

# 利用核移植技术 生产人类疾病大鼠模型的研究<sup>\*</sup>

周 琪

(动物研究所 北京 100080)

**摘要** 大鼠是研究人类疾病的理想模型动物,而利用核移植手段是创造遗传修饰大鼠的最佳手段。但由于大鼠卵母细胞和胚胎发育的特殊性,克隆大鼠一直没有取得成功。我们在对大鼠卵细胞活化进行了深入研究的基础上,采用了全新的快速一步法体细胞核移植技术,并且利用蛋白激酶抑制剂(MG132)阻断大鼠卵母细胞减数分裂中期到后期的转变,成功地创造出有繁殖能力的体细胞克隆大鼠。该项研究为人类疾病的研究、相关药物的研制创造了条件。

**关键词** 细胞核移植,大鼠,动物模型,活化

## 1 研究意义

大鼠是生理学研究的模式动物,并且还是研究人类高血压、糖尿病、乳腺癌和神经系统疾病的理想模型<sup>[1]</sup>。大鼠克隆的成功为这一领域带来了巨大的进步,将会大大加速基因敲除大鼠研究领域的进展。然而,更激动人心的是这项研究或许可以给那些致力于其它难以克隆的物种的研究者们巨大的鼓舞;或许一个小的针对物种特异性的技术改进就可以克隆出这些物种<sup>[2]</sup>。

目前,国际上在该领域尽管做了很多的工作,但以前的研究者都没有能够利用体细胞核移植克隆出大鼠,克隆胚大都在发育、或者在附植的早期发生停滞<sup>[3]</sup>。主要原因是大鼠的卵母细胞从输卵管取出后在 60 分钟内就会自发激活<sup>[4]</sup>,在如此短的时间内研究者无法把体细胞核移入去核的卵母细胞,而激活的卵母细胞不能支持核移植胚继续发育。

## 2 研究主要内容

为了解决大鼠的卵母细胞自发激活这个问题,我们在研究中首先建立了一种快速的一步体细胞核移植方法:首先用注射针把体细胞核注入卵母细胞,在撤出注射针的同时吸出卵母细胞核。利用这种方法可以快速高效地重建核移植胚。但即使利用这种巧妙的方法仍然不足以解决卵母细胞的过早

激活问题,体细胞核移植所选用的卵母细胞中仍有 40%含有两套分离的染色单体,这说明这些卵母细胞已经激活。另外,221 个重构胚被移植到 11 个受体母鼠内,有 9 个重构胚着床,但是都没有发育到期。很明显,尽管操作迅速,大多数的卵母细胞仍不适合用于克隆。

除了核移植方法的改进,我们还使用了一种蛋白酶抑制剂(MG132),在卵母细胞收集时用来阻断大鼠卵母细胞第一次减数分裂中期到后期的转变,这种卵母细胞激活的可逆阻断解决了这个难题,使我们获得了充足的处于适宜细胞周期的卵母细胞来源;此外我们采用 cdc2 的特异性抑制剂(Butyrolactone)来诱导核移植胚的活化<sup>[5]</sup>。采用这种方法,876 枚重构胚移植入 12 个受体母鼠,在受孕后 13.5 天检测时发现,克隆的胎儿有正常的胚胎发育和心跳,共有 16 个胎儿在 4 个母鼠受体子宫中成功着床。

接下来的工作是采用以上方法重构了 129 个胚胎,移植入 2 个受体母鼠,一个母鼠怀孕并生下 3 个克隆雄性大鼠,有 2 个克隆大鼠长到性成熟并用传统的方法生产出了下一代,证明这两只克隆大鼠具有生育能力(见图)。

此外我们还得到了具有正常性状(身长、体重、发育和繁殖能力)的雌性克隆大鼠。这表明我们发

<sup>\*</sup> 收稿日期:2003 年 10 月 20 日

明改进的大鼠克隆流程对不同性别的供体细胞同样适用。

这一研究作为高效生产基因敲除或者基因置换的遗传修饰大鼠，为建立人类疾病研究的动物模型开创了新路<sup>[6]</sup>。该研究成果发表在 2003 年 9 月 25 日出版的 *Science* 和相关国际会议上<sup>[7-8]</sup>，得到了国际同行的高度评价<sup>[2,9-11]</sup>，在 *Science* 和 *Nature Review Genetic* 上都刊载了相关的评论，认为这项研究的成功为人类疾病的动物模型研究领域带来了巨大的进步，将会大大加速基因敲除大鼠研究的进展 (Wilmot, *Science News*, 2003)。



图 具有繁殖能力的克隆大鼠

主要参考文献

1 H J Jacob, A Kwitek. Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nature Rev. Genet*, 2002, 3: 33.

2 Nick Campbell. Cloning, I smell a rat. *Nature Rev. Genet.*, 42003,(in press).

3 Hirabayashi M, Kato M, Ishikawa A et al. Factors influencing chromosome condensation and development of cloned rat embryos. *Cloning Stem Cell*, 2003, 5: 35.

4 Zernicka-Goetz M. Spontaneous and induced activation of rat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 1991, 28:169.

5 Josefsberg L B, Galiani D, Dantes A et al. The proteasome is involved in the first metaphase-to-anaphase transition of meiosis in rat oocytes. *Biol. Reprod.*, 2000, 62: 1 270.

6 Zan Y, Haag J D, Chen KS et al. Production of knockout rats

using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nature Biotechno.*, 2003, 21: 645.

