

正常胚胎与核移植重构胚发育中的生物学变化比较

隋进强, 高文超, 左秀荷, 雷安民*

西北农林科技大学动物医学院, 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100

摘要: 本文介绍了正常胚胎和核移植重构胚发育过程中的生物学变化, 从细胞形态学和分子机理两方面阐述了二者之间的差异, 总结了影响核移植重构胚胎发育的主要因素。在细胞形态学上着重探讨了卵子染色体结构变化对于卵重编程作用的影响, 在分子水平上对卵子组蛋白与供核细胞组蛋白的置换进行了讨论, 理论上为核移植效率的提高提供了借鉴。

关键词: 正常胚胎; 核移植胚胎; 染色体结构变化; 组蛋白置换

DOI:10.3969/j.issn.2095-2341.2012.04.04

The Comparison of Development Biological Changes Between Normal Embryos and Nuclear Transfer Embryo

SUI Jin-qiang, GAO Wen-chao, ZUO Xiu-he, LEI An-min*

Shaanxi Center of Stem Cells Engineering & Technology, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Shaanxi Yangling 712100, China

Abstract: In this paper, we introduced biological morphological change during development of normal embryos and cloned embryos, elaborated the difference from the morphological and molecular mechanism between the two, and summed up the main factors which impact the development of reconstruction of nuclear transfer embryos. Moreover, we discussed morphology in the cells focused on chromosome structural changes to the effect of egg reprogramming, at the molecular level the replacement between the egg histone and the cell histone, in theory, to provide a reference to improve the efficiency of nuclear transfer.

Key words: normal embryos; cloned embryos; chromosome structural changes; histone replacement

哺乳动物体外受精技术的发展与完善, 使受精过程可以在体外环境中完成, 这一技术为人们对受精过程中的生理现象进行实时的追踪观测提供了途径。近年来, 细胞核移植技术, 尤其是体细胞核移植技术的发展, 使人类有可能像植物苗木扦插育苗一样快速扩繁家畜中的优良个体。但是, 目前体细胞核移植技术的效率还很低, 出生的克隆个体绝大部分存在着各类缺陷, 出生后死亡率非常高, 其主要原因在于人们对细胞核移植过程中相关的细胞生物学事件及其分子生物学机理的研究还不透彻。

本文对近年来细胞核移植过程中相关的生物

学事件及其分子生物学机理作一综述, 希望为相关研究提供借鉴。

1 正常受精胚胎发育过程

正常受精过程中, 精子进入卵细胞质后, 首先引发钙离子波动和第二极体排出, 接着形成雌雄原核, 然后雌雄原核融合, 进入合子的第一次有丝分裂。而第二极体的排出就标志着卵细胞减数分裂过程的完成, 同时标志着合子有丝分裂的开始。

1.1 细胞生物学变化

正常体内人工授精时, 一般以输精时间作为

收稿日期: 2012-04-21; 接受日期: 2012-06-13

基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2009JM3008)资助。

作者简介: 隋进强, 硕士研究生, 主要从事卵子成熟、牛体外受精研究。* 通讯作者: 雷安民, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事哺乳动物生殖生物学和胚胎生物技术研究。Tel: 029-87080068; E-mail: anminleiryan@nwsuaf.edu.cn

受精过程的时间起始点;而体外受精研究中,把精卵混合作为受精过程的时间起始点,以后发生的过程均以该时间为基点计算。

1996年,孙青原等^[1]对小鼠体外受精过程中卵超微结构的变化进行了研究,其结果表明:受精后1 h精子进入卵子,2 h左右形成雄原核,雌原核的形成稍早于雄原核。受精后8~9 h两性原核相互靠近,而小鼠原核期胚胎的第一次卵裂多发生在受精后22 h左右。

最早的牛体外受精卵原核形成的报道见于1988年,Hyttel等^[2]利用超数排卵技术处理青年母牛,然后进行人工授精。他们对于受精时间的界定是以LH峰(LH peak)为基点进行,即LH峰就是排卵点。排卵后的4 h左右,雌雄原核开始形成,5~7 h原核开始膨胀,第19 h,两个原核相互靠近并发生融合。第23 h发生第一次卵裂。

随后,Xu等^[3]观察了牛体外受精过程各事件的发生规律,他们将受精过程分为6个事件点,分别为精子入卵(sperm penetration)、精子头部核去浓缩(sperm head decondensation)、雄原核形成(male pronucleus formation)、第二极体抛出(throw out the second polar body)、卵染色体去浓缩(female chromosome decondensation)和雌原核形成(female pronucleus development)等。其研究结果表明,受精后6 h精子入卵,7~8 h后精子完成去浓缩过程,在10~12 h形成雄原核,第一次卵裂约发生于受精后28 h。

