供体细胞来源及预处理对牛体细胞核移植效率的影响

曹俊伟[1,2],马利兵[1,3],张　弛[1],毕聪明[1,4],赛务加甫[1,5],舒建洪[1],华　松[1],张　涌[1]

(1 西北农林科技大学 生物工程研究所,陕西 杨凌 712100;2 内蒙古农业大学 生物工程学院,内蒙古 呼和浩特 010018;
3 内蒙古科技大学 生物与化学工程学院,内蒙古 包头 014010;4 辽宁医学院 动物医学院,辽宁 锦州 121001;
5 新疆石河子大学 动物科技学院,新疆 石河子 832003)

[摘　要]　以牛外耳皮肤成纤维细胞为核供体细胞,比较了不同同步化诱导方式(血清饥饿法与接触抑制法)、供体细胞冷冻与否、供体动物性别与年龄等因素对体细胞核移植效率的影响。结果表明,接触抑制法处理的供体细胞核移植胚囊胚率显著高于饥饿法($P < 0.05$);未冷冻的供体细胞核移植胚囊胚率显著高于冷冻供体细胞($P < 0.05$);成年母牛供体的囊胚率显著高于成年公牛($P < 0.05$);不同年龄供体细胞的核移植胚囊胚率差异不显著($P > 0.05$)。试验表明,以接触抑制法诱导未冷冻成年母牛外耳皮肤成纤维细胞为核供体,有利于核移植胚囊胚的发育。

[关键词]　牛;供体细胞;体细胞核移植;胚胎发育

[中图分类号]　Q813.7　　[文献标识码]　A　　[文章编号]　1671-9387(2007)10-0020-05

Effects of derivation and pretreatment of donor cells on the efficiency of nuclear transfer in cattle

Cao Jun-wei[1,2], Ma Li-bing[1,3], Zhang Chi[1], Bi Cong-ming[1,4], Sai Wu-jia fu[1,5], Shu Jian-hong[1], Hua Song[1], Zhang Yong[1]

(1 *Bio-engineering Institute, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*; 2 *College of Biotechnology, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia* 010018, *China*; 3 *College of Biology and Chemistry Engineering, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou, Inner Mongolia* 014010, *China*; 4 *Department of Veterinary Medicine, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning* 121001, *China*; 5 *College of Animal Sciences, Xinjiang Shihezi University, Shihezi, Xinjiang* 832003, *China*)

Abstract: In this study, with bovine auricle fibroblasts used as nuclear donor, the effects of nuclear donor with serum starvation vs. contact inhibition, frozen vs. non-frozen, as well as the age and sex of animals from which nuclear donor cells were derived on the efficiency of nuclear transfer were investigated and compared. The results showed that the rates of blastocysts derived from nuclear donor cells pretreated with contact inhibition or non-freezing were significantly higher than those derived from nuclear donor cells pretreated with serum starvation or frozen respectively ($P < 0.05$). Moreover, when female cells were used as nuclear donors, the blastocyst rate of cloned embryos was significantly higher than those derived from male cells ($P < 0.05$). However, the age of animal from which donor cells derived could not affect the efficiency of nuclear transfer ($P > 0.05$). When adult female bovine auricle fibroblasts were pretreated with contact inhibition and were not frozen, the results indicated those were significantly beneficial to the development of nu-

*[收稿日期]　2007-05-09
[基金项目]　国家"863"计划项目(2004AA213072)
[作者简介]　曹俊伟(1970-),男,内蒙古呼和浩特市人,讲师,在读博士,主要从事胚胎工程研究。E-mail:caojunwei1970@163.com
[通讯作者]　张　涌(1956-),男,内蒙古和林格尔人,教授,博士生导师,主要从事发育生物学、胚胎工程、分子生物学及形态学研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

clear transfer embryos.

