

文章编号: 1004-0374(2010)09-0837-09

## 供体细胞与哺乳动物体细胞核移植

王 维, 李运生, 曹鸿国, 张运海\*

(安徽农业大学动物科技学院, 安徽地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级实验室, 合肥 230036)

**摘 要:** 哺乳动物体细胞核移植(克隆)技术在转基因动物生产、珍稀动物资源复原与保护、生物学基础研究等方面业已显示出重要的应用价值, 而目前该技术还与诱导多能干细胞技术一同被认为是创制患者特异性多能干细胞, 为再生医学临床“细胞治疗”提供素材的最佳手段。但是, 体细胞克隆的效率仍不理想, 关键机制还不清楚, 严重制约了该技术的推广。因此, 如何提高克隆效率已成为人们普遍关心的首要问题。在体细胞克隆技术所涉及的各环节中, 供体细胞是影响克隆效率的最关键因素之一。该文从供体细胞的生物学因素和技术因素两方面进行了回顾, 旨在为进一步探寻建立物种或供体细胞个性化准备方案, 为提高动物克隆效率提供参考。

**关键词:** 体细胞核移植; 重编程; 供体细胞

**中图分类号:** Q813 **文献标识码:** A

## Lessons learned from effect of donor cells' on efficiency of somatic cell nuclear transfer in mammals

WANG Wei, LI Yun-sheng, CAO Hong-guo, ZHANG Yun-hai\*

(Anhui Provincial Laboratory of Local Domesitic Animal Genetic Resource Conservation and Biological Breeding, College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** Somatic cell nuclear transfer (cloning) has shown its important practical values in aspects of animal transgenesis, recovery and protection of rare or endangered animal species, and biological basic researches, and especially this technique, together with induced pluripotent stem cell technology, is recognized as a most ideal tool to provide potential tailored patient specific pluripotent stem cells for cell therapies in human regenerative medicine clinics. However, unfortunately, poor cloning efficiency and unclear understanding of key mechanisms underlying nuclear reprogramming seriously limit wider uses of animal cloning. Thus, improvement of the cloning efficiency seems to be cloner's priority. Donor cells are regarded as one of the most essential factors among those influencing outcome of mammalian cloning. Herein, this paper reviewed lessons learned from somatic donors' effect on animal cloning efficiency, specifically from the biological and technological aspects of donor cells, to help better our understanding of setting up species- or donor cell type- specific protocols for increasing cloning efficacy.

**Key words:** somatic cell nuclear transfer; reprogramming; donor cells

1997年, 世界首例体细胞克隆动物——绵羊“Dolly”<sup>[1]</sup>的诞生标志着生命科学进入了一个崭新时代, 克隆技术一夜之间成为人们关注的焦点。这项本意用来提高转基因动物制备效率的研究, 给人们带来的不仅仅是一只如今陈列在大英博物馆的绵羊, 还推翻了人们长期以来关于“发育全能性随着

收稿日期: 2010-03-09; 修回日期: 2010-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700574); 重大科学研究计划(2009CB941004); 国家科技支撑计划(2008BADB2B11-4); 转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08006-004B)

\*通讯作者 E-mail: yunhaizhang@ahau.edu.cn

发育、生长、衰老而不断丢失”的错误认识。而伴随着胚胎干细胞系的成功建立和十余种动物<sup>[2]</sup>接连被成功克隆,人们越发清晰地看到该技术可能蕴藏的巨大价值:在畜牧业上,克隆技术有望为高产、优秀家畜扩群,为地方珍稀家畜资源保护及家畜传统品种改造和新品种培育等提供崭新的工具;体细胞克隆技术与胚胎干细胞技术结合,为“治疗性克隆”、“再生医学”和“组织工程”的技术创新奠定基础<sup>[3]</sup>;与转基因及基因靶技术结合,即使用转基因或者靶基因修正后的细胞系生产转基因克隆动物群,解决了以往显微注射方法不可预测以及成功率低的问题,将转基因技术效率提高数十倍,并且除小鼠外,对其他动物进行基因靶操作成为可能<sup>[4]</sup>,使转基因动物生产焕发新的活力;为发育与生殖生物学基础研究提供了新的模型,有助于人类进一步了解高等动物细胞分化/去分化、生长、发育、衰老、肿瘤发生以及慢性神经退行性疾病发病机理等,为攻克威胁人类生存的疾病提供依据。

然而,目前体细胞克隆效率仍不理想,平均还不到5%<sup>[5]</sup>;克隆胚胎在发育的各个阶段的死亡率非常高,即使是发育满期的克隆动物在出生前后死亡率也相当高,且常常出现各种畸形,严重制约了克隆技术在生产中的推广应用。因此,如何提高克隆效率已成为人们普遍关心的首要问题。在克隆技术所涉及的各环节中,供体细胞作为克隆胚的主要遗传物质,决定着核重编程进行的正确性和完整性,是影响克隆效率的最关键因素之一。本文从体细胞生物学因素和技术因素两方面进行了回顾,旨在为进一步探寻建立物种或供体细胞个性化准备方案,为提高动物克隆效率提供参考。

## 1 生物学特性

### 1.1 细胞类型

如今,已经被用来做体细胞核移植实验的细胞种类不到哺乳动物机体细胞种类(200多种)的5%,而能正常获得克隆动物的供体细胞类型也没有明显增加。有些类型的细胞做供体时需要特异的构建、培养和移植方案,如处于终末分化期的成熟淋巴细胞B细胞、T细胞以及嗅觉神经元细胞做供体时,比较流行的做法是借助于四倍体补偿法构建胚胎来生产克隆小鼠<sup>[6,7]</sup>;最近通过诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)获得iPS小鼠<sup>[8,9]</sup>也是采用的这个方案。目前,用于生产克隆动物的供体细胞

