

孙强, 中国科学院神经科学研究所研究员。致力于哺乳动物生殖与发育和模式动物构建相关技术研究; 首次获得具有自闭症表型的转基因猴, 并利用精巢异种移植技术加速获得F1代个体; 首次获得体细胞克隆非人灵长类动物; 首次克隆出基因编辑的节律紊乱疾病模型猴。

<http://www.ion.ac.cn/chinese/corefacilities/Non-human/index.htm>

核移植技术的建立与发展

廖兆蒂 刘真 孙强*

(中国科学院神经科学研究所, 上海 200031)

摘要 核移植技术是指通过显微操作技术将供体细胞核转移到去核卵母细胞, 进而获得重构胚胎的过程。从上世纪50年代开始到现在, 核移植技术得到了广泛的发展和深入的研究, 并在生命科学的多个领域发挥重要的作用。核移植技术的建立与发展可分为两个阶段: 起始阶段开始于卵体积较大的两栖动物。这一阶段核移植技术主要用来研究细胞核的功能及与胞质之间相互作用。其后核移植技术在哺乳动物中的应用促进了该技术的更深入发展。相对于两栖动物, 核移植技术在哺乳动物中的研究和应用也呈现更加深入、多元的特点。主要包括: 不同哺乳动物物种及不同供体细胞类型的克隆研究; 显微操作技术的发展和完善; 重编程机制的研究及核移植效率的提高; 核移植在濒危物种保护、个性化干细胞治疗及遗传修饰动物模型构建方面的应用等。该文将就这两个阶段核移植技术的发展历程进行综述并对其在非人灵长类动物模型构建中的应用进行展望。

关键词 核移植; 显微操作技术; 两栖动物; 哺乳动物; 重编程; 非人灵长类动物

The Establishment and Development of Nuclear Transfer

Liao Zhaodi, Liu Zhen, Sun Qiang*

(Shanghai Institutes for Biological Sciences, CAS, Shanghai 200031, China)

Abstract Nuclear transfer is a technique used to obtain clone embryos or individuals, in detail, people apply micromanipulation skills to transfer donor nuclei into enucleated oocytes, then the reconstructed embryos undergo either *in vivo* or *in vitro* culture. From 1950's to the present, nuclear transfer technology has been widely and deeply developed, and play a significant role in the fields of life science. The establishment and development of nuclear transfer technology can be divided into two stages: initial stage started in the eggs of amphibians. In this period, nuclear transfer technique was firstly used to study the function of nucleus and its interaction with cytoplasm. This technique was further improved later in mammals. Compare with amphibians, the application of

科技部重点研发项目(批准号: 2018YFC1003000)和国家自然科学基金(批准号: 31825018)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54921757, E-mail: qsun@ion.ac.cn

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (Grant No.2018YFC1003000) and the National Natural Science Foundation of China Grant (Grant No.31825018)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921757, E-mail: qsun@ion.ac.cn

网络出版时间: 2019-07-16 16:22:42

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190716.1621.020.html>

nuclear transfer technique in mammals is more intensive and extensive, and this mainly includes: clone of different mammalian species, clone with multiple types of cells, micromanipulation method and procedure improvement, reprogramming mechanism research and efficiency improvement of nuclear transfer, endangered species protection, personal stem cell therapy and gene-modified model generation. In this review we will discuss the development of nuclear transfer technology in the two stages and give a future prospect about the application of the technology in non-human primate model generation.

Keywords nuclear transfer; micromanipulation; amphibian; mammalian; reprogramming; non-human primate

1 以两栖动物为开端的核移植技术的初步建立与发展

在人们尚未认识到细胞核包含了某一物种所有遗传信息之前, Wilhelm Roux和August Weismann等^[1]曾认为细胞核是一种由不同化学物质构成的混合物, 早期胚胎在有丝分裂时可进行“qualitative division”, 即母细胞核不均质分裂产生两个含有不同遗传物质的子细胞核, 其子细胞的分化方向由其从母细胞中获得的遗传物质来决定, 此即Roux-Weismann theory^[1-2]。虽然后期有科学家证实, 至少在受精卵早期卵裂时不同卵裂球的细胞核是相同的, 但由于当时实验技术及方法的匮乏, 直到1952年Robert Briggs和Thomas King^[2]两人才系统地建立了以北美豹蛙的囊胚卵裂球作为核供体的核移植技术。在此基础之上, 1958年, 以John Gurdon为第一作者的研究团队^[3]利用非洲爪蟾晚期胚胎来源、未完全分化的体细胞核进行核移植并成功获得了数只爪蟾个体。紧接着1962年, Gurdon^[4]首次以爪蟾幼体中完全分化的小肠上皮细胞为核供体克隆出爪蟾个体, 虽然其克隆效率极低(约1.4%, 10/726), 但这项工作证明了已经分化的细胞核不仅表达该细胞分化方向的遗传信息, 而且还包含发育成一个完整个体所需要的全部遗传物质。非洲爪蟾是有记载的第一例体细胞核移植动物, 它打开了体细胞重编程领域的大门, John Gurdon也因此与体细胞重编程领域的另一开拓者Shinya Yamanaka共同分享了2012年的诺贝尔生理学奖。

