

克隆动物发育过程中基因组的重编程^{*}

张利生 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 自克隆羊“多莉”诞生后利用体细胞核移植技术进行克隆动物的研究已取得很大进展, 体细胞克隆的牛、猪、山羊、猫、兔等已陆续出生, 但克隆动物的成活率一直都比较低, 并且产出的动物大部分存在某种程度的缺陷. 最新研究表明, 克隆动物胚胎基因组的重编程出现偏差和失误, 尤其是去甲基化不足可能是核克隆动物出现异常的关键所在. 探讨早期克隆胚胎重编程, 特别是对 DNA 的甲基化, 以及供体核在受体卵胞质中进行核重组, 为研究克隆胚胎发育和解决克隆动物中的两大难题——即基因组的重编程和核质相互作用提供一些线索.

关键词 核移植, 基因组, 甲基化, 核重组, 重编程

学科分类号 Q132.7

自“多莉”克隆羊诞生后利用核移植技术生产克隆动物掀起了新高潮, 该领域的研究与发展呈现出新的生机. 体细胞克隆技术生产的克隆羊、牛、猪、鼠、猫等已陆续出生. 但是克隆动物的妊娠率, 囊胚发育率均大大低于体外授精获得的胚胎. 同时克隆动物的流产率又远高于体外受精的胚胎. 而且出生的克隆动物有相当一部分存在着某种程度的缺陷, 例如胎盘和出生儿体重过大, 心肺功能不全, 或者某些器官呈现畸形等. 这说明利用核克隆的方法生产克隆动物还有一些问题需要解决. 胚胎发育过程中“基因组的重编程”, 尤其是克隆动物发育过程中重编程顺序的异常, 被认为是克隆动物生存率低下和表型异常的根源.

1 核移植后遗传的重新程序化

克隆动物若要完成发育和在胚胎发育中正常表达, 则在体细胞中沉默的基因需要重新激活. 配子发生过程中, 精子和卵子的基因组都发生了复杂的后生重构过程, 以保证一旦受精后可以有效地活化早期胚胎的基因表达. 而克隆胚胎中基因组的重编程不同于配子的发生, 它需要在卵胞质内急促发生. 体细胞移入去核的 M II 期卵胞质后形成重构卵, 其中的二倍体核相当于一个有性条件下的“合子核”. 它必须在从移入卵胞质开始到早期胚胎发育所必需的转录之间的短暂时间内发生重编程. 因此有可能导致基因组在重新编程过程中出现某种误差甚至错误. 对基因组重编程及其调控的进一步了解, 将为利用体细胞克隆动物的供体细胞和胞质环境提供一些参数, 从而提高克隆的效率.

正常情况下, 早期胚胎发育是由母源遗传的

RNA 和蛋白质所控制, 合子核几乎没有转录. 发育到一定阶段, 合子核开始控制基因组的表达, 然后以时空调控的方式控制发育, 最终导致特定分化类型的细胞形成. 目前对于细胞分化基因表达的调控机制知道的还不是太多. 在哺乳动物中, DNA 甲基化被认为是胚胎发育和转录调控所必需的^[1]. 染色质和 DNA 甲基化的主要功能是稳定地抑制基因的表达式, 也就是印迹. 这些基因显示等位特异的活化方式. 到底哪些基因呈现活化取决于它来源于母系还是父系染色体^[2]. DNA 甲基化也是雌性一条 X 染色体失活的根本原因. 正常甲基化 (印迹) 的改变会使发育产生异常^[3]. 所以核移植过程中移植的核必须首先不转录, 然后建立时空的定量基因表达.

早期胚胎以主动和被动两种机制来进行重新编程^[4]. 来自父系的染色体基因组在卵子的胞质中发生显著的变化, 在 DNA 复制开始之前整个基因组将发生去甲基化, 之后来自精子中的染色质通过鱼精蛋白的去除, 及被乙酰化的组蛋白所代替而发生精子染色体的重组^[5]. 来自父源染色体的一些序列在受精时受到保护而免于去甲基化, 包括印迹基因 H19, RasGrf1 和一些重复序列. 在随后卵裂过程中由于 DNA 甲基化转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, Dnmt1) 被排除出核而发生被动的甲基化, 但是在小鼠的 8 细胞期胚胎中, Dnmt1 在一次复制周期中又被重新定位于核中^[6]. 小鼠胚胎恢复甲基化发

^{*} 科学技术部攀登专项资助项目 (95 专项-08) 和中国科学院知识创新工程项目 (KSCX1-05-01).

