

## \* 专题评述 \*

## 哺乳动物异种克隆的研究进展\*

文端成 毕春明 陈大元\*\*

中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080

**摘要** 哺乳动物异种克隆是通过异种核移植和异种妊娠两个关键技术来实现的. 对哺乳动物异种克隆的原理, 存在的问题和可能的解决办法进行了阐述, 并对近年来本实验室以及国际上该领域中的研究进展作了介绍.

**关键词** 异种克隆 异种核移植 异种妊娠 哺乳动物

哺乳动物的体细胞克隆已在绵羊、小鼠、山羊、牛、猪、兔、猫等动物上获得成功, 这些都属于同种克隆, 即构建重构胚所用的供体细胞和受体卵母细胞都是来源于同一物种. 相对于同种克隆而言, 动物异种克隆是指构建重构胚所用的供体细胞和受体卵母细胞不是来源于同一物种. 哺乳动物异种克隆包含有异种核移植和异种妊娠两个方面. 异种克隆突破了物种之间的“生殖隔离”限制, 涉及物种之间在分子、细胞和生理水平上的相互作用, 因此, 异种克隆可作为研究核质关系、基因表达调控、细胞分化和物种进化等的一个可能的手段, 对物种的改良、濒危动物的保护具有十分积极的意义, 同时, 动物异种克隆技术也可能是再现某些已灭绝动物的惟一希望.

## 1 哺乳动物异种克隆的原理和研究进展

动物异种克隆在两个方面有别于同种克隆, 一是异种核移植(interspecies nuclear transfer), 即把一种动物的细胞核移植到另一种动物的去核卵母细胞中, 构建成异种重构胚, 异种重构胚中的细胞核与细胞质分别来源于两个不同的物种, 因此, 它们是一种核质杂合体(nucleocytoplasmic hybrids), 与传统意义上的杂种(hybrids)不同, 异种克隆动物主要表现为供核物种的遗传性状. 二是异种妊娠(interspecies pregnancy). 异种妊娠是哺乳动物异种克隆中的关键技术, 在体外构建的重构胚需要放回动

物的子宫中, 才能完成全程发育. 由于重构胚的细胞核和细胞质是来源于两个不同的物种, 因此, 不管选用何物种作为异种重构胚的寄母, 异种重构胚对于寄母来说都具有一定程度的异质性, 也即重构胚的细胞核和细胞质的来源不可能同时与寄母的完全一致.

### 1.1 哺乳动物异种核移植

1938年, Spemann首次提出了细胞核移植的设想, 但直到14年后, 细胞核移植才在两栖类中实现. 异种核移植的研究较早见于1973年, Brun尝试了将多种哺乳动物的体细胞核移植到爪蟾(*Xenopus*)卵内<sup>[1]</sup>. 1977年De Roper等<sup>[2]</sup>将Hela细胞核移入爪蟾卵内, 结果发现Hela细胞核在爪蟾卵内能够发生染色体扩展和DNA合成, 暗示爪蟾卵母细胞内存在某些因子能够激活哺乳动物的体细胞核. 我国童第周教授是鱼类细胞核移植研究的先驱者, 在国际上, 也是最先在鱼类进行异种核移植并获得异种克隆鱼的科学家. 他利用自制的显微注射器成功地在金鱼的两个亚科(*Carassius auratus*和*Rhodeus sinensis*)上进行细胞核移植<sup>[3]</sup>. 后来, 童教授及其后继者在不同科和目之间进行异种核移植, 如将金鱼核(鲤科, 鲤形目)移到泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)去核卵母细胞中(鳅科, 鲤形目), 也获得了较高的囊胚发育率<sup>[4]</sup>. 这些研究说明, 低等动物卵母细胞中存在的胞质因子可以使已

2003-03-21 收稿, 2003-05-07 收修改稿

\* 科技部攀登专项项目(95-专-08)和中国科学院知识创新工程重大项目(KSCXI-05-01)资助

\*\* 联系人, E-mail: chendy@panda.joz.ac.cn

分化了的细胞核去分化和重编程, 并且, 这些因子不存在物种特异性.

