

## 2N-4N 嵌合体小鼠及其在基因功能研究上的应用

周汝江<sup>1,2</sup>, 陈建泉<sup>1</sup>, 成国祥<sup>1\*</sup>, 胡以平<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>上海转基因研究中心, 上海 201203; <sup>2</sup>解放军第二军医大学细胞生物学教研室, 上海 200433)

**摘要:** 2N-4N 嵌合体是由二倍体 (2N) 的胚胎细胞 (或 ES 细胞) 与四倍体 (4N) 的胚胎细胞组构成的一种拯救型嵌合体。这种嵌合体由于 4N 胚胎细胞独特的胚外组织发育特性, 从而可获得完全源自 2N 细胞成份的仔鼠 (或胎儿)。这一特性最终在 ES 细胞转基因的基因功能研究中极具重要价值。综述了 2N-4N 嵌合体研究进展及其在基因功能研究领域的应用。

**关键词:** 2N-4N 嵌合体; 小鼠; 基因功能

**中图分类号:** Q813.819 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)01-19-07

小鼠 4N 胚胎的着床率虽高, 但发育至妊娠中期的胎儿(4N)往往出现典型的面颅部畸型, 且几乎不能发育至足月(development to term)。当以 4N 胚胎与 2N 的胚胎(或 ES 细胞)制作嵌合体时, 既可由 2N 胚胎细胞的存在拯救 4N 胚胎的发育, 又可因 4N 胚胎细胞独特的胚外组织发育特性, 对胚外组织发育功能缺陷的 2N 胚胎(或 ES 细胞)加以拯救。由此构成的 2N-4N 拯救型嵌合体(rescuing chimera), 4N 胚胎细胞几乎不参与胎儿组织的发育, 从而最终可获得完全源自 2N 胚胎(或 ES 细胞)的成活小鼠。

ES 细胞是一种全能性的干细胞, 以 ES 细胞介导的转基因方法制作嵌合体小鼠模型, 为基因功能的研究开辟了一条重要途径。当采用常规的 ES-2N(ES 细胞与 2N 胚胎嵌合)嵌合技术时, 因产生的后代为嵌合体, 一般需要经过繁琐的繁育后, 方可获得模型小鼠; 其次, 因单倍性不足(haploinsufficiency)引起的早期胚胎致死, 限制了对纯合子效应的进一步研究; 此外, 在研究胚外组织发育相关基因的功能缺失试验中, 经繁育得到的纯合子胚胎, 因着床或胚外组织发育缺陷, 而无法获得存活的纯合子小鼠。2N-4N 嵌合技术, 凭借其独有的优势, 可以克服 ES-2N 嵌合技术上存在的上述不足, 从而成为基因功能研究的另一个备择手段。

### 1 2N-4N 嵌合胚的制作

自然界, 哺乳动物自发产生 4N 胚胎的比率极低。在实验室条件下, 一般可由 2N 胚胎、经人工诱导(包括化学、生物及物理等方法)后, 获得胚

胎细胞基因型均一的纯合(homozygous)4N 胚胎。

细胞松弛素 B(CB)<sup>[1,2]</sup>可抑制胚胎细胞胞质分裂、而不影响核 DNA 正常复制, 从而可获得 4N 胚胎, 但有时却易出现 2N 与 4N 胚胎细胞的镶嵌(mosaic)现象<sup>[2]</sup>; 借助植物凝集素介导 4-cell 期胚胎细胞成对聚合<sup>[3]</sup>, 并以 45% 聚乙二醇促使其融合, 亦可获得 4N 胚胎, 但存在化学试剂对胚胎的毒性与发育阻滞性的问题; 灭活的仙台病毒虽可介导 2-cell 期胚胎细胞融合获得 4N 胚胎<sup>[4,5]</sup>, 但具有潜在的致病性; 显微注射法<sup>[6]</sup>制作 4N 胚胎, 对胚胎细胞的损伤较大, 故终效率极低; 电融合法制作 4N 胚胎<sup>[7]</sup>则是以电流破坏 2-cell 胚胎细胞间的质膜, 促使其融合形成 4N 胚胎。因电融合法操作程序简便, 经发育获得 4N 囊胚的比例较高<sup>[7,8]</sup>, 且同时克服了其他制作方法的不足, 故它是目前最可行的 4N 胚胎制作方法。

与常规嵌合胚的制作相似, 目前主要通过聚合法与显微注射法制备 2N-4N 嵌合胚。

正常 2N 小鼠的胚胎一般发育至 4-cell 期即发生极化(polarization), 到 8-cell 期后期, 由于胚胎细胞间的致密化(compaction)而连接紧密, 对其它来源细胞的粘附则下降, 因而在以聚合法制作嵌合胚(又称为聚合胚(aggregate))时, 一般选用未致密化的 8-cell 早期胚胎; 4N 胚胎因提前于 4-cell 后期发生致密化, 故选用 4-cell 早期的 4N 胚胎制作聚合

