

文章编号: 1004-0374(2009)03-0347-06

专题: 细胞重编程与表观遗传

核移植与供体细胞

林江维^{1,2}, 李劲松^{2*}

(1 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所中科院分子细胞生物学重点实验室, 上海 200031)

摘要: “多莉”羊的诞生是生物界的一个里程碑, 它之所以引起如此大的轰动主要是因为它来源于培养的成年绵羊乳腺上皮细胞, 这是人类第一次证明分化的体细胞可以被重编程后恢复全能性并最终分化发育成一个动物个体。这说明哺乳动物分化的体细胞核仍具有全套的遗传物质并能够被卵母细胞逆转恢复全能性。然而, 关于多莉的供体细胞来源却一直是一个谜。由于体细胞克隆的效率非常低, 而用于核移植的供体细胞悬液中往往含有多种类型的细胞, 这使得我们很难确切地知道最终获得的克隆动物是来源于哪一种细胞。这种不确定性给我们研究核移植诱导体细胞重编程的机制带来了很大的困难, 因此, 对供体细胞的研究也是核移植研究领域的一个重要课题, 这包括各种组织来源的体细胞是否均可以用于核移植, 终末分化的体细胞是否能够用于核移植, 组织干细胞是否更有利于体细胞重编程, 供体细胞的分化状态是否与核移植的效率有关, 死亡的体细胞是否也可以用于核移植等等。本文综述了核移植中与供体细胞相关的最新研究进展。

关键词: 核移植; 供体细胞; 胚胎干细胞; 组织干细胞; 终末分化细胞

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Nuclear transfer and donor cells

LIN Jiang-wei^{1,2}, LI Jin-song^{1*}

(1 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2 Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Dolly, the first cloned animal from cultured adult cell, proved that differentiated somatic cell can be reprogrammed to totipotent status in oocyte and reconstructed embryo can develop to adult. However, the donor cell origin of Dolly remained a complete mystery. Because of the low efficiency of somatic cloning and more than one type of cell involved in donor cell suspension, it is difficult to confirm which kind of donor cells developed to cloned animals after nuclear transfer (NT). The uncertainty of the donor origin of cloned animals brings difficulties to the research of somatic reprogramming mechanism after NT. Therefore, the study of donor cell is an important subject of nuclear transfer, which includes whether all kinds of cells can be used for nuclear transfer, whether terminally differentiated somatic cells can be reprogrammed after NT, whether differentiated status of donor cells is related to the efficiency of NT, whether nonviable donor cells can be used for nuclear transfer and so on. This review discusses the recent advances of donor cells used in mammalian somatic nuclear transfer.

Key words nuclear transfer; donor cells; embryonic stem cells; tissue-specific stem cells; terminally differentiated somatic cells

收稿日期: 2009-04-28

基金项目: 国家自然科学基金(30871430)

*通讯作者 E-mail: jsli@sibs.ac.cn

1 终末分化的体细胞与核移植

自“多莉”羊诞生以来,关于“多莉”羊是否真正来自于分化的乳腺上皮细胞,还是来自存在于组织悬液中的少量的组织干细胞,一直是克隆界争论的话题^[1,2]。由于克隆动物的成功率非常低,同时,由于我们缺乏对某种特定细胞核的永久标记,使得最终形成动物的供体细胞,可能是用于核移植(nuclear transfer, NT)的含有多种细胞的细胞悬液中的任何一种或几种,很有可能是来源于其中少量的组织干细胞^[3,4]。那么,到底克隆动物是来源于终末分化的体细胞,还是来源于细胞悬液中组织干细胞?或者,是否终末分化的体细胞能够用于核移植?为了回答这一问题,最好的方法就是用带有遗传标记的终末分化的体细胞进行核移植。为此,外周血中成熟的B细胞和T细胞成了最好的供体。因为,B细胞及T细胞在骨髓及胸腺中成熟的过程中在免疫球蛋白和T细胞受体位点均发生了遗传序列的重排,然后迁移到外周血中执行相应的免疫功能,这是一种天然携带遗传标记的终末分化的体细胞。然而,在用外周血淋巴细胞进行一步法核移植,即将核移植重构胚直接移入假孕母鼠后,科研人员并没有获得克隆小鼠^[5]。Hochedlinger和Jaenisch^[6]随后改进了核移植程序,建立了两步法小鼠核移植的方法,即先将克隆的重构囊胚移入胚胎干细胞培养液中分离胚胎干细胞系(nuclear transfer embryonic stem cell line, ntES cell line),而不是直接植入假孕母鼠的子宫中。然后将ntES细胞注入四倍体囊胚中获得克隆小鼠,在这第二步中,四倍体囊胚的细胞会发育成胚外组织,而小鼠几乎完全来自于注入的ntES细胞。通过这一改良的核移植程序,他们获得了来自成熟B细胞和T细胞的ntES细胞系及克隆小鼠,通过对ntES细胞系及克隆小鼠各种组织的鉴定发现均发生了免疫球蛋白位点及T细胞受体位点的DNA序列重排。这一实验结果证明了终末分化的B、T细胞能够用于核移植。随后,Li等^[7]和Jaenisch实验室^[8]用两步法又成功地获得了来自成熟的嗅觉神经细胞的克隆小鼠,这些结果充分地证明了终末分化的体细胞可以被重编程后恢复全能性。然而通过这种两步法的核移植程序获得的个体并不能完全证明供体细胞的全能性,它与一步法核移植所获得的克隆个体是不完全相同的。这主要是因为:第一,四倍体囊胚在两步法核移植中会发育成胚外组织,我们并不知道此类体细胞核经核移植后

