

异种动物细胞核移植研究现状及相关问题的探讨^{*}

冯秀亮, 雷安民, 杨春荣, 窦忠英

(西北农林科技大学 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 随着体细胞核移植相继在多种动物中取得成功, 异种细胞核移植技术在拯救濒危野生动物、人类干细胞克隆和细胞核质互作研究等方面具有特殊意义, 受到广泛重视并取得了很大进展。文章对异种细胞核移植技术研究现状进行了综述, 并对其应用前景和存在的问题进行了探讨。

[关键词] 体细胞; 濒危动物; 人类胚胎干细胞; 异种细胞核移植

[中图分类号] Q 813

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)04-0200-05

细胞核移植(nuclear transplantation or nuclear transfer)是指将一种细胞的核(供体)移入另一细胞内(受体), 后者的核(遗传物质)通常预先去掉。这样形成的新细胞将在受体细胞胞质信息的驱动下, 按供体的遗传背景进行分化发育。自1981年 Illmense 和 Hoppe^[1] 宣称最早将细胞核移植技术用于哺乳动物, 并且获得克隆小鼠至今20年的时间里, 这一技术取得了极大发展。1997年克隆羊 Dolly 的问世, 使之成为核移植技术发展史上的一个里程碑——体细胞核移植获得成功^[2]。这一事件在全球掀起了一场克隆风暴, 伴随着人们对可能出现的克隆人所产生的有关伦理、道德和法律方面的争论, 克隆知识也迅速普及和传播, 体细胞克隆因其潜在的巨大科学与经济价值而被科学界列入重点研究的高科技领域。之后短短几年时间内, 分别获得了体细胞核移植牛、小鼠、猪、兔、山羊和转基因体细胞核移植牛、绵羊、山羊等^[3-10]。这些研究表明, 分化的体细胞甚至是分化终端的体细胞仍有全能性, 在卵母细胞胞质的作用下完全可以重新发育成一个个体。

体细胞核移植获得成功, 对于异种动物细胞核移植研究具有极大推动作用。本文就异种细胞核移植技术研究现状进行综述, 并重点对其应用前景和存在的问题进行探讨。

1 异种细胞核移植技术研究现状

异种细胞核移植最早在两栖类动物和鱼类中开

展。1952年, Briggs 和 King^[11] 将豹蛙囊胚顶部细胞核移入去核卵中, 近一半重构卵可以分裂并发育至囊胚。1963年, 童第周等^[12] 成功地在金鱼(*Carassius auratus*) 和中华鲟(*Rhodeus sinensis*) 上进行了细胞核移植, 以后还在这2种不同亚科间研究了杂交细胞核与纯种细胞核在发育功能上的差异, 以及细胞质对细胞核的影响, 发现细胞质对性状也有一定的决定作用。他们用鲤鱼和鲫鱼进行核质杂交, 获得了杂交鱼^[13]。

有关哺乳动物的异种细胞核移植在最近几年才有较多报道。McGrath 和 Solter^[14] 利用原核互换技术研究了小鼠种间的核质互作, 结果所得胚胎在进行有限的几次分裂后停止发育。Wolfe 等^[15] 利用家养牛胚胎细胞作核供体, 分别用北美野牛、山羊和仓鼠的去核卵母细胞作受体进行异种间细胞核移植研究, 结果几个属间杂交组合的重构胚发育情况相似, 囊胚率为1.7%~2.3%, 而牛和仓鼠2个目间的组合则未发生卵裂。梅祺等^[16] 研究了鼠和兔胚胎卵裂球的核质杂交组合, 有5.4%的杂交重构胚发育到囊胚, 总卵裂率为43.1%。

随着核移植技术的不断完善和培养体系的改进, 异种细胞核移植研究也取得了很大进展。Dominko 等^[17] 将野牛、绵羊、猪、猴和大鼠的体细胞作供体移入牛去核卵母细胞中, 重构胚均发育到囊胚, 前4种组合囊胚率分别为17.3%, 13.9%, 14.3%, 16.6%。其中以绵羊和野牛体细胞作供体重

^{*} [收稿日期] 2002-12-23

[基金项目] 国家“973”资助项目(G1999054300); 国家自然科学基金资助项目(39970363)

[作者简介] 冯秀亮(1970-), 男, 山西长治人, 在读博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。工作单位为第四军医大学西京医院。
E-mail: fx1700610@yahoo.com.cn

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。E-mail: douzhongying@china.com

