

# 克隆哺乳动物的胎盘发育缺陷

敖政, 刘德武, 蔡更元, 吴珍芳, 李紫聪

华南农业大学动物科学学院, 国家生猪种业工程研究中心, 广州 510642

**摘要:** 克隆又称体细胞核移植(Somatic cell nuclear transfer, SCNT), 该技术已在多种哺乳动物中成功建立并被逐渐应用。然而, 利用该技术获得的哺乳动物克隆胚胎的发育效率非常低(一般只有 1%~5%), 这严重限制了克隆技术的应用。胎盘发育缺陷被认为是抑制克隆胚胎发育的一个主要原因。几乎所有的 SCNT 来源胎盘都会出现不同的发育缺陷, 如胎盘增生、胎盘血管缺陷、脐带畸形等。胎盘异常的根本原因是滋养层细胞基因组在发育过程中未能建立正确的表观遗传修饰, 导致胎盘发育调控相关的重要基因, 特别是印记基因的表达出现异常。印记基因表达异常导致胎盘的形态异常和功能缺陷, 进而影响克隆胚胎的发育能力。目前, 虽然有许多提高克隆胚胎发育能力的研究报道, 然而在大多数研究中克隆效率并没有得到大幅度的提高, 主要原因之一是克隆胚胎的胎盘发育仍然存在诸多缺陷。本文综述了克隆哺乳动物的胎盘异常及其印记基因表达, 并对未来提高克隆效率的研究提出展望。

**关键词:** 体细胞核移植; 克隆; 表观重编程; 胎盘异常; 印记基因

## Placental developmental defects in cloned mammalian animals

Zheng Ao, Dewu Liu, Gengyuan Cai, Zhenfang Wu, Zicong Li

National Engineering Research Center for Swine Breeding Industry, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

**Abstract:** The cloning technique, also called somatic cell nuclear transfer(SCNT), has been successfully established and gradually applied to various mammalian species. However, the developmental rate of SCNT mammalian embryos is very low, usually at 1% to 5%, which limits the application of SCNT. Placental developmental defects are considered as the main cause of SCNT embryo development inhibition. Almost all of SCNT-derived mammalian placentas exhibit various abnormalities, such as placental hyperplasia, vascular defects and umbilical cord malformation. Mechanistically, these abnormalities result from failure of establishment of correct epigenetic modification in the trophectoderm genome, which leads to erroneous expression of important genes for placenta development-related, particularly imprinted genes. Consequently, aberrant imprinted gene expression gives rise to placental morphologic abnormalities and functional defects, therefore decreases developmental competence of cloned embryos. Currently,

收稿日期: 2015-11-12; 修回日期: 2015-12-29

基金项目: 广东省自然科学基金项目(编号: 2014A030313464)和广东省科技计划项目(编号: 2011A020102003)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2014A030313464) and the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No.2011A020102003)]

作者简介: 敖政, 硕士研究生, 研究方向: 分子遗传育种。E-mail: zheng780911@163.com

通讯作者: 李紫聪, 博士, 副教授, 研究方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: lizicongcong@163.com

DOI: 10.16288/j.yeczz.15-466

网络出版时间: 2016/3/2 15:05:07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160302.1505.004.html>

although numerous methods that can improve the developmental ability of SCNT-derived embryos have been reported, most of them are unable to substantially enhance the success rate of SCNT due to failure to eliminate the placental development defects. In this review, we summarize placental abnormalities and imprinted gene expression in mammalian cloning, and propose directions for the future research aiming to improve the cloning efficiency.

**Keywords:** SCNT; cloning; epigenetic reprogramming; placenta abnormalities; imprinted genes

哺乳动物的体细胞核移植(Somatic cell nuclear transfer, SCNT)是一种无性繁殖技术,即将体细胞移入去核的卵母细胞中获得重构胚,并将其移植至代孕母子宫发育获得与供体细胞基因型完全相同的后代<sup>[1]</sup>。自1996年首例体细胞克隆哺乳动物——多莉绵羊诞生以来,SCNT技术已在多种哺乳动物中成功建立并被逐渐应用,例如牛(*Bos taurus*)<sup>[2]</sup>、猪(*Sus scrofa*)<sup>[3]</sup>、小鼠(*Mus musculus*)<sup>[4]</sup>、兔(*Oryctolagus cuniculus*)<sup>[5]</sup>、马(*Equus caballus*)<sup>[6]</sup>、狗(*Canis lupus familiaris*)<sup>[7]</sup>、骆驼(*Camelus bactrianus*)<sup>[8]</sup>等。目前,SCNT技术已应用于优质种畜扩繁、转基因育种、拯救濒危稀有保护品种、治疗性克隆等领域。然而,克隆胚胎的发育效率非常低,一般只有1%~5%<sup>[9]</sup>,这严重限制了克隆技术的发展。鉴于此,研究人员希望通过有效的技术手段提高克隆胚胎的发育能力,例如体外培养添加小分子化合物<sup>[10~13]</sup>、使用不同的细胞系<sup>[14,15]</sup>、优化融合参数<sup>[16,17]</sup>、敲除*Xist*基因<sup>[18]</sup>等。这些研究虽然取得了一定的效果,但在大多数研究中克隆效率并没有大幅度的提高,且产后的克隆动物存在诸多异常。因此,如何克服哺乳动物克隆效率低下和克隆动物异常成为体细胞克隆研究的热点。

