

供核细胞及处理方式对绵羊核移植效率的影响

汪立芹^{1 2}, 王 静^{1 2 3}, 赵云程^{1 2}, 林嘉鹏^{1 2}, 黄俊成^{1 2}

(1. 新疆动物生物技术重点开放实验室 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 农业部草食家畜繁育生物技术重点开放实验室 新疆 乌鲁木齐 830000; 3. 新疆农业大学 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: 旨在研究羔羊、胎儿成纤维细胞、绵羊类胚胎干细胞及处理方式对核移植效率的影响。比较了羔羊皮肤成纤维细胞饥饿及消化后平衡时间对细胞可用率的影响; 胎儿成纤维细胞饥饿及消化后平衡时间对细胞可用率的影响; 羔羊成纤维细胞、胎儿成纤维细胞、类胚胎干细胞在可用率及对融合率的差异和类胚胎干细胞与转基因羔羊皮肤成纤维细胞对核移植效率的影响。结果表明, 饥饿对胎儿成纤维细胞可用率影响不大($P > 0.05$), 但平衡时间影响极大($P < 0.01$); 饥饿及平衡时间对胎儿成纤维细胞影响都很显著($P < 0.01$); 胎儿成纤维细胞的可用率极显著高于类胚胎干细胞和羔羊皮肤成纤维细胞($P < 0.01$), 融合率显著高于羔羊($P < 0.05$), 但与类胚胎干细胞间没有差异($P > 0.05$); 胚胎移植后, 类胚胎干细胞的怀孕率显著高于羔羊皮肤成纤维细胞($P < 0.05$)。饥饿和平衡时间对供核细胞的可用率有显著影响, 类胚胎干细胞的核移植效果好于成纤维细胞。

关键词: 核移植; 成纤维细胞; 类胚胎干细胞; 饥饿; 平衡时间

中图分类号: S858.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)增刊-0069-05

Effect of Donor Cells and Processing on the Efficiency of Sheep Nuclear Transfer

WANG Li-qin^{1 2}, WANG Jing^{1 2 3}, ZHAO Yun-cheng^{1 2}, LIN Jia-peng^{1 2}, HUANG Jun-cheng^{1 2}

(1. Key Laboratory of Animal Biotechnology of Xinjiang, Urumqi 830000, China; 2. Key Laboratory of Livestock Reproduction & Breed Biotechnology, Ministry of Agriculture, Urumqi 830000, China; 3. Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China)

Abstract: Study of lamb fibroblast, fetal fibroblast, embryonic stem cells and treatment methods on the efficiency of nuclear transplantation effect. Compared the lamb skin fibroblasts hunger and balance time on the cell availability effect; Compared the fetal fibroblast starvation and balance time on the cell availability effect; Compared the lamb fibroblasts, fetal fibroblast, embryonic stem cells in the availability and the fusion rate; Compared the embryonic stem cells and transgenic lambs skin fibroblast on the efficiency of nuclear transfer. The result indicated starvation on the availability rate of fetal fibroblast have little effect ($P > 0.05$); But have great impact on the balance time ($P < 0.01$); The effect of hunger and balance time on fetal fibroblasts were very significant ($P < 0.01$); Fetal fibroblast cell availability was significantly higher than those of embryonic stem cells and lamb skin fibroblasts ($P < 0.01$), The fusion rate is significantly higher than that of the lamb ($P < 0.05$), but have no difference on embryonic stem cells ($P > 0.05$). After embryo transfer, embryonic stem cells in pregnancy rates were significantly higher than that of sheep skin fibroblasts ($P < 0.05$). Hunger and balancing time for donor cells have significant impact on availability. The effect of embryonic stem cell nuclear transfer is better than fibroblasts.

Key words: Nuclear transfer; Fibroblast cell; Embryonic stem cell; Starvation; Balance time

1997年,首只克隆羊Dolly的诞生^[1],为生物技术开辟了新的领域,继而牛^[2]、小鼠^[3]、山羊^[4]等克

隆动物相继出生。核移植技术已成为保种、拯救濒危动物、转基因等研究的重要手段之一,但核移

收稿日期: 2012-09-12

基金项目: 新疆自治区科技计划项目(200711104; 200841122); 国家转基因重大专项(011ZX08008-003)