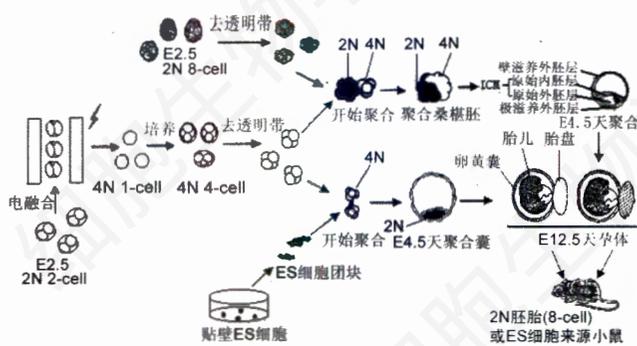


图1 2N(ES)-4N 聚合胚制作示意图 (自拼)

a) 胚胎型的 2N-4N 聚合胚制作中, 麻点与黑色部分实指同种胚胎。b) 胚胎型的 E12.5 天孕体中, 胎儿 (黑色部分) 与卵黄囊中胚层 (斜线部分内层) 为 2N 胚胎 (8-cell) 来源; 胎盘斜线部分) 与卵黄囊内胚层 (斜线部分外层) 为 2N 胚胎 (8-cell) 与 4N 胚胎来源细胞的嵌合分布; c) ES 细胞聚合得到的 E12.5 天孕体中, 胎儿 (黑色部分) 与卵黄囊中胚层 (斜线部分内层) 为 ES 细胞来源; 胎盘 (未着色) 与卵黄囊内胚层 (斜线部分内层) 为 4N 胚胎来源。

胚。在制作由 2N 胚胎细胞与 4N 胚胎细胞组构成的胚胎型 2N-4N 聚合胚时, 一般待透明带去除后, 可将完整的 2N 与 4N 裸胚以 1:1 组合直接聚合; ES 细胞 (或内细胞团 (ICM)) 与 4N 胚胎细胞组构成的 ES (ICM)-4N 聚合胚的制作, 则倾向于采用“三明治” (sandwich) 方式, 即在 2 枚 4N 裸胚中间夹 1 团 ES 细胞 (或 ICM) 来完成。聚合胚在体外培养至囊胚后, 移入受体子宫, 即可获得若干妊娠中、后期的孕体 (conceptus, 包括胎儿与胚外组织)、乃至成活仔鼠 (参照图 1)。囊胚注射法是另一种制作 ES (ICM)-4N 嵌合胚的方法, 采用显微注射法可直接将一定数量的 ES 细胞 (或 ICM 细胞) 注入 4N 胚胎囊胚腔, 移入受体子宫后同样可获得着床后孕体及仔鼠。

## 2 2N-4N 嵌合胚的发育

### 2.1 胚胎型 2N-4N 嵌合胚

2N-4N 嵌合胚的显著特性在于: 4N 胚胎来源的细胞具有胚外组织限制性的分布方式。最早, 在以单个 4N 胚胎细胞 (2N 2-cell 期胚胎经仙台病毒融合得到) 与单个 2N 2-cell 期胚胎细胞聚合的试验中, 所获发育足月的仔鼠中无一检测到任何源自 4N 胚胎的细胞<sup>[4]</sup>; 随后的研究表明, 4N 胚胎来源的细胞几乎存在于嵌合胚的胚外组织中<sup>[2]</sup>。

对 2N-4N 聚合胚的三维重构动态研究表明<sup>[9]</sup>, 聚合胚形成早期, 构成聚合胚的 2N 与 4N 两团细胞各自发生增殖, 但几乎不混杂。当发育至胚龄 3.5 天 (即

E3.5 天) 时, 囊胚腔形成后, 2N、4N 细胞开始出现混杂, 并且囊胚腔周围的壁滋养外胚层 (mural trophoectoderm, 缩写为 mTE)、极滋养外胚层 (polar trophoectoderm, 缩写为 pTE) 及内细胞团 (ICM) 三处细胞中始终有 4N 细胞的存在<sup>[10]</sup> (参照图 1), 其中以 mTE 中比例最高, ICM 中最低。4N 细胞的这种早期 mTE 的分布倾向, 可能是其在后续发育期发生限制性组织分布的主要原因之一。这种倾向性分布主要根源于 4N 胚胎细胞的染色体倍性, 而与聚合开始时 2N、4N 胚胎细胞的体积大小无关<sup>[10,11,12]</sup>。

