

温度敏感突变型(ts-mutant)细胞及其应用

潘 琼 婧

(医学科学院肿瘤研究所)

温度敏感突变型有热敏感和冷敏感两种,常用的是热敏感型,在容许温度(permissive temperature)生长正常,在非容许温度(non-permissive temperature)细胞的生长或特殊功能有缺陷,而野生型母细胞在两种温度下都正常。这种突变型的表现因为是有条件的,所以提供了仅有的带有调控系统的实验工具。ts 细胞变异一般分为两类,一类是影响生长和细胞分裂,在非容许温度下不能生长,另一类是影响细胞的特殊功能,抑制一个或多个特殊功能的表达,不干扰生长,形成改变的但不致死的表型。严格来讲,这些都是细胞变异体(cell variant),不能代表突变,为了简单化,统称为“mutant”^[1]。Thompson^[2]认为“mutant”这一术语用于起因于 DNA 结构改变的可遗传的表型改变,要以稳定性、对诱变剂的反应、有改变的基因产物以及其他的判断标准来鉴定。

在过去十几年中条件致死 ts 变异用于研究遗传、生理和分子生物学等的基本问题,最初是研究噬菌体的 ts 突变,随后研究了细菌、酵母菌、果蝇以及动物病毒的 ts 变种,近年来才发展到动物体细胞的 ts 变异。哺乳动物的第一个 ts 生长突变型是从猴肾细胞 BSC-1 分离的^[3]和从小鼠细胞 L 系分离的^[4],人细胞的 ts 突变型尚未见有报道。

ts 生长突变型的诱变和选择

诱变 一般用两种诱变剂(mutagens),即 N-Methyl-N-Nitrosoguanidine (MNNG) 和 Ethane methyl sulfonate(EMS)。所用剂量为引起 70—90%致死率的量。诱变后有一段在

容许温度的突变“固定”时间(3—8 个一代时间 generation time)。诱变剂是否有效,要看诱变剂能否诱导 ts 突变进行回复突变(reversion),而且回复频率显著提高。

选择 设计选择方法的根据是对野生型细胞致死而对突变型不致死,如在非容许温度条件下野生型细胞能正常繁殖,而 ts 突变型生长和分裂受抑制。若将细胞移至非容许温度并与分裂细胞的致死剂接触,或与细胞行使某些重要功能(如 DNA 合成)的致死剂接触,结果杀死野生型而不杀死突变型。

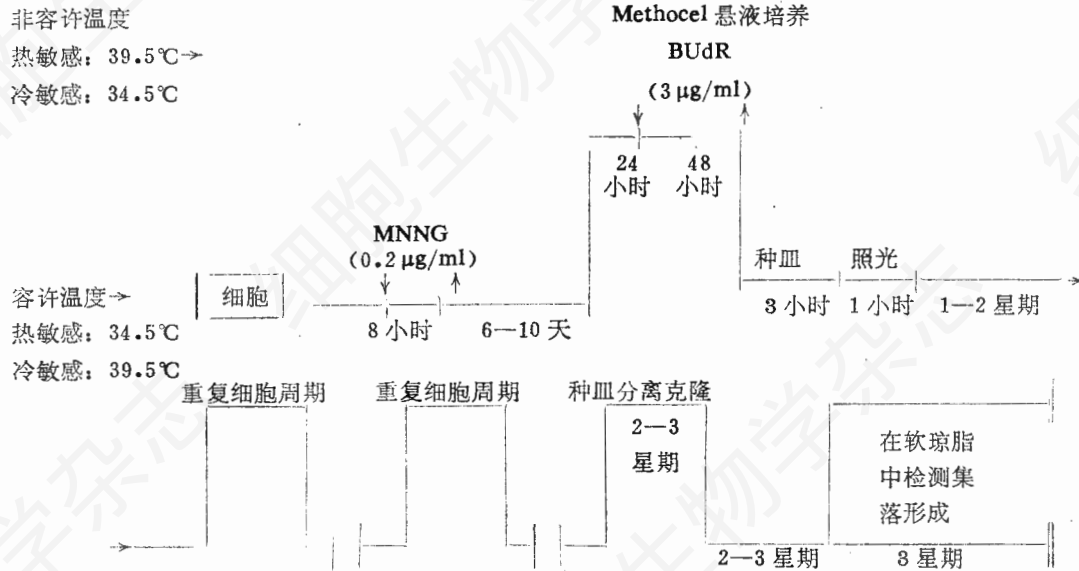
分裂细胞的杀死剂有以下几种:

