

哺乳动物体细胞核移植后核重编程的研究进展

王建, 向舒, 陆凤花*, 杨素芳, 石德顺* (广西大学动物繁殖研究所, 广西南宁 530005)

摘要 介绍了核移植后核重编程的机制, 并讨论了核移植重编程中 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化对核移植胚胎的影响。

关键词 体细胞核移植; 核重编程; DNA 甲基化; 组蛋白乙酰化

中图分类号 S852.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2010)25-13732-02

Advances in Nuclear Reprogramming of Somatic Cell Nuclear Transfer in Mammal

WANG Jian et al (Animal Reproduction Institute Guangxi University, Nanning Guangxi 530005)

Abstract This review takes the DNA methylation and histone acetylation as emphasis to introduce mainly the precise mechanism of nuclear transfer reprogramming and then discusses the effect of DNA methylation and histone acetylation on nuclear transfer reprogramming.

Key words Somatic cell nuclear transfer; Nuclear reprogramming; DNA methylation; Histone acetylation

随着核移植研究步伐不断加快, 人们在动物克隆研究领域取得了丰硕的成果, 越来越多体细胞克隆动物相继诞生, 证明了高度分化的体细胞在卵母细胞质中经过重编程后, 可以恢复其支持胚胎细胞发育的全能性。截至目前, 体细胞核移植效率还非常低, 孕期流产率高, 胎儿过度生长, 出生死亡率高及发育缺陷等问题严重制约了该项技术在生产和科研领域中的实际应用。如何解决这些问题成为了今后核移植技术发展的关键。越来越多的证据表明, 体细胞核移植效率低下与体细胞在去核卵母细胞质中去分化和重编程不完全有很大关系^[1]。

1 核重编程

核重编程是指高度分化的体细胞核作为核供体, 在移植入卵母细胞后关闭自身的基因表达程序, 并启动胚胎发育所需的基因表达程序, 从而获得全能性发育的过程, 其主要包括 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化、X 染色体失活、印记基因表达和端粒长度恢复等方面。而 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化是核移植胚胎中表观遗传修饰的主要方式。

2 DNA 甲基化

DNA 甲基化是哺乳动物基因组表观遗传修饰的主要方式, 是指在 DNA 甲基转移酶 (DNMT) 的作用下, 将 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 的甲基有选择性地转移到 DNA 分子中的胞嘧啶残基 5' 碳原子上形成 5-甲基胞嘧啶的过程。截至目前, 已经发现的 DNA 甲基转移酶有 3 种, 即 DNMT1、DNMT2 和 DNMT3。其中 DNMT1 的主要作用是识别处于半甲基化状态的 CG 序列, 并在细胞分裂过程中对新合成的 DNA 链进行甲基化和维持其 DNA 的甲基化模式; DNMT2 的生物活性较低, 目前对其具体功能的了解还不清楚; DNMT3 由 DNMT3a 和 DNMT3b 共 2 种酶组成, 属于从头甲基转移酶, 主要作用是建立新的甲基化模式, 对未甲基化 DNA 链进行半甲基化, 进而再全甲基化, 通常出现于甲基化早期并参与细胞生长分

化调控。DNA 甲基化在基因表达调控、基因组印记、分化发育和细胞增殖等方面都起着重要作用^[2]。哺乳动物基因组甲基化是一种动态的表观遗传修饰方式, 其表达水平因细胞种类、细胞分裂周期的不同而有所差异。一般情况下, 哺乳动物体细胞的甲基化程度较高, 而生殖细胞甲基化程度较低, 其中卵子的甲基化程度较精子低。正常受精的胚胎在发育早期, 其基因组 DNA 甲基化水平呈逐渐下降的趋势, 其中雄原核中的父源 DNA 迅速发生主动去甲基化, 随后雌原核中的母源 DNA 也在后续的分裂中缓慢地被主动去甲基化, 当胚胎发育至 8~16 细胞期时, 其 DNA 的甲基化水平降到最低点, 但仍保留一些甲基化区域。囊胚期后, 基因组又重新发生甲基化, 而该过程是受精卵获得发育全能性, 并产生新个体所必需经历的^[3]。目前, 父源 DNA 发生主动去甲基化的机制尚不清楚, 其原因可能与卵母细胞质中的一些调控因子的作用有关, 而母源 DNA 发生的被动去甲基化则可能是由于 DNA 复制过程中甲基化的丢失造成的, 主要通过细胞核中 DNA 甲基化转移酶的清除来实现。

人们在对哺乳动物核移植胚胎的研究中发现, 核移植胚胎发育过程中会出现不同程度的去甲基化不完全以及重新甲基化异常等现象。Dean 等在对体细胞克隆牛的研究中, 采用 5-甲基胞嘧啶免疫荧光抗体法对克隆牛桑椹胚进行检测, 发现其处于分裂中期时的细胞表现为较高的甲基化水平^[4]。Beaujean 等对绵羊成纤维细胞核移植胚胎进行检测时发现, 其 2~8 细胞期的核移植胚胎中染色体的形态特征与供体细胞相似, 并表现过高的甲基化水平^[5]。Kang 等研究表明, 在处于囊胚期的牛核移植胚胎中, 其滋养层细胞甲基化水平明显高于内细胞团^[6]。

