

领域前沿 · 中国



周琪, 中国科学院动物研究所研究员。1996年毕业于东北农业大学, 获理学博士学位; 1997年进入中国科学院发育生物学研究所博士后流动站; 1999年在中国科学院发育生物学研究所获副研究员任职资格; 1999-2002年, 法国国家农业研究中心(INRA)分子发育生物学部博士后; 2001年入选中国科学院“百人计划”。2002年12月加入中国科学院动物研究所, 任研究员。周琪研究员主要从事细胞重编程机制和命运调控、干细胞多能性获得与维持等研究工作, 并致力于推动再生医学和应用。周琪研究组现已建立多种克隆及转基因动物模型; 国际首次利用体细胞成功克隆大鼠; 利用iPS细胞通过四倍体囊胚注射证明iPS细胞具有与胚胎干细胞相似的多能性; 发现并明确证实决定小鼠(哺乳动物)干细胞多能性的关键基因决定簇; 通过外源因子诱导实现了跨胚层转分化; 利用基因修饰的单倍体胚胎干细胞成功获得健康成活的转基因小鼠。现已在Nature、Science、PNAS、JBC、Stem Cells、Cell Research等刊物发表研究论文70余篇, 申请、获得重编程技术发明专利6项: 其研究成果多次受到国际著名科学家的高度评价与国际科技媒体的广泛报导, 其中三项研究成果分别于2003年、2009年及2012年入选我国年度十大科技进展新闻、两院院士评选的十大科技进展或十大科技新闻人物, 尤其是证明iPS细胞多能性的工作还入选了美国《时代周刊》评选的2009年年度十大医学突破。周琪研究员先后获得国际转基因研究genOway奖、何梁何利基金科学与技术奖、周光召基金会“杰出青年基础科学奖”等多项奖励。

单倍体胚胎干细胞——哺乳动物基因功能研究的新工具

帅 领 李 伟 赵小阳 周 琪*

(中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100101)

1 单倍体细胞研究背景

单倍体细胞只具有一套染色体, 没有等位基因的存在, 因而它们在遗传分析、基因功能与性状研究中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]。对于哺乳动物, 单倍体细胞仅局限于雌雄配子, 而配子细胞在体外只能存活很短的时间, 极大地限制了哺乳动物的单倍体细胞在遗传学筛选研究中的应用。为了

获得哺乳类的单倍体细胞, 从上世纪70年代开始, 科学家便利用胚胎分割^[3]或孤雌激活卵母细胞^[4]等方法构建单倍体胚胎, 并成功地获得小鼠的单倍体胚胎。在小鼠胚胎干细胞成功建系^[5]之后, 科学家曾尝试建立小鼠的单倍体胚胎干细胞, 但没有成功。研究证据表明, 由于小鼠单倍体胚胎干细胞在体外培养过程中存在着自发二倍化的现象, 因而导致无法获得稳定的小鼠单倍体胚胎干细胞系^[6]。这个问题也成为三十多年来获得哺乳类单倍体细胞的主要障碍。尽管在最新的一些研究中报道, 在人类的癌细

*通讯作者。Tel: 010-64807299, E-mail: qzhou@ioz.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-10-64807299, E-mail: qzhou@ioz.ac.cn