1. DNA 合成抑制物,如 5-氟脱氧尿嘧啶(FuDR)和阿糖胞苷(cytosine arabinoside),在对数生长期的 DNA 合成细胞是致死的,对非 DNA 合成细胞无损。可在非容许温度下选择不合成 DNA 的突变型(DNA⁻)。此法的缺点是需时较长,对那些不能长时经受非容许温度的突变型的选择不利。

2. DNA 致毒物,如 ³H 标记的胸腺嘧啶核苷或 5-溴脱氧尿嘧啶(BuDR)与曝光相结合,³H 胸腺嘧啶核苷的致死是由于 ³H 原子内部的放射活性衰变,而 BuDR 的致死是由于溴尿嘧啶掺入 DNA,对紫外光或远紫外光比 DNA 更敏感, DNA 链断裂和染色体畸变导致细胞死亡。

3. ³H 标记的氨基酸掺入蛋白质合成,选择影响蛋白质合成的突变型,或选择 tRNA 合成酶突变型。

4. ³H 胸腺嘧啶核苷掺入与阿糖胞苷结合。

ts 突变型的分离步骤^[5]

5. 用羟基脲处理, 抑制 DNA 合成, 阻抑野生型细胞周期进行到有丝分裂期, 再使有丝分裂细胞脱落, 在低温接种有丝分裂细胞, 得到在非容许温度下阻抑于有丝分裂的突变型。

分离的 ts 克隆可分以下四种类型

1. 好的突变型 在容许温度克隆生长率与野生型细胞相似, 在非容许温度下不管种多少细胞都不形成克隆。这种突变型的逆转率较低 ($\sim < 10^{-6}$), 虽然培养时间增长后可增加。

2. 高逆转率的突变型 回复突变 (Back mutation) 频率高, 相对贴瓶率 (非容许温度/容许温度) 为 10^{-2} 至 10^{-3} , 亚克隆 (subclones) 也迅速累积逆转型, 这种性质是否反映真正的高逆转率还是细胞群体在 39°C 仍有一定的克隆形成机率 (Probability) 还不清楚。

3. 在非容许温度的条件下表现密度依赖生长的突变型 在高温的条件下, 细胞在低密度时不形成克隆, 在较高密度时所有细胞都生长, 有高细胞密度抑制 ts 表型的现象。

4. 在高温生长的突变型 在容许温度生长很不好, 这种突变型没有真正被利用。

显示各种生长特性的 ts 突变型

1. 影响细胞分裂过程的突变

地鼠细胞突变型 ts 546^[6] 在非容许温度下抑制在分裂中期。胞质分裂缺陷的突变型有 ts NWI^[1] 与 ts III^[7] 在非容许温度聚集大量的多核细胞, DNA 与 RNA 合成未受抑制。这种突变的表型表现和松胞素 B 的作用非常相似。

2. 影响 DNA 合成的突变

(1) 影响 DNA 复制的突变型 猴肾 BSC-1 细胞的 ts 突变型 ts-2, 在染色体 DNA 复制或胸腺嘧啶代谢中有 ts 缺陷^[8], 但没有进一步鉴定。3 T 3 细胞的 ts 突变型在 39°C 细胞低密度时完全抑制生长, DNA 合成率减低 50%^[9]。L 细胞的 tsA1-S9 在高温时有 DNA 连接缺陷, 不能把新复制的 DNA 单链断片变为大分子量的 DNA^[10]。小鼠细胞 3 T 3 clone 的温度突变株 ts-2^[11] 在 38°C 细胞本身和所感染的多瘤病毒的 DNA 合成都受抑制。这一类的突变型还较少, 用更好选择法来分离直接影响 DNA 的突变型, 为研究 DNA 复制过程很需要。

