

鱼类细胞核移植的历史回顾与讨论

严绍颐

(中国科学院发育生物学研究所 北京 100080)

摘 要 介绍 60 年代以来主要是中国在鱼类克隆研究中所获得的实验进展和成果,包括迄今只能在鱼类中得到的,具有发育“全能性”的核质杂种克隆鱼和早在 80 年代初中国就已报道过用体细胞核移植所获得的“克隆鱼”,其记录要比“多莉羊”的报道早 15 年之久。本文还对过去 36 年中所获得的有关实验结果进行了分析和讨论并试图联系其它“克隆动物”对其发展前景作些探讨。

关键词 鱼类,细胞核移植,历史回顾

中图分类号 Q953 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2000)05-0541-07

自“多莉”羊报道后(Wilmot 等 1997);克隆(Clone)这个名称已广为人们所熟悉。它在高等动物中的应用首先见于 70 年代对两栖类的细胞核移植研究(McKinnell, 1978)^[1]。在高等动物中,一般是通过一个单倍体的精子和一个单倍体的卵子相结合的“有性生殖”方式繁殖后代的,而“细胞核移植”或“克隆技术”是指将一个双倍体的细胞核(当然也包含着一点围在核周围的细胞质)与另一个已经去掉(或灭活)了自己那个单倍体细胞核的卵子(生殖细胞)的细胞质重组在一起后,在一定的条件下,它也能像受精卵一样启动发育并形成胚胎、幼体或成体。可见,这是一种用人工的“非有性生殖”的方式来完成的繁殖和发育过程。但因它的受体仍是生殖细胞,而且它们也并非由某一个细胞直接分裂后的“无性繁殖产物”,而且即使参与重组卵的那些细胞核是来自同一个胚胎,或同一个起始培养的细胞,但和它重组的那些卵子彼此之间也不尽相同,后者可产自同一品种但不同的雌性个体,也可产自不同品种的雌性个体。即使它们是来自同一个雌性动物所产的一批卵子,也无法确定它们是否属于同型配子(Homogamete)。所以严格地说,这一名词应用于动物界与其最初所指的微生物的“无性繁殖系”,和后来又应用于“DNA 分子的体外重组和扩增”的原意有些出入。不过有人认为用此类方法能复制与供体细胞核的基因组“相同”的个体,而且听起来比较“现代化”,再冠之以“细胞工程”或“胚胎工程”之名,将它列为“高技术”范畴,便可更吸引公众之注意和容易获得资助,所以许多人喜欢采用它。

迄今在动物界进行过核移植研究的,按首次报道的先后有变形虫(Commandon de 和 Fonbrune, 1939)两栖类(Briggs 和 King, 1952)鱼类(童第周等, 1963)昆虫(Du Praw, 1967)脊索动物(童第周等, 1977)和哺乳类(Illmensee, 1980)等 6 大类动物。其中在进化上介乎两栖类和哺乳类之

间的爬虫类和鸟类则至今无人问津。核移植研究的最初设计和目的并非为了获得现在所说的“克隆动物”,而是在于研究细胞核和细胞质在发育、分化和遗传中的功能及其相互作用,属于基础研究的范畴。当 60 年代和 80 年代起相继在鱼类和哺乳类中应用此技术后,才发现用此法制造的“克隆动物”,可能有潜在的应用价值。

对于细胞核和细胞质在发育、分化和遗传中的功能问题,历来在遗传学家和胚胎学家中存在着不同的争议。一些人认为细胞核内存在着不同的“决定子”(Determinants)(Roux, 1883; Weismann 1892),它们在细胞分裂时被分配到不同的细胞内进而控制细胞向不同的方向分化,并认为细胞核是生命活动的主宰。而另一些人,则认为细胞质能激活含有遗传潜能的细胞核(Driesch, 1894),这显然强调细胞质对细胞核有影响。许多实验胚胎学家们比较支持后一种说法,其实验证据不胜枚举。

为此,德国科学家 Spemann (1938)^[2]首先在两栖类中提出了核移植设想:将一个胚胎细胞的核分离出来,并移植到另一个已除去了卵原核的同种未受精卵内,目的在于观察处于不同发育时期的胚胎细胞核,甚至已分化细胞的核,在与新的卵细胞质结合后,后者能否影响或改变细胞核的功能,启动重组卵的发育和发育到什么程度,以及细胞核的发育“全能性”在胚胎的哪一个时期才会消失等问题。但因当时没有技术可供使用,未能实现。

14 年后,美国科学家 Briggs 和 King (1952, 1953)首先在两栖类中获得核移植实验成功,他们将豹蛙(*Rana pipiens*)囊胚时期的细胞核移入同种动物的去核成熟卵内获得了发育正常的蝌蚪和幼蛙。以后他们和其他许多胚胎学家在不同的两栖类卵中进行了大量实验所得的结果表明(1)用胚胎细胞核可获得有发育“全能性”的克隆蛙(2)已分化细胞

的核(体细胞)被移植后并无发育的全能性,但有一例曾报道过用爪蟾蝌蚪的肠细胞核获得了正常的核移植个体(Gurdon和Uehlinger, 1966)不过此实验结果并未被重复验证(3) Kawamura和Nishioka(1963)曾报道过在蛙类(*Rana*)的种间获得了2种核质杂种蛙,它们是不育的(无发育的“全能性”),但它们除显示供体细胞核蛙的表型(Phenotype)特征外,还出现了一些属于受体蛙的表型或中间型的特征,从而证明细胞质对移核卵的发育、分化和遗传均有影响。