Key words: bovine;donor cell;somatic cell nuclear transfer;embryo development

1997 年,"Dolly"的诞生是核移植研究领域一个重要的里程碑,表明了成年动物的体细胞核在去核卵胞质中可以重新编程并且重获发育全能性[1]。之后,小鼠[2]、牛[3]、猪[4]、家兔[5]、猫[6]、大鼠[7]等各种体细胞克隆动物相继问世。核移植技术是目前复制优良畜种和制备转基因动物的有效途径,其应用不仅会产生巨大的经济效益,同时也为保护和拯救珍稀濒危物种开辟了一条崭新的途径。但是,目前体细胞克隆技术仍存在很多问题,如成功率极低[8]以及克隆动物的各种缺陷[9]等,极大地限制了这项技术在实践中的应用。核移植的成功率低,大多归因于未能完全再程序化供体细胞中的后成性基因印记[10-13],因而大多数被用于提高核移植成功率的策略均着眼于供体细胞。已有的报道表明,供体细胞的类型[14]、所处的细胞周期[15]、体外培养传代次数[16]、来源和供体的年龄[14]等诸多因素,均可能影响核移植的效率,但上述研究缺乏系统性。本试验采用不同来源及经不同预处理后的牛外耳成纤维细胞为核供体,以体外成熟的牛 M Ⅱ期卵母细胞为核受体构建体细胞克隆胚,系统地探讨了不同诱导方式(血清饥饿法与接触抑制法)、供体细胞冷冻与否、供体动物性别与年龄等因素对体细胞核移植效率的影响,以期为提高牛体细胞核移植胚构建效率提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　供体细胞及卵巢　外耳成纤维细胞分别来自杨陵科元生物技术有限公司 4 头优质荷斯坦牛,其中 2 头均为 9 岁成年牛 (雌雄各一头),另外 2 头为犊牛(均为 3 月龄,雌雄各一头)。牛卵巢采自西安市屠宰场。

1.1.2　试　剂　人绒毛膜促性腺激素(Human chorinonic gonadotrophin, HCG)为丽珠制药公司产品,胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)和 DMEM/F-12 为 Gibco 公司产品。其余试剂均购自 Sigma 公司。

1.2　供体细胞的准备

牛外耳成纤维细胞采集方法如下:取外耳部皮肤充分剪碎,用 PBS 清洗 3 遍,然后采用 2.5 g/L 胰蛋白酶于 4 ℃消化 2 h,将细胞悬液于 130 g 离心 5 min,弃上清,沉淀重悬,调整细胞密度为约 105 mL^{-1},在含体积分数 10 % FBS 的 DMEM/F-12 培养基中进行原代及传代培养。同时,取每一代中的部分细胞冷冻,解冻后,迅速去除冷冻液,再次培养用作核供体细胞。

用于核移植的供核细胞为培养第 3 代到第 6 代的牛外耳成纤维细胞,细胞分别用两种方法诱导进入 G_0 或 G_1 期。第一种方法是血清饥饿法:在细胞培养第 2 天,培养液中 FBS 的浓度降为体积分数 0.5 %,饥饿培养 2～5 d;第二种方法是接触抑制法:细胞接种后,每 2 d 更换 1 次培养液(含体积分数 10 %FBS),待细胞长至 100 %汇合时,进行核移植试验。于核移植当天细胞注射前 1 h,用胰酶消化 5～6 min,DMEM/F12 培养液洗涤 2 次,悬浮单细胞于该培养液中备用。

1.3　牛卵母细胞的采集及体外培养

将牛卵巢置于盛有 30～37 ℃生理盐水(含 100 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素)的保温瓶中,在 2～3 h 内运回实验室。随后用含抗生素的等温生理盐水冲洗卵巢至无血水,剪除卵巢上的系膜。用带有 12 号针头的 10 mL 一次性注射器抽取卵巢表面直径为 2～8 mm 卵泡中的卵泡液,置于培养皿中静置片刻,在实体显微镜下拣卵。挑选卵丘层紧密包裹的卵丘-卵母细胞复合体(cumulus oocyte complexs, COCs),放入盛有 PBS 的凹皿中,用 PBS 洗 2～3 次,再经成熟培养液洗涤 1 次后移入成熟培养液中,置于培养箱中成熟培养 20～22 h。成熟培养液预先在培养箱中平衡至少 2 h,培养条件为 38.5 ℃、体积分数 5 % CO_2、饱和湿度。

