

细 胞 电 融 合

彭 银 祥

(武汉大学病毒学系生物物理室)

通过细胞融合产生同核体和异核体的方法,已成为生物学许多研究领域的一种重要手段。近年来在细胞杂交研究中由于 Zimmermann 等人^[1]发展了细胞电融合的方法而引向新的进展。利用这一方法,被融合的细胞首先要经受一个非均一交变电场的作用,使细胞趋于紧密的膜接触,人们称之为凝集作用,也是诱导细胞融合的一个重要先决条件。随后,这些细胞又经受一个短促而又高强度的直流脉冲,这时在膜—膜接触的部位就发生可逆性的电击穿,导致细胞融合。

回顾 60 年代和 70 年代期间,人们利用灭活病毒(如 Sandia Virus)和化学试剂^[2,3](如 Polyethyleneglycol; Pronase; Dispase; Oleoylglycerol; Dimethyl Sulfoxide; Lipid)的促融合性质来诱导培养的哺乳动物细胞之间的融合,取得了一定进展,但由于这些实验分析带经验性,融合过程的分子机制仍为未知,又由于已知化学外源助融剂对细胞有毒性影响,成活的杂交细胞产率总是很低^[4]。

和化学试剂或灭活病毒诱导细胞融合的方法相比较,细胞电融合方法(下称电融合)具有下面几方面的优点:

1. 只有小面积的细胞膜在电场的作用下产生暂时性的结构变化,整个过程是在温和的生理条件下进行的,因此不存在影响细胞活力的某些非生理因素,如高 pH 值、低 pH 值、高浓度钙以及外源生物因子等。

2. 电融合时,人们所期望的那种异核体能够在光学显微镜下直接进行观察、跟踪、鉴定和收集培养,而不需要任何选择的介质。

3. 大数量细胞的融合能够以快速而又近似

同步的方式进行。融合的细胞能够预先进行选择,融合的细胞数也可以进行控制,这在体细胞杂交方面是相当重要的。

4. 杂交细胞产率相当高。

1982 年, U. Zimmermann^[1]提出,“细胞电融合方法可为未来的细胞-细胞融合提供重要的方法”。时隔三年,在学者们的努力下,目前在细胞-细胞杂交研究中,采用电融合方法使同品系(species-species)细胞间的融合,交叉品系(cross-species)间细胞的融合,以及动植物界(cross-kingdom)间细胞的融合都达到理想的控制作用和杂交产率^[5]。

电融合也使植物细胞产生修饰,从而改良作物品种,如作物细胞通过与海藻或海生细菌细胞的融合而得到修饰,培育出耐盐性作物;非豆科植物细胞通过与豆科植物如苜蓿、三叶草细胞融合产生具有固氮能力的杂交品种,一天内就可以表现出来。

除了诱导细胞融合之外,电融合过程中原生质膜的电击穿(electrical breakdown)也使膜具有更大的渗透性。渗透性的增加促进真核细胞间基因信息的转移,同时也促进药物载体系统的发展。例如,药物可以通过插入的方法引入病人红血球内,然后将这些红血球再输入病人体内,这时载药物的红血球就起到贮存药物的作用,在体内缓慢地释放出来,达到治病的目的。

在脂质体和活细胞的融合研究中,人们利用电融合的方法,容易得到裹有各种代谢物质和药物的脂质体与所研究靶细胞相融合的产物。研究者也通过电融合的方法来控制融合的细胞种类和细胞数量。大家知道,为了产生单

克隆抗体 (MAb) 必须形成杂交瘤细胞 (hybridoma), 因此这种控制的意义是相当大的; 通过应用杂交瘤细胞选择介质 (HAT), 使杂交瘤细胞的选择成为现实; 人的杂交瘤细胞, 人的单克隆抗体也能产生。进一步来说, 一些细胞器, 如线粒体, 叶绿体, 和细胞核的融合都能够采用电融合的方法来达到。

总而言之, Zimmermann 细胞电融合方法随着从膜的运输、膜的受体到药物载体系统和单克隆抗体这些研究领域的应用, 在细胞和膜的研究中很快成为一种重要的生物学研究手段。