胚胎在囊胚期分裂形成内细胞团(Inner cell mass, ICM)和滋养层细胞(Trophoblast, TE),其中TE分化形成胎盘。胎盘对营养物质的转运、重要营养物质和激素的合成及代谢能力会直接影响胎儿的生长和发育<sup>[19]</sup>。研究发现胎盘异常几乎是所有克隆哺乳动物的一个共有特征,例如胎盘增生、胎盘血管缺陷、脐带畸形。胎盘异常被认为是抑制克隆胚胎生长发育的主要原因之一<sup>[20]</sup>。Lin等<sup>[21]</sup>通过将克隆囊胚的ICM与受精来源的四倍体胚胎融合形成嵌合胚胎可将克隆小鼠的出生率提高到15.7%,这表明克隆胚胎早期滋养层发育缺陷是阻碍克隆胚胎生长发育的主要原因。胎盘异常的根本原因是克隆胚胎的滋养

层细胞在发育过程中不能建立正确的表观遗传修饰,以致调控滋养层和胎盘发育的重要基因,特别是印记基因表达异常。印记基因的表达异常导致胎盘形态异常和功能缺陷,进而影响克隆胚胎的发育能力<sup>[22]</sup>。克隆哺乳动物的胎盘发育缺陷仍然是当前克隆效率没有大幅度提高的主要原因之一。本文对克隆哺乳动物的胎盘异常及其印记基因表达进行综述,以期对未来提高克隆效率的研究提供参考。

## 1 克隆动物胎盘的形态学异常

### 1.1 胎盘增生及滋养层异常

一些克隆哺乳动物常伴随巨胎症(Large offspring syndrome, LOS)的发生<sup>[20]</sup>,例如小鼠、绵羊和牛。LOS主要特点是胎儿出生体重过大和胎盘增生,同时包括羊膜积水、器官畸形、呼吸异常、妊娠期延长等病理特征。研究发现克隆小鼠胎盘的成体胎盘重量是正常受精胎盘的2~3倍<sup>[23]</sup>,这是胎盘组织增生的结果。小鼠胎盘主要由成胶质层和迷宫层组成,其中迷宫层是胎儿与母体进行物质交换的主要区域。Tanaka等<sup>[19]</sup>研究发现妊娠19.5 d的克隆小鼠胎盘组织最突出的异常特征是成胶质层的扩张,同时包括糖原细胞数量增加、成胶质细胞变大、迷宫层被破坏等异常。然而克隆小鼠胎盘的特异性调控基因的表达与正常受精小鼠胎盘没有明显差异。这说明导致克隆小鼠胎盘组织增生的主要原因是成胶质层扩张,而并非调控胎盘生长发育的相关基因转录活性受损。然而成胶质层扩张并非伴随克隆小鼠的整个胎盘发育过程。Wakisaka-Saito等<sup>[24]</sup>研究发现代孕母鼠妊娠10.5 d时不仅半数以上(12/21)的克隆小鼠胎盘缺乏成胶质层,而且具有成胶质层的胎盘也只有少量或没有成胶质细胞标记基因*Tpbpa*的表达。胎盘成胶质层的发育不良造成大量克隆胚胎在妊娠中期停止发育,即使少部分存活的克隆胚胎发育至成体也会出现胎盘增生。早期滋养层干细胞(Trophoblast

stem cells, TSCs)的细胞特异性分化异常是导致克隆小鼠胎盘的成胶质层扩张或缺失的根本原因。Kdhda 等<sup>[25]</sup>研究了初生克隆小鼠的基因表达模式,发现多数基因在不同个体间有 10%~40%的上调或下调,只有少数基因在所有个体中呈现相同的表达模式,表明克隆胚胎的基因表达存在个体差异。胎盘蛋白的异常表达可能是促使克隆小鼠胎盘增生的一个诱因。基质金属蛋白酶抑制剂 2(Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 2, TIMP-2)是一种参与胞外基质降解以及组织重塑的蛋白。Kim 等<sup>[26]</sup>通过蛋白组分析发现克隆小鼠胎盘的多种蛋白表达与普通小鼠存在显著差异,其中克隆小鼠胎盘中 TIMP-2 的蛋白表达量相对于对照组显著升高,与抑制细胞凋亡相关蛋白前 B 细胞克隆增强因子(Pre-B-cell colony-enhancing factor, PBEF)和 annexin A1 的表达量显著下调。这些蛋白的表达失调可能会导致胎盘的形态异常以及胎盘的功能缺陷,从而影响克隆胚胎的发育能力。

牛是目前体细胞克隆最成功的物种之一,妊娠 30~90 d 是代孕母牛的自然流产率高发期,这与胎盘的发育不良密切相关<sup>[27]</sup>。牛的胎盘属于子叶型胎盘,由包含子叶和肉阜的胎盘节组成,这类胎盘最大的特点是滋养层细胞胞质分裂失败而形成大量的双核细胞,双核细胞入侵肉阜上皮细胞融合形成多核体并分泌维持妊娠相关的蛋白<sup>[28]</sup>。牛体细胞克隆中,子叶与肉阜的相互作用紊乱阻碍了胎盘节的形成,克隆胚胎的胎盘节的数量比正常受精胚胎显著减少。然而,克隆牛的胎盘节质量却有所增加,使胎盘显得更大更厚<sup>[28~31]</sup>,且肉阜表面的隐窝扩张使单一绒毛聚集为复合体<sup>[31]</sup>。组织学分析表明克隆牛胎儿与母体的胎盘比例发生了变化,这种结构上的变化可能是提高胎儿与母体间物质交换效率的一种生理性适应<sup>[22]</sup>。Hill 等<sup>[32]</sup>研究发现所有的克隆牛胎盘在附植时期都有主要组织相容性复合体 I(Major histocompatibility complex class I, MHC-I)的表达,表达 MHC-I 的滋养层细胞比例为 17.9%~56.5%。大多数代孕母牛子宫内膜的 T 淋巴细胞数量显著高于人工授精(Artificial insemination, AI)母牛,这可能会使母体子宫内膜对克隆胚胎产生免疫排斥反应从而导致怀孕失败。克隆牛在妊娠 150~200 d 时,胎盘会

