

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00433

鱼类核移植与重编程

王学耕¹, 朱作言¹, 孙永华², 赵珏¹

1. 北京大学生命科学学院, 北京 100871;

2. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

摘要: 鱼类核移植是动物克隆研究的一个重要领域, 我国学者在上世纪 60 年代首创了鱼类的核移植研究。以斑马鱼为模式动物, 进行核移植与再程序化研究具有独特的优势。文章总结了鱼类细胞核移植研究的历史、斑马鱼核移植研究概况、以及影响核移植胚胎发育的因素, 特别是核移植胚胎基因组的表观遗传修饰, 如基因组 DNA 甲基化及组蛋白乙酰化和甲基化等的研究, 将有助于完善克隆技术并提高克隆的成功率, 推动克隆技术的广泛开展和应用。

关键词: 核移植; 斑马鱼; 再程序化; 表观遗传修饰

Nuclear transfer and reprogramming in fish

WANG Xue-Geng¹, ZHU Zuo-Yan¹, SUN Yong-Hua², ZHAO Jue¹

1. College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

2. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Abstract: As an important sub-field in the study of animal cloning, fish nuclear transfer was first established in the early 1960s by Chinese embryologists. Due to its advantages, zebrafish has become a unique animal model to study the mystery of reprogramming in nuclear transfer. This article summarizes the history and current situation in fish nuclear transfer technology and discusses the factors that may influence the development of the cloned embryos. A comprehensive understanding of the mechanism for epigenetic modification following nuclear transfer, such as genomic DNA methylation and histone acetylation and/or methylation, will likely increase the success rate and eventually lead to the future freedom of cloning technique.

Keywords: nuclear transfer; zebrafish; reprogramming; epigenetic modification

核移植(Nuclear transfer)是应用显微操作技术, 将供体细胞核移入去除细胞核的未受精卵细胞中, 使融合卵不经过受精过程而分裂并发育成胚胎乃至

成体的技术。这是一种用人工非有性生殖方式完成的繁殖和发育过程。现代意义上的核移植概念最早由德国胚胎学家 Hans Spemann 提出, 并在两栖动

收稿日期: 2012-06-18; 修回日期: 2012-09-12

基金项目: 斑马鱼细胞核移植发育再程序化研究项目(编号: 30950001)资助

作者简介: 王学耕, 学士, 研究方向: 发育生物学。E-mail: wangxuegeng@pku.edu.cn

通讯作者: 赵珏, 副研究员, 博士, 研究方向: 发育生物学。E-mail: zhaojue@pku.edu.cn

网络出版时间: 2012-11-21 9:35:38

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121121.0935.004.html>

物中首次进行了尝试^[11]。核移植首先在两栖类中获得成功, 1952 年 Briggs 和 King 将蛙的囊胚期细胞核注射到去核的受体卵细胞, 其融合胚胎可发育到成体, 而其形态特征与核供体相似^[12]。我国杰出的发育生物学家童第周, 在 20 世纪 60 年代初成功完成了世界上首例鱼类细胞核移植^[3]。后来, 核移植陆续在许多其他物种上获得成功, 证明了分化细胞的核能够通过再程序化(Reprogramming)回复到全能状态, 并具有发育成为动物个体的潜能。鱼类产卵数量多, 卵的体积又大, 且进行体外受精和体外发育, 胚胎操作较哺乳类简单, 因此是研究细胞核移植的极好材料。细胞核移植技术后来也被称为克隆技术, 1997 年 Wilmut 等^[4]运用此项技术成功克隆了 Dolly 羊。

传统鱼类核移植主要包括以下几个步骤。首先, 受体卵的获取, 在鱼类核移植过程中, 一般通过人工挤卵的方式获得未受精卵, 再用蛋白酶处理或手工剥膜的方式去除卵膜, 得到完整的未受精卵。然后, 需要将受体卵的雌原核去除, 去核的方式有多种, 如吸核、挑核、X-射线和激光等。第三, 供体细胞的获取根据其来源有多种不同的方式, 如果是体细胞, 需要用胰酶和分离液处理, 使细胞分散开; 如果是囊胚细胞, 只需在细胞培养基中轻轻吹打即可分离; 如果是培养细胞, 可以直接用作供体。第四, 供体核的植入, 用一支内径略小于核供体细胞直径但大于细胞核直径的针, 将核供体细胞吸入针内, 这个过程中细胞膜会被挤破, 但保留了核的完整性, 然后将核供体细胞核植入到去核卵细胞细胞质中心的部位。最后, 融合胚胎置于适宜的条件下培养。如图 1 所示。

