

# 动物异种核移植的研究进展

廖清华, 赵广伟, 何若钢, 潘天彪, 李孟军, 赵彦玲

(1. 广西柳州畜牧兽医学校, 广西柳州 545003; 2. 广西大学动物科技学院, 广西南宁 530004; 3. 广西畜牧研究所, 广西南宁 530001)

**摘要** 论述了种间核移植的历史发展现状、应用前景和存在问题以及体细胞核移植技术在研究核质互作、细胞核的分化和重新编程方面重要的理论意义。

**关键词** 种间核移植; 重构胚; 濒危动物

**中图分类号** S813.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)30-13064-03

## Progress on Interspecies Nuclear Transplantation in Animals

LIAO Qing-hua et al (Liuzhou School of Animal Husbandry and Veterinary Science, Liuzhou, Guangxi 545003)

**Abstract** The history development of the interspecies nuclear transplantation, application foreground and problems as well as important theoretical significance of somatic cell nuclear transfer technology in the karyoplasm interaction, nucleus differentiation and re-programming aspects were summarized.

**Key words** Interspecies nuclear transplantation; Reconstructed embryo; Endangered animals

种间核移植(Interspecies nuclear transplantation)又称为异种核移植,是指把一种动物的细胞核移植到另一物种动物的去核卵母细胞中,以使供体细胞获得重新编程和发育能力的过程,重构胚发育到正常的囊胚或是桑葚胚阶段时,移植到代孕的母体内,产生新生的后代。重构胚的细胞核和细胞质来源于不同的两个物种,所以种间核移植突破了物种之间生殖隔离的限制。1997年克隆羊Dolly的问世,是核移植技术发展史上的一个里程碑——体细胞核移植技术的成功<sup>[1]</sup>,证明了高度分化的细胞核同样具有发育的全能性,受体卵母细胞质内含有能使细胞核去分化和重编程的因子,在卵母细胞质的作用下可以发育到一个完整的个体。

在短时间内用核移植技术成功获得牛、羊、猪、山羊和兔等,使人们对种间核移植技术产生了极大的关注,这推动了异种核移植技术的发展,也为研究重构胚的核质关系、供体细胞在异种细胞质内发育程序的重编、细胞结构的变化、基因的表达调控和物种的进化机理等方面提供了很好的研究渠道,同时也为物种的改良、拯救濒危的野生动物提供了很好的措施,进而促进了畜牧生产、人类医学的进步。但是,异种核移植还处于初期的发展阶段,还有许多有意义的问题值得去探索和研究。因此,笔者对种间核移植技术的历史、研究意义、存在问题及应用前景进行了综述。

### 1 种间核移植技术研究的历史和现状

在两栖类动物和鱼类最早开展种间核移植技术,做出主要贡献的是我国的童第周教授。1963年,童第周教授将金鱼囊胚细胞移植到去核的中华鲟鱼卵胞质中,中华鲟鱼皮鱼囊胚细胞移植到去核的金鱼卵胞质中,两种种间核移植的重构胚都生长成为幼鱼。随后他们用鲫鱼和鲤鱼进行核质杂交试验,成功的获得了杂交鱼<sup>[2]</sup>。1973年, Brun 尝试了将多种哺乳动物的体细胞核移植到爪蟾的卵内,没有获得成功,1977年 De Rooper A 将Hela细胞核移植到爪蟾卵内,发现了Hela细胞核在爪蟾的卵内有染色体和DNA合成<sup>[3]</sup>,证明了卵母细胞质内有能够激活哺乳动物的体细胞核的胞质因子,能使细胞核去分化和重编程的作用,同时也说明了这些胞质因子没有物种的特异性,从而奠定了种间核移植的理论

