

动物异种细胞核移植技术研究进展^{*}

苗义良 谭景和^{**}

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘要 作为研究动物胚胎发育过程中核质关系重要手段的细胞核移植技术正在逐步完善。异种细胞核移植技术不仅可用于保护濒危野生动物和珍贵的动物遗传资源,而且在研究核质相互作用和物种之间的进化关系上有着独特的用途。尽管目前同种核移植在许多哺乳动物上都获得成功,但异种核移植研究还刚刚开始,有许多问题亟待解决。本文现就现已发表的少量文献,简要综述了动物异种核移植研究的历史与现状、影响因素、面临问题和应用前景。

一、异种细胞核移植研究的历史与现状

异种核移植,也叫种间核移植(interspecies nuclear transplantation),是指将某一种动物的细胞核通过显微操作移植到另一种动物的去核卵母细胞中,并使之发育的过程。该技术主要是借助同种动物核移植技术的方法来解决那些很难获得受精卵母细胞的濒危、珍贵动物的克隆以及人类的治疗性克隆问题,并可用以研究核质相互作用和物种之间的进化关系。

我国学者早在 20 世纪 60 年代就开始了鱼类的异种核移植。在鱼类不同属间的囊胚细胞核移植研究中,童弟周等^[1]把鲤鱼胚胎细胞核移植到鲫鱼去核卵中,有 3.2% 的移核胚发育到成鱼。严绍颐等^[2]把鲫鱼的细胞核移植到鲤鱼的去核卵中,有 0.9% 发育到成鱼。在鱼类不同亚科间的囊胚细胞核移植研究中,童弟周等^[3]把金鱼囊胚细胞核移植到去核的鳊鱼卵胞质中,有 0.4% 发育成幼鱼。鳊鱼囊胚细胞核移植到金鱼的卵胞质中组成的移核胚胎,有 1.1% 发育成幼鱼。将发育到囊胚的金鱼鳊鱼移核胚胎细胞核再移植到金鱼的去核卵中,有 1.6% 发育为幼鱼。

在两栖类上,梁桂霞等报道^[4],将非洲爪蟾囊胚细胞核移入花背蟾成熟去核末受精卵中有 36.5% 的发育到囊胚,1.4% 的发育成蝌蚪,0.36% 的发育成幼蟾;将中华大蟾蜍囊胚细胞核移入花背蟾成熟去核末受精卵中有 29.1% 的发育到囊环,2.0% 的发育成蝌蚪,但没有能发育成幼蟾。

李书鸿等^[5]将小鼠囊胚期细胞核移入去核的泥鳅卵中,有 25.3% 的发育到晚期囊胚,但不能继续发育到原肠胚。McGrath 和 Solter^[6]进行小鼠不同种间原核交换研究,结果发现种间核移植胚胎仅能进行几次卵裂。梅祺等^[7]用小鼠 8-细胞胚胎卵裂球

与去核兔卵母细胞构建成重组胚,供体核发生染色质凝集和膨大,并在体内培养后发育到囊胚期。李光鹏等^[8]将小鼠 2-细胞和 8-细胞期的胚胎卵裂球融合到去核的猪卵母细胞后也发生正常的核膨大和染色质凝集。谭世俭等^[9]进行了水牛和黄牛种间胚胎细胞核移植研究,得到了种间核移植囊胚。Meir-elles 等^[10]将瘤牛(*Bos indicus*)的早期卵裂球移植到去核的黄牛(*Bos taurus*)卵母细胞内获得了第一只通过种间胚胎细胞核移植方式出生的动物。