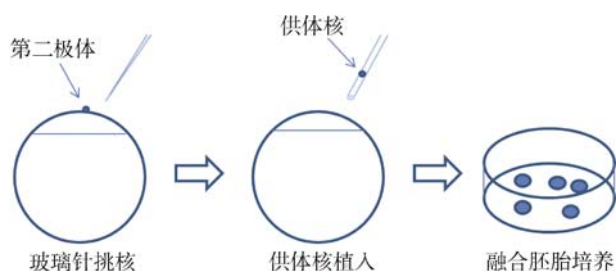


图 1 鱼类细胞核移植过程

1 鱼类细胞核移植研究的历史

童第周等^[3]以金鱼(*Carassius auratus*)和中华鲢(*Rhodeus sinensis* Gunther)为材料分别进行的同种

核移植的成功, 首次证明了发育到囊胚中期的硬骨鱼类细胞核与两栖类一样, 具有指导核移植卵发育成胚胎及个体的全能性。他们又以这两种鱼为材料进行种间核移植实验, 即将金鱼囊胚细胞核移植到中华鲢去核卵中或相反, 并与金鱼和中华鲢人工受精的杂交胚胎进行对比, 研究了一半染色体来源于异种、一半来源于同种的杂交细胞核与染色体完全来源于异种的纯异种细胞核在同一卵质环境中发育功能上的差异, 以及细胞质对细胞核的影响^[5]。他们发现, 无论是在形态上还是在生理上, 种间核移植胚胎的发育都在某种程度上与种间有性杂交的胚胎相似。吴尚懃等^[6]依据童第周等建立的方法, 在 3 种不同品系的金鱼(红龙睛、红鲫鱼和蛋鱼)之间, 采用多代连续移植的方法, 进行了核质融合实验。结果显示, 经过连续多代细胞核移植, 卵细胞质对核移植胚胎发育的影响具有一定的积累效应。这些实验提示, 卵细胞质在鱼类胚胎发育和表型决定方面具有比人们预想的更重要的作用。上述实验是运用核移植的独特优势来研究合子细胞核与卵细胞质之间相互作用的典型工作, 这些实验同时证明种间核移植鱼的性状决定不完全由供体细胞核控制, 受体卵细胞质也有它的重要作用, 核移植融合胚胎发育的关键在于核质间的相互作用。随着研究的深入, 人们发现在不同种属之间的核移植, 其难度相对于同种核移植要大得多。在以鲤鱼(*Cyprinus carpio*)囊胚细胞为供体、鲫鱼(*Carassius auratus*)去核卵为受体所得到的鲤鲫核质杂种鱼中, 脊椎骨数目与受体鲫鱼相近, 表现出细胞质环境影响的性质, 口须和咽喉齿类似于供体鲤鱼, 侧线鳞片数目则介于两者之间^[7]。无独有偶, 我们通过以转基因鲤鱼细胞核为供体, 金鱼去核卵为受体进行克隆鱼实验, 揭示了属间克隆鱼的双重遗传来源, 即核基因组来源于供体鲤鱼, 来源于供体鲤鱼的线粒体基因组随着克隆胚的发育进程逐渐消失, 成体克隆鱼的线粒体基因组仅来源于受体金鱼; 同时揭示了来源于金鱼的受体卵质控制着克隆胚的体节发育进程, 进而影响到克隆鱼的椎骨数目^[8]。这些实验表明, 受体卵质对种间克隆胚早期发育的图式形成具有重要影响, 而且这种影响可以一直持续作用于克隆鱼个体发育的性状决定。但是, 鲫鱼细胞核与鲤鱼细胞质配合的核质杂种鱼的口须、咽喉齿、椎骨数目和侧线鳞片数目

均类似于细胞核供体鲫鱼^[9]。这些结果表明, 在核移植胚胎的发育过程中, 受体卵质虽然可以影响到克隆鱼的某些性状, 但子代性状的决定最终取决于供体细胞的核基因组与受体卵质之间的相互作用。不同种属的鱼, 受体卵质对供体细胞核的影响不尽相同, 核质杂交胚胎的发育能力也有差异。

陈宏溪等^[10]采用连续核移植的方法, 以短期培养的三倍体鲫鱼肾细胞作为供体, 二倍体鲫鱼的去核卵为受体, 进行细胞核移植, 获得了可育的体细胞克隆鱼, 第一次证明了鱼类分化的体细胞核仍然具有遗传和发育的全能性。张念慈等^[11]后来报道了用草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 体外培养细胞做供体的属间、亚种间核移植实验。这些结果以及 Lee 等^[12]在斑马鱼 (*Danio rerio*) 上的工作, 表明在体外经过短期或长期培养鱼类体细胞, 仍保持有完整的遗传信息和发育全能性, 可以用于核移植供体指导克隆胚胎的发育。以培养细胞做核移植供体, 对保存稀有濒危物种及发展育种技术具有重要意义。一方面, 通过细胞培养可以长期保存稀有物种的全基因组, 从而为大量人工繁殖提供供体; 另一方面, 在细胞培养过程中, 可以采用基因工程手段, 对供体进行有目的的改造, 从而得到更加优良的动物个体。

2 斑马鱼核移植研究概况

斑马鱼相对于其他动物种类来说, 是研究细胞核移植的极好材料, 因为它们形体小、生长发育快、产卵量大而便于获得受体卵, 使大样本量的移植操作和研究成为可能。另外, 其卵子直径较大, 便于核移植操作, 且其体外发育胚胎透明易于后期观察。更重要的是斑马鱼的遗传背景清晰, 基因组测序接近完成。其胚胎发育机制也有了较为深入的研究, 已经建立了一套成熟的过表达和基因敲落 (Knock down) 技术, 便于我们对可能的目标基因在胚胎水平进行有目的的表达调控, 从而研究目标基因参与再程序化过程的可能机制。因此, 虽然斑马鱼的进化程度不及鼠等哺乳动物, 但它具有许多功能相似的哺乳动物的同源基因, 所以它仍然是一种研究细胞核移植及再程序化调控机制的理想模型。

2000 年李荔等^[13]首次尝试了斑马鱼的细胞核移植, 将囊胚期细胞直接移植到未去核的未受精卵

中, 并获得了经过染色体数量鉴定的二倍体克隆斑马鱼幼鱼。2002 年李荔等^[14]又将斑马鱼头肾细胞和尾鳍细胞经原代培养后移入同种具核未受精卵中, 获得了发育至尾芽期和肌肉感应期的经 DNA 含量测定证实的二倍体胚胎。但是在 2011 年, Hattori 等^[15]用具有不同体色的斑马鱼品系重复了李荔等 2000 年的核移植实验, 经过流式细胞仪和分子标记检测证实, 所得到的核移植胚胎大部分是三倍体, 只有少数是二倍体、四倍体和嵌合体。这进一步说明了供体核和受体卵核在融合胚胎发育过程中经历了复杂的重构过程, 产生的克隆鱼染色体倍性有很大随机性。因此去除受体卵中的雌原核, 仍然是斑马鱼核移植操作中的必要步骤。此外, 四倍体克隆鱼的获得, 也提示我们用未去核卵子做受体的核移植技术有可能在鱼类多倍体育种方面起到一定作用。

2001 年, 我们开展了不同品系间斑马鱼的细胞核移植, 以囊胚细胞做供体, 去核未受精卵做受体, 获得发育至幼鱼的克隆鱼^[16]。次年, Lee 等^[12]报道了用长期培养的斑马鱼成纤维细胞做供体, 去核卵做受体, 得到发育到成年的克隆斑马鱼。我们获得的克隆鱼在开口摄食 1~2 d 后仍仅以鸡蛋黄为食, 摄食丰年虫困难; 在 Lee 等得到的核移植斑马鱼中, 也观察到了不同程度的表型缺陷。与其他物种克隆动物相似, 这些缺陷的产生很可能是由于细胞核再程序化不完全所造成的。另外, 虽然核移植在多种动物中取得成功, 但效率都很低, 通常仅为 2% 左右^[17]。极低的移植成功率限制了核移植技术的广泛应用, 也对其再程序化机制的研究造成了困难。2009 年, Siripattarapavat 等^[18]对改进斑马鱼核移植技术和提高核移植成功率进行了有益的探索。他们用鲑鱼卵巢液来保存未被激活的受体卵, 在不去膜的情况下进行细胞核移植操作; 另一方面, 他们采用激光烧灼的方法来破坏受体卵雌原核, 这样既可以有效地去除受体卵核, 又可以减少对受体卵的机械损伤。此外, 根据人成纤维细胞和鼠胚胎干细胞融合细胞再程序化的研究, 体细胞核在不分裂的情况下, 也可以被胚胎干细胞中的各种因子再程序化^[19]。所以 Siripattarapavat 等人所采用的先移核后激活的方法, 可以为供体细胞核在受体卵质中完成再程序化提供更为充分的时间。虽然环境因素的改善可能有助于提高核移植的成功率, 但对核移植再程序化机制的

研究才能从根本上解决核移植胚胎的发育率低以及克隆动物早夭等难题。

2007 年,我们以斑马鱼为供体,稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)为受体,构建融合胚胎,利用抑制性差减杂交技术(SSH)对重构胚胎和正常受精卵在囊胚期的差异表达基因进行筛选,找到了 80 个基因^[20]。2009 年,我们用类似的技术手段,对斑马鱼体细胞核移植胚胎在囊胚期的差异表达基因进行了筛选,得到 96 个基因^[21]。82.3% 的差异表达基因在克隆胚胎中表达水平下调,提示体细胞核在受体卵中再程序化的不完全是克隆胚发育障碍的重要原因。上述斑马鱼核移植胚胎差异基因的筛选,是对鱼类核移植再程序化机制及相关因子的有益探索,但限于所采用技术手段的特点,更全面的筛选还有赖于基因芯片或转录组二代测序等高通量实验技术的应用。

3 影响核移植胚胎发育的因素

由处于分化状态的细胞核去执行胚胎细胞核的发育功能,其间需要一个再程序化的过程,以使供体细胞核回复到全能状态。错误和不完全的再程序化被认为是核质融合胚胎发育失败和克隆动物表型异常的重要原因。在动物发育过程中,除个别细胞种类外,细胞的分化都伴随着表观遗传修饰的变化,这些表观遗传修饰在很大程度上决定了基因的表达调控、细胞的命运及功能。因此再程序化是否完全,主要取决于表观遗传修饰能否回复到全能干细胞的状态。

3.1 供体细胞的来源与种类对核移植胚胎发育的影响

供体细胞主要是为克隆胚胎提供基因组。理论上讲,只要是具有完整基因组的细胞都可以用来做供体,例如囊胚细胞、神经细胞、头肾细胞、尾鳍细胞以及培养细胞等。但是以不同来源的细胞做供体,核移植效率会有很大不同。在斑马鱼中,来源于中胚层的尾鳍/脊索细胞做供体时,融合胚胎发育情况要显著优于其他组织来源的供体,但这种优势也只是表现在原肠期到 4 d 的幼鱼^[22]。更有甚者,在牛的核移植实验中,即使是来源于同一细胞类型的不同细胞系供体,其克隆效率也具有显著差异^[23]。这种现象的产生可能是由于不同类型的细胞核的分化

程度和表观修饰状态不同,初期再程序化的潜能与所面临的困难程度也存在差异;但随着核移植胚胎发育的进行,不同胚胎的再程序化和发育状态逐渐趋于相似,所以融合胚胎后期的发育差别逐渐减小。

3.2 供体细胞周期对核移植胚胎发育的影响

细胞周期是影响核移植效率的另一重要因素。根据以往的研究结果,通常认为处于 G_0 期和 G_1 期的细胞最适合做供体。在哺乳动物细胞核移植实验中,通过血清饥饿使供体细胞同步化到 G_0 或 G_1 期,被认为是一个很重要的步骤^[4]。以斑马鱼长期培养细胞作供体的核移植实验中,用经过血清饥饿从而提高了 G_0/G_1 期细胞比例的供体细胞也成功得到了克隆鱼^[12]。事实上,处于 S 期和 M 期的细胞核也能很好地被再程序化。Kwon 等^[24]用 4-细胞时期的小鼠胚胎细胞做供体,经过连续核移植得到了成活的克隆小鼠,而这个时期的细胞正处在旺盛的连续分裂过程中,细胞大部分处在 S 期和 M 期。在鱼类囊胚期,胚胎细胞大部分处于 S 期和 M 期。以斑马鱼为例,在 Sphere 时期约有 60% 的细胞处在 S/M 期(本实验室数据,未发表),但在以囊胚细胞做供体的核移植实验中,已经在多个种属得到了成鱼^[5, 7-9, 25]。这说明,细胞周期的影响可能并没有细胞分化程度重要,或者细胞供体核与受体卵之间可以通过某些机制达到细胞周期的同步化。例如,用可改变表观遗传修饰状态的组蛋白去乙酰化酶抑制剂 Scriptaid 处理癌细胞,可以引起细胞周期的变化^[26]。

3.3 供体细胞基因组甲基化状态对核移植胚胎发育的影响

对于动物而言, CpG 岛的甲基化状态,是决定早期胚胎发育过程中基因组能否正常重编程、特定基因能否正常表达的关键因素之一。Dean 等^[27]发现,克隆牛胚胎与自然受精胚胎相比,在不同发育阶段均表现出 DNA 甲基化状态的异常。克隆胚的 DNA 甲基化情况更接近于体细胞,即其供体细胞核的重编程不完全。这些结果表明,在植入前的克隆动物的胚胎中, DNA 去甲基化是不完全的。除了去甲基化过程之外,对细胞增殖分化过程中印记基因甲基化的维持,也是胚胎正常发育的必要条件。在猪的核移植胚胎中,存在于卵细胞核内的母源 Dnmt1 是维持 DNA 正确甲基化的重要因子,丢失