作者简介: 汪立芹(1981-),女,江苏灌南人,助理研究员,研究生,主要从事动物卵母细胞及胚胎发育研究。

通讯作者: 黄俊成(1968-),男,新疆乌鲁木齐人,研究员,博士,主要从事动物生殖与发育研究。

植效率仍然很低,且成本高昂,因此,如何提高核移植效率成为科学家们研究的热点,他们主要从供体细胞种类、受体细胞及操作系统等方面进行研究,但很少有关于细胞处理方式对可用率影响的研究。本试验着重研究了血清饥饿、平衡时间对羔羊皮肤成纤维细胞、胎儿成纤维细胞及绵羊类胚胎干细胞可用率、融合率及核移植效率的影响,为提高绵羊核移植效率奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 供体成纤维细胞的准备

1.1.1 羔羊皮肤成纤维细胞的培养 试验用羔羊来源于新疆瑞普达农牧科技有限公司,根据章美玲等^[5]介绍的方法,剪取小块耳皮肤组织,用组织块培养法进行原代培养,然后进行传代、纯化培养 2~3 代用于试验。饥饿组培养液为添加 0.5% 胎牛血清(FBS)的 DMEM,饥饿 3 d,未饥饿组 FBS 的浓度为 10%,根据试验设计消化后,细胞用 NICON NIS-Elements 成像系统照相、分析可用成纤维细胞数。

1.1.2 胎儿成纤维细胞的培养 将怀孕 45 日龄的流产胎儿从子宫内剥离,放于含 200 IU/mL 青霉素和 200 μ g/mL 链霉素的 Hanks 液内带回实验室,用消化法进行原代细胞培养,再进行纯化、传代培养,2~3 代成纤维细胞用于试验。

1.1.3 绵羊类胚胎干细胞的培养 将屠宰场获取卵巢的卵母细胞,用特克赛尔公羊精液进行体外受精,得到的囊胚根据 YUNCHENG ZHAO^[6]介绍的方法,建立绵羊体外培养囊胚类胚胎干细胞系,根据试验设计进行消化、平衡处理。

1.2 卵母细胞的准备

1.2.1 卵母细胞的获取 本试验所用卵巢皆取自乌鲁木齐市华凌屠宰场,从半小时内宰杀的绵羊体内剪下卵巢,立即放入温度为 37℃ 左右的加有青霉素(1 000 U/mL)和链霉素(1 000 U/mL)的 DPBS 中,在 3 h 内运回实验室。卵巢用 DPBS 清洗 3 次,用连有 12 G 针头的 10 mL 注射器从卵巢表面直径为 2~6 mm 的卵泡中抽取卵母细胞^[7],吸卵前在注射器中预先抽入 1 mL 吸卵液,在显微镜下挑选出含有完整卵丘细胞层、胞质均匀的卵母细胞,用于体外成熟(IVM)。

本试验所用试剂除特别注明外,皆购自 Sigma 公司。

吸卵液成份为:TCM199-hepes + 1 mg/mL 聚乙烯醇 + 0.7 mg/mL 肝素钠(中国)。

1.2.2 卵母细胞的体外成熟 选出的卵母细胞用

吸卵液和成熟液各洗 2 次,按 25~35 枚/滴的密度将卵母细胞放入 75 μ L 成熟液滴中,置于 38.6℃、5% CO₂、饱和湿度的 CO₂ 培养箱内成熟培养 18 h,在 0.1% 透明质酸酶内用玻璃管反复吹吸,将颗粒细胞全部脱除,排出第一极体的卵母细胞用于试验。

成熟液成分为:TCM199(HCO₃ + 10% 胎牛血清(GIBCO) + 0.05 IU/mL 促卵泡生成素 + 0.05 U/mL 促黄体生成素 + 1 μ g/mL 雌激素 + 24.2 mg/L 丙酮酸钠 + 100 U/mL 青霉素 + 100 U/mL 链霉素。

1.3 重构胚的构建

采用盲吸法将卵母细胞去核,用吊尖的显微注射针把单个供核细胞移至卵周隙内,采取电融合方法将供体细胞与卵母细胞质融合,再用化学方法进行激活^[8]。

1.4 体外培养

将激活好的胚胎置于 4 孔培养板的体外培养液内(SOF + 3 mg/mL BSA),在 5% CO₂、5% O₂、N₂ 为平衡气、饱和湿度的气象环境中培养 48 h,统计卵裂率;或者培养 12 h 后直接移植至同时期发情的受体输卵管内。

