

细胞融合技术的新进展

郑 强 王 竞 沈子威 赵南明

(清华大学生物科学与技术系, 北京)

细胞融合技术的发展已有20多年的历史。利用细胞融合进行动物、植物以及微生物的细胞杂交, 已成为生物科学诸多研究领域的一项重要手段, 而细胞融合本身(特别是膜融合), 也已成为理论与应用研究的重要领域。自1958年 OKada^[1] 首次表明紫外灭活的仙台病毒可以诱导体外培养细胞融合而形成多核体以来, 细胞融合技术得到了迅速发展和应用。除了灭活的病毒外, 还发展了溶血卵磷脂、钙离子及聚乙二醇(PEG)等多种化学融合方法。20多年来, 细胞融合不论是在细胞核质关系、基因调控、基因定位、遗传互补、肿瘤发生以及衰老控制等理论研究领域, 还是在远缘杂交育种、基因治疗、病毒诊断及单克隆抗体制备等应用研究领域, 都取得了可喜成绩。但以往的融合方法所存在的对细胞损伤大、残存毒性、融合率较低及经验性大等缺陷也逐渐显露出来。近年来, 一种物理融合技术——细胞电融合技术迅速崛起, 显示出强大的生命力。其原理是: 在短时间强电场(高压脉冲电场, 场强为kV/cm量级、脉冲宽度为 μ s量级)的作用下, 细胞膜发生可逆性电击穿(Reversible breakdown), 瞬时地失去其高电阻和低通透特性, 然后在数分钟内恢复原状。当可逆电击穿发生在两个相邻细胞的接触区时, 即可诱导它们的膜相互融合, 从而导致细胞融合。自从1978年 Zimmermann等^[2] 及1979年 Senda等^[3] 报道了电脉冲诱导细胞融合成效以来, Zimmermann及其同事做了大量工作, 将细胞电介质电泳(Dielectrophoresis)引入来诱导细胞间接触, 从而创立了物理的、实用的 Zimmermann 电融合法^[4,5]。利用电融合方法, 人们不仅对膜融合的过程和机制进行了进一步的探讨^[6], 而且在农业和医学上亦有着广泛的应用前景。在植物体细胞杂交领域, 用电融合方法可以高频率地融合

植物原生质体^[7,8], 并已获得杂种植株^[9,10]。与以往的病毒及化学融合方法比较, 电融合法存在操作简单、无化学毒性、对细胞损伤小、融合同步、可在显微镜下观察融合过程以及融合率高等优点。Bates等^[11] 用 Zimmermann 电融合法进行烟草种内体细胞杂交(*N. tabacum* \times *N. plumbaginifolia*, 后者抗kanamycin并被 γ -射线纯化细胞核), 实验结果表明, 抗性杂种克隆的形成率高于PEG法10—100倍。Karsten等^[12] 在单克隆抗体的制备研究中表明, 应用 Zimmermann电融合法可获得高于PEG法10倍的克隆形成率(3×10^{-4})。

当然, Zimmermann电融合法也存在一定的缺陷。首先是正弦交变电场对细胞有一定影响, 长时间作用会损伤细胞的活力; 其次, 由于电介质电泳要求细胞处在低离子浓度等渗液(电阻率 $>10^4 \Omega \cdot \text{cm}$)中进行, 限制了外界溶液的缓冲能力和离子浓度, 细胞长时间暴露其中也会受到损伤。此外, 该融合方法属于非特异性融合法, 故无法解决双亲本细胞间的特异配对融合问题。为此, 近几年来, 人们又进一步发展了电融合技术, 包括将各种物理的、化学的细胞聚集方法与电融合结合, 以及在生理盐水缓冲液中进行电融合等。特别是Lo等^[13] 率先发展起来的单克隆抗体制备的特异性电融合法, 革新了电融合技术。本文简单综述自1984年以来电融合领域的国内外最新进展, 以及最近刚刚发展起来的、极富潜力的激光诱导细胞融合技术。

