

鱼类细胞融合中助融剂效应和特异性

阎康 陈敏容 陈宏溪

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

在鱼类细胞融合中,微量的甘油可使 PEG 作用显著下降。DMSO 可以极大提高 PEG 诱导鱼类细胞融合的能力。在低分子量和较低浓度的 PEG 中, DMSO 的作用更加突出。但 PEG 浓度不能低于 40% 的临界,否则,细胞融合就失去了 DMSO 浓度依赖效应。在三组鱼类细胞交叉融合中,我们发现同核体数目远远超过异核体数目 ($P < 0.05$)。这表明,PEG 诱导的鱼类细胞融合具有物种和组织特异性。

鱼类细胞融合是鱼类细胞工程的一个重要组成部分,目前报道甚少。国外曾报道过青鳉的分离胚胎细胞在盐溶液中重新接触而发生融合的过程和影响这种融合的因素^[1],并借此了解鱼胚胎发育早期细胞表面生理特性的变化^[2]。我们在测定了聚乙二醇(PEG)诱导的鲫鱼细胞融合的主要参数的基础上^[3],试验了二甲基亚砜(DMSO)和甘油在 PEG 诱导的鲫鱼细胞融合中的作用,旨在进一步提高细胞融合指数和降低 PEG 对细胞的损伤。进一步完善鱼类细胞融合的方法。此外,我们还以鲫鱼、草鱼细胞为材料,了解鱼类细胞融合中有无物种特异性。

材 料 和 方 法

1. 细胞和培养

实验所用的细胞有鲫鱼异倍体细胞系(CAB-80)^[1]、草鱼胚胎培养细胞和草鱼尾鳍培养细胞^[4]。培养液为 TC-199,含一定浓度小牛血清(鲫鱼细胞为 10%,草鱼细胞为 20%),含青霉素 100IU/ml、链霉素 100 μ g/ml、卡那霉素 40 μ g/ml。培养温度 26 $^{\circ}$ C。

2. 融合剂

PEG1000 和 PEG400 为上海合成洗涤剂二厂产品,其平均分子量范围各为 370—460 和 900—1100。DMSO 为北京医药站分装产品(分析纯),甘油为成都化学试剂厂产品(分析纯)。PEG 液配制参照 Davidson 等方法^[5],即在高压灭菌过的 PEG 中加入无血清的 TC-199 培养液。PEG 浓度依据 w/w 原则,并假定 1 毫升 TC-199 液重 1 克。DMSO 和甘油先加入 TC-199 液中,再与 PEG 混和,以确定最终浓度,其最终浓度为

1985年11月9日收到。

1) 邓初夏、魏延章提供细胞,在此致谢。

2.5、5 和 10%。融合剂的 pH 值用 NaHCO_3 调节到 7.5。

3. 融合程序

(1) 鲫鱼体细胞融合: 融合程序同阎康等方法^[2], 细胞接种密度 $4 \times 10^4/\text{cm}^2$, PEG 处理时间 1 分钟。融合指数 (FI) 公式: $\text{FI} = \left(\frac{\text{实验组多核细胞中核的数目}}{\text{计数细胞中核的数目}} - \frac{\text{对照组多核细胞中核的数目}}{\text{计数细胞中核的数目}} \right) \times 100\%$ 。本文中, 多核细胞是指具 2 核或 2 核以上的细胞, 二核体是指 2 核细胞, 多核体是 2 核以上的细胞。每项实验重复 2 次, 每次计数 3,000 个细胞。细胞存活率的测定是把 PEG 刚处理过的细胞用 0.05% trypan blue 染色, 只有死细胞着色。

