

文章编号: 1004-0374(2009)03-0363-07

## 体细胞核移植诱导的表观遗传学变化

杨东山, 邓 为, 樊娜娜, 赖良学\*

(中国科学院广州生物医药与健康研究院中国科学院再生生物学重点实验室, 广州510663)

**摘 要:** 体细胞核移植技术是指将一个分化的体细胞核置入去核的卵母细胞中, 并发育产生与供体细胞遗传背景一致的克隆后代的技术。目前, 世界上通过体细胞核移植技术已经产生了许多克隆动物。但克隆过程中还存在着很多问题, 比如, 克隆效率太低、克隆个体常伴有表型异常和早亡等, 从而使该技术应有的应用潜力不能得到充分的发挥。体细胞表观遗传学重编程的不完全或紊乱是造成核移植诸多问题的主要原因。近十多年来, 人们对体细胞核移植后的重编程进行了广泛的研究, 其核心内容包括核及核外结构的重塑、DNA 甲基化模式的重建、基因印迹和 X 染色体失活、组蛋白乙酰化模式的重建、端粒长度恢复等, 以期能够对其重编程加以人为干预, 从而提高动物克隆效率。本文拟对体细胞核移植诱导的重编程研究进展加以综述, 希望对体细胞重编程机制的阐明有所启发。

**关键词:** 体细胞核移植; 重编程; 表观遗传学; 甲基化

**中图分类号:** Q813 **文献标识码:** A

## Epigenetic modification related to somatic nuclear transfer

YANG Dong-shan, DENG Wei, FAN Na-na, LAI Liang-xue\*

(Key Lab of Regenerative Biology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510663, China)

**Abstract:** Somatic cell nuclear transfer is a technology by which a somatic nucleus is put into an enucleated oocyte to make a reconstructed embryo, which subsequently develops to an offspring with the same genetics as donor cells. So far cloned animals have been produced in many species by somatic nuclear transfer. However, there are many problems need to be solved before its potential applications become fully practical, such as low efficiency, abnormal phenotypes and premature death, which are probably caused by incomplete or aberrant epigenetic reprogramming of donor cells. In recent decade, reprogramming after somatic nuclear transfer has been extensively studied, mainly focusing on remodeling of structures in or out of nucleus, modification of DNA methylation, X chromosome inactivation, modification of histone acetylation and recovery of telomere length. Those efforts are expected to lead to establish an approach artificially intervening the reprogramming of donor cell in the process of nuclear transfer and eventually improve the efficiency of somatic nuclear transfer.

**Key words:** somatic nuclear transfer; reprogramming; epigenetics; methylation

人类基因组测序表明, 人类基因组编码蛋白的基因数量只有约 35 000 个, 仅仅是果蝇的 2 倍。显然, 仅靠 DNA 的编码并不能解释人类这样复杂的生命体。越来越多的证据表明, 引起染色体结构变化的表观遗传学机制具有非常重要的基因表达调控功能。细胞表观遗传学重编程(epigenetic reprogramming)指的是分化的细胞在特定的条件下被逆转后恢复到全

能性状态, 或者形成胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)系, 或者进一步发育成一个新的个体的过程。自然状态下, 哺乳动物只有在受精卵形成和胚

收稿日期: 2009-06-02

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)资助项目(2006AA02A103)

\*通讯作者 E-mail: Lai\_liangxue@gibh.ac.cn

胎发育过程中的精子和卵子的基因组中才发生彻底的表现遗传学的重编程过程。体细胞核移植技术成功之前,一般认为哺乳动物细胞的分化、发育是不可逆转的,只有通过精卵的结合才能够重新回到发育的起点。1997年,多莉绵羊的诞生彻底推翻了这一生物学界长期以来公认的观点,首次实现了哺乳动物已分化体细胞的重编程<sup>[1]</sup>。此后,科学家们又发现通过胚胎干细胞的融合也可以使分化的体细胞重编程为ES样细胞<sup>[2]</sup>。对这一现象的进一步研究以及对胚胎干细胞基因表达调控和信号通路的深入研究最终引发了生物医学的革命——诱导多潜能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)技术,成为近年来生物学研究最为活跃的研究领域。

