

马卵母细胞孤雌激活与体细胞核移植技术

张志鹏^① 简洪禹^② 孙旺吾^③ 潘静^①
潘庆杰^② 刘羿羿^{①*} 周欢敏^{①*}

① 内蒙古农业大学生命科学院 内蒙古自治区生物制造重点实验室 呼和浩特 010018;

② 青岛农业大学动物科技学院 青岛 266109; ③ 山东省莱西市第一中学 莱西 266000

摘要: 在马 (*Equus caballus*) 的繁殖和非繁殖季节, 本研究探讨马扩展型 (Ex) 和紧凑型 (Cp) 卵丘-卵母细胞复合体 (COCs) 卵母细胞的孤雌激活效率。在繁殖季节, 探讨马驹和成年马成纤维细胞核移植 (SCNT) 的成功率。孤雌激活实验结果显示, 在繁殖季节, 发育到 2-细胞、4-细胞和桑椹胚的比例, 扩展型 (Ex) 卵丘-卵母细胞复合体分别是 52.8% (19/36)、38.9% (14/36) 和 5.6% (2/36), 紧凑型 (Cp) 卵丘-卵母细胞复合体分别是 47.9% (23/48)、33.3% (16/48) 和 6.2% (3/48)。在非繁殖季节, 发育到 2-细胞、4-细胞的比例, 扩展型 (Ex) 分别是 37.2% (16/43) 和 16.3% (7/43), 紧凑型 (Cp) 的比例分别是 35.1% (27/77) 和 11.7% (9/77), 都没有获得桑椹胚。同一季节, 扩展型 (Ex) 与紧凑型 (Cp) 胚胎发育的比率差异不显著 ($P > 0.05$), 不同季节, 两者差异显著 ($P < 0.05$)。体细胞核移植实验结果显示, 以马驹成纤维细胞作为核供体细胞, 胚胎发育到 2-细胞、4~8 细胞和桑椹胚的比例分别是 41.5% (22/53)、33.9% (18/53) 和 15.1% (8/53), 以成年马成纤维细胞作为核供体细胞, 比例分别是 38.9% (7/18)、22.2% (4/18), 没有获得桑椹胚。综上所述, 季节和卵丘-卵母细胞复合体 (COCs) 类型影响马卵母细胞孤雌激活的效率, 不同核供体细胞影响克隆胚胎构建的成功率。

关键词: 马; 体细胞; 孤雌激活; 核移植; 胚胎移植

中图分类号: Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 06-883-10

Parthenogenetic Oocyte Activation and Somatic Cell Nuclear Transfer in the Horse

ZHANG Zhi-Peng^① JIAN Hong-Yu^② SUN Wang-Wu^③ PAN Jing^①
PAN Qing-Jie^① LIU Yi-Yi^{①*} ZHOU Huan-Min^{①*}

① Key Laboratory for Biological Manufacturing of Inner Mongolia Autonomous Region, College of Life Sciences,

Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018; ② College of Animal Science and Technology, Qingdao Agricultural

University, Qingdao 266109; ③ Laixi No. 1 Middle School of Shandong Province, Laixi 266000, China

Abstract: This study investigated the parthenogenetic activation efficiency of oocytes from expanded (Ex)

基金项目 内蒙古农业大学校内项目 (No. 108013), 内蒙古自然科学基金项目 (No. 2017MS0343);

* 通讯作者, E-mail: huanminzhou@263.com, liuyiyifish@139.com;

第一作者简介 张志鹏, 男, 博士; 研究方向: 基因组学与生物技术; E-mail: zhangzhipengs@126.com.

收稿日期: 2019-05-26, 修回日期: 2019-09-01 DOI: 10.13859/j.cjz.201906015

and compact (Cp) type of cumulus oocyte complexes (COCs) in the breeding and non-breeding seasons of horses (*Equus caballus*). The somatic cell nuclear transfer (SCNT) using fibroblasts from foals and adult horses was also studied. The results of parthenogenetic activation test showed that the proportions of Ex type oocytes developed to 2-cell, 4-cell and morula stages were 52.8% (19/36), 38.9% (14/36) and 5.6% (2/36) respectively, while those of Cp type oocytes were 47.9% (23/48), 33.3% (16/48) and 6.2% (3/48) respectively in the breeding season. The proportions of Ex type oocytes developed to 2-cell and 4-cell embryos were 37.2% (16/43) and 16.3% (7/43) respectively, while those of Cp type oocytes were 35.1% (27/77) and 11.7% (9/77) respectively, but morula stage embryos were not obtained in non-breeding season (Fig.4; Table 1). There was no significant difference in the rate of embryonic development between Ex and Cp ($P > 0.05$) groups in the same season, but there was significant difference between Ex and Cp groups in breeding and non-breeding seasons ($P < 0.05$). The percentages of foal fibroblast-derived SCNT embryos developed to 2-cell, 4-8 cell and morula stages were 41.5% (22/53), 33.9% (18/53) and 15.1% (8/53) respectively, while the percentages of adult horse fibroblast-derived SCNT embryos developed to 2-cell and 4-8-cell stages were 38.9% (7/18) and 22.2% (4/18) respectively, but no morula stage embryos were obtained (Fig.5; Table 2). In summary, season and COCs type affect the efficiency of parthenogenetic activation of horse oocyte, and different sources of nuclear donor cells affect the success rate of cloned embryo development.