构胚移植受体均得到早期妊娠。

White 等^[18]以盘羊体细胞作供体, 以绵羊卵母细胞作受体构建重构胚, 囊胚率为 1.56%, 经分析胚胎细胞具有正常核型, 移植受体后有早期附植。陈大元等^[19]选择成年大熊猫骨骼肌细胞、子宫上皮细胞和乳腺细胞为核供体, 以家兔去核卵母细胞作受体, 结果 3 种组合重构胚均可进行早期发育, 3 种组合囊胚率分别为 6.8%, 9.9%, 11.7%。Yoon 等^[20]进行猪牛异种细胞核移植也得到了体外发育囊胚。韩国学者 Hwang 等^[21]用成年韩国虎的皮肤成纤维细胞分别与猫和牛的卵母细胞构建重构胚, 囊胚率分别为 8.8%, 1.8%。将 160 枚 2~4 细胞胚移植到 3 只狮子和 1 只虎的输卵管, 结果 3 只狮子分别于 44, 60 和 120 d 返情, 1 只虎于 58 d 返情。

异种细胞核移植最令人感到振奋的是用印度野牛体细胞与家牛卵母细胞组合, 重构胚经体外培养后移植到受体家牛, 结果出生 1 头发育正常的野牛^[22]。尽管其于出生 48 h 后死亡^[23], 但这一结果证明异种细胞核移植重构胚可以完成直到个体的整个发育过程。另 1 例异种细胞核移植出生后代的报道是以东方盘羊体细胞与绵羊卵母细胞组合, 重构胚移植到受体绵羊后妊娠足月产下 1 只健康盘羊^[24]。

许多学者也尝试利用异种细胞核移植技术重构胚分离克隆人类胚胎干细胞, 即所谓治疗性克隆。1998 年, 美国 ACT 公司宣布以人体细胞与牛卵母细胞形成异种重构胚, 培养至囊胚后分离内细胞团培育出具有全能性的胚胎干细胞^[25], 但未见有科技论文发表。Lanza 等^[26]以人牛组合构建重构胚得到体外发育的囊胚。另据报道^[27], 韩国、上海第二医科大学、中山医科大学等也分别获得了体外发育的胚胎。本实验室于 2001 年和 2002 年以人胎儿成纤维细胞分别与牛和猪卵母细胞组合构建重构胚, 囊胚率最高达 25.0% (未发表资料)。

2 异种细胞核移植技术的意义与应用前景

2.1 拯救濒危动物

拯救濒危动物是异种核移植技术应用最有潜力的领域。对于濒危动物而言, 受其个体数量、生理特征等多方面因素的影响, 同种核移植并不现实。体细胞核移植获得成功使核供体取材问题不再成为阻碍核移植发展的因素, 并且体细胞易于保存和进行体外增殖, 为目前正在灭绝的动物提供了将来复种的可能。在这一领域研究最有说服力的证据即为前述

多位学者近年所取得的巨大进展, 尤其是出生异种核移植野牛和盘羊^[22, 24]。我国科学家正在致力于异种克隆大熊猫的研究, 并且取得了很大进展, 出生异种核移植个体必将对克隆大熊猫等方面的研究产生极大的推动作用。

2.2 分离克隆人类胚胎干细胞

从胚胎干细胞最初在小鼠分离成功开始, 就以其迷人的魅力征服和吸引了众多的研究学者, 并分别在多种动物中取得重大突破。1998 年, Thomson 等^[28]和 Shambolt 等^[29]分别报道, 由体外受精胚和流产胎儿生殖嵴原始生殖细胞分离克隆得到人类多能干细胞系。之后, 许多研究人员在人类胚胎干细胞研究中作了大量工作, Dolly 的降生, 使人们想到用体细胞克隆人类胚胎用于干细胞分离与克隆研究, 并试图应用于临床治疗。但是, 一方面人类卵母细胞缺乏, 远远不能满足研究需要, 另一方面围绕克隆人问题的争论在伦理、道德、法律等方面也有巨大阻力。因此, 通过异种核移植技术构建重构胚分离克隆人类胚胎干细胞便引起人们的重视。Lanza 等^[26]和国内外多个实验室分别用此技术得到了早期发育的异种重构胚。可以相信, 经过进一步深入研究, 完全有可能得到多能性干细胞, 为以后的有关研究如细胞分化甚至某些疾病的治疗提供材料。

2.3 研究核质互作

无论是同种核移植还是异种核移植, 供核细胞进入卵母细胞后核质之间发生相互作用并伴随着一系列生理生化变化。重构胚能否完成全程发育与核质互作频率高低、供核基因组重新编程程度大小有密切关系。核移植技术为开展与细胞重新编程、分化与去分化等方面的核质互作研究提供了有效材料。异种核移植因其材料的特殊性, 在研究核质互作、基因表达、细胞分化与去分化等方面意义可能更大。

