

哺乳动物克隆的现状和研究进展

盛鹏程^{1,2}, 苗向阳¹, 朱瑞良²

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193
2. 山东农业大学动物科技学院, 山东泰安 271018

摘要 哺乳动物细胞克隆是 20 世纪末生命科学领域最引人注目的高新技术, 该技术对于优良种畜的复制、减少试验用动物数目、动物遗传多样性保存及濒危动物挽救、转基因动物培育等方面具有重要意义。近年来克隆技术发展迅速, 多种哺乳动物相继克隆成功, 但也存在克隆效率太低、克隆动物表型正常而实质异常的问题。本文详细阐述了克隆效率太低、克隆动物表型正常而实质异常问题, 介绍了当前动物克隆技术的发展现状, 并对动物克隆涉及的技术进行了总结和概括, 着重介绍了卵母细胞的去核方法和重组胚的构建方法。

关键词 哺乳动物; 核移植; 体细胞克隆

中图分类号 S814.8

文献标识码 A

文章编号 1000-7875(2010)13-0105-06

Status and Research Progress in the Mammalian Cloning

SHENG Pengcheng^{1,2}, MIAO Xiangyang¹, ZHU Ruiliang²

1. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China
2. Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China

Abstract Mammalian cell cloning is the most compelling high-technology in life sciences in the late 20th century. It is important because of its roles played in the reproduction of good breeding stock, reduction of the number of experimental animals, reserving of animal genetic diversity, saving of endangered animals, transgenic animal breeding and other aspects. A variety of cloning animals have been made successful, but with a low efficiency and frequent abnormality in birth weight and physiological conditions, which are discussed in detail in this paper, together with the current developments of animal cloning, and the technologies involved in cloning animals. The methods to remove the nuclei from oocytes and to reconstruct embryos are highlighted. The application prospects are also commented.

Keywords mammals; nuclear transfer; somatic cell clone

哺乳动物克隆是近十几年来生命科学领域最引人注意的高新技术。1996—1997 年英国科学家开创性的连续用胚胎成纤维细胞、成年动物乳腺上皮细胞获得了克隆绵羊。Dolly 羊的出生为体细胞克隆时代的来临拉开了序幕。近年来, 动物体细胞克隆得到了长足的发展, 牛、山羊和猪等动物相继克隆成功, 而且克隆技术也不断完善, 克隆方法不断优化。但该技术还有很多需要解决的问题, 克隆效率极低, 表现为孕期流产率高, 以及出生后生长异常等, 在理论和技术上也还很很成熟, 如基因组重新编程的机制尚不清楚, 选择合适的

施主细胞和实现核质同步协调性的问题尚没有完全解决, 异种克隆动物有很大的困难等。鉴于体细胞克隆技术对抢救珍稀濒危动物、复制优良家畜个体、扩大良种动物群体、提高畜群遗传素质和生产性能、提供足量试验动物、推进转基因动物研究、攻克遗传性疾病、研制高水平新药、生产可供人移植的内脏器官等方面中具有重要的研究意义及现实应用意义。本文对动物克隆技术中涉及的应用方法, 动物克隆技术中亟待解决的问题, 哺乳动物核移植技术的应用前景等关键问题进行了系统的介绍, 旨在阐明国内外哺乳动物体细胞克隆的

收稿日期: 2010-03-26

基金项目: 国家高科技研究发展计划(863 计划)项目(2008AA10Z140); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08008-004B, 2008ZX08008-003); 国家自然科学基金项目(30571339); 中国农业科学院创新基金项目(2004-院-1)

作者简介: 盛鹏程, 硕士研究生, 研究方向为微生物与免疫及转基因动物, 电子信箱: spc198696@sina.com; 苗向阳(通信作者), 研究员, 研究方向为基因工程与功能基因组学及转基因动物, 电子信箱: myx32@sohu.com

研究现状及其发展前景,为进一步研究动物体细胞克隆提供参考。

1 动物克隆技术

1.1 动物克隆技术的研究方法

目前动物克隆技术的核心是核移植。核移植是指将胚胎细胞或体细胞的细胞核用显微外科手术的方法移入去核的卵母细胞中,构建成重组,通过体内或体外培养、胚胎移植,产生与供体细胞基因型相同的后代的技术过程,又称为动物克隆技术。根据核供体的来源不同,可将其分为胚胎细胞克隆技术及体细胞克隆技术,主要包括胚胎细胞核移植、胚胎干细胞核移植、胎儿成纤维细胞核移植、体细胞核移植。胞质内全细胞直接注射法主要有两种方式:Piezo 驱动装置辅助的直接注核^[1]和普通显微操作系统辅助的直接注核^[2]。胎儿成纤维细胞由于能在克隆前进行基因修饰,故目前大多数家畜的克隆都以它为供核细胞^[3]。一些研究人员尝试利用未进行破膜处理的供体细胞进行全细胞直接注射核移植,避开了核的分离和电融合过程,该方法也成功获得克隆后代^[4]。