Key words: Horse; Somatic cell; Parthenogenetic activation; Nuclear transfer; Embryo transfer

“多莉”是第一个来源于成年体细胞的克隆哺乳动物，它诞生至今已有 20 年之久 (Wilmut et al. 1997)。虽然，科学界和公众仍然对克隆技术充满争议，从技术角度来看，克隆是一种十分复杂的技术，从伦理角度来看，或许对人类社会基本的伦理带来颠覆性的挑战，这就存在着争议的模糊地带。但无论如何，体细胞核移植技术 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 已经被应用于大多数哺乳动物的研究和生产实践中。

与羊、猪 (*Sus domestica*) 等家畜相比 (Wilmut et al. 1997, Polejaeva et al. 2000)，马 (*Equus caballus*) 体细胞核移植技术的研究相对较晚。1981 年，首次报道马卵母细胞体外成熟 (*in vitro* maturation, IVM) 的研究，采用 M199 作为基础培养液，添加胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 和其他促成熟因子 (maturation promoting factor, MPF)，获得体外成熟的马卵母细胞 (Fulka et al. 1981)。

在 20 世纪 80 年代，通过胚胎分割技术 (embryo bisection) 将 2~4 细胞期的马胚胎进行等份机械分离，转移到猪的空透明带中，激活后移植到羊的输卵管中继续发育，胚胎发育至桑椹胚晚期或早期囊胚期的阶段进行冲胚，将获得的胚胎移植到受体母马中，获得同卵双胞胎或多胎 (Allen et al. 1984)。骡 (Mule) 由雄性驴 (*Equus asinus*) 和雌性马杂交而成，是体细胞核移植技术克隆的第一个马属动物。Woods 等 (2003) 选取 45 d 的骡胚胎建立了成纤维细胞系，采用活体取卵技术 (ovum pick up, OPU) 获取成熟的马卵母细胞，通过体细胞核移植和细胞融合技术，在 2003 年 5 月 4 日成功诞生克隆骡，命名为 “Idaho Gem” (Woods et al. 2003)。同年，诞生了第一匹由体细胞核移植技术克隆的马，被称为 “Prometea” (Galli et al. 2003)。与克隆骡不同的是，成熟的马卵母细胞是通过体外成熟的方法获得，核供体细胞是取自阿拉伯马 (Arabian) 的皮肤组织建立的成纤维细胞系。2005 年，美国的第一匹克隆马诞生 (Hinrichs 2005)，之后克隆马技术开始迅速推广 (Hinrichs

2006, Hinrichs et al. 2007, Choi et al. 2009, 2013, 2014, 2015)。2008 年, 阿根廷的第一匹克隆马顺利诞生 (Miragaya et al. 2011), 但不幸的是, 在出生后它只存活了几个小时。两年后, 南美洲的第一匹健康克隆马在阿根廷诞生 (Gambini et al. 2012)。2010 年, 亚洲的第一匹克隆马在韩国诞生 (Lee et al. 2015)。2016 年, 澳大利亚的第一匹克隆马诞生 (Gambini et al. 2016)。克隆马的数量逐年增多, 美国在 2006 年实现了克隆马的商业化 (Hinrichs 2006), 阿根廷在 2012 ~ 2016 年间相继生产约 120 匹克隆马 (Gambini et al. 2012, 2014a), 欧洲每年有 2 ~ 5 匹克隆马诞生 (Olivera et al. 2016)。

近几年, 马胚胎体外生产技术 (*in vitro* embryo production, IVP) 飞速发展, 越来越多地应用到商业化的马育种计划中。体细胞核移植、卵胞浆内单精子显微注射技术 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 的突破与应用为高端马术用马的繁育开辟了新的道路 (Christine et al. 2014, Morris 2018)。本研究在马的繁殖和非繁殖季节, 探讨马扩展型 (expanded, Ex) 和紧凑型 (compact, Cp) 卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus oocyte complexes, COCs) 卵母细胞的孤雌激活效率, 以汉诺威马驹和汗血马的成纤维细胞作为核供体细胞, 在繁殖季节, 研究克隆胚胎体外构建技术, 为获得我国的第一匹克隆马奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

成纤维细胞系来源于刚出生汉诺威马驹和成年汗血公马 (16 岁) 的左耳后皮肤上皮组织。成熟卵母细胞来源于青岛周边屠宰场收集的马卵巢, 在繁殖季节 (4 ~ 10 月份) 和非繁殖季节 (11 月至翌年 3 月份), 分别收集卵丘-卵母细胞复合体后, 按形态挑选卵丘颗粒细胞和卵母细胞结合较为疏松的扩展型卵丘-卵母细胞复合体以及两者有部分或全部结合紧密的紧凑型卵丘-卵母细胞复合体。

