

利用成年母兔耳部皮肤上皮细胞 生产克隆胚胎的研究^{*}

杨春荣, 马霄飞, 董书伟, 刘淑娟, 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 杨凌 712100)

[摘 要] 以成年母兔耳部皮肤上皮细胞为核供体, 对家兔体细胞核移植技术中融合、激活以及不同来源受体卵母细胞的选择等环节进行了研究, 比较了不同电场强度对重构胚胎融合率、分裂率的影响。结果表明, 200 V/mm 电场强度时重构胚胎的融合率(82.53%)显著高于 160 V/mm (59.73%), 但与 240 V/mm (79.56%) 无显著差异; 200 V/mm 时重构胚胎的分裂率(71.43%)显著高于 160 V/mm (49.43%) 和 240 V/mm (57.80%)。来源于输卵管卵母细胞组成的重构胚胎的融合率(84.71%)和裂解数与来源于卵巢大卵泡(78.75%)的无显著差异; 但来源于输卵管的重构胚胎分裂率(73.68%)显著高于来源于卵巢大卵泡的(56.35%)。将 646 枚 2~4 细胞期重构胚移植到 38 只同期化及非同期化的受体后无幼仔出生。

[关键词] 兔; 耳部上皮细胞; 核移植; 克隆胚胎

[中图分类号] Q 785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0007-05

自 1997 年 Wilmut 等首次报道成功获得了成年体细胞克隆绵羊 Dolly 后, 体细胞克隆动物的研究得到迅速发展, 相继在牛^[1,2]、小鼠^[3]、山羊^[4]、猪^[5,6]等哺乳动物上获得成功。但兔的体细胞克隆困难较大^[7,8], 直到近来才有利用新鲜颗粒细胞进行兔体细胞克隆成功的报道^[9]。已有研究^[10,11]发现, 颗粒细胞和胎儿成纤维细胞的基因组重新编排能力强于乳腺和其他体细胞。利用成年动物耳部皮肤成纤维细胞克隆在山羊、牛上已得到后代^[12-14]。兔是小型家畜, 也是一种重要的模型动物, 因此, 兔体细胞克隆研究对人类疾病的动物模型发育生物学等有着重要的实践和理论意义。本研究以成年母兔耳部皮肤上皮细胞为核供体, 对兔体细胞核移植技术进行了研究。供体细胞与受体卵母细胞的融合以及卵母细胞的激活是体细胞核移植技术的关键步骤。使用直流电脉冲诱导融合并激活卵母细胞是目前最常用的方法, 但在不同试验条件下, 所用电脉冲的最佳电场强度可能不同。因此, 本研究还着重对核移植技术程序中的融合和激活步骤进行了研究, 以期兔体细胞克隆的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

从杨凌某养兔场购进 4~8 月龄, 体重 2~3 kg

性成熟的健康母兔。

1.2 M II 期卵母细胞的获得

成年母兔连续 6 次颈部皮下注射促卵泡素 (FSH, 宁波激素厂), 每次间隔 12 h, 采用计量递减的方式注射, 每只总计用量为 60 IU。最后一次 FSH 注射后 12 h, 每只母兔耳缘静脉注射绒毛膜促性腺激素 (HCG, 宁波激素厂) 100 IU, 并用玻璃棒刺激阴道子宫颈, 促进排卵。注射 HCG 后 14~15 h, 在无菌条件下, 用含有 100 mL/L NBS (Sigma) 的 DPBS (GBCO) 从输卵管冲取卵丘-卵母细胞复合体 (COCs); 另一部分卵母细胞从卵巢上采集大卵泡中发育成熟的卵母细胞 (已排出第一极体)。将 COCs 移入含 3 mg/g 透明质酸酶 (Sigma) 的 PBS (无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}) 液中, 在 38℃ 下消化 10 min 后, 用内径与卵母细胞直径相近的毛细玻璃管轻轻吹打, 以去除卵丘细胞, 无卵丘细胞的卵母细胞移入 TCM-199 (GBCO, 添加 100 mL/L FCS) 液中备用。