表1 基因产物温度敏感细胞

突变型	细胞来源	温度敏感蛋白质	文献
AARS ^{ts}	CHO, CHL-RJK-O	氨酰 tRNA 合成酶 (Aminoacyl-tRNA synthetases)	见表2
tsAUXBI	CHO	四氢叶酸聚谷氨转移酶 (tetrahydrofolate polyglutamyl transferring enzyme)	McBurney and Whitmore (1974 b) Cell 2:183—188.
526, 536	CHL-V ₇₉ (A3)	次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶 (Hypoxanthineguanine phos- phoribosyltransferase)	Fenwick and Caskey (1975) Cell 5:115—122.
tsAMAR-1	CHO	RNA 聚合酶 II (RNA Polymerase II)	Ingles (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75:405—409.
tsCl-B 59	FM 3 A	胸苷激酶 (Thymidine kinase)	Nakano et al. (1978) Somat. Cell Genet 4:169—178.

(2) 影响细胞进入 DNA 合成期的突变
来自中国地鼠细胞的 K 12 和 BF 113^[11], BHK
细胞的 ts AF 8 和小鼠细胞的 ts B 54, 这四个
细胞系可代表细胞周期阻断在 G₁ 期的突变型,
ts AF 8 与 ts B 54 可互补, 表示有不同的缺
陷^[12]。

3. 影响 DNA 合成或代谢的突变

从 BHK-21 分离的 ts 422 E 在 39℃ 因阻
断 28S 核糖体 RNA 或 60S 核糖体亚单位的产
生而不能生长, 在移到非容许温度后 16 小时缺
陷达最高值^[11]。ts 14 来自 V₇₉ 的 HT-1 克隆。
移到 39℃ 后约在 DNA 和 RNA 合成抑制前 6
小时影响 60S 核糖体亚单位蛋白质合成。

4. 影响蛋白质合成的突变型^[13]

(1) 基因产物(几种酶)的温度敏感细胞,
见表 1。

(2) 温度特异敏感的氨酰转移 RNA 合成
酶(AARS^{ts})的突变型 从遗传和生化研究提出
AARS^{ts} 细胞在氨酰 tRNA 合成酶上有一个单
一的点突变, 最广泛研究的是 ts H1 细胞, 体
内和体外试验证明酶本身是温度敏感的^[14], 其
他的 AARS^{ts} 见表 2。

5. 其他影响生长的温度突变型

ts 营养缺陷型有 ts-Nd-6 和 tsAUXBI^[11]。
自 V₇₉ 细胞分离的 ts galactose⁻ 只能利用半乳
糖在低温生长, 在高温则需葡萄糖^[15]。从中
国地鼠细胞分离的 tsHGPRT 在 39℃ 能在 6-硫
基鸟嘌呤中生长, 于 33℃ 能在 HAT 培养液中
生长, 但比野生型有热不稳定性^[16]。

影响分化功能的温度敏感突变型

自大鼠成肌细胞 L6E 分离的 E₃ 和 H₃ 突
变型^[17], 表现有肌管分化的温度依赖特性。这
些突变型的分离频率高, 比较稳定。分化的阻断
是可逆的, 如在非容许温度长期生长后移到容
许温度仍能融合为肌管。肌管融合阻断还伴随
着肌蛋白积聚的阻断, 磷酸肌酸激酶(phospho-
creatine kinase)和磷酸化酶(phosphorylases)不
增加。

