

供体细胞的选择与动物克隆效率研究进展*

毕春明 文端成 陈大元**

(中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 哺乳动物体细胞克隆经过几年的发展, 已取得了很大进展. 已有多种细胞被采用并得到了克隆后代. 但动物克隆效率仍然很低, 供体细胞的选择是动物克隆中的重要步骤. 供体细胞的细胞周期、细胞类型、细胞来源和分化程度等方面都可能影响动物克隆的效率.

关键词 核移植, 动物克隆, 供体细胞, 细胞周期, 细胞类型, 克隆效率

学科分类号 Q132.7

核移植是指利用显微操作, 将外源细胞核导入去核卵母细胞中, 组成重构胚. 核移植最早是为了研究细胞分化中遗传物质的作用而提出的. 随着核移植的发展, 供体细胞已由胚胎细胞发展到已分化的体细胞. 1997年, 克隆绵羊“多莉”的诞生, 证实了利用体细胞核移植产生克隆动物的可行性^[1].

动物克隆是指利用核移植技术, 得到重构胚, 在体外培养一段时间后, 移植入受体中继续完成发育, 得到遗传上与供体细胞一致的后代. 目前, 在不同哺乳动物中, 已有多种不同类型的体细胞用于克隆, 并得到了后代^[2-6]. 但不同的体细胞核移植后, 可能会影响克隆的效率. 本文从细胞周期、细胞类型、分化程度、细胞来源等方面综述了以不同体细胞为供体的动物克隆.

1 供体细胞的细胞周期

供体细胞所处的细胞周期在体细胞克隆早期即引起人们的注意. 供体细胞的DNA含量将影响重构胚的倍性. 用于克隆的体细胞从开始的G₀期细胞发展到G₂/M期, 但各时期细胞的克隆效率又不相同.

1.1 G₀期细胞为供体的克隆

克隆绵羊“多莉”诞生以后, 其研究者认为, 成功的关键因素之一是供体细胞经血清饥饿后, 处于休眠期, 即G₀期. 认为这种细胞较易于重编程. 此后诞生的多种动物其供体细胞都经过血清饥饿. 但后来发现, 培养的猪胎儿成纤维细胞血清饥饿5天后, 大量细胞显示出凋亡特征, 有约25%细胞的DNA发生碎片化, 而正常培养的细胞只有0.2%碎片化^[7]. Edward等^[8]比较了血清饥饿和正

常培养细胞的核移植, 认为克隆胚胎和胎儿的损失可能与供体细胞的血清饥饿有关. 胎儿的后期流产可能由于DNA被破坏或DNA的不当修复, 而这些错误在胚胎发育过程中不能得到恰当的纠正.

基于血清饥饿得到的G₀期细胞可能存在的某些缺点, 人们想到用非休眠细胞做供体, 并对几个时期的细胞进行了尝试.

1.2 G₁期细胞做供体的核移植

人们认为G₁期细胞做供体可能比G₀期更能适应胚胎早期的快速分裂. 目前已发展了多种获得G₁期细胞的方法. Kasinathan等^[2]采用“摇落”的方法选择G₁期细胞. 认为刚刚分裂的细胞贴壁不紧, 当用涡轮机摇动时, 这部分细胞会被摇落, 由一个胞质桥连着, 此时的细胞处于G₁期. 用这种细胞做供体, 当细胞铺展25%时摇落的细胞, 用于核移植后, 得到核移植后代. 而铺满100%和血清饥饿的细胞核移植后均无后代产生. 可能生长细胞的接触抑制和血清饥饿都会对细胞产生影响.

还可以通过激酶抑制剂来抑制细胞周期的各种激酶, 达到阻滞细胞周期进行的目的. Roscovitine是细胞周期蛋白依赖激酶2 (cell cyclin-dependent kinase 2, cdk2) 的抑制剂, 用它处理牛的颗粒细胞可将细胞同步于G₁/S检验点, 提高培养细胞中G₁/S期的比率. 用这种细胞做供体发现, 虽然重构胚的囊胚率比血清饥饿的细胞低, 但在妊娠的后1/3时期, 即核移植牛流产的高发期, 能大大降低

* 科技部攀登专项 (95-专-08) 和中国科学院知识创新工程重大项目 (KSCX1-05-01).

** 通讯联系人. Tel: 010-62560528, 010-62537815

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

收稿日期: 2003-01-20, 接受日期: 2003-03-24

胎儿的流产率,使胚胎在妊娠后期的死亡率大大降低^[9].本实验室采用 aphidicolin 处理牛耳成纤维细胞,aphidicolin 是哺乳动物细胞中 DNA 多聚酶的抑制剂,可将细胞同步化于 G1/S 检验点.用这种方法得到的细胞用于核移植后,可明显提高重构胚的囊胚率(未发表数据).因此药物处理是核移植中可供选择的细胞同步化方法.

