



# 哺乳动物细胞核重编程方法学研究进展

郝振华, 伊璐, 郝称莉, 翟明霞, 刘红林\*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏南京 210095)

**摘要:** 多莉羊的成功克隆表明分化细胞在环境因素的影响下可以重编程为胚胎的全能状态, 此后体细胞核移植一直是细胞核重编程研究的有力工具。但是技术操作上的繁琐及其伦理上的约束限制了核移植在许多国家的应用。细胞移植、细胞融合、细胞提取物、体外建立诱导模型等方法可以直接并有效地改变细胞命运, 并越来越多地应用到细胞核重编程的研究中。已发现卵母细胞、胚胎干细胞、胚胎生殖细胞、畸胎瘤细胞、成体干细胞、甚至终端分化的体细胞都有使细胞核重编程的能力, 但是在重编程过程中发挥作用的关键因子还不清楚。

**关键词:** 细胞核重编程; 细胞移植; 细胞融合; 细胞提取物; 体外诱导模型

**中图分类号:** S814.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-5130(2007)12-0071-05

上世纪70年代以来, 核移植技术一直是研究细胞核重编程的有力工具, 它精彩地向我们描述了卵母细胞质与供体核之间发生的故事。但是核移植技术操作上的繁琐及伦理上的约束限制了在许多国家的应用。近些年细胞移植 (cell transplantation)、细胞融合 (cellular fusion)、细胞提取物 (cell extracts)、体外建立模型等方法在细胞核重编程的研究中日益受到重视。本文就以上几种方法在细胞核重编程研究中发挥的作用做一综述。

## 1 细胞核重编程

含有完整细胞核的动物细胞携带形成完整个体所必需的全部遗传信息, 具有结构上的完整性和功能上的全能性 (totipotency), 因此, 任何一种分化阶段和分化类型的细胞都可以在内外环境因素的影响下重新程序化产生新的表型和功能, 导致细胞命运的改变, 这个过程称为细胞核重编程 (nuclear reprogramming)。细胞核重编程 (nuclear reprogramming) 包括分化 (differentiation)、去分化 (dedifferentiation) 以及转分化 (transdifferentiation) 3个方面。

哺乳动物生殖系发育过程中, 原始生殖细胞经历了剧烈的表观修饰改变。精子和卵子在发育过程中被打上双亲特异性的烙印, 受精后即在合子及早期卵裂球中迅速擦除, 并重新建立子代特有的标记, 获得发育的全能性<sup>[1]</sup>。这种全能性一直持续到囊胚阶段的内细胞团 (inner cell mass, ICM), ICM在体外培养后可以得到全能的胚胎干细胞 (embryo stem cells, ESCs)。在以后的发育过程中, 细胞开始分化, 以特定的形态和功能参与组织器官的形成。过去一直认为细胞的命运一旦确定, 将不再发生改变。1997年多莉羊的出生向人们证明, 高度分化的体细胞在一定的环境中可以发生去分化, 并且完全可以发育为新个体<sup>[2]</sup>。

血液、皮肤、中枢神经系统、肝脏、胃、骨骼肌、睾丸等

组织中还存在组织特异性干细胞, 能够不断分化为所在组织类型细胞, 使受损的组织得到再生并维持组织的动态平衡。传统观念认为, 与全能性ES细胞不同, 成体干细胞分化和再生能力只限制为它的来源组织。近来大量的试验证明成体干细胞甚至终端分化的细胞也具有令人惊异的可塑性, 在一定的条件下可以不经去分化而直接转分化 (transdifferentiation) 为其他细胞类型。比如持续缺血、缺氧刺激会导致损害的肾小管上皮细胞转变为肌成纤维细胞, 直接参与肾间质纤维化过程<sup>[3]</sup>。乳房脂肪细胞在女性孕育期转化为泌乳细胞, 孕育期过后又重新逆转为脂肪细胞。因此, 细胞核重编程是个体发育、适应机体病理生理变化需求的一个策略。

## 2 核移植

核移植在哺乳动物胚胎工程和组织替代医学上具有重要的价值。近10年, 哺乳动物核移植技术发展非常迅速, 目前, 羊、小鼠、牛、猪、大鼠、狗等哺乳动物的成功克隆<sup>[2,4-7]</sup>表明不同发育阶段、不同胚层的体细胞都可以在卵母细胞质中重编程, 发生命运的逆转。

### 2.1 核移植基本操作程序和原理

体细胞核移植包括一系列的复杂程序: 将供体细胞移入显微去核的卵母细胞中, 供体核与卵母细胞质融合, 重组胚经激活后进行体外培养, 或培养后移植到代孕母体中使其发育成新个体。其基本原理是卵母细胞质中含有一个或多个重编程因子, 融合后供体核暴露其中, 核质之间发生相互作用, 供体细胞基因组在结构和功能上逆转为发育的起始状态。核质互作的效果会直接影响到胚胎能否正常发育。