胞中存在“近单倍体”的细胞系,但并不是一类真正意义的哺乳类单倍体细胞系^[7-8]。

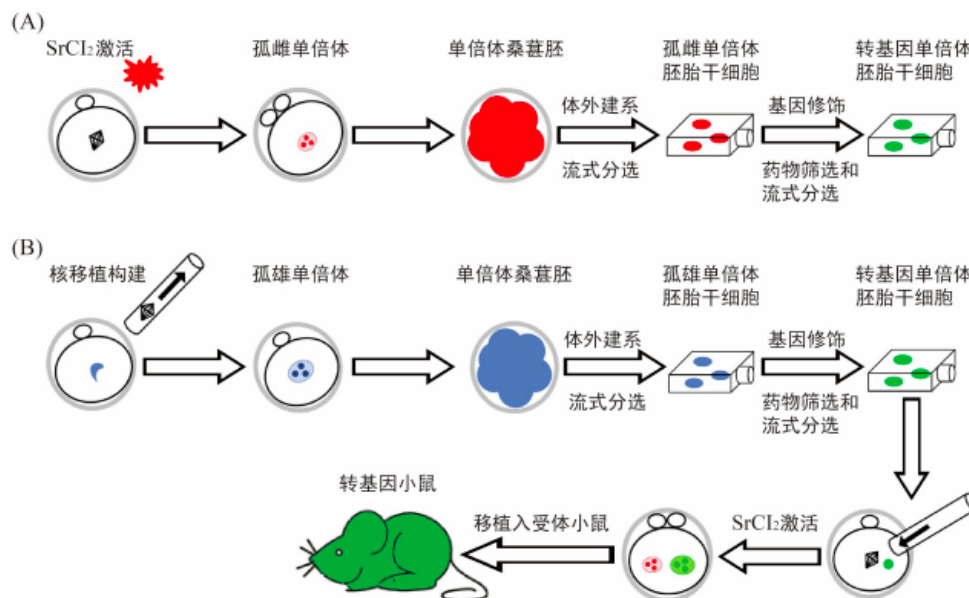
由于体外诱导单倍体很难发生,因此从配子获得单倍体细胞是一个可行性较高的策略。由于干细胞和再生医学的兴起,从配子获得干细胞成为干细胞研究中的一个热点,有望回避胚胎损害带来的伦理风险,提供新的获得病人自体干细胞系的途径。我们在2007年利用孤雌激活人类卵母细胞获得的人类孤雌囊胚,较早地建立了遗传信息完全来自于母本的孤雌胚胎干细胞系^[9]。遗传分析检测时发现,由于卵母细胞发育时染色体重组的影响,这些孤雌胚胎干细胞系的远端着丝粒杂合性较高。基因组高度纯合的细胞和动物在遗传学研究中具有重要的应用价值。因而我们考虑,能否建立一个基因组遗传位点纯合的胚胎干细胞系?这样的细胞系,最可行的来源是单倍体胚胎获得的单倍体胚胎干细胞系,或者单倍体细胞二倍化后得到的细胞系。那是否能够建立哺乳类的单倍体胚胎干细胞系当时并不清楚。

2 单倍体胚胎干细胞的获得

由于可用于基础研究的人类的卵母细胞极为稀缺,影响了实验进程。因此,我们回到小鼠中来开展实验,尝试建立小鼠的单倍体胚胎干细胞系,以用于遗传学筛选的研究。我们尝试用两种方法去获

得小鼠的单倍体胚胎:(1)孤雌激活小鼠的卵母细胞获得孤雌单倍体胚胎;(2)借助体细胞核移植技术^[10],将小鼠的精子头部注射入卵母细胞中并同时去除卵母细胞的遗传物质,进而获得孤雄单倍体胚胎,结果表明,这两种方法都可以获得小鼠的单倍体胚胎(图1)。随后,我们采用小鼠胚胎干细胞建系的方法将这些胚胎用于小鼠单倍体胚胎干细胞的建系研究^[11],并于2009年分别获得了孤雌和孤雄两种单倍体胚胎干细胞系。由于小鼠单倍体胚胎干细胞存在自发二倍化的现象,以及当时的单倍体细胞的富集方法尚不完善,导致我们的单倍体胚胎干细胞随着传代次数的增加而最终全部二倍化。

为了进一步证实单倍体胚胎干细胞的存在,我们进行了一系列实验进行检测。首先,将单倍体胚胎干细胞进行DNA含量分析,结果表明在建系之后5代以内可以检测到单倍体的细胞亚群存在,但是当传代至10代左右便彻底消失了。核型分析实验同样也印证了这一结果。此外,我们还设计了一个更加严格的显微注射实验去证明单倍体胚胎干细胞的存在。2009年新加坡国立大学的科学家发现,将鱼类单倍体胚胎干细胞注射入鱼卵中可以使卵子“受精”,并且发育成一个完整的个体^[12-13]。考虑到哺乳动物中基因印记的影响,我们选择了孤雄单倍体胚胎干细胞来开展这一实验。我们选取低代次的小鼠



A: 孤雌单倍体胚胎干细胞的建立和应用; B: 孤雄单倍体胚胎干细胞产生转基因小鼠。

A: derivation and application of pathogenesis embryonic stem cells; B: generation of transgenic mice from androgenetic haploid embryonic stem cells.

