

[文章编号] 1674-8115(2011)07-1031-04

• 综述 •

人体细胞核移植研究进展

关小红, 冯云

(上海交通大学医学院附属瑞金医院生殖医学中心, 上海 200025)

[摘要] 为解决免疫排斥问题,核移植技术获得深入发展。动物核移植技术方面的成功开展,加之再生医学与药物治疗的需要,促进了对人特异性胚胎干细胞的研究。文章对人体细胞核移植的研究进展及种间核移植研究存在问题和面临的挑战作一综述。

[关键词] 人体细胞核移植;种间核移植;胚胎干细胞

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.07.036

[中图分类号] R392.4

[文献标志码] A

Research progress of human somatic cell nuclear transfer

GUAN Xiao-hong, FENG Yun

(Reproductive Medical Center, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] To solve the problem of immune incompatibility, nuclear transfer has been deeply developed. The successful development of animal nuclear transfer and the requirements from regenerative medicine and drug therapy promote the research of human specific embryonic stem cells. This review discusses the research progress of human somatic cell nuclear transfer and obstacles and challenges of interspecies nuclear transfer.

[Key words] human somatic cell nuclear transfer; interspecies nuclear transfer; embryonic stem cell

随着干细胞技术的发展,治疗性克隆成为人们的研究热点。治疗性克隆是指将患者的体细胞作为核供体植入去核卵母细胞中构建重构胚,待重构胚发育至囊胚时,分离囊胚内细胞团细胞建立与患者自身遗传物质一致的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs),称为核移植胚胎干细胞(nuclear transfer embryonic stem cell, ntES),再将 ntES 进行体外诱导分化为可供移植治疗的各种细胞、组织或器官,用于疾病治疗。该方法解决了传统将 ESCs 应用于临床所带来的免疫排斥难题,对实现临床个性化治疗具有重要意义。

1 人体细胞核移植研究

自 1997 年 Dolly 羊^[1]诞生以来,人们已通过体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)技术获得了小鼠、牛等多种哺乳动物的克隆^[2,3]。动物核移植技术方面的成功促进了人体细胞核移植研究的开展。

1.1 人种内 SCNT

人种间核移植存在效率低下及不可避免的伦理问题,促使更多的研究者尝试人种内 SCNT。2004 年,韩国科学家以健康志愿者自身卵母细胞为胞质受体,以体细胞为核供体构建重构胚,体外培养后分离囊胚内细胞团获得 1 株 ntES 细胞系,传代培养 70 代以上,仍保持正常的女性核型,经鉴定证实该细胞系来源于人体细胞核^[4]。2005 年,Stojkovic 等^[5]以新鲜卵母细胞与 I 型糖尿病患者体细胞构建重构胚,重构胚分裂增殖并成功提取了带有糖尿病基因缺陷的干细胞,通过 DNA 酶解图谱分析证实核移植成功。2009 年,我国研究者从 12 名健康志愿者中获得了 135 枚新鲜卵子,通过核移植技术最终获得了 5 枚囊胚^[6]。以上研究虽取得了可喜成果,但要获得人体内成熟的新鲜卵子,需对妇女进行超促排卵与取卵,导致卵子来源极其有限,且存在一定风险及带来不可避免的伦理问题。因此,研究者相继尝试应用常规体外授精(*in vitro* fertilization, IVF)治疗周期

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(20060102A1022)(National High-tech Research and Development Program of China, “863” Project, 20060102A1022)。

[作者简介] 关小红(1985—),女,硕士生;电子邮箱:guan hong816@163.com。

[通信作者] 冯云,电子邮箱:artruijin@yahoo.com.cn。

受精失败的卵子行核移植,但重构胚经体外培养后,极少能发育超过2-细胞期,宣告该卵子来源途径的失败^[7,8]。此外,在IVF治疗中,每取卵周期并非所有卵子生长发育均同步,尚有部分生发泡期(GV期)的卵子因不成熟而废弃,将这些卵子行未成熟卵体外培养后,选择成熟卵子用作胞质受体构建重构胚,培养后可成功发育至桑葚期^[7],为解决人卵子短缺问题提供了新思路。为充分解决卵子短缺问题,我国有研究^[9]尝试以IVF治疗周期被废弃的多精受精卵为胞质受体进行核移植,结果重构胚发育至8-细胞期。目前,由于核移植技术各操作细节及进行核移植操作时间不确定等因素,导致重构胚均未发育至囊胚期;但随着技术及方法的改进,IVF周期中GV期卵子及多精受精卵有望为解决核移植过程中人卵子短缺的问题提供新途径。

