

·综述·

细胞永生化学技术及其应用研究进展

庄金秋^{1,2}, 梅建国^{1,2}, 王文秀¹, 沈志强^{1*}

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 中国山东 滨州 256600; 2. 吉林大学 畜牧兽医学院, 中国吉林 长春 130062)

摘要: 细胞永生化学是目前细胞生物学研究的热点之一。引起细胞永生化的因素很多, 其中端粒酶在这一过程中发挥重要作用。细胞永生化学技术在未来的成功应用, 不仅为生物制品的研究与开发提供了有力工具, 而且也为疾病的诊断与治疗提出了新的思路。就细胞永生化学技术的原理、方法、途径及其应用等方面研究进展作一综述。

关键词: 细胞永生化学; 端粒酶; 应用

中图分类号: Q813.5

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2011)04-0363-06

Progress in Research and Application of Cell Immortalization Technology

ZHUANG Jin-qiu^{1,2}, MEI Jian-guo^{1,2}, WANG Wen-xiu¹, SHEN Zhi-qiang^{1*}

(1. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou 256600, Shandong, China;

2. College of Animal Science and Veterinary Science, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China)

Abstract: The study on cell immortalization becomes one of the hot research areas of cell biology. Many factors can cause cells immortalization, telomerase plays an important role in the process of cells immortalization. The technology of cells immortalization will be successfully applied in many areas in the future. It will provide a powerful tool for the research and development of the biological products, and also give out a new method for diagnosis and treatment of disease. An overview of the advance in the principles, methods, approaches as well as applications of the cell immortalization technology was given.

Key words: immortalization; telomerase; application

(*Life Science Research*, 2011, 15(4): 363~368)

正常组织来源的细胞在通常的体外培养条件下可生长和分裂, 但经过有限次的细胞传代后, 就会停止增殖, 发生衰老和死亡。这就限制了细胞培养技术的进一步应用。细胞永生化学 (cell immortalization) 指体外培养的细胞经过自发的或受外界因素的影响从增殖衰老危机中逃离, 从而具有无限增殖能力的过程。自发永生化的几率非常小, 啮齿类动物为 10^{-5} ~ 10^{-6} , 而人类细胞则更为罕见, 小于 10^{-12} 。因此, 学者们通过基因转染等技

术将外源性永生化学基因, 如病毒、原癌基因和抑癌基因突变体等, 导入目的细胞内, 以增加永生化的发生率, 进而建立永生化学细胞株 (immortalized cell strains), 以达到使体外培养的细胞具有无限增殖能力且细胞间无差异的目的。目前研究发现细胞永生化学与端粒 (telomere) 和端粒酶 (telomerase) 有密切联系。端粒除保持染色体完整性外, 还作为细胞生存期限的关键性调控因子存在, 端粒功能障碍会导致细胞增殖衰竭或凋亡。端粒酶可维

收稿日期: 2011-05-03; 修回日期: 2011-06-30

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2006D26)

作者简介: 庄金秋(1978-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事细胞培养和动物用病毒疫苗研制, E-mail: zhuangjinqiu2003@yahoo.com.cn, Tel: 0543-3405361; * 通讯作者: 沈志强 (1963-), 男, 山东荣成人, 山东省滨州畜牧兽医研究院研究员, 博士生导师, 主要从事生物技术及兽用生物制品的研究, E-mail: bzshenzq@vip.sina.com.

