

化学诱导法——卵母细胞去核新策略

王 强* 顾 玲 张 涌

(西北农林科技大学生物工程研究所 杨凌 712100)

摘 要 哺乳动物体细胞克隆技术在过去的几年里取得了飞速发展,但是核移植的效率依然很低。于是人们不断的从各个方面进行探索,去核方法随之也成为其中的一个热点。但是传统的物理去核存在着技术要求高、耗费时间长、对细胞损伤大的缺点,作为思路转换的产物,一种新的卵母细胞去核技术——Deme 诱导去核引起了各国科学家的广泛关注。文章着重介绍了 Deme 诱导去核辅助的核移植程序, Deme 诱导去核成功率的影响因素, Deme 诱导去核方法对卵母细胞及克隆胚胎的影响,并结合作者从事的研究对该方法目前存在的问题及某些环节可能的改进措施提出了看法。无论如何, Deme 诱导去核方法的有效应用仍然需要作进一步的深入研究。

关键词 诱导去核 脱羧秋水仙碱 (Demecolcine) 核移植 克隆效率

中图分类号 Q813 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2003)06-0763-04

随着体细胞核移植技术的迅速发展,克隆绵羊^[1]、牛^[2]、小鼠^[3]、山羊^[4]、猪^[5,6]、猫^[7]纷纷诞生。但是显而易见,各种动物的克隆效率依然很低^[8]。为了完善这一技术,人们不断地从各个角度进行探索。在核移植过程中,供体核(Karyoplast)与受体胞质(Cytoplast)是重构胚的两个重要组件,尤其后者对于促进核重塑及胚胎进一步发育至关重要。因此,获得具有良好发育潜能的去核卵母细胞是动物成功克隆的关键因素^[9]。与之相应,去核方法也就成为核移植研究的一个重点。

目前,人们主要是通过显微操作机械性的去除核染色质来获得受体胞质。但该方法却存在着技术要求高、耗费时间长、对细胞损伤大的缺点。于是作为一种思路转换的产物,化学诱导去核法产生了(以下简称诱导去核, Induced-enucleation, IE)。其主要原理是应用破坏微管稳定的药物(Microtubule-de-stabilizing drug)处理激活的卵母细胞,借以干扰染色体的正常分离和纺锤体的功能,促使核内所有染色质随同极体一起排出,进而获得核移植所需的受体胞质。与物理去核相比,它的主要优点有:操作简单、物理损伤小、胞质丢失少、重复性好,适合于大规模的卵母细胞去核和克隆动物的生产。鉴于目前国内尚无相关报道及该方法乐观的应用前景,笔者结合正在从事的部分实验研究对脱羧秋水仙碱(一种破坏微管的药物, Demecolcine, 以下简称 Deme)诱导去核法作一综述。

1 化学诱导去核法简短的发展历程

Fulka 和 Moor 首先报道应用鬼臼亚乙苷(Etoposide, ETO, 一种 DNA 拓扑异构酶抑制剂^[11])和放线菌酮(Cycloheximide,

CHX, 一种蛋白质合成抑制剂^[12])联合处理小鼠 M I 期卵母细胞,去核率达到 96%。可是据 Elsheikh AS 等先后报道^[13,14],分别应用 ETO-CHX 和 ETO 处理的去核卵母细胞与小鼠 2-细胞卵裂球重构得到的胚胎各自只能发育到 4-细胞阶段及 4% 的囊胚率,受体胞质支持供核发育的能力受到明显抑制。直到最近, Baguisi 和 Overstrom^[15]应用 Deme 诱导去除小鼠卵母细胞核染色质,获得 54%(27%~70%)的去核率、70% 的重构胚卵裂率、42% 的囊胚发育率并有 4 只健康克隆小鼠出生,大大提高了小鼠的克隆效率^[16]。这一报道引起了各国科学家的广泛关注,该方法先后被应用于兔^[17]、山羊^[18]、牛^[19]和小鼠^[20,21]的卵母细胞去核研究,且得到了较高的去核率,并有克隆小鼠和兔克隆胎儿的产生。