晚期囊胚 (E4.5 天) 时, 4N 细胞在整个嵌合胚中所占的比例由 E3.5 天的 25.1% 降至 10.0%<sup>[13]</sup>, 其中 ICM 中由 21.0% 降至 13.3%, 滋养外胚层 (TE, 包括 mTE 及 pTE) 中由 26.8% 骤降至 8.2%。嵌合囊胚 ICM 中的 4N 细胞比例明显减少, 最可能的原因在于发生了针对 4N 细胞的负选择<sup>[13]</sup> (negative selection: 正常胚胎发育中的一种现象, 其分子机制可能在于不同胚层细胞间的信号识别机制存在着差异), 以致引起 4N 细胞的选择性凋亡或增殖能力丧失。TE 中 4N 细胞减少的比例高于 ICM 中, 其原因在于 TE 中 4N 细胞负选择的机制可能与 ICM 中有所不同, 或者由于 E4.5 天囊胚的 TE 细胞变大, 而造成统计上的误差。

由于受技术条件的限制, 对晚期嵌合囊胚 ICM 的原始内胚层 (primary endoderm, 又称下胚层) 和原始外胚层 (primary ectoderm, 又称上胚层) 中 4N 胚胎来源细胞的具体分布以及往后的动态变化, 目前仍尚未搞清。

嵌合胚发育至 E7.5 天, 形成的胚胎相对较小, 并且发育受到一定的阻滞; E12.5 天, 胎盘相对大而重, 而胎儿大小则与正常 2N 胚胎的相接近<sup>[14,15]</sup>。对这种发育变化的可能解释是: 由于在孕体水平上发生的负选择, 部分 4N 细胞可能并未完全自原始外胚层中排斥干净, 乃至影响到 E7.5 天胚胎的正常发育, 随着负选择的增强, 4N 细胞逐渐自胎儿组织中消除, E12.5 天胎儿的发育则恢复至正常; 部分形态异常的胎儿可能无法幸存于这种负选择, 而于 E7.5~E12.5 天间死亡。

James 等的研究表明<sup>[14]</sup>: 在 E7.5 天与 E12.5 天的 2N-4N 嵌合胚中, 4N 胚胎来源的细胞具有相似的胚外组织分布特性, 即主要分布至原始内胚层、TE 及其衍生的细胞系中, 如卵黄囊内胚层 (yolk sac endoderm) 与胎盘滋养层 (placenta trophobalst)。由

于4N胚胎细胞的平均体积要大于相同胚龄的正常2N胚胎细胞<sup>[16]</sup>,因而E12.5天的2N-4N嵌合胚的胎盘相对较重。嵌合胚中2N胚胎来源的细胞<sup>[14]</sup>,除主要分布至原始外胚层及其衍生的胎儿组织(embryo)、羊膜(amnion)、尿囊(allantois)及卵黄囊中胚层(yolk sac mesoderm)组织外,在原始内胚层及TE衍生的组织中往往也存在;到E12.5天,胎儿组织完全源自2N胚胎;胚外组织中,除羊膜、尿囊及卵黄囊中胚层外,一般多以2N与4N胚胎来源细胞的嵌合分布存在(见图1)。随着胎儿器官发生的接近完成(E13.5-E14.0天),4N胚胎细胞的这种发育(分布)模式一直贯穿于整个小鼠胚胎的后续发育过程,直至最终完全2N胚胎来源小鼠的出生。

## 2.2 ES-4N 嵌合胚

对ES-2N嵌合胚的研究表明,注入囊胚腔或与8-cell期胚胎细胞聚合后的ES细胞,通常能够分化形成包括生殖细胞系在内的所有嵌合体的组织细胞,但在不同细胞谱系之间的分配上却存在着较大差异。一般而言,ES细胞能够参与形成嵌合体原始外胚层细胞系的发育,但其参与原始内胚层与TE细胞系发育的潜能则有限<sup>[17]</sup>。在胚胎型的2N-4N嵌合时,4N胚胎细胞具有独特的原始内胚层与TE细胞系的倾向性分布(发育)特性,这种发育潜能恰好与ES细胞的参与原始外胚层细胞系的发育潜能相互补,将二者组构成ES-4N嵌合体,则可以更好满足胚胎完整发育的要求,并同时为4N胚胎的未能足月发育加以拯救。

Nagy利用D3ES细胞、 $\alpha$ ES细胞及囊胚ICM分别制备了ES-4N与ICM-4N聚合胚<sup>[18]</sup>。对E13.5天孕体的DNA原位杂交结果表明:胚外部分的胎盘滋养层及卵黄囊内胚层组织几乎完全源自4N胚胎,这一点与胚胎型2N-4N嵌合胚的胎盘等组织中(2N与4N胚胎来源细胞)的嵌合分布有所差异(见图1)。ES细胞来源的细胞不出现于上述胚外组织中,似乎表明ES细胞相对于2N胚胎细胞的发育全能性已有所不同,或者因为ES细胞与2N胚胎细胞以及ES细胞与4N胚胎细胞组成嵌合体时,其细胞相互作用的环境发生了变化。对出生后小鼠(均死亡)主要脏器的磷酸葡萄糖异构酶-1(GPI)分析证实,它们几乎完全源自ES细胞或ICM。