^{**} 通讯联系人.

Tel: 010-62560528, E-mail: Chendy@panda.iz.ac.cn

收稿日期: 2002-05-28, 接受日期: 2002-07-22

生在扩张囊胚的内细胞团细胞中, 而牛的胚胎, 甲基化的恢复发生于 8~16 细胞期^[4]. 合子之后的去甲基化和重新甲基化, 可能在去除发育过程中基因组的修饰起着很重要的作用, 尤其是去除那些在配子发生过程中所获得的修饰.

核移植过程中所用的基因组高度甲基化并且已经高度分化的体细胞, 是如何去除其自身的基因修饰而恢复类似于合子的全能性? 究竟是核酸 (如 mRNA) 还是酶, 使核去分化恢复全能性呢? 现在还不清楚. 以亚硫酸氢盐分析的方法来检测克隆牛的桑椹胚和囊胚中的一些重复序列和单一序列, 发现它们的甲基化水平和供体细胞基因组相似, 比正常胚胎的要高. 虽然成纤维细胞的核被导入去核的卵母细胞时, 会发生类似于主动的去甲基化过程^[7]——失去一部分甲基化, 但是进一步的去甲基化并没有出现, 相反却在胚胎相当大的部位出现了过早的甲基化过程. 另外克隆胚胎核甲基化模式的重组也与分化的细胞核早熟甲基化很相似^[4]. 这些结果表明大多数附植前的克隆胚胎缺乏重新编程, 尤其是去甲基化明显不足导致了克隆胚胎核重编程顺序的紊乱.

Dnmt1 是被研究最广泛和含量最丰富的 DNA 甲基化转移酶, 它与 DNA 合成后的甲基化模式的复制有关, 破坏掉小鼠 Dnmt1 基因将大大降低 DNA 的甲基化, 导致异常的基因印迹, 使胚胎死亡. 体内发育的胚胎具有低水平的 Dnmt 转录. 最近有报道表明^[8], 培养处于细胞周期 G0/G1 阶段的成纤维细胞其 Dnmt 水平明显地降低. 在克隆牛实验中, 核移植生产的胚胎和体外授精对照组胚胎相比, Dnmt 和 Mash2 mRNA 的表达存在差异. 另外 Mash2 和 IF τ 等基因在滋养层 (胎盘前体细胞) 中特异表达, 支持了胎盘出现异常是流产主要原因的观点^[9].

印迹基因是动物长期进化中所形成的自我调控与自我监护机制. 大多数的印迹基因与胚胎发育有关, 在胚胎发育中起着很重要的调节作用. 有人分析研究了小鼠胚胎干细胞 (ES) 印迹基因的状况发现, 胚胎干细胞生产嵌合体 and 克隆动物时, 小鼠 ES 细胞群的印迹模式图是不一致的, 故当这些细胞用来克隆动物或制作嵌合体可能会导致发育出现异常^[4]. 例如胎儿和胎盘的过大增长等, 这些异常和核移植生产的克隆动物出现的异常是一致的.

哺乳动物的剂量补偿是靠灭活雌性个体体细胞中的一条 X 染色体来获得的, 这一过程被叫做 X

染色体的失活. 雌性胚胎在着床前的发育过程中两条 X 染色体均有活性, 选择哪一条 X 染色体失活在胚胎的上胚层细胞系中完全是随机发生的. 与这相反, 一种不明机制的双亲印迹引起了滋养层细胞——父本 X 染色体的优先失活. 用含有遗传标记的 X 染色体的体细胞核作为供核供体, 所得克隆动物 X 染色体在上胚层的细胞系中随机失活. 但在滋养层中却非随机失活, 所以在核移植后, 原来后生遗传给体细胞所做的区别活性 X 染色体和非活性 X 染色体的标记被去除了, 同时在胚胎细胞中的任何一条 X 染色体上又重新做上标记. 因此在克隆的雌性胚胎充分再现了 X 染色体失活的过程^[2]. Mash2 是一个母源性表达的基因, 对胚胎发育来说是必需的, Mash2 基因是胎盘组织的生长促进因子, 缺乏 Mash2 母源基因拷贝的胚胎不能移入子宫^[10]. 最新研究表明, 可能不是 DNA 甲基化而是等位基因特异性染色质的构象变化, 在维持母源 Mash2 的表达中起着很重要的作用^[11].