哺乳动物体细胞克隆的成功充分说明, 哺乳动物的卵母细胞中也存在能使体细胞核去分化和重编程的胞质因子, 这些胞质因子是否也没有物种特异性呢? McGrath 和 Solter<sup>[5]</sup>在啮齿类中进行种间原核互换, 发现异种重构胚在体外能进行分裂. 1992年, Wolfe 等<sup>[6]</sup>将牛(*Bos taurus*)的16~32细胞期的卵裂球作为供核细胞, 分别移植到水牛(*Bubalus bubalis*)、羊(*Ovis aries*)和田鼠(*Mesocricetus auratus*)的去核卵母细胞中, 结果发现牛-羊和牛-水牛之间的异种重构胚, 体外培养可以发育到囊胚, 而牛-田鼠重构胚则不能分裂. 1993年, 梅祺等<sup>[7]</sup>用小鼠(*Mus musculus*)8-细胞期胚胎的卵裂球移植到去核兔(*Oryctolagus cuniculus*)卵母细胞中, 在重构胚中出现了细胞核膨大和染色体早熟凝聚现象, 有5.4%的鼠-兔异种重构胚在体外发育到囊胚, 并证明囊胚的染色体是来源于小鼠. 这些早期研究结果显示, 某些哺乳动物的卵母细胞具有接受异种细胞核的能力, 并且能使异种细胞核去分化, 启动异种重构胚的早期胚胎发育. 1999年, 陈大元教授利用兔卵母细胞作为核受体, 得到了异种克隆的大熊猫胚胎. 他们将大熊猫(*Ailuropoda Melanoleuca*)的子宫上皮细胞、骨骼肌细胞和乳腺上皮细胞分别移入去核的兔卵母细胞中, 得到了9.9%, 6.8%和11.7%的囊胚率, 经核型、线粒体和核DNA分析, 证实了重构胚的遗传物质是来源于大熊猫体细胞<sup>[8]</sup>. 同年, Dominko 等<sup>[9]</sup>分别将绵羊、猪(*Sus scrofa*)、猴(*Macaca fascicularis*)、和大鼠(*Rattus rattus*)等动物的体细胞核移植到去核的牛卵母细胞中, 异种重构胚在体外培养后也能发育到囊胚期. 他们进一步将绵羊-牛、猪-牛和大鼠-牛异种重构胚分别移植到绵羊、猪和大鼠子宫中, 但只有两只受体羊出现了妊娠迹象, 在胚胎移植32d后没有发现胎儿心动, 解剖子宫角有明显的肉团块, 但未有胎盘等膜性组织和胎儿残迹. White 等<sup>[10]</sup>将盘羊(*Ovis ammon*)的体细胞核移植到绵羊的去核卵母细胞中, 异种重构胚有1.56%可发育到囊胚, 将28枚异种重构胚移植到6只受体绵羊的子宫中, 49d后用超声波检测, 发现其中一只受体妊娠, 但在59d后妊娠被终止. 尽管这些实验未得到异种克隆动物, 但研究结果已经表明, 某些哺乳动物(如牛、羊和兔)的卵母细胞具有接受异种体细胞核的能力, 异

种体细胞核在这些动物的卵母细胞中可以发生去分化和重编程.

2001年1月, Advanced Cell Technology(ACT)公司宣布<sup>[11]</sup>, 一头奶牛顺利产下一头珍稀的亚洲野牛(*Bos gaurus*), 这头名叫诺亚(Noah)的小野牛是世界上第一头采用异种克隆技术克隆的哺乳动物. 野牛的染色体数目是58条, 而奶牛(*Bos taurus*)则是54条, 分属两个不同的物种, 诺亚是用野牛的上皮成纤维细胞作为供核细胞, 移植到去核的奶牛卵母细胞中获得异种重构胚, 并在奶牛的子宫内完成妊娠得到的. 虽然, 诺亚在出生后的2d就死于小牛痢疾病, 但这一结果表明, 野牛的体细胞核在异种的奶牛卵母细胞中重新程序化, 并能支持异种重构胚完成全程发育. 就在诺亚出生后不久, 异种克隆盘羊也取得了成功. Loi 等<sup>[12]</sup>将欧洲盘羊(*Ovis orientalis musimon*)的颗粒细胞核移植到绵羊的去核卵母细胞中, 共获得23枚重构胚, 其中有7枚发育到囊胚阶段, 将7枚囊胚移入4只受体绵羊子宫中, 有2只妊娠, 其中1只在40~50d期间流产, 另一只受体正常妊娠最后产下1只异种克隆盘羊. 异种克隆野牛和盘羊的成功证明了哺乳动物的异种体细胞克隆是可行的, 它们是继“多莉”羊之后, 动物克隆技术上的又一重要进展.

