

不同处理牛卵丘/颗粒细胞作为核供体对克隆胚发育的影响

姚雅馨^{1,2}, 李向臣², 张 勇¹, 关伟军^{2*}, 马月辉^{2*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘 要: 本研究利用 TSA (Trichostatin A)、ROS (Roscovitine)、血清饥饿和接触抑制方法处理牛卵丘/颗粒细胞, 检测处理前后细胞乙酰化水平、周期分布及其对重组胚发育能力的影响, 为提高核移植效率提供理论基础。分别采用上述方法处理牛卵丘/颗粒细胞, 首先对处理的细胞形态及活率进行观察, 并利用流式分选技术检测处理细胞的周期分布, 再通过间接免疫荧光法检测经上述不同处理前后细胞乙酰化水平变化, 最后以上述处理细胞作为核供体构建重组胚, 比较重组胚发育水平的不同。试验结果显示, 经上述处理的卵丘/颗粒细胞形态良好, 活率均保持在 94% 以上; TSA 处理卵丘/颗粒细胞后, 其乙酰化水平较对照组和其他处理组明显增加 ($P < 0.05$), 经 ROS 处理的卵丘/颗粒细胞乙酰化表达水平同样高于对照组 ($P < 0.05$), 但仍低于 TSA 处理组 ($P < 0.05$), 但经血清饥饿处理的卵丘/颗粒细胞乙酰化水平较对照组明显降低 ($P < 0.05$); 利用 TSA 处理卵丘/颗粒细胞 24 h 后, 细胞被明显抑制在 G_0/G_1 期, 且较其他处理组的抑制现象更加明显 ($P < 0.05$); 并且, 经 TSA 处理后的卵丘/颗粒细胞充当供体细胞, 其卵裂率和囊胚率较对照组明显增加 ($P < 0.01$), (85.2 ± 3.4)% vs (68.6 ± 6.7)%; (30.2 ± 5.7)% vs (10.4 ± 8.3)%。经 TSA 处理的牛卵丘/颗粒细胞, 与其他处理组相比, 乙酰化水平较高, 细胞形态良好, 细胞周期被明显抑制在 G_0/G_1 期, 且获得了较高的卵裂率和囊胚率, 作为供体细胞的处理方式较为适合。

关键词: 牛; 卵丘/颗粒细胞; 乙酰化; 克隆胚

中图分类号: S823; S814.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)05-0645-07

Effect of Different Treatments with Bovine Cumulus Cells as Donor Cells on Cloning Embryos

YAO Ya-xin^{1,2}, LI Xiang-chen², ZHANG Yong¹, GUAN Wei-jun^{2*}, MA Yue-hui^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University,

Lanzhou 730070, China; 2. Institute of Animal Science,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: In this study, the cumulus cells were dealt with Trichostatin A (TSA), Roscovitine (ROS), serum starvation and contact inhibition, we detect the change of level of acetylation, the cell cycle, and the development of cloning embryos after the treatments, which provided academic foundation for raising efficiency of cloning. Using the above methods, the cell morphology change and the motility rate were observed, then the levels of acetylation and cell cycle were detected through the indirect immunofluorescence and the flow cytometry respectively, and the motility rate were more than 94% all. TSA obviously enhanced the level of acetylation ($P < 0.05$); ROS

收稿日期: 2008-10-06

基金项目: “863” 高新技术发展计划 (2006AA10Z198); 国家自然科技平台建设项目 (2005DKA21101)

作者简介: 姚雅馨 (1983-), 女, 辽宁锦州人, 硕士, 主要从事动物生殖生理与胚胎工程研究, E-mail: yaoyaxin0602@126.com; 李向臣 (1973-),

男, 内蒙古通辽人, 博士, 主要从事动物胚胎工程与发育生物学研究, E-mail: xcli973@gmail.com

* 通讯作者: 关伟军 (1966-), 男, 黑龙江人, 教授, 博导, 主要从事动物遗传资源研究, Tel: 010-62815992, E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn; 马

