



小鼠红白血病细胞分化的诱导

报告人：C. Friend 教授

美国 Mount Sinai 医学院实验细胞学中心主任

报告日期：1979. 6. 6.

在我们的实验里，建立了小鼠病毒（按即 Friend 病毒——译者）所诱发的红白血病组织培养细胞株，从而有可能研究肿瘤发生与正常细胞生长的调节机制之间所涉及的复杂的相互关系。当前有许多人从事这项工作。这种细胞在某些情况下能接受刺激，进行分化，因此使详尽的研究类红血细胞分化的分子控制成为可能。

把 Friend 病毒诱发白血病濒于晚期的小鼠的脾脏碎块作皮下接种，可以形成肿瘤，但肿瘤细胞并没有类红血细胞的特征，而是类似网织细胞肉瘤。只有把这种细胞接种到经致死剂量照光过的小鼠，或者在组织培养中生长时，其类红血细胞的来源才变得明显。在这些培养的细胞或生瘤小鼠的脾脏细胞群落里，可以看到这种白血病所特有的恶性细胞，以及处于不同成熟水平的成红血细胞。这些细胞是受到了低活力的白血病病毒的慢性感染。在移植于正常小鼠后它们回复未分化状态，并形成网织细胞肉瘤。白血病小鼠的血象，显示类红血细胞疾病的性状，组织培养的细胞也保持相同的特征，存在着大的幼稚型白血病细胞，核仁显著，以及分化较为成熟的、直至着色正常的正成红血细胞等小型细胞。

当发现了二甲基甲砒 (DMSO) 能刺激红白血病细胞的分化之后，我们的研究工作得到了很大的动力。把这种化合物加到培养白血病的生长液里，调节正常分化机理的开关就被打开了。对于指导它们进行分化的信号变为有反应性，并合成血红蛋白——类红血细胞的功能性蛋白。在含 20% DMSO 培液里，生长的细胞在进入对数级生长之前，先出现一个 20 小时的停滞期，这是由于细胞周期受阻于 G_1 期，不过第

四天细胞的密度接近对照组。使用现在已知的、有诱导物作用的其他各类化合物处理时，也看到 G_1 期延长的现象。可是这似乎并不能作为类红血细胞分化的先决条件，因为使用强诱导物如放线菌素 D 或次黄嘌呤，就不出现此种情况，而对 DMSO 有抗性的细胞株则发生此种现象。引人兴趣的是 Gambani 等的工作他们发现新合成的 mRNA 首先是在同步化的细胞培养物的 G_1 期细胞中检测到的。

用常规的联苯胺染色方法检查合成血红蛋白的细胞。联苯胺阳性 (B^+) 细胞在 DMSO 处理后两天出现，以后随时间的延长而迅速增加。第四天时 85~95% 的细胞都呈 $B^{(+)}$ 反应，未经 DMSO 处理的细胞呈 $B^{(+)}$ 反应者约为 1%。把经 DMSO 处理 4 天的细胞，再接种到相同品系小鼠，其恶性程度比未受处理的差，接种动物的存活期明显延长。恶性减弱或许是由于 85% 的接种细胞已经达到正成红血细胞阶段，在生长停止前只不过再能进行少数几次分裂，而肿瘤可能来源于 15% 仍保持 $B^{(-)}$ 反应的未受累及的细胞。

诱导物处理的细胞还产生与正常红细胞生成期间许多相似的生化变化。一般来说，DMSO 处理的细胞中大分子的合成是沿循其生长模式的。在整个培养期间标记前体参入 DNA、RNA 和蛋白质的绝对量均较未处理的对照组减少。此外，处理的细胞也发生磷酸盐代谢的变化。Harel 和 Laccour 的实验表明，细胞暴露于 DMSO 30 分钟之后，磷酸盐参入磷脂的受抑制达 39%。这种减少并非归因于前体库的改变，因为磷酸盐的摄入和可溶性有机化合物的磷酸化只抑制了 13%。抑制磷脂合成发生在 RNA 和蛋白质

的受抑制之前,后者是在处理一小时后的细胞先检测到的。这种效应或许是在复杂的分化过程中所表达的早期步骤的信号,因为磷脂是膜的重要成分,据认为诱导物对其流动性有影响。