小鼠ES细胞通常是由囊胚期的ICM、经体外分化抑制培养获得的。当经历多次培养、传代乃至

遗传操作后,由于受一些不良因子(如培养基中的胎牛血清等)的影响,细胞的分化潜能,尤其是参与嵌合体生殖细胞系发育的能力可能会下降。但迄今为止,对于ES细胞的分化全能性与其生殖细胞系传递能力之间是否存在着平行关系,尚不明确。另外,在长期培养传代的ES细胞中,印迹基因(imprinted genes)的表达经常出现紊乱<sup>[19]</sup>,如父源表达的*Igf2*基因,在培养过程中,则可能因母源位点甲基化而导致母源表达,且这种甲基化后的表达模式可以经嵌合体体内分化后传递到后代“ES仔鼠”(完全ES细胞来源),由此将对动物的出生及出生后的表型产生诸多影响,如“胎儿过大综合征”等引起的出生困难或出生后死亡等。

鉴于最初ES-4N嵌合获得的ES仔鼠均于出生后死亡,而与该ES细胞系具相同基因型的ICM细胞产生的小鼠则可以存活<sup>[17]</sup>,Nagy改用了不同代次的及不同来源的ES细胞系制作ES-4N嵌合体,经研究发现<sup>[20]</sup>,所采用的4个ES细胞系中有3个能够着床发育,其中有2个能够发育至足月,但唯早期R1ES细胞系(14代以内)及其亚克隆的细胞(相当于原细胞系24代)产生的后代存活并发育至成年。后来,利用多次传代的TT2ES细胞系与4N胚胎(CB处理产生)聚合,Ueda也能获得存活至成年的、并可实现生殖细胞系传递的ES仔鼠<sup>[21]</sup>。从而在不同的ES细胞系之间,同一ES细胞系的不同代次之间以及相同基因型的ES细胞系与ICM细胞之间,它们分化形成ES-4N嵌合体个体组织的能力上确实存在着很大的差异,并且在因印迹基因表达异常的后遗传不稳定的问题上,它们之间的表现也有所不同。

此外,ES细胞来源小鼠品系的遗传背景也可能对出生后ES仔鼠的表型产生影响。Eggan<sup>[22]</sup>研究发现:近交系(小鼠)ES细胞系所获得的ES仔鼠出生时,往往出现诸如“呼吸窘迫”等不良表型;但当采用杂F<sub>1</sub>代(小鼠品系)ES细胞时,获得的ES仔鼠一般则无ES细胞核移植(克隆)小鼠出现的“胎儿过大综合征”。以B6129S6杂交F<sub>1</sub>代背景ES细胞获得的ES仔鼠为例,除了体重及红细胞比容与正常对照鼠略有差异外,该小鼠的主要形态、生理及行为特征均表现正常<sup>[23]</sup>。

## 3 2N-4N 嵌合技术在基因功能研究中的应用

因4N细胞独特的胚外组织分布方式,以及ES细胞与4N胚胎具有明显的发育互补性,使得2N-4N嵌合技术成为研究胚胎发育中胎儿与胚外组织基因功能的重要手段。特别当采用ES细胞介导中靶突变(targeted mutation)时,携有突变细胞的动物(或胚胎)将会出现一定的表型性状(phenotype),借助表型分析,我们有可能对机体内各种生化途径中相关基因的功能与调控问题进行系统的研究。

### 3.1 获得一般成活突变小鼠

通过DNA的同源重组以及ES-2N嵌合技术,可以获得所需的转基因小鼠模型。但目前该技术路线的障碍主要在于,当采用的ES细胞经过多次传代及多轮转染、筛选后,其参与生殖细胞系发育的能力往往显著下降,以至可能无法将突变基因传递至后代,从而得不到所需的转基因小鼠。采用未经转染的野生型(wide type)ES细胞与4N胚胎嵌合,一般可获得成活的、并可实现生殖细胞系传递的小鼠,故能否通过转基因的ES细胞与4N胚胎组构成ES-4N嵌合体,来获得完全源自突变ES细胞系的小鼠模型?实际上,通过该途径目前已成功实现了小鼠模型的制作。最早,Wang Zhao-qi<sup>[24]</sup>以4N胚胎囊胚腔注入中靶突变ES细胞的方法,获得了3只转*c-fos*基因小鼠,其中2只能够传递目的基因至后代;在获得的4只缺失Fos蛋白相关抗原1基因的模型鼠中,3只能够实现生殖系传递;此外,通过这种方法,Seibler也获得了定点打靶的Cre报告鼠(indicator mice),该小鼠在Cre-lox P诱导重组系统中发挥着重要作用<sup>[25]</sup>。

