

哺乳动物克隆的研究进展与应用前景

谭晓红 杨 晓 黄培堂*

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘 要 显微注射技术本身固有的缺点在很大程度上限制了转基因动物的研究及应用。近年来,体细胞基因打靶和体细胞克隆的最新研究进展表明,这两种技术相结合将成为制备大型转基因动物的有效途径。

关键词 转基因动物,基因打靶,核移植

中图分类号 Q78 Q81 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2001)02-0118-03

对大型哺乳动物进行遗传修饰和大规模克隆的研究已经进行十多年了,转基因动物的研究取得了显著但有限的进展。直到最近,多莉羊的诞生和应用核移植制备转基因动物的尝试,为此领域的研究与发展带来了新的生机。

1 应用传统方法研制转基因动物的局限性

应用转基因动物乳腺生产重组蛋白质在 90 年代得到了广泛的重视和研究,然而具备生产价值和经济效益的乳腺生物反应器系统却屈指可数。这主要是因为用于常规制备转基因动物的显微注射技术本身固有的缺点是很难克服的。转基因通过显微注射整合到动物基因组的效率较低,转基因随机整合造成的“位置效应”所引起的表达结果的不确定性,转基因动物遗传中出现优良性状的分离、减弱,嵌合体动物等问题的存在,通常需要经过大量的筛选才能获得高表达的转基因动物,因此转基因动物乳腺生物反应器的研制周期较长且费用高昂。解决转基因随机整合的最根本的方法是采用定位整合,这样可消除基因表达的位置效应,确保转基因表达的组织特异性,并可能取得与动物乳蛋白一致的表达水平。

在小鼠研究方面,应用同源重组技术和胚胎干细胞(ES 细胞)技术实现了内源基因的定位剔除和外源基因的定位整合,以前所未有的速度培育了多种遗传修饰的突变体小鼠,对它们的研究大大扩展了人类对基因功能的认识^[1]。但迄今为止,仍未培养成功大动物的胚胎干细胞,使得对大动物进行遗传修饰的研究远远落后于对小鼠的研究。近年来,体细胞打靶和核移植的最新研究进展使得对大动物进行精细的遗传修饰成为可能。

2 近期核移植的进展

1997 年 Wilmut 等报道用成年绵羊的乳腺上皮细胞作为核供体,成功克隆出 1 只活的绵羊,命名为多莉(Dolly),同时用绵羊的胎儿成纤维细胞作为核供体,克隆出 3 只绵

羊^[2]。在对多莉羊的身份进行核实和全世界展开克隆的伦理学讨论的同时,各国科学家相继报道了类似的研究成果。1998 年 Wakayama 等报道用小鼠卵丘细胞作核供体成功克隆出小鼠^[3]。同年 Kato 等报道用一只成年牛的卵丘细胞、输卵管上皮细胞分别克隆出 5 只和 3 只小牛^[4]。1999 年 Zakhartchenko 等报道用耳的皮肤成纤维细胞经核移植克隆出 1 只活的牛^[5]。1999 年 Shiga 等报道用来源于肌细胞的传代细胞核移植克隆了四只活的小牛^[6]。2000 年 Irina 等又在克隆猪上取得了进展,他们用滤泡粒细胞作为核供体与体外来源的去核卵母细胞融合,它们所形成的假原核再经核移植到体外来源的去核受精卵胞质受体中,获得重组胚,移植 72 枚重组胚到受体猪中,有 5 只小猪出生,现都健康成长^[7]。