2.4 与同种核移植相同的应用价值

异种核移植技术在畜牧业生产, 生产转基因动物, 生产药用蛋白等方面与同种核移植技术具有相同的经济效益和社会价值。

3 异种细胞核移植存在的相关问题

3.1 拯救濒危动物——受体动物的选择

在拯救濒危动物上使用同种核移植并不现实, 异种核移植重构胚移植受体也存在同样的问题。以大熊猫为例, 其本身生殖系统和生殖过程均高度特化, 这些因素使其在自然交配条件下繁殖妊娠率都很低。因此, 选择合适的受体动物并使其妊娠足月产

仔是异种核移植拯救濒危动物的另一个需要解决的问题。

分析出生异种核移植野牛和盘羊^[22, 24] 2 个例子, 以进化上亲缘关系较为相近的动物作为受体不失为一个很好的选择。但对于某些动物而言, 做到这一点十分困难。基于此, 近年有科学家提出以内细胞团置换的方法使受体动物妊娠成功。此方法的基本思路是, 以 A 动物作为受体, 除去其同种囊胚阶段胚胎的内细胞团, 而以 B 动物胚胎全胚或内细胞团取代。从理论上讲, 受体动物胚胎的滋养层将与受体子宫识别附植并形成胎膜和胎儿胎盘, 而 B 动物胚胎则在其中完成发育, 这样使 A 动物“上当受骗”产下一个异种 B 动物后代。这一方法目前还处于试验阶段, 如果可行, 将会对拯救濒危动物产生极大影响。

3.2 从异种核移植重构胚分离克隆人类胚胎干细胞——伦理与安全性

与由人类胚胎、流产儿分离克隆人类胚胎干细胞以及克隆人相比, 由异种核移植重构胚分离克隆人类胚胎干细胞在一定程度上也存在伦理和道德方面的问题。这一问题的焦点就是线粒体 DNA。哺乳动物的线粒体 DNA 是一个封闭的双链环状分子, 其所含基因在 DNA 分子上排列紧凑, 相邻之间没有或很少有非编码碱基。对人、牛和小鼠线粒体基因组进行比较, 发现基因组成和大小极为相似^[30]。在异种核移植操作过程中, 除供体细胞的细胞核外, 供体细胞胞质的全部或部分进入受体胞质中。也就是说, 在核移植初期, 供体和受体线粒体同时存在。随着重构胚的发育, 供体线粒体可能有 3 种命运: (1) 供体细胞线粒体随卵裂进行而逐渐减少, 最终退化, 而受体线粒体一直占主导地位; (2) 供体细胞线粒体随卵裂进行不断增殖, 而受体线粒体则逐渐退化; (3) 两种线粒体并存。陈大元等^[19]对大熊猫体细胞与兔卵重构胚线粒体进行分析, 发现重构囊胚细胞有供体细胞线粒体, 但是并没有排除存在受体胞质线粒体的可能。而 Loi 等^[24]对异种核移植得到的盘羊进行线粒体分析, 结果线粒体均与受体胞质线粒体相同, 没有供体细胞线粒体。基于以上分析, 对异种核移植重构胚分离克隆人类胚胎干细胞自然产生疑问, 这种干细胞是否为真正的干细胞? 在鱼类的异种核移植已经证明, 受体胞质在一定程度上影响后代的性状^[14], 那么异种核移植获得的人类胚胎干细胞是否也存在同样问题? 干细胞应用的一个方面为临床治疗, 以这种干细胞应用于临床是否会引起

人类的线粒体疾病? 是否真正可以解决排异问题? 有这些问题都有待于在进一步研究中解决证实。

3.3 适宜核供体和核受体组合的选择

目前用于异种核移植的报道中, 受体卵母细胞多选自牛、猪、绵羊、家兔等动物, 其中主要原因是易于取材。选择这样的组合对重构胚发育是否完全适合呢? Wolfe 等^[15]用家牛胚胎细胞与小鼠卵母细胞组合后重构胚仅发生融合而未分裂, Hwang 等^[21]以韩国虎体细胞分别与猫和牛的卵母细胞组合, 囊胚发育率有显著差异。这些结果提示, 对异种核移植受体卵母细胞的选择应该多加以考虑。

