

利用核移植技术建立哺乳类动物模型

周 琪

(中国科学院动物研究所, 研究员 北京 100080)

〔摘要〕 随着大众对人类健康的日益关注、现代医药事业的不断发展, 新药物的研制和试验日益显得重要。但这类与人类自身相关的科学研究如果在人体上进行试验, 则风险很大; 如果通过实验方法使实验动物产生与人类相似的生理状态, 或将外源基因导入实验动物, 则能使其稳定地整合, 从而表达并产生相应的生理效应, 建立能够模拟人类生理或病理状态的动物模型。通过对具有与人类疾病相似的动物模型的研究, 可使药物试验等试验工作准确无误, 更接近真实, 使实验结果具有科学性和重复性, 从而促进人类健康事业的发展。

〔关键词〕 细胞核移植 模式动物 动物模型 人类健康 生物制药 〔中图分类号〕 Q81

一、模式动物和动物模型的意义

在生命科学、人类医药和健康研究领域, 实验动物在生命活动中的生理和病理过程, 与人类或异种动物都有很多相似之处, 并可互为参照, 一种动物的生命活动过程可以成为另一种动物或者人类的参照物。对一些难以在人身上进行的工作, 及一些数量很少的珍稀动物, 或一些因体型庞大、不易实施操作的动物种类, 采用取材容易、操作简便的另一种动物来代替人类或原来的目标动物进行实验研究, 这就是动物实验。为了保证这些动物实验更科学、准确和重复性好, 可以用各种方法把一些需要研究的生理或病理活动相对稳定地呈现在标准化的实验动物身上, 供实验研究之用。这些标准化的实验动物就称之为模式动物。

在生物科学的发展过程中, 模式动物发挥了重要的作用。海胆等低等动物模型的出现催生了现代受精生物学、发育生物学; 果蝇模型的建立大大推进了遗传学和发育生物学的进展; 酵母和大肠杆菌作为生物模型为现代分子生物学和基因工程技术提供了施展的舞台; 线虫模型对基础和应用生物学产生了巨大的推动作用, 并直接导致了细胞凋亡现象的发现, 开创了一个当代生物医学的全新领域。这些研究成果已经充分证明了模式动物在生命科学研究中的作用。目前, 斑马鱼和非洲爪蟾是最常用的两种模式低等脊椎动物。斑马鱼产卵量多、繁殖迅速、胚胎通体透明, 是进行胚胎发育机理和基因组研究的好材料。非洲爪蟾的卵母细胞体积大、

数量多, 易于显微操作, 还可制成具有生物活性的无细胞体系, 易于生化分析, 在发育生物学研究中具有不可替代的作用。

实验研究是生命科学发展的基础, 动物实验尤其是其中的重要组成部分; 而且随着对人类健康的关注和现代医药事业的发展, 新药物的研制和试验日益显得重要。但这类与人类自身相关的实验研究只是探索未知的过程, 直接在人体上进行试验的风险很大; 故应通过实验方法将外源基因或特定 DNA 片段导入实验动物中, 使之稳定地整合, 从而得到能够模拟人类的生理或病理过程的动物模型。该动物模型应具有与人类疾病或紊乱相似的特性, 从而有利于对疾病的研究。因此, 建立适宜的实验动物模型, 使动物实验研究准确无误且更接近真实, 实验结果具有科学性和重复性, 具有十分重要的意义。

二、采用哺乳动物模型的重要性和几种重要的哺乳动物模型

随着对人类医药和健康研究的深入, 低等模式动物已经不能满足需要, 迫切需要建立哺乳类模式动物和人类疾病的动物模型。SARS 的爆发使我们更充分地意识到建立人类疾病动物模型的紧迫性。人类疾病的动物模型是指各种医学科学研究中建立的具有人类疾病模拟表现的动物。一种疫苗和药物在最终应用前, 必须采集大批量的动物实验和人体实验结果来论证。实验的目的是检验动物或人在注射疫苗后能否产生抗体, 病毒袭来时能否安然

