

体细胞克隆中核的重编程

李世杰 杜卫华 李 宁 *

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094; 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001.

* 联系人, E-mail: ninglbau@public3.bta.net.cn)

摘要 尽管体细胞克隆在绵羊、牛、小鼠、猪、山羊、兔、猫、大鼠和骡子等物种中都获得了成功, 但却未能得到狗和猕猴的克隆个体, 而且克隆效率非常低. 克隆效率低使体细胞克隆技术在科研和生物技术等方面的应用受到限制. 供体核移入去核的卵细胞后, 必须经过表观遗传修饰的重编程, 回到胚胎开始发育的全能状态. 目前认为: 供体核的不完全重编程是导致克隆效率低的主要原因. 本文从 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、X 染色体失活、端粒、印记基因以及其他发育相关基因的表达几个方面来探讨影响克隆效率的因素.

关键词 体细胞克隆 核重编程 组蛋白乙酰化 DNA 甲基化 X 染色体失活 端粒 印记 基因表达

1997 年克隆绵羊“多莉”的诞生引起了世界的关注^[1], 接着许多哺乳动物被成功地克隆^[2-8], 体细胞克隆将一个崭新的世界呈现在我们面前. 这一技术的发展与应用对动物生产、医药工业以及珍稀濒危动物的拯救有重要意义^[9-11]. 目前, 虽然体细胞克隆在许多物种中获得了成功, 但克隆的效率却非常低, 只有低于 4% 的重组胚胎可以发育成个体^[12]. 克隆中存在的主要问题有: 孕期流产率高, 围产期死亡率高, 胎儿过度生长以及出生后生长异常. 在体细胞克隆中, 供体核来自高度分化了的体细胞. 在分化过程中, 体细胞核获得了高度特异的 DNA 和染色质的表观遗传修饰 (epigenetic modification), 这些修饰导致了分化状态的细胞记忆. 由于供体核支持克隆胚胎的发育, 所以当供体细胞核被移入去核的卵细胞后, 供体核必须经过这些表观遗传修饰的重编程 (reprogramming), 激活对胚胎早期发育有重要作用的基因, 并抑制与分化相关基因的表达, 从而获得发育的全能性^[13]. 目前认为: 供体核的不完全重编程, 导致在发育过程中有重要作用的基因没有表达或异常表达, 是克隆效率低的主要原因^[14]. 关于供体核的重编程, 目前研究主要集中在 DNA 甲基化 (DNA methylation)、组蛋白乙酰化 (histone acetylation)、X 染色体失活 (X-chromosome inactivation)、端粒 (telomere)、印记基因 (imprinting gene) 等几个方面, 本文结合我们课题组的研究结果, 对这些因素影响体细胞克隆的分子机理进行总结.

1 DNA 甲基化

DNA 甲基化是基因组的主要表观遗传修饰方式, 是调节基因组功能的重要手段. 分化体细胞的甲基化

形式是稳定的和可遗传的. 然而在哺乳动物中, 至少有两个发育阶段 (生殖细胞和植入前胚胎), 其甲基化的形式在基因组范围内发生重编程, 从而产生具有发育潜能的细胞^[15]. 在哺乳动物和其他脊椎动物中, 甲基化位点主要发生在 CpG 双核苷酸序列中胞嘧啶的 5 号碳原子上^[16]. CpG 岛 (CpG island) 是基因组中富含 CG 的一段短的 DNA 序列. 最早由 Gardiner-Garden 和 Frommer^[17] 提出的定义是: 一段富含 CG 并大于 200 bp 的 DNA 片段, CpG 出现的观察值与期望值 (observed/expected ratio) 的比率大于 0.6. 对 DNA 片段的大小以及 CpG 的含量稍加修改, 使之更严格一些, 便可将相当数量的短的外显子区域和寄生重复序列排除在外. CpG 岛一般位于管家基因 (housekeeping gene) 和 4% 的组织特异性基因的启动子和第 1 个外显子区域. 在细胞分化的过程中, 基因的甲基化状态将遗传给后代细胞. DNA 甲基化的研究与 CpG 岛的研究密不可分. DNA 甲基化在组织特异基因表达、印记、X 染色体失活、维持基因组稳定以及减少哺乳动物转位子的流动中都有相当大的作用^[18].