1.4　重构胚的构建与激活

卵母细胞培养 20～22 h 成熟后,挑选卵丘层扩散良好的卵丘 - 卵母细胞复合体,放于含 1 g/L 透明质酸酶的 PBS 液(无 Ca^{2+}, Mg^{2+})中,用吸管吹打几下,去除外围卵丘细胞层。然后在显微镜下挑选排出第一极体的卵母细胞,以 25～30 枚/批放入 50 μL 去核操作液(TCM-199 + 体积分数 10 % FBS + 7.5 μg/mL 细胞松弛素 B(CB))中,上覆石蜡油,按照 Li 等[17]的方法,在显微操作仪上用外径 20 μm 的玻璃针去核。将去核后的卵母细胞按 25～30 枚/批置于 50 μL mSOF + 体积分数 10 % FBS 的微滴中,上覆石蜡油,用外径 10 μm 的玻璃细管将带

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

有完整细胞膜的供体细胞注射到卵母细胞的卵周间隙。将卵母细胞-供体细胞复合体放入融合液中平衡1～2 min,移入含有相同融合液的融合槽中,通入直流脉冲(DC,2.0 kv/cm,20 μs)电流,对卵母细胞-供体细胞复合体进行一次脉冲电融合。在含体积分数10%FBS的mSOF中培养0.5 h后,检查融合情况,未融合的复合体在30 min后再进行第2次电融合处理。

将融合后的卵母细胞-供体细胞复合体用mSOF洗3次,CO_2培养箱中成熟培养24 h,用化学方法激活重构胚。具体方法是:重构胚在含5 μmol/L离子霉素(Ionomycin)的培养液中作用4 min,然后移入含2 mmol/L 6-氨甲基嘌呤(6-DMAP)的培养液中培养4 h,最后移入培养液中培养。

1.5 重构胚的体外培养

将激活后重构胚每10枚放入一个培养液微滴中,上覆盖灭菌石蜡油,在38.5 ℃、体积分数5% CO_2、保和湿度条件下培养,48 h后统计卵裂率,第2天半量换液并添加体积分数10% FBS,第7天和第8天统计桑葚胚和囊胚的数量。

1.6 数据统计分析

采用SPSS软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 供体细胞的同步化处理对牛体细胞核移植效率的影响

由表1可知,接触抑制组与血清饥饿组的核移植胚卵裂率差异不显著($P > 0.05$),但囊胚的发育率差异显著($P < 0.05$)。说明在成年公牛外耳皮肤成纤维细胞为供体细胞的同步化处理上,接触抑制法的效果优于血清饥饿法。

表1 供体细胞周期同步化处理对核移植胚体外发育的影响

Table 1 Effects of cell cycle synchronization treatments on development of nuclear transfer embryos *in vitro*

同步化处理方法 Methods of cycle synchronization treatments	核移植胚数 No. nuclear transfer embryos	卵裂率/% Rate of embryos cleaved	囊胚率/% Rate of blastocyst
接触抑制法 Contact inhibition method	314	45.2(142/314)	20.7(65/314) a
血清饥饿法 Serum starvation method	297	44.1(131/297)	13.8(41/297) b

注:同一列中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下表同。

Note: a, b values with same superscripts in the same column indicate remarkable difference ($P > 0.05$). The same as below.

2.2 供体细胞冻融对牛核移植效率的影响

从表2可以看出,冻融组共培养克隆胚278枚,卵裂率为32.0%,与对照组卵裂率45.2%差异显著($P < 0.05$);囊胚发育第8天,冻融组囊胚率为12.6%,与对照组囊胚率20.7%差异显著($P < 0.05$)。说明冻融对牛外耳皮肤成纤维细胞有显著影响,导致其基因组重新编程能力下降。

表2 供体细胞的冻融对牛核移植胚体外发育的影响

Table 2 Effect of frozen and thawed on development of nuclear transfer embryos *in vitro*

分组 Group	核移植胚数 No. nuclear transfer embryos	卵裂率/% Rate of embryos cleaved	囊胚率/% Rate of blastocyst
冻融组 Freezing-thawing group	278	32.0(109/189) a	12.6(35/189) a
对照组 Control group	314	45.2(142/201) b	20.7(65/201) b

2.3 供体性别对牛体细胞核移植效果的影响

由表3可知,以成年母牛与成年公牛外耳成纤维细胞为核供体的核移植胚卵裂率分别为45.3%和45.2%,差异不显著($P > 0.05$);囊胚率分别为27.5%和20.7%,差异显著($P < 0.05$)。表明以雌性成年牛外耳成纤维细胞为核供体的核移植胚囊胚发育率显著高于雄性牛。

