

## 综述

## 单倍体胚胎干细胞研究进展及思考

陈俏羽 王俊政 李荣凤\*

(南京医科大学江苏省异种移植重点实验室, 南京 210029)

**摘要** 哺乳动物胚胎干细胞通常为二倍体, 这一特性影响其在遗传筛选中的应用。近几年, 科学家在单倍体胚胎干细胞(haploid embryonic stem cells, haESCs)的研究领域取得突破性进展。单倍体胚胎干细胞只含有一套染色体, 但其克隆形态、增殖能力、基因表达模式、分化潜能等与二倍体的干细胞相似。单倍体的特点使其在正向遗传和反向遗传、生物发育以及辅助生殖等研究中具有重要的应用价值。该文从单倍体胚胎干细胞的获得、特点、进展、应用等方面进行了综述, 并对单倍体胚胎干细胞研究中遇到的问题进行了思考。

**关键词** 单倍体胚胎干细胞; 正反向基因研究; 半克隆小鼠

## The Progress on Haploid Embryonic Stem Cells Research

Chen Qiaoyu, Wang Junzheng, Li Rongfeng\*

(Key Laboratory of Xenotransplantation of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**Abstract** Mammalian embryonic stem cells are diploid and this character impedes their potential application on genetic screening. Recently, scientists have gained breakthrough in the haploid embryonic stem cells (haESCs) research field. The haESCs contain only one set of chromosome, express pluripotency markers and can differentiate into all three germ layers *in vitro* and *in vivo*, even more can support full-term development of mouse semi-cloned embryos via serving as oocyte or sperm. Therefore, the haESCs provide a powerful tool for researches on forward and reverse genetic, biological development and the assisted reproductive technology. Here we describe the haploid embryonic stem cell lines derivation and their characteristics, and summarize the progress on haESCs research and the application of haESCs. At the same time, we summarize the difficulties regarding the haploid embryonic stem cells research.

**Keywords** haploid embryonic stem cells (haESCs); forward and reverse genetic research; semi-cloned mouse

在自然条件下, 酵母菌能以单倍体形式稳定存在, 当发生隐性突变时, 缺少另一套染色体去弥补隐性基因缺失<sup>[1]</sup>。由于酵母菌拥有这一“先天优势”, 研究者们常将酵母菌用于功能基因的筛选和研究<sup>[2]</sup>。

正常情况下, 哺乳动物的所有体细胞均带有两套染色体, 分别来自父方和母方, 当环境发生改变导致基因突变时, 二倍体的基因组可减少甚至“掩盖”突变带来的有害影响, 而且从双亲遗传的两套染色体的

收稿日期: 2016-07-05 接受日期: 2016-10-28

国家自然科学基金面上项目(批准号: 31371487)和江苏省心血管病转化医学协同创新中心资助的课题

\*通讯作者。Tel: 025-86869356, E-mail: lirf01@126.com

Received: July 5, 2016 Accepted: October 28, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31371487) and the Collaborative Innovation Center for Cardiovascular Disease Translational Medicine of Jiangsu Province

\*Corresponding author. Tel: +86-25-86869356, E-mail: lirf01@126.com

网络出版时间: 2016-12-29 15:24:23

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161229.1524.006.html>

选择性表达,使后代表型呈现多样性,可使个体在进化选择中保持优势<sup>[3]</sup>。另一方面,由于基因的双等位突变才能表现隐性性状,细胞的二倍体状态成为基因研究工作中的一大障碍,特别是在正向基因筛选中。哺乳动物的体内有两类细胞存在单倍体状态:减数分裂后的生殖细胞和一些肿瘤细胞。卵子和精子有高度特化的功能且在体外不能长期进行培养和扩增,因而无法进行基因操作和筛选。从肿瘤细胞分离出接近于单倍体的亚克隆细胞株虽然能长期稳定培养,但由于来源于癌细胞而且为非整倍体限制了其在基因研究和治疗方面的运用<sup>[4]</sup>。

近年来,小鼠单倍体胚胎干细胞系成功建立,其不仅具有与配子一样稳定的单倍遗传物质,而且能够通过生殖系嵌合及获得半克隆小鼠等方式将遗传修饰传递到下一代,从而实现基因的功能研究从细胞水平提升到机体水平。通过单倍体胚胎干细胞更容易获得隐性特征的动物,因而能够非常方便地进行正反向遗传筛选,在基因打靶过程中缩短实验周期,为哺乳动物的基因研究提供了极大的便利<sup>[5]</sup>。

