

# 哺乳动物核移植研究

孙志宏 邱瑞 李延青 周茂林 (延安大学生命科学学院, 陕西延安 716000)

摘要 介绍了哺乳动物核移植的现状、核移植主要步骤以及核移植中存在的一些问题。

关键词 哺乳动物; 核移植; 受体细胞

中图分类号 S813.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)07-02783-02

## 1 哺乳动物核移植的现状

核移植(Nuclear Transplantation, NT)是将动物早期胚胎或体细胞的核移植到去核的受精卵或成熟卵母细胞的细胞质中,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。它在动物育种、制备转基因动物、基因治疗和器官移植等方面具有重大的作用。核移植因供体核的来源不同可分为胚细胞核移植与体细胞核移植2种。1995年Campbell以培养的已分化的胚盘细胞作为供体细胞培养出了两只羊,它标志着哺乳动物核移植的开端。1997年,利用已分化的成年绵羊乳腺上皮细胞得到了第一只体细胞克隆绵羊多利。此后,其他物种的克隆也取得了较大的进展。核移植技术已经在绵羊、牛、山羊、猪、小鼠等多种动物上取得成功,但总体上效率不高。其效率低下的原因,目前大多归结于体细胞在克隆过程中发生后生的重编程不全、基因印迹异常而导致NT胚着床后的丧失。相对而言,牛的克隆最为成功,主要是由于克隆牛的相关技术都比较成熟。利用去透明带双半卵融合法进行牛体细胞克隆,十分简便有效,不但融合率和囊胚率都很高,而且可以完全做到手工操作,省去了繁杂的显微操作系统,大大降低了生产成本。初步的胚胎移植试验结果也较好,显示出良好的应用前景,是目前最适合工厂化生产体细胞克隆胚胎的方法之一<sup>[1-5]</sup>。利用显微去核后的半卵与供体细胞同步融合,并结合微穴法培养体系批量化生产成年牛克隆胚胎,具有产业开发潜力<sup>[6]</sup>。在小鼠卵丘细胞重组胚的早期发育研究中,采用去核针切开卵母细胞透明带后再对卵母细胞实施挤压和负压的方法,有效去除了卵母细胞的细胞核,并成功获得了来源于小鼠卵丘细胞核移植的早期胚,为核移植研究提供了一种新方法<sup>[7]</sup>。哺乳动物体细胞的核移植技术虽然取得了一定的进展,在生物医药领域也得到了初步应用,例如治疗性克隆就是近年来核移植技术取得的重大成就。它是以患者的体细胞为供核,移入去核的卵母细胞内,将重构胚培育至囊胚,从内细胞团中分离出胚胎干细胞,为患者提供与自身遗传物质相一致的细胞或器官,用于治疗患者的疾病<sup>[8]</sup>。此外,核移植在珍贵野生动物的保护方面也有研究。利用兔卵母细胞作为胞质受体,应用异种核移植技术克隆出世界第一批大熊猫异种重构胚,在世界范围内引起了轰动。从而使快速繁殖濒危野生动物成为可能,有望解决大熊猫等珍贵野生动物的保护问题<sup>[9]</sup>。但目前还没有一个能继续发育为完整的动物个体。如果这项工作能够取得成功,将大大有利于濒

危动物的保护。

## 2 核移植的主要步骤

核移植包括一系列复杂的程序:供体细胞培养、卵母细胞的体外成熟、去核、细胞核移植、融合、激活、重构胚的体外培养和胚胎移植。任何一步不理想,都会对克隆胚胎或动物的发育产生影响<sup>[10]</sup>。