1.2 核移植的基本技术环节

动物细胞核移植是一项复杂的生物技术,主要包括 1 组以显微操作与常规操作相结合的技术:卵母细胞去核、供核细胞的获得和处理、供核细胞移入受体细胞、细胞融合和激活、重组胚的体内外培养及发育胚移入雌性受体的过程。

1.2.1 受体卵母细胞

在细胞核移植的研究中,作为核受体的主要有去核受精卵和去核成熟卵母细胞 2 种。Willadsen^[5]首创用去核成熟卵母细胞(M 期)作受体细胞后,得到了胚胎克隆绵羊。以后的研究者大部分用去核成熟卵母细胞作受体,相继得到了克隆动物。结果证明,处于 M 期的卵母细胞有利于供体核在重组胚中的再程序化,保证了核移植一定的成功率。去核率越高,其重组胚发育成个体的可能性越大^[6]。卵母细胞的去核方法主要如下。

1) 示核法。传统的 Hoechst 33342 示核法为短波激发荧光,可以显示极体与卵母细胞中期板的相对位置,从而可以作为判断去核是否成功的标志。采用这种方法,需要使用紫外光照射,紫外线对卵母细胞可能会造成不同程度的伤害,从而影响克隆胚胎的后续发育。

2) 盲吸法。采用盲吸法去核,去核效率达 90%以上。不需要荧光,也避免了 Hoechst 33342 可能对卵母细胞的不利影响。由于处于 M 期的卵母细胞核不易辨认,在操作过程中一般采用盲吸法。

3) 化学法。上述两种方法虽然常用,但每次只能处理一个卵母细胞,而且操作的技能要求高,去除的胞质体积大,对卵母细胞常常造成机械性的伤害。在卵母细胞成熟期间可以把一些化学试剂添加到成熟液中,造成卵母细胞分裂,分离的动力系统发生改变,使得中期板和极体一同排出,从而达到去核的目的。用于化学去核的物质和方案主要有

Etosipide+CHX,DC+CHX, Democolcine+sucrose 等组合。这种方法可以成批处理卵母细胞。

4) 离心法。由于卵母细胞核与细胞质、极体之间的质量不同,可以利用梯度离心法处理,细胞核和极体一同排出。但还没有获得克隆后代的报道。

5) 功能法。利用物理或化学处理,使卵母细胞的核变性,失去功能,从而达到类似的去核目的。这种非机械法去核得到的克隆囊胚率及胚胎细胞遗传学、核型及微管组成都与常规机械法处理没有太大的区别。目前,该法使用较少。

6) 半卵法。用显微分割刀将卵母细胞一分为二,选择无核物质的一半,同供核体细胞融合重组胚胎。这是绵羊首次胚胎克隆成功应用的方法。缺点是卵胞质去除体积量大,机械伤害大。如果将两个无核物质的半卵同一个体细胞重构卵,则造成浪费。现在此方法使用较少。

7) 末期去核法。在减数分裂第二次成熟分裂的末期,以第二极体为指示,去除与其相邻的部分胞质,去除的胞质少,效率高。

8) 极化显微镜法。可以不用任何染料,普通光路下即可看到清晰的极体以及中期板,但没有关于成活克隆后代的报道。

9) 挤压法。在卵母细胞成熟的一定阶段,如牛的卵母细胞体外培养 16~17h,在多数卵的第一极体即将排出的时候,在极体附近挑破透明带,挤压使极体排出。由于此时极体尚未完全与中期板分开,从而可以带着相邻的核一同排出。这种方法已经在牛、猪上进行了尝试,并且取得了成功。

1.2.2 体细胞的制备

从哺乳动物细胞核移植发展过程看,供体细胞核主要包括胚胎分裂球、体细胞、胚胎细胞。Dolly 羊的成功,使得体细胞作为一个新的供核资源加入到核移植的行列。与胚胎细胞相比,用体细胞作为核供体具有明显优势,而且其应用价值远远大于胚胎细胞作为供体核。

