

用,而同废弃的细胞及培液一起,高压灭菌后再倒掉。这时就需要取用保存的细胞复苏。为此,实验室通常应当在细胞培养的较早代次,选择生长良好的细胞,妥善冻存,以便在万一发生污染时使用。

所有这些措施同时也可以在很大程度上防止其它微生物、病毒,或某些竞争力强的细胞的污染。

很显然,为了做到上述这些,就应当使实验室的所有人员,包括只是使用细胞作实验材料的研究人员和其它有关人员,都能了解支原体污染的途径和可能造成的影响,并制订出相

应的制度。这可以说也是防污染措施中至关重要的一条。

参 考 文 献

- [1] Stanbridge, E. 1971. *Bacterio Rev.* 35: 206—227.
- [2] Barile, M. F., R. A. Delgiudice, H. E. Hopps, M. W. Grabowski and D. B. Riggs. 1973. *N. Y. Acad. Sci.* 225: 251—264.
- [3] Todaro, G. J., S. A. Aronson and E. Rands. 1971. *Exp. Cell Res.* 65: 256—257.
- [4] Russell, W. C., C. Newman, and D. H. Williamson, 1975. *Nature.* 253: 461—462.
- [5] Chen, T. R. 1977 *Exp. Cell Res.* 104: 255—262.

生 长 因 子 与 细 胞 增 殖

王 祖 武

(中国科学院药物研究所)

近年来对生长因子在调节正常和恶性细胞增殖作用的了解进展迅速。不少新发现来自体外培养细胞的研究结果。在维持细胞连续增殖和传代的过程中,血清是不可缺少的成份。培养细胞的最终饱和密度与培养基中的血清浓度密切相关。当血清中某些成份被耗竭时,细胞停止增殖而呈静止状态,处于 G_0/G_1 期。如果这时再补充新鲜的血清,又可刺激细胞重新开始合成DNA,并导致细胞分裂。恶性细胞明显的表型变化之一就是对培液中血清的需要量明显减少。最早 Wolstenholm 就曾提出一种设想,即动物血清中的某些成份,很可能就是几种生长因子(growth factors)在控制细胞增殖中起着决定性作用。多年来的有关工作,不仅证实了多种生长因子的存在,对其生物学作用的认识也有了明显的进展。本文仅就生长因子在调节细胞增殖的一些生物学现象及其与肿瘤恶性生长的关系扼要作些介绍。

一、生长因子对细胞分裂的作用

近年来已经纯化并鉴定了多种多肽生长因子,如表皮生长因子(EGF),成纤维细胞生长因子(FGF),成纤维细胞源生长因子(FDGF),胰岛素类生长因子(IGF_s),血小板生长因子(PDGF),及神经生长因子(NGF)等(表1)。并且认识到正常细胞的分裂要受到各种生长因子的调节,例如小鼠3T3株细胞在无血清培养基中可因这些外源性物质的刺激,重新开始合成DNA,并进入细胞增殖(表2)。几种肯定有效的生长因子在合并应用时对刺激细胞生长有显著的协同作用。甚至达到与血清同样的效果^[1,2]。可见血清在细胞培养中的重要作用是提供有关的细胞生长必需的激素和生长因子。已经证明,至少在四十种以上的细胞株中,可用胰岛素,离子载体转运蛋白,特定的生长因子或激素组合成培养基,部分或完全代替血清

表1 各种生长因子的特性

生长因子	来源	靶细胞	分子量($\times 10^{-3}$)	参考文献
胰岛素样生长因子(IGFs)	血浆 血清	骨组织 成纤维细胞	5-10	Froesch ER, et al.: In: <i>Hormones and Cell Culture</i> , pp.61-77, 1979.
表皮生长因子(EGF)	颌下腺	上皮细胞 成纤维细胞	6	Ref. 3.
神经生长因子(NGF)	颌下腺	交感神经细胞	140	Yanker BA, Shooter EM.: <i>Ann. Rev. Biochem.</i> , 51: 845, 1982.
成纤维细胞生长因子(FGF)	垂体	中胚层源细胞	13.4	Gosdarowicz D, Moran JS.: <i>Ann. Rev. Biochem.</i> , 45: 531, 1976.
血小板生长因子(PDGF)	血小板	结缔组织细胞	28-33	Ref. 25
成纤维细胞生长因子(FDGF)	SV 40 BHK 细胞培养液	结缔组织细胞	33	Ref. 15.

