

克隆羊的成功及其在生命科学研究中的意义

静国忠

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

1997年2月Nature杂志报道了英国科学家Wilmut及其同事们将从胎羊及成年羊中分离出来的细胞系通过核移植(nuclear transplantation)技术成功地获得成活的羔羊^[1]. 这一实验的成功在科学界乃至世界各阶层人们的心中产生热烈的反响, 各国新闻机构也进行了各种的报道. Wilmut等是如何成功地克隆出成活的羔羊, 这一实验的成功在生命科学研究中的意义是什么呢?

1 历史的回顾

所谓利用核移植技术对动物进行克隆, 简单说就是将从处于不同发育阶段的细胞中分离出来的细胞核移植入去核的未受精卵中去, 使重新组建的“卵”细胞发育成新的动物个体.

细胞的全能性(totipotency)是指在适当条件下, 细胞表达其全部遗传信息的能力, 而发育成完整的充分分化的机体. 与植物细胞不同, 在动物发育过程中分化了的细胞不能再产生完整的充分分化的个体. 然而, 动物胚胎的生长、分化和发育是否造成体细胞基因组的不可逆的修饰, 或在发育过程中分化了的细胞是否仍具有与受精卵相同的核等价性(nuclear equivalency)或基因组连续性, 一直是发育生物学多年来要解决的问题. 用两栖动物所做的实验表明, 从早期胚胎细胞分离出的核在移植入去核的未受精的卵细胞后可以产生成体克隆, 但从在蝌蚪期或成体组织中分离出的核在进行核移植后不能产生成活的个体^[2]. 用哺乳动物所做的实验的成功率因取材而相差甚远, 从比8个细胞期老的小鼠早期胚胎细胞、全能的胚胎干细胞以及从内细胞群细胞(inner cell mass cells)所分离出的核都不能产生成活的胚胎^[3]. 然而从羊早期桑椹期胚胎(8~16个细胞期)所分离出的核以及分别从

羊和牛的胚泡(blastocysts)的胚盘所建立的多潜能/全能细胞中分离出的核, 进行核移植后都可以产生成活的后代, 这其中也包括Wilmut实验室在1996年发表在Nature上的工作^[4~6]. 那么, 从晚期胚胎组织、胎儿组织乃至成体组织中所分离出的细胞核通过核移植能否产生成活的后代呢? Wilmut等1997年2月在Nature杂志上报道的工作很好地回答了这一问题.

2 Wilmut等的实验工作

Wilmut等同时进行了三个水平的工作, 首先分别建立了从第9天羊胚的胚盘中得到的胚胎细胞、怀孕26天的羊胎儿细胞以及在孕期最后三个月的6年龄羊乳腺细胞的细胞系, 然后通过诱导使培养细胞处于G0期, 在此期细胞处于“完全”静止期, 无细胞分裂. 从G0期细胞分离出的细胞核通过核移植植入到刚刚去核处于中期II停顿期的羊卵母细胞中, 重建的“卵”细胞经过特定的培养进入束胚后, 植入到受体母羊的子宫中进行发育. Wilmut等从胚胎细胞、胎羊细胞以及6年龄成羊乳腺细胞所提供的供体核进行的核移植克隆中分别得到4、3、1只成活的羔羊, 分别占供体核的1.04%、1.74%以及0.36%. 尽管成功比例很低, 但毕竟第一次从胎儿, 特别是从成年哺乳动物细胞中通过核移植克隆出成活的羔羊.

3 对Wilmut等实验成功的分析

Stewart^[7]在介绍Wilmut等的工作时, 对他们实验成功的原因进行了分析. Stewart指出, Wilmut等的成功不是因为所用的细胞具有全能性(虽然Wilmut等所用的来源于母羊乳腺的细胞中, 可能含少量用以支持在妊娠期

