

“克隆猴”的前世今生

王亮^{1,2}, 赵同标^{1,2*}

1. 中国科学院动物研究所, 干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101;

2. 中国科学院大学存济医学院, 北京 100049

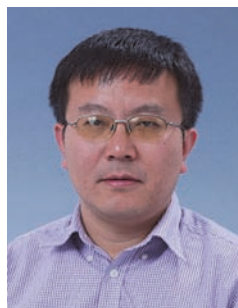
* 联系人, E-mail: tbzhao@ioz.ac.cn

进化和生理上最接近于人类的灵长类动物——猕猴 (*Macaca mulatta*) 被复制出来了, 你相信吗? 科幻电影中克隆人的脚步似乎离我们越来越近了. 2018 年 1 月 24 日, 国际顶级生物学期刊 *Cell* 以封面文章的形式报道了一项振奋人心的重大成果: 中国科学院神经科学研究所孙强研究组^[1]采用体细胞核移植技术 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 成功克隆出两只食蟹猴“中中”和“华华”. “中中”、“华华”的诞生远非仅为克隆动物家族多添一位成员那么简单. 援引 *Cell* 主编 Marcus 的评述: “该成果是一项令人兴奋的、意义非凡的工作, 是全世界同行科学家花了 20 多年时间才达到的里程碑. 它有潜力引发动物的革命并帮助研发治疗人类疾病的新方法”. 克隆猴“中中”和“华华”的诞生标志着我国在克隆技术领域已处于世界最前沿, 与之相关的转化医学研究也有望进入国际领跑阶段.

克隆猴是如何被克隆出来的呢? 《西游记》中从花果山巨石下跳出来的那只石猴——“齐天大圣”孙悟空有着超凡的能力: 随便从身上拔一把毫毛, 吹一口仙气, 一群“齐天大圣”就降临了. 克隆猴也是这样诞生的吗? 提到克隆动物, 自然而然会联想到 1996 年诞生的克隆羊“多莉”^[2]. 作为首只被克隆出的哺乳动物, “多莉”成为动物界最耀眼的明星, 同时也让“克隆”这一概念深入人心. “克隆”是一种无性繁殖的手段. 狭义来讲, 克隆就是通过将某种动物的体细胞核植入去核的卵母细胞, 在体外培育成囊胚后再植入代孕母体, 最终产生与供体细胞核遗传信息完全一致的新个体的过程. 所用到的技术为体细胞核移植技术, 也称为体细胞克隆技术 (图 1). 该过程直接利用体细胞核与卵母细胞质相结合的方式产生动物个体, 巧妙地避开了精子和卵子的受精融合过程.

1 体细胞核移植与细胞核全能性

众所周知, 高等动物的正常发育是从受精卵开始, 经历一系列增殖分化和胚胎发育, 最终形成具有生命的完整个体. 在这一过程中, 受精卵细胞不断地扩增壮大、不停地“改头换面”. 那么, 已经终末分化的成体细胞是否能够重新回到原初状态, 再次发育为各种各样的细胞类型, 担



赵同标 中国科学院动物研究所研究员, 博士生导师, “青年千人计划”入选者, 主要从事干细胞免疫与干细胞转化工作. 首次发现了诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) 的免疫原性, 解析了自噬在多能干细胞调控中的关键作用, 组织撰写了多项干细胞标准草案并发布了

我国第一个干细胞通用标准——《干细胞通用要求》. 担任中国细胞生物学会干细胞生物学会分会委员、标准工作组组长, 国际标准化组织/生物技术委员会 (ISO/TC276) 委员, 中华医学会组织修复与再生分会青年委员.

当起构筑新生命大厦的使命? 换句话说, 即将走向死亡的成熟细胞如表皮细胞、血液细胞等能否实现“返老还童”, 重新“华丽转身”, 并进而继续成为维持生命系统的重要角色? 要想回答这些问题必须从细胞核的全能性谈起.

