

参 考 文 献

- [1] Nieuwkoop, P. D. and L. A. Sutasurya, 1979, Primordial germ cells in the choroides. Cambridge Uni. Press.
- [2] William, M. A. and L. D. Smith, 1971, *Dev. Biol.*, 25: 568.
- [3] Mahowald, A. P. and S. Hennen, 1971, *Dev. Biol.*, 24: 37.
- [4] Ikenishi, K. and M. Kotani, 1975, *Dev. Growth Diff.*, 17: 101.
- [5] Ikenishi, K., 1982, *Ibid.*, 24: 205.
- [6] Buehr, M. and A. W. Blackler, 1970, *J. Embry Exp. Morph.*, 23: 375.
- [7] Tanabe, K. and M. Kotani, 1974, *J. Embry. Exp. Morph.*, 31: 89.
- [8] Smith, L. D., 1966, *Dev. Biol.*, 14: 330.
- [9] Blackler, A. W., 1970, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 5: 71.
- [10] Wakahara, M., 1977, *J. Embry. Exp. Morph.*, 39: 221.
- [11] Ijiri, K. I., 1977, *Dev. Biol.*, 55: 206.
- [12] Neff, A. W. et al., 1983, *Ibid.*, 97: 103.
- [13] Wakahara, M. et al., 1984, *Diff.*, 26: 203.
- [14] Jurand, A. and K. E. Dixon 1986, *J. Exp. Zool.*, 237: 73.
- [15] Cleine, J. H. and K. E. Dixon 1985, *J. Embry. Exp. Morph.*, 90: 79.
- [16] Cleine, J. H., 1986, *Ibid.*, 94: 83.
- [17] Wakahara, M. et al., 1984, *Gamete Res.*, 9: 361.
- [18] Kamimura, M. et al., 1976, *J. Embry. Exp. Morph.*, 36: 197.
- [19] Wylie, C. C. and T. B. Roose 1976, *J. Embry. Exp. Morph.*, 35: 149.
- [20] Kamimura, M. et al., 1980, *Ibid.*, 59: 1.
- [21] Delbos, M. et al., 1982, *J. Morph.*, 171: 355.
- [22] Wylie, C. C. et al., 1976, *J. Embry. Exp. Morph.*, 35: 139.
- [23] Heasman, J. and C. C. Wylie, 1981, *Proc. R. Soc. Lond.*, B 213: 41.
- [24] Wylie, C. C., 1980, *Bioscience.*, 30: 27.
- [25] Heasman, J. et al., 1981 *Cell.*, 27: 437.
- [26] Sanders, E. J., 1986, *Progr. Histochem. Cytochem.*, 16/3: 1-55.
- [27] Fujimoto, T. et al., 1984, *Dev. Growth Diff.*, 26: 362.
- [28] Giorgi, P. P., 1974, *J. Embry. Exp. Morph.*, 31: 75.
- [29] Kuwana, T. et al., 1986, *Anat. Rec.*, 215: 403.
- [30] Wylie, et al., 1985, *Dev. Biol.*, 112: 66.

脂质体作为植物细胞工程载体研究的现状*

甘 苏 生

(华东师范大学生物系)

近年来,植物分子生物学有了迅速发展,相继已建立起了适用于植物细胞的一系列载体系统,如以Ti质粒为基础的单、双质粒系统;以花椰菜花叶病毒(CaMV)为主的植物病毒载体系统;以及脂质体载体系统等。前两者已有综述^[1-3],本文仅就脂质体载体系统及其在植物细胞修饰、遗传修饰研究中的现状作一综合介绍。

一、脂质体载体系统

由于对原生质体加以细胞修饰和遗传修饰

时没有细胞壁的限制,近年来将核酸分子(DNA、RNA)和细胞器等直接引入原生质体的实验越来越多,已成为植物细胞工程研究的一个重要方面。然而,原生质体常常向培养基中分泌核酸水解酶等而使其中的核酸物质在进入原生质体之前就被分解,因此就很有必要建立核酸分子的保护系统。植物细胞工程学家自