### 2.2 影响克隆效果的因素

核移植后供体核重编程的效果一般从以下几个方面来评价: (1) 囊胚发育率; (2) 移植到子宫以后胚胎出生率; (3) 出生后发育到成年的比率; (4) 克隆囊胚移植后获取胚胎干细胞的频率等。直到现在核移植效率仍然非常低, 而且, 重组胚发育严重异常, 妊娠早期流产率和出生后死亡率非常高。影响克隆效果的因素非常多, 卵母细胞状态、核供体的选择、操作者习惯等都有可能影响核移植效率。

研究表明卵母细胞的年龄和细胞周期会直接影响到重组胚

收稿日期: 2007-05-17

基金项目: 国家自然科学基金 (30471244)。

作者简介: 郝振华 (1983-), 女, 硕士研究生。

\* 通讯作者。

重编程过程。卵子成熟后卵母细胞质才获得指导体细胞核膜破裂的能力,在正常受精卵中,母源 mRNAs 在受精到早期胚胎合子型基因激活过程中发挥着核心调控作用。同样,母源信息也能使移入卵母细胞质中的供体基因组重新程序化,这也是核移植所依据的主要原理之一。与正常受精卵相比,克隆胚胎在 X 染色体失活、印记、基因组以及特定位点的 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化和甲基化、染色体重塑复合体聚集、基因表达等方面严重异常。重编程依赖于胞质中特异性转录物和染色质重塑因子进入细胞核发挥作用,而早期克隆胚中,参与印记维持的卵母细胞特异形式的 Dnmt1o 没有在 8-cell 期移入核内,蛋白质从胞质到细胞核的转运过程发生了错误<sup>[8]</sup>。

供体细胞分化特征越明显克隆效率越低,使用胚胎干细胞作核供体比体细胞的克隆效率要高。发展起来的两步克隆法以第一步核移植产生的卵裂球或建立的胚胎干细胞系为供体进行第二轮的克隆,可以大大提高克隆效率,并可以有效地使终端分化的 B 细胞、T 细胞发生重编程<sup>[9]</sup>。

长期体外培养或操作过程中发生的染色体改变也能导致克隆动物发育异常。Wakayama 等<sup>[14]</sup>以克隆小鼠的卵丘细胞作供体连续克隆 4~6 代,效率却在反复克隆中下降,可能是因为供体核染色体突变和核型变异不断积累,以至于供体细胞群体中可提供全程发育的正常供体比例越来越小。

此外,外界环境引起的信号转导、转录后调控等方面的错误都有可能成为重编程失常的诱导因素。细胞核重编程改变是细胞形态和功能改变的一个中间事件,将其上下游事件联系起来探明重编程的分子机制将是一个很有意义的方向。

核移植法是目前除了精卵结合以外产生动物个体的唯一途径,该技术的发展具有非常强的理论意义和现实意义。但是,在哺乳动物卵母细胞较少,取材非常困难,显微操作仪器昂贵,核移植步骤繁琐,对操作人员的熟练程度要求比较高,而且在体外操作时影响因素多,克隆动物多数发育不正常。由于针对动物早期胚胎进行操作,核移植所涉及的伦理问题限制了在一些国家的应用。另外,由于技术本身的限制,核移植无法探讨体细胞生存的微环境等一些非卵母细胞因素对体细胞核的影响,重编程的研究急需其他方法的补充。

### 3 细胞移植

畸胎瘤细胞注射到附植前囊胚得到发育正常的小鼠,注射到小鼠皮下发展成畸胎瘤<sup>[11]</sup>,这些有趣的试验提示从局部微环境来源的信号影响了细胞的命运。事实上,上个世纪 60 年代果蝇盘窝细胞(imaginal disc cells)命运决定(transdetermination)现象就已经引起了人们对细胞所处微环境的极大兴趣。近年来用细胞移植法来探讨微环境的作用是细胞核重编程的研究中非常重要的一个方面。

#### 3.1 体内生理环境与细胞核重编程

细胞移植到体内可以研究体内生理环境对细胞核重编程的影响。最为典型的代表就是血管注射法来探讨骨髓细胞的可塑性。首先采用辐射或其他方法使目标组织发生严重损伤,然后将骨髓注入体内循环系统,观测骨髓细胞是否转化为该组织类型细胞,参与损伤处组织的再生。这种方法的好处是骨髓细胞

