

家兔供体细胞的发育周期与重构胚发育的关系

郝 茹 王玉阁¹ 张正旺 杜 森^{1*}

(北京师范大学生命科学院, 北京 100875; ¹中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100080)

摘要 采用血清饥饿法处理体外培养的兔子胎儿成纤维细胞, 并将其作为供体细胞移入去核卵母细胞内构建重构胚胎。检查供体细胞的细胞周期对重构胚的融合率、分裂率和着床率的影响。实验结果表明: 培养基中血清含量在 0.5% 的情况下, G_0/G_1 期的细胞比例由正常培养条件下(培养液中含有 10%FCS)的 73.2% 明显地增加到 86% 以上。饥饿 1~3 天的细胞作为供体细胞构建重构胚时, 可明显提高重构胚的融合率, 但是不同的饥饿时间其融合率并无显著的差异。饥饿处理可明显增加重构胚的分裂率, 以饥饿处理 3 天为最佳。

关键词 胎儿成纤维细胞; 体细胞核移植; 供体细胞; 血清饥饿; 兔

细胞核移植技术是研究核质关系和细胞核基因组分化与去分化的重要手段之一。近几年相继产生了多种细胞类型为供核细胞的克隆后代, 特别是最近获得了分化程度很高的淋巴细胞^[1]和神经细胞^[2]作为供核细胞的克隆小鼠。

但是, 克隆动物的成功率仍然非常的低, 大约为 1%~2%^[3,4]。通过对鼠^[5]、牛^[6]和羊^[7]等胚胎细胞核移植的研究证明: 将供核细胞移入去核的 MII 期卵母细胞中, 重构胚胎的发育率比较高。其原因可能是在成熟的卵母细胞中有多种因子使供体细胞易于去分化。除了作为受体的卵母细胞的发育状态是重构胚正常发育的重要影响因素外, 适合的供体细胞的发育周期也是影响重构胚胎正常发育的重要因素之一, 同时供体细胞的发育周期也是保证克隆胚胎的正常分裂和细胞中染色体完整的基础^[8]。另一方面重构胚的激活与卵母细胞或重构胚胎细胞中的一些细胞因子的降解和转录有关, 这些因子是胚胎开始发育的信号; 也是供核基因组的去分化和重新编程的起始点^[8]。

对供体细胞发育周期的研究已有很大进展, 现已证明 G_0 期^[9]、 G_1 期^[9]和 M 期^[10]的细胞均可以作为供核细胞, 并获得正常的克隆动物。供体细胞的发育周期的控制可通过多种方法: 如低血清饥饿法、接触抑制法和化学药品抑制法。Wilmut 等^[3]于 1997 年报道用血清饥饿法(serum starvation)控制供体细胞的发育周期, 使其停止在 G_0 期, 获得了重构胚胎的克隆后代 Dolly。但是, Cibelli 等^[11]在 1998 年进行

的体细胞克隆牛中发现: 用正常培养(未经饥饿处理)的细胞进行克隆的重构胚胎, 其发育率和囊胚率以及重构胚胎的出生率都与供体细胞经过饥饿处理的比率相似。接触抑制法指细胞在体外培养生长至互相接触状态时, 由于细胞间紧密的接触, 导致细胞停止分裂而进入 G_0 期。化学药品抑制法的研究包括: 含羞草酸(mimosine), 可以将细胞同步在 G_1 期, 有效地将猪乳腺细胞中 G_1 期的细胞比例从 67% 提高到 79%~82%^[12]; 秋水仙素(colchicine)可将在体外培养的猪乳腺细胞 G_2/M 期细胞比例由 13% 提高到 27%~37%, 将猪的胎儿成纤维细胞 G_2/M 期细胞比例由 17% 提高到 37%^[13]等。

兔子由于其免疫系统与人类很相似, 一直是克隆研究的重要实验动物, 但是到目前为止, 只有一例体细胞克隆兔成功出生^[14]。除中国外, 还有日本^[15]、美国^[16]和西班牙^[17]等多个国家的实验室也在进行兔子的克隆工作。对尚未建立胚胎干细胞系的物种来说, 胎儿成纤维细胞是一种比较理想的供体细胞。本课题主要研究在兔子克隆过程中供体细胞(胎儿成纤维细胞)在体外经不同天数血清饥饿培养处理后作为供核细胞, 对重构胚的融合率、分裂率和着床率(体内发育)的影响。