细胞电融合技术的新进展

细胞融合的机理虽然迄今尚不很清楚, 但以下两步是必须的。第一步, 建立细胞间接触(Cell-

本文于1988年12月30日收到。

to-cell contact); 第二步, 接触区膜结构受扰动而紊乱, 然后恢复并融合。细胞电融合技术利用电脉冲对膜的可逆电击穿完成上述第二步。对于建立细胞间接触, 除了应用电介质电泳来使得细胞接触外, 还有许多物理、化学方法诱导细胞间接触, 根据其诱导细胞接触的性质, 可分为特异性和非特异性两大类。

(一) 非特异性细胞电融合技术

非特异性细胞电融合法是指在进行细胞电融合时, 无法排除亲本细胞的自体融合而只进行双亲本间的细胞杂交融合。其主要原因是细胞间的相互接触是无选择性的, 即非特异性细胞聚集。有许多方法可造成细胞间的非特异性接触, 可分为物理法和化学法两大类。

1. 细胞物理聚集电融合法: Zimmermann及同事把电介质电泳引入电融合技术造成细胞极化而串珠接触, 此后, 为了克服其存在的弊端, 又发展了数种细胞物理聚集法应用于电融合, 其中以磁-电融合法及超声-电融合法较为成功。

(1) 磁-电融合法 (Magneto-electro fusion): 利用磁场使得已表面磁化的细胞相互聚集接触, 然后施加高压电脉冲诱导已互相接触的细胞融合。由于用磁场代替了正弦交变电场, 避免交变电场对细胞的损伤及长时间作用造成的热效应, 并且还可以使用最简单的电极系统及在高离子浓度溶液中进行电融合。具体方法^[14]如下: 首先, 细胞悬浮在含有 280mmol/L 葡萄糖, KCl (0—10mmol/L), 1mmol/L $MgCl_2$ 以及磁性粒子 (铁液 Ferro fluid) 的溶液中。其中铁液由被阴离子表面活性剂所稳定的 Fe_3O_4 粒子悬液组成。使用前, 须通过离子交换柱除去阴离子表面的活性剂。细胞在上述溶液中温浴 (37℃) 20min。此时磁性粒子已被吸收在细胞膜外表面上。然后, 将细胞注入磁电小室^[16], 利用两对电磁铁所形成的磁场可使细胞相互聚集在两电极之间, 然后施加数个高压电脉冲即可诱导融合。值得一提的是, 由于表面磁性粒子 Fe_3O_4 的作用, 细胞融合的电脉冲强度要高于正常的细胞。实验表明, 红细胞经上述处理, 其可逆击穿电压要高于未标记红细胞的40%左右。

(2) 超声-电融合法 (Acoustic-electro fusion): 此方法利用声场力使细胞间相互聚集

接触, 然后施加电脉冲诱导细胞融合。作用在细胞上的声场力大小和细胞与外界的比重差有关, 利用声波不仅能使细胞形成“串珠” (使用纯增强波 Propagating wave), 而且也能使细胞密集在驻波的波峰处 (声压最大处)。由于可以使用波长小于融合小室电极间距的声波, 因此可以用声波来使得细胞聚集在电极间, 然后施加数个可逆击穿电脉冲即可诱导细胞融合。Vienken等^[15]使用1.0MHz的超声波 (波长1mm) 使红细胞及骨髓瘤细胞在同轴圆柱状电极间聚集, 施加数个电脉冲可高频率地诱导细胞融合, 其装置参阅文献^[36]。超声-电融合法具有与前述磁-电融合法相同的优点。而又不必对细胞进行预先处理及标记, 避免了由此造成的不良影响, 但超声波对细胞的影响尚需进一步研究。

由于近年来的研究发现, 电脉冲可造成细胞膜存在一长时间的融合状态^[16], 即先用可逆击穿电脉冲作用后, 在数分钟内 (min 钟以内) 使细胞相互接触, 同样可以发生融合。因此, 一种电-机械-融合法 (Electro-mechanical fusion) 应运而生^[17]。具体方法是: 先对细胞施加数个电脉冲造成膜的可逆击穿, 然后迅速离心沉降细胞, 利用离心力造成细胞接触而发生融合。其主要优点是融合仪及电极系统可以大大简化 (可使用最简单的电容放电系统), 并且可以大量制备融合细胞。