1996年,孙青原等^[4]对牛体外受精过程中卵超微结构的变化进行了研究。结果表明,在精卵混合后3 h左右精子进入卵细胞质,5 h左右卵子释放第二极体,8 h左右形成原核,并逐渐向卵细胞中央移动,到24 h左右,基本位于卵细胞的中央位置。

根据以上研究结果可以看出,对于体内的受精胚胎,原核形成时间约在受精后4 h,而体外受精胚胎原核形成的时间变化较大。Xu等^[3]的结果是受精后10~12 h,而孙青原等^[4]的结果则是在受精后8 h左右,更接近于体内受精的结果。这种差异可能由体外受精过程中具体操作的不同引起。但整体上讲,牛体外受精过程较体内受精过程慢。

受精过程的精子在细胞水平上有两个重要事件,第一是精子进入卵子后的去浓缩过程,第二是

精子雄原核形成,这两个形态学过程其实就是精子核被卵细胞质重塑的过程。

1.2 分子生物学机理

在分子生物学水平上,卵子在M II期的维持机制是受精生物学所关心的核心事件之一。细胞静止因子(cells station factor, CSF)的存在是卵子在M II期维持的关键。CSF可以稳定成熟促进因子(maturation promote factor, MPF)的活性,MPF是一个异源二聚体,由周期依赖性蛋白激酶-1(CDK1)和周期蛋白B(cyclin B)亚基组成。MPF稳定存在即可以使卵子停滞在M II期。目前,CSF的具体成份尚不清楚,有研究显示Emi2是可能的候选因子之一。MPF具有丝氨酸/苏氨酸激酶作用,它可以参与核小体连接组蛋白H1、核孔蛋白(nucleoporin)、核纤层蛋白(lamin)、浓缩素(condensin)复合体、RNA聚合酶(RNA polymerase)以及细胞质内的肌球蛋白(cytoplasmic myosin)等底物的磷酸化过程^[5]。核小体连接组蛋白H1、核孔蛋白、核纤层蛋白和浓缩素复合体的磷酸化促使了核膜崩解与染色体浓缩状态的形成,RNA聚合酶的磷酸化使得卵子的转录活动进入静默状态,肌球蛋白的磷酸化则使得处于中期的纺锤体肌球蛋白处于静止状态,阻止中期染色体的分离。这些作用最终促使细胞/卵子进入有丝分裂中期并停留在中期。目前认为精子进入卵细胞后所诱发的一系列形态学变化都与MPF的活性变化相关。

精子入卵后,会诱发卵细胞内持续的钙离子波动,从而激活钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)。最近基因敲出^[6]和基因敲除^[7]研究已经确定CamK II在受精过程中负责的钙信号转导。CaMK II可以通过特定信号途径激活后期驱动复合体(anaphase promoting factor/complex, APC/C)。APC/C是一种泛素化作用复合体,它可以对蛋白质进行泛素化标记并对蛋白质进行降解,从而达到调控蛋白质功能的作用。APC/C活化后可以降解卵子静止紧密相关的两个分子,即周期蛋白B和染色体禁锢因子(securine),使卵子内的MPF的活性下降或消失,这样卵子完成第二次减数分裂过程。

在小鼠中,精子入卵后,钙离子波动会持续大约4 h左右,而后形成原核,原核形成会导致钙波

的终止。目前的研究结果表明,钙离子波动的维持需要 CDK1 活性的存在,即需要 MPF 活性的存在,CDK1 活性的消失是原核形成的条件^[8]。

致密的精核进入卵细胞质后,精子染色体上与 DNA 紧密结合的鱼精蛋白(类组蛋白)会快速地被卵细胞质内特异性的组蛋白 H1foo 等所置换,这一过程使精子染色体的结构变得疏松,精子核整体出现膨胀,在形态学上表现为精子头核去浓缩(sperm head decondensation)。卵细胞质内特异性的组蛋白 H1foo 等对于精核内鱼精蛋白的置换需要 MPF 的活性存在,同时卵内特定的分子伴侣核浆素(nucleoplasmin)对于置换过程的完成也起着重要的作用。这种置换可能有助于打开精子致密的染色体结构,使卵内的各类生物分子接近精子核,启动新个体的发育。另外,精子核进入卵细胞质后,卵内的 MPF 活性快速下降,这可能也促进了精子核的去浓缩。