1.3 供体细胞的准备

用无菌方法采集一小块健康成年母兔耳部皮肤, 经过 5 mL/L 过氧乙酸浸泡 15 min (杀菌) 后在 PBS 中剪碎, 碎块接种于 TCM-199 (GBCO, 添加 100 mL/L FBS) 培养液中。于 38.5℃、50 mL/L CO_2 和饱和湿度条件下培养, 当培养细胞生长铺满

^{*} [收稿日期] 2004-12-09

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39970363); 国家“973”项目 (G199954301)

[作者简介] 杨春荣 (1971-), 女, 陕西咸阳市人, 助理研究员, 主要从事动物胚胎工程研究。

培养瓶底部后,用含 2.5 g/L 胰蛋白酶(GIBCO)和 0.2 g/L EDTA (Sigma) 的 PBS (无 Ca^{2+} , Mg^{2+}) 消化培养细胞,用吸管吹打使其快速悬浮,离心悬液后用培养液洗涤细胞沉淀。以 $(1\sim 5)\times 10^6\text{ mL}^{-1}$ 传代培养,传到 3 代冷冻保存。核移植前解冻于培养皿并进行传代培养,取传至 2~4 代的细胞,在含有 5 mL/L 胎牛血清(FCS)的培养液 DMEM 中饥饿培养 4~7 d 后用于核移植。

1.4 卵母细胞的去核与注核

将去除卵丘的卵母细胞置于显微操作液(在含 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 细胞松弛素 B 的 TCM-199 中添加 100 mL/L FCS)中培养 15 min,然后将卵母细胞置于显微操作仪的操作液滴内,在纺锤体探测仪下进行去核。将去核后的卵母细胞放入 TCM-199 (添加 100 mL/L FCS)中培养 30 min,然后在操作液中用注核针将上皮细胞注入到透明带下,立即进行电融合。

1.5 电融合与激活

融合液为 cytofusionTM medium (cyto pulse sciences, Inc)。先将重构胚移入电融合液中平衡 1~2 min,然后移入覆盖有融合液的融合槽中,以 160, 200, 240 V/mm 的直流电脉冲诱导融合。重组胚置于 TCM-199 (添加 100 mL/L FCS)中培养 0.5 h 后观察是否融合,融合的胚再进行 2 次电激活,每次间隔 30 min。激活参数为:直流脉冲前给一次 5 V、5 s 的交流脉冲,之后给予 2 次 150 V/mm 时程为 20 μs 的直流脉冲,每次脉冲间隔 3 s,以进一步激活卵母细胞。激活的卵母细胞放入 TCM-199 (添加 100 mL/L FCS) + 2 mmol/L 6-DMAP 中培养 4 h 后,转移到培养小滴中继续培养。

1.6 胚胎体外培养与移植

胚胎在培养液 TCM-199 (添加 100 mL/L

FCS)中培养 4 d,培养条件为 38[°]、50 mL/L CO_2 。一部分重构胚在培养后 17 h 统计胚胎卵裂率,另一部分直接移植。将激活的重构胚或 2~4 细胞胚胎经手术移入同期发情或比供卵母兔晚 16~18 h 的受体兔单侧输卵管内,观察受孕情况。

1.7 统计分析

对所得数据(融合率、裂解数、分裂率)进行卡方(χ^2)独立性检验。

2 结果与分析

2.1 成年母兔耳部皮肤上皮细胞培养

本试验共分离培养了 2 只成年母兔耳部皮肤的上皮细胞。细胞在培养 10 代后仍增殖旺盛,呈多角型,具典型的上皮细胞形态(图 1)。经核型分析,在培养过程中细胞染色体倍性维持正常。