哺乳动物胚胎早期发生的重编程是非常保守的, 而体细胞克隆所用的供体细胞, 如胎儿和成年成纤维细胞、胚胎干细胞以及其他类型的高度分化的体细胞中, 基因组具有较高的甲基化水平, 具有体细胞的典型特征^[19]. 在克隆牛植入前的胚胎中, 发现了基因组重复序列异常的甲基化状态^[19-21]. 其中 Kang 等人^[19] 对体细胞克隆中甲基化的重编程进行了研究, 他们用亚硫酸盐测序法检测体细胞克隆牛桑椹胚和囊胚的几个重复序列和单一序列, 发现其甲基化水平明显高于正常胚

胎,与供体细胞的甲基化水平相似。Dean等人^[20]用5-甲基胞嘧啶免疫荧光抗体法(Anti-5-methyl cytosine immunofluorescence)检测克隆牛桑椹胚处于细胞分裂中期的细胞核,也发现了较高的甲基化水平。这是由于在克隆牛的胚胎中,当供体成纤维细胞核被移入去核的卵母细胞后,基因组发生了一些去甲基化(主动去甲基化的影响),然而在2-细胞以后的胚胎中,没有发生进一步的去甲基化,相反,大部分克隆胚胎发生了过早的重新/从头(de novo)甲基化。此外,克隆胚胎过早地进行类似分化核的甲基化形式重组^[20]。然而在正常牛的胚胎中,基因组从受精卵开始发生主动去甲基化,甲基化水平在8-细胞胚胎进一步降低,一直持续到16-细胞的胚胎,这时胚胎发生重新/从头甲基化。用反向高效液相色谱分析(reverse-phase HPLC)检测克隆牛整个基因组水平的5-甲基胞嘧啶含量,发现核移植的胎儿中5-甲基胞嘧啶的含量降低,并且克隆牛胚胎的存活与基因组范围甲基化的状态密切相关^[22],表明在大多数植入前的克隆牛的胚胎中,DNA甲基化的重编程是不充分的,特别是去甲基化不完全。这可能是由于体细胞核内含有体细胞形式的甲基化转移酶Dnmt1,其不同于卵细胞形式的甲基化转移酶,主要用于维持基因组的甲基化水平。在克隆小鼠植入前的胚胎中,发现其异常表达了体细胞形式的Dnmt1^[23],从而证实了以上推测。可以推断基因组序列的异常重编程导致了克隆的发育问题,特别是当重新/从头甲基化与细胞核的重组和细胞分化相联系的时候^[15]。Kang等人^[24]以体细胞克隆牛植入前的胚胎为材料,研究基因组在整体去甲基化后,序列特异位点(促生长激素神经肽基因序列)的重新甲基化状态,发现在供体核被移入去核卵母细胞后,此位点迅速完成去甲基化,发育到囊胚时,在相应的CpG位点精确完成重新甲基化,说明在克隆动物中,基因组甲基化修饰的重编程具有序列位点特异性。同样用亚硫酸盐测序法检测克隆猪植入前胚胎的着丝粒微卫星和PRE-1短散布重复序列的甲基化状态,发现这些重复序列在细胞核分裂过程中,其去甲基化的模式与正常受精卵中检测到的相似^[25],这与克隆牛中观察到的结果有所不同,说明克隆动物的供体核基因组的甲基化表观遗传修饰的重编程存在种间差异。然而,关于分化的细胞如何进行核重编程,基因组甲基化的形式在胚胎发育过程中如何建立,以及在体细胞克隆中,DNA甲