出现尿囊积水、胎膜和胎盘的水肿,导致大量胎儿死亡以及包括脐带肥大、腹腔积液、心脏增大、脂肪肝等病变<sup>[22]</sup>。胎盘的各类异常会影响胎儿对葡萄糖的利用效率。研究发现妊娠早期到中期的克隆牛胎儿体液中的葡萄糖含量与正常受精胎儿相当,妊娠后期的胎儿体液的葡萄糖水平将降低<sup>[22]</sup>。然而,克隆牛胎盘的葡萄糖转运体 *GLUT3* 的表达量高于正常受精胎盘<sup>[33]</sup>,表明胎儿体液的葡萄糖水平降低的根源并非母体提供的葡萄糖含量的减少,而是 60%~75%的葡萄糖被胎盘吸收用于组织生长,从而破坏了胎儿的葡萄糖供给,同时导致胎盘组织增生<sup>[22]</sup>。有趣的是,代孕母牛血清中妊娠相关糖蛋白(Pregnancy-associated glycoproteins, PAGs)水平比 AI 母牛高,这并非克隆牛的胎盘增生产生了更多的 PAGs,而是胎盘形成一种更高效的转运体将 PAGs 分泌到母体<sup>[22]</sup>。Everts 等<sup>[34]</sup>对 SCNT、AI、体外受精(*In vitro* fertilization, IVF)来源的牛胎盘节转录组谱进行了比较分析,结果显示 SCNT 组与 AI 组有 336 个差异表达基因(Differentially expressed genes, DEGs),与 IVF 组有 733 个 DEGs,功能性分析发现这些 DEGs 参与调控胎盘的细胞周期、细胞死亡及基因表达。这些 DEGs 的表达异常可能是克隆牛发生 LOS 和胎盘积水的重要原因,而根本原因是供体核的表观重编程异常。TP-1 是滋养层细胞特异性表达且与母体妊娠识别相关的基因。研究发现牛克隆囊胚的 TP-1 的表达异常,这可能导致母体的妊娠识别失败而引发流产<sup>[35]</sup>。Kim 等<sup>[36]</sup>检测克隆牛胎盘的蛋白表达发现,相对于正常受精胎盘,克隆牛胎盘的 TIMP-2 和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的蛋白表达量显著上调,而波形蛋白和纤溶酶原激活物抑制剂-1(Plasminogen activator inhibitor-1, PAI)显著下调。这些蛋白的异常表达可能会影响到胎盘的组织和功能完整性,从而抑制克隆胚胎的生长和发育。

相比其他家畜动物的体细胞克隆,猪的克隆效率更低(1%左右)<sup>[37]</sup>。在众多影响克隆猪胚胎发育能力的因素中,胎盘异常占主导地位,主要特征是滋养层发育缺陷<sup>[38]</sup>。猪胎盘属于上皮绒毛膜胎盘,通过绒毛膜褶皱和子宫内膜内陷加大胎盘与子宫的接触面积,说明猪滋养层细胞的分化和迁移对母体-胎儿的物质信息联系建立至关重要。Chae 等<sup>[38]</sup>发现早

期猪克隆胚胎相对于同期的 AI 胚胎有发育迟缓的症状, 且胚外组织形态异常。形态学检测发现克隆猪成体胎盘异常更为严重, 包括绒毛发育不良、滋养层发育不全和细胞滋养层分化减少等<sup>[39,40]</sup>, 说明克隆猪胚胎的早期滋养层发育会直接影响妊娠中后期的胎盘的形态和功能。Chae 等<sup>[38]</sup>和 Ko<sup>[41]</sup>等检测克隆猪胎盘的蛋白水平发现克隆胎盘的细胞凋亡异常且抗氧化能力减弱, 克隆猪胚外组织中参与 RTK、Notch、JAK/STAT 等信号通路的重要分子的表达异常<sup>[42]</sup>。以上结果说明胎盘的蛋白表达异常可能会导致克隆猪胎盘发育缺陷, 从而影响克隆胚胎的发育能力。

## 1.2 胎盘血管缺陷

胎盘血管对胎儿和胎盘发育至关重要。胎盘血管异常的危害在于母体的营养物质和内分泌激素不能被胎儿正常吸收利用。克隆哺乳动物的胎盘血管发育缺陷可能是克隆胚胎发育不良的一个重要原因。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是主要的血管生成刺激因子, 参与调控胎盘的血管发育、血管渗透以及滋养层细胞的生长和发育。胎盘绒毛的血管化减弱将伴随滋养层上皮细胞发育不全、细胞凋亡和脱落<sup>[43]</sup>。Moyer 等<sup>[44]</sup>对妊娠 30 d 的克隆牛胎盘血管生成的研究显示, 尿囊绒毛膜的胎盘生长因子(Placental growth factor, PlGF)的表达量显著低于 IVF 胎盘, 缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (Hypoxia-inducible factor, HIF)的表达量显著高于 IVF 胎盘。免疫组化显示肉阜中 VEGFA 以及受体 Flt1 的蛋白表达水平与 IVF 胎盘没有差异。然而, 妊娠 40 d 的克隆牛胎膜中 *Vegf* 的 mRNA 表达量显著低于 IVF 胎盘, 而 *Vegf* 的受体基因 *Kdr* 和 *Flt* 与 IVF 没有差异<sup>[45]</sup>。说明克隆胎盘血管缺陷可能是随胎盘发育逐渐形成的, 并且妊娠后期会形成缺氧型胎盘。研究发现, 克隆猪胎盘绒毛存在严重的血管发育不良, 其中 *Vegf*、*Ang1*、*Ang2*、*Mmp9* 等重要的促血管生成因子的表达量显著低于正常受精胎盘<sup>[46]</sup>。克隆绵羊胎盘的血管发育缺陷表现更为明显。妊娠 35 d 的克隆绵羊胎盘的子叶数量严重不足, 反映出血管发育不良<sup>[47]</sup>, 成体胎盘的绒毛血管化明显不足且胎盘