是否也具有发育成胚外组织的能力,而胎盘的问题又是导致克隆动物异常最重要的一个因素,所以它的全能性并不明确^[9];第二,ntES细胞的体外培养可能是体细胞进一步进行重编程的过程;第三,所获得的小鼠个体中嵌有部分四倍体细胞;第四,ntES细胞在体外培养过程中会发生遗传的变化,甚至丢失Y染色体,导致获得的个体性别发生变化^[10]。因此,我们将通过两步法获得的小鼠称为clonal小鼠,而不称为cloned小鼠^[10]。随之而来的问题是,能否通过一步法克隆的方法获得来自终末分化体细胞的克隆小鼠?2007年,Sung等^[11]报道了通过一步法获得了来自终末分化的粒性白细胞的克隆小鼠,但由于研究人员用单一的表面标记Gr-1及侧向角散射(side scatter)来分选细胞,分选纯度为99.4%,不能排除有其他类型的表达Gr-1的血液细胞,如未成熟的粒性白细胞和单核细胞被误选用作供核而最终形成了克隆小鼠,因为没有任何标记可以证明克隆的小鼠是来源于成熟的粒性白细胞^[12,13]。因此,终末分化的供体细胞能否通过一步法核移植获得克隆小鼠还有待于进一步的探讨。

2 胚胎干细胞与核移植

提高核移植诱导体细胞重编程的效率一方面可以促进该技术的应用,另一方面可以从分析效率提高的影响因素来了解重编程的机制,因此对核移植效率的比较显得尤为重要。比较重编程的效率通常有以下几个层次^[14]:一是比较重构胚胎着床前的发育率,即成功构建的胚胎发育成囊胚的比例;二是比较重构囊胚着床后发育至个体效率,即将重构囊胚移入受体子宫后发育成个体的比例;三是结合着床前后发育能力的比较,即将重构胚直接移入受体输卵管后比较发育的能力;四是比价重构囊胚在体外形成胚胎干细胞系的能力。重构胚着床前发育的能力受到许多试验因素的影响,如核移植技术的本身会对重构胚造成一定的损伤从而影响重构胚的发育,又如供体细胞的周期也会对重构胚的发育产生重大的影响。因此,比较重构胚着床前的发育率及结合着床前后发育能力的比较并不能真实反映体细胞重编程的效率。然而,一旦重构胚发育至囊胚,它们继续发育至胎儿或在体外培养出胚胎干细胞系的能力受到其他因素的影响较小,从而比着床前胚胎发育率更能说明重编程的效率。进行重编程效率的比较还有一个重要的考虑因素是被比较对象的可比性。由于核移植的效率非常低,因此我们必须严

格控制实验的条件, 合理设计实验的对照组。例如我们所讨论的供体细胞的核移植效率问题, 实验应在同一实验室由同一科研人员完成, 供体细胞应来自同一供体动物、同一细胞谱系, 如研究皮肤干细胞是否有更高的核移植效率, 最佳的选择是对来自同一个体皮肤的干细胞和皮肤分化细胞进行比较, 而不是将皮肤干细胞与颗粒细胞或培养的成纤维细胞进行比较^[15]。

