

浓度为 $10\mu M$ 就使胡萝卜组织培养的邻-氨基苯甲酸合成酶(25)抑制 90%，而该组织中的 Trp 浓度却达 $80\mu M$ 。那么，用于产生反馈抑制效应的氨基酸浓度是否适合于体内的状况呢？似乎是某氨基酸反馈调节的有效浓度一般要低于其在细胞内的总浓度。解释其原因是细胞内的分室起着调节作用，氨基酸分布在细胞内五种库(细胞质的、叶绿体的、线粒体的、调节的和代谢的)之中。豌豆的酶(14)定位在质体内的实验支持这种看法^[16]。

在发育过程中代谢的控制也不是始终如一的。随着植株变老，Pro 生物合成的调节程度减低。随着玉米幼苗生长，高丝氨酸脱氢酶(5)对 Thr 的反馈抑制变得不那么敏感^[17]。胡萝卜悬浮培养生长的对数后期，酶(3)两个同工酶中对 Lys 敏感的一个同工酶活力升高十倍，而对 Thr 敏感的那个同工酶则一直保持恒定的活力^[14]。可见植物个体不是离体反应的简单装配，而是受遗传决定与环境相统一的整体，细胞是受整体制约的，故酶的调节会随植株的不同部位和发育阶段而变化。

参 考 文 献

- [1] 何卓培等, 1979, 植物生理学报, 5:9—18.
[2] Wightman, F. & Forest, J. C., 1978
Phytochemistry, 17:1455—1471.

- [3] Stewart, C. R., 1979 *Plant Sci. Letter*, 14:269—273.
[4] Matthews, B. F. & Widholm, J. M., 1978 *Planta*, 141:315—323.
[5] Dougall, D. K. & Fulton, M. M., 1967 *Plant physiol.*, 42:941—945.
[6] Widholm, J. M. & Matthews, B. J., 1978 *In vitro*, 14:356.
[7] Gengenbach, B. J. et al., 1978 *Crop Sci.*, 18:472—477.
[8] Mazelis, M. et al., 1977 *FEBS Lett*, 84:236—240.
[9] Woodin, T. S. et al., 1978 *Plant Physiol.*, 61:949—952.
[10] Carlson, J. E. & Widholm, J. M., 1978 *Physiol. Plant*, 44:251—255.
[11] Widholm, J. M., 1973 *Biochem. Biophys. Acta*, 320:217—226.
[12] Aarnes, H., 1977 *Plant Sci. Letters*, 9:137—145.
[13] Shewry, P. R. & Mifflin, B. J., 1977 *Plant physiol.*, 59:69—73.
[14] Davies, H. M. & Mifflin, B. J., 1978 *Plant physiol.*, 62:539—541.
[15] Dougall, D. K., 1977 In *Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application*. (Barz, W. et al., ed.), pp. 77—85, Springer-Verlag, Berlin.
[16] Mifflin, B. J. et al., 1979 In *Nitrogen Assimilation of Plant*. (Hewitt, E. J. & Cutting, C. V., ed.), pp. 335—358.
[17] Matthews, B. J. et al., 1975 *Plant Physiol.*, 55:991—998.

小鼠胚胎性癌细胞研究的一些近况

丛笑倩

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

胚胎性癌细胞 (*Embryonal Carcinoma*, 简称 EC 细胞) 是畸胎瘤的恶性干细胞, 它既有恶性生长性质, 又有类似于早期正常胚胎细胞的多能性, 能分化为神经、皮肤、肌肉、软骨和腺管等组织。EC 细胞注射到同系小鼠腹腔后, 可在腹水中分化并聚积成结构类似于早期胚胎的细胞群, 称为拟胚体。

EC 细胞不仅是研究哺乳类胚胎发育和遗传的极好实验材料, 而且也是探讨肿瘤形成和细胞分化及其机制的较理想的模型。近几年来利用这个模型进行研究的范围越来越广, 涉及到肿瘤病理学、免疫学和发育生物学等各个领域。本文仅就 EC 细胞起源, 性质及其在肿瘤生物学研究中的现状作一简述。