目前,在体细胞克隆时供核体细胞的准备方案基本上可分为 4 种:① 罗斯林方案(即血清饥饿法),使细胞处于 G₀ 期;② 檀香山方案,即使用新鲜分离或者处于活跃分裂期的细胞;③ 北京方案,即将体细胞在 4℃冷藏一段时间用于克隆;④ ACT 方案,即接触抑制的细胞准备方案。还有一种就是 -70℃或者液氮冻存的细胞直接复苏后用作供体。其中使用最为广泛的是罗斯林方案。

1996 年 Campbell 等^[7]首先采用血清饥饿法控制细胞周期,使细胞停留在 G₀ 期,从而提高了体细胞克隆的成功率。Kubota 等^[8]通过实验表明,血清饥饿培养对核移植胚胎融合率、卵裂率及囊胚率的影响不显著,但对重组胚胎的妊娠率有较大影响,也就是说,饥饿法处理有助于重组胚后期的发育。因此,在当前体细胞克隆成活率低的前提下,为期望获得较高的成功率,选用血清饥饿法处理供核细胞仍是明智之举^[9]。Wilmut 等^[10]认为该方法对 Dolly 羊的诞生起到关键性的作用。然而,1998 年 Cibelli^[11]在其研究中发现用正常细胞和饥饿处理的细胞克隆动物的出生率相同。由此可见,核与质的

相容性是一个非常复杂的问题。

有人尝试了一些改变供核体细胞表现遗传状态的方法,例如,将细胞置于 55℃ 或 75℃ 水浴中,由于细胞处于非生理温度,蛋白质高级结构发生变性,用这种方法得到了克隆绵羊后代^[12]。另外有人在牛上使用一些抗癌药物,如 5-Aza(去甲基化试剂),TSA(促进乙酰化试剂)处理牛的体细胞,从而改变了供核的表现遗传学状态,可以使 TSA 处理的供核克隆胚胎体外发育到囊胚的比例提高^[13]。最近,Sullivan 等^[14]建立了一种新的体细胞处理方法,在核移植前对供体细胞进行重塑,即在 Streptolysin-O 中渗透处理 30min 后,再用含 ATP 能量系统的有丝分裂药物细胞提取物(Mitotic extract+ATP)处理 45min,以便染色体凝集以及除去核成分(不是核物质)。然后用 2mmol/L 氯化钙封闭处理 2h,再用作供体移入卵胞质。这种方法获得的克隆牛成活率较高。

1.2.3 重组胚的构建方法

1) 融合法

最初利用灭活的仙台病毒介导膜融合,而后逐渐被毒性较低的聚乙烯乙二醇诱导融合。与化学诱导膜融合同时发展起来的还有电融合技术,其容易操作,稳定而可靠。目前比较流行。

2) 胞质内注射

胞质内注射重组胚胎技术强调在注射前,要将供核体细胞的细胞膜撞破,然后再行注射,胞质内注射法比较好,对卵的伤害较轻。有人对传统方法进行了改进,先将体细胞注入到卵胞质内,在撤针时把细胞核吸出。现在人们用此法得到了牛的体细胞克隆后代^[15]。另外,还有人不用 Piezo 驱动,而使用普通的显微操作设备注射,也得到了山羊的克隆后代^[16]。

3) 去透明带——显微操作仪辅助去核法

克隆研究和生产中,绝大部分都是利用显微操作仪获得成功的。但显微操作设备价格昂贵,对操作者的技能要求高,无法实现操作的批量进行。已经有利用无透明带——显微操作辅助的重组胚方案,并且在牛上取得了极大的成功^[17]。

4) 去透明带手工克隆方案

该技术完全做到手工操作,不仅省去了繁杂的显微操作步骤,大大降低了生产成本,而且由于去除了透明带,更便于卵母细胞与供体细胞的融合,从而可进一步提高核移植的成功率。在猪上利用无透明带法也取得了囊胚,但效率不高^[18]。随着实验方法的改进,采用 WOW 培养法进行无透明带胚胎的培养,即将单个无透明带胚胎放于自制的小凹内,不仅可为胚胎提供一个相对稳定的微环境,而且多个小凹处在同一个大微滴中,可发挥群卵培养的优势,便于胚胎细胞间的信息交流、营养物质的供应和有毒代谢产物的扩散。另外,所做的“U”形小凹还可以使致密化前的卵裂球间的细胞连接更加紧密。由于以上优点,该法被广泛应用于无透明带手工核移植中,获得了较高的囊胚率。