图1 转基因单倍体胚胎干细胞的获得

Fig.1 Generation of transgenic haploid embryonic stem cells

孤雄单倍体胚胎干细胞(5代以内)进行卵母细胞胞浆内注射,然后将得到的胚胎经氯化铯化学激活再移植回假孕母鼠的体内。由于只有二倍体的动物才能够发育到期,单倍体、三倍体和四倍体胚胎的发育能力受限,因此如果能够获得到期动物,则证明注射的细胞为单倍体干细胞,反之也能证明孤雄单倍体胚胎干细胞可以替代精子与卵母细胞融合完成发育。我们分别选取处于G₀/G₁期和处于M期的孤雄单倍体胚胎干细胞进行注射;对于G₀/G₁期的孤雄单倍体胚胎干细胞,我们凭借观察挑取直径在8-10微米的光滑核质均匀的细胞得到;而M期的孤雄单倍体胚胎干细胞,我们则通过秋水仙素对其进行同步化处理,挑选直径在10-12微米的能明显可见纺锤体的细胞得到。通过上述办法我们于2011年8月获得了首只孤雄单倍体胚胎干细胞注射得到的到期胎儿,从而最终严格地确认了单倍体胚胎干细胞的存在,并具有可替代精子的特性。

2011年,国际上单倍体干细胞的研究取得了重大的突破,英国剑桥大学的科学家首次报道了小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞系的建立^[14],随后奥地利科学家也报道了类似的工作^[15]。他们通过流式分选技术建立了稳定的孤雌单倍体干细胞系,并进行了初步的遗传学筛选研究,表明这一类哺乳类的单倍体胚胎干细胞也是进行遗传学筛选研究的优良工具。但他们的研究存在一定的局限性,例如,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能够实现这一过程,我们之前的实验也初步证实了这一假设。因此,我们针对这些问题开展了更加深入的研究。

根据我们之前的实验结果,我们改进了流式分选技术,从而更容易获得稳定的小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞系。为了使荧光染料Hoechst33342与孤雄单倍体胚胎干细胞的DNA更牢固地结合,我们在染色的过程中加入了钙泵抑制剂-Verapamil,使染色更加充分,单倍体的富集更加的精准。利用这一技术,我们迅速地建立了27株孤雄单倍体胚胎干细胞系。

3 单倍体胚胎干细胞分化潜能和表观遗传特性

传特性

这些孤雄单倍体胚胎干细胞具有典型的小鼠胚胎干细胞(ES)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鼠体内可以分化形成含三胚层细胞的畸胎瘤,但流式分析结果表明,所有的分化细胞都已经变成二倍体细胞,因此,单倍体胚胎干细胞是否必须先二倍化以后才具有分化能力,当时并不清楚。于是,我们利用携带绿色荧光蛋白(GFP)和多能性报告基因(Oct4-GFP)的孤雄单倍体胚胎干细胞分别进行了嵌合体制作实验,根据对单倍体来源的荧光细胞进行DNA含量分析来解答这一重要问题。结果表明,只有在胚胎发生的第6.5天(E6.5)的嵌合体胚胎中能够检测到单倍体细胞的存在,而在E8.5以后便没有检测到单倍体细胞的存在。后来分析成年嵌合体动物的心、肝、脾和肾四个器官,发现单倍体细胞在终末分化的成体器官中已全部二倍体化。但是,在Oct4-GFP背景的孤雄单倍体胚胎干细胞所形成的E12.5的嵌合体胚胎的生殖嵴中,仍然能检测到表达Oct4-GFP阳性的细胞,证明孤雄单倍体胚胎干细胞也具有生殖系嵌合的能力。综上所述,我们得到的孤雄单倍体胚胎干细胞是一类具有多能性的胚胎干细胞,尽管可能需要经历二倍体化过程才能具有分化能力。

鉴于我们早期实验中发现的孤雄单倍体胚胎干细胞的表观遗传特性,我们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。我们对早期的注射实验进行了优化,借助低浓度的Hoechst33342对孤雄单倍体胚胎干细胞进行染色,然后借助FACS分选的方法得到处于G₀/G₁期的细胞,这样不仅使荧光染料对细胞的毒害降低,同时得到高纯度的G₀/G₁期的单倍体细胞,大大提高了我们注射实验获得动物的效率。我们对随机挑选的6个孤雄单倍体胚胎干细胞系进行卵母细胞胞浆内注射实验,总共获得了24只发育到期的老鼠,其中有10只健康发育至今。

通过亚硫酸氢盐测序检测发现,这些孤雄单倍体胚胎干细胞带有精子特有的父源印记,但与传统的孤雄胚胎干细胞类似,其印记并不稳定,在体外培养过程中逐渐向正常受精来源的胚胎干细胞转

变,即母源印记基因也开始表达。随着细胞传代,孤雄单倍体胚胎干细胞中的某些印记基因(如*Snrpn*、*H19*)会部分丢失父源印记,这种印记的丢失对动物的存活存在重要影响,在我们获得的24只动物中,有14只存在发育滞缓等异常而夭折。

