

# 哺乳动物体细胞核移植技术研究进展<sup>\*</sup>

匡颖<sup>\*\*</sup> 徐国江 王龙 杨桦 严兰珍 费俭 王铸钢

(上海南方模式生物研究中心 上海 201203)

**摘要** 体细胞核移植技术具有十分诱人的应用前景,在农业、物种保护、医疗等领域已显示出优越性。然而核重构等核移植基础理论方面的研究还很薄弱,致使核移植技术还不很完善,克隆动物还存在着甲基化酶异常调节、不正确的印迹基因表达、X染色体异常激活等错误的表观遗传现象,移植成功率较低,在一定程度上限制了它的发展。根据近几年的研究进展,对核移植技术的应用、方法以及存在的问题作一综述。

**关键词** 核移植 核重构 表观遗传

核移植(nuclear transplantation, NT)就是将动物早期胚胎卵裂球或动物体细胞的细胞核移植到去核的(同种或异种)受精卵或成熟的卵母细胞质中,从而获得重构卵,并使其恢复细胞分裂,继续发育为与供体细胞基因型完全相同的后代的技术。核移植技术最早是为了研究细胞核的全能性和发育过程中细胞核与细胞质的相互关系而建立的,由德国胚胎学家 Spemann 于 1938 年首次提出,研究工作主要集中在两栖类和鱼类。哺乳动物的核移植研究始于 1969 年,但由于其卵母细胞较小而且是体内发育,给研究工作带来一定难度。直到 1983 年 McGrath 等<sup>[1]</sup>才建立了一套较为适用的方法并成功地获得了克隆小鼠。随着胚胎工程技术的不断进步,二十几年来核移植技术也有了飞速的发展。早期的研究主要是原核互换,或以胚胎细胞作为核供体,先后培育出了克隆羊、小鼠、猪、牛和兔等。1995 年 Campbell 用培养的已分化的胚盘细胞作为供体细胞培养出了两只羊(Megan and Moran),它标志着哺乳动物体细胞核移植的开端。1997 年英国罗斯林研究所 Wilmut 等<sup>[2]</sup>首次报道了以成体绵羊乳腺上皮细胞为核供体的克隆羊“Dolly”的诞生,证明了高度分化的体细胞仍具有全能性,在全世界掀起了轩然大波,已成为生物学发展史上一个重要的里程碑。自此各国科学家纷纷效仿,相继以

体细胞为核供体培育出了克隆小鼠、牛、山羊、猪、兔、猫等。

1999 年 Wakayama 等<sup>[3]</sup>以 ES cell 作为核供体成功地培育出了克隆小鼠,这一成功为基因敲除和基因敲入转基因动物模型的研制开辟了一条更为有效的途径。

## 1 核移植的主要方法

核移植根据其供体细胞不同又分为早期胚胎细胞核移植、胚胎干细胞核移植和已分化的体细胞核移植。从目前来看,体细胞核移植主要有两条技术路线:一是罗斯林技术<sup>[2]</sup>,一是檀香山技术<sup>[4]</sup>。与以往的技术相比,前者的突破主要在于:采用血清饥饿即休眠法,使培养细胞暂时性地退出增殖周期,使供体细胞核处于 G<sub>0</sub> 期,以保证供体细胞核与受体细胞的细胞质发育同步化;同时采用电脉冲法使供体核与去核的卵母细胞融合并激活卵母细胞。后者则在前者的基础上略有改动:直接采用 G<sub>0</sub> 期或 G<sub>1</sub> 期的体细胞为核供体,避免了血清饥饿;供体核注入后在卵母细胞质中停留一段时间(6h)再激活;利用锶离子来激活卵母细胞(化学激活)。具体来讲,核移植技术主要包括以下几个步骤:

### 1.1 受体细胞的选择与去核

MII 期卵母细胞是目前采用较多的核移植受体,只是各个实验室所采用的激活时间有所不同——移核前激活、移核时激活、移核后延迟激活,无论是早期胚胎卵裂球、ES 细胞,还是体细胞的核移植到这类受体中均获得了后代。

收稿日期:2003-06-19 修回日期:2003-11-03

<sup>\*</sup>国家“十五”攻关重点项目

<sup>\*\*</sup>电子信箱:kuangying01@yahoo.com.cn

卵母细胞去核主要有机械去核和化学去核两种方法。较早的机械去核方法是采用微细玻璃针在显微镜下进行的,包括盲吸法和荧光染料染色后紫外光下去核。1998年Wakayama等<sup>[4]</sup>首次采用piezoelectric microinjection (PEM) 来去核,由于其由高频震动控制,较易穿过透明带,对受精卵的损伤较小,大大提高了去核的成功率,是目前采用较多的一种方法;与机械去核相比,化学去核较为简单,便于掌握,早期主要采用etoposide (亚乙基葡萄糖吡喃糖)和放线菌酮处理,成功率较低。最近Gasparini等<sup>[5]</sup>采用脱羧秋水酰胺成功地完成了小鼠卵母细胞的去核,这种方法是否适用于其它种类还需要进一步的实验证据。