主要是:(1)来源于生殖系统的细胞,如颗粒细胞、卵丘细胞、输卵管上皮细胞、子宫上皮细胞、未成熟的睾丸支持细胞、原始生殖细胞等;(2)来自胎儿的细胞,胎儿成纤维细胞;(3)来自成年个体非生殖系统的细胞,如乳腺上皮细胞、皮肤成纤维细胞、耳组织成纤维细胞、肌肉细胞、尾尖成纤维细胞等<sup>[10]</sup>; (4)来自淋巴系统的细胞:终末分化的B细胞、T细胞;(5)干细胞,如胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)、骨髓间充质干细胞等<sup>[11]</sup>。人们在选择具体的供体细胞时,一般主要考虑取材是否方便、动物福利、实验目的等,如在生产转基因动物,尤其是制备基因打靶大家畜时,往往选择体外培养生长旺盛、筛选窗口期长、相对容易获取的胎儿成纤维细胞用于核供体<sup>[12]</sup>。

### 1.2 供体细胞分化程度

自从多莉羊诞生以后人们做了很多来自不同分化组织和不同年龄的细胞的核移植。Jaenisch等<sup>[13]</sup>和Obach等<sup>[12]</sup>认为供体细胞的分化程度会影响克隆胚的发育能力和克隆效率,而采用分化程度较高的供体细胞可能是导致克隆效率和质量低下的原因之一。尽管有报道称ES的表观修饰不稳定<sup>[14]</sup>,但在小鼠上利用ES细胞进行核移植发现,克隆胚发育程度要好于其他细胞<sup>[15]</sup>。一直以来,还存在另外一种争论:成体干细胞,如造血干细胞和终末分化细胞,做供体克隆效率究竟哪一类较好。Jin等<sup>[16]</sup>的研究认为,相比胎儿成纤维细胞,骨髓间充质干细胞做供体获得的囊胚率和囊胚质量都要好;Bleiloch等<sup>[17]</sup>的研究则发现神经干细胞做供体要比终末分化的细胞效率高;但是Sung等<sup>[18]</sup>和Inoue等<sup>[19]</sup>发现随着分化程度的增加,供体细胞能更好地支持克隆小鼠胚胎的发育。

#### 1.2.1 胚胎干细胞核移植

小鼠中的研究表明,ES作供体时的克隆效率要高于体细胞<sup>[20-22]</sup>,用ES可以获得健康的近交系和远交系小鼠<sup>[20]</sup>;而牛的类型胚胎干细胞也比体细胞的克隆效率高<sup>[23]</sup>。在小鼠中,人们针对一些较难获得克隆后代的供体细胞,尝试先建立该供体细胞克隆胚干细胞系(nuclear transfer embryonic stem cells, ntES),然后再用该干细胞系的ES细胞来生产克隆动物,获得了意想不到的成功<sup>[24]</sup>。我们推测,胚胎干细胞克隆效率相比而言较高而稳定,其关键原因可能是干细胞自身的表观修饰水平有利于在受体卵胞质因子的综合作用下发生较完全的重编程。

### 1.2.2 成体干细胞核移植

在小鼠中, 采用骨髓间充质干细胞<sup>[11]</sup>、神经干细胞<sup>[22]</sup>、造血干细胞<sup>[18, 19]</sup>、胎儿成体干细胞<sup>[25]</sup>、毛囊干细胞和皮肤角质干细胞<sup>[26]</sup>等成体干细胞开展核移植实验, 与分化体细胞作供体时相比, 并没有表现出预期的更高的克隆胚的发育或克隆效率, 说明使用较低分化水平的供体细胞可能并非提高克隆胚发育能力的惟一关键。但是, 也有报道称成体干细胞作核供体可提高克隆胚体外发育能力及克隆效率。例如, 在猪中, 来自骨髓间质干细胞<sup>[16]</sup>、唾液腺源祖细胞(salivary gland-derived progenitor cells)<sup>[27]</sup>的克隆胚都比源于胎儿成纤维细胞的克隆胚囊胚率高, 甚至支持胚胎的满期(to term)发育<sup>[27]</sup>; 在牛中, 当使用间质干细胞作供体时, 也取得了类似结果<sup>[28, 29]</sup>; 此外, Yamazaki 等<sup>[30]</sup>发现小鼠神经干细胞比神经细胞更有助于克隆胚发育。这些成体干细胞作供体时表现出较高的克隆胚胎发育能力或(和)克隆效率, 其背后肯定存在着某种提高克隆效率的机制, 笔者认为关键可能不是细胞的分化水平, 而很可能是由于细胞的表观遗传修饰水平不同所致, 但目前对成体干细胞的研究还都停留在核移植的效率以及克隆个体的出生上, 尚未深入探讨其表观遗传机制。因此, 细胞分化水平与克隆效率之间确切的相关关系还有待进一步的研究来揭示。

### 1.3 供体细胞的传代次数

在牛中, Kubota 等<sup>[31]</sup>发现在体外经过多次传代的细胞有助于克隆胚胎的发育。而在猪中, Lee 等<sup>[32]</sup>经 1~10 次传代培养的细胞支持重组胚发育的效率比经历 10 次以上的更高。这可能是物种间的差异, 也可能是由于成年动物以及胎儿成纤维细胞在体外培养的生长动力学不完全一致所引起的。我们的研究也表明, 细胞经历 10 次以上传代培养之后支持克隆胚胎在体外发育的能力明显不如传代 10 次以内的细胞。而对 10 次以内的传代细胞而言, 6~9 次传代培养的细胞又显著高于 5 次以内的。这可能是由于 5 代之内成纤维细胞的纯度以及一致性不如 6~9 代细胞。

