

TSA 对滩羊成纤维细胞作为供体细胞的作用

李向臣¹,姚雅馨^{1,2},梁素丽^{1,3},王义鹏^{1,4},关伟军^{1*},马月辉^{1*}

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所,北京 100193; 2. 东北林业大学野生动物资源学院,哈尔滨 150040;
3. 西北农林科技大学动物科技学院,杨凌 712100; 4. 内蒙古农业大学动物科学与动物医学学院,呼和浩特 010018)

摘要:为探索成纤维细胞作为供体细胞的潜能和 Trichostatin A(TSA)处理供体细胞的适合浓度,提高克隆胚胎的发育水平。本研究分别利用 100、50、25、10 ng·mL⁻¹ TSA 处理滩羊成纤维细胞,观察细胞形态,统计细胞活率,利用流式分选技术分析处理前后细胞的周期时相,同时通过间接免疫荧光法检测细胞乙酰化水平,并以经过 10~50 ng·mL⁻¹ TSA 处理的成纤维细胞作为供体细胞,检测其重构胚发育水平。结果发现,当 TSA 的浓度达 100 ng·mL⁻¹时,细胞大量死亡,不同浓度 TSA 处理细胞 24 h 后,细胞周期被明显抑制在 G₀/G₁ 期,乙酰化水平明显高于对照组,其中供体细胞经 10 ng·mL⁻¹ TSA 处理的克隆胚胎卵裂率和囊胚率明显升高($P < 0.05$, (85.2 ± 3.4)% vs (68.6 ± 6.7)%, (35.6 ± 5.7)% vs (10.4 ± 8.3)%)。结果表明,经 10 ng·mL⁻¹ TSA 处理的滩羊成纤维细胞周期同步化明显,乙酰化维持较高水平,重构胚胎发育水平明显提高,适合作为成纤维细胞的处理方法和浓度。

关键词: 滩羊; TSA; 成纤维细胞; 乙酰化

中图分类号: S827; S814.8

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)04-0410-07

Effect of TSA on Fibroblast Cell as Donor Cell in the Tan Sheep

LI Xiang-chen¹, YAO Ya-xin^{1,2}, LIANG Su-li^{1,3}, WANG Yi-peng^{1,4},
GUAN Wei-jun^{1*}, MA Yue-hui^{1*}

(1. *Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;*
2. *College of Wildlife Resource, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China;*
3. *College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;*
4. *College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China*)

Abstract: In order to investigate the potential of fibroblasts as donor cells, and find out the optimal concentration of TSA used to treat fibroblasts, and further to improve the developmental level of cloned embryos, the fibroblasts were treated with 100, 50, 25, 10 ng·mL⁻¹ TSA, cell morphology and viability were investigated. Flow cytometry were adopted to analyse cell cycle. Acetylation level was detected by indirect immunofluorescence, and the developmental level of cloned embryos was evaluated. Most cells treated with 100 ng·mL⁻¹ TSA were dead, but a significant increase of acetylation level was detected; the cell cycle was arrested at G₀/G₁ checkpoint with the existence of TSA; generally, there was a higher proportion of cleavages and blastulas ($P < 0.05$, (85.2 ± 3.4)% vs (68.6 ± 6.7)%, (35.6 ± 5.7)% vs (10.4 ± 8.3)%) when the cells were treated with 10 ng·mL⁻¹ TSA. The results suggested that acetylation level, cell morphology and embryonic developmental level were improved and optimal for the donor cells treated with 10 ng·mL⁻¹ TSA.