基础。随后,哺乳动物种间核移植技术也有报道,1990年, Wolfe 等用家牛的卵母细胞培养到4.5~5.0 d时的卵裂球发育到16~32细胞期做供体,移植到野牛、山羊、田鼠去核的卵母细胞中,在体外培养后发现牛-羊和牛-野牛的重构胚在体外可以发育到囊胚,而家牛-田鼠的重构胚不能发育到囊胚,原因可能是牛、羊和野牛的种属关系比较近,重构胚的核质相互支持,家牛和田鼠的种属关系比较远,核质关系不支持<sup>[4]</sup>。梅祺等在1993年用小鼠8-细胞期胚胎的卵裂球与去核的兔卵母细胞构建重构胚,发现小鼠早期卵裂球在兔的卵母细胞内染色体发生染色凝集和膨大,并在体内发育到囊胚期<sup>[5]</sup>。李光鹏等将小鼠的2-细胞和8-细胞、胚胎卵裂球移植到去核的猪的卵母细胞后也发生了正常的核膨大和染色体凝集<sup>[6]</sup>。随着体细胞核移植技术的发展,种间核移植逐渐也用体细胞作为核供体。1994年, Waksztunowska 等将大鼠的体细胞移植到去核的小鼠卵母细胞内,重构胚出现发育阻滞,胚胎阻滞发生在1-细胞或2-细胞期,而小鼠细胞核移植到大鼠去核的卵母细胞内可以发育到5~8细胞期<sup>[7]</sup>。1998年 Wells 等用种间核移植的方法成功的克隆了仅存的一头名为“贵妇”的珍稀母牛(ender by island cattle breed)<sup>[8]</sup>, Dominko 等以牛、绵羊、猪、猴和大鼠的皮肤成纤维细胞作为供核细胞,将他们与去核的牛卵母细胞融合产生胚胎,除大鼠为供核细胞没能获得囊胚外,其余的均获得囊胚<sup>[9]</sup>。中国科学院动物研究所于1999年首次报道了用离体的大熊猫的骨骼肌、子宫上皮细胞和乳腺细胞作供体,移植到去核的兔卵母细胞内,重构胚可以发育到囊胚阶段,染色体分析表明,重构胚的核遗传物质来自大熊猫供体细胞核;线粒体DNA分析表明,重构囊胚中有大熊猫线粒体存在<sup>[10]</sup>。2001年1月,ACT公司宣布,用印度野牛的体细胞做供体,移植到去核的家牛卵母细胞内,重组胚在体外培养后移植到受体的家牛后获得妊娠,顺利的产下了一头珍稀的亚洲野牛——“Noah”,这头野牛是世界上第一头采用异种克隆技术克隆的哺乳动物,虽然该野牛在出生后两天时间内死亡,但是证明了哺乳动物体细胞可以在异种动物卵母细胞内完成核发育程序重编、去分化完成整个发育过程<sup>[11]</sup>。Yoon 等进行猪牛异种细胞核移植也得到了体外发育囊胚<sup>[12]</sup>。韩国学者 Hwang 等用成年韩国虎的皮肤成纤维细胞分别与猫和牛的