**2.1 受体细胞的选择、去核** 迄今已有3类受体细胞用于核移植,并培育了后代。第1类是去除原核的合子,仅局限于用原核或假原核作为核体的情况;第2类是早期胚胎,只适合于用具有全能性的卵裂球作为供体的情况;第3类是MI卵母细胞<sup>[11]</sup>。在细胞核移植研究中,去核这一步非常关键。采用的去核方法主要有半卵去核法、功能性去核法、离心去核法、化学去核法、挤压去核法、点压去核法和蔗糖辅助去核法等,但目前使用较多的仍然是盲吸收去核法和活性荧光染色去核法。在以猪体外成熟卵母细胞周围分离得到的卵丘细胞作为猪体细胞核移植的供核细胞的研究中发现,以荧光染料染色法的去核率最高,而盲吸法去核所用时间最少<sup>[12]</sup>。另外,在小鼠核移植中,从去核卵母细胞的存活率来看,透明带切割法明显较高,其原因可能是小鼠卵母细胞膜非常弱。直接去核法在刺入时非常容易刺破卵膜而造成卵母细胞崩解。PMM法是目前小鼠核移植中使用最经典的方法,许多成功的小鼠核移植都是采用的这种方法<sup>[13]</sup>。无透明带核移植技术包括2种方法(反向核移植法和手工核移植法)以及单个胚胎培养系统。传统的核移植是在透明带完整的基础上进行的。传统观点认为,透明带对于核重新编程和胚胎的后续发育是必需的。利用传统方法进行核移植研究,需要昂贵的仪器设备,同时要求操作者掌握熟练的技术。这都限制了核移植研究,特别是应用的发展。研究表明透明带并非胚胎发育所必需,有学者发现无透明带的受精卵能发育至囊胚。Tatham等尝试利用梯度离心法对完全去除透明带的卵母细胞进行去核<sup>[14]</sup>,尽管结果不理想,但这主要与此方法许多环节不够完善有关。在实际操作过程中,还采用液体表明张力法去核、点压去核等技术。

## 2.2 供体细胞的选择以及供体细胞与受体卵母细胞的融合

目前,成功的核供体细胞有乳腺细胞、肌细胞、性腺细胞和肝细胞等,特别是卵丘细胞与胎儿成纤维细胞,成功地用作多种动物的核供体。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主要因素。早期研究认为,供体处于G<sub>0</sub>期是细胞核移植成功所必需的。后来G<sub>1</sub>期细胞的核移植也获得了成功,研究发现使ES细胞处于G<sub>2</sub>期可能对核移植有利。而使用M期细胞构建的胚胎,已经成功地生产出了以M期细胞为供体的核移植牛后代<sup>[15]</sup>。Wakayama

等<sup>[16]</sup>认为一些供体细胞的胞质也可能会干扰重构胚的发育,而卵丘细胞的胞质相对于其他类型的体细胞与卵母细胞的胞质更相容。因为在卵母细胞的早期发育过程中,卵丘细胞的前体细胞通过细胞膜上的微绒毛与卵母细胞的前体细胞相互连接而发育。通过这种方式沟通,2种细胞可以互相交换胞质因子和信息<sup>[17]</sup>。Lee等<sup>[18]</sup>认为供体细胞的类型对猪克隆胚胎的发育能力影响很大。分别采用胎儿成纤维细胞、成体成纤维细胞、颗粒细胞和输卵管上皮细胞作为供体细胞进行核移植,胎儿成纤维细胞的囊胚发育率最高。ES细胞核移植效率也明显高于体细胞核移植。分化程度越低的细胞越容易重编程,重构胚发育潜能也就越高。

体细胞与受体细胞的融合是哺乳动物体细胞核移植技术的关键步骤<sup>[19]</sup>。融合包括化学融合、仙台病毒融合和电融合。使用直流电脉冲诱导融合和胞质内注射法是目前最常用的方法。电融合法被广泛应用于胚胎细胞核移植,最早由Willadsen在绵羊胚胎细胞核移植上应用并获得成功。比较细胞融合的方法,压电去核装置能去掉供核细胞的细胞膜,直接将细菌核注射到去核后的卵母细胞中。尽管很多动物克隆中均未用此装置而获得成功,然而它却能直接将细胞核注入卵母细胞浆中,使得胞浆的一些因子更好地发挥核重新程序化的效应。在猪的试验中,利用该技术成功获得了克隆猪。Collas和Barnes采用胞质内注射法将牛胚胎ICM细胞直接注射到去核卵母细胞中,获得了核移植牛犊。Wakayama等将该方法成功应用于体细胞核移植研究中,获得了来自卵细胞的核移植小鼠。1998年,Trounson等运用该方法进行体细胞克隆,胚胎的重建效率远高于电融合法<sup>[20]</sup>。现已证明,分化程度越低的细胞越易发生发育程序重编,它们构建的重组胚的发育潜力就越高<sup>[21]</sup>。胎儿成纤维细胞由于分化程度相对较低,它们构建的重组胚的发育潜力明显高于成年动物皮肤成纤维细胞和分化程度更高的细胞所构建的重组胚<sup>[22]</sup>。这些结果都表明,不同类型的供体细胞进行核移植的效率不同。颗粒细胞和成纤维细胞重塑力较大,更适合作为核移植供体。我国学者以牛卵丘细胞核为供体,进行克隆牛的研究,发现核质相容程度对核移植效率具有一定影响,认为核供体与核受体胞质的相容性以及一些关键细胞因子的重新分布和交换,决定了体细胞染色体组的完全去分化和正确的再程序化过程,是体细胞核移植成功的关键<sup>[23]</sup>。