可以随循环系统到达体内绝大多数组织微环境。研究表明,移植的骨髓细胞可以呈肌原性转化参与肌纤维的再生,形成肝卵圆细胞参与肝脏重建,产生神经元对体内生理信号作出反应<sup>[12]</sup>。过去认为骨髓细胞的分化能力仅限制在血细胞和间质细胞,而上述出人意料的分化方向可能是骨髓细胞对其所达到的组织环境因素中的各种信号做出的应答。提示细胞间微环境,包括细胞间通讯、细胞间基质以及生长分化因子在指导细胞命运方面起到了关键作用。在正常生命活动中,这些都是指导干细胞迁移进入组织的因素。

#### 3.2 早期胚胎微环境与细胞核重编程

哺乳动物早期胚胎处于生命的起始阶段,经历着从亲代到子代基因表达模式的剧烈变化,细胞之间互相通讯保持着细胞的全能性,若将外源细胞注入,则很快参与细胞与环境之间的应答,发生细胞核重编程并引起细胞表型机能改变。Geiger 等(1998 年)将成年造血干细胞注入附植前小鼠囊胚后在胚胎微环境中可以存活并获得了胚胎基因转录模式。后来该实验室又分别将人急性髓系白血病细胞<sup>[13]</sup>、神经干细胞<sup>[14]</sup>注入小鼠囊胚均得到嵌合体胚胎并发育至成年,提示囊胚细胞外因子(extracellular factors)或内细胞团细胞与注入细胞之间的相互作用足以使其命运发生改变。人成体细胞可以整合进入鼠胚胎微环境可能是由于早期胚胎尚未分化,特异性表面抗原没有开始表达,不易引起免疫排斥反应。

恶性肿瘤细胞与周围微环境有双向反应,发出并接受趋化因子,直接改变细胞分化、生长、侵袭表型,而细胞外基质为肿瘤细胞的迁移扩散提供了媒介,因此微环境被认为是克服肿瘤的重要障碍。曾经认为肿瘤细胞可以入侵体内各种各样的组织,寻找控制肿瘤的方法成为当前国际上的研究热点。Mintz 等(1975 年)将拥有正常染色体数的小鼠畸胎瘤细胞注射到附植前囊胚,逆转了其增殖侵袭的恶性表型,参与肝、胸腺等不同组织的形成,并得到有功能的精子后裔。具有强侵袭力的人黑素瘤移植到斑马鱼胚<sup>[15]</sup>和鸡胚<sup>[16]</sup>中,肿瘤恶性表型也都得到控制。胚胎微环境控制肿瘤增殖并将其逆转的事实改变了“肿瘤具有无所不能侵袭能力”的传统观点,周围微环境的改变可以使肿瘤细胞发生核重编程而发生逆转,为人类战胜肿瘤提供了一个很好的研究方向。

### 4 细胞融合

精卵之间的结合是自然发生最为生动的细胞融合现象。在肌肉、骨骼、胎盘滋养层的发育以及炎症反应过程中<sup>[17-18]</sup>也都有细胞融合的参与。近年来发展的细胞融合有化学融合和电融合 2 种方法。核移植技术仅能以卵母细胞为对象研究细胞核重编程,而细胞融合技术的研究对象比较广泛,包括胚胎干细胞、胚胎生殖细胞(embryonic germ cells, EGCs)、胚胎癌细胞(embryonal carcinoma cells, ECCs)、成体干细胞、终端分化细胞等。

#### 4.1 体细胞与各种分化状态细胞之间的融合

由于胚胎干细胞也具有分化的全能性,常用来替代卵母细胞研究细胞核重编程。Cowan 等<sup>[19]</sup>报道,ESCs 与人成纤维细胞融合以后杂交细胞呈集落生长、表达干细胞特异的标记并且

可以形成类胚体,提示 ESCs 也能使体细胞基因组发生重编程。2007年,Matsumura等<sup>[20]</sup>发展了从杂交细胞中定向除去染色体的技术,证明杂交细胞多能性的维持来自重编程后体细胞核 Nanog 因子的表达。EGCs 与体细胞融合后也可以使体细胞基因组重编程获得多能性,与 ESCs 不同的是 EGCs 可以改变体细胞的印记状态。与 EGCs 融合后,胸腺淋巴细胞的印记及非印记位点都发生了剧烈的去甲基化<sup>[21]</sup>。可能是由于原始生殖细胞 PGCs 在胚胎发育过程中经历了基因组重编程,包括印记基因及非印记基因的去甲基化,而体外培养得到的 EGCs 保持了 PGCs 的这一特性。

过去认为在体细胞中稳定遗传的表观修饰也可以在另一种体细胞的核质作用下发生转变。2007年,Zhang等<sup>[22]</sup>将外胚层的角化细胞融入中胚层的多核肌肉细胞后,角化细胞核中原来沉默的 MyoD (肌肉细胞标记)发生 DNA 主动去甲基化,而 keratin-14 (角化细胞标记)发生了甲基化。

