

·学科进展·

克隆动物的研究进展

窦忠英

(西北农业大学家畜生殖内分泌与胚胎工程开放实验室, 陕西杨陵 742100)

[摘要] 克隆动物是目前生物技术领域研究的热点之一, 其科学意义和应用价值重大。本文对当前国内外克隆动物的研究进展加以评述。

[关键词] 克隆动物, 胚胎细胞, 体细胞

最近, 英国克隆了一只绵羊“多莉”, 震撼了世界。“多莉”的出现, 证明哺乳动物体细胞可以复制出新个体, 打破了只能使用胚胎细胞克隆动物的传统, 是划时代的成果, 为发展畜牧业展现出美好的前景, 也为发育生物学、遗传学等学科的发展, 进一步揭示生命的奥秘提供了广阔的思路。但同时人们担忧的是, 如果用该项技术克隆人类则将是灾难的降临。所以, 不少国家政府提出取消该项研究经费, 禁止克隆人类, 甚至禁止用克隆技术研究动物。然而, 社会的发展, 科技的进步, 必然引起人们观念的转变, 人们既然能发明克隆技术, 也有能力防止它给人类带来的危害。克隆是英语“clone”的译音, 为无性繁殖之意。以这种方式产生的动物, 其外形、性能和基因型都一样, 亦可称复制动物。克隆动物除用体细胞核移植以外, 亦可通过胚胎分割、胚胎嵌合和胚胎细胞核移植等技术得到。

1 胚胎分割

用显微术将未着床的早期胚胎一分为二、四或更多, 然后分别移植给受体, 妊娠产仔。一枚胚胎可克隆出两个或两个以上的后代。胚胎分割已得到多种动物的胚胎双生后代, 是胚胎移植的重要措施, 也是性别鉴定和核移植等生物工程的基本技术。Mular 等于 1968 年将兔的 2—8 细胞期胚胎一分为二, 移植给受体获得成功。70 年代, 利用胚胎分割先后得到小鼠 (Mullen, 1970)、绵羊 (Trounson, 1974)、牛 (Willadsen, 1981)、山羊 (Tsunoda, 1984)、马 (Allen, 1984) 和猪 (Rorir, 1985) 的同胚双生后代。80 年代以来, 牛胚胎二分割已应用于生产。在胚胎四分割研究方面, 1981 年 Willadsen 首次得到同胚三羔和同胚四羔绵羊。同年, 又得到牛的同胚二犊和同胚三犊。1995 年, 日本报道, 得牛同胚四犊。据近日报道, 乌克兰科学家以胚胎单细胞移植克隆出三头犊牛。

1986 年, 西北农业大学张涌、窦忠英等分别获得胚胎二分割的同胚双鼠和半胚犊牛。此后, 陆续得奶牛 (谭丽玲等, 1987)、山羊 (张涌等, 1987)、兔 (杜森等, 1988) 同胚双生后代。1995 年陶涛等得半胚仔猪 23 头, 但未进行同胚双生鉴定。在胚胎四分割研究方

本文于 1997 年 7 月 11 日收到。

面, 1988年谭丽玲等得奶牛四分胚犊牛和同胚二犊, 1990年窦忠英等得奶牛同胚三犊, 1/4胚移植妊娠率为50%, 郭志勤等得同胚双羔绵羊。1992年徐宁等得同胚三鼠6组。1996年陶涛等得胚胎单细胞(分裂球)移植仔猪。

2 胚胎细胞核移植

用显微术将单个胚胎细胞导入去除染色质的成熟卵母细胞, 电融合后发育成胚胎, 将该重组胚胎移植给受体, 妊娠产仔。理论上讲, 一枚胚胎有多少个细胞, 就可以克隆出多少个动物, 亦可将克隆的胚胎细胞再经核移植克隆出更多的动物。Bondioli等(1990)通过2次连续核移植, 得8头同胚犊牛, 将一枚胚胎反复克隆得190多枚胚胎, 这比胚胎分割可得更多动物。