iPS技术自从2006年在小鼠中取得成功以来<sup>[3]</sup>,在不到3年的时间里迅速发展,先后在小鼠、人、大鼠、猪等物种中获得了iPS。随着iPS技术的不断改进,从最初的4因子发展为3因子、2因子,甚至单因子诱导;从最初的逆转录病毒感染发展为无病毒的转染体系,如质粒转染、游离载体表达、蛋白转染等。但是,就目前的研究来看,人们对于细胞重编程的确切机制以及发生过程的了解还很肤浅。特别需要指出的是,iPS技术诱导的并不是完全的重编程,诱导获得的iPS细胞基本上等同于多潜能的胚胎干细胞的状态,还不能达到全能性的胚胎细胞状态,即不能发育为个体,只有体细胞核移植技术才是目前唯一能够将分化的体细胞人为地重编程为全能性的胚胎细胞状态并发育为个体的技术手段。体细胞核移植诱导的细胞重编程发生在核移植后极短的时间内,卵母细胞胞质对体细胞的重编程能力显然远远高于外源转入的4因子。体细胞核移植诱导重编程的研究对于我们了解细胞重编程的机制具有重要的意义。

体细胞核移植技术是指将一个分化的体细胞与去核的卵母细胞融合形成一个重构胚胎,并发育产生与供体细胞遗传背景一致的克隆后代的技术。在正常受精的胚胎中,表现遗传学修饰模式是在长期的配子发生和受精过程中建立起来的,然而在核移植胚胎中,本来非常稳定的供体细胞表现遗传学修饰模式必须在合子基因组激活之前的很短的时间内逆转为胚胎状态的表现遗传学修饰模式。核移植完成后,重编程立即开始进行,其过程包括核及核外结构的重塑、DNA甲基化模式的重建、基因印迹和X染色体失活、组蛋白乙酰化模式的重建、端

粒长度恢复等。现将有关方面的研究进展分别加以阐述。

### 1 核结构的重塑(nuclear remodeling)

体细胞核移植研究中,促成熟因子(maturation promoting factor, MPF)和有丝分裂激活蛋白激酶(mitogen-activated protein, MAPK)活性最高的第二次减数分裂中期(MII)的成熟卵母细胞已经被证明是最有效的胞质来源。将一个细胞核移入含有高水平MPF和MAPK活性的胞质中将会导致核膜破裂(nuclear envelop breakdown, NEBD)和早熟染色体凝集(premature chromosome condensation, PCC),这一过程将会释放许多参与调节核的三维结构的蛋白质,如核纤层蛋白、核内小核糖核蛋白(snRNP)、核仁蛋白、组蛋白等。此时,如果卵子被激活,就会利用卵胞质中的蛋白质、RNA组装成一个假原核,这个假原核明显比合子的原核要大,但在结构上与合子的原核非常相似,比如,核纤层蛋白的类型和分布的变化、snRNP、核基质中的有丝分裂器、核仁等<sup>[4-6]</sup>。这种核结构的重塑过程使得一些胞质因子能够有机会接近供体核的染色质,因而对于体细胞核移植后基因组的重编程非常重要。但是,并不是所有的核移植胚中都能观察到这种变化,不同的卵母细胞之间<sup>[7]</sup>、不同的物种之间存在差异。比如有研究发现,在小鼠MII期卵母细胞中,MPF和MAPK定位在纺锤体周围,去核后,大部分的MPF和MAPK活性丧失<sup>[8]</sup>,而在猪卵中并没有发现这样的胞质定位<sup>[9]</sup>。Lee等<sup>[10]</sup>在绵羊核移植的研究中发现,使用未去核的卵母细胞比去核卵母细胞更能有效地引发NEBD和PCC,但即使这样也只有不到一半的移入核发生NEBD和PCC。使用能够提高并保持MPF活性的咖啡因处理卵母细胞,可以使大多数移入的核发生NEBD和PCC,核移植胚胎囊胚细胞数增加,而且,处理组的胚胎基因表达模式更加接近体外受精胚胎。Mitalipov等<sup>[11]</sup>在恒河猴的核移植研究中也发现,能够促进核重塑的核移植方法可以提高核移植胚胎发育率,他们采用这种改进的核移植方法最终获得了恒河猴克隆——胚胎干细胞系。目前看来,胞质中高的MPF活性对于体细胞核移植重编程非常重要,由其引发的有效NEBD和PCC等一系列结构重塑是体细胞核移植重编程的重要过程。

核结构的另一重要的重塑过程是组蛋白的替换,在小鼠中,体细胞类型的组蛋白H1在核移植

后60min内被卵子来源的H1替换。由于卵子来源的H1的半衰期很短,到了2到4细胞期,随着胚胎基因组的激活,胚胎来源的H1大量转录和翻译,又替换了卵子来源的H1。这一过程类似于正常受精过程中,卵胞质对精子核的重塑过程<sup>[12-14]</sup>。

## 2 胞质结构重塑

大多数关于核移植重编程的研究都将注意力集中到核的重编程,但是实际上,核移植中移入卵母细胞的不仅仅是细胞核,还包括少量的胞质成分,其中最为重要的是线粒体和中心体。此外,卵母细胞胞质中线粒体与移入核之间的相互作用对于核重塑及核移植胚胎的发育具有重要的影响。

线粒体是哺乳动物细胞中重要的细胞器,是哺乳动物细胞核外唯一拥有自身基因组的细胞器。线粒体在细胞的氧化磷酸化、葡萄糖和脂肪的有氧代谢、钙离子信号通路以及细胞凋亡等过程中发挥重要功能,是细胞能量ATP的生产工厂。线粒体DNA编码37个基因,其功能的发挥及其本身的增殖依赖于线粒体基因组与核基因组复杂的协同调控和表达<sup>[15]</sup>。自然状态下,线粒体是母系遗传,精子线粒体在进入卵母细胞后很快被清除,只有卵母细胞来源的线粒体被保留<sup>[16,17]</sup>。在小鼠和人都有关于父本来源的线粒体偶尔逃脱这种清除机制进入后代细胞中并导致严重的线粒体疾病的报道<sup>[18]</sup>。在核移植中,供体核进入受体卵母细胞后,供体核基因组的表达及调控与受体卵母细胞中的线粒体基因组的表达调控能否很好的协调,直接影响了线粒体呼吸链的正常运行,因此有可能严重影响克隆动物的发育。特别是在异种间核移植中,这一问题尤为明显。最近报道,英国的一个研究组对精卵成熟、早期胚胎发育阶段以及核移植胚胎中线粒体的复制、转录规律进行了深入详细地研究。结果表明,在克隆胚中线粒体的复制和转录与正常受精的胚胎明显不同<sup>[19-21]</sup>。2006年,Lloyd等<sup>[22]</sup>报道用溴乙啶处理体外培养的绵羊和山羊成纤维细胞获得部分清除线粒体的绵羊和山羊成纤维细胞,用这种细胞作核移植,重构胚能够发育到囊胚并孵化,且这种方法得到的囊胚细胞数明显多于对照核移植囊胚。在核移植克隆后代中供体来源的线粒体的比例从0—59%都有报道<sup>[23]</sup>,但大多数情况下,只占很小的比例。在线粒体疾病的研究中人们已经知道,突变的线粒体占细胞中线粒体总数的比率与疾病的发生及其程度呈正相关,所以很可能在克隆动物中供体细胞来

源的线粒体数量低于一定水平时并不会影响克隆动物的正常生理代谢活动。这也是我们能够获得正常克隆动物的基础。

中心体有两个桶状结构的中心粒,每个中心粒又各含9个微管三聚体,中心粒之间相互垂直。中心体负责组织胞质微管构成的细胞骨架,完成有丝分裂或减数分裂时染色体的迁移以及间期胞质中各种细胞器的定位。通常,有丝分裂或减数分裂的微管两端聚焦于一个组织紧密的纺锤体极。但是,在早期胚胎中,中心粒消失,而且纺锤体极是一个桶状结构,这有点类似于植物细胞。直到囊胚阶段,中心粒才重新出现,纺锤体又聚焦于一个很窄的纺锤体极上<sup>[24]</sup>。尽管目前我们还不知道在体细胞核移植中中心粒的变化规律和机制,但已经确定的是与中心体复制及其结构维持有密切关系的中心体蛋白(centrin)基因在核移植后似乎被完全重编程了。中心体蛋白是普遍存在于中心体上的蛋白成分,具有钙离子结合能力。存在于雌性生殖细胞中的中心体蛋白在卵母细胞的减数分裂过程中消失,而存在于精子细胞中的中心体蛋白在受精时降解。直到囊胚阶段又重新出现。体细胞核移植后供体细胞的中心体蛋白发生降解,直到囊胚阶段再次出现<sup>[25]</sup>,与受精胚胎相似。

## 3 DNA 甲基化

DNA甲基化是在单细胞和多细胞生物中研究最多的DNA表观遗传修饰方式。在前体细胞特定的发育时间点上的基因组甲基化模式可以被甲基转移酶(Dnmt1)保持,并导致了后代细胞发育过程中预设的基因表达程序。而且,在分化的组织中特异的去甲基化事件又会导致所需的基因表达改变。在哺乳动物体内存在一些对整个基因组范围甲基化模式进行重编程的发育时期。典型的方式是基因组去甲基化,然后经过一段时间以细胞或组织特异的形式重新甲基化<sup>[26]</sup>。DNA甲基化参与多项细胞生理生化反应,其中包括X染色体失活、基因组印记、基因组稳定性以及染色质结构调控等。

正常受精胚胎和核移植重构胚胎,在植入前,都会经历DNA甲基化水平的变化。但是二者存在显著的差别。在正常受精胚胎中,父系基因组在合子到2细胞期几乎完全去甲基化,并维持这一水平。母系基因组甲基化水平基本也是受精后就开始去甲基化,这一过程持续到桑椹胚,并达到完全去甲基化,继而开始急速甲基化。重新甲基化与胚胎时期

第一次分化事件同步,产生内细胞团和滋养层的两个细胞系,其中内细胞团和滋养层细胞发生有差异的甲基化<sup>[27-29]</sup>。而核移植重构胚胎,基因组去甲基化发生时间跟正常胚胎几乎相同,在 2 细胞期到达最低,50%左右。随后出现过早重新甲基化,甲基化水平上升。但是,体细胞基因组在核移植后基因组去甲基化的程度较受精胚胎低,使其 DNA 甲基化水平仍然明显高于正常胚胎的水平而更接近于体细胞状态<sup>[30]</sup>。在克隆鼠和牛的囊胚期,内细胞团细胞的 DNA 甲基化相对正常,而滋养层细胞显示 DNA 异常的超甲基化<sup>[31]</sup>。这很自然地使我们推测早期克隆胚胎的发育能力低于受精胚胎可能与其甲基化的紊乱有关。克隆动物个体与对照组动物全基因组水平上的甲基化水平的比较发现,它们之间几乎没有差别<sup>[32]</sup>,说明那些有幸逃脱了甲基化紊乱影响的克隆胚胎能够发育为正常的个体。

#### 4 基因组印记和 X 染色体失活

基因组印记(genomic imprinting)指控制某一表型的一对等位基因由于亲本不同而差异性表达,即机体只表达来自亲本一方的等位基因。这是由于基因在雌、雄生殖细胞分化过程中分别受到不同的修饰,一些基因在精子生成过程中被印记;另一些基因在卵子生成过程中被印记,印记基因(imprinting genes)的表达则受到抑制。基因组印记是哺乳动物正常发育所必需的,大部分印记基因在胎儿的生长和发育过程,尤其是在胎盘发育过程中发挥调节作用<sup>[33]</sup>。

IGF-2、IGF-2 受体以及 H19 是目前研究最多的印记基因。在克隆牛的研究中发现许多发育缺陷与一些印记基因异常的小鼠实验模型以及人类印记基因异常引起的疾病症状非常相似<sup>[34-36]</sup>。通过对克隆小鼠 IGF-2、IGF-2 受体以及 H19 等多种印记基因的检测,发现异常胎鼠多种组织和巨大胎盘中有多数印记基因表达异常,有些印记基因表达减少,另一些则表达增加。杨向中的研究组对克隆牛的印记基因进行了研究,发现在死亡的克隆牛中,同一供体细胞来源的不同克隆的组织中印记基因 IGF-2、IGF-2 受体和 H19 的表达差异很大,有些正常,有些不正常。但是,对于存活的克隆牛的组织检测却没有发现明显的印记基因表达异常<sup>[37]</sup>,说明印记基因异常可能是造成克隆牛夭折的重要原因,同时也说明能够正常出生的克隆牛的印记基因已经发生了比较彻底的重编程。与小鼠、牛和绵羊不同的是,

克隆猪很少出现胎儿超重的现象,实际上,在我们的研究中克隆猪通常都比对照体重偏低。对克隆猪的印记基因表达的研究并没有发现印记基因异常与出生体重降低之间有明显的相关性。

在哺乳动物中,雌性动物体细胞的剂量补偿通过一条 X 染色体的沉默来实现,即 X 染色体失活。Xist (X-inactive specific transcript) 基因在 X 染色体失活中起重要作用,它编码非翻译的 RNA,启动 X 染色体的失活。Xist 基因在 X 染色体的失活中心(XIC)开始转录,并使整条染色体转录失活。哺乳动物中,精卵结合后早期胚胎发育阶段两条 X 染色体都处于活性状态。失活发生在囊胚发育的后期,在滋养层中 X 染色体失活服从印迹作用,即特异的失活父本的 X 染色体;而在 ICM 中,两条 X 染色体发生随机失活。Eggan 等用 X-连锁的绿色荧光蛋白监视克隆小鼠胚胎中的 X 染色体失活,结果表明,在体细胞核移植后,雌性供体核中失活的一条 X 染色体被重新激活,然后在滋养层细胞中原先在供体核中失活的染色体优先失活,而在克隆胚胎的内细胞团细胞中发生 X 染色体随机失活;如果用雌性胚胎干细胞作为供体核,则在内细胞团和滋养层细胞中都出现 X 染色体随机失活。Xue 等<sup>[38]</sup>发现,死亡克隆牛 X 连锁基因在同一器官中有的表达,有的不表达,死亡克隆胎盘 X 染色体随机失活,但活克隆为父本 X 染色体失活。我们在克隆猪的研究中对雌性克隆猪五个 X 染色体连锁基因的表达进行了检测,结果发现在死亡克隆中 X 连锁基因表达明显异常,而在存活的克隆猪中只有轻微的表达异常<sup>[39]</sup>。说明 X 染色体表观遗传修饰的异常可能导致克隆胚发育的异常,而那些能够发育足月并正常出生的克隆胚中重建了 X 染色体上表观遗传修饰模式。

#### 5 组蛋白乙酰化

越来越多的证据表明,染色质的结构变化具有非常重要的基因表达调控功能,而这种结构变化主要是通过组蛋白尾部的共价修饰(乙酰化、磷酸化、甲基化)完成的。共价修饰可以改变染色体的结构从而导致染色体上基因转录开/关状态的变化,而且这种状态是可以遗传的。2001 年,Thomas Jenuwein 小组提出组蛋白编码(histone code)这一概念<sup>[40-41]</sup>,他们认为:(1)组蛋白尾部的特定修饰可以决定染色质相关蛋白之间的亲和性;(2)相同或不同组蛋白尾部的修饰可能是相互依赖的并且在任意一

个核小体中产生多种不同的组合;(3)更高级别的染色质区域如常染色质区和异染色质区的数量很大程度上取决于该区域不同修饰的核小体的密度和组合,而这种核小体的编码决定了不同的表观遗传学状态,从而导致对遗传密码的不同解读,如决定基因的激活或沉默、细胞的增殖或分化。组蛋白修饰中,研究最多的是组蛋白乙酰化,许多负责组蛋白乙酰化的酶最初都曾作为激活转录的辅助因子被研究,后来才确定是组蛋白乙酰化酶,可见其对于基因表达调控的重要性。组蛋白乙酰化是由组蛋白乙酰基转移酶(HAT)和组蛋白去乙酰基酶(HDAC)协调催化完成。一般来说组蛋白的甲基化和去乙酰化对应转录失活状态,而组蛋白的乙酰化对应更加开放的染色质构象,允许转录因子接近,处于转录活跃状态。

在哺乳动物卵子发育中,GV期卵母细胞组蛋白H3、H4呈现高乙酰化状态,GVBD后组蛋白整体去乙酰化<sup>[42-43]</sup>。小鼠成熟精子和第二次减数分裂中期卵母细胞组蛋白H4乙酰化水平很低,受精后精子染色质组蛋白H4迅速乙酰化,而母源基因组未检测到。整个G1期雄原核组蛋白H4乙酰化水平高于雌原核,直到S期和G2期,雌原核和雄原核组蛋白H4乙酰化水平达到相同程度<sup>[44]</sup>。同样的去乙酰化的变化也发生在体细胞核移入去核卵母细胞的过程中。小鼠组蛋白整体的去乙酰化发生在供体核移入去核卵母细胞后的1-3h内。体细胞核移入猪卵母细胞后,免疫荧光检测组蛋白H3, K9K14K18位点的乙酰化,发现H3K9乙酰化在核移入的0.5h降低,1h后消失, H3K4H3K18位点的乙酰化在核移入后1h下降,2h后消失。重构胚胎激活后,乙酰化的恢复与孤雌激活胚胎相似, H3/K9、K14乙酰化发生在后/末期, H3/K18的乙酰化发生在原核期。但与孤雌激活的卵母细胞相比10%-20%供体核组蛋白H3未重新乙酰化<sup>[45]</sup>。牛核移植的研究表明,未激活的MII期卵母细胞在融合后2h内对供体细胞核完成去乙酰化,而如果采用激活后的卵母细胞则不能完成此过程。这可能与MII期卵母细胞中的MPF以及MAPK活性有关,类似的过程也可以在小鼠中观察到。应用保持供体核中高乙酰化状态的去乙酰化酶抑制剂,如TSA、Scriptaid等处理供体细胞或重构胚胎显著提高了克隆胚胎的体外发育率以及出生率<sup>[46-48]</sup>,说明改变供体核的整体乙酰化水平有助于促进供体核基因组的重编程,同时也提

示似乎这种核移植后的短期内去乙酰化对于核移植的重编程并不是必要的。

## 6 端粒恢复

端粒是染色体端部的特化部分,因无黏性而能防止染色体黏着,随着体细胞的分裂,端粒的长度变短。端粒复制要靠端粒酶,正常细胞缺乏此酶,故端粒随细胞分裂而变短,细胞发生衰老。而生殖细胞和癌细胞中具有端粒酶活性,因此可以保持分裂的活力。对于克隆动物端粒的长度各实验室报道的结果不同,“多莉”的供体核来自一只6岁母羊的乳腺细胞,其端粒的长度比正常的短20%<sup>[49]</sup>,使人们开始怀疑克隆动物是否会出现短寿。然而,随后在对体细胞克隆牛的研究中却并没有发现端粒缩短的现象<sup>[50]</sup>。用接近衰老的细胞作为供体核,通过克隆,端粒的长度和细胞的寿命均得到恢复,甚至延长<sup>[51]</sup>;而且克隆牛胚胎中端粒酶的活性也恢复到与正常受精相似的水平<sup>[52]</sup>。在体细胞克隆小鼠中,端粒的长度也得到恢复<sup>[53]</sup>。大多数发育正常的克隆动物其寿命也并没有明显的缩短,有些甚至还比对照组动物寿命更长。这说明核移植重编程过程中端粒的长度是可以恢复的,端粒复原存在于大部分克隆动物中,也是核移植重编程的重要步骤之一。

## 7 小结

目前,世界上通过体细胞核移植技术已经产生了许多克隆动物,但是作为新兴的动物克隆技术本身仍处于基础研究阶段,在理论和实践上都不完全成熟。克隆过程中还存在很多有待深入研究的问题,比如,克隆效率太低、克隆个体常伴有的生理或免疫缺陷等。由于缺陷的克隆动物的下一代能够恢复正常,排除了遗传改变的可能性,目前普遍认为造成克隆动物技术效率低、克隆动物发育异常的主要原因是表观遗传学重编程不完全或发生异常导致的。随着iPS技术的出现,人们开始对核移植诱导细胞重编程的途径产生怀疑,甚至有人放弃了体细胞核移植研究转向iPS研究。从个性化治疗的角度来说,考虑到伦理等一系列问题,这种想法是可以理解的。但是,必须注意到,目前人们对于体细胞重编程的了解非常少,iPS细胞用于治疗疾病还有一段很长的路要走,必须对重编程机理进行深入研究,而核移植是研究体细胞重编程机理非常重要的技术手段。