在体细胞克隆获得成功之前, 用于核移植研究的供体细胞多来源于早期胚胎的卵裂球, 这些细胞由于具有多能性甚至全能性, 因此比较容易获得克隆动物。这就使我们联想到具有多能性的胚胎干细胞(ES cell), 已经成系的ES细胞能否用于核移植, 而且具有比体细胞克隆更高的效率呢? 研究人员用不同遗传背景的ES细胞系进行核移植后, 得出了以下的结果^[16-19]: 第一, ES细胞可以用于核移植, 且按照出生小鼠数占移入子宫中重构囊胚的比例算, 具有比体细胞核移植更高的效率; 第二, 由于ES细胞处于快速的细胞分裂周期中, 约35%—40%的细胞处于S期, 而S期的细胞是不能用于核移植的, 只有G1或G2/M期的细胞可以, 因此, 必须对培养的ES细胞进行血清饥饿处理, 并需要达到高的细胞聚合程度, 使得G1期或G2/M期细胞的比例大大提高, 从而提高核移植的效率; 第三, 虽然按照出生小鼠占移植囊胚的比例算, ES细胞的克隆效率大于体细胞, 但按占激活的重构胚的比例算, 却与体细胞的克隆效率相似; 第四, ES细胞克隆效率与细胞的遗传背景有着非常密切的关系, F1遗传背景的ES细胞比近交系及远交系的ES细胞具有更高的克隆效率; 第五, 来自ES细胞的克隆小鼠及胎盘表现出较来自新鲜分离的体细胞的克隆小鼠更多的异常现象, 如出生死亡率高、出生体重更高、胎盘更重等, 这些现象可能与ES细胞长期体外培养造成的遗传及表观遗传的变化有关, 培养代数越高克隆效率越低的实验结果可以支持这一假设; 第六, 经过基因改造过的ES细胞可通过核移植获得基因突变的克隆小鼠, 这可以大大缩短常规方法先获得嵌合小鼠, 再通过生殖遗传获得基因突变的小鼠所需要的时间。毫无疑问, 相比体细胞, ES细胞是一种比较容易获得克隆动物的供体细胞, 不少实验室虽然获得了来自ES细胞的克隆小鼠, 却从未报道过通过一步法获得来自体细胞的克隆小鼠。结合之前的研究发现, 早期卵裂球易于核移植

的事实, 很容易让大家得出细胞的分化程度越低, 核移植的效率越高的结论。然而, 截至目前, 却没有一个有说服力的比较试验证明这一结论, 而存在的疑点却很多, 如目前对体细胞和ES细胞克隆效率的比较均来自不同的文章、不同的实验室、不同的细胞系、不同的细胞谱系, 缺乏可比性; 再如培养的ES细胞中存在一部分分化的细胞, 而ES细胞用于核移植前的血清饥饿等处理可能会增加分化细胞的比例, 再加上克隆效率低, 缺乏特定的遗传标记等问题, 我们还不能确定来自ES细胞的克隆小鼠是具有多能性的ES细胞, 还是已经开始分化的细胞。因此, 供体细胞的分化状态与核移植效率是否有关, 如果有关, 是正相关还是负相关, 还有待于进一步的证实。

3 组织干细胞与核移植

虽然来自ES细胞的克隆囊胚有着比体细胞更高的体内发育率, 但如果按照克隆小鼠占重构胚的比例算, 两者却有着相似的效率。一个影响ES细胞克隆效率的重要因素是体外培养造成ES细胞的遗传及表观遗传的变化^[20], 据此, 不少研究人员提出, 新鲜分离或短期培养的来自成体组织或胎儿组织的干细胞可能是一种更有效的克隆小鼠的供体细胞^[3, 4, 9, 20]。因此, 最近几年, 不少实验室用家畜及小鼠不同的组织干细胞核进行NT后发表了一系列的实验数据, 但结果却是不一致的。来自猪和牛的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)重编程能力的研究^[21-23]发现, 猪和牛的MSC核移植后重构胚的体外发育率高于体细胞组, 而唯一一篇体内发育的报道证明了牛MSC可以用于核移植获得克隆个体, 但却没有设立严格的对照组^[24]。另外, 猪皮肤来源的干细胞核和前脂肪细胞核移植后重构胚的体外发育率明显高于胚胎成纤维细胞^[25, 26], 来源于前脂肪细胞的重构胚移植后能够获得克隆猪。最近, 研究人员来自鹿茸的干细胞及其分化的细胞成功地克隆了红鹿, 但克隆效率没有显著差异^[27]。