如何将杂交细胞变成二倍体是细胞融合合法临床应用的一大障碍。将干细胞去核或许可以作为一个选择,但是去核过程操作非常复杂,而且去核以后有可能失去干细胞的重编程能力<sup>[23]</sup>。

#### 4.2 自发融合与转分化之争

2002年 Terada等<sup>[24]</sup>人发现体外共培养时骨髓细胞可以与其他类型细胞发生自发融合,获得受体细胞表型。而之前认为骨髓细胞移植后出人意料的多胚层分化表型是由于细胞直接发生了转分化。Terada 的观点提出后立即引发了自发融合论与细胞转分化论的激烈争辩。2003年,Alvarez-Dolado等<sup>[25]</sup>证明骨髓细胞移植到体内后分别与肝脏中肝实质细胞 (hepatocytes)、大脑中 Purkinje 神经细胞、以及心脏中心肌细胞 (cardiac muscle) 发生自发融合,结果形成多核细胞,这是细胞核重编程自发融合论首个体内证据。但是,2004年 Harris等<sup>[26]</sup>将骨髓细胞移植后得到了肺、肝、皮肤上皮细胞,都没有找到任何细胞融合的证据。产生2种结果的原因可能是:(1)自发融合是有条件的,严重组织损伤可以促进细胞融合,而 Harris 没有选择严重组织损伤的试验条件;(2)骨髓中可能只有特定类型的干细胞才可以发生自发融合,Alvarez-Dolado 使用全骨髓细胞,但 Harris 用免疫的方法剔除了成熟 T 细胞,而 T 细胞很有可能就是形成异核体的主要细胞类型;(3)有可能自发融合与转分化是同时存在的,但是自发融合的频率非常低<sup>[24]</sup>,不同的检测方法的灵敏性和侧重点不同,导致试验结果存在差别。为了避免以上麻烦,在细胞去分化或转分化的研究中应当把细胞基因型列入检测之列,以保证转分化的细胞拥有正常的核型。

不过,也有人提出骨髓细胞移植后检测到的非造血细胞即非源自成体干细胞的转分化也非自发融合,现有的方法尚不能排除在提取骨髓时混入其他组织细胞的可能性。

### 5 细胞提取物

利用细胞提取物的无细胞系统不需对大量细胞进行鉴定纯化,而且可以排除细胞融合的可能,是研究核重编程很好的选择。近些年,配子、干细胞、体细胞的核质提取物广泛应用到

重编程研究中。该方法操作简单,将体细胞核直接或经透性化处理后 (permeabilized) 置入另一种细胞的全细胞提取物中短暂孵育,提取物中的细胞核调控组分可以进入体细胞核,进而改变体细胞基因组的表达。

#### 5.1 全能性细胞提取物

与核移植和细胞融合试验相同,卵母细胞、干细胞核质提取物都可以使体细胞核发生重编程。非洲爪哇卵提取物中 ATP 依赖的染色体重塑因子可以将体细胞特异的 TATA 结合蛋白 (TATA-binding protein, TBP) 从体细胞染色体上解离,提示染色体重塑复合体参与体细胞核重编程<sup>[27]</sup>。透性化 293T cells 在 ECCs 细胞提取物中暴露 1h 后也开始表达全能性标记 OCT4<sup>[28]</sup>。

#### 5.2 终端分化细胞提取物

Landsverk等<sup>[29]</sup>将分化的上皮细胞和神经前体细胞在活化 T 细胞提取物中孵育 30 min 后发现白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 基因的转录活化因子向核内运输并与染色体结合,SWI/SNF 染色体重塑复合体结合在供体核上,IL-2 基因启动子区 H4 高乙酰化,RT-PCR 分析 IL-2 基因活跃表达。IL-2 由活化的 T 细胞合成并分泌,上皮细胞和神经前体细胞核 IL-2 的转录活化证明体细胞核在终端分化细胞核质提取物的作用下可以发生细胞核重编程,从而证明成体细胞的转分化现象确实是存在的。

细胞提取物的方法为重编程研究提供了新的思路,为体外操作细胞提供了更多可能。但是也有人提出细胞提取物是否具有重编程能力还有待确定,因为检测到的标记性基因产物很有可能来源于提取物残留,因此,还需要更为严谨的试验设计和更为精确的操作方法。

