

DOI: 10.13376/j.cblls/2017131

文章编号: 1004-0374(2017)10-0983-09



李劲松, 博士, 1993年毕业于江西农业大学, 获学士学位; 1996年毕业于扬州大学, 获硕士学位; 2002年毕业于中科院动物研究所, 获博士学位; 2002—2007年在洛克菲勒大学从事博士后研究; 2007年8月起任中科院上海生化与细胞所研究员、研究组长。实验室围绕细胞重编程与胚胎发育开展系统研究, 建立了小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞(即“人造精子”), 证明其能代替精子使卵母细胞受精产生健康小鼠(即“半克隆技术”), 并利用“人造精子”携带 CRISPR-Cas9 文库实现了小鼠个体水平的遗传筛选; 证明 CRISPR-Cas9 技术在遗传疾病治疗中具有重要作用。研究成果入选 2011 年和

2012 年“中国科学十大进展”。以第一作者或通讯作者身份在 *Cell*、*Nature*、*Cell Stem Cell*、*Cell Research* 等杂志发表 70 余篇研究论文。

## 卵子介导细胞重编程的基础与应用研究

李 庆<sup>1</sup>, 徐求文<sup>2</sup>, 李劲松<sup>1\*</sup>

(1 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 细胞生物学国家重点实验室, 上海市分子男科学重点实验室, 中科院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031; 2 杭州百瑞特饲料科技有限公司, 杭州 322261)

**摘 要:** 细胞重编程一般是指将分化细胞转变成全能性胚胎或多能性细胞的过程, 是研究发育和分化的重要手段, 为再生医学、疾病个体化治疗及药物筛选等提供了巨大的应用前景。诱导细胞重编程的方法有多种, 如细胞培养、卵子介导的核移植 (nuclear transfer)、细胞融合、山中伸弥因子介导的诱导多能干细胞 (iPSC) 技术等。以国家自然科学基金重大研究计划为依托, 李劲松课题组围绕着卵子介导的细胞重编程领域开展了系统的研究, 取得了一系列突破性的进展: 完善了卵子介导的核移植体系; 建立精子和卵子来源的“类精子”的单倍体胚胎干细胞系和半克隆技术; 建立人和猴子的孤雌单倍体胚胎干细胞系; 卵子介导的重编程与 iPSC 技术比较揭示影响重编程的重要因子; 建立卵子介导遗传疾病治疗的策略。现主要对卵子介导细胞重编程的基础与应用研究的原创性实验成果进行综述, 并展望未来关注的重点研究方向。

**关键词:** 卵子; 细胞重编程; 核移植; 单倍体胚胎干细胞; 半克隆技术

中图分类号: Q813 文献标志码: A

## Basic and applied studies of oocyte-mediated reprogramming

LI Qing<sup>1</sup>, XU Qiu-Wen<sup>2</sup>, LI Jin-Song<sup>1\*</sup>

(1 State Key Laboratory of Cell Biology, Shanghai Key Laboratory of Molecular Andrology, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2 Bright Feed Sci-tech CO., Ltd. Hangzhou 322261, China)

**Abstract:** Cell reprogramming, which generally refers to the conversion of differentiated cells into totipotent

收稿日期: 2017-08-07

基金项目: 国家自然科学基金委重大研究计划项目(91319310)

\*通信作者: E-mail: jslis@sibcb.ac.cn; Tel: 021-54921422

embryos or pluripotent cells, offers exciting promises in basic and applied research. Adult cells can be successfully reprogrammed into pluripotent stem cells through various ways, including culture-induced reprogramming, oocyte-mediated nuclear transfer (NT), cellular fusion and induced pluripotent stem cell (iPSC) by expression of Yamanaka factors. Supported by grants from the Major Research Program of the National Natural Science Foundation of China, we have carried out a systemic research focusing on oocyte-mediated reprogramming and obtained the following achievements, including optimization of the oocyte-mediated nuclear transfer, establishment of haploid embryonic stem cell (haESCs) lines that can be used as the sperm replacement for producing health semicloned mice (so-called semicloned technology), establishment of monkey and human parthenogenetic haESCs (PG-haESCs) that allow large-scale genetic screening, revealing that the important reprogramming factor involved in oocyte-mediated reprogramming can be used for generation of iPSC cells with high developmental potential, and establishment of the oocyte-mediated gene therapeutic strategies. In this review, we summarize our original works about basic and applied studies of oocyte-mediated reprogramming, and discuss our future research interests.