Key words: Tan sheep; TSA; fibroblast cell; acetylation

收稿日期: 2009-05-11

基金项目: “863”高新技术发展计划(2006AA10Z198); 国家自然科技平台建设项目(2005DKA21101)

作者简介: 李向臣(1973-), 男, 内蒙古通辽人, 博士, 主要从事动物胚胎工程与发育生物学研究, E-mail: xcli973@gmail.com; 姚雅馨(1983-), 女, 辽宁锦州人, 硕士, 主要从事动物生殖生理与胚胎工程研究, E-mail: yaoyaxin0602@126.com

* 通讯作者: 关伟军, E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn; 马月辉, E-mail: yuehui.ma@263.net

哺乳动物细胞克隆是 20 世纪末生命科学领域最引人注目的高新技术,该技术对于优良种畜的复制、动物遗传多样性保存及濒危动物挽救、转基因动物培育等方面具有重要意义^[1-2]。目前,虽然体细胞克隆在许多物种中获得了成功,但克隆的效率却很低,只有低于 4% 的重组胚胎可以发育成个体^[3]。因此,动物克隆研究的目的已经不是仅仅获得为数有限的克隆后代,而是如何进一步解释克隆机理、提高克隆效率。在体细胞克隆过程中,如果供核基因组完全没有进行重新编程,重构胚很快死亡;如果部分重编程,重构胚在不同发育阶段死亡;而完全重新编程,则产生正常的克隆动物^[4]。由此可见,完全的重新编程是成功产生克隆动物的先决条件。成功的核移植动物克隆需要将供体细胞核重编程为全能的、胚胎化的状态^[5],这意味着供体核必须停止本身的基因表达程序,恢复为正常发育所必需的特定的胚胎表达程序状态。研究表明^[6],细胞在重编程过程中高水平乙酰化和低水平的甲基化有利于重编程过程的进行,由于组蛋白的超乙酰化状态可以改变染色质结构,使染色质由原来的致密结构转变为相对松散的结构,即“开放”的结构,从而有利于转录因子的结合^[7]。TSA 可以通过抑制组蛋白去乙酰化酶的作用从而使染色质处于超乙酰化状态,激活了发育相关基因^[8]。有科学家利用 TSA 处理核移植的供体细胞,结果提高了克隆胚胎的发育率^[9]。

细胞周期对核移植成功率的影响至关重要,常以 G_0/G_1 期细胞作为供体细胞,这种细胞较易于重编程^[10]。通常,获得 G_0/G_1 期细胞常用的方法是血清饥饿和接触抑制,更为重要的是应用这两种方法已成功获得家畜体细胞的核移植后代^[11]。但是,血清饥饿和接触抑制所诱导的细胞同步化处理是否是克隆成功的必要条件,并无定论。而 TSA 是一种具有很强的抑制组蛋白去乙酰化酶(HDAC)的特异性抑制剂,在正常大鼠成纤维细胞研究中发现^[12]: TSA 可将增殖细胞特异地锁定在 G_1 和 G_2 期,这对于供体细胞的周期同步化起到了重要作用。

TSA 可以通过促进重编程从而提高克隆胚胎的发育水平,但是对于 TSA 处理供体细胞的适合浓度尚无定论。因此,本研究分别利用 100、50、25、10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TSA 处理滩羊成纤维细胞,观察细胞形态,统计细胞活率,并通过间接免疫荧光法检测其乙酰化水平,同时以 TSA 处理的成纤维细胞作为供体细胞,检测其重构胚发育水平。

1 材料与方法

文中所涉及到的试剂和药品除特殊说明外均购自 Sigma 公司。

1.1 成纤维细胞的复苏与培养

使用本实验室 2007 年 4 月冻存的滩羊耳缘组织成纤维细胞,使用前复苏细胞(细胞冻存编号为 20070423)。

(1)解冻:将冻存管从液氮中取出,迅速投入 42 °C 水浴中,不停的晃动(约 1 min),见余有小冰团黄豆粒大小时放入超净工作台内。(2)加液:用吸管将细胞移入加有培养液的培养瓶中,轻轻吹打均匀,放置于含体积比 5% CO_2 的培养箱中培养,换液后过夜继续培养。(3)传代:当细胞生长达到 80% 汇合时,吸出培养液,用无菌 PBS 清洗 2 遍后,加入 100 μL 的 0.25% 胰蛋白酶(Gibco)+0.01% EDTA 液 37 °C 消化 2~3 min,立即加入 2 mL DMEM + 10% FBS 终止消化。然后按照 1 : 2 传代。