除了应用于基因功能研究,单倍体干细胞在人类辅助生殖方面也有可能的应用价值。(1)异常的卵细胞是导致生殖障碍的主要原因之一,且限制了辅助生殖技术的效率<sup>[6]</sup>。单倍体多能性干细胞在表观遗传学上与生殖细胞虽有较明显差异,但其功能类似配子,可通过胞质注射形成受精卵得到可育的后代。(2)和卵细胞的低温保存比较,孤雌单倍体胚胎干细胞在液氮中保存更简单、方便、活力持久度更佳。(3)当前,线粒体置换为预防线粒体DNA疾病遗传带来了巨大的希望,此方法是通过用父母的细胞核DNA(含绝大多数遗传物质)和捐赠者的线粒体DNA(含37个基因)构建一个胚胎,这意味着婴儿将获得来自母亲、父亲和第二位女性的遗传信息,但其中存在的伦理问题引起了人们的广泛关注。对于患有遗传疾病尤其线粒体遗传病的女性,孤雌单倍体干细胞为她们获得健康后代提供了可能<sup>[7]</sup>。(4)对于卵巢肿瘤、风湿免疫性疾病、放化疗等女性患者,孤雌单倍体胚胎干细胞为她们保留生殖功能提供了一种新的选择方式<sup>[8]</sup>。

## 1 单倍体胚胎干细胞研究的主要历程

### 1.1 单倍体胚胎干细胞研究的艰难起步

19世纪70年代,科学家利用胚胎分割<sup>[9]</sup>、孤雌

激活卵母细胞<sup>[10]</sup>、显微去除原核<sup>[11]</sup>等方法构建单倍体胚胎,并成功地获得小鼠的单倍体胚胎。1981年小鼠胚胎干细胞成功建系,为得到单倍体胚胎干细胞建立了基础<sup>[12]</sup>。但由于哺乳动物的单倍体具有自发二倍体化现象而且当时没有分选富集单倍体细胞的方法,1983年Kaufman等<sup>[13]</sup>建立单倍体胚胎干细胞的研究仍以失败告终。之后二十多年的研究也未有重大突破<sup>[14]</sup>。

### 1.2 单倍体胚胎干细胞研究走上正轨

2009年,新加坡国立大学的Yi等<sup>[15]</sup>成功建立青鳉鱼单倍体胚胎干细胞(haploid embryonic stem cells, haESCs)细胞系,此细胞系不仅能在体外条件下培养维持单倍体,而且可进行生殖系嵌合且得到半克隆后代。这一成果再次激发了研究者对哺乳动物单倍体胚胎干细胞的研究热情。2011年,Elling等<sup>[5]</sup>及Leeb等<sup>[6]</sup>利用含有2i(PD184352和CH99021)的培养基,首次建立了哺乳动物孤雌单倍体胚胎干细胞系。通过多能性验证发现,建立的孤雌单倍体胚胎干细胞系具有体内外分化能力,然而研究并未证明其获得的小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞能否发生生殖系嵌合、是否保留母源的表观遗传特性以及是否能得到半克隆小鼠。在此基础上,Leeb等<sup>[6]</sup>利用小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞筛选错配修复基因。Elling等<sup>[5]</sup>将逆转录病毒载体转入小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞,仅一轮诱变即成功插入了176 178个位点,使cre重组酶瞬时表达来敲除基因,并且用视黄酸筛选得到Rarg敲除的单倍体干细胞克隆。以上实验见证了单倍体胚胎干细胞在反向基因研究中的高效作用。这一研究小组还通过正向基因筛选发现,Gpr107是蓖麻素作为生化武器使人致死的关键基因。

### 1.3 单倍体胚胎干细胞在基因功能研究中从细胞水平上向生物机体水平迈进

对于基因功能的研究,仅细胞水平上的基因筛选是不充分的,更加需要利用单倍体胚胎干细胞建立转基因动物模型,以便在生物机体水平上阐述特定基因的功能。Leeb等<sup>[17]</sup>验证了孤雌单倍体胚胎干细胞的生殖系嵌合能力。他们分别用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)和红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)标记两个单倍体干细胞细胞系,然后将这两个细胞系混合培养,最后并未观察到同时带有红、绿荧光的细胞,否定了二倍体化

