

# 中国细胞重编程和多能干细胞研究进展

康岚<sup>2,3</sup>, 陈嘉瑜<sup>1,2</sup>, 高绍荣<sup>1,2</sup>

1. 同济大学附属第一妇婴保健院转化医学中心, 上海 201104
2. 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092
3. 同济大学附属东方医院再生医学研究所, 上海 200123

**摘要:** 近几十年是干细胞领域飞速发展的重要时期。随着中国经济实力的发展壮大, 科研实力也在稳步增强, 干细胞研究领域达到了国际并跑甚至领跑的水平。本文从体细胞核移植、诱导多能干细胞、单倍体多能干细胞和胚胎早期发育研究 4 个方面, 对中国细胞重编程和干细胞领域的研究进展进行了历史性回顾, 总结了中国科学家在相关领域所取得的重要科研成果。随着单细胞测序技术的发展, 各种发育过程将实现更为深入的解读, 干细胞的临床应用在中国也会大放异彩。

**关键词:** 重编程; 体细胞核移植; 诱导多能干细胞; 单倍体多能干细胞; 单细胞测序

## Historical review of reprogramming and pluripotent stem cell research in China

Lan Kang<sup>2,3</sup>, Jiayu Chen<sup>1,2</sup>, Shaorong Gao<sup>1,2</sup>

1. Center of Translational Medicine, First Maternal and Child Health Care Hospital, Tongji University, Shanghai 201104, China
2. School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China
3. Institute for Regenerative Medicine, Shanghai East Hospital, Tongji University, Shanghai 200123, China

**Abstract:** The research of stem cell field has developed rapidly in recent decades. With the enhancing of China's economic power, the strength of scientific research is steadily increasing, and the stem cell research even has reached international advanced level. Here, we make a historical review of important research in China, focusing on somatic cell nuclear transfer, induced pluripotent stem cells, haploid pluripotent stem cells and early embryo development. The fast development of single cell sequencing will greatly help the understanding of various development process, and the stem cell clinical application will blossom in China in the future.

收稿日期: 2018-07-20; 修回日期: 2018-08-30

基金项目: 国家重点研发计划 (编号: 2016YFA0100400) 和国家自然科学基金项目 (编号: 31721003, 81630035, 31430056, 31871489, 31871446) 资助

[Supported by the National Key R&D program of China (No. 2016YFA0100400) and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31721003, 81630035, 31430056, 31871489, 31871446)]

作者简介: 康岚, 教授, 研究方向: 干细胞与体细胞重编程。E-mail: kanglan@tongji.edu.cn

陈嘉瑜, 副教授, 研究方向: 干细胞与体细胞重编程。E-mail: chenjiayu@tongji.edu.cn

康岚和陈嘉瑜并列第一作者。

通讯作者: 高绍荣, 教授, 研究方向: 干细胞与体细胞重编程。E-mail: gaoshaorong@tongji.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-209

网络出版时间: 2018/9/11 15:24:33

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180911.1523.009.html>

**Keywords:** reprogramming; somatic cell nuclear transfer; induced pluripotent stem cells; haploid pluripotent stem cells; single cell sequencing

在国家“七五”、“八五”、“十一五”、“十二五”、“十三五”、“863 计划”、“973 计划”、“重大科学研究计划”、“重点研发计划”及自然科学基金等国家科技项目和各省部级项目的大力支持下,中国在生殖发育与干细胞领域的研究从早期跟随性研究,逐渐成长为引领世界的分子机制研究和临床转化性探索。2018 年,在中国诞生了世界第一例非人灵长类体细胞核移植克隆猴,成为该领域发展中的又一重大里程碑。中国科学家结合我国的实际情况,通过几代人的不懈努力取得了一系列重大进展,已经在干细胞研究领域跻身于世界第一梯队。本文从体细胞核移植、诱导多能干细胞、单倍体多能干细胞和胚胎早期发育研究 4 个方面对中国的重编程和多能干细胞研究进展进行了历史性回顾。

