

DOI: 10.13376/j.cbls/2017130

文章编号: 1004-0374(2017)10-0977-06



周琪, 中国科学院动物研究所研究员、博士生导师, 中国科学院院士。现任中国科学院动物研究所副所长, 中国科学院大学副校长, 干细胞与生殖生物学国家重点实验室主任。曾任中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性科技先导专项首席科学家, 国家重大科学研究计划项目首席科学家, 兼任国际干细胞组织主席等职务。主要从事生殖、发育、干细胞和再生医学等研究与转化工作。研究组近年来在体细胞重编程新方法创建与调控机制研究、哺乳动物新型干细胞创建与应用、人类疾病动物模型建立以及干细胞临床转化研究等方面取得多项重要进展。在 *Cell*、*Nature*、*Science* 等期刊发表论文 100 余篇; 迄今为止研究团队独立或合作的工作已 4 次入选年度中国科技十大进展, 一项成果入选美国《时代》周刊评选的年度十大医学突破; 研究组获得中华全国总工会工人先锋号等荣誉。

单倍体胚胎干细胞的获得与应用前景

张 映, 周 琪*

(中国科学院动物研究所干细胞与生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)

摘 要: 单倍体细胞在遗传筛选、生物发育与辅助生殖等研究中都具有重要的应用价值。近年来, 有实验室建立了哺乳动物的单倍体胚胎干细胞系, 但这些单倍体胚胎干细胞是否真的具有多能性以及转基因的单倍体胚胎干细胞能否直接从细胞水平传递到动物水平, 这些问题并不清楚。以自然科学基金委重大研究计划为依托, 周琪实验室开展了系统的研究, 获得了一系列前沿性进展: 获得了具有多能性的单倍体胚胎干细胞; 利用单倍体胚胎干细胞获得基因修饰动物; 利用单倍体胚胎干细胞替代精、卵结合获得后代; 利用单倍体胚胎干细胞进行同性生殖; 利用单倍体胚胎干细胞研究物种间杂交。这一系列自主创新的研究成果推进了整个领域对单倍体胚胎干细胞的认识, 大大拓展了单倍体胚胎干细胞研究的理论价值和前景。现主要对自然科学基金委重大研究计划中周琪实验室的原创性工作进行综述。

关键词: 单倍体胚胎干细胞; 细胞融合; 基因编辑; 异种杂合二倍体胚胎干细胞

中图分类号: Q813; R329.28 **文献标志码:** A

The establishment and prospect of haploid embryonic stem cells

ZHANG Ying, ZHOU Qi*

(State Key Laboratory of Stem Cell and Reproductive Biology, Institute of Zoology,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Haploid embryonic stem cells (haESCs) play pivotal roles in genetic screening, biological development and assisted reproductive technology, yet the pluripotency and transgenic animal of haESCs are remained elusive. Supported by grants from the National Natural Science Foundation of China, we have carried out systemic research centering on haploid embryonic stem cells. We have established haploid embryonic stem cells with pluripotency, produced live transgenic mice and bimaternal offspring using haploid embryonic stem cells, and generated mouse-

收稿日期: 2017-08-02

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划项目(91319308)

*通信作者: E-mail: zhouqi@ioz.ac.cn; Tel: 010-64807299

rat allodiploid embryonic stem cells. These studies have led to a better understanding and prospect of haploid embryonic stem cells. In this article, we summarize our original works funded by the National Natural Science Foundation of China.

Key words: haploid embryonic stem cells; cell fusion; genome editing; allodiploid embryonic stem cells

单倍体细胞只具有一套染色体, 大大降低了基因组的复杂程度, 因而在遗传筛选、生物发育与辅助生殖等研究中都具有重要的应用价值。单倍体细胞在低等生物, 如细菌、真菌中普遍存在, 结合这些物种特有的快速增殖能力, 而成为遗传学和基因组学研究的重要工具, 极大地推动了生命科学研究的进展^[1-2]。因此, 建立单倍体干细胞系并探索其在生命科学与技术研究中的应用具有重要价值。然而, 在高等植物和动物中, 单倍体细胞只在配子细胞中少量的存在, 并且在分离培养时倾向于自发加倍, 给单倍体细胞的建立带来了巨大的挑战。