一、EC细胞的起源

EC细胞存在于恶性畸胎瘤组织。在小鼠129/terSV品系,自发性睾丸畸胎瘤高达32%,其中多数表现为良性。异位移植12.5—13.5天的小鼠胚胎生殖嵴75%移植诱发出畸胎瘤,也证明这种肿瘤起源于原始生殖细胞。但14天后的胚鼠生殖嵴就失去形成畸胎瘤的能力。为什么胚胎生殖嵴细胞形成畸胎瘤能力只有两天的时相性质目前还不了解,这可能与生殖嵴细胞的分化决定状态或其对外界环境反应的敏感性不同有关。另一方面,若把2细胞期卵裂球直到卵柱期(7天全胚)的小鼠胚胎同样作异位移植,也能诱发出恶性畸胎瘤,8天以后胚胎则不能产生畸胎瘤,但可长出良性畸胎瘤。这说明8天前的胚胎多能细胞在异位环境中能转化为EC细胞。因此多年来关于EC细胞起源主要有两种看法:即或起源于原始生殖细胞,或起源于发育异常的早期胚胎细胞。自发或实验诱发的畸胎瘤研究说明了这两种看法都有一定的根据。

既然多能胚胎细胞能被诱发产生EC细胞,那么,这种多能细胞属于哪一胚层呢?根据超微结构研究,EC细胞可能起源于胚胎的外胚层。卵柱期的内胚层细胞高度分化,而外胚层细胞呈未分化样,极相似于EC细胞。Diwin和Stevens(1976)把7天的胚胎分成三部分:原始内胚层,胚胎外胚层和胚外外胚层,分别作异位移植。30天后只有胚胎外胚层形成多种分化组织和大量未分化的EC细胞。

已经知道,胚胎的多能干细胞存在于胚泡的内细胞群(*Inner cell mass*,简称ICM)和卵柱期的胚胎外胚层,但目前还不知道这种多能性质何时消失。异位移植8天后的胚胎仅能形成良性畸胎瘤,这表明8天后的整个胚胎细胞由于受到邻近细胞相互作用,发育潜能逐渐受到限制,发生恶性畸胎瘤的可能性大大降低。现有证据表明,从胚胎和生殖嵴细胞诱发的畸胎瘤在类别上似乎不完全相同,由生殖嵴

细胞来的畸胎瘤总是带有雄性染色体组型;由胚胎获得的畸胎瘤有雌雄两性的染色体组型。另外,在一些小鼠品系中,例如C₃H品系能用胚胎诱发畸胎瘤,但生殖细胞不形成畸胎瘤,同时这种品系也没有自发睾丸畸胎瘤。雌性原始生殖细胞或第14天后的胚胎生殖嵴细胞不能诱发畸胎瘤可能与生殖细胞成熟程度有关,雌性原始生殖细胞在胚胎发育第14天进入减数分裂,而雄性原始生殖细胞至出生后8—10天才进行减数分裂。因此畸胎瘤形成的抑制似与胚胎细胞分化和原始生殖细胞的早期成熟程度相关。

二、EC细胞的性质

EC细胞直径一般为12—14微米。超微结构显示未分化的胚胎细胞特性:核大,多为常染色质,核仁也大;胞质结构简单,散布着大量游离的核糖体和为数甚少的线粒体。不论起源于睾丸、卵巢或胚胎的EC细胞,均有相同的形态结构,甚至反复传代的体外培养EC细胞也是如此^[1]。

在形态学特点上,EC细胞和其他肿瘤干细胞相同,接种到小鼠腹腔或皮下经3—4星期后能致宿主死亡,但EC细胞仍然具有独特的分化为各种体组织的能力,即使通过多次体内移植或体外传代也保持着分化多能性,甚至将一个EC细胞注射到腹腔内也能得到多种分化的体组织。从实体瘤或拟胚体所得到的一些体外培养细胞,分化能力并不完全相同。这些差别反映着分离的EC细胞可能处于不同的决定状态,因而在体内表现出不同的分化能力;也可能是在移植和传代过程中EC细胞基因组中部分基因发生选择性激活的结果。分化能力部分地受限制的“少能”或“单能”细胞体内接种后产生少数几种或一种类型的组织;分化能力完全受限制的“无能”EC细胞形成的畸胎瘤则缺乏分化组织,几乎全为恶性EC细胞。近年来有证据表明,在外源诱导物(例如维生素A类衍生物)作用下,“无能”EC细胞在体外

同样地也能分化为内胚层细胞^[2]，如进一步再用双丁酰环化 AMP 处理，则又可分化为类神经细胞^[3]，因此，除恶性生长性质外，保持分化能力是 EC 细胞另一最基本的特性。

拟胚体有简单拟胚体和囊性拟胚体两种。简单拟胚体内部是 EC 细胞团，外层是相似于正常胚胎卵柱的脏壁内胚层；囊性拟胚体为两层或数层分化细胞围绕的囊泡结构。然而，根据组织学检查拟胚体的外层是脏壁内胚层，而胚泡的外层则是滋养层。近来报告，畸胎瘤拟胚体和正常小鼠早期胚胎任何结构并不完全相似。而用免疫手术法 (Immunosurgery) 从胚泡分离出来的 ICM，经体外培养所形成的结构才是典型的拟胚体^[4]。