月辉 (1964-), 男, 吉林伊通人, 研究员, 博导, 主要从事动物遗传学研究, Tel: 010-62813463, E-mail: yuehui.ma@263.net

also made a high level of acetylation, but lower than the TSA treatment ($P < 0.05$), the serum starvation treatment was lower than the control. The cumulus cells after treatments had good morphology, TSA made the cell cycle stop at the G_0/G_1 and the highest cleavage and blastula rate ($P < 0.01$, $(85.2 \pm 3.4)\%$ vs $(68.6 \pm 6.7)\%$; $(30.2 \pm 5.7)\%$ vs $(10.4 \pm 8.3)\%$). These results indicated that the cumulus cells treated with TSA not only had a high level of acetylation and better morphology change compared with the other groups, but also had the highest percent of blastula, so it was more suitable method to deal with the donor cells.

Key words: bovine; cumulus cells; acetylation; cloning embryos

研究发现^[1], 供体细胞核移入去核的卵母细胞后, 必定要经过表观遗传修饰的重编程过程, 回到胚胎开始发育的全能状态。目前认为, 供体核移入卵母细胞后, 其重编程过程的不完全是导致克隆效率低的主要原因^[2]。核的重编程过程不仅仅是供体细胞在移入卵母细胞后所体现的, 不同的供体细胞其重新程序化的潜力也不尽相同^[3]。其中, 卵丘/颗粒细胞和耳成纤维细胞作为核供体应用的最多, 并且所获得的核移植后代较多。将成纤维细胞和卵丘/颗粒细胞的核移植效率做比较, 卵丘/颗粒细胞核移植胚的发育率高于成纤维或其他类型的细胞^[4]。

细胞周期对核移植成功率的影响至关重要, 常以 G_0/G_1 期细胞作为供体细胞, 这种细胞较易于重编程^[5]。通常, 获得 G_0/G_1 期细胞常用的方法是血清饥饿和接触抑制, 更为重要的是应用这 2 种方法已成功获得家畜体细胞的核移植后代^[6]。但是, 血清饥饿和接触抑制所诱导的细胞同步化处理是否是克隆成功的必要条件, 并无定论。研究表明, 细胞在重编程过程中高的乙酰化水平以及低的甲基化水平有利于重编程过程的进行, 血清饥饿本身可以降低体细胞的甲基化水平, 但是对于乙酰化水平的影响尚不明确^[7]。高乙酰化能够促进转录的完成^[8], 而血清饥饿和接触抑制是否通过提高乙酰化水平来刺激转录激活从而完成重编程的, 仍需要进一步研究。

Roscovitine (ROS) 是有丝分裂促进因子 (MPF) 的特异性抑制剂^[9], 能选择性抑制 *cdc2*、*cdk2* 和 *cdk5* 等细胞周期依赖性激酶的活性, 并且, 使用 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ROS 处理 24 h 能够有效地将人成纤维细胞抑制在 G_0/G_1 期^[10]。但是, 利用 ROS 处理供体细胞进行核移植的研究尚不多见, 其对供体细胞重编程过程的影响也罕见报道。研究表明通过 Trichostatin A (TSA) 一组蛋白去乙酰化酶抑制剂来提高供体细胞的重编程能力^[11-13]。在体细胞克隆胚胎中, 供体细胞的组蛋白乙酰化过程是不完全

的, 而 TSA 的加入恰好能够弥补这一缺陷^[13]。供体细胞通过 TSA 处理后, 细胞增殖明显受到抑制, S 期细胞数明显减少, 细胞被抑制在 G_0/G_1 期^[10], 然而, 与其他处理周期的方法比较有无优势还需进一步探索。

本研究利用 TSA、ROS、血清饥饿和接触抑制等方法处理牛卵丘/颗粒细胞, 检测处理前后细胞乙酰化水平、周期分布及其对重构胚发育水平的影响, 为牛卵丘/颗粒细胞作为供体细胞进入卵母细胞后的重编程并最终为克隆效率的提高提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