2 Deme 诱导去核法辅助的核移植程序(图 1)

2.1 Deme 诱导去核(IE)程序

目前,应用于小鼠、兔、牛和羊上的 Deme 诱导去核程序主要包括以下几个环节:选择体内或体外成熟的 M II 期卵母细胞,激活后(Postactivation, P.a)在特定时间内置于一定浓度的含 Deme 培养液中作用一段时间,再经 Hoechst 染色,检查去核效果。该方法成败的关键在于对各个环节的时间控制(Time administration)。

2.2 Deme 诱导去核后的注核程序

选取去核完全的卵母细胞作为受体胞质,通过两种方法将供体基因组移植到胞质中。Baguisi^[15]和 Roslin 研究所的 Gasparrini 等^[20]分别将卵丘细胞与 HM-1 ES 细胞核直接注入

收稿日期 2003-06-02, 修回日期 2003-08-22。

基金项目 科技部 863 高技术研究发展计划资助(No. 2001AA213081)。

* 通讯作者。 Tel: 86-29-7091851; E-mail: wangqiang7864@yahoo.com ©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

到上述胞质中,分别得到了4只、1只克隆小鼠。Yin X^[17]等采取先将第二极体吸出,然后再把兔耳部皮肤成纤维细胞核注入到透明带下,通过电融合的方法进行核移植,得到了兔克隆胎儿。以上实验结果证明,诱导去核后的受体胞质可支持两种核移植程序下克隆胚胎的全程发育。但为了进一步提高克隆效率,笔者认为在以后的研究中有必要对上述两种程序作一比较,加以优化。

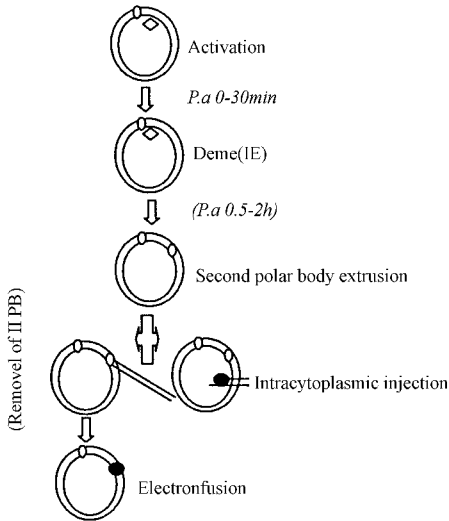


图1 诱导去核辅助的核移植程序

Fig.1 (Nuclear transfer assisted with IE)

3 影响 Deme 诱导去核成功率的因素

结合当前小鼠、兔、牛和羊的研究结果与笔者正在从事的部分实验加以综合分析,我们认为影响 Deme 诱导去核成功率的主要因素有以下三个方面。

3.1 卵母细胞的遗传背景

从目前的研究来看,不同动物甚至同种动物不同品系的卵母细胞的诱导去核成功率也有很大差异(表1)。Ibanez等^[21]比较了B6D2F1和CF1小鼠的去核率(6.9%与21%),二者存在明显的差异。Gasparrini等^[20]对B6D2F1和B6CBAF1小鼠进行了类似的研究,虽然它们的去核率无太大区别,但在随后的重构胚发育能力方面表现出严重的品系依赖性。另外B6D2F1小鼠在不同实验室报道的去核率有很大差距,