血管发育未成熟, 这可能是 CD34 蛋白表达显著降低的结果<sup>[48]</sup>。因此, 克隆哺乳动物的胎盘血管缺陷起源于胎盘形成初期, 并且伴随至妊娠结束。

## 1.3 脐带畸形

脐带主要由脐动脉和脐静脉构成, 是胎儿和胎盘进行代谢废物和营养物质的交换的重要结构。脐带的形态功能完整是胎儿正常发育的关键因素。然而, 克隆动物脐带在发育过程中呈现诸多异常表型<sup>[22]</sup>。克隆牛的脐带异常主要表现为脐带膨大, 其他病理特征包括脐动脉与脐静脉未合拢、平滑肌层增厚、脐带血管水肿<sup>[22]</sup>等。克隆牛脐带的尿囊管明显扩增, 可能是水肿渗透的结果<sup>[31]</sup>。脐带膨大不利于胎儿出生时血管的收缩, 会导致脐带出血, 克隆牛出生时常出现贫血病状。脐带膨大对克隆牛胎儿的血流没有明显影响, 可能与妊娠期间的胎盘水肿有关<sup>[22]</sup>。Park 等<sup>[39]</sup>研究出生的克隆小猪脐带发现, 14%(9/65)的脐带出现严重畸形(Malformed umbilical cords, MUC), 主要病理特征有组织肿胀、缺乏柱状上皮细胞、脐动静脉闭塞性血栓。克隆猪异常脐带的基因和蛋白表达水平相对 AI 脐带都存在异常, 其中血管形成相关基因 *Vegf*、*Vegfr1*、*Ang1*、*Ang2* 以及参与转录调控的基因 *Jun*、*Junb*、*Fosl2* 的表达量显著下调<sup>[39,49]</sup>。蛋白组学分析显示, 克隆猪脐带参与抗氧化应激和调控糖酵解的蛋白相对于 AI 显著下调, 而细胞凋亡相关蛋白显著上调<sup>[39]</sup>。与克隆牛脐带不同的是, MUC 最直接后果是减少了克隆猪胎盘与胎儿间的血流, 使胎儿组织缺氧以及积累过多的 CO<sub>2</sub>, 最终导致胎盘效率降低, 克隆胎儿畸形发育<sup>[39]</sup>。

## 2 印记基因表达对胎盘发育和功能的影响

印记基因是指仅一方亲本来源的同源基因表达, 而另一亲本来源基因沉默的一类基因, 是胎儿和胎盘生长发育的重要调控因子。通常, 有种假设认为父方等位基因表达会促进胎儿和胎盘的生长, 而母方等位基因表达则具有抑制生长的作用<sup>[50]</sup>。印记基因大多成簇存在, 成簇的印记基因通常包含几个蛋白编码基因和至少一个非编码 RNA(Non-coding RNA, ncRNA)基因, 每个簇的印记基因主要受一个

顺式作用元件—印迹控制中心(Imprinting control region, ICR)控制<sup>[51]</sup>。已证实包括灵长类、啮齿类、反刍类以及有蹄类等在内的哺乳动物胎盘存在许多印迹基因,并且某些印迹基因只在胎盘中特异性表达<sup>[52]</sup>。印迹基因表达失调直接导致滋养层细胞的增值、分化和凋亡异常,胎盘生长发育异常和营养物质转运能力降低<sup>[52]</sup>。

## 2.1 印迹基因与胎盘生长

现已发现哺乳动物体细胞克隆胎盘中许多印迹基因表达异常,且物种间存在差异。例如,*Igf2* 是父本表达的印迹基因,具有促进细胞有丝分裂、分化及移动的作用。克隆小鼠胎盘中,*Igf2* 的表达量上调而 *Igf2r* 表达量下调<sup>[53]</sup>。妊娠 150 d 克隆牛胎盘中,*Igf2* 的表达量与正常胎盘没有差异,但 *Igf2* 结合蛋白 IGFBP2、IGFBP3 显著增多<sup>[54]</sup>。更为不同的是,克隆羊和猪的胎盘 *Igf2* 表达量相对正常胎盘都显著下调<sup>[43, 55]</sup>,说明印迹基因异常表达的多样性可能会导致不同的胎盘异常表型。胎盘印迹基因会呈现时间和空间上的差异表达<sup>[52]</sup>。AI 牛胎盘的印迹基因 *Mash2* 在附植前是双等位基因表达,而之后只有母本等位基因表达。然而克隆牛胎盘的 *Mash2* 的 mRNA 表达在附植后并不随印迹状态的变化而发生改变<sup>[56]</sup>,这可能造成滋养层细胞发育异常而使代孕母牛妊娠失败。胎盘增生是胎盘异常的主要部分,其原因很大程度与印迹基因的表达异常相关。*Phlda2* 是母本表达的印迹基因,正常情况下其表达水平与胎盘生长呈负相关。妊娠 200 d 的克隆牛胎盘绒毛中 *Phlda2* 的 mRNA 表达量显著降低,这可能是胎盘增生一个因素<sup>[57]</sup>。其他与滋养层和胎盘生长相关的印迹基因如 *H19*、*Peg3*、*Cdkn1c*、*Grb10*、*Esx1* 等在克隆动物的不同妊娠阶段也都出现异常表达<sup>[55, 58]</sup>。Okabe 等<sup>[59]</sup>基于 RNA 测序发现,所有的克隆小鼠胎盘的印迹基因 *Gab1*、*Sfmbt2*、*Slc38a4* 都出现了印迹丢失。这表明克隆哺乳动物胎盘异常很可能是多种印迹基因表达异常的结果,但其根源是供体细胞核错误或不完整的表观重编程,其中 DNA 甲基化异常尤为明显。Su 等<sup>[60]</sup>对克隆转基因牛的胎盘印迹基因的 DNA 甲基化模式的研究发现,*H19* 的差异甲基化区域(Differentially methylated region, DMR)