文中所涉及到的试剂和药品除特殊说明外均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 卵母细胞的体外成熟

采自屠宰场的新鲜牛卵巢, 放入灭菌生理盐水中, 保持温度在 $30 \sim 33 \text{ }^\circ\text{C}$, 4 h 内运回实验室。采集卵泡液, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释, 在体式显微镜下用吸管挑选包裹 3 层以上、致密、胞质均匀的卵丘/卵母细胞复合体 (COCs)。用平衡 2 h 以上的卵母细胞成熟液 ($\text{M199 } 9.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, Hepes $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 丙酮酸钠 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, L-谷氨酰胺 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 尿促性素 $0.075 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 雌二醇 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 15% 胎牛血清 (FBS)) 洗 2 次后用于成熟培养, 培养条件为 $39 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 , 饱和湿度。成熟培养 22 h 后, 将 COCs 转入 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的透明质酸酶消化, 并用吸管反复吹打去掉卵母细胞表面的卵丘/颗粒细胞, 检查卵母细胞成熟率。

1.3 卵丘/颗粒细胞系的建立

将成熟后的 COCs 在 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的透明质酸酶中消化 2 min。向含有卵丘/颗粒细胞的透明质酸酶中加入 DMEM + 10% FBS 的全细胞培养液终止消化, 将含有卵丘/颗粒细胞的全 DMEM 培养液

移入离心管中,以 $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃上清,重新加入全 DMEM 培养液吹打均匀,后接种到 24 孔板,细胞密度为 1.0×10^5 /孔,条件为 $37\ ^\circ\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$, 饱和湿度的培养箱中贴壁培养。当细胞生长达到 80% 汇合时,吸出培养液,用无菌 PBS 清洗 2 遍后,加入 $100\ \mu\text{L}\ 0.25\%$ 胰蛋白酶 + 0.01% EDTA 液, $37\ ^\circ\text{C}$ 消化 2~3 min,立即加入 2 mL DMEM + 10% FBS 终止消化。后按照 1:2 传代。

1.4 试验设计

1.4.1 细胞形态与活率检测 TSA 和 ROS 处理组:将细胞以 1.0×10^4 密度接种于 96 孔板,用含 10% FBS 的 DMEM 全培养基培养至汇合率达 80% ,此时细胞处于对数生长期,经 PBS 清洗后,用 $10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA 和 $15\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 分别处理卵丘/颗粒细胞各 3 孔,于 24 h 后观察形态,统计活率;血清饥饿组:选取细胞汇合度达到 80% ,在含 0.5% FBS DMEM 液内饥饿 48 h 的卵丘/颗粒细胞^[14],观察形态,统计活率;接触抑制组:选取汇合率达 100% 的卵丘/颗粒细胞,含 10% FBS DMEM 培养基继续培养 48 h^[15],观察形态,统计活率;以对数生长期细胞作为对照组;利用 Trypan Blue 染色法统计细胞活率^[16]。

1.4.2 乙酰化水平检测 采用间接免疫荧光染色法进行乙酰化水平检测^[17]。一抗:兔抗羊组蛋白 H4K12 多克隆 IgG;二抗:FITC 标记羊抗兔 IgG,均购自 Santa Cruz。每组处理各取 3 孔,重复 3 次以上。

1.4.3 周期检测 使用流式细胞分选技术检测经不同处理的卵丘/颗粒细胞的周期分布。

1.4.4 克隆胚发育水平检测 采用胞质内注射的方法,选择经不同处理的卵丘/颗粒细胞进行核移植,构建重组胚。

1.5 重组胚的培养

构建好的重组胚用 $5\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 离子霉素激活 5 min 后,移入含 $2\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-DMAP 培养液内再激活 4 h,激活后的重组胚用培养液清洗 3 次后,放入 4 孔培养板(Nunc)内培养,每 48 h 半量换液 1 次,96 h 后加入 10% FBS 继续培养,培养 48 h 后统计卵裂率,7~8 d 后统计发育的囊胚率。