细胞凝集

如前所述, 促成细胞融合的一个重要先决条件是被融合细胞之间彼此应趋于紧密的膜接触。由于细胞本身的布朗运动和细胞外膜表面所带负电荷的静电斥力影响, 悬浮细胞彼此很难引向紧密的膜接触。要克服膜表面的静电斥力促使膜趋于密切的接触, 可以通过双向电泳和在电场内产生偶极子的细胞之间相互作用来达到。所谓双向电泳是在一个非均一的电场中, 作用于中性粒子的净电力方向上使该粒子产生运动来说的。

在电场中, 带有可动电荷的中性粒子将受极化, 变成极性粒子。在一非均一的电场中, 作用在中性粒子相对两边的场强是不等的, 这就产生了一个净电场力, 正是这一净电力在最大场强的方向上推动粒子的运动。同样道理, 在一非均一的交变电场中, 细胞的移动主要通过双向电泳力的作用来完成。

当细胞朝着最大场强的方向移动时, 由于在非均一电场中产生偶极矩的原因, 邻近细胞受偶极子之间引力的作用而使细胞彼此吸附, 偶极吸附作用使细胞达到点一点膜的接触, 形成类链式的细胞凝集, 类似于念珠 (bead) 或珍珠 (pearl) 链, 珍珠链的长度和悬浮细胞液的密度有关, 也和使用电场的频率和脉冲持续时间有关。

在双向电泳过程中, 珍珠链的形成需要一

种低电导性介质存在。如果融合介质内含有超电导性物质, 那么电场就会产生热, 这是一种干扰因素, 其结果将破坏珍珠链的形成以及随后的细胞融合过程。融合介质的渗透性必须通过加入非电导物质来维持。葡萄糖溶液、蔗糖溶液、甘露糖醇溶液、山梨醇溶液以及某些氨基酸 (如组氨酸) 溶液都已成功地用于作为电融合作用的介质。

细胞融合

值得指出的是, 仅有细胞膜间点一点接触是不适合、也不易于引起膜的融合的。只有在双向电泳力把细胞引向膜的紧密接触、形成长短不一、一串串沿电力线方向排列的类珍珠链之后, 再给这些细胞施加一短促而又高强度的直流脉冲, 使膜受快速极化而达到相当高的膜内电压, 这时膜一膜接触部位的电击穿才发生, 膜的融合开始。这时所有置于场脉冲的细胞都近似以同步方式进行融合。这种可控制的电击穿是完全可逆的, 膜的天然状态也是可以恢复的, 但是如果场强一旦远远超过膜击穿所需电压时, 或者说, 膜处于极高强度的电场时, 可逆性的电击穿就成为不可逆的机械性击穿。通常膜的电击穿是在没有蛋白质的膜脂区发生^[1], 但是也有报道^[2], 细胞膜的电击穿是由于膜内脂质和蛋白质之间的接合, 或各蛋白质之间的接合而发生的。

当膜置于高强度电场中, 就遭受局部的电机械性压缩, 正因为这一压缩才使电击穿的膜部位形成膜孔, 膜孔的出现使膜的电导性和渗透性大大增加, 引起细胞内或细胞间成分的自由扩散。膜渗透性可以增加到这样的程度以至于基因大小的分子都能够自由地穿过膜。膜孔的形成也促使细胞质成分的胞间交换, 以及脂质分子从一个细胞膜扩散到另一个细胞膜。

