

·学科进展与展望·

哺乳动物有性与无性生殖的实验胚胎学研究*

陈大元

(中国科学院动物研究所,北京 100080)

[摘要] 近50年来,发育生物学和生殖生物学领域出现了两大突出进展,震撼了生物学界和整个世界。一是哺乳动物精子获能的发现而创建了试管动物和试管婴儿技术,它标志着人们对生殖生理和生殖控制的完善;二是以卵子为受体的克隆动物的诞生,使哺乳动物体细胞克隆成为可能,这标志着人类对生殖和发育机制的发挥和创新,并为人类干预生殖和发育开拓了广阔前景。虽然受精生物学与动物克隆是研究生命启动奥秘的一门学科,已成为生命科学研究的核心之一,但是还有诸多问题亟待发掘并需要深入研究。本文主要从以下两方面介绍20年来在该领域研究中取得的进展与成果:(1)动物有性生殖研究方面侧重介绍受精机理和显微受精的研究成果;(2)动物无性生殖研究方面重点介绍克隆牛及其基础研究的进展。

[关键词] 受精,克隆牛,实验胚胎学

数10年来对受精机制的深入探讨使人们认识到受精绝不仅是精子穿入卵子的一个简单过程,而是精子与卵子之间发生一系列的相互作用,它们既十分精细又十分复杂地相互承启,其中包括卵母细胞成熟、精子获能、精子顶体反应、卵子皮层反应、膜融合、启动第二次减数分裂、原核形成与卵裂启动以及一系列的发育过程等。虽然随着受精研究的深入开展,弄清了不少机制,但是某些问题尚存在争议和尚未完全阐明,如卵成熟和受精过程中核遗传物质及其结构的迁移和旋转、透明带内表面是否也存在精子受体、受精后原核形成的调控、没有经过变态的单倍体的球形精子细胞能否受精以及信号传递;还有纺锤体交换、生发泡置换、内细胞团交换中的核质关系等一系列问题,仍需加深对它们的认识,从而通过理论联系实际,对人类不孕症治疗提供有力手段。在体细胞克隆方面,自1997年英国罗斯林研究所Wilmut第一例体细胞克隆动物“多莉”羊报道后,世界各国对家畜和多种动物的克隆都陆续有所报道,包括我国首批体细胞克隆牛存活群体的报道,这对动物(家畜)品种改良和加速动物(家畜)育种提供了新的方法。

在国家自然科学基金资助下,近20年来我们就受精机理、显微受精和动物克隆等国际前沿热点问题开展了研究。

1 动物有性生殖研究

1.1 受精机理研究

微丝是卵内遗传物质迁移和旋转的动力。在卵母细胞成熟和受精卵的发育研究中,我们揭示了染色体迁移、分裂器旋转和极体排放都依赖微丝的存在。实验利用秋水仙素(Col)解聚微管,发现染色体能够由卵中央迁移至皮层,卵表出现极性。而用细胞松弛素B(CB)解聚微丝,卵内分裂器能形成,但不能迁移,卵表见不到极性;当除去CB,分裂器恢复迁移特性,极体出现。这表明染色体的迁移受微丝控制。我们还对卵裂方向与分裂器之间的关系进行了研究。在受精卵第一次卵裂时采用CB抑制微丝,导致第二次卵裂停止。然后去除CB,继续培养,卵裂得以恢复,但出现呈“一”字形排列四细胞,卵裂方向发生了完全变化。经电子显微镜技术观察,发现两个细胞的分裂器没有旋转仍呈水平状排列,于是两个细胞分裂出两个子细胞的方向只能各自从两侧

* 2005年度国家自然科学基金二等奖获奖项目。

本文于2006年5月8日收到。

排出。这个实验结果证明卵裂方向与分裂器轴向密切相关。为了进一步证明分裂器旋转机制,当精子刚穿入卵时我们用CB处理,发现极体不能排放;如果培养液中去掉CB,在常规的培养液中继续培养,受精卵不再排放第二极体。用共聚焦(confocal)激光显微术观察揭示卵胞质中有一个雄原核,分裂器两端各形成一个雌原核。实验证明CB抑制了分裂器的旋转,错过了旋转的时相,虽然去除CB后能继续发育,可是极体排放的方向不同,由于分裂器不能旋转与卵表垂直,因此不能向卵表排出极体。虽然分裂器没有旋转,但它仍保留排放的功能,于是只能将一半核物质排于胞质之中,导致一个受精卵中出现三个原核现象。这充分证明分裂器的轴向决定极体的排放方向,而分裂器的旋转受微丝控制^[1]。根据上述系列实验,我们第一次提出了微丝是遗传物质迁移的动力,分裂器的轴向决定减数分裂(极体排放)方向或细胞有丝分裂的方向,而分裂器的旋转必须依赖微丝存在的理论。

