

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01392

供体细胞的不同选择和处理对重编程过程的影响

姚雅馨^{1,2}, 李向臣¹, 张勇², 乔利敏^{1,2}, 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. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070

摘要: 供体细胞核移入去核的卵母细胞后, 必定要经过表观遗传修饰的重编程过程, 回到胚胎开始发育的全能状态。若重编程过程不完全, 必定会导致克隆效率降低。但是, 体细胞核的重编程能力不仅仅是在其移入去核的卵母细胞后所体现, 它在不同的供体细胞当中的潜能也是不尽相同的。并且, 对供体细胞进行不同的处理, 也会导致其重编程的能力和程度不同。文章首先阐述了供体细胞的类型、代数、周期、年龄以及物种的不同选择对其核移植后重编程过程的不同影响, 其后又通过对供体细胞的冷冻保存, 血清饥饿以及不同试剂的处理等方面对重编程过程所起到的作用作出了概况性的论述与分析。

关键词: 供体细胞; 核移植; 重编程

Effect of different choices and treatments with donor cells on reprogramming

YAO Ya-Xin^{1,2}, LI Xiang-Chen¹, ZHANG Yong², QIAO Li-Min^{1,2}, GUAN Wei-Jun¹, MA Yue-Hui¹

1. Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100193, China;
2. College of Veterinary Medicine, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China

Abstract: The donor nucleus must experienced the epigenetic modification of the process reprogramming and went back to the initial state after the donor cell was injected into the oocytes. If the reprogramming is not completed, the efficiency of cloning will be reduced. However, reprogramming of nucleus must was not only embodied in its ability after it was transferred into the oocytes. It was different in the potential if the cell type was not identical. In addition, different treatment to the donor cells resulted in different ability and the level of reprogramming. This paper described different effects of the type, algebra, cycles, age, and species of the donor cells after nuclear transplantation on the reprogramming. An overview of the exposition and analysis through the donor cell cryopreservation, serum starvation, and different reagent treatments were discussed.

Keywords: donor cell; nuclear transfer; reprogramming

收稿日期: 2008-03-07; 修回日期: 2008-06-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863计划)(编号: 2006AA10Z198), 国家自然科技平台建设项目(编号: 2005DKA21101), 国家“十一五”科技支撑计划(编号: 2006BAD13B08)资助[Supported by National High Technology Research and Development Program of China(No. 2006AA10Z198), National Infrastructure of Natural Science and Technology Program(No. 2005DKA21101), the Chinese National Science and Technology Pillar Program for the Eleventh Five-year Plan(No. 2006BAD13B08)]

作者简介: 姚雅馨(1983-), 女, 辽宁省锦州市人, 硕士, 研究方向: 动物生殖生理与胚胎工程。

通讯作者: 关伟军(1966-), 男, 黑龙江人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 动物遗传资源。Tel: 010-62815992; E-mail: wjguan86@126.com
马月辉(1964-), 男, 吉林伊通人, 研究员, 研究方向: 动物遗传学。Tel: 010-62815884; E-mail: yuehui.ma@263.net

体细胞克隆技术历经十年的发展, 已经在很多动物上获得了成功, 但是克隆的效率一直偏低, 在一定程度上制约了这项技术的广泛应用。造成这一结果的原因较多也较复杂, 目前, 人们把提高克隆效率的目光转移到体细胞核的重编程过程上, 研究发现, 供体细胞核移入去核的卵母细胞后, 必定要经过表观遗传修饰的重编程过程, 回到胚胎开始发育的全能状态。除去人为操作技术方面的影响外, 目前认为: 供体核移入卵母细胞后, 其重编程过程的不完全是导致克隆效率低的主要原因^[1]。关于供体核的重编程过程, 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。很多综述文章就核的重编程过程作了详尽的说明, 它主要是通过上述几个方面来影响胚胎的发育。但是, 核的重编程过程不仅仅是供体细胞在移入卵母细胞后所体现的, 不同的供体细胞其重新程序化的潜力也是不尽相同的, 例如, 来源于不同组织或处于细胞周期的不同阶段的细胞作为供体细胞, 其重编程的能力是不同的, 核移植效率也有着明显区别^[2]。也就是说核重编程能力可能与供核者的年龄, 供核细胞的组织来源、分化状态、细胞周期、传代次数都有关联。一般来说, 颗粒细胞作为核供体最易被重编程。供核者为胎体或新生体, 供体细胞处于低分化状态或已传数代, 供体细胞经过去表观遗传标记处理的, 其重编程过程比较易于进行^[3]。