表2 对瑞士小鼠3T3细胞DNA合成有刺激作用的各种因子

化学分类	生长因子
多肽因子	EGF, PDGF, IGFs, 等
神经脑下垂体激素	血管加压素, 催产素及其衍生物
促瘤剂	吡喃内酯, 杀鱼菌素
维生素甲衍生物	维生素甲酸
膜透性调节物	蜂毒肽
环腺苷酸升高物质	霍乱弧菌素, 腺苷激动剂, CAMP 衍生物
微管解聚剂	秋水仙胺, 秋水仙碱, 长春花碱, 鬼臼素
转化细胞释出的多肽激素	

刺激DNA合成和细胞分裂^[1]。因此,生长因子研究的这一领域的飞快发展,为血清代用品在细胞培养中的应用开辟了一个重要途径。对生长因子的研究还有助于发现新的生长因子及研究如何抑制细胞分裂。

二、生长因子与受体结合的分子生物学特性

大量研究结果表明,能促进生长的生物大

分子,作用于细胞的第一步就是同位于质膜上的特异受体相结合。受体不但能识别这种特殊的细胞外的生物大分子,而且还参与产生细胞内讯号,引起有关的代谢后反应,最终导致DNA合成。纯化的生长因子是研究生长调节的重要工具,特别是对有关受体分子性质及生理学效应的研究。同位素标记的生长因子如¹²⁵I-EGF^[3],¹²⁵I-IGF^[4],¹²⁵I-PDGF^[5]及(³H)-吡喃内酯等对研究生长因子与各类细胞表面专一性受体的结合很有用处。以EGF为例,开始,生长因子-受体复合物弥散分布在质膜表面,接着聚集成块,内吞入细胞并被溶酶体蛋白质水解酶所降解,这种现象也在其它生长因子实验中得到证实^[7],因而对多肽激素仅作用于细胞表面的说法提出了挑战。生长因子或与之结合的受体的内容过程,是引起有丝分裂的必需步骤。最近得到的EGF克隆抗体可以进一步研究受体的聚集和内容过程及其作用和结构变化。EGF-受体复合物有激活蛋白激酶活力的作用,使EGF受体作用固有蛋白在酪氨酸残基位上发生磷酸化^[8]。EGF结合部位,激酶与底物都处于同一

单一跨膜多肽链上,其分子量为170,000^[8]。近来还有报告^[9],胰岛素及PDGF能刺激酪氨酸相连的蛋白激酶活力。这点饶有趣味,因为各种RNA肿瘤病毒的转化蛋白也有相似作用^[11]。

受体数目及饱和度能调节细胞对外界生长因子的反应性。细胞接触EGF后能显著减少它在质膜上的结合数,而形成下行调节。只要少部分受体与相应的因子结合,就能引起细胞有丝分裂。受体的下行调节似乎与EGF所引起的生物反应的变化无关。最近对耐啉脂(phorbol ester; PE)^[12],杀鱼菌素(teleoridin, TC)^[13]及血管紧张素^[14]的研究得出一些不同的结果。它们导致的有丝分裂能随着所结合的激素量的增加而逐渐减弱。这种敏感性下降可能是一种至今尚未被重视的重要调节机制。EGF膜受体的饱和度还能被PE^[15]、血管紧张素^[16]或FDGF^[17]所改变,作用发生很快,而且与受体数目无直接关系。可见,细胞对配体所诱导的有丝分裂反应可能还受同类配体的影响,甚至先与在化学结构上无关的配体相作用也能控制激素结合在细胞上的饱和度。这种现象称之为“失敏作用”。