5) 连续核移植

应用于克隆的连续核移植方案主要有两种,其一是先构

建初级克隆胚胎,再用此胚胎作供核,移植到原核期去核遗传物质的受精卵内,构建二级重组胚。第二种方案是先构建克隆胚胎,于体内外培养发育到囊胚期以前的各个阶段,分离卵裂球作供核,再移植给去除核遗传物质的卵母细胞,重组胚胎的方法。连续核移植使供体核多次暴露在卵胞质环境中,有利于核的重编程,从而提高重构胚的发育率。但有些动物不能进行连续核移植,如水牛。

6) 四倍体胎盘补偿法

将胚胎干细胞与四倍体胚胎嵌合,使二者的发育潜能互相补偿,就可能得到完全由胚胎干细胞发育而成的个体,其胚外组织则由四倍体胚胎生成,这种技术被称为四倍体胚胎补偿技术(Tetraploid Embryo Complementation)。胚胎干细胞与二倍体胚胎的嵌合体中,胚胎干细胞能参与胚体所有组织的生成;而在四倍体胚胎与二倍体胚胎的嵌合体中,四倍体胚胎只参与胚外组织的生成。四倍体细胞与二倍体细胞在嵌合体组织中的严重偏离分布现象已被生物学家应用于许多实验,以挽救胚外组织的发育缺陷、划分遗传不相似组织、快速获得基因突变小鼠以及分析突变基因的表型。其优点是耐受免疫排斥。

1.2.4 融合和激活

目前采用的融合-激活方案有 3 种:①融合前激活,即在卵母细胞与供核体细胞融合前激活卵母细胞,首例体细胞克隆山羊就是通过这种方案取得成功。②融合时激活,即在将供受体融合的同时激活卵。③融合后激活,即在供受体融合后数小时再激活,可延长核在受体胞质内的时间,使重编程更彻底。多数研究都是采用后两种方法得到克隆后代,尤其认为融合后激活法,可以使供核与卵胞质充分的相互作用,有利于供核的重新程序化。为保证重组胚的正常染色体倍数,供体细胞和受体可通过 2 种办法来协调,如用 MII 期去核卵(激活前融合),则供体细胞必须处于 2 倍体的 G1 期,如不能保证供体细胞处于 G1 期,则受体卵去核并应在融合前激活。

哺乳动物融合一般采用 2 次连续的直流电脉冲进行融合,然后再进一步用化学药物激活。在鼠、家兔的融合中发现,脉冲强度为 2.0~3.6kV/cm,融合时间 60~200 μ s 是适宜范围。链球菌溶血素处理的猪胎儿成纤维细胞似乎可以改善融合率,促进体外重构胚的形成^[19]。Wakayama 等^[20]用化学融合和激活在鼠克隆上亦取得了良好结果。主要采用琼脂包埋后移入输卵管内培养 4~7d,发育至桑椹胚和囊胚。目前的研究显示,在单峰骆驼中,无论来源于成年成纤维细胞还是颗粒细胞的核转移胚胎都能够在体外形成,这些胚胎转移到受体后,可以导致受体怀孕^[21]。

1.3 去核卵母细胞质对供体细胞核移植效果的影响

虽然理论上核移植完全的受体胞质核移植效果相同,但实际上,体细胞在受体胞质中进行发育程序的重编程受多因素的影响,并不是所有的受体环境都可支持分化细胞进行发育程序重构化。一些受体胞质构建的重组胚发育不超过两细胞阶

段,如用去核受精卵作核移植受体,当供核的胚胎卵裂球超过 2~3 细胞阶段时,其构建的重组胚不能正常分裂。所以在保证一定去核效率的基础上,必须考虑不同受体内部环境对核移植效果的影响。

在牛体细胞核移植中,高水平的卵母细胞促成熟因子(MPF)是重组胚发育程序重编所必需的。卵母细胞有高水平 MPF,有利于供体核在融合之后发生核膜破裂(NEBD)和染色体超前凝集(PCC),而 NEBD 和 PCC 是牛核胚重组所必需的。MII 期卵母细胞含有较高水平的 MPF,有利于牛核移植胚胎的重组。

2 克隆技术中亟待解决的问题

2.1 体细胞克隆成功率低

尽管也有少数体细胞克隆成功率较高的报道,但目前公认的体细胞克隆成功率在 1%~3%。克隆胚胎移植后的出生率平均不到 10%。表观遗传修饰异常应该是体细胞核转移后供体细胞核在细胞质中可逆分化效率低的原因之一^[22]。胎儿异常、流产和围产期死亡率高,出生一周的死亡率最高可达 100%。最近有研究表明,睾丸抽提物(TE)可以使成纤维细胞表达雄性生殖细胞的功能,提高猪的核移植胚胎发育的效率^[23]。

