

猪胚胎细胞核移植研究的新进展*

赵浩斌

(湖北省农业科学院畜牧兽医研究所 武汉 430209)

关键词 猪 卵细胞 胚胎 核移植 胚胎干细胞 细胞周期

核移植就是将供体核移入受体卵母细胞质获得重组胚的过程,包括卵母细胞的去核、卵裂球的分离、卵裂球移入受体卵周隙、去核卵母细胞与供体核的融合和卵母细胞激活等。应用核移植技术能生产遗传组成相同的后代,进行动物克隆,前景诱人。在家畜上,1986年 Willadsen 获得核移植绵羊,1987年 Prather 等获得核移植牛;1989年 Prather 等^[1]在猪的核移植上取得成功,获得7头原核交换后代和1头4-细胞胚胎卵裂球核移植后代。

1 核供体

细胞具有发育所需全部遗传信息,一旦分化,只能按既定的方向发育,但核移植可以逆转这种分化,使其回到未分化状态,重新开始发育。胚胎细胞分化的标志之一是母体-合子转变(Maternal to zygote transition, MZT),此时胎儿基因组开始转录 RNA,并控制发育,猪胚胎 MZT 发生在4-细胞期。Fretzag 等^[2]通过³H-尿嘧啶掺入试验,发现猪4-细胞期胚核 DNA 开始转录,4-细胞期到透明带完整的胚胎,以卵裂球计尿嘧啶掺入的速率差异不显著,为 $0.29 - 0.37 \times 10^{-15}$ mol/细胞/3h,孵化囊胚卵裂球尿嘧啶掺入速率显著增加,为 0.86×10^{-15} mol/细胞/3h,也说明透明带完整胚胎核的活性基本相同。Schoenbeck 等^[3]研究表明猪胚胎基因组从4-细胞期的16h开始控制发育。Prather 和 Rickords^[4]研究发现 RNA 的合成与加工始于4-细胞期的24h,当把16-细胞期胚核移入卵母细胞,就探测不到 PNA 的转录,说明卵母细胞质使16-细胞期的核转变为原核状态,卵母细胞

质对核的重排(reprogramming)不受 MZT 的影响。Nagashima 等^[5]研究表明4-7细胞和8-16细胞期胚核都能支持重组胚的发育,分别有40.5%和43.2%重组胚发育到2-8细胞期,差异不显著,但我们的研究却发现4-细胞期后的核作供体重组胚的发育率有所降低。分化的另一个标志是胚胎致密化,Collas 和 Robl 在兔上进行的研究表明供体致密化(如囊胚内细胞团作供体)并不影响核的发育潜力。以早期囊胚内细胞团作供体核移植已得到核移植的牛和绵羊,Rust 等以滋养层细胞作供体,也使2只羊怀孕。这说明分化是可逆的,分化的核移入合适的受体卵细胞后,可以被重排并完成发育。

核供体除用早期胚胎细胞以外,还可用胚胎干(Embryonic Stem, ES)细胞。ES 细胞具有发育的全能性,为正常二倍体,可以在体外培养、扩增、克隆和冻存。目前,只有 Wheeler 等^[6]得到猪 ES 细胞及其嵌合体后代,但未见生殖腺嵌合的报道。1990年 Evans、Piedrahitá、Notarianni 和 Strojek 等及1991年 Gerfen 等,虽然先后报道获得猪的 ES 细胞,但均未获得嵌合体后代,因此,在猪上还没有获得真正意义上的 ES 细胞。1992年 Matsu 等^[7]报道了培养小鼠原生殖细胞(Primordial germ cells, PGCs)获得具有发育全能性的类 ES 细胞。1996年 Campbell 等^[8]以绵羊胚胎细胞培养后得到的细胞株 TNT4 为供体进行核移植,得到

* 国家自然科学基金资助项目,资助号 39270517;湖北省自然科学基金,资助号 93515;

第一作者简介:赵浩斌,男,32岁,助理研究员,硕士;

收稿日期:1996-04-01,修回日期:1997-03-02

了核移植绵羊,证明了培养细胞的核移植全能性。他们的结果为全能性细胞的建立开辟了新途径,因此,可以进行猪胚胎 PGCs 或囊胚细胞培养以获取 ES 细胞或核移植全能性细胞。

2 核受体

卵母细胞可以重排发育的供体核,使供体核重新开始发育,但尚不清楚重排因子是什么。Ding 等^[9]发现猪卵母细胞发生生发泡破裂(Germinal vesicle breackdown, GVBD)时蛋白质合成发生质的变化,这种变化是卵母细胞成熟和原核发育所必需,一个与雄原核形成与发育有关的 25/22kD 多肽可能是重排因子。

