

- [25] Al-Bader, A. A. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 6064—6068.
- [26] Pastan, I. H. et al., 1975, *Ann. Rev. of Biochem.* 44: 491—522.
- [27] 于树玉等, 1982, *中华肿瘤杂志*, 4 (1): 50.
- [28] Tisdale M. J. et al., 1975, *Biochem. Pharmacol.* 24: 1271—1274.
- [29] Scheid M. P. et al., 1978, *J. Exp. Med.* 147: 1727—1743.

胚胎癌细胞体外诱导分化

施渭康

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

小鼠胚胎癌细胞 (embryonal carcinoma cells, 简称 EC 细胞) 与早期多能性胚胎细胞具有许多生物学共性。目前已分离和克隆了许多 EC 细胞株, 其中大多数移植到同系宿主体内后, 形成癌块中除了 EC 细胞外, 常混杂有各种类型的分化组织, 这种癌块称为畸胎瘤 (teratoma); 有些癌块中 EC 细胞增殖不占优势, 几乎全是各种分化组织, 成为非移植性畸胎瘤 (teratoma); 也有些 EC 细胞分化能力在体内受到限制, 癌块全由 EC 细胞组成, 无任何类型的分化组织, 成为很恶性的胚胎癌 (embryonal carcinoma)。这三种恶性和分化程度不同的肿瘤组织的形成主要取决于 EC 细胞生长和分化的净平衡。这种性质不仅表明 EC 细胞能在一定的条件下分化成不同类型的非恶性细胞; 也表明恶性畸胎瘤的发生是由于细胞正常增殖控制的失调。鉴于 EC 细胞这种特性, 不少实验室已用以研究细胞异常增殖、恶性表型的发育调节以及哺乳类早期胚胎生长和分化的基因表达调控等问题。近年来, 这些问题的研究大多借助于 EC 细胞体外诱导分化实验。现根据有关文献和我们自己的工作结果, 对 EC 细胞体外诱导分化问题作一简单的综述。

一、体外诱导细胞分化的条件

1; EC 细胞 许多 EC 细胞象在体内一样,

在体外也具有分化能力, 要保持未分化表型得依赖于滋养层细胞 (feed cell) 或白明胶一类支持介质, 培养条件改变往往使 EC 细胞分化。大多数 EC 细胞具有分化和发育多能性等共同特点, 但所形成的分化细胞存在着很大的异质性。这难以分析特定分化细胞的基因表达和生物学特种异质性可能是由于胚胎多能细胞在转化成 EC 细胞时所处的不同发育阶段而造成^[1]。因此通常选用在常规条件下不分化, 但通过化学物质诱导或改变细胞环境而进行有限分化的克隆 EC 细胞作为实验模型。

2. 无血清培养液 由于血清因子本身的复杂性, 近年来常用一些特定的物质替代血清加入基础培养液, 配成人工培养液研究体外细胞分化。根据现有一些 EC 细胞和其它细胞的无血清培养资料, 表明大多数细胞的增殖需要激素、生长因子和转运蛋白。例如 F9 EC 细胞可在含胰岛素、纤维凝结蛋白和转铁蛋白的基础培养液中生长^[2]; PC 13 EC 细胞需要转铁蛋白和血浆脂蛋白^[3]。不同类型的细胞需要不同的补充物, 甚至无机盐。因此, 目前还没有一种对较多细胞 (包括 EC 细胞) 都适用的无血清培养液, 也没有一种只对某一种特定细胞适用的无血清培养液。至少有 4 种不同系统的无血清培养液适于 BHK-21 肾上皮细胞生长^[4]。人工培养液的应用和发展, 促进了体内微环境的一些物质分子的研究。由于 EC 细胞性质类似早期胚胎细

