

小鼠体细胞核移植研究进展

郭淑华 (潍坊学院生物工程学院, 山东潍坊 261061)

摘要 哺乳动物体细胞核移植的研究是当今生命科学研究的热点之一。小鼠由于其繁殖周期短、材料来源比较容易, 成为重要的模式动物。对小鼠体细胞核移植的国内外研究现状进行了综述, 为进一步研究其他哺乳动物核移植提供了理论依据。

关键词 小鼠; 核移植; “Hndulu”法

中图分类号 S865.1+3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)28-12279-03

Research Progress on the Somatic Cell Nuclear Transfer of Mice

GUO Shu-hua (College of Biology Engineering, Weifang University, Weifang, Shandong 261061)

Abstract The research on the mammalian somatic cell nuclear transfer is one of the life science research hotspots at present. Mice become the important model animal because of its short reproductive cycle and facile materials. The current status of the researches on the somatic cell nuclear transfer in mice were summarized, in order to provide the theoretical basis for further study on the nuclear transfer of other mammalian.

Key words Mice; Nuclear transfer; “Hndulu” method

1 体细胞克隆小鼠的供体细胞类型

自从1997年“Dolly”诞生以来, 哺乳动物体细胞核移植研究蓬勃发展。小鼠由于其繁殖周期短、材料来源比较容易, 成为重要的模式实验动物。到目前为止, 已经分别用卵丘细胞^[1]、雄性小鼠尾尖细胞^[2]、ES细胞^[3]、卵泡上皮细胞、尾尖成纤维细胞^[4]、转基因ES细胞、未成熟支持细胞^[5]、颗粒细胞、胎儿成纤维细胞、未成熟神经细胞和已分化神经细胞^[6]以及10.5 d胚胎的原生殖细胞^[7]等多种细胞成功克隆了小鼠, 并且把核移植技术和胚胎干细胞技术相结合也获得了来源于T、B淋巴细胞^[8]和嗅觉神经元^[9-10]的克隆小鼠, 另外小鼠的再克隆研究也获得了成功, 得到了第6代再克隆小鼠^[11]。更为有趣的是, Wakayama等通过核移植技术和胚胎干细胞技术获得了缺乏生殖细胞的不育小鼠的后代^[12]。

2 体细胞克隆小鼠的主要方法

2.1 “Hndulu”法 与牛、羊、猪等动物的克隆相比, 克隆小鼠的方法有所不同, 目前最常用的方法是由美国夏威夷大学Yanagimachi研究组采用的借助“piezo”的胞质内直接注射方法, 又称“Hndulu”法。该方法是借助“piezo”装置产生的瞬间高电压, 把供体细胞核直接注入去核的小鼠卵母细胞质中。应用该方法已经得到了多批不同供体细胞类型的克隆小鼠。在应用该法克隆小鼠时, 可以根据供体细胞的大小和坚硬程度调整注射针的内径, 一般来说, 卵丘细胞和原始生殖细胞注射针的内径为4~5 μm, 未成熟支持细胞为3~4 μm, 成纤维细胞为7~9 μm^[11]。

2.2 连续核移植法 2001年, Ono等把同步于M期的小鼠胎儿成纤维细胞为供体移入去核卵母细胞的卵周隙, 通过灭活的仙台病毒介导融合, 激活并培养9~12 h后把形成的原核再移入去核的1-细胞受精卵中获得了克隆小鼠。2002年, Hindryckx等用体外成熟的小鼠卵母细胞为受体通过连续核移植方法也获得了克隆小鼠^[8]。

2.3 电融合方法 2000年, Ogura等通过电融合的方法将小鼠尾尖成纤维细胞移入去核卵母细胞中, 得到克隆小鼠。并且电融合法与直接注射法相比, 克隆胚胎的体外和体内发育