基化的表观遗传修饰恢复到何种程度才能保证克隆的成功,都是需要我们进一步研究的问题。

2 组蛋白乙酰化

在真核细胞中,DNA与组蛋白是染色质的主要成分。染色质结构与基因活性密切相关,通过组蛋白乙酰化和去乙酰化来修饰染色质的结构,在DNA复制、基因转录及细胞周期的调控等方面有重要作用。组蛋白是一组等电点大于10的碱性蛋白质,在进化上十分保守。真核生物的染色体上主要含有5种组蛋白,即核心组蛋白H2a、H2b、H3、H4及连接组蛋白H1。核心组蛋白八聚体(H2a、H2b、H3、H4各两分子组成)、连接组蛋白H1和150 bp的DNA共同组成了染色体的基本单位——核小体。组蛋白乙酰化反应多发生在核心组蛋白N端碱性氨基酸集中区的特定Lys残基。组蛋白乙酰转移酶(histone acetylase, HAT)和脱乙酰转移酶(histone deacetylase, HDAC)的作用是将乙酰辅酶A的乙酰基移去或增加到组蛋白Lys的 ϵ -NH³⁺上,从而进行基因表达的调控^[26]。组蛋白上增加的乙酰基中和掉一个正电荷,这样可减弱组蛋白与带负电的DNA骨架的相互作用,促进组蛋白-DNA复合物的结构松散,使转录因子容易结合到其在DNA上的作用位点,从而促进基因的转录^[27,28]。组蛋白乙酰化状态呈多样性,核小体上有多个位点可供乙酰化,但特定基因部位的组蛋白乙酰化和去乙酰化以一种非随机的、位点特异方式进行。

在体细胞克隆中,关于组蛋白乙酰化的研究还不是很多。Santos等人^[29]研究了组蛋白H3第9位赖氨酸(H3-K9)的甲基化和乙酰化在体细胞克隆牛植入前胚胎中的状态,发现在正常的胚胎中,H3-K9的甲基化和DNA的甲基化变化是平行的;而在克隆牛的植入前胚胎中,H3-K9的过高甲基化伴随DNA的过高甲基化,说明在哺乳动物的胚胎中,DNA的甲基化和组蛋白的甲基化有机械的联系。Enright等人^[30]研究了核移植过程中供体核的组蛋白乙酰化水平,用荧光共聚焦显微镜(epifluorescent confocal microscopy)进行定性,免疫荧光流式细胞仪(immunofluorescent flow cytometry)进行定量,发现不同的细胞类型、细胞周期的不同阶段以及不同的处理过程均影响供体细胞的组蛋白乙酰化(组蛋白H3第18位赖氨酸、组蛋白H4第8位赖氨酸和连接组蛋白H1)水平。为了促进核重排,用一种组蛋白去乙酰化抑制剂(毛发抑制素-A, TSA)和DNA甲基化转移酶抑制剂(5-氮-2'-脱氧胞苷, 5-aza-dC)处理供体核,分别

用来增加供体核的组蛋白乙酰化水平和降低供体核的DNA甲基化水平,结果发现,用组蛋白去乙酰化抑制剂TSA处理可以提高囊胚率^[31],用另一种组蛋白去乙酰化抑制剂丁酸钠(NaBu)处理供体细胞核,得到了同样的结论^[32]。以上研究表明,体细胞克隆胚胎中,组蛋白乙酰化的重编程是不完全的,组蛋白去乙酰化抑制剂的加入可以促进供体细胞的重编程。而有关体细胞克隆中组蛋白乙酰化的研究是一个有待深入探索的领域。

3 X染色体失活

在哺乳动物中,雌性动物体细胞的剂量补偿通过一条X染色体的沉默来实现,即X染色体失活^[33]。在胚胎植入前,雌性胚胎的两条X染色体均具有转录活性。细胞分化时,一条X染色体失活并沉默。*Xist* (X-inactive specific transcript)基因在X染色体失活中起重要作用,它编码非翻译的RNA,启动X染色体的失活。*Xist*基因在X染色体的失活中心(X-chromosome inactive center, XIC)开始转录,并使整条染色体转录失活^[34,35]。