出现高度甲基化,而 *Xist* 的 DMR 和 *Igf2r* 的 ICR 呈现低甲基化水平。Wei 等<sup>[55]</sup>发现产后死亡克隆猪胎盘的 *Igf2* 的 DMR2 以及 *H19* 的 CTCF3 区域都是高度甲基化水平,这与 *Igf2* 和 *H19* 的表达量显著下调的结果相吻合。

## 2.2 印迹基因与胎盘营养转运

印迹基因主要从两方面影响胎盘的营养转运,即胎盘的组织和营养转运基因的表达<sup>[52]</sup>。胎盘的厚度会影响营养物质的被动扩散。小鼠胎盘的迷官层是母体-胎儿主要的营养物质交换场所。克隆小鼠胎盘印迹基因的表达失调导致糖原细胞增多、滋养层干细胞异常、迷官层面积缩小,从而使母体与胎儿间的交换效率降低<sup>[19]</sup>。克隆牛的胎盘增生也可能是印迹基因异常表达的结果,如 *Igf2*<sup>[54]</sup>、*Phlda2*<sup>[57]</sup>。克隆猪胎盘印迹基因的异常表达会影响滋养层细胞的生长、分化及凋亡,从而降低胎盘的营养转运效率<sup>[55]</sup>。印迹基因敲除实验表明印迹基因与主要的营养转运基因存在关联,如敲除 *Igf2P0* 的小鼠胎盘葡萄糖转运载体 *Slc2a3/GLUT3* 以及氨基酸转运载体 *Slc38a4* 的表达量显著上调;敲除 *Igf2* 后,*Slc38a4* 和 *Slc38a2* 的表达显著下调<sup>[52]</sup>。更重要的是,*Slc38a4* 本身是一个印迹基因,并在克隆动物胎盘中印迹异常<sup>[59]</sup>。小鼠和牛的体细胞克隆伴随的 LOS 可能与胎盘的营养过剩有关,研究发现克隆牛胎盘的 *Slc2a1* 和 *Sl2a3* 显著上调<sup>[61]</sup>。克隆哺乳动物胎盘的印迹基因表达紊乱将导致胎盘的生长发育和营养转运异常,从而破坏由胎盘介导的母体与胎儿的物质交换和信号传递,最终导致妊娠失败。

## 3 结语与展望

SCNT 的成功是生命科学领域的一次重大突破,其在优良种畜扩繁、濒危物种保护、克隆性治疗等方面具有广阔的应用前景。然而,在 SCNT 技术发展近 20 年的时间里,除了个别研究中的克隆效率有大幅度提高以外<sup>[18, 21, 62]</sup>,总体上克隆胚胎发育至成体的成功率仍保持在一个很低水平,其根本原因是供体细胞核的表观重编程异常<sup>[20]</sup>。虽然目前并没有找到有效的方法解决这一难题,但研究人员仍在通过不同的技术手段探索核重编程机制,并取得了一

定的成果。

相对于正常受精胚胎, 克隆胚胎虽然具备完整的亲本遗传信息, 但在某些方面却存在明显差异, 其中最关键的是克隆胚胎的表观遗传修饰异常, 修复这些异常已成为目前提高克隆胚胎发育效率的一个重要途径。DNA 甲基转移酶抑制剂(DNA methyltransferase inhibitor, DNMTi)和组蛋白去乙酰化抑制剂(Histone deacetylase inhibitor, HDACi)是修复表观遗传修饰异常最常用的小分子化合物<sup>[63, 64]</sup>, 然而这些药物对克隆胚胎有一定的毒性并且克隆效率没有大幅度提高。克隆胚胎的某些关键的表观修饰异常得以修复后能大幅度提高克隆效率, 如敲除印记基因 *Xist*<sup>[18]</sup>、修饰 H3K9 三甲基化<sup>[62]</sup>。因此, 选择有针对性且无毒性的表观修饰药物将是值得深入研究的发展方向。