[3] Howell Tong, Chaos and Forecasting[M]. World Scientific, Singapore, 1995

[4] 刘洪. 经济系统预测的混沌理论研究评述[J]. 自然, 2000, 22(6): 311- 315

[5] James P. Crutchfield and et al. Chaos[J]. Scientific American, 1986, 12: 38- 49

[6] 刘洪. 预测的混沌范式[J]. 系统辩证学学报, 1998, 6

(4): 31- 35

[7] Lorenz E N. Deterministic Nonperiodic Flow[J]. Journal of Atoms, 1963, 20: 130- 141

[8] May R M. Simple Mathematical Model with Very Complicated Dynamics[J]. Nature, 1977, 82: 98- 167

[9] 刘洪. 经济系统预测的混沌理论原理与方法[M]. 北京: 科学出版社, 2003 (责任编辑 邱夜明)

无恙;是检验药物能否对人类疾病有治疗作用。疫苗研究和药物研制的转折点就是动物模型的建成;建立动物模型就是让某只动物感染相关病毒后,再对其用药并观察药物效果。如果没有动物模型,将很难确定注射了疫苗的动物是否真正拥有了抗体。令人欣慰的是近期已有报道:恒河猴可作为 SARS 病毒感染的动物模型;其感染后出现的病理学改变、体液免疫应答和排毒现象均可作为 SARS 发病机制研究、药物筛选、疫苗评价的重要指标。

为推动、发展我国自主知识产权的生物医药产业,应通过开发研制哺乳类模式动物,以分子手段建立高质量的疾病动物模型,对新药的药理、毒理特性进行更加准确的评估,并及时淘汰疗效不佳、毒性大的候选药物,从而提高临床试验成功的几率、降低新药研发成本。而这类工作是很难利用传统的低等动物来完成的,因而,建立哺乳类模式动物和人类疾病的哺乳动物模型具有重要的意义。

哺乳类模式动物中最具有潜力的是小鼠、大鼠和猴等非人灵长类动物。

小鼠从 17 世纪开始就被用于解剖学研究及动物实验,经长期人工饲养选择培育,已育成多达千余个独立的远交系和近交系。由于繁殖快、饲养管理费用低,小鼠成为生物医学研究中被广泛使用的模式生物,也是当今世界上研究最详尽的哺乳类实验动物之一。尤其在小鼠胚胎干细胞分离和基因敲除技术建立以后,小鼠成为近 20 年最重要的实验动物。1999 年,美英几家大型科研机构成立了小鼠基因组测序的合作团体,作为生物学和医学研究中重要的模式动物,小鼠是基因组测序研究的重点对象之一。2002 年 8 月,小鼠基因组物理图谱正式公布,表明人类与小鼠共享着 80% 的遗传物质和 99% 的基因,因此了解小鼠有助于了解人类自身。基因组草图显示,小鼠的 20 对染色体上共有约 25 亿个碱基对,与人类 23 对染色体上的 29 亿个碱基对相当接近。DNA 链上基因与基因之间的片段也非常相似。两个物种的基因数目大约都是 3 万个,其中绝大部分相同,只有几百个基因是某一物种独有的。对之进行比较研究可以得到关于人类疾病和生理机能的信息。小鼠与人类同属哺乳动物,繁殖速度很快,易于笼养,遗传性状研究起来很容易。

但值得注意的一点是,从小鼠得来的实验结果有时并不能准确反映人类的客观情况,如一些肿瘤的生长在小鼠和人类身上并不一样,对小鼠肿瘤生长几乎没有作用的生化路径对人类却有重要影响,这揭示了小鼠并不是一个理想的关于人类疾病的实验对象。与小鼠相比,大鼠体型较大,其生理学特征易于研究,是多种人类疾病的重要模式动物。在某种意义上,大鼠是比小鼠更优秀的实验动物。大鼠在很多方面比小鼠更接近于人类,在过去一个世

纪中它一直是首选的啮齿类实验动物,被广泛地用在生物医学研究中。只是自上世纪 80 年代以来,由于小鼠胚胎干细胞技术和基因敲除技术的出现,小鼠才逐渐取代了大鼠在医学实验动物中的地位,成为最为常用的模式动物。

