

·学科进展与展望·

猪体细胞核移植研究进展

徐小明 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分中心,杨凌 712100)

[摘要] 由于猪的器官极可能成为人类未来器官的供应源,猪体细胞核移植及转基因等方面的研究已成为全球的热点。近几年来,猪体细胞核移植研究取得了一定的进展,但总体看来核移植效率还很低($<1\%$),还需要不断完善核移植程序及对一些基础问题的深入研究。本文对猪体细胞核移植研究进展及面临的一些问题作一综述与分析,旨在为研究者提供一些有益的启示。

[关键词] 核移植,克隆,转基因,猪

1996年体细胞克隆绵羊“多莉”的问世,掀起了体细胞克隆动物研究的热潮。2000年Onishi等^[1]在世界上首先报道得到体细胞克隆猪。猪器官的大小、解剖结构及生理功能与人体极为相似,是人类异种器官移植最为理想的替代物。核移植技术和转基因技术的结合将促进异种器官移植的临床应用,为人类健康和长寿提供新的希望。因此,这一领域的研究吸引了各国学者极大兴趣,取得了一定的进展。然而,体细胞克隆猪效率还很低,按所移植的胚胎计算,不到1%。影响体细胞克隆猪成功的因素很多,需改善克隆程序以及对一些基础问题的深入研究。本文对猪体细胞核移植研究进展及面临的一些问题加以综述分析,以期研究者提供一些有益的启示。

1 猪体细胞核移植的主要研究进展

2000年8月,Onishi等^[1]使用胎儿成纤维细胞,细胞核胞质内注射到体内成熟的去核的卵母细胞中,3—4 h后电激活,重构胚体外培养(in vitro culture, IVC)20—40 h,110枚重构胚移植4只受体,1只妊娠到期,得到1只克隆猪(0.9%)。几乎与此同时,Polejaeva等^[2]在*Nature*杂志上发表了他们的研究成果。他们总结前人失败的教训,避免了不太成熟的人工激活方法,使用二步核移植法,即将去核的MⅡ期卵母细胞与颗粒细胞融合,然后将其形成的原核再移入到去核后的体内受精原核期的胚胎。

401枚重构胚移植7只受体,2只妊娠(30%),一只妊娠到期,产生5只颗粒细胞克隆猪(1.2%)。紧接着,Batthausen等^[3]得到2只胎儿成纤维细胞,2只胎儿生殖嵴细胞克隆猪,与前两者不同的是使用较多的体外系统。他们用体外成熟(in vitro maturation, IVM)的卵母细胞,重构胚经电融合(1次1.9 kV/cm,持续45 μ s),4 h后经15 μ mol/L离子霉素处理20 min,然后再用DMAP激活3—4 h,重构胚培养8—76 h,902枚重构胚移植7只受体(116—164枚/只),4只妊娠(57.1%),2只到期,每只产生2只克隆猪(0.4%)。Park等^[4]首次报道得到转基因的体细胞克隆猪,他们以转染绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)的成纤维细胞为核供体,以IVM的卵母细胞为核受体,电融合(2次1.2 kV/cm,持续30 μ s),308枚重构胚在孤雌激活胚的协同下,移植3只受体,一只到期,得到5只转基因体细胞克隆猪(1.6%)。随后,他们得到4只转EGFP基因的耳上皮细胞克隆猪。Lai等^[5]采用敲除 α -1,3-半乳糖苷转移酶基因的胎儿成纤维细胞作为核供体,利用体内受精胚帮助妊娠,获得7只 α -1,3-半乳糖苷转移酶基因敲除核移植仔猪,存活4只。De Sousa等^[6]将胎儿成纤维细胞注射到IVM的卵母细胞卵周隙,融合后2 h再激活胚胎,重构胚移植8只受体,3只妊娠(37.5%),一只到期,产生1只克隆猪。Yin等^[7]使用化学法除去IVM的卵母细胞核,注核

