

利用干细胞生产转基因动物研究进展^{*}

杨春荣, 窦忠英

(西北农林科技大学 国家干细胞工程技术研究中心陕西省分中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 干细胞是个体发育过程中遗留在机体的各个部位、保持着原始状态的一些细胞。在临床上, 干细胞有着重要的应用价值。文章概述了利用干细胞生产转基因动物的现状、发展、原理和优点等, 以为转基因动物的生产提供借鉴。

[关键词] 干细胞; 转基因动物; 基因转移技术

[中图分类号] Q 785; S814.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)07-0037-04

干细胞(Stem Cell)是一类具有多种分化潜能、自我更新和高度增殖能力的细胞, 能生产出与自身完全相同的子细胞, 也可以进一步分化成为各种不同的组织细胞, 从而构成机体各种复杂的组织器官。干细胞存在于早期胚胎、骨髓、脐带、胎盘、皮肤、胰岛和其他组织中, 对机体修复各种消耗、损伤及保证生命的延续具有重要意义。

转基因动物技术始于20世纪80年代, 随着研究的深入, 转基因动物的生产方法得到了突破性的发展。与原核注射法、精子载体法及逆转录病毒法等转基因动物生产方法相比, 干细胞法的优点有: 能够将外源基因导入受体染色体的某一特定部位, 或使某一基因发生突变, 实现了外源基因的定点整合, 克服了随机整合的缺点; 可以进行基因打靶或基因剔除生产基因缺失动物, 是目前建立某些疾病模型的一种新途径; 转基因动物的筛选由个体水平转为细胞水平。相对于体细胞核移植法, 干细胞的全能与胚胎细胞相似, 易进行基因的重排和重编程, 具有较高的成功率。本文对利用干细胞生产转基因动物的主要方法进行综述, 以供相关研究人员参考。

1 胚胎嵌合法

胚胎嵌合法指将一定数量转染外源基因的胚胎干细胞(Embryo Stem Cells, ES)或原始生殖细胞(Primordial Germ Cells, PGCs)注射入囊胚或与裸胚共同培养, 生产转基因嵌合胚的方法。由于ES或PGCs参与生殖系的嵌合, 因此从嵌合体后代中可

以得到转基因后代。胚胎嵌合法包括以下3种方法: 第1种方法是将ES或PGCs细胞与脱透明带的早期胚胎聚合后, 共同培养, 形成嵌合胚。Gossler等^[1]用Neo基因表达元件的逆转录病毒载体DNA转染ES细胞后, 将ES细胞与裸胚聚合共同培养24 h, 形成嵌合胚, 得到了生殖系嵌合体。Wood等^[2]将小鼠裸胚与ES细胞聚合制备嵌合体小鼠, ES细胞嵌合率高达90%以上。第2种方法是将ES或PGCs细胞与胚胎卵裂球共同置于胚胎的空透明带内, 体外培养, 形成嵌合胚^[3]。第3种方法是将ES或PGCs细胞注射入囊胚腔内, 使ES细胞与内细胞团(ICM)共同发育, 形成嵌合胚。Bradley等^[4]通过囊胚注射法获得首例小鼠ES细胞种系嵌合体。Magain等^[5]将小鼠干细胞注入到囊胚中, 获得生殖腺嵌合的后代。程莹等^[6]将遗传修饰后的ES细胞用显微注射法注入受体囊胚, 成功地获得了首例条件基因打靶小鼠。

在ES细胞中改造的基因, 可以通过嵌合体的生殖细胞传递给后代, 但其种系嵌合率较低是制约利用ES细胞生产转基因动物的关键问题。为了提高嵌和率研究人员进行了大量研究工作, 并摸索出了许多切实可行的方法。Maeda等^[7]建议, 胚下腔注射时注射孔应尽可能浅, 并应采取一定办法阻止细胞从注射孔外逸; Hong等^[8]认为, 用电穿孔法导入PGCs可以提高PGCs的转染率。最近日本宿外医药公司药物学技术实验室利用电压显微操作(PMM)技术将ES细胞注入小鼠胚泡, 使新生小鼠

^{*} [收稿日期] 2005-09-27

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

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

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事干细胞与胚胎工程研究。E-mail: douzhongying@china.com

的嵌合率由常规方法的 39% 提高到 42%; 而有研究者认为尽量缩短 ES 细胞的体外培养时间以及将 ES 细胞注入早期发育阶段的受体均能提高种系的传递能力^[7]。