克隆羊技术是生物工程技术发展中的一个里程碑,它标志着体细胞核移植技术可作为一种成熟技术应用于转基因动物的研究。1997 年 PPL 公司的科学家与罗斯林研究所的 Wilmut 等联手通过体细胞核移植率先在世界上培育了表达人凝血因子 IX 转基因绵羊^[8]。1998 年 Cibelli 等通过体细胞核移植技术,用胎儿成纤维细胞作核供体,培育了 3 头健康的、相同的含有外源标记基因(β -半乳糖苷酶基因)的转基因牛。他们的研究表明,虽然体细胞(牛胎儿的成纤维细胞)在体外培养的寿命有限,但当培养至衰老时,其群体倍增的数目足够产生转基因细胞系的克隆,而且接近衰老的体细胞的寿命因核移植而延长^[9]。同年,他们又报道以 ES 样的细胞(衍生自体细胞)为核供体,生产转基因牛的嵌合体后代^[10]。但以上研究中,转基因的整合方式仍是随机的。1999 年 Baguisi 从 40 天的转基因雌性胚胎原代培养的体细胞系中获得核供体,核移植复制抗凝血酶 III 的转基因山羊,培育了三个健康的相同的雌性后代^[11]。

1999 年 Wakayama 等报道用小鼠的胚胎干细胞作为核供体,培育出活的小鼠^[12]。这说明可以在胚胎干细胞中将基因打靶和核移植相结合,不必通过生产嵌合体,而直接得

到定位遗传修饰的动物。至今还未有大动物的胚胎干细胞培养成功的报道,但用培养的体细胞进行基因打靶及核移植提供了一种替代方法。2000年 McCreath 等对绵羊胎儿成纤维细胞进行基因打靶,将转基因 AAT(α 抗胰蛋白酶)定位整合在绵羊 $\alpha 1$ 原胶原(COL1A1)基因位点,并通过核移植培育成功一只活的绵羊。对该羊用激素诱导哺乳,测得其奶中的 AAT 含量为 0.65mg/mL。同时,还培育成功 2 只用 *neo* 基因打靶该位点的核移植绵羊^[13]。此研究说明,基因打靶可被有效地应用于大动物体细胞,对体细胞进行精确的遗传修饰,并通过核移植生产出活的动物。在大动物胚胎干细胞尚未培育成功的情况下,此研究具有重要的意义。

3 基因打靶与核移植技术相结合的优势

虽然早期的基因打靶是在体细胞中获得的,但因为体细胞的分裂次数有限,而且打靶的效率通常比胚胎干细胞打靶效率低两个数量级,所以在大动物体细胞中进行基因打靶较为困难。最近通过对打靶载体及其筛选策略的改进,如无启动子打靶载体,无多聚腺苷酸信号打靶载体的应用,使得对大动物体细胞的基因打靶或精确的遗传修饰成为现实^[14]。

基因打靶与核移植技术相结合是创建转基因动物很有前途的一种方法,因为可以在创建一个转基因动物之前在细胞中将目的基因插入染色体的特异位点,避免转基因随机整合带来的位置效应,显著增加转基因动物生产药用和营养蛋白的能力,同时可剔除或替换掉干扰目的蛋白分离或引起移植组织排斥的动物基因。这样,将转基因动物的筛选提前到细胞水平,而不是在动物水平,不但可以节省时间,对大动物的生物反应器来讲,更降低了成本。在胚胎重构前通过基因打靶修饰、筛选细胞群体与整体动物的原代克隆提供了一种群体快速遗传改进或修饰的方法。在生产转基因动物方面,采用体细胞核移植技术比用显微注射技术具有更多的优点。首先体细胞的数量远比受精卵丰富,且现在的研究表明,多种体细胞如乳腺细胞、胎儿的成纤维细胞^[2]、卵丘细胞^[3]、上皮细胞^[4]等等均可作为体细胞核移植的核供体,并能成功克隆。而且打靶成功的转基因细胞可经冷冻保存,为转基因动物的生产在时间上提供了很大的灵活性,这也是降低生产成本的一个重要方面。其次,用该方法制作转基因动物效率高,在鉴定了适用的细胞克隆后,就可用细胞核移植技术,获得“速成动物群”。作为人类医疗用的各种蛋白质药物的供源,这种动物群的遗传一致性可保证生产的医药产品的一致性,这是常规育种所不具备的可贵性能。细胞核移植技术还有利于对转基因动物提前作性别鉴定,适当性别的转基因大动物如牛的整个种群可在一代中产生,在转基因动物的性别是重要条件的情况下,其转基因效率将大大提高。例如,以人体蛋白质在乳汁中表达为主要目标时,其始祖动物可全部为雌性个体。而传统的显微注射方法则需传 2 代才有可能获得一个生产的种群,每一代将节省 2 年的时间^[10]。另一个扩大转基因动物生产的潜在步骤是发现并应用大动物的胚胎干细胞作为核供体。建立牛、羊、猪等家畜的 ES 细胞系,将非常有效地提高基因打靶的效率,从而提高制备大型转基因动物的效率。基因打靶,无论是胚胎干细胞还是体细