随着 MPF(即 CDK1)活性的逐步消失,雄原核也逐渐形成。雄原核形成的分子生物学机制目前仍未完全明了,但从目前与 MPF 相关的研究结果来看,可初步作出以下推论:在 MPF 高活性状态下,核孔蛋白、浓缩素复合体、核纤层蛋白及核小体连接组蛋白 H1 等底物的磷酸化状态是导致染色体浓缩和核膜崩解的分子生物学机制;但是随着受精后 MPF 活性的持续下降,这些底物的磷酸化状态不能够继续维持而发生去磷酸化作用,该过程使得微膜泡在核孔复合体与核纤层蛋白的组织下重新形成核膜结构,染色体的结构也由于浓缩素复合体的去磷酸化作用而逐渐变得松散。

2001 年, Mitalipov 等^[9]对短尾猴卵母细胞孤雌激活的实验研究表明,应用离子霉素配合使用 MPF 的特异性抑制剂 Roscovitine 激活卵母细胞,其效果不如离子霉素配合使用非特异性的磷酸激酶抑制 6-DMAP,由此推断,核膜的形成可能涉及多条信号通路。

1998 年, Liu 等^[10]在对牛卵母细胞激活的研究中,将卵母细胞的激活分为两种情况,一种为完全的激活(full activation),这种激活过程不但引发了 MPF 活性下降,而且导致了 MAPK 活性的下降,结果是第二极体排出并有原核形成;另一种称之为不完全激活(partial activation),该过程引发了 MPF 活性下降,但是 MAPK 活性却维持在较高水平,结果是第二极体排出但没有原核形成。根

据这一结果,研究者认为 MPF 活性下降是卵母细胞离开 M II 期的条件,而 MAPK 活性下降则是原核形成的条件。

本实验室的研究结果表明,牛卵母细胞核成熟(完成第一极体排放)后,卵细胞内的染色体呈团簇状排列,尚未真正进入 M II 期,在真正进入 M II 期之前,染色体结构与形态仍需一段时间调整,大约在卵母细胞成熟培养 26~28 h 左右,才完全形成排列整齐、结构较为致密的赤道板。在赤道板结构没有完全形成之前,单独使用钙离子载体类物质(如钙离子载体 A 和离子霉素等)很难激活卵母细胞,原因可能在于此时卵母细胞质内仍然持续的合成周期蛋白 B,激活处理引发的 MPF 活性下降尽管可以使卵母细胞完成染色体的分离和第二极体抛出,但卵母细胞内周期蛋白 B 的快速合成使 MPF 活性得以恢复,这样就使得卵母细胞无法完成 M II 期到末期的彻底转换,而停留在所谓的 M II 期。卵母细胞成熟培养 26~28 h 左右,卵母细胞质内周期蛋白 B 的合成接近停止,MPF 活性达到最高,此时激活处理引发的 MPF 活性下降较快,因此卵母细胞更容易被激活。而当钙离子载体激活配合蛋白质激酶抑制剂或者蛋白质合成抑制剂时,MPF 活性恢复的可能性消失,因此可以使 MPF 活性较快下降,所以能够完成卵母细胞的完全激活。

2 核移植胚胎发育过程

哺乳动物细胞核移植的过程中,供体细胞核进入卵细胞质后的形态学变化与受精过程中精子核的形态学变化有极大的相似性。经过 20 多年的研究积累,人们对供体细胞核进入卵细胞质后的形态学变化及其相关的分子生物学机理有了一些初步认识。这方面的进一步研究,有助于揭示细胞核移植的机理,促进核移植技术的应用。

2.1 细胞生物学变化

早在 1969 年, Graham 等^[11]就将分化的体细胞与激活后的小鼠卵细胞融合,观察到体细胞染色体的去浓缩和核肿胀现象。1984 年, Czolowska 等^[12]将新生小鼠淋巴细胞注射到乙醇激活/未激活的小鼠卵内,较为系统地观察淋巴细胞核在其中的变化规律。在未激活的卵内,淋巴细胞核发生早期染色质浓缩(premature chromosome

condensation, PCC), 染色体以单条染色体浓缩状态存在, 它们在有些卵内分布在整个细胞质内; 而在激活后的卵内, 淋巴细胞核直接形成原核样的核, 在随后的 24 h 的培养过程中, 体积增加为原体积的 200 倍之多, 最后体积与正常胚胎原核相近。卵细胞激活与淋巴细胞融合之间的时间间隔对于淋巴细胞核的这种形态变化影响明显。在卵激活前 10 ~ 30 min 或者激活后 60 min 之内将淋巴细胞导入, 其核迅速膨胀, 甚至超过雌原核的体积。卵子激活 30 min 之前进入的淋巴细胞, 在发生 PCC 后, 往往不能形成正常形态的核, 而是形成微核结构; 卵子激活 60 min 之后进入的淋巴细胞, 其核变化不明显, 发育基本停滞。