## 1 体细胞核移植的前世今生

核移植(nuclear transfer, NT),又称为体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT),更被人们所熟知的名字是克隆(cloning),是指将供体细胞核移入去除遗传物质的卵母细胞中,使细胞重获全能性的一种方法(图 1A)。值得注意的是,核移植技术是目前已知的唯一一种可以高效地、快速地使分化的细胞获得全能性的方式。该技术在过去的 60 多年里,对核质关系、细胞分化、细胞多能性、表观遗传学、发育生物学和生殖生物学等方面的研究以及转化医学和遗传资源保存等方面做出了巨大的贡献<sup>[1-4]</sup>。

### 1.1 两栖类和鱼类核移植

1952 年,美国费城 Lankenau 医学研究所的科学家 Briggs 和 King 证明,将发育至囊胚期豹蛙(*Rana pipiens*)的卵细胞核移植入去核的豹蛙卵母细胞后,所产生的胚胎可以正常发育并孵出蝌蚪<sup>[5]</sup>。这是人类第一次培育出克隆动物。然而,当他们利用囊胚阶段后期产生的更为分化的细胞作为细胞核供体进行核移植实验时,却发现这些核移植后的胚胎发育异常,最终不能获得蝌蚪<sup>[6]</sup>。该实验也表明,供体

细胞核的差异会影响体细胞重编程的能力(这一现象在几十年后的哺乳动物的克隆实验中也被进一步证实)。20 世纪 60 年代,英国牛津大学 Gurdon 等<sup>[7,8]</sup>将内胚层细胞来源的蝌蚪肠道细胞的细胞核移植入去核的爪蛙(*Xenopus laevis*)卵母细胞中,发现核移植后约 1% 的胚胎可以正常发育并形成蝌蚪和爪蛙,由此获得了全世界首例发育至性成熟的成体克隆动物。Gurdon 教授也因此项突破性的工作,与另一位日本生物学家 Shinya Yamanaka 教授(建立了 iPS 技术)分享了 2012 年诺贝尔生理学或医学奖。该项研究也证明早期胚胎发育所需要的基因,即使在分化的细胞中也可以被再激活,并且暗示了卵母细胞中具有非常重要的重编程因子,且不同品系的卵母细胞的重编程能力可能不同。在此后几年的研究中,他们将更为分化的成体细胞(adult somatic cell)的细胞核进行核移植时,仅能够获得蝌蚪,却不能得到发育至性成熟时期的蛙<sup>[9,10]</sup>。

同一时期,在历经战火和正在重生的中国,也有一位胚胎发育学家进行了相似的研究,但却鲜被国际所知。中国早期的发育生物学家、实验胚胎学主要奠基人童第周先生,师从比利时比京大学(今法语布鲁塞尔自由大学)Albert Brachet 教授和 Albert Dalcq 教授后获得动物学博士学位,于 1934 年毅然回国,在同济大学进行教学与研究工作。抗日战争时期,同济大学迁往四川李庄办学,在极其艰苦的工作环境和简陋的设备条件下,童第周先生与其夫人叶毓芬教授合作,以其超高的实验技巧进行了两栖类和鱼胚的发育和可塑性研究,通过切割、移植、离心等方法,他们以融合的胚胎、半胚胎以及离心后的胚胎为来源,获得多个异常发育的鲫鱼。新中国成立后,童第周先生于 1956 年在青岛组织举行了遗传学研讨会。该会议促使他进一步利用两栖类和鱼类的胚胎系统,研究细胞核与细胞质对胚胎命运的影响,并以自然辩证法的角度阐述核质关系。1962 年,童第周先生领导的团队将鲤鱼及鲫鱼的囊胚细胞核分离,并相互进行核移植,培育出第一尾属间核质杂种鱼,开创了异种核移植的先河,并发现了

