物细胞谱系的研究中,由于 lacZ 基因编码的 β -半乳糖苷酶具有特殊的酶活性,易于在细胞水平上检测和观察,受到了广泛的应用。有了这种原位的细胞标记,我们不仅可以在组织中将带有 lacZ 基因的细胞同其他类型细胞区别开,而且还可以追踪某种细胞的命运,从而为最终彻底了解哺乳动物细胞谱系的知识开辟了新的道路。

参 考 文 献

- [1] Sanes, J. R. et al., 1986, *EMBO J.*, 5: 3133—3142.
- [2] Bonnerot, C. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 6795—6799.
- [3] Gossler, A. et al., 1989, *Science*, 224: 463—465.
- [4] Beddington, R. S. P. et al., 1989, *Development*, 106: 37—46.
- [5] Suemori, H. et al., *Development*, 29: 181—186. 1990.
- [6] Kadokawa, Y. et al., 1990, *Cell Differ. Dev.*, 29: 187—194.
- [7] Lin, W. C. et al., 1990, *Cancer Res.*, 50: 2808—2817.
- [8] Lin W. C. et al., 1992, *Am. J. Pathol.*, 141: 1331—1342.
- [9] Barr. E. and Leiden, J. M., 1991, *Science*, 254: 1507—1509.
- [10] Wood, S. A. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 4582—4585.
- [11] Berry, S. C. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 693—697.
- [12] Arnold D. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 9970—9974.

《实验生物学报》收取送审费和发表费的实施办法

1. 凡投寄本刊的稿件,每篇收取送审费 50 元,以支付该稿的审稿费、邮寄费等。无论文章发表与否,该款不再退还。

2. 根据中科院 出版图书情报委员会(92)出字 33 号文件精神,本刊自 1996 年第 2 期起发表费调整为每版面 120 元(包括随文图表、参考文献、图版说明等);铜版纸图版每版 200 元(胶印)。

3. 发表费通知单在寄作者校样时一并附上。

4. 送审费请连同稿件寄交上海岳阳路 320 号中科院上海细胞所《实验生物学报》编辑部收(邮编 200031)。

5. 发表费请汇至中国科学院上海细胞生物学研究所(帐号: 2210—08808327, 工商银行徐汇区办事处)。

《实验生物学报》编辑部

1996 年 3 月