**作者简介** 廖清华(1971-),女,广西南宁人,讲师,畜牧师,从事畜牧专业的教学与研究。

**收稿日期** 2008-09-01

卵母细胞构建重构胚, 囊囊率分别为8.8%、1.8%, 将160枚2~4细胞胚移植到3只狮子和1只虎的输卵管, 结果3只狮子分别于44, 60和120d返情, 1只虎于58d返情<sup>[13]</sup>。同年, Li P等用欧洲盘羊的颗粒细胞为供体, 移植到去核的绵羊的卵母细胞为胞质受体构建异种克隆胚, 移植给代孕的母羊生产出1只具有明显欧洲盘羊外貌特征的后代<sup>[14]</sup>。2002年中国科学院动物研究所将处于2~4细胞期的大熊猫-兔异种克隆胚胎和猫-兔克隆胚胎一起移植到处理过的家猫输卵管内, 得到的克隆胎儿中有两个来源于大熊猫异种重构胚<sup>[15]</sup>。2003年冯秀亮等证明猪成熟M期卵母细胞可以对人体细胞核进行重新编程, 并可支持其发育到囊胚阶段<sup>[16]</sup>。2004年Sansinena M等将爪哇野牛-牛异种克隆胚胎体外培养囊胚期移植给代孕的母牛体内, 其中一只妊娠维持到30~60d, 一只在60~90d妊娠终止<sup>[17]</sup>。2005年彭涛等发现盘羊-绵羊异种克隆胚胎和北山羊-山羊异种克隆胚胎移植入代孕母羊子宫内能够着床发育, 但没获得后代<sup>[18]</sup>。2006年报道我国在人-山羊种间核移植试验中没有获得囊胚, 但是山羊的卵母细胞可以支持人体细胞完成重编程, 重构胚在体外可以完成早期发育<sup>[19]</sup>。

应用核移植技术获得的动物大多是亚种间的核移植, 但是已经可以证明异种动物间的核移植技术的可行性。

## 2 种间核移植技术研究的意义

**2.1 濒危动物的保护** 濒危的野生动物由于数量, 生理特征和自然环境等方面的影响, 其数量正在日益减少, 种间核移植技术可以很好地应用到濒危动物的保护上, 例如, 中国科学院陈大元研究员主持的克隆大熊猫的工作很好地说明了种间核移植技术对于野生动物的保护是一种有力的保证<sup>[10,15]</sup>, 尤其是异种出生的野牛和盘羊更有力地说明了种间核移植技术将会对濒危动物的保护产生重要的影响<sup>[11,14]</sup>。

**2.2 在畜牧业中的作用** 异种核移植可以用优良性状动物的体细胞作为供体来打破动物的繁殖周期和生殖特征的不利因素, 来改善动物的种群结构, 缩短育种的世代间隔, 加快育种的效率, 节省引进良种的成本, 减少动物疾病的传播, 为更好的畜牧生产提供了一种有力工具。

**2.3 在医学领域的应用** 由于异种核移植动物所获得动物的遗传背景清晰, 因此, 可以很好地运用到需要清楚动物遗传背景的试验中, 使实验数据更准确可靠, 人类胚胎干细胞的生产一直是众多科学家追求的梦想, 但是迫于在伦理、道德、舆论和法律等方面的巨大阻力和压力, 使科学家们对利用异种核移植构建重构胚来分离克隆人类的胚胎干细胞的试验产生了浓厚的兴趣。Lanza等以人牛组合构建重构胚得到体外发育的囊胚<sup>[20]</sup>。另据报道, 中山医科大学陈系古教授和韩毅冰博士等使用核移植技术将一名接受手术的7岁男孩切下的包皮皮肤成纤维细胞移植到家兔卵母细胞中, 成功克隆出100多个人类胚胎, 其中部分发育到桑椹胚阶段<sup>[21]</sup>。

**2.4 核质互作关系的探讨** 异种核移植首先考虑的问题是供核细胞进入去核的卵母细胞后核质之间的互作关系, 以及随着发育引起的一系列的生理变化过程。核质互作频率的高低、供核细胞基因组重新编程程度的大小都影响囊胚的发育程度。所以, 核质关系的研究具有举足轻重的地位, 为研

究细胞核和细胞质之间在结构和组成上能否兼容和支持、功能上能否相互协调支持、各种信号能否顺利建立和联系, 细胞重编程、分化和去分化与基因的表达等方面具有重要的意义。