持端粒的结构和长度稳定,还可提高细胞对应激原和毒性因子的耐受力,在细胞永生过程中发挥重要作用。

1 细胞永生化的作用机理

目前普遍认为细胞永生是细胞恶性转化的必经阶段,因为所有的肿瘤细胞都具备无限分裂的特性。正常人或动物原代细胞在体外经过多次分裂后,在肿瘤抑制因子,如 *p53*、*pRB* 等作用下,细胞进入衰老期(senescence, M1 期),如人上皮细胞在分裂 40~60 代后就停止生长,此时细胞对生长因子等失去反应,产生 DNA 合成蛋白抑制因子,细胞周期检查点(cell-cycle checkpoint)发送细胞周期停止信号, DNA 合成停止,细胞停止分裂开始衰老,但不一定死亡。而病毒、原癌基因和抑癌基因突变体等则可以抑制 M1 期机制,细胞绕过 M1 期继续生长。细胞经过 20~30 群体倍增次数(population doublings, PDs)后,进入危机期(crisis, M2 期),细胞出现退化,如双着丝粒形成、染色体变短而失稳,分裂细胞逐渐减少,绝大多数细胞发生凋亡,只有罕见的细胞在一些因素影响下,端粒酶被激活,以它自身 RNA 为模板不断合成端粒 DNA 来补充和延长端粒有限长度(telomere restriction fragments, TRFs),以维持端粒长度,恢复染色体的稳定性使细胞得以逾越 M2 期,细胞就获得了无限分裂和增殖的能力而成为永生细胞^[2]。可见,抑癌基因 *p53* 和 *pRB* 的失活以及端粒酶的激活是人体细胞获得永生的必要条件,这就是所谓的“端粒假说”,迄今已经得到许多实验研究的验证^[3]。

2 促使细胞永生的基本方法

2.1 端粒和端粒酶

在大多数多细胞真核生物,随着体细胞与生殖细胞的分离,细胞分化赋予了体细胞有限复制及生殖细胞无限增殖的能力。在正常体细胞向永生细胞和肿瘤细胞的转化过程中可能也存在着与生殖细胞类似的机制。端粒、端粒酶的发现为细胞永生的机制提供了新的思路,同时也应用于永生细胞系的建立。

2.1.1 端粒

端粒是真核细胞染色体末端的特殊 DNA-蛋白质结构,由一简单重复的富含碱基鸟嘌呤(G)的高度保守的 DNA 序列及相关蛋白质组成^[4]。它参

与 DNA 复制,对维持染色体的稳定和完全复制有重要作用。其长度反映着细胞复制史及复制潜能,被称作细胞寿命的“有丝分裂钟”。在哺乳类动物和人体中这种序列为 5'-TTAGGG-3',平均长度为 5~15 kb。其主要生物学功能是防止染色体 DNA 降解、末端融合缺失和非正常重组,避免染色体融合和大量遗传信息的不稳定,避免细胞分裂停止及细胞衰老的发生。端粒的长度与有丝分裂次数相关,体外培养的细胞每分裂 1 次,端粒缩短 50~200 bp^[5],正常动物细胞由于末端复制过程,端粒随细胞分裂而进行性缩短,端粒过短时失去保护染色体末端的能力,导致染色体的融合以及基因组的不稳定,使得细胞的分裂次数有了生理限制,导致细胞停止增殖并死亡。相反,永生的细胞或肿瘤细胞由于端粒酶的活化,端粒长度可以维持恒定^[6]。

2.1.2 端粒酶

端粒酶是一种能延长端粒末端的核糖核蛋白酶,由 RNA 和蛋白质组成。1985 年由 Blackburn 首次从四膜虫细胞提取物中发现。端粒酶是一种专一的逆转录酶,能以自身的 RNA 为模板,从端粒 DNA 3'-OH 末端延伸端粒或合成新的端粒 DNA,以补偿细胞分裂时染色体末端的缩短,从而维持端粒的长度,使细胞不会因端粒耗尽而出现凋亡。即端粒酶能“自主”地对端粒 DNA 富含 G 的链进行延长,而富含 G 的链又能通过 G-G 配对(不遵守 Watson-Crick 的 G-C 配对规律)使其终端回折,形成特殊的发卡结构,这样 DNA 复制时新链 5'端缺失就可以得到补齐。1989 年 Morin 教授率先在人类宫颈癌细胞中发现,活性端粒酶由三部分组成:端粒酶 RNA (telomerase RNA, TR)、端粒酶相关蛋白 (telomerase-associated protein, TEP) 和端粒酶逆转录酶 (telomerase reverse transcriptase, TERT) 或称端粒酶催化亚基(telomerase catalytic subunit, TCS)^[7]。正常情况下,大多数体细胞端粒酶的表达是严格调控的,表达是瞬时和低水平的^[8]。大多数肿瘤组织中可以检测到端粒酶的活性,说明端粒酶的激活与肿瘤的发生密切相关^[9]。在原代培养的细胞中稳定表达人端粒酶催化亚基(hTERT)基因能稳定端粒的长度,使细胞易于永生^[6],因此 hTERT 的激活是细胞永生化的重要步骤。另一方面,端粒酶是细胞周期重要的调控因素之一,影响着细胞周期进程。现已知端粒酶反应最适 pH 值为 6.5~8.5,最适反应温