哺乳动物中,X染色体失活发生在囊胚发育的后期,两条X染色体发生随机失活。Eggan等人^[36]用X-linked绿色荧光蛋白监视克隆小鼠胚胎中的X染色体失活,来研究克隆过程是否重设雌性体细胞核中两条X染色体的表观遗传差异(epigenetic differences)。结果发现在克隆胚胎的分裂阶段,两条X染色体均有活性,随后X染色体在胚胎组织发生随机失活;然而在滋养外胚层,X染色体失活是非随机性的,供体细胞中失活的X染色体被特定选择失活。当用两条X染色体均有活性的胚胎干细胞作为供体细胞时,在滋养外胚层和胚胎组织中X染色体均发生随机失活。结果表明,克隆过程可以移去并重新建立X染色体上的表观遗传标记(epigenetic mark),X染色体失活在克隆小鼠中似乎是正常的,但此研究只分析了少数活的克隆动物。Wrenzycki等人^[37]研究了克隆牛植入前胚胎中X-linked的*G6PD*, *PGF*和*Xist*基因的表达,得出了相同的结论。Xue等人^[38]通过研究*MAOA*及9个X-linked的基因在存活和死亡克隆牛中的表达,发现10个基因中有9个异常表达,而且*Xist*基因处于过低甲基化水平,表明不完全的核重编程可能使X染色体上产生异常的表观遗传标记,影响了随机的和印记的X染色体的失活。此结论与Eggan^[36]和Wrenzycki^[37]的研究结论不同。这可能是由于所研究的是不同物种(小鼠与牛)和不同的组织(整个植入前的胚胎与单个组织)造成的。

4 端粒

端粒(telomere)是一种位于真核细胞染色体末端的DNA-蛋白质结构,它由串联的重复结构(5'-TTAGGG-3')_n组成,此重复结构在脊椎动物中很保守。端粒位于染色体DNA的末端,具有防止核酸酶降解、染色体间融合及染色体间非正常重组的功能,从而起到保护染色体完整的作用^[39,40]。在DNA的复制过程中,普通DNA聚合酶通常不能复制后随端粒DNA链至终端,使得每经过一次细胞分裂,端粒DNA便会丢失50至200 bp长度的片段^[42],因此可以把端粒当作计数细胞分裂的“分裂钟”^[41,42]。端粒缩短的程度与细胞分裂的次数有关,当端粒达到某一临界长度时,细胞停止分裂,开始出现分化^[43]。端粒的延长是由端粒酶(telomerase)来完成的。端粒酶是一个多亚基的蛋白核酸复合物,它由两种基本的亚基组成:端粒酶RNA亚基(telomerase RNA unit, TR)和端粒酶反转录酶亚基(telomerase reverse-transcriptase, TERT),前者提供合成重复结构的模板,后者进行转录。正常体细胞中的端粒酶没有活性,而端粒酶的活性存在于生殖细胞,某些干细胞及某些肿瘤细胞中,通过复制端粒末端的重复序列而起到稳定端粒的作用,这可以把完整的染色体传给后代^[44]。

哺乳动物受精后,胚胎的端粒长度进行调整。体细胞一旦开始分化,端粒长度便会逐渐缩短。这就提出了一个问题:体细胞克隆动物是否会遗传供体核缩短了的端粒,从而导致过早衰老。Shiels等人^[45]分析了首例体细胞克隆绵羊“多莉”的端粒长度,发现其明显短于同龄羊,而与供体乳腺细胞的端粒长度相当。然而在对体细胞克隆牛的研究中没有发现端粒缩短的现象^[46,47]。用接近衰老的胚胎细胞作为供体核,通过克隆,端粒的长度和细胞的寿命均得到恢复,甚至延长^[48];而且克隆牛胚胎中端粒酶的活性也恢复到与正常受精相似的水平^[46]。在体细胞克隆小鼠中,端粒的长度也得到恢复^[49]。因此,端粒复原存在于大部分克隆动物中,端粒缩短可能不是造成克隆动物高死亡率的最主要的原因。

5 印记基因的表达

同源染色体上基因表达活性不同的遗传现象称为基因组“印记”。印记基因与胚胎生长、发育以及胎盘的功能有关^[50]。大多数父源印记基因促进胚胎生长,而大多数母源印记基因抑制胚胎生长。这种现象可用印

记的遗传对抗理论(imprinting genetic conflict theory of imprinting)来解释,此理论认为:父源印记基因通过从母体获得更多的营养来促进胚胎生长,相反,为了成功地妊娠,母源印记基因要协调胎儿需求与母体供应间的平衡^[51].印记起始于配子形成时,被成熟的配子携带而进入胚胎^[52].通过对大量印记基因进行研究,结果表明甲基化可能是印记修饰的最可能机制,基因印记的获得与DNA甲基化变化是高度一致的,而富含CG的差异甲基化区(differentially methylated region, DMR)就是基因印记的靶向位点,即印记中心(imprinting center, IC).在鼠中,发现的印记基因已有50多个(<http://www.mgu.har.mrc.ac.uk>).