目前, 关于供体细胞传代次数对克隆效率的确切影响尚存争议。有资料表明, 随传代次数的增加, 供体细胞核基因组稳定性、完整性降低<sup>[33]</sup>, 克隆效率下降<sup>[34]</sup>, 克隆胚的细胞凋亡率上升<sup>[35]</sup>。而 Kubota 等<sup>[31]</sup>则认为高代次(9代以上)的细胞核移植有更高的胚胎发育能力, 因为, 多次传代培养有助于提高供核细胞的组蛋白乙酰化水平<sup>[36]</sup>。近年来, 也

有部分研究认为, 细胞的代次对克隆胚囊胚发育并无明显影响<sup>[37-39]</sup>, 但是来自同一细胞类型的不同细胞系之间的差异往往导致克隆胚的发育命运各异<sup>[39]</sup>。

### 1.4 细胞的形态

细胞形态主要是指消化脱壁之后, 表面的光滑度、形状。Wang 等<sup>[40]</sup>认为表面粗糙的细胞使重构卵的融合率下降, Tao 等<sup>[41]</sup>也发现表面粗糙的细胞克隆胚胎的原核形成率明显降低。而笔者却发现, 圆形且表面粗糙的细胞做供体, 只对重构卵融合率有明显影响, 而对克隆胚早期发育影响不大<sup>[42]</sup>。

### 1.5 供体细胞的年龄和性别

人们从克隆羊 Dolly 的早衰情况推测: 供体细胞年龄可能会影响克隆动物的寿命。然而, Hill 等<sup>[43]</sup>利用来自不同年龄个体的体细胞开展克隆研究时却发现, 无论是来自胎牛, 还是成年牛的耳皮肤细胞, 所得克隆胚早期发育命运差异不明显; 此外, 在小鼠上也有类似的发现。与 Kato 等<sup>[44]</sup>的结果相似, 笔者发现成体猪耳皮肤成纤维细胞作供体时, 克隆胚早期发育效率与以其女儿的细胞得到的没有多大差别。上述这些报道至少表明, 供体细胞的年龄可能并非影响克隆效率的关键因素<sup>[45]</sup>。

就供体细胞性别而言, 研究发现不同性别供体细胞核移植均能获得克隆个体<sup>[45]</sup>, 且供体细胞性别不影响克隆胚的发育<sup>[44, 45]</sup>。

### 1.6 供体细胞的周期

迄今, 除 S 期外的 G<sub>0</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 和 M 期的供体细胞都已成功获得克隆后代, “供体细胞处在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期”不再被认为是克隆成功的必要条件。但研究也发现 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞易于被重编程。对供体细胞进行同步化至 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的处理仍然流行, 并且与 G<sub>0</sub> 的供体细胞相比, G<sub>1</sub> 期似乎更有利于 DNA 的合成以及克隆胚的体内外发育<sup>[46, 47]</sup>。

### 1.7 细胞的活性

2002 年, Loi 等<sup>[48]</sup>发现用热处理使供体细胞失活后, 克隆胚的发育仍然保持正常, 并获得了后代。最近, 无论是用 -80℃ 保存 1 年的小鼠体细胞, 还是使用 -20℃ 冷冻 16 年的小鼠体细胞核, 都能成功获得健康的克隆后代<sup>[24]</sup>。用失去活性的细胞进行克隆获得后代难度较大, 需要先得到 ntES, 再用 ntES 进行核移植才能得到出生动物。这些实验表明供体细胞即使失去活性, 也至少有部分能保持完整的核物质, 指导克隆胚发育。这极大地丰富了供体细胞选择范围, 尤其是对部分已灭绝物种的克隆复

原,可能会在未来取得突破。

### 1.8 供体细胞的表观修饰水平

表观遗传学(epigenetics)调控指在不改变基因DNA序列的前提下,通过DNA甲基化、组蛋白修饰、染色质重塑及非编码RNA调控等途径影响和调节基因表达和功能发挥。哺乳动物在发育过程中,不同细胞和组织按照不同的基因表达程序发育。除了遗传上的作用之外,还受到表观遗传修饰诸如DNA甲基化、组蛋白末端修饰和非组蛋白的调节等<sup>[49]</sup>。这样以来,哺乳动物的各种细胞类型都有自己的表观标记,它反映了个体的基因型、发育历程和环境影响,最终通过细胞和动物个体的表型体现出来。对体内的大部分细胞类型而言,一旦它们处于分化的状态或退出细胞周期时,表观修饰的标记就会固定下来。在正常发育时,一些细胞会进行表观重编程,包括细胞核内表观标记的清除并随之建立一套新的标记<sup>[50]</sup>。例如,在受精阶段,配子上很多的标记被清除,然后被一些早期胚胎发育和全能性维持有关的胚胎特异性标记取代。关键的重编程还发生在原始生殖细胞迁移过程中,在这期间亲本印记被清除,恢复细胞全能性。当然,最极端的重编程(reprogramming)发生在体细胞核移植后的胚胎发育及iPS细胞诱导过程中<sup>[51]</sup>。

由于克隆胚胎、动物来自高度分化的供体细胞,其核遗传物质和供体细胞完全一致,所以人们普遍认为表观遗传水平的异常是克隆效率低下的主要原因之一<sup>[52-56]</sup>。而供体细胞作为重编程事件的客体,其表观遗传修饰水平的差别可能决定了卵胞质对其进行重编程的难易程度,进而影响克隆胚发育命运各异。如Enright等<sup>[57]</sup>发现,细胞类型、细胞周期阶段或体外培养处理过程均影响供体细胞的组蛋白乙酰化水平,直接反应为克隆效率不尽相同。Bonk等<sup>[58]</sup>使用基因芯片技术检测发现,猪供体细胞的甲基化水平与体内发育的囊胚甲基化水平越接近,克隆效率就越高。Wilmut等<sup>[59]</sup>认为克隆效率的进一步提高可能需要人为干预来促进供体核的重编程来实现。目前,尽管人们还没有就选择DNA甲基化水平较低、组蛋白乙酰化水平较高的供体细胞形成共识,但是已经陆续开始通过人为干预来改变细胞的表观修饰水平,尝试提高克隆胚发育能力和克隆效率<sup>[60]</sup>(在第二段技术层面上详述)。