* 本文得到颜季琼教授、沈曾佑、张志良副教授的指导,周苹、黄祥辉同志提出宝贵意见,谨致谢意。

然想到了早已在动物细胞中使用的脂质体。

(一) 脂质体的种类

脂质体是由磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱等构成的双分子膜封闭小泡。按其大小、制备方法 & 结构可分为 SUV 型 (small unilamellar vesicle)、LUV 型 (large unilamellar vesicle)、MLV 型 (multilamellar vesicle) 等。由于 SUV 型脂质体容量小, 不宜用来包裹核酸和细胞器等, 其它三类则都可用作载体。若按其电荷性质又可分为正电荷性、中性及负电荷性脂质体三类。一般用磷脂酰丝氨酸和磷脂酰胆碱分别制成的脂质体呈中性; 但若在其中加入十八胺即呈正电荷性; 混入胆固醇和联十三烷磷酸盐则呈负电荷性。

(二) 脂质体载体的实验体系

目前脂质体载体实验体系基本已建立(图 1)。首先是将目的基因或细胞器等与磷脂溶液混合, 经超声波等处理制成脂质体, 然后将这种含有核酸或细胞器的脂质体与原生质体混合在一起, 经适当处理就能使之与原生质体融合^[4], 或通过内吞作用进入原生质体^[5]而达到遗传修饰或细胞修饰的目的。目前已建立的实验体系具体有如下几种:

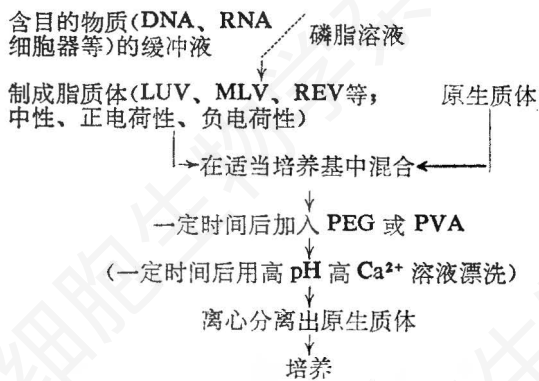


图 1 用脂质体将核酸、细胞器引入原生质体的操作流程^[3]

1. 植物病毒 RNA-脂质体系统 植物病毒 RNA 在通过脂质体被引入原生质体后能复制且合成外壳蛋白而形成病毒颗粒, 这样就可借助荧光标记的抗该病毒的抗体来检测之, 从

而计算出感染率以反映脂质体将功能核酸引入原生质体的多少。该系统主要包括脂质体制备、脂质体与原生质体的融合及检测等三个步骤。

(1) 脂质体的制备 实际上是将植物病毒 RNA 装载入脂质体的过程, 目前比较成熟的方法主要有两种即: Ca-EDTA 螯合法^[6,7]和逆相蒸发法^[8,9]。图 2 表示 Ca-EDTA 螯合法制备包含 TMV-RNA 的 LUV 型脂质体的一般过程。先通过超声波处理将磷脂酰丝氨酸等磷脂制成负电荷性 SUV, 然后加入 Ca²⁺ 使之相互融合直至形成蛋卷状, 再加入 TMV-RNA 等植物病毒核酸, 最后加入 EDTA 来螯合 Ca²⁺, 以除去之, 这样即可得到包含有病毒核酸的 LUV 型脂质体。该法操作缓和, 约有 10% 的核酸能被包入脂质体。图 3 为逆相蒸发法制备 REV 型脂质体的过程示意图。在溶于有机溶剂的磷脂溶液(图 3-1)中加入核酸水溶液时, 磷脂由于亲水基朝水层而并排在两相界面(图 3-2), 经超声波处理即在有机相中形成包有水溶液的小泡(图 3-3), 减压蒸馏有机溶

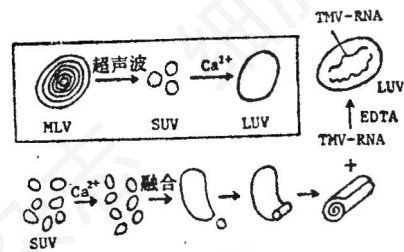


图 2 Ca-EDTA 螯合法制备 TMV-RNA/LUV 模式图^[6,7]
(将磷脂置于水中混和即得 MLV)