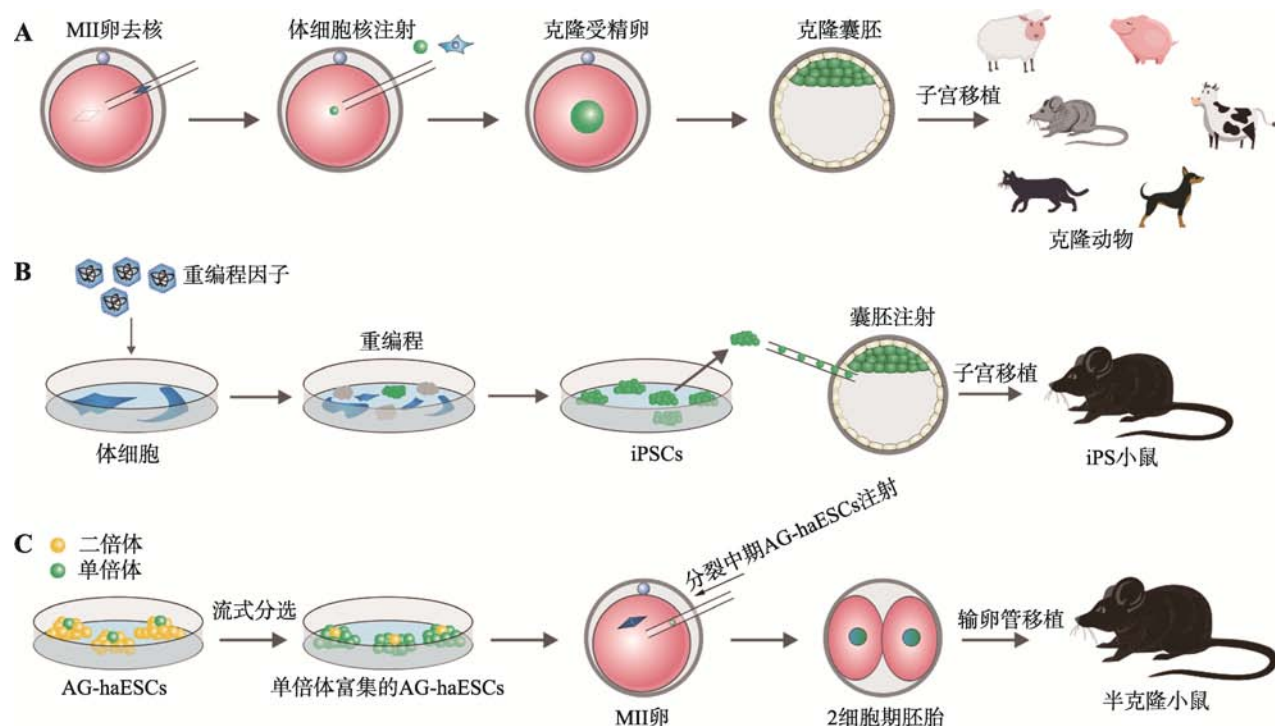


图 1 体细胞核移植、iPSC 和单倍体 ESC 的原理模式图

Fig. 1 Schematic representation of somatic cell nuclear transfer, iPSCs and haploid embryonic stem cells

A: 体细胞核移植获得克隆动物。将第二次减数分裂中期(MII)的卵细胞去核, 然后注入体细胞核, 从而得到克隆胚胎, 继而可以发育到克隆动物。B: 由 iPSC 获得 iPS 小鼠。通过将重编程因子导入到体细胞中并使其表达, 可将体细胞重编程为 iPSC, 将 iPSC 注射到囊胚或者 4 倍体囊胚, 可得到嵌合体或者全 iPSC 小鼠。C: 由单倍体 ESC 获得半克隆小鼠。孤雄单倍体胚胎干细胞(androgenetic haploid embryonic stem cells, AG-haESCs)在体外通过流式分选纯化和维持, 将分裂中期的 AG-haESCs 注射到 MII 卵细胞中, 可使其正常发育, 继而得到半克隆小鼠。