除了上述几种方法, 还有其他细胞聚集方法可进一步发展, 例如激光束捕捉技术等。

2. 细胞化学聚集电融合法: 许多化学粘连剂可用来使细胞相互聚集接触。低浓度的 PEG^[18,19], 植物凝集素 PHA^[20], 伴刀豆蛋白 A (ConA)^[20,21,22], 蛋白酶 (Pronase)^[21] 等均已与电融合法结合, 成功地进行了细胞融合实验。与电介质电泳介导的细胞电融合相比, 化学聚集电融合法避免了交变电场的不利方面, 而且电融合仪及电极系统简单。具体步骤是: 先用化学粘连剂使细胞聚集接触, 然后加电脉冲诱导融合, 最后洗去粘连剂, 培养细胞。Chapel等^[19]用PEG介导植物原生质体电融合, 高频率地获得杂种愈伤组织。最近Conrad等^[21]在杂交瘤制备工作中, 利用ConA及Pronase介导的电融合法获得 10^{-3} — 10^{-2} 的杂交瘤形成率。我们利用

ConA粘连细胞^[22]，在等渗盐缓冲液中成功地进行了小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞的电融合，融合后用ConA结合底物竞争除掉ConA，经选择性培养基HAT培养7天获得 3.4×10^{-4} 的杂交瘤克隆形成率，表明在高离子浓度等渗液中也能进行电融合。

当然，细胞化学聚集电融合法由于化学药品的使用，也带来了弊端，例如细胞毒性等。此外，与电介质电泳介导的电融合相比，化学聚集的细胞接触面与电场方向不完全一致，随机分布。而外电场在细胞膜上的压降与该位置径向方向和电场方向夹角 θ 有关， $V_m = 1.5rE\cos\theta$ （其中 r 为细胞半径， E 为外电场）。因此，细胞接触区处在 $\theta = 90^\circ, 270^\circ$ 的细胞很难融合，因为此时 $V_m = 0$ 。而 $\theta \neq 0^\circ, 180^\circ$ 的细胞融合所需的电场强度要高于 $\theta = 0^\circ, 180^\circ$ 位置的细胞。故此会造成融合率下降（见图1）。

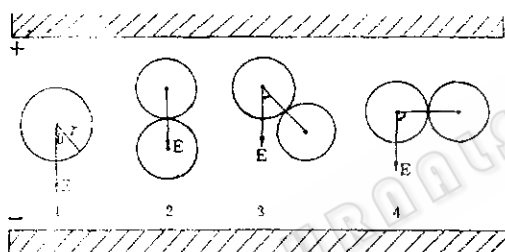


图1 外电场在细胞接触区膜上压降与细胞取向的关系

1. $V_m = 1.5rE\cos\theta$ 2. $\theta = 0^\circ, V_m = 1.5rE$
3. $0^\circ < \theta < 90^\circ, 0 < V_m < 1.5rE$
4. $\theta = 90^\circ, V_m = 0$

前面提到的几种非特异性电融合法，虽然融合率都较高，但所能获得的有用异源融合体的比例却不高，这是由于无法控制许多自体融合。特别是在单克隆抗体的制备中，经增强免疫的小鼠脾脏中具有特异性抗体的B细胞数小于1%，因此，虽然电融合法可提高数个量级的融合率，但杂交瘤分泌特异性抗体的阳性率却不高，而且筛选工作仍然较大，同时也不易得到高亲和力的单克隆抗体。这时，就需要发展特异性电融合法。

（二）特异性电融合法

细胞融合所必需的两步是：（1）细胞间接触；（2）接触区的膜结构受到瞬时扰动而导致融合。因此，其中的任意一步若具有特异性（或选择性）就能形成特异性的细胞融合。以往的病