小鼠核移植系统为研究供体细胞分化状态与重编程效率的关系提供了一个很好的模型。用培养的小鼠MSC细胞系作为供体与成纤维细胞进行核移植效率的比较发现, 虽然体外发育率相似, 但来自MSC的克隆胚胎移植后未能进行体内发育^[28]; 然而, 来自培养的神经干细胞却有着非常高体外及体内的发育率^[28]。同样, 用培养的神经干细胞, Wakayama的实验室^[29]发现克隆效率与分化的神经细胞无显著

差异,但却显著低于睾丸支持细胞和颗粒细胞;Jaenisch实验室^[30]用培养的神经干细胞与已发表的终末分化的神经细胞进行核移植后获得胚胎干细胞系的效率比较,发现神经干细胞有着较高的重编程效率^[30]。我们和Fuchs实验室用来自于同一小鼠个体的皮肤干细胞及分化的皮肤细胞作为供体进行NT发现,皮肤干细胞在雄性和雌性小鼠中均有较高的克隆小鼠获得率^[15]。然而,来自造血干细胞的NT研究却发现,造血干细胞核移植效率低于其他分化的体细胞类型^[11,31]。以上的实验使得供体细胞的分化程度与NT效率的关系更不明了,同时,这些研究中均存在一项或几项以下几方面的瑕疵:(1)培养的组织干细胞或胚胎干细胞中并非所有的细胞均处于多能性,有一部分细胞已经分化;(2)分选细胞(FACS)的纯度不能达到100%;(3)干细胞和分化细胞来源于不同的细胞谱系(lineage),不同的遗传背景,不同的供体动物,甚至用培养的细胞和新鲜分离的细胞进行比较,缺乏可比性。因此,供体细胞的分化状态是否会影响核移植效率仍然是一个有待于进一步探讨的问题。

4 死亡的供体与核移植

核移植技术在基础研究和应用研究中都有着重要的作用。在基础研究中,运用小鼠核移植技术否定了嗅觉受体基因的表达选择是受到DNA序列重组调控的假说^[7,8],这一结果为该领域的研究提供了正确的方向。在应用研究中,核移植技术可以快速扩增优良的家畜个体、保护濒危物种以及对死亡的个体甚至灭绝的物种进行恢复等。

动物克隆技术可以将动物的遗传物质完整地传递下去,这一特点对于那些有价值的动物个体的繁育及保种有着重要的作用。因此,我们可以通过建立优良个体及濒危物种体细胞库的方法对这些遗传资源进行保存。然而,在“多莉”羊诞生以前,人们并不知道可以通过体细胞核移植技术获得克隆动物,因此,没有通过细胞培养的方式对一些有价值的动物个体进行种质的保存,死亡的个体通常会被直接冷冻保存。这种冷冻保存的个体或组织是否可以用于克隆?另外,在一些野生动物或有价值的动物个体意外死亡,尚无细胞系保存的情况下,是否可以对死亡的个体直接进行克隆?