1.2 实验方法

1.2.1 成纤维细胞培养 将刚出生汉诺威马驹和成年汗血公马皮肤去毛消毒后, 用活体取样钳取 0.5 cm^3 大小的皮肤组织, 用含 1% 青霉素-链霉素混合溶液 ($100 \times$ 双抗) (Gibico by life technologies, cat. no. 15140-148) 的磷酸缓冲盐溶液 (Gibico by life technologies, cat. no. 14190-144) 清洗 3 次, 去除杂质、脂肪、结缔组织。75% 酒精浸泡 1 min, 用含 1% 双抗的磷酸缓冲盐溶液清洗 3 次。反复剪碎组织成约 1 mm^3 小块。将组织小块均匀接种到 T25 培养瓶 (Corning incorporated-life sciences, cat. no. 430639), 反转培养瓶。加 5 ml 含 DMEM/F12 (Gibico by life technologies, cat. no. 12400-024)、10% 胎牛血清 (Gibico by life technologies, cat. no. 10082-147) 和 1% 双抗的成纤维细胞培养液, 放入培养箱 (Thermo-Forma 311), 5% CO_2 、37 °C、饱和湿度培养, 4 ~ 6 h 后反转培养瓶, 每 3 d 换液一次。

1.2.2 传代培养 培养 6 ~ 7 d 后, 成纤维细胞游离出来, 10 ~ 11 d 铺满培养瓶底部约 80% 时开始传代培养。去掉培养液, 用含 1% 双抗的磷酸缓冲盐溶液清洗 3 遍, 加入 1 ml 0.25% 的胰蛋白酶 (Gibico by life technologies, cat. no. 25200-056) 消化 3 ~ 5 min, 肉眼观察瓶壁半透明的细胞层, 当见到出现细针孔空隙时, 弃去消化液, 加入 3 ml 的成纤维细胞培养液终止消化。然后将消化后的细胞收集到 1.5 ml 离心管中, 1 000 r/min 离心, 去上清并加入成纤维细胞培养液, 吹打后按一传二的比例分入多瓶继续培养, 每 3 d 换一次培养液。

1.2.3 细胞生长曲线的测定 收集第 1 次传代培养后的成纤维细胞, 放入 2 ml 离心管中, 加入 1.5 ml 成纤维细胞培养液, 移液枪吹打均匀后制成细胞悬液。24 孔培养板每个孔放入 50 μl 细胞悬液, 加入 1 ml 培养液培养。细胞计数板计数剩余细胞悬液的密度。之后, 每天取 3 个孔的细胞, 共取 8 d, 分别在 2 ml 离心管中消化, 相同方法制成细胞悬液, 并用细胞计数板

计数细胞悬液的密度，依次类推。用密度与培养时间做成细胞生长曲线。

1.2.4 卵母细胞成熟培养 在马的繁殖和非繁殖季节，扩展型和紧凑型两组卵母细胞体外培养条件相同。首先，在 60 mm 细胞培养皿（Corning incorporated-life sciences, cat. no. 430166）制备 7 个 100 μ l 含 M-199（Gibico by life technologies, cat. no. 12350-039）、10%胎牛血清、0.01 U/ml 促卵泡生长激素（Sigma-Aldrich, cat. no. F4021-2 μ g）、0.01 U/ml 促黄体素（Sigma-Aldrich, cat. no. L9773-1 μ l）、200 mg/L 胰岛素生长因子 I（Gibico by life technologies, cat. no. PHG0078）、0.05 g/L L-谷氨酰胺（Gibico by life technologies, cat. no. 25030-081）和 1%双抗的卵母细胞培养液微滴，石蜡油覆盖，放入 5% CO₂、38.5 °C、饱和湿度的培养箱内，平衡 3 ~ 4 h。37 °C 预热 3 ml 含 M-199、5%胎牛血清和 1%双抗的洗卵液 1 h。手术刀切割马卵巢，体视显微镜（Olympus SZ61-ILST）下收集卵丘-卵母细胞复合体，去掉凋亡或缺损卵母细胞的卵丘-卵母细胞复合体，按扩展型和紧凑型分为两组，每组 10 ~ 15 枚，洗卵液清洗 3 遍，放入预先平衡的卵母细胞培养液中培养，5% CO₂、38.5 °C、饱和湿度，培养 32 ~ 36 h 后，0.25%的胰蛋白酶消化 1 ~ 3 min，挑出达到 M II 期的卵母细胞。

1.2.5 孤雌激活 在马的繁殖和非繁殖季节，将获得的扩展型和紧凑型的 M II 期卵母细胞用同样的方法分别进行孤雌激活实验。先将 M II 期的卵母细胞用含 1%双抗的磷酸缓冲盐溶液清洗 3 遍，然后将卵母细胞放入含 M-199、5 μ mol/L 离子霉素（Sigma-Aldrich, cat. no. I9657-1 mg）和 1%双抗的 100 μ l 激活液中，放置培养箱内 5% CO₂、38.5 °C、饱和湿度，激活 5 min。然后取出并用含 1%双抗的磷酸缓冲盐溶液清洗 3 遍，放入 100 μ l 含 DMEM/F12、2 mmol/L 6-二甲氨基嘌呤（Sigma-Aldrich, cat. no. D2629-100 mg）、1 mg/L 放线菌酮（Sigma-Aldrich, cat. no. C7698-100 mg）和 1%