## 6 体外定向诱导模型的建立

相比之下,发展起来的 3D 模型 (three dimensional model) 或添加诱导因子等体外定向诱导方法的应用前景更为诱人。

#### 6.1 体外 3D 模型

体外 3D 模型可以逼真的模拟细胞与三维空间微环境之间的作用,其构建方法简单描述为以下几步:首先将待测微环境细胞种植在 3D 胶原基质 (matrigel matrix) 数天,移去细胞得到预处理的无细胞 3D 基质,目的细胞接种到预处理的 3D 基质后检测形态功能变化。利用这种方法将人正常黑色素细胞置入恶性黑色素瘤处理的微环境中,黑色素细胞发生转化,获得强烈的迁移及入侵能力。但是,反过来将恶性黑色素瘤细胞放入正常黑色素细胞微环境中,黑色素瘤的恶性表型没有得到任何控制,该方法生动地模拟了肿瘤细胞与正常组织之间斗争并最终使正常组织恶化的过程<sup>[38]</sup>。

#### 6.2 添加诱导因子

在体外添加细胞因子诱导细胞重编程的方法有 2 种:(1)将药物直接添加在培养基中,通过改变细胞周围微环境诱导细胞转变。Archiniegas等<sup>[30]</sup>在培养基中添加凝血酶及其受体,直接将血管内皮细胞诱导为间充质细胞。Rong等<sup>[31]</sup>在体外培养动脉平滑肌细胞时降低胆固醇浓度得到巨噬细胞样细胞。(2)通过转基因对细胞进行遗传改造,细胞自身过表达转基

因细胞因子而发生表型功能改变。2006年, Takahashi<sup>[32]</sup>利用转基因过表达系统筛选出 Oct3/4, Sox2, c-Myc 和 Klf4 四种因子可以将小鼠胚胎成纤维细胞和成体成纤维细胞诱导为多能性干细胞。

体外定向诱导模型没有卵母细胞来源及伦理问题的限制, 不存在细胞融合、组织细胞污染、提取物残留等方面的干扰, 将在细胞核重编程研究中发挥重要作用。但是如果将其应用在诱导体细胞转分化、产生同基因替代的细胞治疗上还有许多问题要解决: (1) 转分化的效率比较低, 安全、迅速、大量转分化的细胞培养体系尚未建立; (2) 研究者多采用形态学、免疫组化、基因多态性等表型改变来证实转分化的发生, 细胞是否执行相应的功能没有深入探讨; (3) 即使在体外通过转分化获得大量的替代细胞, 移植到患者损伤处以后, 长期在体内微环境影响下是否可以保持体外转分化后的形态和功能, 会不会引发肿瘤不得而知。这些问题的解决将为转分化研究走向临床应用迈出关键的一步。

## 7 结论与展望

理解细胞核重编程机制有助于解决克隆动物中出现的問題, 为细胞替代治疗以及肿瘤的研究提供理论基础, 并且对推动动物繁殖学、发育生物学、细胞生物学的发展有重要意义。但是目前对于细胞核重编程的认识多处于表型或功能上的水平, 探索细胞核重编程的分子和生化机制, 寻找体外培养诱导分化的关键因子成为当务之急。随着现有实验技术的不断改进以及新实验方法不断出现, 相信在不久的将来, 找到控制细胞的命运之神不再是梦想。