1 单倍体胚胎干细胞的获得

植物单倍体的研究起始于1972年, Gupta和Carlson^[3]利用化学试剂诱导和优化培养环境的方法首次建立了烟草单倍体细胞系。在此基础上, 单倍体细胞系在不同种类的高等植物中成功建立, 成为开展优良性状的遗传分析及作物育种的重要工具。相比植物, 动物单倍体细胞系的建立更加困难, 之后十几年, 仅在几种低等动物, 如美洲豹蛙、蟑螂、果蝇、青鳞鱼等物种中建立了单倍体细胞系^[4-7]。直到1983年, Kaufman等^[8]发现单倍体细胞在早期胚胎细胞中存在, 并尝试从中建立单倍体胚胎干细胞系。1999年, Kotecki等^[9]从人的血癌细胞中分离得到了接近单倍体的异倍体细胞系, 除了8号染色体外其余染色体都只含有一条。这个细胞系能在体外长期培养扩增, 并能够在快速的遗传筛选中得到应用, 显示了人单倍体细胞系在遗传分析和疾病研究中的潜在价值^[10]。然而, 这些细胞系中都含有少量二倍体细胞, 会出现二倍体细胞过度增殖的情况, 而且长期传代培养时遗传物质不稳定, 会出现部分染色体丢失。这些都大大限制了单倍体细胞的应用。如何建立哺乳动物的单倍体胚胎干细胞系这一难题直到2011年才由英国科学家Leeb与Wutz^[11]和奥地利科学家Elling等^[12]解决。通过引入流式细胞分选技术, 在建系和传代过程中不断地进行单倍体细胞分选培养, 他们成功地从小鼠孤雌发育的单倍体胚胎中建立了小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞系, 并利用它的单倍性和快速增殖能力, 建立

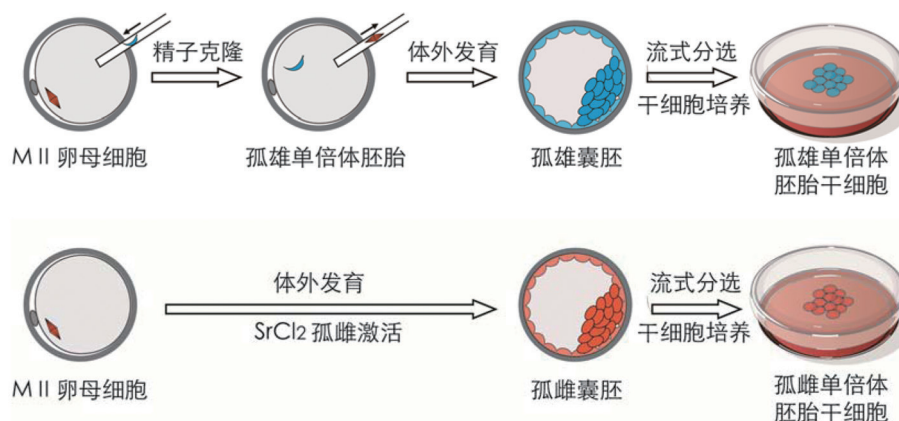
了高通量的纯合型遗传突变细胞库, 进行了正向和反向的遗传分析, 开展了有效的功能基因筛选和药物筛选; 但他们的研究存在一定的局限性, 如孤雌单倍体胚胎干细胞是否真的具有多能性, 单倍体胚胎干细胞的转基因研究能否直接从细胞水平传递到动物水平, 这些问题并不清楚。

由于孤雌单倍体胚胎干细胞注射到卵母细胞中得到的是孤雌胚胎, 可能不能够发育得到一个到期的个体, 而具有父源印记的孤雄单倍体胚胎干细胞则有可能实现这一过程。因此, 本实验室首先选择孤雄单倍体胚胎干细胞, 针对这些问题开展了更加深入的研究。在本计划前期重点项目的支持下, 2012年, 本实验室成功建立了27株小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞系(图1), 这些孤雄单倍体胚胎干细胞具有典型的小鼠胚胎干细胞的集落, 不仅表达Oct4、Nanog和SSEA-1等多能性标记物, 同时, 还具有很强的碱性磷酸酶活性。孤雄单倍体胚胎干细胞能够在体外形成拟胚体, 进而可以分化成神经细胞。在严重联合免疫缺陷小鼠体内可以分化形成含三胚层细胞的畸胎瘤, 具有生殖系嵌合的能力^[13]。综上所述, 本实验室得到的小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞是一类具有多能性的胚胎干细胞。

随后, 本实验室又成功建立了大鼠孤雄单倍体胚胎干细胞^[14]。这些单倍体干细胞具有无限增殖的能力, 表达干细胞的核心标记物, 具有高度生殖系嵌合能力, 其基因组表达谱与二倍体干细胞没有明显区别, 并且能够分化为多种组织和细胞。大鼠单倍体干细胞可以方便地进行基因筛选, 可以用于建立一个大规模的突变细胞库。另外, 还可以结合CRISPR技术进行定点修饰, 高效获得基因突变的干细胞系。值得一提的是, 即使进行过基因操作, 大鼠单倍体干细胞仍能维持单倍体及多能性的特点。

2 利用单倍体胚胎干细胞获得基因修饰动物

单倍体胚胎干细胞能否像单倍体配子那样, 将所携带的遗传信息与基因修饰从细胞水平传递到动物个体水平, 从而在基因功能研究与育种中获得广泛应用。基于此问题, 本实验室开始研究孤雄单倍体胚胎干细胞获得转基因动物的可行性。我们前期



把精子注射到去除了细胞核的卵母细胞中, 再把这样的细胞体外培养到囊胚期, 由此能获得孤雄单倍体胚胎干细胞(上)。孤雌激活卵母细胞, 再将细胞体外培养到囊胚期, 由此能获得孤雌单倍体胚胎干细胞(下)。

图1 单倍体胚胎干细胞的获得

已经发现孤雄单倍体胚胎干细胞保留了精子携带的部分基因印记, 注射到卵胞质内后, 能够替代精子形成二倍体胚胎, 进而发育为健康并具有繁殖能力的正常小鼠。利用这一方式对孤雄单倍体胚胎干细胞进行基因修饰, 并通过卵胞质注射将遗传修饰由细胞水平传递到动物水平, 本实验室成功获得了世界上首个由携带基因修饰的单倍体胚胎干细胞“受精”发育而成的健康转基因小鼠, 从而提供了一种快速建立携带可遗传基因修饰的转基因动物的新途径^[13]。中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物研究所的李劲松和徐国良的团队也独立完成了相似的工作, 他们在单倍体胚胎干细胞里实现了应用更广泛的基因打靶技术, 但是利用单倍体胚胎干细胞注射获得的打靶动物在围产期死亡^[15]。值得注意的是, 这些半克隆小鼠都是雌性, 即只有带有 X 染色体的孤雄单倍体干细胞才能得到半克隆小鼠。孤雄单倍体胚胎是以卵细胞作为载体, 因此, 本实验室开始探索小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞是否可携带母源基因来支持正常的胚胎发育, 从而得到半克隆后代。2013 年, 本实验室将卵细胞孤雌激活后得到孤雌胚胎干细胞, 流式分选得到 G₀/G₁ 期孤雌单倍体胚胎干细胞, 然后将其注射入孤雄单倍体胚胎, 验证了孤雌单倍体胚胎干细胞具有母源印记, 通过注入孤雄胚胎内能够支持胚胎发育到期, 生成可育健康小鼠^[16]。