度为 35~40 °C, 最适离子浓度为 1~25 mmol/L.

2.2 传统细胞永生基因

2.2.1 病毒

2.2.1.1 EB 病毒

EB 病毒(epstein-barr virus)在体外能使 B 淋巴瘤母细胞永生形成淋巴瘤母细胞样细胞系, 它是通过潜伏蛋白激活细胞因子与其受体相互作用的途径使细胞永生的. EBV 基因组含有 100 多个基因, 但只有几个基因在 EBV 感染的 B 淋巴细胞中表达, 称潜伏基因. 据这些基因在细胞中的定位, 将其表达产物分为: EBNA 蛋白家族(EBNA1、EBNA2、EBNA-LP、EBNA3)、LMP 蛋白家族(LMP1、LMP2A、LMP2B)和两种非多聚腺苷酸化的小 RNA (EBER1、EBER2). 经研究结果表明 EBNA1、EBNA2 对于永生是绝对必需的; EBNA-LP 与 *pRB* 和 *p53* 都存在相互作用, EBNA-LP 缺失的病毒永生 B 细胞的能力降低; EBNA3A、EBNA3C、LMP-1 对于 B 细胞的体外转化是必需的; EBNA3B 虽然不是转化所必需的, 但它能诱导波形蛋白和 CD40 的表达. EBV 感染静止期的细胞后, 虽然提高了细胞 *p53* 的转录水平, 但细胞并未衰老死亡, 由此推断, EBV 可能诱导其它细胞周期调控蛋白从而抑制了 *p53* 的促细胞衰老作用, 使细胞永生. EBV 永生化的 B 细胞的一个最显著的特点就是端粒酶活性的提高, 这可能是导致 B 细胞永生的主要原因. 目前, EB 病毒感染细胞使其永生应用最多的是 B 淋巴细胞, 可以直接用与 EB 病毒共培养的方法, 而在其他细胞中的应用很少.

2.2.1.2 SV40 病毒

猿猴病毒 SV40 是简单的真核细胞病毒, SV40 的 T 抗原片段是最常用的目的片段, 将其整合入靶细胞核内并表达, 可导致细胞增殖活力的改变并表现出多种与肿瘤相关的转化显型. Shay 等(1989 年)研究结果表明, 在大多数情况下, SV40 转染细胞的永生率是非常低的, 只有 1/($10^5 \sim 10^8$). 目前对 SV40 转染靶细胞发生永生化的机制并不是很清楚, Aboagye 等 (1996 年) 推测 SV40 大 T 抗原可能与 *p53* 蛋白结合成复合体引起的 *p53* 失活可导致细胞的增殖活跃而永生. Scrivinasan 等(1997 年)推测 SV40 大 T 抗原转染的细胞之所以能永生, 可能是因为大 T 抗原通过一个袋状位点与 *pRB-E2F* 复合体结合, 使 *E2F* 从 *pRB-LT* 复合体中分离出来, 抑制细胞衰老^[10].

Small 等推测经 SV40 转染, 端粒长度稳定的细胞可达到永生. 除了以上因素外, 可能还有很多因素共同调控着 SV40 感染的细胞的永生机制. 近年来, 人们已成功获得多种 SV40 转化的永生细胞株, 应用的方法包括: 野生型 SV40 病毒共培养感染靶细胞、磷酸钙法、电穿孔以及逆转录病毒载体法等.