PGCs 迁移有一定的识别路径, 由于受体 PGCs 的存在, 使供体 PGCs 在受体生殖腺中所占比例甚小, 致使形成种系嵌合体的比例很低。为了提高供体 PGCs 在受体生殖腺中的比例, 常通过物理学或化

学消毒剂等方法损坏受体胚。Reynaud^[9]和 A ige-Gil 等^[10]报道紫外线照射可降低受体 PGCs 的比例。

2 细胞核移植法

2.1 干细胞核移植与受精卵注射 DNA

干细胞核移植与受精卵注射 DNA 生产转基因动物的特点见表 1。

表 1 干细胞核移植与受精卵注射 DNA 生产转基因动物的比较

Table 1 Comparison of producing transgenic animals by nuclear transplantation of stem cells and DNA injection of oocytes

方法 Methods	基因整合特点 Transgenic methods	筛选水平 Screen	周期 Period
干细胞核移植 Nuclear transplantation of stem cells	定点整合; 基因位点单一拷贝; 对内源基因进行基因打靶和基因剔除 Specific insertion, single copy of gene, gene shot and knockout for intrinsic genes	细胞水平 Cells	周期短, 可得大量同基因个体 Obtaining many identical gene creatures and short period
受精卵注射 DNA DNA injection of oocytes	整合位点随机; 基因位点多拷贝; 无法对内源基因修饰 Random insertion, multiple copies of gene, can't modification of intrinsic genes	个体水平 Individuals	繁琐, 周期长 Trifle and long period

由表 1 可知, 干细胞核移植具有基因定点整合、基因位点单一拷贝、在细胞水平上进行筛选及在短时间内可得到大量的同基因个体的优点。

2.2 干细胞核移植与体细胞核移植

由于干细胞与胚胎细胞特征相似, 干细胞作为核供体注射到去核的卵母细胞胞质中后, 也需要在去核卵母细胞内重新编程, 但相对于高度分化的体细胞要容易得多。因此, 与体细胞核移植相比, 干细胞的核移植效率要高得多。这也正是人们猜想目前存活克隆个体所用的供体核大多是源于动物组织的成体干细胞核, 而非最终分化的体细胞核的原因之一^[11]。随着对干细胞研究的深入, 人们已在多种动物上得到了干细胞核移植的后代。Wakayama 等^[12]用长期传代(30 代以上)的小鼠 ES 细胞克隆出了 31 只小鼠, 其中 14 只存活; Sims 等^[13]将培养 6~101 d 的牛 ICM 细胞核移植到去核卵母细胞中, 结果卵裂率为 70%, 囊胚率为 24%, 经胚胎移植有 13 头牛妊娠, 生出了 4 头牛犊; Stice 等^[14]将牛类 ES 细胞进行核移植, 得到重构胚并移入受体牛子宫, 发育至 45 d 流产; Campbell 等^[15]将绵羊类 ES 细胞注射到去核卵母细胞中获重构胚, 经核移植有 4 只羔羊出生。

3 体外诱导 ES 细胞分化成为卵母细胞或精子

利用 ES 细胞在体外能够定向分化的特性, 可以将转染外源基因的 ES 细胞在体外诱导分化成生

殖细胞(卵母细胞或精子), 利用体外受精、单精子注射等技术生产转基因动物。Hübner 等^[16]首次将转染了 *gOcr-GFP* 基因的小鼠 ES 细胞体外诱导培养后形成 PGCs, PGCs 接着分化形成卵泡、卵子, 最后形成囊胚样结构; Toyooka 等^[17]将转染了 *Mvh-GFP* 和 *Mvh-Laz* 报告基因的 ES 细胞(XY)与 BM P4 细胞共培养, BM P4 刺激 ES 细胞经 PGCs 向生殖细胞分化, 将生成的生殖细胞移植给经过处理的小鼠, 最终得到了精子; Geijsen 等^[18]利用视黄酸促进 ES 细胞定向向精子分化, 得到诱导的精子细胞后, 利用显微注射技术将精子注入卵子, 得到囊胚。这些方法给转基因动物的生产提供了新的思路, 也为利用 ES 细胞生产转基因动物提供了一种新方法。

4 利用成体干细胞中的精原干细胞制造“转基因精子”

精原干细胞是出生后雄性生殖系的母体细胞, 其在一生中保持分裂和增殖的能力。性成熟后, 精原干细胞能够提供子细胞继而发育为精子。同时, 精原干细胞的分裂增殖能力很强, 理论上讲大鼠 1 个精原干细胞通过分裂、分化能产生 4 096 个精子; 并且精原干细胞增殖很快, 人在每次心跳的时间里就有 1 000 个精子诞生^[19]。因此精原干细胞是许多研究转基因动物学者关注的对象。