不同种类供核细胞的选择同样需要考虑。理论上讲, 只要供核细胞含有全部遗传物质, 细胞核在受体胞质中经过重新编程, 均可以发育为一个新的个体。但是目前体细胞核移植的结果并非如此, 某些细胞如神经细胞的核移植并没有获得成功。核移植的报道中用作供体的细胞分别有胎儿成纤维细胞、乳腺细胞、卵丘/颗粒细胞、输卵管/子宫上皮细胞、肌肉细胞、耳部皮肤细胞等, 但是这些细胞核移植的结果也存在差异。陈大元等^[19]选择成年大熊猫骨骼肌细胞、子宫上皮细胞和乳腺细胞为核供体, 以家兔去核卵母细胞作受体, 尽管 3 种组合重构胚均可进行早期发育, 但囊胚发育率差异显著。

与此相关的另一个问题是关于母型信息支持胚胎发育时间与合子型基因激活时间的差异。小鼠、猪的合子型基因在 2-细胞期和 4-细胞期激活, 牛卵母细胞可以支持 8-细胞期以前的胚胎发育, 当小鼠、猪的体细胞进入牛卵母细胞后很难突破 8-细胞期^[20, 31]。选择异种核移植受体卵母细胞时, 考虑这一因素可能有利于提高重构胚的发育率。

3.4 提高异种核移植效率

目前有关体细胞核移植的成功率仍较低, 异种核移植成功率更低。提高异种核移植成功率一方面应借鉴体细胞核移植的新发现、新成果, 另一方面就异种核移植本身还需要对培养系统进行优化, 其中主要包括培养基和温度的选择。猪体细胞与牛卵母细胞重构胚在常用的牛培养基 CR1aa 中的效果优于在常用的猪胚胎培养基 NCSU-23 (North Carolina State University solution 23, 一种专用于猪胚胎培养的培养液)^[20], 似乎提示异种核移植胚的早期营养需求更类似于受体卵母细胞。对温度选择也具有相同的问题, 但培养条件需要在大量试验基础上不断完善。

4 展 望

异种核移植随着体细胞核移植的不断发展, 在试验中取得了很大进展, 积累了一定的经验和资料。

尽管如此, 异种核移植还处于初级阶段, 影响其成功率的因素还有很多未搞清楚。同时也面临着人类生命科学伦理道德的考验。但随着时代的进步和科学的发展, 这一领域的研究必将会有大的突破。

[参考文献]

- [1] Ilmensee K, Hoppe P C. Nuclear transplantation in *mus musculus*: developmental potential of nuclei from preimplantation embryos[J]. Cell, 1981, 23: 9- 18
- [2] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. Nature, 1997, 385: 810- 813
- [3] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al Eight calves cloned from somatic cells of a single adult[J]. Science, 1998, 282: 2095- 2098
- [4] Wakayama T, Perry A C F, Lucotti M, et al Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. Nature, 1998, 394: 369- 374
- [5] Onishi A, Lwamoto M, Akita T, et al Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. Science, 2000, 289: 1188- 1190
- [6] Polejaeva I, Chen S H, Vaught T D, et al Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. Nature, 2000, 407: 86- 90
- [7] Chesne P, Adenot P G, Boulanger L, et al Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 366- 369
- [8] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al Cloned transgenic calves produced from unquiescent fetal fibroblasts[J]. Science, 1998, 280: 1256- 1258
- [9] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell derived stem-like cells[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16: 642- 646
- [10] Buguisi A, Behboodi E, Melican D T, et al Production of goats by somatic cell nuclear transfer[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17: 456- 461
- [11] Briggs R, King T J. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1952, 38: 455- 463
- [12] 童第周, 吴尚勤, 叶毓芬, 等 鱼类细胞核的移植[J]. 科学通报, 1963, 7: 60- 61
- [13] 童第周, 叶毓芬, 陆德裕, 等 鱼类不同亚科间的细胞核移植[J]. 动物学报, 1973, 19(3): 201- 209
- [14] McGrath J, Solter D. Nucleocytoplasmic interaction in the mouse embryos[J]. J Embryol Exp Morphol, 1986, 97(suppl): 277- 289
- [15] Wolfe B A, Westhusin M E, Levanduski M J, et al Preimplantation development of embryos produced by intergeneric nuclear transplantation[J]. Theriogenology, 1990, 33(1): 350
- [16] 梅 祺, 邹贤刚, 杜 森 鼠兔核质杂交胚胎早期发育的研究[J]. 实验生物学报, 1993, 26(4): 389- 394
- [17] Dominko T, Mitalipova M, Haley B, et al Bovine oocytes cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species[J]. Biology of Reproduction, 1999, 60: 1496- 1502
- [18] White K L, Bunch T D, Mitalipov S, et al Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear embryos produced from the fusion of Argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes[J]. Cloning, 1999, 1: 47- 54
- [19] 陈大元, 孙青原, 刘翼琰, 等 大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育[J]. 中国科学(C 辑), 1999, 29(3): 324- 330
- [20] Yoon J T, Choi E J, Han K Y, et al In vitro development of embryos produced by nuclear transfer of porcine somatic cell nuclei into bovine oocytes using three different culture systems[J]. Theriogenology, 2001, 55: 298
- [21] Hwang W, Kim K, Kim H, et al Interspecies somatic cell nuclear transfer for the production of endangered Korean tiger (*Panthera tigris altaica*) [J]. Theriogenology, 2001, 55: 271
- [22] Lanza R P, Cibelli J B, Diaz F, et al Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer[J]. Cloning, 2000, 2(2): 79- 90
- [23] Vogel G. Cloned gaur a short-lived success[J]. Science, 2001, 291(5503): 409
- [24] Loi P, Ptak G, Barboni B, et al Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using postmortem somatic cells[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19: 962- 964
- [25] 孙国凤(摘). 将人的体细胞移植到牛卵中培育出人ES 细胞[J]. 生物技术通报, 1999, (2): 41- 42
- [26] Lanza R P, Cibelli J B, West M D. Prospects for the use of nuclear in human transplantation[J]. Nature Biotech, 1999, 17: 1171- 1174
- [27] 韩毅冰, 黄 冰, 黄文革, 等 将人的成纤维细胞移植到兔去核卵中培育克隆人胚的研究[J]. Developmental & Reproductive Biology, 2001, 10(suppl): 105
- [28] Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, et al Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282:

1145- 1147.

- [29] Shamblott M J, Axelman J, Wang S, et al Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13726- 13731.
- [30] 汪莹仁, 薛绍白, 柳惠图 细胞生物学[M]. 第 2 版. 北京: 北京师范大学出版社, 1998 118- 190.
- [31] A rats S, Keskintepe L, Gibbons J, et al Transfer of mouse embryonic fibroblast cells to bovine oocytes[J]. Theriogenology, 2001, 55: 253.

The progress and problem of inter-species nuclear transfer

FENG Xiu-liang, LEI An-min, YANG Chun-rong, DOU Zhong-yang

(Shaanxi Center of Stem Cell Research and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Following the successful production of nuclear transfer sheep, mice, goat, cattle, porcine and rabbit et al, the inter-species nuclear transfer has become one of the most attentioned questions in scientific field and international society, just because of its potential value in preserving endangered species, human embryonic stem cells research and other areas. This paper reviewed the progress of the inter-species nuclear transfer, and also discussed the related problems.

Key words: somatic cells; endangered animals; human embryonic stem cells; inter-species nuclear transfer

欢迎订阅 2004 年《西北农业学报》

《西北农业学报》是由教育部主管, 西北农林科技大学、甘肃、宁夏、青海、新疆农(林)业科学院、新疆、青海畜牧(兽医)科学院及新疆农垦科学院八院校联合主办的综合性农林牧业学术期刊。本刊立足大西北, 面向国内外, 主要刊登农学、林学、植(森)保、园艺、土壤农化、畜牧、兽医、农业机械与电子工程、水利与建筑工程、食品加工与食品机械等学科领域以第一手资料撰写的学术论文、研究报告、研究简报以及有新意的专题综述、评述等。读者对象为农林牧业科技人员、大专院校师生及高级农业技术管理人员。

《西北农业学报》1992 年创刊, 曾多次获得陕西省优秀科技期刊一等奖, 已被中国科学引文数据库、中国科技论文统计源、中国核心期刊数据库等 16 家权威性文摘期刊和数据库固定转载或收录。

《西北农业学报》为季刊, 季末月 10 日出版, 大 16 开, 120 页, 国内外公开发行。国内统一刊号: CN 61-1220/S, 国际标准刊号: ISSN 1004-1389, 邮发代号: 52-111。国外发行: 中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱), 代号 Q 4380。每期定价: 12 元, 全年 48 元。全国各地邮局均可订阅, 也可向编辑部直接订阅。

编辑部地址: 陕西杨凌西北农林科技大学西农校区 33 号信箱

邮编: 712100 电话: 029-7091132 银行汇款: 农业银行杨陵支行李台营业所

帐户: 西北农林科技大学(7) 帐号: 200701040000391

E-mail: xbnx@chinajournal.net.cn 网址: <http://xbnx.chinajournal.net.cn>