### 1.9 iPS细胞核移植

iPS技术是在动物或人的体细胞中通过基因导入

技术导入某些特定因子,并选择性地在培养液中加入特定的小分子物质,使体细胞重编程为多潜能干细胞。目前,人们已经在小鼠<sup>[61]</sup>、人<sup>[62,63]</sup>、猴<sup>[38]</sup>、大鼠<sup>[64,65]</sup>、猪<sup>[66-68]</sup>上成功诱导出iPS细胞,但利用这些iPS细胞做核移植实验的报道还很少,只在小鼠上利用四倍体补偿法成功获得iPS细胞生产出嵌合体小鼠<sup>[8,9]</sup>,表明iPS细胞核具有发育成一个完整个体的能力。属于多能细胞的iPS细胞,和ES细胞在DNA甲基化、组蛋白H3赖氨酸4(H3K4)和赖氨酸27(H3K27)的甲基化上十分相似<sup>[51,69]</sup>。使用与ES细胞表观水平相似的iPS细胞开展核移植能否为克隆效率和克隆质量的提高带来重大突破,值得我们期待和研究。而一旦iPS细胞在家畜上被证明能用于生产克隆动物,鉴于iPS细胞的多能特性,必将有助于人们借助此类细胞开展动物转基因、基因打靶等对供体细胞要求苛刻的研究,丰富体细胞克隆的供体细胞选择,服务于畜牧业发展。

## 2 技术层面上

### 2.1 人为干预供体细胞表观修饰水平

与自然受精胚相比,哺乳动物克隆胚都存在DNA甲基化、组蛋白乙酰化等表观修饰的异常<sup>[70]</sup>。受肿瘤临床治疗上利用人为干预的手段来缓解癌症患者症状的启发,通过人为干预改变供体细胞的表观遗传修饰,或帮助卵胞质对供体进行重编程来提高克隆效率正在为人们所关注。基于目前人们对表观遗传学的认识,人为干预改变供体细胞表观修饰水平的手段主要有表观修饰剂干预、卵母细胞提取物处理、基因改造等。

#### 2.1.1 表观修饰剂干预

目前,在动物克隆研究中常用的表观遗传修饰剂如表1所示,包括5-aza-dC(5-氮-2'-脱氧胞苷)和S-adenosylhomocysteine(SAH)等以DNA甲基转移酶为靶点的DNA甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)抑制剂,以及Trichostatin(TSA)和Sciptaid等以组蛋白去乙酰化酶为靶点的组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor, HADCI)。

5-aza-dC对DNMT有很强的抑制作用。Enright等用高于0.04 μmol/L的5-aza-dC处理牛体细胞76 h后,发现克隆囊胚DNA甲基化及组蛋白乙酰化水平降低,甚至能达到与体外受精胚相似的水平,但这一处理不利于克隆胚发育,也造成了克隆囊胚发育率显著下降<sup>[57,71,72]</sup>;他们随后将5-aza-dC剂量降至0.01

表1 表观遗传修饰剂处理体细胞对克隆效率的影响

抑制剂类型	表观修饰剂	供体细胞类型	对克隆胚胎发育影响	其他效果	参考文献
组蛋白乙酰化抑制剂	TSA	牛成纤维细胞	是		[36, 60]
	NaBu	兔卵丘细胞; 兔胎儿成纤维细胞	是		[78]
	NaBu	猪胎儿成纤维细胞	无核移植实验		[77]
	TSA	牛转 GFP 成纤维细胞	否	提高转基因克隆胚的比例	[76]
DNA 甲基化抑制剂	5-aza-dC	牛成纤维细胞	否		[72]
	5-aza-dC	猪胎儿成纤维细胞	无核移植实验		[74]
	SAH	牛成纤维细胞	是		[75]

$\mu\text{mol/L}$  (预实验表明无细胞毒作用) 时, 其克隆胚的囊胚率与不用 5-aza-dC 处理组相似<sup>[72]</sup>。造成这样结果的原因可能是: (1) 5-aza-dC 本身对细胞有毒性, 影响后期胚胎的发育; (2) 5-aza-dC 抑制的是所有的 DNMTs 的活性, 而提高克隆效率关键可能是对某个具体的 DNMT 的抑制, 如 DNMT1<sup>[73]</sup>。Mohana Kumar 等<sup>[74]</sup> 尝试在经 5-aza-dC 处理后, 根据猪胎儿成纤维细胞细胞形态变化、周期改变、凋亡发生等情况, 来筛选处理方案, 并发现 0.5  $\mu\text{mol/L}$  的 5-aza-dC 处理供体细胞 96 h 的组合, 但未提及该方案能否改善克隆胚发育命运。Jeon 等<sup>[75]</sup> 用 SAH 处理成年牛体细胞, 发现能有效降低供体细胞的全基因组 DNA 甲基化水平, 同时可提高克隆胚体外发育能力。