胞,根据一些 EC 细胞人工培养液需补充血清脂蛋白成份,从而推论并证实早期胚胎细胞的体内微环境同样存在着这些成份^[5]。

3. 化学诱导物 维生素 A 酸 (RA) 首先被用于处理 F9 EC 细胞,结果产生表型上类似早期小鼠胚胎脏壁内胚层的分化细胞^[6]。以后证明许多 EC 细胞系或克隆株能被 RA 诱导分化^[7]。所以在 EC 细胞体外诱导分化的研究中,RA 是常用的化学诱导物之一。另外发现六亚甲基双乙酰胺 (HMBA) 也能诱导一些 EC 细胞分化^[8,9]。二甲亚砜 (DMSO),二甲乙酰胺 (DMA),环腺嘌呤核苷酸 (c-AMP) 以及 Polybrene 等也是诱导 EC 细胞分化的物质。PCC 4 aza 1 EC 细胞经 Polybrene 处理 7 天,有 99% 细胞分化^[10]。单独使用 Polybrene 不诱导 PC 13 EC 细胞分化,但和 RA 合并使用,则促进 RA 对 EC 细胞的诱导分化效应。几种化学诱导物综合处理往往改变 EC 细胞的分化方向。RA 和 c-AMP 合并处理 F9 EC 细胞,则分化为神经样细胞^[11]。培养中一些因子和细胞支持介质等环境的改变,也会使同一系或克隆株 EC 细胞分化为不同类型的组织^[12]。

二、分化细胞的表型和生化特性

1. 内胚层细胞形成 常规培养的未分化 F9 EC 细胞经 RA 处理后,其形态和超微结构均产生明显的分化,类似于胚胎内胚层细胞^[13,14],处理 6—8 天,形成拟胚体,外层脏壁内胚层能合成甲胎蛋白,也产生和分泌与内胚层相关的基膜蛋白,包括层粘连蛋白 (laminin),Ⅳ型胶原蛋白和血浆纤维蛋白溶酶原激活因子等生物大分子,甚至在脏壁内胚层下衬有基膜层,发育成典型的上皮结构^[13]。F9 EC 细胞对 RA 反应存在着差异性^[15]:从 F9 EC 细胞克隆出 F9-1 和 F9-3 株,经 RA 作用后,F9-1 株对 RA 反应敏感,易被诱导分化,表达 H-2 抗原,而花生凝集素 (PNA) 受体减少;但 F9-3 株则对 RA 不太敏感,不易被诱导分化,H-2 抗原和 PNA 受体没有相

应变化^[16,17]。实验证明,F9 EC 细胞经 RA 诱导后的分化细胞类型包括内胚层、脏壁内胚层和体壁内胚层^[18]。同样,PC 13 EC 细胞经 RA 处理后,分化细胞 (END 细胞)也类似于早期小鼠胚胎内胚层,表达 I 型胶原蛋白和甲胎蛋白。就生化等表型而言,PC 13 END 细胞属于脏壁内胚层类型的细胞。但是,PC 13 EC 细胞用 RA 处理 5 天,换以正常培养液继续培养 2 周,发现除 END 细胞外,还有类神经样细胞。目前还不知道,这些细胞是直接来自残存的 EC 细胞,还是来自尚未达到终极分化的 END 细胞?与小鼠胚泡的内细胞团 (ICM) 类似,首先出现分化的是原始内胚层,EC 细胞体外诱导的最初分化,也总是内胚层或内胚层样细胞,能表达和分泌与内胚层相关的大分子。不仅 RA 诱导如此,还发现 HMBA 也能诱导 B7-2 克隆 EC 细胞分化为原始内胚层样细胞^[9]。因此,通过化学诱导物的作用,EC 细胞可作为研究早期胚胎内胚层分化的模型。

2. EC 细胞增殖减缓和生瘤率降低 许多实验证明,不论 RA 或 HMBA 诱导的分化细胞,其增殖速率都比亲代 EC 细胞慢得多。RA 对增殖速率的影响并不立即显示出来,而是在处理 48 小时以后,其增殖速率才明显减缓,并出现新的生长表型。同时,细胞恶性生长性质降低或消失。通常接种 2×10^5 PC 13 EC 细胞至同系宿主皮下,长瘤率达 100%,RA 处理 4 天后的 EC 细胞则不形成肿瘤^[18]。如果把 EC 细胞接种至预先给以 RA 的动物,瘤块生长也十分缓慢。

3. 生长因子及其受体 EC 细胞合成和分泌一些能刺激成纤维细胞生长的多肽生长因子。随着诱导分化,生长因子的合成和分泌大幅度降低。同时,分化细胞还表达另一些新的生长因子。从 EC 细胞的条件培养液中,已经分离到一些多肽生长因子,能刺激早期胚胎细胞、EC 细胞和成纤维细胞增生^[19,20]。我们也直接从 F9-3 EC 细胞的实体瘤组织分离到能使正常大鼠肾 (NRK) 细胞增生并转化的多肽转