ES-4N嵌合体小鼠模型的优势在于:相对于ES-2N嵌合小鼠,ES-4N嵌合小鼠一般不混杂野生型2N或4N胚胎来源的细胞系,特别当采用等位基因双中靶突变的ES细胞时,所获得的动物则完全为中靶突变的纯合子,由此可以避免表型分析时野生型细胞的背景干扰。尽管这种纯合子的获得效率并不高,且具有明显的因ES细胞后遗传不稳定所带来的问题,但因为具有无需生殖细胞系传递的优点,从而可将模型鼠的获得时间由14个月缩短至4-6个月<sup>[23,25]</sup>。

但是为获得成活仔鼠,ES细胞涉及的突变必须不影响出生前胚胎(胎儿与胚外组织)的表型,即为胚胎非致死性突变,这样获得的动物方可能正常出生。嵌合体小鼠出生后,除直接供表型研究外,若中靶突变不涉及出生后的成体表型,则可待其活至

成年、经正常繁育后,继续供分析。此外,为避免ES细胞后遗传不稳定引起的小鼠异常表型,并由此减少这种异常表型对中靶突变表型分析产生的干扰,所用的ES细胞系最好为早期传代的、且具有良好的发育潜能。当然,杂交品系小鼠来源的ES细胞系则也可尝试使用。

### 3.2 获得经ES细胞系发育的妊娠早、中期胎儿

采用早期传代的ES细胞制作ES-4N嵌合体,尽管并不一定能够获得成活乃至生殖细胞系传递的小鼠模型,但却较易获得妊娠早、中期的胎儿。由此,我们可以在无需生殖系传递的等待以及经过繁琐的繁育(主要指ES-2N)的情况下,即可于短期内,获得关于该基因功能的基本信息,并同时降低所需实验小鼠群体的大小。近期,Kunath等结合ES-4N嵌合与最新的RNAi技术,实现了胎儿体内源性p120-Ras GTPase酶激活蛋白(*RasGAP*)基因的沉默<sup>[26]</sup>,并且其表型与以前报道的*Rasal*无义突变表型相一致。

利用ES-4N嵌合后胎儿的易获得性,还可以对无法实现生殖系传递的胎儿致死表型直接进行研究。对于预期致死的功能获得性显性突变(如转基因过度异位表达),则无需运用繁杂的条件或诱导打靶策略;对于功能丧失性突变,则可直接对ES细胞衍生的胎儿致死表型进行观察,由此可能揭示出该基因在胎儿细胞系发育中的一些基本功能。重要的是,在杂合子状态亦呈现致死效应(单倍性不足)的突变表型研究上,它提供了唯一研究基因纯合子效应的方法<sup>[27]</sup>。实际上,对VEGF参与胎儿血管发育功能的阐明,正是得益于对这种胎儿致死表型的研究。

此外,利用ES-4N嵌合胚着床后发育相对较高的特性,还可以对新建ES细胞系的发育潜能进行检验,并可筛选最适合作多轮基因转染的ES细胞。Nagy利用该项技术,筛选出发育潜能性较佳的R1 ES细胞系及其亚克隆细胞<sup>[21]</sup>,并同时证明,培养过程中ES细胞全能性的丧失只是局部性的。R1 ES细胞系目前已广泛应用于基因打靶实验,它极好的分化性能已被大量实验所证实<sup>[24,28,29]</sup>。

### 3.3 拯救胚外组织发育突变表型

在所有调控胚胎发育的功能基因中,有一类控制胚胎着床及胚外组织发育的基因,当它们发生突变(自发或诱导)时,由此形成的胚胎会丧失着床及着床后发育的能力。当以正常的4N胚胎与这类

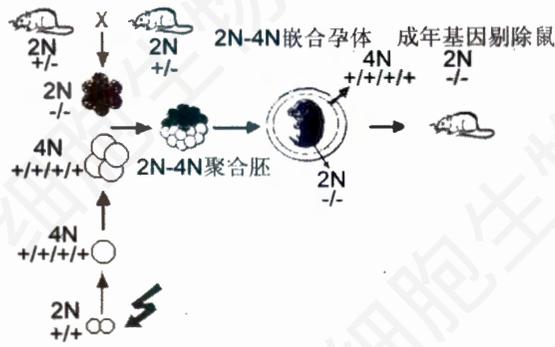


图2 “胚胎拯救法”示意图(引自文献30)