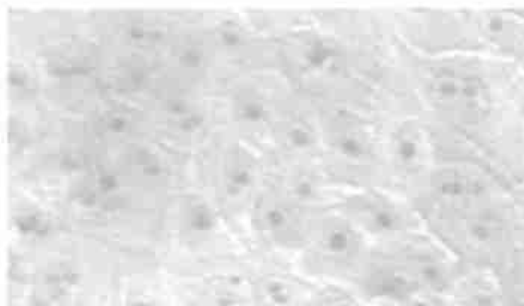


图 1 培养至 10 代的成年母兔耳部皮肤上皮细胞形态

Fig. 1 Morphosis of epidermal cells

2.2 去核

对纺锤体探测仪去核前后的卵母细胞进行荧光检测,结果表明去核率为 100% (图 2 A、B)。

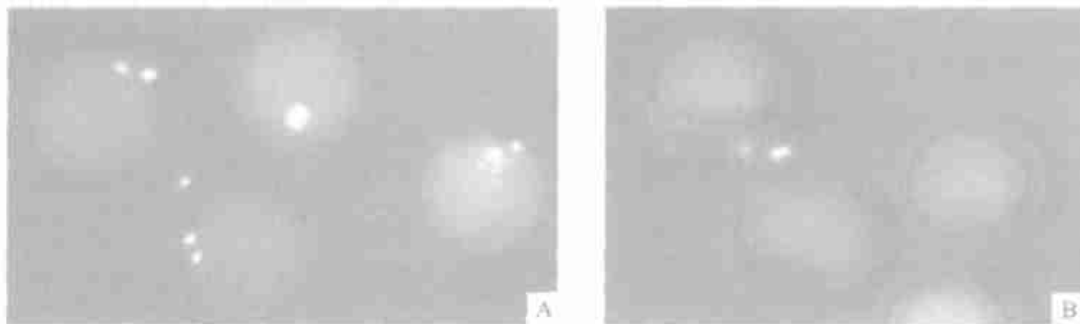


图 2 去核前后卵母细胞 hoechst33342 染色

A. 去核前; B. 去核后

Fig. 2 Stained by hoechst33342 before and after enucleation

A. Stained before enucleation; B. Stained after enucleation

2 3 细胞融合及重构胚胎的激活

由表 1 可以看出, 在 3 种电场强度下, 160 V/mm 时的融合率显著低于 200 和 240 V/mm ($P < 0.05$), 200 与 240 V/mm 的融合率差异不显著($P > 0.05$)。160 V/mm 时的裂解数显著低于 200 及 240 V/mm ($P < 0.05$), 200 V/mm 的裂解数显著

低于 240 V/mm ($P < 0.05$), 即随着电场强度的增加, 裂解数也增加。160 V/mm 的分裂率显著低于 200 和 240 V/mm ($P < 0.05$), 200 V/mm 的分裂率显著高于 240 V/mm ($P < 0.05$)。综合考虑认为, 适宜的融合电场强度应为 200 V/mm, 该条件下, 融合率为 82.35%, 裂解率为 7.84%, 分裂率为 71.43%。

表 1 不同电场强度对核移植胚融合及分裂的影响

电场强度/ (V · mm ⁻¹) Electric pulse	重构胚胎数 Reconstructive embryos	融合率/% Fused rate	裂解数 No. of breakdown	分裂率/% Cleavage
160	149	59.73(89) a	8 a	49.43(44) a
200	153	82.35(126) b	12 b	71.43(90) b
240	137	79.56(109) b	26 c	57.80(63) c

注: 分裂率以融合胚胎数为基数; 同一列中相同字母标记为差异不显著($P > 0.05$), 不同字母为差异显著($P < 0.05$); 试验重复 13 次。
Note: Fused rate was based on fusing embryos; within a column, values different superscripts were significantly different; repeating 13 times

2 4 不同来源的卵母细胞对核移植胚胎融合率及分裂率的影响

在 200 V/mm 电场强度下, 研究了不同来源的卵母细胞对核移植胚胎的影响, 结果见表 2。表 2 结

果表明, 来源于输卵管卵母细胞的融合率和裂解数与来源于卵巢大卵泡的无显著差异($P > 0.05$); 但来源于输卵管卵母细胞的分裂率显著高于来源于卵巢大卵泡的分裂率($P < 0.05$)。