1 供体细胞的选择

1.1 不同类型的供体细胞对重编程的影响

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。供体细胞的类型大致可以分为 4 类。第一类为生殖系统的细胞, 如颗粒/卵丘细胞、输卵管/子宫上皮细胞、未成熟的睾丸支持细胞等; 第二类为胎儿细胞, 如胎儿成纤维细胞; 第三类为成年个体生殖系统以外的细胞, 如乳腺上皮细胞、皮肤成纤维细胞、耳成纤维细胞、肌肉成纤维细胞、尾尖成纤维细胞、心肌成纤维细胞等; 第四类为终末分化的细胞, 如 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞。其中颗粒/卵丘细胞和耳成纤维细胞, 它们作为核供体应用的最多, 并且所获得的核移植后代较多, 并且有人专就成纤维细胞和颗粒/卵丘细胞的核移植效率

做过比较, 大多认为颗粒/卵丘细胞核移植胚的发育率高于成纤维或其他类型的细胞。Kubota 等^[2]以乳腺上皮细胞、卵巢颗粒细胞、皮肤成纤维细胞为供核细胞进行了核移植研究, 结果显示 3 类不同细胞源的克隆胚胎分裂率无明显差异, 但颗粒细胞却产生了最高的囊胚发育率及 6 头完成整个妊娠期的克隆牛, 更重要的是其中 4 头已经 4 岁, 各方面都表现健康。然而乳腺上皮细胞源胚胎体外发育状况最差, 且无活克隆牛产生。该结果表明, 供核细胞类型会显著影响胚胎体外和体内发育。同时也证明颗粒细胞是体细胞克隆较有效的细胞类型, 即颗粒细胞 DNA 能被更有效的重新程序化。卵丘/颗粒细胞更适合作为供体细胞的可能原因: 卵丘细胞是自然静止在 G_0/G_1 期的细胞; 卵丘细胞是包围在卵母细胞周围的细胞, 核移植后两者胞质更易互融;

卵丘细胞内端粒酶活性较高。卵巢颗粒细胞和输卵管上皮细胞的克隆效率较其它类型体细胞高, 推测其外遗传标记程度相对最小。另外, 来源于不同组织的不同细胞类型作为供核细胞其发育潜能是不同的, 这可能与细胞中基因的表观遗传修饰有关, 分化的细胞中大部分基因的表达调控是通过基因修饰来进行的, 这些修饰包括 DNA 甲基化和组蛋白的乙酰化。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, 甲基化密度限定了组蛋白乙酰化程度^[4]。并且有研究针对性的指出了例如 DNA 甲基化在供体细胞中的水平^[5], 我们可以参考此类研究, 在选择供核细胞类型时, 从表观遗传修饰程度的角度出发, 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类型来进行核移植。

1.2 不同周期的供体细胞对重编程的影响

细胞周期对核移植成功率的影响至关重要。目前, 由于 S 期细胞处于 DNA 合成阶段, 重构胚易形成 2 倍化和 4 倍化之间的非整倍体动物, 而没有克隆个体的报道以外, 其他 G_1 、 G_2 和 M 期^[5]的细胞都被证明可作为供体细胞, 用于克隆研究。但是, 多数核移植仍然采用传代早期的细胞, 这样似乎更有利于重构胚的发育。 G_0/G_1 期细胞是首选的供体细胞周期时相, 这种细胞较易于重编程。获得 G_0/G_1 期细胞常用的方法是血清饥饿法, 应用这种方法已成功获得家畜体细胞的核移植后代。但是, 血清饥饿法所

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。G₁ 期细胞的染色体被认为进行了某种修饰, 由此推测休眠状态的染色体在卵母细胞质中得到更完善的修饰, 而这种修饰对重编程可能十分关键。另外, 研究结果表明供体核细胞所处细胞周期也直接影响着其正常的重新编程。Miyamoto 等^[6]在研究克隆猪的过程中发现使供体细胞同步化在 G₁ 期, 对比 G₀ 更有利于重构胚的发育, 且对于 DNA 的合成以及后成发育都十分有利, 并且细胞的高度同步性对研究其在去核的卵母细胞中的重编程过程也十分有利。

