

细胞核重新编程的研究进展

王凌燕 张学明 岳占碰 李德雪 李子义*

(吉林大学畜牧兽医学院动物胚胎工程吉林省重点实验室, 长春 130062)

摘要 细胞核重新编程是哺乳动物正常胚胎和克隆胚胎发育的关键性因素, 主要表现为表观遗传学上变化。在受精卵形成和发育过程中, 基因组的甲基化状态和组蛋白的结合形式均发生改变; 在核移植产生的克隆胚胎中, 供体细胞核也会经历核膜破裂、早熟染色体凝集等变化, 重新获得分化的潜能而发育为正常的克隆动物。同时存在多种因素影响重新编程的进行。现对哺乳动物细胞核重新编程的研究进展进行综述, 以为该领域进一步的探索提供借鉴。

关键词 重新编程; 细胞核; 克隆; 哺乳动物

细胞核重新编程(reprogramming)主要是指表观遗传学(epigenetic)水平上的变化, 即非基因序列改变所导致的基因表达水平的变化, 如 DNA 甲基化和染色质构象变化等。基因组的表观遗传学变化可发生在细胞发育潜能改变的各个阶段。受精作用后父源基因组便发生 DNA 甲基化和组蛋白修饰; 而母源基因组却表现得相对稳定。近年来哺乳动物体细胞克隆发展十分迅速, 但克隆效率仍然很低。核移植后供体核基因组经历了一系列的变化, 研究发现供体核的完全重新编程是克隆胚胎正常发育的关键。本文仅对正常受精胚胎及克隆胚胎细胞核重新编程的研究进展进行综述, 为进一步研究其机制提供理论依据。

1 受精卵形成和发育过程中细胞核的重新编程

1.1 受精卵中的 DNA 甲基化

DNA 甲基化是哺乳动物胚胎着床前发生的一重要的核重新编程的事件。受精作用完成后, 精子染色质结合的鱼精蛋白立即被组蛋白代替; 而母源基因组完成减数分裂, 由 2 倍体变为 1 倍体。利用免疫荧光化学和特定基因序列亚硫酸化技术^[1]对基因进行分析, 发现父源基因组在结合组蛋白后呈现广泛的 DNA 去甲基化, 这种去甲基化一般在父源原核的 DNA 复制开始前完成。当然基因组中仍存在一些保存甲基化的区域, 如着丝粒附近的异染色质^[2]、IAP(Intracisternal A-particle)反转录转座子(retrotransposon)^[3]和父源甲基化印迹基因, 这些都需要保持甲基化才能维持正常染色质的稳定、抑制 IAP 转座(transposition)及保护

亲本印迹。

不同动物受精卵去甲基化的情况存在差异。用免疫荧光化学对小鼠、大鼠、猪、牛和人^[3]的受精卵研究证明, 父源 DNA 均发生去甲基化。但绵羊与上述动物略有不同^[4], 其父源原核甲基化程度高于小鼠和人, 但母源原核甲基化水平仍然较低。近来学者研究发现交配后, 小鼠受精卵的父源原核在 10 h 后完成去甲基化, 而大鼠在 16 h 后仍未完成^[5]。另外由于配子甲基化的起始水平、基因组中不同序列的去甲基化数量以及免疫荧光的敏感性和饱和性不同, 采用不同的方法研究 DNA 去甲基化状态会得到不同的结果。在兔用免疫荧光化学就无法区分胚胎着床前的发育中是发生主动去甲基化还是被动去甲基化; 但研究序列亚硫酸化却可为去甲基化提供依据^[6]。

父源基因去甲基化的机制和功能目前尚不清楚。卵母细胞胞质中可能存在某种去甲基化因素, 能专一作用于或专一不作用于父源基因的某段序列。卵母细胞胞质能诱导 DNA 去甲基化而促使父源基因发生重新编程。多种动物的父源基因早于母源基因实现转录激活, 说明父源 DNA 的去甲基化可能是正确激活并转录胚胎基因所必需。并且胚胎基因活化较早的动物均表现出较为广泛的受精卵去甲基化^[7]。DNA 去甲基化是由特定的生殖基因转为胚胎全能性基因过程的一部分, 但父源基因组中具体哪些基因需要去甲基化尚须做进一步的研究。