在 Dominko 等<sup>[9]</sup>发现去核的牛卵母细胞具有接收多个物种体细胞核的能力后, 以牛卵母细胞为受体的异种克隆已取得了一些重要结果. Lanza 等<sup>[13]</sup>将野牛皮肤成纤维细胞移入去核的牛卵母细胞中, 得到异种克隆野牛胚胎, 体外培养异种克隆胚胎有12%的囊胚率, 将囊胚移植到受体母牛子宫中, 有18%可以发育到胎儿阶段, 在5头妊娠的母牛中, 3头在46~54d时人工中断妊娠用于其他研究, 1头妊娠到201d流产, 流产胎儿的体重已达10.7kg, 其核型和表型都与供体野牛一致, 另一头受体母牛妊娠到期, 并产下1头发育正常的克隆野牛. Kitiyanant 等<sup>[14]</sup>以水牛的胎儿成纤维细胞作核供体, 分别移植到去核的黄牛或水牛的卵母细胞中, 体外培养发现, 水牛-水牛和水牛-黄牛的重构胚无论是分裂率, 还是囊胚率都无显著差异. 2001年, Meirelles 等<sup>[15]</sup>将瘤牛(*Bos indicus*)的早期胚胎卵裂球移植到黄牛(*Bos taurus*)的去核卵母细胞内, 获得异种克隆囊胚, 囊胚移植到5头受体黄牛中, 其中两头妊娠, 一头产下异种克隆瘤牛. 同年, 韩国的 Hwang 等<sup>[16]</sup>用成年韩国虎(*Panthera tigris altaica*)

的耳缘皮肤成纤维细胞与牛的去核卵母细胞构建重构胚,并将重构胚移植到1只虎和3只狮子受体中,但均未发现妊娠。

我们实验室将大熊猫成纤维细胞移植到去核的兔卵母细胞中,构建大熊猫异种重构胚,再将发育到2~4细胞期的大熊猫异种重构胚移植到经同期处理的21只家猫(*Felis catus*)受体中,19只受体先后返情,胚胎移植21d后,2只死于肺炎,剖检发现其中1只怀孕6个胎儿,微卫星分析表明2个胎儿来源于大熊猫异种重构胚<sup>[17]</sup>。我们将家猫的成纤维细胞移植到去核的兔卵母细胞内,得到猫-兔异种克隆胚,体外培养获得14.5%的囊胚率,比较猫-兔异种克隆胚和猫同种克隆胚在体外的发育能力和发育时程,两种胚胎在发育能力上无显著差异,猫-兔异种克隆胚的前3次分裂时间是与兔同种克隆胚的分裂时间相似,而不同于猫同种克隆胚,但到达囊胚期的时间却是与猫克隆胚相似,明显不同于兔同种克隆胚,说明异种克隆胚的早期发育主要是由胞质控制,到达囊胚后,胚胎的发育主要由核控制(待发表资料)。将猕猴的体细胞移入去核的兔卵母细胞中,猴-兔重构胚体外培养也能发育到囊胚,分别检测猴和兔的线粒体发现,在囊胚前的各个阶段,猴和兔的线粒体是共存的<sup>1)</sup>。

## 1.2 哺乳动物的异种妊娠

哺乳动物的异种妊娠通俗来讲是指在物种之间进行“借腹怀胎”,即一种动物的胚胎在另一种动物的子宫内进行妊娠。在自然界中,动物存在多个层次上的生殖隔离机制,如在遗传上,两个不同物种的卵子和精子受精所产生的胚胎,往往由于染色体不能正常分配、基因表达调控异常而不能发育;在细胞水平上,异种卵子和精子往往不能互相识别,无法完成受精过程;在生理上,母体对异种胚胎存在免疫排斥现象。但物种之间并不存在严格的生殖隔离,在某些特定的情况下,异种妊娠也能发生,如种间杂交动物,驴和马杂交所得的骡子,狮和虎杂交的狮虎兽,这些动物的妊娠过程是属于异种妊娠。

异种妊娠可分为3类。第一类是两物种杂交后代的异种妊娠;第二类是物种间嵌合体的异种妊娠;第三类是通过胚胎移植进行的完全异种妊娠。

对于第一类的异种妊娠,在自然界中可以以极低的频率发生,但第二类和第三类异种妊娠只有在人工干预下才可能出现。通过胚胎移植技术,可以对异种妊娠进行直接的研究,现已建立了3类主要的异种妊娠模型:啮齿类模型,驴和马模型以及绵羊和山羊模型<sup>[18]</sup>。通过对这些异种妊娠模型的研究发现,异种妊娠失败有两个主要原因:(1)胚胎的滋养层细胞与母体子宫内膜之间不能相互识别,胚胎不能附植在子宫内膜上,也即胚胎不能着床<sup>[19]</sup>;(2)胚胎着床后,母体的免疫系统对胎儿进行排斥,免疫排斥阻碍了胎盘的形成功<sup>[18,20]</sup>。

妊娠的建立是以胚胎在子宫中附植和着床为标志。胚胎的附植和着床是一个复杂的过程,这一过程通常是发生在囊胚期后,控制胚胎着床的因素在物种之间存在一定的差异。在大多数动物中,胚胎发育到囊胚期后,具备了附植和侵入的能力,这时,母体子宫内膜也发生一些相应的变化,使其处于一种接受状态,允许胚胎的附植和侵入,母体子宫允许胚胎着床的这一时期称“着床窗口”。“着床窗口”在一些哺乳动物中非常短暂,只有在“窗口”期内完成着床,才能建立妊娠。对那些延缓着床动物来说,胚胎是否着床,主要取决于母体的状态,这些动物也有一个“着床窗口”期,但胚胎可以在体内耐心等待这一时期的到达而不发生退化凋亡,这一等待时间因物种种类而异,可以从几天到几个月之长<sup>[21]</sup>。胚胎着床后,母胎之间建立一个生物结构上的相互联系,如胎盘是哺乳动物成功妊娠的关键,滋养层细胞在建立母胎联系的过程中起着重要作用<sup>[22,23]</sup>。由滋养层细胞所形成的胎盘具有分泌激素和生长因子的功能,同时,胎盘也是母胎之间的一个重要的免疫屏障器官,使母体不对胎儿发生免疫排斥反应<sup>[24,25]</sup>。

对嵌合体的研究发现,异种妊娠能否建立与滋养层细胞的类型直接相关。当滋养层细胞与母体是同一物种时,不管内细胞团细胞是来自何物种,异种妊娠往往能够建立;反之,如果滋养层细胞与母体不是同一物种,即使内细胞团细胞与母体是同一物种,也无法建立异种妊娠<sup>[22,26,27]</sup>。在啮齿类模型中,将*Mus caroli*的内细胞团注入去除内细胞团的小鼠囊胚腔中,再把嵌合体胚胎移植到小鼠子宫中妊娠,可以得到存活的*Mus caroli*幼仔。如将*Mus*

1) Yang C X, et al. *In vitro* development and mitochondrial fate of macaca-rabbit cloned embryos. (in press)

caroli 胚胎直接移植到小鼠子宫内, 则不能得到成活的幼仔<sup>[22, 26]</sup>. 影响异种妊娠建立的因素有许多, 如物种之间的亲缘关系、妊娠期长短、动物的体温差异、子宫结构等因素. 亲缘关系也许是影响最大的一个因素, 越近的两个物种, 异种妊娠建立的可能性越大, 如在猫科动物中, 就有人用家猫作为受体, 成功地繁殖了印度沙漠猫 (*Felis sylvestris ornate*)<sup>[28]</sup>; 异种克隆野牛和盘羊的成功, 也许与供体和受体之间的亲缘关系较近, 较容易建立异种妊娠有关.

虽然, 异种妊娠不太可能在任一种动物上建立, 但如果充分考虑受体和供体之间的亲缘关系, 生殖生理、解剖结构上的差异, 再对胚胎进行适当的改造, 建立异种妊娠是完全可能的.

## 2 异种克隆存在的问题和可能的解决方法

动物同种克隆主要解决细胞核的去分化和重编程问题, 异种克隆则在同种克隆的基础上, 还要解决核质相容性问题和异种妊娠问题.

### 2.1 核质相容性问题

核质相容性是指细胞核和细胞质在组成和结构上是否能够兼容并相互支持, 功能上是否能够协调, 核质之间的各种信号通道是否能正确建立. 异种克隆的核质相容性问题主要包括两个方面: (1) 卵母细胞中的胞质因子是否能够支持异种细胞核去分化和重编程; (2) 线粒体和细胞核在功能和结构上是否能够相互支持.

**2.1.1 核质相容性与核受体的选择** 早期胚胎几乎没有 RNA 转录活性, 这时胚胎发育主要是由卵母细胞中贮存的母源性 RNA 和蛋白质控制, 只有在一定的时期后, 这一时期通常是物种特异性的, 胚胎中的核基因才开始转录, 重新转录的 RNA 和合成的蛋白质将逐渐取代母源性的 RNA 和蛋白质, 这个取代过程称“母胚转换”(maternal to embryonic transition, MET). 然后, 细胞核从时间和空间上完全控制着胚胎的发育, 并由此形成各种不同的细胞分化类型. 当将体细胞核移植到去核的卵母细胞中后, 细胞核首先去除分化, 也即关闭所有转录的基因, 然后进行重编程<sup>[29, 30]</sup>, 去除分化和重编程是由卵母细胞中的母源性 RNA 和蛋白质因子控制, 因此, 核移植重构胚和正常胚胎一样, 其发育过程中也存在 MET<sup>[31]</sup>. 能否正确地进行 MET 是影响异

种重构胚发育的重要因素, 只有在母源性 RNA 和蛋白质消耗完之前, 细胞核能正确地及时启动某些基因转录, 合成相应的蛋白质和酶, 胚胎发育才能继续进行下去, 否则, 胚胎发育将停滞. 不同物种的卵母细胞对异种体细胞核的接受能力具有差异. 以大鼠和小鼠的卵母细胞为核受体进行异种核移植研究发现, 大鼠体细胞核移入去核的小鼠卵母细胞中, 重构胚无论是在体内还是在体外培养, 其发育都阻滞在 1-细胞或 2-细胞期, 小鼠细胞核移入去核的大鼠卵母细胞内, 重构胚也只能发育到 5~8 细胞期<sup>[32]</sup>; 而用牛、羊、兔卵母细胞进行异种核移植, 异种重构胚不管是什么物种的体细胞, 至少都有能发育到囊胚<sup>[8~10, 12, 13, 17]</sup>. 牛的 MET 是发生在 8-细胞期<sup>[33]</sup>, 羊和兔都是发生在 8~16-细胞期<sup>[34, 35]</sup>, 而小鼠则是发生在 1, 2-细胞期<sup>[36]</sup>. 因此, 我们推断卵母细胞对异种体细胞核的接受能力可能是与 MET 发生的时间有关.

核质相容性涉及到胞质中的众多因子与细胞核的相互作用, 不同物种胞质中存在的胞质因子也可能存在一定的差异, 对这些胞质因子是否具有物种特异性, 是哪些因子参与了细胞核的去分化和重编程过程, 哪些因子起着关键作用, 目前还都不清楚. 对这些问题的进一步研究, 将有助于我们对异种克隆机理的认识, 提高异种克隆的成功率.

**2.1.2 异种克隆中的线粒体命运** 线粒体命运是异种核移植中最令人关注的问题之一. 线粒体是细胞的“动力工厂”, 它为细胞的一切生命活动提供能量, 同时也是动物细胞中的惟一核外遗传物质. 哺乳动物的线粒体中含有一个 DNA 分子, 共编码 37 个基因, 包括 13 条多肽、22 个 tRNA 和 2 个 rRNA, 这些基因只是线粒体自身复制所需要基因的一小部分, 大部分基因是在核 DNA 中<sup>[37, 38]</sup>. 在核移植过程中, 如果采用细胞融合的方法则不可避免地要将体细胞中的线粒体带入到重构胚中, 因此, 重构胚中同时存在受体和供体两种来源的线粒体. 一个体细胞中大约有几千个线粒体, 一个卵母细胞中则有大约十万个线粒体<sup>[39]</sup>. 在正常胚胎中, 来源于卵母细胞的线粒体得到增殖, 而来源于精子的线粒体经一种尚未完全清楚的机制被消除掉. 在异种克隆中, 来源于供体和受体的两种线粒体是如何变化的呢? 已有的研究发现, 随着胚胎的发育, 异种重构胚的线粒体存在 3 种不同的变化模式: (1) 供体细胞的线粒体随着胚胎的发育逐渐消失,

受体卵母细胞中的线粒体不断增殖,最后从数量上占绝对优势,供体细胞中的线粒体则在克隆个体中完全消失;(2)供体细胞的线粒体随着胚胎的发育不断增殖,而受体卵母细胞的线粒体则逐渐消失,最后供体线粒体完全取代受体线粒体;(3)供体和受体的线粒体两者始终共存。

两种来源的线粒体如果没有选择压力,在囊胚期后线粒体的数量都将按几何级数增加,由于来源于体细胞中的线粒体比卵母细胞中的线粒体在数量上至少相差10倍,通过多次增殖后,卵母细胞来源的线粒体在数量上将占绝对优势,体细胞来源的线粒体逐渐被稀释,最后,供体来源的线粒体在个体中完全消失。Lanza等<sup>[13]</sup>发现,用奶牛的卵母细胞克隆濒危的野牛,在所获得的3个克隆胎儿中,有11种组织中的线粒体是来源于受体奶牛,而没有来源于野牛的线粒体。Loi等<sup>[12]</sup>用异种克隆方法克隆了欧洲盘羊,在克隆盘羊中,线粒体也完全来源于受体卵母细胞,盘羊的线粒体已检测不出。

如果异种重构胚中的细胞核不能支持卵母细胞来源的线粒体进行增殖,线粒体的变化将出现第二种模式。在异种克隆胚胎中,如果细胞核不能支持卵母细胞来源的线粒体进行分裂,这样,重构胚将选择性地增殖供体来源的线粒体,而受体来源的线粒体,尽管在数量上首先占有优势,因不能增殖而逐渐被淘汰。我们实验室利用大熊猫体细胞作为供体,以兔卵母细胞作为受体,克隆出的大熊猫胚胎经检测线粒体发现,在囊胚前各个阶段,大熊猫和兔的线粒体共存,但在着床后的大熊猫胚胎中,兔的线粒体已经消失而只能检测到大熊猫的线粒体<sup>[17]</sup>。

在异种重构胚中,如果细胞核对供体来源和受体来源的线粒体的增殖都能够支持,但对供体来源的线粒体存在某种优先增殖的机制,那么,在克隆动物中,两种来源的线粒体将出现共存的局面,也即第三种变化模式。Steinborn等<sup>[40]</sup>报道用瘤牛或奶牛的卵母细胞克隆牛,在11头克隆牛中,4头是供体和受体线粒体共存的。最近,Takeda等<sup>[41]</sup>用单链构象多态性PCR(PCR-SSCP)对克隆牛中的线粒体进行检测发现,在9头克隆牛中,有3头是供体和受体线粒体共存,供体的线粒体所占比例从6%~40%不等,他们认为,这种高比例的供体线粒体的存在,是由于细胞核对供体线粒体优先增殖的结果。Hiendleder等<sup>[42]</sup>也发现,在克隆牛中普遍存在

供体和受体线粒体共存的现象,不过,他们认为,克隆动物中的线粒体共存现象主要还是因线粒体的中性分离机制所致。

## 2.2 异种妊娠的可能技术

异种妊娠是哺乳动物异种克隆必然遇到的问题,也是限制异种克隆能否成功的一个关键因素。目前,对异种妊娠技术的研究非常有限,主要集中在异种妊娠机理的探讨上。根据已有的一些研究结果,我们认为,在充分考虑克隆动物与寄母之间的亲缘关系和生殖生理差异的基础上,还可以采用以下几种技术来帮助实现异种妊娠:

(1)同种胚胎帮助异种胚胎妊娠的方法。将异种克隆胚胎与寄母同种胚胎一起移植到寄母子宫中,通过同种胚胎在子宫中的妊娠来带动异种胚胎的妊娠,简称同种诱导异种妊娠。我们将处于2~4细胞期的大熊猫-兔异种克隆胚胎和猫-兔异种克隆胚胎一起移植到同步处理的家猫输卵管中,在移植21d后,有一只受体猫因故死亡,解剖后发现已妊娠,双侧子宫角共有6个明显的胎儿,经微卫星DNA检测,确认其中2个是大熊猫胎儿<sup>[17]</sup>。大熊猫是延缓着床型动物,胚胎何时着床将取决于母体的状态,暗示大熊猫胚胎在着床过程中是被动的,即不会发出信号给母体要求着床,而家猫则是非延缓着床型的多胎动物,胚胎和母体着床前可能存在某种信号交流。在非延缓着床型动物中,胚胎和母体同步化是胚胎移植成功的关键。我们推测,大熊猫胚胎之所以能够在家猫子宫中着床,是由于家猫的胚胎首先发出了信号,使母体子宫处于接受胚胎着床的状态,这一状态的出现,也诱导了大熊猫胚胎及时启动着床程序,使其没有错过“着床窗口”。