受精卵胞质中MAPK的失活导致原核形成。哺乳动物精子和卵子受精后,精子和卵子遗传物质分别形成雄原核和雌原核,早在20世纪80年代,我们就提出了雄原核形成及生发泡破裂相关的概念,但一直没有确定这一因子是什么,90年代我们的研究揭示受精后MAPK的失活与雄原核形成是一致的;激活后不形成雄原核的卵子中MAPK不发生失活;激活PKC通过引起MAPK失活导致雄原核形成。在已形成原核的受精卵中,人为激活MAPK导致雄原核消失。所有这些证据表明,受精后MAPK失活导致原核形成。这是国际上受精机理研究中对原核形成机制的第一次发现^[2]。

1.2 显微受精研究

(1) 卵透明带内表面精子受体的发现。精子与卵子结合,精卵发生识别,这是因为卵透明带外表面存在精子受体(受体蛋白),那么透明带内表面能与精子识别吗?于是我们设计如下实验,采用同种完整精子,同种已发生顶体反应的精子(即已脱掉精子质膜并囊泡化),异种动物的完整精子分别注射到卵的卵周隙中,发现同种完整精子与卵透明带内表面发生识别,而同种已发生顶体反应的精子和异种的精子都不识别,这是因为精子由于质膜丢失或不存在配体,这足以证明透明带内表面也存在精子受体,异种精子不发生识别,揭示了透明带内表面的精子受体具有明显的种特异性。为了进一步证明这个发现,用光敏生物素标记的ZP₃cDNA探针证明了透明

带内表面的精子受体蛋白是由卵在早期发生中合成和分泌的。这是国际上的第一次发现,并为后来显微受精研究奠定了理论基础。

(2) 精子细胞可以跨越变态实现受精。球形精子细胞是精母细胞减数分裂后形成最早的单倍体雄性生殖细胞,球形精子细胞带下受精后能获得后代,该研究揭示了球形精子细胞核可以在卵胞质中跨越变态直接形成雄原核,充分表明球形精子细胞已具有潜在的受精能力,其球形精子细胞核已成熟,并能接受卵胞质因子的指令,完成胚胎的全程发育。精子形成期的变态、精子在附睾成熟、获能和顶体反应等过程只是为了保证在自然状态下使雄性单倍体核与卵母细胞结合,并非受精本质所必需,同时该研究的成功使精子形成障碍的男性不育症的治疗成为可能,为无精症患者打开了希望之门,对保存动物遗传资源方面也具有价值。这项工作与美国同年发表。

(3) MⅡ期分裂器(纺锤体)交换可以克服遗传性疾病发生。利用昆明白小鼠和C57BL/6黑色小鼠之间的卵母细胞MⅡ期分裂器交换,结果发现交换后的核与质能相容,重构卵母细胞经过电融合、IVF和体外培养并通过胚胎移植至继母小鼠输卵管,可正常产仔。这项研究结果为开展不同年龄间的分裂器交换提供了一个模型,对人类生殖医学的研究具有重要意义。用分裂器交换,可望解决人类因减数分裂器异常造成的染色体非整倍性导致的遗传疾病的发生。这项报道属于国际首次^[3]。

(4) 生发泡(GV)置换可以提高后代质量。雌性(女性)可因生育年龄的增大引起不孕或后代异常,这可能与其所排卵母细胞的胞质质量有关。大龄卵母细胞中的一些有害的因子可能会导致卵母细胞的遗传物质产生异常,最终导致不育或后代异常。可能解决的方法是用健康年轻雌性卵母细胞质来取代老化的卵胞质。我们为这个问题以免为实验动物进行了研究,结果表明生发泡(GV)置换是可行的,并证明同体或异体卵GV的互换,重构卵的成熟率很高(80%),经ICSI(显微受精)后,可以发育到囊胚,并能获得后代。结果表明,此项研究有可能成为解决大龄妇女因卵母细胞质量问题造成的不育,可采用健康女性卵母细胞来取代老化的卵胞质通过生发泡置换来提高后代质量,为生殖医学提供了理想模型。该项研究的报道先于美国一年有余,为世界首例^[4,5]。

