

生长因子与癌

A. S. Goustin 等

生长因子是通过与细胞膜上专一性受体结合从而刺激细胞增殖的多肽分子。与所周知的胰岛素和促肾上腺皮质激素等多肽激素不同，不仅在所产生的反应，而且从分泌细胞到靶细胞的信息传递方式上都有差别。生长因子通常不以内分泌方式起作用，可能是仅通过细胞间隙的短程扩散在局部区域内发生作用。在细胞质内生长因子含量极微，血浆中的生长因子可能是血小板在血凝过程中释放的。生长因子存在于血小板中可能便于把它们向伤口部位输送，从而在创伤愈合中起着重要的作用。

除了血小板外，生长因子还存在于各种不同的成体和胚胎组织，以及大多数的培养细胞。生长因子受体也是普遍存在，许多细胞表面同时存在着一种以上的生长因子受体。生长因子对不同种类的细胞有其一定的专一性，如造血系统的一些因子(象 IL-2 和 CSF-1) 仅能刺激这一系统的一种或少数几种细胞。而 IGF-1 和 EGF 可以刺激多种类型的细胞：上皮型和间质型细胞。以无血清培养所进行的研究表明，非转化细胞的生长繁殖需要一种以上的生长因子。因此，除恶性转化的细胞外，一般细胞的生长要求多于一种生长因子。但是，一种生长因子的存在可以降低第二种生长因子促有丝分裂作用的阈值。不同的生长因子是在细胞周期的不同时刻起作用，如 PDGF 短时间处理将诱导成纤维细胞进入稳定的“感受”状态 (competence) 从而使细胞能对其他来源于血浆的生长因子发生反应。各种组织中生长因子的多样性、不同种类细胞对生长因子的专一性，以及特定类型细胞的生长需要多种生长因子的刺激等性质，可以认为这些特点是为发育期间的组织形成和在成体时的组织维持过程中，各种细胞之间协调其生长所必需的相对增殖速度提供了精巧的节奏。

人们早就发现肿瘤细胞对血清的需求较正常细胞为少。随着无血清培养技术的应用和生长因子纯品的获得，发现转化的细胞对血清需求的改变是由于其对特定生长因子需求减少或消失。失去对特定生长因子的需要常见于很多类型的肿瘤细胞，它们可以从下列

三种途径获得弥补：a) 自身生长因子合成途径的激活(自泌作用)，b) 合成一种结构改变了的生长因子受体，c) 激活受体后的途径，而无需生长因子受体的介导。

一、各类生长因子(见表 1)

1. 表皮生长因子(EGF) Cohen 最先将 EGF 描述为具有刺激新生小鼠提前睁开眼帘和长出犬齿的活性多肽，后来才认识到它对培养细胞的增殖作用。EGF 是各种培养的间质或上皮细胞的有丝分裂原，它的促有丝分裂作用被胰岛素大大加强。EGF 还能与 PDGF 一起协同作用于 BALB/C-3 T 3 细胞的增殖反应。另外，在体内和某些培养细胞，EGF 处理将诱导它们产生分化现象。近几年放射受体法的发展和运用，发现了一种 EGF 类似物 TGF- α ，它们不仅结合同一细胞膜受体，而且在大多数系统中，产生相同效应的剂量水平亦一致。可能 EGF 是胚胎型生长因子 TGF α 的成体形式。由于目前尚未在肿瘤中发现 EGF，结合肿瘤发生的概念，肿瘤很可能异位性地重新激活胚胎型基因。因此所有合成 EGF 样分子的肿瘤和肿瘤细胞事实上合成的就是 TGF α 分子。

EGF 受体是了解得最详细的生长因子受体，作为了解其他生长因子受体的一个范例。EGF 受体包括一个细胞外供配体结合的区域，一个跨膜区域以及具有酪氨酸激酶活力和可能为 ATP 磷酸化底物结合位点的细胞内区域。EGF 作用时，受体在其一定的酪氨酸上发生自身磷酸化作用。在 A 431 细胞还发现以分泌形式产生一种缺少了跨膜结构域的 EGF 受体，这一分子的生物学意义尚不清楚。