供核的选择中供核细胞浆所处何期为最佳状态及其影响因素如何起作用等尚需进一步研究。对现在所用不同体细胞如何进行基因重排而形成胚或获得其全能性的机制还需要更深入的探索,以便于从分子水平控制核基因的重排,从而提高核移植的效率<sup>[24]</sup>。

**2.3 卵母细胞的激活** 以成熟卵母细胞为受体的核移植中,由于缺乏诸如受精等自然的过程,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、氯化铯、三磷酸酯、精子提取物激活等。卵母细胞激活的原理为通过电刺激、钙离子载体等方法,使卵母细胞从M期中释放出来,并恢复到受精时的状态。由精子诱发的正常卵母细胞激活,可引起卵母细胞质钙离子浓度脉冲性规律升高,并一直持续几个小时。电刺激等

引起的卵母细胞质的激活可能不在于电刺激本身,而在于电刺激等引起的膜穿孔进一步引起了离子流动。卵母细胞的充分激活是一种持续机制而非点状事件,而最有效的激活程序毫无疑问应是模仿精子对卵母细胞刺激的反应。电脉冲可使胞质膜上形成小孔,膜去极化、渗透性改变,使细胞内游离钙离子瞬间释放;电脉冲另一个可能途径是质膜破裂,启动磷酸戊糖途径,某些膜表面受体激活后,促进肌醇磷脂水解成三磷酸肌醇,刺激细胞内钙离子的释放,细胞内钙离子释放后作为第二信使促使细胞外钙离子内流;第3种可能途径是电刺激引起膜电压依赖性钙通道开放。还有一些研究表明,注射精源性因子可能会模拟自然过程的钙离子波动,然而此方法的效率较低<sup>[25]</sup>。

### 3 小结

哺乳动物核移植技术虽然在生物医药、农业以及其他领域的应用取得了一定进展,但目前核移植技术还不够完善。存活率和异常发育是当今核移植技术的最大缺陷。导致这些现象的原因很多,如卵母细胞质量、供核细胞的种类、核质互作关系、供核重新编程、操作水平、培养条件和外界环境等<sup>[8,26]</sup>。动物核移植技术的不断完善,需要分子遗传学、细胞学、发育生物学等相关基础学科的进一步发展。

### 参考文献

- [1] BOOTH P J, TAN S J, REIPURTH R, et al. Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique[J]. *Cloning Stem Cells*, 2001, 3(3): 139-150.
- [2] VAJTA G, LEWIS M, HYTIEL P, et al. Somatic cell cloning without micromanipulators[J]. *Cloning*, 2001, 3(2): 89-95.
- [3] BOOTH P J, MUFF D, TAN S J, et al. Numerical chromosome error in day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts[J]. *Bd Reprod*, 2003, 68(3): 922-928.
- [4] BOOTH P J, TAN S J, REIPURTH R, et al. Simplification of bovine and porcine nuclear transfer by a zona-free manipulation technique[J]. *Theriogenology*, 2002, 57(1): 399.
- [5] VAJTA G, LEWIS M, TROUNSON A O, et al. Hardened somatic cell cloning in cattle: Analysis of factors contributing to high efficiency in vitro[J]. *Bd Reprod*, 2003, 68: 571-578.
- [6] 谭世俭, QIAN L M, 石德顺. 牛体细胞核移植胚胎的批量化生产[J]. *中国兽医学报*, 2007, 27(2): 260-263.
- [7] 沈新明, 乔贵林, 江培洲, 等. 改进的核移植方法完成小鼠卵丘细胞重组胚的早期发育[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(6): 613-618.
- [8] 徐小明, 雷安民, 华进联, 等. 核移植与治疗性克隆[J]. *遗传*, 2005, 27(2): 289-296.
- [9] 陈大元, 孙青原, 刘冀龙, 等. 大熊猫供体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育[J]. *中国科学*, 1999, 29(3): 324-329.
- [10] 杨正田, 沈伟, 邓继光. 体细胞核移植胚胎核重编程的研究进展[J]. *遗传学报*, 2004, 31(6): 641-646.
- [11] 乔岩岩, 史小林. 体细胞核移植的研究进展—核移植供体细胞与受体细胞的选择[J]. *生殖医学杂志*, 2005, 14(2): 113-116.
- [12] 索永善, 曹胜兰, 李跃民. 卵母细胞去核及卵丘细胞移核方法对猪体细胞核移植的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2006(7): 15-17.
- [13] 王锋, 蒋晓明. 小鼠体细胞核移植程序的研究[J]. *四川动物*, 2006, 25(3): 459-462.
- [14] TATHAM B G, DOWLING A T, TROUNSON A O. Enucleation by centrifugation of in vitro matured bovine oocytes for use in nuclear transfer[J]. *Bd Reprod*, 1995, 53: 1088-1094.
- [15] 韩伟, 章孝荣. 哺乳动物体细胞核移植中质体细胞的研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(5): 775-779.
- [16] WAKAYAMA T, PERRY A C F, ZUCCOTTI M, et al. Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclear[J]. *Nature*, 1998, 394: 369-374.
- [17] KATO Y, SOTOMARA Y, SOTOMARA Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult[J]. *Science*, 1998, 282: 2095-2098.
- [18] LEE G, HYUN S, KIM H, et al. Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparation (下转第2788页)