(2) 细胞杂交: 鲫鱼细胞、草鱼胚胎培养细胞和草鱼尾鳍培养细胞相互进行 3 组融合。以 50% PEG1000 为融合剂, 融合程序参照 Wright^[8,13,14] 等。一种亲本细胞用 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ BudR 标记 4 天, 4 天后, 二种亲本细胞以 1:1 接种于小方瓶 ($4 \times 10^5/\text{瓶}$) 中; 24 小时后, PEG 处理细胞 1 分钟, 然后迅速洗净 PEG, 加入培养液; 26°C 保温 4 小时后, 用胰酶 (0.25%) -EDTA (0.02%) 液消化细胞, 接种于带盖玻片的大方瓶中; 10 小时后, 95% 乙醇固定盖玻片 10 分钟, 空气干燥, 最后把片子放入 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst 33258 液中染色 20 分钟, PBS 封片, 荧光镜检。每张玻片计数 200 个二核体, 实验重复 2 次。

结 果

1. 甘油对 PEG 诱导鲫鱼细胞融合的影响

据报道甘油和 DMSO 不仅是理想的细胞冻存保护剂, 而且具有诱导细胞融合的能力^[7], 还可以促进 PEG 诱导的细胞融合。但是我们的实验表明, 甘油不仅不能诱导鲫鱼细胞融合, 而且对 PEG 诱导的鲫鱼细胞融合有明显负作用 (图 1, 表 1)。从表 1 和图 1 中可见。

表 1 甘油对 PEG 诱导鲫鱼细胞融合的影响

Tab. 1 Effects of glycerol on the cell fusion of *Carassius auratus* induced by PEG

PEG + Glycerol (%)	FI $\pm$ S. D. (%)	二核体 ¹⁾ Dikaryon	多核体 ¹⁾ Polykaryon	细胞存活率 Cell Viability (%)
50% PEG1000 +2.5	6.7 $\pm$ 1.9	47	5	69.0
+5	5.3 $\pm$ 1.5	42	4	65.7
+10	5.3 $\pm$ 3.9	37	7	51.0
+20				
50% PEG1000	29.5 $\pm$ 0.7	150	26	94.7

1) 平均 1000 个计数细胞中二核体和多核体数目。

Average number of dikaryons and polykaryons in 1000 cells counted.

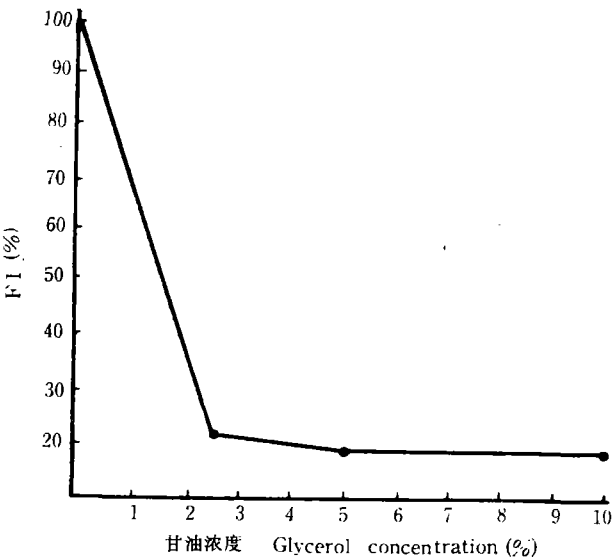


图1 甘油对 PEG 作用的影响。图示三种浓度甘油对 PEG 的负作用。以未加甘油的 50% PEG 1000 的 FI 作为 100%。

Fig. 1 Effects of glycerol on the function of PEG. Three concentrations of glycerol are used and the FI induced by 50% PEG1000 is taken as 100%.