1988 年, Szollosi 等^[13] 用小鼠淋巴细胞和卵母细胞构建核移植胚胎, 观察淋巴细胞核重塑过程。淋巴细胞进入卵细胞质后发生完全的形态学重塑 (complete nuclear remodeling), 包含核膜破裂 (nuclear envelope breakdown) 和超前染色质浓缩 (premature chromosome condensation) 以及紧接着发生原核样核的形成 (formation of pronucleus-like nucleus) 等几个环节。完全的核重塑只出现在处于减数分裂 M II 期到末期的小鼠卵内, 这个时间段很短, 并且处于卵内 MPF 高峰期。如果淋巴细胞与原核期的卵细胞质融合, 那么淋巴细胞核基本维持其自身原有状态, 但是核膜会出现一些轻微膨胀, 形成发泡样的细胞核膜 ('Blebbing' of the nuclear envelope) 结构, 这种形态学的变化说明, 受精后的卵细胞质对于淋巴细胞仍然有一些重编程的作用^[14], 1998 年, Sutovsky 等^[15] 证明了牛卵内含有大量的核孔复合体蛋白, 这些蛋白质在胚胎的早期发育过程中有重要作用, 可能参与了受精后卵细胞质对于引入的淋巴细胞细胞核产生的作用, 导致了发泡样的细胞核膜结构的形成。

上述研究结果表明, 对于小鼠, 供体细胞核进入高 MPF 活性的卵细胞质后, 会发生一个“完整的”重编程过程, 即完全包含核膜破裂、染色质浓缩及原核样核的形成等 3 个环节; 而当供体细胞核进入低 MPF 活性的卵细胞质后, 核膜会出现一些轻微膨胀, 形成发泡样的细胞核膜结构 (可以称之为“非完整的”重编程过程)。1998 年, Wakayama 等^[16] 利用压电陶瓷注射系统进行小鼠体细胞克隆试验, 该研究通过延长体细胞注入卵

细胞质到激活卵细胞质的时间间隔, 增加高 MPF 活性的卵细胞质对供核细胞的作用时间, 获得较高的体细胞克隆率。该结果表明一个“完整的”重编程过程在小鼠体细胞克隆中的重大意义。

这一结果对于其他动物也有一定的指导意义, 但不同物种之间存在着差异。1996 年, Campbell 等^[17] 利用饥饿培养法获得的绵羊胚胎传代细胞进行核移植得到了克隆后代, 试验过程中, 通过延长重组胚胎融合与激活之间的时间间隔, 可增加高 MPF 活性的卵细胞质对供核细胞的作用时间, 有助于卵母细胞对体细胞的去分化作用。对猪的体细胞核移植研究发现, 通过延长重组胚胎融合与激活之间的时间间隔, 也提高了核移植的效率^[18,19]。但也有报道称, 在猪核移植研究中, 长时间暴露在高 MPF 活性卵细胞质内有降低囊胚的趋势^[20]。

Aston 等^[21] 对牛的研究结果表明, 在 2.5 h 之内, 增加体细胞注入卵细胞质到激活卵细胞质的间隔, 可延长高 MPF 活性卵细胞质对供核细胞的作用时间, 进而提高囊胚的发育率, 但是一旦超过 2.5 h, 反而会降低囊胚的发育率, 这一结果与猪核移植的研究结果相似。Sung 等^[22] 发现, 牛体细胞克隆中, 超前染色质浓缩对于牛体细胞重编程不是必需的, 即形态学上的“非完整的”重编程过程对于牛的体细胞核去分化已经足够。这个结果反映了不同物种间体细胞重编程的差异。大鼠克隆的技术过程似乎更能说明不同物种间体细胞重编程对卵细胞质内 MPF 活性的不同要求。由于大鼠卵内的 MPF 活性相对较低, 降低速度很快, 因此 Zhou 等^[23] 在克隆大鼠时, 利用 MG132 抑制 APC/C 复合体对于周期蛋白 B 的降解, 从而使得大鼠卵内的 MPF 活性可以在较高的水平维持更长的时间 (可以达到 3 h), 结果促进了大鼠卵对体细胞核的重新编程。