**Key words:** oocyte; cell reprogramming; nuclear transfer; haploid embryonic stem cells; semicloned technology

在有性生殖中, 精子和卵子结合, 从两个高度特化的单倍体配子细胞形成了全能性的二倍体受精卵, 是一种自然的细胞重编程过程。受精卵通过增殖、分化, 产生各种不同功能的二倍体细胞。正常情况下不同种类的细胞群体有其独特的稳态和表观遗传修饰, 自然条件下不会轻易向其他细胞群体转化, 故沿着既定轨道逆行或者跳转到其他轨道都是重编程<sup>[1]</sup>。细胞重编程的方法有多种, 包括细胞培养 (cell explantation)<sup>[2-4]</sup>、核移植 (nuclear transfer)<sup>[5-6]</sup>、细胞融合 (cell fusion)<sup>[7]</sup> 和 iPSC (induced pluripotent stem cell)<sup>[8-9]</sup> 等技术。目前最常用和有效的细胞重编程方法有核移植和 iPSC 技术。2006 年, 山中伸弥课题组利用逆转录病毒将 Oct4、Sox2、c-Myc 和 Klf4 四个转录因子导入小鼠成纤维细胞中, 诱导形成多能干细胞, 从此揭开 iPSC 技术的序幕<sup>[8]</sup>。经过 10 多年的发展, iPSC 的诱导方式逐渐多样化, 可以通过 miRNA<sup>[10]</sup>、重组蛋白<sup>[11-12]</sup>、化学小分子<sup>[13]</sup> 等方式实现, 但是由于 iPSC 技术诱导的多能干细胞存在基因组不稳定<sup>[14]</sup>、单核苷酸突变<sup>[15-16]</sup>、拷贝数变异<sup>[17-18]</sup> (copy number variation, CNV)、异常的表观遗传学修饰<sup>[19]</sup> 等缺点, 对于 iPSC 在再生医学以及疾病个体化治疗等方面的应用, 依然存在较大的优化空间。核移植, 又称动物克隆技术, 是一项既古老又充满新活力的重编程方法。1997 年, “Dolly” 羊的问世开启了细胞重编程研究新时代<sup>[20]</sup>, 特别是基于人核移植胚胎干细胞的治疗性克隆概念的提出<sup>[6]</sup>, 为再生医学提供了全新的思路。本课题组长期围绕卵子介导细胞重编程开展研究, 在以下几方面取得了一些研究成果。

## 1 卵子介导的核移植

核移植是指利用显微操作技术将供体细胞的核移入去核的卵子中的过程。重构卵子经过体外孤雌激活后形成克隆胚胎, 可进一步移入体内发育成克隆个体或者体外培养形成胚胎干细胞系。1952 年, Briggs 和 King<sup>[21]</sup> 首次成功地将囊胚细胞的细胞核转移至蛙卵中, 克隆出北方豹纹蛙 (*Pipiens Rana*), 从此拉开了核移植的序幕。1962 年, Gurdon<sup>[22]</sup> 将爪蟾 (*Xenopus*) 内胚层细胞的核通过核移植注入卵中, 从而获得了多个可育的成体蛙, 说明已经分化的细胞的细胞核也可以使得去核蛙卵发育为成蛙, 从而证明细胞的分化是可以被逆转的。1997 年, 克隆羊 “Dolly” 问世证明了哺乳动物的细胞核也能通过核移植获得个体<sup>[20]</sup>, 开启了细胞重编程研究的新时代。2001 年, Wakayama 等<sup>[5]</sup> 首次通过核移植方式将小鼠的体细胞重编程成胚胎干细胞系 (nuclear transfer ESCs, ntESCs), 具有 3 个胚层分化和生殖嵴嵌合的能力。然而, 由于伦理和技术的限制, 人的 ntESCs 始终未能成功建立<sup>[23-24]</sup>。2013 年, Tachibana 等<sup>[6]</sup> 通过灵长类动物模型优化了体细胞核移植 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 的流程, 首次建立了人的 ntESCs, 从而为获得患者的 ntESCs 以及利用核移植胚胎干细胞进行个体化治疗提供了可能。

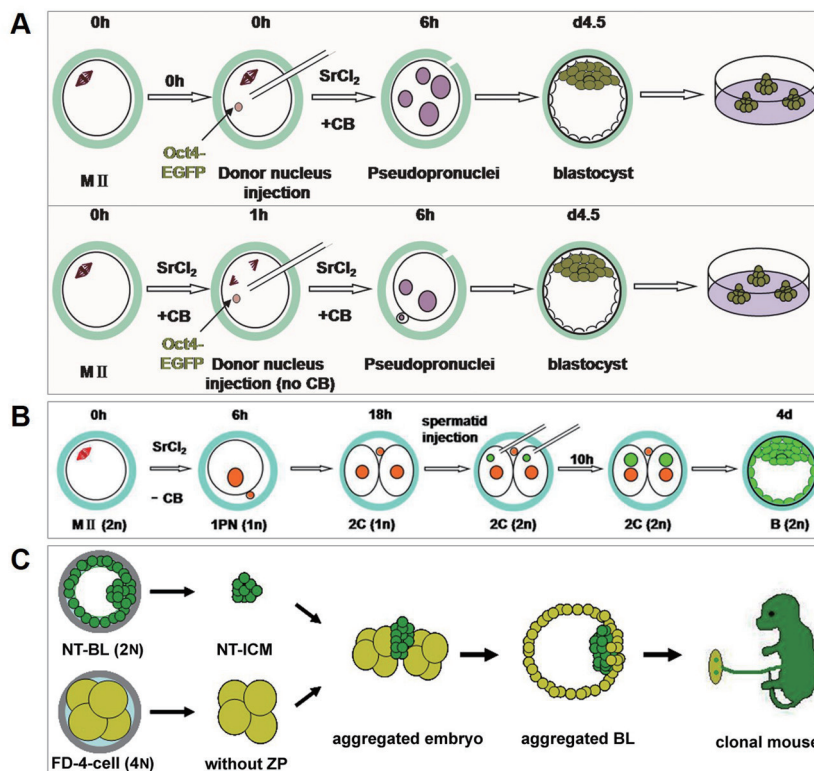
上述实验结果证明, 卵子中存在大量的重编程因子, 可将已分化的体细胞重编程成未分化的状态。核移植技术是研究细胞重编程和胚胎发育的重要方法, 但该技术程序复杂, 需要去除卵子的遗传物质, 然后注入二倍体细胞核形成克隆胚胎 (100% 遗传物质来源于供体细胞)。为了进一步简化核移植程序,