(5) 内细胞团交换为异种核移植提供了可能。在大鼠ICM(内细胞团)注入完整小鼠囊胚(含

ICM), 获得嵌合体 and ICM 移植获得胎儿的基础上, 作者设计通过 ICM 交换构建两种重构胚, 运用显微操作和免疫手术法, 建立了由不同昆明白小鼠个体的囊胚滋养层和内细胞团交换构建的同品系异体重构胚; 另一种重构胚是由切除内细胞团的昆明鼠囊胚滋养层与 C57BL/6 鼠囊胚内细胞团构建的异品系重构胚, 结果前者生下了后代, 不同品系的内细胞团交换也成功地获得了后代, 实验结果为异种核移植的研究提供了极好的手段^[6]。

2 动物无性生殖研究

2.1 动物克隆研究

我国首批成年体细胞克隆(核移植)牛存活群体成功。我国的胚胎细胞核移植研究曾经达到国际领先的水平, 可是体细胞核移植研究起步稍晚, 为了尽快赶上国际前沿, 我们力图尝试把高科技应用于畜牧业, 对高度分化的体细胞去分化、恢复全能性和核质关系进行了探索。2002 年与山东曹县粮香公司合作研究, 进行体细胞培养、卵母细胞体外成熟、卵母细胞去核、体细胞核移植、重构胚体外培养和胚胎移植等研究, 并创造了分裂器挤压去核法, 在我国首次独立自主地成功获得了成年体细胞核移植克隆牛群体。实验共培养 980 枚重构胚, 其中 261 枚发育到囊胚, 移植到 112 头受体牛子宫中, 有 26 头妊娠, 最后 12 头受体牛怀孕到期, 共产犊 14 头, 最后存活 5 头, 生长发育良好。一年半后配种, 均怀孕并分娩后代。经微卫星 DNA 亲子鉴定, 证明其遗传物质与供体牛体细胞的相同, 而与代孕母牛没有遗传关系。这一研究的成功, 实现了我国成年体细胞克隆牛群体零的突破, 标志着我国动物克隆研究已跻身于国际先进行列, 曾获山东省省委省政府的奖励。

2003 年与新疆金牛公司合作, 又成功获得了 12 头存活克隆犊牛, 并获新疆自治区科技进步一等奖; 同年晚些时间与北京锦绣大地公司合作, 再一次获得了 3 头存活牛。这充分说明我国已稳定掌握了体细胞克隆牛技术, 体细胞核移植技术的重复性很强, 这一技术正逐步走向成熟。

实验证明高度分化的体细胞核可以在卵胞质的作用下去分化, 恢复全能性, 进一步阐明了核决定遗传而质起到了积极作用的核质关系问题。理论研究发现克隆动物线粒体的异质性, 证明母源性卵子线粒体是体细胞克隆动物成活所必需的^[7]。也证明了来源于耳的成纤维细胞在克隆中端粒不仅不会缩短而且部分还有延长现象。

2.2 动物克隆的基础研究

(1) 表观遗传研究

DNA 甲基化作为一种主要的表观遗传重编程, 对哺乳动物的发育非常重要。哺乳动物克隆过程中, 高度分化的供体细胞核必须进行去分化, 停止其自身的基因表达谱, 并表达早期胚胎发育所需的基因。为了解 DNA 甲基化变化与克隆低效率之间的关系, 我们首先检测了体内胚胎、体外胚胎和同种克隆胚胎中的 DNA 甲基化变化。发现雄性基因的主动去甲基化现象。在克隆兔胚胎中有异常的甲基化变化, 单拷贝基因启动子区有迅速的去甲基化和过早的重甲基化现象。为了解不同物种克隆胚胎中这种去甲基化能力差异是由卵胞质还是由供体细胞核主导, 我们分别构建了猪-兔和兔-猪异种克隆胚胎, 并检测了供体基因组重复序列在胚胎发育过程中的甲基化状况, 发现克隆胚胎中重复序列去甲基化的能力主要由卵胞质决定的。通过不同种间的体细胞与卵子组合, 发现卵子中使替细胞重新编程序的物质无种特异性。