甘油可使 50% PEG 1000 诱导细胞融合的能力比原来下降约 80%。当 PEG 中的甘油浓度达到 20% 时,细胞大量死亡(图版 I:2,5)。这同已报道的甘油可以极大地促进 PEG 诱导哺乳类细胞杂交的结果截然相反。

表 2 DMSO 对 PEG 诱导的鲫鱼细胞融合的促进作用

Tab. 2 Promotive effects of DMSO on PEG-induced cell fusion of *Carassius auratus*

PEG + DMSO (%)	FI±S. D. (%)	二核体 ¹⁾ Dikaryon	多核体 ¹⁾ Polykaryon	细胞存活率 Cell Viability (%)
50% PEG1000 +2.5	30.7±1.7	144	34	56.2
+5	31.9±0.6	138	43	52.5
+10	38.9±1.5	161	60	33.4
50% PEG1000	29.5±0.7	150	26	94.7
45% PEG1000 +2.5	18.5±1.1	98	12	92.1
+5	24.2±0.9	119	21	81.1
+10	28.1±1.9	139	26	69.0
45% PEG1000	14.7±0.7	82	9	99.5
45% PEG 400 +2.5	16.1±0.2	79	14	91.3
+5	23.7±0.6	122	16	82.0
+10	29.6±4.2	142	28	66.0
45% PEG400	7.5±1.2	42	5	
35% PEG 400 +2.5	12.4±1.0	65	6	93.5
+5	12.2±0.8	63	6	89.8
+10	13.9±1.4	71	7	78.5
35% PEG 400	7.3±1.5	38	5	
2.5	1.5±0.2	19	1	
5	1.7±1.5	21	1	
10	2.6±0.9	25	2	

1) 平均 1000 个计数细胞中二核体和多核体数。

Average number of dikaryons and polykaryons in 1000 cells counted.

2. DMSO 对 PEG 诱导的鲫鱼细胞融合的促进作用

已广泛证实 DMSO 能较大地提高 PEG 诱导哺乳类细胞融合的效率，融合的程度直接与这二种化合物浓度成正比^[12]。就 DMSO 本身而言，对鲫鱼细胞融合的诱导能力极弱，一旦加到 PEG 中，可以明显提高细胞融合的程度（图版 I:1, 4）（表 2）。在 45% PEG 400 中加入最终浓度为 10% 的 DMSO，可以提高 FI 约 22%，在 45% PEG 1000 中，10% 的 DMSO 可以使鲫鱼细胞 FI 提高约 14%。表 2 前三项实验表明，鲫鱼细胞 FI 的变化与 PEG 浓度和 DMSO 浓度成正比。我们发现，DMSO 使 50% PEG(1000) 引起的 FI 变化不如 45% PEG 引起的 FI 变化显著。在 50% PEG (1000) 中，5% DMSO 可使 FI 提高约 2%，而在 45% PEG 400 和 45% PEG 1000 中，则 FI 可分别提高 10 和 16%。当 PEG (400) 浓度下降到 35% 后，尽管加入 DMSO 可使 FI 有较大提高，但 FI 并不与 DMSO 浓度正相关。这一结果出乎意料之外。可能 DMSO 对 PEG 的促进作用要求一定的 PEG 临界浓度。无疑，随着 DMSO 浓度增加，细胞存活率下降，形态上与高浓度 PEG 和较长处理时间所产生的结果相似。但在较低 PEG 浓度中，细胞存活率下降较缓。

表 3 鲫鱼和草鱼的三种细胞杂交

Tab. 3 Hybridization of three cell-lines from *Carassius auratus* and *Ctenopharyngodon idellus*

实验次数	Ca 同核体 Homokaryon	Ca×CtC Ca×CtC 异核体 Heterokaryon	CtC 同核体 Homokaryon	同核体:异核体 Homokaryon: Heterokaryon
1	63	58	79	2.7:1
2	79	47	74	
3	58	56	86	
平均 mean	67	54	80	
	Ca 同核体 Homokaryon	Ca×CtE Ca×CtE 异核体 Heterokaryon	CtE 同核体 Homokaryon	
1	74	64	62	1.9:1
2	64	81	55	
3	77	63	60	
平均 mean	72	69	59	
	CtE 同核体 Homokaryon	CtE×CtC CtE CtC异核体 Heterokaryon	CtC 同核体 Homokaryon	
1	66	58	76 [*]	2.6:1
2	75	59	66	
3	69	50	81	
平均 mean	70	56	74	

注: Ca 代表鲫鱼异倍体细胞系, CtE 代表草鱼胚胎培养细胞, CtC 代表草鱼尾鳍培养细胞。
Ca—heteroploid line from *Carassius auratus*; CtE—cultured embryonic cells of *Ctenopharyngodon idellus*; CtC—cultured cells from caudal fins of *C. idellus*.