是由细胞融合导致的猜想。2012年, Li<sup>[8]</sup>和Yang<sup>[18]</sup>领导的团队分别报道了将携带父源基因的孤雄单倍体胚胎干细胞代替精子注射入卵细胞, 得到了存活且可育的小鼠后代。值得注意的是, 这些半克隆小鼠都是雌性, 即只有带有X染色体的孤雄单倍体干细胞能得到半克隆小鼠。孤雄单倍体胚胎是以卵细胞作为载体, 因此, 科学家们开始探索小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞是否可携带母源基因来支持正常的胚胎发育从而得到半克隆后代。2013年, Wan等<sup>[19]</sup>将带有增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)报告基因的卵细胞孤雌激活后得到孤雌胚胎干细胞, 流式分选得到G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期孤雌单倍体胚胎干细胞, 然后将其注射入孤雄单倍体胚胎。该研究验证了孤雌单倍体胚胎干细胞具有母源印记, 通过注入孤雄胚胎内能够支持胚胎发育到期, 生成可育健康小鼠。但是将290个二细胞期胞质内孤雌胚胎干细胞注射(intracytoplasmic pHES cell injection, ICPI)胚胎移植入假孕母鼠, 最终只获得2只足月小鼠, 而且仅有1只小鼠成年, 可见此过程的效率很低。这种低效率可能与随着传代印记基因非甲基化有关<sup>[19]</sup>。

#### 1.4 食蟹猴和大鼠孤雌单倍体胚胎干细胞的成功建系

Yang等<sup>[20]</sup>建立了可长期不需流式细胞术筛选就能稳定存在的食蟹猴孤雌单倍体干细胞, 可通过逆转录病毒或piggy bac转座子介导基因筛选, 但未验证其生殖系嵌合能力。后来, Li等<sup>[21]</sup>首次建立具有高度生殖系嵌合能力的大鼠孤雄胚胎干细胞。他们利用大鼠孤雄单倍体胚胎干细胞进行高效正向基因筛选, 且对单倍体胚胎干细胞特异位点进行基因敲除, 从而实现反向基因研究: 成功敲除*SCN4b*(sodium voltage-gated channel beta subunit 4)基因得到长QT综合征模型及利用CRISPR-Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein-9 nuclease)敲除了*Tet*(ten-eleven translocation)家族基因。值得注意的是, 即使进行过基因操作, 大鼠单倍体干细胞仍能维持单倍体及多能性的特点。

#### 1.5 CRISPR-Cas9技术辅助单倍体胚胎干细胞在基因功能研究中的应用

Zhong等<sup>[22]</sup>将CRISPR-Cas9技术与单倍体联合, 得到H19、IG差异性甲基化区域(intergenic

germline-derived DMR)的双敲除孤雄单倍体干细胞系, 使产生健康半克隆小鼠的效率达到了22.3%, 与之前Yang等<sup>[18]</sup>的研究结果相比提高了10倍。对双敲孤雄单倍体干细胞系进行多基因敲除和敲入, 仍能稳定高效得到半克隆小鼠, 而且应用全基因组sgRNA(small guide RNA)文库, 使单个的细胞携带一个sgRNA和Cas9核酸酶, 简单的步骤就可批量产生转基因小鼠, 巩固了单倍体干细胞在个体水平遗传筛选的重要地位。但是利用孤雌单倍体干细胞产生半克隆小鼠必须借助核移植才能实现, 且操作复杂、技术要求高, 只有少数实验室能进行, 限制了单倍体干细胞的研究。后来, Zhong等<sup>[23]</sup>比较了孤雄单倍体干细胞和高代次的孤雌单倍体干细胞的基因表达谱及印记状态发现, 两者相似性很高。因此, 将前述的两个父源印记基因差异性甲基化区域的敲除策略运用于孤雌单倍体干细胞, 只需将H19、IG差异性甲基化区域的双敲孤雌干细胞注入MII卵母细胞即可以15.5%的高效率得到健康半克隆小鼠, 与Wan等<sup>[6]</sup>先得去除母源核构建孤雄胚胎再将孤雌单倍体细胞注入得到重构胚的方法相比, 不仅节约了人力、物力, 而且使得利用孤雌单倍体干细胞得到半克隆小鼠的效率大大提高。

#### 1.6 具有创新性的异源二倍体干细胞带来新思路以及人单倍体胚胎干细胞研究的突破性进展

更加令人振奋的是, Li等<sup>[24]</sup>利用大鼠和小鼠的单倍体干细胞得到了异源二倍体干细胞, 打破了以往异种杂交细胞不稳定、发育受限的四倍体状态, 开辟了单倍体应用的新领域。大/小鼠异源二倍体干细胞有以下特点: (1)在长期培养过程保持完整的二倍体核型、在体内或体外能分化为异源二倍体三胚层细胞、可得到嵌合后代; (2)成为研究X染色体失活调节机制、X染色体失活逃逸相关基因、高效确认种间调节表型差异的基因的强大工具。由此我们想到, 可否利用小鼠或大鼠的孤雄单倍体与食蟹猴的孤雌单倍体进行杂交, 来检验两个种系较远的物种能否得到具有上述特征的异源二倍体, 以便用于灵长类与啮齿类动物基因表达差异的研究。Sagi等<sup>[25]</sup>成功建立了人单倍体胚胎干细胞, 拥有干细胞的典型特征, 这为研究人类基因组功能以及发育机制提供了新颖的方式。利用转座子基因捕获系统得到全基因组突变库, 筛选到了人类6-硫代鸟嘌呤抗性基因。由于伦理问题, 人单倍体胚胎干细胞在基

