

异种杂交及核移植*

王敏康^{①②③} 刘冀珑^① 陈大元^{①**}

(^①中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080;

^②云南师范大学生命科学学院 昆明 650223; ^③中国农业大学生物学院 北京 100094)

摘要:概括了异种杂交及异种核移植所涉及的内容及近年的研究结果。提出异种核移植中供体核与不同种类动物的受体胞质间的相容性或排斥性有一定差异;也提出了一些解决异种核移植胚胎妊娠的可能途径。

关键词:异种杂交;异种受精;异种核移植;异种胚胎移植

中图分类号:Q954 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3263(2001)05-74-05

Hybrid and Inter-species Nuclear Transfer in Mammals

WANG Min-Kang^{①②③} LIU Ji-Long^① CHEN Da-Yuan^①

(^①Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080;

^②College of Life Science, Yunnan Normal University Kunming 650223;

^③College of Biology, China Agricultural University Beijing 100094, China)

Abstract:This article reviewed some topics relative to hybrid and inter-species nuclear transfer research and their progress in recent years. The authors suggested that the compatibility or rejection of recipient cytoplasm to donor is different in reconstructed embryos from inter-species nuclear transfer. Some probable ways for establishing and maintaining the pregnancy of hetero-reconstructed embryos were also suggested.

Key words:Hybrid; Inter-species fertilization; Inter-species nuclear transfer; Inter-species embryo transfer

异种核移植及相关研究具有重要的基础理论及实践意义。异种杂交及核移植包括三方面的内容。^①自然的杂交和异种受精。其中异种受精多在人工控制的条件下完成,通过人为方式如去透明带及显微注射等可完成许多种类动物异种间的受精。^②异种胞质重构。异种胞质重构还是使一种动物的雌雄配子在另一种动物的去核卵母细胞中相遇,以完成受精和部分或整个发育过程。^③异种核移植。异种核移植是将一种动物的早期胚胎细胞或体细胞移入另一种动物的去核卵母细胞等受体细胞中,以获得重新编程和开始发育的能力的过程。另一类与异种杂交不同的是嵌合体。这里所指的嵌合体是通过人工的方法使两种动物的胚胎聚合在一起,共同结合完成胚胎发育过程而获得的动物个体。这是一种细胞水平的异种混合体。

1 自然界的种间杂交

自然界早已存在的雄驴和雌马杂交而生的骡子,

是人们最为熟悉的例子。反之,雌驴和雄马交配而生的后代就是驴骡或驴骡。啮齿类也有种间杂交产生后代的报告^[1]。由研究结果可知,除了个体大小、生理状况、激素水平、生殖系统及生殖行为的差异及相似之处外,异种间的受精还需克服卵母细胞的透明带及细胞膜两道屏障,然后形成雌性和雄性原核,随后是杂交的合子核指导受精卵完成早期胚胎发育,并与母体建立起正常的母胎关系,由母体支持其正常发育到期,从而完成胎儿的发育,然后是个体发育。但杂交个体所表现的最大差异就是由于染色体数目的不同而不能产

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39360028);

第一作者简介 王敏康,男,39岁,副教授,博士;研究方向:生殖生物学;E-mail: wangmk 1998@yahoo.com

** 通讯作者;

收稿日期:2000-11-13,修回日期:2001-02-05

生正常可育的配子。

2 低等脊椎动物的异种间核移植

在低等脊椎动物中,由于鱼类的卵子很大,又很容易进行体外培养,也由于上个世纪 50~60 年代受显微操作技术、胚胎培养技术和仪器的限制,研究者都采用鱼类和两栖类的卵子进行有关的核移植和显微操作。

在鱼类所进行的异种核移植的结果表明,属间的组合如鲤鱼核移入鲫鱼卵母细胞质中,以及鲫鱼核移入鲤鱼卵胞质中,都可发育至成鱼。其中前者的组合可连续繁殖^[2,3]。在另一个亚科间的组合,草鱼核移入团头鲂卵胞质中,虽然移核鱼的形态与核供体(草鱼)相似,但与草鱼和团头鲂相比,移植鱼均有新的血清蛋白出现,并认为这是由于受体胞质影响了供体核的基因表达所致。在科间的金鱼核到泥鳅卵胞质的异种核移植中,5%的移植胚发育到幼鱼^[4]。目间的异种核移植组合,如罗非鱼核移入鲤鱼卵胞质或泥鳅卵胞质中均有发育到幼鱼的记录。另外,目间的罗非鱼核与金鱼卵胞质的组合,甚至纲间的小鼠核与泥鳅卵胞质的组合也可发育至原肠胚和囊胚阶段^[5,6]。