7 Zhou Q et al. Generation of fertile cloned rates by regulating oocyte activation. *Science*, 2003., 1 088 313.

8 Fraichard et al. First cloned rat embryos (12 dpc) were produced by nuclear transfer. Present at the Cold Spring Harbor "Physiological Genomics and Rat Models" meeting, (New York, Dec. 2001).

9 Rhind S et al. Human cloning: can it be made safe? *Nature Rev. Genet.*, 2003, 4, (in press).

10 Jacob H J, A Kwitek. Rat genetics: attaching physiology and harmacology to the genome. *Nature Rev. Genet.*, 2003, 3: 33-42.

11 Lab Rats Cloned-Finally. *Science News*, 25, Sep, 2003.

Generation of Fertile Cloned Rats by Regulating Oocyte Activation

Zhou Qi

(Institute of Zoology, CAS, 100080 Beijing)

The rat is a reference animal model for physiological studies and for the analysis of multigenic human diseases such as hypertension, diabetes and neurological disorders. Nuclear transfer is a useful technique to produce knock out or knock in rat for this purpose. We used MG132, a protease inhibitor that reversibly blocks the first meiotic metaphase-anaphase transition in the rat, and reconstructed nuclear transfer embryos by a quick one step manipulation method, cloned embryos were transfer into oviducts of foster mothers, several alive cloned rats were produced by this protocol, which could grew to sexual maturity and generated normal progeny. Our data highlight the importance of adapting the SCNT procedure to oocyte physiology for successful cloning, and pave the way for

more extensive genetic modifications such as conditional knock-out and gene replacement which are required to produce relevant models of human diseases.

**Keywords** cell nuclear transfer, rat, animal model, activation

周琪男,动物研究所研究员。1970 年出生于哈尔滨市。1996 年毕业于东北农业大学,获理学博士学位。中国科学院“百人计划”入选者。自 1999 年开始在法国国立农业研究中心(INRA)主持实验动物克隆研究,成功地改进了动物克隆技术,提高了动物克隆效率,生产出体细胞克隆小鼠、转基因体细胞克隆小鼠、胚胎干细胞克隆小鼠。2000 年 10 月利用发明的核移植技术获得了世界第一头没有利用“多莉”技术生产的体细胞克隆牛,2001 年在世界上首次利用分裂期的细胞生产出体细胞克隆牛。2002 年底在世界上首次获得体细胞克隆大鼠,这是人类首次获得的克隆大鼠。2000 年、2001 年和 2002 年获得香港王宽诚科研奖、法国华人青年企业家协会年度科研奖和法中科技促进协会生物技术奖。发表论文多篇,其中 2003 年 9 月 25 日在 *Science* 上发表的克隆大鼠一文是中国科研机构 and 科学家在该刊动物克隆领域发表的第一篇原始创新性的工作。

资料窗

### 第三世界科学院简介

第三世界科学院(The Third World Academy of Sciences, TWAS)是在已故巴基斯坦物理学家、诺贝尔奖获得者阿布杜斯·萨拉姆倡议下于 1983 年 11 月 10 日成立的,总部设在意大利的里雅斯特,是一个非政府、非政治和非营利性的国际科学组织。现任 TWAS 院长是印度总理办公室高级科技顾问拉奥教授。

TWAS 自创建以来,一直致力于支持和促进发展中国家的科研活动,鼓励对第三世界存在的共性问题进行研究和发 展,促进发展中国家科技人员和科研机构之间的交流和合作,以提高第三世界科学家的科研水平,培养未来一代有前途的科学家,进而推动第三世界基础科学和应用科学的蓬勃发展。

TWAS 的经费主要来自意大利政府、国际原子能机构、联合国教科文组织及其它政府或非政府组织的捐款。从 1983 年至今,TWAS 共获得捐款 1 000 多万美元。我国先后于 1994 年、1996 年和 2002 年由科技部代表中国政府向 TWAS 捐款 10 万美元、50 万美元和 50 万美元。

为促进第三世界国家科学家之间的交流与合作,TWAS 设立专项基金以资助优秀学者和年轻科技人员开展合作研究。截至 2000 年,TWAS 共为 100 多个发展中国家的学者提供了 1 000 余万美元的资助,中国累计获得资助 130 多万美元,是获资助最多的国家。TWAS 还在发展中国家评选出 80 多个研究单位作为“优秀科学中心”和 10 个研究单位作为“高级研究中心”,为发展中国家的年轻科技人员提供科技合作、交流和培训的机会。我国有十几个科研单位被选为“TWAS 优秀科学中心”和“TWAS 高级研究中心”。

TWAS 现有院士 666 名,来自全世界 77 个国家和地区,TWAS 设立的奖项主要有:基础科学奖 5 项(数学奖、物理奖、化学奖、生物奖和基础医学奖);应用科学奖 2 项(即“第三世界科学组织网络(TWNSO)农业奖”和“TWNSO 技术奖”);TWAS 讲演奖和阿布杜斯·萨拉姆科学技术奖于 1995 年增设,以奖励发展中国家学者在科学研究方面取得的成就。以上奖项每年评选 1 次。截至 2002 年 10 月,我国有 17 名学者和 2 个科研单位获得 TWAS/TWNSO 奖。

TWAS 每年召开 1 次院士大会,每 2 至 3 年召开 1 次学术大会,邀请 TWAS 院士、发展中国家科技部长、各国科学院院长和国际组织的代表参加,以探讨发展中国家共同关心的科学技术问题。