脊椎动物远缘物种间细胞核和细胞质之间的可配合性。该实验还发现, 异种核移植后的卵发育到成体后有些性状介于两种鱼之间, 由此也证明细胞质存在可影响胚胎命运的物质, 并希望进一步利用该特性产生更强壮鱼类, 以便适合生产繁殖。但由于历史原因, 该工作直到 1973 年才得以发表<sup>[11]</sup>。童第周先生在极其简陋的条件下, 用一台显微镜、一套基本手术器械和双手, 以一己之力, 穷毕生心血, 创立了中国的克隆事业, 被誉为“中国克隆之父”。此后, 1981 年中国科学院水生生物研究所陈宏溪研究员领导的课题组将成年三倍体鲫鱼的肾脏细胞核移植到二倍体鲫鱼的去核卵子里, 获得了三倍体的克隆鱼。

## 1.2 哺乳动物核移植

哺乳动物的核移植研究相对于两栖类动物更为困难, 因为哺乳动物卵母细胞的直径小, 卵母细胞

取材困难, 且数量相对较少。1975 年, 英国牛津大学 Bromhall 教授<sup>[12]</sup>将桑椹胚期细胞的细胞核移植入去核的兔卵母细胞中, 证实了这些核移植后的胚胎可以发育至桑椹胚时期。1983 年, 美国费城 Wistar 研究所 McGrath 教授和 Solter 教授通过将受精后合子的细胞核移植入去核的小鼠卵母细胞中, 最终获得了发育至成年的小鼠<sup>[13]</sup>。1986 年, 英国剑桥大学 AFRC 研究所 Willadsen 教授<sup>[14]</sup>将发育至 8-细胞或 16-细胞时期胚胎中的细胞与去核的羊卵母细胞融合后, 成功得到了健康的克隆动物。随后的几年中, 以胚胎发育期的细胞为供核细胞的核移植实验, 在兔(*Oryctolagus cuniculus*)<sup>[15]</sup>、猪(*Sus scrofa*)<sup>[16]</sup>、小鼠(*Mus musculus*)<sup>[17]</sup>、牛(*Bos taurus*)<sup>[18]</sup>以及猴(*Rhesus macaque*)<sup>[19]</sup>等动物上均取得了成功。然而, 以终末分化的体细胞为供核细胞的核移植实验, 一直难以获得存活的克隆动物。

直到 1996 年, 核移植领域取得了重大的突破。

英国爱丁堡大学 Roslin 研究所生物学家 Campbell 教授和 Wilmut 爵士(教授)等以胚胎来源的、发育至第 9 天的分化细胞为供核细胞,成功获得了健康的克隆羊<sup>[20]</sup>。该核移植实验的成功,主要是由于在核移植操作前,供核细胞经过药物处理后停滞在了特定的时期。使用类似的技术,Wilmut 爵士等利用来自成年羊的乳腺上皮细胞的细胞核,获得了健康存活的、可发育至成年的绵羊,即著名的“多莉”(Dolly)羊<sup>[21]</sup>。由此,以终末分化的体细胞为供核细胞的核移植研究迈入了一个新的篇章。随后,体细胞核移植先后在牛(1998 年)<sup>[22]</sup>、小鼠(1998 年)<sup>[23]</sup>、山羊(*Capra hircus*) (1999 年)<sup>[24]</sup>、猪(2000 年)<sup>[25, 26]</sup>、猫(*Felis domesticus*) (2002 年)<sup>[27]</sup>和兔(2002 年)<sup>[28]</sup>等多种动物中获得了成功(表 1)。中国科学院动物研究所周琪研究员在法国国家农业科学研究院(INRA)完成了世界上第一例克隆大鼠(*Rattus norvegicus*)的制作<sup>[29]</sup>。2005 年,韩国国立首尔大学黄禹锡教授领导的研发团队完成了狗(*Canis lupus familiaris*)的克隆<sup>[30]</sup>。这些重要的研究成果均证明,许多哺乳动物的体细胞基因组,甚至那些终末分化的细胞在进行核移植后,是能够被重新激活的,它们可以表达正常发育所需的全部基因并最终产生存活的克隆动物。同时,这些研究也表明在分化过程中细胞基因组上的发育限制是可逆的遗传学和表观遗传修饰变化,而卵母细胞中一定含有某些重要的物质能够有效地将终末分化的体细胞进行重编程。