作为肿瘤化学治疗的药物, TSA 抑制组蛋白去乙酰化酶的能力很强。2003 年, Enright 等<sup>[36]</sup> 用 1.25  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$  的 TSA 处理牛成纤维细胞, 发现能有效提高受处理细胞的组蛋白 H3 乙酰化水平, 尤其是 0.08  $\mu\text{mol/L}$  的 TSA 处理还能促进克隆胚的发育。2007 年, Wee 等<sup>[60]</sup> 发现 TSA 也可改变牛成纤维细胞 DNA 甲基化水平, 并有利于增强克隆胚的发育能力。2008 年, Wu 等<sup>[76]</sup> 在用 TSA 处理转基因细胞时, 筛选出能有效改变表观修饰水平的浓度, 但该浓度的 TSA 处理仅能提高转基因克隆胚囊胚发育, 而对克隆胚的发育命运并无实质上的帮助。

2007 年, Mohana Kumar 等<sup>[77]</sup> 尝试利用丁酸钠 (sodium butyrate, NaBu) 处理猪胎儿成纤维细胞, 根据受试细胞形态、细胞周期、凋亡、染色体倍性、组蛋白乙酰化和凋亡相关基因表达的变化情况, 声称筛选出了可能有助于提高克隆胚胎发育的 NaBu 处理方法, 即 1.0  $\mu\text{mol/L}$  处理 96 h, 但均未经核移植实验证实。不过, 同年, Yang 等<sup>[78]</sup> 使用

NaBu 处理兔体细胞, 发现不仅能显著提高兔克隆胚的发育能力, 而且克隆胚的发育能力与供体细胞组蛋白乙酰化水平相关。

使用表观修饰剂提高体细胞克隆效率虽取得了一定的成功, 但仍有很多问题尚不清楚, 如使用修饰剂人为干预异常的表观修饰时, 选择恰当的处理剂量、时间十分重要, 其潜在的作用机理是什么; 表观修饰的改变对胚胎发育中的一些重要基因会带来什么样的变化; 是否能研发出针对特定类型细胞的特异性强、个性化的, 只改变关键修饰位点, 而不至于影响一般位点的药物和方法。对于这些问题的深入研究将有助于寻找更高效、低毒副作用的人为干预表观水平, 提高克隆效率的好方法。

### 2.1.2 RNA 干扰

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种高效的特异性强的基因阻断技术, 是通过实验手段将双链 RNA (ds-RNA) 导入细胞内, 特异性地降解与之同源的 mRNA。其中, 小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 可通过使目标 RNA 降解, 进而沉默靶基因, 能有效介导培养的哺乳动物细胞发生 RNAi。在哺乳动物中, 常见 DNMT 主要有 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 三种, 其中主要由 DNMT1 负责 DNA 甲基化水平的维持。因此, 理论上讲, 用 DNMT1 基因特异的 siRNA (DNMT1-specific siRNA) 应能有效、特异性地抑制 DNMT1 的表达, 降低 DNA 甲基化的水平<sup>[79]</sup>。

2009 年, Giraldo 等<sup>[80]</sup> 采用 siRNA 技术有效抑制了牛成纤维细胞 DNMT1 的表达, 降低了克隆胚中过高的 DNA 甲基化水平。但是, 由于降低的水平较有限, 未能达到与体外受精胚相似的甲基化水平, 能否显著提高克隆效率还需进一步研究。随后, Giraldo 等<sup>[81]</sup> 又利用 siRNA 成功抑制并降低了猪

胎儿成纤维细胞的DNMT1的表达,发现轻微降低DNMT1的表达就足以使供体细胞的DNA甲基化水平有显著降低。

目前,此方面的研究大多处于探索阶段,加之哺乳动物的RNAi能否有效抑制基因表达及抑制程度受多种因素影响(如细胞类型),所以,利用siRNA干扰改善表观修饰水平,提高克隆效率尚需时日。

## 2.2 细胞提取物孵育

克隆动物的成功诞生表明,存在于卵母细胞中的一些分子可以有效地重编程供体细胞核。在细胞培养时,使用细胞提取物孵育体细胞也同样可以改变其表观修饰水平,而这种改变如果合理,有可能会提高克隆胚的发育能力。

2008年,Bui等<sup>[82]</sup>用小鼠GV期卵母细胞提取物尝试处理小鼠卵丘细胞,发现不仅能使H3K9彻底去甲基化和H3K9、H3K14部分去乙酰化,而且还能显著提高克隆胚囊胚发育率;不过,小鼠MII期卵母细胞提取物虽也能使卵丘细胞发生重编程,但克隆胚发育没有得到明显改善。2009年,Tang等<sup>[83]</sup>用牛MII期卵母细胞提取物孵育牛成纤维细胞,亦可改善克隆胚发育能力,而GV期卵母细胞、孤雌胚的提取物虽也能使受体细胞发生重编程,但未能促进克隆胚发育。上述结果表明,不同时期的卵母细胞提取物重编程的能力存在差异,而这种差异极可能是造成克隆胚发育能力不同的原因。所以,用卵母细胞提取物孵育供体细胞提高克隆胚的发育能力受到物种和卵母细胞的发育阶段的影响,在具体应用时应进行筛选。

除用雌性生殖细胞(卵母细胞)提取物外,用睾丸细胞的提取物(testis extracts)孵育供体细胞,也可以让细胞的雄性生殖细胞特异性基因和雄性生殖细胞功能得到部分/短期表达,同时提高猪克隆胚的囊胚率以及多能性基因,如*Nanog*、*Sox9*和*Eomes*的表达水平<sup>[84]</sup>。Sullivan等<sup>[85]</sup>发现,牛胎儿成纤维细胞被链球菌溶血素O(Streptolysin O, SLO)渗透后与有丝细胞提取物一起孵育,能显著提高核移植牛的克隆成功率。

## 2.3 细胞同步化处理

常用的细胞同步化的方案有血清饥饿、接触抑制、Roscovitine(一种依赖于周期素的蛋白激酶2的抑制剂)处理等,它们都能有效地将细胞静止在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,但血清饥饿法常会诱发细胞凋亡,降低克隆胚的发育能力<sup>[42, 86, 87]</sup>,囊胚细胞凋亡率上升<sup>[87, 88]</sup>;与