50年代, 美国科学家将胚胎细胞核移植用于两栖类动物和鱼类的研究。对于哺乳动物, 则是从1981年首次得胚胎细胞核移植小鼠后, 相继得绵羊、牛、兔、猪等细胞核移植克隆动物^[1-7]。在连续核移植方面, 目前已得到牛六代克隆胚胎, 三代克隆犊牛(Willadsen, 1989; Stice, 1991, 1993)。美国俄勒冈的科学家于1996年8月用细胞核移植将猴的胚胎细胞克隆出两只仔猴, 但其程序复杂, 操作难度大, 成功率仅1%—6%。该项技术已引起商业界的重视, 美国等国家为此先后成立了牛克隆公司, 但成功率过低未能如愿。

我国胚胎细胞核移植的研究, 从杜森等于1990年克隆出家兔^[3]后, 陆续有山羊^[4]、兔(王斌等, 1991; 唐铁山等, 1994; 朱裕鼎等, 1993; 安民, 陈永福等, 1995; 周琦等, 1996)、牛(谭丽玲等, 1995; 朱裕鼎等, 1996)、猪(窦忠项等, 1995; 陈乃清等, 1996)和小鼠(湖南医科大学, 1997)克隆成功。在连续核移植研究方面, 中国科学院发育生物学研究所和扬州大学合作于1993年获得世界上第一批连续核移植山羊; 唐铁山等(1994)得连续核移植兔胚胎。

目前, 主要研究调控细胞周期, 采用各种因子加速胞质和核的融合与激活, 改进操作程序, 完善该项技术, 提高克隆胚胎的成功率。

3 胚胎干细胞核移植

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)是早期胚胎或原始生长细胞(primordial germ cell, PGC)经离体抑制分化筛选出在发育阶段上类似于早期胚胎的内细胞团(inner cell mass, ICM), 具有分化潜能和整倍体核型, 既可进行离体培养、扩增、转化和筛选, 又可分化成包括生殖系在内的各种组织的全能性细胞。ES细胞的重要价值在于: ES细胞通过核移植和细胞嵌合, 可克隆出高产优质动物; 利用外源基因导入、基因敲除和基因突变, 为基因治疗提供有效手段; 也是基因转移改良品种的有效途径; 与定向诱导分化技术结合可得医用细胞株; 是研究哺乳动物胚胎发育、分化和遗传等问题的理想模型^[5]。利用胚胎干细胞核移植克隆动物, 即将胚胎细胞抑制分化, 细胞数倍增, 使每个细胞仍具有发育成个体的能力。将这种细胞利用核移植技术导入去除染色质的成熟卵母细胞, 电融合后发育成胚胎, 移植给受体, 妊娠产仔, 得克隆动物。这种方法要比胚胎细胞核移植可克隆出更多的动物。

ES细胞的价值已引起世界各国学者的关注。目前已分离得到小鼠的ES细胞系^[6]。其它如仓鼠、大鼠、水貂、家兔、猴子、绵羊、猪和牛等动物仅得类ES细胞^[7-10]。类ES细

胞在形态结构及分化能力方面类似于小鼠 ES 细胞, 但未能证实是否参与生殖系嵌合体的形成。1984 年, Niemann 和 Strelchenko 建立了兔的类 ES 细胞系, 在嵌合体实验中得到 5 只仔兔, 但尚未来得及鉴定就被母兔吃掉了。1990 年, Notrianni 采用 STO 饲养层得到猪的类 ES 细胞系, Peidrahita 和 Stojek 亦建立了猪的类 ES 细胞系, Wheeler 也宣称获得了参与嵌合体形成的猪的 ES 细胞系, 但未能证实是否发生生殖系嵌合。Tsuchiya 等 (1994) 得到了绵羊的类 ES 细胞克隆, 但生长慢, 仅传 4 代。1994 年 Campbell 等分离得绵羊胚胎类 ES 细胞^[11], 以此细胞核移植得 5 只威尔士雌性山地羊羔。1993 年 Sims 建立了牛的类 ES 细胞, 传代 101 天, 核移植, 13 头受体妊娠, 产 4 头犊牛。1994 年 Strelchenko 和 Stice 建立了牛的类 ES 细胞, 传代 12 个月, 形态未分化, 核移植, 胚胎在受体牛子宫内发育 35—45 天; 嵌合体胚胎在受体牛子宫内发育 80 天。1994 年 Bongso 等得人类的类 ES 细胞克隆^[12]。