2 核移植技术在哺乳动物水平的建立与发展

两栖动物卵母细胞在体外操作简单且易于培养的特点使其自然而然成为了早期人们利用核移植技术研究细胞核与细胞质功能的重要模式生物, 然而两栖动物与哺乳动物之间的巨大差异使该技

术应用于哺乳动物时遇到诸多问题。首先, 哺乳动物卵母细胞的培养难度更大, 而且其卵母细胞更小, Derek Bromhall发现兔子的卵母细胞直径约为蛙卵的1/1 000, 而小鼠的卵母细胞则比兔卵母细胞还要小^[5], 因此其操作上的难度要比两栖类更大; 其次便是体细胞核移植的问题, 在显微操作技术尚未发展起来的当时, 人们已经开始尝试利用病毒介导胚胎与细胞的融合来实现核转移^[6-8], 但因实验条件限制需先将胚胎外层透明带去掉然后再跟细胞融合, 该方法融合效率低、融合后的胚胎发育较差。

1973年Lin等^[9]将浸泡过灭活仙台病毒的体细胞和一部分病毒悬液注射到二至八细胞时期的小鼠胚胎卵周隙中以达到体细胞与卵裂球融合的目的。1975年Bromhall^[5]在进行家兔的核移植实验时对哺乳动物卵母细胞的微操技术进行了一些改进, 这是显微注射法在哺乳动物中的第一次尝试, 同时也是哺乳动物克隆胚胎可发育至桑葚胚阶段的首次报道, 对日后哺乳动物核移植研究的意义重大。1984年, 英国科学家Steen Willadsen^[10]将绵羊卵母细胞极体及以下近一半的胞质吸取出来以达到去核目的, 并经检测发现留在透明带中的卵胞质大多数为去核部分, 然后他们把八细胞时期的卵裂球注入卵周隙中并在灭活病毒或电刺激下介导二者融合, 最后通过将一部分克隆重组胚胎移植回受体得到了3只克隆绵羊这标志着世界上第一例克隆哺乳动物的诞生。1996年, Keith Campbell等^[11]在*Nature*上发表了他们利用绵羊胚胎干细胞分化而来的上皮细胞TNT4(totipotent for nuclear transfer 4)进行核移植实验并最终获得存活克隆绵羊个体的研究, 他们这项研究也为后来首只体细胞克隆羊“Dolly”的诞生埋下了伏笔。1997年英国Roslin研究所的Keith Campbell和Ian Wilmut等^[12]5位研究者以白面(Finn Dorset)母羊的乳腺细胞为核供体, 以黑面(Scottish

Blackface)母羊的卵母细胞为卵供体,在二者融合获得的重构胚中最终有一枚发育成“Dolly”(白面)。Wilmot等^[12]在这项研究中也采用了羊胚胎成纤维细胞作为核供体,并且也获得了3只克隆个体,但“Dolly”诞生的最大意义在于它的核供体细胞是成年羊来源且高度分化的成熟体细胞,证明了高度分化的哺乳动物体细胞在一定条件下仍然具有发育成完整个体的能力。“Dolly”之后,许多其他体细胞克隆哺乳动物如雨后春笋般被相继报道出来,其中包括:奶牛^[13]、小鼠^[14]、山羊^[15]、猪^[16]、印度野牛^[17]、欧洲盘羊^[18]、兔^[19]、猫^[20]、马^[21]、大鼠^[22]、非洲野猫^[23]、骡子^[24]、爪哇野牛^[25]、鹿^[26]、狗^[27]、雪貂^[28]、狼^[29]、水牛^[30]、骆驼^[31]和猴子^[32]。表1展示了已经被正式报道的体细胞克隆哺乳动物的种类^[33]。

3 哺乳动物体细胞重编程效率提升的相关研究

体细胞克隆的一个重要特点就是个体出生率

很低,说明体细胞在重编程过程中遇到了阻碍,导致其中很大一部分克隆胚胎不能像正常受精卵一样发育,而只有一小部分能够发育为完整个体。那么到底是什么阻碍了体细胞克隆胚胎的正常发育,又为什么有少部分细胞能够跨越这些障碍回复到全能状态并指导胚胎最终发育为完整个体呢?