## 3 种间核移植技术存在的问题

异种核移植是在同种核移植的基础上建立的, 所以, 影响同种核移植的因素都会影响异种核移植的效率。

**3.1 核质相容性** 核质相容性就是指细胞核和细胞质在组成和结构上是否能够协调和支持, 核质之间的信号通道是否建立和保持。种间核移植的核质相容性问题包括两个方面:

卵母细胞中的胞质因子是否支持异种细胞核的去分化和重编程; 线粒体和细胞核在功能和结构上是否能够相互支持。

**3.2 核质相容性与核受体的选择** 早期胚胎几乎没有RNA转录活性, 这时胚胎发育主要由卵母细胞中贮存的母源性RNA和蛋白质控制, 只有在一定时期后, 胚胎中的基因才开始转录, 重构胚的RNA转录和蛋白质的合成将逐渐取代母源性的RNA和蛋白质, 这个取代过程称“母胚转换”(Maternal to Embryonic Transition, MET)。各种动物的MET发生时间是不一样的, 牛的MET时间发生在8细胞期, 羊和兔的都发生在8~16细胞期, 猪的MET发生在4细胞期, 小鼠的发生在2细胞期。卵母细胞对细胞核的接受和支持与卵母细胞的MET有关。MET之后细胞核完全控制着胚胎的发育。当经体细胞移植到去核的卵母细胞内时, 细胞核发生去分化, 关闭所有转录基因, 然后进行重编程<sup>[22]</sup>, 去除分化和重编程是由卵母细胞的母源性RNA和蛋白质控制的, 当母源性的RNA和蛋白质消耗时, 细胞核基因的转录开始, 合成蛋白质, 补充消耗的母源性RNA和蛋白质, 所以, 核移植重构胚和正常的胚胎一样存在MET现象<sup>[23]</sup>。能否正确的发生MET的转换是保证重构胚正常发育的重要因素, 细胞核在母源性RNA和蛋白质消耗之前及时的启动基因转录, 合成相应的蛋白质和酶是保证胚胎继续进行的前提, 否则, 胚胎将停滞发育, 不同物种的卵母细胞对异种体细胞核的接受能力具有明显的差异, 以大鼠和小鼠的卵母细胞为核受体进行异种核移植研究发现, 大鼠的体细胞移入去核的小鼠卵母细胞内, 重构胚的发育都会被阻滞在1-细胞或者2-细胞期, 小鼠的体细胞核移入去核的大鼠卵母细胞内, 重构胚发育到5~8细胞期<sup>[24]</sup>, 而用牛、羊、兔卵母细胞进行异种核移植, 都可以发育成囊胚<sup>[10,14]</sup>。

研究核质的相容性和互作关系有利于进一步理解种间核移植的机理, 为更好地填补理论上的空白, 优化种间核移植的条件, 提高种间核移植的效率提供了理论基础。

**3.3 种间核移植线粒体的组成和命运** 线粒体为细胞的新陈代谢提供了能量, 是细胞的“动力工厂”, 一个体细胞大约含有几千个线粒体, 一个卵母细胞大约含有十万个线粒体。线粒体是包含有16~17 kb mtDNA的半自主性的细胞器。只编码13种蛋白质, 22种tRNA和2种rRNA, 涉及线粒体生物功能约95%的蛋白质是由细胞核所编码的, 也是动物细胞核外唯一的遗传物质<sup>[25]</sup>。在核移植过程中, 如果采用细胞融合的方法则不可避免地要将体细胞中的线粒体带入到重构

胚中,因此,重构胚含有来自供体细胞和受体细胞的两种线粒体,在正常胚胎中,来源于卵母细胞中的线粒体得到增殖,来源于精子的线粒体经一种尚未完全清楚的机制被消除掉。异种间核移植的胚胎随着发育,重构胚的线粒体存在3种变化模式: 供体细胞的线粒体随着胚胎的发育逐渐消失,受体卵母中线粒体不断增殖; 供体细胞的线粒体随着胚胎发育不断增殖,受体的卵母细胞线粒体逐渐消失,最后来自供体细胞的线粒体取代受体线粒体; 供体线粒体和受体线粒体共存的现象。Li 等用种间核移植方法得到的欧洲盘羊,经检测线粒体完全来源于受体的卵母细胞,盘羊的线粒体已经检测不到<sup>[26]</sup>。中国科学院动物研究所用大熊猫体细胞做供体,以兔的卵母细胞做受体,克隆出的大熊猫胚胎经检测发现,在囊胚前阶段大熊猫和兔的线粒体共存,在着床后的大熊猫胚胎中,已经检测不到兔的线粒体存在,只能检测到大熊猫的线粒体<sup>[15]</sup>,Steinborn 等用瘤牛或奶牛的卵母细胞克隆牛,在11头克隆牛中,4头牛供体和受体线粒体共存<sup>[27]</sup>。