毒和化学融合方法由于将前述两步合成一步，很难做到特异性细胞融合。电融合技术把细胞接触和膜融合分成两步进行，有利于实现特异性融合。但由于电脉冲造成的膜可逆击穿无特异性，因此只能在细胞相互接触时实行特异性来实现特异性融合。Lo等^[13]率先在单抗制备中发展了一种特异性电融合法。他们巧妙地应用生物素-抗生物素-抗原-抗体桥联使得骨髓瘤细胞只与其特异性抗体的B细胞配对接触。Lo等用此方法制备ACE酶（Angiotensin-converting enzyme）的单抗，所获得的杂交瘤百分之百地分泌抗ACE抗体。该方法的原理如图2，首先将已免疫的脾细胞与抗生物素-抗原复合物反应，使抗原-抗体特异地结合；然后将这些脾细胞与已用NHS将生物素标记的骨髓瘤细胞混合，利用生物素-抗生物素的特异结合造成分泌抗体的B细胞与骨髓瘤细胞特异配对；最后施加4—4.5kV/cm，5 μ s的电脉冲数个，诱导融合。D. M. Wojchowski等^[23]为了避免Lo的方法所存在的缺陷，即：

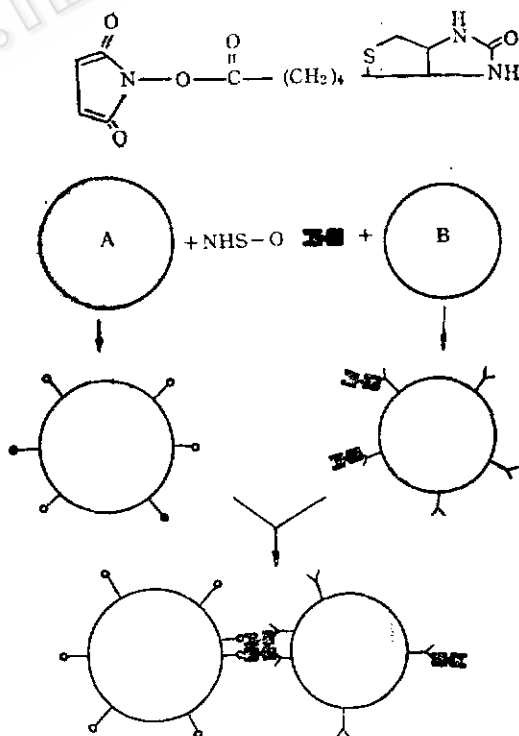


图2 Lo等的选择性细胞融合法。其中，
—○—生物素，—■—抗生物素，—■—抗原，—Y—抗体，
A.骨髓瘤细胞，B.B细胞

1.有限量的抗原共价结合在抗生物素上；2.对抗生物素的共价修饰会影响其与生物素结合的活性等，修改了 Lo 的方法（图 3），但却增加了配对结合步骤。最近，胡强华等^[24]进一步简化了这种特异性结合法，他们用SPDP 双功能剂直接将抗原标记在骨髓瘤细胞上（如图 4 所示），利用抗原-抗体的特异结合造成特异配对。他们用此方法制备转铁蛋白的单抗，获得 100% 的特异抗体阳性率。三种特异性电融合法的比较见表 1。

然而，特异性电融合仅仅在单抗制备领域获得成功，在通常的体细胞杂交却很难实现。近来，Koop等^[25]发展起来的植物单细胞培养及显微操作电融合法可用于特异性电融合，但存在着操作烦琐及仪器复杂等缺点。或许普通细胞的特异性融合须借助于激光微束技术。