表 2 不同来源的卵母细胞对核移植胚融合与发育的影响

卵母细胞来源 Sources of embryo	重构胚胎数 Reconstructive embryos	融合率/% Fused rate	裂解数 No. of breakdown	分裂率/% Cleavage
输卵管 Oviduct	157	84.71(133) a	10 a	73.68(98) a
卵巢大卵泡 Large follicles	160	78.75(126) a	12 a	56.35(71) b

注: 分裂率以融合胚胎数为基数; 同一列中相同字母标记为差异不显著($P > 0.05$), 不同字母为差异显著($P < 0.05$); 试验重复 6 次。
Note: Fused rate was based on fusing embryos, within a column values different superscripts were significantly different, repeating 6 times

2 5 重构胚胎的培养

融合激活后, 将重构胚胎放入 TCM-199 (添加 100 mL/L FCS) + 2 mmol/L 6-DMAP 中培养 4 h

后, 转移到培养小滴中继续培养。培养 6 h 后重构胚胎形态见图 3A; 培养 17 h 重构胚胎 2-细胞期见图 3B; 培养 17 h 重构胚胎 4-细胞期见图 3C。

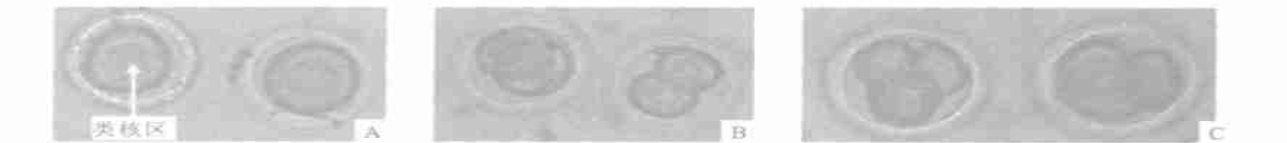


图 3 重构胚发育阶段

A. 具类核区的重构胚; B. 2-细胞期; C. 4-细胞期

Fig 3 Development of reconstructive embryos

A. Reconstructive embryos possessing nuclearoid zone; B. 2-cell stage; C. 4-cell stage

2 6 胚胎移植结果

将通过上述方法获得的 467 枚 2~4 细胞期胚胎经手术移植到 26 只比供卵母兔晚 16~18 h 发情的受体兔两侧输卵管内, 观察受孕情况, 无幼仔出生; 将 179 枚 2~4 细胞期胚胎经手术移植到 12 只

同期发情的受体兔输卵管内, 也无幼仔出生。

3 讨论

3 1 卵母细胞的去核

卵母细胞的去核操作是核移植的重要技术之

一,哺乳动物核移植效率低的原因之一是不能高效率除去受体卵母细胞中的染色体,盲目去核技术损失 $1/2 \sim 1/3$ 的卵母细胞质,卵母细胞的去核量对核移植胚胎的发育产生很大影响。Westhusin 等^[15]认为,卵母细胞去核量为 50% 时,重组胚的囊胚发育率明显低于对照组。本试验采用纺锤体探测仪,其原理是在微分干涉差(DIC)倒置显微镜下去核操作。在 DIC 倒置显微镜的最高分辨率视野下,使卵母细胞旋转,当纺锤体与焦平面垂直时核区域与卵母细胞质的折光率有差异,可准确吸除中期核,所以去核过程中除去的卵母细胞质很少,去核率可达 100%,为理想的去核方法。

