

## 领域前沿 · 中国



沙红英, 复旦大学基础医学院医学神经生物学国家重点实验室, 讲师。1987年9月至1991年6月, 就读于华东师范大学生物学系, 大学毕业后进入江苏联环药业集团工作十年, 2001年返回华东师范大学生命科学学院攻读硕士学位, 2004年进入同济大学生命科学与技术学院攻读博士学位。2007年, 进入复旦大学临床医学博士后流动站从事核移植与体细胞重编程研究, 2009年出站留校工作至今。中国解剖学会医学发育生物学分会青年委员, 《Stem Cell》、《Cell Death and Differentiation》、《Human Molecular Genetics》等杂志审稿人。目前主要研究方向包括: (1) 线粒体置换治疗母源性线粒体疾病; (2) 卵子重编程患者体细胞为胚胎干细胞及其向神经细胞的诱导分化, 围绕上述研究方向以第一或通讯作者发表SCI论文6篇, 包括《Cell》、《RNA Biology》、《Cloning and Stem Cells》等高影响力期刊。在没有科研团队及充足经费的条件下, 自主选题、自组攻关小组、自筹经费完成的研究论文《Polar Body Genome Transfer for Preventing the Transmission of Inherited Mitochondrial Diseases》(第一作者并第一通讯责任作者), 于2014年6月20日在《Cell》杂志发表。该项研究首次提出极体基因组移植治疗遗传性线粒体疾病新理论、发明治疗该疾病的新技术。该工作具有潜在的临床应用价值, 有力地推动了线粒体捐赠技术的临床应用步伐, 获得国际同行的高度评价。

## 线粒体捐赠——极体基因组移植治疗 遗传性线粒体疾病

王 天 沙红英\* 纪冬梅 张海伦 陈大尉 曹云霞 朱剑虹

(复旦大学上海医学院医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200032)

**摘要** 遗传性线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)疾病通过母亲遗传给下一代, 引起破坏性的临床结果。因无有效的治疗方法, 故预防该疾病向子代传递成为首选。在患者卵子与健康者的卵子之间进行核置换, 可阻止突变mtDNA向子代传递, 这一技术称为线粒体捐赠。该研究成果发表前, 线粒体捐赠技术包括原核移植和纺锤体移植, 但这两种手段都不能彻底阻止疾病线粒体向子代传递。结果发现: 极体中线粒体含量极少并与卵子拥有相同的基因组物质, 故有望成为线粒体捐赠的首选核供体。基于此, 利用小鼠模型比较了四种不同的生殖细胞基因组(纺锤体-染色体复合物、原核、第一极体、第二极体)移植的特点和有效性。研究结果显示, 重构卵/胚胎支持正常受精、发育及诞生后代。遗传分析证实: 相对于纺锤体-染色体和原核移植, 极体移植产生的F1代体内携带的核供体来源的mtDNA量极少, 其中第一极体移植(first polar body transfer, PBIT)子代中

\*通讯作者。Tel: 021-54237480, E-mail: shahongying@fudan.edu.cn

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54237480, E-mail: shahongying@fudan.edu.cn

网络出版时间: 2015-04-15 11:10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150415.1110.001.html>

未检测到核供体来源的线粒体。更重要的是, mtDNA基因型在极体移植后的子二代中仍保持稳定, 提示极体基因组移植有望阻止遗传性线粒体疾病向子代的遗传。

**关键词** 遗传性线粒体疾病; 线粒体捐赠; 极体; 线粒体DNA

## Mitochondrial Donation — Polar Body Genome Transfer for Preventing the Transmission of Inherited Mitochondrial Diseases