大鼠是生理学研究的理想模型,研究者已经得到了大量的纯系大鼠,并且在大鼠的行为、细胞、生理、生化、药理和毒理学方面积累了大量的数据;而且大鼠还是研究人类高血压、糖尿病、乳腺癌和神经系统疾病的最理想动物。大鼠在形成乳腺癌等肿瘤时的激素反应和人非常相似,从某种程度上说,大鼠是目前最适宜的人类疾病动物模型,也是适宜的可以将基因组和功能结合起来的动物模型^[1]。美国国立健康研究院认识到大鼠在人类健康、医药和基础生物学方面的重要性,于 1995 年启动了大鼠基因组计划,并于 1997 年又启动了大鼠 EST 计划,这两个计划由美国国际健康研究院的 13 个研究所和中心共同投资,并由美国国立心脏、肺和血液研究所协调项目进展^[2]。但是由于难以获得胚胎干细胞,无法进行基因敲除,大鼠在人类疾病研究和药物研制方面的实际应用受到了很大的限制。

在哺乳类模式动物中,灵长类作为人类的近亲,在形态结构、生理机能和生化代谢方面同人类非常相似,应用灵长类进行实验研究的结果,最容易应用于人类。目前,对于一些人类疾病如乙肝等,用小鼠等小型动物模型的肝炎病毒均无法精确模拟,只能做初步的药效评价,而不能作为人类乙肝的疾病模型。缺乏理想的动物模型,难以准确评价药效是这类药物开发过程中的主要问题。有不少药物在实验模型上表现出较高的抗病毒活性,但应用于临床后发现效果并不尽如人意。尽快建立起理想的疾病模型将有利于阐明疾病的机理,筛选出有效的药物。HBV 感染的动物仅限于灵长类如人或黑猩猩,但黑猩猩模型因价格关系难以广泛应用;猕猴等灵长类动物则是世界上用途最广泛的高级实验动物,广泛应用在生命科学、环境保护、航天飞行、医药保健、计划生育、生态平衡等方面。

在医学生物学领域内,作为实验动物的猴等灵长类动物,除用作人类的疾病尤其是传染病的模型动物外,还可以用作原材料和用于检定。所以在近代医学生物学的一些最重要课题,如神经生理学、病毒学、心理学和行为学、计划生育、老年学、肿瘤学和器官移植等课题的研究中,都广泛地采用了灵长类动物作为模式动物。近期,恒河猴作为 SARS 病毒感染的动物模型已经通过了鉴定,这表明应用猴等灵长类动物作动物模型具有特别重要的意义,其价值是其它动物所不能比拟的。迄今为止,已经有 46 种灵长类动物被用于生物学和医学研究,其中猕猴是应用得最多的一种。

三、核移植技术在哺乳动物模型建立中的重要作用

细胞核移植技术是指将供体细胞核利用显微操作的办法移植到去核的成熟卵母细胞或是去核的受精卵中,并使重组的胚胎发育到期的技术。应用细胞核移植技术可以大量地复制动物、扩大动物的数量,理论上可以使动物个体数量无限增加;核移植技术还是基础研究中的重要手段,它为研究配子和胚胎发生、细胞和组织分化、基因表达调控、核质相互作用提供了技术平台。除此之外,细胞核移植技术在建立动物模型方面也有着重要的作用。

能够得到表达特定目的基因、表达相应性状的动物模型,是进行药物研制开发的必要条件。利用克隆技术结合同源重组等转基因技术,可以大大缩短药物的研制开发周期,为解除人类的疾病困扰提供可能。随着人类基因组图谱的完成,人类迈进了功能基因组的研究时代,各种基因功能的鉴定使得模式动物和疾病模型动物的需求量大增。基因敲除技术是研究基因功能的最有效手段。基因被部分敲除的动物,其相关的功能被功能性停止,从而为研究这个缺失基因的功能,以及更彻底地探索人类疾病的机理提供了证据。这为疾病的治疗带来了一个前所未有的新机会,为新药的发展带来了更广阔的前景,为未知基因功能和人类疾病发病机制的研究提供了强有力的技术手段;而核移植技术正是目前最有潜力的生产转基因、建立基因敲除动物模型的技术手段。