三、生长因子诱导细胞内讯号的产生

当生长因子与细胞膜表面专一受体结合之后,如何触发产生有丝分裂反应的细胞内讯号,是当前细胞增殖研究中的核心问题之一。有证据表明,通过开启质膜上离子转运通道,改变细胞内环苷酸的浓度或细胞骨架组织的变化等可调节细胞的增殖反应。

已有丰富的资料支持这样一个理论,即离子转运及重分布有媒介等某些生长因子的作用^[18]。在血清及PDGF、FDGF、血管紧张素、PE、TC及蜂毒肽(melittin, MLT)等生长因子刺激各类静止细胞进入DNA合成及细胞分裂时,最早发现的现象就是Na⁺的转入细胞^[18]。Na⁺进入细胞后,部分与H⁺的转运相耦合,这是通过氨氯吡脒(amiloride)敏感的Na⁺-H⁺

交换系统来实现的。Na⁺的运入显然是以调节细胞内pH,随之增强Na⁺-K⁺泵的运转,进而增加K⁺的转运入细胞^[18]。Na⁺的运入或细胞内pH的改变也能导致Ca⁺⁺的重新分布。因此,生长因子的作用可能触发离子穿过质膜及线粒体膜的一系列变化。细胞内K⁺与Ca⁺⁺浓度的明显增加,从而激发了各种途经的细胞代谢。

虽然已认识到cAMP可作为多种激素控制短期代谢过程的第二信使,但它对细胞分裂的作用却报道不一。近来发现细胞内cAMP水平增加可作为静止细胞进入增殖期的讯号^[19],大量的研究3T3细胞的资料支持此说。cAMP的增加可以协同其它生长因子刺激cDNA合成。通过一些外源性配体如霍乱菌素,腺嘌呤激动剂或cAMP衍生物可提高cAMP的细胞内水平。但cAMP的增加并不刺激Na⁺转运入静止细胞^[20],可见cAMP对DNA合成的调节机理不同于依赖于Na⁺的离子转运过程。这样,一个引人注意的新假设就被提出来了:各种外源性配体可以引起cAMP与离子转运这二种不相同的有丝分裂讯号,在适当的细胞外因子合并刺激下,同时在静止的3T3细胞中出现,由此协同刺激细胞进入DNA合成期^[20]。

关于生长因子诱导产生的细胞内讯号,最新的报道是胞质微管系统的聚合状态的变化,可能作为调节细胞从G₀/G₁进入DNA合成相的信号。在3T3细胞中,用秋水仙胺、秋水仙碱,长春新碱或Nocodazole (NCD)等解聚微管网,可以显著增强前述各种生长因子诱导的DNA合成。这种增强作用还能与cAMP的作用相协同,但它们二者的作用环节不同^[21,22]。进一步的研究表明,在各类生长因子的作用下,细胞内游离微管蛋白的含量迅速增加,而聚合的微管蛋白量维持不变,相对造成聚合微管蛋白占细胞总微管蛋白的百分率下降^[23]。可见,当某些类型的细胞从G₀/G₁期进入S₁期时,需要在细胞内维持高浓度的游离微管蛋白。因此,细胞质微管蛋白的聚合与