精原干细胞通过体外培养可以建立既能在体外无限分裂增殖, 又能被诱导分化成精子的精原干

胞系,使体外操作精原干细胞成为现实。在精子成熟之前,采用与ES细胞相同的处理方法对精原干细胞进行基因转染和筛选,可获得转染的精原干细胞系。与利用ES细胞生产转基因动物不同,一旦从细胞水平上筛选到整合了目的基因的精原干细胞克隆,即可将其移入不育动物的睾丸,或经过各种理化手段处理的不育动物的曲精细管中,依靠精原干细胞自身的增殖潜能和分化潜能,源源不断地产生遗传信息改变的干细胞、各级生精细胞和精子。然后,通过自然交配就可将携带目的基因导入受精卵中,从而免除了利用ES细胞生产转基因动物所需要的着床前胚胎的采集,以及繁杂的显微注射等步骤。因此,利用精原干细胞生产转基因动物是一种捷径。但到目前为止,精原干细胞没有永生化细胞系,各国学者立足现有条件,采用曲精细管显微注射法和精原干细胞移植法生产转基因动物,其原理均是借助生物体自身的生精微环境,诱导异源、异体精原干细胞的定向分化。

4.1 曲精细管显微注射法

Kim等^[20]用白消安预处理动物,创造一个适合高效转染精原干细胞的生精小管环境,3周后用显微注射针向曲精细管中注射脂质体-细菌 $LacZ$ 基因复合物,直接转染小鼠曲精细管或猪睾丸中的雄性生殖细胞。结果显示,在小鼠上有8.0%~14.8%的精子表达 $LacZ$ 基因,7%~13%的附睾精子携带外源基因;在猪的曲精细管中有15.3%~25.1%生殖细胞表达外源基因。该成果被视为“跨物种精子产生中的重大突破”。在曲精细管显微注射法中,为了提高其转染效率,国外学者还进行了其他一些尝试,如逆转录病毒载体法和最近应用较多的慢病毒载体法等^[21]。在国内,曹阳等^[22]、沈新明等^[23]、王宁等^[24]分别用曲精细管显微注射法对兔、小鼠的曲精细管注射外源基因,再与雌性动物交配,分别获得转基因兔和转基因小鼠。

虽然曲精细管显微注射法成功地避开了精原干细胞体外培养的难题,但由于不能对动物进行多次

转染,所以其转染效率仍很低。

4.2 精原干细胞移植法

Brinster等^[25]将 $LacZ$ 基因导入5~28日龄小鼠的精原干细胞后,将精原干细胞移植到白消安处理的成年小鼠睾丸中,移植的细胞可以在生精小管中成活,并发育成精子,将受体产生的精子用于受精,结果80%的后代携带有报告基因。Russell等^[26]将大鼠精原干细胞移入10只丧失免疫力的小鼠曲精细管中,结果小鼠产生了大鼠的精子。Nagano等^[27]用反转录病毒离体感染供体睾丸细胞,并将其移植入受体小鼠睾丸中,结果在子代中有4.5%的转基因小鼠。Dobrinski等^[28]和Oatley等^[29]分别将兔、狗和牛的精原细胞移植入小鼠曲精细管中,供体精原细胞均在受体内成功增殖聚集。这种异种间移植的成功,更为转基因动物的生产提供了一个绝佳的方案,引起人们的广泛关注。

5 利用干细胞生产转基因动物存在的问题及展望

除了在小鼠以外,在其他动物上还没有真正意义上的胚胎干细胞建系,无法利用干细胞技术有目的地获得基因敲除动物,这大大限制了其他哺乳动物模型在生物基础科学、人类健康和医药领域的应用。同时,转基因动物的生产是一个艰辛、复杂的系统工程,在这个工程中还存在以下问题:首先是生产个体的成功率太低,核移植的成功率只有1%左右;其次是转基因动物模型可能与预期的动物模型不符;第三是已整合的外源基因很容易从宿主基因组中消失,遗传给后代的概率很低;第四是转基因的整合还可造成宿主细胞基因的突变,导致四肢畸形、死胎、木乃伊等现象的发生。总之,效率低下是制约转基因动物生产的关键问题,但不能否认,转基因动物正以其特有的、潜在的优势蓬勃发展,相信随着理论和技术的不完善,转基因动物及其产品必将进入真正的产业化和市场化阶段,为人类的生产和发展做出重大贡献。

[参考文献]

- [1] Gossler A, Doetschman T, Korn R, et al. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines[J]. Proc Natl Acad U S A, 1986, 83: 9065-9069.
- [2] Wood S A, Pascoe W S, Schmidt C, et al. Simple and efficient production of embryonic stem cell embryo chimeras by coculture[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 365: 6441-6443.
- [3] 郝捷, 冯波. 转基因动物研究进展[J]. 动物医学进展, 2004, 25(1): 1-4.
- [4] Bradley A, Evans M, Kaufman M H, et al. Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines[J]. Nature, 1984, 309(5965): 255-256.