2. 血小板来源的生长因子(PDGF) PDGF 是血清中的主要有丝分裂原，由大部分血管上皮细胞合成。对成纤维细胞和平滑肌细胞，PDGF 还能诱导趋化反应。PDGF 是一种较强的有丝分裂原，可以单独诱导一些细胞的增殖。大多数转化的间质细胞可能产生 PDGF 或 PDGF 样分子。人血小板的 PDGF 为异型二聚体，由 A、B 链组成，其中 B 链已证明由 c-sis 原

癌基因编码,转化细胞可能分泌 B-B 同型二聚体起作用。

PDGF 受体存在于各种间质细胞和人的胎盘滋养层细胞,从早期胎盘得到的细胞株也存在 PDGF 受体,在对外源 PDGF 起反应时表现 c-myc 的激活和促发 DNA 的合成。由于滋养层细胞是已知的最具浸润性和增殖性的正常细胞,PDGF 受体在这一组织的表达可能有助于说明他们的“假恶性”行为。除了滋养层细胞,大多数的上皮细胞未检测到 PDGF 受体的存在。许多细胞 DNA 合成的最大刺激浓度从 11 PM 到 310 PM,很不一致,这些差异可能反应了有其他生长因子参与作用,从而降低了细胞对 PDGF 的反应阈。

3. 转化生长因子(TGF) 转化生长因子 α 类(TGF- α)最初称为肉瘤生长因子,由小鼠肉瘤病毒转化的细胞株分泌到条件培养液,具有与 I^{125} -EGF 竞争同一细胞受体的能力。现知肉瘤生长因子实际上是 TGF- β 和 TGF- α 两种物质的混合物,纯化的 TGF- α 本身在含血清的培养液中仅有微弱的软琼脂集落形成刺激活力。当初认为的 TGF- α 在 NRK 细胞上显著的集落刺激活力实际上是 TGF- α 和 TGF- β 共同作用的结果。TGF- α 除了存在于多种病毒转化的细胞,还存在于各种非瘤性组织,包括人胎盘和小鼠、大鼠的胚胎。但是,目前尚未在非瘤性的成体组织发现 TGF- α ,因此,TGF- α 很可能代表了胚胎型 EGF,只是在某些肿瘤细胞中得到了不适当的表达。

转化生长因子 β 类(TGF- β)从分子组成、膜受体结构到引发的生物反应,都与 TGF- α 不同。依细胞类型的不同,TGF- β 对细胞增殖有刺激和抑制两种不同的作用。TGF- β 起初被定义为能刺激 AKR-2B 和 NRK 细胞在软琼脂上生长,且不与 I^{125} -EGF 竞争受体的一种转化生长因子。TGF- β 对 AKR-2 B (克隆 84 A)细胞能单独起作用,但对 NRK (克隆 49 F)细胞则需 EGF 或 TGF- α 共同作用。以后知道 NRK 细胞的软琼脂分析需要 EGF,似乎是比较特殊的。因此,最近便把原先在 TGF β 定义中需 EGF 共同作用这一点给删除了。

TGF- β 存在于多种正常和肿瘤细胞中,如正常肝、肺、肾、唾液腺、大脑、心脏及胚胎和胎盘都检测到了 TGF β 。一些培养细胞能同时产生 TGF- β 和表达 TGF- β 受体,然而它们并未表现出持续的 TGF- β 刺激反应,这一现象与最近发现的可能存在非活性形式的 TGF β 是吻合的。有证据表明,TGF β 可能以类似于 IGF-1 的方式与其结合蛋白一起形成非活性分

子。考虑到 TGF β (及其受体)存在的普遍性,这一非活性分子的激活可能代表了 TGF β 作用的一个重要调节步骤。

TGF β 对各种单层培养的成纤维细胞具有有丝分裂原的作用。在 AKR-2 B 细胞中,它的有丝分裂原活力明显地是通过 PDGF 参与的间接方式发生作用。TGF β 在 AKR-2 B 细胞诱导 DNA 合成需 24 小时的前复制期,而不是 PDGF 或 EGF 通常的 12 到 14 小时。TGF β 处理 AKR-2B 细胞后的 4 小时内,c-sis 表达迅速增加,在 8 小时后产生 PDGF 样的活力分子,因此认为诱导产生的 PDGF 才是直接的有丝分裂原。这一现象表明:几种生长因子可能存在着协调作用,从而加强了细胞的增殖能力。