自 1990 年后,中国科学家也扎根于祖国大地进行了多种哺乳动物的克隆研究工作,并利用最新的技术获得了胚胎细胞或体细胞克隆动物。在克隆羊领域,1991 年西北农林科技大学张涌教授团队成功获得了胚胎细胞核移植的山羊,并在 2000 年成功获得了存活的、有生育能力的体细胞克隆山羊“阳阳”。在克隆牛领域,1995 年中国第一头胚胎细胞克隆牛在广西农业大学完成。2002 年,中国科学院动物研究所陈大元研究员在国家自然科学基金重点项目支持下,利用牛耳上皮成纤维细胞为供体细胞,获得了 14 头存活的克隆牛,由此真正实现了中国体细胞克隆牛的零突破。在克隆猪方面,2005 年中国农业大学李宁教授研究团队成功获得了体细胞克隆香猪;2007 年,东北农业大学刘忠华教授研究团队成功完

表 1 代表性哺乳动物克隆汇总

Table 1 List of cloned mammalian species

年份	物种	细胞来源
1997	绵羊( <i>Ovis aries</i> )	成体乳腺上皮细胞 <sup>[21]</sup>
1998	奶牛( <i>Bos taurus</i> )	胚胎成纤维细胞 <sup>[31]</sup> 、 成体卵丘颗粒细胞 <sup>[22]</sup>
1998	小鼠( <i>Mus musculus</i> )	成体卵丘颗粒细胞 <sup>[23]</sup>
1998	山羊( <i>Capra hircus</i> )	胚胎成纤维细胞 <sup>[24]</sup>
1999	猪( <i>Sus scrofa</i> )	胚胎成纤维细胞 <sup>[26]</sup> 、 壁层颗粒细胞 <sup>[25]</sup>
2002	兔( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	成体卵丘颗粒细胞 <sup>[28]</sup>
2002	猫( <i>Felis domesticus</i> )	成体卵丘颗粒细胞 <sup>[27]</sup>
2003	马( <i>Equus caballus</i> )	成体成纤维细胞 <sup>[32]</sup>
2003	大鼠( <i>Rattus norvegicus</i> )	胚胎成纤维细胞 <sup>[29]</sup>
2005	狗( <i>Canis lupus familiaris</i> )	成体成纤维细胞 <sup>[30]</sup>
2006	雪貂( <i>Mustela putorius furo</i> )	成体卵丘颗粒细胞 <sup>[33]</sup>
2007	水牛( <i>Bubalus bubalis</i> )	胚胎成纤维细胞和 壁层颗粒细胞 <sup>[34]</sup>
2010	骆驼( <i>Camelus dromedarius</i> )	成体卵丘颗粒细胞 <sup>[35]</sup>
2018	食蟹猴( <i>Macaca fascicularis</i> )	胚胎成纤维细胞 <sup>[36]</sup>

成了东北农民猪的体细胞克隆猪的制作<sup>[37]</sup>。

1999 年之后,陈大元研究员进一步继承并发展了其恩师童第周先生的异种克隆工作,展开了包括大熊猫在内的多种哺乳动物之间的异种克隆研究,并对异种克隆胚胎的体外发育潜能、异种着床情况及供体和受体线粒体含量的动态变化特征等展开了系统研究<sup>[38~47]</sup>。陈大元研究员所领导的团队将大熊猫的体细胞核移植到去核的兔卵母细胞中,发现这些异种克隆胚胎有一定比例可在体外发育至囊胚阶段。他们还进一步将这些异种克隆胚胎移植入假孕兔或猫的输卵管内,观察并记录了异种胚胎的着床和发育情况<sup>[40, 41]</sup>。

### 1.3 核移植中的表观遗传研究

21 世纪,随着克隆技术和相关仪器的进一步优化以及测序技术尤其是微量组学技术的发展,克隆胚胎的研究进入了分子水平和人类疾病治疗探索阶段。继童第周先生之后的中国第三代克隆胚胎研究的科学家,也登上了世界舞台。多年以来,体细胞核移植的效率一直较低,其中供体细胞 DNA 甲基化和组蛋白修饰的不完全重编程被认为是造成低效率