国家自然科学基金资助项目。
本文于2005年1月25日收到。

后体外培养 24—48 h, 1439 枚重构胚移植 6 只, 3 只妊娠 (50%), 得到 8 只成年心肌细胞克隆猪 (0.5%)。Lee 等^[8]以成年皮肤成纤维细胞为核供体, IVM 去核的卵母细胞为核受体, 采用全细胞胞质内注射法, 3 h 后进行激活, IVC 20—24 h 后, 685 枚重构胚移植 9 只受体, 6 只妊娠 (66.7%), 3 只到期, 得到 4 只克隆猪 (0.5%)。Phelps 等^[9]以胎儿成纤维细胞为核供体, IVM 的卵母细胞为核受体, 重构胚移植 16 个受体, 10 个妊娠 (62.5%), 2 个到期, 得到 4

只健康的 α -1, 3-半乳糖苷转移酶基因缺陷猪 (第 2 轮敲除, 两个等位基因全部敲除)。Kolber-Simonds 等^[10]也得到了健康的 α -1, 3-半乳糖苷转移酶基因缺陷猪。这样产生克隆猪的器官移植给人后就不会发生急促的免疫排斥反应 (hyperacute rejection, HAR), 迈出了猪器官人源化改造的第一步。国内, 至今还没有见到体细胞克隆猪成功的报道, 不同的方法成功产生体细胞核移植猪的研究状况见表 1。

表 1 体细胞核移植猪研究状况

供核细胞	体内/外成熟卵母细胞	注核方法	克隆胚胎 IVC 时间 (h)	成活体克隆猪 (只)	是否转基因	文献
颗粒细胞	体内	二步法核移植	0	5	no	Polejaeva, et al. Nature, 2000
胎儿成纤维细胞	体内	胞质内注入	20—40	1	no	Onishi, et al. Science, 2000
胎儿成纤维细胞	体外	带下注射	8—76	4	no	Bettauser, et al. Nat Biotechnol, 2000
皮肤成纤维细胞	体内	带下注射	24—32	2	yes	Bondioli, et al. Mol Reprod Dev. 2001
胎儿成纤维细胞	体外	带下注射	18—22	5	yes	Park, et al. Ani Biotech. 2001
胎儿成纤维细胞	体内	带下注射	5—36	4	yes	Lai, et al. Science, 2002
成年心肌细胞	体外	带下注射	24—48	8	no	Yin, et al. Biol Reprod, 2002
胎儿成纤维细胞	体内	带下注射	12—36	2	no	Boquest, et al. Biol Reprod, 2002
胎儿成纤维细胞	体外	带下注射	1	1	no	De Sousa, et al. Biol Reprod, 2002
胎儿成纤维细胞	体外	带下注射	12	1	yes	Lai, et al. Mol Reprod Dev, 2002
胎儿成纤维细胞	体外	带下注射	12—36	28	no	Walker, et al. Cloning Stem Cell, 2002
耳上皮细胞	体外	带下注射	18—22	4	yes	Park, et al. Biol Reprod, 2002
胎儿成纤维细胞	体外	带下注射	12—48	6	yes	Dai, et al. Nat Biotechnol, 2002
胎儿成纤维细胞	体外	带下注射	8—24	3	1yes; 2 no	Hyun, et al. Biol Reprod, 2003
皮肤成纤维细胞	体外	胞质内注入	20—24	4	no	Lee, et al. Biol Reprod. 2003
胎儿成纤维细胞	体外	带下注射	12—48	4	yes	Phelps, et al. Science, 2003