- [5] Magin T, McWhir J, Melton D W. A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency[J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 3795-3796
- [6] 程 莹, 周 江, 谭晓红, 等. 遗传修饰小鼠胚胎干细胞种系嵌合体小鼠的研制[J]. *生物技术通讯*, 2003, 14(1): 1-3
- [7] Maeda T, Yamakawa Y, Masuda K, et al. Distribution of blastodermal cells transferred to chick embryos for chimera production using windowed eggs[J]. *Br Poult Sci*, 1997, 38(3): 241-244
- [8] Hong Y H, Moon Y K, Jeong D K, et al. Improved transfection efficiency of chicken gonadal primordial germ cells for the production of transgenic poultry[J]. *Transgenic Res*, 1998, 7(4): 247-252
- [9] Reynaud M G. The localization of primordial germ cells in Japanese quail embryos using a technique of ultraviolet irradiation[J]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*, 1976, 282(12): 1195-1198
- [10] Aigé-Gil V, Simkiss K. Sterilisation of avian embryos with busulphan[J]. *Res Vet Sci*, 1991, 50(2): 139-144
- [11] Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature band T donor cells[J]. *Nature*, 2002, 415(6875): 1035-1038
- [12] Wakayama T, Rodriguez I, Perry A C, et al. Mice cloned from embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 96(26): 14984-14989
- [13] Sims M M, First N L. Production of fetuses from totipotent cultured bovine inner cell mass cells[J]. *Theriogenology*, 1993, 39: 313
- [14] Stice S L, Strolchanko N S. Pluripotent bovine embryonic cell lines directed embryonic development following nuclear transfer biology of reproduction[J]. *Theriogenology*, 1996, 54: 100-110
- [15] Campbell K H S, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line[J]. *Nature*, 1996, 380(6569): 64-66
- [16] Hübner K, Fuhrmann G, Christensson L K, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cell[J]. *Science*, 2003, 300(23): 1251-1256
- [17] Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, et al. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 11457-11462
- [18] Geijsen N, Horoschak M, Kim K, et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cell[J]. *Nature*, 2004, 427(6970): 48-54
- [19] Brinster R L. Germ line stem cell transplantation and transgenesis[J]. *Science*, 2002, 296: 2174-2176
- [20] Kim J H, Machaty Z, Balatti P A, et al. Activation of porcine oocytes via an exogenously introduced rat muscarinic M1 receptor biol reproduction[J]. *Biol Reprod*, 1997, 57: 85
- [21] Nagano M, Brinster C J, Orwig K E, et al. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ line stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(23): 13090-13095
- [22] 曹 阳, 高华颖, 李庆伟, 等. 精子干细胞转染法制备基因兔的研究[J]. *高技术通讯*, 2001, 11(10): 17-21
- [23] 沈新明, 乔贵林, 张 玲, 等. 用曲细精管微注射法建立绿色荧光蛋白转基因小鼠[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(3): 250-253
- [24] 王 宁, 陈晓光, 姚纪花, 等. 利用精原干细胞建立人凝血因子IX转基因小鼠[J]. *科学通报*, 2003, 48(17): 1848-1850
- [25] Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11298-11302
- [26] Russell L D, Brinster R L. Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules[J]. *J Androl*, 1996, 17: 615-627
- [27] Nagano M, Brinster C J, Orwig K E, et al. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ line stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13090-13095
- [28] Dobrinski I, Varbock M R, Brinster R L. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes[J]. *Biol Reprod*, 1999, 61: 1331-1339
- [29] Oatley J M, Avila D M, Mclean D J, et al. Transplantation of bovine germinal cells into mouse testes[J]. *J Anim Sci*, 2002, 80: 1925-1931

Progress on producing transgenic animals with stem cells

YANG Chun-rong, DOU Zhong-yang

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

Abstract: Stem cells, harboured in some parts of organisms, remain primitive during the development. They play a key role in clinical application. In this paper, the status quo, development, mechanism, and advantage to provide references for producing transgenic animals were summarized.

Key words: stem cell; transgenic animal; transgenic technology