双抗的融合液中，相同条件培养 4 h。最后，取出卵母细胞并清洗 3 遍后，放入 100 μ l 含 DMEM/F12、10%胎牛血清、0.1 g/L 牛磺酸（Sigma-Aldrich, cat. no. T0625-10 g）、0.1 g/L 半胱氨酸（Sigma-Aldrich, cat. no. V900400-100 g）、0.11 g/L 丙酮酸钠（Sigma-Aldrich, cat. no. P5280-100 ml）、0.05 g/L L-谷氨酰胺和 1%双抗的胚胎培养液中，相同条件培养，每 2 d 换液一次，观察胚胎的发育情况。

1.2.6 体细胞核移植 核供体细胞选自第 3 次传代培养后的汉诺威马驹和成年马的成纤维细胞，将成纤维细胞接种到 24 孔培养板中，每个孔的细胞数量维持在 $(1 \sim 2) \times 10^4$ 个。加入 1 ml 成纤维细胞培养液，放入培养箱中，5% CO₂、37 °C、饱和湿度培养 2 d，然后去掉培养液，用含 1%双抗的磷酸缓冲盐溶液清洗 3 遍，加入 1 ml 含 DMEM/F12、0.5%胎牛血清和 1%双抗的培养液，相同条件培养 3 ~ 5 d 后用于体细胞核移植。通过显微仪（Eppendorf TransferMan 4r）操作，去除 M II 期卵母细胞的细胞核和第一极体，将去核的卵用含 1%双抗的 M199 培养液洗 3 遍，移入胚胎培养液中，5% CO₂、38.5 °C、饱和湿度，平衡 30 min。用注射针在显微镜下挑选小而光滑的成纤维细胞，从原来去核的位置注入透明带间隙，用注射针挤压体细胞附近的透明带，使体细胞与卵母细胞的胞质粘到一起，构建成胞质-体细胞复合体。将构建好的胞质-体细胞复合体放入融合液中，相同条件平衡 2 min，之后放入融合槽中，140 V 20 μ s，使两者胞膜穿孔而融合，用胚胎培养液将电融合处理后的卵母细胞洗 3 遍，然后放入胚胎培养液中置于培养箱中培养，15 ~ 20 min 后观察融合情况，将未融合的胞质-体细胞复合体进行二次电融合，融合的重构胚在培养箱中培养 2 h 后进行激活处理（方法同卵母细胞孤雌激活），最后放入胚胎培养液中，置于培养箱相同条件下培养，每 2 d 换半液。

1.2.7 构建胚胎的移植 体细胞核移植的胚胎发育到桑椹胚时，收集胚胎，并用胚胎保存

液 (IMV, cat. no. 19449) 清洗 3 遍, 进行胚胎装管。整个装胚管 (IMV, cat. no. 014498) 中吸入胚胎保存液, 以气泡分为 3 段, 中间一段装有胚胎 (图 1), 肉眼检测装胚管中的胚胎位置, 然后将胚胎转移到移胚管 (IMV, cat. no. 6430) 中, 最后将移胚管装入移胚枪 (IMV, cat. no. 7246) 内。待受体马固定并清理外阴后, 进行胚胎移植。

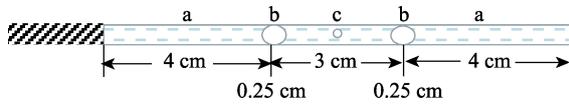


图 1 胚胎装管的剖面图

Fig. 1 Sectional view of the embryo tube

a. 胚胎保存液; b. 气泡; c. 胚胎。

a. Embryo preservation solution; b. Bubble; c. Embryo.

2 结果与分析

2.1 马成纤维体细胞系的建立

马驹和成年马成纤维细胞贴壁生长的时间不同, 马驹成纤维细胞从第 4 天开始, 有少量细胞脱落组织 (图 2a), 开始贴壁生长, 而成年马从第 5 天开始, 才出现少量游离细胞。马驹的成纤维细胞生长到 8 天左右逐渐呈放射状伸展, 胞体的中心部分亦随之变扁平, 能基本覆盖培养皿底部 (图 2b), 生长 10~12 d 时,

细胞完全贴壁, 呈现典型的成纤维细胞形态 (图 2c)。成年马的成纤维细胞生长稍慢, 比马驹的晚 2~3 d, 在培养 10~15 d 时, 基本铺满整个培养皿。

成纤维细胞的生长曲线测定表明, 第一次传代培养 (图 3a), 细胞密度 $(1.17 \pm 0.14) \times 10^4$ 个 (图 3c), 培养 5~8 d 后, 成纤维细胞的纯度较高, 具有完整的生物学特征 (图 3b)。马驹的成纤维细胞在 4~6 d 处于对数生长期, 生长速度最快, 细胞数量由 $(4.16 \pm 0.35) \times 10^4$ 个迅速增长到 $(2.87 \pm 0.82) \times 10^5$ 个 (图 3c)。成年马在 1~3 d 内, 生长缓慢, 处于潜伏期, 5~7 d 生长速度最快, 处于对数期, 细胞数量由 $(4.62 \pm 0.29) \times 10^4$ 个迅速增长到 $(2.67 \pm 0.56) \times 10^5$ 个 (图 3c), 8 d 以后, 处于稳定期。