影响体外恶性转化表现的 ts 突变型

根据转化细胞在琼脂中生长的特点建立了
BHK 细胞化学致癌转化系统^[18,19]。用二甲基亚
硝酸或亚硝基甲基脲进行体外转化的细胞主

表 2 氨酰 tRNA 合成酶温度敏感的哺乳动物细胞

影响的 AARS	突变型	细胞来源	文 献
丙氨酰-(Alanyl-) tRNA 合成酶	ML-ts 3	小鼠 L 5178 Y	Stato 1975, Nature(London) 257:813—815
精氨酰-(Arginyl-) tRNA 合成酶	AARS ^{ts} (Arg-1)	CHO	Adair et al. 1978, Somat. Cell Genet. 4:27—44
天冬酰胺酰- (Asparaginyl-) 合成酶	AARS ^{ts}	CHL	Tompson et al., 1975, Somat. Cell Genet. 1:187—208
	RJK-474	CHL-RJK-O	Cell 1977 11:157—168.
	RJK-472		Wasmath and Caskey 1976, Cell 9:655—662.
谷氨酰胺酰- (Glutaminyl-) 合成酶	AARS ^{ts} (Gln-1,-4)	CHO	Adair et al., 1978, Somatic Cell Genet. 4:27—44
组氨酰- (Histidyl-) 合成酶	AARS ^{ts} (His-1)	CHO	Adair et al., 1978, Ashman 1978, Somat. Cell Genet. 4:299—311
亮氨酰-(Leucyl-) 合成酶	tsH 1	CHO	Thompson et al., 1978, Somat. Cell Genet. 4:423—435
	tsO 25		McBurney and Whitmore 1974 a, J. Cell Physiol. 83:69—74
	AARS ^{ts}	CHO	Haars et al., 1976, Biochem. Biophys. Acta 454:493—503
甲硫氨酰- (Methionyl-) 合成酶	AARS ^{ts}	CHO	Adair et al., 1978, Somat. Cell Genet. 4:27—44

要是温度依赖性转化, 在 38.5℃ 为转化型 (transfomants), 在 32℃ 则否。测定转化的参数是在软琼脂中生长和集落形态, 温度不影响其他的生长特性, 在两种温度下的贴瓶率相似。

ts-223 为大鼠肝上皮细胞受化学致癌物作用后转化的温度敏感系^[20]。在 36℃ 表现转化表型, 能在软琼脂中生长, 在 40℃ 不能生长, 野生型在两种温度下都能生长。在 40℃ 贴瓶率低, 细胞饱和密度也较低, 会合培养物 (confluent culture) 在扫描电镜下为扁平的多边形细胞, 在 36℃ 出现细胞堆积, 堆积的细胞为球形并由于微绒毛多而使细胞表面显得粗糙。随

着温度上移或下移, 这些改变是可逆的。

Miyashita 等^[21]自中国地鼠肺细胞的自发转化的集落受 MNU 作用后在 39.5° 与 34.5℃ 分离了有转化表型的 6 个热敏感和 3 个冷敏感突变型。热敏感突变型在 34.5℃ 有转化细胞的生长特性, 在 39.5℃ 表现正常表型。冷敏感突变型在 34.5℃ 表现正常细胞的特性, 在 39.5℃ 为转化型。母细胞没有明显的温度依赖性。

ts 13 和 ts 14 是从一个异倍体猴肾上皮细胞系 BSC-1 分离的, 经甲基亚硝脲 MNU 作用后在 39.5℃ 转化, 在 33℃ 不转化, 野生型 BSC-1 在两种温度下都不转化。三个细胞系的

比较研究发现 ts 13 和 ts 14 与致癌物接触时处于细胞周期的 G_1 期, 在 G_1 期后 ts 13 细胞大量地抑制在有丝分裂。ts 13 的转化率比 ts 14 大 50%, 电泳显示 ts 13 和 ts 14 的细胞核中有一种新的蛋白质, 而野生型缺此蛋白质。这些研究帮助了解在癌变转化中“靶细胞”的生理状态, 转化只有在细胞增殖中出现, 细胞短时抑制在 G_1 期对致癌转化更敏感^[22,23]。