研究表明, DNA 甲基化直接影响基因组印记形成和维持。印记基因是指来自父本和母本的等位基因在传递给子代时发生了某种修饰, 其子代只表现出一方的等位基因。人们在对小鼠和人体中印记基因的研究中发现, 大部分基因组印记受同一 DNA 链上的印记控制区位点调控, 而这些位点则是甲基化的直接目标。来自父本和母本的等位基因中, 有一方等位基因的调控区位点会被甲基化, 当这些位点的甲基化模式出现异常则可能导致其印记基因的异常表达, 从而造成克隆动物的失败。Ogawa 等在对克隆小鼠胚胎和胎盘中的印记基因表达情况进行检测时, 发现 *H19* 和 *IGF2* 基因的表达出现异常, 他们利用

基金项目 国家高科技研究发展计划“863”项目 (2007AA100505-2008AA10Z160); 广西科技攻关项目 (桂科转 0718005-3A); 霍英东教育基金 (111034) 资助。

作者简介 王建 (1983-), 男, 河南新乡人, 硕士, 从事动物克隆研究。
* 通讯作者, 石德顺, 研究员, E-mail: andssh@gxu.edu.cn
陆凤花, 研究员, E-mail: lfhgga@163.com

收稿日期 2010-05-18

亚硫酸盐测序法对 *H 19* 和 *IGF2* 基因进行检测, 发现其甲基化状态出现异常^[7]。此后, Kremensky 等又用同样的方法对克隆牛胚胎中的印记基因进行研究, 发现牛胎儿脑中的 *Leptin* 基因出现甲基化异常^[8]。该研究还表明, *Leptin* 基因表达的异常影响了胎儿胎盘的发育和功能, 从而导致了胎儿的发育异常。由于 DNA 甲基化异常所造成的印记基因的异常表达, 在一定程度上也导致了克隆效率的低下和克隆动物发育的异常。目前, 人们主要通过使用一些药物来降低核移植胚胎的 DNA 甲基化水平, 例如 5-氮-2'-脱氧胞苷作为一种胞嘧啶核苷类似物, 可以与 DNA 甲基转移酶结合, 有效降低其活性, 从而达到去甲基化的作用。

3 组蛋白乙酰化

组蛋白是一种碱性蛋白, 主要包含有核心组蛋白 H2a, H2b, H3 和 H4 以及连接组蛋白 H1。核心组蛋白八聚体与连接组蛋白 H1 以及环绕在其周围的一段 DNA 链共同组成了染色体的基本单位——核小体, 其中 H3/H4 富含精氨酸; 连接组蛋白 H1 富含赖氨酸; H2a/H2b 介于二者之间。组蛋白尾端存在有大量的赖氨酸和精氨酸残基, 并伸向核小体外。组蛋白乙酰化是一个可逆过程, 其在组蛋白乙酰基转移酶 (Histone acetylase HAT) 和去乙酰基转移酶 (Histone deacetylase HDAC) 的作用下, 将乙酰辅酶 A 上的乙酰基结合到组蛋白 N 端的赖氨酸残基上去或去除, 实现对基因表达的调控, 一般作用于组蛋白 H3 的 Lys9, Lys14, Lys18, Lys23 和 H4 的 Lys5, Lys8, Lys12, Lys16 位点。乙酰基在组蛋白 HAT 的作用下与这些赖氨酸残基位点相结合, 以中和组蛋白所带正电荷, 降低其与 DNA 链的亲合性, 干扰染色质的稳定结构, 有效防止染色体的折叠, 使转录核小体处于开放状态, 并且刺激 RNA 聚合酶催化转录。HAT 通过影响染色质结构来增加转录活性, 而 HDAC 作用下的去乙酰化过程也可能与基因转录的激活有关, 二者可能分别促进一些特定的转录因子形成转录复合物, 从而激活或抑制基因转录^[9]。因此, 组蛋白的乙酰化和去乙酰化与染色质的结构、基因的表达有着密切的联系。Santos 等对克隆牛胚胎中的组蛋白 H3K9 位赖氨酸乙酰化水平进行检测时, 发现其较正常胚胎高, 并且其 DNA 的甲基化水平也偏高^[10]。在哺乳动物的胚胎中, DNA 的甲基化和组蛋白的乙酰化存在联系。Enright 等在对供体核组蛋白乙酰化水平的研究中发现, 细胞类型、周期及处理方法的差异是影响供体细胞组蛋白乙酰化水平的主要因素^[11]。Wee 等在对体细胞克隆牛胚胎中组蛋白 H4K5 位赖氨酸进行检测时发现, 其赖氨酸残基位点的乙酰化出现异常^[12]。而人们在对死亡的体细胞克隆牛内脏器官中的 *PCAF* 基因进行检测分析时, 发现其表达异常, 而该基因作为激活因子与乙酰基转移酶的活性关系密切。因此, 推测 *PCAF* 基因的表达异常导致了组蛋白乙酰化水平的异常, 并最终造成克隆动物的死亡^[13]。