3 哺乳动物的异种受精和胚胎移植

在哺乳动物中,一个主要的阻止杂交(异种受精)的部位是透明带,它只允许同种内精子的穿透。Barros 证明仓鼠的精子不能穿透大鼠和小鼠卵子的透明带^[7],而人的精子甚至不能与许多种非灵长类卵母细胞的透明带附着。但除去透明带后,异种受精的比率即可大大增加。虽然卵母细胞膜也有一定阻止多精穿卵和异种精子结合的能力。Hanada 和 Chang 等发现去透明带的大鼠卵子可与小鼠精子进行受精。但反过来,大鼠精子却不能与小鼠的卵子进行受精^[9]。与此类似,仓鼠的精子不能与去透明带的大鼠及小鼠卵子受精^[9],但去透明带的仓鼠裸卵即可与多种哺乳动物的精子完成受精^[8,9]。70 年代 Uehara 和 Yanagimachi 采用显微注射的方式将人及仓鼠的精子注入仓鼠的卵子,发现所注入的精子可以解凝聚并形成原核。注入的步骤下无论是否有精子都可能会激活卵子,结果导致完成减数分裂并形成雌性原核。也有精子出现解聚但不形成原核的情况,说明卵子没有被激活,这可通过皮质颗粒仍然保留并且未完成减数分裂来判断^[10-12]。Thadani 进行的异种间显微授精的实验结果指出,在细胞质中精子与卵胞质的相互作用较精子与卵子表面即卵母细胞膜之间的作用更加缺少种的特异性^[11]。近年来所做的异种间精子胞质内显微注射受精的工作也证

明,不同种间的精子可通过释放一种停留于精子顶体赤道段区域的分子量为 33 ku 的蛋白质来激活卵子,这种蛋白质被称为卵子激活因子(oocytes activating factor, OAF)^[14,15]。Wakayama 等和 Kimura 等观察到注射仓鼠、兔、猪、人和海兔(sea urchin)的精子到小鼠卵母细胞质中都可活化小鼠卵子。因此卵子激活因子无明显的种特异性^[16,17]。Kim 等的实验结果表明,在猪卵母细胞质中注射猪、牛、小鼠或人的精子都可观察到有雄性原核形成和原核对合(pronuclear apposition)。注入同种的猪精子后,微管星体从精子的颈部开始组织并充满整个胞质。相反,在注入异种牛、小鼠或人的精子后,胞质起源的微管却是从卵子的皮质部开始组织,然后到达卵的中部,似乎通过这种方式把雌雄原核移动到卵子的中部。另外,他们还观察到同种精子注射后,猪的受精卵可在精子注射后的 19~21 h 分裂为 2 细胞胚胎;而进行小鼠、牛或人精子注射的猪卵无一例可分裂到 2 细胞期^[15]。我们在实验中也观察到,从小鼠卵母细胞中分离出来的 MII 期核(纺锤体),可在获能的小鼠和大鼠精子作用下进行 1~2 次分裂,而精子是不能进入这种含有纺锤体的核质体中去的(王敏康等,未发表资料)。以上实验结果都说明了精子所含的卵子激活因子无明显的特异性。但对以上实验结果进行分析也可看出卵母细胞质内也存在对异种精子或核等的相容性及排斥性问题。

4 哺乳动物异种间的胚胎移植

20 世纪 50 年代就观察到羊的受精卵可在兔的输卵管中分裂并发育至囊胚阶段^[18]。直到现在,结扎的兔或羊的输卵管仍在用作异种胚胎早期发育阶段的良好支持系统。Wawick 和 Berry 等进行了绵羊和山羊的胚胎相互移植,得到胎龄为 30~45 d 的成活绵-山胚胎^[19]。Tarkowski 所做的大-小鼠间的相互胚胎移植结果表明:① 小鼠的 2 细胞和 8 细胞期胚胎以及大鼠的 4~8 细胞期胚胎均可在对方的输卵管中发育至囊胚阶段;② 一些大鼠的胚胎发育到囊胚阶段后透明带不能在相应的时间脱落,囊胚的体积继续增大,内细胞团扩散到滋养层下方,囊胚失去致密的胚胎结构;另一些胚胎可发育为正常的囊胚;小鼠的受精卵可在大鼠输卵管中发育成正常的囊胚;③ 大鼠的正常囊胚和中空囊胚以及小鼠的囊胚都可在对方的子宫中引发一典型的蜕膜反应;异种囊胚在与子宫上皮接触时可形成正常的隐窝;④ 大、小鼠的囊胚不能在对方的子宫中与粘膜建立正常的接触;⑤ 小鼠与大鼠的囊胚在植入后存活的时间非常有限,大鼠的囊胚在小鼠体内的存活时间

