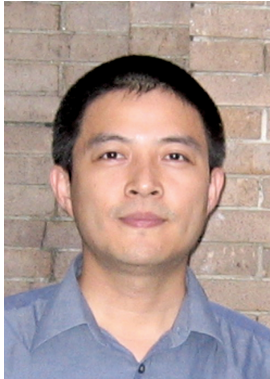


## 领域前沿 · 中国



李劲松, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究员。2002年7月毕业于中国科学院动物研究所, 获得博士学位; 主要从事克隆牛研究, 获得国内第一批体细胞克隆牛, 并获国家自然科学基金二等奖(排名第四)。2002年8月-2007年7月在美国洛克菲勒大学从事博士后研究; 主要探讨不同供体细胞对核移植诱导体细胞重编程的影响, 获得嗅觉神经、皮肤干细胞的克隆小鼠(Nature, 2004; PNAS, 2007), 获第40届美国生殖年会的USDA-CSREES-National Research Initiative Merit Awards。2007年8月获中国科学院“百人计划”引进国外杰出人才项目资助, 回国建立实验室, 继续从事体细胞重编程的研究。发现滋养外胚层缺陷是克隆动物出生率低的关键原因(Lin *et al.* Cell Stem Cell, 2011); 与徐国良研究员合作揭示母源因子TET3蛋白参与了卵母细胞介导的细胞重编程(Gu *et al.* Nature, 2011), 建立能替代精子使用的孤雄单倍体胚胎干细胞(Yang *et al.* Cell, 2012)。研究成果于2011年和2012年两次入选科技部评选的“中国科学十大进展”。2012年获国家杰出青年基金支持。

## 代替精子使用的孤雄单倍体胚胎干细胞的建立

钟翠青 李劲松\*

(中国科学院上海生科院生物化学与细胞生物学研究所细胞生物学国家重点实验室, 上海 200031)

在有性生殖中, 单倍体配子(卵子和精子)通过受精结合成二倍体的受精卵, 开始了一个新生命, 并且将自身的遗传物质延续给后代。在这样一个生命周期中, 由减数分裂获得的单倍体配子需要进一步高度特化, 形成特定的结构和功能以完成受精过程。就目前的研究技术和手段, 我们仍无法实现卵子和精子在体外进行长期的扩增和培养, 这大大阻碍了科学家对单倍体配子的基础研究以及体外的遗传操作。那么, 能否利用其中的任一种配子获得单倍体细胞系呢? 早在三十多年前, 科学家对此进行了大胆的尝试<sup>[1-4]</sup>。虽然他们利用不同的手段获得了孤雌和孤雄的单倍体胚胎, 并能在胚胎的卵圆柱期观察到单倍体细胞的存在, 但是这些单倍体胚胎建立的胚胎干细胞系最终都变成二倍体<sup>[3]</sup>。因此, 在高等的哺乳动物个体中, 除了发生减数分裂的生殖细胞以单倍体形式存在之外, 绝大部分细胞均为二倍体。即使在人肿瘤细胞和白血病细胞株中偶尔会出现接近于单倍体的细胞<sup>[5-7]</sup>, 并能在体外长期稳定培养,

但是这种细胞株来源于癌细胞, 不能广泛运用于基因研究和治疗。而胚胎干细胞具有体外培养无限增殖, 并能嵌合到生殖嵴实现遗传物质的传递的特性, 于是人们把更多注意力集中于单倍体胚胎干细胞系的建立上。因此如何在单倍体细胞变成二倍体之前将其维持住将是关键所在。

最近, Anton Wutz和Josef M. Penniger两个实验室先后报道了小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞的成功建立<sup>[8-9]</sup>。针对单倍体胚胎干细胞容易二倍体化的问题, 他们利用流式细胞术(FACS)实现了单倍体细胞的富集和维持。这些细胞除了具有正常胚胎干细胞的特性之外, 利用其单倍体性, 还能够运用于遗传的正反向筛选。相比于二倍体胚胎干细胞, 利用单倍体胚胎干细胞进行遗传筛选具有其独特的优点, 因为这将克服对于隐性基因只有在二倍体基因组为纯合子时才能显现表型这一困难, 由于单倍体只有一份染色体, 只要其发生了遗传改变, 就能出现相应的表型。而相对于癌细胞来源的类似单倍体细胞系来说, 单倍体胚胎干细胞能够通过生殖系嵌合的方式将遗传修饰传递到下一代, 实现基因的功能研究从细胞水平向动物模型的提升。

\*通讯作者。Tel: 021-54921422, E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54921422, E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2013-04-01 14:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130401.1448.002.html>