3. 鲫鱼和草鱼的三种细胞杂交

Hochest33258/BudR 是一种新的鉴定异核体的方法^[13,14]。BudR 具有使 Hochest33258 荧光部分熄灭的功能,二者结合可使异二核体中二核一明一暗。我们用鲫鱼细胞、草鱼尾鳍细胞和草鱼胚胎细胞进行了 3 组交叉融合,用 Hochest/BudR 技术鉴定二核体。在镜下,凡用 BudR 标记的细胞,其核荧光暗淡;反之,则明亮(图版 I:3, 6)。在合适细胞密

度下不会有由于细胞过分靠近而造成的观察误差。我们在对照组中检查了 2,000 个细胞(相当于在实验组中统计 200 个二核体所涉及的细胞总数),只发现个别二核体。结果表明(表 3),异核体比同核体少得多。 χ^2 检验, $P < 0.05$, 具有显著差异。可见,PEG 诱导的鱼类细胞融合中,同种细胞比异种细胞更易融合,融合具有特异性。

讨 论

Klebe 等曾系统研究过促进 PEG 诱导作用的物质,发现它们许多是红白血病细胞分化的诱导剂,其中有 10 种化合物其增强 PEG 诱导细胞杂交的能力超过了 DMSO,甘油的作用比 DMSO 强 3 倍左右^[4]。为了进一步提高 PEG 诱导鱼类细胞融合的程度,我们把一定浓度的甘油与 PEG (1000) 混和作为融合剂。我们发现甘油本身不仅无诱导细胞融合的能力,而且使 PEG 作用显著下降。微量的甘油(2.5%)就使 50% PEG 1000 的诱导融合的能力下降 78% 左右(图 1);当 PEG 中甘油浓度达到 20% 时,对细胞是致死的。我们这一结果与哺乳类细胞融合结果截然相反。甘油的这种对 PEG 的负作用机理还不清楚。如果不是甘油和 PEG 的分子结构所致,就是实验材料本身的差异造成的。这有待于进一步弄清。

业已证明,PEG 只能在一个很狭窄的浓度范围内诱导细胞融合,超过这个范围,它引起广泛的细胞损伤和作用降低。因此,在哺乳类细胞融合中,广泛使用 DMSO 作为 PEG 的助融剂,旨在降低 PEG 浓度的同时,提高细胞 FI 和减小融合剂对细胞的毒性。表 2 表明,在 50% PEG 1000 中,2.5 和 5% DMSO 使 FI 只有微小提高;当 DMSO 达到 10% 时,FI 明显提高,达到 39%,为未加 DMSO 时的 1.3 倍。而 DMSO 之所以提高 PEG 诱导鲫鱼细胞融合,主要在于它促进了较多的多核体形成,而对二核体数目无明显影响。当 PEG 浓度下降到 45% 时,微小的 DMSO 浓度变化,可以引起 FI 的较大变化。当 DMSO 浓度达到 10% 时,FI 提高近 14%,达到 28%,为未加 DMSO 时的 1.9 倍。由此可见,FI 不仅与 DMSO 浓度有关,而且也与混合融合剂中 PEG 浓度有关。在较低浓度的 PEG 中,DMSO 的作用更有效,这在 45% PEG 400 中也得到证实。当 DMSO 浓度达到 10% 时,FI 达到 29%,提高 22%,为未加 DMSO 时的 4 倍左右。但当 PEG 400 的浓度下降到 35% 时,尽管加入 DMSO 可使 FI 有较大提高,然而 FI 并不与 DMSO 浓度成正比。这一结果令人意外。显然,在鲫鱼细胞融合中,DMSO 对 PEG 的促进作用要求 PEG 一定的临界浓度,低于这个临界浓度,DMSO 的作用就失去其浓度依赖效应。我们认为,这个临界浓度为 40%。