2.2.1.3 其它病毒

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)已成功地人的包皮细胞、角化上皮以及乳腺、胰导管和口腔等的上皮细胞以及牛牙乳头成纤维细胞永生, 其永生率可达 $10^{-5[11]}$. HVB E6 蛋白是最常见的转化蛋白, 通过对 hTERT 的转录调控而激活端粒酶; hTER 启动子上游 HBV 增强子的整合可顺式激活 hTER 基因转录, 这种顺式激活作用是 hTERT 基因转录端粒酶调节的原发机制^[12]. Klingelutz 等^[13]发现 HPV16 型或 18 型的 E6 和 E7 蛋白在永生人子宫及包皮细胞的过程中, M2 期前的细胞的 TRFs 随着传代逐渐缩短, 每代大约缩短 30~100 bp, 细胞一旦通过 M2 期获得永生时, TRFs 即停止缩短并开始逐渐延长. Furukawa 等(1996 年)曾报道将人乳头瘤病毒 E6 与 E7 基因通过逆转录病毒介导的方法来感染人的胰管上皮细胞, 其中有一个细胞能传到 20 代以上而达到永生, 该永生细胞保留哺乳动物细胞附着依赖的特性且无致癌性. 其它如腺病毒 E1A 基因可有效永生大鼠肾细胞^[14].

2.2.2 原癌基因

细胞内许多原癌基因可编码生长因子等蛋白质, 参与细胞增殖和分化的调控. 因此, 一些原癌基因, 如 *Myc*、*c-Jun*、*c-Ias*、*vsrc* 和 *Mdm2*, 通过基因转染可介导目的细胞的永生. 其中 *Myc* 应用较为广泛, *Myc* 被用于大鼠胚胎成纤维细胞和神经上皮细胞以及成年小鼠嗅上皮神经元前体细胞等的永生. 研究表明: TERT 启动子含有许多 *Myc* 结合部位, 它们可以介导 TERT 的转录激活. 因此, *Myc* 可诱导 TERT mRNA 的与细胞增殖和其它蛋白合成无关的快速表达, 从而激活端粒酶, 使细胞永生^[15].

2.2.3 抑癌基因 *p53* 与 *pRB* 突变体

除了端粒和端粒酶外, *p53* 和 *pRB* 途径是细胞永生过程的第 2 个重要调控点. CDKN2A 基因编码两种蛋白, 一种是 INK4A (*p16*), 另一种是 ARF(人细胞中为 *p14*, 动物细胞为 *p19*). *p16* 是细

胞周期依赖性激酶抑制剂, 通过与细胞周期素 cyclin D1 的结合特异性抑制细胞周期依赖性激酶 4(cyclin-dependent kinase, CDK4)和 6(CDK6), 进而通过调控 *pRB* 蛋白的磷酸化状态来控制细胞周期^[6]; 而 ARF 则通过与 MDM2 的相互作用, 调控 *p53* 蛋白的功能^[7]. 因此任何能影响 *p53* 和 *pRB* 蛋白功能的途径均能促使细胞跨越细胞周期阻滞从而获得不断增殖的能力. *p53* 是一种肿瘤抑制因子, 而 *p53* 突变体则能够使啮齿动物原代细胞永生化. 而对于人类细胞永生化率取决于细胞类型和(或)细胞 *p53* 功能选择性去除的效率. 第 273 位丙氨酸被置换为组氨酸的 *p53* 突变体仅能延长人成纤维细胞的寿命而不能使其永生化^[8]. 然而, 该突变体和去除第 239 位的天冬氨酸的 *p53* 突变体则可使人乳腺上皮细胞发生永生化. 在人体细胞老化调控中, INK4A 的作用比 ARF 显得更为重要, 当人成纤维细胞接近老化阶段时, INK4A 水平增加, 而 ARF 或 *p53* 水平维持不变^[9]; 乳腺上皮细胞和角质细胞中 INK4A 的上调与细胞生长阻滞直接关联^[20]; 由于突变或启动子甲基化而导致 INK4A 功能缺失时, 细胞获得增殖优势, 而随后导入的端粒酶能使细胞获得永生化^[21]; INK4A 基因缺失的人成纤维细胞能抵抗 RAS 诱导的老化^[22], 提示 INK4A 在人细胞老化调控中起关键作用. 多种人体细胞研究证明 *p53* 和 *pRB* 抑癌基因的同时失活细胞才能逃脱老化^[23]. 因此人体细胞与啮齿类动物细胞获得永生化的途径主要区别在于: 端粒酶激活、*p53* 和 *pRB* 抑癌基因失活是人体细胞逃脱老化的必要条件, 而在动物细胞中仅有 ARF-*p53* 通路失调就足以使细胞获得永恒增殖的能力.