Wang Tian, Sha Hongying\*, Ji Dongmei, Zhang Helen L., Chen Dawei, Cao Yunxia, Zhu Jianhong  
(State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract** Inherited mitochondria disease inherit through the maternal line and develop severe systemic diseases. Nuclear genome transfer between patients' and healthy eggs to replace mutant mtDNAs holds promises to prevent the transmission of mitochondria diseases. This technique is named mitochondria donation, including pronuclei transfer (PNT) and spindle-chromosome complex transfer (ST) before publishing our paper. However, PNT and ST couldn't thoroughly prevent the transmission of mitochondria diseases. We found polar body (PB) was able to be the prior candidate, since PB contains few mitochondria, and PB nucleus is identical to female nucleus in ooplasm. We compared the effects of different types of germline genome transfer, including ST, PT, PB1T and PB2T in mice. Our results showed reconstructed embryos support normal fertilization and produce live offspring. Genetic analysis confirms that the F1 generation from polar body transfer possesses minimal donor mtDNA compared to the F1 generation of the other procedures. Moreover, the mtDNA genotype remains stable in F2 progeny after polar body transfer, suggesting first polar body transfer (PB1T) has great potential to prevent inherited mtDNA diseases.

**Keywords** inherited mitochondria diseases; mitochondria donation; polar body; mitochondria DNA

### 1 遗传性线粒体疾病与线粒体捐赠

发生在卵子中的线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)突变引起母系家族性疾病<sup>[1]</sup>, 即遗传性线粒体疾病, 目前尚无有效治疗手段。据不完全统计, 在发生线粒体疾病致肌无力患者中, 每200名妇女就有1名将线粒体肌无力遗传给下一代<sup>[2-3]</sup>。另一方面, 人体重要器官(能量需求高的部位如脑、心、肾、骨骼肌和内分泌腺等)更易受突变影响。疾病的临床表型非常广泛, 包括线粒体脑肌病、线粒体肌病、胃肠综合征、肌张力障碍、糖尿病、心肌病、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿氏舞蹈病、痴呆以及耳聋等<sup>[4-8]</sup>。绝大多数线粒体疾病影响到多器官系统的正常功能, 患者只能靠药物短期缓解症状, 生活质量无法保证。同时, 因mtDNA是通过卵胞质以母源性遗传的方式进入下一代, 故患者不建议生育, 这给无数家庭带来痛苦和不幸。

卵子/胚胎显微操作技术的发展为遗传性线粒体疾病治疗带来了希望。线粒体遗传物质呈母

源性遗传方式, 即由母亲遗传给下一代, 因此可利用卵子/胚胎显微操作技术对患线粒体疾病的母亲卵子进行线粒体置换(mitochondria replacement, MR), 将其核移植到去核的健康女性胞质中, 使患者获得功能正常的线粒体, 又称为线粒体捐赠(mitochondria donation, MD)。截至本研究成果公开发表前, MD技术包括中期纺锤体-染色体复合物移植(spindle-chromosome transfer, ST)——将患者卵子的核转移到去核的健康卵子胞质内, 以及原核移植(pronucleus transfer, PNT)——将患者夫妇受精卵的原核转移到去除原核的健康受精卵胞质内。

### 2 线粒体捐赠研究与临床应用现状

近年来, 在动物(小鼠、灵长类)研究中, 利用这两种MD技术手段都已获得线粒体置换后产生的后代<sup>[9-10]</sup>。因此, 从2011年开始, 英国人类受精与胚胎管理局(human fertilisation and embryology authority, HFEA)便已着手总结近年线粒体置换调研结果, 酝