### 1.2 供体细胞的选择与移植

目前用于核供体的主要有卵丘细胞、睾丸支柱细胞、精子细胞、脑细胞、胎儿或成体成纤维细胞、乳腺细胞、胚胎干细胞(ES细胞)等。供体与受体细胞的细胞周期发育同步化是影响核移植成败的一个重要因素,早期的研究认为供体细胞处于G<sub>0</sub>期<sup>[4]</sup>是体细胞核移植成功所必需的,并指出可通过选择细胞类型或人工诱导两种方法来获得G<sub>0</sub>期细胞。然而近来发现未经休眠诱导的G<sub>1</sub>或G<sub>2</sub>甚至M期供体细胞的核移植也均获得了成功<sup>[6]</sup>。与此同时,研究还发现在小鼠的核移植中供体细胞的类型和基因型对移植效率也有较大影响<sup>[7]</sup>。

供体核的移植主要有融合和注射两种方法,融合包括化学融合、仙台病毒融合与电融合,目前采用较多的是电融合。注射包括微细玻璃针和piezoelectric microinjection两种,均有成功的例子。

### 1.3 卵母细胞的激活

以成熟卵母细胞为受体的核移植过程中缺少了受精这一步骤,故必须对卵母细胞进行人工激活以促使其进一步发育。目前应用较多的激活方法有电激活、乙醇、离子霉素、钙离子载体A23187、氯化锶、三磷酸酰肌醇(IP<sub>3</sub>)、精子提取物等,这些方法经常是组合使用或是与蛋白合成抑制剂(放线菌酮、嘌呤霉素),丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶抑制剂DMAP联合使用。然而研究发现所有这些方法都只能引起卵母细胞内的钙浓度升高,并不能形成钙震动,这可能是核移植效率低的一个原因。

## 2 核移植技术的应用前景

作为生物学发展史上最伟大的成就之一,核移

植技术特别是体细胞核移植技术具有十分广阔的应用前景,随着该技术的不断完善必将带来生物学、医学的一场革命,其在畜牧业、物种保护、医疗卫生等领域有着不可估量的作用。

### 2.1 畜牧业

采用核移植技术可加速育种的进程,在短时间内有效地扩大种群的数量,保持种群的性状,避免了自然交配所带来的优良性状的分离和减弱。目前美国市场上已有克隆牛出售。

同时核移植与基因打靶相结合,可以对物种的基因进行定点修饰,产生具有优良性状的新品种(如提高繁殖力、增加产奶量、增强抗病能力等)。同时在核移植前可以对阳性克隆进行性别选择,减少了盲目性,一旦产生转基因后代,其遗传背景清楚,遗传稳定性好,不需选配,仅一代就可建立转基因群体,节约了时间和费用。

### 2.2 物种保护

体细胞核移植在拯救濒危物种方面也显现出优越性,如Wells等<sup>[8]</sup>利用一只惟一存活的恩德比利牛(Enderby Island cow)的腹膜壁层粒细胞成功地克隆出了2只小牛。考虑到濒危动物的特殊性,经常会用到种间核移植,自Dominko(1991)等首次报道了种间核移植以来,已有多篇报道,如将虎的细胞核移植到猫的卵母细胞质中;马的细胞核移植到牛的卵母细胞质;水牛的细胞核移植到家牛等等,到目前为止,种间核移植只有一例成功的例子,Lanza等<sup>[9]</sup>将一头即将灭绝的牛(*Bos gaurns*)的体细胞核移入家牛的去核卵母细胞中,得到了一头小牛,遗憾的是牛仔出生后48h死亡。我国科学家也正在进行大熊猫与家兔之间的异种核移植研究,并取得了一定的进展。

### 2.3 医疗卫生

2.3.1 制药 乳腺生物反应器是目前生产药用人体蛋白的一个重要手段,近年来核移植法制作乳腺生物反应器已成为研究热点,给转基因制药带来了无限生机。主要表现在以下两个方面:已有转基因动物的保持,避免了生殖周期的限制,以及有性生殖所带来的遗传性状分离。如PPL公司曾培育出一只可高效表达人的I-抗胰蛋白酶(I-AT)的转基因羊,但该品系羊第二代的蛋白表达效率却较低,仅为始祖羊奶的1/10。利用核移植技术则能很好地解决这一问题。其次,基因打靶与核移植技术相结合也培育出了转基因家畜,McCreath等<sup>[10]</sup>对绵羊胎儿成纤维细胞进行基因打靶,以阳性克隆为核