其原因还不很清楚。全面分析表1资料可以看出,卵母细胞的遗传背景对去核成功率有很大影响。

3.2 Deme 处理起始的时间

激活完成至开始 Deme 处理的时间间隔是影响去核率的另一个重要因素。Baguisi等^[15]的研究结果表明,小鼠卵母细胞激活后10~15min放入含Deme培养液中处理,去核率可达54%(27%~70%)。但随后的报道^[18,20,21]却认为,激活后的小鼠卵母细胞迅速放入含Deme培养液中比延迟Deme处理可获得更高的去核率。牛卵母细胞在激活后30min进行Deme处理,去核率仅为10%~16%,而在激活后1~2h放入含Deme培养液中,去核率可提高到60%~91%^[19]。在山羊,激活后30min进行Deme处理,激活卵母细胞的去核率达63%^[18]。据我们在实验过程中的初步统计,昆白系小鼠卵母细胞在激活后0~5min进行75min的Deme处理,去核率在40%左右(资料待发表)。因此不同遗传背景的卵母细胞进行Deme处理时,采取的时间间隔有所不同,这很可能与它们各自的细胞周期进程不同步有关。一般来说,Deme处理应在激活卵母细胞由第二次减数分裂后期(Anaphase)向末期(Telophase)过渡时进行^[15,20,21]。

3.3 卵母细胞对 Deme 的耐受程度

从目前的资料来看,不同动物卵母细胞对Deme的敏感程度有所不同。在牛、羊、小鼠的去核研究中,采用0.4μg/mL的浓度,而在兔的去核研究中,所用浓度为0.6μg/mL(试剂均为Sigma公司产品)。据笔者观察,用0.6μg/mL的含Deme培养液处理小鼠卵母细胞,会使核染色质高度浓缩成小团,而0.4μg/mL组则相对较松散。另外,Deme处理时间的长短对去核率的影响尚有不同看法,Ibanez^[21]和Baguisi^[15]等的结果表明,Deme处理45~75min获得相对较高的去核率,而Gasparrini等^[20]认为,Deme分别处理15、30、45min后,各自的去核率无明显差异。

除上述几点外,笔者认为卵母细胞的卵龄及激活的方法和强度也是两个不可忽视的因素。这是由于不同卵龄卵母细胞对激活的敏感程度不同^[21],而且经化学去核的卵母细胞的卵龄严重影响重构胚胎的卵裂率^[13]。同时较强的激活刺激往往使第二极体不能排出,形成两个或多个原核^[22],导致去核率下降。

表1 不同遗传背景卵母细胞的去核率及克隆胚胎的发育率

Table 1 The enucleation rate of oocytes with different genetic background and development rate of cloned embryos

动物品种	去核率	卵裂率	囊胚率	克隆后代数	参考文献
B6D2F1 小鼠	54%(27%~70%)	70%(85/121)	42%(50/121)	4只健康	[15]
	23%~100%	—	—	—	[18]
	21%	14(25/178)	2%(4/178)	1只健康	[20]
	6.9%	—	—	—	[21]
CF1 小鼠	21%	—	—	—	[21]
B6CBAF1 小鼠	21%	36(130/360)	14%(50/360)	—	[20]
牛	60%~91%	48%(51/106)	27%(14/51)	—	[19]
山羊	63%*	—	—	—	[18]
兔	18/18	—	33%~55%	4只胎儿	[17]

注:*示激活卵母细胞去核率=去核卵母细胞数/激活卵母细胞数

其余为总去核率=去核卵母细胞数/总处理卵母细胞数 “—”示作者未作该项研究

4 诱导去核程序对卵母细胞及克隆胚胎的影响

4.1 预激活的影响

在诱导去核程序中,卵母细胞需要预激活处理。现在大多研究者都选用乙醇^[15,18,20,21]或离子霉素(Ionomycin)^[15,17],而二者均能引起胞质内Ca²⁺的迅速增加,促使卵母细胞快速进入分裂后期^[23],这会使后期的Deme起始处理时间不易掌握。所以选用作用较温和的能引起Ca²⁺多次波动性升高的激活剂(如SrCl₂^[25]),或许会更有助于诱导去核程序的优化。

另外,预激活会使胞质中的成熟促进因子(MPF)水平迅速下降,而低水平MPF的受体胞质不利于体细胞核的重新编程^[26,27,28],不过却似乎更倾向于支持卵裂球作为供核的克隆胚胎的发育^[29]。但也有学者认为,应用化学诱导法获得的受体胞质可能具有较高的MPF活性^[11,15]。这一结果在其他实验研究中未见报道,尚无定论,还需进一步深入研究。