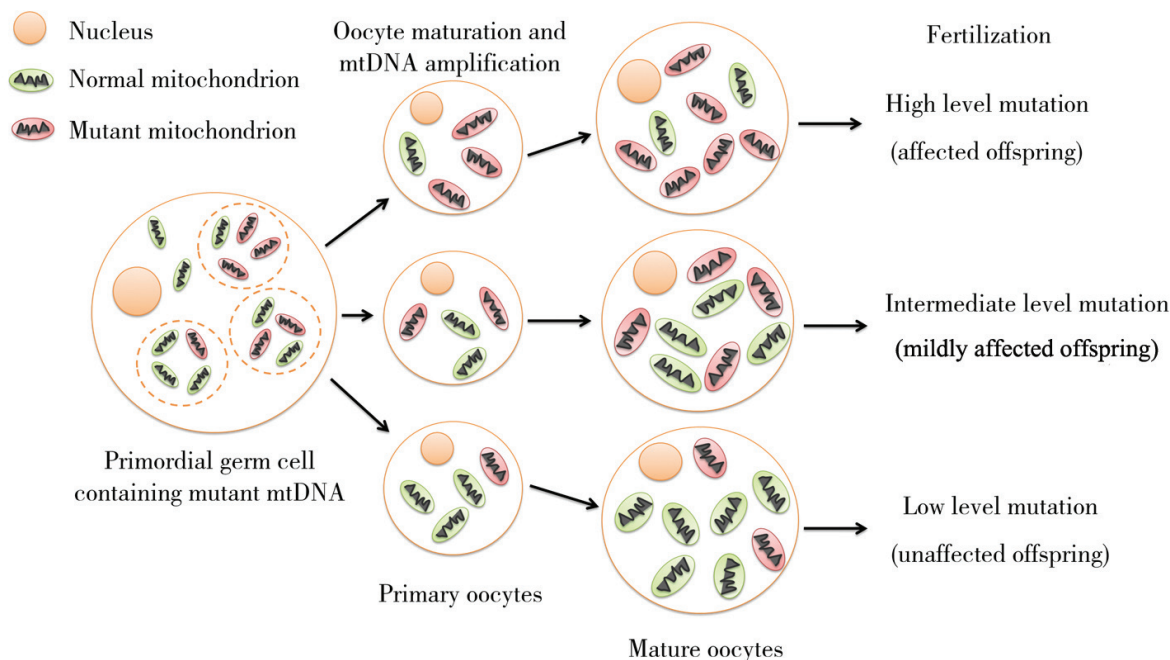


图1 突变线粒体向子代遗传的随机性

Fig.1 Random transmission of mutant mitochondria

酿相应政策,有趋势鼓励进一步临床试验研究。在漫长的科学和伦理评估以及公共咨询之后,2014年6月,英国当局公布了新的草案,拟允许HFEA批准医院进行线粒体置换的临床试验<sup>[11]</sup>。同时,今年2月份,美国食品和药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)也开始讨论和关注线粒体置换问题<sup>[12]</sup>。但美国FDA和英国HFEA评估小组最终总结认为,在将线粒体置换用于临床前,还需要就一些问题进行深入研究,其中关键的问题之一是子代mtDNA混杂现象的存在。无论原核还是纺锤体-染色体复合物,因为能量的需要,其周围总是包裹着大量的线粒体,当母亲的缺陷型mtDNA意外与核DNA一同转移到新的卵细胞中,会出现子代mtDNA混杂的现象。然而,目前人们对mtDNA混杂这一问题会引起什么后果还不清楚。更重要的是,缺陷型mtDNA与核DNA一同转移,使置换后的重构卵中仍含有一定量的突变mtDNA,这些mtDNA有可能通过“遗传瓶颈”(图1)<sup>[13-17]</sup>,在子代中复制和扩增,积累到一定的阈值,仍会导致子代发病<sup>[18-20]</sup>。已有研究证实,原核移植产生的MR小鼠虽然未出现被置换线粒体的表型,但其体内仍存在线粒体异质性,且这种异质性可以传递给子代<sup>[9]</sup>。纺锤体移植产生的MR灵长类体内亦存在约3%的线粒体异质性<sup>[10]</sup>。在采用人类胚胎的研究报道中,虽然2010年Craven等<sup>[21]</sup>报道

原核置换所获重构胚胎中仅检测到极低的被置换线粒体;2013年,Tachibana等<sup>[22]</sup>与Paull等<sup>[23]</sup>两个研究团队分别报道采用ST方法获得的重构卵所衍生的胚胎干细胞中未检测到被置换的线粒体DNA,但在早期胚胎及干细胞水平上的分析结果无法反映活体水平上置换后mtDNA遗传全景。因此,虽然近年来英国政府多次召开相关讨论会征求各界意见,最终仍未允许线粒体捐赠技术用于临床治疗。