病毒转化的温度依赖突变型不在此详述。

温度敏感突变型细胞的应用

ts 突变型的细胞特性在容许温度是被遮蔽的, 在不容许温度表现出来, 无论在细胞生长的不同环节或不同代谢过程以及不同的功能都出现诱变的缺陷, 利用这些有缺陷的特性可进行多方面的研究。

1. 研究哺乳动物细胞的周期进程, 在周期功能中带有 ts 突变的, 在容许温度生长正常, 在非容许温度生长受到部分或全部抑制。ts 细胞周期突变型是细胞被抑制在周期的特异点, 由于温度变化使受影响的基因产物不活跃, 可以用不同的 ts 细胞的周期功能来做细胞周期进程中经历各种事件的时间图, 如研究抑制于 G_1 (或 G_0 期) 期的 ts 细胞, 从已有的少量遗传分析, 提出至少有 12 个基因来决定此过程。在细胞周期中的 G_1 期是复杂而重要的, 需要有更多的 ts 突变型来补充这些基因定位。

2. 从容许条件到非容许条件的开关, 只须调节温度就能达到, 可研究已知表型与特殊基因产物的关系, 研究细胞结构间的关系, 细胞结构和细胞代谢的关系。

3. 利用哺乳动物细胞的 ts 损伤可用人染色体校正, 尤其 ts 哺乳动物细胞都带有隐性突变, 通过互补作用来进行遗传分析。如 ts 突变型在带有人 x 染色体或其他染色体的杂交细胞中在非容许温度的互补证明周期进展调节过程的突变编码在 x 染色体的基因上。

4. 利用 ts 突变型研究细胞恶性转化和细胞分化的机制; 研究细胞分化和细胞恶性转化

的关系, 虽然可以用基因调控来说明, 但究竟如何影响表型的表现不是十分清楚的。利用这样一个可调控的细胞系统, 对分析转化表现的因素和维持不转化或保持正常分化的因素是一个有用的工具。

参 考 文 献

- [1] Claudio Basilico, 1977, *Advances in Cancer Research* 24: 223—266.
- [2] Thompson, L. H., 1979 *Methods in Enzymology* v. 58: Cell Culture pp. 308
- [3] Naha, P. M., 1969, *Nature (London)* 223: 1380—1381.
- [4] Thompson, L. H. et al. 1970 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 66: 377—384.
- [5] Kiichi Miyashita and Takeo Kakunaga, 1975, *Cell* 5: 131—138.
- [6] wang R. J. 1974, *Nature (London)* 248: 76—78.
- [7] Hatzfold, J. and G. Buttin, 1975, *Cell* 5: 123—129.
- [8] Naha, P. M., 1970, *Nature (London)* 228: 166—168.
- [9] Wittes, R. E. and H. L. Ozer, 1973, *Exp Cell Res.* 80: 127—136.
- [10] Rose Sheinin, 1976 *Cell* 7: 49—57.
- [11] Slater, M. L. and H. L. Ozer, 1976, *Cell* 7: 289—295.
- [12] Hirokaya Zaitzu and Genki Kimura, 1984, *J. Cellular Physiol.* 119: 82—88.
- [13] Rose Sheinin, 1980, In: *Nuclear-cytoplasmic interactions in the cell cycle* (Ed. G. L. Whitson) Academic Press pp. 152—155.
- [14] Hampel, A. E. et al., 1978, *Nature (London)* 276: 844—845.
- [15] Sun N. C. et al. 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 468—473.
- [16] Fenwick, R. G. Jr. and C. T. Caskey, 1975, *Cell* 5: 115—122.
- [17] Loomis, W. F. Jr. et al., 1973 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70: 425—429.
- [18] Mayorca G. D. et al., 1973, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70: 46—49.
- [19] Mishra, N. K. and G. Di. Mayorca, 1974, *Biochim. Biophys. Acta* 355: 205—219.
- [20] Yamaguchi, N. and T. B. Weinstein, 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 214—218.