对冷冻保存的死亡个体或死亡没多久的个体进行克隆最根本的问题就是是否能够获得可用于克隆的供体细胞。这可以通过两种方式来完成,一是将

供体组织进行体外的分离和培养,以期获得活的体细胞系,这种可能性已被证明是存在的。2007年日本科学家成功地对未经任何抗冻处理的冷冻了13年的牛睾丸组织细胞进行了克隆,这头叫“安福号”的种公牛是日本最著名的HIDA牌牛肉的原始祖先,它死于1993年9月,它的睾丸在未经任何抗冻处理的情况下被直接冻存在 -80°C ,10年后又被移入液氮中继续保存了3年。研究人员担心随着时间的推移,“安福号”优秀的肉质特色会逐渐丢失,因此他们开始尝试对“安福号”进行克隆。他们首先将部分冷冻的睾丸组织分离出来在体外进行培养。令人惊奇的是,他们获得活的细胞并建立了4个细胞系,然后利用这些细胞进行克隆并在2007年和2008年获得了4头克隆牛,其中有3头存活至今^[32]。然而,并非所有冷冻的组织或个体中都能分离出活的体细胞,这需要非常严格的保存条件。第二种方式是将细胞或核直接从死亡的组织中分离出来直接进行核移植。2001年,Loi等^[33]对两头死亡的成年欧洲盘羊进行了克隆并获得了一头正常的克隆欧洲盘羊。欧洲盘羊是一种濒危的物种,研究人员从在死亡18—24 h的欧洲盘羊体内取出卵子-颗粒细胞复合物并在体外进行培养,发现卵子不能进一步发育成熟,台盼蓝染色证明所有的细胞均无活性。即便如此,他们仍然将颗粒细胞注入去核的绵羊卵子中并最终获得了一头克隆盘羊。2002年,他们进一步证明绵羊的颗粒细胞在核移植前经 55°C 或 75°C 处理后可以用于核移植并获得克隆绵羊^[34]。2008年,Li等^[35]用未经抗冻处理的冷冻小鼠体细胞进行克隆,将分离的小鼠皮肤细胞直接冷冻在 -80°C 约一年后用于核移植发现,这些细胞遗传物质及染色体仍然保存完好,通过两步法核移植可以获得克隆小鼠。我们同时证明了长期冷冻导致细胞膜破损的供体细胞,即死亡细胞也可以用于核移植。Wakayama等^[36]证明了未经任何抗冻处理的来自冷冻了16年的小鼠的体细胞也可以用于克隆,他们从小鼠中分离出各种细胞核直接用于核移植,通过两步法核移植获得了克隆小鼠。在这两项研究中,研究人员均未能通过经典的一步法小鼠克隆技术,即将克隆囊胚直接移入假孕母鼠子宫中获得克隆小鼠,而是通过两步法,即先从克隆的囊胚中建立核移植胚胎干细胞系,然后通过四倍体囊胚注射或再次核移植的方法获得了克隆小鼠。这一方面说明,来自冷冻个体细胞的遗传物质及染色体保存得

足够好, 能够被重编程后形成胚胎干细胞系和克隆动物; 另一方面, 也可以说明, 冷冻对细胞核造成了一些小的损伤, 导致通过一步法核移植不能获得克隆小鼠。在两步法小鼠核移植程序中, 首先要建立小鼠的核移植胚胎干细胞系, 胚胎干细胞在体外的培养过程可能为这些小损伤的修复提供了时间, 使得这些细胞核能被修复到可被用于克隆的程度。因此, 虽然通过上述的方法获得的克隆小鼠看上去与正常小鼠无区别, 并且能够繁殖后代, 但我们还是不能排除在染色体上有着细小的基因序列的变化, 而这种变化不会对个体的生长及发育造成致命的影响。

以上的这些研究说明, 通过克隆技术可以复制那些冷冻保存的死亡动物个体或死亡不久的个体, 或者通过从组织中分离出活的体细胞进行克隆, 或者通过分离出细胞直接进行核移植的方法, 通过两步法核移植的方法, 即先建立核移植胚胎干细胞系, 然后用于核移植。因此, 只要核物质保存完整, 我们就有可能对其进行克隆。

5 结语

供体细胞是开展核移植研究的基础, 是探讨核移植效率的关键, 是研究核移植诱导体细胞重编程机制的前提。随着核移植研究的不断深入, 越来越多类型的细胞被成功用于核移植。然而由于供体细胞悬液中细胞成分的复杂性、缺乏不同细胞特定的永久性标记, 以及克隆效率低等原因, 到目前为止, 与供体细胞相关的一些问题仍不清楚, 如终末分化的供体细胞能否通过一步法核移植技术获得克隆动物, 供体细胞的分化状态是否会影响克隆的效率等。对这些核移植研究基础问题的解答可以使我们全面地了解核移植诱导体细胞重编程的过程, 有助于我们对核移植诱导体细胞重编程机制的研究, 从而进一步地提高核移植诱导体细胞重编程的效率。

[参 考 文 献]