对鱼类进行核移植研究是由中国的童第周等(1963)首创的(见McKinnell, 1978; Di Berardino, 1997; 严绍颐, 1998)。它比两栖类的研究晚了约10年,比哺乳类者早18年。但从1963年到1999年的36年间,在国外只见到由前苏联作者(Gasaryan, 1979)和日本作者(Niwa等, 1999)发表过2篇论文。其它的都是中国科学家的研究结果,所以说中国在鱼类细胞核移植(克隆)研究方面,至今一直是独占鳌头。这并非“夸大其词”,就连国际的同行们都公认这一点(见DiBerardino, 1997^[3]; 严绍颐, 1998^[4]),以下就鱼类细胞核移植(克隆)的研究,分几个方面加以介绍。

1 在同种鱼类中进行核移植研究

童第周等(1963)^[5]首先报道,将金鱼(*Carassius auratus*)和鲫鱼(*Rhoeus sinensis*)的囊胚细胞核分别移入同种鱼的去核未受精卵内,都能获得正常的胚胎和幼鱼。这是首次报道细胞核移植技术在鱼类中的建立。

2 在不同种鱼类之间进行核移植研究

以中国科学院动物研究所的童第周等(1963, 1973)为主开始的“核质杂种鱼”的研究,是以他们过去对鱼卵本身结构的研究为依据的,主要是想从理论上研究“核质关系”问题。所以与他们前人所用的方法虽然相同,但学术思路和研究的重点有异。其根据是美国的Oppenheimer(1936)曾用一种鱼(*Fundulus heteroclitus*)卵和中国的童第周等(1945)曾用金鱼(*Carassius auratus*)卵为材料,证明在它们的卵细胞质中有一种物质,由植物性极流向动物性极的胚盘内,它能决定卵子能否正常发育,他们称这种物质为“组织者”(Organizer),从而证明细胞质因子对发育和分化的重要性。至于对这种因子的确切性质还未弄清楚。童第周等想用核移植实验来证明这类细胞质因子对(一)发育和分化的影响;(二)对遗传的影响。由于在同种动物中无法区别核和质所代表的遗传特性,所以用同种动物为材料只能判断细胞质因子的第一种影响,而无法判断其第二种影响。为了着重研究第二方面的问题,他们将一种鱼的囊胚细胞核移入另一种鱼的去核未受精卵内,构建成一个核质杂种卵,由此发育成核质杂种胚胎、幼体或成体,这样便不但能判断细胞质因子对发育和分化的影响,而且又能判断它们的遗传特性(表型)究竟是由细胞核还是由细胞质决定的,还是两者都有作用?同时在应用上也可能探索鱼类品种的改良问题。

他们在鲤科(Cyprininae)鱼类的不同变种之间,将鲫鱼

(*Carassius auratus*, $2N = 100$)的囊胚细胞核移入金鱼(*Carassius auratus*, $2N = 100$)的去核卵内获得了核质杂种鱼(童第周和严绍颐, 1985);在不同属之间,将鲤属(*Cyprinus*)的红鲤(*Cyprinus carpio*, $2N = 100$)核移入鲫属(*Carassius*)的鲫鱼(*Carassius auratus*, $2N = 100$)去核卵内获得了核质杂种鱼(童第周等, 1980; 严绍颐等, 1985; 余来宁等, 1989)。将这二种鱼的核、质反向重组后也获得了核质杂种鱼(严绍颐等, 1984),这就是后来有人称之为“世界上首创的“试管鱼”。他们又在不同亚科之间,将雅罗鱼亚科(*Leucinae*)的草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*, $2N = 48$)核移入鲃亚科(*Abramidinae*)的团头鲂(*Megalobrama amblycephalus*, $2N = 48$)的去核卵内也获得了核质杂种鱼(严绍颐等, 1985)。这些核质杂种鱼都具有发育的“全能性”,都能繁殖后代,而且已多次重复获得。将这些核质杂种鱼与它们的细胞核供体鱼相比,它们都表现出不同程度的遗传特性的变化。例如将鲤鱼核移入鲫鱼去核卵内所得的核质杂种鱼,其多数性状为核型,有的属细胞质型和中间型,也有新的变异性状(童第周等, 1980; 严绍颐等, 1985; 余来宁等, 1989)。而且它们还显示生长速度快,肌肉蛋白质含量较高,脂肪含量较低等特点并已推广养殖,繁殖五代以上。另一种更远缘的、不同亚科间鱼类间(草鱼核和团头鲂的去核卵组合)的核质杂种鱼,也出现了不同程度的性状变异并已繁殖到第二代(严绍颐等, 1985, 1998; 余来宁等未发表资料)。