早期胚胎发育的特征之一就是有一过渡期即发育程序由母型调控转变为合子型的调控. 在此期间, 母型 mRNA 选择性降解, 合子型 mRNA 含量迅速上升并占据统治地位. 在受精之前, 大约有 50% 的储藏 poly (A) mRNA 消失, 在受精时 poly (A) mRNA 含量回升, 增加 40%. 然而在小鼠自 1 细胞到 2 细胞后期 mRNA 减少 70%, 在此期间, 大部分贮藏的母源 mRNA 已完成他们的功能而被降解. 母型 mRNA 的稳定水平是受选择性降解作用的影响. RNA 的降解通常是从 3' 端开始的. 在某些仅作短暂表达的 mRNA 的 3' 端非翻译区中, 发现 AU 富集序列, 它能促进 mRNA 的降解^[12, 13]. 所有这些均与最近发现的 RNA 干扰 (RNA interfering, RNAi) 相似.

RNAi 现象是指特定双链的 RNA (dsRNA) 被 DICER (类似于 RNase III) 作用后, 成为 21~23 个核苷酸的小干扰 RNA (siRNA), 可以作用于靶 mRNA 使之降解, 表现为转录后的基因沉默. 由于 siRNA 只是作用于靶 mRNA, 而不是对基因的敲除, 因此 RNAi 在研究早期胚胎的发育中显示了其独特的优越性, 尤其是那些在胚胎发育不同阶段表达的同基因^[14]. 所以用 RNAi 研究核移植将会使我们更加清楚地了解其基因组的重编程事件. 最近的研究表明, RNAi 现象存在于哺乳动物的胚胎细胞和体细胞中, DICER 也被定位于细胞质中^[15]. DICER 在体细胞克隆动物的最初发育调控

过渡: 由体细胞核的转录后沉默到合子核转录活性的出现这一过程中究竟起着怎样的作用, 也需要作进一步的探讨, 总之 RNAi 技术将会成为未来研究核移植机制的一种重要工具.

一般认为来源于未分化胚胎细胞的核比分化的体细胞的核更适于重编程或较少要求重编程. 但是采用胚胎干细胞做供体, 有些实验并未显出其比体细胞做供体的优越性, 小鼠的胚胎干细胞做供体仅获得了 2.4%~3.6% 的成功率^[16], 然而有些用胚胎干细胞做核供体却取得较高的出生率, 最高达 23%, 平均 17%, 而且有 50%~100% 存活到成年. 最近经 Eggan 等^[17] 分析得知用近交系动物的 ES 细胞为供核体成功率低, 而且克隆的仔鼠不能存活至成年, 而杂交一代小鼠的 ES 细胞为核供体成活率高而且仔鼠能存活至成年. 说明供体核的杂合性对克隆动物的成活率和生存率有重要影响.

据报道休眠细胞的染色质发生凝集, 转录和翻译活性下降, mRNA 被降解, 多聚核糖体也发生变化, 休眠细胞减少他们的甲基化, 因此认为休眠细胞染色质可能更适于核移植后基因表达重编程的结构变化^[18]. 目前已有更多关于用胚胎、胎儿、成年体细胞获得的克隆后代以及绵羊、牛、小鼠用非休眠细胞作供体获得的克隆后代. 但由于所报道的细胞培养均非来源于单一克隆的细胞, 因此很难作为一个整体来比较细胞的性状, 是否在非休眠期的细胞因为培养环境, 接触抑制而进入 G0 期还不得而知.