1.6 数据统计

荧光强度的分析应用 Confocal 荧光分析软件,使用了 H4K12 和 PI 的荧光强度的对比值^[18]。荧

光强度的数据分析采用 SPSS 13.0 软件进行 t 检验。所有试验重复 3 次,试验数据用 χ^2 进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 不同处理方法对卵丘/颗粒细胞形态与活率的影响

卵丘/颗粒细胞经血清饥饿和 ROS 处理后,细胞形态与对照组相比,无明显变化(图 1A, 1C, 1D);而经 $10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TSA 处理后,细胞形态存在变扁平趋势,核区清晰可见,但形态依旧良好(图 1B);而接触抑制后的卵丘/颗粒细胞之间界限不明显,部分失去原有长条梭形的特点,趋于铺路石形态(图 1E)。经 Trypan Blue 染色法统计细胞活率,发现经不同处理后的卵丘/颗粒细胞活率均保持在 94% 以上,与对照组之间差异不显著($P > 0.05$)。

2.2 TSA、ROS、血清饥饿与接触抑制对卵丘/颗粒细胞乙酰化水平的影响

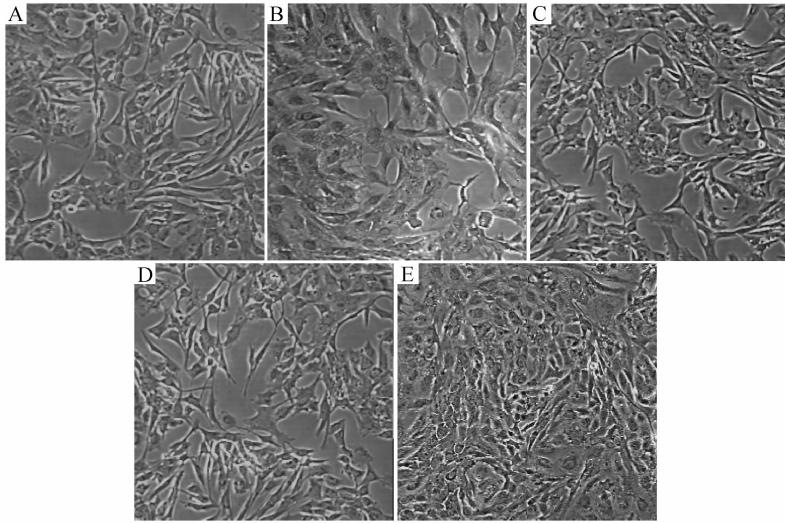
分别利用 $10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA、 $15\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS、血清饥饿、接触抑制处理卵丘/颗粒细胞在激光共聚焦显微镜下观察和记录荧光图像(图 2),观察到经 TSA 处理后的细胞表达强烈的荧光,说明其乙酰化水平较对照组和其他处理组明显增高,为进一步说明问题,通过 Confocal 分析软件对荧光强度进行定量分析,确定不同方法处理的卵丘/颗粒细胞乙酰化荧光定量分析图式(图 3)。结合图 2 和图 3,共同分析得出结论:卵丘/颗粒细胞经 $10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA 处理后,乙酰化水平明显升高($P < 0.05$);经 ROS 处理后乙酰化水平较对照组也有升高趋势,但仍低于 TSA 处理组($P < 0.05$);接触抑制处理组的乙酰化水平明显高于血清饥饿组($P < 0.05$),但是仍然低于 TSA 处理组。血清饥饿处理组的乙酰化水平低于对照组($P < 0.05$)。

2.3 不同处理方法对卵丘/颗粒细胞周期的影响

利用 $10\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TSA 处理卵丘/颗粒细胞 24 h 后见表 1,与对照组相比,细胞增殖明显受到抑制($P < 0.05$),S 期细胞数明显减少,细胞被抑制在 G_0/G_1 期(表 1),其余处理组的 G_0/G_1 期细胞也较对照组明显增多($P < 0.05$),但没有 TSA 处理组明显。