### 3 减数分裂过程中形成的极体基因组特点使其能攻克线粒体捐赠技术瓶颈问题

雌性生殖细胞形成过程中经过两次减数分裂,形成一个大的单倍体即卵细胞和2~3个小的细胞,这些小的细胞称为极体。当第一次减数分裂时,形成一个大的次级卵母细胞和一个小的第一极体(first polar body, PB1);第二次减数分裂时,同样产生一个小的第二极体(second polar body, PB2)。无论第一还是第二极体,均具备以下几个特点:(1)虽然极体的体积远远小于卵细胞,但其所获得的核遗传物质与卵细胞质中的雌性核遗传物质是相等的<sup>[24-29]</sup>;(2)极体内细胞质(主要是线粒体)极少,保证大量胞质储存于卵子内,以供早期胚胎发育的需要<sup>[30]</sup>。极体的这两个特点提示,极体可成为线粒体置换治疗的首选母方遗传物质供体。基于此,我们课题组利用



两种不同线粒体遗传背景的小鼠(NZW小鼠模拟线粒体疾病女性提供核基因组, BDF1小鼠模拟健康女性提供含健康线粒体的胞质), 设计两组对比实验, 第一组: 采用NZW小鼠卵子的第一极体置换BDF1小鼠的中期染色体(PB1 transfer, PB1T)、NZW小鼠卵子的中期纺锤体-染色体复合物置换BDF1小鼠的中期纺锤体-染色体复合物(spindle-chromosome transfer, ST), 构建两种线粒体置换后的重构卵, 体外受精后移植假孕母鼠体内诞生PB1T、ST线粒体置换小鼠; 第二组: NZW小鼠(♀)与BDF1小鼠(♂)受精卵的第二极体置换BDF1小鼠(♀)与BDF1小鼠(♂)受精卵的雌原核(PB2 transfer, PB2T)、NZW小鼠(♀)与BDF1小鼠(♂)受精卵的雌雄双原核置换BDF1小鼠(♀)与BDF1小鼠(♂)受精卵的雌雄双原核(pronuclei transfer, PNT), 构建两种线粒体置换后的重构胚, 并移植假孕小鼠体内诞生PB2T、PNT线粒体置换小鼠。获得各组个体及其子二代后, 采用焦磷酸测序的方法检测NZW、BDF1两种线粒体在这些个体体内的异质性比例。研究结果发现, PB1、PB2具备用于母源性线粒体疾病治疗的基础和优势: (1)相对于纺锤体和原核, PB1、PB2携带极少的线粒体; (2)PB1与纺锤体-染色体复合物、PB2与雌原核遗传与表观遗传学特征一致; (3)PB1、PB2基因组移植诞生线粒体置换后代效率与ST、PNT及IVF胚胎无显著差异性; (4)PB1T、PB2T线粒体置换小鼠体内核供体来源的线粒体比例分别显著低于ST、PNT置换小鼠体内核供体来源的线粒体比例。更重要的是, PB1T线粒体置换小鼠及其诞生的子代仅含有胞质供体即健康卵胞质供者的线粒体, 提示PB1T有望彻底阻断线粒体疾病向子代的遗传。考虑到物种之间的差异性, 我们对人的极体基因组是否仍保持完整性进行了初步的检测, 比较基因组学检测结果显示, 人类PB1与纺锤体-染色体复合物、PB2与雌原核遗传特征一致, 提示极体基因组移植技术有望应用于临床。

#### 4 极体基因组推动线粒体捐赠技术早日转化成临床应用, 造福线粒体疾病患者

该项工作不仅使我国成为国际上第三个从事该领域研究的国家, 也使我国在该领域占据国际领先地位。研究结果在《Cell》杂志公开发表后, 引起国内外广泛的关注和重视。文章发表后数日内,