后来以中国科学院发育生物研究所为主,他们又在不同科之间,将鲤科(Cyprinidae)的金鱼(*Carassius auratus*, $2N = 100$)核移入鳅科(Cobitidae)的泥鳅(*Paramisgurnus dabryus*, $2N = 48$)去核卵内,以及这二种鱼的核、质反向重组(严绍颐等, 1990);将斑马鱼(*Brachydanio rerio*, $2N = 50$)核移入泥鳅($2N = 48$)的去核卵内(严绍颐等, 1993);不同目之间的鱼类,将尼罗罗非鱼(*Oreochromis nilotica*, $2N = 44$)的核移入金鱼($2N = 100$)的去核卵内(严绍颐等, 1990)以及尼罗罗非鱼的核移入泥鳅的去核卵内(严绍颐等, 1991)等试验,都获得了核质杂种胚胎和幼鱼。他们甚至将不同纲的动物,即哺乳纲(Mammalia)中,小鼠(*Mus musculus*, $2N = 40$)16-细胞时期的胚胎细胞核移入鱼纲(Osteichthyes)中,泥鳅($2N = 48$)的去核卵内,也获得了正常的核质杂种囊胚(严绍颐, 1998)。所有这些核质杂种卵的发育速度和模式均表现为细胞质的类型,说明它们受细胞质的影响很明显。在这些实验中,由于所得核质杂种胚胎、幼鱼或成鱼的性状主要表现为供体鱼的表型,而且为双倍体核型,所以不论其是否带有标记染色体,都能确证为正常的“核质杂种”个体。而且根据重组卵的线粒体DNA(mtDNA)分析,它们属于卵子型也能确证这一点(严绍颐, 1993; Evens等, 1999)。

潘光碧(1989, 1990)又将上述鲤鲫核质杂种鱼的子二代(F₂)雄性,与散鳞镜鲤雌性进行品种间有性杂交,获得了子一代(F₁)并命名为“鲤鲫”;用鲤鲫核质杂种鱼的子二代(F₂)雌性和散鳞镜鲤雄性进行反向有性杂交,获得了子一代(F₁)并命名为“5号鱼”。根据对这些子代的分析表明,镜

鲤和鲤鲫核质杂种鱼对子代的某些性状都各有较强的遗传影响,这说明其某些细胞核和细胞质因子在有性杂交子代的遗传中都起着各自的作用。这些结果都为用核移植法探索鱼类育种新途径提供了宝贵的依据。

从这些实验中可以得出以下几点结论和假设(1)与在两栖类和哺乳类中的情况不同,在鱼类中,不仅在同种内,而且在远缘物种之间,用胚胎细胞核移植都能获得具有发育“全能性”的核质杂种鱼,这可能与它在进化地位上比前两者低有关(Di Berardino, 1997),也可能是因为在鱼类中,物种间的“不相容性”限制较小,因为它们之间获得有性杂交个体的可能性也较大(仇潜如, 1983; Chevassus, 1983),但两种鱼类之间的亲缘关系愈远,则成功率愈小;(2)鱼卵细胞质对启动重组卵(包括哺乳类的核与鱼的卵细胞质之间的重组卵)的早期发育不受种类特异性的限制(严绍颐, 1998);(3)如果两种鱼类的染色体数目相同或相近,则即使它们的亲缘关系较远,也能获得具有发育“全能性”的核质杂种鱼或幼鱼(严绍颐, 1993);(4)卵子发育的模式和幼鱼摄食的行为不同,会影响核质杂种幼鱼的成活(严绍颐, 1998);(5)核质杂种鱼和有性杂交鱼之间的相似点是两者都表现出“杂种优势”,而且它们的某些特性能传给下一代(潘光碧, 1989, 1990),对培育新品种有利,不同点是前者能繁殖后代而后者是不育的(刘建康等, 1945; 仇潜如, 1983; Chevassus, 1983),不能形成新品种;(6)在核质杂种鱼中所表现出的性状变异可能是因为在异种核、质的相互作用下,使在进化过程中所保留的一些“静止基因(Silent gene)”被重新激活,或对基因组进行了“重编码”的缘故(严绍颐, 1998; Pritchard, 1986; DiBerardino, 1997; Wassenegger, 1998; Fire, 1999)。

由于在两栖类中只有个别例子报道能获得不育的核质杂种成蛙(Nisioka, 1972)。而在哺乳类中仅报道过,不同种间最多只能获得胚泡期的胚胎。因此在鱼类中所获得的核质杂种鱼便很令人注意。例如国外学者们对此项研究有这样的评介:“中国在鱼类遗传和胚胎学研究方面有着悠久的历史。已故董第周教授是将细胞核移植研究应用于鱼类的伟大先驱者,他们在中国现代史中最困难的时期,继续长期地用细胞核移植法为鱼类胚胎学作出了很大贡献,特别是在核质杂种鱼方面。这些都是真正独创性的工作”(Okada, 1998)。当然这些评价是令人鼓舞的,但这是已经过去的事了。核质杂种鱼对研究这些重要的问题显然是一种比较理想的实验材料。国外的科学家在两栖类和哺乳类中做了很多努力,尚未成功,而我们虽已获得成功,却由于种种原因,不能继续做下去,这是非常遗憾的事。