2.4 不同处理方法对克隆胚发育水平的影响

卵丘/颗粒细胞经过不同处理后,其克隆胚的卵裂率和囊胚率见表 2。与对照组相比,经 TSA 处理



A. 未经处理的对数生长期卵丘/颗粒细胞; B. 经 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA 处理 24 h 的卵丘/颗粒细胞; C. 经 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS 处理 24 h 的卵丘/颗粒细胞; D. 血清饥饿 48 h 的卵丘/颗粒细胞; E. 接触抑制 48 h 的卵丘/颗粒细胞

A. Untreated cumulus cells; B. Cumulus cells treated with $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA for 24 h; C. Cumulus cells treated with $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ROS for 24 h; D. Serum starvation for 48 h; E. Cumulus cells treated with contact inhibition for 48 h

图 1 不同处理的卵丘/颗粒细胞形态 200×

Fig. 1 The morphologic of cumulus cells after different treatments 200×

表 1 不同处理方法对卵丘/颗粒细胞周期的影响

Table 1 The effect of different treatments on the cumulus cell cycle

处理方法 Different treatment	细胞周期 ($\% \pm \text{SE}$) Cell cycle		
	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组 Control	64.5 ± 1.3^c	18.8 ± 0.7^a	16.7 ± 1.7^a
TSA	88.5 ± 1.6^a	3.3 ± 1.2^c	8.2 ± 0.7^b
ROS	78.1 ± 1.1^b	12.8 ± 0.5^a	9.1 ± 1.3^b
血清饥饿 Serum starvation	77.0 ± 2.7^b	8.5 ± 2.8^{ab}	14.5 ± 0.2^a
接触抑制 Contact inhibition	74.8 ± 3.3^b	14.0 ± 2.0^a	11.2 ± 2.1^b

上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。下同

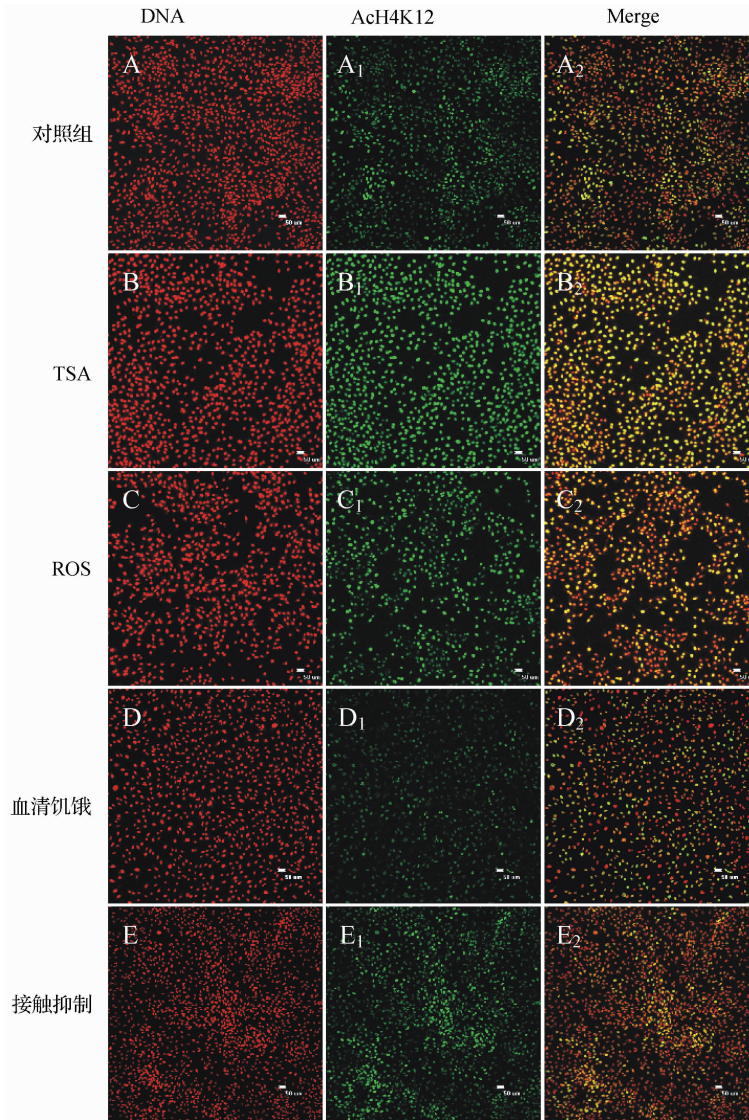
Different letters in the same row means significant difference between the treatments ($P < 0.05$), same letter in the same row means not significant difference between treatments ($P > 0.05$). The same as below