率没有明显的差别, 因此可作为克隆小鼠的一种可行方法。

2.4 二倍体-四倍体嵌合体法 将来自核移植囊胚的小鼠ntES细胞(Nuclear transfer embryonic stem cell)注入四倍体囊胚中, 移植后得到的后代来自ntES细胞, 而四倍体囊胚发育为胎盘组织^[13], 并且利用该法得到的克隆小鼠没有克隆动物常有的胎盘肥大、体积大的症状。Hchedlinger等利用小鼠高度分化的T、B淋巴细胞为供体, 核移植后得到克隆囊胚, 从这些囊胚中分离内细胞团获得了2个ntES细胞系: 来源于B淋巴细胞的LN1 ntES细胞系和来源于T淋巴细胞的LN2 ntES细胞系。他们将这些ES细胞注入四倍体囊胚中获得了19只来源于LN1的克隆小鼠和1只来源于LN2的克隆小鼠, 通过Southern blot分析表明, 来源于B细胞核的克隆小鼠在所有组织中完全携带重排的免疫球蛋白等位基因, 同样来源于T细胞核的克隆小鼠在所有组织中也携带重排的T细胞受体基因。这说明终末分化的细胞核能够重新编程并获得克隆后代。神经细胞也是一种终末分化细胞, Jaenisch研究组将小鼠嗅觉神经元移植到去核卵母细胞中, 在352次尝试中获得了48个囊胚, 从中分离培养了3个ntES细胞系, 获得了40只具有繁殖能力的克隆小鼠。同年, Li等也获得了来源于嗅觉神经元的克隆小鼠。这些结果证明完全成熟的神经细胞的DNA也能够重新进入细胞周期, 其细胞基因组并不存在阻止其重新编程的不可逆遗传变化。

综上所述, 在克隆小鼠研究中, 不同的研究者根据不同的研究目的、供体细胞类型和实验室条件, 采用了不同的方法, 那么不同的研究方法对小鼠克隆效率的影响如何呢? Yabuuchi等研究了不同核移植程序对小鼠核移植胚胎在体外和体内发育潜能的影响, 发现M期ES细胞通过灭活的仙台病毒介导融合的核移植胚胎囊胚发育率高于直接注射的胚胎; M期ES细胞比G₁期ES细胞的囊胚发育率高; 但是在各种核移植程序中, 发育成存活个体的能力都很低; 另外, 他们还发现不同激活方法也影响囊胚发育率, 但是并不影响发育成存活个体的能力^[14]。这些结果说明, 不同核移植程序及激活方法不影响以ES细胞为供体的核移植胚胎发育成存活个体的能力和出生后的死亡。同年, Chen等对piezo、激光和传统核移植方法的优点和缺点进行了比较^[15]。通过piezo、激光和传统方法把小鼠卵母细胞去核, 并把卵丘细胞

注入。目前在核移植研究中,无论哪种操作方法和供体细胞类型,产生存活克隆后代的成功率均低于5%。导致这种低效率的原因是否由于去核的MI期卵母细胞的发育潜能受到损害?还是因为在核移植操作中,去核过程移走了重新编程供体核所必须因子?Wakayama等研究了核移植过程中去核的作用^[16]。把卵丘细胞核注入到未去核的卵母细胞中3h后,65%的卵母细胞含有2个明显的中期纺锤体,而剩余的卵母细胞含有1个纺锤体,其中卵母细胞染色体和卵丘细胞染色体混合。而当供体核注入后1h,染色发现大多数含有2个分离的纺锤体。在不染色时,看不到供体核纺锤体。这为在供体核注入后1h鉴定和选择卵母细胞来源的中期染色体提供了一种直接的方法。 Sr^{2+} 诱导激活后,34%~41%的克隆胚胎发育到桑椹胚/囊胚期,与核移植之前去核的对照组相比无明显差异。因此,在核移植前或后去核对克隆胚胎发育无明显影响。这些结果说明克隆的低效率并不是因为卵母细胞的染色体缺失,也不是由于在去核过程中移走了重编程所必需的因子造成的。

3 体细胞克隆小鼠机理的研究

3.1 影响体细胞克隆小鼠发育的因素

3.1.1 供体细胞汇合程度的影响。ES细胞汇合生长能显著影响重构胚的发育潜能。当ES细胞系HM1 80%~90%汇合时,49%的重构胚发育到桑椹胚/囊胚期,胚胎移植后9%的克隆胚胎发育到期,并且在18只存活幼鼠中有5只发育到成年。与之相比,当ES细胞60%~70%汇合时,只有22%的克隆胚胎发育到桑椹胚/囊胚期,并且在胚胎移植后,只有1个胎儿发育到期。R1 ES细胞系也能支持重构胚发育到期,但是没有存活的幼鼠来自传代后期的细胞核。研究显示,ES细胞汇合程度和传代次数可能影响重构胚的发育潜能^[17]。