1.3 不同代数的供体细胞对重编程的影响

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。研究发现, 当来自胎儿和成年动物的成纤维细胞进行群体培养时, G₁ 期细胞比例随时间延长而呈线性增长, 而 S 期细胞同比下降, 这就解释了晚期传代细胞较早期传代细胞用作供体时有更高的囊胚发育率的原因。但 8~16 代细胞较 17~32 代细胞有更高的囊胚发育率, 这可能是 17~32 代细胞传代次数太多, 细胞染色体突变累积而降低了其支持发育的能力。目前, 大多数使用的是原代培养或短期培养的细胞(4~6 代), 认为这类细胞利于核移植胚的发育。另外, Enright 等^[7]认为细胞在体外培养可以减少外遗传修饰, 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。研究中发现, 细胞在体外培养过程中其组蛋白乙酰化程度有着显著改变, 在第 15 代细胞中(无论是成纤维细胞还是卵丘细胞)乙酰化的组蛋白 H4 和 H3 的含量均高于第 5 代细胞。然而, 目前人们仍大多使用低代次的细胞用于核移植, 高代次培养细胞是否有利于核移植仍有争议。不过, Giraldo 等^[8]将牛胎儿成纤维细胞分别培养到第 2、7、15、30、45 和 70 代, 利用流式细胞术以及免疫荧光等方法检测发现, 培养到第 30 代的细胞其甲基化的现象较第 7、15、45 代都明显, 而第 2、70 代的甲基化现象特别明显。笔者认为第 70 代细胞的甲基化水平过高可能是由于细胞培养代数过多而引起细胞的癌变, 而癌细胞的甲基化水平普遍偏高^[9]。而第 2 代细胞高甲基化现象的发生, 是否应该引起我们的重视, 我们对于第 2 代细胞在核移植上的应用是否应该考虑适当的降低, 还是只是牛

的成纤维细胞存在这样的现象还有待进一步的研究。

1.4 不同年龄的供体细胞对重编程的影响

由于供体细胞在细胞更新过程中, 某些特定基因会随着个体的生长而出现选择性表达, 因此选用“年龄较大”的供体细胞, 在重构胚发育过程中会受到供体细胞基因本身活性的影响, 某些对胚胎发育至关重要的基因由于在个体发育生长阶段的原因而处于低活性时期, 与卵母细胞融合后, 很难达到胚胎发育所要求的基因表达量, 因此不能开始重新编程。但是, 在婆罗门牛^[10]的研究中, 作者却得出不一样的观点, 利用 40 日龄克隆胎儿的耳细胞和一头 21 岁的公牛耳细胞作为供体细胞进行核移植, 囊胚发育率完全相同。供体细胞本身对克隆后代“年龄”的影响究竟有多大, 目前尚无定论。重构胚在发育过程中染色体端粒长度在核移植胚胎的发育中是否可恢复到正常水平, 端粒长度变化的机制都有待研究。Kato 等^[11]的实验也表明, 将克隆胚进行子宫腔移植后, 来源于胎牛及新生牛的克隆比来源于成年牛的克隆具有更高的妊娠率和产后存活率。这可能是由于来源于胎体及新生体的体细胞基因突变少, 具有更低分化状态, 因此, 核移植后具有更高的核重编程效率。

1.5 不同物种的供体细胞对重编程的影响

供体细胞需要在移入去核卵母细胞后, 很短的时间内完成重编程过程。在大多数哺乳动物中, 成熟的精子和卵子基因组是高度甲基化的, 在受精后数小时内, 精子基因组发生主动去甲基化, 卵子基因组在卵裂过程中依赖于 DNA 的复制被动地、滞后地去甲基化, 直到囊胚期, 胚胎基因组甲基化水平达到最低^[12]。核移植过程也是如此, 在早期的重构胚当中体现出较高的去甲基化水平, 达到囊胚期时, 去甲基化水平达到最低, 但是, 这一现象却没有发生在羊或兔的重构胚当中, 并且在母牛中, 也只是少部分发生。在 Beaujean 等^[13]的实验中, 他们以绵羊成纤维细胞作为供体, 绵羊卵母细胞为受体, 通过 5-甲基胞嘧啶免疫荧光染色法, 检测其核移植之后的 DNA 甲基化水平变化, 发现在早期的重构胚中, 没有去甲基化的现象发生, 只在 2 细胞和 8 细胞之间检测到极其有限的去甲基化现象, 到桑椹胚乃至囊胚阶段再没有检测到去甲基化的现象发生。研究者认为在绵羊和其他哺乳动物的早期胚胎发育过程