胞的基因打靶,与核移植共同应用都将为转基因动物的研究与生产开辟新径。

4 基因打靶与核移植技术相结合的应用前景

利用基因打靶和核移植技术生产转基因动物有着广阔的应用前景,主要表现在以下几个方面:

(1) 制作及复制具有巨大经济价值的转基因动物,生产人类所需的药用蛋白或具有特殊营养作用的蛋白质。血液可被用来作为载体生产特异的蛋白,如用基因打靶将人的抗体基因替代动物的抗体基因,生产单克隆抗体^[15]。可在牛奶中生产大量的药用蛋白质,同时可用基因打靶剔除影响该目的蛋白纯化的蛋白质基因。核移植技术为乳腺生物反应器的生产研究注入了新的活力,使其发展更快更好,转基因制药业必将成为生物技术领域发展的重要方向。

(2) 克隆技术目前在畜牧、农业等实践中具有显而易见的优势,可以用于优良品种、优良性状的保持,精确改造动物的遗传性状,提高动物的繁殖力和抗病能力,培育出新的优良品种,加速育种和扩群。如在反刍动物中将编码细胞朊病毒蛋白的基因(*PrP^c*)敲除,则可使如羊和牛这些动物具有一定的抵抗羊瘙痒症、疯牛病的能力^[16]。在通常情况下,通过有性生殖获得大动物的胚胎数目是有限的。而在体外生产一个胚胎,即使卵母细胞体外成熟和体外培养的效率很低,费用也是很少的,且在一定程度上并不受到动物交配和数量的限制。

(3) 对核供体细胞系进行基因打靶或基因修饰后,再进行无性克隆,生产基因背景一致,个体差异小的动物,建立各种遗传病动物模型,用于医学和生物学的研究。目前对脊椎动物基因功能的研究多利用突变体小鼠进行,克隆羊技术将使这方面的研究在许多动物身上都可以实现。在解剖、生理和体型上,家畜如猪、牛和羊等,比啮齿类动物更接近于人体,能较大限度地解决动物模型与预期不符的问题。如猪眼的大小和视网膜的解剖情况和人眼很相似,可以作为研究人类眼病的动物模型,羊可用来作为研究人的肺囊性纤维化的疾病模型。

(4) 体细胞核移植技术也是提供研究哺乳动物细胞发育全能性及核质关系最有效的手段之一。通过它可研究任何一种基因产物的作用、分析基因表达调控的机制、体细胞发育、细胞核的发育调控、核质间作用、细胞的分化、去分化、衰老、抗衰老、细胞发育的潜能、胚胎的发育等等,最终将有利于揭示基因功能和生命的本质。

(5) 消除异种反应的移植抗原,复制哺乳动物,为人类提供更多的动物移植器官。如从猪中得到心、肝、肾等,解决器官长期缺乏的问题。2000年 Irina 等克隆猪的成功使移植异种器官的研究更进一步。 α -1,3-半乳糖苷转移酶是引起异种移植排斥反应的主要原因,Irina 等已获得成功剔除 α -1,3-半乳糖苷转移酶的猪的原代细胞。用该原代细胞进行核移植获得的猪的器官将在一定程度上克服免疫排斥反应^[8]。