乳腺再生的相对未分化的干细胞), 而是他们找到一种使供体核与受体卵母细胞更相容的方法. 无论是在两栖类还是哺乳类所进行的核移植研究都指出, 致使经核移植的卵母细胞不能正常发育的一个关键问题是供体核和受体卵母细胞之间的细胞周期不相容性. 由于这种不相容性, 当发育一旦启动, 被移植的供体核会产生染色体畸变, 导致核移植克隆失败. 在以前的实验中, 绝大多数用作分离供体核的哺乳动物细胞处于细胞周期的 S 期或 G2 期 (非二倍体期), 因此从这些细胞中分离出的供体核与处于二倍体的中期 II 停顿期的卵母细胞不相容. 当在 S 期或 G2 期的核植入到卵母细胞后, 它们倾向于进行另外的 DNA 复制和染色体超前凝聚, 结果导致产生非整倍体 (aneuploidy) 和畸型发育.

Wilmut 等通过血清饥饿法使分离供体核的细胞处于二倍体的 G0 期, 这样分离出的处于 G0 期的供体核在 DNA 复制的时间上与受体卵母细胞同步, 从而减少了核移植细胞在发育过程中产生染色体畸变的可能性, 在此基础上的正确的核、质相互作用可能是 Wilmut 等成功的关键之一.

Wilmut 等成功的另一些因素可能是从 G0 期细胞分离出的供体核的染色质更易接纳来自于卵母细胞中的一些“重塑因子” (remodeling factors, 诸如转录因子和染色质结合蛋白等). 再者对于羊而言, 胚胎基因组的转录一直到 8 ~ 16 个细胞期才开始, 而在小鼠中转录发生在 2 个细胞后期. 这种转录起始时间的差异在理论上将允许羊胚胎有更充裕的时间 (与鼠相比至少有两轮细胞周期) 对植入的成体羊细胞核进行重新编程, 使其进入胚胎发育期. 如果这后一种分析是 Wilmut 等成功的重要因素的话, 那么要在其他物种上重复羊的结果就可能会出现, 因为胚胎转录的起始时间因物种而异.

总之, 通过核移植产生的胚胎的正常发育依赖于细胞保持正常的染色体的整倍性和受体细胞能为供体核基因的表达提供相匹配的条件. Wilmut 等选用处于 G0 期的供体核和处于

中期 II 停顿期去核的卵母细胞作为受体细胞, 保证了核移植克隆羊实验的成功.

4 克隆羊实验成功的意义

Wilmut 等克隆羊实验的成功无论在发育生物学理论上还是在应用上都具有重大的意义. 在理论上, 它确证了动物胚胎的生长、分化和发育过程并不对基因组 (除了免疫球蛋白和 T-细胞受体基因) 造成不可逆的修饰, 在发育过程中已分化的体细胞核仍具有与受精卵相同的核等价性或基因组连续性. 已经分化了的体细胞核在适当的条件下可以被重新编程, 发育成新的个体. 这一实验的成功将对动物发育过程中基因表达的调控以及发育生物学、遗传学的理论发展产生深远的影响, 同时也对老年学、神经生物学的发展开辟了一条崭新的思路. 在实际应用上, 首先它为人们提供了一个如何利用动物体细胞克隆动物个体的成功方法, 虽然这种方法仍然处在初期发展阶段, 很多的具体理论和技术手段还需要通过更多的实验来验证和完善, 但它必将为家畜育种学, 哺乳动物的基因工程的发展提供一个成功的细胞工程手段, 可以想见, 以此技术为出发点, 基因工程和细胞工程的结合, 将为人类获得哺乳动物新品种做出贡献.

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**: 810~ 813
- 2 Gurdon J B, Laskey R A, Reeves O R. The developmental capacity of nuclei transplanted from ketatinized skin cells of adult frogs. *J Embryol Exp Morph*, 1975, **34**: 93~ 112
- 3 Cheong H T, Takahashi Y, Kanagawa H. Brith of mice after transplantation of early-cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol Reprod*, 1993, **48**: 958~ 963
- 4 Campbell K H S, Mcwhir J, Ritchie W A *et al.* Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, **380**: 64~ 66
- 5 Sims M, First N L. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 6143~ 6147
- 6 Willadsen S M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 1986, **320**: 63~ 65
- 7 Stewart C. An udder way of making lambs. *Nature*, 1997, **385**: 769~ 771