收稿日期: 2007-02-05 接受日期: 2007-05-28

国家自然科学基金(No.30671510)、吉林大学引进优秀人才科研启动基金资助项目

* 通讯作者。Tel: 0431-87836187, E-mail: ziyili@jlup.edu.cn

1.2 受精卵中组蛋白的修饰

受精时母源染色质已经完成了蛋白质的修饰,包括核酸组蛋白的活化和抑制染色质相关蛋白质结构的形成^[8]。与父源染色质结合的组蛋白乙酰化程度较高,并且DNA一旦与组蛋白结合,H3K4me1、H3K9me1、H3K27me1便可被检测出来^[9,10],而这时父源DNA仍处于甲基化状态。目前尚不清楚是否是这些早期标记保护了特殊区域(如着丝粒)免于去甲基化。对同一氨基酸残基可产生不同修饰(乙酰化、甲酰化等),但发生在基因组的不同部位。

1.3 DNA甲基化与组蛋白修饰之间的关系

在脉孢菌和拟南芥中,H3K9me通过HP1同系物之间的介导而成为DNA甲基化的信号,并且DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, Dnmt)在标记区域实现募集^[11]。在对拟南芥的研究中,虽然很难排除翻译的间接控制,但DNA的甲基化的确可以引起组蛋白的甲基化。在体外DNA甲基缺失的胚胎干细胞中其组蛋白甲基化状态的改变也不大。假设体内也存在这种关系,那么也可能仅局限在特定的基因区域或特定的发育阶段^[12]。而对小鼠研究发现,很多基因的甲基化对组蛋白的乙酰化有较大影响,主要表现为抑制作用^[13]。DNA甲基化与组蛋白修饰之间的关系可能受发育的调控,并与发育阶段、细胞类型和基因区域有关,但目前该领域还有很多问题等待解决。

1.4 受精卵发育到囊胚阶段细胞核的重新编程

受精卵发育到囊胚阶段,DNA甲基化和组蛋白修饰会发生进一步的变化。DNA甲基化程度随卵裂的进行而降低,这一降低是由于DNA的不断复制,结果会产生姊妹染色单体的不平衡甲基化。卵母细胞原有的Dnmt1(Dnmt1 from oocyte, Dnmt1o)随DNA去甲基化而在卵裂的前三个阶段便离开核。尽管DNA许多不同序列在这一阶段去甲基化,但印迹基因仍保持原有状态,可能是因为Dnmt能专一识别保存甲基化的区域。Dnmt1o仅在8-细胞阶段入核,这可能是维持印迹基因甲基化状态所必需。到目前为止,这一阶段DNA甲基化的改变还没有在哺乳动物以外的生物中发现,也许这是哺乳动物所特有的性质。

在DNA被动去甲基化时,组蛋白如何进行重组目前尚不清楚。对小鼠研究发现H3K4me、H3K9me、H3K27me并没有全部被替换^[9]。但在牛胚胎中,主要基因活化之前异染色质组蛋白甲基化和H3K9乙酰化均先降低后又增加^[14]。很多暂时性的组蛋白标记

(如磷酸化和精氨酸甲基化)在小鼠胚胎细胞周期中发生了许多变化^[15],这些变化可能是由DNA复制而不是由重新编程引起的,但这些都与分化细胞调控细胞周期的标记有何不同,有待进一步研究。

2 克隆胚胎细胞核的重新编程

2.1 克隆胚胎细胞核重新编程过程中的形态学变化

克隆过程中细胞核重新编程的第一个明显表现是核移植后体细胞核膜的破裂(nuclear envelope break down, NEBD),这一过程一般发生在核移植后30 min内^[16]。卵母细胞成熟之前,其胞质没有指导核膜破裂的能力。核膜破裂不完全将阻碍核重新编程相关事件的发生,但却不妨碍如H₁组蛋白交换之类的其他事件发生。如果卵母细胞或受精卵胞质没有得到有效地活化,将导致向去核受精卵植入核后的发育失败。

第二个与核重新编程相关的显著事件是体细胞染色体因暴露于M阶段卵母细胞胞质而发生早熟染色体聚集(premature chromosome condensation, PCC),这与卵母细胞成熟过程中发生的染色体聚集相似。目前认为,PCC可促进多种哺乳动物核移植后的重新编程,但有学者报道PCC并不是牛体细胞核移植后基因重新编程所必须^[17]。

染色体聚集成新的纺锤体形式之后,卵母细胞开始活化,组合的染色体完成类似第二次减数分裂的分裂。然而,供体细胞基因组处于G₁阶段,而受体细胞处于减数分裂M II期,没有机制保证复制的同源染色体正常配对,也没有机制保证它们将被平均分配。结果在最后的分裂过程中(假设允许极体分离),极体和卵母细胞可任意分到0~40个染色体^[18],并且分到极体和卵母细胞的染色体可能是母源和父源染色体的任意组合。但克隆必须保持二倍体的完整性,因此应阻止极体的排出,而使活化后的卵母细胞内出现两个原核。克隆胚胎中两套基因的成功组合与正常受精胚胎一样都发生在第一次有丝分裂之前。

