

哺乳动物配子发生过程中核的印迹作用*

杨增明

(中国科学院动物所生殖生物学开放实验室,北京 100080)

谭景和 秦鹏春

(东北农学院生物工程系)

Q959.803

很多无脊椎动物、部分鱼类和鸟类都可进行单性生殖。关于哺乳动物的单性生殖,长期以来人们进行了大量的研究。Pincus 和 Shapiro^[1]报道用冷刺激法处理兔卵母细胞后,有的卵进一步发育成胚胎,超过植入期,并且获得了几例活的单性生殖个体。以后, Hoppe 及 Illmensee^[2]报道,他们也得到了纯合子的小鼠。但是,这些实验至今一直未能被别人所重复,故其真实性的有待进一步研究。除此之外,哺乳类中至今仍未见有单性生殖的个体,其原因何在? 本文将讨论与此相关的核的印迹作用(imprinting)。核的印迹作用是指雌雄配子发生过程中原核发生了某些差异性变化,使得二者在以后的胚胎发育过程中功能上有所差异。下面分别对这一问题作一讨论。

(一) 正常胚胎发育需要雌雄原核的互补性作用 在以前的哺乳动物单性生殖实验中, LT/SV 品系小鼠的卵在输卵管内可自发地激活并进行单性发育。这些发育的卵中,有些甚至可超过植入期,达到卵柱期,但最终还是停止发育而死亡^[3]。Tarkowski 等用电刺激小鼠的输卵管诱导卵子在体内单性发育,有的卵着床后可继续发育,但至多只能达到 8 个体节期^[4]。从一些杂交一代(F₁)小鼠来的卵母细胞在体外被激活后,可在体外培养到胚泡期,当移植到适宜的假孕母鼠体内后,双倍体胚胎可发育到相当于正常妊娠的第 10—11 天。在相同条件下,推定为单倍体的单性发育胚可发育到更高级的卵柱期;但仅少数能发育到原条期以后^[5]。Surani 及 Barton^[6]用细胞松弛素 B 抑制卵子排出第二极体,使受精卵具有两个雌原核及一个雄原核而成为三倍体卵。当移植入受体后,

这些卵显示出三倍体卵典型的不正常:神经管不能闭合或头区膨大,胚胎不能适当地转动等。当从此三原核受精卵中去掉一个雌原核使其恢复到正常的遗传组型时,几乎 40% 可发育到分娩期。然而,若去掉雄原核使其成为具两个雌性原核的孤雌生殖卵,则其发育很类似于双倍体单性生殖的卵,这种卵植入后,仅有几个可发育到具 25 个体节的胚胎,且总是具有稀疏的滋养层细胞^[4]。

上述具两个雌原核的胚胎不能继续发育,是否由于这些单性生殖胚为纯合子,从而导致隐性致死基因的表达使胚胎死亡呢? Surani 等^[6]的实验基本上排除了这种可能性。他们将小鼠卵激活后,选取单倍体的单性发育卵,注入第二个雌性或雄性原核。结果证实:只有当注入的第二个原核是雄性时,发育才能进行到分娩期。若注入的为雌原核,则这种卵的发育类似于上述具两个雌原核的胚胎,只能发育到妊娠中期,且总是具极少量的胚外组织。显然,这种胚胎不是单亲纯合子,因为两个雌原核不是来自同一母体。既然具有两个雌原核的胚胎不能正常发育,那么带有父本基因的双雄核胚胎的发育情况又如何呢? 在由除去受精卵的雌原核并抑制第一次卵裂制得的双倍体个体,以及其移植第二个雄原核进入单倍体雄核发育的卵中所产生的异合子双亲本雄核生殖的个体中,仅约 20% 的胚胎发育达到胚泡期,且由于缺乏 X 染色体,YY 型的卵仅卵裂几次就夭折了。虽然剩余 50% XX 及 25% XY 的雄核生殖的胚胎能进一步发育,但仅少数发育超过植入期,至多

* 本文经陈大元先生及潘星光先生审阅,谨此致谢!