受体卵母细胞可采用体内成熟的和体外成熟的卵母细胞。Pranther 等^[1]以体内成熟卵母细胞为受体获得核移植猪,Nagashima 等^[5]用体外成熟卵母细胞作受体进行猪的核移植,重组胚能正常发育。Schoenbeck 等^[10]发现蛋白质文库体外成熟与体内成熟卵母细胞一样。猪卵母细胞体外成熟时间不同,孤雌活化后原核形成时间也不同,卵母细胞成熟时间和激活-融合方法对移入核的加工也有一定影响,Stumpf 等^[11]发现 42h 和 64h 成熟的卵母细胞活化后原核形成时间分别为 6h 和 2h。以 8-16 细胞期胚卵裂球作供体,42h 成熟卵为受体,同时激活,融合的重组卵 20h 后核缩小,激活 6h 后融合的重组卵 20h 后核膨大;64h 成熟的卵作受体,融合后 20h 核膨胀,与激活、融合方法无关。这也说明激活卵具有重排核的能力。

成熟卵母细胞在细胞静止因子(Cytostatic factor, CSF)作用不滞留在 M II 期,胞质内含有丰富的成熟促进因子(Maturation promoting factor, MPF),受精或激活后,胞质内 Ca^{2+} 浓度迅速增加,使 CSF 活性消失,也使 MPF 失活,卵母细胞进入有丝分裂期(活化)。Procházka 等^[12]推测猪卵母细胞活化后 1h 内 MPF 活性就消失了,并认为猪卵母细胞的活化不需要成熟(M II 期)后的继续培养(Aging)。卵的活化方法有多种,朱裕鼎等用 Ca^{2+} 载体和 7% 酒精对猪卵母细胞的活化率分别为 16.5% -

25.4% 和 18.25% - 35.3%; Prather 等^[1]以 120v/mm 直流电场 30 μ S 一次电脉冲,卵的激活率 81%,并得到核移植猪。Prather 及其同事们^[10,13,14]研究了第二信使在猪卵激活中的作用,成熟卵母细胞注入 G-蛋白激活剂 GTP- γ -S,卵母细胞发生与受精同样的变化,如皮质颗粒排出、蛋白质合成变化、原核形成和囊胚发育,说明猪的卵母细胞激活与 G-蛋白途径有关。G-蛋白激发磷酸肌醇途径,导致胞内钙池钙的释放,从而卵被激活,电激活液中加入 D_1C_8 (1, 2-dioctanoyl-sn-glycerol.) 能增加电激活效率,激活卵蛋白质的合成与原核期胚胎相似。蛋白激酶抑制剂直接处理能激活卵母细胞,说明蛋白质磷酸化的降低使 MPF 失活而激活卵,但广谱蛋白激酶抑制剂不能引起所有正常受精时发生的事件,它能引起原核形成,22-kD 蛋白出现,但不能引起皮质颗粒排出,卵未能发育到囊胚期,说明蛋白激酶的抑制不是这些卵母细胞激活的唯一机制。

3 核质相互作用

去核卵母细胞质能使移入的胚核发育钟回到受精卵状态,重新开始发育。卵母细胞质对核的重排包括染色体凝集、核膜破裂、染色体又去凝集、原核形成、供体核在第一次分裂周期显著膨胀等。对兔的研究表明,内细胞团(ICM)和滋养层细胞移入卵母细胞后,原核形成时间与 8-32 细胞期细胞相比较迟,形成的原核也较小,猪的晚期供体核形成的原核也小,但 ICM 的重组胚也能发育到囊胚期,说明核形态上的完全改变不是重组胚发育所必需,其发育率低于早期核也说明它对发育是有益的,可以反映重排和核支持发育的能力。

核重排的机制还不清楚,但重排明显地伴随着重组细胞核与细胞质间的蛋白质交换。两栖类上的研究表明核移入卵后,核的酸性蛋白质消失而细胞质酸性和碱性蛋白质进入供体核内。核的基因活动也受到调节,发育的基因表达活性被重排,在正常卵中表达的基因表达,其余基因活性被抑制。Prather 等^[1]把 16-细胞期胚核移入