3 利用单倍体胚胎干细胞替代精、卵结合获得后代

哺乳动物的发育起始于精子与卵子的受精^[17-18]。

受精后精卵细胞核融合, 但其基因组在 8- 细胞之前在空间上及功能上都是相互独立的, 这种卵裂早期独特的核结构被称为“Rabl 结构”^[19-20]。4- 细胞期的孤雌及孤雄单倍体胚胎融合形成的二倍体胚胎可正常发育获得可育动物, 说明至少到 8- 细胞之前的胚胎发育都不需要雌雄基因组间的互作^[21]。但 8- 细胞期之后的胚胎发育需不需要雌雄基因组间的互作是值得研究的科学问题之一。基于单倍体胚胎干细胞技术, 本实验室获得了小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞系及孤雄单倍体胚胎干细胞系, 再利用细胞融合技术获得了融合的二倍体胚胎干细胞系 (fused ESCs, fESCs)(图 2), fESCs 的雌雄基因组独立经历了着床前胚胎发育。经过一系列的检测, 本实验室发现 fESCs 具有完整的胚胎干细胞特性, 并且通过四倍体补偿实验证明其可以发育为正常可育动物^[22]。该实验证明至少着床前胚胎发育阶段不需要雌雄基因组间的互作。

4 利用单倍体胚胎干细胞进行同性生殖

由于在哺乳动物中进化出了基因组印记调控, 哺乳动物无法实现同性生殖^[23-25]。2004 年, Kono 等^[26]利用 H19 和 H19DMR 完全敲除的 non-growth 卵 (ng 卵), 得到了孤雌来源的成年动物。随后, 他们又证实, 进一步敲除 12 号染色体上的 IGDMMR, 能够将孤雌小鼠的发育效率提高到 30%^[27]。利用单倍体胚胎干细胞技术, 使小鼠的同性生殖成为了现实。本实验室利用新型的基因编辑技术 CRISPR-Cas9 系统改变了孤雌单倍体干细胞中 H19DMR 和 IGDMMR 两个非常重要的印记基因区域, 将原本的

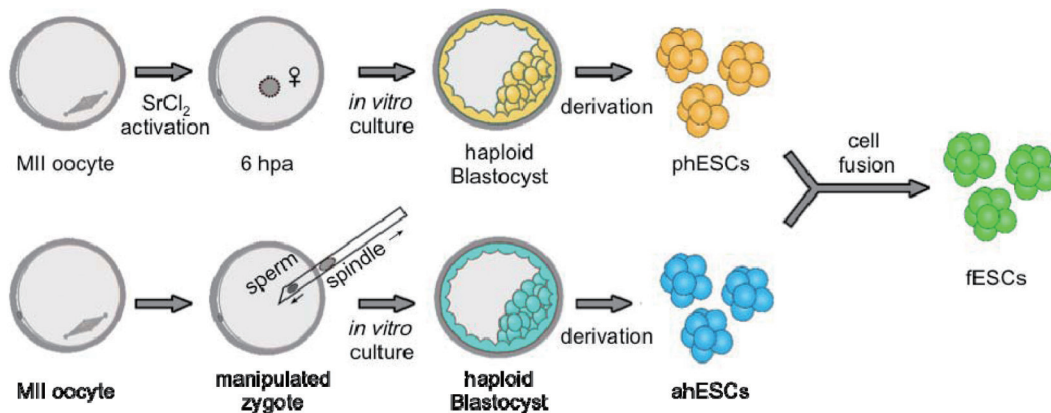
雌性印记逆转为了雄性印记, 然后, 将这种逆转后的孤雌单倍体干细胞替代精子, 注射进卵母细胞, 获得了遗传物质来自于两个雌性亲本的后代小鼠^[28]。这一技术将加速人们对于基因组印记机制的研究, 也会给生殖方式带来新的认知。本工作提出了研究印记基因的新的手段, 并且对重要的印记基因和印记区域进行了新的探索 and 发现; 另一方面, 实现了从成熟的卵细胞获得孤雌动物的操作流程, 对哺乳动物的生殖发育研究运用有着广泛的启示。

5 利用单倍体胚胎干细胞研究物种间杂交

物种间杂交个体因其具有独特的杂合遗传背景和性状, 而为研究物种形成、基因调控进化^[29-30]和 X 染色体失活的机制^[31-32]提供了重要模型。然而, 由于物种间存在生殖隔离——即不同物种间的个体即使交配也不能产生后代或者产生的后代不可育, 种间杂交只在近亲物种间发生。以往人工创造出的哺乳动物远亲物种间的杂合细胞, 由于都是体