(6) 应用病人正常的或修饰后的细胞通过核移植得到胚胎干细胞系,使其在体外发育成各种细胞、组织或器官,然后

再进行移植去修复或替代损伤的组织或器官。在这种情况下,移植用的供体与受体在遗传上是相同的,具有良好的相容性,可非常有效地解决移植排异反应的问题^[17]。

(7)挽救一些濒临灭绝的物种,如 Wells 等用唯一存活的恩德比地牛的腹膜壁层粒细胞克隆出了 2 只活的牛,使该物种得以保存^[18]。现在异种移植也在研究之中,如将大熊猫的体细胞核移植到兔卵中^[19],并有可能产生新的动物。

5 结 语

虽然在多莉羊之后有若干体细胞成功克隆活体动物的报道,但是核移植的效率仍然很低。影响哺乳动物克隆成功的因素有很多,核移植的技术还有待于完善,如在制作效率和生产费用方面,相关方面的基础研究还需进一步深入,才有可能从根本上降低生产成本,使该技术得到广泛的应用。

REFERENCES(参考文献)

- [1] YANG X(杨晓),HUANG P T(黄培堂),HUANG C F(黄翠芬). Progress of the gene targeting in mouse. *Chinese Science Bulletin(科学通报)* 2000, **45**(15):1584~1592
- [2] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385**: 810~813
- [3] Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, **394**(6691):369~374
- [4] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Sotomaru Y *et al.* Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, **282**(5396):2095~2098
- [5] Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M *et al.* Adult cloning in cattle: potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures. *Mol Reprod Dev*, 1999, **54**(3):264~272
- [6] Shiga K, Fujita T, Hirose K *et al.* Production of calves by transfer of nuclear from cultured somatic cells obtained from Japanese black bull. *Theriogenology*, 1999, **52**(3):527~535
- [7] Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD *et al.* Cloned pigs produced

by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, **407**(6800):86~90

- [8] Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA *et al.* Human Factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 1997, **278**:2130~2133
- [9] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, **280**(5367):1256~1258
- [10] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ *et al.* Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**(7):642~646
- [11] Baguisi A, Behboodi E, Melican DT *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**(5):456~461
- [12] Wakayama T, Rodriguez I, Perry A *et al.* Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Nat Acad Sci*, 1999, **96**:14984~14989
- [13] McCreath KJ, Howcroft J, Campbell K *et al.* Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 2000, **405**(6790):1066~1069
- [14] Polejaeva IA, Campbell KHS. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. *Theriogenology*, 2000, **53**(1):117~265
- [15] Jakobovits A. Production of fully human antibodies by transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, **6**(5):561~566
- [16] Wolf E, Zakhartchenko V, Berm G. Nuclear transfer in mammals: recent developments and future perspectives. *Biotechnol*. 1998, **65**(2~3):99~110
- [17] Keller G, Snodgrass HR. Human embryonic stem cells: The future is now. *Nature Medicine*, 1999, **5**(2):151~152
- [18] Wells DN, Misica PM, Tervit HR *et al.* Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev*, 1998, **10**(4):369~378
- [19] Chen Dayuan, Sun Qingyuan, Lin Jilong *et al.* The giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) somatic nucleus can dedifferentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg. *Science in China (series C)*, 1999, **42N3**:346~353

New Advances and Future Perspectives in Mammal Cloning

TAN Xiao-Hong YANG Xiao HUANG Pei-Tang

(Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

Abstract To the great extent, the study and application of transgenic animal are restricted by the inherent limitation of pronuclear microinjection. Recently, the rapid progresses in gene targeting and cloning of somatic cells have shown that the combination of these two technologies will become a virtual way to producing large transgenic animals.

Key words transgenic animal, gene targeting, nuclear transfer

Received October 11, 2000

This work was supported by Hi-Tech Research and Development Program of China (Z21-03-01) and (102-08-02).

* Corresponding author. Tel 86-10-66948801; Fax 86-10-63833521; E-mail: Huangpt@im.ac.cn ©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn