

# 哺乳动物核移植中线粒体命运\*

杨彩侠 文端成 张可莹 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** 线粒体是哺乳动物细胞中一种重要的产能、供能细胞器, 与生长、发育、衰老和凋亡等多种细胞事件以及多种疾病有关。哺乳动物核移植中, 供体细胞和受体卵胞质两种来源的线粒体在重构胚胎发育进程中的变化一直是科学家们研究的热点。对哺乳动物同种胚胎细胞核移植、同种体细胞核移植、异种核移植研究中线粒体的变化进行了综述。

**关键词** 哺乳动物, 核移植, 线粒体命运

**学科分类号** Q26

1997年, 英国罗斯林研究所第一头体细胞克隆羊“Dolly”的诞生是克隆研究中的一个里程碑, 它表明成年动物的体细胞在去核卵胞质中可以核重编程并且重获发育全能性<sup>[1]</sup>。此后, 小鼠<sup>[2]</sup>、牛<sup>[3]</sup>、山羊<sup>[4]</sup>、猪<sup>[5]</sup>、家兔<sup>[6]</sup>和猫<sup>[7]</sup>等多种体细胞克隆哺乳动物纷纷问世, 另外, 异种克隆野牛<sup>[8]</sup>和盘羊<sup>[9]</sup>也获得成功。哺乳动物核移植中, 无论采用电融合法还是胞质内注射法重构卵, 都不可避免地会把部分供体线粒体带入受体卵胞质, 即重构卵胞质中既含有供体又含有受体来源的线粒体。两种来源的线粒体在重构胚的各阶段发育中到底会有什么样的变化一直是科学家们研究的热点。我们实验室对猕猴-兔异种克隆胚胎(未发表资料)、大熊猫-兔异种克隆胚胎及其在家猫子宫中着床后的胎儿<sup>[10]</sup>线粒体命运进行了检测, 本文结合我们的研究工作, 对哺乳动物同种胚胎细胞核移植、同种体细胞核移植、异种核移植研究中线粒体的变化进行了综述。

## 1 线粒体生物学及其与核移植的关系

### 1.1 线粒体生物学

线粒体是哺乳动物细胞中最为重要的细胞器之一, 它的主要功能是通过氧化磷酸化产生能量货币——ATP, 从而为细胞的一切生命活动提供动力。哺乳动物线粒体有自己的遗传物质——线粒体DNA (mitochondria DNA, mtDNA)。mtDNA呈双链环状, 大小约为16.5 kb, 编码氧化磷酸化所需数百个基因中的37个, 包括13种多肽, 22种tRNA和2种rRNA, 其余的都由核线粒体基因编码<sup>[11, 12]</sup>。研究表明, 只有mtDNA编码的基因和核

DNA (nuclear DNA, nDNA) 编码的线粒体基因均正常表达并相互协调, 才能保证线粒体的正常发育和生理功能的正常行使, 倘若线粒体基因或者核线粒体基因发生突变均会导致线粒体疾病。在核移植胚胎中, 细胞核和细胞质来源于不同的动物个体, 甚至是不同的物种, 核质(主要是线粒体)之间协调互作是供核完成重编程并指导全程发育的先决条件。因此, 近年来核移植中线粒体的命运及其与供核间的互作关系, 成为科学家们感兴趣的研究课题。

### 1.2 细胞核移植中线粒体可能的三种命运

细胞核移植有两种操作程序: 一种是胞质内注射法, 就是把供体的核质体(细胞核及其周围的部分胞质)直接注入去核的受体卵胞质; 另一种是电融法, 即把整个供体细胞放至去核的受体卵周隙内, 通以直流电脉冲使两者融合。后一种方法是目前动物细胞核移植研究中普遍采用的操作程序, 因为这种方法具有操作简便、对卵母细胞损伤小等许多优点, 但是采用这两种操作程序都不可避免地会将一部分(或全部)供体细胞的胞质带入受体卵内, 因此重构胚胞质中含有供体细胞和受体卵母细胞两种来源的线粒体。那么重构胚在一系列的发育进程中两种来源的线粒体会有什么样的变化呢? 总而言之, 不外乎三种可能的变化: 第一种可能是和正常受精胚胎发育中线粒体变化相似, 供体来源的线粒体被受体卵胞质中的泛素标记, 随后被蛋白质

\* 国家重点基础研究发展规划项目(973)(001CB5099和G20000161)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 010-62560528, Fax: 010-62565689

E-mail: chendy@panda. ioz. ac. cn

收稿日期: 2002-12-12, 接受日期: 2003-01-28

水解作用降解并消失, 最后只剩下受体类型的线粒体; 第二种可能是两种来源的线粒体同时存在, 重构胚或核移植个体中的线粒体呈异质性 (heteroplasmy); 最后一种可能是受体来源的线粒体被选择性降解, 供体来源的线粒体选择性复制, 重构胚或核移植个体中以供体类型的线粒体占主导。

## 2 细胞核移植中线粒体的命运

### 2.1 同种胚胎细胞核移植中线粒体的命运

Steinborn 等<sup>[13]</sup>通过基因特异性 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR) 分析方法对胚胎细胞克隆牛的线粒体进行了检测。两头来源于 24 细胞桑椹胚的克隆牛个体中, 供体与受体来源的线粒体比例分别为 13% 和 18%; 另外两头来源于 92 细胞桑椹胚的克隆牛个体中, 其比例为 0.6% 和 0.4%。这表明, 在胚胎细胞核移植中, 供体卵裂球的胚胎所处的发育阶段越早, 其核移植个体中供体卵裂球来源的线粒体含量越高。1999 年, Takeda 等<sup>[12]</sup>采用 PCR 片段单链构象多态性 (single-strand conformation polymorphism of PCR fragments, PCR-SSCP) 分析法检测了来源于卵裂球的核移植胚胎和个体的线粒体, 结果显示供体来源的线粒体在早期分裂中逐渐减少, 至囊胚阶段已经几乎检测不到其存在, 21 头核移植个体中有 20 头只存在受体卵胞质来源的线粒体, 1 头存在供体和受体来源的线粒体。由此可见, 在胚胎细胞克隆动物及早期胚胎中, 广泛存在线粒体异质性的现象, 有关研究者认为, 这可能是由于以卵裂球作为供体时带入的胞质量多, 使重构胚中供体来源的线粒体含量增多, 从而导致克隆个体的线粒体异质性。

### 2.2 同种体细胞核移植中线粒体的命运

1999 年, Evans 等<sup>[14]</sup>通过 PCR 产物的限制性片段长度多态 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析方法, 检测了来源于 6 岁母羊乳腺细胞的 Dolly 和其他 9 只来源于胎儿体细胞的克隆绵羊的线粒体, 结果表明 10 头体细胞克隆绵羊的 mtDNA 均来源于受体卵母细胞。但是, Steinborn 等<sup>[15]</sup>采用 AS-PCR 分析对来源于胎儿和成年体细胞克隆牛的线粒体进行了检测, 结果证明线粒体呈异质性, 供体和受体来源的线粒体共存。2001 年, Do 等<sup>[16]</sup>把用绿色荧光色素标记线粒体的卵丘细胞注射入去核的 MII 期牛卵母细胞中, 重构胚在体外培养并检测供体线粒体的变化, 结果

表明, 标记的供体线粒体在 8~15 细胞期重构胚中存在, 16 细胞期及其以后的各体外发育阶段检测不到标记的线粒体。2002 年 Do 等<sup>[17]</sup>又采用 AS-PCR、DNA 直接测序 (direct DNA sequencing) 和 DNA 色谱法 (DNA chromatography) 三种不同的分析方法, 重新研究了以冻融的卵丘细胞作为供体的体细胞克隆牛胚胎中的 mtDNA, AS-PCR 分析表明从 1 细胞到囊胚各发育阶段的克隆胚胎中均存在供体和受体来源的 mtDNA, 线粒体呈异质性。但是, 线粒体 D-Loop 控制区的直接 PCR 产物测序分析并没有发现克隆囊胚中供体来源的线粒体, 仅存在受体来源的线粒体。进一步对 AS-PCR 产物进行 DNA 色谱和测序分析, 验证了克隆囊胚中确实存在供体来源的 mtDNA。Do 等<sup>[17]</sup>认为在 PCR-RFLP、PCR-SSCP、AS-PCR、直接 PCR 产物测序和 DNA 色谱等多种线粒体异质性分析方法中, AS-PCR 可能是最为灵敏和适合的一种, 而直接 PCR 产物测序和 DNA 色谱可能不适合用于线粒体异质性测定, 因为这两种方法由于灵敏度较低测不出微量供体 mtDNA 的存在。他们前后两次对克隆牛胚胎中 mtDNA 的检测结果不同, 可能就是由于分析方法不同所致。

### 2.3 异种核移植中线粒体的命运

异种克隆是指把一种动物的胚胎细胞或体细胞移入另一种动物的去核卵母细胞中, 即供核体和供质体来源于不同种的动物, 形成的是一核质杂交胚胎。异种克隆为濒危动物保护提供了有效的方法, 同时也为异种核质 (主要是线粒体) 互作研究带来了方便。

Lanza 等<sup>[8]</sup>利用种间核移植克隆出了野牛, 分析三个异种克隆野牛胎儿 11 种组织中的线粒体型, 表明其线粒体均来源于受体卵胞质, 而没有供体来源的线粒体存在。Loi 等<sup>[9]</sup>将死亡后 18~24 h 的欧洲盘羊 (mouflons, *Ovis orientalis*) 颗粒细胞注入绵羊的去核卵母细胞中, 将 7 枚发育到囊胚的重构胚移入 4 只受体绵羊子宫角, 有 2 只妊娠, 其中 1 只产下了 1 只正常的欧洲盘羊。线粒体分析结果显示, 异种克隆盘羊的线粒体完全来源于受体卵母细胞。Meirelles 等<sup>[18]</sup>把 *Bos indicus* 的桑椹胚期卵裂球融入去核的 *Bos taurus* 卵中, 检测了异种重构胚及其移植后产生的胎儿和牛犊的线粒体基因型。在异种重构胚早期发育中, 供体来源的线粒体逐渐减少, 在所有检测的桑椹和囊胚中除一个囊胚含有 63% *Bos indicus* 的 mtDNA 外, 其他的不含或仅

含有少量的 *Bos indicus* 的 mtDNA. 进一步检测妊娠 55 天胎儿的多种胚胎外和胚胎组织的线粒体基因型, 表明这些组织中存在 2.7% 的供体 mtDNA, 供体和受体来源 mtDNA 的比例与着床前胚胎中的相似. 然而, 对克隆牛犊线粒体基因型分析显示, 供体来源的 mtDNA ( $<5 \times 10^{-5}$ ) 已检测不到.

以上异种克隆动物的线粒体广泛来源于受体卵母细胞的报道, 使人们对异种核移植能否完全拯救濒危动物提出了疑问, 即异种核移植在把濒危动物核遗传物质保存下来的同时, 源于濒危动物的线粒体是否也能被拯救? 研究者针对这个问题提出了两种可能的解决措施. 措施之一就是要把濒危动物体细胞中分离出来的线粒体注射入重构卵中<sup>[19]</sup>, 其次就是选择性移植线粒体呈异质性的重构囊胚. 然而, 即使移植线粒体异质性的重构囊胚到受体子宫, 在胎儿发育及个体发育中, 仍有可能因遗传漂变而导致供体来源的线粒体消失.

我们实验室<sup>[10,20]</sup>把大熊猫的体细胞核移入去核的 M II 期卵中, 重构大熊猫-兔异种克隆胚胎, 移植入家猫子宫中建立妊娠, 采用大熊猫和兔线粒体 D-loop 区特异的引物扩增植入前囊胚和妊娠后胎儿中 mtDNA. 我们发现在克隆囊胚中供体来源的大熊猫线粒体和受体卵胞质来源的兔线粒体共存; 在着床后的早期胎儿中, 兔卵胞质来源的线粒体数量下降, 供体大熊猫来源的线粒体占据主导地位, 这表明在植入后的异种克隆胚胎中, 供体细胞来源的线粒体可以代替受体卵胞质来源的线粒体. 对这种现象的一种可能解释是, 异种克隆胚胎的最初几次有丝分裂与正常受精的哺乳动物早期胚胎发生相似, 分裂依赖的是卵母细胞中原本存在的 mRNA 和蛋白质, 胚胎基因组并不表达. 随着发育的进行, 母源物质被降解, 胚胎进一步的发育主要依赖于自己核基因组遗传信息的表达. 这种由母体到胚胎对发育控制的转换称为母胎转换 (maternal-embryonic transition, MET). 在正常胚胎发育中, MET 具有种属特异性, 小鼠发生在 1~2 细胞期<sup>[21]</sup>, 牛在 8~16 细胞期<sup>[22]</sup>, 猴在 4~8 细胞期<sup>[23]</sup>. 当胚胎基因组表达时, 编码线粒体复制、转录和翻译所需因子的核线粒体基因也同时表达. 然而, 由于大熊猫和兔在遗传上亲缘关系较远, 这些核线粒体基因编码的因子只能支持核供体来源的大熊猫线粒体的发育, 并不能支持受体兔卵来源的线粒体发育. 另一方面, 线粒体是一个完整的膜性结构, 在早期胚胎发生中即使不会复制, 但

也并不会被马上降解, 因此早期重构胚中线粒体呈异质性, 待到胚胎基因组表达泛素标记的蛋白水解酶降解系统和供体来源的线粒体发育所需的因子后, 受体卵胞质来源的线粒体因被蛋白水解酶降解系统作为外来的蛋白质标记并降解而数量逐渐减少, 供体来源的线粒体因被复制而数量增加并逐渐代替受体卵胞质来源的线粒体. 作者采用线粒体细胞色素 b 基因特异的引物, 扩增体外培养的猕猴-兔异种克隆胚胎中的线粒体 DNA, PCR 产物经测序证明, 1 细胞至囊胚期胚胎中均存在猕猴体细胞来源的线粒体, 同时也能检测到受体兔卵胞质来源的线粒体存在 (待发表). 猕猴-兔重构胚中线粒体异质性, 部分证明了上述解释的正确性. 尽管还需要进一步证实这种现象是否是异种克隆特别是远缘异种克隆中普遍存在的现象, 但我们的工作也为利用异种克隆特别是远缘异种克隆完全拯救濒危动物 (包括核和线粒体遗传物质) 带来了希望.

### 3 结 语

综上所述, 目前哺乳动物核移植研究中, 供体和受体来源的线粒体命运如何还没有完全一致的规律. 对这一问题进行深入的研究, 有助于弄清核移植动物及早期胚胎中线粒体存在的状态、变化规律、与核之间的互动, 从而逐步提高核移植效率并推动核移植技术在完全拯救濒危动物、纠正与 mtDNA 遗传有关的疾病和建立 mtDNA 异质性的疾病动物模型等多方面的应用.

### 参 考 文 献

- 1 Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *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. *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. *Science*, 1998, **282** (5396): 2095~2098
- 4 Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, **17** (5): 456~461
- 5 Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, **407** (6800): 86~90
- 6 Chesne P, Adenot P G, Viglietta C, *et al.* Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2002, **20** (4): 366~369
- 7 Shin T, Kraemer D, Pryor J, *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, **415** (6874): 874~859
- 8 Lanza R P, Cibelli J B, Diaz F, *et al.* Cloning of endangered

- species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. Cloning, 2000, **2** (2): 79~90
- 9 Loi P, Ptak G, Barboni B, *et al.* Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. Nat Biotech, 2001, **19** (10): 962~964
  - 10 Chen D Y, Wen D C, Zhang Y P, *et al.* Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. Biol Reprod, 2002, **67** (2): 637~642
  - 11 Hiendleder S, Schmutz S M, Erhardt G, *et al.* Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. Mol Reprod Dev, 1999, **54** (1): 24~31
  - 12 Takeda K, Takahashi S, Onishi A, *et al.* Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. J Reprod Fertil, 1999, **116** (2): 253~259
  - 13 Steinborn R, Zakhartchenko V, Wolf E, *et al.* Non-balanced mix of mitochondrial DNA in cloned cattle produced by cytoplasmic fusion. FEBS Lett, 1998, **426** (3): 357~361
  - 14 Evans M J, Gurer C, Loike J D, *et al.* Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. Nat Genet, 1999, **23** (1): 90~93
  - 15 Steinborn R, Schinogl P, Zakhartchenko V, *et al.* Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. Nat Genet, 2000, **25** (3): 255~257
  - 16 Do J T, Hong K H, Lee B Y, *et al.* *In vitro* development of reconstructed bovine embryos and fate of donor mitochondria following nuclear injection of cumulus cells. Zygote, 2001, **9** (3): 211~218
  - 17 Do J T, Lee J W, Lee B Y, *et al.* Fate of donor mitochondrial DNA in cloned bovine embryos produced by microinjection of cumulus cells. Biol Reprod, 2002, **67** (2): 555~560
  - 18 Meirelles F V, Bordignon V, Watanabe Y, *et al.* Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. Genetics, 2001, **158** (1): 351~356
  - 19 Irwin M H, Johnson L W, Pinkert C A. Isolation and microinjection of somatic cell-derived mitochondria and germline heteroplasmy in transmitochondrial mice. Transgenic Res, 1999, **8** (2): 119~123
  - 20 Chen D Y, Sun Q Y, Liu J L, *et al.* The giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) somatic nucleus can dedifferentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg. Sci China Ser C, 1999, **42** (4): 346~353
  - 21 Bolton V N, Oades P J, Johnson M H. The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo. J Embryol Exp Morphol, 1984 Feb, **79**: 139~163
  - 22 Barnes F L, First N L. Embryonic transcription in *in vitro* cultured bovine embryos. Mol Reprod Dev, 1991, **29** (2): 117~123
  - 23 Schramm R D, Bavister B D. Onset of nucleolar and extranucleolar transcription and expression of fibrillarin in macaque embryos developing *in vitro*. Biol Reprod, 1999, **60** (3): 721~728

## The Mitochondria Fate in Mammalian Nuclear Transfer\*

YANG Cai-Xia, WEN Duan-Cheng, ZHANG Ke-Ying, CHEN Da-Yuan\*\*

(State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** Mitochondria, an energy-producing organelle, is involved in the events of growth, development, age, apoptosis and disease. In the development of mammalian embryos produced by nuclear transfer, the change of mitochondria derived from the nucleus donor and the recipient is an interesting and essential question. Based on the research in the laboratory, the recent advances on mitochondria fate in intraspecies and interspecies nuclear transfer embryo were reviewed.

**Key words** mammal, nuclear transfer, mitochondria fate

\* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (001CB5099 and G20000161).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-62560528, Fax: 86-10-62565689, E-mail: chendy@panda.ioz.ac.cn

Received: December 12, 2002 Accepted: January 28, 2003