哺乳动物克隆的低效率不仅与植入前胚胎中去甲基化的异常有关, 可能与植入后胚胎能否正常甲基化有更直接的关系。相比正常牛, 克隆牛在怀孕前三个月有很高的流产率。为了解 DNA 甲基化与此高流产率间的关系, 我们选取 IVF 流产胎儿、克隆流产胎儿、正常成体牛和克隆成体牛各四个样本, 检测了一个重复序列(satellite I)和两个单拷贝基因(interleukin 3 和 cytokeratin)的启动子区的甲基化状态。发现异常的低甲基化可能与克隆胎儿流产有关。

(2) 线粒体遗传研究

进行细胞核移植时, 供体细胞的线粒体与细胞核一起被移入受体卵子中。供体细胞的线粒体与受体卵子中的线粒体命运决定着克隆动物的遗传物质是不是供体细胞 100% 拷贝。研究发现, 克隆胚胎中线粒体的命运有三类: (i) 卵子母源线粒体增殖, 而供体细胞线粒体逐渐退化; (ii) 供体细胞线粒体取代卵子母源线粒体; (iii) 供体细胞线粒体与卵子母源线粒体共存。在所有的成活克隆牛中发现了线粒体的异质性, 证明母源性卵子线粒体是体细胞克隆动物成活所必需的。

(3) 中心体遗传研究

在核移植过程中纺锤体两极的 MTOCs 随着去核操作被去除, 而供体细胞的中心体和细胞核一起移入到受体卵中。我们的研究表明: (i) 来源于供体

细胞的拥有两个中心粒结构意义上的中心体结构在重构胚活化过程中退化;(ii) 来源于供体细胞的中心体成分参与了瞬间纺锤体和第一次有丝分裂纺锤体组装,是维持正常纺锤体功能所必需的;(iii) 来源于供体细胞的中心体的成分参与纺锤体组装可能没有种属特异性,同时受体卵胞浆中的一些中心体周物质(PCM)也可能被募集到纺锤体两极并参与纺锤体组装。

注:5名获奖者按次序排列为陈大元、孙青原、李光鹏、李劲松、朱子玉;而没有出现名字的无名英雄们有很多,如:韩之明、刘灵、王敏康、刘辉、刘冀琬、毕春明、征曰良、蒋满喜、张利生、高绍荣、刘忠华、雷蕾、廉莉、寇朝辉、吴昱琪、张家新、宋祥芬、赵学坤等;还有合作单位的朋友们,对他们付出的辛勤劳动和提供的帮助表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Zhu ZY, Chen DY, Li JS et al. Rotation of meiotic spindle is controlled by microfilaments in mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, 2003, 68: 943—946.
- [2] Lu Q, Smith GD, Chen DY et al. Activation of protein kinase C induces mitogen-activated protein kinase dephosphorylation and pronucleus formation in rat oocytes. *Biology of Reproduction*, 2002, 67: 64—69.
- [3] Wang MK, Chen DY, Liu JL et al. *In vitro* fertilization of mouse oocytes reconstructed by transfer of metaphase II chromosomes results in live births. *Zygote*, 2001, 9: 9—14.
- [4] Li GP, Chen DY, Lian L et al. Viable rabbits derived from reconstructed oocytes by germinal vesicle transfer after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Mol Reprod Dev*, 2001, 58(2): 180—185.
- [5] Li GP, Chen DY, Lian L et al. Mouse-rabbit germinal vesicle transfer reveals that factors regulating oocyte meiotic progression are not species-specific in mammals. *Journal of Experimental Zoology*, 2001, 289(5): 322—329.
- [6] Chen DY, Li JS, Han ZM et al. Somatic cell bovine cloning: effect of donor cell and recipients. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(6): 549—554.
- [7] Han ZM, Chen DY, Li JS et al. Mitochondrial DNA heteroplasmy in calves cloned by using adult somatic cell. *Molecular Reproduction and Development*, 2004, 67: 207—214.

EXPERIMENTAL EMBRYOLOGY OF SEXUAL AND ASEXUAL MAMMAL REPRODUCTION

Chen Dayuan

(*Institute of Zoology, CAS, Beijing 100080*)

Abstract This research was casted in the area of experimental embryology, which covers from animal fertilization to cloning. Two achievements in the field of reproductive biology have created major influence in the past 50 years. One is the discovery of sperm capacitation and the establishment of *in vitro* fertilization technology, and the other is the birth of somatic cell nuclear transfer animals. Although researches in reproductive biology have developed very quickly and a lot of literatures have been published, many basic theoretical questions are still remained illusive. This paper gives a brief description of our researches during the past decade.

Key words fertilization, bovine cloning, experimental embryology