从表 2 中还可看到,在 PEG 浓度为 45% 时,任何浓度的 DMSO 对 PEG 400 的促进作用均比对 PEG 1000 强。显而易见,DMSO 对低分子量的 PEG 的促进作用要比高分子量 PEG 有效。因此,在悬浮和单层细胞融合中,低分子量 PEG 结合 DMSO 比高分子量 PEG 结合 DMSO 更有效。

加入 DMSO 到 PEG 中的主要目的是为了提高细胞的 FI,同时降低细胞损伤。遗憾的是,在 50% PEG 1000 中虽然 FI 的终值较高,但细胞存活率又太低。而在低浓度的 PEG 中加入使细胞存活率水平可以接受的 DMSO 浓度时,FI 终值又不高,仅达到

不加 DMSO 的 50% PEG 1000 的水平。这种情况在哺乳类的细胞融合中是不曾有过的。在哺乳类细胞融合中,在低浓度的 PEG (44%—6000) 中,5% DMSO 就使细胞的 FI 提高 26% 左右,达到 36%;7.5% DMSO 使 FI 达到 55% 左右,而细胞存活率约为 50%^[12]。我们认为这种差异主要是由实验材料引起。即 PEG 和 DMSO 混和融合剂对鱼类细胞的毒性比对哺乳类细胞高,但其膜结构对这种混和融合剂的敏感性又不及哺乳类细胞。这一矛盾也许可采用在融合中加入 PHA 来减小融合剂对细胞的毒性而得到解决^[9]。故在鱼类细胞融合中,有待寻找比 DMSO 更理想的助融剂或细胞损伤保护剂,既能大幅度提高 PEG 诱导细胞融合的作用,又能保持较高的细胞存活率。

近年来,人工标记亲本细胞以鉴定杂种细胞引起人们越来越多的注意。除采用放射性核苷酸和乳珠标记细胞外,Hochest/BudR 技术也是一种新的鉴定异核体的方法。我们把这一技术用于鱼类细胞融合中,细胞在镜下发出浅蓝色的荧光,同核体与异核体清晰可辨。我们把 3 种鱼类细胞以 1:1 接种,交叉进行单层融合。在这种融合体系中,如果细胞融合取决于亲本细胞的随机分布和接触的机率,那么,在双核细胞中,同型二核体与异型二核体之比应是 1:1。我们的实验表明,在鲫鱼细胞×草鱼尾鳍细胞、鲫鱼细胞×草鱼胚胎细胞和草鱼胚胎细胞×草鱼尾鳍细胞中,同型二核体与异型二核体之比分别为 2.7:1、1.9:1、2.6:1(表 3)。同核体比异核体多得多。这些数值与理论比值相比有显著差异, $P < 0.05$ 。Koprowski 曾指出,当用仙台病毒为融合剂时,仓鼠成纤维细胞的种内融合比种间融合容易^[5],Lanfranchi 等则认为 PEG 可能破坏了细胞负责物种特异性识别的膜结构,因而 PEG 诱导的细胞融合不受物种特异性的限制^[6]。我们的结果反映了以 PEG 诱导的鱼类细胞融合并不单纯取决于二亲本细胞的随机分布和接触,而是可能与亲本细胞膜表面特性有关,具有物种特异性和组织特异性。这与仙台病毒诱导的细胞融合情况基本一致。不过,根据 PEG 诱导融合的机制,这种特异性可能是由不同细胞表面的电荷或结合水的状态的差异引起的,而不是细胞表面受体所致。