无论就形态或发育行为而言，EC 细胞和胚胎细胞有许多相似性。EC 细胞和正常胚胎细胞的关系可概括如图示。

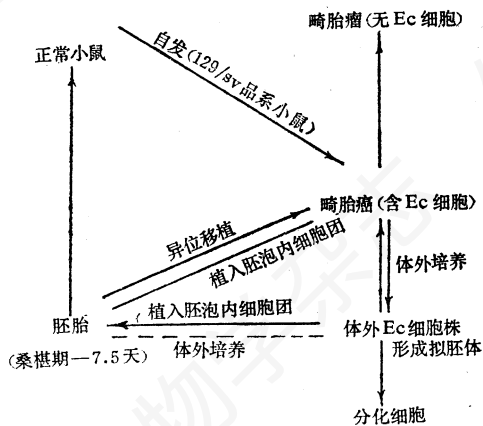


图 1 EC 细胞和正常小鼠胚胎的相互关系
虚线表示从正常早期胚胎细胞分离的多能细胞经体外培养时细胞行为和特性类似于 EC 细胞

三、EC 细胞的染色体

早期对移植型和体外培养的 EC 细胞染色体组型分析表明，EC 细胞具有正常的核组型，因此曾认为这种双倍体核组型是使 EC 细胞保持分化能力的遗传基础。近年来发现，几乎所有 EC 细胞株，即使接近双倍体，也存在着三体 and 单体以及染色体部分丢失和增加，Y

染色体缺失和出现中部着丝点染色体等异常现象。似乎染色体异常并不导致 EC 细胞失去多能分化性质。细胞松弛素 B 诱导的四倍体 EC 细胞同样保留着分化能力^[5]。还发现 OTT6050 畸胎瘤 (从 6 天龄胚胎异位移植到睾丸膜下诱发的) 衍生的拟胚体均缺乏 Y 染色体^[6]。然而，当把这种 EC 细胞注射到正常胚泡，却能发育成带 Y 染色体的功能性精子^[7]。因此，OTT6050 畸胎瘤衍生的一些亚株细胞除了 Y 染色体丢失外，也可能是 Y 染色体移位到常染色体上去了。小鼠胚胎卵裂期间，两条 X 染色体都是活跃的，胚泡形成后，滋养层 X 染色体失活，而内细胞团两条染色体仍然都活跃；在 EC 细胞也已重复观察到两条 X 染色体都有活力。近来证明 EC 细胞在体外分化期间两条 X 染色体失活。这些结果表明胚胎分化与 X 染色体关系密切，随着胚层或 EC 细胞分化至少有一条染色体失活；X 染色体失活和胚胎或 EC 细胞分化的这种关联，提示性染色体功能活动的“开关”和细胞分化中常染色区域选择地“开关”存在着类似的基本调节机制。

四、EC 细胞分化的控制

畸胎瘤干细胞多方向分化途径使有可能探讨控制这种肿瘤细胞的基因表达。体外 EC 细胞用 5-溴脱氧尿苷处理，2—4 天内不仅细胞形态发生显著变化，而且对多瘤病毒和 SV₄₀ 病毒感染更为敏感^[8]。然而，5-溴脱氧尿苷处理的细胞并不改变细胞多能性质。多能 PCC₄ 细胞用突变原亚硝基胍处理后，获得耐受 8-氮鸟嘌呤的瘤细胞株，从这些突变细胞又得到分化能力明显减少以及长瘤率降低的一些细胞亚株^[9]。此外培养液组成可能促进或减缓 EC 细胞分化。EC 细胞在体外分化需葡萄糖，小牛血清和人脐带血清能促进胚胎和拟胚体分化，而成年人血清，牛血清和大鼠血清却无这种作用。

近年来，随着显微操作技术发展，把 EC 细胞注射到小鼠受精后 4 天左右的胚泡内，然

后移植到假孕的另一小鼠子宫, 胚泡着床并发育成健康的功能正常的基因嵌合体小鼠。这种嵌合体, 尽管带有 EC 细胞的基因标志, 但将其组织细胞移植至组织相容性小鼠皮下, 决不会再形成肿瘤^[10]。显然, 这一结果说明 EC 细胞在正常胚胎细胞诱导下参加正常组织的分化, 并失去其恶性生长的性质。