因缺失研究方面的应用仅止步于细胞水平。通过RNA深度测序分析单倍体胚胎干细胞与二倍体胚胎干细胞发现,单倍体干细胞的X染色体上的基因表达出现与常染色体不匹配的升高,其中的机制有待研究。惊喜的是,体内外分化实验后,通过流式分选仍能得到高达70%单倍体分化细胞。三胚层分化细胞能保持单倍体状态,这与先前报道的小鼠单倍体干细胞分化为三胚层组织后均为二倍体细胞的结果<sup>[5]</sup>形成鲜明对比,但是他们并未进行后续培养来说明在分化状态能维持多久。Zhong等<sup>[26]</sup>通过显微去除人受精卵中的雄原核建立孤雌胚胎,高效得到了两个人单倍体胚胎干细胞系。同时,他们利用化学激活法却未得到单倍体细胞系。他们推测,因为精子介导的卵母细胞激活更有利于胚胎发育。由此可见,选择适合的激活方法对建系至关重要。

## 2 获得单倍体胚胎干细胞的方法

根据来源,人们将单倍体干细胞分成了孤雌单倍体胚胎干细胞和孤雄单倍体胚胎干细胞。建立单倍体胚胎干细胞首先需要得到孤雌胚胎或孤雄胚胎。孤雌胚胎的获得主要通过物理和化学方法引起胞内钙振荡,进而使卵细胞开始发育,模拟正常的受精过程。其中,物理方法主要是电脉冲,化学方法包

括乙醇、离子霉素、细胞松弛素、放线菌酮等,还可以采用联合法(物理-化学、化学-化学、物理-物理),最终目的是,尽可能地模拟精子进入卵子时引发的钙振荡从而激活卵细胞完成减数分裂,之后将其在体内或体外培养,获得孤雌囊胚<sup>[27]</sup>。也可通过显微去除受精卵的雄原核建立孤雌胚胎,但是此方法技术要求高。孤雌胚胎的获得较复杂,在进行激活之前还需建立带有雄性基因组的“卵细胞”,主要通过去除受精卵中的雌原核和向去核的卵母细胞注入成熟精子的头部这两种方法<sup>[18]</sup>(图1)。

随后,用化学免疫法去除孤雌胚胎或孤雄胚胎囊胚的滋养层,得到的内细胞团接种在以丝裂霉素C或 $\gamma$ 射线处理成纤维细胞制作的饲养层上,使用干细胞培养液进行培养。在传代过程中,将干细胞克隆团块用消化酶打散成单个细胞后用Hoechst33342染色,定期使用流式细胞仪进行分选富集,建立单倍体胚胎干细胞系。

## 3 单倍体干细胞的特点

在克隆形态、增殖能力、基因表达模式、分化潜能等方面,单倍体干细胞与二倍体的干细胞相似。无论是孤雌单倍体胚胎干细胞还是孤雄单倍体胚胎干细胞,都只带有一条X染色体。由于细胞的大小