在核移植过程中除过上述染色体形态学变化对于供体细胞核重编程的影响外, 原核形成的数量是另外一个关键因素。核移植与受精过程的区别在于, 核移植胚胎的二倍体核型需要通过体细胞本身染色体活动变化来调整, 而受精过程中, 卵子会抛出第二极体, 形成单倍体的原核, 而缺少的染色体则由精子带入的核物质补充。所以核移植过程中正常二倍体核型的维持也是克隆成功的基础和关键。在卵子的孤雌激活过程中, 通过激活

卵子使其进入第一次有丝分裂,同时防止其排出第二极体,从而使得其核型维持于二倍体并形成一一个类原核。核移植试验中,可以添加放线菌酮(或称亚胺环己酮)并配合细胞松弛素 B,不但可以抑制染色体的复制,还可以阻止第二极体的排出,从而保证核移植胚胎的正常二倍体核型。

2001年,Lai等^[24]利用G2/M供体细胞进行猪的核移植研究。结果表明,四倍体的G2/M供体细胞通过排出第二极体后,形成1PN+1PB(PN表示原核样核,PB表示极体)或2PN+1PB的重组胚胎,其发育最好。而来自于G0/G1期的细胞则多数形成1PN+0PB(78.3%,65/83),少部分形成1PN+1PB(21.7%,18/63)。因此,正常二倍体核型的维持是核移植胚胎顺利发育的前提。

2.2 分子生物学机理

对于核移植胚胎,在分子生物学水平上应当关注两点,第一是“完整的”重编程过程与“非完整的”重编程过程的分子生物学机理;第二是体细胞重编程的分子生物学实质是什么。

“完整的”重编程过程与“非完整的”重编程过程的不同在于卵内MPF活性的差异。就目前的研究结果而言,使供体核产生形态学变化的作用因子主要是MPF。“完整的”重编程过程与受精过程中卵细胞质对于精子核作用的机理是一致的;而“非完整的”重编程过程的特点是体细胞核的膨大和形成发泡样的细胞核膜结构。其原因在于,在MPF低活性状态下,核孔蛋白复合体、核纤层蛋白等与核膜结构相关底物的磷酸化状态不能够维持,于是参于到供体核的结构重建中,导致供体细胞核的膨大。核膜膨大一方面为核内的染色体提供更大的结构变化空间,另一方面可能也促进了供体核内物质与卵细胞质内物质的互换,有利于卵细胞质对供体核进行重编程作用。

卵细胞质对供体细胞核的作用在染色体水平上表现为卵特异性连接组蛋白将体细胞型连接组蛋白置换。2004年,Gao等^[25]和Takahide等^[26]同时发现,在受精卵和核移植胚胎中都存在着卵特异性连接组蛋白对精子鱼精蛋白/体细胞型连接组蛋白的置换,这种置换过程可能是卵细胞质对外来核进行重编程的分子生物学基础。由于连接组蛋白在维持染色体空间结构中发挥重要作用,这种连接组蛋白的替换使得供体细胞核的染

色体结构与状态更接近于早期胚胎的染色体状态。卵细胞质内的MPF活性和核质蛋白的磷酸化状态等因素都影响着卵特异性连接组蛋白对精子鱼精蛋白/体细胞型连接组蛋白的置换进程。在卵细胞质内存在的卵特异性连接组蛋白,由此可知染色体的空间结构的变化应当是基因重新编程的基础。近期有关iPS的研究结果也表明,引起染色体空间结构的变化是iPS能够成功的前提之一。Takahashi等^[27]认为,体细胞逆分化为iPS细胞必须具备:①染色质的广泛松解导致多能性转录因子的表达;②在此基础之上的细胞凋亡的抑制。该研究中转录因子起到不同的作用:c-Myc可以使全基因组广泛去甲基化以松解染色质,使oct3/4和sox2接近各自的转录调节位点发挥下游基因转录,进而使细胞获得多能性;klf4则扮演了两个角色,一方面作为oct4和sox2的协同因子,另一方面发挥抑制细胞凋亡的作用。从中可以看出染色体结构的打开无疑是多能性干细胞诱导成功的关键所在。除了利用特定的转录因子打开染色体结构外,利用细胞正常有丝分裂过程中的染色体结构的变化过程,也可以起到有效的去分化作用。例如,Eqli等^[28]将位于细胞有丝分裂中期的细胞核移植到位于第一次有丝分裂中期的原核期小鼠胚胎中,成功的得到核移植小鼠。这一结果更充分表明了染色体结构的变化在细胞去分化过程中的作用,同时也在细胞周期变化与细胞的全能性之间建立了一个节点。

除了卵内MPF活性高低所存在引起的“完整的”或“非完整的”重编程以及卵特异性连接组蛋白的互换之外,还有很多其他生物学大分子在体细胞核进入卵细胞之后发挥了去分化的作用,例如卵细胞内的特异性甲基化转移酶、乙酰化酶等,此外,MPF活性的变化除引起染色体结构性的变化外,还使组蛋白的磷酸化状态发生变化,导致染色体空间结构进一步变化,从而引起基因表达的变化。卵内储备的大量的泛素化物质在体细胞核的重编程中也有一定的反作用,在大鼠克隆中利用MG132抑制APC/C复合体的作用,获得了MPF活性更长时间的维持,但这种作用也有可能阻止泛素化对于供核细胞成份的降解,对于供核细胞重编程可能有阻碍作用^[29]。对于上述这些分子在体细胞去分化中作用的认识还远远不够,需要进行更深入的研究。

3 核移植胚胎发育的影响因素

如果能够使得体细胞核移植的细胞学变化与分子生物学事件有效地接近于正常胚胎发育过程中的变化,这种处理可能更有利于核移植的胚胎发育接近正常胚胎的发育。根据上述卵细胞对精子和体细胞的作用机理,结合具体试验研究的报道,可以考虑从以下几个方面对体细胞核移植进行更为深入的研究,以便于未来改善体细胞核移植的效率。

3.1 首先解决卵细胞质量对于克隆胚胎发育的影响

受精与体细胞核移植过程中,精子核与供体细胞核都是在卵母细胞质的主导下发生一系列的形态学变化。猪体外成熟的卵母细胞,其细胞形态学的变化往往慢于体内成熟的卵母细胞,这种精子核变化的滞后被认为和卵细胞的成熟质量紧密相关^[30]。卵细胞质内相关物质的含量对这一过程的影响非常大,而卵母细胞的成熟质量无疑是影响这些物质含量的关键因素之一。

3.2 提前处理供体细胞,使其状态更有利于重编程

通常情况下,分化程度低的细胞核移植的效率相对于体细胞要高些,如胚胎分裂球的核移植效率就比体细胞高。以此推论一些组织特异性的干细胞其核移植效率应该高于完全分化的体细胞,然而 Inoue 等^[31]利用小鼠造血干细胞进行的核移植研究却表明,造血干细胞的核移植效率比体细胞还低。这一研究结果提示,某些类型的细胞,其可塑性很差,或者说染色体的结构状态比较稳定,难以进行基因结构的重新调整。2006年, Belloch 等^[32]在小鼠体细胞核移植中的研究结果表明,细胞的分化状态和表观遗传状态对于体细胞核移植的重编程都具有重要影响。

哺乳动物核移植胚胎与自然受精胚相比,都存在 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化等表观修饰的异常^[33]。人为干预供体细胞表观修饰水平能够提高核移植的效率。动物克隆研究中常用的表观遗传修饰剂有 5-氮-2'-脱氧胞苷(5-aza-dC)、S-adenosyl homocysteine(SAH)、Trichostatin(TSA)和 Scriptaid 等,前两者是以 DNA 甲基转移酶为靶点

的 DNA 甲基化转移酶(DNA methyl transferase, DNMT)抑制剂,后两者是以组蛋白去乙酰化酶为靶点的组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HADGi)。Enright 等^[34]曾用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-aza-dC 处理供体核,结果发现 0.01 $\mu\text{mol/L}$ 5-aza-dC 即可显著提高牛重构胚的融合率、卵裂率和囊胚率。另外,温兵强等^[35]在重构胚培养过程中加入 Scriptaid,实验证明,也可以显著提高绵羊核移植重构胚的囊胚发育率。

3.3 卵细胞质与供体细胞核的协调互作

在卵细胞质量和供体细胞都确定的情况下,积极采取一些措施,使卵细胞质与供体细胞核的互作更加彻底,将会极大的促进体细胞核移植效率。De Sousa 等^[36]的研究表明,通过延长融合与卵激活之间时间间隔的办法,能够提高猪体细胞核移植的效率,但是,过长时间的间隔反而会降低核移植效率^[21]。如何在方法学上提高核移植的效率,则依赖于研究者对于核移植重编程过程与机理的深入了解与认识。2009年,本实验室对牛体细胞核移植的显微操作过程进行了优化,并成功产下克隆牛犊。具体的优化程序为:采用 Spindle view 系统对牛卵母细胞进行去核操作,并将供核体细胞注射到卵周隙内,然后通过电融合法(电融合参数为 1.9 kV/cm,脉冲时程 10 μs ,方波 2 次间隔 2 s)将供体核引入去核卵细胞质^[37]。

