

测定,放射自显影银粒定量分析等等。但该方法受输入设备限制,不能直接对面积较大的整个颗粒分布的区域进行处理,使得该方法有一定的局限性。遇到这种情况,可以对整个区域的多个部位逐次进行测算,然后求其平均值作为最后结果,以此来弥补上述局限性所造成的误差。然而这样做增加了处理时间。另外由于数据采集系统和微处理机之间的数据通道不是DMA形式也延长了处理时间。为此对于大面

积较复杂的图像处理问题,就必须建立分辨率高的图像输入装置。

参 考 文 献

- [1] 曾弥白,王新民。1984。实验生物学报, 17(2):219—243。
 [2] Groen, F. C. A, Verbeek, P. W. and Ploes, W. Van der, 1977, Computation of DNA-based parameters from chromosome scans. From Informatik-Fachberichte 8, digitale 8, digitale Bildverarbeitung (Herausgegeben Von h. -H. Nagel):21—30.

细胞工程讲座

动物细胞工程的现状和展望

叶 敏

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

70年代开始,由于DNA重组和细胞融合技术的迅速发展,使生物工程进入了一个崭新的发展阶段。据不完全统计全世界生物工程公司近400个,美、日、西欧各国以及苏联等无一不卷入在这场技术革命中,有人估计到2000年全世界生物工程的总经费将达640亿美元左右,生物工程热正波及着整个世界。

作为生物工程主体之一的细胞工程,由于淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体的大力发展和应用,也在迅速崛起,在我国,单抗的研制在最近几年中也如雨后春笋。然而细胞工程决不限于单抗,它的内容应当广阔得多。本文将从动物细胞工程方面予以说明,以引起大家的注意和讨论,也许会有利于对这领域的理解,从而得到应有的更大发展。

一、什么是动物细胞工程

单就“细胞工程”这个名词而言,在西方国家的杂志书刊中尚未见到相应的提法,日本有称为“细胞工学”的期刊。英文译名为Cell Technology,但Cell Technology这一名词的含意可以甚广,不一定能体现它是属于生物工程的范畴。如果套用遗传工程的说法,细胞工程似应译为Cellular Engineering,这名词虽曾用过,

但原意是指用细胞移植的方法来取代体内机能缺损的细胞,是否会引起误解,另一种译法可为Cell Biotechnology,也许更能表达它的本意。

细胞工程或动物细胞工程的意义是什么?究竟应包括那些内容,迄今尚无定论。有人提出[1]它是应用细胞生物学和分子生物学的方法,按照人们设计的蓝图,有计划地改变细胞内遗传物质的技术和发展这种技术的领域。如果是这样,那么只有牵涉到改变细胞遗传物质的技术领域才算作细胞工程的范围。然而从更广义的内容来看,在体外培养和繁殖大量的细胞以获得细胞产品或利用细胞本身的技术领域也应包括在内。其次细胞工程是渗透有工程学的生物学,是一门综合的科学技术,它的成果最终要落实到能提供产业化规模的产品,因而定义上最好能反应出结合工程科学的含意在内。