3.2 细胞周期对核移植胚发育的影响

处于第二次减数分裂中期(M II)的卵母细胞质中含有成熟促进因子(MPF),这些因子可诱导供体核物质发生一系列形态学的变化,包括核膜破裂(NEBD)和早熟凝集染色体(PCC)的出现。当供体核处于 S 期时,受体胞浆中高水平的 MPF 使染色体出现异常的概率显著升高;而当供体核处于 G1 或 G2 期时,虽然供体核同样会出现 PCC 现象,但对染色体无损害。基于此,Campbell 等^[16,17]提出以下 2 条协调供体核和去核卵母细胞的途径:其一,选取处于 G0 或 G1 期的细胞作核供体;其二,选取 MPF 水平低时的卵母细胞作受体。获取 G0 或 G1 期细胞的方法主要有 2 种,一是采用人工捕获的方法,即通过限制细胞培养基中的某种成分,从而使大部分细胞滞留在细胞周期的某一阶段;二是通过选择细胞类型来获得,对于不同类型的细胞,其在细胞周期不同阶段上的细胞数目相差很大,如刚排出的卵母细胞,其周围的卵丘细胞 90% 以上处于 G0 期或 G1 期。本试验所用供体细胞在含有 5 mL/L 胎牛血清(FCS)的培养液 DMEM 中饥饿培养 4~7 d 后细胞停至 G0 期,用于核移植。

3.3 重构胚的融合与激活

融合率以及融合后经活化处理提供可培养重构胚的比例,对核移植胚胎效率影响很大,提高融合率可以达到事半功倍的效果。一般来讲,细胞融合所采

用的电压强度是根据供核细胞大小、融合液、融合装置、电极类别等条件决定的。在家兔中有用 125~320 V/mm 融合电场强度的^[9,18,19]。本研究根据融合率、裂解数及分裂率等综合指标认为,在该类研究中电场强度以 200 V/mm 为宜。

融合激活后,将重构胚胎放入 TCM-199(添加 100 mL/L FCS)+2 mmol/L 6-DMA P 中培养 4 h 后转移到培养小滴中继续培养。虽然蛋白激酶抑制剂 6-DMA P 本身不能激活卵母细胞,但它可以显著提高激活后卵母细胞的分裂率和发育率,若激活后的卵母细胞不在 6-DMA P 中短暂培养,会使卵母细胞的分裂率和发育率降低。

3.4 不同来源的卵母细胞对核移植胚胎融合率及分裂率的影响

本试验分别采用来源于输卵管和卵巢大卵泡成熟的卵母细胞作为核受体,结果发现来源于输卵管的卵母细胞重构胚胎的分裂率显著高于来源于卵巢大卵泡的重构胚($P < 0.05$)。可能原因有:第一,卵母细胞的卵龄不同,来源于输卵管的成熟卵母细胞的卵龄大于来源于大卵泡的;卵巢大卵泡中卵母细胞虽然有第一极体排出,但卵龄较小,卵龄较小的卵母细胞易于融合,但不易激活,因此融合率差异不显著($P > 0.05$),分裂率差异显著($P < 0.05$)。第二,来源于卵巢大卵泡的卵母细胞虽然排出第一极体,但可能受到优势卵泡的影响,不能进行正常排卵和受精,从而影响后期胚胎发育(资料待发表)。

本试验中融合、激活的重构胚胎有 73% 可以卵裂,而目前的报道仅 50%^[20]。为了尽量减少体外环境对胚胎发育的影响,将 646 枚 2~4 细胞期重构胚胎移植到同期化或非同期化的受体,均未见幼仔出生。Chesne 等^[9]研究表明,由于克隆胚胎发育迟缓,所以推迟受体母兔的发情诱导时间,使受体母兔的生理状态更好地适应克隆胚胎的发育,从而显著提高了克隆胚胎的着床率和全程发育率,本试验也采用了推迟 16~18 h 移植给非同期化受体,但未产仔,此问题有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts[J]. Science, 1998, 280: 1256-1258
- [2] Kato Y, Tani T, Tsunoda Y, et al Eight calves cloned from somatic cells of single adult[J]. Science, 1998, 282: 2095-2098
- [3] Wakayama T, Perry A C F, Yananagimachi R, et al Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nu-