4.2 Deme的影响

Gasparrin和Ibanez等^[20,21]研究发现,Deme可以抑制激活后卵母细胞纺锤体的旋转和第二极体的排出。Yin XJ和Kato Y等^[30]将猪体细胞克隆胚胎在含Deme培养液中处理1h,不仅有利于供体核的重塑,而且还可防止出现染色质扩散(Scattering)现象,通过该方法得到了8头克隆仔猪。对于Deme在其他方面的影响人们目前还知之甚少。不过Deme作为一种破坏微管稳定的药物,肯定会对由微管介导的生物学过程有一定的影响,例如原核形成、胚胎卵裂等。这种影响在一定程度上可能取决于各生物学过程的可逆性。因此,笔者以为选用一种可逆性破坏微管稳定的药物代替Deme,既可优化诱导去核程序,又可减少对卵母细胞和克隆胚胎的损伤。

总之,在Deme诱导去核技术被有效应用于卵母细胞去核之前,其作用机制及影响应被全面系统地研究。

5 展望

任何技术的出现有其必然的背景,任何技术的成熟需要不断的完善。化学诱导去核法是一种刚刚发展起来的技术,在有着诸多优点的同时肯定也存在着一些已被认识或尚未被了解的缺点。它作为一种化学手段,不可避免的会对克隆胚胎或出生后代产生直接或间接的影响。笔者认为以后应当加强以下几个方面的研究(1)诱导去核化学药物的发现和筛选(2)诱导去核过程中卵母细胞骨架及细胞周期进程的动态变化(3)去核程序对重构胚全程发育的影响(4)诱导去核法在不同动物上的应用。相信在全世界科学家的共同努力下,这一技术一定会不断的趋于完善,从而有效的应用于克隆动物的生产。

REFERENCES(参考文献)

[1] Wilmut I, Schnieke A E, Mewhir J *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997 **385** :810 - 813

- [2] Cibelli J B, Stice S L, Golouke P J *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998 **280** :1256 - 1258
- [3] Wakayama T, Penry A C F, Zucetti M *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus nuclei. *Nature* 1998 **394** :369 - 374
- [4] Baguisi A, Behboodi E, Melican D T *et al.* Production of goats by somatic cell nuclei transfer. *Nature Biotechnology* 1999 **17** :456 - 461
- [5] Onishi A, Iwamoto M, Akita T *et al.* Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000 **289** :1188 - 1190
- [6] Poleiaeva I A, Chen S H, Vaught T D *et al.* Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cell. *Nature* 2000 **407** :86 - 90
- [7] Shin T, Kraemer D, Pryor J *et al.* A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 2002 **415** :859
- [8] Tsunoda Y, Kato Y. The recent progress on nuclear transfer in mammalian. *Zool Sci* 2000 **17** :1177 - 1184
- [9] Campbell KHS, Loi P, Wilmut I *et al.* Cell cycle coordination in embryo cloning nuclear transfer. *Rev Reprod* 1996 **1** :40 - 46
- [10] Fulka J Jr, Moor R M. Noninvasive chemical enucleation of mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1993 **34** :427 - 430
- [11] Downes C S, Mullinger A M, Johnson T. Inhibitors of DNA topoisomerase II prevent chromatid separation in mammalian cells, but do not prevent exit from mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 **88** :8895 - 8899
- [12] Clarke H J, Masui Y. The induction of reversible and irreversible chromosome decondensation by protein synthesis inhibition during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1983 **97** :291 - 301
- [13] Elsheikh A S, Takahashi Y, Hishinuma M *et al.* Developmental ability of mouse late 2-cell stage blastomeres fused to chemically enucleated oocytes *in vitro*. *J Vet Med Sci* 1997 **59** :107 - 113
- [14] Elsheikh A S, Takahashi Y, Hishinuma M *et al.* Functional enucleation of mouse metaphase II oocytes with etoposide. *Jpn J Vet Res* 1998 **45** :217 - 220
- [15] Baguisi A, Overstrom EW. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology* 2000 **54** :209
- [16] WANG H(王海), LIAN Z X(连正兴), LI N(李宁) *et al.* The problems and thoughts of mammalian somatic cell cloning. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报) 2003 **11**(2) :207 - 211
- [17] Yin X J, Kata Y, Tsunoda Y *et al.* Effect of enucleation procedures and maturation conditions on the development of nuclear transfer rabbit oocytes receiving male fibroblast cells. *Reproduction* 2002 **124** :41 - 47
- [18] Ibanez E, Sanfins A, Albertini D F *et al.* Induced enucleation of mouse and goat oocytes: kinetic and phenotypic characterization. *Theriogenology* 2002 **57** :421(abstract)
- [19] Fiesher D, Ibanez E, Albertini D F *et al.* Activated bovine cytoplasts produced by induced enucleation support development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. *Biol Reprod* 2002 **66**(suppl 1) :238(abstract 346)
- [20] Gasparrin B, Gao S, Wilmut I *et al.* Cloned mice derived from embryonic fibroblasts and cytoplasts prepared by in-