存在缺陷的胚胎(2N)聚合后,可以对后者的致死表型进行拯救,使之完成着床及后续发育,从而最终获得成活动物。

具体而言,在利用ES-2N嵌合技术研究胚外组织发育相关基因功能缺失的实验中,首先由不同的ES-2N嵌合组合(突变ES细胞与野生型胚胎嵌合,以及野生型ES细胞与突变杂合子胚胎嵌合)后获得嵌合胚表型的不同(前者正常,同时后者异常),我们即可初步确定这类基因在胚外组织发育中的功能;其次,在由杂合子交配得到纯合子小鼠时,等位基因双缺失的纯合子胚胎可能无法着床或表现胚外组织发育缺陷,从而无法获得出生后的纯合子动物。借助于基因分型(genotyping)与2N-4N嵌合技术,我们可获得由纯合子胚胎细胞与野生型的4N胚胎细胞所组成的2N-4N聚合胚,由此得到存活的纯合子小鼠<sup>[30]</sup>(见图2)。此外,对同样实验中获得等位基因双缺失的ES细胞,则也可直接于ES-4N嵌合后,获得成活纯合子小鼠。

在对哺乳动物囊胚滋养层的分化、演变过程中一些转录因子及细胞因子的功能研究方面,2N-4N嵌合技术具有其独到的优势与作用。通过这种特异的“4N胚胎拯救法”,Guillemet首先阐明了Mash-2基因在哺乳动物胚胎胚外组织发育中的关键作用<sup>[31]</sup>。其他如*Ets2*, *Estrrb*, *Hnf*, *Hand1*, *mK8*, *Brcal*, *FAK*, *Rb*, *TBP*, *Kinase-2*, *Keratin-8*等基因功能的研究也得益于这种技术体系<sup>[30,32-35]</sup>。很明显,本研究主要针对一些在胚外组织表达并发挥作用、而在胎儿组织不表达或无作用的基因,这样不会影响到胎儿表型。

### 3.4 以突变ES细胞系克隆模型小鼠

目前通过体细胞核移植获得克隆鼠的总成功率

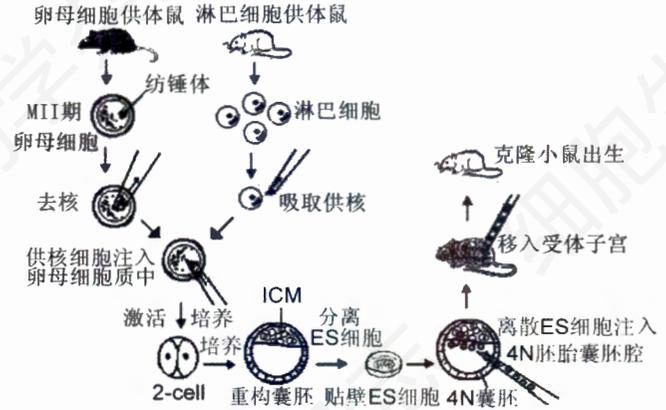


图3 “二步克隆法”示意图(自绘)

一般为1%~4%。同其他动物的克隆一样,问题主要在于供核细胞的重编程(reprogramming)不全或错误,导致绝大多数的克隆胚死于着床后发育早期,或者表现典型的胚外组织发育不全,如胎盘的结构异常等。此外,胚胎体外培养过程引起的印迹基因表达异常,造成大量克隆动物初生严重增加等发育畸形,这些因素均使得克隆动物的成活率急剧下降。

因ES细胞具分化全能性,而可能易于重编程,以ES细胞作供核细胞的核移植成功率相对体细胞要高得多。尽管如此,ES细胞克隆动物也往往面临体细胞克隆所遇到的大量问题,特别是采用ES细胞后遗传状态的不稳定,引起大量ES克隆鼠的难产及出生后异常<sup>[23]</sup>。

考虑到ES细胞作核移植存在的上述不足,Hochedlinger利用经改进后的两步克隆法<sup>[36]</sup>(见图3),最终获得了由高度分化的淋巴细胞克隆得到的个体,且成功率较高。其设想在于:(1)4N胚胎可能对克隆胚胎胚外组织的发育异常进行拯救;(2)采用ES细胞中介,使得重构胚(reconstructed embryo)基因组的激活可以不受时间制约,或者能够自培养的克隆囊胚中选择基因组已成功激活的细胞,从而最终对重编程有利。根据这一原理,在利用中靶突变的ES细胞进行核移植得到重构胚时,再引入4N胚胎与之组成2N-4N嵌合胚,有可能使得该途径获得ES仔鼠的成功率得到提高,而成为制作基因剔除动物模型的另一个有效途径。这些均有待进一步证实。

## 4 问题与展望

### 4.1 限制性分布机制的研究

尽管许多研究者对2N-4N嵌合体体内4N细胞的限制性组织分布的成因进行了探讨,但目前尚未形成统

一的结论。此外, Yuji Goto 等<sup>[37]</sup>获得的关于4N 胚胎细胞可能大量存在于嵌合胎儿组织的结论, 尚有待验证。在2N-4N 嵌合技术的实际应用中, 这一点有可能对完全2N 来源动物的得率产生不良影响。

