

供体细胞状态对牛重组胚发育的影响

李向臣, 跃 华, 刘 鹏, 乌云其其格, 关伟军*, 马月辉*

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094)

摘 要: 本试验通过比较供体成纤维细胞的不同血清饥饿培养天数、传代次数、冻存复苏等方面试验条件对重组胚发育的影响因素进行了深入的研究。结果表明: 供体细胞血清饥饿 0、1~3、4~6、7~9 d 之间重组胚卵裂率没有显著差异($P>0.05$), 但囊胚率以饥饿 1~3 d 的最高, 与 4~6 和 7~9 d 组别差异显著($P<0.05$); 以传代 0、1~3、4~6、7~9 代的细胞作为供体细胞, 卵裂率没有显著差异($P>0.05$), 桑椹胚率以传 1~3 代最高, 差异显著($P<0.05$); 2 代细胞解冻后的卵裂率显著高于 4 和 8 代细胞, 而以 2 和 6 代冷冻解冻后细胞为供体, 卵裂率并无明显差异, 8 代细胞的桑椹胚率显著低于其它组。本试验为提高供体成纤维细胞在卵母细胞中重新程序化及后续重组胚发育等相关研究提供参考。

关键词: 牛; 供体成纤维细胞; 血清饥饿; 核移植

中图分类号: Q322

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)04-0513-04

The Research of the Impact of the State of Donor Cell on the Growth of Reorganization Embryos

LI Xiang-chen, YUE Hua, LIU Peng, WU Yun Qi Qi Ge, GUAN Wei-jun*, MA Yue-hui*
(Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: This study conducted in-depth research on the effect factors of the growth of reconstructed embryos, through comparing the different serum starvation days, the number of generations with the recovery of cryopreserved of Donor fibroblast and so text conditions. The research results show that the difference of reorganized embryo cleavage rate is not significant ($P>0.05$) as donor serum were starved 0, 1-3, 4-6 and 7-9 days, but blastocysts rate was the highest as donor serum were starved 1-3 days, and the difference was significant ($P<0.05$) compared with the 4-6 and 7-9 days groups; the difference of embryo cleavage rate was not significant ($P>0.05$) and morula rate of 1-3 generation was the highest as the cells of 0, 1-3, 4-6 and 7-9 generation as a source of donor cells; The cleavage rate of reorganized embryos from 2 generation frozen-thawed cell was significantly higher compared with 4 and 8 generation. 2 and 6 generation thawed cells of after frozen as were donor cells, egg(embryo) cleavage rate did not differ significantly, and morula rate of 8 generation was lower compared with the other groups. This experiment provide important theoretical basis and technological support to improve donor cells re-program(procedure) in oocyte, the growth of follow-up reorganization embryo and the research of related fields.

Key words: bovine; donor fibroblast; serum starvation; nuclear transfer

自从高度分化的体细胞在卵母细胞质中具有去分化、重获全能性的能力被证实之后, 体细胞核移植

的研究得到了飞速的发展, 已有很多种类的体细胞被应用为核供体, 并成功获得了体细胞核移植的小

收稿日期: 2006-11-13

基金项目: 国家自然科技资源平台建设项目(2004DKA30450); 国家“863”高技术项目(2006AA102198)

作者简介: 李向臣(1973-), 男, 内蒙古通辽人, 博士, 主要从事哺乳动物胚胎工程和发育生物学研究, E-mail: nobelli@126.com

* 通讯作者: 关伟军, 博士, 教授, 博导, 主要从事细胞与分子生物学研究, E-mail: wjguan86@126.com; 马月辉, 男, 研究员, 博导, E-mail: yuehui.ma@263.net

鼠、牛、猪、绵羊、山羊、兔、猫、骡和大鼠等,这些成果表明分化的体细胞甚至是分化终端的细胞仍具有发育的全能性。体细胞核移植也为拯救珍稀濒危动物开辟了一条新的途径^[1]。新西兰的 Wells 等^[2]利用这一技术成功地克隆了当地一头濒临灭种的土种牛;美国的 Lanza 等^[3]通过种间核移植的方法用家牛的卵母细胞获得了种间核移植胚胎,并成功获得了后代,这些结果表明通过体细胞核移植方法增加濒危动物的数量是可行的,可以成为解决我国珍贵遗传资源保存的有效途径之一。