1.5 数据统计

采用 SPSS 11.0 统计软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 羔羊皮肤成纤维细胞饥饿及平衡时间对细胞可利用率的影响

经统计分析得出,饥饿对羔羊耳皮肤成纤维细胞的可用率没有显著影响,但平衡时间对可用率影响显著(图 1)。细胞消化后未经平衡,直接使用的可用率极显著低于平衡 20~40 min 组($P < 0.01$),而平衡 20 min 与 40 min 间没有差异($P > 0.05$),在平衡 0~40 min 之间,随着平衡时间的延长,细胞可用率有逐渐升高的趋势(表 1),因而,在核移植试验中,用羔羊皮肤成纤维细胞作为供核细胞,消化后平衡处理能提高可用细胞比例,而饥饿不能提供细胞可用率。

2.2 胎儿成纤维细胞饥饿及平衡时间对细胞可利用率的影响

从表 2 中可以看出,不仅平衡时间能极显著影响胎儿成纤维细胞可用率($P < 0.01$),饥饿 1~2 d 能显著降低其可利用率($P < 0.05$) (图 2),综合两方面因素,对于胎儿成纤维细胞而言,不进行饥饿,消化后平衡 20 min 细胞状态最好。

表 1 羔羊皮肤成纤维细胞饥饿及平衡时间对细胞可利用率的影响

Tab.1 Lamb skin fibroblasts hunger and balance time on cell availability effect

饥饿时间/d Starving time	平衡时间/min Balance time	细胞数/个 N.	可用细胞数/个 N.	可用率/% Available rate
0	0	300	30	10.19 ± 1.72A
	20	363	95	25.90 ± 3.46B
	40	274	90	31.99 ± 8.07BC
1	0	186	21	11.42 ± 1.97A
	20	218	77	35.41 ± 4.2BC
	40	198	80	40.73 ± 5.12C
2	0	131	7	5.86 ± 2.17A
	20	89	27	29.82 ± 8.34BC
	40	159	63	33.31 ± 1.39BC

注: 同列不同大写字母差异极显著($P < 0.01$)。
Note: Different capital letters in same column differ significantly ($P < 0.01$).

表 2 胎儿成纤维细胞饥饿及平衡时间对细胞可利用率的影响

Tab.2 Fetal fibroblast cell starvation and balance time on cell availability effect

饥饿时间/d Starving time	平衡时间/min Balance time	细胞数/个 N.	可用细胞/个 N.	可用率/% Available rate
0	0	79	18	20.85 ± 6.66AB
	20	77	38	49.02 ± 1.7C
	40	52	17	32.68 ± 8.42BC**
1	0	85	6	7.12 ± 3.18A
	20	104	20	19.16 ± 5.42AB
	40	96	28	20.20 ± 14.9AB*
2	0	217	10	5.25 ± 4.08A
	20	102	24	23.59 ± 3.19B
	40	107	33	25.55 ± 9.95B*

注: 同列不同大写字母差异极显著($P < 0.01$); * . 表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: Different capital letters in same column differ significantly ($P < 0.01$); * . Show significant difference ($P < 0.05$).

2.3 绵羊类胚胎干细胞与成纤维细胞对可用率、融合率影响的比较

类胚胎干细胞与成纤维细胞对可用率、融合率影响的结果如表 3 所示,干细胞的可用率显著低于未经饥饿处理的、平衡 20 min 的胎儿成纤维细胞

的可用率($P < 0.01$),但与羔羊皮肤成纤维细胞间差异不显著($P > 0.05$),干细胞的融合率与胎儿和羔羊成纤维细胞的融合率间差异不显著,但胎儿成纤维细胞的融合率要显著高于羔羊($P < 0.05$) (图 3 4)。

表 3 不同种供核细胞对可用率、融合率的影响

Tab.3 The effect of different donor cells on the available rate and fusion rate

组别 Groups	可用率/% Available rate	重构胚数 Number of reconstructed embryos	融合胚数 Number of fused embryos	融合率/% Fusion rate
类胚胎干细胞 Embryonicstem cells	28.31 ± 5.17A	1 470	1 008	68.61 ± 7.04ab
羔羊成纤维细胞 Lamp Fibroblast	25.90 ± 3.46A	1 575	1 010	64.55 ± 9.74a
胎儿成纤维细胞 Fetal fibroblast	49.02 ± 1.7B	795	580	73.36 ± 5.66b