#### 4.2 ES 细胞后遗传不稳定性的研究

目前, 利用ES-4N 嵌合技术(包括核移植程序)制备ES 仔鼠的主要障碍在于ES 细胞后遗传的不稳定, 以至大多数小鼠无法正常出生并活至成年<sup>[17, 19, 22, 38]</sup>, 从而使得成活模型小鼠的获得率偏低。采用ES-2N 嵌合技术, 则极少出现相应的后遗传不稳定所带来的后果, 其可能原因在于2N 胚胎中的部分细胞参与了胎儿组织的发育, 从而有可能对嵌合胎儿中印迹基因的表达异常进行了纠正。随着对胚胎干细胞研究的不断深入, 全新的ES 细胞分离、建系和遗传操作等技术的建立有望突破这一瓶颈。

ES-4N 嵌合技术获得存活小鼠的生殖系传递能力要高于ES-2N 嵌合技术, 这似乎意味着, 相同ES 细胞系在与2N 胚胎及4N 胚胎组构成嵌合体时, 其参与形成嵌合体生殖细胞系发育的能力上表现不同, 这种差异是否源于2N 及4N 胚胎细胞在诱导ES 细胞向生殖细胞分化机制上的不同? 我们目前尚不得而知。利用ES-4N 嵌合技术研究基因功能, 尽管存在着一定的优势, 但它仍不足以完全取代经典的ES-2N 嵌合方法, 只有将二者有机地加以结合以及整合上其它的一些功能研究手段, 我们对生物体基因组功能的认识才会更全面、更清晰。

#### 参 考 文 献

- [1] SNOW M H L. Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage [J]. *Nature*, 1973, **244**: 513 - 514.
- [2] TARKOWSKI A K, WITKOWSKA A, OPAS J. Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1977, **41**: 47 - 64.
- [3] EGLITIS M A. Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol [J]. *J Exp Zool*, 1980, **213**(2): 309 - 313.
- [4] GRAHAM C F. Virus assisted fusion of embryonic cells [J]. *Acta Endocr, Copenh Supp*, 1971, **153**: 154 - 165.
- [5] O'Neill G T, SPEIRS S, KAUFMAN M H. Sex-chromosome constitution of postimplantation tetraploid mouse embryos [J]. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1990, **53**: 191-195.
- [6] MODLINSKI A. Transfer of embryonic nuclei to fertilized mouse eggs and development of tetraploid blastocysts [J]. *Nature*, 1978, **273**(8): 466 - 467.
- [7] KUBIAK J Z, TARKOWSKI A K. Electrofusion of mouse blastomeres [J]. *Exp Cell Res*, 1985, **157**: 561 - 666.
- [8] JAMES R M, KAUFMAN M H, WEBB S, *et al.* Electrofusion of mouse embryos results in uniform tetraploidy and not tetraploid/diploid mosaicism [J]. *Genet Res Camb*, 1992, **60**: 185 - 194.
- [9] EVERETT C A, STARK M H, WEST J D, *et al.* Three-dimensional reconstruction of tetraploid-diploid chimaeric mouse blastocysts [J]. *J Anat*, 2000, **196**(3): 341 - 346.
- [10] EVERETT C A, WEST J D. The influence of ploidy on the distribution of cells in chimaeric mouse blastocysts [J]. *Zygote*, 1996, **4**(1): 59 - 66.
- [11] TANG P C, RITCHIE W A, WILMUT I, *et al.* The effects of cell size and ploidy on cell allocation in mouse chimaeric blastocysts [J]. *Zygote*, 2000, **8**(1): 33 - 43.
- [12] TANG P C, WEST J D. The effects of embryo stage and cell number on the composition of mouse aggregation chimeras [J]. *Zygote*, 2000, **8**(3): 235 - 243.
- [13] EVERETT C A, WEST J D. Evidence for selection against tetraploid cells in tetraploid-diploid mouse chimeras before the late blastocyst stages [J]. *Genet Res Camb*, 1998, **72**(3): 225 - 228.
- [14] JAMES R M, KLERKX A H M, KEIGHREN M, *et al.* Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid-diploid chimeras [J]. *Dev Biol*, 1995, **167**(1): 213 - 226.
- [15] JAMES R M, WEST J D. A chimaeric animal model for confined placental mosaicism [J]. *Hum Genet*, 1994, **93**(5): 603 - 604.
- [16] HENERY C C, KAUFMAN M H. Relationship between cell size and nuclear volume in nucleated red blood cells of developmentally matched diploid and tetraploid mouse embryos [J]. *J Exp Zool*, 1992, **261**(4): 472 - 478.
- [17] BEDDINGTON R S P, ROBERTSON E J. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo [J]. *Development*, 1989, **105**: 733 - 737.
- [18] NAGY A, GOCZA E, MERENTES DIAZ E, *et al.* Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse [J]. *Development*, 1990, **110**(3): 815 - 821.
- [19] DEAN W, BOWDEN L, AITCHISON A, *et al.* Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses association with aberrant phenotypes [J]. *Development*, 1998, **125**: 2273 - 2282.
- [20] NAGY A, ROSSANT J, NAGY Y, *et al.* Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells [J]. *PNAS*, 1993, **90**: 8424 - 8428.
- [21] UEDA O. Production of mice entirely derived from embryonic stem(ES) cell with many passages by coculture of ES cells with cytochalasin B induced tetraploid embryos [J]. *Exp Anim*, 1995, **44**(3): 205 - 210.
- [22] EGGAN K, AKUSTSU H, LORING J, *et al.* Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation [J]. *PNAS*, 2001, **98**(11): 6209 - 6214.
- [23] SCHWENK F, ZEVNIK B, BRUNING J, *et al.* Hybrid embryonic stem cell-derived tetraploid mice apparently normal morphological, physiological and neurological characteristics [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, **23**(11): 3982 - 3989.
- [24] WANG Z Q, KIEFER F, URBANEK P, *et al.* Generation of

- completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection [J]. *Mechanisms of Development*, 1997, **62**: 137 — 145.
- [25] SEIBLER J, ZEVNIK B, KUTER-LUKS B, *et al.* Rapid generation of inducible mouse mutants [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**(4): e12.
- [26] KUNATH T, GISH G, LICKERT H, *et al.* Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryonic recapitulates a genetic null phenotype [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(5): 559 — 561.
- [27] CARMELIET P, FERREIRA V, BREIER G, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele [J]. *Nature*, 1996, **380**(6573): 435-439.
- [28] KONDOH G. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 1999, **39**(3): 137 — 142.
- [29] HADJANTONAKIS A K, GERTSENSTEIN M, IKAWA M, *et al.* Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells [J]. *Mechanisms of Development*, 1998, **76**: 79 — 90.
- [30] KUPRIYANOV S, BARIBAULT H. Genetic control of extraembryonic cell lineages studied with tetraploid-diploid chimeric concepti [J]. *Biochem Cell Biol*, 1998, **76**(6): 1017 — 1027.
- [31] GUILLEMOT F, NAGY A, AUERBACH A, *et al.* Essential role of Mash-2 in extraembryonic development [J]. *Nature*, 1994, **371**(6495): 333-336.
- [32] WUL, DEBRUIN A, SAAVEDRA HI, *et al.* Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development and viability [J]. *Nature*, 2003, **421**(6926): 942 — 947.
- [33] HOBBS N K. Removing the vertebrate-specific TBP N terminus disrupts placental beta2m-dependent interactions with the maternal immune system [J]. *Cell*, 2002, **110**(1): 43 — 54.
- [34] MISHINA Y, CROMBIE R, BRADLEY A, *et al.* Multiple roles for activin-like kinase-2 signaling during mouse embryogenesis [J]. *Dev Biol*, 1999, **213**(2): 314 — 326.
- [35] JAQUEMAR D, KUPRIYANOV S, WANKELL M, *et al.* Keratin 8 protection of placental barrier function [J]. *J Cell Biol*, 2003, **161**(4): 749 — 756.
- [36] HOCHEDLINGER K, JAENISCH R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells [J]. *Nature*, 2002, **415**: 1035 — 1038.
- [37] GOTO Y. Developmental potential of mouse tetraploid cells in diploid-tetraploid chimeric embryos [J]. *Int J Dev Bio*, 2002, **46**: 741 — 745.
- [38] HUMPHERYS D, EGGAN K, AKUTSU H, *et al.* Epigenetic instability in ES cells and cloned mice [J]. *Science*, 2001, **293**(6): 95 — 97.

## Diploid-tetraploid Chimera Mouse and Its Applications in the Study of Gene Function

ZHOU Ru Jiang<sup>1,2</sup>, CHEN Jian Quan<sup>1</sup>, CHENG Guo Xiang<sup>1\*</sup>, HU Yi Ping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Shanghai Transgenic Research Center, Shanghai 201203, China; <sup>2</sup>Research and Teaching Institute of Cell Biology, Department of Basic Medicines, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract:** As a specific type of rescuing chimerism, diploid-tetraploid aggregation approach usually results in pure animals derived predominantly from diploid component, which fulfills its wide application in gene expression and control research. This review hereby summarizes current diploid-tetraploid research progresses and its possible applications in gene function, meanwhile, the relevant prospective has also been envisaged objectively.

**Key words:** diploid-tetraploid chimera mouse; gene function

\*Corresponding author with email address: chenggx@cngeneon.com