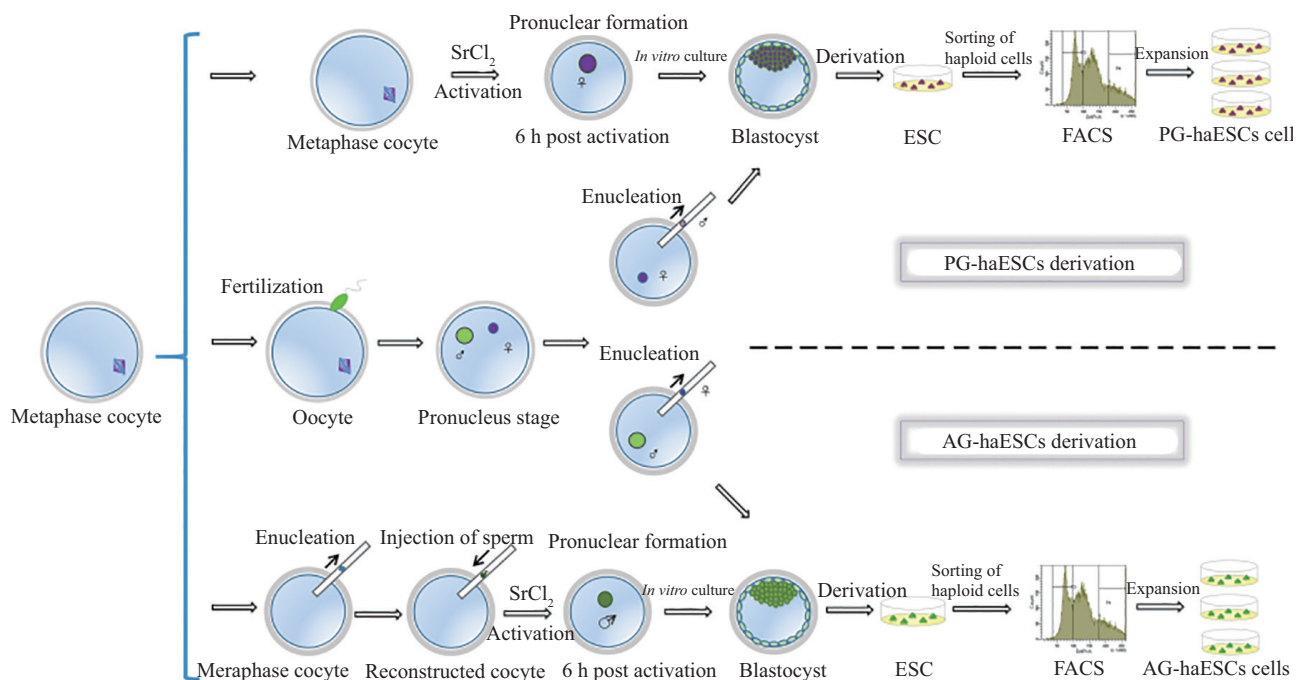


图1 来源于孤雌或孤雄胚胎的单倍体胚胎干细胞(根据文献[28]适当修改)

Fig.1 Derivation of haploid embryonic stem cells (haESCs) from parthenogenetic and androgenetic haploid embryos (modified from reference [28])

与其染色体倍型有关, 单倍体胚胎干细胞的体积大约是其二倍体胚胎干细胞体积的三分之二<sup>[1]</sup>。

在培养过程中, 哺乳动物的单倍体干细胞易于二倍体化, Elling等<sup>[5]</sup>估计每天约有2%~3%的单倍体细胞染色体加倍成为二倍体细胞。来源于单倍体干细胞的二倍体细胞仍然具有干细胞特性, 体外能够形成拟胚体, 体内能够形成畸胎瘤, 所形成的类胚体和畸胎瘤都带有三胚层标记。在分化实验中, 可发现分化形成的三胚层组织均为二倍体细胞。这不禁让科学家猜想, 单倍体干细胞是否必须二倍体化为“正常”干细胞才能发挥干细胞的全/多能性( naïve/primed)的特点。单倍体胚胎干细胞在体外分化为神经干细胞后仍能维持单倍体, 神经前体细胞进一步诱导分化为胶质细胞和神经细胞, 4天内所有的细胞都成为二倍体。这很大程度上动摇了单倍体干细胞必须二倍体化才能具有发育潜能分化为各胚层组织的猜想。分化状态的细胞很难长久维持单倍体状态。Shuai等<sup>[29]</sup>通过定期筛选, 添加Y-27632和Pifithrin-a得到稳定的单倍体外胚层干细胞, 证明了单倍体干细胞的单倍体不稳定性与多能性状态无关。

## 4 单倍体干细胞研究面临的难题

### 4.1 染色体单倍体的维持

单倍体细胞自发二倍体化的特点是一把双刃剑, 既要利用又要避免。一方面, 基因改造过的单倍体细胞因其自发二倍体化使我们可以轻松得到100%纯和基因型的转基因二倍体细胞。另一方面, 在进行基因操作前, 我们要寻找可靠方法来维持稳定的单倍体状态。目前对自发二倍体化的机制尚不了解, 主要通过定期对细胞系进行流式细胞术分选富集单倍体细胞, 去除细胞系中已二倍体化的细胞来建立稳定的单倍体细胞系。但是应用流式细胞术, 单倍体干细胞必须用核染料进行染色且暴露在紫外光下分选富集, 这些无疑对单倍体干细胞造成了不可避免的损伤甚至凋亡, 影响随后的胚胎发育能力。最近, Takahashi等<sup>[30]</sup>研究发现, 向培养体系中添加适量的Week1激酶小分子抑制剂PD166285可使孤雌单倍体干细胞不用流式细胞术筛选纯化即可保持单倍体状态至少4周。这种抑制剂是通过调节细胞周期, 加速G<sub>2</sub>期向M期过渡, 抑制细胞重新进入G<sub>1</sub>/S期来实现这一作用。经过处理的单倍体干细胞保持基因组完整性, 表达干细胞标记基因, 在体内外仍有三胚