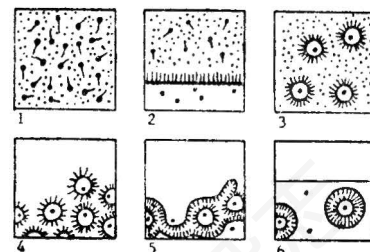


图 3 逆相蒸发法制备 REV 型脂质体示意图^[8,9]

剂(图3-4,5)并加入水溶液,搅拌后即形成REV型脂质体(图3-6)。该法核酸包被率可高达30-50%,高分子量的DNA也同样可被包入脂质体,故其应用范围较广。

(2) 脂质体与原生质体的融合^[7,8] 将上述所制备的脂质体与烟草或长春花原生质体按一定比例混合,并用聚合度为300的聚乙烯醇(PVA)或聚合度为80的PEG处理一定时间,然后再用高pH高Ca²⁺溶液处理30分钟以上,分离原生质体,并将它们培养在改良的Linsmaier和Skoog培养基上和25℃条件下。

(3) 检测 培养20-24小时后即可用免疫荧光组织学或电镜观察法^[7,8]或荧光化学法^[9]来检测植物病毒在原生质体内的增殖情况。

2. Ti质粒-脂质体系统 通过上述的逆相蒸发法将Ti质粒包入REV型脂质体内,在PVA或PEG处理下与原生质体融合^[10]。由于Ti质粒的T区DNA进入原生质体后即能整合进植物细胞的DNA组^[1,2],因而可通过生长素自主型来选择、鉴定细胞株,或进一步用Southern杂交法来确定之。

3. 其它核酸-脂质体系统 上述两个系统中的核酸都来自在自然条件下就易于侵入植物细胞的植物病毒或Ti质粒,还可用大肠杆菌DNA^[11]或质粒pBR 322^[11-13]等的核酸,其一般的方法是:先用放射性³H标记这些核酸,然后通过上述两种方法制备包被有这些核酸的REV型^[11]或LUV型^[12,13]脂质体,最后利用PEG诱导脂质体与原生质体融合,并追踪带有³H的原生质体检测融合效果。

4. 细胞器-脂质体系统 (见后面脂质体与细胞修饰一节)

(三) 脂质体载体的特点

脂质体作为植物细胞工程载体有如下四大特点:

1. 人造性 Ti质粒和一些植物病毒在作为植物基因载体时虽然也经过一定的人工修饰和加工,但它们终究是“天然的”,而脂质体则

完全是人造的,并可根据需要制备出不同的脂质体,而且也比较经济。

2. 稳定性 裸露的DNA虽然也可直接用于原生质体遗传修饰,但由于易受原生质体分泌在介质中的核酸酶的作用而降解,故其稳定性和感染率都较小(参见表1第3项),脂质体则具有抗核酸酶的能力因而具有较大的稳定性。

3. 广宿主性 无论是Ti质粒还是TMV病毒载体,它们都有一定的宿主范围,如Ti质粒就不易感染禾本科作物,而脂质体则不受宿主的限制,它几乎能与所有的原生质体融合而将内含物引入。

4. 超载性 脂质体的超载性有三个方面的含义,一是Ti质粒等载体所能运载的基因片段是有一定大小及特定粘性末端限制的,而脂质体则不然,一个LUV的容量可高达数个完整的Ti质粒;二是Ti质粒等本身就是基因的载体,而脂质体则可作为这些载体的载体;三是脂质体能将叶绿体之类的细胞器载入原生质体,这是其它任何植物基因载体所无法比拟的。

二、脂质体与遗传修饰

所谓遗传修饰,就是指向原生质体引入大分子遗传物质(DNA、RNA等)的技术。自从Cassells^[18]1978年将包被有FDA(荧光素二乙酸酯, fluorescein diacetate)的正电荷性LUV型脂质体与西红柿原生质体混合并发现FDA被引入原生质体以来,脂质体便作为原生质体遗传修饰的重要载体,越来越受到人们的重视并取得了相当大的进展。

近几年来,随着以脂质体为中心的实验体系的逐步建立,人们对脂质体将目的物质引入原生质体的最适条件进行了大量的研究。首先是原生质体与脂质体融合时存在一个最适数量关系,认为 3×10^6 个原生质体与相当于1-2微摩尔磷脂的脂质体相混合较妥,否则,脂质体量过多就会引起原生质体的破裂^[10];其次,