2 由核质作用而引起的核重组

成熟的配子明显不同于体细胞的结构, 因为卵子能够逆转在分化过程中作用于基因组的渐进式的遗传修饰 (如配子发生过程的等位基因印迹和早期胚胎发育过程雌性的一条 X 染色体的失活等), 使之重新恢复到全能状态. 哺乳动物中, 重新程序化事件最早发生于转移核变为转录后沉默的时候. 在小鼠, 到 2 细胞期转移核正常的转录活性又重新出现, 表明供核的最初转录活性是受精卵质控制的. GV 中储备的大量加速体细胞核重构的物质, 包括分子伴侣, 如核精蛋白 (nucleoplasmin) 和 N1/N2 等, 它们都能调节核里的组蛋白向 DNA 转运和核小体的组装^[19], 影响发育的潜能.

将供核移入去核的 MII 卵子核膜破裂 (nuclear envelope break down, NEBD) 和早熟染色体凝集 (premature chromosome condensation, PCC) 发生的时

间将大大提前发生于合子转录起始之前. 如果将一供核移入一活化卵母细胞的胞质体中, 在随后的减数分裂中, 染色质凝集将加速与基因表达时空调控有关因子的交换. 供体核为了能够在受体中运行和维持 DNA 复制和实现分裂, 还要调整核与染色体的结构. 供核在受体胞质成熟促进因子 (maturation promoting factor, MPF) 作用下发生的 NEBD 和 PCC 是核发生重构的根本. MPF 的活性在减数分裂和有丝分裂细胞中的 M 期达到高峰. 哺乳动物成熟的卵子停留在 M 期并维持高 MPF 活性, 受精或激活后 MPF 活性下降, 第二次减数分裂完成并排出第二极体 (Pb II), 染色质发生去凝集形成原核. 核移植过程中, MPF 活性高时发生胚胎的重构, 同时出现 NEBD 和 PCC. 但是在 MPF 活性下降以后重构胚胎仍可发生 NEBD 和 PCC 表明, 存在其他的激酶活性 (如 MAPK) 或融合时供核 MPF 亚单位与受体胞质 MPF 亚单位的相互作用.

染色质聚集的特征受到二核苷酸 (CpG) 甲基化的强烈影响, 在脊椎动物胚胎中主要是 DNA 的共价调节, 从另外一个侧面反映了 DNA 甲基化状态在胚胎发育早期决定细胞发育命运中起着重要作用.

如果受体胞质在移入供核之前就被活化, 激酶活性下降, 不发生 NEBD 和 PCC, DNA 合成的发生则与移核时供体细胞的周期有关. 免疫组化研究表明, 移核发生了大量的变化. 例如, 牛和猪核纤层蛋白的聚集, SnRNPs 的变化, 牛体细胞组蛋白 H2 的去除及被胚胎型组蛋白代替, 以及特定的蛋白质阶段性表达. 调整核与染色质的结构, 核膨胀可作为重编程的指标, 在兔中已被证明降低体细胞核的组蛋白 H1 含量, 就等于除去重编程基因的一个重要障碍.

本实验室克隆出生的 14 头牛中有 9 头出现了不同程度的病变. 在出生前后死亡的牛中, 一头死于肠扭转, 一头死于心脏瓣膜粘连, 一头死于肺炎, 一头死于肺血管破裂, 一头死于胃出血, 结合国外报道克隆动物大部分出现了贫血, 胎膜易碎等, 都可能与结缔组织发育有关. 结缔组织是由中胚层发育来的, 是所有组织中分化最低的组织, 它首先形成疏松的间充质, 最后形成骨骼, 软骨, 肌肉, 结缔组织和真皮, 泌尿系统以及心脏的血管系统和血细胞. 从组织胚胎学的角度来说, 克隆动物的死亡原因有可能与中胚层发育不完全有关, 但确切原因尚待进一步研究.