中, 有着巨大的去甲基化的差异^[14]。而且, 似乎不止是绵羊存在这样的差异, 牛的供体细胞在植入前阶段也存在一些差异, Wee 等^[4]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。

2 供体细胞的处理

2.1 供体细胞的冷冻保存

正常的供体细胞核移植后, 我们发现其在融合率、卵裂率之间没有差异, 但是桑葚胚和囊胚的发育率随着冷冻解冻次数的增多而降低。推测供体细胞的冷冻解冻过程对在受体卵内的重编程能力造成影响。但是, 冻存的牛胎儿皮肤组织细胞作供体与源于新鲜组织的细胞作供体的重组胚, 在体外发育能力上无差异。Ogura 等^[15]用新鲜消化的、培养和冻存的成熟前卵母细胞克隆出小鼠桑葚胚或囊胚, 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 8 个后代。供体细胞冷藏 1~2 周, 不影响早期重组胚的体内外发育能力, 这可能是将体细胞进行冷藏处理也可使细胞迅速进入休眠状态而获得某些修饰。

2.2 供体细胞的血清饥饿处理及离子霉素激活

血清饥饿对培养细胞的生长特性、DNA 复制和细胞骨架及消化后细胞的大小均有不同程度的改变, 用血清饥饿的成纤维细胞作供体, 囊胚率显著高于非血清饥饿组^[6]。血清饥饿与非血清饥饿的区别在于, 血清饥饿法是使供体细胞在 0.5% FBS 的 DMEM 液中, 血清饥饿培养 5~7 d, 核移植前用胰蛋白酶消化, 1 500 r/min 离心 5 min, 之后再应用于核移植; 非饥饿法是在正常的含 10% FBS 的 DMEM 液中培养供体细胞, 而后用胰蛋白酶消化后直接用于核移植。在体细胞核移植研究中, 供体细胞 DNA 的合成与细胞分裂间的协调性是影响核移植胚胎发育的重要因素, 直接影响着核重编程的能力。因此, 多用血清饥饿法使细胞同步于细胞周期的 G₀/G₁ 期, 以提高核移植的效率。另外, Lacham-Kaplan 等^[16]用离子霉素预激活供体细胞提高了重构胚的卵裂率与囊胚率。这可能是由于; 预激活因素可以引起供体细胞

的活化, 供体细胞在移入卵母细胞内之前就开始恢复细胞活动并为 DNA 的合成做好充分的准备, 这样的细胞注入后与受体细胞在周期上可以取得较好的协调性, 对发育以及其重编程过程有利^[17]。

2.3 促重编程试剂对供体细胞的处理

组蛋白乙酰化和 DNA 甲基化是两种可遗传的非基因序列变化的染色体改变, 即表观遗传学改变, 这种改变与细胞分化有关。在正常受精过程中, 配子处于低甲基化水平, 在胚胎发育早期这些甲基化被擦除而形成胚胎基因的原始化、全能化。同样在核移植过程中, 供核的表观遗传学改变也需要在胚胎中得到恢复才能形成成功的克隆, 因此, 人为的减少供核的表观遗传标记可能更有利于核重编程。Jones 等^[18]用去甲基化试剂 5-aza-dc(5-氮-2-脱氧胞苷)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。Enright 等^[2]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水平。为了促进核重排, 用一种组蛋白去乙酰化抑制剂(曲古菌素-A, TSA)和 DNA 甲基化转移酶抑制剂(5-aza-dC)处理供体细胞, 分别用来增加供体细胞的组蛋白乙酰化水平和降低 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; 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。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等试剂的加入可以促进供体细胞的重编程。