解聚状态是细胞 DNA 合成时的重要内源性调节讯号之一。

四、生长因子与肿瘤

从小鼠皮肤癌的诱发等实验,了解到致癌过程至少要包括两个阶段,即始动(initiation)阶段和促进(promotion)阶段。在其它器官的诱癌研究中也得到了证实。晚近的实验证明,生长因子的作用与恶性变的发生密切相关。因为某些促癌剂与生长因子,在引起细胞反应方面是通过共同的途径。而且许多肿瘤细胞株能产生有效的促进生长的多肽。在小鼠皮肤诱癌试验中,最强的促癌剂就是从巴豆油中分离到的 PE 以及从链霉菌中分得的生物碱 TC。最近的研究结果表明它们结合在同一受体上,而且与生长因子的作用有关。PE 族促癌剂能影响一系列的细胞行为,尤其在有丝分裂方面。有实验证据表明,PE 的生物作用是通过 EGF 受体介导的,然而它们并不直接竞争于同一受体^[23]。曾发现 PE 与 TC 能与多种生长因子协同刺激 DNA 合成,只有血管紧张素是例外^[24]。因此,如果促癌剂与上述大多数生长因子的作用途径相同的话,那将是个非常重要的生物学现象。值得研究和阐明 PE 与 TC 等促癌剂是否结合在内源性生长调节物质的有关受体上,如同鸦片与内非肽的相互关系那样。

多年来,生长因子在细胞恶性转化中的作

用是受到质疑的。因为恶性细胞有可能逃避正常生长调控,比对应正常细胞所需生长因子少得多^[25]。培养由肿瘤病毒或化学致癌物诱导的或自发的转化细胞,能释放出大量促进生长的多肽,强有力地引起单层培养静止细胞进入分裂。而且能在半固体培养基中导致着壁非依赖性的生长^[26]。这些多肽与生长因子的作用相仿。特别是恶性纤维母细胞不仅能在血清中,同样在血浆中也能很好地生长。这些显然有别于正常细胞。可见对恶性细胞不需要提供 PDGF,正常它是在血凝时才释放出来的。如果这些恶性细胞对它们自己产生的生长因子也能发生反应的话,则一个正反馈途径被建立起来,就可以使恶性细胞群体大幅度地增长。曾以“自体内分泌”(autocrine secretion)这样一个名称来描述这一类型能分泌生长促进物质来启动外部受体从而产生自我刺激的细胞,肿瘤产生的生长因子能作为恶性转化的直接作用物或内源性促癌剂。恶性肿瘤产生生长因子的另一重要性是使许多转化细胞能在无血清成份的培养基中增殖,但相应未转化细胞则不能生长。这是很有实用价值的研究方向。在这些已知化学结构的生长因子作用下,从临床常规活检取得的肿瘤细胞在体外培养中也能生长分裂^[27]。这对肿瘤的诊断,体外药敏试验,以及恶性细胞来源的生长因子的评价都有一定意义。

从前述大量的研究资料可见,细胞增殖受

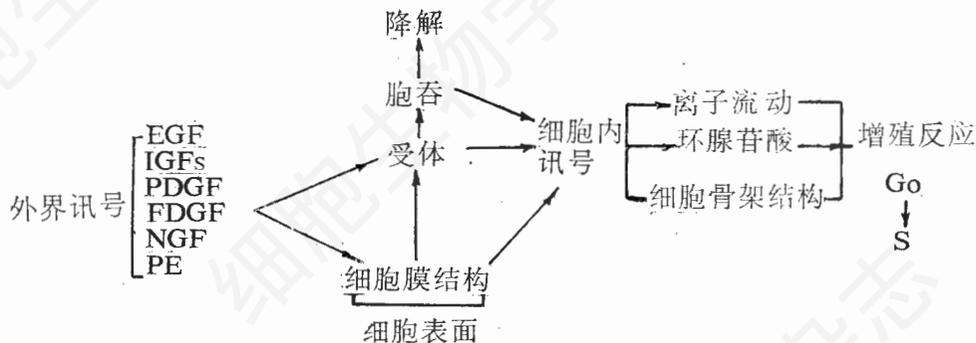


图 1 动物细胞增殖反应发生的模式概念(虚线部分尚未得到足够的实验证据)