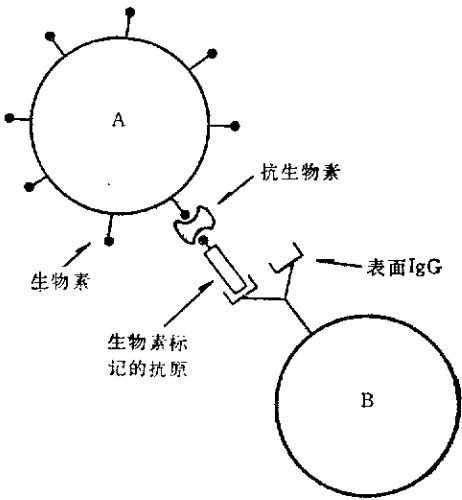


图 3 Wojchowski等的选择性电融合法
(图为生物素标记的骨髓瘤细胞)
A.骨髓瘤细胞，B.B细胞

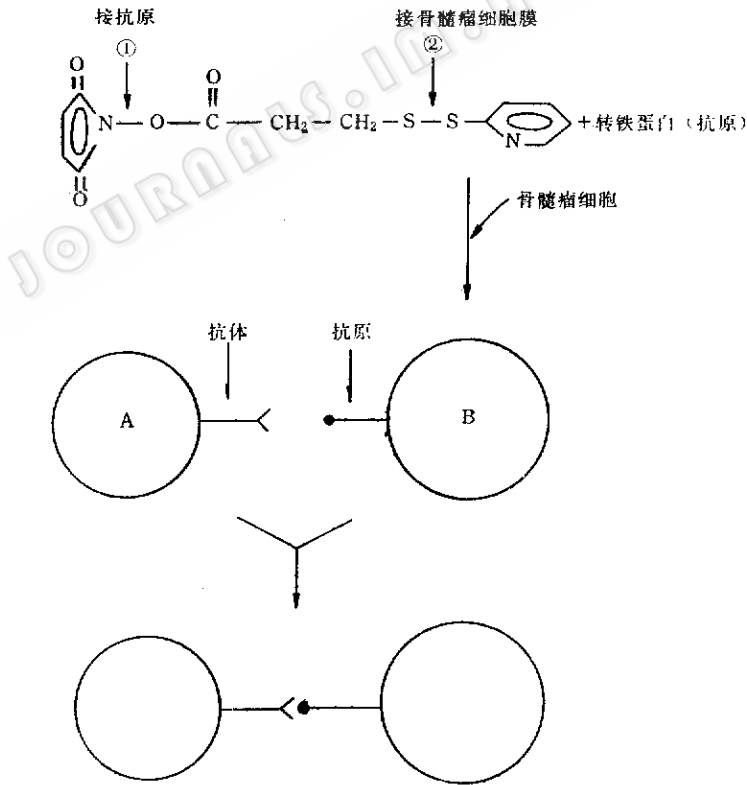


图 4 胡强华等的选择性电融合法
A.转铁蛋白免疫的 Bal b/c B细胞，B.骨髓瘤细胞

表 1 三种特异电融合方法的比较

	Lo et al.	Wojchowski et al.	胡强华等
特异配对方式	Mye-Bio-Avi-Ag-Ab-B	Mye-Bio-Avi-Bio-Ag-Ab-B	Mye-Ag-Ab-B
完成配对的步骤	4 步	5 步	3 步
融 合 率	$\sim 6.2 \times 10^{-7}$	$\sim 5 \times 10^{-7}$	$\sim 1.75 \times 10^{-6}$
单抗阳性率	100%	100%	100%
Mye: 骨髓瘤细胞	B: B细胞	Bio: 生物素	Avi: 抗生物素

激光诱导的细胞融合技术

以往建立的各种病毒、化学融合方法，无法实现所选定细胞间的特异融合。电融合技术把细胞聚集接触和膜结构扰动及融合分成两步，因此特异性融合成为可能。但是，由于电脉冲造成的膜的可逆击穿不具有选择性和特异性，因此特异性只能发生细胞聚集接触时，这种特异性受到很大的约束。利用激光微束技术^[26,27]可以诱导许多细胞中所需的两个相邻细胞融合。

(一) 激光微束技术 (Laser microbeam technique)

利用显微物镜，把引入显微镜的激光束聚焦，可以在样品上获得直径与光波长相当的激光微束。用激光微束可对细胞进行各种加工。K. Jacobson 把它用于膜动力学研究，发展了激光漂白技术 (FRAP technique)^[28]；M. W. Berns等^[26]用它对染色体、中心粒进行加工，研究前者的遗传性质及后者在有丝分裂中的作用；梁宏等^[29]用它作细胞切除以研究卵细胞的发育；Tsukakoshi^[30]及 Tao^[31]等用激光微束在细胞膜上打一个可自行恢复的小孔，使得外源基因进入细胞内表达，进行基因导入的研究。