继膜的击穿和膜孔形成之后, 膜即进行再封闭。当膜再封闭时, 相邻细胞膜间先形成脂桥。脂桥形成所需时间要比再封闭所需时间短, 这些脂桥具有非常小的曲率半径和大的表

面张量,具有不稳定的热动力学性质,这对于随后细胞膜的封闭并逐渐形成圆形的杂交细胞从能量的角度来说是很有利的,整个再封闭过程不需要外界能量的输入。

膜的再封闭过程和温度有关,在相对高的温度(37℃)下,膜的再封闭在若干秒或几分钟内完成;而在相对低的温度(4℃)下,则往往长达若干小时。

人们发现,脂桥的形成和细胞融合之后所遗留的膜碎片,在融合细胞膜的边界上形成囊泡。融合杂交细胞的体积等于融合前原初各细胞的总和^[5]或 97%^[6]。

细胞融合的机制

到目前为止,细胞电融合的机制仍然处于实验探索和经验分析阶段。某些学者是根据自己的实验结果提出了一些假设。1981年 Zimmermann 等^[7]首次获得“电致击穿引起 *Avena Sativa* 叶肉细胞原生质体融合”的实验结果,并结合从红血球、脂质体和培养的哺乳动物细胞等所得到的某些未经发表的资料,提出了细胞膜内电场的变化是启动细胞—细胞膜融合的决定性步骤这一假设。1982年, Zimmermann 在一篇综述文章中^[1],又在详细讨论生物膜场效应以及前人对化学诱导或病毒诱导细胞融合的认识基础上,再一次重申了上述假设。1984年, J. Teissie 和 C. Blangero^[6]利用重复电场脉冲(1.5千伏/厘米,持续时间10微秒,迟滞时间1秒)以平行方向或交叉方向作用于培养的哺乳动物细胞,结果发现,以平行方向作用于细胞时,4次重复脉冲之后,融合指数 R (表示融合的程度)不再递增,但如有8个脉冲沿交叉方向(4×4)施行作用,则融合细胞指数 R 一直是递增的。作者根据直接的实验数据,证明融合细胞率和产生多核细胞的程度与应用的电脉冲相关方向有关,脉冲对细胞融合的影响是矢量性的,不是一个标量。首次提出电脉冲及其相关融合细胞之间相互作用的矢量性证明。

Zimmermann 细胞融合系统^[5]

最近,美国精密科学仪器公司(GCA)提供一种新颖而有效的 Zimmermann 细胞融合系统,它采用可控制的电场来产生新的杂交细胞和多核巨大细胞,同时也可以转移大分子进入细胞内,获得高细胞融合产率和好的细胞活性。

该系统主要由 Zimmermann 细胞融合仪、融合室和标准光学显微镜所组成。融合室分平坦开放式和螺旋式二种。为了测定细胞融合的各种参数,可采用平坦开放式融合室。这种融合室容易载入样品,供少量样品和密度低的细胞悬液实验用,融合参数可以直观测出。大体积螺旋式融合室是为大量细胞的融合而设计的,由于该融合室经高压消毒处理,杂交细胞可直接进行收集和培养。整个细胞电融合过程是通过标准亮场显微镜的观察而得到控制。实际的融合条件则通过系统的直接反馈来实现。

在通常的实验中,用于融合的细胞必须先在低电导性介质中洗涤以清除细胞原初环境中所带来的过量离子,避免过量离子在电场作用下产生热的现象。近来 Zimmermann 及其 Wuerzburg 大学的同事研究出新的融合介质 Buw-8401 以及融合之后使用的介质 Buw-8402,这二种介质一起使用,即能确保许多哺乳动物细胞的融合,包括小鼠(murine)杂交瘤细胞的融合,得到产率高和杂交细胞活性强的融合细胞。

应 用

尽管细胞电融合方法问世时间不长,但是在生物技术领域中已经产生了重大的影响, Shivarova 等人发现,利用聚乙二醇(PEG)的传统融合方法不适于诱导苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)细胞原生质体的融合,而应用电融合方法则能够把含有质粒 pUB110(有抗卡那霉素的密码)的原生质体成功地与缺乏 pUB110(对卡那霉素敏感)的原生质体相融合,结果同核体是抗卡那霉素的,而且通过20次选择

的和非选择的介质培养之后达到稳定,对于亲本品系来说没有发现有分离作用^[8]。

Schnetter 等人^[9]采用电融合方法产生酵母的杂交体是非常成功的。在他们的实验中,酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 营养缺乏型突变体的原生质体被融合,简单地说,含有 pADH 040-2 质粒的酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 原生质体带有 β -内酰胺酶 (β -Lactamase) 基因,把 *S. cerevisiae* 原生质体同缺乏这种质粒的原生质体相融合,得到的杂交体能在仅供融合产物成活的少量介质中生长,同时表达出 β -内酰胺酶基因。