2010年本实验室报道了一种简单高效的重编程策略<sup>[25]</sup>(图1A), 直接将小鼠体细胞注入未去核的卵子中, 可以高效地获得四倍体(tetraploid, 4N)或者三倍体(triploid, 3N)的胚胎干细胞系, 有30%的重构卵能够形成胚胎干细胞系, 这远远高于传统的利用去核卵子10%的建系效率, 从而为研究重编程过程中的分子机制提供了更加简单直接的方法。2011年, 本实验室通过向孤雌激活的单倍体胚胎的2-cell时期两个卵裂球分别注入球形精子(round spermatid)(图1B), 获得了正常的胚胎干细胞系, 并通过四倍体补偿技术<sup>[26]</sup>产生了正常的小鼠, 证明2-cell阶段胚胎的两个卵裂球均具有重编程的能力<sup>[27]</sup>。

供体细胞对于核移植的效率至关重要, 通常认为多能干细胞作为核移植的供体效率远高于体细胞作为供体<sup>[28]</sup>。供体细胞影响核移植效率的原因复杂, 包括遗传背景、分化状态、谱系来源、是否体外培养等。本实验室曾报道, 小鼠白色脂肪组织来源的细胞(white adipose tissue-derived cells, ADCs)中, 新鲜分离的阴性谱系细胞(lineage-negative cells, Lin<sup>-</sup>)

可以作为核移植的供体细胞, 而阳性谱系的细胞(lineage-positive cells, Lin<sup>+</sup>)和体外培养的ADCs作为供体细胞均无法产生克隆后代, 为利用核移植技术进行重编程分子机制的研究, 提供了容易获取的材料<sup>[29]</sup>。

体细胞作为核移植供体效率低的原因可能与细胞周期、端粒长度、X-染色体失活状态、DNA甲基化等有关<sup>[30-31]</sup>。近期有工作报道体细胞核移植过程中加入组蛋白去甲基化酶KDM4a<sup>[32]</sup>、KDM4b和KDM5b<sup>[33]</sup>可显著提高核移植的效率, 体细胞中H3K4Me3表观遗传修饰的记忆可能是影响体细胞重编程的重要障碍<sup>[34]</sup>。Wakayama实验室提出体细胞重编程的效率低下主要是由于“滋养外胚层缺陷”<sup>[35]</sup>, 可以通过两步法进一步提高体细胞核移植的效率, 即先将克隆的重构囊胚体外建立胚胎干细胞系(ntESCs), 然后将ntES细胞注入四倍体囊胚中获得克隆小鼠<sup>[26,36]</sup>。这种四倍体补偿技术证明了ntES细胞的多能性, 但是克隆囊胚滋养外胚层异常是克隆胚胎发育失败的重要原因的假设一直未能得到直接证明, 本实验室2011年在*Cell Stem Cell*杂



A: MII卵子中直接注入供体细胞, 建立4N或者3N的小鼠胚胎干细胞系; B: 球形精子注入小鼠单倍体胚胎的2-cell时期, 建立2N的胚胎干细胞系; C: 四倍体补偿技术修复克隆胚胎滋养外胚层细胞缺陷。

图1 卵子介导的核移植<sup>[25,27,37]</sup>

志上报道了一个巧妙的实验<sup>[37]</sup>, 通过将克隆内细胞团细胞与两个四倍体胚胎进行聚合(图1C), 重构胚胎移植后出生效率可达15.7%; 但是, 正常胚胎的内细胞团与两个克隆四倍体胚胎进行聚合, 重构胚胎移植后出生效率只有3.7%。这两个互补的结果直接地证实了克隆囊胚滋养外胚层细胞异常是克隆胚胎发育失败的重要原因, 同时间接证明克隆囊胚内细胞团(发育成胎儿, 在体外可形成胚胎干细胞)具有正常的发育潜能。