## 参考文献:

- [1] 陈雯, 陈杰, 刘红林. 哺乳动物胚胎基因组表达起始的调控 [J]. 畜牧与兽医, 2003, 35(11): 42-44.
- [2] Lan H Y. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003, 12(1): 25-29.
- [3] Morroni M, Giordano A, Zingaretti M C, et al. Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(48): 16801-16806.
- [4] Polejaeva I A, Chen S H, Vaught T D, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells [J]. *Nature*, 2000, 407(6800): 86-90.
- [5] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei [J]. *Science*, 2000, 289(5482): 1188-1190.
- [6] Zhou Q, Renard J P, Le Fric G, et al. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation [J]. *Science*, 2003, 302(5648): 1179.
- [7] Lee B C, Kim M K, Jang G, et al. Dogs cloned from adult somatic cells [J]. *Nature*, 2005, 436(7051): 641.
- [8] Chung Y G, Ratnam S, Chaillet J R, et al. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(1): 146-153.
- [9] Rideout W M 3rd, Hochedlinger K, Kyba M, et al. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy [J]. *Cell*, 2002, 109(1): 17-27.
- [10] Wakayama T, Shinkai Y, Tamashiro K L, et al. Cloning of mice to six generations [J]. *Nature*, 2000, 407(6802): 318-319.
- [11] Bissell M J, LaBarge M A. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment [J]. *Cancer Cell*, 2005, 7(1): 17-23.
- [12] Brazelton T R, Rossi F M, Keshet G I, et al. From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice [J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1775-1779.
- [13] Durr M, Harder F, Merkel A, et al. Chimaerism and erythroid marker expression after microinjection of human acute myeloid leukaemia cells into murine blastocysts [J]. *Oncogene*, 2003, 22: 9185-9191.
- [14] Harder F, Kirchhof N, Petrovic S, et al. Erythroid-like cells from neural stem cells injected into blastocysts [J]. *Exp Hematol*, 2004, 32(7): 673-682.
- [15] Lee L M, Sefror E A, Bonde G, et al. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation [J]. *Dev Dyn*, 2005, 233(4): 1560-1570.
- [16] Kulesa P M, Kasemeier-Kulesa J C, Teddy J M, et al. Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(10): 3752-3757.
- [17] Ogle B M, Cascalho M, Platt J L. Biological implications of cell fusion [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(7): 567-575.
- [18] Vignery A. Macrophage fusion: are somatic and cancer cells possible partners [J]. *Trends Cell Biol*, 2005, 15(4): 188-93.
- [19] Cowan C A, Atienza J, Melton D A, et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells [J]. *Science*, 2005, 309(5739): 1369-1373.
- [20] Matsumura H, Tada M, Otsuji T, et al. Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells [J]. *Nat Methods*, 2007, 4(1): 23-25.
- [21] Tada M, Tada T, Lefebvre L, et al. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells [J]. *EMBO J*, 1997, 16(21): 6510-6520.
- [22] Zhang F, Pomerantz J H, Sen G, et al. Active tissue-specific DNA demethylation conferred by somatic cell nuclei in stable heterokaryons [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(11): 4395-4400.
- [23] Do J T, Scholer H R. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells [J]. *Stem Cells*, 2004, 22(6): 941-949.
- [24] Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion [J]. *Nature*, 2002, 416(6880): 542-545.
- [25] Alvarez-Dolado M, Pardo R, Garcia-Verdugo J M, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes [J]. *Nature*, 2003, 425(6961): 968-973.
- [26] Harris R G, Herzog E L, Bruscia E M, et al. Lack of a fusion re-

# 鸡胚肢芽发育机理的研究进展

韩向琨, 陈秋生\*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 由于鸡胚是在蛋内完成发育, 有利于人们方便地进行实验操作, 所以它作为了解脊椎动物肢芽发育的理想模型, 具有其他生物无法比拟的特点。经典的发育生物学为我们提供了鸡胚发育命运图, 并阐明了肢芽发育模式划分中细胞间相互作用的关系。而最早用化学手段模拟这些细胞间相互作用的试验也始于鸡胚的研究。研究表明, Shh 和 Bmp 等基因表达决定着肢芽发育。鸡的基因测序更为我们方便地进行研究提供了机会。本文对鸡胚早期肢芽发育情况进行了介绍, 并阐述了早期鸡胚肢芽发育的分子机理以及各个基因之间相互作用的关系, 为进一步研究动物肢芽的发育机制提供参考。

**关键词:** 鸡胚; 肢芽; 发育机理

**中图分类号:** S831.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0529-5130(2007)12-0075-04

## 1 鸡胚肢芽发育概况

鸡胚四肢的发育是在受精后第3天体轴形成时开始的, 其最早发生部位主要由中心的疏松间充质细胞和表面的上皮样外胚层构成。随着间充质细胞的不断增殖和分化, 逐渐形成了明显的隆起, 称为肢芽。肢芽顶端的外胚层加厚, 称之为顶端外胚层嵴 (apical ectodermal ridge, AER), 其下是由快速分裂增殖的未分化细胞构成的生发带 (progress zone, PZ)。这些细胞脱离 PZ 后, 就会开始分化。大约 7 d 后, 肢芽开始变长, 并由近及远地逐渐形成肢体各部分结构。同时, 间充质细胞开始分化, 形成肢软骨、骨、血管、神经和肌肉等各种组织。骨骼系统的发生来自于软骨组织, 之后神经进入肢体相应的组织结构中。鸡胚的翼骨和腿骨与其他脊椎动物的骨骼组成基本一致, 由近及远依次是: 肩甲/骨盆, 肱骨/股骨, 尺骨/胫骨, 腓骨和指骨/趾骨。

鸡翼上只有 3 个指, 从前到后依次是第 2、第 3 和第 4 指,

而后腿上则具有第 I、第 II、第 III 和第 IV 共 4 个趾, 第 V 趾退化丢失。少见的 5 趾鸡是丝羽乌骨鸡等一些地方鸡种的品种特征, 但许多研究表明, 5 趾品种鸡的额外趾并不是丢失的第 V 趾的恢复, 而是在第 I 趾处长出的一个新趾, 因此鸡多趾应归为轴前多趾 (preaxial polydactyly, PPD)<sup>[1]</sup>。鸡的趾具有经典的四足动物形态结构, 每个趾都有不同数目的趾骨。