收稿日期: 2004-04-22 接受日期: 2004-06-08

国家重点基础研究发展项目(973 计划)(No. 2000016107)和中国科学院知识创新项目(No. KSCX2-SW-303)资助

* 通讯作者。Tel: 010-62555140; E-mail: dumiao@263.net

1 材料与方法

1.1 兔子胎儿成纤维细胞的培养

成熟青紫蓝雌兔经自然交配后, 在无菌条件下, 取出 13 天的胎儿, 去除内脏、四肢和头部, 用胰蛋白酶消化分离细胞, 然后培养在含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养液中。根据细胞的生长情况进行细胞传代, 在传到 6~7 代时, 以相同密度接种, 在细胞长到 70%~80% 满时, 将细胞培养液换用含 0.5%FBS 的 DMEM/F12 培养液中饥饿培养, 两天换一次液。

1.2 流式细胞仪检测

用胰蛋白酶消化的方法, 收集未经饥饿的细胞和饥饿 1、2 和 3 天的细胞, 酒精固定, 溴化乙啶 (PI) 染色后在 0.5 h 内用流式细胞检测仪 (BD 公司) 检测细胞的发育周期情况。

1.3 细胞核移植

成熟的雌性新西兰白兔经 FSH 和 HCG 超数排卵处理, 收集成熟的卵母细胞。用透明质酸酶去除颗粒细胞, 然后在含有 7.5 $\mu\text{g/ml}$ CB 的 M2 手术液中去核, 将不同天数血清饥饿培养处理的供核细胞移入去核卵母细胞的透明带中。电刺激方法将供核细胞与去核卵母细胞融合, 所得的重构胚用 6-DMAP 激活, 体外培养 24 h 后, 检查重构胚胎的分裂情况, 然后将已分裂的重构胚胎移植到继母体内发育, 待到第 17~18 天时剖腹检查重构胚的体内发育情况。

1.4 数据处理

实验结果用 SPSS 软件进行 ANOVA 和 LDS 多重比较检验。

2 结果

2.1 饥饿处理对 G_0/G_1 期细胞比例的影响

本实验中, 胎儿成纤维细胞培养在 38 $^{\circ}\text{C}$ 、5%

CO_2 的培养箱中, 培养基为含 10%FBS 的 DMEM/F12, 待细胞长满后进行传代。细胞传到 6~7 代时, 进行分组试验。试验共分为 4 组: 第 1 组是正常生长的细胞, 细胞在含 10%FBS 的培养液中长到 60%~70% 满时收集细胞。第 2、3 和 4 组分别是当细胞长到 60%~70% 满时, 将培养液中的血清含量降为 0.5%, 然后继续培养 1、2 和 3 天, 分别收集细胞, 然后用流式细胞仪进行分析 (图 1), 每组各有 (5~9) 次重复。4 组不同天数饥饿处理的细胞中 G_0/G_1 期的细胞平均比例分别是: 73.20% (图 1A)、86.65% (图 1B)、92.05% (图 1C) 和 91.04% (图 1D) (表 1)。用线性回归和单因素方差分析表明: 饥饿与未饥饿培养的细胞的 G_0/G_1 期细胞比例差异极显著 ($P < 0.01$), 由正常培养的 73.20% 上升到 86.65% 以上。而饥饿培养 1、2 和 3 天的细胞 G_0/G_1 期细胞比例无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.2 饥饿处理对重构胚胎的融合率的影响

由于饥饿处理对兔子胎儿成纤维细胞的细胞周期影响很大, 所以我们分别用不同饥饿时间的细胞为供核进行了大量的核移植实验, 结果如表 2 所示: 正常培养细胞的融合率为 70.7%, 饥饿培养 1、2 和 3 天的融合率分别是 84.7%、83.9% 和 83.6%。单因素方差分析和多重比较显示: 饥饿处理可极显著增加重构胚的融合率 ($P < 0.01$), 但是不同的饥饿时间对重构胚的融合率并无明显的影响 ($P > 0.05$)。

Table 1 Average percentage of G_0/G_1 cells in culture treated with/without serum starvation

Duration of serum starvation (day)	Number of repeat	Average percentage of G_0/G_1 cells
0	9	73.20%
1	9	86.65%
2	5	92.05%
3	5	91.04%