## 2 卵子介导的单倍体胚胎干细胞系的建立与应用

通过核移植介导的重编程产生克隆小鼠的出生率极低(<2%), 但是, 卵子中注入单倍体的精子(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)重编程后出生效率可达30%以上<sup>[38]</sup>。那么是否可以获得体外培养的单倍体细胞系呢。几十年来, 科学家们也在努力尝试建立小鼠的单倍体细胞系<sup>[39-41]</sup>, 虽然他们利用不同实验方法, 可以获得小鼠孤雌或者孤雄单倍体的胚胎, 也可以发育到囊胚, 但是由于单倍体细胞在发育的过程中易于二倍体化, 所以一直未能成功获得单倍体细胞系。2009年, Hong实验室成功建立了青鳉鱼(*Oryzias latipes*)孤雌单倍体多能干细胞系(parthenogenetic haploid embryonic stem cell lines, PG-haESCs), 并通过注入卵胞质中获得正常的后代, 这种将单倍体细胞直接注入卵子中获得后代的技术可称之为半克隆技术(semiclone technology, SC)<sup>[42]</sup>。这项研究激励了更多的科学家去建立哺乳动物的单倍体胚胎干细胞系。

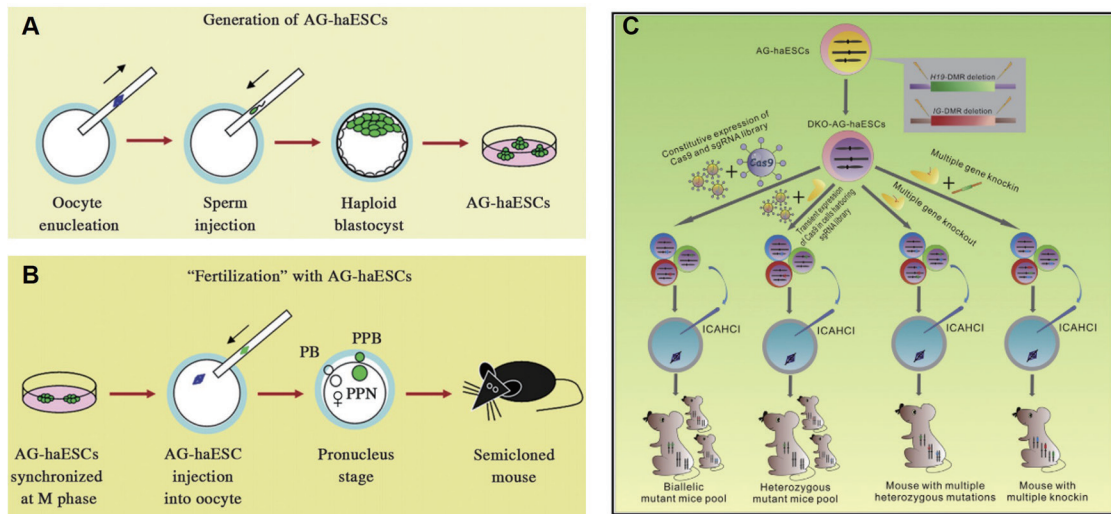
2011年, Wutz实验室<sup>[43]</sup>和Penniger实验室<sup>[44]</sup>先后报道成功建立了小鼠的孤雌单倍体胚胎干细胞系, 他们利用流式细胞分选的方法(fluorescence-activated cell sorting, FACS)实现了体外单倍体胚胎干细胞的富集和维持。这些细胞除了具有正常胚胎干细胞的特性之外, 同时可以利用其单倍体特性进行正反向遗传筛选; 但是, 小鼠的孤雌单倍体胚胎干细胞与青鳉鱼不同, 注入卵胞质中无法获得后代。青鳉鱼中不存在基因印记的问题, 小鼠的孤雌单倍体胚胎干细胞注入卵胞质中得到的孤雌胚胎可能由于其印记的不平衡而无法发育到期<sup>[45-47]</sup>。那么我们是否可以建立小鼠孤雄来源的单倍体胚胎干细胞系(androgenetic haploid embryonic stem cell lines, AG-haESCs); 小鼠的孤雄单倍体胚胎干细胞的雄性印记的维持是否与精子类似; 小鼠的孤雄单倍体胚胎

干细胞注入卵子中是否可以代替精子获得后代。

2012年, 本实验室通过两种策略首次建立了小鼠的孤雄单倍体胚胎干细胞系<sup>[48-49]</sup>。第一种, 向去核的卵子中注射成熟精子的头部; 第二种, 将受精后获得的合子胚胎的雌原核去除(图2A)。上述方法获得的重构胚胎, 只含有一套来源于父本的遗传物质, 即孤雄单倍体胚胎。利用孤雄单倍体胚胎发育获得的囊胚建立胚胎干细胞系, 通过流式分选富集的方法, 最终我们得到了5株孤雄单倍体胚胎干细胞系。通过卵胞质内注入孤雄单倍体胚胎干细胞(intracytoplasmic AG-haESC injection, ICAHCI)方法(图2B), 移入假孕受体子宫后, 可以发育成健康的小鼠(~2.1%), 我们称这种小鼠为“半克隆小鼠”(semiclone mice, SC mice)。不久之后, 周琪实验室也报道了他们利用孤雄单倍体胚胎干细胞获得转基因小鼠模型的研究成果<sup>[50]</sup>。