3.1.2 体细胞克隆胚胎的类似体细胞的特征。在体细胞核移植过程中,使供体细胞基因表达程序沉默,并起始胚胎基因表达程序,即核重编程,是至关重要的。当以成肌细胞核为供体的克隆小鼠胚胎在标准胚胎培养液中培养时不能正常发育,但却能在适宜供体成肌细胞的细胞培养液中正常发育,表现为囊胚率高、囊胚形态正常、囊胚细胞数目多,并且在大多数囊胚中内细胞团细胞分配正常。成肌细胞为供体克隆的胚胎继续表达GLUT4葡萄糖转运蛋白,而正常状态下,该蛋白在肌肉中表达,不在着床前胚胎中表达。成肌细胞克隆胚胎还表现为细胞表面过早地富集GLUT1。成肌细胞和卵丘细胞为供体的克隆胚胎都表现为葡萄糖摄取增加。这些研究显示,在克隆过程中,供体细胞基因组的沉默不完全,或者供体细胞基因组在着床前胚胎发育过程中提前启动表达。结果,体细胞克隆胚胎表现许多类似体细胞的特征。因此,克隆胚胎在着床前阶段具有供体细胞特异的特点,把克隆胚胎放在标准的胚胎培养条件下可能导致胚胎内环境稳定的破坏,并抑制许多关键的过程,导致克隆胚胎死亡^[18]。

3.1.3 不同培养条件对体细胞克隆胚胎的影响。来自于不同的F₁供体B6D2F1和B6CBAF1的卵母细胞,对克隆胚胎发育到桑椹胚/囊胚阶段没有明显影响,并且胚胎移植后都能发育到期。用B6D2F1的卵母细胞为受体时,培养在M16和20%氧条件下的克隆囊胚的细胞总数明显高于培养在CZB

和20%氧条件下的克隆囊胚。克隆胚胎在CZB培养液中培养时,低的氧浓度对着床前胚胎发育有不利影响,胚胎移植后也没有胚胎发育到期。因此,在培养小鼠克隆胚胎时,M16培养液好于CZB培养液,并且在用CZB培养液培养时,低氧浓度对小鼠克隆胚胎发育有不利的影响^[19]。

3.2 体细胞克隆小鼠的重编程

3.2.1 DNA甲基化异常。在已有的报道中,体细胞克隆的效率很低,胚胎和胎儿发育的各个阶段都伴随着大量死亡。克隆小鼠着床前胚胎与供体细胞表达DNA甲基转移酶1(Dnmt1)基因的形式相同。另外,在克隆胚胎中,卵母细胞来源的Dnmt1o同工酶在8细胞期并不转移到胚胎细胞核。这些在Dnmt1和Dnmt1o表达调节和胞质-核运输方面的缺陷可能是抑制克隆胚胎完成早期发育的关键事件。并且,Dnmt1的异常定位和表达可能与克隆动物中的DNA甲基化缺陷和发育异常有关。

通过检测克隆小鼠囊胚中印迹基因表达的转录丰度、等位基因特异性和父方等位基因特异DNA的甲基化,发现在5个印迹基因中,其总转录丰度和等位基因特异性表达有显著破坏。只有4%的克隆胚胎这5个基因的囊胚表达模式正常。在H19和Snprn基因的印迹控制区域,克隆胚胎也显示等位基因特异DNA甲基化的大量缺失。因此,在大多数克隆胚胎中,后成性错误在发育的早期已产生,不能进行有效的重编程,并且某些后成性信息丢失。

3.2.2 体细胞连接组蛋白。连接组蛋白(H1)是染色质结构和功能的关键调节子。但是在早期胚胎发生过程中不同H1的功能,以及调节它们与染色质关系的机制所知甚少。通过检测H1在卵母细胞生长、成熟、受精及早期胚胎发生和克隆胚胎中的发育变化,发现卵母细胞特异的H1foo,在卵母细胞、原核和极体中都与染色质相联系。在精子胞质内注射(ICSI)和体细胞核移植(SCNT)胚胎中,H1foo在5min内与精子或体细胞染色质相连,并且到60min时完全取代体细胞H1。SCNT后从H1到H1foo的转换是受发育调节的。在2细胞和4细胞后期,H1foo被体细胞H1代替。H1foo与染色质的连接可在存在核膜的情况下发生,并且不依赖于原核形成。该过程受与纺锤体有关的因子调节,并且很可能是一个主动的过程。所有SCNT重构胚重演H1变化的正常过程,说明仅H1并不对克隆胚胎的发育潜能具有重要性。

