

哺乳动物嵌合体*

陆德裕

(中国科学院发育生物学研究所)

嵌合体 Chimera 一词源自希腊文，古希腊神话中用它代表羊头、狮身、蛇尾这样一些由不同种类的动物所拼凑成的怪物。这意味着人们改造自然的愿望。本世纪 60 年代中期，在高等哺乳动物上得到了由两个或两个以上不同遗传组成的胚胎发育成的个体，这种个体的组织器官是由基因型不同的细胞群所组成，故称之为嵌合体。有人用非自主表型 (Allophenone) 一词代表这种个体，意指不同的表型是由于不同的基因型的缘故。为了方便起见 Ford (1969)^[1]把在发育的很早期，如卵裂期甚至受精期所形成的嵌合体，称为原发性嵌合体 (Primary Chimera)，把在发育的较晚期，如胚层已分化，或器官开始形成后通过组织移植或嫁接等方法所形成的部分组织或器官的嵌合，称为次生性嵌合体 (Secondary Chimera)。本文将只介绍在哺乳动物用实验方法所产生的原发性嵌合体 (以下简称嵌合体)，即人工地将两个或多个具有不同遗传性状的早期胚胎，或者把具有特种遗传性质的细胞和早期胚胎聚合所产生的嵌合体。有关自然发生的如 XX/XY 两性个体及其他情况将不在讨论之列。

Nicholas 和 Hall (1942)^[2]就曾试图用不同品系的大鼠，将其早期分裂球进行组合制作嵌合体，结果只得到一个死胎，未能证明为嵌合体。后来 Tarkowski (1961, 1963)^[3,4]获得了嵌合的小鼠胎儿，但均未能成活。B. Mintz 自 1960 年便开始着手对制作嵌合体的技术进行研究，于 1965 年第一次得到了活至成年的正常小鼠嵌合体。此后，嵌合体技术受到了哺乳动物发育生物学工作者们极大的重视。Gardner (1968)^[5]创建了用注射细胞至胚泡的方法制作嵌合体。有许多人在其他的哺乳类

试作嵌合体，都得到不同程度的成功^[6-10]。Markert 等 (1978)^[11]，Petter (1980)^[12]还得到了由 3 个或 4 个胚胎聚合而成的 6 个双亲和 8 个双亲的小鼠嵌合体及其子代。

哺乳动物嵌合体是研究哺乳动物发育遗传以及细胞分化过程中基因表达和调控的极为理想的手段。十多年来，它已为这方面提供了大量宝贵的资料，并引伸出许多重要而有待探讨的新课题。目前大量的工作是在小鼠上进行的，所以本文将小鼠为对象，着重谈谈制作嵌合体的技术和方法，对其研究概况加以扼要的介绍，并对这一工作的发展前景提出几点粗浅的看法。

制作嵌合体的方法

迄今为止，制作嵌合体的方法有两种，即聚集法和胚泡注射法。可根据实验的目的而选用。聚集法适用于同种，发育阶段处于同步或者差距不大的胚胎。一般说 8 细胞期的聚合率最高。胚泡注射法技术难度较大，但适用范围较广，可用于种内或种间，供体和受体的发育阶段可同步，也可以是不同步的。它还适用于不能去透明带的动物，如兔等。这两种方法可用符号表示：如 A 为供体细胞，B 为受体胚胎，注射法以 A→B 示之，聚集法以 A↔B 示之。

1. 聚集法按其步骤分述如下：

(1) 胚胎的获取 实验用胚胎可取自超排卵或自发排卵的小鼠。将小鼠饲养在光照 14 小时，黑暗 10 小时交替条件下，一般在午后 4:00 注射孕马血清 (PMS) 5 I.U.，48 小时后注射絨

* 本文承蒙庄孝德教授审阅修改，于建康同志提出宝贵意见，谨致谢意。

毛膜促性腺激素(HCG)5 I.U.。第二次注射后即将雌鼠放入雄鼠笼内待配,次日晨检查阴栓,若以见阴栓为第1天,则约在第3天中午可得到8细胞期的胚胎(发育时期因种类不同而有差异)。