2005年,来自日本理化研究所的Teruhiko Wakayama团队^[34]将组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA用于处理小鼠的体细胞核移植胚胎,发现TSA可以显著提升其胚胎发育率。该实验中,Wakayama团队^[34]用TSA处理小鼠卵丘细胞、神经干细胞、尾尖成纤维细胞和脾脏细胞的克隆胚后,四组的囊胚率可分别达到75%、40%、60%和80%,其中分别用5 nmol/L和50 nmol/L TSA处理卵丘细胞核移植胚胎均可将小鼠出生率提升到6%以上。

正常体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)的雌性胚胎中存在X染色体失活(X chromosome inactivation, XCI)现象,其作用主要是让两条X染色体中的一

表1 已报道的克隆哺乳动物种类
Table 1 Reported cloned mammalian species

物种 Specie	年份 Year	供体核细胞类型 Donor somatic cell type
Sheep	1997	Mammary cell
Cow	1998	Fetal fibroblast cell
Mouse	1998	Cumulus cell
Goat	1999	Fetal fibroblast cell
Pig	2000	Granulosa cell
Gaur	2000	Skin fibroblast cell
Muflon	2001	Granulosa cell
Rabbit	2002	Cumulus cell
Cat	2002	Cumulus cell
Horse	2003	Skin fibroblast cell
Rat	2003	Fetal fibroblast cell
Banteng	2003	Skin fibroblast cell
Mule	2003	Fetal fibroblast cell
Africa wild cat	2003	Skin fibroblast cell
Deer	2003	Skin fibroblast cell
Dog	2005	Skin fibroblast cell
Ferret	2006	Cumulus cell
Wolf	2007	Skin fibroblast cell
Buffalo	2007	Skin fibroblast cell
Camel	2009	Skin fibroblast cell
Crab-eating monkey	2018	Fetal fibroblast cell

条失活,从而形成基因表达上的剂量补偿(dosage compensation),即在正常受精的雌性胚胎和雄性胚胎中使其X染色体相关基因的表达水平相同^[35-37]。然而2010年Atsuo Ogura团队^[38]发现,小鼠克隆胚胎的X染色体基因表达水平相较于受精卵来说显著降低,同时他们发现,Xist在克隆胚胎中异常表达,这与受精卵中Xist的表达情况明显不同。而Xist是介导XCI的关键长链非编码RNA^[38-39],所以他们认为,Xist的异常表达与小鼠体细胞克隆胚胎中X染色体失活有关^[38]。接下来研究人员们利用Xist敲除的卵丘细胞和睾丸支持细胞进行核移植实验,经检测,雄性和雌性小鼠克隆胚胎中被沉默的X染色体相关基因的数量均有所降低^[38]。最终他们将卵丘细胞和睾丸支持细胞的克隆个体出生率分别提升到12.7%和14.4%^[38]。2011年,Atsuo Ogura团队^[40]在小鼠的体细胞核移植胚胎中注射Xist的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)以敲低Xist表达量,并结合TSA处理重组克隆胚胎将睾丸支持细胞的克隆出生率提升到约20%。但这一实验是基于雄性克隆胚胎,当该实验小组以卵丘细胞为核供体时,发现Xist敲低并不能提升雌性克隆胚胎的出生效率,尽管他们观察到Xist siRNA可有效降低雌性小鼠克隆胚胎中Xist表达量^[41]。

体细胞克隆胚胎中滋养外胚层的异常被认为是限制克隆胚胎发育效率的一个重要因素。2011年,中国科学院李劲松研究员^[42]首次利用胚胎聚合的方法,利用正常受精二细胞胚胎融合得到的四倍体胚胎与体细胞克隆胚胎的内细胞团聚合成一个胚胎,获得拥有正常发育能力的滋养外胚层及克隆胚胎内细胞团的重构胚胎,经过胚胎移植他们发现,重构胚胎的出生率达到15.7%,远高于普通克隆胚胎的2.7%。首次通过实验证明了滋养外胚层确实是影响克隆胚胎发育效率的关键因素之一,为体细胞克隆效率的提升提供了重要参考。

2014年,哈佛大学张毅团队^[43]利用比较转录组分析方法比较了小鼠受精卵在二细胞时期与一细胞时期的转录组,通过二者的比较他们首先找到了811个在IVF胚胎二细胞时期高表达的基因区域。然后比对这些区域在核移植胚胎二细胞时期的表达水平,发现其中342个区域在核移植胚胎中也一样被激活,247个区域只能被部分重编程,另外222个区域的表达则被显著抑制。他们分别将这些区域称为完全

重编程区域(fully reprogrammed regions, FRRs)、部分重编程区域(partially reprogrammed regions, PRRs)和重编程顽固区域(reprogramming resistant regions, RRRs)。随后他们在体细胞水平进行了染色体免疫共沉淀测序(chromatin immunoprecipitation high-throughput sequencing, ChIP-seq),发现在RRR区域有明显的H3K9me3富集,通过在一细胞时期注射H3K9me3特异的组蛋白去甲基化酶Kdm4d可以有效降低体细胞核移植胚胎中H3K9me3的表达水平^[43]。该实验表明,使用Kdm4d可将体细胞克隆胚胎囊胚率提升到88.6%,出生率可提升为7.6%(卵丘细胞)和8.7%(睾丸支持细胞)。