1.2 不同浓度 TSA 对成纤维细胞形态与活率的影响

DMSO 融解 TSA,分别配制成 100 和 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓储液,-20 °C 储存。当细胞接种达对数生长期,在 24 孔板内分别加入 0、10、25、50、100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TSA 各 3 孔,处理 24 h 后,观察其形态变化。

利用 Trypan Blue 染色法统计细胞活率^[13]。

1.3 周期检测

经 TSA 处理前后的成纤维细胞利用 0.25% 胰蛋白酶+0.01% EDTA 液消化 2~3 min,收集于 5 mL 的离心管中,用 PBS 离心洗涤 3 次,将细胞重悬于 4 °C 预冷的 70% 乙醇中固定备用。检测前用 DPBS 离心洗涤 3 次,用 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNA 酶 37 °C 作用 30 min, PBS 洗涤离心 3 次,调整细胞密度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,上流式细胞仪前用 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI 染色 10 min 后检测。记录异倍体细胞所占百分比和处于 G_0/G_1 期时相的细胞所占百分比,以“平均数±标准差”表示。

1.4 卵母细胞的体外成熟

采自屠宰场的新鲜牛卵巢,放入灭菌的生理盐水中,保持温度在 30~33 °C,4 h 内运回实验室。采集卵泡液,磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)稀释,在体式显微镜下用吸管挑选包裹 3 层以上、致密、胞质均匀的卵丘/卵母细胞复合体(Cumulus-oocyte complexes, COCs)。用平衡 2 h 以上的卵母细胞成熟液(M199 9.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,

Hepes $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 丙酮酸钠 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, L-谷氨酰胺 $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 尿促性素 $0.075 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 雌二醇 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 15% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS, Gibico) 洗 2 次后用于成熟培养, 培养条件为 $39 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 饱和湿度。成熟培养 22 h 后, 将 COCs 转入 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的透明质酸酶消化, 并用吸管反复吹打去掉卵母细胞表面的颗粒细胞, 检查卵母细胞成熟率。

1.5 重构胚的构建与培养

采用胞质内注射的方法, 选择经不同浓度 TSA 处理的成纤维细胞进行核移植, 构建重组胚。构建好的重组胚用 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 离子霉素激活 5 min 后, 移入含 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 6-DMAP 培养液内再激活 4 h, 激活后的重组胚用培养液清洗 3 次后, 放入 4 孔培养板 (Nunc) 内培养, 每隔 48 h 半量换液 1 次, 96 h 后加入 10% FBS 继续培养, 培养 48 h 后统计卵裂率, 7~8 d 后统计发育的囊胚率。

1.6 间接免疫荧光法检测乙酰化水平

一抗: 兔抗羊组蛋白 H4K12 多克隆 IgG (Santa Cruz); 二抗: FITC 标记羊抗兔 IgG (Santa Cruz)。

间接免疫荧光试验: 收集各处理组细胞各 3 孔, 于 3.7% 多聚甲醛中室温固定 1 h 或 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜; 用 PBS+1% BSA 清洗 3 次, 去除固定液; 将细胞置于 0.5% TritonX-100 溶液中室温作用 30 min, 以提高细胞膜通透性; PBS+BSA 清洗 3 次, 去除 TritonX-100; 组蛋白 H4K12 一抗分别用 PBS+BSA 进行

1 : 200 稀释, 滴入各孔 $30 \mu\text{L}$, 室温孵育 1 h; PBS+BSA 清洗, 重复 4~5 次; 将细胞置于 FITC 标记的二抗 (1 : 100 稀释) 中, 室温作用 45 min, 注意避光; PBS+BSA 清洗 4~5 次; 用 PI ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 染核, 室温作用 10 min; PBS+BSA 清洗 3 次; 于共聚焦显微镜下检测荧光。仪器预设值在每个重复中保持不变, 每组处理各取 3 孔, 重复 3 次以上。