TGF β 对许多转化的上皮细胞具有生长抑制作用。已证明 TGF β 与 Holley 等人在 BSC-1 猴肾细胞生长的条件培养液中发现的生长抑制因子是同一种物质。在一定情况下,上皮细胞的转化可能包含了 TGF β 抑制作用的消失。在无血清培养液中,正常人前角质细胞的生长受 TGF β 抑制,而扁平上皮癌细胞在同样的培养液中不受 TGF β 的抑制,这一现象表明在转化中,生长抑制反应的阻断和生长刺激反应的诱导具有同样的效果。

TGF β 受体广泛存在于各种类型的细胞,包括上皮型和间质型细胞。放射受体法定量每个细胞的受体数目为 15000—40000 个,解离常数 25—140 PM 不等。

除了 TGF β 和 TGF α , 还有其他一些性质各异的 TGFs。有一种上皮组织来源的 TGF,能刺激癌细胞株 SW 13 在软琼脂上生长,很有意思的是,这种细胞本身也释放这一因子到其生长的条件培养液中,提示 TGF 可能是癌细胞中以自泌方式进行生长调节的因子。

4. 胰岛素样生长因子(IGF) IGF 包括 IGF-I 和 IGF-II。IGF-I 即为大家所熟知的生长调节素 C(Somatomedin C),而 IGF-II 为人的生长调节素 A 和大鼠的增殖刺激因子。IGF-I 由循环的生长激素刺激产生,在血清中与载体蛋白以非共价结合形式存在。血浆和细胞质中的 IGF-I 是一种很重要的生长因子,它能刺激大多数培养细胞的增殖。抗 IGF-I 单抗能强烈抑制血清对静态 BALB/C-3 T 3 细胞的有丝分裂作用。超生理浓度的胰岛素在合成培养液中可以替代 IGF 的需求。IGF 被认为是以自泌方式刺激细胞生长,然而,BRL-3 A 细胞虽然分泌大量的 IGF-II 到培养液,

但它们的增殖并不需要 IGF-II, 由此与自泌假设相矛盾。最近也有证据表明在小鼠胎儿的生长发育中 IGF-I 不是以自泌或侧泌方式起作用的。

人们猜测 IGF-I 可能是成年型的生长调节素, 而 IGF-II 为胚胎型对应物。IGF-I 和 IGF-II 有各自的受体, 虽然在高浓度时有交叉反应。IGF-I 受体与胰岛素受体在结构上极其相似, 为异型四聚体, 两个跨膜的 β 亚基各以二硫键连结一 α 亚单位。 α 亚单位提供配体结合部分, β 亚基具 ATP 酶和酪氨酸酶活力。IGF-II 受体较为简单, 为单链分子, 可能不存在配体诱导的下降调节。

5. 白细胞介素 2(IL-2) IL-2 最初叫 T 细胞生长因子(TCG-F), 它能维持正常的细胞毒性 T 淋巴细胞克隆群落的体外长期培养。用植物凝集素处理正常人淋巴细胞可使 IL-2 转录提高 30 倍。而免疫抑制药物 Cyclosporin A 能抑制这一转录的扩增效应, 提示了 IL-2 基因的激活在 T 细胞活化中的作用。在白血病病毒 1 转化的 HUT-102 B 2 细胞中, 含有一种特殊 IL-2 受体的 mRNA, 它有一段 216 碱基区域被裂解出来, 与正常 IL-2 受体比较, 这种受体分子在 IL-2 结合部位或靠近其结合部位缺失了 72 个氨基酸, 这一改变的意义还未完全证实, 但很可能类似于 VerbB 产物的方式起作用。目前在静止 T 细胞尚未发现有功能性的 IL-2 受体存在。ConA 或抗原对 T 细胞的增殖作用包括了 T 辅助细胞诱导产生 IL-2 和 T 杀伤细胞开始表达 IL-2 受体的二步过程。因此, 控制 IL-2 受体在免疫反应中的表达是正常 T 细胞增殖控制的关键。