植物原生质体经电融合后,杂交体能够合成细胞壁,又能进行细胞分裂是众所共知的^[10,11]。Zachrisson 等应用芸苔 (*Brassica napus*) 细胞原生质体研究报道了获得的稳定杂交体超出 PEG 诱导融合产率的 4 倍。同时指出电融合可避免 PEG 的毒性。Bates 等采用电融合方法研究豇豆 (*Vigna*) 细胞原生质体的融合,虽然双子叶细胞的融合比单子叶细胞的融合要求较大的直流电压,但 *Vigna* 杂交体具有合成细胞壁和进行细胞分裂的能力。Tempelaar 等对一系列的植物叶肉细胞原生质体和悬浮的原生质体建立了各种融合参数。这些学者测知大原生质体比小原生质体电融合时所需电压较低,由于杂交体是有活力的,而且具有合成细胞壁和进行细胞分裂的能力,因此,甚至于融合配对之间原生质体大小差异极大也不成为问题。

真核生物细胞的电融合已经取得了相当大的成功,Finaz 等^[12]报道了经中国仓鼠细胞和 LM 小鼠细胞系 ID 克隆的电融合产生出异核体,异核体通过染色体分析和酶分析得到证实。得到的异核体超出 PEG 方法产生异核体的 100 倍。

更为出色的研究是 Podesta 等^[13]采用电融合方法研究老鼠肾上腺细胞和老鼠睾丸间质细胞 (Leydig) 的融合。在正常情况下,促肾上腺皮质激素 (ACTH) 刺激肾上腺皮质细胞产生皮质酮,促黄体(生成)激素 (LH) 通过对睾丸间质细胞的刺激产生睾(甾)酮。当作者用促

肾上腺皮质激素或促黄体激素刺激肾上腺-睾丸间质杂交细胞时,这种杂交细胞同时具有产生皮质酮和睾酮的能力。作者认为,这是由于杂交细胞内产生 LH 受体-肾上腺腺苷酸环化酶复合物之故。同时,受体-环化酶偶联和随后的再装配均发生在电融合产生的异核体内。

一种敏化的产抗体细胞与一种不活泼的 (immortal) B-细胞瘤 (neoplasm) 或骨瘤 (myeloma) 的细胞融合是产生单克隆抗体 (MAb) 的基础。十年前,仙台病毒被用于开创第一种分泌单克隆抗体的杂交瘤 (hybridoma)^[14]。最近小鼠杂交瘤也能用电融合方法产生^[15]。Vienken 等描述了骨瘤-淋巴细胞 (M/L) 融合的情况,他们采用电液系统把被融合的细胞用注入的方法引入融合室,具体来说,在二支注射器内分别吸入骨瘤细胞和淋巴细胞,然后将这两种细胞注入融合室。一般来说,低密度细胞悬液能增加二种细胞 (M/L) 融合的产物。Karsten 等报道了电融合产生的杂交瘤出现一种抗细胞角蛋白单克隆抗体产物。杂交瘤产物也比 PEG 方法产生的杂交瘤产物大 10 倍。

LO 等^[16]利用生物素 (biotin) 和抗生物素蛋白 (avidin) 之间存在的高度亲和性提出了一种新方法对电融合形成的杂交瘤选择出特异性抗原的 B 细胞。该抗原 (Ag) 同抗生物素蛋白结合生成的复合物与 B 细胞作用,只有特异性抗原 B 细胞形成 B 细胞-抗原-抗生物素蛋白复合物。然后生物素被吸附到骨瘤细胞表面,当 B 细胞-抗原-抗生物素蛋白复合物和骨瘤-生物素接合体相结合时,只有特异性抗原 B 细胞密切结合到骨瘤。经典的情况是具有高度亲和性表面免疫球蛋白 (Ig) 的 B 细胞保持与骨瘤密切结合。这就有助于选择高亲和性抗体,也有助于减少被掩饰的杂交瘤数。在人-人杂交瘤的研究中, Bischoff 等利用电融合方法的初步研究表明,淋巴细胞与骨瘤细胞之比是 5:1 时,能得到好的人杂交瘤细胞。