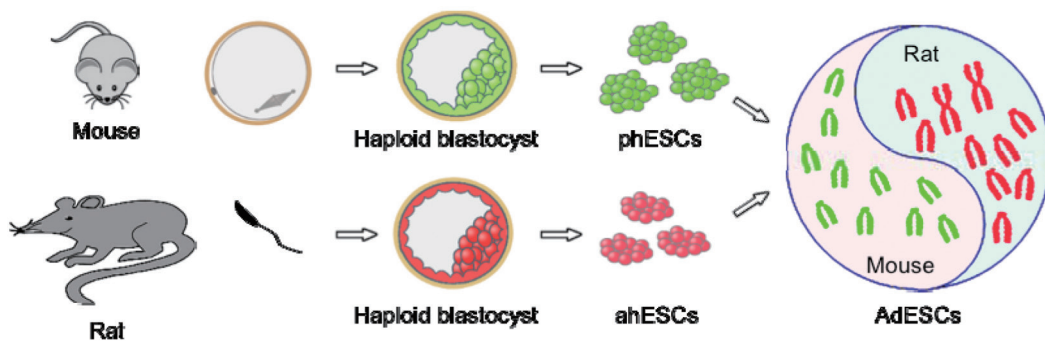
细胞融合产生, 因而都是四倍体并且基因组不稳定, 往往出现大量的染色体丢失, 而且几乎没有分化能力。

本实验室通过细胞融合技术将小鼠孤雌(雌)和大鼠孤雌(雄)单倍体胚胎干细胞融合, 从而绕开了小鼠和大鼠的精卵融合后无法发育的生殖隔离障碍, 获得了异种杂合二倍体胚胎干细胞^[33](图3)。这类杂交细胞具有胚胎干细胞的三胚层分化能力, 甚至能分化形成早期的生殖细胞, 并在培养和分化过程中保持异种二倍体基因组的稳定性。基因表达分析发现, 异种杂合二倍体细胞展现出“高亲”、“低亲”等独特的基因表达模式及独特的生物学性状, 对两者结合进行分析能有效挖掘出物种间性状差异的分子调控机制。同时, 杂合细胞的 X 染色体失活也不采用哺乳动物常见的“随机失活”模式, 而是采用小鼠 X 染色体特异失活模式。利用该特性, 我们系统地鉴定了小鼠 X 染色体失活逃逸基因。这是首例人工创建的, 以稳定二倍体形式存在的异种杂合胚胎干细胞, 为进化生物学、发育生物学和遗传



通过细胞融合技术将小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞(parthenogenetic haploid embryonic stem cells, phESCs)及孤雄单倍体胚胎干细胞(androgenetic haploid embryonic stem cells, ahESCs)融合, 获得了融合的二倍体胚胎干细胞系。

图2 利用单倍体胚胎干细胞替代精、卵结合获得后代



通过细胞融合技术将小鼠孤雌(雌)和大鼠孤雌(雄)单倍体胚胎干细胞融合, 获得了异种杂合二倍体胚胎干细胞。

图3 利用单倍体胚胎干细胞研究物种间杂交

学等研究提供了新的模型和工具, 从而完成更多的生物学新发现。

6 结语

以自然科学基金委重大研究计划为依托, 本实验室以单倍体胚胎干细胞为重点开展系统研究, 获得了一系列前沿性进展: 获得了单倍体胚胎干细胞; 利用单倍体胚胎干细胞获得基因修饰动物; 利用单倍体胚胎干细胞替代精、卵结合获得后代; 利用单倍体胚胎干细胞进行同性生殖; 利用单倍体胚胎干细胞研究物种间杂交。这一系列自主创新的研究成果推进了整个领域对单倍体胚胎干细胞的认识, 大大拓展了单倍体胚胎干细胞研究的理论价值和应用前景。单倍体胚胎干细胞的研究既蕴含着表观遗传调控、染色体倍性维持等重要基础研究问题, 也在遗传分析、功能基因筛选和转基因动物制备等方面有着重要应用前景, 是未来几年干细胞研究中的重要热点之一。

[参 考 文 献]