化因子(未发表资料)。PC 13 EC 细胞经 RA 诱导分化为 END 细胞,并表达胰岛素样生长因子 IGF-II。撤除 RA 后,在特定成份的无血清培养液中加入表皮生长因子(EGF),则 EGF 与 END 细胞结合并刺激其生长。已经证明,PC 13 END 细胞表面的 EGF 受体比未分化 PC 13 EC 细胞的高二倍。F 9 EC 细胞仅结合很低的小血小板生长因子(PDGF),RA 处理 3 天的细胞,结合率比亲代细胞高 30 倍;处理 6 天,则高达 80 倍^[21]。这种现象同样在 PC 13 END 细胞中也观察到。值得注意的是 EC 细胞和其分化细胞共培养时,³H-胸腺嘧啶在分化细胞中标记指数明显增加;EC 细胞条件培养液培养分化细胞,也显示同样效应。另一方面,EC 细胞在有分化细胞存在时,细胞总数也比仅有 EC 细胞时多^[22]。这些实验表明 EC 细胞和其分化细胞之间存在着生长协同作用,细胞的增殖受异源或内源生长调节多肽分子的控制。也表明这些多肽分子的合成、分泌和细胞对这些分子的反应在发育中是受调节的。小鼠胚胎发生可能也存在着类似的机制:细胞增殖和分化受特异性生长因子以及细胞对这些因子的反应系统来控制的。

4. 磷蛋白 各种转化细胞的磷蛋白含量比正常细胞高得多。聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 EC 细胞和分化 END 细胞的³²P-标记蛋白,发现 EC 细胞本来具有的许多磷蛋白(例如分子量 21 k, 24 k, 29 k, 36 k 和 53 k)在 END 细胞中检测不出来,表明 EC 细胞分化为 END 细胞后,一些磷蛋白分子消失或减少。用抗分子量 34 K 蛋白(一种与磷酸转移酶活性相关的底物)的抗血清免疫沉淀 EC 细胞和 END 细胞³²P-标记物,EC 细胞有 20 k, 34 k 和 50 k 的几种分子,而在 END 细胞中却检测不到这些物质。EC 细胞有较高含量的磷酸化酪氨酸,RA 处理 5 天,磷酸化酪氨酸明显降低。已经知道 Src 相关蛋白激酶的活性对酪氨酸残基是专一的。有证据表明 EC 细胞表达致癌病毒相关的酪氨酸磷酸化激酶活性,同时也发现小鼠

胚胎和 EC 细胞存在着类似许多致癌病毒基因的 mRNA^[23]。最近,我们发现 B 7-2 和 F 9-3 EC 克隆株表达 C-ras^{Hs}, C-ras^{K1}, C-ras^N, C-myb, C-abl, C-sis 和 C-fos 癌基因。有趣的是 B 7-2 细胞经 HMBA 诱导分化后, C-sis 癌基因表达的产物明显降低(未发表资料)。因此,EC 细胞的恶性生长表型很可能与某些癌基因的表达有关。

三、诱导分化的作用机制

维生素 A 类药物 RA 作用于靶细胞的分子基础目前还不清楚。但有证据表明,³H-RA 标记物与 PCC 4 aza RI EC 细胞质制品温育后,在蔗糖密度梯度的 2 S 区域可检测到高放射性物质,显然 EC 细胞质中存在着 RA 结合蛋白。RA 作用于靶细胞的过程很可能类似于糖皮质激素的作用模式,即 RA 与细胞质中相应受体蛋白结合,成为受体-配体复合物,然后被转移到细胞核与染色质蛋白起作用,从而使某些与细胞分化有关的基因被激活并表达。³H-RA 标记物参入 EC 细胞,与高分子量物质相结合的标记复合物集中在细胞核和线粒体处。RA 集中在线粒体上的原因还不清楚,可能与线粒体具有酯化维生素 A 类似物的功能有关。RA-结合蛋白作用模式的另一证据是用 MNN (N-methy-N-nitrosoguanidine) 处理 PCC 4 aza RI EC 细胞,得到二种不能被 RA 诱导分化的突变株,它们的细胞质制品都缺乏 2 S RA 结合峰^[24]。然而,也有突变株 (Nulli RA⁻ 株和 PCC 4 HMBA⁻ 株)虽不能被诱导分化,但有细胞质 RA-结合蛋白。也发现另一些细胞系统,例如 HL 60 和 10 T1/2 成纤维细胞并不存在 RA-结合蛋白^[25],但 RA 类药物对这些细胞癌变和分化有着明显的作用。看来,RA 类药物对细胞分化的控制并不一定通过 RA-结合蛋白的途径。