血清饥饿相比,接触抑制诱发细胞凋亡率较低,克隆囊胚率也较高<sup>[89]</sup>;而使用Roscovitine处理有着较小的细胞凋亡率,并能显著提高猪<sup>[87]</sup>和犬类动物<sup>[90]</sup>的克隆胚的发育能力及克隆后代出生率<sup>[87, 90]</sup>。

## 2.4 细胞质膜通透性改善

细胞的质膜是包围在细胞外表面将细胞与其周围环境分隔开的生物膜。使用SLO可以透化哺乳细胞的胞质膜,在胞质膜上形成微孔,从而使细胞更好地与外界环境进行物质交换和信息传递。因此,在用细胞提取物孵育体细胞时,常同时用SLO改善质膜的通透性,让细胞提取物的有效因子更加充分的进入细胞中。Naruse等<sup>[91]</sup>用SLO透化的猪胎儿成纤维细胞进行核移植,发现重构胚融合率和后期囊胚率均有提高,表明质膜通透性的适当改善有利于供体细胞和卵母细胞胞质的融合和进行有效的重编程。

## 2.5 细胞保存方法对核移植的影响

细胞超低温(-196℃液氮)冻存常用于长期保存一些重要细胞系,而低温冷藏(一般指在4℃冰箱内保存)细胞方便取用,但保存时间有限。源于冻存细胞与新鲜细胞的克隆胚胎,其体外发育能力相似<sup>[92]</sup>,均能获得克隆后代<sup>[93]</sup>。低温冷藏可使细胞迅速进入休眠状态,不会对细胞核质造成较大伤害,一般将供体细胞在4℃冰箱保存1~2周不会影响克隆胚发育能力<sup>[94]</sup>,短期冷藏的供体细胞与新鲜消化的供体细胞所获克隆胚有着相似的囊胚率<sup>[42]</sup>。

干冻法常温保存供体细胞能省去如冷冻设施和繁琐操作。常温干冻法保存的小鼠精子能获得ISCI后代<sup>[95]</sup>,伴随干冻保护剂的添加<sup>[96]</sup>,干冻保存的效果得到提高。Loi等<sup>[97]</sup>用干冻保存三年的绵羊体细胞核移植获得囊胚,表明供体细胞干冻后仍能支持克隆胚的早期发育<sup>[98]</sup>。虽然这种保存方法不能保持细胞的所有生物学活性,但细胞核的完整性却得到很好的保持,干冻后的体细胞仍然能用于生产克隆动物和嵌合体动物<sup>[99]</sup>。干冻法常温保存供体细胞为供体细胞准备、存放提供了新的选择。

## 3 展望

体细胞核是克隆的遗传物质主要来源,供体细胞核在受体卵胞质作用下的重编程直接关系到克隆胚胎、动物的发育命运。我们最终的目的是照顾动物福利、生物安全的同时,进一步提高克隆效率并保证克隆后代的健康,服务于现代畜牧业、医学及生物学基础研究的需要。现代技术工具和新的检测

手段如 iPS 技术、基因芯片、蛋白质组学、系统生物学等平台的层出不穷, 将为供体细胞筛选、准备等提供帮助, 有助于人们发现克隆背后蕴藏分子机制、作用网络, iPS 技术在小鼠、人、猴、猪、大鼠等动物上的相继成功就是一个鲜明的例证。

### [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] Cibelli J. Developmental biology. A decade of cloning mystique. *Science*, 2007, 316(5827): 990-2
- [3] Cibelli J. Development. Is therapeutic cloning dead? *Science*, 2007, 318(5858): 1879-80
- [4] Prather RS, Hawley RJ, Carter DB, et al. Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 115-23
- [5] Wakayama T. Production of cloned mice and ES cells from adult somatic cells by nuclear transfer: how to improve cloning efficiency? *J Reprod Dev*, 2007, 53(1): 13-26
- [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 J, 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] Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461(7260): 86-90
- [9] Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(2): 135-8
- [10] 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
- [11] Faast R, Harrison SJ, Beebe LF, 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
- [12] Oback B, Wells D. Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4(2): 147-68
- [13] Jaenisch R, Hochedlinger K, Eggan K. Nuclear cloning, epigenetic reprogramming and cellular differentiation. *Novartis Found Symp*, 2005, 265: 107-18
- [14] Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, 2001, 293(5527): 95-7
- [15] Eggan K, Rode A, Jentsch I, et al. Male and female mice derived from the same embryonic stem cell clone by tetraploid embryo complementation. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(5): 455-9
- [16] Jin HF, Kumar BM, Kim JG, et al. Enhanced development of porcine embryos cloned from bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol*, 2007, 51(1): 85-90
- [17] Blelloch R, Wang Z, Meissner A, et al. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells*, 2006, 24(9): 2007-13
- [18] Sung LY, Gao S, Shen H, 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
- [19] 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
- [20] Wakayama T, Rodriguez I, Perry AC, et al. Mice cloned from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(26): 14984-9
- [21] Rideout WM, 3rd, 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
- [22] Mizutani E, Ohta H, Kishigami S, et al. Developmental ability of cloned embryos from neural stem cells. *Reproduction*, 2006, 132(6): 849-57
- [23] Saito S, Sawai K, Ugai H, et al. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 309(1): 104-13
- [24] 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
- [25] Hornen N, Kues WA, Carnwath JW, et al. Production of viable pigs from fetal somatic stem cells. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(3): 364-73
- [26] Li J, Greco V, Guasch G, et al. Mice cloned from skin cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(8): 2738-43
- [27] Kurome M, Tomii R, Ueno S, et al. Production of cloned pigs from salivary gland-derived progenitor cells. *Cloning Stem Cells*, 2008, 10(2): 277-86
- [28] 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
- [29] 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
- [30] Yamazaki Y, Makino H, Hamaguchi-Hamada K, et al. Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral cortex of mouse embryo by nuclear transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 14022-6
- [31] Kubota C, Yamakuchi H, Todoroki J, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(3): 990-5
- [32] Lee GS, Hyun SH, Kim HS, et al. Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology*, 2003, 59(9): 1949-57
- [33] Mastro Monaco GF, Perrault SD, Betts DH, et al. Role of chromosome stability and telomere length in the production of viable cell lines for somatic cell nuclear transfer. *BMC Dev Biol*, 2006, 6: 41-53