后的卵丘/颗粒细胞充当供体细胞, 其卵裂率和囊胚率较对照组增加最为明显 ($P < 0.05$), (85.2 ± 3.4)% vs (68.6 ± 6.7)%; (30.2 ± 5.7)% vs (10.4 ± 8.3)%。

3 讨论

迄今为止, 很多种类的体细胞被应用为核供体, 并获得了成功, 其中卵丘/颗粒细胞和耳成纤维细胞作为核供体应用的较多。Kubota 等^[19]以乳腺上皮

细胞、卵巢颗粒细胞、皮肤成纤维细胞为供核细胞进行了核移植研究, 结果显示, 3 类不同细胞源的克隆胚胎分裂率无明显差异, 但颗粒细胞却产生了最高的囊胚发育率及 6 头完成整个妊娠期的克隆牛, 且存活至今。该结果表明, 供核细胞类型会显著影响胚胎体外和体内发育, 同时也证明颗粒细胞是体细胞克隆较有效的细胞类型。Yang 等^[20]就兔的成纤维细胞和卵丘/颗粒细胞乙酰化水平作比较, 发现卵丘/颗粒细胞具有比成纤维细胞较强的乙酰化修饰



A. 对照组,PI, 红色荧光,染色示核;A₁. 抗 H4K12 乙酰化抗体免疫荧光染色;绿色荧光;A₂. 红绿荧光共聚焦

A. Control,PI, red; A₁. Anti-H4K12 acetyl immunofluorescent, Green; A₂. Merge

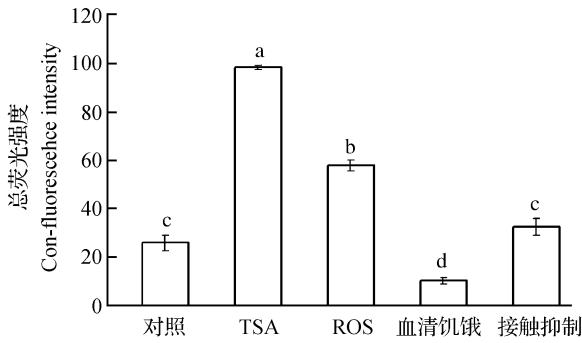
图 2 分别用 TSA(B)、ROS(C)、血清饥饿(D)和接触抑制(E)处理后的卵丘/颗粒细胞乙酰化免疫荧光标记 100×

Fig. 2 The acetylate immunofluorescent labelling of cumulus cells after deal with TSA(B), ROS(C), serum starvation(D) and contact inhibition(E) 100×

表 2 不同处理方法对牛卵丘/颗粒细胞克隆胚发育水平的影响

Table 2 The effect of different treatments on the cumulus cell

处理方法	培养胚胎数	卵裂数(%±SE)	囊胚数(%±SE)
Different treatment	No. of embryos cultured	No. of embryos cleaved	No. of blastocysts
对照组 Control	288	198(68.6±6.7 ^b)	30(10.4±8.3 ^c)
TSA	301	256(85.2±3.4 ^a)	91(30.2±5.7 ^a)
ROS	310	248(79.9±1.8 ^a)	59(19.0±6.8 ^b)
血清饥饿 Serum starvation	297	216(72.9±3.9 ^{ab})	56(18.9±4.3 ^b)
接触抑制 Contact inhibition	291	215(73.8±2.7 ^{ab})	50(17.3±3.8 ^b)