6. 集落刺激因子(CSF) 由软琼脂集落形成法鉴定, 纯化的一些能调节造血母细胞生长和分化的因子, 叫集落刺激因子(CSF)。这些因子包括 CSF-1、CSF-2、粒细胞 CSF 和 muti-CSF, muti-CSF 能刺激混合细胞的集落形成, 它能促进粒细胞、巨噬细胞和多潜能干细胞的生长、分化; 早期红细胞、嗜伊红细胞、多异染色质细胞和肥大细胞前体的集落形成。最近报道 c-fms 癌基因产物就是 CSF-1 受体, 但不象 Verb B, V-fms 基因产物与 CSF-1 受体比较并没有明显的缺失现象。c-fms 基因位于人类 5 号染色体长臂, 有趣的是骨髓细胞缺失 5 号染色体长臂的病人特别易患髓性白血病和红细胞增多症, 但目前还没有分子水平的解释。用 CSF-1 或 muti-CSF 处理牛骨髓粘附细胞导致 CSF-1 受体的上升调节, 而不是通常的生长因子诱导的下降调节。目前虽然只有一些零散的证据, 但仍可以看出, 造血细胞的分化是通过细胞间各种生

长因子介导的一系列复杂事件所形成的(见表 1)。

二、肿瘤中的自泌与侧泌作用

一个细胞自体产生生长因子并同时表达其受体则导致明显的生长优势。显而易见, 转化细胞具有这种生长的自我刺激作用。平滑肌细胞、人软骨肉瘤细胞、化学转化的小鼠成纤维细胞和 T 细胞淋巴瘤分别含有 IGF-1, PDGF, TGF β 和 IL-2, 它们已被认为可能以这一自我刺激模型生长。然而, 事实上结果并不一致。利用抗生长因子抗体抑制生长因子与其受体结合作用的特点, 用抗体处理细胞, 发现软骨肉瘤细胞克隆株 U-2 OS 的生长分别被 IGF-1 和 PDGF 的相应抗体所抑制。在化学转化的成纤维细胞中, 由于缺乏高亲和力的 TGF β 抗体, 没有做抗体抑制试验, 但已证明它们的环境中具有 TGF β 。有意思的是, 化学转化的成纤维细胞较未转化的亲本细胞的变化只是增加了细胞对 TGF β 反应的敏感性, 而不是增加 TGF β 的产量。此外, 这一自我刺激现象不适用于人的 T 细胞淋巴瘤。无论是新鲜分离的、还是由此建株的淋巴瘤细胞, 均不产生 IL-2 因子或对 IL-2 起反应。成年 T 细胞淋巴瘤病人的瘤细胞或细胞株, 只表达 IL-2 受体, 目前还不清楚这种细胞表达的 IL-2 受体是否具有类似于 VerbB 产物的作用方式。

然而, 一些转化细胞能在软琼脂上生长以及对生长因子或血清的不依赖性, 甚至正常胎盘滋养层细胞的“假恶性”行为都可用自泌作用模型予以解释。此外, 侧泌作用也可能是生长因子在肿瘤发展过程中的一种重要方式。癌细胞和基质细胞相互提供生长因子, 彼此刺激, 使得肿瘤不断增生。同时, 这种侧泌作用也可以解释何以一些恶性上皮癌细胞不能在体外培养。当然, 这种情况也可用血清中的 TGF β 对上皮细胞生长有抑制作用予以解释, 因为实验证明, TGF β 对不少上皮细胞的生长具有一定程度的抑制作用。

三、生长因子、癌基因及细胞反应

详细分析生长因子与受体结合直到引发 DNA 合成之间一系列细胞事件是目前细胞生物学和肿瘤生物学的一个主要任务。生长因子信号传递到细胞核这一过程包括生长因子受体、它们的底物、许多关键的酶(包括激酶和脂酶), 细胞骨架蛋白、转录因子、DNA 结合蛋白以及 RNA 聚合酶复合物等。生长因子诱导