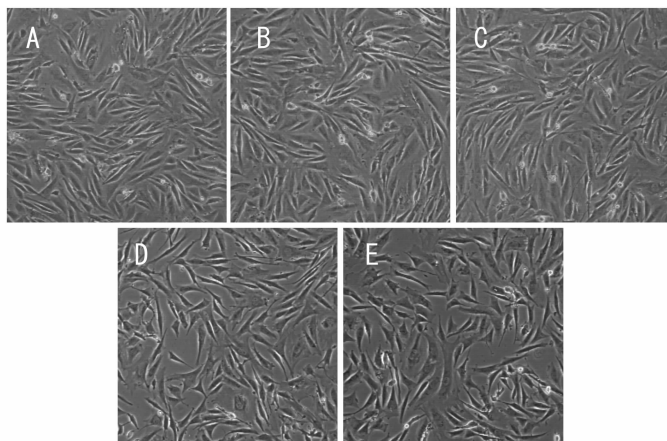
1.7 数据统计

荧光强度的分析应用 Confocal 荧光分析软件 EZ-C1 3.70 FreeViewer 得到 H4K12 和 PI 的荧光强度值, 算出两者的比值, 即是乙酰化抗体在细胞中的相对荧光强度^[14]。数据分析采用了 SPSS 软件的配对 T 检验方法。以上所有试验重复 3 次。

2 结果

2.1 TSA 对成纤维细胞形态和活率的影响

成纤维细胞经 TSA 处理后, 随着 TSA 浓度的增加, 细胞形态不再饱满, 变得扁平, 核区明显可见, 胞质出现空洞且随浓度的增加而变多, 细胞失去原有长条梭形的特点, 即使在低浓度 ($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理 24 h 也表现出明显的形态改变, 而且形态改变随药物浓度的增加变的更加明显 (图 1), 且当 TSA 浓度为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 细胞大量死亡 (图 2), 浓度在 $10 \sim 50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时细胞不易死亡, 作为供体细胞的处理方法基本适合。

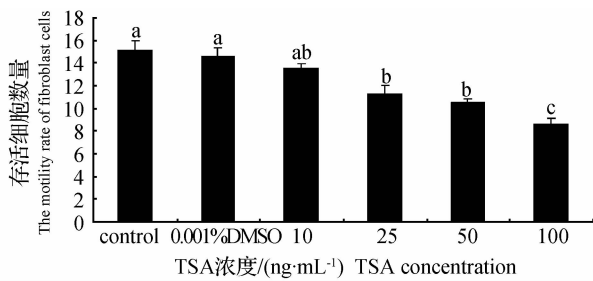


A. 未经处理的对数生长期滩羊成纤维细胞; B. 经 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA 处理 24 h 的滩羊成纤维细胞; C. 经 $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA 处理 24 h 的滩羊成纤维细胞; D. 经 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA 处理 24 h 的滩羊成纤维细胞; E. 经 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA 处理 24 h 的滩羊成纤维细胞

A. Untreated fibroblast cells; B. Fibroblast cells treated with $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA for 24 h; C. Fibroblast cells treated with $25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA for 24 h; D. Fibroblast cells treated with $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA for 24 h; E. Fibroblast cells treated with $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA for 24 h

图 1 经不同浓度 TSA 处理的滩羊成纤维细胞形态 (200×)

Fig. 1 The morphology of fibroblast cells treated with different concentrations of TSA (200×)



误差线表示测得数据的标准偏差。上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。图 4 同 Different letters mean significant difference between the treatments ($P < 0.05$), the same letter means no significant difference between the treatments ($P > 0.05$). The same as Figure 4

图 2 不同浓度 TSA 处理成纤维细胞后存活细胞数的变化

Fig. 2 The motility rate of fibroblast cells treated with different concentrations of TSA

表 1 不同处理方法对成纤维细胞周期的影响

Table 1 The effect of different concentrations of TSA on the fibroblast cell cycle