#### 4 提高异种妊娠的可能

截至目前,对异种妊娠技术方面的研究非常有限,主要集中在妊娠生理的研究上。根据已有报道,可考虑以下几方面来实现异种动物间的妊娠:选择亲缘关系接近,生殖生理相似的动物做代孕母体,最好也用该动物的卵母细胞作为受体。充分地运用同种诱导异种妊娠的方法,该方法就是将异种克隆胚胎与寄母同种胚胎一起移植到寄母子宫中,通过同种胚胎在子宫中的妊娠来带动异种胚胎的妊娠。中国科学院动物研究所将处于2~4细胞期的大熊猫-兔异种克隆胚胎和猫-兔异种克隆胚胎一起移植到经过处理的家猫输卵管中,得到的胎儿中2个是大熊猫的胎儿,经分析大熊猫胚胎着床的原因是因为家猫的胚胎首先发出了信号,使家猫的子宫处于接受胚胎着床的状态,也诱导大熊猫的胚胎启动着床程序,使其没有错过“着床窗口”,还有内细胞团置换法,滋养层细胞对建立妊娠起着关键作用<sup>[15]</sup>,利用显微操作方法将囊胚中的内细胞团切除,然后,将另一物种的内细胞团注入到无内细胞团的囊胚腔中,组成一个异种的嵌合体囊胚,把这种囊胚移植到与滋养层细胞同一物种的动物子宫内,由于胚胎的滋养层细胞与寄母是同一物种,因此,胚胎着床、胎盘形成都能正常进行,胎盘形成后,建立起妊娠。内细胞团置换法在理论上是最具有可能的方法。还有二倍体/四倍体(2N/4N)嵌合体方法,该法在小鼠的克隆和基因缺陷动物模型上应用很广泛,能否应用到其他动物上还有待进一步研究。

#### 5 展望

种间核移植技术为人类医学和濒危动物的保护提供了有效工具,为推动畜牧业的发展提供了理论基础,同时也促进了动物学、遗传学、免疫学和繁殖学诸多领域的研究和应用。但是,种间核移植技术作为一项新的技术,还处于探索的初步阶段,因此,需要更多的研究异种细胞核的去分化和重编程、异种核质间的关系和异种妊娠的建立等,探索异种