层分化潜能, 说明PD166285对于单倍体干细胞倍型的维持是“安全有效”的。这无疑巩固了单倍体干细胞在正反向基因筛选研究的地位, 且对于单倍体干细胞细胞周期的调节机制研究提供了方向。

### 4.2 保持正常的基因印记状态

正常的基因印记状态是哺乳动物的正常发育的基本条件, 但在分离和体外培养单倍体干细胞过程中基因印记状态会发生改变。小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞*Snrpn*(small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N)和*Airn*(antisense Igf2r RNA)两个母源印记基因不管在早期传代还是晚期传代都能保持正常, 即非甲基化状态。但是, *H19*和*Gtl2*(gon-two like)随着传代次数增加失去了原本的甲基化状态。这一现象是小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞内在特性还是由于传代导致需要进一步的研究<sup>[8]</sup>。类似地, Yang等研究组<sup>[18,22]</sup>对小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞进行印记基因分析发现, *Gtl2*的甲基化状态大体上完整, 而*H19*表达上调。那些因发育迟缓出生后不久便死亡的小鼠, *H19*基因的差异性甲基化区域异常(即失去了甲基化), 而那些健康长到成年的小鼠具有正常的甲基化状态。他们认为, *H19*印记的丢失可能是低效率产生半克隆小鼠的主要原因, 而且孤雌胚胎干细胞代次越高, 得到的发育迟缓的半克隆小鼠发育迟缓越多。单倍体干细胞在体外培养过程中, 印记基因异常趋于明显。对食蟹猴孤雌单倍体胚胎干细胞的*Snrpn*和*H19*基因的甲基化状态进行分析发现, *Snrpn*保持正常的甲基化(和孤雌单倍体来源于雌性食蟹猴卵子的事实一致), 而*H19*在雌性等位基因上未甲基化的状态被打破, 在2个食蟹猴孤雌单倍体干细胞系均有出现<sup>[20]</sup>。单倍体胚胎干细胞二倍体化后仍具有干细胞特性, 但是上述文章都没有检测当单倍体细胞二倍体化后其印记状态与单倍体干细胞, 以及跟“正常来源”的二倍体胚胎干细胞之间是否有差异。由于基因印记异常, 半克隆小鼠的出生率低, 且有一半出生小鼠发育迟缓而在出生后不久死亡<sup>[18]</sup>。当利用CRISP-Cas9敲除异常基因印记区域后, 健康且有生殖能力的半克隆小鼠产出率提高了约10倍<sup>[22]</sup>。优化培养条件以及结合基因打靶技术保证单倍体干细胞的正常印记状态, 对于广泛利用单倍体干细胞在机体水平进行正反基因筛选至关重要。

### 4.3 实验动物的遗传背景选择

最初获得的小鼠胚胎干细胞系, 供体的遗传背

景是129品系小鼠,其睾丸畸胎瘤自发率达30%。此品系小鼠具有胚胎干细胞的高建系率和高生殖系嵌合率的特点。之后,科学家尝试对其他品系的小鼠进行胚胎干细胞建系,该过程并不是一帆风顺,例如在时隔将近30年后Hanna等<sup>[31]</sup>建立具有生殖系嵌合能力的非肥胖性糖尿病小鼠(non-obese diabetic mouse, NOD)胚胎干细胞系,但是必须在表达外源基因(Krüppel like factors/v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog, Klf/C-myc)或添加小分子(CHIR99021、Kenpaullone)的情况下才能得到稳定的胚胎干细胞系,否则转变为外胚层干细胞。2011年,Elling等<sup>[5]</sup>及Leeb等<sup>[6]</sup>都利用杂交一代小鼠的MII期卵母细胞建立孤雌胚胎干细胞系,可能高杂合度的遗传背景是成功、高效率建系的关键因素。李劲松团队<sup>[20]</sup>建立来自食蟹猴孤雌囊胚的单倍体胚胎干细胞系MPH1和MPH2。在不进行细胞分选富集的情况下,MPH1能够在体外维持单倍体状态超过140天,而MPH2只能维持60天左右。通过进一步研究发现,这一差异与细胞本身的增长速度没有关系。由于这两株细胞来自两只不同的供体猴,该差异可能是两只供体猴本身的遗传背景差异造成的。建立稳定的单倍体干细胞应当慎重选择特定遗传背景的实验动物。对那些易建立起胚胎干细胞的品系的研究,可为优化干细胞的分离、建系及得到原始态单倍体胚胎干细胞提供借鉴。

