

# 《生物工程讲座》(V)

## ——细胞工程(一)细胞工程概述

严绍颐

(中国科学院发育生物学研究所)

当今,在世界上各科学技术发达的国家内,不论是政府、科技界或一般人士均关注着“生物工程”的发展及其可能为人类谋取的巨大福利。这是因为目前生物科学和工程技术的发展,已使它们之间能在非常精密而有效的基础上结合在一起,为人类创造新的物质财富。在过去的年代里,人类社会借助于科学技术的发展,把它们的成果转化为生产力,成为人类创造生活资料和其它财富的源泉。因此把科学研究中基础研究领域所获得的成果逐渐开拓成为能与一定的技术创造结合,而制造各种产品供社会需要的各种工程学,便应运而被发展起来,解决了人类对衣、食、住、行各方面的需要。但是人们对物质财富的需求日益增长,原来依靠自然界既有的资源加工后所提供的物质财富,愈来愈不能满足人们更高的要求,例如原来由生物界本身为人类所提供的吃、穿、用资料,主要停留在靠天吃饭,天然供应的基础上,还谈不到依靠人为的力量来驾驭生物界,使之更有目的地为人类社会服务。现在,由于生物工程的突起,这种局面正在改变,所以生物工程才会对人们造成如此之大的吸引力。有人把生物工程解释为运用生物学、化学和工程学相结合的方法来利用生物体,使之成为生产服务,使人们对生物资源的利用提高到一种创新的水平。这在大体上概括了生物工程的内容。

生物工程虽然是近十年来才提出的一个现代化的概念,但是由于它涉及的研究领域实际上有些已有相当的历史,只不过那时因技术水

平、生产规模和产品价值均没有被提高到如此的高度而已,所以一般认为生物工程所包括的内容除了从七十年代以后所发展起来的基因工程外,还应包括已有相当历史的利用生物体为材料的发酵工程和酶工程,当然两者目前的发展也已达到了崭新的水平。此外,由于细胞水平的基础研究所获得的大量成果均显示了非常重要的、能应用于生产或解决人类生活中的各种实际问题的前景,因此也有人提出了“细胞工程”的概念,并认为它也应被包括在生物工程的范畴之内。不过细胞工程的提法在国际上还是少见的,而事实上把在细胞水平上所进行的各项具有生产价值或有其它社会效益(如治疗疾病、改良环境等)的工作列于生物工程的范畴,或列于其它学科研究领域之内,也都不无合理之处。现就“细胞工程”所涉及的主要内容作一简要介绍:

### 一、什么叫细胞工程

对于细胞工程目前尚无统一的认识。有人认为它是应用细胞生物学和分子生物学的方法,按照人们设计的蓝图,有计划地改变或创造细胞内的遗传物质从而达到控制或改变细胞的功能甚至整个有机体的技术,以及发展这种技术的研究领域;也有人认为,它还应包括在体外培养能繁殖的细胞,提供细胞产品,并且必须与工程学的方法和技术结合起来使之达到产品工业化水平的目的。看来其所以不容易给细胞工程下一个比较恰当的定义。一方面是因为它所

涉及的内容相当广泛，许多以细胞为材料的工作几乎都可以挂上这个名称，以提高它们对公众的吸引力；另一方面这一领域确实尚未发展成为一种象基因工程、发酵工程或酶工程那样比较完善的独立系统。所以“细胞工程”的定义及范畴还有待于在进一步的研究和发展中加以明确。