(2)内细胞团置换法。滋养层细胞对建立妊娠起着关键作用<sup>[25]</sup>,利用显微操作方法将囊胚中的内细胞团切除,然后,将另一物种的内细胞团注入到无内细胞团的囊胚腔中,组成一个异种的嵌合体囊胚,把这种囊胚移植到与滋养层细胞同一物种的动物子宫内,由于胚胎的滋养层细胞与寄母是同一物种,因此,胚胎着床、胎盘形成都能正常进行,胎盘形成后,妊娠也就建立起来。用去除内细胞团的小鼠囊胚作为载体,将*M. caroli*的内细胞团注入无内细胞团的小鼠囊胚腔中,构成嵌合体胚胎,并移植到小鼠的子宫内,可以建立妊娠,并能生下正常的*M. caroli*幼仔<sup>[23]</sup>。内细胞团置换法是建立异

种妊娠最具可能性的一种方法。

(3) 二倍体/四倍体 ( $2n/4n$ ) 嵌合体方法。 $2n/4n$  嵌合体是指用四倍体 ( $4n$ ) 胚胎与二倍体胚胎 ( $2n$ ) 或胚胎干细胞 (ES 细胞) 进行聚合, 形成由二倍体和四倍体细胞组成的嵌合体。 $2n/4n$  嵌合体胚胎在发育过程中, 两种类型的细胞 (二倍体和四倍体) 表现出非随机的分布特点,  $4n$  来源的细胞通常分布在胚外组织 (extraembryonic tissue), 如滋养层、卵黄囊膜、尿囊膜和胎盘等,  $4n$  来源的细胞几乎不参与胎儿的形成<sup>[43~45]</sup>。用具青紫色的 129/Sv 小鼠的内细胞团细胞或胚胎干细胞与白化的小鼠四倍体胚胎嵌合, 这种  $2n/4n$  嵌合体胚胎移植到白化的小鼠子宫内妊娠, 所生的幼鼠均来源于内细胞团细胞或胚胎干细胞, 只有个别个体中能检测到四倍体的细胞<sup>[43,44]</sup>。利用  $2n/4n$  嵌合体胚胎发育的这些特点, 可以构建一种异种的  $2n/4n$  嵌合体, 用与寄母相同物种的胚胎制成四倍体胚胎, 与正常的二倍体胚胎或胚胎干细胞嵌合, 形成异种  $2n/4n$  嵌合体, 这种嵌合体胚胎移植到寄母子宫中妊娠, 在胚胎发育过程中, 与寄母同属一个物种的四倍体细胞将形成胎盘, 二倍体细胞形成胎儿。 $2n/4n$  嵌合体方法已在小鼠的克隆和基因缺陷动物模型的制作上得到广泛应用, 但能否应用到其他动物上还需要进一步的研究。

### 3 展望

目前, 哺乳动物异种克隆还主要处于探索阶段, 技术本身还远未成熟, 尤其是异种克隆的机理, 如异种细胞核如何去分化和重编程, 异种核质间如何互作, 异种妊娠如何建立, 异种妊娠对克隆动物有何影响等, 都还不完全了解。对异种克隆不论是机理的探索, 还是技术的完善, 很有必要作深入的研究。丰富和完善动物异种克隆的理论和技術, 解决动物异种克隆中的艰深复杂问题, 必然有助于推动发育学、遗传学、动物资源保护和利用、医药等诸多领域的研究和应用。