3 培养过的鱼类胚胎细胞、体细胞和不经培养的体细胞核的移植和继代移植

由于在一些体细胞移植实验中都用一次以上的继代核移植法,为避免说明上的重复,现将它们放在一起讨论。

到70年代初人们转而注意对体细胞核移植的研究。由于两栖类的核移植只能在同种中进行,为确保实验的准确

性,同行们一致同意在用已分化的细胞为材料时,必须明确四个标准:(1)要确凿地证明被移植的那个细胞核的确是已分化的核;(2)要肯定移植后所得的个体是来自被移植的那个细胞核;(3)移植后所得的个体的细胞核必须是一个正常的二倍体核,而不是单倍体或多倍体核;(4)被移植的那个细胞核本身或其表型必须要有遗传标记,以便和可能因未被除尽而残留在受体卵内的卵原核参与了个体发育的情况相区别。迄今能满足其中个别要求的两栖类只有豹蛙(*Rana pipiens*)及其变种可用色素标记,以及爪蟾(*Xenopus laevis*)及其变种可用单核仁和双核仁标记(见Eisadale等, 1958; Di Berardino, 1997)。其中最广为引用的例子便是上述用爪蟾蝌蚪肠细胞核移植后获得的2个能生育的成体(Gurdon和Uehlinger, 1966)。对于这一实验结果仍有争议,因为(1)作者判断肠细胞的已分化状态所用的标准是细胞形状的大小,证据不够(Brun, 1978);(2)至今没有见到作者或其他人对此有重复验证的报道。至于用培养的两栖类幼体或成体的肝细胞、表皮细胞、肺细胞、成红血球细胞、红血球细胞、白血球细胞以及肿瘤细胞等移植后都未获得有发育“全能性”的成年个体,即使经过一代以上的连续移植也未成功(见Di Berardino, 1997)。

在过去对鱼类体细胞核移植的介绍中大家忽略了一个重要的记录,那就是中国的吴尚懃等(1982)首先报道了,直接将鲤鱼成体的红血细胞核移植到金鱼去核卵中。她们报道在4年中共移植了5106个鱼卵,最后获得了3尾幼鱼,其中2尾因感染真菌于2个半月后死亡,另一尾待该文发表时已成活了17个月。它是具有中间性状的核质杂种鱼,其单尾鳍、体长、大鳞片、喜跳跃等性状都似鲤鱼,而嘴形状、无口须则似金鱼。陆仁后等(1982)用长期培养并经秋水仙诱变的四倍化的草鱼尾鳍细胞核进行移核,仅获得了肌肉效应期的胚胎。

后来,陈宏溪等(1986)又报道了二组实验:(1)将鲫鱼的肾组织的细胞短期培养后,移植到同种鱼的去核卵内得到囊胚,再将其的囊胚细胞核第二次移植到同种鱼的去核卵内,最后得到一尾成鱼(1.2%),它的染色体数目为三倍体($2N=150$),外观像雌性,但实际上它的性腺发育不良;(2)用金鱼的肾组织的细胞短期培养后,同样经过二次连续移核到白鲫或鲫鱼的去核卵内仅得到3尾幼鱼,它们的尾鳍像金鱼。从这些实验中,作者们认为(1)这些移核鱼都是来自短期培养的鲫鱼和金鱼肾细胞核,而不是因雌核发育或受体卵内未剔尽核的参与发育等情况而发生。它们中有少数细胞核仍保持遗传的“全能性”,并能促进去核卵发育成“性成熟”的个体;(2)连续移植能促进移核卵的更进一步发育,增加了获得成鱼的可能性。

对以上的结论不妨提出以下的讨论(1)用于移核的鲫鱼肾细胞培养的纯度如何,是否也含有其它干细胞在内(如来自血球和结缔组织的干细胞)?(见Di Berardino, 1997对此问题的讨论)。因为即使产生“多莉羊”的乳腺细胞培养中也含有约10%的非乳腺细胞(Walton等, 1996),因而有人对

“多莉羊”的来历提出了质疑(2)由鲫鱼的肾组织的细胞核所获得的那尾鱼(2N=150)实际上其性腺并未发育好。在鱼类有性杂交后代中,经常会见到性成熟的第二性征,但实际上它们却是一种“性腺不育”的现象(Gonadic sterility)(Susuki和Fukuda,1973)。在青鳉的移核鱼中,这种现象也表现得很典型,它们能分别雌雄,其雄性个体的精子是活的,也能使卵子受精,但受精后的胚胎却不能发育下去(见Niwa等,1999)因此像这样的个体似乎还不能认为它们具有发育的“全能性”。(3)如果它不是同源三倍体(Homotriploid),那么在无精子进入移核卵的情况下,其中多余的那组单倍体(1N=50)来自何处,如果排除了卵原核的参与,则对此应作何解释?对于这些问题如果能将体细胞核加以标记,或在表型特性不同的变种、亚种和种之间进行移核,将有助于解决这些问题,因为在鱼类中利用核质杂交来验证是可以做到的。

另外,张念慈等(1989)用经过传代培养的草鱼体节初期胚胎细胞(属间)和传代培养的青鱼囊胚细胞核(亚科间),移植到团头鲂卵内,获得了肌肉反应期的胚胎。林礼堂等(1996)在不同属、科、目的鱼类中,直接用成鱼体细胞核作核供体,进行二次继代核移植。他们将(1)鲫鱼(*Carassius auratus*)(2)鲮鱼(*Cirrhinus molitorella*)和(3)尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)的肾细胞核移植到鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的成熟去核卵中。结果仅分别在属间组合中,获得了发育到血液循环期的幼鱼;在亚科间组合中,获得了发育到心脏跳动期的晚期胚胎;在目间组合中,获得了发育到肌肉效应期的胚胎。他们的推论认为,在硬骨鱼类中,用体细胞核代替囊胚细胞核进行核质杂交是可行的,如组合恰当,移核卵有可能发育成完整的个体。

余来宁等(1996)用电融合法,先将草鱼肝细胞株的细胞核与草鱼的未受精卵(未除去卵细胞核)融合,获得了囊胚细胞,再将此囊胚细胞核进行第二次继代移入草鱼的未受精卵内,其目的有4方面:(1)试验电融合方法的效果;(2)试验体细胞核能否发育为具有抗病毒的移核鱼;(3)不除去受体卵的核以简化移核手续。最后在继代移核卵中获得了1尾1年龄的移核鱼。他们检查了供体细胞核为正常二倍体(2N=48),但尚未检查该移核鱼的染色体。由于草鱼的性成熟期要4~5年,所以这尾鱼是否具有发育的“全能性”尚未明确。作者们认为这些方法结合起来是获得体细胞移核鱼的一种新途径。但在这一实验中又增加了另一个新问题,即没有被除去的那个卵原核到哪里去了?这一点可结合以下的实验进行讨论。

4 未去核的未受精卵内的细胞核移植和电融合法的核移植

易永兰等(1988)为了简化细胞核移植技术,进行了鱼类囊胚细胞与卵的电融合试验。实验分三组(1)大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)的囊胚细胞和同种鱼的未受精卵融合获得了4尾正常鱼苗(0.013%)(2)大鳞副泥鳅(雌)

×鳊尾泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*,雄)所得的杂种囊胚细胞和大鳞副泥鳅的未受精卵融合获得了5尾正常鱼苗(0.004%),它们的外部形态基本上与供体杂种鱼类类似;(3)鲤(*Cyprinus carpio*)囊胚细胞和红鲫(*Carassius auratus*, red variety)的未受精卵融合获得了4尾与供体鱼类似的鱼苗(0.006%)。由于这些鱼苗未作染色体分析,它们是否为正常的二倍体不清楚。尽管其中出现了大量畸形胚胎和少量畸形鱼苗,而且融合率较低,但作者认为这种电融合法的核移植是可行的,不过尚存在着一些有待完善的技术问题。李书鸿等(1993)又重复用大鳞副泥鳅的囊胚细胞和同种鱼的未受精卵融合,得到了80%的融合率和20%的幼鱼孵化率,但未得到成鱼。

余来宁等(1989)在不同鱼类间,将囊胚细胞细胞核移入不去核的未受精卵内。实验分四组,其7天幼鱼的成活率分别为:(1)红鲤核移入鲫的未去核的未受精卵内(属间,1.2%);(2)草鱼核移入团头鲂的未去核的未受精卵内(亚科间,0.7%);(3)鲮(*Hypophthalmichthys molitrix*)核移入团头鲂的未去核的未受精卵内(亚科间,0.6%);(4)尼罗罗非鱼的核移入金鱼的未去核的未受精卵内(目间,0%)。这四组胚胎的染色体均为供核型二倍体。在第一组中还获得了一尾成活6个月的供核型二倍体鲤鲫核移鱼。因此,作者认为未受精卵内的单倍体卵原核,在供体的二倍体核移入后的发育过程中被排斥了,因此去核过程可以省略。

Niwa等(1999)将一种具有野生形体色品系的青鳉(*Oryzias latipes*)的囊胚细胞细胞核移入另一种具有橘红色品系的青鳉未去核的未受精卵内。其中有27个(3.2%)长成成鱼(有第二性征,14个雌性,13个雄性)。根据对这些核移鱼的葡糖磷酸变位酶(Phosphoglucumutase)DNA含量和染色体计数,均证明它们的细胞核是由移入的细胞核和未被去掉的卵原核合并成的三倍体,而且都是不育的。显然其中也出现了“性腺不育”的现象(Susuki和Fukuda,1973)。

综上所述可提出以下几点讨论(1)在鱼类中用电融合法来代替注入法进行移核实验,其效果并不一定更好,因为鱼卵和所用细胞的直径相差悬殊,在显微镜下很难将两者一对一地对准在鱼卵的某个部位用电融合法进行操作。所以融合时只能将含有许多细胞的悬浮液与鱼卵放在一起,结果可能有多个细胞与卵融合,而融合的部位也是随机的,最后得到了各式各样不正常的胚胎或幼鱼,要从中再筛选出正常的个体,手续并未简化(李书鸿等,1989)。(2)从在去核的未受精卵内移核的结果来看,中国作者和日本作者所得的结果完全不同。这可能是因为所用的实验材料不同所致,但在同种鱼类内,用不经标记的核移入未去核的未受精卵内,对于最后所得的个体,究竟是来自被移入的核还是由于卵原核所引起的雌核发育是很难说清楚的,因为在鱼类中,卵子自然的雌核发育(Purdum,1969;Stanley和Sneed,1973)和人工的雌核发育是很容易发生(Matsubara K,Arai K,和Suzuki R,1995;Horvath L,Orban L,1995)。现在已可用报告基因标记等办法来追踪早期胚胎中的基因表达,但还未能

解决对早期活细胞核的标记问题(Lin,1994,Ju,1999)。因此,在这种情况下用不同种鱼类进行核质杂交仍是进行这方面研究的一个可行办法。

以上介绍了有关鱼类核移植(克隆)研究的一些主要成果和讨论,但还有一些问题是在鱼类、两栖类和哺乳类核移植(克隆)的研究中都共同存在的,例如:

(一)在细胞核移植研究中所指的发育的“全能性”,有它严格的定义,即应准确地释为,由此所得到的动物应能发育到“性成熟”并能繁殖后代。如果仅得到了一个复制的胚胎或不是性成熟的个体,则只能认为该细胞核只是在不同程度上恢复了发育的“多能性”(Pluripotency)。这种结果在用核移植研究的各种动物中已屡见不鲜,但两者有很大区别,不能混为一谈。

(二)同行们已一致同意,在用细胞核移植法研究“已分化的细胞”或“体细胞”为材料移核时应明确的标准。而今在各种报道中对“已分化的细胞”或“体细胞”这些名称的使用却大有差别。因为作者们对“已分化的细胞”或“体细胞”在性质上的判断不一致。例如,对最广为引用的例子是用爪蟾蝌蚪肠细胞核移植后,获得了2个能生育的成体。因其仅靠细胞的大小来判断所用的细胞是“已分化的肠细胞”,其证据不确凿。一般地说,除了从发育的起始阶段以后,胚胎细胞便开始进行不同程度的分化,这些不同程度分化的细胞,不论在幼体、胎儿以至成体中都始终存在。例如,在许多动物组织中都有供再生用的“干细胞”,特别是像“乳腺上皮细胞”。身体表面的各种上皮细胞。输卵管上皮细胞等,它们在生存一段时间后都会死亡,而由新的“干细胞”,经不断地分化而补充之,而分化又是一个渐进的过程,所以在这类组织的混合培养中,可能包含着各种不同分化程度的细胞。至于卵丘细胞则是一种并未很好分化的营养性细胞,成纤维细胞也是一种并未完全分化的多潜能细胞。由于这些细胞都可叫做“体细胞”,而对它们的分化程度现在还没有办法来确定其标准,所以对这些偶然获得的结果,到底是因为极少数“已完全分化的体细胞”还能恢复其发育的全能性?还是由于被移植的正好是“少数并未完全分化的体细胞”,对此尚难作出评价,目前这些报道的成功率也尚无规律可循,大家正在为此继续作出努力。

(三)迄今对上述所有提到的,用幼体或成体的体细胞核所获得的“克隆动物”实验本身都未被重复证实,而“重复验证”是检验科学成果的最起码要求。尤其甚者,当国际同行科学家要求“多莉羊”的作者重复验证其结果时(Zinder和Sgaramella,见Bovsun,1998)却遭到了其资助者的断然拒绝(Colman,1998)⁶。中国的科学家想重复验证自己的发现,既不受重视又得不到支持,而为什么对国外不经“重复验证”的同样的工作就那么相信和推崇呢?

(四)一般地说,科学上的许多重大成果都是先发表科学论文,然后再由新闻报道加以介绍,但自从把科学问题和商业行为结合之后,问题就变得复杂了。某些公司通过媒体对克隆动物先进行“炒作”已经不是第一次了。在1992年8月

12日美国纽约出版的“世界日报”上就登载过署名报道,题目是“无性繁殖牛大羊壮”,内容是说:一群英、美生物学家尝试以无性繁殖科技,复制出品系优良的牛羊,不料竟然造出一批巨兽,震惊了科学界。这篇报道说的显然是与多莉羊类似的方法,结果很具体,而且数目之多令人吃惊。为此,我们曾多方设法追踪其来源,原来纯属“子虚乌有”。而且现在有的商业机构往往又以“专利法”保护为由,拒绝透露用体细胞克隆动物的细节。由于现在用“未分化细胞的核”已能在许多动物中获得“克隆动物”,而现有的知识和技术却又无法来鉴别那些克隆动物究竟是来源于“分化的核”还是来源于“已分化的体细胞核”,那最后怎么办呢?这是一个非常重要的问题。现在大概已没有什么人愿意浪费时间,去重复连原作者本人也无法重复的实验了。科学家对待科学的成果应当是严肃的。

回顾历史,展望未来,那么在鱼类核移植研究方面还可能有哪些作为呢?中国在这方面的研究曾处于国际“领先”地位,这是事实,但这也是历史。过去国外之所以缺乏这方面的研究至少有两个原因:(1)在许多发达国家中,对淡水食用鱼类的养殖和遗传育种的研究并不发达,对用难度大的方法去改良鱼类品种,其需要并不迫切;(2)许多实验室习惯于利用他们所能饲养的小鱼为材料。例如,青鳉和斑马鱼等,它们都能在实验室内控温、控时产精产卵,而且性成熟期短,一年之中可以反复使用,无需多方面的合作。但是并非这些鱼类都适合于作为核移植的材料。

与两栖类的核移植研究相比,对鱼类的研究深度还远远不够。另外,由于鱼类生活在水体中,许多鱼类的繁殖季节相仿,生物隔离的生态系统不十分严格,有些鱼类的染色体数目又很多,还出现了许多“表型”上的“多态性”,而这些“多态性”又并非属于物种之间“基因型”(Genotype)的差别。对它们的遗传背景不易搞清楚,在研究上便有困难。由此可见,这种“领先”的基础并不巩固。但由于上述原因,估计这种国际空白的情况还会持续一段时间。如果我们能抓紧这个机遇,利用鱼类的特点和我们已有的工作基础,去研究上述在其它动物中还无法解决,或正在进行解决的问题,那么我们无疑还可以继续争取作出很好的贡献。可惜的是进一步的研究必需结合到分子生物学的探讨,而在目前的中国,科学家们对交叉学科的训练和基础知识的了解却又远远不足,所以这是一个一时还难以解决的实际问题。对科研不重视“继往”和“开来”的结合,把不同的学科简单地分为“新”和“旧”,并以此为据来使用人才和决定资金的投入就很容易将一些重大而又持久性的工作毁于一旦。这种情况在我国并不仅仅出现在“克隆动物”的研究领域。

据我拙见,首先对基础理论研究不能忽视,因为现在已经出现了技术上难以解决的问题。至少有四方面的问题应当继续进行研究:(1)在远缘鱼类物种之间可克服核、质的不亲和性而获得有发育“全能性”的核质杂种鱼,这在两栖类和哺乳类中至今还未获成功,其原因是什么?是物种进化上的原因,还是仅仅属于技术上的问题?而且在核质杂种鱼中明

显地表现出细胞质的功能以及它对细胞核的影响,它的物质基础和作用机理是什么?(2)用体细胞或培养的体细胞核已获得了移核鱼(克隆鱼),但其中有的核型为三倍体,在这种情况下能否完全排除卵原核的参与?(3)怎样才能用客观的指标来确定体细胞已分化到什么程度?在培养的体细胞中是否能肯定不存在尚未完全分化的,或其它干细胞被在移核时误用了?用什么办法可证明这一点?(4)在二种亲缘关系虽较远的鱼类中,只要它们之间的染色体数目相同,就比较容易进行“有性杂交”和“核移植杂交”,但“有性杂交”的后代是不育的,而“核质杂交”的后代是可育的,二者之间的共同点和差异的基础是什么?(4)在“三倍体移核鱼”和“有性杂交鱼”的后代中都出现了“性腺不育”现象,因此并不能认为它们具备了发育的“全能性”,造成这种后果的原因是什么?(5)在未去核的未受精卵中移核后,对卵原核是否参与移核卵的重建问题,不同作者报道的结果完全相反,其原因何在?

在应用方面当然也要加强探索,例如:

(1)在动物的核移植研究中有一个很重要的目的是可用它研制纯化的“模型动物”,因为在种内由“克隆动物”再克隆是可以做到的(若山辉彦和柳町隆藏,1998),而且可以缩短纯化的时间。例如将自然界所存在的、或人工诱变而得的突变体进一步纯化为稳定的“突变体模型动物”。又如,在鱼类育种中,传统的办法之一是从江河湖泊中自然选育出优良个体,再进行驯化繁殖,但由于对这些个体的历史背景不清楚,育种所耗时间往往很长。如用克隆的办法使它们连续产生纯化的后代,因为这些后代都是单性别的,所以可以得到稳定而又严格隔离的雌、雄个体。再用性别转化的办法(Horvath和Orban,1995)将单性别的克隆鱼转变为双性,以此为基础再进行自交或品种间杂交,这样就能缩短纯化和育种的时间。鉴于长期的鱼类品种内自交繁殖会出现某些退化现象,因此长期使用纯种“克隆鱼”自交并非上策。但用纯化的“克隆鱼模型”进行品种间的杂交繁殖就可以对其后果有所预测,比较理想。

在这方面我们也应当注意中国自己实验材料的可贵性。现在国外都在注意研究青鳉和斑马鱼中的一些突变体,而它们在形态直观上并不明显。中国有很多特有的金鱼突变体,它们的形态直观却非常明显,而且是经过历史悠久的人工选育而成的。它们的差异可表现在各个方面,而且一目了然。这些表型特征的差异当与其基因型的表达和调控有直接关系。如果,将这些现有的突变体用“克隆”的办法,获得进一步纯化,再用它们作为研究发育、分化、遗传以及基因表达和调控机制的“模型动物”,是非常理想的,有望获得很好的研究成果。

(2)克隆“转基因动物”正在研究之中,目前对用它们作为食品和它们对生物多样性及生态环境可能产生的影响等问题,科学家们还有很多争议。不过对用转基因动物制备一

些天然药物或疫苗似乎前景看好,不过由于鱼类的卵子很多,所以研制“转基因鱼”并非一定需要用“克隆技术”来配合。

(3)用克隆的办法对濒危动物进行保种和繁殖也是一个令人感兴趣的问题。濒危动物一般是指珍稀动物,它们面临濒危的原因主要有三方面:第一,是它们本身的繁殖率低;第二,是它们赖以生存的生态环境遭到破坏;第三,是对之过度捕捞或捕猎。用“克隆”的办法使之增加繁殖是一种好的愿望,但是否可行尚难预测。因为它们本身的繁殖率低,不可能获得相当数量自己的胚胎细胞和受体卵,因此必须利用体细胞或其它非生殖细胞的核作为供体,并用异种动物的卵作为受体。这样,至少涉及体细胞能否恢复其发育全能性,和如何克服种间核移植的不亲和性这两大问题,这就需要为时不短的探索。在鱼类中目前已证明可获得“核质杂种鱼”,但尚未有人提出这样的濒危对象值得一试。有的“克隆”对象生活在水中,很像鱼类,但它们却是哺乳动物。