上限是到第7 d,而在大鼠体内的是到第8 d。与小鼠子宫粘膜建立联系的大鼠囊胚可经历某些分化,如形成小的卵圆柱体(cylinder);小鼠囊胚的表现为大小增加很大,但内细胞团却无分化也无生长;⑥把在小鼠体内发育至囊胚的大鼠胚胎再次移入受体大鼠中,随后的死亡率很高,所观察到的3个滋养层囊泡被认为是从中空的囊胚发育而来的^[20]。

通过胚胎聚合法可在关系较近的啮齿类种间如 *Mus musculus* 和 *Mus caroli* 产生嵌合体后代,这种嵌合体后代是可育的^[21,22]。Fehilly 等于 1984 年获得了绵羊和山羊的嵌合体^[23]。但关系较远的物种如小鼠-大鼠和绵羊-山羊间的嵌合体则表现出一物种细胞较另一物种的细胞占优势。这样导致细胞群体的一种基因型的全部消失,特别是在小鼠与大鼠嵌合体中的大鼠细胞,或者是绵羊-山羊嵌合体不育的现象。在山羊-绵羊的嵌合体中也观察到细胞核型的不均等表现^[24]。另外,Williams 等也通过胚胎聚合法用 *Bos indicus* 和 *Bos taurus* 半胚产生了种间嵌合体牛^[25]。

5 哺乳动物的异种核移植

1983 年美国科学家 McGrath 和 Solter 开创了哺乳动物的核移植方法并得到克隆小鼠^[26]。从此以后,核移植研究在不同种类的哺乳动物上得到了广泛的开展,并相继得到了许多种类的以早期胚胎为供体的克隆动物后代。1992 年, Wolfe 和 Kreamer 报道了进行哺乳动物种间核移植的情况,他们将 16~32 期的牛胚胎核移入对半分割的美洲水牛、山羊、绵羊和仓鼠的去核卵母细胞中。另外,山羊和绵羊的胚胎细胞也作为供体移入对半分割的牛卵中。重构胚移入绵羊输卵管内进行体内培养,6~7 d 后冲出以分析重构胚的发育状况。结果指出,与同种内的核移植相比较,异种间核移植胚胎发育至囊胚的效率很低。仅有很少的牛-美洲水牛和牛-羊的核质杂合胚发育至囊胚阶段。异种间核移植胚的囊胚发育率不到 2%。其中 1 个山羊-牛的异质扩张囊胚经冻存后移植到一经同步化处理的西班牙母兔(*Spanish doe*)体内,结果未观察到有活体胎儿妊娠。他们的实验也观察到,牛的供体核移入仓鼠卵母细胞中的异种重构胚不能进行甚至 1 次的分裂,72 枚重构胚无 1 例可分裂到 2 细胞期^[27]。

梅祺等进行了以小鼠 8 细胞分裂球(含细胞核)移入兔去核卵母细胞的实验。结果移入小鼠输卵管中的融合重构胚有 43.1% 的发生分裂,有 5.4% 的重构胚发育到囊胚期^[28]。

我们采用小鼠 2 细胞期胚胎的核质体(karyoplast)