肢体的结构组成存在着重复的单元, 这主要集中在数量、位置以及识别上。在肢芽发育过程中, 是什么决定了趾的数量? 又是什么机制来区分臂/翼和腿? 拇指为什么在手的一端而小指却长在另一端? 这些问题都可以在鸡胚肢的发育研究中找到答案<sup>[2]</sup>。

## 2 肢芽发育体制的建立

### 2.1 肢芽发育命运图

在胚胎两侧临近结节的部位有少部分细胞已经包含了将来能生成翼、肢间区、肢以及腿的前体。Saunders 利用碳标记技术绘制了早期肢芽发育命运图, 揭示了很多肢芽发育中的结构与细胞学特性, 如肢 (翼) 上所有的趾都来自早期肢 (指) 芽的后半部分<sup>[3]</sup>, 外胚层相对于间质的细胞移动<sup>[4]</sup>, 并且顶端外胚层嵴是自主的永久性结构等。

利用亲脂染料标记特定的细胞群, 发现包围肢芽主干的外

收稿日期: 2007-05-17

基金项目: 国家自然科学基金 (30671513)。

作者简介: 韩向琨 (1981-), 男, 硕士研究生。

\* 通讯作者。

- quirement for development of bone marrow-derived epithelia [J]. Science, 2004, 305(5680): 90-93.
- [27] Taranger C K, Noer A, Sorensen A L, et al. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells [J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(12): 5719-5735.
- [28] Landsverk H B, Hakelien A M, Kuntziger T, et al. Reprogrammed gene expression in a somatic cell-free extract [J]. EMBO Rep, 2002, (4): 384-389.
- [29] Seftor E A, Brown K M, Chin L, et al. Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment [J]. Cancer Res, 2005, 65(22): 10164-10169.
- [30] Archiniegas E, Neves C Y, Candelle D, et al. Thrombin and its protease-activated receptor-1 (PAR1) participate in the endothelial-mesenchymaltransdifferentiationprocess [J]. DNA Cell Biol, 2004, 23(12): 815-825.
- [31] Rong J X, Shapiro M, Trogan E, et al. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(23): 13531-13536.
- [32] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell, 2006, 126(4): 663-667.

# 哺乳动物细胞核重编程方法学研究进展

作者: 郝振华, 伊璐, 郝称莉, 翟明霞, 刘红林  
作者单位: 南京农业大学动物科技学院, 江苏, 南京, 210095  
刊名: 畜牧与兽医 ISTIC PKU  
英文刊名: ANIMAL HUSBANDRY & VETERINARY MEDICINE  
年, 卷(期): 2007, 39(12)  
被引用次数: 2次

## 参考文献(32条)

1. Onishi A;Iwamoto M;Akita T [Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei](#)[外文期刊] 2000(5482)
2. Polejaeva I A;Chen S H;Vaught T D [Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells](#)[外文期刊] 2000(6800)
3. Morrioni M;Giordano A;Zingaretti M C [Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland](#) 2004(48)
4. Kulesa P M;Kasemeier-Kulesa J C;Teddy J M [Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment](#)[外文期刊] 2006(10)
5. Lee L M;Seftor E A;Bonde G [The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos:assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation](#) 2005(04)
6. Harder F;Kirchhof N;Petrovic S [Erythroid-like cells from neural stem cells injected into blastocysts](#)[外文期刊] 2004(07)
7. Takahashi K;Yamanaka S [Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors](#)[外文期刊] 2006(04)
8. Rong J X;Shapiro M;Trojan E [Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading](#)[外文期刊] 2003(23)
9. Archiniegas E;Neves C Y;Candelle D [Thrombin and its protease-activated receptor-1 \(PAR1\) participate in the endothelial-mesenchymaltransdifferentiationprocess](#)[外文期刊] 2004(12)
10. Seftor E A;Brown K M;Chin L [Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment](#)[外文期刊] 2005(22)
11. Landsverk H B;Hakelien A M;Kuntziger T [Reprogrammed gene expression in a somatic cell-free extract](#)[外文期刊] 2002(04)
12. Taranger C K;Noer A;Sorensen A L [Induction of dedifferentiation,genomewide transcriptional programming,and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells](#) 2005(12)
13. Rideout W M 3 rd;Hochedlinger K;Kyba M [Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy](#)[外文期刊] 2002(01)
14. Chung Y G;Ratnam S;Chaillet J R [Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression in cloned mouse embryos](#)[外文期刊] 2003(01)
15. Lee B C;Kim M K;Jang G [Dogs cloned from adult somatic cells](#)[外文期刊] 2005(7051)
16. Zhou Q;Renard J P;Le Friec G [Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation](#)[外文期刊] 2003(5648)