克隆胚胎的两个原核与单性生殖及正常受精胚胎的原核相似,但可能存在不同起源染色体的随机分离,这也是克隆胚胎和正常胚胎的主要区别。正常受精胚胎将不同起源的染色体分在两个原核中,两原核在转录、DNA甲基化和组蛋白修饰方面存在差异^[19]。基因表达的任何限制都可能产生受精卵中父源和母源染色体修饰的不同,而这些限制因素可能在

克隆胚胎中消失。

2.2 克隆胚胎细胞核重新编程过程中的分子生物学变化

卵母细胞胞质活化后, Dnmt 发挥作用, 开始基因组的去甲基化。但体细胞 Dnmt 在克隆胚胎中的表达与正常胚胎差异很大^[20]。一般体外培养胚胎的 DNA 甲基化水平要比体内正常胚胎高^[5]。狨猴大部分的 2- 细胞期和 4- 细胞期的克隆胚胎中, DNA 甲基化水平高于体外受精胚胎, 去甲基化过程一直持续到桑椹胚阶段, 并且克隆囊胚的内细胞团一直维持较高的甲基化水平^[21]。这种基因组不正常的去甲基化会导致着床前克隆胚胎的发育不良, 从而直接影响克隆动物的出生率。许多核移植产生的克隆胚胎不能正常发育, 有些在着床后便死亡, 有些即使能出生也常伴随肥胖^[22]和早亡^[23]等现象。Prather^[24]通过对猪的研究指出, 进一步的理解核移植胚胎中 DNA 甲基化的变化, 可以帮助解释和预防胎儿肥胖症。

核移植 5 min 之内体细胞 H₁ 组蛋白变异体开始被卵母细胞特有的 H₁FOO 变异体取代^[25]。核移植 30 min 后, 核膜开始破裂, 染色体聚集, H₁FOO 含量增加。核移植 60 min 后, 染色体上将检测不到体细胞 H₁ 变异体。这种现象发生在全部的克隆体中, 说明此过程是高效的。有趣的是, 卵母细胞胞质把体细胞 H₁ 从染色体去除的能力是不断被调控的, 活化后 2~4 h 内开始消失, 消失的时间受卵母细胞纺锤形染色体复合体的影响, 说明这种复合体存在调节胚胎发育的因素, 也有报道认为此复合体参与胚胎的早期发育^[26]。发育过程从 2- 细胞阶段到 4- 细胞阶段, H₁FOO 从正常受精胚胎的核上被大量消除。而体细胞的 H₁ 变异体重新出现, 它在 2- 细胞阶段处在较低水平, 而在 4- 细胞阶段开始明显增加^[16]。因此 2- 细胞阶段是任何种类的 H₁ 结合蛋白相对缺乏的时期。这可能使调节基因转录能力的暂时性消失, 暂时的转录混乱导致克隆胚胎与受精胚胎转录基因本质上的不同。

克隆胚胎还坚持表达一些供体细胞的分子标记。最近发现把小鼠胎儿成纤维细胞移植到牛卵母细胞中, 一绿色荧光蛋白转基因在核移植后并没有沉默, 这一结构继续表达 Hsp70.1^[27]。有趣的是与染色体结合的转录因子在克隆期间仍与核相连, 消除这些因子有可能会降低供体细胞的基因表达^[28], 并且增加着床前发育的成活率。

除分子标记外, 其他分子变化也明显影响克隆胚

胎的变化过程。一些研究发现克隆可增加端粒的长度, 但它也可能与组织的选择、供体细胞类型等有关^[29]。克隆胚胎可表达一种能为胚胎基因活化提供暂时性标志的转录复合物, 而它的表达受相关因素的控制^[30]。另外 Oct4 的表达在细胞间存在差异, 在大多数克隆胚胎中显著减少, Oct4 相关基因也不表达^[31], 而这些基因在支持胚胎发育中的细胞分裂方面起重要作用。本实验室在雪貂体细胞克隆的研究中发现, 体外培养并孤雌激活的卵母细胞与交配后获得的卵母细胞相比, 其 Oct4 表达更为缓慢和不完全^[32]。另外鼠科克隆囊胚与正常受精胚胎相比, 许多基因都不表达^[33], 这些现象说明早期胚胎中的正常表达形式缺失。因此体细胞基因沉默的缓慢和不完全与胚胎基因活化的缓慢和不完全相关, 这揭示了核重新编程在分子水平上具有缓慢和渐进的特点。