为供体,移入兔去核卵母细胞的实验结果也证明,小鼠-兔异种间的核移植重构胚可在体外培养的条件下发育至囊胚期。将在体外培养发育到 2~4 细胞期的重构胚分别移入受体小鼠和受体兔中,结果均未产仔,也未发现死胎和着床点^[29]。我们在用不同类型大熊猫体细胞为供体进行的异种核移植研究中,将体外培养的大熊猫骨骼肌、子宫上皮和乳腺细胞分别作为供体核移入兔的去核卵母细胞中,均可支持早期重构胚的发育。其中以乳腺细胞效果最好,骨骼肌细胞最差。对线粒体 DNA 的分析表明,重构囊胚中并存有大熊猫和兔的线粒体,但细胞核 DNA 完全属于大熊猫的^[30]。Dominko 等采用牛的卵母细胞为受体,分别移入奶牛、绵羊、猪、猴和大鼠的成纤维细胞,结果均可完成早期胚胎发育。除大鼠-牛的重构胚在 4 细胞期用于胚胎移植外,其它几种异质重构胚均在体外发育到囊胚阶段。进行胚胎移植后,在猪和绵羊均未能在移植后的第 25 d 观察到胎儿的心脏搏动。奶牛移植后 35 d,在两只寄母羊的子宫角观察到有肉状突起,但无胎膜及胎儿残留物^[31]。刘冀珑(2000 年博士学位论文)采用新鲜分离的小鼠卵丘细胞直接注入到受体牛的去核卵母细胞中,经过激活处理后进行体外培养,结果有 57% 的重构卵可进行分裂。以这些分裂为 8~16 细胞期的卵裂球为供体与去核小鼠卵母细胞进行电融合,结果有 20%~45% 的继代重构卵发生卵裂,但未能发育到 4 细胞期。我们最近在大、小鼠和沙土鼠间进行的核移植交换后的体外受精及核移植结果表明,以装入小鼠透明带的去核大鼠 MII 期卵母细胞为受体,通过显微操作移入 C57BL/6 小鼠(黑色)的 MII 期核(纺锤体)及少量细胞质,经电融合方式构建异质重构卵母细胞,并在 M16+ET 培养液中与 C57BL/6 小鼠的获能精子进行 IVF。结果表明这种重构卵可与小鼠精子完成正常的 IVF 及第 1~2 次分裂。将 1~3 细胞期的 22 个重构胚胎移入 4 只自然交配后怀孕 1 d 的昆明小鼠(KM×KM,白色)的输卵管中,结果无异种重构胎儿出生,子宫中也未发现有着床点和死胎等;将大鼠 2~4 细胞期胚胎的核质体移入去核的小鼠卵母细胞和去核小鼠 2 细胞胚胎中,或将小鼠 2 细胞胚胎的核质体移入去核的大鼠卵母细胞中,所得重构胚在体外培养中均不能进一步发育(王敏康等,未发表资料)。这一结果和 Waksmundzka 所进行的部分类似的实验^[22]结果一致。说明大、小鼠间核与质存在严重的相互排斥或不相容性。

6 小结

综上所述,哺乳动物异种核质之间既存在相容性

或亲合性,也存在相斥性。这一对矛盾存在于三个层次上:①细胞质水平;②胎儿与母体间;③胎儿出生后自身生长发育水平。在细胞质水平可能通过生化代谢途径和基因表达这两个方面表现。从不同动物间核移植结果的差异可以看出,兔及牛的卵胞质比啮齿动物的卵胞质与异种核有较好的亲合性。异种母体的内环境在早期胚胎发育阶段均可表现良好的适应及亲合性。但在多数情况下难与受异种核控制的囊胚期后的胚胎建立良好的胎儿-母体界面关系。而鱼类及两栖类的胚胎发育无需胎儿母体关系的建立,因而许多种间的杂交组合可发育到新个体的产生。从可观察到的自然杂交及人工嵌合体后代的出生可以反过来说明,这些组合的胎儿与母体建立了很好的母-胎界面关系。在个体水平上,从有的异种核移植鱼出现幼体存活一定时间后死于血液循环系统障碍^[5]和体细胞克隆动物出生后死亡^[32]的情况,也可以看出异种胞质或是显微操作及体外培养条件都可能对异种核移植后代的个体形态发育及机能产生一定的影响。今后,采用不同的方式及技术进行研究和选择,如胞质数量控制和显微操作的处理、培养条件的完善、基因表达差异的比较、内细胞团的移植和交换、转基因技术、免疫及细胞因子处理以及人工子宫的建立等以最终获得哺乳动物的异种核移植后代都是有希望和值得探索的方向。