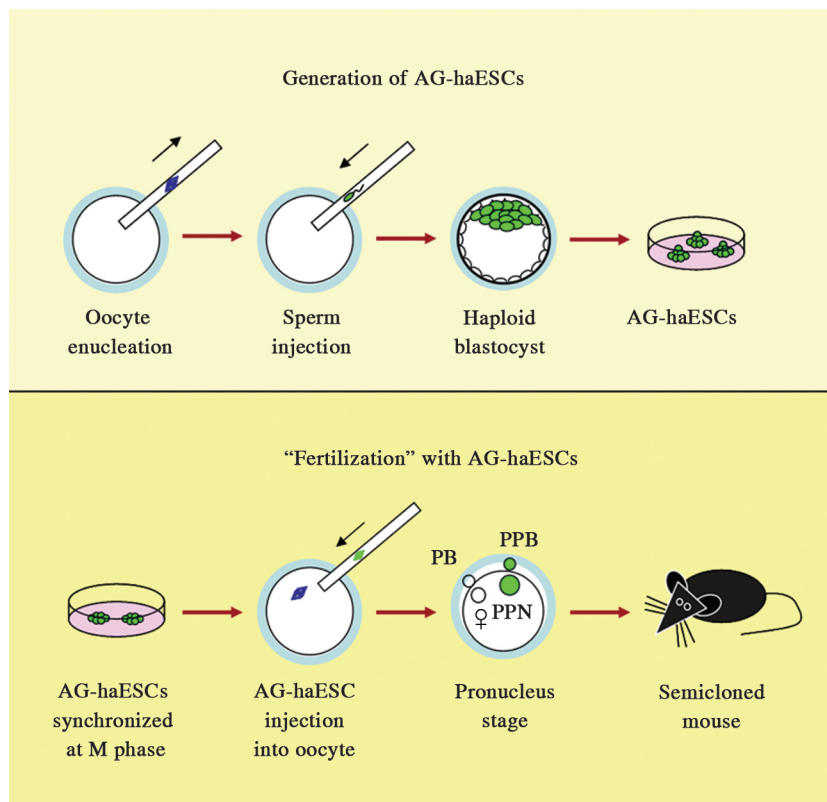
但是, Anton Wutz和Josef M. Penniger的研究并未表明其获得的小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞能否嵌合到生殖系。另外,来自于卵母细胞的孤雌单倍体胚胎干细胞是否携带雌性的表观遗传特性也不得而知。同时,这种孤雌胚胎干细胞能否像青鳉鱼(*Oryzias latipes*)单倍体多能干细胞系一样,通过将单倍体干细胞注入卵细胞中获得半克隆后代呢<sup>[10]</sup>?考虑到鱼不存在基因印记的情况,小鼠的孤雌单倍体胚胎干细胞注入卵细胞中得到的孤雌囊胚可能会因为印记的不平衡而导致胚胎无法发育到期<sup>[11-14]</sup>。即使可以用单倍体细胞的染色体纺锤丝复合物(chromosome-spindle-complex, CSC)代替MII卵的纺锤丝复合物,然后进行单精注射这种稍繁琐的方法<sup>[15]</sup>,但是也没有被成功证实。基于此,我们设想,能否在体外建立孤雄单倍体胚胎干细胞系?并且这种胚胎干细胞能否维持与精子类似的雄性印记?如果可以,利用这种孤雄单倍体干细胞代替精子注入卵母细胞能否得到正常的个体?再者,如果能够代替精子得到正常的个体,这种孤雄单倍体胚胎干细胞能否在体外进行基因改造后通过注射到卵细胞而省略常规基于二倍体胚胎干细胞的打靶技术需获得生殖系嵌入的小鼠这一步来获得遗传修饰的后代呢?

一系列的设想被提出之后,本研究组首先采用2种策略来获得小鼠的孤雄单倍体胚胎:(1)向去核的卵母细胞中注射成熟精子的头部;(2)将受精后获得的合子胚胎的雌原核去除。利用上述方案获得的重构胚胎只含有一套来自父系的遗传物质,即孤雄单倍体胚胎。它们能像正常胚胎一样发育到囊胚,从这些囊胚中能够分离建立胚胎干细胞系。然后,我们通过流式分选的方法检测建立的孤雄胚胎干细胞系是否存在单倍体细胞。令人惊喜的是,虽然大部分孤雄胚胎干细胞系是二倍体的,但是仍有部分细胞系存在单倍体细胞。通过流式富集的方法,最终我们得到了5株孤雄单倍体胚胎干细胞系(andro-genetic haploid embryonic stem cells, AG-haESCs)。这些细胞系能够在体外培养超过30代,通过定期流式分选富集的方法可以在体外维持单倍体细胞的存在。同时,我们证明这些AG-haESCs具有胚胎干细胞的基本特性,不仅能表达小鼠胚胎干细胞特异的多能性标志基因,而且能在体内外分化发育成各个胚层的细胞。