注: 成活体克隆猪 82 只, 其中转基因 27 只。

2 面临的问题及可能解决的办法

2.1 供核细胞及细胞周期的选择

目前, 体细胞核移植猪成功的报道大多数使用胎儿成纤维细胞。Lee 等^[11]认为供核细胞的类型对猪克隆胚胎的发育能力影响很大。他用胎儿成纤维细胞、成体成纤维细胞、颗粒细胞和输卵管上皮细胞分别作为供核细胞进行核移植, 结果表明胎儿成纤维细胞囊胚发育率最高。胚胎细胞与胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES 细胞) 核移植效率也明显高于体细胞核移植。可能是由于胚胎细胞与 ES 细胞基因组中与早期胚胎发育相关的必需基因已经激活, 因而容易发生发育程序的重编。分化程度越低的细胞越容易重编程, 重构胚发育潜能也就越高。ES 细胞系的建立可源源不断地提供供核细胞, 而且还是最理想的遗传操作材料。但至今猪 ES 细胞系还没有建立, 成体干细胞在机体组织中处在相对未分化的状态, 使用成体干细胞作为供核细胞可能会

提高克隆效率, 并且具有良好的应用前景。

2.2 卵母细胞的选择

相对体内成熟的卵母细胞来说, IVM 的卵母细胞来源丰富, 价格低廉, 因而已成为核移植研究的主流 (表 1)。但猪卵母细胞 IVM 还不是很完善, 核、质成熟不同步, 成熟培养时间长, 如何获得高质量的成熟卵母细胞也就成为人们亟待解决的问题。在克隆胚的发育能力上, 体内成熟的卵母细胞要好于 IVM 的卵母细胞, 能提高克隆猪的成功率^[1,2]。但 De Sousa 等^[6]认为, 猪体细胞核移植过程中体内成熟和 IVM 的卵母细胞作为胚胎受体在克隆胚胎的发育能力上没有差异。Lee 等^[11]研究结果也表明, 进行孤雌激活时, 猪体内成熟比 IVM 的卵母细胞囊胚发育率高, 而分别进行核移植时, 二者囊胚率无显著差异。

目前, 普遍认为来自成熟后猪卵母细胞更适合猪的体细胞克隆。Hyun 等^[12]研究了卵母细胞的来源对克隆胚胎发育能力的影响, 结果表明性成熟后

猪卵母细胞比性成熟前卵母细胞具有更强的减数分裂能力,囊胚率较高,并且囊胚内细胞数也多,移植受体后在体内发育能力也强。

2.3 核移植方法

去核是核移植的一个重要环节,去核是否成功直接影响到核移植的效率。目前,盲吸法在猪核移植去核时使用较多,尽管盲吸法辅助 Hoechst33342 染色法能提高去核的效率,但有的学者并不支持这种做法^[8]。猪卵母细胞纺锤体的位置就在第一极体的附近,作者使用盲吸法去核,经 Hoechst33342 染色确认,去核率达 85% (未发表的资料)。Spindle-view 系统辅助去核,能提高去核效率并且尽可能的减少胞质损失,但由于猪的卵母细胞含有较多的脂肪颗粒,在 Spindle-view 系统下看不到纺锤体。因而,探索其他切实可行的方法是很有必要的。Yin 等^[7]使用脱羧秋水仙碱 (Demecolcine) 作用于后末期到末期转换阶段体外成熟的卵母细胞成功地进行了非侵袭性的化学去核,得到 8 只成年心肌细胞克隆猪。他认为此法去核容易,胞质损失少,去核率高 (93%),囊胚率与其他方法相比无明显差异。无透明带核移植方法可以不使用昂贵的显微操作仪,容易操作,适合生产上运用。其基本方法为:将卵母细胞切成两半,把含有极体及核物质的一半丢弃,再将一个体细胞与两个半卵融合。这种方法产生的核移植囊胚质量不受透明带影响。但此法浪费了一半的卵母细胞,另外,将三种不同来源的线粒体置于一个细胞内,增加了线粒体异质体的发生率。最近, Sullivan 等^[13]采用一种新型的克隆方法,即用链球菌融血素 (SLO) 和细胞有丝分裂提取物处理供核细胞,使细胞膜变的可渗透性,细胞质及细胞核组分丢失,只剩下凝集的染色质,加入 CaCl_2 重建胞质膜,重建胞质膜的供核细胞与去核的卵母细胞融合组建重构胚,移植后得到 5 头健康的克隆牛,他们认为此法可明显提高体细胞克隆牛的存活率,并为进一步提高克隆效率提供了新的思路。