注: 不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$); 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: Different capital letters in same column differ significantly ($P < 0.01$); Columns with different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

2.4 绵羊类胚胎干细胞及转基因羔羊皮肤成纤维细胞对核移植效率的比较

将分别以绵羊类胚胎干细胞和转基因羔羊皮肤成纤维细胞作为供核细胞的重构胚移植至受体,试情 8 d 移植后 2.5 ~ 3 月进行 B 超检查,类胚胎干细

胞的怀孕率为 39.47%,极显著高于转基因羔羊的怀孕率 22.73%($P < 0.01$),但后期流产都很严重,怀孕 157 d 未生产的,进行破腹产处理,共有类胚胎干细胞克隆后代 7 只,转基因羔羊克隆后代 6 只出生,结果见表 4。

表4 类胚胎干细胞及转基因羔羊皮肤成纤维细胞对核移植效率的比较

Tab.4 Embryonic stem cells and transgenic sheep skin fibroblasts on the efficiency of nuclear transfer comparison

组别 Groups	移植受体数/只 Recipient	2 情期末 返情数/只 No estrus	2 情期末 返情率/% No estrus rate	B 超检测 妊娠受体数/只 B - test	妊娠率/% Pregnancy rate	分娩母羊/只 Number of delivery	产羔率/% Delivery rate
类胚胎干细胞 Embryonic stem cells	127	50	39.37A	16	12.6A	7	5.51
转基因羔羊皮肤成纤维细胞 Transgenic sheep skin fibroblasts	176	40	22.73B	13	7.38B	6	3.41

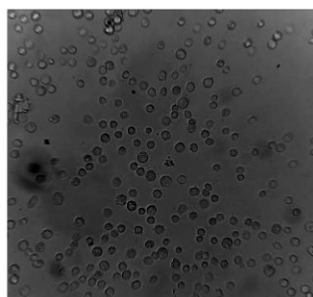
注: 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。Note: Different capital letters in same column differ significantly ($P < 0.01$).

图1 绵羊皮肤成纤维细胞消化后平衡 0 min (200 ×)

Fig.1 Sheep skin fibroblasts after digestion balance 0 min(200 ×)

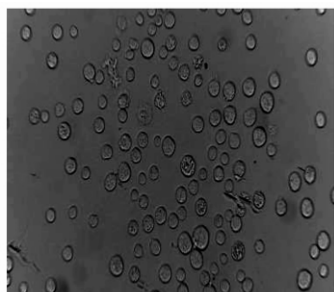


图2 胎儿成纤维细胞消化后平衡 0 min(200 ×)

Fig.2 Fetal fibroblasts after digestion balance 0 min(200 ×)

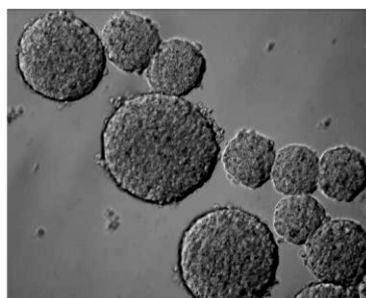


图3 绵羊类胚胎干细胞集落(200 ×)

Fig.3 Sheep embryonic stem cell colony (200 ×)

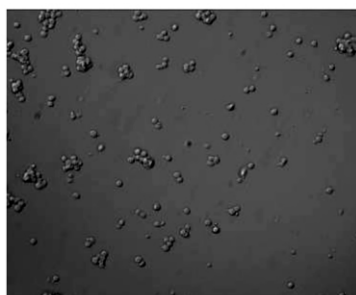


图4 消化后的绵羊类胚胎干细胞(200 ×)

Fig.4 After digestion in sheep embryonic stem cells(200 ×)