最近Gazitt曾测定了分化的红白血病细胞不同部分的蛋白质合成的积累率。含有或不含诱导物的组织培养细胞,每日以 ^{35}S -蛋氨酸脉冲标记3小时,然后进行细胞成分的分部,分离质膜、胞液及微粒体—线粒体部分,并用聚丙烯酰胺凝胶电泳把蛋白分开。我们追踪了红细胞的spectrin(红细胞的一种膜蛋白——译者)和肌动蛋白的出现。特别引人兴趣的是,大部分spectrin与胞液相伴随,只有一小部分与质膜和微粒体相联系。肌动蛋白则等量地存在于胞液和质膜部分,少量存在于微粒体部分。另一项重要的观察是,肌动蛋白(分子量45K)和spectrin(分子量220~240K、复式结构)两者均以等量聚集在受诱导的和未受诱导的细胞里。蛋氨酸的参入率在凝胶电泳放射自显术中显示,无论在受诱导的还是未经诱导的细胞中,spectrin和肌动蛋白合成的速率相同,证实了前述的结果。

把细胞用 ^{32}P 脉冲标记,在所有部分磷酸盐的参入均降低。凝胶电泳放射自显术表明,在质膜蛋白方面肌动蛋白是磷酸化的,而spectrin则没有。这种情况在胞液部分所见尤为明显。用双抗体间接荧光技术所获得的结果恰好相反,spectrin集聚在膜上面。两项结果的不同可能由于细胞暴露于诱导物中不久就体积缩小,因此spectrin或许在较小的分化中的细胞里较为集中,而其总含量并没有增加。

DMSO也使受处理细胞的DNA结构发生改变。从对照组和受处理组的细胞提取DNA,经碱性蔗糖梯度离心进行比较;在 ^3H -胸腺嘧啶标记后暴露于DMSO 24小时的细胞,其DNA在密度梯度中有两个峰,主峰为140S,较小峰在17S左右。与对照组相比,DMSO处理样品的沉降值和主峰大小都有所下降。细胞在标记后暴露于DMSO 30小时,主峰的S值甚至降

到约120S(用噬菌体 $\phi 105$ 的DNA、37S为标志物)。但上述实验处于两个峰区之间沉降比较缓慢的DNA却在量上有所增加。这些变化是同实验材料中单链DNA断裂的累集相一致的。对剂量与时间存在着依赖性的效应,在使用其他诱导物时也都可以看到。不过单链DNA的断裂是否就同控制细胞分化有关则尚待确定,因为抑制细胞分化和血红蛋白合成的化合物,例如皮质醇(HC)以及地塞米松(DEX)等甾体激素似乎并不能阻遏上述现象。生长在含DMSO和HC(1mM)培液中的细胞,血红素及珠蛋白的抑制率达90%,珠蛋白mRNA含量也受到同样程度的抑制。与单用DMSO处理的细胞相比,在DMSO及HC共同处理组中珠蛋白mRNA含量降低很多。这一情况表明HC是作用于转译前的阶段。除去珠蛋白外,其他任何主要蛋白均无变化。在DMSO与HC共同处理的细胞中单链DNA的断裂未见消除,可是数量上减少了,因此这种现象在分化中的作用还是不清楚的。

甾体激素抑制DMSO诱导细胞分化这一事实,促使我们测定了这种细胞糖皮质激素受体的存在,并发现在未经处理的细胞上存在对DEX有高度亲和性的受体。 ^3H -DEX的特异性结合是剂量依赖性的,在 10^{-8}M 浓度下几乎所有结合点均被占位,而用DMSO处理后导致分化中的细胞结合位点数目减少。脱氧皮质素(10^{-9}M)或孕酮(10^{-6}M)有阻遏DEX的效用。已知这类化合物都能特异地阻遏DEX结合到糖皮质激素的受体上。证实了未受处理的红白血病细胞上存在着糖皮质激素受体,以及经DMSO处理后其数目的减少,从而提示甾体激素对诱导分化的阻抑作用可能是通过受体的介导。

嘌呤的代谢也出现变化。这种细胞失去了从小分子重新合成蛋白的能力,可是仍象正常红细胞生成一样,保持着酶的补救支路(salvage pathway)。一种与类红血细胞分化有关的酶—碳酸酐酶有增加,并出现红细胞膜抗原。用荧光抗体技术检测的spectrin和血型糖

蛋白 (glycophrin) 似也见增加, 但鉴于我们在这些蛋白的合成和累积方面所获得的新的资料, 上项结果仍待讨论。细胞体积的减小, 只具有有限的自我更新能力。