1989 年尚克刚等、1990 年丛笑倩等分别建立了小鼠 ES 细胞系, 并得到嵌合体小鼠^[13-15]。1995 年赖学良得到了兔的类 ES 细胞和一只皮毛嵌合体仔兔。本实验室培养小鼠类 ES 细胞传至 9 代, 未见形态分化, 经证明具有多能性^[16]; 利用小鼠成纤维细胞饲养层得到了猪的类 ES 细胞, 传二代, 胚胎细胞附着生长率为 26.7%, 形成的类 ES 细胞克隆率为 13.3%; 同样, 利用小鼠成纤维细胞饲养层得牛的类 ES 细胞, 传二代^[17], 胚胎细胞附着生长率为 47.1%, 1CM 克隆率为 47.1%, 形成的类 ES 细胞克隆率为 41.2%。此外, 还对小鼠、猪和牛的类 ES 细胞的生物学特性、分离培养的差异进行了对比。

阻止胚胎细胞离体培养分化, 使之继续增殖, 是建立 ES 细胞系的关键。这不仅要寻找适宜的分化抑制物和体外培养的各种附加成分, 还须摸清培养 ES 细胞的最适条件等。目前, 研究选用饲养层细胞、条件培养基和/或添加某些抑制分化因子, 如髓样白血病抑制因子、表皮生长因子和胰鸟素样生长因子, 亦有用肿瘤抑制因子 M 等进行 ES 细胞的分离与克隆。

Wilmot 等^[18]采用 9 日龄 Poll Dorset 绵羊胚胎分离胚胎干细胞, 在培养基中添加 DIA/LIF, 将 8 日龄的细胞胚盘以酶消化离散后移至新的饲养层上传, 至第 8 代时, 绝大多数细胞染色体为 54 条, 以第 7—9 代的细胞作为核供体, 在核移植前进行休眠处理。融合重组胚胎 358 枚 (82.8%), 由中间受体重组胚胎 231 枚 (85.3%), 其中桑囊胚 90 枚 (39%)。将 72 枚移植给 27 头受体, 妊娠 14 头 (51.8%), 产羔 4 只 (5.6%); 体外培养重组胚 92 枚, 发育成桑囊胚 36 枚 (39%), 将 15 枚移植给 5 头受体, 1 头妊娠 (20%), 未能产羔。

4 胎儿成纤维细胞核移植

从妊娠早期胎儿分离出单个成纤维细胞, 导入去除染色质的成熟卵母细胞, 融合、发育为胚胎, 移植给受体, 妊娠产仔, 产生克隆动物。这比胚胎干细胞克隆动物更进了一步, 因为成纤维细胞是分化了的细胞, 它发育成新的个体, 是动物体细胞全能性理论的突破。

Wilmot 等^[18]将 26 日龄黑威尔士绵羊胎儿切碎, 用胰蛋白酶消化分离成纤维细胞, 在 BHK21 中培养, 添加 L-谷氨酰胺 (2mM)、丙酮酸钠 (1mM) 和 10% 的胎牛血清。培养至四代时, 大多数成纤维细胞具有 54 条染色体, 在 4—6 代时用作核供体。细胞核移植的方法与前同。给苏格兰黑面母羊注射 GnRh 28—33 小时后采集卵母细胞, 并尽快去除染色质。在含 1% 胎牛血清的无钙、镁磷酸盐缓冲液中检卵, 移入含 10% 胎牛血清无钙 M2 培养液 (37℃, 5% CO₂) 培养。降低培养液中血清的浓度 (5 天内降至 0.5%), 使供核细胞休眠滞

留在 G_0 期。用电脉冲使供体细胞与去核卵母细胞融合和激活卵母细胞。大多数重组胚胎移入用 GnRM 处理 34—36 小时后的绵羊结扎的输卵管内培养，少数体外培养。将发育至桑葚胚或囊胚的胚胎移入终末受体母羊，妊娠产仔，得到融合重组胚胎 172 枚 (84.7%)，由中间受体回收胚胎 124 枚 (86.7%)，其中桑囊胚 34 枚 (27.4%)。将该 34 枚移植给 10 头终末受体，妊娠 4 头 (40%)，产羔 2 只 (5.9%)；体外培养 24 枚组合胚，其中桑囊胚 13 枚 (54.2%)，将 6 枚桑囊胚移植给 6 头受体，1 头妊娠 (16.7%) 产仔一只 (16.7%)，羔羊衰弱，产后几分钟死亡。所生羔羊都显示了核供体的形态学特征，与提供卵母细胞的母羊不同。经多态位点分析，证实他们来自核供体细胞群。