2016年,来自同济大学的高绍荣团队^[44]利用胚胎活检法将小鼠体细胞克隆胚胎的单个卵裂球取出来进行测序分析,而剩下的卵裂球则继续培养并追踪其发育情况。根据发育情况他们将其分为二细胞停滞(NT 2-cell arrest)、二细胞至四细胞停滞(NT 2-cell to 4-cell arrest)、从二细胞发育至囊胚(NT 2-cell to blast)、四细胞停滞(NT 4-cell to arrest)、从四细胞发育至囊胚(NT 4-cell to blast)等5组^[44]。他们首先将二细胞时期的小鼠核移植胚胎与卵母细胞的基因表达进行比较找到全基因组激活(zygotic genome activation, ZGA)时高表达的基因,然后比较NT 2-cell arrest和NT 2-cell to blast两者的差异性表达情况,他们认为,在NT 2-cell to blast组中特异高表达的基因是指导二细胞时期体细胞克隆胚胎继续发育的关键^[44]。于是在结合了Jisha Antony等^[44-45]的工作基础之上他们将Kdm4b mRNA注射进小鼠体细胞克隆胚胎,之后通过少量细胞的ChIP-seq分析发现,克隆胚胎中H3K9me3表达水平显著降低,其囊胚率也得到显著提升。采用类似的方法,他们在NT 4-cell to arrest组和NT 4-cell to blast组中也找到了一些差异性表达的基因。通过进一步分析,他们在NT 4-cell to arrest组发现了Prps1、Rad54b、Kdm5b、Dyrk3和Fgf4等5个与维持细胞全能性相关的基因表达被抑制,最后通过向克隆重组胚胎中注射Kdm5b mRNA以去除H3K4me3甲基化成功帮助其突破四细胞时期的发育阻滞^[44]。最终,该研究通过Kdm4b和Kdm5b的共同作用将小鼠核移植囊胚率提升到95%,个体出生率也达到11.1%^[44]。

2018年,张毅团队^[46]结合Kdm4d和Xist敲除这两种方法将卵丘细胞和睾丸支持细胞的出生率分别

提升到18.7%和23.5%, 这是有史以来小鼠克隆出生率最高的报道。但同时他们发现, 即使小鼠克隆胚胎体外囊胚率很高而且Kdm4d和Xist敲除结合起来可显著提升其出生效率, 大部分胚胎只能够形成着床点却不能发育成完整个体^[46]。因此他们认为, 还存在着一个影响小鼠体细胞克隆胚胎着床后发育的障碍, 而该阻碍在着床前就已经存在了。于是首先他们做了着床前的核移植胚胎和IVF胚胎的全基因组甲基化分析, 结果发现, 囊胚时期小鼠克隆胚胎的甲基化水平与同时期IVF胚胎的甲基化水平相似(15.6% vs 19.1%), 随后对差异性甲基化区域的分析也没有找到阻滞克隆胚胎着床后发育的关键原因^[46]。于是他们转而对小鼠印记基因的表达情况进行等位分析, 发现13个在IVF胚胎母本印记的基因中有7个丢失了其母源印记, 而巧合的是其中4个, Slc38a4、Sfmbt2、Jade1(Phf17)和Gab1在他们2017年的一项研究中显示是由H3K27me3介导形成印记的^[46-47]。最后他们对桑葚胚时期的IVF胚胎进行H3K27me3位点特异性分析并找到了大量母源特异的H3K27me3富集区域, 而这些区域的母源特异性在体细胞核移植胚胎中则大量丢失, 所以他们提出H3K27me3介导的母源印记基因的等位表达很可能是影响小鼠核移植出生率的另一个关键障碍^[46], 但可惜的是该研究并没有给出克服这一障碍的具体方法。

同年, 高绍荣团队^[48]再次利用胚胎活检法将小鼠的体细胞克隆胚胎分为NT 2-cell arrest、NT 2-cell to 4-cell arrest、NT 2-cell to blast、NT 4-cell to arrest、NT 4-cell to blast等5组并对各组的卵裂球进行少量细胞的全基因组甲基化测序。发现小鼠体细胞核移植胚胎的部分差异性甲基化区域会在胚胎发育过程中再次甲基化(re-methylated DMRs,

rDMRs), 他们同时发现, 这些rDMR区域的甲基化是细胞类型特异的, 于是他们推测, 这些再次甲基化的区域是由从头甲基化转移酶Dnmt3a/3b介导的^[48]。通过向小鼠的体细胞克隆胚胎中注射该甲基化转移酶Dnmt3a/3b的siRNA以干扰其表达, 从而将小鼠克隆胚胎出生率提升到5.33%^[48]。而在结合了Kdm4b和Kdm5b之后, 卵丘细胞克隆胚胎的出生率可达到17.21%, 与张毅团队的18.7%十分接近^[48]。