EC 细胞与其他类型细胞杂交同样也可以研究杂交细胞中的基因表达和控制。双倍体和四倍体 EC 细胞与小鼠 3T₃ 细胞的杂交体形态象纤维母细胞, 也无恶性生长性质, 似乎肿瘤特性为隐性表型。但也有相反的报告, PCC₄ 多能 EC 细胞与胸腺细胞或 Friend 红白血病细胞杂交体都保留着体外 EC 细胞形态学和生化特点, 接种小鼠后, 产生大量未分化细胞和一些分化组织。这一结果表明未分化细胞某些表型为显性, 而分化细胞基因组的某些表型被抑制。近来 McBurney(1977)证明 EC 细胞和 Friend 红白血病细胞的杂交细胞在诱导物存在下能够产生血红蛋白。因此, EC 细胞和其他细胞杂交体的基因分析目前虽有一些工作, 但还不能得到一致的结果, 需要进一步深入分析杂交细胞基因组是如何协同作用的。

五、EC 细胞中胚胎性基因产物

由于 EC 细胞类似于早期胚胎细胞, 可以想象必然存在一些胚胎性的基因产物。包括细胞表面蛋白, 细胞质分泌性蛋白以及细胞核蛋白。Solter 和 Damjanov (1979) 在这方面已有较详细评述。

个体发育和器官发生期间, 细胞表面蛋白在细胞和细胞间相互作用中起着重要作用。EC 细胞表面存在着一些和正常胚胎细胞类似的抗原, 其中 F₀ 抗原几乎存在于所有 EC 细胞, 着床前小鼠胚胎和着床后的胚胎外胚层细胞, 同时也存在于小鼠、人体和其他哺乳类动物的精子, 而在其他一些小鼠非畸胎瘤肿瘤细胞却未检出。免疫沉淀法证明 F₀ 抗原的分子量和亚单位结构与 H-2 抗原 D 和 K 位点的

产物非常相似, H-2 和 F₀ 抗原的分子量都是 44,000, 都有 12,000 的亚单位。但两者的确切关系目前还不清楚。兔抗 F₀ 抗原的抗体 Fab 对小鼠早期胚胎发育有明显的阻滞作用。F₀ 细胞免疫的雌鼠, 在其妊娠早期胚胎就受到严重干扰^[11]。这些结果说明 F₀ 抗原在早期胚胎发育和分化中起着重要作用。用免疫荧光和微量细胞毒方法还发现人体畸胎瘤细胞和小鼠 EC 细胞存在着共同抗原, 提示 EC 细胞有可能用于临床畸胎瘤的诊断。

EC 细胞分化期间, 细胞表面不同的植物凝集素受体数量发生相对变化。体外分化后的细胞碱性磷酸酶活性明显降低。EC 细胞分化为内胚层细胞时, 表皮生长因子 (EGF) 受体也明显增加。带畸胎瘤的宿主腹水中存在着一类由几种糖蛋白成份组成的畸胎瘤粘附因子 (TAF), 对 EC 细胞彼此间凝集和粘附起着重要作用。这些因子的研究对了解 EC 细胞分化机制都是密切相关的^[12]。

EC 细胞存在着早期胚胎型的同功酶, 例如肌酸激酶, 醛缩酶, 磷酸甘油酸变位酶和烯醇酶等。畸胎瘤中由于存在着分化或正在分化中的体组织, 组织化学研究证明这些胚胎型的同功酶在分化过程中逐渐被成年型所代替^[13,14]。由于胚胎型同功酶在其他类型的肿瘤中也同样存在, 因此目前还不能肯定同功酶型式是否反映细胞分化状态或肿瘤生长的生理状态。

EC 细胞不产生甲胎蛋白 (AFP), 只是在 EC 细胞分化为内胚层细胞后才能合成。AFP 位于实体型畸胎瘤的内胚层囊腔和拟胚体外层细胞。已经证明, EC 细胞和成年小鼠胸腺细胞杂交后接种而产生的畸胎瘤也能合成 AFP, 并分泌到宿主血清中。此外, 分化中的 EC 细胞也能合成和分泌生物学活性物质, 其中以血纤维蛋白溶酶原激活因子 (PGA) 和抗炎症物质研究得最多。未分化的 EC 细胞本身 PGA 含量不高, 腹水中的拟胚体移至体外培养后不久, PGA 增加。无能 EC 细胞被外源诱导物诱导分化为内胚层细胞时, PGA 也明显