时, 发酵培养基中的酵母细胞数最高, 每克干物质中含酵母细胞数达  $1.283 \times 10^9$  个。因此, 花生粕是固态发酵培养基的最适氮源, 最适的碳氮比为 1:1。

表1 不同碳源培养基中每克干物质的酵母细胞数  $\times 10^8$  个/g

Table 1 Number of yeast cells for per gram dry matter in media with different carbon sources

| 碳源<br>Carbon source | 碳氮比 C/N ratio |       |      |       |      |      |
|---------------------|---------------|-------|------|-------|------|------|
|                     | 1:1           | 1.5:1 | 2:1  | 2.5:1 | 3:1  | 4:1  |
| 玉米淀粉 Corn starch    | 2.52          | 2.85  | 3.52 | 2.71  | 1.87 | 1.92 |
| 秸秆 Straw            | 12.35         | 9.92  | 9.15 | 9.21  | 9.41 | 8.66 |

注: 表中数据均为 3 次平行试验的平均值。

Nte: Data in above table are the mean of three parallel tests.

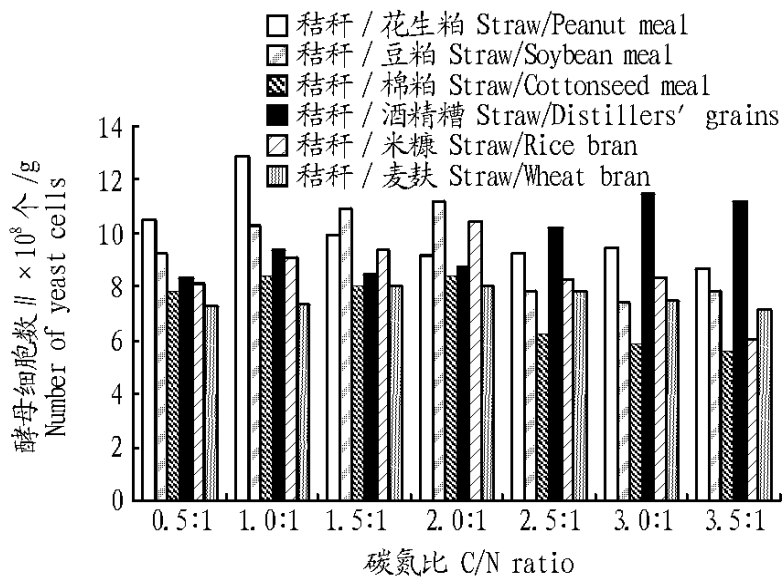


图1 不同氮源培养基中每克干物质的酵母细胞数

Fig.1 Number of yeast cells for per gram dry matter in media with different nitrogen sources

2.3 不同碳源混合后对固态发酵的影响 首先将秸秆、玉米淀粉按质量比 0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1 混合, 以 6 种不同比例的混合物为碳源, 再与花生粕配制成碳氮比为 1:1 的 6 种固态发酵培养基。从图 2 可以看出, 秸秆、玉米淀粉按 2:1 混合作为碳源时, 固态发酵培养基中的酵母细胞数最高, 每克干物质中含酵母细胞数达  $1.315 \times 10^9$  个。

(上接第 2784 页)

ions[J]. Theriogenology, 2003, 59:1949-1957.