2.2 供体核与受体胞质细胞周期同步的问题

供体核与受体胞质细胞周期同步与否是影响克隆胚胎发育的重要因素之一。目前通用的受体胞质是 MII 期的卵母细胞。使用猪的 MII 期的卵母细胞构建的鼠体细胞核移植胚胎有在体外发育到胚泡阶段的潜力^[24]。最近有实验表明,供体细胞和移植胚胎中组蛋白乙酰化水平可能是对预测兔体细胞核移植效率有用的一种表观遗传标记^[25]。

2.3 线粒体来源问题

无论直接注射还是细胞融合,供体核都带有一部分胞质。于是,就出现了移核胚胎的线粒体来源问题。Evans 等^[26]发现,Dolly 和另外 9 只经细胞融合产生的克隆绵羊的 mtDNA 完全来源于受体胞质。Meirelles 等^[27]证明,瘤牛(*Bos indicus*)克隆后代的线粒体完全来源于黄牛(*Bos taurus*)卵母细胞质。但 Steinborn 等^[28]却发现,克隆牛的线粒体为杂合型,既有来自于供核细胞的,也有来自于受体胞质的。因此,核移植克隆动物实际上是一种遗传嵌合体—nDNA 来源于核供体细胞,而 mtDNA 则至少部分来自受体胞质。

2.4 端粒的问题

端粒是染色体端部特化部分,因无黏性而能防止染色体黏着。端粒由高度重复的短序列核苷酸组成,具有高度保守性。细胞每复制一次端粒核苷酸就减少 50~100bp。端粒复制要靠端粒酶。正常细胞缺乏此酶,故端粒随细胞分裂而变短,细胞衰老。而生殖细胞和癌细胞则都有此酶,因此不衰老。那么,克隆动物是否会遗传供核细胞缩短的端粒而提前衰老呢? Shields 等^[29]发现,Dolly 等 3 只克隆羊的端粒限制性片段平均长度(mean Terminal Restriction Fragment, TRF)都比同龄对照羊短。供核细胞培养时间越长,TRF 越短。然而, Betts 等^[30]

都证明,克隆牛的端粒不缩短。Wakayama 等^[31]证明克隆小鼠的端粒也恢复到原有长度。Xu 等^[32]在牛体外受精、孤雌生殖和克隆各阶段早期胚胎都检测到了端粒酶活性,囊胚活性最高。Betts 等^[33]发现,牛克隆胚胎最初接受了供核细胞在体内、外所获得的基因组修饰,端粒缩短,但在后来的发育过程中又擦除了这些修饰,端粒长度恢复。因此,关于克隆动物端粒酶活性是否恢复的研究结果是趋于肯定的。

2.5 X 染色体灭活问题

雌、雄哺乳动物的基因剂量补偿是通过灭活雌性动物的一条 X 染色体来实现。正常情况下,着床前胚胎的两条 X 染色体都活动。后来,上胚层中 X 染色体随机灭活,而滋养层细胞则专门灭活父系 X 染色体。Eggan 等^[34]发现,小鼠克隆胚胎体的 X 染色体灭活方式是随机的;即体细胞中活动 X 染色体 X_a 与灭活 X 染色体 X_i 之间不同的标志在核移植后被擦除了,重新发生随机灭活。但克隆胚的滋养层则保留了原有体细胞的 X 染色体灭活状态。然而, Xue 等^[35]发现,死亡克隆牛 X-连锁基因在同一器官中有的表达,有的不表达,说明 X 染色体灭活不完全。死亡克隆胎盘 X 染色体随机灭活,但活克隆为父系 X 染色体灭活。

2.6 克隆胚胎某些基因的再程序化异常

已经证明,受精后父系和母系基因组都发生广泛的去甲基化。Dean 等^[36]发现,牛正常胚胎在 8-细胞前,甲基化程度进一步下降,到 16-细胞时又开始再甲基化。克隆 1-细胞胚胎的甲基化程度下降,但以后并不进一步去甲基化,而是提前发生再甲基化。克隆桑椹胚所有卵裂球的核都高度甲基化,类似于供核胎儿成纤维细胞。经过咖啡因或钒酸盐处理的核能够影响核转移的发展和甲基化程度^[37]。还有人证明,牛着床前移核胚胎中有些重复序列的甲基化异常,某些胚胎基因往往不能再激活^[38]。这说明,大多数克隆胚胎的后成性再程序化异常,不彻底的再程序化可能是造成克隆成功率低的原因。