3 讨论

供体细胞形态是影响融合率的主要因素之一。根据潘登科等^[9]对猪体细胞克隆的研究得出,圆形光滑供体细胞的融合率要显著高于表面粗糙的供体细胞,因而,在核移植中通常选择表面光滑的圆形细胞作为供体。同时,供体细胞不仅影响重构胚的倍性、核的重编程、重构胚的发育,还影响着移植后代的生长情况。在各种动物的核移植试验中大多使用G0/G1期的细胞作为供体,认为处于静止期的细胞染色体在卵母细胞中更容易发生重编程^[1,10]。诱导细胞处于G0期的方法之一是血清饥饿方法。Wilmut等即是用该方法获得了克隆羊“Dolly”。然而,本试验研究了饥饿和平衡时间对羔羊皮肤成纤维细胞形态的影响发现,饥饿不影响细胞可用率,而平衡时间却能显著改善细胞形态,并且有随着平衡时间的延长,可用率增加的趋势,分析原因,可能是生长平铺于细胞培养瓶的细胞被酶消化时,需要将梭状的细胞触角收缩变为圆形,而刚收缩的细胞表面仍不光滑,需要一定时间修复。因而,当平衡后,表面光滑的细胞比例逐渐提高。然而在研究胎儿成纤维细胞时发现,血清饥饿和平衡时间都能显著影响细胞可用率,以不饥饿、平衡20 min组的细胞形态最好,与羔羊成纤维细胞的结果不一致,可见对于不同发育阶段的绵羊成纤维细胞应选择不同的处理方式。而且Lai等^[11]选择G2/M期的细胞作为供核细胞,获得了体细胞克隆猪。

而在研究绵羊类胚胎干细胞、羔羊皮肤成纤维细胞及胎儿成纤维细胞未经饥饿处理对细胞形态及融合率影响时发现,绵羊类胚胎干细胞的可用率与羔羊之间没有差异,但显著低于胎儿成纤维细胞,融合率与二者皆没有显著差异,胎儿成纤维细胞的融合率高于羔羊。Lee等^[12]比较成年猪体细胞和胎儿成纤维细胞对核移植的影响,得到的结果显示,胎儿成纤维细胞效果最好,与本研究结果一致。但干细胞处理方式对融合率、核移植效率影响的研究还未见报道。消化后的单个绵羊类胚胎干细胞形态与

成纤维细胞相似,接近圆形,作为核移植的核供体的选择标准也与成纤维细胞一样,只有大小在 20 μm 左右、表面光滑、折光度好的细胞才能用于核移植供体,且融合率与成纤维细胞间没有差异。

本研究使用绵羊类胚胎干细胞和转基因羔羊的皮肤成纤维细胞作为供核细胞,移植后按常规试情,2 个情期末返情率及 3 个月 B 超检测受胎率,绵羊类胚胎干细胞皆显著高于转基因羔羊成纤维细胞,但最终仅获得存活 7 只类胚胎干细胞和 6 只转基因羔羊成纤维细胞克隆后代,产羔率分别为 5.51% 和 3.41%,与其他克隆动物的流产率相当,可见,胚胎干细胞可作为核供体进行核移植,为核移植提供了一种新的途径。

参考文献:

- [1] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J *et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. *Nature*, 1997, 385: 810 – 813.
- [2] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J *et al.* Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts[J]. *Science*, 1998, 280: 1256 – 1258.
- [3] Wakayama T, Perry A C, Zuccotti M *et al.* Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. *Nature*, 1998, 394: 369 – 374.
- [4] Baguisi A, Behboodi E, Melican D T *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer[J]. *Nature Biotechnol*, 1999, 17: 456 – 461.
- [5] 章美玲,张运海,陶 勇. 供体细胞和曲古抑菌素 (TSA) 对奶牛克隆胚胎发育的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(4): 597 – 60.
- [6] Yuncheng Zhao, Jiapeng Lin, Liqin Wang *et al.* Derivation and Characterization of Ovine Embryonic Stem-Like Cell Lines in Semi-defined Medium Without Feeder Cells[J]. *J Exp Zool*, 2011, 315: 639 – 648.
- [7] Pujol M, Lopez-Béjar M, Paramio M. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test[J]. *Theriogenology*, 2004, 61: 735 – 744.
- [8] Nisar A W, Wernery U, Hassan F A H *et al.* Production of the First Cloned Camel by Somatic Cell Nuclear Transfer[J]. *Biology of Reproduction*, 2010, 82: 373 – 379.
- [9] 潘登科,张运海,孙秀柱,等. 供体细胞对猪体细胞克隆胚胎早期发育的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(4): 331 – 336.
- [10] Campbell K H, McWhir J, Ritchie W A *et al.* Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line[J]. *Nature*, 1996, 380: 64 – 66.
- [11] Lai L, Tao T, Machaty Z *et al.* Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G2/M-stage fetal fibroblasts as donors[J]. *Biol Reprod*, 2001, 65(5): 1558 – 1564.
- [12] Lee G S, Hyun S H, Kim H S *et al.* Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer techniques by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations[J]. *Theriogenology*, 2003, 59: 194 – 195.