胚胎生长异常在体细胞克隆动物中具有普遍性,表现为胎盘与出生重的增加.在印记基因异常表达的遗传病人和印记基因定点敲除的小鼠中,存在着类似的表型异常.那么就提出了一个问题:在克隆中表现出的某些异常是否由某些印记基因的异常表达造成^[53].关于印记基因在克隆小鼠中的表达,已有一些研究报道.为了研究基因表达与克隆动物存活及过度生长的关系,Humpherys等人^[54]研究了经核移植胚胎干细胞所获得的克隆小鼠印记基因的表达状况,发现胚胎干细胞基因组的后成状态非常不稳定,大多数克隆小鼠中印记基因表达发生异常,没有一个克隆胚胎被检测的基因是全部正常表达的.Ogawa等人^[55]分析8个印记基因在克隆小鼠(胚胎干细胞为供体细胞)胚胎和胎盘中的表达情况,发现了*H19*和*IGF2*的异常表达以及*H19*和*IGF2R*基因的异常甲基化状态;而且还发现*IGF2*的异常表达可能导致了胚胎和胎盘的过度生长.在另一篇报道中也发现了*H19*和*IGF2*在胚胎和胎盘中的异常表达以及*H19*和*Snprn*基因的DMR区域的异常甲基化状态^[56].研究克隆羊中*H19-IGF2*和*IGF2R*基因,同样发现了*IGF2R*第2个内含子的DMR区域和*H19*上游含有多个CTCF结合位点的DMR区域的异常甲基化状态^[57].由此可见,印记基因位点的异常重编程可导致克隆动物的表型异常.在核移植动物中,有关克隆动物表型异常是否与特定基因相联系,以及供体核的异常重编程是否导致一些基因的随机异常表达的研究很重要.

6 其他与发育相关基因的表达

胚胎发育是一个沿时空顺序,形态上发生剧烈、复杂变化的过程.在调控胚胎发育的基因和基因簇中,最典型的是同源框*Hox*基因,此外还有*Oct4*, *FGF*, *IL*,

*Chk1*等.人们研究了核移植后植入前胚胎中供体核转录活性的整体变化,发现供体核缺失重编程或不完全重编程^[58-61].用RT-PCR对单个基因的表达进行研究,发现猪的 β -actin-GTP基因^[62],牛的*TEC-3*^[63], *Oct4*, *FGF2*, *FGFr2*, *gp130*, PolyA 聚合酶基因^[14], *LDH*, 柠檬酸合酶和*PFK*基因^[64],在正常受精的和克隆的胚胎中有相似的转录模式.在牛的植入前囊胚阶段,发现了一些异常表达的基因, *Mash2* 基因表达升高, *DNMT*表达降低, *hsp70* 表达缺失, *INF*基因表达不稳定^[65].在用颗粒细胞作为供体细胞得到的克隆牛胚胎中, *FGF4*, *FGFr2* 和 *IL6* 基因的表达异常^[14],但在用胚胎上皮细胞作为供体细胞进行的克隆中,未发现*FGFr2*, *IL6* 的异常表达^[66].可见不同的供体细胞系和不同的核移植程序会影响基因的表达.所有这些研究均不能解释克隆胚胎在植入时大量死亡.有些克隆动物在出生后不久死亡,并表现出器官的异常,为了研究克隆动物出生死亡以及器官异常的可能分子机理,我们课题组应用荧光定量(real-time quantitative)RT-PCR技术,研究了*PCAF*, *XIST*, *FGFR2*, *PDGFRa*, *FGF10*, *BMP4*, *Hsp70* 和 *VEGF*等8个发育相关基因在新生死克隆牛心、肝、脾、肺、肾和大脑6个组织中的表达.结果发现, *BMP4*, *FGF10* 和 *Hsp* 的异常表达与所有被研究的6个组织的异常有关; *PDGFRa* 的异常表达与5个组织(心、脾、肺、肾和大脑)的异常有关; *VEGF* 的异常表达与4个组织(心、肝、脾和大脑)的异常有关; *PCAF* 的异常表达与3个组织(心、脾和肝)的异常有关,由于这些基因在胚胎发育和器官的形成过程中具有重要作用,所以它们的异常表达可能导致克隆动物的器官异常以及出生死亡.