核移植的技术和理论,可更好地服务于人类。

#### 参考文献

- [1] WILMUTI, SCHNEKE A E, MCWHIR J, et al. Maternal offspring derived from fetal and adult mammalian cell [J]. *Nature*, 1997, 85: 810 - 813.
- [2] 童第周, 叶毓芬, 陆德裕, 等. 鱼类不同亚科间的细胞核移植 [J]. *动物学报*, 1973(3): 201 - 212.
- [3] ROEPER A D, SMITH J A, WATT R A, et al. Chromatin dispersal and DNA synthesis in G1 and G2 HeLa cell nuclei injected into *Xenopus* egg [J]. *Nature*, 1977, 265: 469 - 470.
- [4] WOLF B A, KRAEMER D C. Methods in bovine nuclear transfer [J]. *Theriogenology*, 1992, 37: 5.
- [5] 梅祺, 邹贤刚, 杜森, 等. 鼠兔核质杂交胚胎早期发育的研究 [J]. *试验生物学报*, 1993, 26(4): 389 - 397.
- [6] 李光鹏, 兰国成, 刘莹. 鼠猪异种细胞核移植 [J]. *动物学研究*, 2000(5): 416 - 418.
- [7] WAKSMUNDZKA M. Development of rat X mouse hybrid embryos produced by microsurgery [J]. *J Exp Zool*, 1994, 269(6): 551 - 559.
- [8] WELLS D N, MISCAL P M, TERVIT H R, et al. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Friesian Island cattle breed [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1998, 10(4): 369 - 378.
- [9] DOMINKO T, MITALPOVA M, HALEY B, et al. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclear from various mammalian species [J]. *Bd Reprod*, 1999, 60: 1496 - 1502.
- [10] 陈大元, 孙青原, 刘冀珑, 等. 大熊猫供体细胞在兔卵中可去分化而支持早期重构胚胎发育 [J]. *中国科学C 辑*, 1999, 29(3): 324 - 330.
- [11] VOGEL G. Cloned gar a short-lived success [J]. *Science*, 2001, 291: 409.
- [12] YOON J T, CHI E J, HAN K Y, et al. In vitro development of embryos produced by nuclear transfer of porcine somatic cell nuclei into bovine oocytes using three different culture systems [J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 298.
- [13] HWANG W, KIM K, KIM H, et al. Interspecies somatic cell nuclear transfer for the production of endangered Korean tiger (*Parthera tigris altaica*) [J]. *Theriogenology*, 2001, 55: 271.
- [14] LO P, PIAK G, BARBON B, et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-natal somatic cells [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(10): 962 - 964.
- [15] CHEN D Y, WEN D C, ZHANG Y P, et al. Interspecies implantation and mitochondrial fate of panda-rabbit cloned embryos [J]. *Biology Reproduction*, 2002, 67: 637 - 642.
- [16] 冯秀亮. 人-猪异种细胞核移植研究 [D]. 杨凌: 西北农林大学, 2003: 79 - 83.
- [17] SANINENA M J, HMLAND, HEBERT K, et al. Barterg (*Bos javanicus*) embryos and pregnancies produced by interspecies nuclear transfer [J]. *Theriogenology*, 2005, 63(4): 1081 - 1091.
- [18] 彭涛, 吕自力, 朱海, 等. 电融合条件对盘羊、北山羊异种核移植胚胎发育的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2005, 32(9): 36 - 39.
- [19] 王春雨, 刘凤军, 武浩, 等. 人-山羊异种核移植胚胎发育的初步研究 [J]. *生命科学研究*, 2006, 10(1): 50 - 54.
- [20] LANZA R P, GIBELI J B, DIAZ F, et al. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer [J]. *Cloning*, 2000, 2(2): 79 - 90.
- [21] 韩毅冰, 黄冰, 黄文革, 等. 将人成纤维细胞移植到兔去核卵中培育克隆人的研究 [J]. *发育与生殖生物学报: 英文版*, 2001, 10(B10): 105.
- [22] KANKAJ, SMITHS D, SOLOY E, et al. Nuclear ultrastructure in bovine nuclear transfer embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 52: 253 - 263.
- [23] CAMPBELL K H. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle [J]. *Cloning*, 1999, 1: 3 - 15.
- [24] WAKSMUNDZKA M. Development of rat X mouse hybrid embryos produced by microsurgery [J]. *J Exp Zool*, 1994, 269(60): 551 - 559.
- [25] HENDLEDER S, SCHMUTZ S M, ERHARDT G, et al. Farnitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle [J]. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54: 24 - 31.
- [26] LO P, PIAK G, BARBON B, et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-natal somatic cells [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 962 - 964.
- [27] STEINBORN R, SCHNOGL P, WELLS D N, et al. Coexistence of *Bos taurus* and *Bindicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones [J]. *Genetics*, 2002, 62: 823 - 829.