TSA 浓度/(ng·mL ⁻¹) Concentration of TSA	细胞周期分布(% ± SE) Cell cycle		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	60.5 ± 2.1 ^b	29.6 ± 0.7 ^a	9.9 ± 2.7 ^a
10	73.3 ± 2.6 ^a	16.3 ± 0.8 ^a	10.4 ± 2.1 ^a
25	77.2 ± 1.8 ^a	8.8 ± 1.5 ^a	14.0 ± 2.3 ^{ab}
50	73.0 ± 1.3 ^a	8.5 ± 2.0 ^a	18.5 ± 1.1 ^b

上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同字母表示差异不显著($P > 0.05$)。表 2 同

Different letters in the same row mean significant difference between the treatments ($P < 0.05$), the same letter in the same row means no significant difference between the treatments ($P > 0.05$). The same as Table 2

2.4 不同浓度 TSA 对重构胚发育水平的影响

成纤维细胞经过不同浓度 TSA 处理后, 其重构胚的卵裂率和囊胚率见表 1。与对照组相比, 经 10 ng·mL⁻¹ TSA 处理后的成纤维细胞充当供体细胞, 其卵裂率和囊胚率较对照组明显增加($P < 0.05$, (85.2 ± 3.4)% vs (68.6 ± 6.7)%, (35.6 ± 5.7)% vs (10.4 ± 8.3)%)。而细胞经 25 ng·mL⁻¹ TSA 处理

2.2 不同浓度 TSA 对成纤维细胞周期的影响

在相对较低 TSA 处理组(10~50 ng·mL⁻¹), 细胞增殖明显受到抑制, S 期细胞明显减少, 细胞被抑制在 G₀/G₁ 期(表 1)。

2.3 不同浓度 TSA 对成纤维细胞乙酰化水平的影响

通过免疫荧光结果分析显示, 红色为 PI 显示核, 绿色为乙酰化水平, 我们发现不同浓度的 TSA 处理成纤维细胞后, 其乙酰化水平均较对照组明显增加(图 2、图 3)。细胞经 10 ng·mL⁻¹ 的 TSA 处理后, 与 100 ng·mL⁻¹ TSA 处理组相比没有明显区别, 同样其他处理组之间乙酰化水平没有明显区别。

的重构胚囊胚发育水平较对照组也大量增加($P < 0.05$, (25.3 ± 4.3)% vs (10.4 ± 8.3)%), 但是低于 10 ng·mL⁻¹ 处理组((25.3 ± 4.3)% vs (35.6 ± 5.7)%)。50 ng·mL⁻¹ TSA 处理组的卵裂率同样明显提高($P < 0.05$, (78.0 ± 8.6)% vs (68.6 ± 6.7)%), 但是囊胚率较对照组差异不显著($P > 0.05$, (16.9 ± 8.3)% vs (10.4 ± 8.3)%。