转录因子 *Oct4* 在胚胎卵裂阶段表达,其正确表达为囊胚分化以及囊胚以后阶段的胚胎发育所必须.胚胎早期发育的一些重要基因的表达受其调控,包括 *FGF4*, *Rex-1*, *Sox-2*, *OPN*, *HCG*, *Utf-1* 基因^[67], *INF*基因^[68]和其他一些假定的下游基因,包括肌酸激酶B, *Makorin 1*, *Importin β* , 组蛋白H2A.Z, 核糖体蛋白S7^[69].转录因子*Oct4*在体细胞克隆动物中的表达备受人们的关注.Boiani等人^[72]研究了*Oct4*在体细胞克隆小鼠植入前胚胎中的时空表达,发现*Oct4*基因起始表达的时间是正确的,但空间表达的位置发生了异常^[70].Bortvin等人^[71]研究了克隆小鼠胚胎中*Oct4*以及另外10个在发育表达形式上与*Oct4*相似的基因,发现只有62%的来自卵丘细胞的克隆囊胚正确表达这些基因.

因此, *Oct4* 基因重编程的异常会导致克隆的失败, 通过促进与 *Oct4* 有类似作用的转录因子的重编程, 可能会找到控制体细胞克隆成功的关键。

7 结语

体细胞克隆技术在动物育种和拯救濒危动物方面具有广泛的应用价值, 尤其是应用体细胞克隆技术生产转基因动物来制备高效表达外源基因的各种生物反应器, 从而克隆动物变成了“制药工厂”, 这为医药蛋白的生产提供了一条经济有效的途径。本课题组已经建立起以不同类型的转基因细胞为核供体生产转基因克隆牛胚胎的技术^[73,74], 目前已经得到转人的乳铁蛋白(lactoferritin)基因和转人的岩藻糖转移酶(fucosyltransferase)基因的体细胞克隆牛, 后面将陆续有转人的溶菌酶(lysozyme)基因和转人的 α -乳清蛋白(α -lactalbumin)基因的体细胞克隆牛出生。体细胞核移植的重要意义还在于治疗性克隆, 即通过核移植技术, 以病人的细胞为供体构建重组胚胎, 然后从重组胚获取与病人遗传构成相同的胚胎干细胞, 可从根本上克服免疫排斥反应。克隆效率是影响体细胞克隆技术应用的最大障碍, 核移植后几小时内发生的供体核的分子重排事件, 决定了克隆胚胎的命运。然而我们对此知之甚少。尽管通过优化核移植的程序可以提高一些克隆效率, 但期望得到更大的提高也许还必须通过干预和促进供体核的核重排来实现。通过在核移植以前使用促进核重排的复合物或重构因子来去除体细胞的后成修饰, 也许能够提高核移植的成功率。