增加^[3]。近来 Burke 等 (1978) 证明多能 EC 细胞并不产生干扰素, 对其作用也不敏感, 当这种 EC 细胞体外分化时, 却产生干扰素, 并对其作用也敏感起来。似乎那些担负产生干扰素的基因和合成干扰素的受体在 EC 细胞中并不活跃, 而是随着分化开始表现出活性。

染色体组蛋白和非组蛋白常视为细胞分化期间控制基因表达的分子物质, 但至今 EC 细胞中有关这类染色体蛋白的报告并不多。根据 EC 细胞, 肌母细胞和成纤维细胞组蛋白的比较分析, 并未发现彼此间的差别。随着双向电泳分辨力的提高, 发现了 EC 细胞分化期间非组蛋白存在一些区别, 有些蛋白消失, 另一些蛋白增加^[15], 但这些蛋白变化和分化关系还不了解。最近发现不同 EC 细胞株中染色体非组蛋白并不完全相同。看来要确立未分化 EC 细胞共同的非组蛋白图谱是比较困难的。

六、小 结

从上面谈到的几方面问题可以看出, EC 细胞来源于原始生殖细胞和未分化的胚胎细胞。同时 EC 细胞是一种恶性癌细胞。在体内或体外分化时可失去其恶性生长性质, 这就表明 EC 细胞可用于研究癌变和分化之间的关系。EC 细胞恶性生长行为可能类似于早期胚胎细胞的生长功能。正常多能胚胎细胞转变为恶性 EC 细胞同样具有可塑性质。这些问题的研究至少可对癌变的外遗传论提供依据。

通过体外培养获取 EC 细胞, 要比从正常胚胎取材容易得多。EC 细胞在体内和体外均能表现出分化性质, 因此又为研究哺乳动物胚胎细胞决定和分化过程提供了一种有效的手段; 另一方面, EC 细胞和胚胎细胞至少具有一种除精子以外其他成体组织所没有的共同抗原, 它们的 H-2 抗原均不表达或很少表达。这两类细胞在免疫学上的相似性, 使有可能利用 EC 细胞探讨胚胎细胞抗原性和其他与个体发育相关的免疫学问题。

细胞杂交, 胚泡注射技术和嵌合体形成提

供了新的实验分析技术。EC 细胞和荷载突变基因的细胞融合后, 注入小鼠胚泡, 使它们参与正常胚胎发育。这样, EC 细胞可以作为载体把一些突变基因引入小鼠体内, 从根本上使有可能在体内分析杂交细胞染色体的基因活动。在今后若干年内, 癌细胞恶性生长和胚胎细胞分化的基因表达调控, 可能是肿瘤生物学和发育生物学共同关心的问题之一, 可以预料从事这方面研究的工作者必将越来越多地采用 ED 细胞作为实验材料。而这方面的任何重大进展也必然加深我们对肿瘤发生的机理及其基因表达的调控问题的认识。

参 考 文 献

- [1] Damjanov, I. and Solter, D., 1975 In "Teratoma and Differentiation" (M. I. Sherman and D. Solter eds). Academic Press, New York, pp. 209—220.
- [2] Strickland, S. and V. Mahdavi, 1978 *Cell*, 15:393—403.
- [3] Kuff, E. L. and J. W. Fewell., 1978 *Dev. Biol.*, 77:103—115.
- [4] Martin, G. R., et al. 1977 *Dev. Biol.*, 61: 230—244.
- [5] McBurney, M. W., 1976 *J. Cell. Physiol.*, 89:441—456.
- [6] Graham, C. F., 1977 In "Concepts in Mammalian Embryogenesis (M. I. Sherman, ed) MIT Press, Cambridge, Massachusetts, pp. 315—394.
- [7] Mintz, B. and Illmensee, K., 1975 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:3585—3589.
- [8] Swartzendruber and Lehman, J. M., 1975 *J. Cell Physiol.*, 85:179—188.
- [9] Boon, T. and Kellermann, O., 1977 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:272—275.
- [10] Illmensee, K. and Stevens, L. C., 1979 *Scientific American*, 4:86.
- [11] Hamilton, M. S. et al., 1979 *Transpl. Proc*, 11(1):1069—1071.
- [12] Oppenheimer, 1975 *Exp. Cell. Res*, 92: 122—126.
- [13] Adamson, E. D., 1976 *J. Embryol, Exp. Morphol*, 35:335—367.
- [14] Fletcher, L. et al., 1978 *Dev. Biol.*, 65: 462—475.
- [15] Faily-Cerpin, C. and Martin, G. R. 1979 *Cell Differentiation*, 8(1):61—73.