1.2 人与动物种间 SCNT

人受体卵母细胞缺乏的问题引起了研究者对人-动物种间SCNT(interspecies somatic cell nuclear transfer, iSCNT)研究的兴趣;但目前有关人异种SCNT研究的报道较少。2003年,冯秀亮^[10]证明猪成熟卵母细胞可对人体细胞核重新编程并支持其发育到囊胚期。同年,有研究^[11]首次构建人-兔核移植重构胚并获得ntES系,其中有14株传至10代以上,4株传至25代以上,绝大部分集落保持稳定的紧密状生长;通过原位杂交、免疫组织化学、核型和同源基因分析证实ntES与供核细胞基因一致,与传统的人ES具有相似的特征,保持干细胞未分化特性,能形成类胚体,可自我更新并分化为3个胚层的细胞群。该研究表明,兔卵母细胞至少能部分重编程人体细胞核并完成种植前早期发育,即人体细胞重编程可通过非人哺乳动物的卵母细胞来实现。2006年,另一研究^[12]在人-山羊种间核移植试验中没有获得囊胚,但重构胚在体外可完成早期发育,证实山羊卵母细胞可支持人体细胞完成重编程。2009年,有研究^[13]通过对人-人、人-牛、人-兔3种克隆胚胎的比较研究得出,与人种内核移植重构胚与常规IVF胚胎比较,异种卵母细胞胞质通过下调或沉默某些关键基因引起种间核移植胚胎基因表达模式的异常。

2 人体细胞核移植研究面临的问题

2.1 卵母细胞来源短缺

获取人卵母细胞进行研究面临着伦理问题。即使不考虑伦理问题,要解决长期细胞重编程的材料

来源,应用新鲜的人卵母细胞进行研究亦不可行。由于技术与方法的限制,尝试应用IVF周期受精失败的卵子、GV期卵子和多精受精卵进行核移植的研究目前尚无法完成。另有人提出利用在辅助生育技术中卵子共有或捐赠作为人卵母细胞来源,但均不能解决研究和治疗群体所面临的人卵子缺乏问题。作为解决方法之一,从人ESCs中诱导分化出有活力的卵子,至今无法实现,这些限制促使人们将注意力转向种间SCNT这一可行的策略。研究^[14]表明,异种卵母细胞胞质可支持完全分化的体细胞核返回至种植前阶段的有丝分裂周期,因此动物卵母细胞一度被认为是患者特异性ESCs较易获得的资源。也许iSCNT最重要的预期应用价值在于它有重编程人体细胞的潜力,而不会涉及因应用人卵母细胞而引起的伦理问题。应用哺乳动物卵母细胞进行体细胞重编程,对晚发疾病的个体具有直接的应用价值。因此,近些年,牛、兔等哺乳动物卵母细胞被认为是iSCNT中受体卵母细胞最有价值的替代品。但目前较为明确的是iSCNT存在受体胞质不能完全重编程体细胞的可能性及不同程度的相容性,重构胚极易出现早期发育阻滞。因此,有研究^[15]尝试在核移植前增加卵母细胞胞质以期提高卵母细胞的重编程能力,但结果不理想。

2.2 核与线粒体之间的相容性

核与线粒体之间的相互作用在维持细胞稳定性方面发挥至关重要作用。虽然线粒体有自己独特的基因组和转录装置,但必须依赖核基因组编码的输出蛋白。因此,核与线粒体基因组编码因子间的协调配合对线粒体DNA的转录、翻译及氧化磷酸化系统的组装和功能非常重要。但在人-猴种间核移植的研究^[16]中发现,猩猩的线粒体氧耗率降低20%~30%,线粒体复合体I活性下降40%,杂合体显示细胞呼吸作用减弱,可能是由于核与线粒体之间基因编码产物相互作用缺陷所致。在特定物种,核与线粒体基因组的共同进化以及遗传信息从线粒体到核的传递形成了核与线粒体功能这一独特的互补作用,这一相互作用被认为与物种形成有关。然而,在iSCNT胚胎中,尚不清楚是否完全恢复了核与质的交互功能,核与线粒体之间的不相容性是否是导致iSCNT问题的根本原因,尚需研究证明。