总之,对“克隆动物”的研究,已经延续了半个多世纪,从科学的意义来说,对它所希望解决的有关发育、分化和遗传等理论问题还远远未见分晓。从应用技术上说也并非“高不可攀”,因为用“未分化细胞”获得“克隆动物”,在多种动物中都已比较成熟,每项研究都有它的发展过程,从基础理论研究到应用开发,再从应用开发中出现的问题回到理论探索,循环不已。在不同的动物中,有许多是共性的问题,也有特殊的问题。另外,任何一个学科,任何一种技术都有它的局限性,不可能到处可以适用。当然科学研究是没有止境的,现在没有成功的试验,也许将来可以实现,这要靠努力去实践,而不是“舆论先行”,靠媒体的炒作,更重要的是“贵在坚持”和“精益求精”。就我国过去的情况来看,对许多重要研究项目的起始规划听起来似乎“雄心勃勃”,但却往往不能持续、稳定地进行下去,而且急于求成。后来又又在强调竞争机制的同时,忘记了团结合作、相互配合的优良传统,甚至相互贬低,结果使许多工作中断或停滞不前。这种失误,往往会使科学家坐失良机,后悔莫及。我国对“克隆鱼”的研究状况就是其中的一例。另外,现在许多人已开始注意到了与科学事实相违背的一些“伪科学”的欺骗性,但对有一些纯粹为了商业目的而加以“炒作”的“科学问题”却还在被掩盖着,有待于被认识。这就是当前影响我们科学正常发展的一个值得注意的问题。

* 为科学问题撰写述评,既要有述,也要有评。述是介绍客观存在的科学事实,评是对所列事实的评议,它不可避免地会表达出述评者对事物分析后的观点和意见,它们往往可能是片面的、局限的或不完整的。但它的意义在于可能会从而引发一番讨论,那么大家对科学真理的认识就会因此而向前推进一步。在国内,过去对科学问题的公开讨论比较罕见,科学界应当鼓励有不同意见的切磋,才会有利于“百家争鸣”方针的贯彻。本文欢迎批评指正。

文献说明:本文原列出了94篇参考文献,因篇幅太大,现仅列出以下几篇,读者们可从[3][4]中再查出原文献。但在文章中列出了所述各实验结果的作者和年份,以作为引证之根据,也便于读者们进一步查证。

参 考 文 献

- [1] Mckinnell R G. "Cloning-Nuclear Transplantation in Amphibia" University of Minnesota Press Minneapolis ,U. S. A. 1978
- [2] Spemann H. "Embryonic development and induction" ,Yale University Press. *New Haven Conn* . Reprinted by Hafner Press(Macmillan Inc.) , New York ,1962
- [3] Di Berardino M A. "Genomic Potential of Differential Cells" ,Columbia University Press ,New York ,U. S. A. 1997
- [4] YAN S Y (严绍颐); "Cloning in Fish-Nucleocytoplasmic Hybrids" ,Educational and Cultural Press Ltd. ,Hong Kong (in English). 1998
- [5] Tung T (童第周) ,Wu S C ,Tung Y F Y *et al* . Nuclear Transplantation in Fishes. *Scientia Sinica(notes)* ,1963 ,14(8) :1244(in English)
- [6] Colman A. from PPL ,In "Sheep Clones Challenged" UPI Science News ,Washington ,USA Jan. 30

A Historical Review and Some Comments on the Nuclear Transplantation in Fish

YAN Shao-Yi

(Institute of Developmental Biology , The Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080)

Abstract In this review article , a brief history and main results of the studies on the nuclear transplantation(cloning) in fish was introduced. Late Professor T. C. Tung(TONG Di-Zhou) , a noted Chinese Experimental Embryologist and his research group at the Institute of Zoology , the Chinese Academy of Sciences(CAS) in Beijing , China initiated and established successful technology of nuclear transplantation in fish in 1963. During the past 36 years , most of the studies on fish cloning were performed mainly by Chinese groups except only one article was published by authors in former USSR (Gasaryan *et al* . 1979). and the other one was published by Japanese authors in Japan(Niwa *et al* . 1999).

The primary goals of the studies of Tung 's group were : (1) to study the inter-relationship between the nucleus and the cytoplasm in terms of the controlling effects determined by nucleus or cytoplasm or both during the ontogenesis , cell differentiation and phenotypic expression in a developing animal ; and (2) to produce fish clones of commercial importance for agricultural purposes.

The most successful results that have been obtained by Tung 's group in collaboration with the investigators at various fisheries institutions in China were the production of nucleocytoplasmic adult hybrid fish between different varieties , species , genera and subfamilies that produced viable offspring. Furthermore , these nucleocytoplasmic fish hybrid revealed that while most phenotypic characteristics are controlled by the nucleus , a few are controlled by the cytoplasm or by both. In addition , the resulting nucleocytoplasmic fish hybrids also showed some better characteristics of economic importance such as faster growth rate , increasing of protein content and reducing of fat content in muscle , *etc* . So far , no such kinds of evidences are available either in amphibian or in mammals.

Another most important result obtained by other Chinese groups showed that the uncultured or cultured adult somatic cell in fish which can support the nuclear transplanted eggs developing into adults. They were : (1) a 17 month old goldfish obtained by transplanting an adult erythrocytes into an enucleated egg(WU *et al* . 1982); (2) a subcultured kidney cell nucleus of Crucian carp(*Carassius auratus*) can support the transplanted enucleated egg of same species developing into a three years old adult with female sexual characteristics(CHEN *et al* . 1986) and (3) a cultured liver cell nucleus from grass carp(*Ctenopharyngodon idellus*) can support a nuclear transplanted unfertilized egg of the same species developing into an adult fish at least of one year old when that paper was published. Some discussions and comments for evaluating the results obtained from previous studies and suggestions for further investigations in this research field are also provided. More detailed information could be found in the book—"Cloning in Fish-nucleocytoplasmic Hybrids" which was written by Shaoyi Yan in English and published by International Union of Biological Sciences and Educational and Cultural Press Ltd. Hong Kong in 1998.

Key words The nuclear transplantation , fish