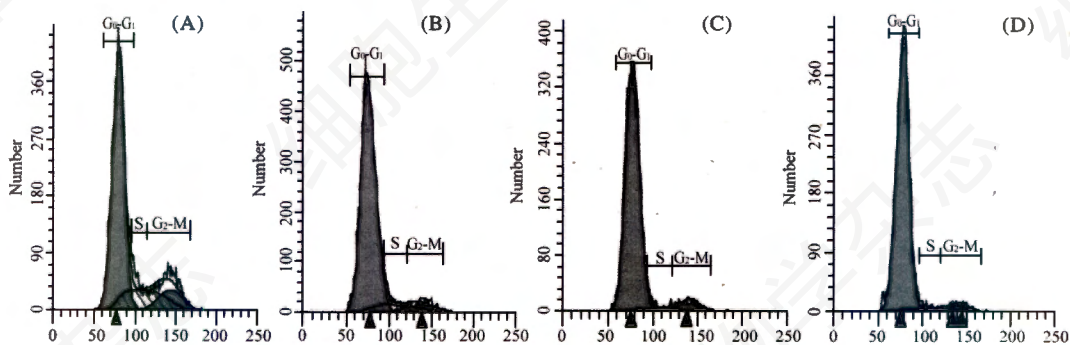
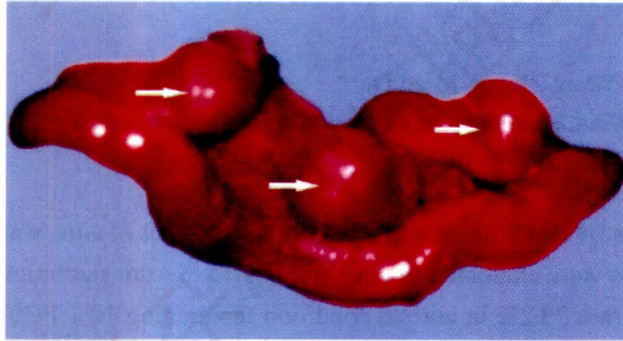


Fig.1 Flow cytometer graph

A: no starvation (control); B: starvated one day; C: starvated two days; D: starvated three days.

Table 2 Effects of the serum-starvation of donor cells on the development of reconstructed embryos

Duration of serum starvation (day)	Number of reconstructed embryos	Fusion rate (%)	Division rate (%) (at 24 h cultured <i>in vitro</i>)	Implantation rate(%)
0	485	343/485(70.7)	48/343(14.0)	2/48(4.2)
1	288	244/288(84.7)	101/244(41.4)	16/101(15.8)
2	1204	1014/1204(83.9)	507/1014(50.0)	4/507(0.8)
3	67	56/67(83.6)	50/56(89.3)	4/50(8.0)

**Fig.2** Three of implantation positions indicated by arrow in one side of the uterus

2.3 饥饿处理对重构胚早期发育的分裂率和着床率的影响

饥饿处理使大部分(86%以上)的培养细胞处于 G_0/G_1 期,然后移入去核的卵母细胞中,经激活后,重构胚胎培养在M16中。经不同方式处理供核细胞,重构胚胎在体外的分裂率不同。24 h 重构胚胎体外培养结果表明:不经饥饿处理,正常培养的培养细胞为供核的重构胚的分裂率只有14.0%;而饥饿处理1、2和3天的细胞为供核的重构胚的分裂率分别为:41.4%、50.0%和89.3%。饥饿处理明显增加重构胚胎的分裂率,以饥饿处理3天为最佳($P < 0.01$)。供核细胞饥饿处理对重构胚胎的着床率无规律性影响,饥饿处理1天的供核细胞获得的重构胚胎的着床率高于其他3组。但是,各组之间的着床率差异较大,无法进行有统计学意义的比较(表2)。着床情况如图2所示。

3 讨论

血清饥饿处理可将大部分培养细胞的细胞周期调整到 G_0 期^[13]。 G_0 期的细胞核可能对体细胞克隆胚胎的发育有利^[3]。但也有研究结果证明: G_1 期的细胞和未经饥饿培养处理的供核细胞,同样可用于克隆研究,并获得正常的克隆动物^[9,11]。我们实验室曾用处于M期的细胞为供核获得克隆羊^[10]。兔子的克隆工作被认为是一个比其他动物(如牛,羊)的克隆难度要大一些,至今,只有一例兔子克隆成功的