2.2.4 放射因素

通过 X 射线、电离辐射、⁶⁰Co 等放射性因素进行细胞永生化的方法, 可使细胞周期得到延伸. 可能是由于放射因素破坏了细胞的衰老机制, 或促进了与细胞永生相关基因的表达. O'keilly 等 (1997 年)将人的 2 个皮肤角质细胞系经紫外灯照射, 发现紫外灯照射能相对延长这 2 个细胞系的存活寿命^[24].

2.3 基因转染

由于体外培养细胞自发性永生化率非常低, 而且耗时、费力. 学者们普遍采用基因转染技术将外源性永生化基因, 如病毒、原癌基因和抑癌基因突变体等, 导入目的细胞内, 以增加永生化

的发生机率. 包括电穿孔法、磷酸钙沉淀法、脂质体转染法以及逆转录病毒和腺病毒介导转染法. 电穿孔法和磷酸钙沉淀法需要大量的目的细胞, 而逆转录病毒介导转染法因为整合效率很高而只需少量目的细胞. 近年兴起的脂质体介导转染法因为效率高、操作方便等优点而被广泛应用^[25].

3 已建成的永生化细胞系

1998 年, Bodnar 等首先利用外源的 hTERT 转染人视网膜色素上皮细胞和包皮成纤维细胞, 结果细胞的端粒酶转为阳性, 分裂旺盛, 而且内源性 β -半乳糖苷酶(一种衰老标志物)的染色显著降低. 细胞的端粒保持稳定, 细胞寿命也延长了至少 20 PDs. 后续研究发现, 此类细胞可持续增殖, 至少达未转染细胞 PDs 的 2~3 倍^[26]. Wang J 等用正常的人乳腺上皮细胞经逆转录病毒介导转染法表达外源性 hTERT 后, 细胞的端粒长度稳定, 细胞的寿命也超过了未转染的对照组细胞 40 PDs, 并且无明显 β -半乳糖苷酶染色, 而且 PAI(另一种衰老标志物)表达未见增加. 同样, 人肺成纤维细胞系 IMR90 获得外源性 hTERT 后, 端粒长度增加, 达 10 kb(IMR90 为 7.5 kb), 目前已达 124 PDs, 而转染空载体细胞在 57~58 PDs 时衰老死亡. 在即将衰老的细胞也取得了类似的结果. Vaziri 等将 hTERT 导入衰老前 10~15 PDs 的正常新生儿成纤维细胞株(BJ)后, 细胞寿命延长, 已达 124 PDs, 较对照组长 28 PDs. 另外, hTERT 可使人类染色体失衡综合征(human chromosome instability syndromes) 和/或早衰患者的正常皮肤成纤维细胞永生化. 随后, 国内外学者先后利用转染端粒酶基因 CD8+T 细胞系人的乳腺上皮细胞长寿细胞系、人脐静脉血管内皮细胞系及前列腺上皮细胞系. 在动物方面, 也分别建立了牛毛细管内皮细胞系、猪肝细胞系和猪脐静脉血管内皮细胞系等^[27].