- [1] Otto SP, Jame P. Evolution. Haploids - hapless or happening? *Science*, 2001, 292: 2441-3
- [2] Hartwell LH, Culotti J, Reid B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970, 66: 352-9
- [3] Gupta N, Carlson S. Preferential growth of haploid plant cells *in vitro*. *Nat New Biol*, 1972, 239: 86
- [4] Freed JJ, Mezger-Freed L. Stable haploid cultured cell lines from frog embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970, 65: 337-44
- [5] Philippe C, Landureau JC. Culture of cockroach embryonic cells and hemocytes of parthenogenic origin. maintenance *in vitro* of haploid and aneuploid forms. *Exp Cell Res*, 1975, 96: 287-96
- [6] Wiellette E, Grinblat Y, Austen M, et al. Combined haploid and insertional mutation screen in the zebrafish. *Genesis*, 2004, 40: 231-40
- [7] Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*, 2009, 326: 430-3
- [8] Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, et al. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 1983, 73: 249-6
- [9] Kotecki M, Reddy PS, Cochran BH. Isolation and characterization of a near-haploid human cell line. *Exp Cell Res*, 1999, 252: 273-80
- [10] Carette JE, Guimaraes CP, Varadarajan M, et al. Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens. *Science*, 2009, 326: 1231-5
- [11] Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 2011, 479: 131-4
- [12] Elling U, Taubenschmid M, Wimsberger G, et al. Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 563-74
- [13] Li W, Shuai L, Wan H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, 490: 407-11
- [14] Li W, Li X, Li T, et al. Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 404-14
- [15] Yang H, Shi L, Wang BA, et al. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 2012, 149: 605-17
- [16] Wan H, He Z, Dong M, et al. Parthenogenetic haploid embryonic stem cells produce fertile mice. *Cell Res*, 2013, 23: 1330-3
- [17] McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 1984, 37: 79-83
- [18] Surani MA, Barton SC, Norris ML. Nuclear transplantation in the mouse: heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. *Cell*, 1986, 45: 127-36
- [19] Mayer W, Smith A, Fundele R, et al. Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. *J Cell Biol*, 2000, 148: 629-34
- [20] Santenard A, Zieglerbirling C, Koch M, et al. Heterochromatin formation in the mouse embryo requires critical residues of the histone variant H3.3. *Nat Cell Biol*, 2010, 12: 853-6
- [21] Renard JP, Babinet C, Barra J. Participation of the paternal genome is not required before the eight-cell stage for full-term development of mouse embryos. *Dev Biol*, 1991, 143: 199-202
- [22] Li X, Wang JQ, Wang LY, et al. Co-participation of paternal and maternal genomes before the blastocyst stage is not required for full-term development of mouse embryos. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7: 486-8
- [23] Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, 1984, 308: 548-50
- [24] Surani MA, Barton SC, Norris ML. Influence of parental chromosomes on spatial specificity in androgenetic---parthenogenetic chimaeras in the mouse. *Nature*, 1987, 326: 395-7
- [25] Mann JR, Lovell-Badge RH. Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm. *Nature*, 1984, 310: 66-7
- [26] Kono T, Obata Y, Wu Q, et al. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, 2004, 428: 860-4
- [27] Kawahara M, Wu Q, Takahashi N, et al. High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1045-51
- [28] Li Z, Wan H, Feng G, et al. Birth of fertile bimaternal offspring following intracytoplasmic injection of parthenogenetic haploid embryonic stem cells. *Cell Res*, 2016, 26: 135-8
- [29] Mihola O, Trachtulec Z, Vıcek K, et al. A mouse speciation

- gene encodes a meiotic histone H3 methyltransferase. *Science*, 2009, 323: 373-5
- [30] Tang S, Presgraves DC. Evolution of the *Drosophila* nuclear pore complex results in multiple hybrid incompatibilities. *Science*, 2009, 323: 779-82
- [31] Carrel L, Willard HF. Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 7364-9
- [32] Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 2005, 434: 400-4
- [33] Li X, Cui XL, Wang JQ, et al. Generation and application of mouse-rat allodiploid embryonic stem cells. *Cell*, 2016, 164: 279-92