3 影响克隆胚胎细胞核重新编程的因素

3.1 胚胎培养条件对重新编程的影响

早期克隆胚胎与受精胚胎的细胞特点存在较大差异, 因此克隆胚胎不能适应正常的胚胎培养条件, 并且在这种条件下无法进行细胞核重新编程。卵丘细胞供体核的克隆胚胎很难在受精胚胎适应的培养液 (CZB, KSOM) 中发育到囊胚阶段, 但它们可以在体细胞培养液 (MEM α) 中正常生长^[30]。卵丘细胞克隆胚胎需要葡萄糖才能有效发育到 2- 细胞阶段^[34], 培养需要一定浓度的氧^[35], 而这些培养条件与受精胚胎的要求相反。这表明克隆胚胎的基本生长和代谢需要与体细胞更为接近。

3.2 供体细胞的类型和分化程度对重新编程的影响

早期对两栖动物的研究发现供体细胞的分化程度与克隆的存活率呈反比, 同样哺乳动物供体细胞的分化程度也影响到重新编程的效率(表 1)^[36]。对胚胎卵裂阶段的裂殖细胞进行克隆实验发现多能性核的重新编程效率较高^[37]。从多能性胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)产生的克隆明显优于从成纤维细胞、卵丘细胞、支持细胞等已分化体细胞得到的克隆, 并且克隆囊胚产生 ES 细胞的效率显著高于克隆囊胚移入子宫后的个体出生率。培养基中克隆囊胚的发育情况与体内不同, 它可能很少受时间限制, 并能选择未充分重新编程的细胞转变为稳定的 ES 细胞系, 从而提高重新编程的效率。重新编程可能并不局限于卵母细胞阶段, 它可持续到囊胚内细胞团中, 并

表1 不同分化程度供体细胞的克隆效率^[36]

供体细胞	由囊胚发育到小鼠(%) [*]	由囊胚发育为胚胎干细胞(%) [#]
受精卵	60~80	25~68 [*]
卵裂细胞	13~26 [*]	不确定
胚胎干细胞	11~23	50
胚胎癌细胞	不确定	50
神经干细胞	不确定	64
造血干细胞	0.7	不确定
支持细胞	6 [*]	27 [*]
卵丘细胞	1~3 [*]	9~19 [*]
成纤维细胞	1 [*]	13~33 [*]
黑素瘤细胞	不确定	25
自然杀伤性 T 细胞	1~2 [*]	6 [*]
B/T 淋巴细胞	不确定	7
神经元	不确定	6~28

^{*} 为克隆囊胚移植到代孕母鼠后克隆小鼠的出生率; [#] 为克隆胚胎产生胚胎干细胞的效率; * 为桑椹胚和囊胚产生小鼠和胚胎干细胞的复合数。

能高效的产生核移植 ES 细胞。总之可得出以下结论: ①哺乳动物细胞核分化程度的提高能增加重新编程的难度; ②形成克隆囊胚和产生 ES 细胞很少受内源及外源异常的抑制; ③从克隆囊胚生成 ES 细胞比从克隆囊胚长成成体的潜力大。

体内的其他干细胞与 ES 细胞相似, 均比终极分化的细胞核易被重新编程。但如果降低终极细胞 DNA 甲基化程度, 则它也可获得与干细胞相似的重新编程效果, 这说明供体细胞的基因状态影响了细胞重新编程能力。Gurdon^[38]认为如果 DNA 去甲基化酶和其他核重新编程相关分子过度表达, 那么人体任一细胞均可产生大量 ES 样细胞, 同样可用于疾病治疗。

3.3 成熟促进因子(maturation promoting factor, MPF)对重新编程的影响

MPF 是卵母细胞胞质中能促进卵母细胞成熟的成分, 是促进克隆胚胎核重新编程的重要因素。哺乳动物成熟卵子一般停留在 M 期, 维持较高的 MPF 活性。一旦受精, 高活性的 MPF 便可以使细胞内的底物磷酸化, 导致染色质凝集、细胞核裂解、细胞骨架破坏等, 从而有利于原核的形成、融合和受精卵的正常发育。

克隆过程中, 一般选处于 M II 期的卵母细胞作为核受体。供体细胞核移入去核卵母细胞后, 由于胞质中 MPF 活性很高, 在 MPF 作用下供体核纤层蛋白被磷酸化, 进而导致核纤层解体和 NEBD。暴露的核染色体能与胞质中的 MPF 充分接触, 引起胞质和核质蛋白质的移动。这一过程可能带入去甲基化因子, 改变基因的表现遗传学标记, 从而有利于重构胚胎的发育。