- [21] Kiichi Miyashita and Takeo KaKunaga,
1975, *Cell* 5: 131--135.
[22] Naka, P. M., 1975, *Brit. J. Cancer* 31:

338—347.

- [23] Naka, P. M., 1982, *Cancer Biol. Rev.* 3:
63—95.

血纤维蛋白溶酶原激活剂的研究进展

陈振国*

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

血纤维蛋白溶酶原激活剂(Plasminogen Activator, 简称 PA)由于与许多基本的细胞生理现象有关,如细胞分裂、细胞伸展、肿瘤浸润和转移灶的生长等,因而引起了人们的注意。近年来对它的研究日益增多和深入。本文就有关 PA 的一些性质、检测方法以及在细胞生理及病理过程中某些有关功能作一简述。

一、PA 的性质

PA 是一种广泛存在于动物组织和体液里的丝氨酸蛋白酶,因分子量和亚单位不同而有不同的种类。早先按其来源分为外源性及内源性二类^[1]。存在于血液、体液、尿、组织及分泌物中的称为内源性 PA,而外源性 PA 主要是指一些细菌产物,如链激酶(Streptokinase)。随着研究的深入,现在又通常把 PA 分为四类:循环 PA(血液)、组织 PA、尿 PA(尿激酶)和培养细胞 PA。目前尚不知这些 PA 分子是否属于不同基因的产物^[2]。

最为大家所知的 PA 功能,是把没有活性的血纤维蛋白溶酶原催化为有活性的血纤维蛋白溶酶(Plasmin)。完成这个反应是通过水解酶原分子中的第 560—561 位置上精氨酸—缬氨酸肽键。血纤维蛋白溶酶有广泛的底物专一性,可破坏各种蛋白中的赖氨酸—赖氨酸键^[3]。血纤维蛋白是 PA 最重要的间接的天然底物之一,因此在临床上循环 PA 的主要作用是溶解血栓。

1966 年 White 等从人尿中提纯了尿激酶,

这是迄今内源性 PA 中唯一获得纯品的物质,分子量为 53,000,电泳位置在 β 球蛋白区。通过 SDS 凝胶电泳分析,尿激酶至少是由二个亚单位组成的。

癌细胞中的 PA 又分为尿激酶型和非尿激酶型,这个区分是以对尿激酶抗体的不同反应为基础的。大多数肿瘤合成的是尿激酶型,例如在人肺肿瘤中 90%以上 PA 是尿激酶型,而在正常肺组织中还不到 50%。与此类似,在人乳腺癌中约 80%属尿激酶型,而正常乳腺组织仅占 62%。卵巢癌和胰腺癌也主要产生尿激酶型,而脑瘤却合成非尿激酶型。为什么尿型 PA 在肿瘤中占比例高而相应正常组织却比例较低的原因还不清楚,但把肿瘤 PA 区分为这两类仍过于简单。有人发现培养的 MCF-7 乳腺癌细胞分泌 6 种分子量从 25,000 到 65,000 不同的 PA,但其中仅一种分子量为 59,000 的有与尿激酶相同的抗原性^[4]。还有报道肺癌细胞株培养液中含有一种分子量为 $1-2 \times 10^6$ 道尔顿的尿激酶型 PA,但这种高分子量的酶却不能象尿激酶那样被 SDS 或 8 M 尿素解离成亚单位,表明尚不能用简单的免疫反应来定性^[5]。

二、PA 的检测方法

PA 的检测通常是用以纤维蛋白溶酶原和纤维蛋白作底物的间接方法。在这类测定中,PA 把纤维蛋白溶酶原转变为纤维蛋白溶酶,后者再把血纤维蛋白降解。其中最灵敏的是用 ¹²⁵I

* 现在地址:上海市胸科医院胸部肿瘤研究室。