小鼠基因敲除技术应用于基因功能研究和小鼠模型建立方面,已经取得了大量的成果。如果进一步利用核移植技术来生产基因敲除小鼠,不仅可以提高效率,而且可以缩短生产周期。目前,中国科学院动物所生殖生物学重点实验室已经成功地获得了体细胞核移植小鼠、转基因体细胞核移植小鼠和胚胎干细胞核移植小鼠。这些工作始终处于该领域的国际前沿^[3,4]。

对于其它模式动物来说,由于胚胎干细胞技术尚未成功,无法利用干细胞技术有目的地获得基因敲除动物模型,这大大限制了其它优秀的哺乳动物模型在生物基础科学、人类健康和医药领域的应用,在这种情况下核移植技术成了生产基因敲除动物的唯一手段。目前几种优秀的哺乳类模式动物中,大鼠是一种研究人类疾病的理想模型,利用核移植技术可以创造遗传修饰大鼠作为人类疾病模型。但由于大鼠卵母细胞和胚胎发育的特殊性,克隆大鼠一直没有取得成功。我们在对大鼠卵细胞活化进行深入研究的基础上,采用了全新的快速一步

法体细胞核移植技术,并且利用蛋白激酶抑制剂(MG132)阻断大鼠卵母细胞减数分裂中期到后期的转变,成功地创造出有繁殖能力的体细胞克隆大鼠,这项工作也是中国科学院动物所和法国国立农艺研究中心共同合作完成的工作。该项研究为人类疾病的研究、相关药物的研制创造了条件^[5]。利用核移植技术,基因敲除猪也已经出生^[6],体细胞克隆猕猴等灵长类动物的工作也正在进行中。

动物模型是进行药理学、毒理学、营养学、发育生物学等研究的必备模型。如果能够得到相同遗传背景的一群同基因型的动物,将会在药理学、营养行为学、发育进化的研究方面取得事半功倍的效果。目前,法国在研究卵细胞成分与细胞核程序重排关系的工作中,已经开始利用来源于克隆牛的卵细胞。这种实验的设计大大减少了所需动物的数量,并且缩短了研究周期。利用核移植技术生产出大量的同基因型的动物模型并应用于药物试验等工作,必将极大地促进人类健康事业的发展。

在任何一种动物模型上都不能全部复制出人类疾病的所有表现,因动物毕竟不是人体,模型实验只是一种间接性研究,只可能在一个局部或一个方面与人类疾病相似。所以,模型实验结论的正确性是相对的,最终还必须在人体上得到验证。若复制过程中一旦发现与人类疾病不同的现象,必须分析差异的性质和程度,找出异同点,以便正确评估。

参考文献

- [1] Jacob H J, Kwitek A. Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nature Rev. Genet.* 2002, 3: 33
- [2] <http://www.nhlbi.nih.gov/meetings/index.htm>.
- [3] Qi Zhou, Jouneau A, Brochard V, Adenot P, Renard J P. Developmental potential of mouse embryos reconstructed from metaphase ES nuclei. *Biology of Reproduction*, 2001, 65(2): 284-296
- [4] Qi Zhou, Boulanger L, Renard J P. A simplified method for the reconstruction of fully competent mouse zygotes from adult somatic donor nuclei. *Cloning* 2000, 2(1): 35-44
- [5] Zhou Q, Renard J P, Le Fric G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J: Generation of Fertile Cloned Rats by Regulating Oocyte Activation. *Science*, 2003, 302: 1179
- [6] Lai L, Kolber-Simonds D, Park K W, Cheong H T, Greenstein J L, Im G S, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day B N, Murphy C N, Carter D B, Hawley R J, Prather R S. Production of alpha-1, 3-galactosyltransferase knock-out pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295: 1089-1192.

(责任编辑 苏青)