2.2 孤雌激活成功率

在马的繁殖季节, 将 84 枚 MII 期卵母细胞进行孤雌激活实验 (表 1), 卵母细胞达到 MII 期后 (图 4a), 经孤雌激活液处理, 细胞的形态完整, 培养 36~48 h, 卵母细胞发生卵裂, 达到 2-细胞期 (图 4b), 之后经过 4-细胞期、8-细胞期 (图 4c) 等阶段后发育成桑椹胚 (图 4d)。在马的非繁殖季节, 120 枚 MII 期卵母细胞进行孤雌激活实验 (表 1), 没有获得桑椹胚胎。

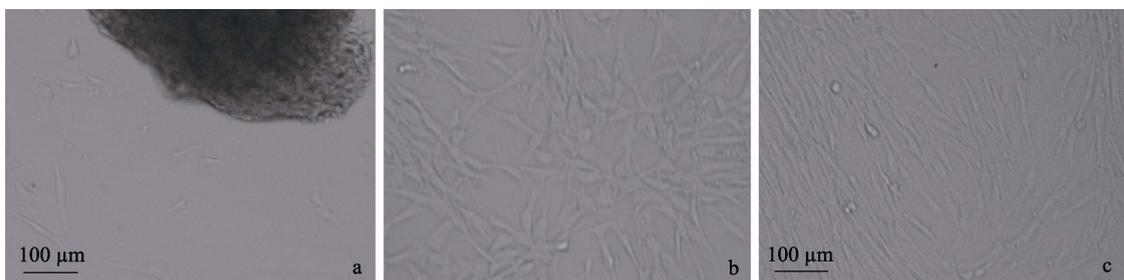


图 2 马驹成纤维细胞体外培养

Fig. 2 Fibroblast culture *in vitro*

a. 马驹成纤维细胞培养第 4 天, 开始有少量细胞脱落组织; b. 成纤维细胞生长 8 d 左右覆盖了细胞培养皿大面积; c. 成纤维细胞生长 10~12 d, 基本铺满培养皿。

a. Indicates that there are a few exfoliated cells in foal fibroblasts at the beginning of the 4th day; b. Indicates that fibroblasts growing to 8 days or so cover a large area of culture plate; c. Indicates that fibroblasts growing to 10 to 12 days basically cover the plate.

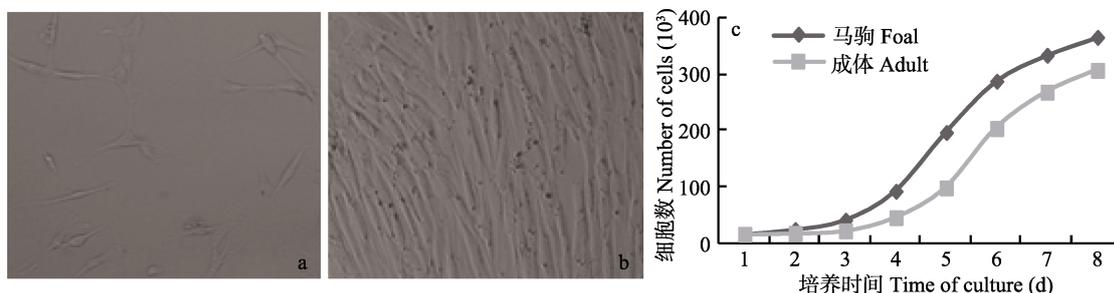


图3 成纤维细胞的生长曲线

Fig. 3 The growth curve of fibroblasts

a. 马成纤维细胞传代培养第1天; b. 传代胚胎第5天; c. 马成纤维细胞生长曲线。

a. The first day of passage culture of horse fibroblasts; b. The fifth day of passage culture of horse fibroblasts; c. The growth curve of horse fibroblasts.

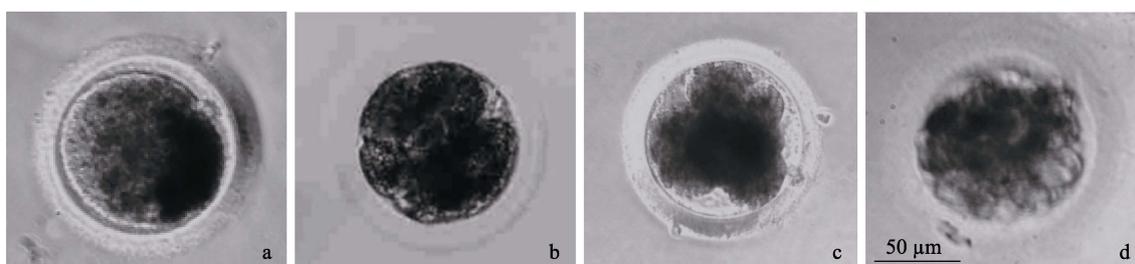


图4 马胚胎的孤雌激活

Fig. 4 Parthenogenetic activation of horse embryos

a. 成熟的卵母细胞; b. 2-细胞期孤雌激活胚胎; c. 8-细胞期; d. 桑椹胚。

a. Mature oocyte; b. Parthenogenetic activated embryo at 2-cell stage; c. 8-cell stage; d. Morula stage embryo.