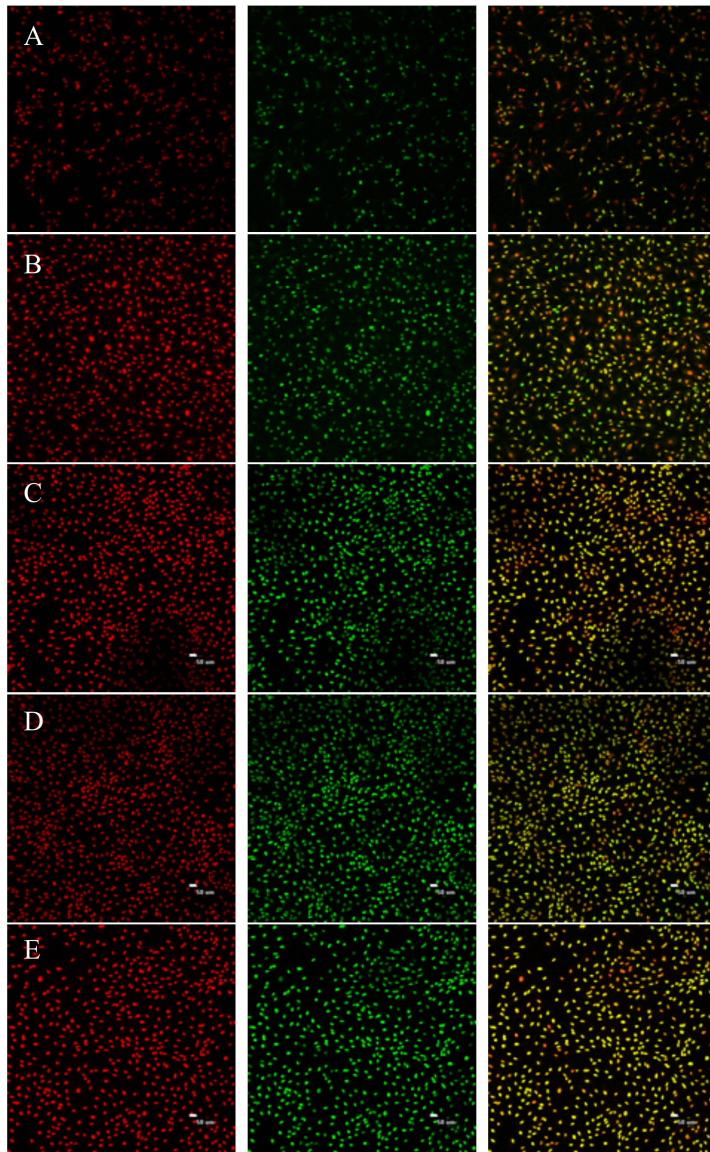
表 2 不同浓度 TSA 对重构胚发育水平的影响

Table 2 The effect of different concentration of TSA on the reconstructed embryos

TSA 浓度/(ng·mL ⁻¹) Concentration of TSA	培养胚胎数	卵裂数(% ± SE)	囊胚数(% ± SE)
	No. of embryos cultured	No. of embryos cleaved	No. of blastocysts
0	288	198(68.6 ± 6.7 ^b)	30(10.4 ± 8.3 ^c)
10	301	256(85.2 ± 3.4 ^a)	107(35.6 ± 5.7 ^a)
25	297	236(79.5 ± 3.9 ^a)	75(25.3 ± 4.3 ^b)
50	295	230(78.0 ± 8.6 ^a)	50(16.9 ± 8.3 ^{bc})

综上所述, 经 10 ng·mL⁻¹ TSA 处理的滩羊成纤维细胞, 与对照组相比, 细胞乙酰化维持较高水平, 细胞周期被明显抑制在 G₀/G₁ 期, 并且与其他

处理组相比, 细胞形态良好, 活率较高, 重组胚胎发育水平较高, 较适合作为成纤维细胞的处理方法。



A~E. 滩羊成纤维细胞经 0、10、25、50、100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA 处理 24 h 后的乙酰化水平(红色荧光,PI 染色示核);抗 H4K12 乙酰化抗体免疫荧光染色(绿色荧光);黄色为红绿荧光共聚焦

A—E. The level of acetylation after incubation with 0, 10, 25, 50, 100 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TSA for 24 h(red fluorescence, nuclear stained by PI); Anti-H4K12 acetylation antibody immunofluorescence staining(green fluorescence); The yellow fluorescence is the confocal of red and green fluorescence

图 3 滩羊成纤维细胞经不同浓度的 TSA 处理 24 h 后的乙酰化荧光标记 (100 \times)

Fig. 3 Level of acetylation after incubation with different concentrations of TSA for 24 h (100 \times)

3 讨论

体细胞在移入去核的卵母细胞后必然经历重编程过程,以恢复胚胎开始发育的全能状态。如果这一重编程过程不完全就必然导致体细胞克隆胚发育率低,胎盘发育异常,胚胎移植后高的流产率及出生后的异常,正是这些不利因素制约了克隆技术的广泛应用。研究表明,细胞在重编程过程中高的乙酰

化水平以及低的甲基化水平有利于重编程过程的进行^[14]。所以,在选择处理供核细胞的处理方法时,可以从表观遗传修饰程度的角度出发,来选择 DNA 甲基化程度相对较低,组蛋白乙酰化程度相对较高的细胞处理方式来进行核移植。Wee 等^[15]用 TSA (trichostatin A)处理牛的成纤维细胞发现,DNA 的甲基化水平和组蛋白的去乙酰化水平都有所降低,而组蛋白的乙酰化水平却没有明显改变,但是牛的