随着体细胞核移植技术的发展,异种核移植也逐步以体细胞作为核供体。Waksmundzka 等^[11]将大鼠体细胞核移入小鼠去核卵母细胞内构建的重组胚出现发育阻滞,胚胎阻滞于 1-或 2-细胞期。Wells 等^[12]用异种核移植的方法成功地克隆了仅存的一头名为“贵妇”的珍稀母牛(enderby island cattle breed)。Dominko 等^[13]以牛、绵羊、猪、猴和大鼠的皮肤成纤维细胞作为供核细胞,将它们与去核的牛卵母细胞融合产生的胚胎,除以大鼠为供核细胞没能获得囊胚外,其余的均获得囊胚。陈大元等^[14]把体外培养的大熊猫骨骼肌细胞、子宫上皮细胞和乳腺细胞核移植到去核的兔卵母细胞内,重组胚发育到囊胚。李光鹏等^[8]将小鼠的卵丘细胞移入去核的猪卵母细胞后,有 19% 的重组胚能够卵裂,但停止于 4-细胞期。Hwang 等^[15]用成年韩国虎的耳缘皮肤成纤维细胞与猫和牛卵母细胞构建的重组胚分别有 8.8% 和 1.8% 的发育到囊胚,并将 160 枚胚胎移植到 1 只虎和 3 只狮子,但均未妊娠。Vogel 等^[16]报道,用印度野牛的皮肤细胞做供核细胞,移植到去核的家牛卵母细胞内,得到的重组胚在体外培养后移植到受体家牛后出生了 1 头发育正常的野牛“*Noah*”,但“*Noah*”在出生后两天因细菌感染而死

^{*} 国家重点基础研究发展规划(973)项目(编号 G200016107)资助。

^{**} 联系人。E-mail: tanjh@sdaa.edu.cn

亡。Loi等^[17]把欧洲盘羊(*Ovis orientalis musimon*)颗粒细胞核植入绵羊卵内,重构胚移植到绵羊体内,出生一只正常的欧洲盘羊。

以上实验结果说明:(1)动物细胞核可以在异种卵母细胞胞质内发生一定程度的重新编程,维持囊胚以前的早期发育;(2)鱼类胚胎细胞核可以在不同属的卵母细胞中,哺乳动物体细胞核可以在亲缘关系很近的异种卵母细胞中完成核发育程序重编,并发育出生个体。

二、异种核移植成功的影响因素

1. 供核细胞

陈大元等^[14]分别将培养的骨骼肌、子宫上皮和乳腺细胞核移植到异种卵胞质中发现,乳腺来源的细胞作核供体的囊胚率最高,子宫上皮细胞次之,而骨骼肌细胞效果最差。这种差异可能与细胞的分化程度有关。相对而言,骨骼肌细胞分化程度最高(终端分化),而且常常为多核,这种染色体的不稳定性可能不利于支持进一步发育。Saikhun等^[18]将水牛的胎儿成纤维细胞、卵丘细胞及输卵管细胞与去核的牛卵母细胞相融合证明,输卵管细胞与牛卵母细胞的融合率要高于胎儿成纤维细胞和卵丘细胞(83% vs 77%和73%),但由胎儿成纤维细胞和输卵管细胞来的重构胚的分裂率要明显高于卵丘细胞(84%和78% vs 68%);而且,由胎儿成纤维细胞来的重构胚的囊胚发育率也要比卵丘细胞及输卵管细胞来的高($p < 0.05$)。王鸿等^[19]证明,以去核的兔卵母细胞为受核胞质,以小鼠胚胎干细胞为供核细胞(16.1%)要明显比以成年小鼠外耳皮肤成纤维细胞(0% - 3.1%)和小鼠胚胎成纤维细胞(2.1% - 3.7%)为供核细胞构建的重构胚的发育能力高。这些结果表明,以胚胎干细胞和胎儿成纤维细胞作核供体要比成年细胞作核供体所支持的异种移核胚发育率高。

2. 受核胞质

Kitiyant 等^[20]以水牛胎儿成纤维细胞为供核细胞,分别与去核的水牛和牛卵母细胞相融合,结果融合率与卵裂率均无差异(74% vs 71%, 77% vs 75%),构建重构胚的囊胚率与培养第七天囊胚的细胞数也无差异(39% vs 33%, 88.5 ± 25.7 vs 51.7 ± 5.4)。在鼠兔异种间的核移植中,以小鼠2-细胞胚胎卵裂球为供核细胞有58%的重构胚发育到2细胞,2%的发育到囊胚^[21];而在鼠猪异种间的核移植中,以小鼠2-细胞胚胎卵裂球为供核细胞只能使