体外培养的哺乳动物细胞一般比人细胞易于永生化, 主要原因在于两种细胞端粒的长度和端粒酶的调控机制存在差异. 大部分啮齿类动物细胞中端粒酶是持续性表达的, 而人体细胞一般在胚胎发育成熟后端粒酶的表达处于抑制状态, 因此通常成年人体细胞中端粒酶的活性难于检测到^[28]. 此外, 啮齿类动物细胞的端粒长度约 40~60 kb, 而人的端粒长度一般为 10 kb^[29]. 动物细胞在增殖分裂时是以相对较长的端粒作为前提的, 而且端粒长度不会随着细胞分裂明显缩短. 端粒酶活性

缺失的雌性小鼠细胞还能继续分裂 125 代, 雄性小鼠细胞甚至能继续分裂 310 代^[30]. 这些研究结果解释了为什么体外培养的动物细胞较人体细胞易于永生, 且细胞转化不会由于端粒的缩短和端粒酶的缺失明显受阻抑的现象. 基于端粒较长以及端粒酶活性持续性地存在这两种主要的原因, 啮齿类动物细胞的端粒以及端粒酶在调控细胞生长增殖以及永生等过程中与人体细胞存在明显差异. 因此在进行端粒或端粒酶调控机制等方面的研究时, 最好选择人体细胞作为研究对象.

4 永生细胞的检测方法

经人工转染的永生细胞能无限增殖生长, 可长期传代, 但并不改变细胞本身的特性. 目前对永生细胞的鉴定方法主要有以下几种.

4.1 检测外源基因在细胞中的整合及表达情况

Southern-blot 分析外源基因在基因组中的整合情况, Northern-blot 分析外源基因是否能进行转录然后用免疫细胞化学染色或 Western-blot 等方法对外源基因的表达情况进行鉴定. 除此之外, 还可以通过对那些与外源基因相连锁的基因进行鉴定来判断该外源基因的是否发挥了其应有的生物学活性.

4.2 端粒酶活性的检测

永生细胞除了能在体外长期传代外, 还应具有很高的端粒酶活性. 用端粒酶重复扩增 PCR (TRAP-PCR) 来检测永生细胞的端粒酶活性. 野生型细胞在体外培养端粒酶活性逐渐降低, 而永生细胞在体外长期培养, 其端粒酶活性应保持在一个较高的水平.

4.3 永生细胞表面抗原的检测

每种细胞都有其特异的表面抗原, 永生细胞应具有该细胞特异的表面抗原标记, 可用免疫细胞化学技术(如间接法、PAPL、SAB、SPA)对永生细胞的表面抗原进行鉴定.

4.4 永生细胞功能的检测

首先对于那些有分化潜能的细胞进行体外诱导分化, 观察它们的分化能力; 然后可利用细胞移植、制作嵌合体等方法来检测永生细胞在体内组织中是否具有原有细胞相应的功能. 另外, 永生细胞不同于癌细胞, 它没有致癌性, 可用皮下注射方法来检测所获得的永生细胞是否有致瘤性.

5 永生细胞目前存在的问题及发展前景

将外源性病毒、原癌基因等导入目的细胞, 其基因整合是随机性的, 其表达产物可干扰细胞内生理途径, 发生非预期的改变, 如失去分化特征和细胞周期检查点的控制. 同时, 通过病毒、原癌基因等转染获得的是转化细胞而非正常细胞, 其表型、核型等可发生改变, 如血清依赖性降低, 接触抑制丧失等. 而且, 目前所建立的永生细胞株, 并非全部是“无限增殖”, 有的仅渡过了 M1 期而延长了细胞寿命. 相对于传统的永生基因, 即病毒、原癌基因等, 端粒酶转染建立的永生细胞是正常细胞, 而非转化细胞, 这些细胞依然保持了正常细胞的生理特性. 研究表明, 这些细胞具有正常的生长速率, 正常的核型, 还有生长锚着依赖性, 接触生长抑制性, 细胞的生长还需要一定浓度的血清, 而不会像转化细胞具有致癌作用和软琼脂克隆形成能力. 同时, 细胞如果受到紫外线或者电离辐射损伤后, 细胞的 *p53* 和 *p21* 的诱导性反应与正常细胞相同. 当它们处于增殖期时, *pRB* 发生过磷酸化(hyperphosphorylation), 汇合 (con-fluent) 时则发生低磷酸化(hypophosphorylation)并下调, 而 *p16^{INK4A}* 水平则保持稳定, 符合正常细胞的特征^[31]. 另外, TERT 介导的永生细胞已通过了 M1 期和 M2 期, 同胚胎干细胞一样, 是真正意义上的永生. 而目前通过传统方法获得的转化细胞系有的仅通过了 M1 期, 寿命延长, 而非永生^[32]. 通过转染 hTERT 建立永生细胞系也有它的不足之处, 主要是并非所有类型的细胞都能通过这种方法建立永生细胞系, 甚至对于同一种细胞, 不同的研究得到不同的结果.