表1 各类生长因子

生长因子	前体分子	成熟分子	细胞来源	靶细胞	受体分子
EGF	1168 或 1217 aa	6 KDa 53 aa	唾液腺、十二指肠腺、壁细胞	多种上皮和间质型细胞	170 KDa 酪氨酸酶活力、C-erbB编码
TGF α	160 aa	5.6 KDa 50 aa	转化细胞、胎盘胚胎	同 EGF	同 EGF
TGF β	391 aa	25 KDa (2 \times 112 aa)	血小板、肾、胎盘培养细胞	成纤维细胞、乳腺上皮细胞、黑色素瘤	565-615 KDa 复合物, (2 \times 280 - 290 KDa)
PDGF	B链: 241 aa(B链由 c-sis 编码)A链还不清楚	32 KDa(B链: 16 KDa, A链: 14-18 KDa), + CHO 基团	血小板、内皮细胞胎盘	间质细胞平滑肌细胞、胎盘滋养层细胞	185 KDa、酪氨酸酶活力
IGF-I	130 aa	7 KDa 70 aa	成体的肝和其他部位平滑肌细胞	上皮、间质细胞	450 KDa 复合物 2 α 链: 130 KDa 2 β 链: 85 KDa
IGF-II	180 aa	7 KDa 67 aa	胚胎肝、胎盘	上皮、间质细胞	260 KDa 单链分子
IL-2	鼠 153 aa 人 160 aa	15 KDa(133 aa) 一些有 CHO 基团	辅助性 T 细胞	细胞毒性 T 淋巴细胞	55 KDa(33 KDa 蛋白 + 22 KDa CHO)
FGF	不清楚	14-18 KDa(碱性 FGF, 146aa)	大脑、垂体、软骨肉瘤	内皮细胞、成纤维细胞	不清楚
β -NGF	307 aa	26 KDa 2 \times 118aa	唾液腺	交感和感觉神经元	130 KDa, 可能有酪氨酸酶活力
CSF-1	252 aa	70 KDa (2 \times 35 KDa)60%CHO	小鼠 L 细胞	巨噬细胞前体	170 KDa 酪氨酸酶活力, c-fins 编码
CSF-2	144 aa	15-28KDa(127aa) (1-50%CHO)	内毒素处理的肺; 胎盘	巨噬细胞和粒细胞前体	不清楚
Muti-CSF (IL-3)	144 aa	28 KDa(134 aa) (50%CHO)	T 淋巴细胞	嗜伊红细胞、肥大细胞、粒细胞、巨噬细胞前体; T 淋巴细胞	不清楚

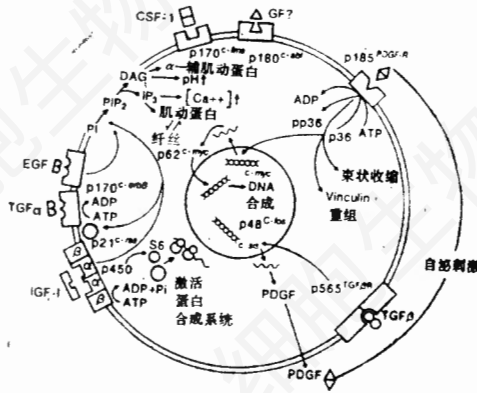


图1 生长因子—受体—应答途径中包含的原癌基因的细胞产物

生长因子的特异性高亲和力受体以细胞膜平面上矩形表示。它们都有自己特有的生长因子结合位点，表明了亚单位结构。c-myc和c-sis原癌基因以细胞核内双螺旋表示；它们的mRNA转录子用单条波浪形曲线表示。磷脂酰肌醇途径(PI→PIP₂→DAG + IP₃)表示的是发生在细胞膜平面上。c-fos原癌基因的蛋白产物在核内表示，虽然这一虚构的细胞表示出带有七种不同的生长因子受体，但是事实上，不同的生长因子具有一定程度的细胞种类专一性(见表1)，这里没有表示出受体内容和/或下降调节。进一步的解释见下文。P170：表示170-kDa蛋白(其他蛋白也是相同表示法)，PP36：36 ka的磷酸化蛋白。