体细胞核移植重组胚的发育潜能受到多种因素的影响。其中供体细胞是体细胞核移植的重要元件之一,其状态是影响重组胚发育的非常重要的因素。供体细胞携带着胚胎后期发育的所有遗传物质,并在去核卵母细胞中完成重新编程这一过程。供体细胞周期时相、周期同步化的方法、培养代数、冻存复苏后细胞活力等都对重组胚的发育有很大的影响。因此,本研究探讨了供体成纤维细胞状态对核移植效率的影响,以筛选出核移植效率较高的细胞系,为保存动物的遗传资源提供有力的理论依据。

1 材料和方法

1.1 卵母细胞体外成熟

卵母细胞采集及成熟见文献^[4]。

1.2 重组胚构建

以脱羧秋水仙碱辅助去核方式构建重组胚,方法见文献^[4]。

1.3 重组胚的培养

构建好的重组胚用 $5 \mu\text{mol/L}$ 离子霉素激活 5

min 后,移入含 2 mmol/L 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 半量换液一次,96 h 后加入 10% FBS 继续培养,培养 7~8 d 后统计发育的桑椹胚数和囊胚数。

1.4 试验设计

试验 1:1~3 代的细胞汇合度达到 80%,在含 0.5% FBS 的 DMEM 液内饥饿培养,分别饥饿 0、1~3、4~6、7~9 d 用于核移植,胞质内注射法构建重组胚,7~8 d 检查囊胚率。

试验 2:比较细胞的传代对重组胚发育能力的影响,以培养 0、1~3、4~6、7~9 代的细胞为核供体细胞,0.5% FBS 血清饥饿 1~3 d 用于核移植。

试验 3:2、4、6、8 代冷冻的细胞,经解冻培养 24 h,饥饿 1~3 d 用于核移植。

1.5 数据分析

所有试验重复 3 次,试验数据用 χ^2 进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 血清饥饿培养时间对重组胚发育的影响

从表 1 可见,饥饿 0、1~3、4~6、7~9 d 4 组间重组胚卵裂率无显著差异($P > 0.05$),但是重组胚的囊胚率表现了显著的不同,饥饿 1~3 d 的细胞囊胚率为 11.43%。数据分析表明,饥饿 1~3 d 细胞的囊胚率与饥饿 4~6、7~9 d 组间存在显著的差异($P < 0.05$),与正常培养(饥饿 0 d)的细胞相比,囊胚率没有显著的差异($P > 0.05$),以饥饿 7~9 d 效果最差,在 77 枚重组胚中仅有 1 枚发育到囊胚。

表 1 血清饥饿时间对重组胚发育的影响

Table 1 Effects of serum starvation time on the development of reconstructed embryos

饥饿时间/d Time of starvation	卵母细胞数 No. of oocytes	重组胚数 Reconstructed embryos	卵裂率/% Rate of cleavage	囊胚率/% Rate of blastocyst
0	77	39	84.62 ^a (33/39)	6.06 ^{ab} (2/33)
1~3	135	88	79.55 ^a (70/88)	11.43 ^a (8/70)
4~6	103	79	77.22 ^a (61/79)	3.29 ^{bc} (2/61)
7~9	112	98	78.57 ^a (77/98)	1.30 ^c (1/77)

同一列中标注不同字母表示差异显著($P < 0.05$),下表同

Figures with different letters in the same column show significant difference($P < 0.05$). The following tables are the same

2.2 供体细胞传代次数在核移植中的效果比较

本试验以传代 0、1~3、4~6、7~9 代的细胞作为供体细胞,以成熟 18 h 的卵母细胞作为核受体,共构建了 283 枚重组胚,数据分析发现体细胞的传

代次数对重组胚的卵裂率并未表现出显著的差异($P > 0.05$);而在桑椹胚率上开始出现显著的不同,细胞传代 1~3 代用于核移植的效果显著高于其它组,桑椹胚率达到 32.06%,传代 7~9 代的细胞其

表 2 细胞的代数对重组胚发育的影响

Table 2 Effects of donor cell passages on the development of reconstructed embryos

细胞代数 Passage	卵母细胞数 No. of oocytes	重组胚数 Reconstructed embryos	卵裂率/% Rate of cleavage	桑椹胚率/% Rate of morula
0	99	83	85.54 ^a (71/83)	22.54 ^{ac} (16/71)
1~3	77	69	76.81 ^a (53/69)	32.06 ^b (17/53)
4~6	68	37	83.78 ^a (31/37)	25.80 ^a (8/31)
7~9	130	94	84.04 ^a (79/94)	17.72 ^c (14/79)