1.1 细胞核全能性理论的萌芽

很早之前, 人类就已经知道植物具有与生俱来的超强再生能力, 一根枝条插入泥土就可生长成一颗新的植株; 动物界某些生物亦具有再生能力, 如蚯蚓断掉一截后可再生长出另一半等. 但更高等的动物似乎丢失了这种再生的“超能力”. 其中的奥秘是什么呢? 为了回答这个问题, 长期以来科学家一直进行着不懈的努力. 直到 1938 年德国胚胎学家 Spemann^[3]报道了一个简单而又巧妙的试验, 为回答这一问题带来了曙光 (图 2). 他用头发将蝾螈 (*Cynops*) 的受精卵结扎成两部分, 并把细胞核推移到一侧, 结果发现, 只有带核的 B 侧 (图 2) 受精卵能够向胚胎发育, 而 A 侧无核受精卵则处在发育停滞状态; 但如果将经过几次分裂的细胞核重新推移到 A 侧, 则该侧受精卵亦重新开始分裂并能发育成个体, 而且该个体比 B 侧受精卵发育的个体更显年轻态. 这个操作简单的开创性试验首次提示: 经过几次分裂并初步分化了的动物细胞核依然具有发育成完整



图1 (网络版彩色)体细胞核移植(SCNT)流程

Figure 1 (Color online) Procedure of somatic cell nuclear transfer (SCNT)

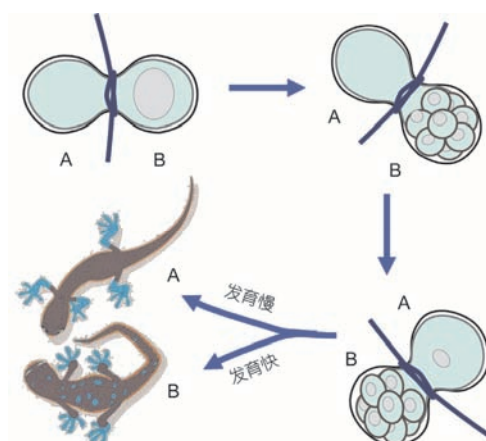


图2 (网络版彩色)蝾螈受精卵横缢实验

Figure 2 (Color online) Constriction experiment on fertilized salamander egg

个体的能力。随后, Spemann 进一步提出了将发育相对较后时期的细胞核移植到去核的卵细胞中, 研究其是否能够完成整个发育过程。这将会是一个激动人心的试验, 然而在他的有生之年并未完成这个试验。这是最早的关于分化了的体细胞细胞核依然具有全能性探索的记载, 亦是体细胞克隆技术的最初萌芽。

1.2 第一只克隆动物——青蛙的诞生

利用体细胞克隆技术进行动物克隆最早是在青蛙 (*Rana nigromaculata*) 上实现的。青蛙的卵细胞大而明显, 易于操作, 此外青蛙是在体外受精和胚胎发育的, 这些特征使得青蛙成为进行核移植和动物克隆的理想模型。Hans Spemann 的受精卵横缢试验在当时的确是天才般的设想, 然而似乎在科学探索的世界里无论你多聪明, 总会有人能同你想到一起。距离 Spemann 最初提出的核移植实验萌芽的 14 年后, Briggs 于 1952 年完成了类似的试验设计, 他和 King^[4] 一起将青蛙的囊胚期细胞的细胞核移植到去核的卵细胞, 成功获得了正常发育的蝌蚪, 完成了人类历史上首次核移植动物克隆试验(图1)。随后, 1958 年, 约翰·戈登 (John Gurdon) 应用同样策略成功地以蝌蚪的末端分化的肠上皮细胞的细胞核为供体克隆了青蛙(图1), 首次证明了末端分化的成熟体细胞的细胞核也具有发育的全能性。这个试验改变了当时领域内普遍认为的末端分化的体细胞(发育上即将走向死亡的细胞)不具备发育全能性的错误观点。此后, 采用相同的方法鱼 (*Piscium*) 被成功克隆。

1.3 高等哺乳动物的成功克隆

然而, 上述这些动物都是体外受精和体外发育, 生殖发育方式与高等动物存在巨大区别, 因而在当时并未引起

科学界的普遍关注. 直到1996年, Campbell研究组^[2]利用乳腺细胞成功克隆绵羊(*Ovis aries*)——“多莉”(图1), 动物克隆才在世界范围内引起了轰动. 与青蛙的克隆不同, 羊等高等哺乳动物胚胎发育是在母体子宫中进行的, 因此大大增加了实验的难度. 尽管如此, 随着技术的不断进步, “多莉”羊诞生后, 多种高等哺乳动物已被成功克隆: 小鼠(*Mus musculus*)和奶牛(*Bos taurus*)(1998)、山羊(*Capra aegagrus*)(1999)、猪(*Sus scrofa*)(2000)、大鼠(*Rattus norvegicus*)、马(*Equus ferus*)、骡子(*Equus mulus*)(2003)、狗(*Canis lupus*)(2005)等.

2 年轻因子的寻找

至此, 对体细胞克隆技术有了初步了解, 然而新的疑惑也接踵而来: “全能”的动物细胞核为什么在体细胞中偃旗息鼓, 而在卵子提供细胞质的情况下能大显身手?