- [34] Li X, Tremoleda JL, Allen WR. Effect of the number of passages of fetal and adult fibroblasts on nuclear remodeling and first embryonic division in reconstructed horse oocytes after nuclear transfer. *Reproduction*, 2003, 125(4): 535-42
- [35] Magnani L, Lee K, Fodor WL, et al. Developmental capacity of porcine nuclear transfer embryos correlate with levels of chromatin-remodeling transcripts in donor cells. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(5): 766-76
- [36] Enright BP, Jeong BS, Yang X, et al. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. *Biol Reprod*, 2003, 69(5): 1525-30
- [37] Kasinathan P, Knott JG, Moreira PN, et al. Effect of fibroblast donor cell age and cell cycle on development of bovine nuclear transfer embryos *in vitro*. *Biol Reprod*, 2001, 64(5): 1487-93
- [38] Liu H, Zhu F, Yong J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(6): 587-90
- [39] Poehland R, Al-Rostum F, Becker F, et al. Donor cell lines considerably affect the outcome of somatic nuclear transfer in the case of bovines. *J Reprod Dev*, 2007, 53(4): 737-48
- [40] Wang YG, Zou XG, Liu J, et al. Cloned goats (*Capra hircus*) from foetal fibroblast cell lines. *Chn Sci Bull*, 2000, 45(1): 34-8
- [41] Tao T, Boquest AC, Machaty Z, et al. Development of pig embryos by nuclear transfer of cultured fibroblast cells. *Cloning Stem Cells*, 1999, 1(1): 55-62
- [42] Zhang Y, Pan D, Sun X, et al. Production of porcine cloned transgenic embryos expressing green fluorescent protein by somatic cell nuclear transfer. *Sci China C: Life Sci*, 2006, 49(2): 164-71
- [43] Hill JR, Winger QA, Long CR, et al. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biol Reprod*, 2000, 62(5): 1135-40
- [44] Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil*, 2000, 120(2): 231-7
- [45] Wakayama T, Yanagimachi R. Mouse cloning with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev*, 2001, 58(4): 376-83
- [46] Miyamoto K, Hoshino Y, Minami N, et al. Effects of synchronization of donor cell cycle on embryonic development and DNA synthesis in porcine nuclear transfer embryos. *J Reprod Dev*, 2007, 53(2): 237-46
- [47] Urakawa M, Ideta A, Sawada T, et al. Examination of a modified cell cycle synchronization method and bovine nuclear transfer using synchronized early G1 phase fibroblast cells. *Theriogenology*, 2004, 62(3-4): 714-28
- [48] 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
- [49] Han YM, Kang YK, Koo DB, et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 33-44
- [50] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001, 293(5532): 1089-93
- [51] Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 2008, 454(7200): 49-55
- [52] Dean W, Santos F, Stojkovic M, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13734-8
- [53] Young LE, Beaujean N. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. *Anim Reprod Sci*, 2004, 82-83: 61-78
- [54] Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J, et al. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr Biol*, 2004, 14(7): R266-7
- [55] Suteevun T, Parnpai R, Smith SL, et al. Epigenetic characteristics of cloned and *in vitro*-fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *J Anim Sci*, 2006, 84(8): 2065-71
- [56] Yang J, Yang S, Beaujean N, et al. Epigenetic marks in cloned rhesus monkey embryos: comparison with counterparts produced *in vitro*. *Biol Reprod*, 2007, 76(1): 36-42
- [57] Enright BP, Kubota C, Yang X, et al. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod*, 2003, 69(3): 896-901
- [58] Bonk AJ, Li R, Lai L, et al. Aberrant DNA methylation in porcine *in vitro* parthenogenetic-, and somatic cell nuclear transfer-produced blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(2): 250-64
- [59] Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, et al. Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 2002, 419(6907): 583-6
- [60] Wee G, Shim JJ, Koo DB, et al. Epigenetic alteration of the donor cells does not recapitulate the reprogramming of DNA methylation in cloned embryos. *Reproduction*, 2007, 134(6): 781-7
- [61] 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
- [62] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861-72
- [63] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-20
- [64] Wang K, Chen Y, Chang EA, et al. Dynamic epigenetic regulation of the Oct4 and Nanog regulatory regions during neural differentiation in rhesus nuclear transfer embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*, 2009, 11(4): 483-96
- [65] Liao J, Cui C, Chen S, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 4(1): 11-5
- [66] Esteban MA, Xu J, Yang J, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *J Biol Chem*, 2009, 284(26): 17634-40
- [67] Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from pigs somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(27): 10993-8
- [68] Wu Z, Chen J, Ren J, et al. Generation of pig induced pluri-