致谢 本工作为国家高技术研究发展计划生物工程主题项目(批准号: 2001AA213091)和北京市自然科学基金重大资助项目(批准号: 5030001)。

参 考 文 献

- 1 Wilmot I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810~813 [DOI]
- 2 Campbell K H, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, 380: 64~66 [DOI]
- 3 Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282: 2095~2098 [DOI]
- 4 Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 456~461 [DOI]
- 5 Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394: 369~373 [DOI]
- 6 Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289: 1188~1190 [DOI]
- 7 Shin T, Kraemer D, Pryor J, et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, 415: 859 [DOI]
- 8 Chesne P, Adenot P G, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 366~369 [DOI]
- 9 Wall R J, Kerr D E, Bondioli K R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *J Dairy Sci*, 1997, 80: 2213~2224
- 10 Wilmot I. Cloning for medicine. *Sci Am*, 1998, 279: 58~63
- 11 Stice S L, Robl J M, Ponce de Leon F A, et al. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology*, 1998, 49: 129~138 [DOI]
- 12 Wilmot I, Beaujean N. Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 2002, 419: 583~585 [DOI]
- 13 Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, et al. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 12889~12894 [DOI]
- 14 Daniels R, Hall V, Trounson A O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod*, 2000, 63: 1034~1040
- 15 Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001, 293: 1089~1093 [DOI]
- 16 Jones P A, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 2001, 293: 1068~1070 [DOI]
- 17 Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 1987, 196: 261~282
- 18 Bird A P, Wolffe A P. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell*, 1999, 99: 451~454
- 19 Kang Y K, Koo D B, Park J S, et al. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, 2001, 28: 173~177 [DOI]
- 20 Dean W, Santos F, Stojkovic M, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 13734~13738 [DOI]
- 21 Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, et al. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. *Curr Biol*, 2001, 11: 1542~1546 [DOI]
- 22 Cezar G G, Bartolomei M S, Forsberg E J, et al. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol Reprod*, 2003, 68: 1009~1014
- 23 Chung Y G, Ratnam S, Chaillet J R, et al. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos. *Biol Reprod*, 2003, 69: 146~153
- 24 Kang Y K, Yeo S, Kim S H, et al. Precise recapitulation of methylation change in early cloned embryos. *Mol Reprod Dev*, 2003, 66: 32~37 [DOI]
- 25 Kang Y K, Koo D B, Park J S, et al. Typical demethylation events in cloned pig embryos. Clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome. *J Biol Chem*, 2001, 276: 39980~39984 [DOI]
- 26 Davie J R. Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8: 173~178 [DOI]
- 27 Finnin M S, Donigian J R, Cohen A, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, 1999, 401: 188~193 [DOI]
- 28 Richon V M, Emiliani S, Verdin E, et al. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3003~3007 [DOI]
- 29 Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, et al. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, 2003, 13: 1116~1121 [DOI]
- 30 Enright B P, Jeong B S, Yang X, et al. Epigenetic characteristics of

- bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. *Biol Reprod*, 2003, 69: 1525~1530
- 31 Enright B P, Kubota C, Yang X, et al. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod*, 2003, 69: 896~901
- 32 Shi W, Hoefflich A, Flaswinkel H, et al. Induction of a senescent-like phenotype does not confer the ability of bovine immortal cells to support the development of nuclear transfer embryos. *Biol Reprod*, 2003, 69: 301~309
- 33 Lyon M F. X-chromosome inactivation. *Curr Biol*, 1999, 8-9: R235~237
- 34 Penny G D, Kay G F, Sheardown S A, et al. Requirement for Xist in the X chromosome inactivation. *Nature*, 1996, 379: 131~137 [DOI]
- 35 Marahrens Y, Panning B, Dausman J, et al. Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes Dev*, 1997, 11: 156~166
- 36 Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, et al. X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos. *Science*, 2000, 290: 1578~1581 [DOI]
- 37 Wrenzycki C, Lucas-Hahn A, Herrmann D, et al. *In vitro* reduction and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biol Reprod*, 2002, 66: 127~134
- 38 Xue F, Tian X C, Du F, et al. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet*, 2002, 31: 216~219 [DOI]
- 39 Counter C M, Avilion A A, LeFeuvre C E, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*, 1992, 11: 1921~1929
- 40 Hackett J A, Feldser D M, Greider C W. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell*, 2001, 106: 275~286 [DOI]
- 41 Harley C B, Futcher A B, Greider C W. Telomeres shorten during aging of human fibroblast. *Nature*, 1990, 345: 458~460 [DOI]
- 42 Holt S E, Shay J W, Wright W E. Refining the telomere-telomerase hypothesis of aging and cancer. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 836~839
- 43 Faragher R G, Kipling D. How might replicative senescence contribute to human aging? *Bioessays*, 1998, 20: 985~991 [DOI]
- 44 Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [see comments]. *Science*, 1994, 266: 2011~2015
- 45 Shiels P G, Kind A J, Campbell K H, et al. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*, 1999, 399: 316~317 [DOI]
- 46 Betts D H, Bordonov 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: 1077~1082 [DOI]
- 47 Tian X C, Xu J, Yang X. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nature Genet*, 2000, 26: 272~273 [DOI]
- 48 Lanza R P, Cibelli J B, Blackwell C, et al. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, 2000, 288: 665~669 [DOI]
- 49 Wakayama T, Tateno H, Mombaerts P, et al. Nuclear transfer into mouse zygotes. *Nat Genet*, 2000, 24: 108~109 [DOI]
- 50 Barlow D P. Genomic imprinting in mammalian. *Science*, 1995, 270: 1610~1613
- 51 Moor T, Haig D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet*, 1991, 7: 45~49
- 52 Davis T L, Yang G J, McCarrey J R, et al. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet*, 2000, 9: 2885~2894 [DOI]
- 53 Jaenisch R. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet*, 1997, 13: 323~329 [DOI]
- 54 Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, 2001, 293: 95~97 [DOI]
- 55 Ogawa H, Ono Y, Shimosawa N, et al. Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. *Reproduction*, 2003, 126: 549~557 [DOI]
- 56 Mann M R, Chung Y G, Nolen L D, et al. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod*, 2003, 69: 902~914
- 57 Young L E, Schnieke A E, McCreath K J, et al. Conservation of IGF2-H19 and IGF2R imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech Dev*, 2003, 120: 1433~1442 [DOI]
- 58 Kanka J, Hozak P, Heyman Y, et al. Transcriptional activity and nucleolar ultrastructure of embryonic rabbit nuclei after transplantation to enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev*, 1996, 43: 135~144 [DOI]
- 59 Schultz G A, Harvey M B, Watson A J, et al. Regulation of early embryonic development by growth factors: Growth factor gene expression in cloned bovine embryos. *J Animal Sci*, 1996, 75: 50~57
- 60 Smith S D, Soloy E, Kanka J, et al. Influence of recipient cytoplasm cell stage on transcription in bovine nucleus transfer embryos. *Mol Reprod Dev*, 1996, 45: 444~450 [DOI]
- 61 Lavoie M C, Kelk D, Rumph N, et al. Transcription and translation in bovine nuclear transfer embryos. *Biol Reprod*, 1997, 57: 204~213
- 62 Koo D B, Kang Y K, Choi Y H, et al. Developmental potential and transgene expression of porcine nuclear transfer embryos using somatic cells. *Mol Reprod Dev*, 2001, 58: 15~21 [DOI]
- 63 Van Stekelenburg-Hamers A E, Rebel H G, Van Inzen W G, et al. Stage-specific appearance of the mouse antigen TEC-3 in normal and nuclear transfer bovine embryos: Re-expression after nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*, 1995, 37: 27~33
- 64 Winger Q A, Hill J R, Shin T, et al. Genetic reprogramming of lactate dehydrogenase, citrate synthase, and phosphofructokinase mRNA in bovine nuclear transfer embryos produced using bovine fibroblast cell nuclei. *Mol Reprod Dev*, 2000, 56: 458~464 [DOI]
- 65 Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, et al. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod*, 2001, 65: 309~317
- 66 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: 281~288 [DOI]
- 67 Pesce M, Schöler H R. Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*, 2001, 19: 271~278
- 68 Ezashi T, Ghosh D, Roberts R M. Repression of Ets-2-induced transactivation of the tau interferon promoter by Oct-4. *Mol Cell Biol*, 2001, 21: 7883~7891 [DOI]
- 69 Du Z, Cong H, Yao Z. Identification of putative downstream genes of Oct-4 by suppression-subtractive hybridization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282: 701~706 [DOI]
- 70 Boiani M, Eckardt S, Scholer H R, et al. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev*, 2002, 15: 1109~1119
- 71 Bortvin A, Eggan K, Skaletsky H, et al. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development*, 2003, 130: 1673~1680 [DOI]
- 72 Pan G J, Chang Z Y, Scholer H R, et al. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res*, 2002, 12: 321~329
- 73 龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 等. 以不同类型的转基因细胞为核供体生产出的转基因克隆胚胎. *中国科学, C辑*, 2003, 33(6): 532~538 [摘要] [PDF]
- 74 龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 等. 利用体细胞核移植技术生产转基因牛. *科学通报*, 2003, 48(24): 2528~2533 [摘要] [PDF]

(2004-01-13 收稿, 2004-03-04 收修改稿)