的DNA合成的可能途径以及肿瘤转化中的可能变化简述如图1。

1. 生长因子与其相应的细胞表面受体结合 结合生长因子后的受体可能发生构象变化，或与膜上其他蛋白发生联系，产生活化的受体。

2. 活化的受体激活一系列的细胞内底物 除受体自身磷酸化外，还磷酸化一些目前尚不知其功能的底物。也可能包括 Vinculin、烯醇酶和磷酸甘油酸变位酶。

受体激活有时并不需要生长因子的存在。象 VerbB 癌基因产物，认为它们是活化形式的 EGF 受体，无需 EGF，就能传递 EGF 的有丝分裂作用信号。最近，在 ALV 诱导的鸡红白血病中，观察到整个 ALV 基因组整合到 c-erbB 位点，在 ALV 启动子的控制下，过量表达缺失配体结合域的受体，使细胞处于生长刺激的“开启”状态，持续地被激活。此外，也证明 c-fms 基

因的蛋白产物是细胞表面 CSF-1 受体，V-fms 也可能编码 CSF-1 受体的另一种形式。

3. 随着短暂的细胞内游离Ca⁺⁺浓度的增加，蛋白激酶C和环腺苷酸激活，细胞骨架重组以及三磷酸肌醇和二磷酸甘油酯浓度增加 这些早中期事件发生在生长因子刺激后的几分钟内。目前，尚不清楚这些时间上密切相连的事件是否存在着因果关系。

最近发现 ras 癌基因的 P21 蛋白可能参与生长因子信号的传导。除了诱导形态转化外，P21 蛋白的显微注射还诱导 DNA 合成。用抗 P21 蛋白的单抗显微注射，能阻断 EGF/insulin 刺激的 DNA 合成，表明 P21 蛋白是生长刺激传导过程中必不可少的中介物，由此也提示，这一途径其他步骤的改变将可能导致肿瘤的发生。如果受体后过程被持续激活，细胞就可能连续地接受增殖刺激，无需生长因子或其受体的存在，这也可能是(激活 ras)癌基因的转化机制。

4. 在中期阶段(20分钟—4小时)，许多基因开始转录 其中最引人注目的是诱导了一些细胞癌基因的转录。用 PDGF 处理成纤维细胞，分别在45分钟和2小时内，导致 c-fos mRNA 和 c-myc mRNA 提高近40倍。

5. 由生长因子诱导产生并位于细胞核的蛋白可能参与生长调节基因多种效应的激活 c-myc 和 c-fos 基因产物可能是 DNA 结合蛋白，主要位于细胞核，详细的功能还不清楚。但这些基因的表达水平与细胞增殖能力是密切相关的。小鼠浆细胞瘤和 Burkitts 淋巴瘤细胞株，都有特征性的含 c-myc 位点的染色体易位现象，因此在这些肿瘤细胞中，染色体重排可能使 c-myc 位点激活，结果都有高水平的 c-myc mRNA 的表达。但是，myc mRNA 持续性高水平合成并不足以使成纤维细胞转化，完全转化似乎需要另一个 Ras 家族的癌基因的共同作用。Armelin 等人用 c-myc 基因转染 3T3 细胞证明 c-myc 基因的激活只是导致细胞不依赖于 PDGF 的刺激作用，而不是靶细胞的转化。如果应用 Pledger 等人的感受态——进行态模型(Competence-progress model)，问题就更清楚了，根据这一假设，生长因子可分为两大类：感受性因子和进行性因子，感受性因子诱导细胞处于对进行性因子起反应的“感受”状态。按照 PDGF 对 c-myc 基因的诱导作用，推测 c-myc 蛋白的表达可能就是细胞感受态的一种表现。然而最近在入正常 B 淋巴细胞的实验表明 c-myc 基因的诱导作用是必需的，但不足以诱导完全的感受状态。因此这种假说除生长因子外，生长