通过前面的分析我们可以看出,如果对克隆胚胎或死亡的克隆动物表观遗传学各个指标进行检

测,基本上都是异常的;而如果以出生后表型正常的克隆动物为研究对象,检测结果基本上都是正常的,这是因为核移植胚胎中只有少数(约 2%—5%)能够正常发育产生后代。因此可以说,体细胞核移植至少可以将一部分分化的体细胞完全彻底的重编程为全能性的胚胎细胞。而如果与 iPS 等技术手段做一个简单的比较,可以看出体细胞核移植仍然是目前最有效最彻底的细胞重编程手段,卵母细胞对体细胞进行重编程的能力远远高于目前发现的任何转录因子组合的转染。尽管体细胞核移植的效率还很低,但是即使以出生正常的克隆动物作为重编程完成的标准,克隆的效率也在 2%—5%,远远高于 iPS 的万分之一,而 iPS 并不能将体细胞重编程为全能性的胚胎细胞。越来越多的证据表明核移植胚中表观遗传学异常更多的是影响囊胚滋养层细胞来源的胚外组织,对内细胞团的影响相对较低。近期的研究也表明克隆胚来源的 ES 细胞在形态学、多潜能性以及转录水平及转录后水平等各个方面与受精胚胎来源的 ES 细胞没有区别<sup>[54-57]</sup>,而从克隆胚中分离获得 ES 细胞的效率高于获得克隆动物的效率,因此也远远高于获得 iPS 的效率。因此,未来我们似乎应该将更多的注意力集中到核移植中那些少数发生完全重编程的胚胎,研究其发生重编程的过程及分子机理将有助于阐明细胞表观遗传学重编程的机理。

### [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] Cowan CA, Atienza J, Melton D, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 2005, 309: 1369-73
- [3] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663-76
- [4] Prather RS, Sims MM, Maul GG, et al. Nuclear lamin antigens are developmentally regulated during porcine and bovine embryogenesis. *Biol Reprod*, 1989, 41(1): 123-32
- [5] Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in the pig embryo: nuclear swelling. *J Exp Zool*, 1990, 255(3): 355-8
- [6] Prather RS, Rickords LF. Developmental regulation of a snRNP core protein epitope during pig embryogenesis and after nuclear transfer for cloning. *Mol Reprod Dev*, 1992, 33(2): 119-23
- [7] Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmut I. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol Reprod*, 1993, 49(5): 933-42
- [8] Fulka Jr J, Ouhibi N, Fulka J, et al. Chromosome condensation activity (CCA) in bisected C57BL/6JxCBA mouse oocytes. *Reprod Fertil Dev*, 1995, 7(5): 1123-7
- [9] Goto S, Naito K, Ohashi S, et al. Effects of spindle removal on MPF and MAP kinase activities in porcine matured oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2002, 63(3): 388-93
- [10] Lee JH, Campbell KH. Effects of enucleation and caffeine on maturation-promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) activities in ovine oocytes used as recipient cytoplasts for nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2006, 74(4): 691-8
- [11] Mitalipov SM, Zhou Q, Byrne JA, et al. Reprogramming following somatic cell nuclear transfer in primates is dependent upon nuclear remodeling. *Hum Reprod*, 2007, 22(8): 2232-42
- [12] Teranishi T, Tanaka M, Kimoto S, et al. Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer. *Dev Biol*, 2004, 266(1): 76-86
- [13] Gao SR, Chung YG, Parseghian MH, et al. Rapid HI linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Dev Biol*, 2004, 266(1): 62-75
- [14] Bordignon V, Clarke HJ, Smith LC. Factors controlling the loss of immunoreactive somatic histone HI from blastomere nuclei in oocyte cytoplasm: a potential marker of nuclear reprogramming. *Dev Biol*, 2001; 233(1): 192-203
- [15] Khan SM, Smigrodzki RM, Swerdlow RH. Cell and animal models of mtDNA biology: progress and prospects. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(2): 658-69
- [16] Kaneda H, Hayashi JI, Takahama S, et al. Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(10): 4542-6
- [17] Shitara H, Kaneda H, Sato A, et al. Non-invasive visualization of sperm mitochondria behavior in transgenic mice with introduced green fluorescent protein (GFP). *FEBS Lett*, 2001, 500(1-2): 7-11
- [18] Schwartz M, Vissing J. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*, 2002, 347(8): 576-80
- [19] Spikings EC, Alderson J, St John JC. Transmission of mitochondrial DNA following assisted reproduction and nuclear transfer. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(4): 401-15
- [20] Bowles EJ, Lee JH, Alberio R, et al. Contrasting effects of *in vitro* fertilization and nuclear transfer on the expression of mtDNA replication factors. *Genetics*, 2007, 176(3): 1511-26
- [21] Bowles EJ, Tecirlioglu RT, French AJ, et al. Mitochondrial DNA transmission and transcription after somatic cell fusion to one or more cytoplasts. *Stem Cells*, 2008, 26(3): 775-82
- [22] Lloyd RE, Lee JH, Alberio R, et al. Aberrant nucleo-cytoplasmic cross-talk results in donor cell mtDNA persistence in cloned embryos. *Genetics*, 2006, 172(4): 2515-27
- [23] Takeda K, Akagi S, Kaneyama K, et al. Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos*