供体进行核移植,培育出了可分泌 AAT(抗胰蛋白酶)的绵羊。目前通过核移植方法已获得的转基因家畜主要有表达人凝血因子 IX 的转基因绵羊,分泌抗凝血酶 III 的转基因山羊等。

2.3.2 基因打靶与核移植技术相结合,建立各种人类疾病的动物模型,用于医学和药学的研究 由于小鼠生殖周期短,易于繁殖,且多数组织和器官与人的相似,其已成为各国学者首选的人类疾病动物模型。核移植法所获得的基因突变体小鼠必将成为研究某些遗传病、肿瘤等的重要手段。

值得注意的是,某些情况下转基因小鼠的病变并不能完全等同于人体,而且某些在小鼠身上非常有效的药,对人体却无效。家畜如猪、羊、牛等无论在生理学还是在解剖学上比小鼠都更接近于人类,近来位于 DeForest 的一家克隆和生物技术公司 Infigen 正在与 Duke 大学医学中心的科学家合作研制克隆猪,用于一种罕见的儿童神经退化性疾病(共济失调)毛细血管扩张症(ataxia telangiectasia)的研究。

2.3.3 胚胎干细胞技术与核移植技术相结合,培育出细胞、组织或器官用于医疗-治疗性克隆 应用病人正常的或经过基因修饰的体细胞作为核供体,通过核移植技术获得重构卵,使其发育至囊胚,然后从囊胚中分离培养出 ES 细胞,通过体外定向诱导分化产生所需要的细胞、组织或器官,再移植到病人体内。以修复或替代受损伤的组织或器官,避免了免疫排斥反应。这种方法在治疗一些退行性疾病如帕金森症、糖尿病、肌营养不良、白血病等方面有着十分诱人的前景。这一技术在小鼠身上已获成功<sup>[11]</sup>,科学家们将患有免疫缺陷小鼠  $Rag2^{-/-}$  的上皮细胞作为核供体通过核移植获得 ES 细胞,在体外进行同源重组并筛选出  $Rag2^{+/+}$  的 ES 细胞,修复过的 ES 细胞经体外诱导产生造血细胞前体,这些造血细胞前体移植到免疫缺陷小鼠体内 3~4 周后监测到了成熟的淋巴细胞、髓样细胞以及免疫球蛋白。

2.3.4 异种器官移植 异种器官移植是治疗晚期器官坏死疾病的首选方法,猪的心、肝、肾等器官在形态、大小等方面与人的极为相似,无论从生理学、生物学、还是从经济、伦理学方面考虑,猪都是最理想的器官来源。然而人在长期的进化过程中产生了针对猪器官的超级免疫排斥反应,-1,3 半乳糖苷酶是引起这一免疫排斥反应的主要原因。近年来培育 -1,3 半乳糖苷酶基因敲除猪愈来愈引

起各国学者的重视,已有几个实验室相继获得了剔除 -1,3 半乳糖苷酶基因的猪细胞。值得欣慰的是 Lai 等(2002)和 Dai 等(2002)分别利用核移植技术获得了成功剔除 -1,3 半乳糖苷酶基因的杂合子猪。在此基础上,他们利用剔除 -1,3 半乳糖苷酶基因的纯合子细胞又获得了 4 只 -1,3 半乳糖苷酶基因双敲除的猪<sup>[12]</sup>,为异种器官移植打下了坚实的基础。

### 3 存在的问题(影响核移植成功率的因素)

自 1997 年首次报道体细胞核移植成功,数年来研究取得了一定的进展,但仍没有重大突破。核移植成功率较低( $<3\%$ ),即使是出生的个体也经常出现一些异常,如胎盘过大、胎儿过大及呼吸系统疾病等,这些现象在小鼠和牛中均有发现。研究发现,在以卵丘细胞为供体的核移植小鼠胚胎中,90%的胚胎均具有正常的染色体结构,基因组是正常的,故推测大部分的克隆胚胎异常都是由于错误的表观遗传重构(epigenetic reprogram)造成的。近年来,越来越多的实验证明了这一理论<sup>[13]</sup>。错误的表观遗传重构主要表现在以下几个方面:

#### 3.1 DNA 甲基化

在小鼠的发育过程中伴随着两轮去甲基化和再甲基化过程,一次发生在生殖细胞发生过程中;一次发生在受精后。受精后的去甲基化时间与胚胎基因组的转录激活相一致,哺乳动物中胚胎基因组的转录激活时间随种类不同。在所有克隆小鼠的 CpG 岛中都发现过不正确的甲基化,而且甲基化的错误每只克隆鼠各不相同。据推测在克隆动物每个组织中,大约每 1000 个等位基因中就有 2~5 个基因甲基化异常<sup>[14]</sup>。

#### 3.2 基因印迹(imprint gene)

基因印迹现象在哺乳动物的发育过程中普遍存在,它是指基因的表达与否取决于它们是在父源染色体上还是母源染色体上。不正确的印迹基因表达是引起核移植失败的重要原因<sup>[15]</sup>,以卵丘细胞为供体的克隆小鼠中印迹基因的正确表达要高于以 ES 细胞为供体的克隆小鼠,而且研究发现 ES 细胞中印迹基因表达不稳定,正是由于 ES 细胞在体外培养过程中这种表观遗传的不稳定性,导致 ES 细胞核移植效率仍较低( $<3\%$ )。在 Eggan 等<sup>[16]</sup>的研究中他分别采用了近交和杂交鼠的 ES 细胞作为供体核进行核移植,近交鼠 129/Sv 的 ES 细胞的克隆小鼠出生后不久就死亡

了,而杂交鼠 C57BL/6 × 129/Sv F1 的 ES 细胞克隆小鼠中,所有出生小鼠均长至成年,这说明基因的异质性在某种程度上可掩盖表现遗传的错误。

### 3.3 X 染色体失活

在核移植过程中负责调节 X 染色体失活/激活的基因发生了重构,X 染色体的激活是随机的,失活染色体的异常激活,导致与 X 染色体相关基因的异常表达,从而影响了克隆胚胎的正常发育<sup>[17]</sup>。

### 3.4 端粒与端粒酶

端粒是染色体上一个特殊的结构,随着体细胞的分裂,端粒的长度变短,端粒酶则起到抑制端粒变短的作用。对于克隆动物端粒的长度各实验室报道的结果不同,世界上首个克隆动物“多莉”的供体核来自一只 6 岁母羊的乳腺细胞,其端粒的长度比正常的短 20 %<sup>[18]</sup>;而后来的克隆牛与克隆鼠端粒的长度却并没有缩短,有些甚至加长<sup>[19]</sup>。这说明端粒的长度是可以恢复的,尽管详细的机制我们还不清楚。研究还发现克隆牛端粒酶的活性在胚胎植入前的发育过程中逐渐升高,到囊胚期达到最高,而正常牛胚胎端粒酶的活性则在 8 ~ 16 细胞期达到最高。端粒的恢复程度可能与供体的细胞类型有关,分化程度低的细胞端粒长度易恢复,而分化程度高的则较难。

核移植还处在它的婴儿期,方法上的突破有赖于基础理论的研究,核移植是为了研究发育过程中的核质关系而建立的,然而在核移植技术日渐成熟的今天,这种核质关系仍未完全清楚。高度分化的体细胞是如何在卵母细胞中去分化的,核重构的分子机制,表现遗传重构的机制等都是我们需要进一步研究的问题。