3 哺乳动物核移植技术的应用前景

哺乳动物核移植技术特别是体细胞核移植技术为生物学带来了一场革命,也为人类的科学研究提供了许多新思路,具有非常广阔的应用前景。

3.1 在畜牧方面的作用

利用核移植技术可以大规模地生产具有优良性状、理想性别,相同遗传背景的克隆动物。利用体细胞克隆技术,结合胚胎移植等已经非常成熟的生物技术,可以节约大量生产种牛的时间和费用,同时,完成对高产、优秀奶牛的扩群。越来越多的资料表明,克隆奶牛的牛奶,克隆肉牛的肉质与自然交配生产的后代之间并没有什么不同,完全可以放心食用^[39]。这无疑是动物育种方面最具潜力的方法之一。

3.2 复制濒危动物扩大其种群

Dominko 等^[40]发现除去核的牛的卵母细胞能使来自羊、猴、鼠、猪等不同种属的细胞核激活并在体外发育成相应的胚胎,如在 2001 年, *Nature Biotechnology* 上报了异种体细

胞克隆濒危哺乳动物—欧洲盘羊的成功,为濒危动物的保护提供了重要的借鉴^[41]。中国科学家提出用异种核移植技术克隆大熊猫,把大熊猫体细胞核移至兔的去核卵细胞质中可以发育到囊胚^[42]。

3.3 体细胞克隆技术在医药生产方面的价值

将体细胞克隆技术与生物反应器的生产制作技术结合,可以对体细胞进行转基因或基因组修饰后,制作生产生物反应器,利用动物的乳腺、膀胱等器官,生产治疗人类疾病、保健所需的蛋白。许多全球知名的生物技术企业尤其看重体细胞克隆技术在这些方面的应用价值,纷纷投资科研机构开展研究。实际上第1个体细胞克隆动物——绵羊 Dolly 的诞生就是这种动机的直接产物。

3.4 体细胞核移植结合基因打靶技术、胚胎干细胞技术将提高转基因动物的生产效率

用于做核供体的细胞是确保整合了的某一外源基因的细胞,一旦移植成功,就意味着得到了转基因动物。此外,核移植制备转基因动物还有性别可提前确定、转基因定点整合效率高等优点。由于转基因生物反应器可以降低人类所需药物蛋白的成本,确定转基因动物的无性繁殖技术具有深远的现实意义。Maga 等^[43]将人溶菌酶基因在转基因山羊乳腺中的表达量提高到 270 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。邹贤刚等^[44]利用转基因克隆奶山羊乳腺生物反应器大量生产重组人的抗凝血酶 III(rhAT III)蛋白,其中1头转基因克隆羊后代的奶中 rhAT III 的含量为 3g/L。

3.5 在临床方面的作用

通过深入研究细胞质核的相互作用,控制胚胎细胞的分化方向,有望获得适合向人体移植的具有遗传改变的动物器官,通过细胞核移植技术可以避免不必要的免疫排斥作用。目前,人们已经利用体细胞克隆技术获得了小鼠—小鼠、人一兔、人一—ES 细胞系,并已经在小鼠模式上开展了如帕金森氏症等神经退行性疾病的治疗尝试。

3.6 体细胞克隆对帮助阐明一些生物学基础问题的价值

体细胞克隆技术除了在上述生产实践中具有极大的价值之外,还为许多生物学基础问题的研究提供了一个强大的技术平台。体细胞克隆技术本身涉及到细胞生物学、发育生物学、胚胎生物学、遗传学、分子生物学、生物化学等诸多学科的理论问题。利用这一技术对人们进一步深入认识发育、分化、生长、衰老、肿瘤发生等长期困扰人们的常见的生物学现象提供了可能。如 Li 等^[45]利用小鼠嗅觉神经元得到了克隆小鼠后代,证明了细胞分化过程中基因表达本身是不可逆的。

4 结语

哺乳动物体细胞克隆技术仍处于发展阶段,故在一定程度上存在技术缺陷,需要不断地完善提高才能达到较高的水平。我们相信,随着哺乳动物体细胞克隆技术的发展,不管是品种的繁殖、某些濒危物种的保护,还是在医学领域的应用,其都将成为生物学家今后研究的热点。至于有人利用“克隆