2.4 电融合和胞质注射对克隆效率的影响

目前,猪体细胞核移植成功的报道大多使用电融合的方法 (表 1)。Nagashima 等^[14]发现电融合法的核移植效率显著高于胞质注射法,电融合法正常的分裂率和囊胚发育率 (45.6%, 19.2%) 显著高于胞质注射法 (32.1%, 5.4%), 并且,使用电融合法重构胚移植受体后能妊娠到期,而胞质注射法却不能。电融合法和胞质注射法各有特点,胞质注射法无需电融合,省了一步核移植操作步骤,注核时并没有引

起卵母细胞的激活,保持高的 MPF 活性,并且核移植效率与供核细胞膜状态无关。但胞质注射操作技术难度相对较大。电融合法应用很广,效率相对较高,但电融合同时或多或少引起卵母细胞的激活,并且核移植的效率受供核细胞膜状态的影响。

2.5 激活方法

大部分体细胞克隆猪的成功报道都是使用电激活的方法^[1,4,5,6,12], Hyun 等^[12]认为单独使用电激活核移植效率高,化学激活如离子霉素和 6-DMAP 没有必要。然而, Betthauser^[3]使用离子霉素和 6-DMAP 组合激活囊胚率、囊胚细胞数及妊娠率均有改善。至于化学物质是否对胚胎发育有不良影响,还有待于进一步研究。尽管核移植过程中广泛采用了人工激活的方法,但是由于缺乏诸如受精这些自然的激活过程,受精卵的胞浆环境仍然被认为优于卵母细胞, Polejaeva 等^[2]应用二步法核移植体细胞克隆猪的成功,就是为了弥补这一缺陷。他首先将 M II 期的卵母细胞与供核细胞融合,然后将其形成的原核移入到去核后的体内受精原核期的胚胎。后者的目的是使体细胞来源的原核进入自然受精的原核阶段的胞浆。

2.6 重构胚 IVC 及妊娠维持

目前,猪胚胎 IVC 系统还很很成熟,不成熟的 IVC 体系是妨碍体外受精囊胚正常产仔的主要原因。早期胚胎培养过程中加入血清会导致与印记基因表达异常。核移植、体外受精与孤雌激活囊胚内细胞数目 (分别为 66, 66 和 49 个) 比体内发育囊胚 (200—300 个) 明显低的多,这可能也是核移植与体外受精胚胎妊娠率低的原因之一^[3]。至今,所有成功克隆猪的克隆胚在 IVC 的时间都不超过 76 h (见表 1)。在猪身上,可利用中间宿体,即将胚胎移植于输卵管中短暂培养发育到囊胚后再取出,可以克服这一缺陷。猪胚胎 IVC 系统的改进已成为人们亟待解决的问题。

猪的妊娠有一个特征就是猪至少需要几个质量很好的胚胎才能附植并保持妊娠。妊娠 11—12 d 个阶段对胚胎附植很重要,需要最少 4—5 个胎儿提供的信号才能维持母体妊娠。克隆胚的质量依照普通的形态学观察很难作出评估,即使克隆胚能产生很高的囊胚率,仍然很难妊娠到期。因此,移入大量的克隆胚是必需的。如果得不到大量数目的克隆胚胎用于移植,不妨采用以下 3 种方法。第一,克隆胚可与 30—40 枚发育同期的孤雌激活胚一同移入,这些孤雌激活胚由于基因组印记的缘故在后来的妊娠

过程中会退化,但却能提高母体识别信号确保妊娠^[6]。第二,在胚胎移植后12天,人为的注射外源激素,提高母体识别信号有利于胚胎的附植^[15]。第三,将克隆胚移入同期的自然受精的母体输卵管内^[15]。