表3 供体性别对牛体细胞核移植胚体外发育的影响

Table 3 Effects of sex of donor cells on development of nuclear transfer embryos *in vitro*

性别 Sex	核移植胚数 No. nuclear transfer embryos	卵裂率/% Rate of embryos cleaved	囊胚率/% Rate of blastocyst
成年雌性 Female	258	45.3(117/258)	27.5(71/258) a
成年雄性 Male	314	45.2(142/314)	20.7(65/314) b

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　供体年龄对牛体细胞核移植效果的影响

由表 4 可知,雄犊牛和成年公牛核移植胚卵裂率分别为 44.2 %和 45.2 %,囊胚率分别是 18.4 %和 20.7 %,差异均不显著($P > 0.05$)。表明供体年龄对牛体细胞核移植效果没有影响。

表 4　供体年龄对牛体细胞核移植胚体外发育的影响

Table 4　Effects of age of donors on development of nuclear transfer embryos *in vitro*

年龄 Age	核移植胚数 No. nuclear transfer embryos	卵裂率/ % Rate of embryos cleaved	囊胚率/ % Rate of blastocyst
雄犊牛 Male calf	342	44.2(151/342)	18.4(63/342)
成年公牛 Adult male cattle	314	45.2(142/314)	20.7(65/314)

3　讨　论

Liu 等[18]在牛的核移植研究中发现,血清饥饿与非血清饥饿细胞囊胚率无差异。Zakhartchenko 等[19]用血清饥饿的成纤维细胞作供体,囊胚率显著高于非血清饥饿组;血清饥饿胎儿细胞比非饥饿细胞囊胚率显著提高,但用血清饥饿的成年牛体细胞作供体,其重组胚的囊胚发育率并非比未进行血清饥饿的体细胞高;用血清饥饿法与 100 %汇合的接触抑制法所获细胞作供体时,卵裂率和囊胚发育率无显著差异。本试验结果表明,接触抑制法与血清饥饿法诱导供体细胞进入 G0/ G1 期的核移植胚囊胚发育率具有显著差异,这可能是血清饥饿对培养细胞的生长特性、DNA 复制和细胞骨架及消化后细胞的大小均有不同程度的改变,导致重构胚的体外发育能力降低。

规模化的动物克隆需要将大量的供核体细胞进行冷冻。在本试验中,作者对冻融与未冷冻的供核细胞的核移植效果进行了比较,结果发现重构胚的囊胚发育率差异显著,与 Kato[3]等的研究结果不同。Amano 等[20]对小鼠进行研究,用新鲜消化的、培养的和冻存的成熟前足细胞克隆出小鼠桑椹/囊胚,经移植后均获得存活小鼠后代,而且以冻存细胞作供体的胚胎移植后,产仔率高于前二者。供体细胞冷藏 1～2 周,不影响早期重组胚的体内外发育能力,这可能是将体细胞进行冷藏处理也可使细胞迅速进入休眠状态而获得某些修饰。由于本研究中的重构囊胚未进行进一步的移植,其后期发育能力有无差异还有待于进一步研究。

目前,有关供体性别对核移植效率影响的相关报道还比较少。陈大元等[21]利用母牛和公牛外耳成纤维细胞作为核供体进行移植试验,结果表明雄性与雌性牛核移植胚的囊胚率没有显著差异,但雌性动物胚胎后期发育的比例却高于雄性。本试验结果显示,雌性供体的核移植胚囊胚发育率高于雄性,这可能是因为前者较后者具有更强抗逆能力,这种结果是否具有代表性还有待进一步的证实。