把细胞置电场内而发生的细胞融合现象不仅仅是一种物理现象,电场还能够诱导细胞膜膜孔的形成,促使基因在细胞间的转移。Shiva-

果糖-2, 6-二磷酸和它的生物学作用

张 楚 富

(武汉大学生物系)

一、前 言

果糖-2, 6-二磷酸(Fru-2, 6-P₂)对许多人来说, 还是一个很生疏的物质。它的发现、分离、鉴定及其生物学研究只不过是近五、六年的事情^[1]。果糖-1, 6-二磷酸 (Fru-1, 6-P₂) 则是

大家所熟悉的, 它是糖酵解过程中的一种中间场, 也是磷酸果糖激酶(PFK)的产物。而 Fru-2, 6-P₂ 却不是 PFK 的产物, 而是该酶的一种最有效的激活剂, 在哺乳动物的糖酵解和糖异生过程中起很重要的调节作用^[1,2]。

rova 等^[4]通过把原生质体处于高强度的电场脉冲把苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的 pUB 110 质粒 (抗卡那霉素) 转化为枯草杆菌 (*B. cereus*), 转化率近似增加一个数量级, 枯草杆菌转化体是稳定的而且 pUB 110 能够在染色体外保留下来。Neumann 等利用电场把疱疹胸腺激酶 (TK) 基因转移到缺 TK 的老鼠 L 细胞。TK 基因被携带到重组的质粒 pAGO 上, 这时线型质粒和环型质粒被应用而且线型质粒在产生 TK-显性 L 细胞方面更为有效。作者指出, 电场诱导基因转移的最适条件将会随着细胞的大小和类型的改变而改变。因此, 具体对于每一种情况来说都应该作出新的测定。Potter 等证明了人的免疫球蛋白 (Ig) 基因的组织特异性表达。这些学者采用电场把小鼠-B 淋巴细胞和小鼠成纤维细胞与人的 Ig 基因转染 (transfection)。结果人的 Ig 基因被小鼠-B 淋巴细胞复制而小鼠成纤维细胞却不能。

外, Zimmermann 细胞融合系统还具有其它方法所没有的调控和再生性优点, 电融合方法在生物学研究中的应用将展示出广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] Zimmermann, U.: *Biochem. Biophys. Acta*, 694, 227, 1982.
- [2] Kao, K. N. et al.: *Planta*, 115, 335, 1974.
- [3] Toister, Z. et al.: *Bio. Chem.*, 248, 422, 1973.
- [4] Zimmermann, U. et al.: *J. Membrane Biology*, 67, 165, 1982.
- [5] Kuta, A. E. et al.: *American Biotechnology Laboratory*, May/June, 31, 1985.
- [6] Teissie, J. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 775, 446, 1984.
- [7] Zimmermann, U. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 641, 160, 1981.
- [8] Shivarova, N. et al.: *Bioelectrochem. and Bioenerg.*, 11, 181, 1983.
- [9] Schnettler, R. et al.: *FEMS Microbiology Letters*, in press.
- [10] Zachrisson, A., et al.: *Physiol. Plant*, 61, 314, 1984.
- [11] Bates, G. W. et al.: *Plant Physiol.*, 72, 1110, 1983.
- [12] Finaz, C. et al.: *Exp. Cell Res.*, 150, 477, 1984.
- [13] Podesta, E. J. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 145(2), 329, 1984.
- [14] Kohler, G. et al.: *Nature*, 256, 495, 1975.
- [15] Lo, M. S. et al.: *Nature*, 310, 792, 1984.
- [16] Shivarova, N. et al.: *Z. Allg. Mikrobiol.*, 23, 595, 1983.

结 语

细胞电融合方法为细胞的融合、转染和大分子的摄入 (uptake) 提供了一种有效的方法。使用这一方法除了不需要加入外源化学试剂之

[本文于 1985 年 11 月 19 日收到]