17. [Lan H Y Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells](#) [外文期刊] 2003(01)
18. [Harris R G;Herzog E L;Bruscia E M Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia](#)[外文期刊] 2004(5680)
19. [Alvarez-Dolado M;Pardal R;Garcia-Verdugo J M Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes](#)[外文期刊] 2003(6961)
20. [Terada N;Hamazaki T;Oka M Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion](#)[外文期刊] 2002(6880)
21. [Do J T;Scholer H R Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells](#)[外文期刊] 2004(06)
22. [Zhang F;Pomerantz J H;Sen G Active tissue-specific DNA demethylation conferred by somatic cell nuclei in stable heterokaryons](#) 2007(11)
23. [Tada M;Tada T;Lefebvre L Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells](#)[外文期刊] 1997(21)
24. [Matsumura H;Tada M;Otsuji T Targeted chromosome elimination from ES-somatic hybrid cells](#)[外文期刊] 2007(01)
25. [Cowan C A;Atienza J;Melton D A Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells](#)[外文期刊] 2005(5739)
26. [Vignery A Macrophage fusion:are somatic and cancer cells possible partners](#) 2005(04)
27. [Ogle B M;Cascalho M;Platt J L Biological implications of cell fusion](#)[外文期刊] 2005(07)
28. [Durr M;Harder F;Merkel A Chimaerism and erythroid marker expression after microinjection of human acute myeloid leukaemia cells into murine blastocysts](#)[外文期刊] 2003(57)
29. [Brazelton T R;Rossi F M;Keshet G I From Marrow to Brain:Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice](#) 2000(5497)
30. [Bissell M J;LaBarge M A Context, tissue plasticity, and cancer:are tumor stem cells also regulated by the microenvironment](#) 2005(01)
31. [Wakayama T;Shinkai Y;Tamashiro K L Cloning of mice to six generations](#)[外文期刊] 2000(6802)
32. [陈雯;陈杰;刘红林 哺乳动物胚胎基因组表达起始的调控](#)[期刊论文]-[畜牧与兽医](#) 2003(11)

#### 本文读者也读过(10条)

1. [杨利军. 李煜. YANG Li-jun. LI Yu 无透明带体细胞核移植研究进展](#)[期刊论文]-[中国畜牧兽医](#)2009, 36(3)
2. [刘雪霞. 李建远. LIU Xuexia. LI Jianyuan 哺乳动物体细胞核移植后核重编程研究进展](#)[期刊论文]-[国际生殖健康/计划生育杂志](#)2008, 27(6)
3. [刘辉. 黎江. 刘新垣. 钱其军. Hui Liu. Jiang Li. Xin-Yuan Liu. Qi-Jun Qian 细胞提取物介导的体细胞重编程](#)[期刊论文]-[细胞生物学杂志](#)2008, 30(5)
4. [沈彦军. 杨福合. 杜卫华. 朱化彬. 郝海生. SHEN Yan-jun. YANG Fu-he. DU Wei-hua. ZHU Hua-bin. HAO Hai-sheng 哺乳动物体细胞核移植的DNA甲基化重编程研究进展](#)[期刊论文]-[动物医学进展](#)2009, 30(4)
5. [王凌燕. 张学明. 岳占碰. 李德雪. 李子义. Ling-Yan Wang. Xue-Ming Zhang. Zhan-Peng Yue. De-Xue Li. Zi-Yi Li 细胞核重新编程的研究进展](#)[期刊论文]-[细胞生物学杂志](#)2007, 29(5)
6. [杨正田. 沈伟. 邓继先 体细胞核移植胚胎核重编程的研究进展](#)[期刊论文]-[遗传学报](#)2004, 31(6)

7. 郭淑华. GUO Shu-hua 小鼠体细胞核移植研究进展[期刊论文]-安徽农业科学2008, 36(28)
8. 彭礼繁. 罗光彬. Peng Lifan. Luo Guangbin 供体细胞核在小鼠重构胚胎重编程中的变化[期刊论文]-广东畜牧兽医科技2008, 33(6)
9. 王建. 向舒. 陆凤花. 杨素芳. 石德顺 哺乳动物体细胞核移植后核重编程的研究进展[期刊论文]-安徽农业科学2010(25)
10. 彭佑共 Hela细胞M期促进因子(MPF)的初步纯化及其对未成熟卵母细胞的体外促成熟作用分析[学位论文]2004

#### 引证文献(2条)

1. 彭礼繁. 罗光彬 供体核和受体胞质在核移植重构胚重编程中的研究进展[期刊论文]-中国草食动物 2008(5)
2. WAN Yong-jie. 张艳丽. ZHU Tie-gang. 王锋 体细胞核移植的不完全核重编程与克隆动物的发育异常[期刊论文]-畜牧与兽医 2008(8)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_xmysy200712028.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_xmysy200712028.aspx)