4 灵长类动物核移植相关研究与探索

1997年, 以孟励为第一作者的美国俄勒冈灵长类研究中心的Don Wolf团队^[49]利用早期胚胎卵裂球克隆出两只恒河猴。他们使用盲吸法吸出第一极体及极体以下25%~35%的卵胞质, 后将单个卵裂球注入卵周隙中并在加有cycloheximide和CB的KSOM培养液中激活卵胞质, 再经数次间断性电刺激将两者融合, 融合后的胚胎与大鼠肝细胞体外共同培养^[49]。同时该实验比较了fresh MII、aged MII和合子来源的卵胞质对核移植胚胎发育的影响, 发现与其他两组相比, 老化的MII显著影响了重组胚胎的早期卵裂(仅26%发育到八至十六细胞时期), 合子卵胞质组次之, 而fresh MII组有55%发育到八至十六细胞时期^[49]。将fresh MII组的29枚克隆胚胎移植($n=9$)后有3只受体怀孕, 其中2只分别生下一雌一雄2只克隆猴^[49]。这两只克隆猴虽然以早期胚胎卵裂球为核供体, 但却是第一例克隆出存活灵长类动物的报道, 对日后体细胞克隆猴工作的影响意义深远(图1)。

2002年, Don Wolf团队^[50]首次报道了利用恒河猴体细胞进行灵长类核移植实验的报道。在这项研究中, 他们一方面探索了血清饥饿法和接触抑制法处理胚胎成纤维细胞对体细胞核移植胚胎发育的影响, 另一方面对体细胞克隆胚胎的激活时间(电

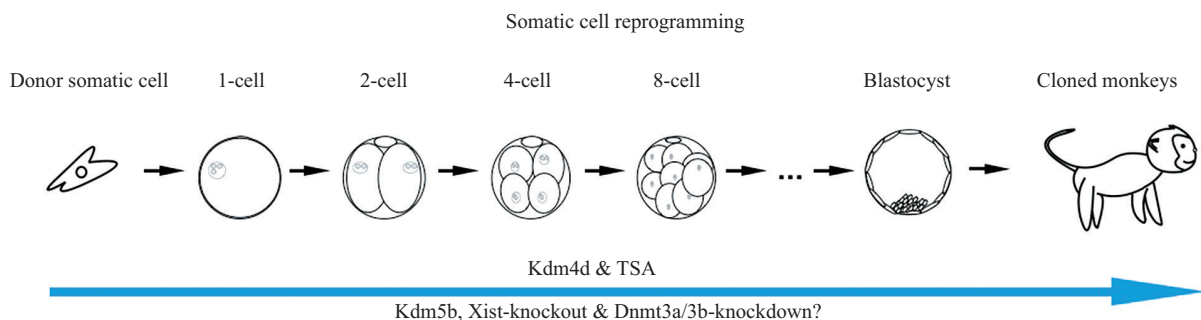


图1 已在非人灵长类克隆实验中验证或未经验证的促进体细胞重编程的因子

Fig.1 Factors certified and uncertified in non-human primate that claims to promote somatic cell reprogramming

融合之前4个小时激活卵胞质、融合之后立即激活、融合3个小时之后再激活)和激活方法(ionomycin/DAMP和ionomycin/roscovitine/CB)进行了探讨^[50]。最终他们选择以接触抑制法处理后的胚胎成纤维细胞为核供体,在供体细胞与卵胞质融合3个小时之后以I/DAMP法激活重组胚胎,并将14枚体细胞核移植胚胎移植到3只受体,但受体全部没有怀孕^[50]。该实验还以十六细胞时期的卵裂球为核供体细胞进行了核移植尝试,并在155天时通过剖腹产获得一只死胎^[50]。

2003年,由Gerald Schatten所领导的团队^[51]将33枚恒河猴的体细胞核移植胚胎移植入16只受体,但都没有怀孕。有趣的是,Shatten等^[51]在这项研究中首次对灵长类体细胞核移植胚胎有丝分裂时纺锤体的紊乱现象进行了描述,他们认为对卵母细胞去核的同时也破坏了NuMA和HES2这两个与细胞分裂有关的蛋白,从而导致了克隆胚胎发育异常。

2004年,Paolo Martelli团队^[52]在Schatten等的基础上对食蟹猴体细胞核移植胚胎的第一次卵裂进行了系统的研究,并使用了SpindleView技术来实现快速去核和直接观察细胞核的形态,这也是偏振光技术在核移植领域的首次应用。他们观察到在供体核注入胚胎2小时后,大部分克隆胚胎在纺锤体类似结构形成过程中会出现异常^[52]。研究者们在该研究的最后将93枚体细胞克隆胚胎移植入31只受体,但最终7个怀孕的受体其孕期均没有超过60天^[52]。

由于传统的盲吸法去核对卵母细胞的损伤较大,操作缓慢,而且很难将所有细胞核在较短的时间内全部去除,为了进一步优化灵长类核移植程序,2007年,Don Wolf团队^[53]对核移植中的去核过程进行改进。他们使用Oosight Imaging System(一种偏振光系统)将每颗卵的去核时间缩短到1分钟之内,去核效率也提升到100%。同年,该研究团队的第一作者Shoukhrat Mitalipov利用这一改进后的去核方法以成年恒河猴成纤维细胞为供体细胞成功建立了两支雄性灵长类核移植干细胞系,并以通讯作者的身份将该研究发表于*Nature*^[54]。2009年该团队^[55]利用同样的方法建立了另外两支雌性核移植干细胞系。