5 体细胞核移植

将动物体细胞抑制培养，使其处于休眠状态，导入去除染色质的成熟卵母细胞，克隆胚胎，移植给受体，妊娠产仔，克隆出动物。理论上讲，体细胞核移植可无限地克隆动物。Wilmut 等用一头 6 岁妊娠后 1/3 时期的 Finn Dorset 绵羊的乳腺细胞 (其中 90% 以上为乳腺上皮细胞，含少量肌上皮细胞、成纤维细胞，其中还夹杂有干细胞)，将分离出的乳腺细胞传 3—6 代作核供体，融合重组胚胎 277 枚 (63.8%)，从中间受体回收胚胎 247 枚 (89.2%)，其中桑囊胚 29 枚 (11.7%)，移植受体 13 头，妊娠 1 头 (7.7%)，妊娠期 148 天，产羔 1 只 (3.4%)，重 6.6kg，发育良好，形态学特征和供核羊相同，而与提供卵母细胞的母羊不同，这就是“多莉”。经过 DNA 分析，确认“多莉”是由核供体的乳腺细胞发育而来。“多莉”的问世，冲破了用胚胎细胞克隆动物的传统方式，为培养良种家畜、生产某些药物、提供能被人体接受的移植器官、建立实验动物模型等开辟了新的途径。另外，罗林研究所培养出一只奶中含治疗血友病药物的转基因羊，给患者带来福音。

6 胚胎嵌合

将两枚或多枚胚胎细胞聚合共同发育成一个胚胎，称为嵌合体 (chimera)。将该胚胎移植给受体，妊娠产仔，如果仔畜具有以上两枚或多枚胚胎的细胞成分者称之为嵌合体动物。如将两枚胚胎各分割为相等等分彼此嵌合，可以克隆出含两种胚胎细胞相同的多个嵌合体动物。如同种黑、白鼠胚胎嵌合，生黑白相间的花鼠；不同属的绵羊和山羊胚胎细胞嵌合，生绵山羊，具有两者特征，为一个新物种。利用该项技术亦可检测动物胚胎干细胞的全能性，即将胚胎干细胞和同种类动物胚胎嵌合，如生下包括生殖系在内的嵌合体，即可确认该干细胞具有全能性。胚胎嵌合在畜牧业生产中有重要意义，如对水貂、狐狸、绒鼠等毛皮动物进行胚胎嵌合，可得传统方式得不到的皮毛花色后代，提高商品价值。利用该项技术可以克服动物种间杂交繁殖障碍，创造新物种，进行异种动物彼此妊娠产仔，加快珍稀濒危动物的繁殖。例如，利用其它动物代替珍贵的大熊猫妊娠产仔，加快其繁殖；也可培育含人类细胞成分的猪，供人类器官移植用。

自 Tarkowski (1961) 得小鼠嵌合体后^[19]，相继得大鼠、兔、牛、猪、山羊嵌合体以及大鼠-小鼠、绵羊-山羊、马-斑马和牛-水牛等属间嵌合体^[20—24]，可以胚胎 (或细胞) 聚合，囊胚注入和囊胚重组等技术制作嵌合体。我国的胚胎嵌合研究，已得小鼠 (李幼兰等，1982；张锁链等，1989)、家兔 (赖良学，1995)、山羊^[25]和猪 (沈三浜，1990) 嵌合体。

近几年来,克隆动物的研究日新月异,有的已用于生产。“七五”以来,国家科委、国家自然科学基金委员会、农业部等部门对动物胚胎工程的研究特别重视,多次立项,组织力量协同攻关,在胚胎分割、胚胎细胞核移植等方面取得了较大的进展。在国际上克隆出的动物中,除个别外,我国均已克隆成功。但这与体细胞克隆动物的成功尚存在质的差距。今后,我们应加大投资,完善技术,提高成功率,对促进科学研究,发展畜牧业生产作出贡献。