相对正常的ICSI技术获得健康小鼠的效率为~30%, 本实验结果中通过ICAHCI技术获得健康的半克隆小鼠的效率很低(~2.1%)。随着AG-haESC传代次数的增加, 这种“受精”的能力逐渐丢失, 特别是经过基因编辑之后, 这些AG-haESC注入卵子中很难产生后代。ICAHCI技术产生的半克隆小鼠接近50%出现发育迟缓的现象, 我们发现在精子中不表达的雄性印记基因H19在单倍体细胞和发育迟缓的半克隆小鼠中出现高表达的现象, 这暗示印记基因的异常表达可能是导致半克隆小鼠胚胎发育异常的关键原因, 是否可以通过调控印记基因的表达提高半克隆小鼠的出生效率。2015年, 本实验室率先通过将调控雄性印记基因H19和Gtl2表达的H19-DMR和IG-DMR敲除后, 获得了能稳定高效产生半克隆小鼠的AG-haESCs, 半克隆小鼠的出生效率高达20%以上<sup>[51-52]</sup>。同时, 我们将这种高效的半克隆技术与CRISPR/Cas9文库筛选技术<sup>[53-55]</sup>相结合, 能够一步产生大量的携带不同基因纯合突变的半克隆小鼠, 从而为开展小鼠个体水平的遗传筛选提供了技术支持(图2C)。更加有趣的是, 我们通过将小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞中H19-DMR和IG-DMR敲除后, 同样获得了具备“类精子细胞”的能力, 从而在哺乳动物中实现了高效的孤雌发育<sup>[56]</sup>。之后, 其他实验室也报道了与上述两个实验结果相类似的研究成果<sup>[57-58]</sup>。

单倍体胚胎干细胞具有其独特的优势。首先, 由于其只含有一套染色体, 可用于隐性基因功能的筛选和研究; 其次, 利用CRISPR/Cas9技术<sup>[59-60]</sup>



A: 小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞系 (AG-haESCs) 的建立; B: 利用AG-haESC建立的ICAHCl技术产生半克隆小鼠; C: 出生效率显著提高的ICAHCl技术结合CRISPR/Cas9技术进行个体水平的遗传筛选。

图2 卵子介导的单倍体胚胎干细胞系的建立与应用<sup>[48,51]</sup>

可有效对其进行基因编辑, 从而遗传给下一代; 另外, 单倍体胚胎干细胞介导的高效 ICAHCl 技术结合 CRISPR/Cas9 文库筛选技术进行小鼠个体水平基因筛选, 增加对基因新功能的认识。目前, 关于小鼠的单倍体胚胎干细胞的建立以及应用技术已经相当成熟, 对于非人灵长类和人的单倍体胚胎干细胞的建立, 一直存在技术和伦理的限制。2013年, 本实验室首次建立了食蟹猴的孤雌单倍体胚胎干细胞, 并进行了基因编辑<sup>[61]</sup>, 但是灵长类孤雄单倍体胚胎干细胞受技术的限制, 至今未能建立。2016年, Benvenisty 和 Egli 课题组<sup>[62]</sup>以及本实验室<sup>[63]</sup>, 先后报道建立了人的孤雌单倍体胚胎干细胞系, 从而为人类基因功能的研究提供了新的工具。目前对于人的孤雄单倍体胚胎干细胞的建立, 依然存在材料、技术以及伦理的限制。

### 3 卵子介导的重编程应用于iPSC技术

核移植技术相对复杂, 但是产生的核移植胚胎干细胞具有更高的体内发育潜能。iPSC 技术相对简单, 但是近年来 iPSC 技术诱导的多能干细胞存在基因组不稳定<sup>[14]</sup>、单核苷酸突变<sup>[15-16]</sup>、拷贝数变异<sup>[17-18]</sup>、异常的表现遗传学修饰<sup>[19]</sup>等安全性问题, 因此, iPSC 技术的应用还存在较大提升空间。本实验室曾系统地比较了核移植胚胎干细胞 (ntESC) 和 iPSC 在多能性基因表达、印记状态、四倍体补偿能力、囊胚注射能力以及基因表达谱方面的差异<sup>[64]</sup>, 发现核移植来源的胚胎干细胞体内发育潜能比