- taurus*) derived from cumulus cells. *Mol Reprod Dev*, 2003, 64(4): 429-37
- [24] Schatten G. The centrosome and its mode of inheritance—the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol*, 1994, 165(2): 299-335
- [25] Mananadhar G, Schatten H, Lai L, et al. Centrosomal protein centrin is not detectable during early cleavages but reappears during late blastocyst stage in porcine embryos. *Biol Reprod*, 2004, (Special Issue): 146
- [26] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001, 293(5532): 1089-93
- [27] Mayer W, Niveleau A, Walter J, et al. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 2000, 403(6769): 501-2
- [28] Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14(1): 93-100
- [29] Santos F, Hendrich B, Reik W, et al. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*, 2002, 241(1): 172-82
- [30] Kang YK, Park JS, Koo DB, et al. Limited demethylation leaves mosaic type methylation states in cloned bovine preimplantation embryos. *EMBO J*, 2002, 21(5): 1092-100
- [31] Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, et al. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, 2003, 13(13): 1116-21
- [32] Yang X, Smith SL, Tian XC, et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 295-302
- [33] Jaenisch R. DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet*, 1997, 13(8): 323-29
- [34] Reik W. Genomic imprinting and genetic disorders in man. *Trends Genet*, 1989, 5(10): 331-6
- [35] Reik W, Constancia M. Genomic imprinting. marking sense or antisense? *Nature*, 1997, 389(6652): 669-71
- [36] Young LE, Fairburn HR. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology*, 2000, 53(2): 627-48
- [37] Yang L, Chavatte-Palmer P, Kubota C, et al. Expression of imprinted genes is aberrant in deceased newborn cloned calves and relatively normal in surviving adult clones. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71(4): 431-8
- [38] Xue F, Tian XC, Du F, et al. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet*, 2002, 31(2): 216-20
- [39] Jiang L, Lai L, Samuel M, et al. Expression of X-linked genes in deceased neonates and surviving cloned female piglets. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(2): 265-73
- [40] Peters AH, Mermound JE, O'Carroll D, et al. Histone H3 lysine9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterchromatin. *Nat Genet*, 2002, 30(1): 77-80
- [41] Boggs BA, Cheung P, Heard E, et al. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet*, 2002, 30(1): 73-6
- [42] Kim JM, Liu H, Tazaki M, et al. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J Cell Biol*, 2003, 162(1): 37-46
- [43] Endo T, Naito K, Aoki F, et al. Changes in histone modifications during *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71(1): 123-8
- [44] Adenot PG, Mercier Y, Renard JP, et al. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*, 1997, 124(22): 4615-25
- [45] Bui HT, Van Thuan N, Wakayama T, et al. Chromatin remodeling in somatic cells injected into mature pig oocytes. *Reproduction*, 2006, 131(6): 1037-49
- [46] Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, et al. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 183-9
- [47] Van Thuan N, Bui HT, Kim JH, et al. The histone deacetylase inhibitor scriptaid enhances nascent mRNA production and rescues full-term development in cloned inbred mice. *Reproduction*, 2009 May 11. [Epub ahead of print]
- [48] Zhao J, Ross JW, Hao Y, et al. Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2009, Apr 22. [Epub ahead of print]
- [49] Shiels PG, Kind AJ, Campbell KH, et al. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*, 1999, 399(6734): 316-7
- [50] Tian XC, Xu J, Yang X. Normal telomere lengths found in cloned cattle. *Nat Genet*, 2000, 26(3): 272-3
- [51] Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, et al. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, 2000, 288(5466): 665-9
- [52] Betts DH, Bordignon V, Hill JR, et al. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(3): 1077-82
- [53] Wakayama T, Tateno H, Mombaerts P, et al. Nuclear transfer into mouse zygotes. *Nat Genet*, 2000, 24(2): 108-9
- [54] Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, et al. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science*, 2001, 292(5517): 740-3
- [55] 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
- [56] Brambrink T, Hochedlinger K, Bell G, et al. ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(4): 933-8
- [57] Ding J, Guo Y, Liu S, et al. Embryonic stem cells derived from somatic cloned and fertilized blastocysts are post-transcriptionally indistinguishable: a microRNA and protein profile comparison. *Proteomics*, 2009, 22(9): 2711-21