参 考 文 献

- [1] Illmensee K et al. *Cell*, 1981, **23**: 9.
- [2] Willadsen S M. *Nature*, 1986, **227**: 298.
- [3] 杜森等. 动物胚胎移植及有关生物技术国际学术研讨会论文集, 乌鲁木齐, 1992年, 第123页.
- [4] 张涌等. *中国农业科学*, 1991, **24** (5): 1.
- [5] 唐铁山等. *西北农业大学学报*, 1993, **21** (增刊2): 87.
- [6] Evans M J et al. *Nature*, 1981, **292** (9): 154.
- [7] Deetschman T et al. *Developmental Biology*, 1988, **127**: 224.
- [8] Nieman H et al. *Theriogenology*, 1994, **41**: 265.
- [9] Evans M J et al. *Theriogenology*, 1990, **33**: 125.
- [10] Stice S et al. *Theriogenology*, 1994, **41**: 301.
- [11] Campbell K H S et al. *Nature*, 1996, **380** (7): 64.
- [12] Bongso A et al. *Theriogenology*, 1994, **41**: 167.
- [13] 丛笑倩等. *实验生物学报*, 1987, **20**: 237.
- [14] 尚志刚等. *北京大学学报 (自然科学版)*, 1993, **29**: 196.
- [15] 尚志刚等. *北京大学学报 (自然科学版)*, 1994, **30** (4): 500.
- [16] 钱永胜等. *四川大学学报 (自然科学版)*, 1996, **33** (专辑): 135.
- [17] 钱永胜等. *四川大学学报 (自然科学版)*, 1996, **33** (专辑): 142.
- [18] Wilmut I et al. *Nature*, 1997, **385**: 810.
- [19] Tarknusi A K. *Nature*, 1961, **190**: 357.
- [20] Pighills E et al. *J. Reprod. Fert.*, 1968, **17**: 543.
- [21] Mayer J F et al. *J. Reprod., Fert.*, 1974, **39**: 1.
- [22] Gardner R L. *Nature*, 1974, **250**: 146.
- [23] Brem G et al. *Theriogenology*, 1984, **22**: 609.
- [24] Fehilly C B et al. *Nature*, 1984, **307**.
- [25] 吴民跃等. *西北农业大学学报*, 1993, **21** (增刊2): 77.

PROGRESS IN THE RESEARCH OF CLONING ANIMALS

Dou Zhongying

(*Laboratory of Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shanxi 712100*)

Abstract Animal cloning, with its great value in science and practice, is one of the important re-

search fields in biotechnology. The author here reviewed the research advances and new achievement in animal cloning by discussing different cloning techniques such as embryo splitting, nuclear transfer of embryo cells, embryonic stem cells, fetal fibroblasts and somatic cells, and chimera production in domestic animals. Some of the data and achievements in this laboratory were also included, which have not yet been published.

Key words animal cloning, embryo cell, somatic cell

·资料·

1997 年度获国家自然科学基金面上项目 资助的前 20 所科研院所名单 (按资助金额顺序)

单 位 名 称	项 数 (项)	资 助 金 额 (万元)
中国科学院地质研究所	17	272. 50
中国科学院动物研究所	23	268. 50
中国科学院地球化学研究所	17	257. 00
中国人民解放军军事医学科学院	23	256. 00
中国科学院生态环境研究中心	19	239. 50
中国科学院广州地球化学研究所	17	238. 00
中国科学院物理研究所	18	218. 00
中国科学院上海有机化学研究所	17	212. 00
中国科学院力学研究所	17	207. 00
中国科学院海洋研究所	13	189. 50
中国科学院化学研究所	15	184. 50
中国科学院大气物理研究所	11	166. 00
中国科学院地理研究所	11	161. 50
中国科学院长春应用化学研究所	14	161. 50
中国科学院植物研究所	14	156. 00
中国医学科学院基础医学研究所	13	150. 50
中国科学院南京土壤研究所	10	143. 00
地质矿产部地质研究所	9	143. 00
中国科学院金属研究所	10	141. 00
中国科学院地球物理研究所	8	132. 00

(综合计划局信息处 供稿)