#### 4.4 物种差异对建系的影响

物种之间发育及遗传背景差异可能是不同物种胚胎干细胞建系难易存在差异及得到不同状态(即原始态多能性和始发态多能性)干细胞的根本原因<sup>[32]</sup>。目前,在大鼠、小鼠、灵长类动物的二倍体胚胎干细胞已成功建系,而真正的猪胚胎干细胞系却迟迟未被建立。在孤雌单倍体干细胞研究中,我们也可以发现,不同物种的单倍体干细胞存在差异。小鼠及大鼠的孤雌单倍体干细胞必须每4~5代进行一次流式细胞术筛选来消除细胞系中的异质性,维持“纯正”的单倍体干细胞系<sup>[5,21]</sup>。在体外培养过程中,食蟹猴孤雌单倍体胚胎干细胞却可长期不经筛选仍然保持单倍体状态<sup>[20]</sup>。在三胚层分化实验中,研究人员发现,小鼠及大鼠的孤雌单倍体干细胞分化后,三胚层细胞几乎都为二倍体。令人惊讶的是,最近成功建系的人单倍体干细胞在分化为三胚层细胞后,相当数量的细胞可维持单倍体状态<sup>[25]</sup>。除上述小鼠、

大鼠、人和食蟹猴外,其他物种尚未见成功建立孤雌单倍体干细胞系的报道。我们对单纯电激活获得的猪早期孤雌胚胎进行基因组分析发现,约半数卵裂球仍然是遗传完整的单倍体细胞。我们将由此方法获得的孤雌胚胎移植到代孕母猪,回收孤雌胎儿建立了早期孤雌胎儿成纤维细胞系,以期望通过流式细胞筛选获得大量的单倍体细胞。非常遗憾的是,富集获得的胎儿成纤维细胞中单倍体细胞比例没有明显提高(富集之前的单倍体细胞比率3.4%~8.3%,富集之后的单倍体细胞比率5.6%~6.0%),且存在染色体的随机丢失与补充<sup>[33]</sup>。猪在异种移植、疾病动物模型领域占据极其重要的地位,建立猪单倍体干细胞可加快相关研究的进程。

## 5 结语

haESCs具有多能性,在体外可以诱导分化为不同类型的细胞。但目前培养的体系下,单倍体胚胎干细胞易于发生二倍体化,其中的原因需要进一步探究,寻找更好的维持单倍体状态的方法。在此基础上,我们可得到高效的单倍体干细胞体外分化体系,再结合Crisp-Cas9技术大规模的敲入或敲除基因,最终建立单倍体细胞突变文库。在细胞水平上,对疾病(如肿瘤)、药物作用机制、毒物致病机理研究发挥作用。另一方面,进行过基因改造的单倍体胚胎干细胞可代替卵子或精子,通过胞质内注射得到转基因半克隆小鼠。相比传统的转基因小鼠的制备方法,利用单倍体胚胎干细胞极大地缩短了实验周期,推动了在动物个体水平上的实验研究进程。单倍体胚胎干细胞正常印记状态的维持方法也需要进一步研究,这样可提高健康半克隆动物的生产效率。

### 参考文献 (References)

- 1 Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 1974; 183(4120): 46-51.
- 2 Schimenti J. Haploid embryonic stem cells and the dominance of recessive traits. *Cell Stem Cell* 2011; 9(6): 488-9.
- 3 Leeb M, Wutz A. Haploid genomes illustrate epigenetic constraints and gene dosage effects in mammals. *Epigenetics Chromatin* 2013; 6(1): 41.
- 4 Sukov WR, Ketterling RP, Wei S, Monaghan K, Blunden P, Mazzara P, *et al.* Nearly identical near-haploid karyotype in a peritoneal mesothelioma and a retroperitoneal malignant peripheral nerve sheath tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 202(2): 123-8.