3.2.3 牛-小鼠克隆胚胎的基因表达。通过检测把小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)移入牛去核卵母细胞的克隆胚胎中的染色质形态、体外发育和某些基因的表达,发现激活6h后,70%的异种核移植胚胎有1个原核,而20%的胚胎有2个原核。体外培养72h后,62.6%的胚胎发育阻滞在8细胞阶段,31.2%的胚胎在2-4细胞阶段,只有6.2%的胚胎发育到8细胞以后,但是没有克隆胚胎发育到囊胚阶段。而来自牛胚胎成纤维细胞和牛去核卵母细胞的克隆胚胎,20%发育到囊胚阶段。表达强绿色荧光蛋白(EGFP)转基因的供体MEF核导致在1-8细胞阶段的MEF NT胚胎表达EGFP。利用RT-PCR技术,在8细胞MEF NT胚胎、8细胞小鼠胚胎、去核牛卵母细胞和MEF中检测到某些基因的表达。在MEF NT胚胎和MEF中检测到热激蛋白70.1的mRNA,但在小鼠胚胎中

没有。在正常小鼠胚胎和MEF中发现羟基-磷酸核糖转移酶(Hprt)的mRNA,而在MEF-NT中没有。只在正常小鼠胚胎中监测到Oct-4和胚胎碱性磷酸酶(eAP)基因的表达,而在异种NT胚胎中没有。异常的基因表达模式与异种克隆胚胎发育阻滞在8-细胞阶段有关,但是MEF-NT胚胎与种内NT胚胎一样进行染色质重塑。因此,与染色质重塑相比,分子重编程能更好地显示异种核移植重构胚的核重编程情况。

体细胞核移植技术是研究细胞核-质关系的重要手段。由于小鼠是重要的模式动物,其遗传背景相对较清楚,因此具有更加重要的意义。目前无论从技术上还是从机理上都对小鼠核移植进行了深入的研究,建立了各种不同的操作方法,并且新的方法也正在探索中,例如:Ibanez等选择CF-1和B6D2F1品系小鼠的MII期卵母细胞用乙醇激活,然后在激活后不同时间加入秋水仙胺,利用DNA、微管、微丝选择性探针通过荧光显微镜检测染色体分离、纺锤体动力学和极体的排放,发现加入秋水仙胺并不影响乙醇对卵母细胞的激活率,但是确实破坏胞质分裂和核分裂的协调,抑制纺锤体旋转的完成和第二极体的排放。并且,也检测了不同品系和不同处理对卵母细胞去核的影响。与B6D2F1卵母细胞相比,CF1卵母细胞的去核效率较高,并且激活后早期进行秋水仙胺处理比晚期处理的去核率高。这些结果显示,可以通过对激活的卵母细胞加入破坏纺锤体微管的药物的方法,产生具有发育能力的胞质体。然而应用秋水仙胺诱导去核形成的胞质体能否用于小鼠克隆还需进一步研究。随着研究的不断深入,人们必将进一步认识影响克隆效率的各种因素,并且更加深入了解细胞核与细胞质之间的复杂关系。

参考文献

- [1] AKAYAMA T, PERRY A C F, ZUCCOTTI M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [J]. *Nature*, 1998, 394:369-374.
- [2] WAKAYAMA T, YANAGIMACH R. Cloning of male mice from adult tail-tip cells [J]. *Nat Genet*, 1999, 22:127-128.
- [3] WAKAYAMA T, RODRIGUEZ I, PERRY A C, et al. Mice cloned from embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:14984-14989.

(上接第12278页)

铁果实还可能含有蛋白质、活性多糖、不饱和脂肪酸、苷、黄酮、多酚等降血脂的活性成分,能提高脂蛋白脂肪酶和卵磷脂胆固醇酰基转移酶的活性,从而促进脂质分解代谢,抑制脂质合成转运及在动脉壁上的沉积,抑制胆固醇的生物合成途径中一个或几个环节;能与胆固醇或其转化物胆酸结合,从而抑制其在肠内的吸收,促进降解和排泄,如果阻断胆汁酸的肝肠循环,减少重吸收数量,不仅可增加胆汁酸衍生物的排泄量,还能通过反馈机制增强胆汁酸合成限速酶的活性,可促使更多胆固醇转化为胆汁酸,达到降低血胆固醇的目的;能通过抗氧化来降血脂,体内活性氧易溶于膜中,氧浓度高有利于引发脂质过氧化的链式自由基反应,从而造成膜脂质破坏,脂质代谢紊乱,动脉硬化,通过清除机体内多余自由基可以达到降血脂的目的^[8]。