细胞永生虽是目前细胞生物学的热点之一, 但有许多问题尚未解决, 如细胞的衰老机制还不是很清楚, 一些细胞循环的分子机理还没有摸清以及对不同的细胞采用何种永生方法还未来定性等. 这一系列难题, 迫使我们需对细胞永生进行深入研究, 这不仅有利于我们了解细胞增殖与衰老的分子机制及保存一些重要疑难病例的样本, 而且为治疗肿瘤、控制肿瘤细胞的增殖以及器官移植的研究奠定了坚实的基础. 由于永生细胞具有可以多次传代的这一特性, 我们可以利用各种细胞永生的方法使那些传代困难、增殖慢、易衰老的细胞获得永生, 从而为我们提供更

多的细胞资源. 总之永生化细胞的应用前景广阔, 只要我们潜心研究, 逐步揭开那些未知领域, 有可能在细胞学及医学领域中获得突破性进展.

参考文献(References):

- [1] KATAKURA Y, ALAM S, SHIRAHATA S. Immortalization by gene transfection[J]. *Methods in Cell Biology*, 1998, 57: 69-91.
- [2] HABER D A. Telomeres, cancer and immortality[J]. *New England Journal of Medicine*, 1995, 332(14): 955.
- [3] HAHN W C, WEINBERG R A. Modelling the molecular circuitry of cancer[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2(5): 331-341.
- [4] BLACKBURN E H. Structure and function of telomeres[J]. *Nature*, 1991, 350(6319): 569-573.
- [5] LANGE T. Protection of mammalian telomeres[J]. *Oncogene*, 2002, 21(4): 532-540.
- [6] CEMI C. Telomeres, telomerase, and *Myc*. An update[J]. *Mutation Research-reviews in Mutation Research*, 2000, 462(1): 31-47.
- [7] GREIDER C W, BLACKBURN E H. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity[J]. *Cell*, 1987, 51(6): 887-898.
- [8] MASUTOMI K, YU E Y, KHURTS S, *et al.* Telomerase maintains telomere structure in normal human cells[J]. *Cell*, 2003, 114(2): 241-253.
- [9] PFITZENMAIER J, ELLIS W J, ARFMAN E W, *et al.* Telomerase activity in disseminated prostate cancer cells[J]. *BJU International*, 2006, 97(6): 1309-1313.
- [10] SRINIVASAN A, MCCLELLAN A J, VARTIKAR J, *et al.* The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain[J]. *Methods in Cell Biology*, 1997, 17(8): 4761-4773.
- [11] FURUKAWA T, DUGUID W P, ROSENBERG L, *et al.* Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic duct transfected by the E6 E7 gene of human papillomavirus 16[J]. *American Journal of Pathology*, 1996, 148(6): 1763-1770.
- [12] 杨娜娜, 王娟, 杜立新. 细胞永生化的研究进展[J]. *中国畜牧兽医* (YANG Na-na, WANG Juan, DU Li-xin. Research progress in the cell immortalization[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*), 2005, 32(1): 37-39.
- [13] KLINGELHUTZ A J, BARBER S A, SMITH P P, *et al.* Restoration of telomeres in human papillomavirus-immortalized human anogenital epithelial cells[J]. *Methods in Cell Biology*, 1994, 14(2): 961.
- [14] GRASSMANN R, BETCHTOLD S, BADANT I, *et al.* Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture [J]. *Journal of Virology*, 1992, 66 (7): 4570-4575.
- [15] KATAKURA Y, ALAM S, SHIRAHATA S. Immortalization by gene transfection[J]. *Methods in Cell Biology*, 1998, 57(2): 69-91.
- [16] SHARPLESS N E, RAMSEY M R, BALASUBRAMANIAN P, *et al.* The differential impact of *p16* (INK4a) or *p19* (ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2004, 23(2): 379-385.
- [17] D'AMICO M, WU K, FU M, *et al.* The inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a/alternative reading frame (INK4a/ARF) locus encoded proteins *p16^{INK4a}* and *p19^{ARF}* repress cyclin D1 transcription through distinct cis elements[J]. *Cancer Research*, 2004, 64(12): 4122-4130.