为了获得好的激光微束，对显微镜的要求如下^[32] (图 7)：(1) 使用荧光显微镜 (落射、倒置均可)，只要把荧光光源换成激光光源即可 (2) 一个低倍物镜用于寻找目标，一个 100× 高倍物镜用来聚焦激光束至衍射极限 ($<1\mu\text{m}$) (3) 配备有恒温系统及相差装置，有微分干涉装置更好 (4) 照相机和低照度摄像机记录融合过程。

对激光器的要求^[32]：(1) 激光器波长从 200nm 到 800nm 可调谐，以适应各种生物物质的需要，至少应有短波长；(2) 足够大的能量。

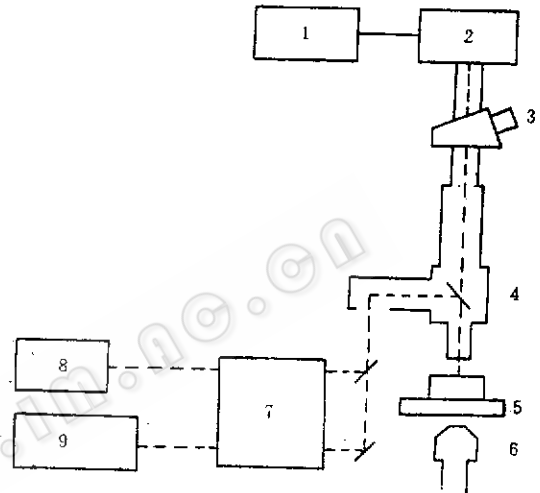


图 5 激光诱导细胞融合装置框图

1. 监视器 2. 电视摄像机 3. 目镜 4. 偏转板
5. 物镜样品台 6. 透视照相 7. 光学接口
8. He-He 激光器 9. Nd YAG 激光器

样品上单脉冲能量 $>250\mu\text{J}$ ；(3) 短脉冲以避免热效应，脉宽 $<10\text{ns}$ ；(4) 可重复频率为 20 脉冲/s；(5) 各种衰减系数的滤色片，用来调节激光器的能量输出。

(二) 激光诱导的细胞融合

利用激光微束对相邻细胞的接触区细胞膜进行破坏 (或扰动)，可以诱导细胞融合。Schierenberg等^[33]以一种线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 为材料进行激光诱导的细胞融合实验。张闻迪等^[34]以泥鳅受精卵为材料进行激光诱导细胞融合实验，融合率可达 40%。融合后的泥鳅卵大都能进一步发育，个别的甚至形成了幼体。具体方法是：经人工授精的泥鳅除去卵膜后放入融合槽中，用激光微束照射鱼卵相邻部位，从而导致相邻的卵细胞融合。激光束能量密度为 $10\mu\text{J}/(\mu\text{m})^2$ ，激光束由 YAG 激光器输出经二倍频波长

变为 $0.53\mu\text{m}$,再经染料池输出 $0.59\mu\text{m}$ 的激光束。

最近, R. Wiegand 等^[35]用激光微束技术成功地诱导骨髓瘤细胞与能分泌特异性抗体的小鼠 B 细胞的融合, 植物原生质体之间的融合。她的方法中, 骨髓瘤细胞与 B 细胞的连接通过前述 Lo 的方法实现。激光能量: 300—600 个脉冲, $1\mu\text{J}/\text{脉冲}$, 脉宽 17ns, 激光波长 320—970nm 可调谐。

与以往的融合方法相比, 激光诱导融合技术最突出的优点在于它的高度选择性。R. Wiegand 指出: 由于激光诱导细胞融合具有高度的选择性, 人们可以在体外生产出针对于每一个癌症患者的抗体, 这将为癌症的治疗展示光明的前景。此外, 激光诱导细胞融合可以在正常的培养液中进行也是一特点。当然, 激光诱导融合技术尚处在发展初期, 还有待于完善之中。例如: 只能逐一地处理细胞, 以及设备昂贵。