2.1 卵母细胞和胚胎干细胞中存在“年轻因子”

显然, 卵子细胞质中隐藏着某些神奇的因子能够使得成熟体细胞的细胞核“返老还童”, 并重新赋予其发育成完整个体的“超能力”(图3(a)). 无独有偶, 多能干细胞融合实验也给出类似的提示. 1976年, 科学家Miller和Ruddle^[5]将胚胎癌细胞和胸腺细胞融合后, 发现产生的杂交细胞拥有类似胚胎癌细胞的表型并能向3个胚层分化. 随后, 日本和美国的科学家分别将小鼠的胸腺细胞和胚胎干细胞、人成纤维细胞和胚胎干细胞相融合, 发现融合的四倍体细胞亦具有胚胎干细胞特征^[6,7]. 上述试验充分说明类似于卵母细胞, 胚胎干细胞和胚胎癌细胞的细胞质中也存在着某些“年轻因子”, 这些因子能够帮助成熟体细胞实现“返老还童”(图3(b)).

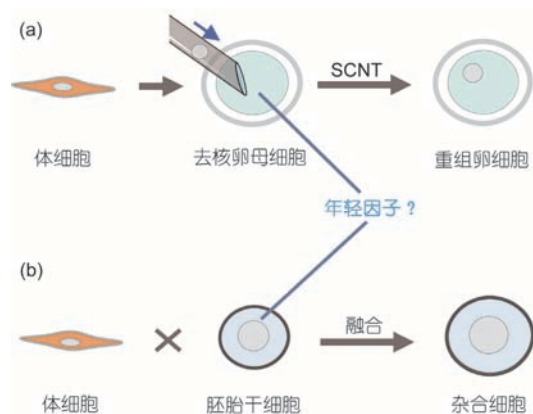


图3 (网络版彩色)SCNT(a)与细胞融合(b)提示卵母细胞和胚胎干细胞的胞质中存在“年轻因子”

Figure 3 (Color online) SCNT (a) and fusion of somatic cell with embryonic stem cell (ESC) (b) experiments suggest the existence of “young factors” in the cytoplasm of egg and ESC

这些发现颠覆了人们传统认为“发育是一个不可逆转的基因水平变化的过程”的错误观点, 提示发育是一个可以逆转的表观遗传变化的过程. 随着科学技术的飞速发展和研究的不断深入, 科学家们对细胞核全能性的理解也更加全面: 无论是发育早期的受精卵还是处于发育末期的成熟体细胞的细胞核都具有全能性, 然而细胞核的状态会随着发育分化而改变, 其DNA甲基化、组蛋白甲基化及乙酰化等多种表观遗传修饰都发生相应的变化, 从而使得分化细胞的细胞核的全能性处于“休眠”状态. 卵子细胞质或多能干细胞细胞质中存在的某些“年轻因子”能够擦除这些表观遗传印记, 使细胞核摆脱束缚, 重塑自我, 最终实现全能性的重新激活. 那么, 这些能够实现“返老还童”永葆青春的“年轻因子”到底是什么? 人类能否找到甚至利用这些因子直接实现成熟体细胞的年轻化? 答案似乎并没有那么简单.

2.2 山中伸弥发现“年轻因子”

细胞虽小, 但结构极其复杂, 细胞中充满了形形色色的DNA, RNA, 蛋白质等, 将其比作浩瀚的宇宙一点儿不为过. 而要在这浩如烟海的细胞宇宙中寻找能够实现“返老还童”的“灵丹妙药”谈何容易! 无数科学家为此进行了长期不懈的探索, 最终幸运之星降临于日本科学家山中伸弥(Shinya Yamanaka). 通过对24个多能性调控关键转录因子的筛选, 山中伸弥研究组^[8]发现仅用4个转录因子Oct4, Sox2, Klf4和c-Myc就能实现成熟体细胞的“返老还童”! 整个科学界为之沸腾! 为此, 山中伸弥同约翰·戈登共同分享了2012年的诺贝尔生理学或医学奖, 以表彰他们在成熟细胞“返老还童”研究中的卓越贡献.

3 猴的克隆历程

随着进化树上动物等级的升高, 其生命维持机制越来越复杂, 其研究亦越来越困难. 事实上在“多莉”羊诞生之前, 科学家们就已经开始了克隆猴的尝试, 但进展缓慢.