## 二、细胞工程的主要内容

**(一) 人工授精和体外受精** 高等动、植物和人类的繁殖主要都是依靠自然交配，即雄性和雌性配子的结合(又叫受精)来实现的。本来这种结合仅限于同类之间选择配偶，但在长期的育种过程中，人们学会了选择不同品种之间的个体强迫它们进行杂交。在这种情况下，不同生物之间生殖器官和性行为方面的差异或精子与卵子的不亲和性，常使杂交不能成功。因此人们设计出一套工具和方法，可以帮助它们逾越这些天然屏障，使不同品种雌、雄个体的精子和卵子能够在体内或体外人工培养的条件下实现受精作用，从而有可能得到新的杂种个体。由于杂种个体表现出杂种优势，所以可达到改良品种的目的。这类杂交均按人类的愿望和育种设计进行，尤其是体外人工授精要靠精密的细胞培养条件，所以这是一种属于创造性的、细胞水平上的研究成果。现在在农业、畜牧业以至人类中均已得到“试管作物”、“试管动物”和“试管婴儿”，为人类和生物界解决不育症、优良品种的培育等方面均作出了非常惊人的贡献。特别是在家畜方面，人工授精已发展成为一种新的工业，因为已发明的优良冷冻精子保存法，可以为全世界各地的良种培育提供精子。例如美国的奶牛主要是由 10 个专业机构提供的精液进行人工授精而获得的，仅 1972 年就获得了 8,643,089 头之多。此外，在山羊、绵羊、猪和家禽(鸡和火鸡)方面均有较广泛的应用。以下几种技术是保证这一工业发展的关键：1. 要用正确的方法收集精子；2. 使保存的精子具有授精活力；3. 控制人工授精时的适当精子用量；4. 恰当的冷冻精子技术；5. 要有熟练的技术人员。

此项工作在世界上很多国家均已推广使用，在我国也已在某些家畜家禽中有广泛的使用，效果很好。

**(二) 胚胎移植** 尽管有了人工授精(体内或体外)的方法，但是在很多情况下，不同品种或种类差异较远的个体之间，精子与卵子结合的天然障碍仍不能逾越，因此科学家又设计了另一套方法，可以使优良品种的动物用人工方法多排卵(又叫超排卵法)。这样便能得到较多的发育到早期的胚胎，进行冷冻保存后，运到各地，用手术或非手术的方法，转移到已用人工方法诱发同步假孕(就是用注射性激素的方法，使未交配的雌性动物处于类似妊娠早期，子宫壁能接受卵子种植的状态)的保姆母畜子宫内，使它能在后者体内发育并产出良种动物。这种尝试首先开始于兔子，已有近百年的历史，现在在家畜业中已发展到商业化的水平，其中有 90% 以上是牛的胚胎移植。据统计，在北美地区，1979 年移植的牛卵已超过 17,000 例，每次移植所用的代价 300—2000 美元，在这方面的投资约为 20,000,000 美元。此项工作的发展取决于下列技术因素：1. 超排卵技术；2. 收集卵子的恰当时间(一般为妊娠后的第 6—9 天，12—15 天时成功率有降低，但优点是可判别性别，使将来出生的仔畜能按性别选择)；3. 保证保姆雌性动物的恰当同步发情；4. 胚胎的短期保存(0—15℃)，10 天以内供运输或移植前的准备所需，可保存在体外人工条件下，也可保存在另一种动物的生殖道内，如兔子。也有人将胚胎较长时间地保存在深度冷冻的液氮内(—196℃)，如牛胚保存后的成活率为 70% 左右；5. 熟练的胚胎移植技术。据统计，以牛胚胎的移植为例，1981 年在北美地区，手术和非手术移植的例子各占一半，其中手术移植的成功率为 70—90%，到 1982 年，80—90% 的胚胎移植将用非手术方法在农场就地地进行。到 1983 年，80—90% 的胚胎已过渡到用冷冻保存，每个胚胎保存所需价格为 50—100 美元。经过性别鉴定的胚胎移植比例于 1983 年达到 10—20%。1983 年，已训练有熟练的胚胎移植技术人员 1000 名

以上,每次移植所耗的费用为 25 美元左右。1982 年牛胚胎的移植数为 50,000 例,预计到 1990 年将达到 250,000 例。由此可见,此项技术所创造的经济效益是相当可观的。此项工作在我国已开始用于羊和牛的试验,并正在发展中。