一般认为 PVA(聚乙烯醇)和(或)PEG(聚乙二醇)的处理是必要的,不然脂质体与原生质体几乎不发生融合;第三, Ca^{2+} 处理也是绝对必需的^[16];第四,存在一个最适 pH 值^[16]。Lurquin 等(1982-1983)^[6]发现,混合时介质的最适 pH 为 5.6(对 MLV 型脂质体而言)或 9.0(对 REV 型脂质体而言),若加 12%PEG 将更有效。实验发现,当脂质体与原生质体混合一定时间后(5 分钟^[18]或 1.5 小时^[11]),用 PEG 或 PVA 处理则能得到较理想的结果,否则效果不大。Fukunaga 等^[7]用中性的 LUV 包被 TMV-RNA 试验,发现用 10%PEG 和 10%PVA 处理后,若再用高 pH 值高 Ca^{2+} 浓度的溶液处理,则引入长春花原生质体的百分率就高,荧光抗体法检测发现可高达 80%。Rouze 等(1983)^[16]在用免疫荧光和酶标免疫吸附分析法研究了包被有 TMV-RNA 的负电荷 REV 型脂质体与烟草叶肉原生质体融合时的最适条件后指出,用 PEG 预处理的原生质体,有 70%可与脂质体融合,并指出融合时 Ca^{2+} 处理是必不可少的,但脂质体中若夹杂胆甾醇则对原生质体活力和融合都不利。而 Nagata 等(1981)^[8]则报道,用中性 REV 型脂质体将 TMV-RNA 引入烟草原生质体时, PVA 处理较 PEG 更有效。表 1 显示在不同实验条件下用 PEG 或 PVA 处理后 TMV-RNA 引起原生质体感染的百分率。

此外,脂质体的电荷性质及类型对其将目的核酸引入原生质体的影响也很大。据 Lurquin 等^[22]报道,正电荷的脂质体无论对于核酸的包被还是将核酸引入原生质体,其效果都较好。Fraley 等^[23]将烟草花叶病毒的 RNA 包被在 LUV 内引入烟草原生质体,发现若用正电荷性 LUV,则不仅原生质体的生存率低,而且原生质体中也找不到引入的 TMV-RNA;而负电荷的 LUV 则能获得较好的结果。据 Rollo 等^[24]报道,若将芜菁丛生病毒的 RNA 包被在 MLV 中则不引起感染,仅在用 REV 包被时才能引起感染。

至于由脂质体引入原生质体之核酸的命

表 1 不同处理条件下 TMV-RNA 对原生质体的感染率^[6]

感染条件	原生质体感染率(%)	
	PEG	PVA
1.用脂质体包被 TMV-RNA	68	56
2.用 RNase 处理包被有 TMV-RNA 的脂质体后,再与原生质体融合	65	52
3.TMV-RNA 直接与原生质体混合	3	1
4.先用 RNase 处理 TMV-RNA,然后与原生质体混合	0	0
5.TMV-RNA + 空载脂质体 + 原生质体	2	1
6.TMV 病毒粒子 + 原生质体	19	13

注: PEG 聚乙二醇; PVA 聚乙烯醇。

运,尽管有人^[15,25]曾报道质粒被引入后不久即被分解掉,但大多数的实验都获得了外来核酸在原生质体内整合和(或)表达的证据。早在 1979 年, Lurquin^[27]就报道,包被有质粒 DNA 和大肠杆菌 DNA 的脂质体经多聚鸟氨酸(PLO)和 PEG 处理被引入了豇豆原生质体,但它们并非以闭环型(CCC 型, closely covalent circular form)而是以开环型(OC 型, open circular form)存在于原生质体的细胞核中。Ohgawara 等^[26](1983)也报道,用正电荷性 REV 脂质体将质粒 pBR 322 引入胡萝卜原生质体一星期后,在培养的原生质体中仍有若干此质粒存在。Wacanabe 等^[28](1982)用中性的 LUV 脂质体将 TMV-RNA 引入烟草原生质体,6 小时后即形成 TMV 粒子,20—24 小时后每个原生质体中可观察到 5×10^5 个病毒粒子。