已经有《Nature Review Genetic》、《Nature》、《Cell Metabolism》、《Biology of Reproduction》等杂志以及F-1000网站发文, 高度评价该研究的创新性及其未来潜在的临床应用价值<sup>[31-34]</sup>。日本科学院在网上评价该研究成果, 并称“该项研究标志中国胚胎学研究工作领先全世界”<sup>[35]</sup>。英国HFEA组织及政策制定机构尤其重视这一突破: 2014年8月31日, 英国HFEA的负责人之一Hannah Verdin女士发来邮件, 向我们征询人线粒体置换研究结果, 希望能为英国国会9月底即将召开的讨论会提供有力的数据, 用以修改这项技术应用于临床的相关法律政策。在文章发表后, 我们已经启动对这项研究的临床探索, 并取得了预期的结果。为了使患者早日得到有效治疗, 我们将已获得的前期结果毫无保留地提供给了Hannah Verdin女士, 供他们讨论和制定相关政策参考。随后, 英国HFEA组织进一步邀请沙红英博士通过电话参加HFEA的专家组会议, 就线粒体捐赠技术的临床应用的有效性、安全性以及伦理等问题进行了热烈的讨论和交流。英国HFEA就该次电话会议以及我们的前期研究成果在HFEA官方网站撰文50页<sup>[36-37]</sup>, 评价极体基因组移植为线粒体捐赠技术带来的突破性进展。2014年10月, 英国政策调节委员会邀请沙红英博士, 作为其他国家在该领域的专家之一向英国政府撰文呼吁, 尽快解禁这项技术在临床的应用限制。在各国专家的强力建议下, 英国政府已经于2015年2月4日通过了线粒体捐赠技术用于临床治疗的草案<sup>[38]</sup>。这些事实有力地显示了该项目的研究成果在国际上所处的地位以及对人类社会的作用, 有望促进该线粒体置换技术尽早转化成临床应用, 造福患者及其家庭。

#### 参考文献 (References)

- Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF. The epidemiology of mitochondrial disorders-past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1659(2/3): 115-20.
- Brown DT, Herbert M, Lamb VK, Chinnery PF, Taylor RW, Lightowlers RN, *et al.* Transmission of mitochondrial DNA disorders: Possibilities for the future. *Lancet* 2006; 368(9529): 87-9.
- Bitner-Glindzicz M, Pembrey M, Duncan A, Heron J, Ring SM, Hall A, *et al.* Prevalence of mitochondrial 1555A-->G mutation in European children. *N Engl J Med* 2009; 360(6): 640-2.
- Park CB, Larsson NG. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol* 2011; 193(5): 809-18.
- Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA:

- Roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 2012; 13(12): 878-90.
- 6 Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3(10): a021220.
- 7 ChinneryPF, Elliott HR, Hudson G, Samuels DC, Relton CL. Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol* 2012; 41(1): 177-87.
- 8 Schaefer AM, McFarland R, Blakely EL, He L, Whittaker RG, Taylor RW, *et al.* Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol* 2008; 63(1): 35-9.
- 9 Sato A, Kono T, Nakada K, Ishikawa K, Inoue S, Yonekawa H, *et al.* Gene therapy for progeny of mito-mice carrying pathogenic mtDNA by nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(46): 16765-70.
- 10 Tachibana M, Sparman M, Sritanandomchai H, Ma H, Clepper L, Woodward J, *et al.* Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* 2009; 461(7262): 367-72.
- 11 HFEA (2012). Mitochondria public consultation 2012. Mitochondria replacement consultation-advice for government. <http://www.hfea.gov.uk/6896.html>
- 12 FDA (2014). Cellular Tissue, and Gene Therapies Advisory Committee. Briefing Document-Oocyte Modification in Assisted Reproduction for the Prevention of Transmission of Mitochondrial Disease or Treatment of Infertility. <http://www.fda.gov/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/CellularTissueandGeneTherapiesAdvisoryCommittee/ucm380047>.
- 13 Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, Abe K, *et al.* The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet* 2007; 39(3): 386-90.
- 14 Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC, Rajasimha HK, Wonnapijit P, Mann JR, *et al.* A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet* 2008; 40(2): 249-54.
- 15 Meirelles FV, Smith, LC. Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. *Genetics* 1997; 145(2): 445-51.
- 16 Steffann J, Frydman N, Gigarel N, Bulet P, Ray PF, Fanchin R, *et al.* Analysis of mtDNA variant segregation during early human embryonic development: A tool for successful NARP preimplantation diagnosis. *J Med Genet* 2006; 43(3): 244-7.
- 17 Wallace DC, Chalkia D. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3(10): a021220.
- 18 Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, Abe K, *et al.* The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet* 2007; 39(3): 386-90.
- 19 Rahman JS, Poulton D, Marchington A, Suomalainen A. Decrease of 3243 A-->G mtDNA mutation from blood in MELAS syndrome: a longitudinal study. *Am J Hum Genet* 2001; 68(1): 238-40.
- 20 Larsson NG, Holme E, Kristiansson B, Oldfors A, Tulinius M. Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr Res* 1990; 28(2): 131-6.
- 21 Craven L, Tuppen HA, Greggains GD, Harbottle SJ, Murphy JL, Cree LM, *et al.* Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* 2010; 465(7294): 82-5.
- 22 Tachibana M, Amato P, Sparman M, Woodward J, Sanchis DM, Ma H, *et al.* Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature* 2013; 493(434): 627-31.
- 23 Paull D, Emmanuele V, Weiss KA, Treff N, Stewart L, Hua H, *et al.* Nuclear genome transfer in human oocytes eliminates mitochondrial DNA variants. *Nature* 2013; 493(7434): 632-7.
- 24 Bieber FR, Nance WE, Morton CC, Brown JA, Redwine FO, Jordan RL, *et al.* Genetic studies of an acardiac monster: Evidence of polar body twinning in man. *Science* 1981; 213(4509): 775-7.
- 25 Hino T, Kusakabe H, Tateno H. Chromosomal stability of second polar bodies in mouse embryos. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30(1): 91-8.
- 26 Wakayama T, Yanagimachi R. The first polar body can be used for the production of normal offspring in mice. *Biol Reprod* 1998; 59(1): 100-4.
- 27 Wakayama S, Hikichi T, Suetsugu R, Sakaide Y, Bui HT, Mizutani E, *et al.* Efficient establishment of mouse embryonic stem cell lines from single blastomeres and polar bodies. *Stem Cells* 2007; 25(4): 986-93.
- 28 Wakayama T, Hayashi Y, Ogura A. Participation of the female pronucleus derived from the second polar body in full embryonic development of mice. *J Reprod Fertil* 1997; 110(2): 263-6.
- 29 Hou Y, Fan W, Yan L, Li R, Lian Y, Huang J, *et al.* Genome analyses of single human oocytes. *Cell* 2013; 155(7): 1492-506.
- 30 Caroline MD, Carroll J. Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J Cell Sci* 2013; 126(Pt 13): 2955-64.
- 31 Koch L. Mitochondrial replacement techniques under the spotlight. *Nat Rev Genet* 2014; 15(8): 516.
- 32 Halting inheritance of genetic disease. *Nature* 2014; 511: 9.
- 33 Wolf DP, Mitalipov S. Mitochondrial replacement therapies can circumvent mtDNA-based disease transmission. *Cell Metab* 2014; 20(1): 6-8.
- 34 <http://f1000.com/prime/thefaculty/member/8328521032549746>
- 35 <http://aasj.jp/news/watch/1776>
- 36 <http://www.hfea.gov.uk/9357.html>
- 37 [http://www.hfea.gov.uk/docs/2014-10-07\\_-\\_Polar\\_Body\\_Transfer\\_Review\\_-\\_Final.PDF](http://www.hfea.gov.uk/docs/2014-10-07_-_Polar_Body_Transfer_Review_-_Final.PDF)
- 38 <http://edition.cnn.com/2015/02/03/health/uk-ivf-3-person-babies/index.html>