4 提高核移植的效率亟待研究的问题

4.1 在细胞水平上的一些处理

如何在细胞水平上进行一些处理,达到提高核移植效率的目的,仍是需要进一步研究讨论的问题。已知通过延长体细胞注入卵细胞质到激活卵细胞质的时间间隔,可增加高 MPF 活性的卵细胞质对供核细胞的作用时间,获得较高的体细胞克隆率;人为应用一些表观遗传修饰剂如 5-aza-dC、SAH、TSA 和 Scriptaid 等可干预供体细胞表观修饰水平,提高核移植的效率。

4.2 亚细胞水平上一些亟待研究的问题

在亚细胞水平上,核移植过程可以理解为细胞内染色体的形态学变化,各种细胞器功能状态的变化。细胞器如线粒体、高尔基体等皆参与核

移植过程,在目前的克隆研究中,人们通常只考虑细胞核基因组的重编程过程,而忽视了细胞质遗传物质在克隆过程中的重编程过程,线粒体具有独立的遗传物质,早期胚胎发育过程对能量的要求很高,因此,对线粒体的研究显得尤为重要。对于异种动物核移植的线粒体,必须加强异种克隆胚胎内线粒体融合、分裂过程的研究。对于远缘异种核移植胚胎,还应当注意加强胚胎内以卵源线粒体为主向以供核线粒体为主的转换过程和规律的研究。

4.3 分子水平上一些需要深入研究的问题

在分子水平上,供体核 DNA 空间构象的变化、DNA 上组蛋白的各类修饰的变化等影响着核移植过程。了解体细胞核移植与受精过程中连接组蛋白的置换过程的差异,对提高核移植的效率具有重要的意义。如本实验室针对卵母细胞特异性连接组蛋白 H1foo 对供体细胞内体细胞型连接组蛋白的置换过程进行了研究,希望能够通过荧光照相技术观察到组蛋白的替换过程。