将孕鼠处死,剖开腹腔,迅速将两侧输卵管,上端自喇叭口下端带一小段子官取出,置培养液中,除去周围脂肪。冲洗卵子前,应准备1毫升注射器和已磨钝针尖的4号注射针头。待用培养液在37℃含5% CO₂温箱中预热,然后将注射器盛满培养液,套上针头。置输卵管于一干燥的玻璃方杯或培养皿内,将针头从喇叭口插入,并用镊子夹紧喇叭口,以固定针头,轻轻推动注射器,即可见卵子位于冲出之小量培养液内,再将卵子转移至盛有较多量培养液的方杯中,这样卵子不会丢失。

(2) 去透明带 去透明带的方法因实验者而异。有的用浓度为0.5%的蛋白酶(Pronase),有的用酸性溶液,作者常用酸性泰洛氏液(Tyrode's Solution) pH2—2.5,效果良好。不管选用何种溶液,都必须掌握处理时间不宜过长,否则会伤害卵子。这一过程要在解剖镜下进行,待透明带消失,马上取出,用培养液洗涤2—3次。

(3) 聚集 已去透明带的卵子,置于小玻璃方杯中,用植物凝集素(PHA P, Difco)促进细胞聚集。浓度为10微升 PHAP 母液加入1毫升培养液(即1/100 PHA 母液)。最好使含有PHA的培养液在培养皿内成小滴状,溶液上复盖液体石蜡或无毒性的矿物油,以防止蒸发。将待聚的胚胎放入小滴中,用细针使彼此靠近,接触面越大越好,然后置37℃含5% CO₂温箱中保温15—20分钟。取出已聚集的胚胎,在培养液内洗涤1—2次,再放入有液体石蜡覆盖的滴状培养液内,置37℃含5% CO₂温箱内24小时。聚合的胚胎所发育成的桑椹胚或胚泡比对照大,选择好的胚胎供移植用。

我们曾试用国产液体石蜡和植物凝集素,效果似乎不够理想。根据多次摸索的结果,现

在用倾倒一层加温的1%琼脂溶液于小玻璃方杯底上,待冷却后在琼脂上用加热的铂金丝做成略大于两个胚胎的小凹陷,用培养液覆盖琼脂,胚胎放入小凹陷内彼此紧靠,这样可以不用液体石蜡和PHA,以达到聚合的目的。用此法聚集率可达90%以上。

(4) 胚胎移植 为了使假孕小鼠的子宫状态与移植胚胎同步,假孕鼠应比供体小鼠晚一天配种。移植时,先按小鼠每克体重腹腔注射0.01毫升(浓度为5毫克/毫升)戊巴比妥钠,待麻醉后,自背部对准卵巢的位置切开一小口,于解剖镜下用镊子仔细夹住输卵管附近的结缔组织或脂肪,使子宫上端处于可见的位置,用5号注射针将子宫壁(避开血管)刺一小孔,再用胚胎移植管从小孔将胚胎送入子宫腔内。

胚胎移植管的制备:先制备管径略大于被移植胚胎直径的毛细管,内径约为200微米,套入一较粗的玻管,用火漆使其固定。粗玻管与一较长的胶管联接,这样就做成了一根口吸的吸管。为了便于在解剖镜下观察胚胎在管内的移动,应在吸取胚胎前,在毛细管的水柱中做一个可见的气泡(图1)。

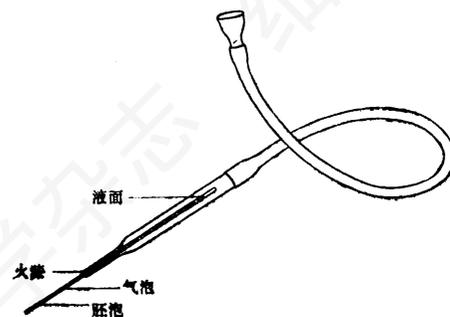


图1 胚胎移植管

吸取胚胎前,先借毛细管作用使培养液进入毛细管,再吸入一气泡,最后吸取胚胎,并使管内液体处于固定状态,使胚胎不致因吸管位置的移动而在管内移动。这时可用左手持镊子固定子宫,另一手将移植管插入子宫,然后向管内吹气,观察气泡移动的位置,就可确定胚胎是否进入子宫。

2. 胚泡注射法

此方法技术难度较大，需使用显微操作器和拉针仪，前者一般使用 Leitz 厂生产的显微操作器，后者可根据需要购买或自行设计。注射时所用之针有两类，一类为固定卵子和胚胎用，叫固定吸管，一类用以注射细胞用，叫注射吸管。Gardner(1978)^[13]曾详细地描述了他所设计的注射系统，针共 5 根，1 根为固定吸管，1 根为注射吸管，3 根为切开胚泡用的针。