综上所述,该实验为铁果实粉的降血糖血脂作用提

- [4] OGURA A, INOUE K, TAKANO K, et al. Birth of mice after nuclear transfer by electrofusion using tail tip cells [J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 57:55-59.
- [5] OGURA A, INOUE K, OGONUKI N, et al. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Setdi cells [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62:1579-1584.
- [6] YAMAZAKI Y, MAKINO H, HAMAGUCHI HAMADA K, et al. Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:14022-14026.
- [7] NAGY A, GERISENSTEIN M, VINTERSTEN K, et al. Manipulating the mouse embryo a laboratory manual [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003:557.
- [8] HEINDRYCKX B, RYBOUCHKINA A, VAN DER ELST J, et al. Serial pronuclear transfer increases the developmental potential of in vitro-matured oocytes in mouse cloning [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67:6-13.
- [9] EGGAN K, BALDWIN K, TACKETT M, et al. Mice cloned from olfactory sensory neurons [J]. *Nature*, 2004, 428:44-49.
- [10] LI J, ISHII T, FEINSTEIN P, et al. Olfactory receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons [J]. *Nature*, 2004, 428:393-399.
- [11] WAKAYAMA T, SHINKAI Y, TAMASHIRO K L K, et al. Cloning of mice to six generations [J]. *Nature*, 2000, 407:318-319.
- [12] WAKAYAMA S, KISHIGAMI S, VAN THUAN N, et al. Propagation of an infertile hermaphrodite mouse lacking germ cells by using nuclear transfer and embryonic stem cell technology [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102:29-33.
- [13] EGGAN K, AKUISU H, LORING J, et al. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:6209-6214.
- [14] YABUCHI A, YASUDA Y, KATO Y, et al. Effects of nuclear transfer procedures on ES cell cloning efficiency in the mouse [J]. *J Reprod Dev*, 2004, 50:263-268.
- [15] CHEN S U, CHAO K H, CHANG C Y, et al. Technical aspects of the piezo, laser-assisted, and conventional methods for nuclear transfer of mouse oocytes and their efficiency and efficacy: Piezo minimizes damage of the ooplasmic membrane at injection [J]. *J Exp Zool*, 2004, 301:344-351.
- [16] WAKAYAMA S, GIBELLI J B, WAKAYAMA T. Effect of timing of the removal of oocyte chromosomes before or after injection of somatic nucleus on development of NT embryos [J]. *Cloning Stem Cells*, 2003, 5:181-189.
- [17] GAO S, MCGARRY M, FERRIER T, et al. Effect of cell confluence on production of cloned mice using an inbred embryonic stem cell line [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68:595-603.
- [18] GAO S, CHUNG Y G, WILLIAMS J W, et al. Somatic cell-like features of cloned mouse embryos prepared with cultured myoblast nuclei [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69:48-56.
- [19] GAO S, MCGARRY M, PRIDDLE H, et al. Effects of donor oocytes and culture conditions on development of cloned mice embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, 66:126-133.

供了实验依据,确切的有效成分及作用机制有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 谢宗万,余友琴.全国中草药名鉴[M].北京:人民卫生出版社,2000:506.
- [2] 陈旭健,甘耀坤,吴慧慧,等.红菇子实体对小鼠血糖、血脂的影响[J].*食品科技*,2008(4):237-239.
- [3] 侯水薇,王志勇,王厚冰,等.鹰嘴豆对小鼠血糖及血脂的影响[J].*新疆师范大学学报:自然科学版*,2005,24(4):62-64.
- [4] 刘浩,崔美芝,李春艳.大蒜素对2型糖尿病大鼠血糖的干预效应[J].*中国临床康复*,2006,10(31):73-75.
- [5] 刘爱青,段玉峰.中华稻蝗黄酮降血脂及抗氧化作用的研究[J].*山东农业大学学报:自然科学版*,2007,38(2):239-242.
- [6] 刘红梅,马玉卓.苦瓜降血糖、降脂作用研究进展[J].*中南药学*,2007,5(4):353-355.
- [7] DE TOMMASE N, DE SIMONE F, HIZZA C, et al. Constituents of *Eribrya japonica*, a study of their antiviral properties [J]. *J Nat Prod*, 1992, 55(8):1067-1073.
- [8] 张勇,尚德静,李庆伟.中药降血脂的研究进展[J].*辽宁师范大学学报:自然科学版*,2004,27(2):201-205.