**(三) 哺乳动物的孤雌生殖、双胎和嵌合体** 在营有性生殖的动、植物中,个体的繁殖一般要靠精子和卵子的结合,但在生物学的基础研究中,人们早已发现,在动、植物中也有依靠单性繁殖的现象,较常见的是孤雌生殖。一般来说单个卵子或精子的细胞核内仅含有该物种所特有的半数染色体(又叫单倍体),所以如果精、卵不能结合使它们的受精卵内细胞核所含的染色体数目恢复到象体细胞内那种整数的水平(又叫双倍体),卵子便不能正常发育成为个体。但是在有些动物中,由于目前某些尚不清楚的原因,卵子成熟过程中的减数分裂阶段(即染色体数目减少一半,使成熟的卵子中只含半数染色体,以便待它和精子中的半数染色体结合后恢复到整数染色体的水平)被抑制了,因而形成了一个双倍体的卵核,或者在动物中由于某些因素的刺激(如冷、热刺激)使卵子成熟过程中,所分裂出去的极体(一种除了把半数染色体带离卵子外没有什么其他功能的小细胞)不排出或又并入卵内,重新组成双倍体的卵核,这种卵子便有可能发育成为个体。由于这种个体是由单纯的卵细胞核内所含的遗传物质而绵延的后代,所以它们所表现的性状特征也是相对纯的,而且因为卵子中仅含有决定雌性性别的染色体,所以由此发育而成的个体一般均为雌性。这种孤雌生殖的现象,在动物界的无脊椎动物、某些爬行类、两栖类和鱼类中均不罕见,而在哺乳动物中则仅有得到胚胎的实验报道,尚未发现有自然的孤雌生殖产仔的现象。为了培育纯系和纯雌动物,这方面研究的发展和應用將有很大的吸引力。

双生在各类动物中并不罕见,有的是由同一个受精卵在发育过程中因某种原因自然地分成两半后形成的双生,有人称之为真双生;也有

的是因为母体同时排放两个卵子并同时被受精而形成的双生,有人称之为假双生。与此类似,如果同时排放并受精的卵子数目多于两个,则可形成一胎多仔。这在有些动物中是屡见不鲜的,但在某些高等哺乳类和人类中则少见。现在人们着重研究的是,要人为地增加真双生的比例,使有些动物的产量可以增加一倍。例如在 1970 年就有人首先试验将 2 细胞时期的小白鼠胚胎一分为二,再移回母鼠内得到一模一样的双生仔。近年来又在发育晚期的胚胎中施行同样手术成功。例如在牛、羊和马中均已获得双生胚胎,但尚未见到在商业上的应用。这种试验还有另一种值得注意的可能性,就是将分成二半后的半个胚胎先种植到母体内,另一半则冷冻保存起来,若前一半产出的仔畜质量好,则可再移植另一半冷冻保存的胚胎使之发育成仔。

还有一种方法,可以将两种不同品系的老鼠胚胎,在其早期阶段用手术方法全部或部分地将它们并合在一起,然后移回母体,可以诞生出两种品系相间的小鼠。这些个体一般是不育的,并无生产价值,但对分析动物遗传特征的控制机理有重要价值。中国科学院发育生物学研究所的科学家们已于 1980 年将此项技术引进国内,得到了嵌合型小鼠。

**(四) 家畜性别的选择** 动物的性别是由生殖细胞内所含的性染色体(即 X、Y 染色体)来决定的,一般来说,卵子内所含的性染色体为 X 型,而精子内所含的性染色体为 X 或 Y 型,两者受精结合以后发育成的个体有二种可能性:一为 XX 型,表现为雌性;另一为 XY 型,表现为雄性。因此,如果 X 型的卵子和 X 型的精子结合,发育成的个体表现为雌性,X 型卵子和 Y 型精子结合发育成的个体表现为雄性。现在已有方法可在哺乳动物胚胎的某一时期或妊娠后期胚胎的尿囊液中检查胚胎双倍体细胞内所含的是 XX 型染色体还是 XY 染色体,这可用染色体分析方法找到带有 Y 小体的染色体或用一种能检测带 Y 染色体的细胞所含的抗原(HY 抗原)来判断。