产生相当于妊娠 10 天左右的 6—8 个体节的胚胎, 这些胚胎均具极发达的滋养层组织^[40]。雄核生殖的胚胎具有发达的滋养层组织, 这也可在葡萄胎上得到证实。葡萄胎由胚外组织组成, 胎体中多无胎儿, 仅在两例中有胎儿。这些胎儿产生高水平的人绒毛膜促性腺激素, 表现为滋养层功能亢进^[47]。细胞学及染色体检查均证实这种胎儿的基因完全来自精子; 且由于为双倍体, 推断可能是由雌原核退化, 而精子染色体加倍产生的。偶尔, 这种胎儿似乎来自两个不同的精子, 但也未发现雌性基因组^[43]。此外, Whitten^[49] 用雌雄同体小鼠进行的实验更进一步证实了纯合基因型并不是单性生殖胚发育受阻的根本原因。在雌雄同体的小鼠中, 常可见到卵精巢; 有时可见到卵巢在一侧, 而睾丸在另一侧。当存在一卵巢及一睾丸时, 将其卵巢移植到一个已切除卵巢的正常雌鼠中, 待携带移植卵巢的雌鼠长成后, 使之与现仅具一睾丸的雌雄同体个体交配, 结果获得了成功, 并产出了后代。从遗传学的角度讲, 这种雌雄同体个体产生了它本身, 应为纯合型的。

由上述的实验可以看出, 即使是纯合基因型, 只要有雌雄原核共同参与, 胚胎也有可能正常地发育。这说明一个胚胎的发育需要雌雄原核的互补性作用, 即雌雄原核在受精卵中作为一信息单位, 只有互相协同作用, 才能保证胚胎发育的顺利进行。这可能表明雌雄原核在各自的发生过程中, 都发生了相应的变化, 即印迹作用, 使得两者在以后的胚胎发育过程中行使不同的功能。由上述的例子可以看出, 雄性原核对胚外组织的正常发育是必需的, 而雌性原核对胚胎发育则起着重要作用^[4]。

(二) 各级水平的印迹作用 由于核的印迹作用在哺乳动物中为一普遍的现象, 在染色体及基因组水平上都有表现。

1. 染色体水平 在有袋类雌性个体中, X 染色体的失活并不是随机的, 失活者多是来自雄性并是专一性的。即使在小鼠的胚外膜中, 雌雄个体的 X 染色体也总是来自雄性的 X 染色体选择性的失活。对小鼠 2 号染色体远区的研

究证实, 此染色体母本正常而父本缺陷的小鼠体长且扁平, 表现为机能低下; 而此区父本正常但母本缺陷时小鼠则又短又方, 表现为机能亢进^[2]。对 17 号染色体的研究同样也证实, 当染色体近区的一缺失突变来自父本时, 杂合子可正常地发育; 但此突变基因来自母本时, 则在妊娠中期发育便受阻停止^[6, 4]。这些结果都说明染色体的亲本来源对胚胎发育有明显的影响。这种染色体的功能差异可能是核印迹作用的根本原因。现在小鼠的第 2、6、7、8 及 17 号染色体上均发现有这种印迹作用^[46]。

2. 基因组水平 近来的研究表明, 在基因组也有这种印迹作用。在全部 DNA 都为低度甲基化的原始生殖细胞发生甲基化的过程中, 父本 DNA 发生相对高频的甲基化, 母本 DNA 则并不发生这一甲基化过程^[46]。

为了检查 DNA 序列的甲基化形式, Sapienza 等^[22]用 DNA 显微注射法将外源基因整合在小鼠基因组的位点, 由于整合位点两侧的基因组合对转基因的甲基化形式产生影响, 检测转基因动物后代中转基因的甲基化形式便可间接知道基因组的甲基化形式。他们发现当转基因来自父本时, 其中一个位点的甲基化程度较低, 而当转基因来自母本时, 另一位点的甲基化程度则较低。Reik 等^[44]用同样的转基因方法, 也发现当所转基因来自父本时, 有一位点的 DNA 甲基化程度低于来自母本时的情况。这表明配子的来源(即亲本来源)对转基因的甲基化程度有明显影响, 这也可能说明雌雄配子在一些位点上的 DNA 甲基化程度具有明显差异。

(三) 核印迹作用的可能机制 目前, 关于核的印迹作用了解得很少, 其分子机制仍不清楚。但 Sapienza 等^[22]根据现有的证据, 认为至少需满足下列四项标准才有可能解释印迹作用的机制: (1) 在形态上, 印迹作用必须与原核有关; (2) 印迹作用需持续通过 DNA 复制期及细胞分裂期; (3) 印迹作用必须有影响基因表达; (4) 后代由一种性别到另一性别时, 印迹作用的特性必须改变。已经证明 DNA 的甲基化形式