### 参 考 文 献

- Brun R. Mammalian cells in *Xenopus* eggs. *Nature*, 1973, 243: 26
- De Roeper A. Chromatin dispersal and DNA synthesis in G1 and G2 HeLa cell nuclei injected into *Xenopus* eggs. *Nature*, 1977, 265: 469
- 董第周, 等. 细胞核的移植. *动物学报*, 1963, 15 (1): 151
- 董第周, 等. 鱼类不同亚科间的细胞核移植. *动物学报*, 1973, 19: 201
- McGrath J D, et al. Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development *in vitro*. *Science*, 1984, 226: 1317
- Wolfe B A, et al. Methods in bovine nuclear transfer. *Theriogenology*, 1992, 37: 5
- 梅 祺, 等. 鼠兔核质杂交胚胎早期发育的研究. *实验生物学报*, 1993, 26: 389
- 陈大元, 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. *中国科学, C辑*, 1999, 29: 324
- Dominko T, et al. Bovine oocyte cytoplasm support development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol Reprod*, 1999, 60: 1496
- White K L, et al. Establishment of pregnancy after the transfer embryos produced from the fusion of Argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning*, 2000, 1: 47
- Lanza R P, et al. Cloning Noah's ark. *Sci Am*, 2000, 283: 84
- Loi P, et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 962
- Lanza R P, et al. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, 2000, 2: 79
- Kitiyant Y, et al. Somatic cell cloning in Buffalo (*Bubalus bubalis*): Effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells*, 2001, 3: 97
- Meirelles F V, et al. Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. *Genetics*, 1997, 145: 445
- Hwang W, et al. Interspecies somatic cell nuclear transfer for the production of endangered Korean tiger (*panthera tigris altaica*). *Theriogenology*, 2001, 55: 271
- Chen D Y, et al. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol Reprod*, 2002, 67: 637
- Anderson GB. Interspecific pregnancy: Barriers and prospects. *Biol Reprod*, 1988, 38: 1
- Tachi S, et al. Ultrastructural studies on maternal-embryonic cell interactions during experimentally induced implantation of rat blastocysts to the endometrium of the mouse. *Dev Biol*, 1979, 68: 203
- Oppenheim S M, et al. Evidence against humoral immune attack as the cause of sheep-goat interspecies and hybrid pregnancy failure in the doe. *Theriogenology*, 2001, 55: 1567
- Mead R A. Embryonic diapause in vertebrates. *J Exp Zool*, 1993, 266: 629
- Rossant J, et al. Interspecies hybrids and chimeras in mice. *J Exp Zool*, 1983, 228: 223
- Surani M A H, et al. Experimental reconstruction of eggs and embryos: An analysis of mammalian development. *Biol Reprod*, 1987, 36: 1
- Crepeau M A, et al. Morphological demonstration of the failure of *Mus caroli* trophoblast in the *Mus musculus* uterus. *J Reprod Fert*,

- 1989, 86: 277
- 25 Hunziker R D, et al. Placental immunoregulation. *CRC Rev Immunol*, 1987, 6: 245
- 26 Rossant J, et al. Importance of trophoblast genotype for survival of interspecific murine chimeras. *J Embryol Exp Morph*, 1982, 69: 141
- 27 Polzin V J, et al. Production of sheep-goat chimeras by inner cell mass transplantation. *J Anim Sci*, 1987, 65: 325
- 28 Pope, C E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*, 2000 53: 163
- 29 Howlett S K, et al. Nuclear cytoplasmic interactions following nuclear transplantation in mouse embryos. *Development*, 1987, 101: 915
- 30 Kanka J, et al. Nucleolar ultrastructure in bovine nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev*, 1999, 52: 253
- 31 Campbell K H S. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning*, 1999, 1: 3
- 32 Waksmundzka M. Development of rat × mouse hybrid embryos produced by microsurgery. *J Exp Zool*, 1994, 269: 551
- 33 Camous S, et al. Autoradiographic detection of the earliest stage of 3H-uridine incorporation into the cow embryo. *Biol Cell*, 1986, 58: 195
- 34 Crosby I M, et al. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fertil*, 1988, 82: 769
- 35 Henrion G, et al. Identification of maternal transcripts that progressively disappear during the cleavage period of rabbit embryos. *Mol Reprod Dev*, 1997, 47: 353
- 36 Telford N A, et al. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol Reprod Dev*, 1990, 26: 90
- 37 Hiendleder S, et al. Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Mol Reprod Dev*, 1999, 54: 24
- 38 Takeda K, et al. Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J Reprod Fert*, 1999, 116: 253
- 39 Michaels G, et al. Mitochondrial DNA copy number in bovine oocytes and somatic cells. *Dev Biol*, 1982, 94: 246
- 40 Steinborn R, et al. Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones. *Genetics*, 2002, 62: 823
- 41 Takeda K, et al. Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Mol Reprod Dev*, 2003, 64: 429
- 42 Hiendleder S, et al. Heteroplasmy in bovine fetuses produced by intra- and inter-subspecific somatic cell nuclear transfer: neutral segregation of nuclear donor mitochondrial DNA in various tissues and evidence for recipient cow mitochondria in fetal blood. *Biol Reprod*, 2003, 68: 159
- 43 Nagy A, et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in mouse. *Development*, 1990, 110: 815
- 44 Nagy A, et al. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8424
- 45 Tarkowski A K, et al. Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 1977, 41: 47