参 考 文 献

- [1] Okada, Y.: *Biken's J.* 1: 103—110, 1958.
- [2] Zimmermann, U. and Pilwat, G.: In Sixth Int. Biophys. Congr. Kyoto, Abstr. IV-10(H), P.140, 1978.
- [3] Senda, M.: *Plant Cell Physiol.*, 20:1441—1443, 1979.
- [4] Zimmermann, U.: *Biochim. Biophys. Acta*, 694:227—277, 1982.
- [5] Zimmermann, U. et al.: In: *Investigative Microtechniques in Medicine and Biology* (J. Chayen and L. Bitensky eds.), pp.89—167, 1984, Dekker, New York.
- [6] 郑强, 赵南明: 中国科学B辑, (8):825—832, 1988.
- [7] Zimmermann U. and Scheurich, P.: *Planta*, 151:26—32, 1981.
- [8] 郑强等: 生物物理学报, 4(2):134—140, 1988.
- [9] Kohn, H. et al.: *Plant Sci.*, 38:121—128, 1985.
- [10] Bates, G.W. et al.: *Theor. Appl. Genet.*, 70:227—233, 1985.
- [11] Bates, G.W. et al.: *Theor. Appl. Genet.*, 74:718—726, 1987.
- [12] Karsten, U. et al.: *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.*, 21:733—740, 1985.
- [13] Lo, M.M.S. et al.: *Nature*, 310:792—794, 1984.
- [14] Kramer, I. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 772:407—410, 1984.
- [15] Vienken, J. et al.: *Biochim Biophys. Acta*, 820(2):259—264, 1985.
- [16] Sowers, A.E.: *J. Cell Biol.*, 102:1358—1362, 1986.
- [17] Zimmermann, U. et al.: In: *Adv. Biotechnol. Processes*, 4:79—150, 1985.
- [18] Weber, H. et al.: *Curr. Genet.*, 4:165—166, 1981.
- [19] Chapel, M. et al.: *FEBS Lett.*, 196(1):79—86, 1986.
- [20] 汪和融等: 科学通报, 32(13), 1032—1035, 1987.
- [21] Conrad, M.K. et al.: In: *Cell Fusion* (Sowers A. E. eds.), 427—439, Plenum, New York, 1987.
- [22] 郑强, 赵南明: 生物物理学报, 5(1):94—95, 1989.
- [23] Wojchowski, D.W. et al.: *J. Immunol. Methods*, 90:173—177, 1986.
- [24] 胡强华等: 科学通报, 1989, 待发表.
- [25] Koop, H. U.: *Eur. J. Cell Biol.*, 39:46—49, 1985.
- [26] Berns, M.W. et al.: *Science*, 213:505—513, 1981.
- [27] White, J.G. and Horritz, H.R.: *Elec.-Opt. Systems Design*, August:23—24, 1979.
- [28] Jacobson, K. in: *Lasers in Biology and Medicine* (Hillenkamp, F., Pratesi, R. and Sacchi, C. A. eds.), 271—286, Plenum, New York, 1980.
- [29] 梁宏等: 应用光学, 6(4):185—189, 1987.
- [30] Tsukakoshi, M. et al.: *Appl. Phys.*, B 35:135—140, 1984.
- [31] Tao, W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:4180—4184., 1987.
- [32] Schierenberg, E.: In: *Cell Fusion* (Sowers, A. E. eds.), 409—418, Plenum, New York, 1987.
- [33] Schierenberg, E.: *Dev. Biol.*, 101:240—245, 1984.
- [34] 张闻迪等: 待发表.
- [35] Wiegand, R. et al.: *J. Cell Sci.*, 88:145—149, 1987.
- [36] Arnold, W.M. and Zimmermann, U.: *Biochemical Society Transactions*, 614th, Meeting, Oxford, 1986,