人”可能引发的伦理、道德等问题而对体细胞克隆技术进行无端的阻挠与抨击,那是很片面的认识。因为体细胞克隆技术是一门生物高新技术,它能否朝着良性方向发展关键在于人们能否正确而合理的应用它。也就是说,“克隆人”可能引发的一些伦理、道德等问题与体细胞克隆技术本身无必然的联系,而仅与人们利用该技术的动机有关。所以,不能只凭此消极影响否定其产生的应用价值,而应有一个正确的认识,采取正确的态度与措施。一方面,应加快该技术的完善,使其产生更广泛的应用价值;另一方面,呼吁各国政府立法禁止克隆人实验或制定国际公约禁止克隆人,使哺乳动物体细胞克隆技术在有关的法律范围内朝着理性方向发展,造福于人类。可以预言,体细胞克隆技术将会在新的世纪不断完善并得到更为广泛的应用。

参考文献 (References)

- [1] Campbell K H, Fisher P, Chen W C, *et al.* Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives[J]. *Theriogenology*, 2007, 68: S214–S231.
- [2] Lee B C, Kim M K, Jang G, *et al.* Dogs cloned from adult so-matic cells [J]. *Nature*, 2005, 436(7051): 641.
- [3] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, *et al.* Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. *Science*, 2000, 289(5482): 1188–1190.
- [4] Chen D Y, Jiang M X, Zhao Z J, *et al.* Cloning of Asian yellow goat (*C. hircus*) by somatic cell nuclear transfer: Telophase enu- cleation combined with whole cell intracytoplasmic injection[J]. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(1): 28–34.
- [5] Willadsen S M. Nuclear transplantation in sheep embryos [J]. *Nature*, 1986, 320: 63–65.
- [6] Baquasi A, Behboodi E, Melican DT, *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer[J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(5): 456–461.
- [7] Campbell K H, McWhir J, Ritchie W A, *et al.* Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line[J]. *Nature*, 1996, 380(6569): 64–66.
- [8] Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, *et al.* Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term cultural[J]. *PNAS*, 2000, 97(3): 990–995.
- [9] 陈大元. 克隆技术及其应用[J]. 中国科学院院刊, 2002, 17(3): 173–176. Chen Dayuan. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences*, 2002, 17(3): 173–176.
- [10] Wilmut I, Schnleke A E, McWhir J, *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, 1997, 385: 810–813.
- [11] Zawada W M, Cibelli J B, Choi P K, *et al.* Somatic cell cloned transgenic bovine neurons for transplantation in parkinsonian rats [J]. *Nat Med*, 1998, 4(5): 569–574.
- [12] Loi P, Clinton M, Barboni B, *et al.* Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation [J]. *Biol Reprod*, 2002, 67: 126–132.
- [13] Enright B P, Sung L Y, Chang C C, *et al.* Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine[J]. *Biol Reprod*, 2005, 72: 944–948.
- [14] Sullivan E J, Kasinathan S, Kasinathan P, *et al.* Cloned calves from chromatin remodeled in vitro[J]. *Biol Reprod*, 2004, 70: 146–153.