每一栏表示卵丘/颗粒细胞经不同处理的细胞核区总荧光强度的平均值. 上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)

Every column indicates the average of the con-fluorescence intensity of the cumulus cell nucleus. Different letters means significant difference between treatments ($P < 0.05$), same letter means not significant difference between treatments ($P > 0.05$)

图3 不同方法处理的卵丘/颗粒细胞乙酰化荧光定量分析

Fig. 3 The quantitative analysis to the cumulus cells after different treatments

功能,其重编程能力和克隆胚胎发育水平也相对较强,即卵丘/颗粒细胞DNA能被更有效的重新程序化。故本研究采用卵丘/颗粒细胞作为研究对象。

一般来说,供核者为胎体或新生体,处于低分化状态或已传数代,经过去表观遗传标记处理的,其重编程过程比较易于进行^[21]。而人们常用的处理供体细胞的方法是血清饥饿和接触抑制^[5],本研究中采用的卵丘/颗粒细胞虽不是采自胎体或新生体,但经过 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA 处理 24 h 的卵丘/颗粒细胞即实现了低分化状态,即周期被抑制在 G_0/G_1 期,并获得了有益的表观遗传修饰,即乙酰化水平维持在较高水平,且获得了较高的卵裂率和囊胚率,这不但节省了因长期传代或血清饥饿处理而投入的时间,而且在乙酰化水平上弥补了血清饥饿和接触抑制处理供体细胞后其重编程能力的不足之处。且本研究中所使用的 TSA 浓度仅为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,在成本上并不高于血清饥饿和接触抑制。

研究表明,细胞在重编程过程中高的乙酰化水平以及低的甲基化水平有利于重编程过程的进行,甲基化密度限定了组蛋白乙酰化程度^[22]。Jones 等^[23]用去甲基化试剂 5-氮-2'-脱氧胞苷处理供体细胞后反而降低了克隆胚的囊胚发育率,这可能是由于其本身具有毒性,其他学者也没有成功的报道,看

来这一思路虽然不错,但合适的试剂,合理的剂量及恰当的处理时间还需要摸索。Enright 等^[12]利用 25 和 $375 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA 分别处理供体细胞,发现经 $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理的供体细胞其囊胚率较高,因此, TSA 的浓度不一定与获得的重组胚发育水平成正比,所以本研究利用更小浓度 ($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 尝试处理牛卵丘/颗粒细胞,发现细胞形态良好,乙酰化水平较高,细胞周期被明显抑制在 G_0/G_1 期,且获得了较高的卵裂率和囊胚率,作为供体细胞的处理方式较为适合。

虽然没有发现 ROS 处理供体细胞的报道,但其通过抑制 cdc2、cdk2 和 cdk5 等细胞周期依赖性激酶的活性而控制细胞周期的能力在本研究中得到了证实,并获得了较高的卵裂率 ($P < 0.05$, $(79.9 \pm 1.8)\%$ vs $(68.6 \pm 6.7)\%$),同时 ROS 的处理组也表现出较高的乙酰化水平,虽然没有 TSA 的处理明显,但是也达到了预期效果。而血清饥饿导致乙酰化水平明显降低可能是由于血清浓度的明显降低,使得某些基因表达出现沉默,也有可能是由于 H4K12 是乙酰化在组蛋白上最先表达的位点之一^[24],所以对于基因的沉默表现出较明显的乙酰化水平降低的现象。

本研究证明经 TSA 处理后具有高乙酰化水平的卵丘/颗粒细胞充当供体细胞,其卵裂率和囊胚率较对照组差异显著 ($P < 0.01$),恰好证明了细胞在重编程过程中高的乙酰化水平有利于重编程过程这一观点^[7]。然而,单纯的处理供体细胞是否是提高重编程效率的最有效方法,还不能下定论,利用 TSA 处理克隆胚胎,孤雌激活胚胎,体外受精胚胎是否都能够有效的提高胚胎发育水平,还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] DANIELS R, HALL V, TROUNSON A O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63(4): 1034-1040.
- [2] KING H, JANENISCH R. Nuclear reprogramming and pluripotency [J]. *Nature*, 2006, 441(7097): 1061-1067.
- [3] 姚雅馨,李向臣,张勇,等. 供体细胞的不同选择和 处理对重编程过程的影响 [J]. *遗传*, 2008, 30(11): 1392-1396.
- [4] TIAN X C, KUBOTA C, ENRIGHT B, et al. Clo-