- [1] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385(6619): 810-3
- [2] Sgaramella V, Zinder ND. Dolly confirmation. *Science*, 1998, 279(5351): 635
- [3] Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 2000, 100(1): 157-68
- [4] Liu L. Cloning efficiency and differentiation. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(5): 406
- [5] Wakayama T, Yanagimachi R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev*, 2001, 58(4): 376-83
- [6] Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*, 2002, 415(6875): 1035-8
- [7] Li JS, Ishii T, Feinstein P, et al. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. *Nature*, 2004, 428(6981): 393-9
- [8] Eggan K, Baldwin K, Tackett M, et al. Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature*, 2004, 428(6978): 44-9
- [9] Rossant J. A monoclonal mouse? *Nature*, 2002, 415(6875): 967-9
- [10] Li JS, Ishii T, Wen DC, et al. Non-equivalence of cloned and clonal mice. *Curr Biol*, 2005, 15(18): R756-7
- [11] Sung LY, Gao SR, Shen HM, et al. Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Genet*, 2006, 38(11): 1323-8
- [12] Hochedlinger K, Jaenisch R. On the cloning of animals from terminally differentiated cells. *Nat Genet*, 2007, 39(2): 136-7
- [13] Yang XZ, Cheng T, Sung LY, et al. Reply to "On the cloning of animals from terminally differentiated cells". *Nat Genet*, 2007, 39(2): 137-8
- [14] Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, 2006, 441(7097): 1061-7
- [15] Li JS, Greco V, Guasch G, et al. Mice cloned from skin cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(8): 2738-43
- [16] Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, et al. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(26): 14984-9
- [17] Rideout III WM, Wakayama T, Wutz A, et al. Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat Genet*, 2000, 24(2): 109-10
- [18] Eggan K, Akutsu H, Loring J, et al. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(11): 6209-14
- [19] Gao S, McGarry M, Ferrier T, et al. Effect of cell confluence on production of cloned mice using an inbred embryonic stem cell line. *Biol Reprod*, 2003, 68(2): 595-03
- [20] Rideout III WM, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 2001, 293(5532): 1093-8
- [21] Faast R, Harrison SJ, Beebe LFS, et al. Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. *Cloning Stem Cells*, 2006, 8(3): 166-73
- [22] Bosch P, Pratt SL, Stice SL. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal Stem Cells. *Biol Reprod*, 2006, 74(1): 46-57
- [23] Colleoni S, Donofrio G, Lagutina I, et al. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells*, 2005, 7(3): 154-66
- [24] Kato Y, Imabayashi H, Mori T, et al. Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells: developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal.

- Biol Reprod, 2004, 70 (2) : 415-8
- [25] Zhu H, Craig JA, Dyce PW, et al. Embryos derived from porcine skin-derived stem cells exhibit enhanced preimplantation development. *Biol Reprod*, 2004, 71 (6) : 1890-7
- [26] Tomii R, Kurome M, Ochiai T, et al. Production of cloned pigs by nuclear transfer of preadipocytes established from adult mature adipocytes. *Cloning Stem Cells*, 2005, 7 (4) : 279-88
- [27] Berg DK, Li C, Asher G, et al. Red deer cloned from antler stem cells and their differentiated progeny. *Biol Reprod*, 2007, 77 (3) : 384-94
- [28] Inoue K, Noda S, Ogonuki N, et al. Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells. *Stem Cells*, 2007, 25 (5) : 1279-85
- [29] Mizutani E, Ohta H, Kishigami S, et al. Developmental ability of cloned embryos from neural stem cells. *Reproduction*, 2006, 132 (6) : 849-57
- [30] Blelloch R, Wang Z, Meissner A, et al. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of donor nucleus. *Stem Cells*, 2006, 24 (9) : 2007-13
- [31] Inoue K, Ogonuki N, Miki H, et al. Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. *J Cell Sci*, 2006, 119 (pt 10) : 1985-91
- [32] Hoshino Y, Hayashi N, Taniguchi S, et al. Resurrection of a bull by cloning from organs frozen without cryoprotectant in a -80°C freezer for a decade. *PLoS One*, 2009, 4 (1) : e4142
- [33] Loi P, Ptak G, Barboni B, et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2001, 19 (10) : 962-4
- [34] Loi P, Clinton M, Barboni B, et al. Nuclei of nonviable ovine somatic cells develop into lambs after nuclear transplantation. *Biol Reprod*, 2002, 67 (1) : 126-32
- [35] Li JS, Mombaerts P. Nuclear transfer-mediated rescue of the nuclear genome of nonviable mouse cells frozen without cryoprotectant. *Biol Reprod*, 2008, 79 (4) : 588-93
- [36] Wakayama S, Ohta H, Hikichi T, et al. Production of healthy cloned mice from bodies frozen at -20°C for 16 years. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (45) : 17318-22