Dnmt1 会造成错误的甲基化^[28]。猪的融合胚胎基因组甲基化水平和野生型相比虽然没有明显差异,而只是在个别基因的甲基化上存在一些差异,但这可能就足以导致基因表达紊乱^[29,30]。再程序化过程需要主动去甲基化作用,Rai 等^[31]在斑马鱼中证实,AID 去甲基化系统具有主动去甲基化的作用。AID/MBD4 可识别甲基化位点,然后 AID 将 5-meC 脱氨基,形成 G:T 错配,随后通过碱基切除修复达到去甲基化的目的。最近的研究表明,AID 去甲基化系统在融合细胞再程序化过程中同样起重要作用,可以激活多能干细胞基因^[19]。

除了去甲基化之外,在融合胚胎发育过程中的重新甲基化同样也是至关重要的。Pawlak 等^[32]研究发现,在诱导产生 iPSCs 的过程中,Dnmt3a 和 Dnmt3b 介导的重新甲基化并不是必需的,但这样诱导出来的 iPSCs 缺乏发育潜能,说明重新甲基化是融合胚胎正常发育所必需的。综上所述,去甲基化和重新甲基化的完美实现,是融合胚胎能够正常早期发育和后期生长的必要保证,对再程序化过程中甲基化的调控机制的研究是实现克隆技术突破的必要途径之一。

3.4 供体细胞基因组组蛋白乙酰化状态对核移植胚胎的影响

组蛋白乙酰化反应多发生在核心组蛋白 N 端碱性氨基酸集中区的特定赖氨酸(Lys)残基上。组蛋白乙酰转移酶(Histone Acetylase, HAT)的作用是将乙酰辅酶 A 的乙酰基转移到组蛋白 Lys 的 ϵ -NH₃⁺上;而脱乙酰转移酶(Histone Deacetylase, HDAC)可以将组蛋白赖氨酸残基上的乙酰基脱去^[33]。一般来说,组蛋白的甲基化和去乙酰化对应转录失活状态,而组蛋白的乙酰化对应更加开放的染色质构象^[33, 34]。在克隆过程中,在体细胞核移植至成熟卵母细胞胞质后不久,体细胞 H1 组蛋白被卵母细胞特有的 H1_{oo} 取代,随后发生染色体重塑:核膜破裂、染色体聚集,卵母细胞开始活化,组合的染色体完成类似减数分裂,细胞内出现两个与正常受精胚胎形态相似的原核^[35, 36]。

Enright 等^[37]研究了核移植过程中供体核的组蛋白乙酰化水平,发现不同的细胞类型、细胞周期的不同阶段以及不同的处理过程均影响供体细胞的组

蛋白乙酰化水平。用组蛋白去乙酰化酶抑制剂 TSA 处理可以提高克隆动物囊胚率,这种作用跟供体细胞类型相关,在体细胞克隆中效果显著,但是在用胚胎干细胞做供体的核移植中,TSA 的作用非常有限。这可能是因为 ES 细胞本身就处于高乙酰化和低甲基化的状态。事实上,TSA 处理体细胞克隆所能达到的成活率 6%~7%与 ES 细胞克隆成功率(约 5%)很接近,TSA 作用的机制可能就是通过提高乙酰化和降低甲基化,使得体细胞进入和 ES 细胞类似的状态,从而提高克隆效率^[38]。在以猪为实验动物的核移植实验中,TSA 处理也可以获得类似的效果,免疫荧光分析表明,acH3K9 和 acH4K16 在 2-细胞时期有显著上升,但在囊胚期,乙酰化水平又回到正常^[39]。

由于 TSA 对胚胎有一定的毒性,研究人员又使用了另外一种去乙酰化酶抑制剂 Scriptaid。在以猪为实验动物的核移植实验中,Scriptaid 处理可以使核移植猪胚胎发育到囊胚期的比例从 9%上升到 21%,同时降低囊胚期胚胎甲基化水平,并且使得多个基因回到正常的表达水平^[40]。经过 Scriptaid 处理的牛融合胚胎,组蛋白 H3K9m2 水平明显下降,对细胞多能性具有重要作用的 Oct4 和 IFN- τ 在囊胚期表达量明显上升^[41]。

3.5 供体细胞基因组组蛋白甲基化修饰对核移植胚胎的影响

相对于组蛋白乙酰化修饰,组蛋白的甲基化修饰可能更为复杂,这主要由于其发生位点和每个残基的甲基化状态都具有多样性。组蛋白甲基化对转录的影响可以是正向的,也可以是反向的,这取决于甲基化所在的位点。在正常发育的胚胎中,组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸(H3K9)的甲基化和 DNA 的甲基化变化是平行的。在克隆牛的植入前胚胎中,H3K9 的过高甲基化伴随 DNA 的过高甲基化,说明 DNA 的甲基化和组蛋白的甲基化是有联系的^[42]。上述去乙酰化酶抑制剂 TSA 或 Scriptaid,除具有增强基因组乙酰化水平的作用外,同时具有降低基因组甲基化水平的作用,它们提高核移植成功率的作用可能是两种作用的叠加效果。已经有研究者证明,维生素 C 可以促进 iPSCs 的产生^[43],并且对猪的核移植胚胎在体外和体内发育都有促进作用^[44]。最近有研究表明,维生素 C 促进 iPSCs 产生的作用,可能是通过两