因子诱导的细胞内反应事件也应分感受性和进行性两大类。这样,某些癌基因产物可能涉及感受态(如 *myc*、*myb*、*Ela*、*fos*、*sis*),另一些则与进行态有关(如 *ras*、*Blym*、*raf/mil*),也有介于两者之间(多瘤病毒的 *middle T*)。

四、摘要与小结

刺激细胞增殖的多肽生长因子,是培养细胞也可能是活体内细胞重要的生长调节分子。体外非转化细胞的生长繁殖一般需要一种以上的生长因子。通常条件下,由于生长因子较培养液中其他成分更易耗尽,因此成为增殖的限制因子。肿瘤细胞的增殖对特异生长因子需求的减少或消失是一种较普遍的现象,也是肿瘤细胞的主要特征。对各类生长因子及其癌基因产物的研究,使我们对肿瘤细胞增殖的机制有了进一步的了解:细胞增殖是通过生长因子—受体—细胞反应这一信息传递途径完成的,这一途径中任何一步改变都可能影响细胞增殖。

研究生长因子作用的分子机制刚开始,最近几年对细胞癌基因的注意力和兴奋点已逐渐转向生长因子。这不仅是由于生长因子参与了正常细胞的生长控制,而且由生长因子启动的细胞增殖过程包含着癌发生的病因学。对生长控制进行分子分析的一个重要目的是希望找出在生长调节过程中起重要作用的具体基因或蛋白。编码生长因子、受体和受体后过程的基因可能是关键性调节基因中一组重要的子集。此外,这些基因的细胞专一性提示人们有可能用只杀伤那类增殖细胞的药物来进行导向治疗,而不是目前所用的广泛性杀伤药物。比如,那些干预 *TGF β -sis-PDGF* 途径的试剂,可能抑制肉瘤中大部分间质细胞的增殖,而不影响造血系统的细胞和肠上皮细胞的正常增殖,对后者也有同样的损伤效果是目前化学药剂经常产生的副作用。

陈虹摘译自 *Cancer Research*

第 46 期(1986年)

施渭康校

植物组织培养的次生代谢产物

IV. 生物素(诱导突变与生物测定)*

渡边 克美

1. 实验材料

生物素是一类维生素。可试用细胞筛选方法分离出生物素高产株。生物素在体内几乎均作为生物素酶的辅助因子以与蛋白质结合的形态存在,而参与 CO_2 固定与转移反应。缺乏生物素则毛发脱落、皮肤发炎。筛选生物素高产株必需先以多种富含生物素的植物细胞作为筛选高产株的试验材料,选出培养细胞种^[1]。在细胞进入生物素含量最高的恒定期时测定其生物素含量,选择含有生物素最多的培养细胞种。本文将测定过的植物培养细胞中生物素含量最高的绿色薰衣草(*Lavender*)作为培养细胞的实验材料。

2. 生物素高产株的分离

A. 生物素含量的定量方法

培养细胞中生物素含量的定量采用乳酸杆菌

Lactobacillus plantarum ATCC 8014 进行微生物定量法,以滤纸圆片平板法测试^[2],测定进入生物素含量最高的恒定期细胞的鲜重。将细胞进行深度冷冻,冷冻的细胞放入玻璃匀浆器(*Homogenizer*)加入少量蒸馏水进行破碎,细胞碎片移入离心管,加入少量蒸馏水在匀浆器中,收集残留的细胞碎片,一放入离心管,以 3000 r/m 转速离心 15 分钟,上清液移入另一试管作为生物素定量用的检测液。用滤纸圆片平板法求出检测液的生物素浓度,然后测定检测液的量,求出每一培养细胞鲜重的游离状态生物素的含量,这一数值作为高产株的筛选指标。结合态生物素在细胞中仅作为辅酶存在,因而可以认为游离型态生物素含量高的细胞中生物素总量也高。

B. 筛选方法

将培养细胞置于网孔为 250 μm 的不锈钢筛网上,筛网放于培养皿中,细胞稍稍浸没于加入的液体培养