如果用分离X和Y型精子的方法使卵子分别与Y型或X型精子受精,则可按预定目标获得所需要的性别的个体。如果是在胚胎晚期取细胞分析染色体,则只能确定已发育的胚胎是雌性或雄性,这样虽不能按预定的目标得到雌或雄性,但却能利用流产的办法排除所不需要的性别的个体,这种方法目前尚在试验阶段。利用精子内HY抗原来判别并进而分离X和Y精子的方法尚待改进。从胎儿得到液体和细胞供染色体鉴别的方法目前在牛中应用比较有效,对于应用于它种动物尚待发展。

**(五) 植物的花药、花粉培养和原生质体培养** 值得提出的是在植物界中还有依靠单个精子发育成为个体的孤雄生殖现象;由此建立的技术已被广泛应用于育种的研究并已取得了很大成功,这就是从六十年代发展起来的花粉和花药培养技术。植物细胞与动物细胞相比有较大的全能性,即科学家已证明利用分离植物组织所得到的单个细胞可以在特殊的培养基中培育成为完整的植株,就像一根植物的插枝能长成一株植物那样,这均属于不需要精子和卵子相结合的无性繁殖,是植物界所具有的一种普遍特性。现已证明,将整个花药或其中的花粉作离体培养,均有可能得到由单倍体花粉细胞(精子细胞)发育而成的单倍体植株。这种植株通过人工或天然的方法使它们细胞内的染色体加倍可形成稳定的纯合二倍体植株,由此再产生下一代植株的性状相对稳定整齐,在较短的时间内便可培育成为优良的品种。例如用常规有性杂交的方法培育植物新品种一般需要8—10年,而用花药或花粉培养的单倍体育种方法,4—5年即可培养成品种。利用这种方法,现已在小麦、小黑麦、玉米、辣椒、茄子、杨树、油菜、烟草、水稻等方面培育出了单倍体花粉植株和新品种、新品系。我国在这方面的工作处于世界上较先进的行列。

利用植物细胞发展起来的另一新技术是原生质体的培养(植物细胞与动物细胞的区别之一,在于它的细胞膜外面多一层纤维素性质的细胞壁,要得到能被单独培养和分裂的植物细

胞,首先要把它们膜外的细胞壁用特殊的酶消化掉,然后可以分离得到单个游离的细胞,这种去掉了细胞壁的植物细胞又叫原生质体),这同样也是利用植物细胞的全能性。这种含有双倍染色体数的植物原生质体,便可在人工条件下培养成为正常的、无性繁殖植株。如果发现某株植物好,就可将它的组织细胞分离成原生质体再培养成许多植株,或者把不同植物的原生质体,用人工诱导方法进行融合,获得杂种细胞,这种方法可以克服植物之间远缘杂交的不亲和性而培养成杂种植株。现已在烟草、胡萝卜和其它一些花卉中获得初步成功,进一步的研究及其应用正在深入之中。这方面的研究,我国已有良好基础。

**(六) 在细胞内进行不同水平基因或其载体物质转移、重组细胞结构、改变细胞功能、制造新细胞产物、培育新的动、植物品种。**

1. 体细胞杂交 体细胞杂交是指用人工诱导的方法(一般用灭活的仙台病毒或聚乙二醇为诱导剂)使两种不同的细胞融合在一起(在植物中,因用去掉细胞壁的原生质体进行杂交,所以又叫原生质体融合)。结果,便产生了一种含有二种不同细胞核的异核细胞,它们之中也包括二种母细胞的其他成分的不同组合。在这种杂种细胞内,最初由二个不同的细胞核所合并成的那个细胞核中包含来自双亲细胞的染色体,但是这种杂合的染色体组成是不稳定的,在杂种细胞经过不断分裂以后,其中有些染色体被丢失,最后成为具有稳定杂合染色体组成的杂种细胞系。由于方法上的不断革新和进步,现在已能获得种内、种间的杂种细胞,甚至动、植物细胞也能杂交。