本试验结果表明,供体的年龄对重构胚囊胚发育率没有影响。供体细胞的年龄对克隆出生动物的寿命、繁殖性能是否具有影响,一直是研究的热点。随着"多莉"的成长,其出现提前老化迹象。研究证明,它的端粒长度与供体羊相似,而端粒的长短又直接决定着动物个体寿命的长短[22],也就是说从它一出生它就已经 6 岁了。类似的情况也出现在牛的研究中[3]。供体细胞年龄在影响动物寿命的同时,对克隆效率的影响也是值得关注的。杨素芳等[23]研究发现,成年耳部成纤维细胞的融合率、卵裂率和囊胚发育率显著低于胎儿成纤维细胞和胎儿皮肤细胞。由于供体细胞在细胞更新过程中,某些特定基因会随着个体的生长而出现选择性表达,因此选用"年龄较大"的供体,在重构胚发育过程中会受到供体细胞基因本身活性的影响,某些对胚胎发育至关重要的基因在个体发育生长阶段处于低活性时期,与卵母细胞融合后,很难达到胚胎发育所要求的基因表达量,因此不能开始重新编程。但是,Hill 等[24]的研究却得出不同的观点,其利用 40 日龄克隆胎儿的耳细胞和一头 21 岁的婆罗门公牛耳细胞作为供体细胞进行核移植,胚泡发育率完全相同。供体细胞本身对克隆后代"年龄"的影响究竟有多大,目前尚无定论。关于重构胚发育过程中,染色体端粒长度在核移植胚胎的发育中是否可恢复到正常水平、以及端粒长度变化的机制等均有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1]　Wilmut I, Schnieke A E, Mc Whir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. Nature, 1997, 385(6619): 810-813.

[2]　Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. Nature, 1998, 394(6691): 369-374.

[3]　Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult[J]. Science, 1998, 282(5396): 2095-

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2098.

[4] Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. Nature, 2000, 407(6800): 86-90.

[5] Chesne P, Adenot P G, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transferr from adult somatic cells[J]. Nat Biotech, 2002, 20(4): 366-369.

[6] Shin T, Kraemer D, PryorJ, et al. A cat cloned by nuclear transplantation[J]. Nature, 2002, 415(6817): 859-874.

[7] Zhou Q, Renard J P, Friec G L, et al. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation[J]. Science, 2003, 302: 1179

[8] William V H, Amanda R P, Randall S P. Wildlife conservation and reproductive cloning[J]. Reproduction, 2004, 127: 317-324.

[9] Cibelli J B, Campbell K H, Seidel G E, et al. The healt profile of cloned animals[J]. Nature Biotech, 2002, 20: 13-14.

[10] Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, et al. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos[J]. Curr Biol, 2001, 11: 1542-1546.

[11] Dean W, Santos F, Stojkovic M, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 13734-13738.

[12] Kang Y K, Koo D B, Park J S, et al. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos[J]. Nat Genet, 2001, 28: 173-177.

[13] Rideout W M, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome[J]. Science, 2001, 293: 1093-1098.

[14] Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows[J]. J Reprod Fertil, 2000, 120: 231-237.

[15] Wells D N, Laible G, Tucker F C, et al. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle[J]. Theriogenology, 2003, 59: 45-59.

[16] Enright B P, Jeong B S, Yang X, et al. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation[J]. Biol Reprod, 2003, 69: 1525-1530.

[17] LI X C, ZHANG Y, HUA S, et al. The use of demecolcine for enucleation of bovine oocytes[J]. Belg J Zool, 2007, 137(2): 209-214.

[18] Liu L, Shin T, Pryor J H, et al. Regenerated bovine fetal fibroblast support high blastocysts development following nuclear transfer[J]. Cloning, 2001, 3(2): 51-58.

[19] Zakhartchenko V, Durcova-Hills G, Stojkovic M, et al. Effects of serum starvation and recloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts[J]. J Reprod Fertil, 1999, 115(2): 325-331.

[20] Amano T, Kato Y, Tsunoda Y. Full-term development of enucleared mouse oocytes fused with embryonic stem cells from different celllines[J]. Reproduction, 2001, 121(5): 729-733.

[21] 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.

[22] 张德福, 汪 铮. 端粒酶和细胞衰老[J]. 动物医学进展, 2003, 24(5): 32-35.

[23] 杨素芳, 石德顺, 韩 杰, 等. 供体核种类对水牛核移植效果的影响[J]. 广西农业生物科学, 2004, 23(3): 233-237.

[24] Hill J R, Winger Q A, Long C R, et al. Development rates of male bovinenuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells[J]. Biology of reproduction, 2000, 62: 1135-1140.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net