种维生素 C 依赖性的 H3K36 组蛋白去甲基化酶 Jhdmla/lb 实现的^[45]。

上述总结的影响核移植胚胎发育的表观遗传学因素,主要是基于哺乳类模型或是体外细胞培养系统的工作,但这些成果可以和鱼类核移植后再程序化研究的成果相互借鉴。因为鱼类作为脊椎动物在进化上介于哺乳动物和无脊椎动物之间,许多在哺乳动物中对维持细胞干性和再程序化具有重要作用的基因,在鱼类中也有相应保守的同源基因。如哺乳动物中的 *Oct4* 基因在斑马鱼中就有其同源基因 *pou2*, 并且其表达和功能与其在哺乳动物的同源基因具有很强的相似性。其不但在卵细胞中表达,而且对维持细胞干性以及调节胚胎的早期发育具有重要的作用^[46~48]。因此,将来在斑马鱼中获得的相关研究成果,也可以应用于哺乳动物,从而推动相关研究领域的快速发展。

4 结 语

我国学者开创了鱼类核移植研究,成功实现了多种鱼类的克隆。但是,大多数研究仅限于技术层面的探讨,虽然可有若干改进,但因为不能掌握克隆胚胎发生发育的内在调控机制,无法进行有效的人工干预,因而克隆的成功率依然很低。目前对相关分子机制的研究更是仅局限于检测一些分子标记的变化,鲜有涉及鱼类核移植后基因组再程序化机制的研究,而在其他物种已有研究成果揭示了基因组甲基化状态某些异常造成体细胞核移植胚胎发育异常的一些可能机制^[49],这在某种程度上制约了鱼类核移植研究的进一步发展和深入。因此,利用模式动物斑马鱼深入研究鱼类核移植后细胞核再程序化的分子机制,特别是研究核移植胚胎再程序化中表观遗传的调控机制,将有助于揭开鱼类核移植中再程序化的秘密,最终提高核移植的成功率,推进鱼类核移植技术的发展与应用。

参考文献(References):

- [1] Spemann H. Embryonic development and induction. New Haven: Yale University Press, 1938, 210–211. DOI
- [2] Briggs R, King TJ. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1952, 38(5): 455–463. DOI
- [3] 童第周, 吴尚懋, 叶毓芬, 严绍颐, 杜森, 陆德裕. 鱼类细胞核的移植. *科学通报*, 1963, (7): 60–61. DOI
- [4] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385(6619): 810–813. DOI
- [5] 童第周, 叶毓芬, 陆德裕, 童凤明, 杜森. 鱼类不同亚科间的细胞核移植. *动物学报*, 1973, 19(3): 201–212. DOI
- [6] 吴尚懋, 蔡难儿, 徐权汉. 不同品系金鱼间细胞核的多代移植. *实验生物学报*, 1980, 13(1): 65–77. DOI
- [7] 中国科学院动物研究所细胞遗传研究组, 中国科学院水生生物研究所体细胞遗传研究组, 水产总局长江水产研究所细胞核移植研究组. 硬骨鱼类的细胞核移植——鲤鱼细胞核和鲫鱼细胞质配合的杂种鱼. *中国科学*, 1980, (4): 376–380. DOI
- [8] Sun YH, Chen SP, Wang YP, Hu W, Zhu ZY. Cytoplasmic impact on cross-genus cloned fish derived from transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) nuclei and goldfish (*Carassius auratus*) enucleated eggs. *Biol Reprod*, 2005, 72(3): 510–515. DOI
- [9] 严绍颐, 陆德裕, 杜森, 李光三, 林礼堂, 靳光琴, 王洪, 杨永铨, 夏德全, 刘爱珠, 朱作言, 易詠兰, 陈敏容, 杨兴棋, 陈宏溪. 硬骨鱼类的细胞核移植——鲫鱼细胞核和鲤鱼细胞质配合的杂种鱼. *中国科学(B 辑)*, 1984, (8): 729–731. DOI
- [10] 陈宏溪, 易詠兰, 陈敏容, 杨兴棋. 鱼类培养细胞核发育潜能的研究. *水生生物学报*, 1986, 10(1): 1–7. DOI
- [11] 张念慈, 曹铮, 尹文林, 吴乐丁, 沈锦玉, 毛树坚, 张铭, 杭绮, 赵小立. 草鱼、青鱼体外培养细胞的属间、亚科间核移植. *水产学报*, 1990, 14(4): 344–346. DOI
- [12] Lee KY, Huang HG, Ju BS, Yang ZG, Lin S. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term-cultured cells. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(8): 795–799. DOI
- [13] 李荔, 张士瑾, 王锐, 李国荣, 王梅林. 斑马鱼的克隆: 囊胚细胞核移入正常具核卵子的发育. *高技术通讯*, 2000, 10(7): 24–27. DOI
- [14] 李荔, 张士瑾, 李红岩, 郭华荣. 斑马鱼体细胞核移植——头肾细胞和尾鳍细胞核移入成熟具核卵子发育能力的初步研究. *青岛海洋大学学报 (自然科学版)*, 2002, 32(1): 73–78. DOI
- [15] Hattori M, Hashimoto H, Bubenshchikova E, Wakamatsu Y. Nuclear transfer of embryonic cell nuclei to non-enucleated eggs in zebrafish, *Danio rerio*. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(4): 460–468. DOI
- [16] 胡炜, 汪亚平, 陈尚萍, 朱作言. 不同品系间斑马鱼的细胞核移植. *科学通报*, 2001, 46(24): 2062–2065. DOI
- [17] Meissner A, Jaenisch R. Mammalian nuclear transfer. *Dev Dyn*, 2006, 235(9): 2460–2469. DOI
- [18] Siripattarapavat K, Pinmee B, Venta PJ, Chang CC, Ci-