3 结 语

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。

克隆虽然在很多动物上都获得了成功, 但是效率都普遍偏低, 围绕提高克隆率这一主题, 不仅要着眼于供体细胞的选择和处理上, 卵母细胞的选择和处理也同样面临着一系列的问题, 另外, 显微操作效率的提高, 胚胎的培养体系的健全, 胚胎移植手术成功率的上升, 都有待于我们进一步的探索和研究。

参考文献(References):

- [1] Daniels R, Hall V, Trounson AO. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biol Reprod*, 2000, 63(4): 1034–1040.[\[DOI\]](#)
- [2] Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2000, 97(3): 990–995.[\[DOI\]](#)
- [3] LI Yan, FENG Yun, SUN Yi-Juan. Influencing factors of nuclear reprogramming after somatic cell nuclear transfer. *Chinese Bull Life Sci*, 2006, 18(4): 355–360.
李雁, 冯云, 孙贻娟. 体细胞核移植后核重编程的影响因素. *生命科学*, 2006, 18(4): 355–360
- [4] Wee G, Shim JJ, Koo DB, Chae JI, Lee KK, Han YM. Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction*, 2007, 134(6): 781–787. [\[DOI\]](#)
- [5] Blelloch R, Wang Z, Meissner A, Pollard S, Smith A, Jaenisch R. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the Differentiation and Methylation State of the Donor Nucleus. *Stem Cells*, 2006, 24(9): 2007–213.
- [6] Miyamoto K, Hoshino Y, Minami N, Yamada M, Imai H. Effects of synchronization of donor cell cycle on embryonic development and DNA synthesis in porcine nuclear transfer embryos. *Reprod Dev*, 2007, 53(2): 237–246.[\[DOI\]](#)
- [7] Enright BP, Kubota C, Yang X. Epigenetic characteristics and development of embryo cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2-deoxycytidine. *BiolReprod*, 2003, 69(3): 869–901.
- [8] Giraldo AM, Lynn JW, Purpera MN, Godke RA, Bondioli KR. DNA methylation and histone acetylation patterns in cultured bovine fibroblasts for nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(12): 1514–1524.[\[DOI\]](#)
- [9] Murphy TM, Perry AS, Lawler M. The emergence of DNA methylation as a key modulator of aberrant cell death in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2008, 15(1): 11–25.[\[DOI\]](#)
- [10] Hill JR, Winger QA, Long CR. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biology Reproduction*, 2000, 62(5): 1135–1140.[\[DOI\]](#)
- [11] Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *Reprod Fertil*, 2000, 120(2): 231–237.[\[DOI\]](#)
- [12] ZHANG Li-Sheng, CHEN Da-Yuan. Epigenetic reprogramming of the genome in cloned animals. *Prog Biochem Biophys*, 2002, 29 (6): 881–884.
张利生, 陈大元. 克隆动物发育过程中基因组的重编程. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29 (6): 881–884.
- [13] Beaujean N, Taylor J, Gardner J. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2004(71): 185–193.
- [14] Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, Young L. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr Biol*, 2004, 14(7): R266–R267.[\[DOI\]](#)
- [15] Ogura A, Inoue K, Ogonuki N. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature Sertoli cells. *Biol Reprod*, 2000, 62(6): 1579–1584.[\[DOI\]](#)
- [16] Lacham-Kaplan O, Diamente M, Trounson A. Pregnancy following injection of mechanically isolated fetal fibroblast nuclei into enucleated bovine oocytes. *Theriogenology*, 1999, 51: 206.[\[DOI\]](#)
- [17] LI Xue-Feng, AN Zhi-Xing, LI Yu, GUO Ji-Tong, LI Xiang-Chen, ZHANG Yong. Effects of Sources, serum starvation and preactivation of bovine donor cells on development of nuclear transferred embryos *in vitro*. *Zool Res*, 2003, 24 (1): 35–38.
李雪峰, 安志兴, 李煜, 郭继彤, 李向臣, 张涌. 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. *动物学研究*, 2003, 24(1): 35–38.
- [18] Jones KL, Hill J, Shin TY, Lui L, Westhusin M. DNA hypomethylation of karyoplasts for bovine nuclear transplantation. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(2): 208–213.[\[DOI\]](#)