是稳定、可遗传的,对基因表达及染色体的构型等都有调节作用^[9]。Sapienza 等^[12]也证明转基因的甲基化形式可随配子的来源不同而有所改变,这表明 DNA 的甲基化状态基本上可满足上述四项标准,很可能为核印迹作用的一种机制。另外,由于核的印迹作用在发育过程中是可重复及变化的,最终还可消失,而 DNA 中胞嘧啶残基的甲基化也具这些特点,这提示这种印迹作用很可能是以胞嘧啶残基甲基化的形式来具体体现的。

由于对核的印迹作用还缺乏了解,有关这方面的研究仍需进一步进行。一旦对基因组分化的分子和结构基础有了深入的了解,我们就有可能使已发生印迹作用的核恢复到未分化状态,从而使其在卵中行使功能产生新的个体,这样便可方便地进行遗传育种及生产纯系动物。此外,对核或基因组印迹作用的研究,将更加有助于了解胚胎发育过程中的核质关系及其它一些发育遗传学问题。

最后,还应指出,虽然现在将单性生殖的胚胎不能发育到分娩期,大都归于核的印迹作用,认为是在雌雄配子发生过程中核的分化所致。但上述 Pincus 等^[10]及 Hoppe 等^[4]已报道他们得到了哺乳动物单性生殖的后代。1981 年 Illmensee 等^[5]报道他们又用新法得到了小鼠单性生殖的后代。因此,尽管基因组的印迹作用现在基本上已确定无疑,但这些孤雌生殖个体的出生(假如他们的实验是真实的),又是印迹作用所不能解释的。这提示这些个体有可能是由于细胞质中的一些因子掩盖或逆转了印迹作用,或者由于一些未知机制的作用而出生的,但这仍需进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Barton S. C. et al. 1984. Roles of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* 311: 374—376.
- [2] Cattanach B. M. and M. Kirk 1985 Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* 315: 496—498.
- [3] Check W., 1978 Chromosomes provide new view of hydatiform moles. *JAMA* 239—399.
- [4] Hoppe P. C. and K. Illmensee, 1977 Microsurgically produced homozygous diploid uniparental mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5656—5661.
- [5] Illmensee K. and P. C. Hoppe, 1981 Nuclear transplantation in *Mus musculus*: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 230: 9—18.
- [6] Johnson D. R. 1974 Hairpin-tail: A case of post-reductional gene action in the mouse egg. *Genetics* 76: 795—805.
- [7] Kaufman M. H. 1983 Early mammalian development: Parthenogenetic studies. Cambridge University Press, Cambridge 1—4.
- [8] McGrath J. and D. Solter 1984 Maternal Thp lethality in the mouse is a nuclear, not cytoplasmic defect. *Nature* 308. 550—551.
- [9] Monk M. 1987 Genomic imprinting: Memories of mother and father. *Nature* 328: 203—204.
- [10] Pincus G. and H. Shapiro, 1940 The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. VII. Further studies on the activation of rabbit eggs. *Proc. Am. Phil. Soc.* 83: 631—647.
- [11] Reik W. et al. 1987 Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. *Nature* 328: 248—251.
- [12] Sapienza C. et al. 1987. Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete origin. *Nature* 328: 251—254.
- [13] Stevens L. C. 1975 Teratocarcinogenesis and spontaneous parthenogenesis in mice. *Symp. Soc. Devel. Biol.* 33: 93—106.
- [14] Surani M. A. H. and S. C. Barton, 1983 Development of gynogenetic eggs in the mouse: Implications for parthenogenetic embryos. *Science* 222: 1034—1036.
- [15] Surani M. A. H. et al. 1984 Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308: 548—550.
- [16] Surani M. A. H. et al. 1987 Experimental reconstruction of mouse eggs and embryos: An analysis of mammalian development. *Biol. Reprod.* 36: 1—16.
- [17] Szulman A. E. and V. Surti, 1984 Complete and partial hydatiform moles: Cytogenetic and morphological aspects. In: Human trophoblast and placenta (Patillo R. A. and R. O. Husa, eds.) N. Y. Plenum Press 135—146.
- [18] Tarkowski A. K. et al, 1970 Experimental parthenogenesis in the Mouse. *Nature* 226: 162—165.
- [19] Whitten W. K. 1975 Chromosomal basis for hermaphroditism in mice. In: The developmental biology of reproduction (Markert C. L. and J. Papacostas, eds.), Academic press, New York 189—205.