三、脂质体与细胞修饰

所谓细胞修饰,就是指向原生质体中引入叶绿体、线粒体等细胞器的技术。尽管曾有人报道用 PEG 直接将细胞器引入了原生质体^[21],但实际上细胞器膜因与原生质膜融合而已破裂^[20]。近年 Giles 等人^[19]以脂质体作

为载体成功地将菠菜叶绿体引入了美洲曼陀罗的原生质体。

细胞器-脂质体载体系统的构建方法与前述的其它系统不同,其间不用超声波和 Ca^{2+} 处理。根据 Giles 等的工作^[19],是先将卵磷脂、十八胺及胆甾醇以 10:3:7 的比例混合,并在真空干燥器中冷冻干燥使之呈单一薄膜沉积在玻璃器皿的表面,然后在这层脂膜上加入叶绿体悬液,升温至 25℃ 并轻轻振荡,使膜脂形成包被有叶绿体的正电荷脂质体。脂质体与原生质体的融合则用 PEG-6000 来诱导,并用显微镜和氧电极进行检测。他们发现,所引入的叶绿体都排列在原生质体膜的内表面附近,并在较长时间内表现出了较高的放氧活性。

虽然 Giles 等的工作已揭示了脂质体用于细胞修饰的光明前景,但实际上有关这方面的报道远没有象它用于遗传修饰那么多,这方面的研究毕竟只是刚刚开始,各种细胞器尤其象具细胞质雄性不育遗传信息的线粒体和具莠去津抗性遗传信息的叶绿体的脂质体引入法尚待建立^[3]。

综上所述,脂质体作为植物细胞工程中遗传修饰和细胞修饰载体的实验体系已基本建立,但应当指出的是,目前所用的植物原生质体种类还不多,引入的外来性状经济价值也都不高;另一方面,与其它基因载体相比较,脂质体虽然能将一些外来基因引入原生质体,但它本身并不能决定所引入的遗传物质能否整合进染色体、能否表达乃至遗传给后代。脂质体载体的这种局限性无疑要影响到它的使用价值。但是,脂质体载体具有很大的发展潜力,其前景是十分广阔的。

摘 要

脂质体作为植物细胞工程载体具有人造性、稳定性、广宿主性及超载性等特点,目前它用于遗传修饰和细胞修饰的实验体系已基本建立,即植物病毒 RNA-脂质体系统、Ti 质粒-脂质体系统、其它核酸-脂质体系统及细胞

器-脂质体系统等。在遗传修饰方面的研究进展很快,但脂质体不能决定引入遗传物质能否整合和表达而影响了其广泛使用;在细胞修饰方面工作还只是刚开始。脂质体载体有很大的发展潜力。

参 考 文 献

- [1] 白永延,唐 惕,许智宏,1984.细胞生物学杂志,6(3):97-102.
- [2] 唐 惕,1984.植物生理学通讯(4):11-13.
- [3] 甘苏生,1984.当代研究生(创刊号)1:272-279.
- [4] Lurquin, P. F. and Sheehy, R. E., 1982, *Plant Sci. Lett.*, 25: 133-146.
- [5] Fukunaga, Y. et al., 1983, *Exp Cell Res.*, 144: 181-189.
- [6] Wilson, T. et al., 1979, *Cell.*, 17: 77-84.
- [7] Fukunaga, Y. et al., 1981, *Virology.*, 113: 752-760.
- [8] Nagata, T. et al., 1981, *Mol. Gen. Genet.*, 184: 161-165.
- [9] Cutler, A. J. et al., 1984, *Anal. Biochem.* 139, 482-486.
- [10] 长田敏行,1982,化学と生物 20, 177-184.
- [11] Matthews, B. F. & Cress, D. E., 1981, *Planta.*, 153: 90-94.
- [12] Lurquin, P. F., 1981, *Plant Sci. Lett.*, 21: 31-40.
- [13] 内宫博文,原田 宏,1981,日本植物生理学会 1981 年会讲演要旨集 p. 49-50.
- [14] Cassells, A. C., 1978, *Nature.*, 275: 760.
- [15] Lurquin, P. F. et al., 1982/83, *Plant Sci. Lett.*, 28: 49-61.
- [16] Rouze, P. et al., 1983, *Plant Sci. Lett.*, 31, 55-64.
- [17] Lurquin, P. F. & Sheehy, R. E., 1982, *Plant Sci. Lett.*, 25: 133-146.
- [18] Fraley, R. T. et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79: 1859-1863.
- [19] Giles, K. L. et al., 1980, *IN VITRO.*, 16: 581-584.
- [20] Davey, M. R. et al., 1980, *Plant Sci. Lett.*, 7: 7-16.
- [21] Bonnett, H. T. & Eriksson, T., 1974, *Planta.*, 120: 71-79.
- [22] Lurquin, P. F. et al., 1981, *FEBS Letters.*, 125: 183-187.