从理论上说,每个AG-haESC系来源于一个精

子,那么我们所建立的AG-haESCs是否仍保留着与精子相似的表观遗传特性?通过芯片表达谱分析、Real-time PCR以及bisulfite sequencing等手段,我们分析了AG-haESCs的印记基因的表达情况,发现AG-haESCs很大程度上仍维持着典型的父本印记。印记基因对于哺乳动物的胚胎发育起着重要的作用,在有性繁殖中只有父本和母本的印记都能正常表达,胚胎才能发育成正常的个体<sup>[13]</sup>。既然AG-haESCs能够保留这种典型的父本印记,那么这种AG-haESCs能否当成是一种可长期培养的“人造精子”通过类似于胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)的方法注射到卵细胞中,在父本和母本印记都正确表达的情况下,获得正常的小鼠呢?为此,研究组采用了改进的ICSI的方法——胞浆内孤雄单倍体胚胎干细胞注射(intracytoplasmic AG-haESCs injection, ICAHCI),将AG-haESCs注入到卵细胞获得重构的胚胎,这些胚胎能够在体外正常发育到囊胚,移到假孕母鼠的子宫内,也能够发育成健康的小鼠,称半克隆小鼠(semiclone mice, SC mice)。由此可见,AG-haESCs能够代替精子,使卵细胞成功“受精”,支撑小鼠胚胎的全程发育。有意思的是,这些半克隆小鼠均为雌性,这是因为在构建孤雄单倍体胚胎时,携带Y染色体的小鼠胚胎不能正常发育到囊胚<sup>[2,16]</sup>,因此不可能获得携带Y染色体的AG-haESCs。

相对于正常的ICSI技术获得健康小鼠的效率而言,孤雄单倍体胚胎干细胞这种“人造精子”进行ICAHCI获得半克隆小鼠的效率较低。可能存在的原因有:(1)AG-haESCs在结构和功能特性上与精子有很大的差别;(2)AG-haESCs与精子之间表观遗传特性也存在一定的差异。我们发现,虽然AG-haESCs维持着典型的父本印记,但是仍有部分印记发生了改变,例如雄性印记基因*H19*出现启动子区域低甲基化,从而导致该基因的过表达。另外,随着培养环境的变化与传代次数的增加,AG-haESCs的雄性印记也会出现不同程度的擦除<sup>[17-18]</sup>。而印记基因的表达异常最终会导致胚胎的畸形发育<sup>[19]</sup>。这些问题的出现不仅能帮我们理解自然受精之后遗传物质发生的早期表观修饰事件,同时也为我们如何提高AG-haESCs的精子特性以更高效率地获得半克隆小鼠提供了新的线索。利用ICAHCI获得半克隆小鼠,从观念上改变了人们所认为的只有精子才能



上图: 向去核的MII卵细胞中注入小鼠的精子, 得到只含精子基因组的重构囊胚, 并在体外建立孤雄单倍体胚胎干细胞系AG-haESCs; 下图: 将AG-haESCs阻滞在M期后, 将其注射到MII卵细胞中, 形成含有雌雄原核的受精卵, 最终发育成一个健康的半克隆小鼠。

Top: injection of sperm into enucleated oocytes generates haploid embryonic stem cells; bottom: AG-haESCs injected into oocyte support the production of live animals(SC mice).

图1 孤雄单倍体胚胎干细胞系的建立以及半克隆小鼠的获得

Fig.1 Generation of androgenic haploid embryonic stem cells(AG-haESCs) and semicloned(SC) mice

与卵细胞完成“受精”的传统思维, 我们的研究表明AG-haESCs同样具有“受精”能力。

AG-haESCs的成功建立, 不仅为大规模进行基因筛选提供了新材料, 而且为获得遗传修饰的动物模型开辟了新思路。传统的基因打靶都必须经历在胚胎干细胞中进行基因打靶、将打靶的胚胎干细胞注入囊胚获到嵌合体小鼠、嵌合小鼠通过生殖系遗传将打靶基因传递到下一代等步骤。其中, 获得生殖系遗传的嵌合小鼠是一个限速步骤, 使得整个基因打靶的周期变得漫长。如果在体外将AG-haESCs进行基因打靶操作, 然后利用ICAHCI的方法将其注入到卵细胞得到正常后代的话, 那么这种方法得到的后代均将带有遗传修饰的基因, 这将大大缩短了整个基因打靶的周期。因此, 我们和徐国良研究组将此设想付诸实践, 尝试着利用AG-haESCs进行基因敲除, 成功得到基因敲除的后代。不久以后, 周琪和赵晓阳团队也发表了他们利用孤雄单倍体胚胎干