因为基因是在染色体上,所以通过细胞杂交所得到的杂种细胞,就带有含双亲基因的染色体,这些染色体上所拥有的不同基因在同一新的杂种细胞内所表现的功能,就会使该细胞表现出各种特征。所以最初的体细胞杂交的试验主要是用于研究一些非常重要的生物学问题。例如在不同表现型细胞所形成的杂种细胞中,不同基因功能的表达;恶性细胞和正常细胞

形成的杂种细胞中恶性的控制；能接纳病毒和不能接纳病毒的细胞间所形成的杂种细胞中，病毒感染和病毒基因表达的控制；以及借助于杂种细胞中某些染色体的丢失而表现出的细胞性状或功能的差异来判断某些基因在染色体上的定位等理论研究。

但近年来，体细胞杂交已被发展成一种非常有实用意义的技术，这就是英国人米尔斯坦 (Milstein) 于 1975 年开始建立的杂交瘤技术。对此，下一讲将有详细介绍。但单克隆抗体技术建立的历史还不长，它虽然是细胞生物学研究领域中创造的一项能给我们带来较明显的经济效益和社会效益的新技术，但它不论在制备的原理、技术和应用方面均存在着很多有待于克服的问题，所以适当地判断它在“细胞工程”中所应占的地位是我们的科学家、工程师和宣传家们应予注意的问题。

2. 细胞核移植 这是指将一种细胞的细胞核移植到另一种事先去掉了细胞核的细胞内，以观察由不同来源的细胞核和细胞质重新组成的细胞所表现的功能会发生什么变化，其最初目的在于从理论上研究细胞核和细胞质的功能及其相互作用。由于细胞核内的染色体上包含着基因，所以当一种细胞核被移入于另一种细胞的细胞质内后，它所含的基因的功能就会受控于异源的细胞质环境而发生某些变化，所以这种技术也可视为基因转移的一种方式，不过这与后面将要提到的单一目的基因的转移有区别。此项研究最先在 1952 年开始于两栖类中，将早期胚胎的细胞核移植到事先去掉或杀死了细胞核的卵细胞质中获得成功，并得到了各种类型的个体，甚至还有用两栖类的肿瘤细胞核移植至正常去核卵内，也获得了异常或正常的个体。所有这些结果对于研究细胞分化和肿瘤形成的机制提供了很丰富的资料。可惜的是两栖类的经济价值不大，因此这方面的研究缺乏实用意义。为了在研究理论问题的同时探讨这种技术应用于改良动物品种的可能性，已故中国科学院副院长童第周教授及其研究组从六十年代开始就着手研究鱼类的细胞核移植。

在过去的十几年中，他们和中国科学院水生生物研究所、中国水产科学院长江水产研究所以及广西水产研究所等合作，已在淡水经济鱼类中进行了细胞核移植试验并获得成功。他们在不同属的鱼类间用鲤鱼的胚胎细胞核移入去核的鲫鱼卵细胞质内，或者反之用鲫鱼的核移入鲤鱼的细胞质内，以及在不同亚科的鱼类间，用草鱼的细胞核移入团头鲂的细胞质内，或者反之，团头鲂的细胞核移入草鱼的细胞质内，均获得了移核鱼。其中鲤鱼核和鲫鱼质配合的移核鱼的形态特征显示了既有来自鲤鱼（口须和咽齿），又有来自鲫鱼（脊椎骨数），还有中间类型（侧线鳞片数）的性状；经过对它们血液的分析，也发现了不同于鲤鱼和鲫鱼的特征（血清蛋白电泳图谱）。初步小规模养殖实验也显示了这种杂种鱼要比鲤鱼生长快些。这些杂种鱼和鲤鱼与鲫鱼的有性杂交鱼不同，前者能繁殖而后者是雄性不育的。又如所获得的草鱼细胞核与团头鲂细胞质配合的移核鱼，虽然外形上与草鱼相似，但对其血清蛋白和器官乳酸脱氢酶的生化分析也证明有新的特征产生。原来草鱼雌性和团头鲂雄性，或者草鱼雄性和团头鲂雌性进行有性杂交时，大都为早期致死，偶有成活者，也是两性不育，但由草鱼细胞核和团头鲂细胞质配合成的移核鱼已显示雄性为可育的。所以从这些结果来看，鱼类的细胞核移植不仅同样能探讨理论上的重大问题，而且这种方法还能克服鱼类之间远缘有性杂交的严重缺陷而获得有性状变异，或有综合性状的移核鱼。这种移核鱼如能稳定性状并繁殖，则很有可能培育出鱼类的新品种。1981 年瑞士的科学家报道用细胞核移植的方法获得了二种品系间的杂种小鼠，但尚未见到有进一步深入的报道。