重组胚的桑椹胚率仅在 17.72%，显著低于 1~6 代的细胞($P < 0.05$)，与未经传代的细胞相比没有显著的差异(17.72% Vs 22.54%)，同时也发现不经传代的细胞同样可以用作核移植，其桑椹胚率达到 22.54%。最后将获得的桑椹胚冷冻保存。

2.3 细胞的冷冻保存对重组胚发育的影响

本试验比较了 2、4、6、8 代冷冻的细胞，经解冻

培养 24 h，饥饿 1~3 d 后用于核移植。2 代细胞解冻后卵裂率和桑椹胚率相对比较高(83.72%，27.78%)，4 代解冻的细胞与 2 代细胞比卵裂率有显著的差异($P < 0.05$)，8 代解冻的细胞卵裂率比较低为 67.71%；桑椹胚率 2、4、6 代的细胞差异不显著，8 代解冻的细胞与其它组出现显著的差异($P < 0.05$)。也将桑椹胚冷冻保存于液氮中。

表 3 细胞的冷冻保存对重组胚发育的影响

Table 3 Effects of donor cell cryopreservation on the development of reconstructed embryos

冷冻细胞代数 Passages of cell cryopreservation	卵母细胞数 No. of oocytes	重组胚数 Reconstructed embryos	卵裂率/% Rate of cleavage	桑椹胚率/% Rate of morula
2	113	86	83.72 ^a (72/86)	27.78 ^a (20/72)
4	75	53	73.58 ^{bc} (39/53)	23.08 ^a (10/39)
6	89	67	76.12 ^{ab} (51/67)	25.49 ^a (13/51)
8	122	96	67.71 ^c (65/96)	12.31 ^b (8/65)

3 讨论

3.1 血清饥饿用于细胞周期同步化对重组胚发育的影响

体细胞核移植中受体胞质多使用 M 期卵母细胞，M 期卵母细胞中 MPF 高活性使得核膜破裂，早期染色体凝聚，可将供体染色质暴露在与早期发育有关的受体胞质因子之中，能促进供体遗传物质的重编程^[5-6]，供体细胞多采用 G₀/G₁ 期细胞。血清饥饿可以使细胞处于静止状态(G₀ 期)，1996 年 Campbell 等^[7]将传 6~13 代的胎儿上皮细胞经血清饥饿停于 G₀/G₁ 期，将其作为核供体进行核移植后得到了 5 只绵羊，之后 Wilmut 等用乳腺上皮细胞获得了“多莉”羊^[8]。1998 年 Wakayama 等^[9]用处于 G₀ 期小鼠的体细胞获得了克隆小鼠。张德福等^[10]在对细胞进行血清饥饿的同时加入 0.1 mg/L Aphidicolin，重组胚卵裂率，均高于血清饥饿和一般培养处理的同种供体细胞。

本试验中饥饿 1~3 d 的细胞用于核供体较饥饿 4~6 和 7~9 d 的囊胚率高，而没有饥饿正常培养的细胞与饥饿 1~3 d 细胞发育率没有显著的差异，说明血清饥饿时间延长不利于胚胎的发育。Peng 等^[11]培养猪和 Hu 等^[12]培养牛的颗粒细胞发现，较长时间的饥饿会导致细胞 DNA 的大规模碎片化，细胞发生凋亡。Chang 等^[13]曾试图挽救经过血清饥饿的细胞，当向培养液中加入凋亡抑制剂时，可降低细胞的死亡率。说明血清饥饿后确有一部分细胞发生了凋亡。从目前的研究来看，似乎应用于各个细胞时相的细胞都能得到克隆动物，但还没有 1 种伴随核移植动物出生的细胞周期专一性标记物来证明核移植所得后代来源于某一个特定细胞时相^[3]。因此深入研究供体细胞类型、细胞周期、同步化处理方式等在核移植胚胎发育过程中所起的作用显得异常重要。