- 5 Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, O'Malley R, Demers SP, Vanhaelen Q, *et al.* Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9(6): 563-74.
- 6 Wan H, He Z, Dong M, Gu T, Luo GZ, Teng F, *et al.* Parthenogenetic haploid embryonic stem cells produce fertile mice. *Cell Res* 2013; 23(11): 1330-3.
- 7 Murray TH. Genetics. Stirring the simmering "designer baby" pot. *Science* 2014; 343(6176): 1208-10.
- 8 Li W, Shuai L, Wan H, Dong M, Wang M, Sang L, *et al.* Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature* 2012; 490(7420): 407-11.
- 9 Tarkowski AK, Rossant J. Haploid mouse blastocysts developed from bisected zygotes. *Nature* 1976; 259(5545): 663-5.
- 10 Tarkowski AK, Witkowska A, Nowicka J. Experimental parthenogenesis in the mouse. *Nature* 1970; 226(5241): 162-5.
- 11 Modlinski JA. Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus. *J Embryol Exp Morphol* 1975; 33(4): 897-905.
- 12 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- 13 Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, Evans MJ. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1983; 73: 249-61.
- 14 Latham KE, Akutsu H, Patel B, Yanagimachi R. Comparison of gene expression during preimplantation development between diploid and haploid mouse embryos. *Biol Reprod* 2002; 67(2): 386-92.
- 15 Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science* 2009; 326(5951): 430-3.
- 16 Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature* 2011; 479(7371): 131-4.
- 17 Leeb M, Walker R, Mansfield B, Nichols J, Smith A, Wutz A. Germline potential of parthenogenetic haploid mouse embryonic stem cells. *Development* 2012; 139(18): 3301-5.
- 18 Yang H, Shi L, Wang BA, Liang D, Zhong C, Liu W, *et al.* Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell* 2012; 149(3): 605-17.
- 19 Wan H, He Z, Dong M, Gu T, Luo GZ, Teng F, *et al.* Parthenogenetic haploid embryonic stem cells produce fertile mice. *Cell Res* 2013; 23(11): 1330-3.
- 20 Yang H, Liu Z, Ma Y, Zhong C, Yin Q, Zhou C, *et al.* Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell Res* 2013; 23(10): 1187-200.
- 21 Li W, Li X, Li T, Jiang MG, Wan H, Luo GZ, *et al.* Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2014; 14(3): 404-14.
- 22 Zhong C, Yin Q, Xie Z, Bai M, Dong R, Tang W, *et al.* CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library. *Cell Stem Cell* 2015; 17(2): 221-32.
- 23 Zhong C, Xie Z, Yin Q, Dong R, Yang S, Wu Y, *et al.* Parthenogenetic haploid embryonic stem cells efficiently support mouse generation by oocyte injection. *Cell Res* 2016; 26(1): 131-4.
- 24 Li X, Cui XL, Wang JQ, Wang YK, Li YF, Wang LY, *et al.* Generation and application of mouse-rat allodiploid embryonic stem cells. *Cell* 2016; 164(1/2): 279-92.
- 25 Sagi I, Chia G, Golan-Lev T, Peretz M, Weissbein U, Sui L, *et al.* Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells. *Nature* 2016; 532(7597): 107-11.
- 26 Zhong C, Zhang M, Yin Q, Zhao H, Wang Y, Huang S, *et al.* Generation of human haploid embryonic stem cells from parthenogenetic embryos obtained by microsurgical removal of male pronucleus. *Cell Res* 2016; 26(6): 743-6.
- 27 张曼玲, 赵丽华, 周鑫, 李荣凤. 不同激活方法对猪孤雌胚胎单倍体率的影响. *中国农业科学* (Zhang Manling, Zhao Lihua, Zhou Xin, Li Rongfeng. Different activation methods on the influence of the porcine parthenogenetic embryos' haploid rate. *Scientia Agricultura Sinica*) 2011; 44(1): 218-24.
- 28 Bai M, Wu Y, Li J. Generation and application of mammalian haploid embryonic stem cells. *J Intern Med* 2016; 280(3): 236-45.
- 29 Shuai L, Wang Y, Dong M, Wang X, Sang L, Wang M, *et al.* Durable pluripotency and haploidy in epiblast stem cells derived from haploid embryonic stem cells *in vitro*. *J Mol Cell Biol* 2015; 7(4): 326-37.
- 30 Takahashi S, Lee J, Kohda T, Matsuzawa A, Kawasumi M, Kanai-Azuma M, *et al.* Induction of the G<sub>2</sub>/M transition stabilizes haploid embryonic stem cells. *Development* 2014; 141(20): 3842-7.
- 31 Hanna J, Markoulaki S, Mitalipova M, Cheng AW, Cassady JP, Staerk J, *et al.* Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 513-24.
- 32 Wu J, Izpisua Belmonte JC. Dynamic pluripotent stem cell states and their applications. *Cell Stem Cell* 2015; 17(5): 509-25.
- 33 Liu Q, Zhang M, Hou D, Han X, Jin Y, Zhao L, *et al.* Karyotype characterization of *in vivo*- and *in vitro*-derived porcine parthenogenetic cell lines. *PLoS One* 2014; 9(5): e97974.