- ning animals by somatic cell nuclear transfer-biological factors [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1: 98.
- [5] 李雪峰, 安志兴, 李煜, 等. 牛供体细胞的来源、血清饥饿和预激活对核移植卵体外胚胎发育的影响 [J]. *动物学研究*, 2003, 24: 35-38.
- [6] MIYAMOTO K, HOSHINO Y, MINAMI N, et al. Effects of synchronization of donor cell cycle on embryonic development and DNA synthesis in porcine nuclear transfer embryos [J]. *Reprod Dev*, 2007, 53(2): 237-246.
- [7] YANG J F, YANG S H, BEAUJEAN N, et al. Epigenetic marks in cloned rhesus monkey embryos: Comparison with counterparts produced *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 2007, 76(1): 36-42.
- [8] XU F, ZHANG K, GRUNSTEIN M. Acetylation in Histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast [J]. *Cell*, 2005, 121: 375-385.
- [9] 穆润清, 贺安宁, 王丽, 等. MAPK 和 MPF 对小鼠受精卵有丝分裂期作用 [J]. *中国公共卫生*, 2006, 2(25): 594-595.
- [10] ALESSI F, QUARTA S, SAVIO M, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitors olomoucine and roscovitine arrest human fibroblasts in G1 phase by specific inhibition of CDK2 kinase activity [J]. *Exp Cell Res*, 1998, 245(1): 8-18.
- [11] KISHIGAMI S, MIZUTANI E, OHTA H, et al. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 183-189.
- [12] ENRIGHT B P, KUBOTA C, YANG X, et al. Epigenetic characteristics and development of embryo cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(3): 869-901.
- [13] SHI W, HOEFLICH A, FLASWINKEL H, et al. Induction of a senescent-like phenotype does not confer the ability of bovine immortal cells to support the development of nuclear transfer embryos [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69: 301-309.
- [14] 李向臣, 跃华, 刘鹏, 等. 供体细胞状态对牛重组胚发育的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(4): 513-516.
- [15] 严丽萍, 陶茂萱. 血清饥饿和接触抑制两种 G₀ 期同步化方法效果评价 [J]. *卫生研究*, 2007, 36(3): 275-278.
- [16] WEINGARTL H M, SABARA M, PASICK J, et al. Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages partial characterization and virus susceptibility [J]. *J Virol Methods*, 2002, 104(2): 203-216.
- [17] 高爱民. TSA 对小鼠早期胚胎发育及基因表达模式的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [18] WEE G, KOO D B, SONG B S, et al. Inheritable Histone H4 acetylation of somatic chromatins in cloned embryos [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(9): 6048-6057.
- [19] KUBOTA C, YAMAKUCHI H, TODOROKI J. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(3): 990-995.
- [20] YANG F K, HAO R, KESSLER B, et al. Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation [J]. *Society for Reproduction and Fertility*, 2007, 133: 219-230.
- [21] 李雁, 冯云, 孙贻娟, 等. 体细胞核移植后核重编程的影响因素 [J]. *生命科学*, 2006, 18(4): 355-360.
- [22] SCHÜBELER D, LORINCZ M C, CIMBORA D M, et al. Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation of transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(24): 9103-9112.
- [23] JONES K L, HILL J, SHIN T Y. DNA hypomethylation of karyoplasts for bovine nuclear transplantation [J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(2): 208-213.
- [24] SHESTAKOVA E, BANDU M T, DOLY J, et al. Inhibition of Histone deacetylation induces constitutive derepression of the Beta interferon promoter and confers antiviral activity [J]. *Virol*, 2001, 75(7): 3444-3452.