细胞获得转基因小鼠的研究成果<sup>[20]</sup>。

AG-haESCs在基因打靶过程中缩短实验周期上具有一定的优势, 而另外一个更加诱人的运用将会在那些不能进行有效的嵌合体形成和生殖系传递的动物上得到体现, 例如灵长类大型动物。虽然灵长类的胚胎干细胞早已建立, 但是最新的研究显示这些胚胎干细胞不能有效形成嵌合体动物<sup>[21]</sup>。因此, AG-haESCs作为可以替代精子的“人造精子”, 能够在体外进行培养以及遗传操作, 并通过ICAHCI技术完成与卵细胞进行结合的使命(图1), 从而获得健康后代, 同时也实现遗传信息的有效传递, 为遗传修饰的更高效完成开辟了新的道路。

### 参考文献 (References)

- 1 Kaufman MH. Chromosome analysis of early postimplantation presumptive haploid parthenogenetic mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1978; 45: 85-91.
- 2 Latham KE, Akutsu H, Patel B, Yanagimachi R. Comparison of



- gene expression during preimplantation development between diploid and haploid mouse embryos. *Biol Reprod* 2002; 67(2): 386-92.
- 3 Modliński JA. Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus. *J Embryol Exp Morphol* 1975; 33(4): 897-905.
- 4 Tarkowski AK, Rossant J. Haploid mouse blastocysts developed from bisected zygotes. *Nature* 1976; 259(5545): 663-5.
- 5 Kotecki M, Reddy PS, Cochran BH. Isolation and characterization of a near-haploid human cell line. *Exp Cell Res* 1999; 252(2): 273-80.
- 6 Carette JE, Guimaraes CP, Varadarajan M, Park AS, Wuethrich I, Godarova A, *et al.* Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens. *Science* 2009; 326(5957): 1231-5.
- 7 Sukov WR, Ketterling RP, Wei S, Monaghan K, Blunden P, Mazzara P, *et al.* Nearly identical near-haploid karyotype in a peritoneal mesothelioma and a retroperitoneal malignant peripheral nerve sheath tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 202(2):123-8.
- 8 Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature* 2011; 479(7371): 131-4.
- 9 Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, O'Malley R, Demers SP, Vanhaelen Q, *et al.* Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9(6): 563-74.
- 10 Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science* 2009; 326(5951): 430-3.
- 11 Surani MA, Barton SC. Development of gynogenetic eggs in the mouse: Implications for parthenogenetic embryos. *Science* 1983; 222(4627): 1034-6.
- 12 Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984; 308(5959): 548-50.
- 13 Surani MA, Kothary R, Allen ND, Singh PD, Fundele R, Ferguson-Smith AC, *et al.* Genome imprinting and development in the mouse. 1990; 108: 89-98.
- 14 McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984; 37(1): 179-83.
- 15 Liu H, Krey LC, Zhang J, Grifo JA. Ooplasmic influence on nuclear function during the metaphase II-interphase transition in mouse oocytes. *Biol Reprod* 2001; 65(6): 1794-9.
- 16 Latham KE, Patel B, Bautista FD, Hawes SM. Effects of X chromosome number and parental origin on X-linked gene expression in preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 2000; 63(1): 64-73.
- 17 Rugg-Gunn PJ, Ferguson-Smith AC, Pedersen RA. Epigenetic status of human embryonic stem cells. *Nat Genet* 2005; 37(6): 585-7.
- 18 Rugg-Gunn PJ, Ferguson-Smith AC, Pedersen RA. Status of genomic imprinting in human embryonic stem cells as revealed by a large cohort of independently derived and maintained lines. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No. 2: R243-51.
- 19 Dean W, Bowden L, Aitchison A, Klose J, Moore T, Meneses JJ, *et al.* Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: Association with aberrant phenotypes. *Development* 1998; 125(12): 2273-82.
- 20 Li W, Shuai L, Wan H, Dong M, Wang M, Sang L, *et al.* Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature* 2012; 490(7420): 407-11.
- 21 Tachibana M, Sparman M, Ramsey C, Ma H, Lee HS, Penedo MC, *et al.* Generation of chimeric rhesus monkeys. *Cell* 2012; 148(1/2): 285-95.