- belli JB. Somatic cell nuclear transfer in zebrafish. *Nat Meth*, 2009, 6(10): 733–735. [DOI](#)
- [19] Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*, 2010, 463(7284): 1042–1047. [DOI](#)
- [20] Pei DS, Sun YH, Chen SP, Wang YP, Hu W, Zhu ZY. Identification of differentially expressed genes from the cross-subfamily cloned embryos derived from zebrafish nuclei and rare minnow enucleated eggs. *Theriogenology*, 2007, 68(9): 1282–1291. [DOI](#)
- [21] Luo D, Hu W, Chen S, Xiao Y, Sun Y, Zhu Z. Identification of differentially expressed genes between cloned and zygote-developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos at the dome stage using suppression subtractive hybridization. *Biol Reprod*, 2009, 80(4): 674–684. [DOI](#)
- [22] Siripattarapivat K, Pinmee B, Chang EA, Munoz JD, Kawakami K, Cibelli JB. The influence of donor nucleus source on the outcome of zebrafish somatic cell nuclear transfer. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(11–12): 1679–1683. [DOI](#)
- [23] Wells DN, Laible G, Tucker FC, Miller AL, Oliver JE, Xiang T, Forsyth JT, Berg MC, Cockrem K, L'Huillier PJ, Tervit HR, Oback B. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 45–59. [DOI](#)
- [24] Kwon OY, Kono T. Production of identical sextuplet mice by transferring metaphase nuclei from four-cell embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(23): 13010–13013. [DOI](#)
- [25] Niwa K, Ladygina T, Kinoshita M, Ozato K, Wakamatsu Y. Transplantation of blastula nuclei to non-enucleated eggs in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ*, 1999, 41(2): 163–172. [DOI](#)
- [26] Lee EJ, Lee BB, Kim SJ, Park YD, Park J, Kim DH. Histone deacetylase inhibitor scriptaid induces cell cycle arrest and epigenetic change in colon cancer cells. *Int J Oncol*, 2008, 33(4): 767–776. [DOI](#)
- [27] Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13734–13738. [DOI](#)
- [28] Wang HM, Wei YC, Huan YJ, Shi YQ, Liu ZF, Bou GC, Luo YB, Zhang L, Yang CR, Kong QR, Tian JT, Xia P, Sun QY, Liu Z. Unfaithful maintenance of methylation imprints due to loss of maternal nuclear dnmt1 during somatic cell nuclear transfer. *PLoS ONE*, 2011, 6(5): e20154. [DOI](#)
- [29] Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Kim HN, Chang WK, Lee KK, Han YM. Typical demethylation events in cloned pig embryos: clues on species-specific differences in epigenetic reprogramming of a cloned donor genome. *J Biol Chem*, 2001, 276(43): 39980–39984. [DOI](#)
- [30] Gao F, Li ST, Lin L, Li J, Luo YL, Zhang XQ, Nielsen AL, Bolund L. DNA methylation in peripheral blood cells of pigs cloned by somatic cell nuclear transfer. *Cell Reprogram*, 2011, 13(4): 307–314. [DOI](#)
- [31] Rai K, Huggins IJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR. DNA Demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and Gadd45. *Cell*, 2008, 135(7): 1201–1212. [DOI](#)
- [32] Pawlak M, Jaenisch R. De novo DNA methylation by Dnmt3a and Dnmt3b is dispensable for nuclear reprogramming of somatic cells to a pluripotent state. *Genes Dev*, 2011, 25(10): 1035–1040. [DOI](#)
- [33] Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 2011, 21(3): 381–395. [DOI](#)
- [34] Lindeman LC, Winata CL, Aanes H, Mathavan S, Aleström P, Collas P. Chromatin states of developmentally-regulated genes revealed by DNA and histone methylation patterns in zebrafish embryos. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(5): 803–813. [DOI](#)
- [35] Gao SR, Chung YG, Parseghian MH, King GJ, Adashi EY, Latham KE. Rapid H1 linker histone transitions following fertilization or somatic cell nuclear transfer: evidence for a uniform developmental program in mice. *Dev Biol*, 2004, 266(1): 62–75. [DOI](#)
- [36] Teranishi T, Tanaka M, Kimoto S, Ono Y, Miyakoshi K, Kono T, Yoshimura Y. Rapid replacement of somatic linker histones with the oocyte-specific linker histone H1foo in nuclear transfer. *Dev Biol*, 2004, 266(1): 76–86. [DOI](#)
- [37] Enright BP, Jeong BS, Yang X, Tian XC. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. *Biol Reprod*, 2003, 69(5): 1525–1530. [DOI](#)
- [38] Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Thuan NV, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 183–189. [DOI](#)
- [39] Li J, Svarcova O, Villemoes K, Kragh PM, Schmidt M, Bøgh IB, Zhang Y, Du Y, Lin L, Purup S, Xue Q, Bolund L, Yang H, Maddox-Hyttel P, Vajta G. High *in vitro* development after somatic cell nuclear transfer and trichostatin A treatment of reconstructed porcine embryos. *Theriogenology*, 2008, 70(5): 800–808. [DOI](#)