二、动物细胞工程所涉及的技术领域

动物细胞工程所涉及的主要技术是细胞融合,细胞拆合、染色体导入和基因转移这四个方

• 本文承孝德教授审阅,并提出宝贵意见,谨致谢意。

染色体水平以及基因水平这四个不同层次来改造细胞。这方面的内容参阅文献^[1]。有一点要提出讨论的,就是前三方面的技术——细胞融合、细胞拆合和染色体导入——是细胞生物学传统的技术领域,这是很清楚的。第四项是基因转移,在细胞工程上的基因转移和以DNA重组技术为基础的基因工程上的基因转移是否有区别?换句话说动物细胞工程在基因水平上改变细胞遗传性的技术方面是否有自己的特点?根据所采用的方法来看,应用磷酸钙、脂质体、红血球外壳以及直接的显微注射等方法,可把从原核或真核细胞分离的一些基因成功地转移到哺乳动物宿主细胞,并进行表达。有些工作证明导入的基因能整合到宿主细胞的基因组内,并稳定地传给子代。这些技术都不涉及应用DNA重组技术以构建质粒来转移基因,因而是属于细胞工程的技术领域。当然另外一点也必须提出,就是当前细胞工程和基因工程有逐渐汇合的趋势,把两种技术结合起来运用已成为当今生物工程重要的发展方向。最近国外在基因工程上应用的宿主系统已开始从细菌、酵母转向哺乳类细胞,这样的系统具有直接释出产物于胞外以及无需修饰(如糖基等)的好处。因而哺乳动物细胞的大规模培养就成为当前开展基因工程中迫切需要解决的问题,而细胞和组织培养正是动物细胞工程技术的基础,也是当今细胞工程重要的研究项目之一。再者由于细胞工程的研究成果最终要落实到产业规模的生产,就必然要涉及到工程学中开拓出来的新技术、新工艺。因而细胞工程,同其它生物工程(基因工程,酶工程和发酵工程)一样,是基础科学研究和工程科学结合起来的一门综合性的科学技术体系。

三、动物细胞工程的发展现况

近年来细胞生物学、发生生物学和分子生物学等基础学科的迅速发展,为细胞工程的开展铺平了道路,使它从试验研究阶段,逐渐走向大规模生产人们所需的工农医多种产品的时

代,现将国内外情况综合报道如下:

1. 细胞融合方面

(1) 淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体 这是当今生物科学领域中可以和DNA重组技术相提并论的一次重大技术革命,杂交瘤所分泌的单抗和过去的动物免疫血清(多克隆抗体)相比,其纯度高、特异性强、产量大、容易标准化。因而单抗既是重要的基础研究手段,对神经生物学、发育生物学和免疫生物学的发展起很大的推动作用,同时在保障人民健康和发展农牧业上也有很大的经济效益。这方面由于本刊过去已有介绍^[2],不再详述。附带要提的是人的单抗。

人的单克隆抗体^[3],目前的单抗一般均为小鼠的单抗,因为它用小鼠的免疫脾细胞和小鼠的骨髓瘤细胞融合后获得的杂交瘤产生的。这样的单抗作为体外检测或分离提纯抗原用是没问题的。但是如果预备把它接上药物或同位素注入人体作治疗或体内诊断定位用,就要考虑它是个异源蛋白,因而早就有建立人-人淋巴细胞杂交瘤的尝试。目前世界上已建立的人的融合亲本瘤系已有十几个,也可能近30个。它们和人的淋巴细胞融合后也能产生抗体,然而至今尚未能获得像小鼠骨髓瘤系NS-1,SP2/0等那样理想的瘤系,产生的杂交瘤细胞存在不够稳定、抗体效价也不够理想等问题。因而从1977年起^[4]相继有几个实验室应用EB病毒来转化人的B淋巴细胞,因为人的B淋巴细胞上有EBV受体。采用这样的方法就不用做细胞融合了,然而也存在抗体产量低、病毒释出等问题,近年来有人把EB病毒转化和细胞融合结合起来做。总之在人单抗的研制上还存在不少问题等待解决。

(2) T淋巴细胞杂交瘤和淋巴因子^[5] 上述的淋巴细胞杂交瘤,应称为B淋巴细胞杂交瘤。淋巴细胞杂交瘤中还有一类T淋巴细胞杂交瘤。它不生成抗体,而是生产淋巴因子,淋巴因子是一类调节性或效应性的物质,具有临床应用的潜在可能性,其中包括干扰素,促T淋巴

细胞生长因子(IL-2),巨噬细胞激活因子(MAF)等不下十余种。T淋巴细胞杂交瘤所采用的融合技术和B淋巴细胞杂交瘤一样,只是瘤细胞系和分泌因子的细胞均源自T淋巴细胞。目前人和小鼠的系统都已建立。这项技术除了瘤系方面的问题外,还有一个重要的技术限制因素,就是它的检测方法比较间接,不如检测抗体那样直接准确,因为一般采用的是功能检测而不是检测因子本身,例如在筛选分泌MAF的杂瘤细胞时,检测的是培液是否能激活巨噬细胞产生效应而不是培液中是否存在该因子。因而首先要用杂交瘤细胞的培液去激活巨噬细胞,然后再检测经培液处理的巨噬细胞是否能杀死靶细胞,这样一来就要化两天的时间。虽然如此,T淋巴细胞分泌的各种因子的潜在应用价值还是吸引了大批科技人员在各种来源的资金支持下去开发这项技术。