2.3 线粒体与线粒体之间的相容性

目前涉及iSCNT的研究中,重构胚发育大多未超越囊胚期。随供受体物种间遗传距离的加大,

iSCNT胚胎囊胚形成率降低。事实上,目前 iSCNT 研究中,相近的物种才产生子代,可能是由异种间线粒体生理上的不相容性导致的^[17]。在 SCNT 中,相对较少的供核细胞线粒体被注入受体,导致了同一胞质内线粒体 DNA 异质性。有研究^[18]报道,不同物种间线粒体共存对细胞的生存是有害的,供受体间优劣势线粒体 DNA 的变异可导致细胞功能紊乱;亦有研究^[16]得出相反的结论,认为两物种线粒体共存时互不干扰,不影响其生长特性。实际上,线粒体分布具有较高度度的变异性,一些动物显示完全的同型异源性^[19],另一些则显示不同程度的异质性^[20],供核细胞线粒体在受试者中也存在高度变异。Takeda 等^[21]指出,与受体线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 比较,供者 mtDNA 存在复制优势;但 Cao 等^[22]研究发现供核 mtDNA 在 SCNT 胚胎发育过程中选择性消失。在牛 SCNT 重构胚胎、胎儿和动物中,mtDNA 的中性分离似乎是遗传的主要模式,供核线粒体较受体线粒体而言,基因并不选择性复制或消失^[23]。仅较亲近品系间的 iSCNT 才能产生子代,这一事实提示对于线粒体生理上的不相容性,在种间核移植研究中需倍加注意。

2.4 胚胎基因组激活的起始时间

研究^[24]指出,调控 iSCNT 胚胎发育的一个主要方面是胚胎基因组激活的起始时间。如重构胚成功发育至囊胚,正常的胚胎基因组激活需要受者和供者组分的协调作用。哺乳动物的早期发育受卵子发生时储存在胞质中的蛋白和 mRNAs 的控制,分子的消耗似乎与胚胎基因组激活同时发生,受精后这些因子调控早期卵裂,以后逐渐衰竭。通过 iSCNT 已获得活的子代,可假设供核细胞基因组起始转录能够适应或被适应兼容性的发育时序,甚至导致基因表达模式的改变^[24]。种间核移植研究需特别注意胚胎基因组激活的起始时间的调节,因储存在卵质和染色质修饰中的母源性信息的缺失是共同发生的事件,也许可影响转录起始的时间。供核细胞内源基因再激活的研究报道很少,仅有一项研究^[25]表明,牛/鼠 iSCNT 胚胎在 8 细胞期发生稳定的转基因激活,但在同一阶段另外几个内源性基因却选择性转录失败^[25]。尽管基因表达数据有限,形态和发育观测提供的间接证据可证明,至少一些遗传距离物种受体胞质能够激活供体细胞基因组,使重构胚发育至囊胚。但当受者卵母细胞必须经历主要的激活事件时,绝大部分 iSCNT 胚胎经历了发育阻滞。总之,

胚胎基因组激活是克服物种特异性发育阻滞失败的主要原因,在未来 iSCNT 研究中应予以高度重视。

2.5 ntES 细胞的安全性和伦理问题

iSCNT 研究的目的是制造 ESCs,以避免人卵子应用所带来的伦理问题。然而,将这些细胞用于疾病治疗存在传染疾病的风险,且从胞质杂合体中分离 ESCs 可能含有非人受体卵母细胞的线粒体,治疗中可能导致生理和免疫系统的长期危害^[26]。同时,在利用动物卵母细胞的研究中,人畜细胞不可避免地结合和相互作用,也带来了新的伦理问题。世界各国对克隆技术都采取了比较谨慎的态度,绝大多数国家对因医学研究而进行的克隆研究表示支持。我国《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》允许开展 ESCs 和治疗性克隆研究,禁止生殖性克隆研究,为科学家们提供了保障。从 iSCNT 胚胎中获得 ESCs 可方便建立人类疾病新的细胞模型,加深对体细胞与卵子之间基本的核质相互作用的理解。

3 展 望

人体细胞核重编程为研究早期发育事件提供了新方法;但 ntES 试验还处于初期研究阶段,在体细胞重编程至 ESCs 的过程中也存在种属特异性的障碍,有关核移植试验的数据尚不能明确解释基本的生物学问题。为了更切实地发挥 iSCNT 胚胎的治疗作用,尚需更多的实验研究。

[参考文献]