参 考 文 献

- [1] 陈敏容,陈宏溪,1985。鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性。水产学报,9(2): 121—130。
- [2] 阎康,陈敏容,陈宏溪,1984。鱼类细胞融合的初步研究。遗传,6(6): 19—21。
- [3] Davidson, R. A. and K. A. O'Malley, 1976. Polyethylene Glycol-induced Mammalian Cell Hybridization: Effect of Polyethylene Glycol Molecular Weight and Concentration. *Somatic Cell Genetics*, 2: 271—280.
- [4] Klebe, R. J., 1982. Enhancement of Polyethylene Glycol-mediated cell hybridization by inducer of erythroleukemia cell differentiation. *Somatic Cell Genetics*, 8: 723—730.
- [5] Koprowski, H. 1971. Cell Fusion and Virus Rescue. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 30: 914—920.
- [6] Lanfranchi, G. and G. Marin, 1981. Hybridization frequencies of Chinese hamster and mouse fibroblasts fusion with polyethylene glycol at different cell densities. *Cell Differentiation*, 10: 87—91.
- [7] Lucy, J. A., 1977. Cell Fusion. *Trends in Biochemical Science*, 2: 17—20.
- [8] Marshal Graves, J. A., 1980. Evidence for an indirect effect of radiation on mammalian chromosomes. *Exp. Cell. Res.*, 125: 483—486.
- [9] Mercer, W. E. and R. A. Schlegel, 1979. Phytohemagglutinin enhancement of cell fusion reduces polyethylene glycol cytotoxicity. *Exp. Cell. Res.*, 120: 417—421.
- [10] Mizukami, S., 1977. Fusion of dissociated fish embryonic cells. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 40: 265—270.
- [11] Mizukami, S., 1979. Fusion of dissociated embryonic cells in the teleost. *Zoological Magazine*, 88: 17—23.
- [12] Norwood, T. H., Zeigler, C. J. and G. M. Martin, 1976. Dimethyl sulfoxide enhances polyethylene gly-

col-mediated somatic cell fusion. *Somatic Cell Genetics*, 2: 263—270.

- [13] Wright, W. E., 1978. The isolation of heterokaryons and hybrids by a selective system using irreversible biochemical inhibitors. *Exp. Cell. Res.*, 112: 395—407.
- [14] Wright, W. E., 1978. A general method for heterokaryon identification using a BUDR/Hoechst technique. *Exp. Cell. Res.*, 111: 451—454.