滋养层或胎盘发育正常是维持胎儿体内平衡的重要保证, 然而几乎所有的克隆哺乳动物胎盘都呈现发育缺陷, 其结果是降低了克隆胎儿的出生率和存活率。因此, 提高克隆效率的另一个直接途径是改善胎盘的发育质量。大量印记基因的表达紊乱可能是克隆哺乳动物胎盘发育缺陷的主要原因之一, 印记基因的表达异常则源于滋养层的表观遗传修饰错误, 而掌握克隆胚胎滋养层的表观修饰的变化规律将是解决克隆哺乳动物胎盘异常的基础。“替换”早期克隆胚胎的滋养层细胞也是一种减少胎盘异常的重要途径, 研究人员已通过四倍体补偿的方法显著提高了克隆小鼠的出生率<sup>[21]</sup>, 但这种方法在其他物种却难以操作。对早期克隆胚胎补偿正常受精来源的 TSCs 则可能成为一种既可以降低操作难度又能减少异常胎盘产生的技术手段。在其他方面, 由于克隆胚胎的发育缺少精子胞浆和卵母细胞胞浆中某些重要成分的参与, 如卵母细胞线粒体 DNA<sup>[65]</sup>、卵母细胞富集因子<sup>[66]</sup>等, 因而克隆胚胎体外培养阶段补充这些重要成分将有可能提高重编程效率。再者, 根据提高克隆效率的不同方法所呈现的优势, 将这些方法整合使用也将成为今后体细胞核移植发展的一种重要途径。

总之, 今后体细胞核移植发展的重点仍然是以修复供体核的表观重编程异常为主。另外, 高通量测序<sup>[59]</sup>、CRISPR/Cas9<sup>[67]</sup>等新兴技术的结合使用将

更加快速准确地解析体细胞表观重编程机制, 从而大幅度提高克隆效率, 降低克隆动物异常表型的发生率, 最终将 SCNT 技术应用于更多领域。

## 参考文献(References):

- [1] Ogura A, Inoue K, Wakayama T. Recent advancements in cloning by somatic cell nuclear transfer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368(1609): 20110329.
- [2] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato JY, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282(5396): 2095–2098.
- [3] Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai YF, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KHS. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407(6800): 86–90.
- [4] Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*, 2002, 415(6875): 1035–1038.
- [5] Chesné P, Adenot PG, Viglietta C, Baratte M, Boulanger L, Renard JP. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(4): 366–369.
- [6] Galli C, Lagutina I, Crotti G, Colleoni S, Turini P, Ponderato N, Duchi R, Lazzari G. Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature*, 2003, 424(6949): 635.
- [7] Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Shimim HM, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 2005, 436(7051): 641.
- [8] Wani NA, Wernery U, Hassan FAH, Wernery R, Skidmore JA. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2010, 82(2): 373–379.
- [9] Sung LY, Gao SR, Shen HM, Yu H, Song YF, Smith SL, Chang CC, Inoue K, Kuo L, Lian J, Li A, Tian XC, Tuck DP, Weissman SM, Yang XZ, Cheng T. Differentiated cells are more efficient than adult stem cells for cloning by somatic cell nuclear transfer. *Nat Genet*, 2006, 38(11): 1323–1328.
- [10] Zhao JG, Ross JW, Hao YH, Spate LD, Walters EM, Samuel MS, Rieke A, Murphy CN, Prather RS. Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2009, 81(3): 525–530.
- [11] Kishigami S, Mizutani E, Ohta H, Hikichi T, Van Thuan N, Wakayama S, Bui HT, Wakayama T. Significant im-

- provement of mouse cloning technique by treatment with trichostatin A after somatic nuclear transfer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 340(1): 183–189.
- [12] You J, Kim J, Lee H, Hyun SH, Hansen PJ, Lee E. MG132 treatment during oocyte maturation improves embryonic development after somatic cell nuclear transfer and alters oocyte and embryo transcript abundance in pigs. *Mol Reprod Dev*, 2012, 79(1): 41–50.
- [13] Tsuji Y, Kato Y, Tsunoda Y. The developmental potential of mouse somatic cell nuclear-transferred oocytes treated with trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Zygote*, 2009, 17(2): 109–115.
- [14] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(1): 3–7.
- [15] Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil*, 2000, 120(2): 231–237.
- [16] [16] Lee GS, Hyun SH, Kim HS, Kim DY, Lee SH, Lim JM, Lee ES, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer technique by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations. *Theriogenology*, 2003, 59(9): 1949–1957.
- [17] Dinnyés A, Dai YP, Jiang SE, Yang XZ. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2000, 63(2): 513–518.
- [18] Inoue K, Kohda T, Sugimoto M, Sado T, Ogonuki N, Matoba S, Shiura H, Ikeda R, Mochida K, Fujii T, Sawai K, Otte AP, Tian XC, Yang XZ, Ishino F, Abe K, Ogura A. Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell nuclear transfer. *Science*, 2010, 330(6003): 496–499.
- [19] Tanaka S, Oda M, Toyoshima Y, Wakayama T, Tanaka M, Yoshida N, Hattori N, Ohgane J, Yanagimachi R, Shiota K. Placentomegaly in cloned mouse concepti caused by expansion of the spongiotrophoblast layer. *Biol Reprod*, 2001, 65(6): 1813–1821.
- [20] Yang XZ, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, 2007, 39(3): 295–302.
- [21] Lin JW, Shi LY, Zhang M, Yang H, Qin YR, Zhang J, Gong DQ, Zhang X, Li DS, Li JS. Defects in trophoblast cell lineage account for the impaired in vivo development of cloned embryos generated by somatic nuclear transfer. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(4): 371–375.
- [22] Chavatte-Palmer P, Camous S, Jammes H, Le Cleac'h N, Guillomot M, Lee RSF. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. *Placenta*, 2012, 33(Suppl): S99–S104.
- [23] Inoue K, Kohda T, Lee J, Ogonuki N, Mochida K, Noguchi Y, Tanemura K, Kaneko-Ishino T, Ishino F, Ogura A. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science*, 2002, 295(5553): 297.
- [24] Wakisaka-Saito N, Kohda T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Hikichi T, Mizutani E, Wakayama T, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F. Chorioallantoic placenta defects in cloned mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349(1): 106–114.
- [25] Kohda T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Naruse M, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F. Variation in gene expression and aberrantly regulated chromosome regions in cloned mice. *Biol Reprod*, 2005, 73(6): 1302–1311.
- [26] Kim HR, Naruse K, Lee HR, Wakayama T, Park CS, Jin DI. Proteomics analysis of placentomegaly in cloned mice. *Reprod Fertil Dev*, 2007, 19(1): 143–144.
- [27] Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod*, 2000, 63(6): 1787–1794.
- [28] Arnold DR, Fortier AL, Lefebvre R, Miglino MA, Pfarrer C, Smith LC. Placental insufficiencies in cloned animals—a workshop report. *Placenta*, 2008, 29(Suppl.): 108–110.
- [29] Lee RS, Peterson AJ, Donnison MJ, Ravelich S, Ledgard AM, Li N, Oliver JE, Miller AL, Tucker FC, Breier B, Wells DN. Cloned cattle fetuses with the same nuclear genetics are more variable than contemporary half-siblings resulting from artificial insemination and exhibit fetal and placental growth deregulation even in the first trimester. *Biol Reprod*, 2004, 70(1): 1–11.
- [30] Constant F, Guillomot M, Heyman Y, Vignon X, Laigre P, Servely JL, Renard JP, Chavatte-Palmer P. Large offspring or large placenta syndrome? Morphometric analysis of late gestation bovine placentomes from somatic nuclear transfer pregnancies complicated by hydrallantois. *Biol Reprod*, 2006, 75(1): 122–130.
- [31] Miglino MA, Pereira FTV, Visintin JA, Garcia JM, Meirelles FV, Rumpf R, Ambrósio CE, Papa PC, Santos TC, Carvalho AF, Leiser R, Carter AM. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. *Theriogenology*, 2007, 68(4): 604–617.
- [32] Hill JR, Schlafer DH, Fisher PJ, Davies CJ. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility com-