- [19] 侯健, 安晓荣, 关宏, 等. 兔体细胞核移植的初步研究[J]. 动物学杂志, 2002, 37(6): 25-28.
- [20] TROUNSON A, LACHAMKAPLAN O, DIAMENIE M, et al. Reprogramming cattle somatic cells by isolated nuclear injection[J]. Reprod Fertil Dev, 1998, 10(7/8): 645-650.
- [21] 刘凤军, 安志兴, 高立功, 等. 优化山羊体细胞核移植方案的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(10): 972-976.

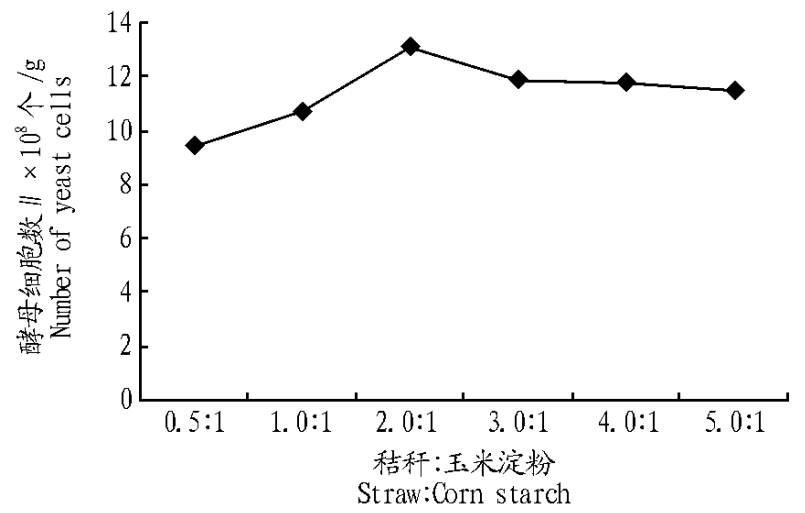


图2 秸秆、玉米淀粉混合物作碳源的培养基中每克干物质的酵母细胞数

Fig.2 Number of yeast cells for per gram dry matter in the media with mixture of straw and corn starch as carbon source

### 3 小结与讨论

研究表明, 固态发酵培养基最适的碳源是秸秆、玉米淀粉按 2:1 比例的混合物。这是因为秸秆、玉米淀粉虽然都是固态发酵培养基中常用的碳源, 但玉米淀粉比秸秆更能为酵母菌繁殖提供充足的碳源, 秸秆则具有更好的通透性。酵母菌在最适碳氮比的培养基中能进行大量繁殖, 酵母细胞数达到最高值。当碳氮比高于或低于这个比例时酵母细胞数都将下降, 但有时并不是呈依次下降的趋势, 而是会有一些波动。这可能是由于受试验过程中一些外界条件或内部因素如 pH 值、通气条件等的影响。该试验以秸秆、玉米淀粉、花生粕、豆粕、棉粕、酒精糟、米糠、麦麸等物质作为酵母菌固态发酵的原料, 成功地使这些农作物副产物、工业废弃物等转化为酵母菌生长的基质, 解决了环境污染问题。

### 参考文献

- [1] 尹召华, 杨万玉. 酵母培养物在奶牛日粮中的应用效果[J]. 安徽农业科学, 2002, 30(3): 389-390.
- [2] 李声永, 王加启, 龚月生, 等. 酵母培养物在反刍动物日粮中的应用研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2002, 29(5): 18-22.
- [3] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 90-92.
- [22] CHEN L H, BEHBOODI E, REGGIO B C, et al. Production of transgenic goats from a transfected fibroblast cell line[J]. Theriogenology, 2001, 55: 559.
- [23] 安晓荣, 苟克勉, 朱士恩, 等. 卵丘细胞核移植生产克隆牛犊[J]. 中国科学, 2002, 32(1): 69-76.
- [24] 夏兰, 冯云. 影响哺乳动物细胞核移植的因素[J]. 上海交通大学学报, 2006, 26(2): 210-212.
- [25] 韩建永, 桑润滋. 哺乳动物核移植技术研究进展[J]. 河北农业大学学报, 2001, 24(3): 105-109, 112.
- [26] 征月良. 动物核移植中核的重编程[J]. 生命的化学, 2007, 27(3): 216-218.