一系列生长因子的调控。一些纯化了的生长因子的合并应用可以产生有效的协同作用。甚至能达到血清一样的强度来诱导和支持各种类型细胞的增殖。这对培养某些正常和肿瘤细胞,鉴别新的生长因子以及研究细胞分裂等都有很大意义。特别利用纯化的生长因子,可以探索有关细胞增殖的质膜表面受体的分子及生理性质,细胞的生长调节可以被初步总结如图1模式:各种多肽生长因子或具有生长刺激作用的促瘤物,作为外源性讯号首先影响细胞质膜结构并与其专一性受体结合;配体-受体复合物被胞饮或部分降解;配体与受体或其它膜结构相互作用之下可诱导出细胞内讯号。目前的研究结果表明,主要有三个重要讯号产生,即离子转运通道开放,细胞内环腺苷酸浓度的变化及细胞骨架系统的聚合状态等。由此所进行的调节作用,最终使细胞从 G_0/G_1 进入S期进行DNA合成而导致细胞增殖分裂。

因为促瘤物与生长因子在某些类型的细胞中通过共同的途径来诱导有丝分裂,并且由于肿瘤细胞能产生有效的促生长多肽,所以认为生长因子也能在细胞恶性转化中起重要作用。肿瘤细胞能产生生长因子这一生物学现象提出了一个基本问题,即这些分子能否直接引起癌细胞的不可控制的生长?随着生长因子逐个被高度纯化并定出化学结构以及免疫学的发展,其作用机理的研究及实际应用将会取得许多更有意义的成果。

参 考 文 献

- [1] Bottenstein J, et al., 1979, *Methods in Enzymol.*, 58: 94—109.
- [2] Rozengurt E., 1980, *Current Topics in Cellular Regulation*, 17: 59—88.
- [3] Carpenter G, Cohen S., 1979, *Annual Review of Biochemistry*, 48: 193—216.
- [4] Kasuga M, et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257 (17): 9891—9894.
- [5] Bowen-Pope DF, Ross R., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257 (9): 5161—5171.
- [6] Driedger PE, Blumberg PM., 1980, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77 (1): 567—571.
- [7] Pastan IH, Willingham MC., 1981, *Ann. Rev. Physiol.*, 43: 239—250.
- [8] Cohen S, et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257 (3): 1523—1531.
- [9] Hedo JA., et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257 (16): 10020—10026.
- [10] Heldin C-H, et al., 1983, *J. Biol. Chem.*, 258 (16): 10054—10061.
- [11] Hunter T, et al., 1981, *Protein Phosphorylation*, Cold Spring Harbor Lab., pp. 1189.
- [12] Collins MKL, Rozengurt E., 1982, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 104 (4): 1159—1166.
- [13] Collins MKL, Rozengurt E., 1982, 112 (1): 42—50.
- [14] Brown KD, et al., 1979, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 86 (4): 1037—1043.
- [15] Rozengurt E, et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257 (7): 3680—3686.
- [16] Rozengurt E, et al., 1981, *J. Biol. Chem.*, 256 (2): 716—722.
- [17] Rozengurt E., 1981, *Adv. in Enzyme Regulation*, 19: 61—85.
- [18] Rozengurt E., 1982, *Exptl. Cell Res.*, 139 (1): 71—78.
- [19] Rozengurt E., 1982, *J. Cell Physiol.*, 112 (2): 243—250.
- [20] Wang ZW, 1983, *Acta Pharmacol. Sin.*, 4 (3): 205—210.
- [21] Wang ZW, Rozengurt E., 1983, *J. Cell Biol.*, 96 (6): 1743—1750.
- [22] Wang ZW, 1984, *Intrn. Cell Biology*, Academic press Japan, Inc., PP. 525.
- [23] Rozenfurf E, 1979, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76 (3): 1284.
- [24] Holley RW, 1975, *Nature*, 258 (5535): 487—490.
- [25] Heldin CH, 1981, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 78 (6): 3664—3668.
- [26] Todaro GJ, et al., 1981, *J. Supromol. Struct. & Cellul. Biochem.*, 15 (1): 287—291.
- [27] Carney DN, 1981, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 78 (5): 3185—3189.