- [18] WU K J, GRANDORI C, AMACKER M, *et al.* Direct activation of TERT transcription by *c-Myc*[J]. *Nature Genetics*, 1999, 21(3): 220-224.
- [19] DICKSON M A, HAHN W C, INO Y, *et al.* Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a *p16*(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics [J]. *Methods in Cell Biology*, 2000, 20(4): 1436-1447.
- [20] FU B, QUINTERO J, BAKER C C. Keratinocyte growth conditions modulate telomerase expression, senescence, and immortalization by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes[J]. *Cancer Research*, 2003, 63(22): 7815-7824.
- [21] WRIGHT W E, SHAY J W. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology[J]. *Nature Medicine*, 2000, 6(8): 849-851.
- [22] BOND J A, HAUGHTON M F, ROWSON J M, *et al.* Control of replicative life span in human cells: barriers to clonal expansion intermediate between M1 senescence and M2 crisis[J]. *Methods in Cell Biology*, 1999, 19(4): 3103-3114.
- [23] DELIA D, FONTANELLA E, FERRARIO C, *et al.* DNA damage-induced cell-cycle phase regulation of *p53* and *p21* waf1 in normal and ATM-defective cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22(49): 7866-7869.
- [24] O'KEILLY J P, BOEH J, SHING Y, *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *International Journal of Radiation Oncology-Biology-Physics*, 1997, 72(1): 111-119.
- [25] AUSUBEL F M, BRENT R, BONGSTON R E, *et al.* *Short Protocols on Molecular Biology* (3rd ed)[M]. New York: John Wiley and Son Inc, 1995. 274-326.
- [26] BODNAR A G, OUELLETTE M, FROLKIS M, *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells[J]. *Science*, 1998, 279(5349): 349-352.
- [27] 马泉荔, 洪海霞, 张彦明, 等. 猪脐静脉血管内皮细胞永生化的初步研究[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*(MA Quan-li, HONG Hai-xia, ZHANG Yan-ming, *et al.* Study on immortalization of swine umbilicus veins endothelial cells[J]. *Journal of Northwest Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*), 2007, 35(7): 43-47.
- [28] NEWBOLD R F. The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer[J]. *Mutagenesis*, 2002, 17(6): 539-550.
- [29] RICH J N, GUO C, MCLENDON R E, *et al.* A genetically tractable model of humanglioma formation[J]. *Cancer Research*, 2001, 61(9): 3556-3560.
- [30] WENG N P, HODES R J. The role of telomerase expression and telomere length maintenance in human and mouse [J]. *Journal of Clinical Immunology*, 2000, 20(4): 257-267.
- [31] HUSCHTSCHA L I, MOORE J D, NOBLE J R, *et al.* Normal human mammary epithelial cells proliferate rapidly in the presence of elevated levels of the tumor suppressors *p53* and *p21*WAF1/CIP1 [J]. *Journal of Cell Science*, 2009, 122(16): 2989-2995.
- [32] MICHAEL K, STELLA P. *c-Myc*, Apoptosis, and disordered tissue growth[J]. *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases*, 2007, 1: 137-178.