4 单倍体胚胎干细胞在转基因研究中的应用

实验结果表明,孤雄单倍体胚胎干细胞既具有无限增殖和多能性等胚胎干细胞的特点,又具有能够使卵母细胞“受精”而得到健康动物的能力。所以我们尝试利用孤雄单倍体胚胎干细胞进行转基因研究,并借助卵母细胞胞浆内注射的方法,直接获得转基因动物。我们挑取了一个携带GFP,并且能够使卵母细胞受精而获得健康动物的细胞系AHGFP-4进行转基因研究。我们将携带新霉素抗性基因(*Neo^r*)的质粒电转到该细胞系中,通过G418药物筛选后,我们随机挑取了12个具有新霉素抗性的亚克隆细胞系,然后将这12个亚系经过扩增后,利用FACS将其分选,最终得到了6个仍然维持单倍性并且整合了目的基因的细胞系,具体方法如图1所示。我们随机选取其中的两个转基因细胞系进行卵母细胞胞浆内注射实验,得到了23个到期的转基因动物,这些动物全部携带新霉素抗性基因,其中有6只存活至今。由此证明,孤雄单倍体胚胎干细胞是一类可以进行遗传学筛选的优良的工具细胞,并且可以将引入的转基因突变传递到动物水平,从而形成了一种新型的构建转基因动物的体系。中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学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^[16]。

科学家已经利用孤雌单倍体胚胎干细胞开展了基因筛选的工作,证实单倍体胚胎干细胞可以成为基因功能研究的重要工具^[14-15]。同时,孤雄单倍体胚胎干细胞具有使卵母细胞受精并获得转基因动物的,结合功能基因筛选和替代精子的能力,单倍体干细胞将大大加速功能基因在细胞和个体水平的研究。单倍体干细胞还为不具备生殖系嵌合能力的胚胎干细胞的物种提供了一种新的获得转基因动物的研究线索,也为辅助生殖研究提供了一个新的研究

平台。另外,单倍体胚胎干细胞还存在诸多问题值得研究,例如单倍体胚胎干细胞的倍性维持机制目前并不清楚;单倍体胚胎干细胞的印记的维持机制也不明确,这些问题的解决均将推动单倍体细胞在遗传学筛选中的应用。

参考文献 (References)

- 1 Otto SP, Jarne P. Evolution. Haploids—Hapless or happening? *Science* 2001; 292(5526): 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(2): 352-9.
- 3 Tarkowski AK, Rossant J. Haploid mouse blastocysts developed from bisected zygotes. *Nature* 1976; 259(5545): 663-5.
- 4 Kaufman MH. Chromosome analysis of early postimplantation presumptive haploid parthenogenetic mouse embryos. *J Embryol Exp Morph* 1978; 45: 85-91.
- 5 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(581): 154-6.
- 6 Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, Evans MJ. Establishment of pluripotential cell-lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morph* 1983; 73: 249-61.
- 7 Carette JE, Guimaraes CP, Varadarajan M, Park AS, Wuethrich I, Godarova A, *et al.* Brummelkamp, haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens. *Science* 2009; 326(5957): 1231-5.
- 8 Sukov WR, Ketterling RP, Wei S, Monaghan K, Blunden P, Mazzara P, *et al.* Nearly identical near-haploid karyotype in a peritoneal mesothelioma and a retroperitoneal malignant peripheral nerve sheath tumor. *Cancer Genet Cytogen* 2010; 202(2): 123-8.
- 9 Mai QY, Yu Y, Li T, Wang L, Chen MJ, Huang SZ, *et al.* Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Res* 2007; 17(12): 1008-19.
- 10 Zhou Q, Renard JP, Le Fric G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, *et al.* Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 2003; 302(5648): 1179.
- 11 Bryja V, Bonilla S, Arenas E. Derivation of mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 2006; 1(4) 2082-7.
- 12 Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science* 2009; 326(5951): 430-3.
- 13 Hong YH. Medaka haploid embryonic stem cells. *Method Cell Biol* 2010; 100: 55-69.
- 14 Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature* 2011; 479(7371): 131-4.
- 15 Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, O'Malley R, Demers SP, Vanhaelen Q, *et al.* Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9(6): 563-74.
- 16 Yang H, Shi LY, Wang BA, Liang D, Zhong CQ, Liu W, *et al.* Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell* 2012; 149(3): 605-17.