在马的繁殖季节, 扩展型卵丘-卵母细胞复合体卵母细胞经孤雌激活处理后, 扩展型与紧凑型 MII 期卵母细胞发育到 2-细胞期、4-细胞期、8-细胞期以及获得的桑椹胚的比例差异均不显著 ($P > 0.05$, 表 1)。在马的非繁殖季节, 扩展型与紧凑型 MII 期卵母细胞发育到 2-细胞、4-细胞和 8-细胞的比例亦差异不显著 ($P > 0.05$), 在此季节, 并未获得桑椹胚 (表 1)。在繁殖季节, 马胚胎发育到 2-细胞、4-细胞、8-细胞和桑椹胚的比例显著高于非繁殖季节 ($P < 0.05$)。

2.3 体细胞核移植

在繁殖季节, 通过体细胞核移植共构建了 71 枚胚胎 (图 5a), 融合成功 52 枚胚胎

(73.2%), 激活后有 29 枚 (40.8%) 发生卵裂 (图 5b), 最后有 8 枚发育到桑椹胚 (图 5c)。

本研究核供体细胞分别来源于马驹和成年马的成纤维细胞 (表 2)。核供体细胞来源于马驹成纤维细胞的克隆胚胎, 77.4% (41/53) 发生细胞融合, 15.1% (8/53) 发育到桑椹胚, 将桑椹胚移植到发情同步的母马子宫中, 共进行了 3 次胚胎移植, 第一次移植 2 枚胚胎, 第二次移植 4 枚胚胎, 第三次移植 2 枚胚胎, 均未获得孕马。核供体细胞来源于成年马成纤维细胞的克隆胚胎, 61.1% (11/18) 发生细胞融合, 仅 22.2% (4/18) 发育到 4-8 细胞期, 没有获得桑椹胚。

表 1 孤雌激活胚胎体外发育情况

Table 1 Development of parthenogenetic activated embryos *in vitro*

		繁殖季节 Breeding season		非繁殖季节 Non-breeding season	
		扩展型 Expanded type	紧凑型 Compact type	扩展型 Expanded type	紧凑型 Compact type
M II (枚) M II quantity		36	48	43	77
2-细胞 2-cell	数量 Quantity (cell)	19	23	16	27
	比例 Proportion (%)	52.8 ^a	47.9 ^a	37.2 ^b	35.1 ^b
4-细胞 4-cell	数量 Quantity (cell)	14	16	7	9
	比例 Proportion (%)	38.9 ^a	33.3 ^a	16.3 ^b	11.7 ^b
8-细胞 8-cell	数量 Quantity (cell)	6	5	2	2
	比例 Proportion (%)	16.7 ^a	10.4 ^a	4.7 ^b	2.6 ^b
桑椹胚 Morula	数量 Quantity (cell)	2	3	0	0
	比例 Proportion (%)	5.6 ^a	6.2 ^a	-	-

具有相同字母, 表示差异不显著 ($P > 0.05$), 反之差异显著 ($P < 0.05$)。

There was no significant difference among groups with the same letters ($P > 0.05$), whereas different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

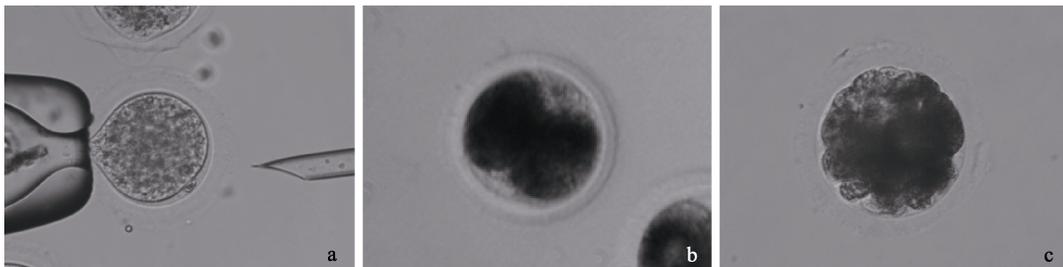


图 5 体细胞核移植

Fig. 5 Somatic cell nuclear transfer

a. 核移植, $\times 100$; b. 2-细胞胚胎, $\times 100$; c. 桑椹胚, $\times 100$ 。

a. Nuclear transfer, $\times 100$; b. 2-cell embryo, $\times 100$; c. Morula stage embryo, $\times 100$ 。