### 参考文献

- [ 1 ] McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 1983, 220 (4603): 1300 ~ 1302
- [ 2 ] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385 (6619): 810 ~ 813
- [ 3 ] Wakayama T, Rodriguez I, Perry A C F, et al. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (26): 14984 ~ 14989
- [ 4 ] Wakayama T, Perry A C F, Zocotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394 (6691): 369 ~ 374
- [ 5 ] Gasparini B, Gao S, Ainslie A, et al. Cloned mice derived from embryonic stem cell karyoplasts and activated cytoplasts prepared by induced enucleation. *Biol Reprod*, 2003, 68 (4): 1259 ~ 1266
- [ 6 ] Zhou Q, Jouneau A, Brochard V, et al. Developmental potential of mouse embryos reconstructed from metaphase embryonic stem cell nuclei. *Biol Reprod*, 2001, 65 (2): 412 ~ 419
- [ 7 ] Inoue K, Ogonuki N, Mochida K, et al. Effects of donor cell type and genotype on the efficiency of mouse somatic cell cloning. *Biol Reprod*, 2003, 69 (4): 1394 ~ 1400
- [ 8 ] Wells D N, Misica P M, Tervit H R, et al. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev*, 1998, 10 (4): 369 ~ 378
- [ 9 ] Lanza R P, Cibelli J B, Diaz F, et al. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, 2000, 2 (2): 279 ~ 290
- [ 10 ] McCreath K J, Howcroft J, Campbell K, et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, 405 (6790): 1066 ~ 1069
- [ 11 ] Rideout W M 3rd, Hochedlinger K, Kyba M, et al. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*, 2002, 109 (1): 17 ~ 27
- [ 12 ] Phelps C J, Koike C, Vaught T D, et al. Production of 1, 3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003, 299 (5605): 411 ~ 414
- [ 13 ] Fairburn H R, Young L E, Hendrich B D. Epigenetic reprogramming: how now, cloned cow? *Curr Biol*, 2002, 12 (2): R68 ~ R70
- [ 14 ] Shiota K, Yanagimachi R. Epigenetic by DNA methylation for development of normal and clone animals. *Differentiation*, 2002, 69 (4 ~ 5): 162 ~ 166
- [ 15 ] Solter D. Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat Rev Genet*, 2000, 1 (3): 199 ~ 207
- [ 16 ] Eggan K, Akutsu H, Loring J, et al. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (11): 6209 ~ 6214
- [ 17 ] Xue F, Tian C, Du F L, et al. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet*, 2002, 31 (2): 216 ~ 220
- [ 18 ] Shiels P G, Kind A J, Campbell K H, et al. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*, 1999, 399 (6734): 316 ~ 317
- [ 17 ] Tian X C, Xu J, Yang X. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat Genet*, 2000, 26 (3): 272 ~ 273

## Progress on Somatic Cell Nuclear Transfer

Kuang Ying Xu Guojiang Wang Long Yang Hua Yan Lanzhen Fei Jian Wang Zhugang

(Shanghai Research Center for Model Organisms Shanghai 201203)

**Abstract** Somatic cell nuclear transfer offers exciting opportunities in many areas and brings tremendous changes to agriculture, conservation and therapeutics. However, the fundamental research of nuclear transfer including nuclear reprogramming is not fully understood. Some inappropriate epigenetic modifications have been reported in the clone animals, including abnormal regulation of DNA methyltransferase expression, improper expression of imprinted genes, reactivation of the inactive X chromosome. The low efficiency of nuclear transfer hinders the further progress in some degree. we describe some recent advances in applications, methods and main problems limiting efficiency.

**Key words** Nuclear transfer Embryo reconstruction Epigenetic reprogramming

## 科学出版社推荐新书

欢迎访问生命科学图书网站 <http://www.lifescience.com.cn>

### 结构生物学与药学研究

杨铭 主编, 2003 年 11 月出版, 定价: 48.00 元

结构生物学是以生物大分子三维结构及其运动性的研究为基础, 定量阐明生命现象的学科。药物的合理设计、新药的发现都以结构生物学的研究成果为基础。本书概述了结构生物学的研究现状和发展趋势, 从分子水平上探讨主要生物大分子的三维结构与生物功能的关系及药学研究前沿领域中的一些重要科学问题, 最后介绍了结构生物学研究中的主要方法。

### 糖生物学基础(中译版) *Essentials of Glycobiology*

Ajit Varki 等编著, 张树政 朱正美 王克夷等译, 定价: 82.00 元

本书是冷泉港实验室《糖生物学基础》一书的中译本, 论述了糖生物学的所有核心内容。本书是糖生物学的理想读物, 是试图描述聚糖生物发生和功能的第一部教科书。适于高等院校生命科学和医药科学专业师生。

### 实验室生物安全手册

马文丽 郑文岭主编, 2003 年 11 月出版, 定价: 24.00 元

本书综述了生物安全 1~4 级 (biological safety level, BSL) 标准和特殊微生物学操作规程、安全设备和设施, 目的是帮助实验室将研究生物病原体的过程严格控制在生物安全标准范围内有序进行。

### 鲢、鳙与藻类水华控制

谢平著, 2003 年 11 月出版, 定价: 38.00 元

本书是一部论述滤食性鱼类——鲢、鳙与藻类水华控制的专著。作者从鲢、鳙的自然分布和向国外的引种历史, 鲢、鳙养殖的起源及在中国池塘混养系统中的地位入手, 然后过渡到关于用鲢、鳙控制池塘养殖系统、富营养水库及小型人工湖中的藻类以改善水质的国内外的实验研究, 并详细地介绍了在武汉东湖用鲢、鳙控制蓝藻水华的成功实践, 仔细地分析了国内外关于鲢、鳙的食性及鲢、鳙对藻类消化机制方面的研究。

邮购地址: 100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社科学分社

联系人: 阮芯, 联系电话: 010-64034622 (带传真)