iPSC 高。

为了进一步建立系统, 筛选在核移植诱导体系中可能对产生高质量多能干细胞起重要作用的因子, 我们选择了 10 个在卵子或者卵裂过程中高表达的因子, 发现 *Zscan4* 能显著提高 iPSC 的形成效率并降低重编程细胞的 DNA 损伤反应。进一步研究揭示, *Zscan4* 能够快速延长重编程细胞的端粒, 并稳定重编程细胞端粒区以及非端粒区遗传物质。由于 *Zscan4* 的介入稳定了重编程细胞的基因组, iPSC 的质量得到了显著地改善, 19 株中有 11 株 (58%) 通过四倍体囊胚注射能够获得完全来自 iPSC 的小鼠, 而通过传统 iPSC 方法获得的 iPSC 11 株中只有 1 株能够获得完全来自 iPSC 的小鼠。这些结果提示, 在细胞重编程过程中, 除了多能性的获得, 细胞遗传物质稳定性的维持对于产生高发育潜能的多能干细胞起着至关重要的作用<sup>[65]</sup>。这一结果为生产安全性高的 iPSC, 应用于再生医学提供了重要的理论依据。

### 4 卵子介导的遗传疾病的治疗

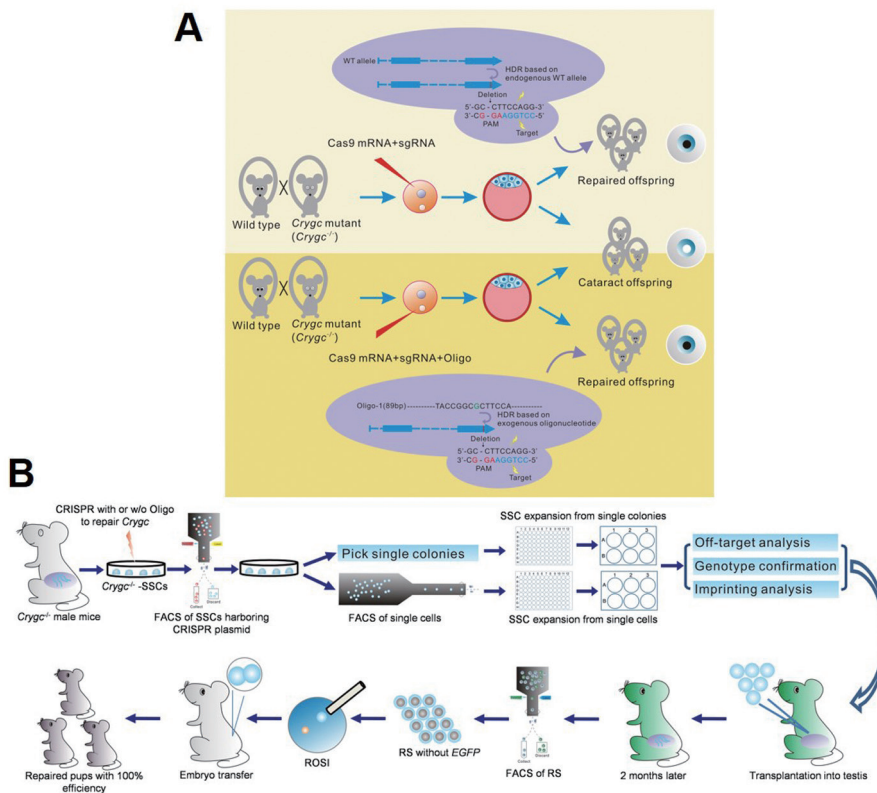
精子与卵子结合形成全能性的受精卵, 其实就是卵子对精子重编程的过程, 开始了新的生命。如果能在精卵形成或受精过程中修复导致疾病的遗传缺陷, 将会使携带遗传缺陷的父母产生健康的后代, 这对于人口健康具有重要的意义。CRISPR/Cas9 技术<sup>[59-60]</sup>具有高效的基因编辑能力, 通过受精卵中注射 Cas9 mRNA 和 sgRNA 可以一步获得基因编辑的

小鼠<sup>[66-67]</sup>,那么这种受精卵中基因编辑技术是否可以用来修复遗传疾病?

为了验证 CRISPR/Cas9 技术是否能用于高效治疗遗传疾病,我们选择小鼠白内障遗传疾病模型进行研究。该模型小鼠携带显性突变的 *Crygc* 基因,产生变性的晶状体蛋白而发生混浊,携带一个突变位点的新生小鼠即表现出症状。我们设计了针对突变 *Crygc* 基因的 sgRNA,通过直接将 sgRNA 和 Cas9 注入杂合子的受精卵中后,发现有 1/3 的新生小鼠(24 只)的白内障症状被治愈(图 3A)。基因治疗存在的一个潜在风险是脱靶效应,即 Cas9 被带到非 *Crygc* 基因的位点进行了异常的切割,破坏了原本正常的基因。我们根据 sgRNA 同源程度,预测存在 10 个潜在的脱靶位点。对这些位点进行 DNA 测序发现,12 只治愈的小鼠中只有 2 只在一个位点上存在脱靶现象。治愈的小鼠可以通过生殖细胞将 CRISPR-Cas9 系统修复的 *Crygc* 基因传递到下一代,证明白内障遗传疾病得到了根治<sup>[68]</sup>,从而为 CRISPR-Cas9 技术介导的人类遗传疾病治疗研究提供了一条新的思路。