参 考 文 献

- [1] Sun Q Y, Liu L, Li M W, *et al.* Chronological and morphological progression of nucleus during mouse oocyte maturation and fertilization *in vitro*[J]. *Dev. Reprod. Biol.*, 1996,5(1):24-33.
- [2] Hyttel P, Greve T, Callesen H. Ultrastructure of *in vivo* fertilization in superovulated cattle[J]. *J. Reprod. Fertil.*, 1988,82(1):1-13.
- [3] Xu K P, Greve T. A detailed analysis of early events during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes[J]. *J. Reprod. Fertil.*, 1988,82(1):127-134.
- [4] 孙青原,秦鹏春. 牛体外受精的程序及超微结构研究[J]. *动物学报*, 1996,42(3):303-308.
- [5] Jones K T. Meiosis: mouse eggs do their anaphase topsy-turvy[J]. *Curr. Biol.*, 2012,22(5):R153-R155.
- [6] Chang H Y, Minahan K, Merriman J A, *et al.* Calmodulin-dependent protein kinase gamma 3 (CamK II gamma3) mediates the cell cycle resumption of metaphase II eggs in mouse[J]. *Development*, 2009,136(24):4077-4081.
- [7] Backs J, Stein P, Backs T, *et al.* The gamma isoform of CaM kinase II controls mouse egg activation by regulating cell cycle resumption[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010,107(1):81-86.
- [8] Ducibella T, Fissore R. The roles of Ca²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development[J]. *Dev. Biol.*, 2008,315(2):257-279.
- [9] Mitalipov S M, Nusser K D, Wolf D P. Parthenogenetic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos [J]. *Biol. Reprod.*, 2001,65(1):253-259.
- [10] Liu L, Ju J C, Yang X. Differential inactivation of maturation-promoting factor and mitogen-activated protein kinase following parthenogenetic activation of bovine oocytes [J]. *Biol. Reprod.*, 1998,59(3):537-545.
- [11] Graham C F. The fusion of cells with one-and two-cell mouse embryos[J]. *Wistar. Inst. Symp. Monogr.*, 1969,9:19-35.
- [12] Czolowska R, Modlinski J A, Tarkowski A K. Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes [J]. *J. Cell Sci.*, 1984,69:19-34.
- [13] Szollosi D, Czolowska R, Szollosi M S, *et al.* Remodeling of mouse thymocyte nuclei depends on the time of their transfer into activated, homologous oocytes[J]. *J. Cell Sci.*, 1988,91(Pt 4):603-613.
- [14] Szollosi M S, Szollosi D. 'Blebbing' of the nuclear envelope of mouse zygotes, early embryos and hybrid cells[J]. *J. Cell Sci.*, 1988,91(Pt 2):257-267.
- [15] Sutovsky P, Simerly C, Hewitson L, *et al.* Assembly of nuclear pore complexes and annulate lamellae promotes normal pronuclear development in fertilized mammalian oocytes[J]. *J. Cell Sci.*, 1998,111(Pt 19):2841-2854.
- [16] Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M, *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [J]. *Nature*, 1998,394(6691):369-374.
- [17] Campbell K H, McWhir J, Ritchie W A, *et al.* Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line [J]. *Nature*, 1996,380(6569):64-66.
- [18] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, *et al.* Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. *Science*, 2000,289(5482):1188-1190.
- [19] Bethausser J, Forsberg E, Augenstein M, *et al.* Production of cloned pigs from *in vitro* systems[J]. *Nat Biotechnol*, 2000,18(10):1055-1059.
- [20] Liu L, Lee C, Moor R M. DNA synthesis, microtubule and nuclear dynamics in porcine parthenotes[J]. *Zygote*, 1996,4(2):139-144.
- [21] Aston K I, Li G P, Hicks B A, *et al.* Effect of the time interval between fusion and activation on nuclear state and development *in vitro* and *in vivo* of bovine somatic cell nuclear transfer embryos[J]. *Reproduction*, 2006,131(1):45-51.
- [22] Sung L Y, Shen P C, Jeong B S, *et al.* Premature chromosome condensation is not essential for nuclear reprogramming in bovine somatic cell nuclear transfer [J]. *Biol. Reprod.*, 2007,76(2):232-240.
- [23] Zhou Q, Renard J P, Le Fric G, *et al.* Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation[J]. *Science*, 2003,302(5648):1179.
- [24] Lai L, Tao T, Machaty Z, *et al.* Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblasts as donors[J]. *Biol. Reprod.*, 2001,65(5):1558-1564.
- [25] Gao S, Chung Y G, Parseghian M H, *et al.* Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice

- [J]. *Dev. Biol.*, 2004,266(1):62-75.
- [26] Teranishi T, Tanaka M, Kimoto S, *et al.*. Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer[J]. *Dev. Biol.*, 2004,266(1):76-86.
- [27] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006,126(4):663-676.
- [28] Egli D, Rosains J, Birkhoff G, *et al.*. Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes[J]. *Nature*, 2007,447(7145):679-685.
- [29] Whitworth K M, Zhao J, Spate L D, *et al.*. Scriptaid corrects gene expression of a few aberrantly reprogrammed transcripts in nuclear transfer pig blastocyst stage embryos [J]. *Cell Reprogram.*, 2011,13(3):191-204.
- [30] Huang J, Li T, Ding C H, *et al.*. Insufficient histone-3 lysine-9 deacetylation in human oocytes matured *in vitro* is associated with aberrant meiosis[J]. *Fertil. Steril.*, 2012,97(1):178-184.
- [31] Inoue K, Ogonuki N, Miki H, *et al.*. Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer[J]. *J. Cell Sci.*, 2006,119(Pt 10):1985-1991.
- [32] Blleloch R, Wang Z, Meissner A, *et al.*. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus [J]. *Stem. Cells*, 2006,24(9):2007-2013.
- [33] Mann M R, Bartolomei M S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo; struggle of the clones[J]. *Genome Biol.*, 2002,3(2):S1003.
- [34] Enright B P, Sung L Y, Chang C C, *et al.*. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. *Biol. Reprod.*, 2005,72(4):944-948.
- [35] 温兵强,李俊杰,胡媛媛,等. 咖啡因和 Scriptaid 对绵羊核移植重构胚发育的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2011(23):22-25.
- [36] De Sousa P A, Dobrinsky J R, Zhu J, *et al.*. Somatic cell nuclear transfer in the pig: control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy[J]. *Biol. Reprod.*, 2002,66(3):642-650.
- [37] 雷安民,马晓玲,高志敏,等. 牛体细胞核移植显微操作环节的优化[J]. *生物工程学报*, 2009,9:1424-1432.