- plex class I antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biol Reprod*, 2002, 67(1): 55–63.
- [33] Hirayama H, Sawai K, Hirayama M, Hirai T, Kageyama S, Onoe S, Minamihashi A, Moriyasu S. Prepartum maternal plasma glucose concentrations and placental glucose transporter mRNA expression in cows carrying somatic cell clone fetuses. *J Reprod Dev*, 2011, 57(1): 57–61.
- [34] Everts RE, Chavatte-Palmer P, Razzak A, Hue I, Green CA, Oliveira R, Vignon X, Rodriguez-Zas SL, Tian XC, Yang X, Renard JP, Lewin HA. Aberrant gene expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. *Physiol Genomics*, 2008, 33(1): 65–77.
- [35] Wrenzycki C, Wells D, Herrmann D, Miller A, Oliver J, Tervit R, Niemann H. Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod*, 2001, 65(1): 309–317.
- [36] Kim HR, Naruse K, Lee HR, Han RX, Park CS, Jin DI. Abnormal expression of TIMP-2, SOD, vimentin and PAI proteins in cloned bovine placentae. *Reprod Domest Anim*, 2009, 44(4): 714–717.
- [37] Keefer CL. Artificial cloning of domestic animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(29): 8874–8878.
- [38] Chae JI, Cho SK, Seo JW, Yoon TS, Lee KS, Kim JH, Lee KK, Han YM, Yu K. Proteomic analysis of the extraembryonic tissue from cloned porcine embryos. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(9): 1559–1566.
- [39] Park JY, Kim JH, Choi YJ, Hwang KC, Cho SK, Park HH, Paik SS, Kim T, Park C, Lee HT, Seo HG, Park SB, Hwang S, Kim JH. Comparative proteomic analysis of malformed umbilical cords from somatic cell nuclear transfer-derived piglets: implications for early postnatal death. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 511.
- [40] Lee SY, Park JY, Choi YJ, Cho SK, Ahn JD, Kwon DN, Hwang KC, Kang SJ, Paik SS, Seo HG, Lee HT, Kim JH. Comparative proteomic analysis associated with term placental insufficiency in cloned pig. *Proteomics*, 2007, 7(8): 1303–1315.
- [41] Ko YG, Hwang S, Kim SW, Kim H, Seong HH, Kim JH, Song Y, Yang BS, Song YM, Cho JH. Proteomic analysis of the extraembryonic tissues from cloned porcine fetus at day 35 of pregnancy. *BMC Res Notes*, 2014, 7(1): 861.
- [42] Chae JI, Yu K, Cho SK, Kim JH, Koo DB, Lee KK, Han YM. Aberrant expression of developmentally important signaling molecules in cloned porcine extraembryonic tissues. *Proteomics*, 2008, 8(13): 2724–2734.
- [43] Fletcher CJ, Roberts CT, Hartwich KM, Walker SK, Millen IC. Somatic cell nuclear transfer in the sheep induces placental defects that likely precede fetal demise. *Reproduction*, 2007, 133(1): 243–255.
- [44] Hoffert-Goeres KA, Batchelder CA, Bertolini M, Moyer AL, Famula TR, Anderson GB. Angiogenesis in day-30 bovine pregnancies derived from nuclear transfer. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9(4): 595–607.
- [45] Borowicz PP, Johnson ML, Beraldi R, Edwards A, Grazul-Bilska AT, Thorson C, Kasinathan P, Wang Z, Robl J, Reynolds LP, Redmer DA. Vascular endothelial growth factor mRNA expression in fetal membranes during early pregnancy as a biomarker for development of hydrops placenta later in pregnancy in bovine embryos created through somatic cell nuclear transfer (SCNT). *Reprod Fertil Dev*, 2009, 21(1): 111.
- [46] Kim JH, Park JY, Park MR, Hwang KC, Park KK, Park C, Cho SK, Lee HC, Song H, Park SB, Kim T, Kim JH. Developmental arrest of scNT-derived fetuses by disruption of the developing endometrial gland as a result of impaired trophoblast migration and invasiveness. *Dev Dyn*, 2011, 240(3): 627–639.
- [47] De Sousa PA, King T, Harkness L, Young LE, Walker SK, Wilmut I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol Reprod*, 2001, 65(1): 23–30.
- [48] Palmieri C, Loi P, Reynolds LP, Ptak G, Della Salda L. Placental abnormalities in ovine somatic cell clones at term: a light and electron microscopic investigation. *Placenta*, 2007, 28(5–6): 577–584.
- [49] Park JY, Park MR, Hwang KC, Chung JS, Bui HT, Kim T, Cho SK, Kim JH, Hwang S, Park SB, Van Nguyen T, Kim JH. Comparative gene expression analysis of somatic cell nuclear transfer-derived cloned pigs with normal and abnormal umbilical cords. *Biol Reprod*, 2011, 84(1): 189–199.
- [50] Moore T, Haig D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet*, 1991, 7(2): 45–49.
- [51] Edwards CA, Ferguson-Smith AC. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(3): 281–289.
- [52] Fowden AL, Coan PM, Angiolini E, Burton GJ, Constancia M. Imprinted genes and the epigenetic regulation of placental phenotype. *Prog Biophys Mol Biol*, 2011, 106(1): 281–288.
- [53] Palmieri C, Loi P, Ptak G, Della Salda L. Review paper: a review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sheep, and mice. *Vet Pathol*, 2008, 45(6): 865–880.