然而,通过直接胚胎注射的方法存在两个问题:

一是只有 1/3 的新生小鼠被治愈;二是存在非常少的脱靶现象。这两个问题都是临床应用不被允许的。为了解决这些问题,我们选择了精原干细胞介导的遗传疾病治疗的策略<sup>[69]</sup>。首先,从白内障小鼠的睾丸中建立了精原干细胞系(spermatogonia stem cells, SSCs),该细胞携带了纯和的遗传突变。SSCs 可以在体外长期培养,并能维持稳定的表观遗传特性,移植到通过白消安处理去除了生殖细胞的受体小鼠睾丸中后能够产生有功能的雄性配子细胞。我们将 CRISPR/Cas9 转入 SSCs 中,通过单细胞增殖的方式建立了一系列来自单个 SSC 的细胞系。随后,对这些细胞系进行了深入分析,选择满足以下三个条件的细胞系进行移植实验:1)通过基因型分析确定两个突变位点均已修复;2)通过预测脱靶位点测序或者全基因组测序确定不存在脱靶问题;3)通过特定印记基因甲基化鉴定或者全基因组甲基化测序确定修复的 SSCs 维持正常的表观遗传特性。最后,将这些细胞移植到小鼠体内后,获得了 100% 健康的小鼠(图 3B)。CRISPR/Cas9 技术介导的生殖细胞遗传修复为人类基因治疗提供了另一条新的思路。今后的研究需要验证这一技术路线在人生殖干



A: 受精卵中 CRISPR/Cas9 注射高效治愈白内障遗传病; B: CRISPR/Cas9 和精原干细胞介导遗传疾病治疗。

图3 卵子介导的遗传疾病的治疗<sup>[68-69]</sup>

细胞中实施的可行性。

## 5 结语

本课题组一直以卵子介导的细胞重编程为重点进行了系统的研究, 并取得系列突破性进展: 完善了卵子介导的核移植体系; 建立精子和卵子来源的“类精子”的单倍体胚胎干细胞系和半克隆技术; 建立人和猴子的孤雌单倍体胚胎干细胞系; 卵子介导的重编程与 iPSC 技术比较揭示影响重编程的重要因子; 建立卵子介导遗传疾病治疗的策略等。尽管目前对于重编程的研究报道越来越多, 但是重编程过程本身是一个复杂的网络调控, 仍然有大量的科学问题等待探索和研究。对于重编程机制的研究会为早期胚胎发育的分子机制提供线索, 同样也为能够获得最为安全的重编程多能干细胞提供理论支持。本课题组将继续完善核移植及 iPSC 技术诱导细胞重编程的方法, 提高重编程的效率, 制备最为安全的干细胞, 为再生医学的发展贡献力量。同时, 我们将充分结合半克隆技术与 CRISPR/Cas9 技术进行个体水平基因筛选, 尤其关注与原始生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs) 发育相关的重要基因。另外, 我们计划利用半克隆技术高效产生基因编辑小鼠的能力, 进行基因组范围内基因的标记 (genome tagging)。

### [参 考 文 献]

- [1] Hemberger M, Dean W, Reik W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10: 526-37
- [2] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292: 154-6
- [3] Martin MR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78: 7634-8
- [4] Thomson JA, Itskovitz-Eodor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282: 1145-17
- [5] 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: 740-3
- [6] Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2013, 153: 1228-38
- [7] Cowan CA, Atienza J, Melton DA, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, 2005, 309: 1369-73
- [8] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-76
- [9] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131: 861-72
- [10] Anokye-Danso F, Trivedi CM, Jühr D, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 376-88
- [11] Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, 4: 381-4
- [12] Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood*, 2010, 116: 386-95
- [13] Hou PP, Li YQ, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 2013, 341: 651-4
- [14] Maysar Y, Ben-David U, Lavon N, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 7: 521-31
- [15] Pear MF. The dark side of induced pluripotency. *Nature*, 2011, 471: 46-7
- [16] Gore A, Li Z, Fung HL, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 471: 63-7
- [17] Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*, 2011, 471: 58-62
- [18] Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 106-18
- [19] Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2011, 471: 68-73
- [20] Wilmut I, Schinieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810-3
- [21] Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1952, 38: 455-63
- [22] Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol*, 1962, 4: 256-73
- [23] Noggle S, Fung HL, Gore A, et al. Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature*, 2011, 478: 70-7
- [24] Egli D, Chen AE, Saphier G, et al. Reprogramming within hours following nuclear transfer into mouse but not human zygotes. *Nat Commun*, 2011, 2: 488
- [25] Yang H, Shi L, Zhang S, et al. High-efficiency somatic reprogramming induced by intact MII oocytes. *Cell Res*, 2010, 20: 1034-42
- [26] Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated

- by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*, 2002, 415: 1035-8
- [27] Yang H, Shi L, Chen CD, et al. Mice generated after round spermatid injection into haploid two-cell blastomeres. *Cell Res*, 2011, 21: 854-8
- [28] Rideout WM 3Rd, Wakayama T, Anton Wutz A, et al. Generation of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. *Nat Genet*, 2000, 24: 109-10
- [29] Qin Y, Lin J, Zhou C, et al. Mice cloned from white adipose tissue-derived cells. *J Mol Cell Biol*, 2013, 5: 348-50
- [30] Rideout WM 3Rd, Eggan K, Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 2001, 293: 1093-8
- [31] Liu L. Cloning efficiency and differentiation. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 406
- [32] Chung YG, Matoba S, Liu Y, et al. Histone demethylase expression enhances human somatic cell nuclear transfer efficiency and promotes derivation of pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 758-66
- [33] Liu W, Liu X, Wang C, et al. Identification of key factors conquering developmental arrest of somatic cell cloned embryos by combining embryo biopsy and single-cell sequencing. *Cell Discov*, 2016, 2: 16010
- [34] Hormanseder E, Simeone A, Allen GE, et al. H3K4 methylation-dependent memory of somatic cell identity inhibits reprogramming and development of nuclear transfer embryos. *Cell Stem Cell*, 2017: 135-43.e6
- [35] Yang X, Smith SL, Tian XC, et al. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, 2007, 39: 295-302
- [36] 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: 393-9
- [37] Lin J, Shi L, Zhang M, et al. Defects in trophoblast cell lineage account for the impaired *in vivo* development of cloned embryos generated by somatic nuclear transfer. *Cell Stem Cell*, 2011, 8: 371-5
- [38] Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod*, 1995, 52: 709-20
- [39] Tarkowski AK, Rossant J. Haploid mouse blastocysts developed from bisected zygotes. *Nature*, 1976, 259: 663-5
- [40] Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, et al. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 1983, 73: 249-61
- [41] Latham KE, Akutsu H, Patel B, et al. Comparison of gene expression during preimplantation development between diploid and haploid mouse embryos. *Biol Reprod*, 2002, 67: 386-92
- [42] Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*, 2009, 326: 430-3
- [43] Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 2011, 479: 131-4
- [44] Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, et al. Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 563-74
- [45] Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, 1983, 308: 548-50
- [46] Surani MA, Barton SC. Development of gynogenetic eggs in the mouse implications for parthenogenetic embryos. *Science*, 1983, 222: 1034-6
- [47] McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 1984, 37: 179-83
- [48] 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
- [49] Shi L, Yang H, Li J. Haploid embryonic stem cells: an ideal tool for mammalian genetic analyses. *Protein Cell*, 2012, 3: 806-10
- [50] Li W, Shuai L, Wan H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, 490: 407-13
- [51] Zhong C, Yin Q, Xie Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 221-32
- [52] Bai M, Wu Y, Li J. Generation and application of mammalian haploid embryonic stem cells. *J Intern Med*, 2016, 280: 236-45
- [53] Wang T, Wei JJ, Sabatini D M, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343: 80-4
- [54] Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 267-73
- [55] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343: 84-7
- [56] Zhong C, Xie Z, Yin Q, et al. Parthenogenetic haploid embryonic stem cells efficiently support mouse generation by oocyte injection. *Cell Res*, 2016, 26: 131-4
- [57] Zhang M, Liu Y, Liu G, et al. Rapidly generating knockout mice from *H19-Igf2* engineered androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell Discov*, 2015, 1: 15031
- [58] 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
- [59] Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*, 2013, 8: 2281-308
- [60] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262-78
- [61] Yang H, Liu Z, Ma Y, et al. Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell Res*, 2013, 23: 1187-200
- [62] Sagi I, Chia G, Golanlev T, et al. Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells. *Nature*, 2016, 532: 107-11
- [63] Zhong C, Zhang M, Yin Q, et al. Generation of human



- haploid embryonic stem cells from parthenogenetic embryos obtained by microsurgical removal of male pronucleus. *Cell Res*, 2016, 26: 743-6
- [64] Jiang J, Ding G, Lin J, et al. Different developmental potential of pluripotent stem cells generated by different reprogramming strategies. *J Mol Cell Biol*, 2011, 3: 197-9
- [65] Jiang J, Lv W, Ye X, et al. Zscan4 promotes genomic stability during reprogramming and dramatically improves the quality of iPS cells as demonstrated by tetraploid complementation. *Cell Res*, 2013, 23: 92-106
- [66] Yang H, Wang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154: 1370-9
- [67] Yang H, Wang H, Jaenisch R. Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat Protocol*, 2014, 9: 1956-68
- [68] Wu Y, Liang D, Wang Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 659-72
- [69] Wu Y, Zhou H, Fan X, et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*, 2015, 25: 67-79