37%的重构卵分裂1次^[8]。这表明,在亲缘关系较近的异种动物之间,受核胞质支持供核细胞发育的能力相差不大,而在亲缘关系较远的异种动物之间,不同的受核胞质支持同一种供核细胞的发育能力有着明显的差异。

另外,在鼠兔异种间的核移植中发现,鼠核质体带进的胞质和兔卵母细胞胞质的比例也对早期胚胎发育和着床产生影响^[21]。

3. 核移植方法

在重构胚的构建方法上,陈大元等^[14]分别用电融合与直接注射的方法来构建大熊猫-兔重构胚。结果,用电融合的方法获得的重构胚发育到桑葚胚与囊胚的比例为9.1%和6.4%,而用直接注射的方法获得的重构胚发育到桑葚胚与囊胚的比例为13.9%和11.1%,这表明,直接注射的方法可获得较高的囊胚率,但该方法操作成功率较低,且受实验者操作熟练程度的影响很大。

在重构胚的激活上,Kitiyant 等^[20]在激活由水牛胎儿成纤维细胞与去核的牛卵母细胞构建的重构胚时,采用A23187结合6-DMAP要明显比单独用6-DMAP的激活效果好(33% vs 17%)。

4. 培养条件

在体外培养中,培养液的种类和培养温度也会影响重构胚的发育。例如,在鼠兔异种间的核移植中,若选择RD培养液(RPM II 1640:低糖DMEM,1:1),有利于兔胞质的发育,但不利于小鼠核的发育。反之,能支持小鼠核很好发育的培养液(如M16)又不能很好地支持兔胞质的发育^[21]。因此,必须考虑将两种动物的最适合的培养基按一定比例进行混合来培养重构胚。另外,在培养鼠-兔的异种重构胚时,由于小鼠胚胎体外培养的适合温度为37℃,在39℃时很少能发育至囊胚,而兔胚胎的适合温度为39℃,在37℃时发育缓慢,达到囊胚的比例很低。因此,选择什么温度培养异种重构胚也就成了一个有待研究的问题^[21]。

三、异种细胞核移植中的问题

1. 胚胎发育的控制

在鱼类异种核移植中,童弟周等^[1,3]获得的鲤核移植鱼的口须和咽喉齿像鲤鱼,侧线鳞片数介于二者之间;椎骨数接近鲫鱼,表现了细胞质的性状。且获得的金鱼鳃核移植鱼的幼鱼性状主要像鳊鱼,而获得的鳊核移植鱼的幼鱼有的像鳊鱼,有的为中间类型。严绍颐等^[2]获得的鲫核移

植鱼的形态特征均像鲫鱼,无口须,无咽喉齿,侧线鳞片数和椎骨数均少。这些实验表明,在低等动物,细胞质在发育中有着重要的作用,出生的个体兼有供核细胞与受核胞质二者动物的特征。而在高等动物,出生的动物只表现出供核细胞来源动物的特征^[10,12,16,17]。

Dominke 等^[13]报道,绵羊-牛、猪-牛、猴-牛所形成的异种重构胚,头两次卵裂发生的时间都与受体胞质种属即牛的体外胚胎一致,但在进一步发育中胚胎的发育时程便开始接近核供体物种的发育时程。种间移核胚胎发育到囊胚的比例与种内移核胚的无显著差异,种间移核胚胎囊胚腔出现的时间更接近与核供体物种的囊胚腔形成的时间。这表明,异种重构胚的早期发育是由受核胞质控制,而在进一步发育中就由供核细胞的细胞核来控制。

2. 异种重构胚的着床

陈大元等^[22]发现,大熊猫-兔重构胚不能在兔的子宫内着床,而在与大熊猫妊娠期相近的猫的子宫内可成功着床。而且,在移植大熊猫-兔重构胚的同时再移入猫-兔重构胚,可帮助大熊猫-兔重构胚的着床。目前,只有亲缘关系较近的异种重构胚能在受体子宫内着床和发育到出生物^[10,12,16,17]。因此,在胚胎着床过程中,受体子宫能识别的供核细胞信号可能具有种属特异性。