HMBA 的化学结构和 RA 极不相似,是否通过类似机制致使 EC 细胞分化还不明确。一些实验证明,用下列不同方法处理 OC 15 SI

EC 细胞, 均能在体外分化为内胚层性质的细胞; 50—100 个 EC 细胞聚集培养; $1 \times 10^{-7} M$ RA 处理; 细胞培养在纤维凝结蛋白的支持介质中, 以胰岛素、转铁蛋白和高密度脂蛋白代替牛血清或纤维凝结蛋白作支持介质的血清培养。因此, EC 细胞诱导分化似乎存在着多种触发机制。

四、结 语

多能 EC 细胞用比较简单的方法处理就能被诱导分化, 但分化细胞的类型有很大的异质性, 难以作深入研究。一些 EC 细胞克隆株经化学诱导物处理后有限分化为较均一的细胞, 可作为 EC 细胞体外诱导分化的实验系统。近年来, 从具有一定分化的 EC 细胞中分离和建立了一些细胞系, 在一定条件下, 能够继续终极分化成特殊类型的细胞, 使有可能研究某些特殊组织的分化。例如神经细胞^[26]、骨组织和滋养层细胞等^[1]。

同一系或克隆株 EC 细胞在不同的诱导条件下产生属于不同胚层的组织, 体外细胞的环境包括培养液中一些因子和细胞支持介质的改变, 都会影响 EC 细胞的分化途径; 体内不同的微环境对同一克隆株 EC 细胞的分化方向也有显著影响^[27]。环境因子和 EC 细胞分化关系的研究是值得探索的一个领域。

胚胎发育过程中, 细胞对大量微环境的信号具有高度的专一性反应。已经注意到细胞表面糖脂和糖蛋白中的碳水化合物对细胞识别起着重要作用。EC 细胞和早期胚胎细胞的表面都具有丰富的、由半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺组成核心结构的高分子糖肽, 这与许多正常和恶性细胞有所不同。这类大分子糖肽对细胞间的信息传递, 稳定表面抗原结构以及植物凝集素受体的作用都是十分重要和必需的^[28]。若从细胞识别观点来了解胚胎发生机制, 则这种识别的可能作用是选择细胞分化的方向。因此, 研究 EC 细胞表面碳水化合物将直接关联到细胞识别和细胞分化的关系。

EGF 和 PDGF 等生长因子对细胞增殖和分化起着重要作用。EC 细胞不仅能产生和分泌 PDGF 等促有丝分裂因子, 而且随着被诱导分化, 细胞对 PDGF 和 EGF 等生长因子的结合能力也发生变化。这种现象与癌细胞通过自泌作用 (autocrine) 而增殖的假设是完全一致的。有证据表明 EC 细胞恶性生长表型可能与某些癌基因活动有关。RA 类药物和一些生长因子在控制细胞生长和分化中具有类似的功能关系^[29]。因此, 今后的研究可能会澄清正常和恶性细胞中生长因子及其受体相互作用与癌基因表达的关系。

参 考 文 献

- [1] Nicolas, J. F. et al., 1981, In "Sato, G. ed. Functionally differentiated cell lines". Alan R. Liss. New York. pp. 185—210.
- [2] Rizzino, A. et al., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 457—461.
- [3] Heath, J. K. et al., 1983, *J. Cell. Physiol.*, 115: 225—230.
- [4] Bradshaw, G. L. et al., 1983, *J. Cell. Physiol.*, 114: 215—221.
- [5] Shi, W-K. (施渭康) et al., 1984, *JEEM*, 81: 143—152.
- [6] Strickland, S. et al., 1978, *Cell*, 15: 393—403.
- [7] Jetten, A. M. et al., 1979, *Expt. Cell Res.*, 124: 381—391.
- [8] Jacob, H. et al., 1978, *C. R. Hebd. Acad. Sci. (D) Paris*, 286: 109—111.
- [9] 丛笑倩, 姚鑫, 1984, *实验生物学报*, 17: 309—321.
- [10] Speers, W. C. et al., 1979, *Am. J. Pathol.*, 97: 563—578.
- [11] Kuff, E. L. et al., 1980, *Develop. Biol.*, 77: 103—115.
- [12] Darmon, M., 1983, In "Hormonally defined media, a tool. in cell biology" eds. Fischer, G. et al., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 143—150.
- [13] Hogan, B. L. M. et al., 1983, *Cancer Surveys*, 2: 115—140.
- [14] 施渭康, 姚鑫 1983, *实验生物学报*, 16: 201—212.
- [15] 施渭康等 1982, *实验生物学报*, 15: 41—55.
- [16] 丛笑倩, 姚鑫 1983, *实验生物学报*, 16: 93—105.