2010年,Shoukhrat Mitalipov团队^[56]在以上对核移植程序的优化基础上又对融合、激活时间和克隆胚胎培养等步骤进一步改进。他们认为,电极法

介导融合时也会是卵母细胞过早激活,所以改用仙台病毒提取物来介导二者融合,在激活时间上也由原来的融合后2个小时再激活改为融合后立即激活,最后结合37.5 nmol/L TSA处理重组胚胎22~24个小时^[56]。通过这些改进,他们发现猴子的体细胞核移植胚胎囊胚率可提升到18%左右^[56]。在移植了67枚胚胎后,有一枚最终在孕期81天时流产,这也是截至2018年“中中”和“华华”为止,灵长类克隆胚胎在体内发育最久的报道^[56]。

2013年,Mitalipov团队^[57]首次报道了人的核移植干细胞系的建立,并且他们在该研究中进一步优化了“注核”和重组胚胎处理条件。当研究成员们首先把胚胎成纤维细胞与完整MII时期卵母细胞融合后,17/17的重组胚胎会在30分钟内形成类似纺锤体的结构,而当3枚去核MII卵母细胞与体细胞融合后没有一枚观察到有该现象,所以他们认为,去核这一步会导致卵母细胞过早激活从而影响了纺锤体类似结构的形成^[57]。本实验中他们在操作液中加入caffeine,caffeine是一种蛋白磷酸化酶抑制剂,可以有效阻止供体卵母细胞的过早激活;另外,传统的电刺激促进融合也很有可能使卵细胞过早激活。于是研究人员们使用灭活的日本红血球凝聚病毒膜(envelop of inactivated hemagglutinating virus of Japan, HVJ-E)介导供体细胞与受体卵胞质的融合^[57]。最终,通过对操作程序的优化并联合使用TSA和caffeine这两个因子,人的克隆胚胎的囊胚率可达到23.5%,NT-ESC的建系效率也达到50%^[57]。采用这一技术,该团队^[57]利用Leigh综合征患者皮肤来源的成纤维细胞成功建立了该病人特异的NT-ESC^[57]。利用核移植技术将体细胞经过重编程回复到全能状态从而建立起个性化的干细胞系,再诱导NT-ESC分化形成功能性细胞用于治疗疾病并且同时可排除免疫排斥风险,这种治疗性克隆为人类克服疾病困扰提供了新途径。

2018新年伊始,来自中国科学院神经所灵长类研究平台的孙强团队^[32]就在*Cell*刊文报道了克隆食蟹猴“中中”、“华华”的诞生,同时标志着世界上第一例非人灵长类动物的成功克隆。该团队在总结了前人经验的基础上对灵长类核移植技术进一步改进,利用Oosight Imaging System快速去核,HVJ-E介导体细胞与受体卵胞质融合,同时摒弃了电击法激活而完全改用ionomycin/DAMP/TSA(I/D/T)法激活克隆胚胎,之后用TSA处理重组胚胎,最关键的是在

克隆胚胎中注射*Kdm4d*的信使RNA以实现RRR区域H3K9me3甲基化的去除,促进体细胞重编程过程的顺利进行从而显著提升其优质囊胚率^[32]。2019年初,该团队^[58]从经过基因编辑、节律紊乱的成体猴皮肤中分离出成纤维细胞,然后采用同一方法克隆出5只疾病模型猴,这项工作发表于*National Science Review*。从以上灵长类核移植的研究进程我们可以发现,克隆灵长类动物作为困扰了核移植领域多年的难题,科学家们对其攻破所做的努力绝非一朝一夕,而是总结了前人们许多失败和成功的经验并在此基础上进一步优化核移植技术和条件而获得的创新性研究成果。

5 体细胞核移植技术在非人灵长类疾病模型构建中的优势及意义

目前,人的疾病研究主要利用大小鼠等动物模型展开^[59],典型的如帕金森综合征^[60],这是由于小鼠具有体积小、易操作、生殖周期短等优点。经过精确设计、在其基因组特定位点遗传修饰过的模式动物,如基因敲除和基因敲入动物模型,对诠释疾病的发病机理等研究中发挥了重要作用。但由于进化上的物种分离导致啮齿类动物与灵长类动物在解剖学和亲缘关系上存在巨大差距^[61],很多灵长类动物特有疾病或者生理结构及功能的研究并不能很好的在啮齿动物中展开^[59-60]。由于进化上与人相近,非人灵长类的脑结构、功能活动等很多方面与人类高度相似^[62]。相对于其他实验动物,非人灵长类是研究脑疾病机理和治疗方法的理想模型。然而传统的基于慢病毒感染和胚胎基因编辑构建非人灵长类基因修饰动物模型的方法还存在脱靶、首建动物嵌合、复杂基因修饰操作困难和遗传背景复杂等几个关键问题没有解决。