- [40] Whitworth KM, Zhao JG, Spate LD, Li RF, Prather RS. Scriptaid corrects gene expression of a few aberrantly reprogrammed transcripts in nuclear transfer pig blastocyst stage embryos. *Cell Reprogram*, 2011, 13(3): 191–204. [DOI](#)
- [41] Wang LJ, Zhang H, Wang YS, Xu WB, Xiong XR, Li YY, Su JM, Hua S, Zhang Y. Scriptaid improves in vitro development and nuclear reprogramming of somatic cell nuclear transfer bovine embryos. *Cell Reprogram*, 2011, 13(5): 431–439. [DOI](#)
- [42] Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, Peters A, Jenuwein T, Wolf E, Reik W, Dean W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, 2003, 13(13): 1116–1121. [DOI](#)
- [43] Esteban MA, Wang T, Qin BM, Yang JY, Qin DJ, Cai JL, Li W, Weng ZH, Chen JK, Ni S, Chen KS, Li Y, Liu XP, Xu JY, Zhang SQ, Li F, He WZ, Labuda K, Song YC, Peterbauer A, Wolbank S, Redl H, Zhong M, Cai DZ, Zeng LW, Pei DQ. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(1): 71–79. [DOI](#)
- [44] Huang YY, Tang XC, Xie WH, Zhou Y, Li D, Zhou Y, Zhu JG, Yuan T, Lai LX, Pang DX, Ouyang HS. Vitamin C enhances in vitro and in vivo development of porcine somatic cell nuclear transfer embryos. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(2): 397–401. [DOI](#)
- [45] Wang T, Chen KS, Zeng XM, Yang JG, Wu Y, Shi X, Qin BM, Zeng LW, Esteban MA, Pan GJ, Pei DQ. The histone demethylases Jhdmla/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(6): 575–587. [DOI](#)
- [46] Takeda H, Matsuzaki T, Oki T, Miyagawa T, Amanuma H. A novel pou domain gene, zebrafish *pou2*: expression and roles of two alternatively spliced twin products in early development. *Genes Dev*, 1994, 8(1): 45–59. [DOI](#)
- [47] Morrison GM, Brickman JM. Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. *Development*, 2006, 133(10): 2011–2022. [DOI](#)
- [48] Onichtchouk D, Geier F, Polok B, Messerschmidt DM, Mössner R, Wendik B, Song SM, Taylor V, Timmer J, Driever W. Zebrafish Pou5f1-dependent transcriptional networks in temporal control of early development. *Mol Syst Biol*, 2010, 6: 354. [DOI](#)
- [49] Chan MM, Smith ZD, Egli D, Regev A, Meissner A. Mouse ooplasm confers context-specific reprogramming capacity. *Nat Genet*, 2012, 44(9): 978–980. [DOI](#)