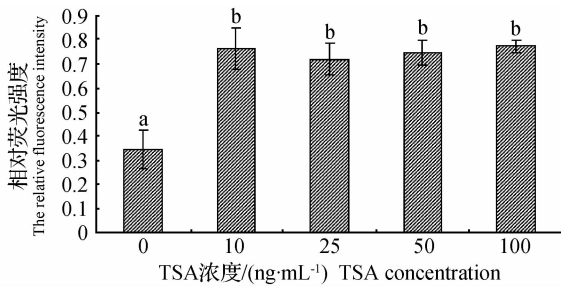


图4 滩羊成纤维细胞随 TSA 浓度变化的荧光定量分析图谱
Fig. 4 The quantitative analysis to the fibroblast cells incubation with different concentrations of TSA

供体细胞这些表观遗传修饰作用却并没有在其克隆胚的 DNA 甲基化过程中显现。而本研究就成纤维细胞的乙酰化水平分析后发现,其乙酰化水平随着浓度的升高而明显升高,这可能与种属的表观修饰程度有关,可能是羊的乙酰化程度较牛的容易优化。

迄今为止,很多种类的体细胞被应用为核供体,并且获得了成功。其中颗粒/卵丘细胞和成纤维细胞作为核供体应用的最多,并且所获得的核移植后代较多,最近几年开始利用促重编程的试剂来处理供体细胞,期望达到提高克隆胚胎发育率的效果。但是,有研究显示,成纤维细胞具有保持细胞稳定性的能力,对比颗粒细胞,成纤维细胞经传代或处理仍能保持细胞所特有的生物学特性^[16]。本研究利用 TSA 处理后的成纤维细胞表现出明显升高的乙酰化水平和胚胎发育水平。Yang 等^[6]就兔的颗粒细胞和经 NaBu(丁酸钠,另外一种组蛋白去乙酰化抑制剂)处理的成纤维细胞乙酰化水平作比较,发现经 NaBu 处理的成纤维细胞具有颗粒细胞相对较强的乙酰化修饰,其重编程能力和克隆胚胎发育水平也相对较强,这与本研究的结论有异曲同工之效。因此,经组蛋白去乙酰化抑制剂处理的成纤维细胞似乎更适合作为供体细胞。

但是, TSA 的处理浓度一直是困扰人们的一大因素, Enright 等^[9]利用 25 和 375 ng·mL⁻¹ L 的 TSA 分别处理供体细胞,发现经 25 ng·mL⁻¹ 处理的供体细胞其囊胚率较高,因此, TSA 的浓度不一定与获得的重组胚发育水平成正比,我们发现,用 100 ng·mL⁻¹ TSA 处理成纤维细胞细胞,导致了明显的细胞毒性,大量细胞趋于凋亡,得出这样的结果,可能是由于不同种细胞对药物的耐受性不同所致。同时发现,在相对较低的处理浓度(25~50 ng·mL⁻¹),细胞的增殖明显被抑制,细胞形态不再

饱满,变得扁平,核区明显可见。所以本研究利用更小浓度 10 ng·mL⁻¹ 尝试处理成纤维细胞,发现细胞形态良好,乙酰化水平较高,且获得了较高的卵裂率和囊胚率,且囊胚率比 25 ng·mL⁻¹ 处理组要明显增加,这可能是由于 TSA 的毒害作用在极小浓度没有体现,反而只体现了其提高供体细胞重编程能力这一方面,也证明了 10 ng·mL⁻¹ TSA 作为供体细胞的处理方式更为适合。Jones 等^[17]用去一种促进供体细胞重编程的甲基化试剂 5-aza-dc,处理供体细胞后反而降低了克隆胚的囊胚发育率,这可能是由于 5-aza-dc 本身具有毒性,其他学者也没有成功的报道,看来这一思路虽然不错,但合适的试剂与合理的剂量及处理时间还需要摸索。