3.2 供体细胞传代次数在核移植中的效果比较

关于供体细胞在第几代最适合作为核供体，在研究者中还存在争论。多数核移植采用传代早期的细胞，细胞长期培养导致基因突变和染色体丢

失^[14]。但 Kubota 等^[15]对供体细胞多次传代后进行核移植,发现随着传代次数的增加(15代)仍能支持重组胚发育成新个体。Arat 等^[16]用 GFP 基因转染颗粒细胞并用于克隆,发现细胞转染与否都不影响核移植囊胚的发育率。但 15 代细胞囊胚发育率显著高于 10、11 及 13 代细胞。16 及 36 代细胞仍能支持胚胎发育。Enright 等^[17]认为细胞在体外培养可以减少表观遗传修饰,早期体细胞组蛋白乙酰化的程度比晚期高。有学者证实了上述理论,体外培养后的细胞可以表达出培养前所不能表达的蛋白质,证实了体外培养去分化的能力。在本研究中,核移植胚胎的桑椹胚发育率随着供体细胞培养代数的增加而降低,新鲜的细胞与 4~6 代细胞无显著差异,而与 1~3 代的细胞差异显著,这种差异可能是由于种属和培养条件不同所致。

3.3 细胞的冷冻保存对重新程序化的影响

细胞的冷冻是保存细胞最直接的方法,细胞的冷冻是否对核移植胚发育有影响,Ogura 等^[18]用新鲜消化、培养和冻存的成熟前足细胞克隆出小鼠桑椹/囊胚,经移植后均获得存活小鼠后代,而且冻存细胞作供体的胚胎移植后获得了 7 个后代(6.7%, 7/105)。用冷冻后未成熟的小鼠支持细胞为供体也获得了后代,进一步说明虽然以雌性生殖系统细胞为供体具有较高的克隆效率,但雄性特异的细胞也能发育成新个体。在本试验中 2 代细胞解冻后卵裂率和桑椹胚率较 4 与 6 代解冻后的细胞高,8 代解冻的细胞卵裂率比较低,说明随代数增加冷冻的细胞效果较差。

参考文献:

- [1] COMIZZOLI P, MERMILLOD P, MAUGET R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species[J]. *Reprod Nutr Dev*, 2000, 40(5):493-504.
- [2] WELLS D N, MISICA P M, TERVIT H R, et al. Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed[J]. *Reprod Fertil Dev*, 1998, 10(4):369-378.
- [3] LANZA R P, CIBELLI J B, DIAZ F, et al. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer[J]. *Cloning*, 2000, 2(2):79-90.
- [4] 李向臣, 吴月红, 马毅, 等. 脱羧秋水仙碱(DM)辅助去牛卵母细胞核的研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(6):537-541.
- [5] POLEJAEVAL I A, CHEN S H, VAUGHT T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. *Nature*, 2000, 407: 86-90.
- [6] MIYOSHI K, RZUCIDLO S J, GIBBONS J R, et al. Development of porcine embryos reconstituted with somatic cells and enucleated metaphase I and II oocytes matured in a protein free medium [J]. *BMC Development Biology*, 2001, 1:12.
- [7] CAMPBELL K H, MCWHIR J, RITCHIE W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line[J]. *Nature*, 1996, 380:64-66.
- [8] WILMUT I, SCHNIEKE A E, MCWHIR J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(1):3-7.
- [9] 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(6 691):369-370.
- [10] 张德福, 刘东, 汤琳琳, 等. 不同供体细胞及其处理对猪核移植重构胚体外发育的影响[J]. *遗传*, 2007, 29(2):211-217.
- [11] PENG X, MARUO T, MATSUO H, et al. Serum deprivation-induced apoptosis in cultured porcine granulosa cells is characterized by increased expression of p53 protein, Fas antigen and Fas ligand and by decreased expression of PCNA[J]. *Endocr J*, 1998, 45: 247-253.
- [12] HU C, COWAN R C, HARMAN R M, et al. Apoptosis of bovine granulosa cells after serum withdrawal is mediated by Fas antigen (CD95) and Fas ligand [J]. *Biol Reprod*, 2001, 64: 518-526.
- [13] CHANG K E, JORGE A P. Inhibition of apoptosis in serum starved porcine embryonic fibroblasts[J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62:106-111.
- [14] 安晓荣, 苟克勉, 陈永福. 体细胞克隆法生产绵羊转基因囊胚[J]. *科学通报*, 2001, 46:820-824.
- [15] KUBOTA M, YAMA KUCHI H, TODOROEH I, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:990-995.
- [16] ARAT S, RAUCIKLO J, GIBBONS J, et al. Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes[J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60:20-26.
- [17] ENRIGHT B P, JEONG B S, YANG X, et al. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation[J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(5):1 525-1 530.
- [18] OGURA A, INOUE K, OGONUKI N, et al. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells[J]. *Biol Reprod*, 2000, 62 (6): 1 579-1 584.