参 考 文 献

- [1] West, J., W. I. Frels, V. M. Chapman. *Mus mus* × *Mus caroli* hybrids: mouse mules. *J. Hered.*, 1978, **69**:321 ~ 326.
- [2] 童第周等. 硬骨鱼类细胞核移植 I. 将鲤鱼细胞核移到鲫鱼细胞质中. 中国科学(B), 1980, **23**:371 ~ 380.
- [3] Yan, S. Y., M. Du, N. H. Wu *et al.* Identification of intergenetic nucleo-cytoplasmic hybrid fish obtained from the combination of carp nucleus and crucian cytoplasm. In: Harold, C. S. ed. *Progress in Developmental Biology (Part A)*, New York: Alan. R. Liss. Inc., 1986. 35 ~ 38.
- [4] Yan, S. Y., M. Tu, H. Y. Yang *et al.* Developmental incompatibility between cell nucleus and cytoplasm as revealed by nuclear transplantation experiments in teleost of different families and orders. *Int. J. Dev. Biol.*, 1990, **34**:255 ~ 266.
- [5] Yan, S. Y. *et al.* Nuclear transplantation in teleosts, II. Hybrid fish from the nucleus of crucian and cytoplasm of carp. *Sci. Sin(B)*, 1989, **27**:1 029 ~ 1 034.
- [6] 李书鸿. 鱼类细胞核移植. 见:陈吉龙, 马海飞主编. 发育生物学进展. 北京:高等教育出版社, 1994. 196 ~ 207.
- [7] Barros, C. *In vitro* capacitation of golden hamster spermatozoa with fallopian tube fluid of mouse and rat. *J. Reprod. Fertil.*, 1968, **17**:203 ~ 206.
- [8] Hanada, A., M. C. Chang. Penetration of zone-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol. Reprod.*, 1972, **6**:300 ~ 309.
- [9] Yanagimachi, R. Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 1972, **28**:477 ~ 480.
- [10] Uehara, T., R. Yanagimachi. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod.*, 1976, **15**:467 ~ 470.
- [11] Uehara, T., R. Yanagimachi. Activation of hamster eggs by pricking. *J. Exp. Zool.*, 1977a, **199**:262 ~ 274.
- [12] Uehara, R., R. Yanagimachi. Behavior of nuclei of testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa injected into hamster eggs. *Biol. Reprod.*, 1977b, **16**:315 ~ 321.
- [13] Thadani, V. M. A study of hetero-specific sperm-egg interactions in the rat, mouse and deer mouse using *in vitro* fertilization and sperm injection. *J. Exp. Zool.*, 1980, **212**:435 ~ 453.
- [14] Parrington, J., K. Swann, V. J. Shevchenko *et al.* Protein, Nucleotide calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*, 1996, **379**:364 ~ 368.
- [15] Kim, N. H., S. H. Jun, J. T. Do *et al.* Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse, or human spermatozoon into porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 1999, **53**:84 ~ 91.
- [16] Wakayama, T., T. Uehara, Y. Hayashi *et al.* The response of mouse oocytes injected with sea urchin spermatozoa. *Zygote.*, 1997, **5**:229 ~ 234.
- [17] Kimura, Y., R. Yanagimachi, S. Kuretake *et al.* Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol. Reprod.*, 1998, **58**:1 407 ~ 1 415.
- [18] Adams, C. E., L. E. A. Rowson. Transfer of mammalian ova between species. *Nature*, 1955, **176**:167.
- [19] Warwick, B. L., R. O. Berry. Inter-generic and intra-specific embryo transfers in sheep and goats. *J. Hered.*, 1949, **40**:297 ~ 303.
- [20] Tarkowski, A. K. Inter-specific transfers of egg between rat and mouse. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 1962, **10**:476 ~ 495.
- [21] Koniukhov, B. V. Interspecies chimeras of mammals. *Ontogenez.*, 1985, **16**:242 ~ 246.
- [22] Waksmundzka, W. Development of rat × mouse hybrid embryos produced by microsurgery. *J. Exp. Zool.*, 1994, **269**:551 ~ 559.
- [23] Fehilly, C. B., S. M. Willadsen, E. M. Tucke. Interspecific

- chimaerism between sheep and goat. *Nature*, 1984, **307**:634 ~ 636.
- [24] Jaszczak, K., M. Czlonkowska, A. Guszkiwica *et al.* Cytogenetic analysis of experimental interspecies goat-sheep chimera. *J. Hered.*, 1991, **82**:244 ~ 245.
- [25] Willams, T.J., R. K. Munro, J. N. Shelton. Production of interspecies chimeric calves by aggregation of *Bos indicus* and *Bos taurus* demi-embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1990, **2**:383 ~ 394.
- [26] McGrath, J., D. Solter. Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 1983, **220**: 1 300 ~ 1 302.
- [27] Wolfe, B. A., D. C. Kraemer. Interspecies nuclear transplantation. In: *Symp. on Cloning Mammals by Nuclear Transplantation*. Colorado State University, January, 17, 1992. 43 ~ 45.
- [28] 梅祺, 邹贤刚, 杜森. 鼠兔核质杂交胚胎早期发育的研究. *实验生物学报*, 1993, **26**:389 ~ 397.
- [29] 王敏康, 张田, 王晓燕等. 鼠-兔异种间的核移植及胚胎发育研究. *云南教育学院学报*, 1999, **15**:45 ~ 47.
- [30] 陈大元, 孙青原, 刘冀琰等. 大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持早期重构胚发育. *中国科学(C辑)*, 1999, **29**:324 ~ 329.
- [31] Dominko, T., M. Mitalipova, B. Haley *et al.* Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.*, 1999, **60**:1 496 ~ 1 502.
- [32] Kato, Y., T. Tani, Y. Sotomaru *et al.* Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, **282**:1 975 ~ 1 976.