本研究证明经合适浓度(10 ng·mL⁻¹)的 TSA 处理后的具有高乙酰化水平的成纤维细胞充当供体细胞,其卵裂率和囊胚率较对照组差异明显($P < 0.05$),恰好证明了细胞在重编程过程中高的乙酰化水平有利于重编程过程这一观点^[11]。

近些年来,人们对于供体细胞核移入去核的卵母细胞后,所经历的重编程过程的研究逐渐深入,但是它仍然是一个有待于开发的领域。目前,人们对于它的研究主要集中在重构胚的构建、处理及其发育水平上,但是笔者认为,从供体细胞的选择和处理上着眼,我们可以避免一些不必要的困扰,加之后续的处理,相信能够大幅度提高重构胚核重编程的能力。

4 结论

本研究利用不同浓度 TSA 处理滩羊成纤维细胞,发现经过 25~100 ng·mL⁻¹ TSA 处理的细胞形态不佳,细胞活率明显降低,而经 10 ng·mL⁻¹ TSA 处理的滩羊成纤维细胞周期同步化明显,乙酰化维持较高水平,重构胚胎发育水平明显提高,适合作为成纤维细胞的处理方法和浓度。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] STICE S L, ROBL J M, PONCE F A, et al. Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities [J]. *Theriogenology*, 1998, 49(1): 129-138.

- [3] WILMUT I, BEAUJEAN N, SOUSA P D, et al. Somatic cell nuclear transfer [J]. *Nature*, 2002, 419 (6907): 583-586.
- [4] RIDEOUT W M, KEVIN E. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome science [J]. *Science*, 2001, 293: 1093-1098.
- [5] GURDON J B, COLMAN A. The future of cloning [J]. *Nature*, 1999, 402(6763):743-746.
- [6] YANG J F, YANG S H, BEAUJEAN N, et al. Epigenetic marks in cloned rhesus monkey embryos; comparison with counterparts produced *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, 2007, 76(1): 36-42.
- [7] TURNER B M. Histone acetylation as an epigenetic determinant of long-term transcriptional competence [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1998, 54(1): 21-31.
- [8] LEE D Y, HAYES J J, PRUSS D, et al. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA [J]. *Cell*, 1993, 72(1): 73-84.
- [9] ENRIGHT B P, KUBOTA C, YANG X, et al. Epigenetic characteristics and development of embryo cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69 (3): 869-901.
- [10] 李雪峰, 安志兴, 李煜, 等. 牛供体细胞的来源、血清饥饿和预激活对核移植卵体外胚胎发育的影响 [J]. *动物学研究*, 2003, 24(1):35-38.
- [11] MIYAMOTO K, HOSHINO Y, MINAMI N, et al. Effects of synchronization of donor cell cycle on embryonic development and DNA synthesis in porcine nuclear transfer embryos [J]. *Reprod Dev*, 2007, 53 (2): 237-246.
- [12] 穆润清, 贺安宁, 王丽, 等. MAPK 和 MPF 对小鼠受精卵有丝分裂期作用 [J]. *中国公共卫生*, 2006, 2 (25):594-595.
- [13] WEINGARTL H M, SABARA M, PASICK J, et al. Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages Partial characterization and virus susceptibility [J]. *Virology Methods*, 2002, 104(2): 203-216.
- [14] SCHUBELER D, LORINCZ A, CIMBORA D M. Genomic targeting of methylated DNA; influence of methylation of transcription, replication, chromatin structure and histone acetylation [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:3103-3112.
- [15] WEE G, KOO D B, SONG B S, et al. Inheritable Histone H4 Acetylation of somatic chromatins in cloned embryos [J]. *Biol Chem*, 2006, 281(9): 6048-6057.
- [16] DINNYES A, DAI Y, BARBER M, et al. Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts; effect of activation treatment and donor cell preparation [J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(1): 257-263.
- [17] JONES K L. DNA hypomethylation of karyoplasts for bovine nuclear transplantation [J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(2): 208.