DMSO调节红白血病细胞基因表达的机理仍属未知。不同类别的许多其他化合物也有在这一细胞模式系统中诱导血红蛋白合成的相同效力。这些诱导物中的大多数都引起细胞膜的改变。象DMSO这样的极性溶剂和双乙酰胺, 都能引起受处理细胞的膜的流动性和通透性减弱, 以及单链DNA的断裂。脂肪酸和嘌呤是天然存在的产物, 还没有证据表明这些化合物对红白血病细胞有生理功能。丁酸和次黄嘌呤能使DNA结构发生变化, 并可能影响细胞表面组份。血红素本身并不是一种特殊有效的诱导物, 但同DMSO一起确起着协同作用。对细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 腺苷酶有特异结合作用和抑制作用的强心苷 (cardiac glycoside), 即箭毒 (ouabain), 在抑制摄入 K^+ 的浓度时, 是一种很好的诱导物, 可是这种对 K^+ 的依赖并不象是其他诱导物所共有的一种特性。另外, 放线菌素D是具有诱导能力的代谢抑制物的一个例证。

诱导细胞分化的抑制物也来源于类别很不相同的化合物。特别使人感兴趣的是一些抑制物对某些细胞株也能起诱导物作用。我们最近曾有激发一拮抗作用的密切相关的简单生物性化合物进行了实验研究。这些结果或许可能有助于阐明各种无关联的诱导物和抑制物在触发红白血病细胞复杂的调节过程中的一些问题。

自从Gusella和Housman证明了一些嘌呤及其类似物属强诱导物之后, Lacour和Harel又研究了嘌呤素的氨基核苷 (AMS) 的效用。在结构上这种化合物是腺嘌呤和次黄嘌呤核苷结构的上面部分。细胞培养后不同时间加以浓度各异的AMS, 在96小时后对培养细胞作 $\text{B}^{(+)}$ 细胞计数, 结果是剂量依赖性的。AMS浓度为5微克/毫升时, 超过90%的细胞呈 $\text{B}^{(+)}$ 反应。象在受DMSO处理的细胞所看到的一样, 与对照组相比AMS也引起细胞繁殖轻度的延滞, 不

过在实验终了时两组细胞又相近似。没有诱导物作用的次黄嘌呤核苷能抑制AMS所诱导的细胞分化。两次实验结果均表明, 细胞培养开始时 (T_0) 同时加入次黄嘌呤核苷和AMS, 96小时后作 $\text{B}^{(+)}$ 细胞计数, 在20微克次黄嘌呤核苷和AMS一起加入时, 细胞分化完全受到抑制。但是次黄嘌呤含量提高至2毫克/毫升时也不产生细胞毒性。倘使在开始先用AMS处理24小时, 随后再加入次黄嘌呤核苷, 抑制分化的效用就见减弱。另外又检测了许多其他嘌呤衍生物对AMS诱导细胞分化的抑制作用。腺嘌呤核苷几乎象次黄嘌呤核苷同样有效, 鸟嘌呤核苷对细胞有毒性作用, 无抑制效用; 但次黄核苷酸 (次黄嘌呤核苷的衍生物) 却有抑制作用。由于次黄核苷酸也是腺苷酸及鸟苷酸的前体, 因此也把这两种核苷酸的混合物作了检测, 结果只观察到微弱的抑制活性。单用多聚次黄嘌呤核苷酸就能抑制30%AMS诱导的细胞分化。

用AMS处理细胞培养物, 也抑制RNA的合成。 T_0 时在培养物中只加AMS (5微克/毫升), 或加AMS再加次黄嘌呤核苷 (20微克/毫升), 温育24小时后分别用 ^{32}P 标记1小时或 ^3H -尿嘧啶标记2小时的细胞测定RNA的合成。与AMS处理的细胞相比较, 在有次黄嘌呤核苷存在时, RNA合成有些增加, 不过在有次黄嘌呤核苷存在时AMS的效用也从未完全恢复。单用AMS处理或结合次黄嘌呤核苷共同作用的细胞, 其RNA含量与抑制RNA合成的结果是相平行的。除加以AMS之外, 再加次黄嘌呤核苷虽导致RNA含量增加, 不过其水平仍低于未经处理的对照组细胞。此项结果是Judinski和Ellem所报道的次黄嘌呤核苷不能抵消AMS的摄入相符合。

AMS和次黄嘌呤核苷两者都是在低浓度时就具有高度活性的物质, 而且没有细胞毒性作用, 所以它们的作用很可能是特异性的。它们之间相互作用进一步的生化研究, 有可能弄清这个模式系统中与细胞分化有关的机制。

(姚曾序摘译)