3.1 猴克隆的早期探索

1997年, Wolf研究组^[9]利用卵裂球的细胞核成功获得了“克隆猴”. 然而卵裂球是受精卵初始分裂得到的早期胚胎, 细胞尚处于全能性状态, 因而并不属于分化了的体细胞“返老还童”的范畴. 2000年, 美国科学家将早期猴胚胎分割, 分割后的胚胎分别能发育成猴个体, 这种方法获得的“克隆猴”并不是上述文中所定义的体细胞克隆猴, 亦未实现成熟体细胞的年轻化. 直到2007年, Wolf的学生Mitalipov研究组^[10]成功地通过SCNT技术构建了猴的克隆胚胎干细胞系, 成为第一个克隆出猴胚胎的科学家. Mitalipov一直致力于灵长类克隆, 曾被认为是世界上最有可能克隆猴的人, 但其最成功的一次克隆也以81 d胚胎猴的流产而告终. 克隆猴成了世界级难题, 甚至被认为是现

有技术不可能实现的。

3.2 猴克隆的技术难题

那么,灵长类体细胞克隆到底难在哪里(图4)?首先是灵长类自身生物学特性的原因。灵长类的卵母细胞不透明,去核难度大,需要精湛的操作技巧。刘真博士正是凭借长期卓越的训练,练就了10 s去核、15 s注核的娴熟手法。此外,灵长类的卵细胞非常敏感,极易提前激活。2007年,Mitalipov等人^[11]发现使用咖啡因可以暂时抑制某些信号通路,降低卵母细胞的敏感性。但出于咖啡因具有毒性的顾虑,孙强研究组^[1]采用了一种压电驱动(piezo-driven)的显微操作方法,避免了对卵细胞的挤压,使细胞所受损伤减到最小。

其次,成本高以及伦理限制等问题也是阻碍克隆猴研究进展的重要因素。作为实验动物的灵长类本身数量少,卵子不易获取,难以进行大规模尝试;高额的实验费用也限制了猴模型研究的规模化发展。同时,灵长类试验的伦理审查极为严格,特别是欧美等动物保护意识强烈的国家和地区,这在一定程度上使灵长类克隆的脚步受到延滞。

最后也是最重要的原因是我们对体细胞重编程机制缺乏深入的理解。以往经典的克隆方法往往忽视了从体细胞重编程机制上寻找对策,常常因为细胞核重编程不完全导致克隆胎儿发育异常从而频频流产。2014年,华裔科学家张毅研究组^[12]发现,基因组上大量存在的H3K9三甲基化是阻碍胚胎克隆的巨大障碍,而这些障碍可以被H3K9me3去甲基化酶Kdm4d所消除,从而提高SCNT效率。同济大学高绍荣研究组^[13]也发现,联用Kdm4b和Kdm5b处理克隆胚胎显著提高了小鼠克隆囊胚的发育率。此外早在2006年,科学家发现组蛋白去乙酰化抑制剂曲古柳菌素(Trichostatin A, TSA)处理能够使小鼠克隆成功率提高5倍以上^[14]。正是基于这些前期重编程机制的研究成果,孙强研究组^[1]找到了Kdm4d和TSA的合适配比用量,一举攻克了这一世界难题(图4)。

4 结语

克隆猴的成功一方面证明了灵长类动物是可以被克隆的,另一方面为探索更接近于人类生理病理机制的医学动物模型的研发掀开了新篇章。中国科学院神经科学研究所所长蒲慕明表示:“体细胞克隆猴的成功将推动中



图4 (网络版彩色)灵长类动物克隆的难点与解决途径

Figure 4 (Color online) The difficulties and solutions for primate cloning

国率先发展出基于非人灵长类疾病动物模型的全新医药研发产业链,促进针对阿尔茨海默症、自闭症等脑疾病,以及免疫缺陷、肿瘤、代谢性疾病的新药研发进程,同时也让中国成为世界脑科学人才的汇聚高地。”事实上,体细胞克隆猴的成功不仅在脑科学的研究领域具有重要意义,而且在细胞治疗、移植免疫、器官再造及谱系发育等诸多生命科学研究领域具有巨大的潜在应用价值。