报道^[14]。目前大部分的研究工作都集中在对卵母细胞的激活^[15],供核细胞类型和细胞周期以及重构胚胎的去甲基化和重新编程的研究中^[16,17]。

在体外正常培养的兔子胎儿成纤维细胞的 G_0/G_1 期细胞比例为73.2%,饥饿处理后, G_0/G_1 期细胞比例增加到86%以上。饥饿培养2~3天,可将 G_0/G_1 期细胞比例增加到90%以上。这有利于(在克隆过程中)选择 G_0/G_1 期细胞为供核细胞。并且,饥饿处理可以提高供重核胚的融合率和分裂率。这是因为在体外的培养细胞经饥饿处理后, G_0 期细胞的比例增加,细胞中的蛋白质合成减少,这有利于重构胚胎细胞的染色体浓缩和原核的形成,从而有利于重构胚胎的早期发育和体内发育^[13]。

我们将706个重构胚胎移植到71只寄母中。对着床点的观察是在重构胚胎移植后的第17天左右,将寄母兔剖腹,检查克隆胚胎的着床情况。发现其中的13只继母的子宫共有26个着床点,着床点最多的两只继母各有4个着床点。对部分着床部位进行解剖发现有胎盘。这证明了我们的兔子克隆技术路线和显微操作是可行的;也表明,兔子本身的妊娠生理或卵母细胞的激活等都与兔子克隆的成功有关,相关的研究工作正在进行中。

感谢李光三先生和牛文光先生在试验中给予的帮助;感谢邹贤刚博士在试验工作和文稿修改中的细致指导。感谢北京大学医学院柳林老师和北京中医研究院李玉梅老师协助使用流式细胞仪。

参考文献 (References)

- [1] Hochedlinger K *et al. Nature*, 2002, **415**: 1035
- [2] Li J *et al. Nature*, 2004, **428**: 393
- [3] Wilmut I *et al. Nature*, 1997, **385**: 810
- [4] Wakayama T *et al. Nature*, 1998, **394**: 369
- [5] McGrath J *et al. Science*, 1983, **220**: 1300
- [6] Robl JM *et al. J Anim Sci*, 1987, **64**: 642
- [7] Willadsen SM *et al. Nature*, 1986, **320**: 63
- [8] Campbell KH *et al. Rev Reprod*, 1996, **1**: 40
- [9] Kasinathan P *et al. Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 1176
- [10] Zou X *et al. Mol Reprod Dev*, 2002, **61**: 164
- [11] Cibelli JB *et al. Science*, 1998, **280**: 1256

- [12] Prather RS *et al.* *Cloning*, 1999, **1**: 17
[13] Boquest AC *et al.* *Biol Reprod*, 1999, **60**: 1013
[14] Chesne P *et al.* *Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 366
[15] Tsunoda Y *et al.* *Methods Mol Biol*, 2004, **254**: 195
[16] Dinnyes A *et al.* *Biol Reprod*, 2001, **64**: 257
[17] Cervera RP *et al.* *Zygote*, 2003, **11**: 151

The Relationship of the Rabbit Somatic Donor Cells at Different Cell Cycle and the Development of Nuclear-transferred Embryos

Ru Hao, Yu-Ge Wang¹, Zheng-Wang Zhang, Miao Du^{1*}

(College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; ¹Institute of Genetic and Developmental Biology, Chinese Academia Science, Beijing 100080, China)

Abstract Cell cycle of rabbit fetal fibroblast cells treated with or without serum starvation *in vitro* was analyzed by flow cytometer and nuclear-transferred embryos were examined *in vitro* and *in vivo*. Serum starvation could remarkably increase the percentages of G₀/G₁ stages from 73.2% in normal condition (containing 10% FCS) to above 86%, but there were no significant difference among serum starvation for 1, 2 and 3 days. Donor cells treated with different culture time were fused into enucleated oocytes. And the fusion rate between donor cell and enucleated oocyte, division rate of reconstructed embryos cultured *in vitro* and implantation rate of reconstructed embryos *in vivo* were compared, in which showed that: serum starvation could significantly increase the fusion rate, division rate and embryo implantation rate; donor cells starved for 1 day or more could largely increase the fusion rate and division percentage, starved for 1 days could increase the reconstructed embryo implantation rate *in vivo*.

Key words fetal fibroblast cells; somatic nuclear transfer; donor cells; serum starvation; rabbit

Received: April 22, 2004 Accepted: June 8, 2004

This work was supported by the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2000016107) and Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (No.KSCX2-SW-303)

*Corresponding author. Tel: 86-10-62555140, E-mail: dumiao@263.net