4 小结

综上所述, 在正常胚胎发育早期及在克隆条件下, 细胞基因组均发生变化, 其 DNA 和相关蛋白质都经历了表观遗传学的重新编程。体细胞核重新编程是一复杂过程, 目前对核重新编程分子和功能机制的探索才刚刚开始。这一问题的解决将不仅有助于揭示哺乳动物克隆的机制, 而且可以帮助人们建立起人类 ES 细胞系, 为人类医学开辟一条新的道路, 因此值得人们去研究。

参考文献(References)

- [1] Lane N *et al. Genesis*, 2003, **35**: 88
- [2] Santos F *et al. Dev Biol*, 2002, **241**: 172
- [3] Fulka H *et al. Reproduction*, 2004, **128**: 703
- [4] Beaujean N *et al. Biol Reprod*, 2004, **71**: 185
- [5] Zaitseva I *et al. Mol Reprod Dev*, 2007, **74**: 1255
- [6] Shi W *et al. Biol Reprod*, 2004, **71**: 340
- [7] Memili E *et al. Zygote*, 2000, **8**: 87
- [8] Kourmouli N *et al. J Cell Sci*, 2004, **117**: 2491
- [9] Erhardt S *et al. Development*, 2003, **130**: 4235
- [10] Santos F *et al. Dev Biol*, 2005, **280**: 225
- [11] Jackson JP *et al. Nature*, 2002, **416**: 556
- [12] Lehnertz Bet *et al. Curr Biol*, 2003, **13**: 1192
- [13] Lande-Diner L *et al. J Biol Chem*, 2007, **282**: 12194
- [14] Santos F *et al. Curr Biol*, 2003, **13**: 1116
- [15] Nowak SJ *et al. Trends Genet*, 2004, **20**: 214
- [16] Gao S *et al. Dev Biol*, 2004, **266**: 62
- [17] Sung LY *et al. Biol Reprod*, 2007, **76**: 232
- [18] Tateno H *et al. Fertil Steril*, 2003, **79**: 216
- [19] Santos F *et al. Dev Biol*, 2002, **241**: 172
- [20] Chung YG *et al. Biol Reprod*, 2003, **69**: 146
- [21] Yang J *et al. Biol Reprod*, 2007, **76**: 36
- [22] Tamashiro K L *et al. Nature Med*, 2002, **8**: 262

- [23] Ogonuki N *et al. Nature Genet*, 2002, **30**: 253
[24] Prather RS. *Adv Exp Med Biol*, 2007, **591**: 1
[25] Teranishi T *et al. Dev Biol*, 2004, **266**: 76
[26] Kang Y K *et al. FEBS Lett*, 2001, **499**: 55
[27] Arat S *et al. Mol Reprod Dev*, 2003, **66**: 334
[28] Sullivan E J *et al. Biol Reprod*, 2004, **70**: 146
[29] Latham KE. *Differentiation*, 2004, **72**: 11
[30] Gao S *et al. Biol Reprod*, 2004, **70**: 1162
[31] Boiani M *et al. Genes Dev*, 2003, **16**: 1209
[32] Li ZY *et al. Dev Biol*, 2006, **293**: 439
[33] Mann MR *et al. Biol Reprod*, 2003, **69**: 902
[34] Chung Y G *et al. Biol Reprod*, 2002, **66**: 1178
[35] Gao S *et al. Biol Reprod*, 2003, **69**: 48
[36] Hochedlinger K *et al. Nature*, 2006, **441**: 1061
[37] Hiiragi T *et al. Mol Reprod Dev*, 2005, **70**: 417
[38] Gurdon JB. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, **22**: 1

The Progress in Nuclear Reprogramming

Ling-Yan Wang, Xue-Ming Zhang, Zhan-Peng Yue, De-Xue Li, Zi-Yi Li*

(Key Laboratory of Animal Embryo Engineering, Jilin Province; College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract Nuclear reprogramming is an important event in the mammalian development of normal and cloned embryos. And characteristic changes of nuclear reprogramming are mainly showed in epigenetic marking systems. During the formation and development of zygote, genome undergoes demethylation and acquires histone modifications. In cloned embryo, nuclear envelop breaks down and premature chromosome condensation occurs. Thereafter, the cloned embryo regains development potency to be a cloned animal. There are many factors involved in nuclear reprogramming. This review focuses on current progress of nuclear reprogramming in order to provide the clue for further investigations.

Key words reprogramming; nucleus; clone; mammals

Received: February 5, 2007 Accepted: May 28, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30671510) and Jinlin University Research Starting Fund of Recruiting Outstanding Faculty

*Corresponding author: Tel: 86-431-87836187, E-mail: ziyili@jluhp.edu.cn