THE EFFECTS OF PROMOTING AGENTS ON AND THE SPECIFICITY IN THE FUSION OF FISH CELLS

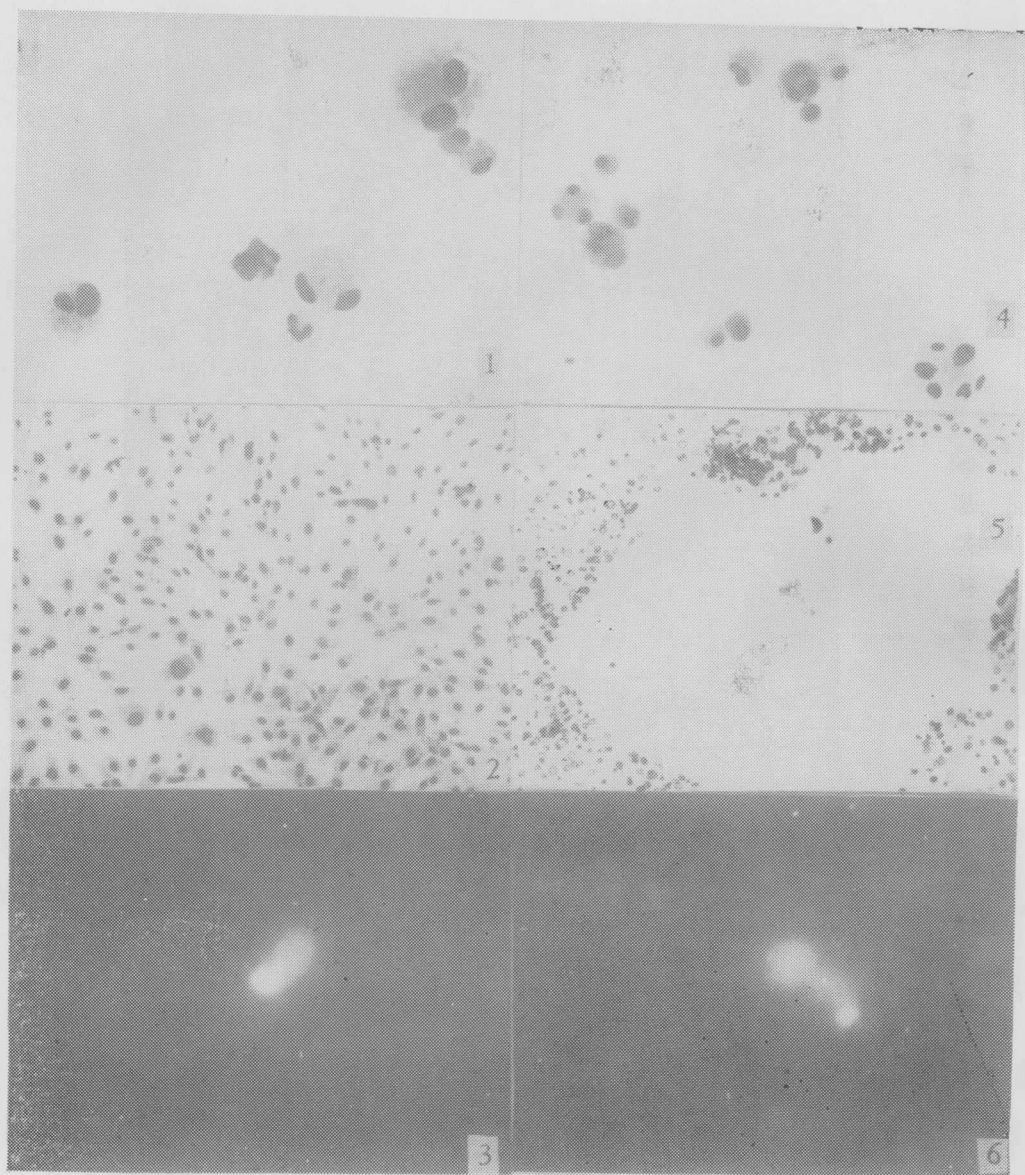
Yan Kang, Chen Minrong and Chen Hongxi

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan*)

Abstract

A small amount of glycerol may obviously reduce the function of PEG in the fusion of fish cells, while the presence of DMSO may greatly improve the cell fusion induced by PEG. The effect DMSO was even more prominent if the molecular weight of PEG and the concentration of PEG were relatively low. However, its concentration should not be lower than 40%, or the DMSO-dependent concentration would be ineffective. In the fusion experiment based on three groups of fish cells, we found that the number of dihomokaryons was much greater than that of diheterokaryons ($P < 0.05$). This shows that the PEG-induced fish cell fusion has its specificity in relation to species and tissue.

Key words dihomokaryon, diheterokaryon



1, 4 融合细胞 2 50% PEG 1000 处理后的细胞形态 5 含 20% 甘油的 50% PEG 处理的细胞形态 3, 6 融合细胞, 明亮的核未用 BudR 标记

1, 4 Fused cells 2 Cells treated by 50% PEG 1000 5 Cells treated by a mixture of 20% glycerol and 50% PEG 1000. 3, 6 Fused cells, the lighter nucleus being unlabeled by BudR.