1.3 G2/M 期细胞做供体的克隆

与 G0、G1 期细胞不同的是,G2/M 期细胞含有四倍体 DNA,导入受体胞质后,能否发育为正常的二倍体胚胎成为人们关注的问题.Lai 等^[10]以猪的胎儿成纤维细胞为供体,比较了 G0/G1 期和 G2/M 期细胞核移植后的发育情况.发现核移植后,80.6%来自 G2/M 期细胞的重构胚排出类极体的结构,而只有 21.7%来自 G0/G1 期细胞的重构胚排极体.对来自 G2/M 期细胞的重构胚进行染色体分析发现,得到的 13 枚胚胎中,有 10 枚是二倍体,余下的 3 枚是二倍或四倍嵌合体,可能是极体排出失败或纺锤体形成异常造成的.以牛的卵丘细胞为供体,将 G2 期和 M 期的细胞分开,发现当以 G2 期细胞为供体,未见排出第二极体.虽然二者囊胚率无差别,但来自 G2 期细胞的胚胎染色体分析为四倍体.而用 M 期细胞为供体,核移植后,27%的重构胚排出极体.染色体分析发现,排出极体的胚胎为二倍体,不排出极体的胚胎为四倍体,并首次生出了以 M 期细胞为供体的克隆牛^[11].最近,Lai 等^[12]又克隆出来自 G2/M 期细胞的转基因克隆猪.G2/M 期细胞做供体虽可支持重构胚发育至胎儿出生,但融合后极体的排放是关键,因此,胚胎发育率比 G0 和 G1 期细胞为供体的低.

到目前为止,除 S 期细胞外,其他时期的细胞克隆后都得到了后代.由于目前任何一种同步化手段都不能避免其他时期细胞的污染,因此,要寻找理想的细胞周期还需要更多系统的实验.

2 供体细胞的类型

“多莉”羊的诞生指出了高度分化的乳腺上皮细胞在导入受体卵母细胞以后,可以去分化,恢复全能性.但是否所有类型的体细胞都可以经核移植而恢复全能性、克隆效率是否有组织差异性,这些问题随着“多莉”的诞生而提出.现在,从生殖系统细胞到终端分化细胞都可被用做供体,并得到了克隆后代.

2.1 细胞类型与核移植成功率

比较小鼠不同组织细胞做供体的克隆发现,当以胎儿体细胞、输卵管细胞和睾丸细胞做供体,可以产生后代.而以成纤维细胞、胸腺细胞、脾细胞、巨噬细胞为供体,无后代出生^[13].在克隆牛中发现,卵丘细胞做供体,克隆效率高于成纤维细胞^[14].这似乎说明体细胞克隆效率有一定的组织特异性.

虽然从理论上讲,克隆过程可将已分化的体细胞去分化.但目前用于核移植的体细胞类型主要集中于生殖系统细胞(卵丘细胞、颗粒细胞、输卵管上皮细胞)、成纤维细胞、上皮细胞等,其他组织的细胞用得很少,是否所有组织的细胞都可用于克隆,目前还不能得出系统的结论.

2.2 终端分化细胞的克隆

克隆技术发展到现在,不管用那种类型的细胞做供体,核移植的效率都很低,只有 0.5%~5%,这使人们怀疑成功的体细胞克隆后代也许是来自培养细胞中极少的干细胞.为了弄清这一问题,Hochedlinger 等^[15]选择小鼠的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞为供体,经连续核移植得到了克隆后代. B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞属终端分化细胞,其内没有干细胞.这一实验有力地说明了培养的体细胞克隆的后代至少有一部分是来自分化的体细胞,这为克隆技术指出了良好的发展前景.

2.3 已灭活细胞的克隆

随着研究的深入,核移植技术可操作的空间越来越大.Loie 等^[16]将绵羊颗粒细胞经 55℃ 和 75℃ 加热灭活后进行核移植,结果 55℃ 灭活的细胞产生核移植后代.细胞虽然死亡了,但只移植供体细胞核进入受体胞质,仍可支持重构胚发育至出生,且囊胚率和出生率略高于新鲜细胞.Loie 等认为加热虽然动摇了染色体的高级结构,但核小体结构依然完整,且加热可能改变了核质中那些组织 DNA 活化或非活化的热不稳定蛋白质,从而改变了核蛋白的结构.也许正是这种改变,使得受体胞质更容易将供核的核蛋白结构扭转为较易于重编程的形式.这一实验验证了核移植先驱 Marie 的理论:体细胞核移植的理想境界是,只有 DNA 与蛋白质复合体及有功能的中心体被导入受体胞质.这是哺乳动物中首例支持这一说法的实验.这种核移植方法若具有普遍性,将为拯救濒危物种甚至复活已灭绝的物种指出光明的前景.