- [54] Ravelich SR, Breier BH, Reddy S, Keelan JA, Wells DN, Peterson AJ, Lee RSF. Insulin-like growth factor-I and binding proteins 1, 2, and 3 in bovine nuclear transfer pregnancies. *Biol Reprod*, 2004, 70(2): 430–438.
- [55] Wei YC, Zhu J, Huan YJ, Liu ZF, Yang CR, Zhang XM, Mu YS, Xia P, Liu Z. Aberrant expression and methylation status of putatively imprinted genes in placenta of cloned piglets. *Cell Reprogram*, 2010, 12(2): 213–222.
- [56] Arnold DR, Lefebvre R, Smith LC. Characterization of the placenta specific bovine mammalian achaete scute-like homologue 2 (Mash2) gene. *Placenta*, 2006, 27(11–12): 1124–1131.
- [57] Guillomot M, Taghouti G, Constant F, Degrelle S, Hue I, Chavatte-Palmer P, Jammes H. Abnormal expression of the imprinted gene *Phlda2* in cloned bovine placenta. *Placenta*, 2010, 31(6): 482–490.
- [58] Zhang XY, Wang DX, Han YH, Duan FF, Lv QY, Li ZJ. Altered imprinted gene expression and methylation patterns in mid-gestation aborted cloned porcine fetuses and placentas. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31(11): 1511–1517.
- [59] Okae H, Matoba S, Nagashima T, Mizutani E, Inoue K, Ogonuki N, Chiba H, Funayama R, Tanaka S, Yaegashi N, Nakayama K, Sasaki H, Ogura A, Arima T. RNA sequencing-based identification of aberrant imprinting in cloned mice. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(4): 992–1001.
- [60] Su JM, Yang B, Wang YS, Li YY, Xiong XR, Wang LJ, Guo ZK, Zhang Y. Expression and methylation status of imprinted genes in placentas of deceased and live cloned transgenic calves. *Theriogenology*, 2011, 75(7): 1346–1359.
- [61] Rodrigues VHV, Tavares KCS, Lazzarotto C, Alves JPM, Neto SG, Gerger RPDC, Forell F, Bertolini LR, Bertolini M. 196 changes in metabolic expression profiles in placenta and fetal liver from bovine cloned concepti. *Reprod Fertil Dev*, 2014, 27(1): 189.
- [62] Matoba S, Liu YT, Lu FL, Iwabuchi KA, Shen L, Inoue A, Zhang Y. Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation. *Cell*, 2014, 159(4): 884–895.
- [63] Xu WH, Li ZC, Yu B, He XY, Shi JS, Zhou R, Liu DW, Wu ZF. Effects of DNMT1 and HDAC inhibitors on gene-specific methylation reprogramming during porcine somatic cell nuclear transfer. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64705.
- [64] Mao JD, Zhao MT, Whitworth KM, Spate LD, Walters EM, O'Gorman C, Lee K, Samuel MS, Murphy CN, Wells K, Rivera RM, Prather RS. Oxamflatin treatment enhances cloned porcine embryo development and nuclear reprogramming. *Cell Reprogram*, 2015, 17(1): 28–40.
- [65] Deuse T, Wang D, Stubbendorff M, Itagaki R, Grabosch A, Greaves LC, Alawi M, Grünewald A, Hu XM, Hua XQ, Velden J, Reichenspurner H, Robbins RC, Jaenisch R, Weissman IL, Schrepfer S. SCNT-derived ESCs with mismatched mitochondria trigger an immune response in allogeneic hosts. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(1): 33–38.
- [66] Khaw SL, Min-Wen C, Koh CG, Lim B, Shyh-Chang N. Oocyte factors suppress mitochondrial polynucleotide phosphorylase to remodel the metabolome and enhance reprogramming. *Cell Rep*, 2015, 12(7): 1080–1088.
- [67] Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(4): 347–355.

(责任编辑: 高绍荣)