3. 基因的直接转移 已知生物的各种性状分别由各种基因所决定，有的是一个基因决定某一性状，有的是若干基因共同决定某一性状。由于现代分子生物学技术已能分离得到，或者人工合成单一的基因，并能在特定的培养基中把它们繁殖成为克隆（无性繁殖系），因此就可获得大量单一的基因克隆供转移使用，基因的

获得和繁殖首先要依赖 DNA。基因在细胞内的转移,一般采用显微注射的方法,用显微吸管吸取基因或带基因的质粒,在显微镜下借助于特殊的注射装置,把它们注射入细胞的核内。目前实验较多而有些结果的是将基因注射于早期胚胎内,或直接注射于受精卵的细胞核内。如 1977 年有人将小鼠 RNA 病毒注射于小鼠的早期胚胎内,并发现由被注射的小鼠胚胎发育而成的小鼠中,有些个体的生殖细胞中含有该 RNA 病毒的基因组(RNA 病毒的基因组就是 RNA 而不是 DNA)。也有人把一种猴病毒(SV40 病毒)的基因注射至小鼠的受精卵细胞核内,结果发现在由此诞生的若干小鼠内可以找到该病毒 DNA。现在看来,用注射方法把基因转移至细胞或细胞核内,在技术上是可行的,但是注射进去以后,这部分外源的基因如何能插入到被注射细胞核的染色体上,变成它的基因组的组成部分,并随着细胞染色体的分裂而复制传代,或者随着受精卵的发育而发挥其功能等重大问题尚未得到解决,现在世界上各先进国家的许多著名实验室都在进行这类试验。人们就是想把有特殊功能的基因转移到原来没有该基因的动物的细胞或个体内,使细胞和个体产生新的功能和性状来达到改造细胞、改良品种的目的。从理论上说,这是一种非常吸引人

的设想,但毕竟还在开始试验阶段,真正的成功还有待于更大的努力。

除了上面谈到的一些内容以外,还有许多工作也可列为“细胞工程”的范畴,因为从事与细胞研究有关的科学家们往往想强调他们的研究在不同程度上是按人们的意志来改变原来细胞的结构或功能,而把对某些细胞的研究提高到“细胞工程”的高度,可能更容易赢得对这些研究的道义上或物质上的支持。当然,反过来说,即使对上面所提到的各种试验、技术和成果,也都可以分别列入于细胞生物学、分子生物学、遗传学或医学等的研究领域而不使用“细胞工程”这样的名称。不过,在当今生物工程是如此吸引人的时代里,把有关的研究归纳成为“细胞工程”领域,使这类研究更赋有时代感和更明确的目的性,无论如何总能为加强这些研究创造更有利的条件。

## 参 考 文 献

- [1] Benjamin G. et al. 1981 *New Technologies in animal Breeding* Academic Press New York.
- [2] Freeman W. H. 1983 *Frontiers in Science and Technology* New York/San Francisco.
- [3] Puett D. 1984 *Human Fertility Fertiligt, Health and Food-Impact of Molecular Biology and Biotechnology* Dnified Nations Fund for Popalation Activities, New York.