2.4 细胞类型与克隆后代的端粒长度

已有的研究表明在正常生理条件下的体细胞,随着分裂次数的增加,端粒会逐渐缩短.以体细胞为核供体的克隆后代是否因为细胞端粒的缩短而出现“未老先衰”,成为动物克隆中的重要问题.研究表明,以不同类型的细胞为供体,克隆后代的端粒长度有差别. Tian 等^[17]用牛的胎儿成纤维细胞做供体,发现克隆后代端粒比对照长. Miyashita 等^[18]发现,用老年牛的成纤维细胞、肌肉细胞做供体,其核移植后代的端粒比供体细胞长;而输卵管上皮细胞和乳腺上皮细胞做供体,核移植后代端粒短于供体细胞.这种核移植后代端粒长度的不同,可能由于不同组织的细胞,其端粒长度本身就不同.研究小鼠不同组织细胞的端粒长度发现,脾脏和脑组织细胞的端粒长度有较大差异,而肝脏、睾丸和肾脏细胞的端粒长度无明显差别^[19]. Betts 等^[20]以成纤维细胞为供体,核移植后代的端粒明显长于其供体细胞.来自体细胞的核移植后代端粒变长的现象,是否说明核移植技术本身可以启动细胞内端粒酶的活性,目前还没有一致的看法.

2.5 细胞类型与重构胚的基因表达

供体细胞导入去核卵母细胞以后,核的 DNA 发生重编程,调整为表达胚胎发育所需基因的状态.不同类型的细胞做供体,重构胚的基因表达也存在差异. Daniels 等^[21]以牛颗粒细胞和胎儿上皮细胞为供体核移植,检测重构胚中 FGF4 (fibroblast growth factor4)、FGFr2 (fibroblast growth factor receptor2) 和 IL-6 (interleukin-6),这三种被认为是与胚胎着床有重要关系的基因.当用颗粒细胞为供体时,重构胚中 FGF4 和 IL6 表达与体外受精的胚胎相似,但许多重构胚检测不到 FGFr2 基因的表达.当用胎儿上皮细胞为供体时,重构胚中都可以检测到 FGFr2. 令人感兴趣的是,当检测颗粒细胞和胎儿上皮细胞时,发现颗粒细胞中检测不到 FGFr2 的 mRNA,而胎儿上皮细胞中却检测到了.这种供体细胞与重构胚在基因表达上的一致性,似乎传达了这样一个信息:即供体细胞中已转录的基因,核移植后较易转录.核移植实验中发现的某些细胞比另一些更适合核移植,可能体现在重构胚的基因表达上.核移植若采用了较难重编程的细胞系或细胞类型,有可能更易导致重构胚基因表达的异常.根据这些实验,可以从基因水平决定哪些细胞类型或细胞系的细胞核移植后,重构胚有更高的发育潜能,从而为核移植中细胞类型的选择提供一定

的指导.但必须指出的是,从基因表达水平研究供体细胞的类型,这方面的探索还不多,还需要检测大量的基因.

3 供体细胞的来源和培养代数

目前体细胞核移植所用的供体细胞多数经过体外培养,其来源和培养代数成为实验考虑的因素.

3.1 供体细胞的来源

供体细胞的来源是指提供原代培养组织的动物,主要指动物的年龄.比较培养的成年牛、胎牛、牛犊成纤维细胞发现,在相同时间内,培养的成年牛细胞 G1 期细胞比例比胎牛和牛犊细胞的高.这对于供体细胞的选择有重要意义.若以 G1 期细胞做供体,来自成年牛、胎牛、牛犊细胞克隆胚胎的囊胚率和囊胚细胞数无明显差别,似乎年龄对胚胎的体外发育无明显影响^[22].但 Heyman 等^[23]以胚胎细胞、胎儿细胞和成年牛细胞做供体核移植后,统计出生率,发现克隆后代的出生率从胚胎细胞到成年牛细胞逐渐降低.也许供体细胞的年龄对核移植的影响要在整个个体发育中才显示出来.

3.2 供体细胞的培养代数

克隆技术的一个重要应用是用于生产转基因动物.即利用基因转染技术,得到含有目的基因的体细胞,经核移植,导入去核卵母细胞中,发育为携带有目的基因的克隆动物.有研究指出,供体细胞的培养代数与囊胚率的高低有关. Arat 等^[24]克隆转基因牛发现,培养 15 代的细胞核移植后,囊胚率高于培养 10、11、13 代的细胞. Chikara 等^[25]用培养 5、10、15 代的牛耳皮肤成纤维细胞发现,第 10、15 代细胞核移植囊胚率高于第 5 代细胞的囊胚率,并生出了核移植牛.这说明培养代数高的细胞比代数低的细胞克隆效率高,目前对这一现象还没有合理的解释.