- clei[J]. Nature, 1998, 384: 370- 374
- [4] Baquisi A, behboodi E, Melican D T, et al Production of goats by somatic cell nuclear transfer[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 456- 461.
- [5] Polejaeva J, Chen S H, Vaught T D, et al Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. Nature, 2000, 407: 505- 509
- [6] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al Pig cloned by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. Science, 2000, 289: 1188- 1190
- [7] Dinnyes A, Dai Y, Yang X, et al Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts: effect of activation treatment and donor cell preparation[J]. Bio Repro, 2001, 64: 257- 263
- [8] Yin X J, Tian T, Kato Y, et al Development of rabbit parthenogenetic oocytes and nuclear transfer oocytes receiving cultured cumulus cell[J]. Theriogenology, 2000, 54: 1469- 1476
- [9] Chesne Patrick, Pierre G A denot, Celine V iglietta, et al Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 366- 369
- [10] Beyhan Z, Mitalipova M, Chang T, et al Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos produced using different types of adult donor cells[J]. Theriogenology, 2000, 53: 210
- [11] Chense P, A dent P G, Boulanger L, et al Somatic nuclear transfer in the rabbit[J]. Theriogenology, 2001, 55: 260
- [12] Behboodi E, melican D T, L iem H, et al Production of transgenic goats by adult somatic cell nuclear transfer[J]. Theriogenology, 2001, 55: 254
- [13] Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, et al Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97: 990- 995
- [14] 陈大元, 李劲松, 韩之明, 等 体细胞克隆牛: 供体细胞和受体的影响[J]. 科学通报, 2003, 48(8): 768- 773
- [15] Westhusin M E, Collas P, Marek D, et al Reducing the amount of cytoplasm available for early embryonic development decreases the quality but not quantity of embryos produced by *in vitro* fertilization and nuclear transplantation[J]. Theriogenology, 1996, 46: 243- 252
- [16] Campbell K H S Nuclear-cytoplasmic interaction during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development[J]. Biology of Reproduction, 1993, 49: 933- 942
- [17] Campbell K H S Cloned sheep by nuclear transfer from cultured differentiated cells[A]. Proceedings of International Conference on Animal Biotechnology[C]. Beijing: International Academic Publishers, 1997. 61- 68
- [19] Yin X J, Kato Y, Tsunoda Y. Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear-transferred rabbit oocytes receiving male fibroblast cells[J]. Reproduction, 2003, 124: 41- 47.
- [20] 侯 健, 安晓荣, 苟克勉, 等 兔体细胞核移植的初步研究[J]. 动物学杂志, 2002, 37(6): 25- 29
- [18] Ha R J, Kang D W, Choe C Y, et al Effect of ionomycin and 6-dimethylaminopurine on oocyte activation and production of rabbit nuclear transplant embryos[J]. Korean J Emb Trans, 1998, 13: 11- 19

Producing cloned embryos from ear skin epidermal cells of adult female rabbits

YANG Chun-rong, MA Xiao-fei, DONG Shu-wei, LIU Shu-juan, DOU Zhong-yang

(Northwest A & F University, Shaanxi Center of Stem Cell Engineering and Technology, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: With the nucleic donors from ear skin epidermal cells of adult female rabbits, the fusion, activation and selection of different oocytes as recipient in the somatic nuclear transfer of rabbits were studied. The fused rate under 200 V/mm (82.53%) was significantly higher than that under 160 V/mm (59.73%), and had no difference from that under 240 V/mm (79.56%); the cleavage rate under 200 V/mm (71.43%) was significantly higher than those under 160 V/mm (49.43%) and under 240 V/mm (57.80%). The fused rate from oviduct oocytes (84.71%) had no difference from that from large follicles (78.75%); the cleavage rate from oviduct oocytes (73.68%) was significantly higher than that from large follicles (56.35%). When 646 reconstructive embryos in 2-4 cells were transferred into 38 recipients under synchronous and asynchronous, no child was born.

Key words: rabbits; epidermal cells; nuclear transfer; cloned embryo