- [1] Wilmut I, Shnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cell [J]. *Nature*, 1997, 385 (6619): 810-813.
- [2] Munsie MJ, Michalska AE, O'Brien CM, et al. Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(16): 989-992.
- [3] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, et al. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(7): 642-646.
- [4] Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst [J]. *Science*, 2004, 303(5664): 1669-1674.
- [5] Stojkovic M, Stojkovic P, Leary C, et al. Derivation of a human blastocyst after heterologous nuclear transfer to cloned oocytes [J]. *Bio-Medicine online*, 2005, 11(2): 226-231.
- [6] Li J, Liu X, Wang H, et al. Human embryos derived by somatic cell nuclear transfer using an alternative enucleation approach [J]. *Cloning Stem cells*, 2009, 11(1): 39-50.
- [7] Heindryckx B, De Sutter P, Gerris J, et al. Embryo development

- after successful somatic cell nuclear transfer to *in vitro* matured human germinal vesicle oocytes[J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(7): 1982–1990.
- [8] Lavoie MC, Weier J, Conaghan J, et al. Poor development of human nuclear transfer embryos using failed fertilized oocytes[J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 11(6): 740–744.
- [9] Fan Y, Chen X, Luo Y, et al. Developmental potential of human oocytes reconstructed by transferring somatic cell nuclei into polyspermic zygote cytoplasm[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382(1): 119–123.
- [10] 冯秀亮. 人-猪异种细胞核移植研究[D]. 杨凌: 西北农林大学, 2003: 79–83.
- [11] Chen Y, He ZX, Liu A, et al. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocyte[J]. *Cell Res*, 2003, 13(4): 251–263.
- [12] 王春雨, 刘凤军, 武浩, 等. 人-山羊异种核移植胚胎发育的初步研究[J]. *生命科学研究*, 2006, 10(1): 50–54.
- [13] Chung Y, Bishop CE, Treff NR, et al. Reprogramming of human somatic cells using human and animal oocytes[J]. *Cloning Stem Cells*, 2009, 11(2): 213–223.
- [14] Tecirlioglu RT, Guo J, Trounson AO. Interspecies somatic cell nuclear transfer and preliminary data for horse-cow/mouse iSCNT[J]. *Stem Cell Rev*, 2006, 2(4): 277–287.
- [15] Thuan NV, Kishigami S, Wakayama T. How to improve the success rate of mouse cloning technology[J]. *J Reprod Dev*, 2010, 56(1): 20–30.
- [16] Dey R, Barrientos A, Moraes CT. Functional constraints of Nuclear-Mitochondrial DNA Interactions in xenomitochondrial rodent cell lines[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(40): 31520–31527.
- [17] Mastromonaco GF, Favetta LA, Smith LC, et al. The influence of nuclear content on developmental competence of Gaur X Cattle hybrid *in vitro* fertilized and somatic cell nuclear transfer embryos[J]. *Bio Reprod*, 2007, 76(3): 514–523.
- [18] Zuckerman SH, Gillespie FP, Solus JF, et al. Mitochondrial protein synthesis in interspecific somatic cell hybrids[J]. *Somat Cell Mol Gene*, 1986, 12(5): 449–458.
- [19] Hua S, Zhang Y, Song K, et al. Development of bovine-ovine interspecies cloned embryos and mitochondrial segregation in blastomeres during preimplantation[J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 105(3–4): 245–257.
- [20] Inoue K, Ogonuki N, Yamamoto Y, et al. Tissue-specific distribution of donor mitochondrial DNA in cloned mice produced by somatic cell nuclear transfer[J]. *Genesis*, 2004, 39(2): 79–83.
- [21] Takeda K, Akagi S, Kaneyama K, et al. Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves derived from cumulus cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 2003, 64(4): 429–437.
- [22] Gao L, Shitara H, Horii T, et al. The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 386–390.
- [23] Hiendleder S, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, et al. Heteroplasmy in bovine fetuses produced by intra- and inter-subspecific somatic cell nuclear transfer; neutral segregation of nuclear donor mitochondrial DNA in various tissues and evidence for recipient cow mitochondrial in fetal blood[J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(1): 159–166.
- [24] Latham KE. Early and delayed aspects of nuclear reprogramming during cloning[J]. *Biol Cell*, 2005, 97(2): 119–132.
- [25] Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo[J]. *Hum Reprod Update*, 2002, 8(4): 323–331.
- [26] Hall VJ, Stojkovic P, Stojkovic M. Using therapeutic cloning to fight human disease: a conundrum or reality? [J] *Stem Cells*, 2006, 24(7): 1628–1637.

[收稿日期] 2010-10-21

[本文编辑] 吴 洋