4 结 语

供体细胞的选择影响到重构胚的倍性、核的重编程程度、重构胚的发育及克隆后代的出生.选择合适的供体细胞在克隆技术应用中有重要的实际意义.动物克隆从最初的胚胎细胞克隆发展到体细胞克隆、终端分化细胞克隆,已取得了很多突破性的进展.相信随着研究的系统和深入,会有更多的信息加入进来,使这项技术不断地发展、完善.

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 Kasinathan P, Knott J G, Wang Z, *et al.* Production of calves from G1 fibroblasts. *Nature Biotech*, 2001, **19** (12): 1176~1178
- 3 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): 505~509
- 4 Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, *et al.* Production of male cloned mice from fresh, cultured and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol Reprod*, 2000, **62** (6): 1579~1584
- 5 Shin T, Kraemer D, Pryor J, *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, **415** (6874): 859
- 6 Chesne P, Adenot P G, Viglietta C, *et al.* Cloned rabbit produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotech*, 2002, **20** (4): 366~369
- 7 Boquest A C, Day B N, Prather R S, *et al.* Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol Reprod*, 1999, **60** (4): 1013~1019
- 8 Edward J L, Dorado C M, Wilson T J, *et al.* Development of cloned embryos reconstituted with serum fed or starved adult granulosa cells. Program of the 27th annual meeting of the international embryo transfer society, Omaha, 2001
- 9 Gibbons J, Arat S, Rzucidlo J, *et al.* Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol Reprod*, 2002, **66** (4): 895~900
- 10 Lai L, Tao T, Machaty Z, *et al.* Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblast as donors. *Biol Reprod*, 2001, **65** (5): 1558-1564
- 11 Tani T, Kato Y, Tsunoda Y, *et al.* Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol Reprod*, 2001, **64** (1): 324~330
- 12 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** (3): 300~306
- 13 Wakayama T, Yanagimachi R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev*, 2001, **58** (4): 376~383
- 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 Reprod Fertil*, 2000, **120** (2): 231~237
- 15 Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*, 2002, **415** (6875): 1035~1038
- 16 Loi P, Clinton M, Barboni B, *et al.* Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation. *Biol Reprod*, 2002, **67** (1): 126~132
- 17 Tian X C, Xu J, Yang X. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat Genet*, 2000, **26** (3): 272~273
- 18 Miyashita N, Shiga K, Yonai M, *et al.* Remarkable differences in telomere length among cloned cattle derived from different cell type. *Biol Reprod*, 2002, **66** (6): 1649~1655
- 19 Coviello-McLaughlin G M, Prowse K R. Telomere length regulation during postnatal development and aging in *Mus spretus*. *Nucleic Acid Res*, 1997, **25** (15): 3051~3058
- 20 Betts D H, Bordignon V, Hill J R, *et al.* Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (3): 1077~1083
- 21 Daniels R, Hall V J, French A J, *et al.* Comparison of gene transcription in cloned bovine embryos produced by different nuclear transfer techniques. *Mol Reprod Dev*, 2001, **60** (3): 281~288
- 22 Forsberg E J, Strelchenko N S, Augenstein M L, *et al.* Production of cloned cattle from *in vitro* system. *Biol Reprod*, 2002, **67** (3): 327~333
- 23 Heyman Y, Palmer P C, LeBourhis D, *et al.* Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod*, 2002, **66** (1): 6~13
- 24 Arat S, Rzucidlo S J, Gibbons J, *et al.* Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2001, **60** (1): 20~26
- 25 Chikara K, Hiroshi Y, Junichi T, *et al.* Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (3): 990~995

Advances in Donor Cell Selection and Efficiency of Animal Cloning*

BI Chun-Ming, WEN Duan-Cheng, CHEN Da-Yuan**

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

Abstract Although much progress has been achieved in the last few years, mammalian cloning is still inefficient. Donor cell selection is critical for the success of cloning animal, and it is also an important factor affecting the cloning efficiency. The progress of cloning animal using donor cells of different cell cycle, cell type, cell resource and cell differentiation degree has been summarized.

Key words nuclear transfer, mammal clone, donor cell, cell cycle, cell type, cloning efficiency

* This work was supported by a special grant (Climbing-special-08) of The Climbing Project from The Ministry of Science and Technology of China and a grant from The Knowledge Innovation Project of The Chinese Academy of Sciences (KSCX1-05-01).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62560528, 86-10-62537815, E-mail: chendy@panda.iz. ac. cn

Received: January 20, 2003 Accepted: March 24, 2003