虽然胞质受体和核移植的步骤并未发生较大的

变化,但是在近 20 年的时间内,供体核的来源已经发生了相当大的改变,第一只克隆鼠是用胚胎的卵裂球克隆出来的,最近利用转基因和基因敲除的体细胞生产的克隆牛、羊、猪等均已出现。

由先进细胞公司生产的克隆牛“Victoria”已经近 4 岁了,她的后代“vichy”也有 6 个月了,母子都是正常而且健康的,因此 Lanza 等^[20]对 24 头克隆牛进行体检后在《Science》上发表文章指出“克隆牛也可以健康而正常的生长”,为我们展示了体细胞克隆动物在未来的器官移植和药物生产等方面的应用有着美好前景。

参 考 文 献

- 1 Woffe A P, Matzke M A. Epigenetics: regulation through repression. *Science*, 1999, **286** (5439): 481~ 486
- 2 Rideout III W M, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 2001, **293** (10): 1093~ 1098
- 3 Okano M, Bell D W, Haber D A, *et al.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999, **99** (3): 247~ 257
- 4 Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001, **293** (10): 1089~ 1093
- 5 Mayer W, Niveleau A, Walter J, *et al.* Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 2000, **403** (6769): 501~ 502
- 6 Howell C Y, Bestor T H, Ding F, *et al.* Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, 2001, **104** (6): 829~ 838
- 7 Kang Y K, Koo D B, Park J S, *et al.* Aberrant methylation of donor genome in donor bovine embryos. *Nat Genet*, 2001, **28** (2): 173~ 177
- 8 Robertson K D, Keyomarsi K, Gonaes F A, *et al.* Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferase (DNMTS2) 1, 3a and 3b during G0/G1 to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res*, 2000, **28** (10): 2108~ 2113
- 9 Wrenzycki C, Well D, Herrmann D, *et al.* Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod*, 2001, **65** (1): 309~ 317
- 10 Guillemot F, Caspary T, Tilghman S M, *et al.* Genomic imprinting of Mash2, a mouse gene required for trophoblast development. *Nat Genet*, 1995, **9** (3): 235~ 242
- 11 Tanaka M, Puchier M, Gertsenstein M, *et al.* Parental origin-specific expression of Mash2 is established at the time of implantation with its imprinting mechanism highly resistant to genome wide de methylation. *Mech Dev*, 1999, **87** (1~ 2): 129 ~ 142
- 12 Ross J. Messenger RNA turnover in eukaryotic cells. *Mol Biol Med*, 1988, **5** (1): 1~ 14
- 13 Shaw G, Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 1986, **46** (5): 659~ 667
- 14 Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nature Cell Biol*, 2000, **2** (2): 70~ 75
- 15 Paddison P J, Caudy A A, Hannon G J. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (3): 1443~ 1448
- 16 Ramazaki Y, Makino H, Hamada K H, *et al.* Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (24): 14022~ 14026
- 17 Eggan K, Akutsu H, Loring J, *et al.* Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (11): 6209~ 6214
- 18 Campbell K H S. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning*, 1999, **1** (1): 3~ 15
- 19 Kikyo N, Wolffe A P. Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. *J Cell Science*, 2000, **113** (Pt1): 11~ 20
- 20 Lanza R P, Cibelli J B, Faber D, *et al.* Cloned cattle can be healthy and normal. *Science*, 2001, **294** (5548): 183~ 184

Epigenetic Reprogramming of The Genome in Cloned Animals*

ZHANG Li-Sheng, CHEN Da-Yuan**

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

Abstract Cloning of bovine, pig and monkey etc. has been successful by nuclear transfer since “dolly” was born, but the overall efficiency of cloning is very low (typically between 0% and 3%), and many cloned animals display abnormalities in some degrees. Recent studies showed that the reprogramming of the genome that occurs during normal development is aberrant in cloned embryos, especially demethylation is inefficient. Progress in reprogramming of genome of early cloned embryos and the somatic nucleus remodeling in the recipient cytoplasm is reviewed in order to offer some clues to resolve the two important problems in cloning.

Key words nuclear transfer, genome, methylation, nucleus remodeling, reprogramming

* This work was supported by grants from The Climbing Project of the Ministry of Sciences and Technology of China (95-zhuanxiang 2) and The Important Project of Knowledge Innovation of The Chinese Academy of Sciences (KSCX1-05-1).

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

Received: May 28, 2002 Accepted: July 22, 2002