表 2 不同体细胞核移植胚胎数量

Table 2 Numbers of SCNT embryos derived from different donor cells

		核供体 Nuclear donor	
		马驹 Foal	成年马 Adult horse
核移植数量 Number of nuclear transplants		53	18
融合 Fusion	数量 Quantity (cell)	41	11
	比例 Proportion (%)	77.4	61.1
2-细胞 2-cell	数量 Quantity (cell)	22	7
	比例 Proportion (%)	41.5	38.9
4-8 细胞 4-8 cell	数量 Quantity (cell)	18	4
	比例 Proportion (%)	33.9	22.2
桑椹胚 Morula	数量 Quantity (cell)	8	0
	比例 Proportion (%)	15.1	0
胚胎移植数量 (枚) Number of embryo transfer		8	0
受孕马 (匹) Recipient horse		0	0

3 讨论

3.1 季节对马胚胎重构效率的影响

马是季节性多次发情动物, 在青岛地区每年的 4~10 月份是其繁殖季节。在繁殖季节, 受光照、温度等变化影响, 卵泡开始生长发育, 非繁殖季节卵泡处于静止期。与其他家养物种相比, 马的卵巢结构具有特殊性, 皮质在内部, 髓质在外周 (Hawley et al. 1995), 卵母细胞紧密附着在卵泡壁上, 收集卵母细胞存在较大难度, 且马卵母细胞的成熟率不高, 导致克隆效率较低 (Gambini et al. 2014b)。

本研究探讨了马在繁殖和非繁殖季节成熟卵母细胞孤雌激活后胚胎的发育能力。胚胎的

发育能力受卵母细胞质量的影响,在繁殖季节,我们收集的卵母细胞处于发情周期的不同阶段,较非发情季节的卵母细胞质量高。在繁殖季节,扩展型成熟卵母细胞孤雌激活达到2-细胞期的比例为52.8%,显著高于非繁殖季节的37.2%;紧凑型成熟卵母细胞在繁殖季节获得胚胎的比例也显著高于非繁殖季节。本研究结合季节性差异,探讨孤雌激活的成功率,选择在繁殖季节进行体细胞核移植实验,成功获得8枚克隆胚胎。

3.2 不同核供体细胞对马克隆效率的影响

核移植效率取决于重构胚胎重新编程的能力,对克隆胚胎的生长发育和后代的健康起到至关重要的作用(Niemann 2016)。选择不同的体细胞作为核移植的供体细胞,克隆效率差异显著。皮肤成纤维细胞是最常见的核供体细胞,但也有研究选择肝(Waghmare et al. 2011)、肾(Richter et al. 2012)、颗粒细胞(Lagutina et al. 2005)等作为核供体细胞,发育桑椹胚/早期囊胚的比率较低。间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)作为核供体细胞在猪(Nazari et al. 2016)、牛(Silva et al. 2016)和山羊(*Capra hircus*) (Kwong et al. 2014)等物种应用,被证明可以获得更高的囊胚率。

本研究建立两个不同年龄段马成纤维细胞系,一是刚出生汉诺威马驹的,另一个是成年汗血公马(16岁)的。核移植选取细胞生长更好的刚出生汉诺威马驹的成纤维细胞作为核供体,与选择马间充质干细胞作为核供体细胞的囊胚率(18.7%) (Bols et al. 1995)相比,胚胎发育率仍较低。下一步,我们将建立汉诺威马间充质干细胞系,作为核供体,探讨重构胚胎的融合率、发育情况等。

3.3 体外构建胚胎的凋亡

马克隆的整体效率仍然很低,主要是因为核移植后获得重构胚胎比率较低,通常在1%~15% (Lagutina et al. 2005),未继续发育的胚胎发生凋亡,在胚胎发育的不同时间发生不同状

态的凋亡或退化,如2-细胞期卵母细胞胞质卵裂不均或4-细胞期发生阻滞等。受卵母细胞质量影响,胚胎发育呈现“两极分化”状态。本研究获得成熟卵母细胞中,23枚质量好的全部顺利发生卵裂,31枚质量差的则全部发生凋亡或退化。如表1所示,本研究对204枚成熟卵母细胞进行孤雌激活实验,未发育到2-细胞期的比例达到58.3% (119/204),在4-细胞期到8-细胞期胚胎凋亡比例最高,达到67.4% (31/46),仅获得5枚(2.5%)孤雌发育的桑椹胚。如表2所示,71枚成熟卵母细胞进行体细胞核移植实验,未融合的胚胎达到26.8% (19/71),发育到2-细胞期,有50% (26/52)的胚胎凋亡,仅获得8枚(11.3%)重构胚胎。

在非繁殖季节,本研究并未获得孤雌激活的胚胎,因此本研究选取马卵泡颗粒细胞作为滋养层细胞,与重构胚胎进行共培养后,提高了胚胎的发育能力,获得桑椹胚的比例达到2.8%。下一步,我们将在马的繁殖季节优化共培养体系,选择不同类型的滋养层细胞与克隆胚胎进行共培养,提高胚胎质量和囊胚率。另外,马体外重构胚胎退化的机制研究比较少,我们将在下一步实验中,探讨胚胎退化的分子机制,以便更好地获得体外重构胚胎。