2.7 转基因克隆与人类异种器官移植存在的问题

异种器官移植面临的主要障碍是猪细胞表面存在 α -1,3-半乳糖苷抗原决定簇。灵长类在生物进化过程中已失去 α -1,3-半乳糖苷转移酶活性,因此能产生这种物质的天然抗体,移植给人后就会发生HAR。利用核移植技术可敲除 α -1,3-半乳糖苷转移酶基因^[5,9]。但要彻底解决异种器官移植中的排斥反应,要求用于器官移植的猪不仅仅是 α -1,3-半乳糖苷转移酶缺陷,而且还要有抗凝蛋白和下调猪内皮细胞粘附分子(vascular cell adhesion molecular, VCAM),以克服迟发性异种排斥反应。还有猪异种动物器官移植中存在的公共卫生问题,如在异种动物器官移植时,随猪器官移植而将猪内源性逆转录病毒(porcine endogenous retrovirus, PERV)移植给人类的可能性,也是人们不可忽视的。

2.8 去分化和重编程

供核细胞不完全重编程是克隆动物发育异常的最可能的原因,也就是说来自体细胞的供体核不能完成像正常受精卵那样所完成的基因组次生性修饰。核重编程的过程就是使在体细胞中被关闭、而在正常胚胎发育中表达的基因重新被激活的过程。去分化过程伴随着基因水平的后生重编程(epigenetic reprogramming),包括与染色质相关的其他蛋白(如组蛋白、转录因子)的重构、基因组甲基化变化、组蛋白组装及核小体形成等不同形式。在该过程中出现的任何差错都会导致克隆胚胎或动物的不同畸形发育。体细胞克隆需要染色体结构的显著性重构。许多蛋白质从供核中丢失,其他一些蛋白质由卵母细胞中进入供体核中^[13]。核重编程涉及到基因组DNA甲基/去甲基化和组蛋白乙酰化。哺乳动物通过基因组甲基化来改变DNA与蛋白质间的作用,提供非编码序列(包括内含子、重复序列,以及一些蕴藏着的活性转座成分)和发育相关基因沉默的可遗传机制。核重编程需要打破这种基因沉默的状态,恢复基因活性。目前,对细胞核去分化和重编程分子机制还不是很清楚,对这些问题的深入研究有助于我们对克隆机理的认识,提高克隆的效率。

2.9 线粒体异质性问题

目前,猪细胞核移植大多使用细胞融合的方法,

因而就不可避免的将体细胞的线粒体带入重构胚中,这样重构胚中同时存在受体卵母细胞和供核细胞两种来源的线粒体。如果两种来源的线粒体都被复制,将导致线粒体的异质性,若其中一种来源的线粒体被选择性复制,则另外一种被选择性破坏,这样,克隆动物线粒体来源可能存在来源于供体细胞、受体卵母细胞或二者共存三种可能性。供核细胞核是如何来支持和协调供体或受体来源的线粒体?供体来源或受体来源的线粒体又是怎样重编程的?线粒体不完全重编程对核基因的表达有何影响?所有的这些问题还都不是很清楚,有待于进一步研究。

3 展望

猪体细胞核移植研究已经取得很大的进展,体细胞克隆技术与转基因技术的不断完善及完美结合将会把猪的器官移植给人类的梦想变为现实。然而,核移植效率还很低,需要不断完善核移植的操作程序;深入研究卵母细胞成熟、胚胎发育及核重编程的分子机理;另外,线粒体异质性问题也得引起我们的重视。相信在各国学者的共同努力下,猪体细胞核移植技术必将更加完善,更好地造福于人类。