伴随着克隆猴的成功,人们对“克隆人”的担忧再度引起热议。毕竟人与其他哺乳动物尤其是非人灵长类动物在生理结构上高度雷同,非人灵长类的成功克隆进一步印证了克隆人理论上的可行性。鉴于巨大的伦理争议,早在克隆羊诞生后,联合国就通过协议和宣言禁止克隆人,多数国家也以法律形式明确禁止人的生殖性克隆。生殖性克隆会引起一系列自身、家庭乃至社会等各个层面的种种问题,也是伦理道德所不允许的。然而与之不同的是,以临床应用为目的的“治疗性克隆”有着重大医疗价值和实践意义,将会为人类疾病治疗提供崭新的手段。早在2002年Jaenisch研究组^[15]采用核移植的方法重建了免疫缺陷小鼠的免疫功能,实现了治疗性克隆的概念性突破。而最近,同样采用体细胞核移植的方法Mitalipov研究组^[16]成功建立了人的克隆胚胎干细胞系,这无疑为体细胞克隆技术在人类疾病治疗中的应用奠定了良好基础。我们期待着克隆技术能够在人类健康服务中大显身手。

推荐阅读文献

- 1 Liu Z, Cai Y, Wang Y, et al. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2018, 172: 881–887
- 2 Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810–813
- 3 Spemann H. *Embryonic Development and Induction*. New Haven: Yale University Press, 1938
- 4 Briggs R, King T J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1952, 38: 455–463
- 5 Miller R A, Ruddle F H. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell*, 1976, 9: 45–55

- 6 Tada M, Takahama Y, Abe K, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with es cells. *Curr Biol*, 2001, 11: 1553–1558
- 7 Cowan C A, Atienza J, Melton D A, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 2005, 309: 1369–1373
- 8 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663–676
- 9 Meng L, Ely J J, Stouffer R L, et al. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol Reprod*, 1997, 57: 454–459
- 10 Byrne J A, Pedersen D A, Clepper L L, et al. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 2007, 450: 497–502
- 11 Mitalipov S M, Zhou Q, Byrne J A, et al. Reprogramming following somatic cell nuclear transfer in primates is dependent upon nuclear remodeling. *Hum Reprod*, 2007, 22: 2232–2242
- 12 Matoba S, Liu Y, Lu F, et al. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell*, 2014, 159: 884–895
- 13 Liu W, Liu X, Wang C, et al. Identification of key factors conquering developmental arrest of somatic cell cloned embryos by combining embryo biopsy and single-cell sequencing. *Cell Discov*, 2016, 2: 16010
- 14 Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, et al. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340: 183–189
- 15 Rideout W M, Hochedlinger K, Kyba M, et al. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*, 2002, 109: 17–27
- 16 Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2013, 153: 1228–1238

Summary for “‘克隆猴’的前世今生”

Deciphering the history of monkey cloning

Liang Wang^{1,2} & Tongbiao Zhao^{1,2*}

¹State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

* Corresponding author, E-mail: tbzhao@ioz.ac.cn

Two macaques named “Zhong Zhong” and “Hua Hua”, born on Jan 24, 2018, are the first monkeys cloned by somatic cell nuclear transfer (SCNT), which made Dolly the sheep. This is not only a milestone in mammalian cloning, but also opens a new window to using non-human primates for biomedical research. SCNT is a technique for animal cloning that depends on transferring the nucleus of a somatic cell into an enucleated egg. It was initially proposed by Spemann to study the totipotency of differentiated salamander nuclei in 1938. The prevalent SCNT procedure used today was first developed by Robert Briggs and Thomas King, who successfully used this technique to generate the first cloned animals-tadpoles-using the nuclei of cells from blastocysts as the donors. At the same time, they found it was much more difficult to produce clones from donor cells at later stages of development. John Gurdon extended this experiment and for the first time showed that nuclei from fully differentiated intestinal cells could produce clones. The rejuvenation of nuclei from terminally differentiated cells can be explained by the existence of “young factors” in the cytoplasm of the egg. Interestingly, this is reminiscent of somatic cell rejuvenation by fusion with embryonic stem cells (ESCs), which indicates the existence of young factors in the cytoplasm of ESCs as well. By screening 24 transcription factors that are highly expressed in ESCs, Shinya Yamanaka successfully identified 4 young factors-Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc-which could reset mature nuclei to the totipotent stage. Non-human primates are very hard to clone and extensive efforts had been made in that area with little success before Qiang Sun’s report. Based on advances in our further understanding of the mechanism of somatic cell reprogramming, Dr. Sun’s team optimized the standard SCNT protocol with improved nuclear manipulation and TSA/Kdm4d treatment for a short period of time after cell fusion to successfully clone monkeys. The success of monkey cloning further indicates that there is no obstacle to cloning humans in principle. Although we must forbid human cloning due to the complex associated social and ethical problems, we should consider therapeutic cloning for human disease treatments.

cloned monkey, Kdm4d, reprogramming, somatic cell nuclear transfer (SCNT), totipotency

doi: 10.1360/N972018-00179