体细胞核移植为解决以上问题提供了一种可能。研究人员们可以对体细胞进行基因编辑,然后经过一系列筛选步骤获得阳性克隆,将这些阳性克隆用于核移植,出生的个体在首代即为非嵌合体。这种方法的优势在于可对体细胞进行复杂修饰,如基因敲入、敲除以及定点突变等,缩短了获得非嵌合体的周期,更重要的是这些基因编辑个体其遗传背景几乎一致,解决了灵长类动物没有近交系的问题,可大大减少临床应用和科学研究中实验动物的使用量。非人类灵长类体细胞核移植的建立和优化

将为非人灵长类基因操作提供更为便利和精准的技术条件,使得非人灵长类遗传操纵动物模型成为真正意义上的可以广泛应用的动物模型,将极大地推动灵长类生物学、生物医学尤其是脑认知科学及脑疾病等的研究。

参考文献 (References)

- 1 Wilson EB. The cell in development and inheritance. *Mol Biol Cell* 2015; 26(21): 3697-9.
- 2 Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into nucleated frog's eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1952; 38(5): 455-63.
- 3 Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958; 182(4627): 64-5.
- 4 Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol exp Morph* 1962; 10: 622-40.
- 5 Bromhall JD. Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature* 1975; 258: 719-22.
- 6 Baranska W, Koprowski H. Fusion of unfertilized mouse eggs with somatic cells. *J Exp Zool* 1970; 174(1): 1-14.
- 7 Bernstein RM, Mukherjee BB. Control of nuclear RNA synthesis in 2-cell and 4-cell mouse embryos. *Nature* 1972; 238(5365): 457-59.
- 8 Lin TP, Florence J, Oh JO. Fusion of mouse egg cells induced by Newcastle disease virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1972; 139(1): 169-72.
- 9 Lin TP, Florence J. Cell fusion induced by a virus within the zona pellucida of mouse eggs. *Nature* 1973; 242(5392): 47-9.
- 10 Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 320(6057): 63-5.
- 11 Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380(6569): 64-6.
- 12 Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385(6619): 810-3.
- 13 Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, et al. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 28: 1256-8.
- 14 Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394(6691): 369-74.
- 15 Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destrempes MM, Cammuso C, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol* 1999; 17(5): 456-61.
- 16 Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 407(6800): 86-90.
- 17 Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Moraes CT, Farin PW, Farin CE, et al. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2000; 2(2): 79-90.
- 18 Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P, Clinton M. Ge-