参 考 文 献

- [1] Onishi A, Iwamoto M, Akita T et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289:1188—1190.
- [2] Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407:86—90.
- [3] Bettauser J, Fordberg E, Augenstein M et al. Production of cloned pigs from in vitro systems. *Nat Biotechnol*, 2000, 18:1055—1059.
- [4] Park K W, Chenong H T, Lai L et al. Production of nuclear transfer-derived swine that expressed green fluorescent protein. *Ani Biotech*, 2001, 12(2):13—181.
- [5] Lai L, Tao T, Machaty Z, et al. Production of α -1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295:1089—1092.
- [6] De Sousa P A, Bobrinsky J R, Zhu J et al. Somatic nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod*, 2002, 66:642—650.
- [7] Yin X J, Tani T, Yonemura I et al. Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod*, 2002, 67:442—446.
- [8] Lee J, Wu S C, Tian X C et al. Production of cloned pigs by whole-cell intracytoplasmic microinjection. *Biol Reprod*, 2003, 69:995—1001.
- [9] Phelps C J, Koike C, Vaught T D et al. Production of α -1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003, 299:1232—1235.
- [10] Kolber-Simonds D K, Lai L, Watt S R et al. Production of α -1,3-

- galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101(19):7335—7340.
- [11] Lee G, Hyun S, Kim H et al. Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology*, 2003, 59:1949—1957.
- [12] Hyun S, Lee G, Kim D et al. Production of nuclear transfer-derived piglets using porcine fetal fibroblasts transfected with the enhanced green fluorescent protein. *Biol Reprod*, 2003, 69:1060—1068.
- [13] Sullivan E J, Kasinathan S, Kasinathan P et al. Cloned calves from chromatin remodeled in vitro. *Biol Reprod*. 2004, 70: 146—153.
- [14] Nagashima H, Fujiimura T, Takahagi Y et al. Development of efficient strategies for the production of genetically modified pigs. *Theriogenology*, 2003, 59:95—106.
- [15] Lai L, Park K W, Cheong H T et al. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicines-treated fibroblasts as donor cells. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62:300—306.

RECENT PROGRESS OF SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER IN PIGS

Xu Xiaoming Dou Zhongying

(Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Shaanxi Branch of National Stem Cell Engineering and Technology, Yangling 712100)

Abstract Research in the field of somatic cell nuclear transfer (SCNT) and transgenic cloning in pigs has become a global hotspot, because porcine organs probably become the first source of donor organs for human xenotransplantation. Recently, great progress had been made in porcine SCNT. However, the efficiency of nuclear transfer remains very low (< 1%). It is necessary to improve the procedure of nuclear transfer and to further investigate some basic problems. Recent progress of SCNT in pigs and some existing problems are reviewed and analysed. The aim is to offer some beneficial illumination for researchers.

Key words nuclear transfer, cloning, transgene, pigs

·资料·信息·

美国国家科学基金会 2006 财年预算请求为 56 亿美元

美国国家科学基金会(NSF)主任小阿登·贝蒙特博士于 2005 年 2 月 7 日公布了向国会提交的 NSF 2006 财年预算,总计为 56 亿美元。与 2005 财年 54.7 亿美元的预算相比,2006 财年 NSF 的预算拟增长 2.4%。

2006 财年 NSF 的资助重点定位在解决国家迫切需求的同时,加强对各学科研究与教育活动的支持。具体包括以下 4 个方面:(1)加强对各学科研究活动的资助。与前几年的预算请求不同,2006 财年预算没有列出 NSF 将予以优先资助的几个综合性研究领域,而是强调对量大面广的以学科为基础的研究活动的支持。(2)支持世界级的研究设施以及具有广泛开放性的网络基础设施建设。2006 财年 NSF 用于资助重点研究设施的经费预算拟增长

44%。NSF 认为,网络基础设施建设将有助于研究方式的转型,以解决科学研究中面临的诸多挑战,在促进前沿领域更迅速发展的同时,创造出新的研究领域。(3)扩大科学和工程领域的劳动力队伍并促进青年科学家成长。2006 财年涉及 NSF 各科学部的教育活动资助经费约为 4 亿美元,由教育与人力资源部的人力资源处独立管理的资助经费拟超过 1.18 亿美元。(4)保持 NSF 的卓越管理水平。2006 财年 NSF 用于实现卓越的组织管理方面的预算请求为 3.36 亿美元,比上年增长约 16%。NSF 还提出明年增加 25 个全时职位的职位,从而有助于改进工作,提高效率。

(政策局 龚旭 供稿)