3. 异种移核胚的线粒体组成

线粒体是含有 16-17kb mtDNA 的半自主性的细胞器。mtDNA 只编码 13 种蛋白质、22 种 tRNA 和 2 种 rRNA,而涉及线粒体生物功能的约 95% 的蛋白质是由细胞核所编码的^[23,24]。一般细胞中线粒体的数量在 2×10^3 ,而在卵母细胞中则约含 2×10^5 个线粒体^[25]。在细胞核移植过程中,供核细胞中的线粒体会伴随细胞核一同进入受核胞质中。种间移核胚中的线粒体组成可能有三种情况:(1) 供核细胞的线粒体随着卵裂的进行而逐渐减少,最终退化;(2) 供核细胞的线粒体随胚胎发育进程不断增殖,而受核胞质的线粒体则逐渐退化;(3) 供核细胞和受核胞质的线粒体共存,二者处于某种平衡中。在有关异种核移植的报道中,Meirelles 等^[10]在瘤牛-黄牛重构胚中发现,在多数情况下,供核细胞中的线粒体逐渐减少,最后全部消失。而陈大元等^[22]则报道,来自大熊猫体细胞的线粒体与受核兔卵母细胞中的线粒体在着床前共存,而在着床后,来自大熊猫的线粒体仍能检测到,而来自兔卵母细胞的却检测

不到。他们认为,这可能是由于大熊猫供体细胞核只支持来自大熊猫细胞的线粒体而不支持来自兔卵母细胞的线粒体所造成的。

综上所述,异种细胞核移植技术不仅可用于保护濒危野生动物和珍贵的动物遗传资源,而且在研究核质相互作用和物种之间的进化关系上有着独特的用途。虽然目前该技术还面临许多困难,但相信随着技术的进一步完善与发展,其应用前景会更加广泛。

参 考 文 献

- [1] 童弟周等,1980,中国科学,4:376-380.
- [2] 严绍颐等,1984,中国科学(B辑),8:729-731.
- [3] 童弟周等,1973,动物学报,19:201-212.
- [4] 梁桂霞等,2000,动物学报,46(2):183-189.
- [5] 李书鸿等,1998,生物工程学报,14:345-348.
- [6] McGrath. J. et al., 1986, *J Embryol Exp Morphol*, 97 (Suppl):277-289.
- [7] 梅祺等,1993,实验生物学报,26(4):389-397.
- [8] 李光鹏等,2000,动物学研究,21:416-418.
- [9] 谭世俭等,2001,广西农业生物科学,20(1):10-12.
- [10] Meirelles. F. V. et al., 2001, *Genetics*, 158(1):351-356.
- [11] Waksmundzka. M., 1994, *J Exp Zool*, 269(6):551-559.
- [12] Wells. D. N. et al., 1998, *Reprod Fertil Dev*, 10:369-378.
- [13] Dominko. T. et al., 1999, *Biol Reprod*, 60:1496-502.
- [14] 陈大元等,1999,中国科学(C辑),29:324-329.
- [15] Hwang. W. et al., 2001, *Theriogenology*, 55:271.
- [16] Vogel. G., 2001, *Science*, 291(5503):409.
- [17] Loi. P. et al., 2001, *Nat Biotechnol*, 19:962-964.
- [18] Saikhun. J. et al., 2002, *Theriogenology*, 57:1829-1837.
- [19] 王鸿等,2002,科学通报,47(17):1313-1316.
- [20] Kitiyanant. Y. et al., 2001, *Cloning Stem Cells*, 3(3):97-104.
- [21] 王敏康等,1999,云南教育学院学报,5(2):45-47.
- [22] Chen. D. Y. et al., 2002, *Biol Reprod*, 67(2):637-42.
- [23] Hiendleder. S. et al., 1999, *Mol Reprod Dev*, 54:24-31.
- [24] Takeda. K. et al., 1999, *J Reprod Fertil*, 116:253-59.
- [25] Michaels. G. S. et al., 1982, *Dev Biol*, 94:246-51.