- duced enucleation. *Biol Reprod* 2003 **68** :1259 – 1266
- [21] Ibanez E , Albertini D F , Overstrom E W . Demecolcine-induced oocyte enucleation for somatic cell cloning : coordination between cell cycle egress kinetics of cortical cytoskeletal interactions , and second polar body extrusion. *Biol Reprod* 2003 **68** :1249 – 1258
- [22] DENG M (邓满齐) , FAN B (范必勤) . Intracellular free calcium changes of mouse oocytes during activation induced by ethanol or electrical stimulations and parthenogenetic development. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica* (实验生物学报) , 1994 **27** :289 – 293
- [23] CHEN D (陈大元) . Fertilization Biology (受精生物学) , Science Press 2000
- [24] Iiyin V , Parker I . Effects of alcohol on responses evoked by inositol trisphosphate in xenopus oocytes. *J physiol* , 1992 **448** :339 – 354
- [25] Swannk , Ozil J P . Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int Rev Cytol* , 1994 **152** :183 – 222
- [26] Wakayama T , Yanagimachi R . Effect of cytokinesis inhibitors , DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* 2001 **22** :49 – 60
- [27] Tani T , Kato Y , Tsunoda Y . Direct exposure of chromosomes to non-activated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol Reprod* 2001 **64** :324 – 330
- [28] Wilmut I , Beaujean N , de Seasa PA *et al* . Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2002 **419** :583 – 586
- [29] Campbell K H S , Loi P , Cappai P *et al* . Improved development to blastocyst of ovine nuclear transfer embryos reconstructed during the presumptive S-phase of enucleated activated oocytes. *Biol Reprod* , 1994 , **50** (6) :1385 – 1393
- [30] Yin X J , Tani T , Kato Y *et al* . Production of cloned pigs from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes. *Biol Reprod* 2002 **67** :442 – 446

Chemical Induction——New Strategy of Oocyte Enucleation

WANG Qiang* GU Ling ZHANG Yong

(Institute of Bio-Engineering Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry , Yangling 712100 , China)

Abstract Mammalian somatic cloning has got great progress during past few years , however , the efficiency of nuclear transfer remains low . In order to improve this technique , different perspectives of which are studying . Accordingly , the method of oocyte enucleation also becomes a focus . But the physical enucleation is technically demanding , time-consuming , inherently invasive and clearly damaging to cytoplasm spatial organization . As a alternative strategy to traditional method , Demecolcine-induced enucleation (IE) attracted the scientist 's eyes . Nuclear transfer procedure assisted with IE , factors related with success rate of IE and effects of IE on the oocytes and cloned embryos are mainly discussed in this review . At the same time , combining with author 's research , the existing problems of IE and potential improved measures of some key steps in IE procedure are also elucidated . However , the utility of the demecolcine-induced enucleation protocol will require further deep investigation .

Key words induced-enucleation (IE) , demecolcine , nuclear transfer , cloning efficiency

Received : 06-02-2003

This work was supported by Grant from 863 Program of Ministry of Science and Technology of China (No. 2001AA213081) .

* Corresponding author . Tel : 86-29-7091851 ; E-mail : wangqiang7864@ya1001.com.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>