若注射较小的细胞，一般用两根吸管即可。作者(未发表)曾用两根针的系统，注射神经嵴细胞至胚泡腔内。固定吸管与 Gardner 所用相同，但注射吸管要磨成带锋利针尖的斜面，斜面的口径略大于被注射的细胞，以免损伤细胞膜，针插入胚泡时，以其斜面对准内细胞团，从而增加注入细胞参与内细胞团的机率(图 2, 3, 4)。

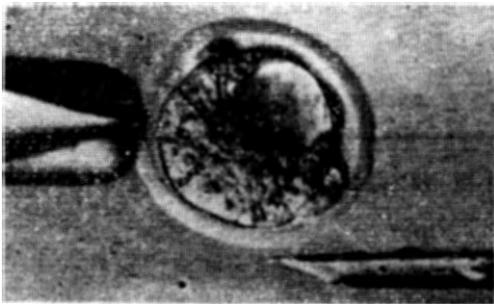


图 2 固定吸管和注射吸管

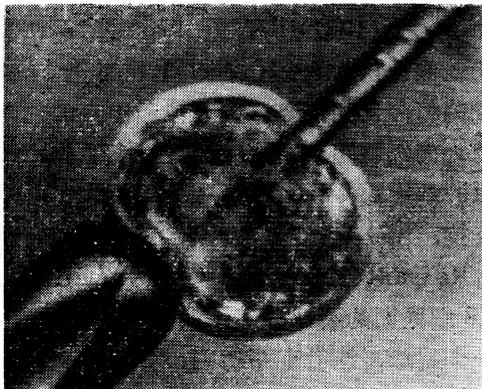


图 3 细胞注入胚泡

3. 几种常用培养液的介绍

见表 1、表 2。

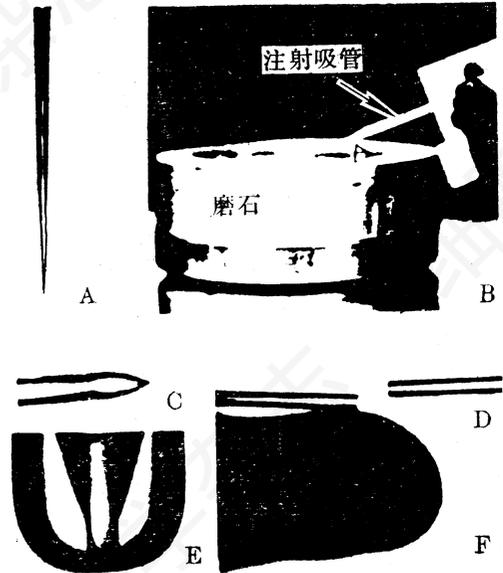


图 4 固定吸管、注射吸管制备过程

A. 取内径为 1.5—1.6 毫米的毛细管，加热拉成管径为 10—20 μ 的细针；B. 将图 a 的细针，在磨针器上加工(磨针器可用一马达带动一细磨石制成)；C. 经磨针器加工后的注射针尖；D. F 示电热丝，加热使图 a 所得之细针断裂；E. 将断裂之吸管用电热丝使管口光滑并缩小

研究的近况

十多年来，国际上特别是美、英、波兰等国的科学家们，利用这一技术对哺乳动物发育遗传学方面的问题进行了广泛的研究。McLaren(1976)^[14]曾著有哺乳动物嵌合体一书。本文侧重于近年来的工作，大致可归纳于以下几方面：

1. 早期胚胎细胞发育能力的研究

Dalcq 等(1957)^[1]曾提出一假说，认为哺乳动物早期胚胎细胞的分化，是由受精卵细胞质的异质性所决定。后来大量嵌合体的实验证明，哺乳动物卵子(至少在小鼠)的早期发育，具有惊人的调整性。Mintz(1965)^[16], Tarkowski(1961, 1967)^[8, 17]曾将具有不同毛色和葡萄糖磷酸异构酶(Glucose Phosphate Isomerase 简称 GPI)迁移率不同的两种小鼠的胚胎，在卵裂的不同时期，如 8 细胞期，16 细胞期，甚至桑椹期进行聚集，都能得到完全正常

表 1 制作嵌合体常用的几种培养液

成分 (克/升)	Brinster 1965 a	Mullen & Whitten 1971	Mulnard 1971	Mystkowska & Tarkows- ki 1970	Hoppe 1973	Mintz 1964 a, 1971 a
氯化钠	0.55	5.14	6.09	6.41	5.97	等量小牛血清和
氯化钙	0.19	—	0.18	0.18	—	Earle 氏
氯化钾	0.36	0.36	0.34	0.35	0.356	盐溶液加
磷酸二氢钾	0.16	0.16	—	—	0.162	0.1% 乳酸
硫酸镁	0.29	0.29	0.114	0.09	0.294	0.002% 酚红, 用碳酸氢钠 (7.5%) 调节至 pH 7.0
磷酸二氢钠	—	—	0.106	0.13	—	
碳酸氢钠	2.11	2.11	2.21	2.00	1.90	
丙酮酸钠	0.028	0.035	0.013	0.013	0.025	
乳酸钠	2.42	2.42	1.38	1.33	—	
乳酸钙	—	0.53	—	—	0.527	
葡萄糖	—	1.00	1.08	—	1.00	
结晶牛血清白蛋白	1.00	3.00	—	5.00	3.00	
小牛血清(热灭活)	—	—	20%	—	—	
青霉素	0.08	0.08	—	—	0.075	
链霉素	0.05	0.05	—	—	0.05	
酚红	—	0.01	0.02	0.02	0.01	
气相	含 5% CO ₂ 的空气	5% CO ₂ 5% O ₂ 90% N ₂	含 5% CO ₂ 的空气	含 2% CO ₂ 的空气	含 5% CO ₂ 的空气	含 5% CO ₂ 的空气

表 2 酸性泰洛氏液

氯化钠	8.00
氯化钾	0.2
氯化钙	0.2
氯化镁	0.1
磷酸二氢钠	0.05
葡萄糖	1.00
聚乙烯—吡咯烷酮	4.00

用盐酸(6N)调节 pH 至 2—2.5。

的嵌合体。通过毛色和同功酶的测定, 证明这些嵌合体的各种组织中都有来自两种胚胎的细胞。Kelly (1975) [18] 曾将 4 细胞期的裂球分离, 然后把每一个裂球和另一种遗传性状(以毛色和同功酶作指标)的胚胎聚合, 移至假孕小鼠体内继续发育, 从四个聚集的胚胎中, 得到了 3 个嵌合体, 8 细胞期亦然。这些实验证

明小鼠至少在 8 细胞期, 每个裂球仍具有发育的全能性。

哺乳动物的囊胚称为胚泡, 它具有两类不同的细胞, 一种位于胚泡的表面, 称为滋养层, 一种位于胚泡腔内一端, 称为内细胞团。Tarkowski(1967)[17]曾提出内—外细胞的假说, 该假说认为 8—16 细胞期, 位于表面的那些细胞将分化为滋养层, 而位于中央的细胞将分化为内细胞团。这一假说受到了 Hillman 等(1972)[19]、Wilson 等(1972)[20] 实验结果的支持。

Rossant(1980)[21]将 GPI-16/GPI-16 小鼠 16 细胞期的裂球分离, 然后用显微操作器吸一个裂球, 注射至 GPI-1a/GPI-1a 小鼠 8 细胞期的透明带内, 在体外作短暂培养后, 移至假孕小鼠输卵管内, 8 天后对胚胎进行分析, 在所得的嵌合体的滋养层和内细胞团的衍生物中, 均有 GPI-1b/GPI-1b 产物。这说明 16

细胞期的裂球仍有形成两类细胞的能力。该作者又将 GPI-1b/GPI-1b 小鼠桑椹胚表面的细胞,用显微吸管使其与中央细胞分离,然后将表面细胞注射到 GPI-1a/GPI-1a 小鼠 8 细胞期的透明带内,或者将 20—23 个表面的细胞注射到一个空透明带内,使其重组成一个全由表面细胞组成的胚胎,结果由前者所得的胚胎,其胚胎和胚外组织中都有 GPI-1b/GPI-1b 产物;由后者所得的胚胎,发育为形态正常的卵柱期(egg cylinder)。这说明晚期桑椹胚表面的细胞,仍具有形成内细胞团的能力。

Rossant(1979)^[22]对早期和晚期胚泡的内细胞团的发育潜能进行了研究。他用免疫外科手术的方法将第 3 天和第 4 天胚泡的内细胞团分离出来,再与桑椹胚聚集。由早期内细胞团聚集后所发育成的嵌合体中,有的个体的滋养层衍生物有来自内细胞团的产物。这说明至少早期胚泡的内细胞团细胞,仍具有形成滋养层的能力。

2. 发育中细胞间的相互作用

发育生物学的中心问题之一,是细胞的分化问题,也就是说一个受精卵是怎样演变成一个复杂的个体。用遗传学的术语,就是如何由一个受精卵的基因型产生出名目繁多的表现型。归根到底也就是基因的表达与调控问题。嵌合体是研究发育过程中细胞间相互作用与基因表达的理想手段之一。

Mintz(1975)^[23], Illmensee(1976)^[24]曾对小鼠恶性畸胎瘤干细胞的发育能力进行了研究,证明这种干细胞因所在的环境不同而向不同的方向分化。他们把在 129 品系小鼠诱发的畸胎瘤,经过小鼠腹腔内连续传代达 8 年之久后移植至小鼠皮下,它发展成恶性肿瘤使小鼠致死;但若把这种瘤细胞移植至正常的胚泡中,它们却具有正常发育的全能性,发育成正常的嵌合体。不仅在嵌合体的绝大多数组织中有由畸胎瘤干细胞分化来的细胞,而且在生殖腺中还有由畸胎瘤干细胞分化产生的功能正常的生殖细胞。

这一实验证明,畸胎瘤细胞的恶性化,不

是因为基因结构的突变,而是由于基因表达的改变所致。

近些年来,还有人利用正常的胚胎与某些致死性的胚胎形成嵌合体,由于细胞与细胞间的相互作用,而使某些不能正常发育下去的胚胎得到了“挽救”。

Stevens(1978)^[25]曾用两种单性发育高废品系, LT/SV 和 LT 小鼠进行实验。前者卵子于第一次成熟分裂后在卵巢内就发生分裂,直到卵柱期,组织发生紊乱而形成畸胎瘤。后者卵子排出后不受精就分裂,发育到胚泡,于种植子宫后不久死亡。他将 LT/SV, 和 LT 小鼠的 8 细胞期与正常白色小鼠 8 细胞期胚胎聚合,得到了正常的嵌合体, LT/SV 和 LT 的细胞还能在嵌合体内分化为功能正常的生殖细胞。作者(1980)^[26]曾将黑色小鼠 $B_6D_2F_1$ 的卵子,在 2 细胞期用松胞素 B 处理后使其变成四倍体,然后与 ICR 白色小鼠的二倍体 8 细胞期胚胎聚合,待其发育至囊胚期,移至假孕小鼠子宫继续发育,得到了黑白相嵌的二倍体 \leftrightarrow 四倍体嵌合小鼠(图 5, 6, 7)。

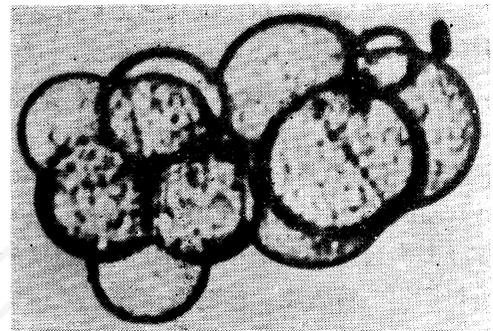


图 5 4 细胞期的四倍体与 8 细胞期的二倍体胚胎聚集

3. 把外源基因带入动物体内

把外源基因带入动物体内,是一个前景诱人的研究课题,因为它为人们研究高等动物基因在体内的表达与调控提供了可能,并为人类遗传疾病的防治开辟了一条光明的途径。

近些年来,人们利用畸胎瘤细胞作为载体,并把嵌合体技术与细胞拆合术相结合,成功地 把外源基因带入了小鼠体内,将外源基因带入

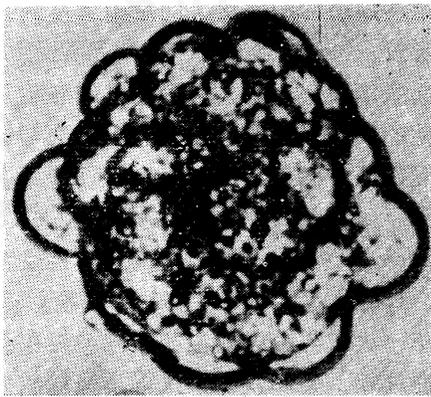


图 6 嵌合的桑椹胚

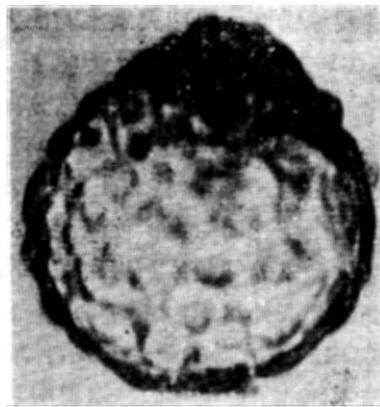
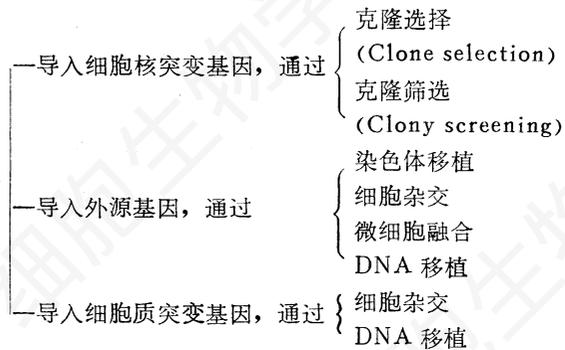


图 7 嵌合的胚泡

动物体内的途径是多样的，大致可归纳如下：

养母子宫 ← 小鼠胚泡 ← 小鼠畸胎瘤细胞作为载体



目前已见报道并获得成功的方法有选择畸胎瘤突变株、细胞杂交以及胞质杂交。

人类有一种遗传病叫列许尼汉综合症 (Lesch-Nyhan)，是由于不能合成次黄嘌呤转磷酸核糖基酶 (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase—HPRT) 而引起的。Dewey (1977) [27] 选用来源于小鼠 129 品系的早期胚胎的 HPRT⁻ 畸胎瘤干细胞突变株，把这种细胞注射到 C₆₇ 品系小鼠的胚泡中，再移至假孕小鼠子宫内继续发育，结果得到毛色相嵌的小鼠。经生化测定，由畸胎瘤干细胞分化来的细胞仍保持 HPRT⁻ 特性，而且它们在嵌合体内的分布不规律，有的嵌合体的绝大部分组织中都含有来自畸胎瘤干细胞的细胞，有的则只在一种或极少几种组织中有这种细胞。这种结果具有很重要的价值，前者有可能产生 HRPT⁻ 的生殖细胞，从而可以得到与人类 Lesch-Nyhan 综合症相同的动物模型，后者有助于了解

这种综合症的原发病灶是在什么组织或器官中。

最近 Goldstein 等 (1979) [28] 又证明畸胎瘤干细胞具有高度亲和低密度脂蛋白的受体，并进一步准备诱发低密度脂蛋白受体缺损株。通过荧光激活细胞分离仪，可获得纯化的低密度脂蛋白受体缺损株，把这种细胞注射至胚泡，从而可望获得与人类高胆固醇血症相同的动物模型。

Illmensee 等 (1979) [29] 曾用细胞融合的方法把人或大鼠的基因带入到小鼠体内。他们选用胸腺激酶 (Thymidine Kinase) 缺损 (TK⁻) 的畸胎瘤细胞突变株，与人或大鼠的 HPRT⁻ 成纤维瘤细胞合并，再用选择培养基选择 HPRT⁺、TK⁺ 杂交细胞，最后人和大鼠的绝大部分染色体被排出，而只保留带胸腺激酶位点的染色体。已知人、大鼠、小鼠的胸腺激酶基因与半乳糖激酶基因连锁，而这三者的半乳糖激

酶又很容易用电泳法予以区别,这样就为鉴别基因是否带入动物体内和是否具有生物功能提供了检测的指标。他们把人—小鼠、大鼠—小鼠的杂交细胞,单个地分别注入另一种小鼠的胚泡中,然后移到假孕小鼠子宫,结果得到了嵌合体。经检测各种组织表明,注射人—小鼠杂交细胞者,能测出人的半乳糖激酶活性,注射大鼠—小鼠杂交细胞者,能测出9种大鼠所特有的酶和一些杂交形式的酶。更有趣的是有一些酶是大鼠—小鼠杂交细胞在离体培养条件下从来不曾表达的。如把杂交细胞移到裸鼠皮下,则发展成恶性肿瘤。

Watanabe等(1978)^[30]用胞质杂交法将线粒体耐氯霉素突变基因(CAP^R)引入了小鼠体内。他们选择一种HPRT⁻、CAP^S的黑色素瘤细胞,用突变剂诱发其突变为HPRT⁻、CAP^R细胞株,再用氯霉素培液选择得到HPRT⁻、CAP^R细胞。用松胞素处理并离心,以去其细胞核,借仙台病毒使这种带CAP^R的胞质体与CAP^S、HPRT⁺畸胎瘤干细胞合并,然后用HAT、CAP双重培液选择得到HPRT⁺、CAP^R胞质杂种细胞。把这种胞质杂种细胞注入小鼠胚泡,移到假孕小鼠子宫,获得了嵌合体。经分析表明,嵌合体的很多组织中,都有来自胞质杂种的细胞。如果胞质杂种细胞能进入嵌合体的生殖腺并分化为卵子,又如果线粒体是通过母本遗传的,那么耐氯霉素的线粒体突变基因就可以通过卵的胞质而遗传到后代。

哺乳动物嵌合体的工作,十多年来发展非常迅速。人们已利用这一技术为哺乳动物的实验胚胎学,发育遗传学提供了大量有用的资料,并已成为一些长期争论不休的问题如骨骼肌多核细胞的起源等,给予了令人信服的回答,为免疫耐受性、性分化等一些极为重要的问题,提供了新的线索。

把哺乳动物嵌合体技术与细胞拆合、DNA重组等技术相结合,利用畸胎瘤细胞作为载体把外源基因带入动物已分化的细胞,今后将是一个发展的重要方面。目前许多的工作者,正

在培养和筛选一些与人类遗传疾病有关的畸胎瘤突变株,这将为研究哺乳动物发育过程中基因的表达与调控,以及人类肿瘤、遗传疾病的防治开辟广阔的途径。

利用嵌合体作为携带者,用以“挽救”一些致死或半致死的突变体,以研究发育中基因表达与细胞间的相互关系,今后也将成为一个很重要的方面。特别是探索“挽救”的分子机理将具有十分重要的理论和实践价值。

利用嵌合体技术研究哺乳动物胚胎细胞的发育能力、生长的遗传控制以及X染色体失活与细胞分化的关系,也将会引起广泛的兴趣。

参 考 文 献

- [1] Ford, C. E., 1969. *Brit. Med. Bull.* 25: 104-109.
- [2] Nicholas, J. S., et al. 1942. *J. Exp. Zool.* 90: 441-459.
- [3] Tarkowski, A. K. 1961. *Nature, Lond.* 190: 857-860.
- [4] Tarkowski, A. K. 1963. *Natl. Cancer Inst. Monograph.* 11: 51-71.
- [5] Gardner, R. L. 1968. *Nature, Lond.* 220: 596-597.
- [6] Tucker, E. M., et al. 1974. *Immunology.* 26: 613-621.
- [7] Moustafa, L. A. 1974. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 147: 485-488.
- [8] Gardner, R. L. 1974. *Nature, Lond.* 250: 146-147.
- [9] Mayer, J. F., et al. 1974. *J. Reprod. Fert.* 39: 1-9.
- [10] Yamamura, Ken-ichi., et al. 1980. *Develop. Genetics (in press).*
- [11] Markert, C. L., et al. 1978. *Science* 202: 56-58.
- [12] Petters, R. M., et al. 1980. *J. Hered.* 71: 71-74.
- [13] Gardner, R. L. 1978. *Methods in mammalian Reproduction* edited by Joseph C. Daniel, Jr. Academic Press.
- [14] McLaren, A. 1976. *Mammalian Chimaeras.* Cambridge University Press.
- [15] Dalcq, A. M. 1957. *Introduction to general embryology.* London: Oxford University Press.
- [16] Mintz, B. 1965b *Science*, 148: 1232-1233,