- potent stem cells with a drug-inducible system. *J Mol Cell Biol*, 2009, 1(1): 46-54
- [69] Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(1): 55-70
- [70] Mann MR, Bartolomei MS. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol*, 2002, 3(2): REVIEWS1003
- [71] Jones KL, Hill J, Shin TY, et al. DNA hypomethylation of karyoplasts for bovine nuclear transplantation. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60(2): 208-13
- [72] Enright BP, Sung LY, Chang CC, et al. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod*, 2005, 72(4): 944-8
- [73] Yamanaka K, Balboula AZ, Sakatani M, et al. Gene silencing of DNA methyltransferases by RNA interference in bovine fibroblast cells. *J Reprod Dev*, 2010, 56(1): 60-7
- [74] Mohana Kumar B, Jin HF, Kim JG, et al. DNA methylation levels in porcine fetal fibroblasts induced by an inhibitor of methylation, 5-azacytidine. *Cell Tissue Res*, 2006, 325(3): 445-54
- [75] Jeon BG, Coppola G, Perrault SD, et al. S-adenosyl-homocysteine treatment of adult female fibroblasts alters X-chromosome inactivation and improves *in vitro* embryo development after somatic cell nuclear transfer. *Reproduction*, 2008, 135(6): 815-28
- [76] Wu X, Li Y, Li GP, et al. Trichostatin A improved epigenetic modifications of transfected cells but did not improve subsequent cloned embryo development. *Anim Biotechnol*, 2008, 19(4): 211-24
- [77] Mohana Kumar B, Song HJ, Cho SK, et al. Effect of histone acetylation modification with sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, on cell cycle, apoptosis, ploidy and gene expression in porcine fetal fibroblasts. *J Reprod Dev*, 2007, 53(4): 903-13
- [78] Yang F, Hao R, Kessler B, et al. Rabbit somatic cell cloning: effects of donor cell type, histone acetylation status and chimeric embryo complementation. *Reproduction*, 2007, 133(1): 219-30
- [79] Eilertsen KJ, Power RA, Harkins LL, et al. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*, 2007, 98(1-2): 129-46
- [80] Giraldo AM, Lynn JW, Purpera MN, et al. Inhibition of DNA methyltransferase 1 expression in bovine fibroblast cells used for nuclear transfer. *Reprod Fertil Dev*, 2009, 21(6): 785-95
- [81] Giraldo AM, Vaught TD, Fu L, et al. Gene expression pattern and downregulation of DNA methyltransferase 1 using siRNA in porcine somatic cells. *Gene Exp*, 2009, 14(5): 251-63
- [82] Bui HT, Wakayama S, Kishigami S, et al. The cytoplasm of mouse germinal vesicle stage oocytes can enhance somatic cell nuclear reprogramming. *Development*, 2008, 135(23): 3935-45
- [83] Tang SA, Wang YS, Zhang D, et al. Reprogramming donor cells with oocyte extracts improves *in vitro* development of nuclear transfer embryos. *Anim Reprod Sci*, 2009, 115(1-4): 1-9
- [84] Roh S, Choi HY, Park SK, et al. Porcine nuclear transfer using somatic donor cells altered to express male germ cell function. *Reprod Fertil Dev*, 2009, 21(7): 882-91
- [85] Sullivan EJ, Kasinathan S, Kasinathan P, et al. Cloned calves from chromatin remodeled *in vitro*. *Biol Reprod*, 2004, 70(1): 146-53
- [86] Hashem MA, Bhandari DP, Kang SK, et al. Cell cycle analysis and interspecies nuclear transfer of *in vitro* cultured skin fibroblasts of the Siberian tiger (*Panthera tigris altaica*). *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(4): 403-11
- [87] Park HJ, Koo OJ, Kwon DK, et al. Effect of Roscovitine-treated donor cells on development of porcine cloned embryos. *Reprod Domest Anim*, 2009, [Epub ahead of print]
- [88] Kues WA, Carnwath JW, Paul D, et al. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts by serum deprivation initiates a nonconventional form of apoptosis. *Cloning Stem Cells*, 2002, 4(3): 231-43
- [89] Dalman A, Eftekhari-Yazdi P, Valojerdi M, et al. Synchronizing cell cycle of goat fibroblasts by serum starvation causes apoptosis. *Reprod Domest Anim*, 2009, [Epub ahead of print]
- [90] Oh HJ, Hong SG, Park JE, et al. Improved efficiency of canine nucleus transfer using roscovitine-treated canine fibroblasts. *Theriogenology*, 2009, 72(4): 461-70
- [91] Naruse K, Quan YS, Kim BC, et al. Streptolysin-o treatment of fetal fibroblasts improves cell fusion and *in vitro* development of porcine nuclear transfer embryos. *J Reprod Dev*, 2009, 55(3): 236-9
- [92] Fahrudin M, Otoi T, Suzuki T. Developmental competence of bovine embryos reconstructed by the transfer of somatic cells derived from frozen tissues. *J Vet Med Sci*, 2001, 63(10): 1151-4
- [93] Ogura A, Inoue K, Ogonuki N, et al. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature sertoli cells. *Biol Reprod*, 2000, 62(6): 1579-84
- [94] Liu JL, Wang MK, Sun QY, et al. Refrigeration of donor cells in preparation for bovine somatic nuclear transfer. *Reproduction*, 2001, 122(5): 801-8
- [95] Wakayama T, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(7): 639-41
- [96] Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y. Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum Reprod*, 2008, 23(2): 233-9
- [97] Loi P, Matsukawa K, Ptak G, et al. Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer. *PLoS ONE*, 2008, 3(8): e2978
- [98] Loi P, Matzukawa K, Ptak G, et al. Nuclear transfer of freeze-dried somatic cells into enucleated sheep oocytes. *Reprod Domest Anim*, 2008, 43(Suppl 2): 417-22
- [99] Ono T, Mizutani E, Li C, et al. Nuclear transfer preserves the nuclear genome of freeze-dried mouse cells. *J Reprod Dev*, 2008, 54(6): 486-91