2. 细胞拆合方面

(1) 核移植 核移植技术在哺乳类尚属实验性阶段,但在鱼类和两栖类业已成熟,而且我国在用核移植技术选育鱼类新品种方面是有特色的。早在50年代,童第周教授就开始以鱼和两栖类为材料进行核移植试验,得到了核质杂种。近年来又做了经济鱼类的核质杂种^[6],如鲤鱼核和鲫鱼质、草鱼核和团头鱼质的杂种鱼表现了两种鱼的特点。鲤鲫杂种的口须和咽喉齿像核型,脊椎骨数目像质型,侧线鳞片数为中间型,生化性状有的像核型,有的出现了新的特征(如血红蛋白及血清的电泳图谱)。这些特性一般能传至第二代。值得提出的是,用有性杂交一般很难得到远缘杂交种鱼,即使得到了杂种鱼也为不育,而现在获得的鲤鲫新种雌雄均能育,因而运用核移植技术可获得鱼类属间、亚科间、甚至不同目间的核质杂种,也许能为选育优良新品种提供可能的途径。这里附带提一下受精卵和胚胎的移植,这是用哺乳动物进行核移植和用卵作基因转移时的必要技术,但也可用于迅速扩增品质优良的哺乳类大动物如牛、马等。目前乳牛的胚胎移植在西

方国家已成为企业经营的项目,形成了胚胎移植工业。在国内也已建立了奶牛的胚胎移植技术,预备进一步提高成功率并推广应用。

(2) 雌核发育^[7,8] 这是一种单亲本或单性生殖的方法,该技术是将受精卵中的雄原核去掉,然后使雌原核加倍形成纯合二倍体,待发育成胚胎后植入假孕的子宫,通过这样处理后得到的幼仔,将全部为纯合二倍体的雌性个体,这种技术主要是为快速建立动物的纯系提供原始的遗传材料。因为一般要得到一个纯系动物要化多年甚至终生的时间,用这样的方法应在三周就可以得到一个纯种小鼠,9个月就可以得到一头纯合子的母牛。雌核发育的技术已在小鼠系统上得到成功。

在鱼类也开展了雌核发育的技术,同样也是一种培育经济鱼类纯系的快速有效方法。

3. 基因转移方面

近年来由于分子遗传学的迅速发展。目前已能得到一些真核细胞的克隆化基因,如 β 珠蛋白基因、TK基因等,把这些基因通过显微操作导入小鼠受精卵的原核中,再植入假孕的子宫,通过发育得到的个体不但能表达该基因决定的性状,并能将该基因传给第二代。1982年底^[9]美国一组科学家成功地将大鼠生长激素基因通过显微注射导入小鼠受精卵内得到了“超级小鼠”,最近他们采用同样的方法将人的生长激素基因也成功地移植到小鼠并得到了表达。该项工作为基础研究及遗传育种开辟了一条新途径。国内这方面的工作尚属起步。

4. 细胞培养方面

大量培养和无血清培养为了获得细胞产品必须建筑在大量培养细胞的基础上,否则不能适应工业化规模的需要。此外为了利用细胞本身也需要大量培养。由于对生长因子研究的进展,使得一向认为是难以培养的正常二倍体细胞在某些方面也有了突破。例如T淋巴细胞在T细胞生长因子(IL-2)的作用下,在体外增殖的速度可以是十分惊人的。据报道用IL-2培养人的细胞毒性T细胞,