- [15] Renard J P, Zhou Q, LeBourhis D, *et al.* Nuclear transfer technologies: between successes and doubts[J]. *Theriogenology*, 2002, 57(1): 203–222.
- [16] Guo J T, An Z X, Li Y, *et al.* Cloned goats (*Capra hircus*) from adult ear cels[J]. *Science in China: Serices C*, 2002, 45(3): 260–267.
- [17] Oback B, Wells D. Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen[J]. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4(2): 147–168.
- [18] Kragh P M, Vajta G, Coyrdon T J, *et al.* Production of transgenic porcine blastocysts by hand-made cloning [J]. *Reprod Fertil Dev*, 2004, 16(3): 315–318.
- [19] Narnus K, Quan Y S, Kim B C, *et al.* Streptolysin-o treatment of fetal fibroblasts improves cell fusion and in vitro development of porcine nuclear transfer embryos[J]. *J Reprod Dev*, 2009, 55(3): 236–239.
- [20] Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei [J]. *Nature*, 1998, 394: 369–374.
- [21] Khatir H, Anouassi A. Preliminary assessment of somatic cell nuclear transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*) [J]. *Theriogenology*, 2008, 70(9): 1471–1477.
- [22] Li J, Svarcova O, Villemoes K, *et al.* High in vitro development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin a treatment of reconstructed porcine embryos[J]. *Theriogenology*, 2008, 70(5): 800–808.
- [23] Roh S, Choi H Y, Park S K, *et al.* Porcine nuclear transfer using somatic donor cells altered to express male germ cell function[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2009, 21(7): 882–891.
- [24] Suqawara A, Suqimura S, Hoshino Y, *et al.* Development and spindle formation in rat somatic cell nuclear transfer (SCNT) embryos in vitro using porcine recipient oocytes[J]. *Zyqote*, 2009, 17(3): 195–202.
- [25] Yang F, Hao R, Kessler B, *et al.* Rabbit somatic cell cloning: Effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation[J]. *Reproduction*, 2007, 133(1): 219–230.
- [26] Evans M J, Gurer C, Loike J D, *et al.* Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep [J]. *Nat Genet*, 1999, 23 (1): 90–93.
- [27] Meirelles F V, Bordignon V, Watanabe Y, *et al.* Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos Taurus* oocyte [J]. *Genetics*, 2001, 158: 351–356.
- [28] Steinbom R, Schinog P, Zakhartchenko V, *et al.* Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning [J]. *Nat Genet*, 2000, 25(3): 255–257.
- [29] Shiels P G, Kind A J, Campbell K H, *et al.* Analysis of telomere lengths in cloned sheep[J]. *Nature*, 1999, 399(6734): 316–317.
- [30] Betts D, Bordignon V, Hill J, *et al.* Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle [J]. *PNAS*, 2001, 98: 1077–1082.
- [31] Wakayama T, Shinkai Y, Tamashiro K L, *et al.* Cloning of mice to six generations[J]. *Nature*, 2000, 407(6802): 318–319.
- [32] Xu J, Yang X. Telomerase activity in early bovine embryos derived from parthenogenetic activation and nuclear transfer [J]. *Biol Reprod*, 2001, 64: 770–774.
- [33] Betts D, Bordignon V, Hill J, *et al.* Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle [J]. *PNAS*, 2001, 98: 1077–1082.
- [34] Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, *et al.* X-Chromosome inactivation in cloned mouse embryos [J]. *Science*, 2000, 290(5496): 1578–1581.
- [35] Xue F, Tian X C, Du F, *et al.* Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones[J]. *Nat Genet*, 2002, 31: 216–220.
- [36] Dean W, Santos F, Stojkovic M, *et al.* Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos[J]. *PNAS*, 2001, 98: 13734–13738.
- [37] Kwon D J, Park C K, Yang B K, *et al.* Control of nuclear remodeling and subsequent in vitro development and methylation status of porcine nuclear transfer embryos[J]. *Reproduction*, 2008, 135(5): 649–656.
- [38] Daniels R, Hall V, Trounson A O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei [J]. *Biol Reprod*, 2000, 63: 1034–1040.
- [39] Tian X C, Kubota C, Sakashita K, *et al.* Meat and milk compositions of bovine clones[J]. *PNAS*, 2005, 102: 6261–6266.
- [40] Dominko T, Ramalho-Santos J, Chan A, *et al.* Optimization strategies for production of mammalian embryos by nuclear transfer [J]. *Cloning*, 1999, 1(3): 143–152.
- [41] Loi P, Ptak G, Barboni B, *et al.* Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using postmortem somatic cells[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(10): 962–964.
- [42] Chen D Y, Sun Q Y, Liu J L, *et al.* The giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) somatic nucleus can dedifferentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg[J]. *Sci China: Series C*, 1999, 29: 324–330.
- [43] Maga E A, Shoemaker C F, Rowe J D, *et al.* Production and processing of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland[J]. *Journal of Dairy Science*, 2006, 89: 518–524.
- [44] Zou X G, Yuan S P, Xian J, *et al.* Large scale production of recombinant human antithrombin III (*rhAT III*) in transgenic cloned goats[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(1): 117–123.
- [45] Li J, Ishii T, Feinstein P, *et al.* Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons [J]. *Nature*, 2004, 428: 393–399.

(责任编辑 吴晓丽)

《科技导报》“研究论文”栏目征稿

《科技导报》以发表国内外科学技术各学科专业原创性学术论文为主,同时刊登阶段性最新科研成果报告,以及国内外重大科技新闻,快速、全方位、高密度、大容量提供科技信息。“研究论文”栏目专门发表自然科学、工程技术领域具有创新性的研究论文,要求学术价值显著、实验数据完整、具有原始性和创造性,同时应重点突出、文字精炼、引证及数据准确、图表清晰,并附中、英文摘要以及作者姓名、所在单位、通信地址、关键词等信息。本栏目欢迎广大一线科技工作者投稿。投稿网址:www.kjdb.org;投稿邮箱:kjdbbjb@cast.org.cn。