人们在对核移植重构胚的组蛋白修饰的研究中发现, 曲古抑菌素 A (Trichostatin A, TSA) 是一种去乙酰化抑制剂, 可以用来提高组蛋白的乙酰化水平, 可以与 HDAC 相互作用, 从而抑制其对组蛋白的去乙酰化作用, 使染色体结构松弛, 以达到结合转录因子和增强基因表达的作用。Enright 等

TSA 和 DNA 甲基化转移酶抑制剂 (5-azac) 对供体细胞进行处理, 以提高供体核中组蛋白的乙酰化水平, 并降低供体核的 DNA 甲基化水平, 其结果发现供体核的组蛋白的乙酰化水平升高, 并且核移植胚胎的囊胚发育率也得到了有效提高^[14]。Sh 等则选用另一种组蛋白去乙酰化抑制剂——丁酸钠 (NaBu) 来对供体细胞进行处理, 并得出了同样的结果^[15]。在体细胞克隆中, 对组蛋白乙酰化的研究还较少, 如何更加有效的提高体细胞克隆胚胎中组蛋白乙酰化水平, 促进供体细胞的重编程还有待于人们进行更深一步的探索。

4 结语

目前, 克隆技术已经广泛应用于农业、生物技术及医学等多个领域, 但核移植效率低下却一直制约其发展的瓶颈。随着人们对核移植重编程研究的不断深入, 核移植效率低下这一问题也终将得到解决, 而核移植技术也将在多个领域中发挥其更大的作用。

参考文献

- [1] DANIELS R, HALL V, TROUNSON A O. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulose cell nuclei [J]. *Biol Reprod* 2006 3(4): 1034-1040
- [2] HERMAN J G, BAYLIN S B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation [J]. *N Engl J Med* 2003 349: 2042-2054
- [3] SANTOS F, DEAN W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals [J]. *Reproduction* 2004 127(6): 1643-1651
- [4] DEAN W, SANTOS F, STOKOVIC M, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13734-13738
- [5] BEAUJOURN N, TAYLOR J, GARDEN J, et al. Effect of limited DNA methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer [J]. *Biol Reprod* 2004 71: 185-193
- [6] KANG Y K, PARK J S, KOO D B, et al. Limited demethylation leaves mosaic type methylation states in cloned bovine preimplantation embryos [J]. *EMBO J* 2002 21(5): 1092-1100
- [7] OGAWA H, HON Y, SHIMOZAWA N, et al. Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells [J]. *Reproduction* 2003 126(4): 549-557
- [8] KREMENSKOY M, KREMENSKAYA Y, SUZUKI M, et al. Epigenetic characterization of the CpG islands of bovine *Leptin* and *POU5F1* genes in cloned bovine fetuses [J]. *Reprod Dev*, 2006 52(2): 277-285
- [9] VIDAL M, GABER R F. RFD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Cell Biol* 1991 11: 6317-6327
- [10] SANTOS F, WOLF E, DEAN W, et al. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos [J]. *Curr Biol* 2003 13: 1116-1121
- [11] ENRIGHT B P, JEONG B S, YANG X, et al. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation [J]. *Biol Reprod* 2003 69: 1525-1530
- [12] WEE G, KOO D B, SONG B S, et al. Inheritable histone H4 acetylation of somatic chromatin in cloned embryos [J]. *Biol Chem*, 2006 281(9): 6048-6057
- [13] SUTTEEVUN T, PARNPAPIR, SMITH S L, et al. Epigenetic characteristics of cloned and in vitro fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos [J]. *J Anim Sci* 2006 84(8): 2065-2071
- [14] ENRIGHT B P, KUBOTA C, YANG X, et al. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-azac-2'-deoxycytidine [J]. *Biol Reprod* 2003 69: 896-901
- [15] SHI W, HOEFLICH A, FIASCHINKE H, et al. Induction of a senescent-like phenotype does not confer the ability of bovine immortal cells to support the development of nuclear transfer embryos [J]. *Biol Reprod* 2003 69: 301-309
- [16] 淡新刚, 史远刚. 小鼠卵母细胞去核方法的初步研究 [J]. *安徽农业科学*, 2007 35(32): 73-75
- [17] 李晓霞, 刁云飞, 李钟淑, 等. 不同融合液对延边黄牛体细胞核移植效率的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2008 36(4): 183-185