如果所有的细胞都保存下来, 10^5 细胞在培养两个月之后可以达到 9.3×10^{13} , 相当 90 kg 的压积细胞。其他人也有类似的数字报道。然而大量培养动物细胞(这里主要指的是哺乳类细胞)和大量培养细菌、酵母、霉菌等微生物完全是两件事。细菌能在 5 万加仑的培养罐内生长良好, 而哺乳动物细胞就不行, 他们要脆弱和复杂得多。并且通常是作为器官组织中的一个单位生活在精密调节的内平衡环境中。这就给培养的条件设备提出了新课题。一个方向是扩大容量, 增加转瓶的数目, 加大培养罐的容积甚至到成百立升, 应用微载体以扩大细胞贴壁的面积。但目前的方向^[10]不是专向容量的扩大化而是向更自动化更模拟体内代谢环境的方向发展, 以期培养罐中的培液以至细胞都能新陈代谢。这样一来每毫升培液中可容纳的细胞浓度就可从几十万、一百万提高到二三千万。在大量培养中还存有一个问题就是血清的使用。目前的培液中一般需要加 5—15% 的动物或人的血清。这样一方面血清的来源有限, 价格昂贵, 有时各批之间的变化甚大, 因而无血清培养^[11], 再进一步为无蛋白培养^[12]也成为开展细胞工程迫切需要解决的问题了。血清中的成份十分复杂, 有几百种。然而不是每种成份对每种细胞都是必需的, 有的甚至还起抑制作用, 其浓度也不一定是某种细胞的最适浓度。如果能调整培液中某种细胞所需的成份和浓度, 加上它所需要的生长因子, 就为这种细胞在体外生存和大量繁殖创造了良好的条件。目前市场上已有各种无血清培养剂出售可供试用。

四、结 束 语

从目前的研究进展来看, 动物细胞工程的前景是光明的, 值得提出的是它是建立在生物资源的可循环性上, 即节约能源, 又有利于保持自然条件。然而对它也应有个清醒而正确的估价。目前除少数产品, 如某些单抗以外, 大多数项目离表现明显的经济效益和社会效益还有很长一段距离, 其中涉及两个主要问题; 一是

大量基础性的研究和开发工作有待进行。二是如何将实验室中的成果转为生产力, 这方面必须有工程技术人员的协同工作才能完成。就前者而言, 在克隆化基因导入受精卵发育成新品种方面有单个基因分离、基因的定位而不是随机的整合问题。就卵细胞发生的细胞工程而言, 还有卵的体外成熟、体外受精、体外发育等问题。在生产人的单抗方面, 还有体外致敏的问题, 因为对人不能像对小鼠那样去免疫以取得抗原特异的 B 淋巴细胞。在用病毒感染细胞以建成永久的细胞系方面还有如何保持其原有的分化机能的问题。还有其它种种的问题。总之动物细胞工程提出许多基础研究课题需要大家努力去解决。

综上所述, 从细胞、核质、染色体以及基因这四个不同水平来改造细胞为人类服务的细胞工程, 虽然目前尚处在开始阶段, 肯定会在今后的几十年中作出巨大的贡献。

参 考 文 献

- [1] 陈瑞铭. 1983. 细胞工程研究的一些进展(组织和细胞培养专题讨论会材料)。
- [2] 黄嘉陵. 1981. 细胞生物学杂志, 3(3) 43—48, 3(4)41—46。
- [3] Kozbor, D. and Roder, D. C. 1983 *Immunology Today* 4(3), 72—79.
- [4] Steinitz, M. et al; 1977 *Nature* 269(5627) 420—422.
- [5] Beezley, B. B. and N. H. Ruddles 1982 *J. Immunol. Methods* 52(3), 269—281.
- [6] 严绍颐. 中国科学, 23(4) 518—523.
- [7] Brackett, B. G. et; 1981 *New Techniques in Animal Breeding*.
- [8] Hoppe, P. C. and ILLmensee, K. 1977 *PNAS* 74(12), 5657—5661.
- [9] Palmiter, R. D. et al; 1982 *Nature* 300 (5893)611—615.
- [10] Feder, J. and Tolbert, W. R. 1983 *Scientific American* 248(1), 24—31.
- [11] Murakami, H. et al; 1982 *PNAS* 79(4) 1158—1162.
- [12] Cleveland W. L., Wood, I. and Erlanger, B. F. 1983 *J. Immunol. Methods* 56(2) 221—234.