- [23] Rollo, R. et al., 1981, *Plant Sci. Lett.*, 20: 347—354.
- [24] Rollo, F. & Hull, R., 1982, *J. Gen. Virol.* 60, 359—363.
- [25] Uchimiya, H. & Harada, H., 1981, *Plant Physiol.*, 68: 1027—1030.
- [26] Ohgawara, T. et al., 1983, *Protoplasma* 116: 145—148.
- [27] Lurquin, P. F., 1979, *Nucleic Acids Res.*, 6: 3773—3784.
- [28] Watanabe, Y. et al., 1982, *Virology.*, 120: 478—480.

淋巴因子激活的杀伤细胞和肿瘤继承免疫治疗的新进展

李兴强

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

1980年, Rosenberg等人首先观察到,小鼠脾脏细胞或新鲜制备的人外周血淋巴细胞与无凝集素的白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)的制备物温育,可诱导产生抗各种新鲜实体瘤细胞的杀伤细胞。这种由IL-2激发的杀伤细胞就称为淋巴因子激活的杀伤(lymphokine activated killer, LAK)细胞^[1,2]。由于LAK细胞能杀伤组织学差异很大的肿瘤细胞如黑色素瘤、肉瘤等,而对正常细胞没有毒性,提示了在肿瘤继承免疫治疗(tumor adoptive immunotherapy)中的潜在价值,因而引起了人们的广泛兴趣。本文对LAK细胞和肿瘤继承免疫治疗研究的新进展做扼要综述。

一、LAK细胞的特征

对LAK细胞深入研究的结果表明, LAK细胞可能是一种不同于体内两种主要的细胞毒细胞——细胞毒T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)和天然杀伤(natural killer, NK)细胞的杀伤细胞^[3,4,5]。第一,从表型上看,人和小鼠LAK前体细胞缺乏典型的T细胞标志和Ia/DR标志。现在尚未发现LAK细胞特异的表面标志,似乎LAK前体细胞是一种“裸”细胞。但是,经IL-2刺激后, LAK效应细胞获得了典型的CTL表面标志。小鼠LAK效应细胞具有Thy 1⁺Lyt-1⁻2⁺表型,人

LAK细胞的表型为OKT 3⁺4⁻8⁺。LAK细胞在表型上与NK细胞也不同,没有OKM 1和Leu 7等NK细胞的表面标志。人LAK细胞的一些特征列于表1。

第二,从靶细胞来看, LAK细胞、NK细胞和CTL虽都是细胞毒性细胞,但三者的靶细胞特异性有很大差异。CTL的靶细胞特异性很高,只针对带有相同MHC I类抗原的同种异体靶细胞,对NK细胞敏感的主要是培养的淋巴瘤细胞。而LAK细胞杀伤肿瘤细胞的范围相当广泛。研究表明,对LAK敏感的靶细胞包括自身或同种异体的新鲜肿瘤细胞,异种肿瘤细胞。除Con A转化的母细胞外,几乎所有的培养细胞对LAK活性是敏感的。而正常细胞对LAK活性是不敏感的。尤其是LAK细胞也能杀伤对NK相对抵抗的肿瘤细胞如新鲜的实体瘤细胞,提示LAK细胞在机体天然抗肿瘤免疫中可能具有更大的作用。表

表 1 人LAK细胞的特征^[5]

LAK 前体细胞	非粘附性的
	E花环阴性
	OKM1 ⁻ , OKT3 ⁻ , Leu1 ⁻ , Leu7 ⁻
	分布于外周血、脾、淋巴结、骨髓和胸导管
LAK 效应细胞	非粘附性的
	OKM 1 ⁻ , OKT3 ⁺ , OKT4 ⁻ , OKT8 ⁺ , Leu1 ⁺