参 考 文 献

- Allen W R, Pashen R L. 1984. Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 71(2): 607-613.
- Bols P E J, Vandenheede J M M, van Soom A, et al. 1995. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, 43(3): 677-687.
- Choi Y H, Hartman D L, Fissore R, et al. 2009. Effect of sperm extract injection volume, injection of PLCzeta cRNA, and tissue cell line on efficiency of equine nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 11(2): 301-308.
- Choi Y H, Norris J D, Velez I C, et al. 2013. A viable foal obtained by equine somatic cell nuclear transfer using oocytes recovered from immature follicles of live mares. *Theriogenology*, 79(5):

- 791–796.
- Choi Y H, Ritthaler J, Hinrichs K. 2014. Production of a mitochondrial-DNA identical cloned foal using oocytes recovered from immature follicles of selected mares. *Theriogenology*, 82(3): 411–417.
- Choi Y H, Velez I C, Hinrichs K. 2015. Timing factors affecting blastocyst development in equine somatic cell nuclear transfer. *Cell Reprogram*, 17(2): 124–130.
- Christine A, Jana S. 2014. Sex determination in horses—Current status and future perspectives. *Animal Reproduction Science*, 146(1/2): 34–41.
- Fulka J, Jr Okolski A. 1981. Culture of horse oocytes *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61(1): 213–215.
- Galli C, Lagutina I, Crotti G, et al. 2003. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 424 (6949): 635.
- Gambini A, Jarazo J, Olivera R, et al. 2012. Equine cloning: *in vitro* and *in vivo* development of aggregated embryos. *Biology of Reproduction*, 87(7): 1–9.
- Gambini A, Stefano A, Bevaqua R J, et al. 2014a. The aggregation of four reconstructed zygotes is the limit to improve the developmental competence of cloned equine embryos. *PLoS One*, 9(11): e110998.
- Gambini A, Jarazo J, Karlanian F, et al. 2014b. Effect of collection–maturation interval time and pregnancy status of donor mares on oocyte developmental competence in horse cloning. *Journal of Animal Science*, 92(2): 561–567.
- Gambini A, Kelly J M, McKinnon A O, et al. 2016. Rescuing equine cloned embryos by aggregation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41(7): 62–63.
- Hinrichs K. 2005. Update on equine ICSI and cloning. *Theriogenology*, 64(3): 535–541.
- Hinrichs K. 2006. A review of cloning in the horse. "52nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners Proceedings", 52: 398–401.
- Hinrichs K, Choi Y H, Varner D D, et al. 2007. Production of cloned horse foals using roscovitine-treated donor cells and activation with sperm extract and/or ionomycin. *Reproduction*, 131(6): 1063–1072.
- Hawley L R, Enders A C, Hinrichs K. 1995. Comparison of equine and bovine oocyte–cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction*, 52(monograph_series1): 243–252.
- Kwong P J, Nam H Y, Khadijah W E, et al. 2014. Comparison of *in vitro* developmental competence of cloned caprine embryos using donor karyoplasts from adult bone marrow mesenchymal stem cells vs ear fibroblast cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(2): 249–253.
- Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, et al. 2005. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction*, 130(4): 559–567.
- Lee W, Song K, Lee I, et al. 2015. Cloned foal derived from *in vivo* matured horse oocytes aspirated by the short disposable needle system. *Journal of Veterinary Science*, 16(4): 509–516.
- Miragaya M, Revora M, Rigali F, et al. 2011. First equine clone born in Argentina by somatic cell nuclear transfer from a polo Argentino mare. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1): 131.
- Morris L H A. 2018. The development of *in vitro* embryo production in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 50(6): 712–720.
- Niemann H. 2016. Epigenetic reprogramming in mammalian species after SCNT-based cloning. *Theriogenology*, 86(1): 80–90.
- Nazari H, Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, et al. 2016. The effect of amniotic membrane stem cells as donor nucleus on gene expression in reconstructed bovine oocytes. *The International Journal of Developmental Biology*, 60(4/6): 95–102.
- Olivera R, Moro LN, Jordan R, et al. 2016. *In vitro* and *in vivo* development of horse cloned embryos generated with iPSCs, mesenchymal stromal cells and fetal or adult fibroblasts as nuclear donors. *PLoS One*, 11(10): e0164049 11.
- Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407(6800): 86–90.
- Richter A, Kurome M, Kessler B, et al. 2012. Potential of primary kidney cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in pig. *BMC Biotechnology*, 12: 84.
- Silva C G, Martins C F, Cardoso T C, et al. 2016. Production of bovine embryos and calves cloned by nuclear transfer using mesenchymal stem cells from amniotic fluid and adipose tissue. *Cellular Reprogramming*, 18(2): 127–136.
- Wilmut I, Schnieke A E, Mewhir J, et al. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619): 810–813.
- Woods G L, White K L, Vanderwall D K, et al. 2003. A mule cloned

from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, 301(5636): 1063.
Waghmare S K, Estrada J, Reyes L, et al. 2011. Gene targeting and

cloning in pigs using fetal liver derived cells. *Journal of Surgical Research*, 171(2): 223–229.