- netic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19(10): 962-4.
- 19 Chesné P, Adenot PG, Viglietta CI, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20(4): 366-9.
 - 20 Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002; 415(6874): 859.
 - 21 Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, *et al.* Pregnancy: A cloned horse born to its dam twin. *Nature* 2003; 424(6949): 635.
 - 22 Zhou Q, Renard JP, Fric GL, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, *et al.* Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 2003; 302(5648): 1179.
 - 23 Gomez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, *et al.* Birth of african wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* 2004; 6(3): 247-58.
 - 24 Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, *et al.* A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 2003; 30(5636): 1063.
 - 25 Janssen DL, Edwards ML, Koster JA, Lanza RP, Ryder OA. Postnatal management of chryptorchid banteng calves cloned by nuclear transfer utilizing frozen fibroblast cultures and enucleated cow ova. *Reprod Fertil Dev* 2004; doi: org/10.1071/RD08222.
 - 26 CVM researchers first to clone white-tailed deer-Texas A&M Veterinary Medicine & Biomedical Scienc. <http://vetmed-web.cvm.tamu.edu/news/press-releases/cvm-researchers-first-to-clone-white-tailed-deer> 2003.
 - 27 Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, *et al.* Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 2005; 436(7051): 641.
 - 28 Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q, *et al.* Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol* 2006; 293(2): 439-48.
 - 29 Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, *et al.* Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning and Stem Cells* 2007; 9(1): 130-7.
 - 30 Shi D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, *et al.* *Buffalos (Bubalus bubalis)* cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol Reprod* 2007; 77(2): 285-91.
 - 31 Wani NA, Wernery U, Hassan FAH, Wernery R, Skidmore JA. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 2010; 82(2): 373-9.
 - 32 Liu Z, Cai Y, Wang Y, Nie Y, Zhang C, Xu Y, *et al.* Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 2018; 172(1): 881-7, e7.
 - 33 Rodriguez-Osorio N, Urrego R, Cibelli JB, Eilertsen K, Memili E. Reprogramming mammalian somatic cells. *Theriogenology* 2012; 78: 1869-86.
 - 34 Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, *et al.* Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340(1): 183-9.
 - 35 Lee Jeannie T, Bartolomei Marisa S. X-Inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell* 2013; 152(6): 1308-23.
 - 36 Tukiainen T, Villani AC, Yen A, Rivas MA, Marshall JL, Satija R, *et al.* Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. *Nature* 2017; 550(7675): 244-8.
 - 37 Sahakyan A, Yang Y, Plath K. The role of Xist in X-Chromosome dosage compensation. *Trends in cell biology* 2018; 28(12): 999-1013.
 - 38 Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, *et al.* Impeding Xist expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science* 2010; 330(6003): 496-9.
 - 39 Chen C-K, Blanco M, Jackson C, Aznauryan E, Ollikainen N, Surka C, *et al.* Xist recruits the X chromosome to the nuclear lamina to enable chromosome-wide silencing. *Science* 2016; 354: 468-72.
 - 40 Matoba S, Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Mizutani E, Ogonuki N, *et al.* RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(51): 20621-6.
 - 41 Oikawa M, Matoba S, Inoue K, Kamimura S, Hirose M, Ogonuki N, *et al.* RNAi-mediated knockdown of Xist does not rescue the impaired development of female cloned mouse embryos. *J Reprod Dev* 2013; 59(3): 231-7.
 - 42 Lin J, Shi L, Zhang M, Yang H, Qin Y, Zhang J, *et al.* Defects in trophoblast cell lineage account for the impaired in vivo development of cloned embryos generated by somatic nuclear transfer. *Cell Stem Cell* 2011; 8(4): 371-5.
 - 43 Matoba S, Liu Y, Lu F, Iwabuchi KA, Shen L, Inoue A, *et al.* Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell* 2014; 159(4): 884-95.
 - 44 Liu W, Liu X, Wang C, Gao Y, Gao R, Kou X, *et al.* Identification of key factors conquering developmental arrest of somatic cell cloned embryos by combining embryo biopsy and single-cell sequencing. *Cell Discov* 2016; 2: 16010.
 - 45 Antony J, Oback F, Chamley LW, Oback B, Laible G. Transient JMJD2B-mediated reduction of H3K9me3 levels improves reprogramming of embryonic stem cells into cloned embryos. *Mol Cell Biol* 2012; 33(5): 974-83.
 - 46 Matoba S, Wang H, Jiang L, Lu F, Iwabuchi KA, Wu X, *et al.* Loss of H3K27me3 imprinting in somatic cell nuclear transfer embryos disrupts post-implantation development. *Cell Stem Cell* 2018; 23(3): 343-54, e5.
 - 47 Inoue A, Jiang L, Lu F, Suzuki T, Zhang Y. Maternal H3K27me3 controls DNA methylation-independent imprinting. *Nature* 2017; 547(7664): 419-24.
 - 48 Gao R, Wang C, Gao Y, Xiu W, Chen J, Kou X, *et al.* Inhibition of aberrant DNA re-methylation improves post-implantation development of somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell Stem Cell* 2018; 23(3): 426-35, e5.
 - 49 Meng L, Ely JJ, Richard L, Stouffer, Wolf DP. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol Reprod* 1997; 57(2): 454-9.
 - 50 Mitalipov SM, Yeoman RR, Nusser KD, Wolf DP. Rhesus monkey embryos produced by nuclear transfer from embryonic blastomeres or somatic cells. *Biol Reprod* 2002; 66(5): 1367-73.
 - 51 Simerly C, Dominko T, Navara C, Payne C, Capuano S, Gosman G, *et al.* Molecular correlates of primate nuclear transfer failures. *Science* 2003; 300(5617): 297.
 - 52 Ng SC. The first cell cycle after transfer of somatic cell nuclei in a non-human primate. *Development* 2004; 131(10): 2475-84.
 - 53 Mitalipov SM, Zhou Q, Byrne JA, Ji WZ, Norgren RB, Wolf

- DP. Reprogramming following somatic cell nuclear transfer in primates is dependent upon nuclear remodeling. *Hum Reprod* 2007; 22(8): 2232-42.
- 54 Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, Nelson M, Sanger WG, Gokhale S, *et al.* Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; 450(7169): 497-502.
- 55 Sparman M, Dighe V, Sritanaudomchai H, Ma H, Ramsey C, Pedersen D, *et al.* Epigenetic reprogramming by somatic cell nuclear transfer in primates. *Stem Cells* 2009; 27(6): 1255-64.
- 56 Sparman ML, Tachibana M, Mitalipov SM. Cloning of non-human primates: the road "less traveled by". *Int J Dev Biol* 2010; 54(11/12): 1671-8.
- 57 Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, *et al.* Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 2013; 153(6): 1228-38.
- 58 Liu Z, Cai Y, Liao Z, Xu Y, Wang Y, Wang Z, *et al.* Cloning of a gene-edited macaque monkey by somatic cell nuclear transfer. *Nat Sci Rev* 2019; doi:10.1093/nsr/nwz002.
- 59 Birling M-C, Herauld Y, Pavlovic G. Modeling human disease in rodents by CRISPR/Cas9 genome editing. *Mammalian Genome* 2017; 28(7/8): 291-301.
- 60 Antony PMA, Diederich NJ, Balling R. Parkinson's disease mouse models in translational research. *Mammalian Genome* 2011; 22: 401-19.
- 61 Meredith RW, Janecka JE, Gatesy J, Ryder OA, Fisher CA, Teeling EC, *et al.* Impacts of the cretaceous terrestrial revolution and KPg extinction on mammal diversification. *Science* 2011; 334(6055): 521-4.
- 62 Belmonte Juan Carlos I, Callaway Edward M, Caddick SJ, Churchland P, Feng G, Homanics Gregg E, *et al.* Brains, genes, and primates. *Neuron* 2015; 86(3): 617-31.