卵母细胞,就探测不到 RNA 的转录,说明卵母细胞质抑制了 16-细胞期的核基因活性。

核供体与受体必需在细胞周期上协调,才能使重组胚正常有效地发育。核移入卵母细胞后, G₁ 期核的重组胚有丝分裂结构和染色体结构正常, S 期核重组胚有丝分裂结构和染色体结构异常。牛重组卵 DNA 合成的研究表明,当核处于 G₁/S 期,卵母细胞激活与否,均发生 DNA 合成; G₂ 核在受体未激活时合成 DNA,激活后卵母细胞作受体时无 DNA 合成。对猪的研究也发现 G₁ 期 2-细胞胚核移入卵母细胞后, DNA 合成过程与正常 2-细胞胚相似。由于大部分早期胚胎卵裂球处于 S 期,移入未激活卵母细胞后, DNA 又复制一次,就形成大量非二倍体重组胚,造成发育停滞或死亡,这也是核移植效率低的一个主要原因。因此,核移植时,要使供体细胞周期同步在 G₁ 期,否则,采用卵母细胞先激活后融合的办法,这样,核 DNA 复制不受影响,而保持完整的二倍体。Cheong 等^[15]发现鼠早(相当于 G₁)期 2-细胞胚细胞作供体的囊胚发育率显著高于中(相当于 S)、后(相当于 G₂)期供体(分别为 77.8%, 0% 和 20.8%),并以 G₁ 期核作供体得到了 4-和 8-细胞胚核移植后代。

猪胚胎具有对低温敏感等特殊特性,又是多胎动物,猪胚胎移植的成功需要较多的供体胚胎,因此核移植难度较大。猪胚胎在体外培养时,存在 4-细胞期的发育阻滞,可以采用与输卵管上皮细胞共培养的办法克服,或改进简单培养基,如培养基中加入谷氨酰胺、牛磺酸和次牛磺酸可以促进猪的胚胎发育。为了减少胚胎培养过程中胚胎的损失,重组胚可以不经体外培养直接进行胚胎移植。在核移植胚胎的移植时,也可把胚胎移入同期化的已配母猪体内,以增加受孕机会,Prather 等^[1]就采用了这种办法。

核移植可以进行动物克隆,有广阔的应用前景,可以促进猪的育种和转基因猪的研究应用。目前,核移植的效率还比较低,还不能在生产上应用,这需要从卵母细胞的体外成熟、去核方法、激活与融合的方法、细胞周期同步化、胚

胎移植等多方面入手进行研究,以提高核移植的效率,降低核移植的成本,简化操作步骤,使核移植技术早日进入生产应用。

致谢 陈东宝提供部分资料,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Prather, R. S., M. M. Sims and N. L. First. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.*, 1989, 41: 414 - 418.
- 2 Freitag, M., H. H. Dopke and H. Niemann et al. ³H-uridine incorporation in early porcine embryos. *Mol. Reprod. Develop.*, 1991, 29: 121 - 128.
- 3 Schoenbeck, R. A., M. S. Peters and L. F. Rickords et al. Characterization of deoxyribonucleic acid synthesis and the transition from maternal to embryonic control in the 4-cell porcine embryo. *Biol. Reprod.*, 1992, 47: 1118 - 1125.
- 4 Prather, R. S. and L. F. Rickords. Development regulation of an snRNP core protein epitope during pig embryogenesis and after nuclear transfer for cloning. *Mol. Reprod. Develop.*, 1992, 33: 119 - 123.
- 5 Nagashima, H., S. Saito and H. Yamakawa. Development of porcine nuclear transplant embryos from 8 - 16 cell stage donor nuclei. *Theriogenology*, 1992, 37(1): 263.
- 6 Wheeler, M. B. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod. Fertil. Develop.* 1994, 6: 563 - 568.
- 7 Mitsu, Y. K. Zsebo and B. M. Hogan. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 1992, 70: 814 - 847.
- 8 Campbell, K. H. S., J. McWhir and W. A. Ritchie et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, 380: 64 - 66.
- 9 Ding, J., R. M. Moor and G. R. Foxcroft. Effects of protein synthesis on maturation, sperm penetration and pronuclear development in porcine oocytes. *Mol. Reprod. Develop.* 1992, 33: 59 - 66.
- 10 Schoenbeck, R. A., M. S. Peters and L. F. Rickords et al. Diacylglycerol-enhanced electrical activation of porcine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 1993, 40: 257 - 266.
- 11 Stumpf, T. T., S. L. Terlow and H. Funahashi et al. Processing of nuclei transplanted into in vitro matured porcine oocytes. *Theriogenology*, 1993, 39: 322.
- 12 Procházka, R., J. Kaňka and P. Šutovský et al. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. *J. Reprod. Fert.* 1992, 96: 753 - 758.

-
- 13 Machaty, Z., M. A. Mayes and R. S. Prather. Parthenogenetic activation of porcine oocytes with guanosine-5'-o(3'-thiotriphosphate) *Biol. Reprod.*, 1995, 52:753-758.
- 14 Mayes, M. A., P. L. Stogsdill and R. S. Prather. Parthenogenic activation of pig oocytes by protein kinase inhibition. *Biol. Reprod.*, 1995, 53:270-275.
- 15 Cheong, H. T., Y. Takanashi and H. Kanagawa. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle stage embryonic nuclei into enucleated oocytes *Biol. Reprod.*, 1993, 48:958-963.