的重要原因。英国剑桥大学 Babraham 研究所 Reik 教授领导的团队发现核移植胚胎中存在异常的甲基化水平, 原第二军医大学刘厚奇教授团队和东北农业大学刘忠华教授团队也分别证实降低核移植胚胎中的 DNA 甲基化有助于提高核移植胚胎的发育潜能<sup>[48-51]</sup>。此外, 许多报道也证实了核移植胚胎中存在异常的组蛋白修饰, 而组蛋白乙酰化酶抑制剂 TSA 和 Scriptaid 可显著提高核移植胚胎的发育率<sup>[52]</sup>。2007 年, 北京生命科学研究高绍荣教授课题组揭示了核移植胚胎发育第一个细胞分裂周期中, 组蛋白 H3K9、H3K14、H4K16、H4K8 和 H4K12 上乙酰化修饰的动态变化规律, 并进一步发现 H3K9me3 和 H3K9me2 在核移植后逐渐去甲基化<sup>[53]</sup>。2011 年, 中国科学院生物化学与细胞生物学研究所李劲松研究员课题组将克隆囊胚的内细胞团与正常胚胎融合后的四倍体胚胎进行聚合, 由此替换了克隆胚胎的滋养外胚层细胞, 不仅将克隆小鼠的生率提高了 6 倍, 也同时证实了克隆囊胚的滋养外胚层存在缺陷<sup>[54]</sup>。此后, 高绍荣教授课题组还证实克隆技术相比于 iPS 技术, 能更好地恢复体细胞中受损的端粒长度及线粒体功能<sup>[55]</sup>, 并进一步利用超高难度的单胚胎多次显微操作技术, 深入探讨了小鼠受精卵中雌雄原核的不对称重编程能力, 证明了重编程因子主要集中在雄原核内<sup>[56]</sup>。2014 年, 哈佛大学霍华德休斯医学研究所张毅教授提出体细胞基因组 H3K9me3 是体细胞核移植的一个主要障碍, 过表达 H3K9 去甲基化酶或降低体细胞中 H3K9me3 水平能极大改善核移植的效率<sup>[57]</sup>。此后, 同济大学高绍荣教授课题组和张勇教授课题组联合通过建立早期克隆胚胎命运追溯系统, 结合单细胞/微量细胞测序技术, 绘制了不同发育命运胚胎细胞的基因表达图谱, 也进一步证实 H3K9me3 是体细胞核移植胚胎表观重编程的一个主要障碍, 同时也证明体细胞基因组上 H3K4me3 的存在也是体细胞基因组不能被完美重编程的一个障碍<sup>[58]</sup>。2018 年, 张毅教授和高绍荣教授课题组再次发表相关工作, 分别证明 H3K27me3 和 DNA 再甲基化是克隆胚胎发育的表观遗传障碍<sup>[59, 60]</sup>。

#### 1.4 人克隆胚胎干细胞研究

多种哺乳动物的卵母细胞均具有重编程体细胞

的能力, 那么建立人(*Homo sapiens*)的克隆胚胎干细胞系, 似乎为胚胎干细胞及其分化细胞的应用提供了非常好的供体细胞来源。然而, 出于道德及伦理学上的考虑, 许多国家法律明令禁止人类克隆实验。人类克隆胚胎干细胞研究相对于传统的人类胚胎干细胞研究, 面临着更大的道德挑战, 因为建立人类克隆胚胎干细胞系需要他人胚胎的供给, 这可能造成人类胚胎的非法买卖, 使得人类胚胎变为建立克隆细胞系的工具。此外, 有限的人类卵母细胞数量也是人类体细胞核移植研究中不得不面临的难题。人类克隆胚胎干细胞的研究至关重要的一点既是建立人类克隆胚胎干细胞系。过去的十几年里, 全世界的科学家一直在致力于人类细胞相关的克隆研究, 却均未能成功获得人类克隆胚胎干细胞系。虽然在 2005 年韩国黄禹锡教授领导的团队声称建立了病人特异的胚胎干细胞, 但这一研究却被最终定性为欺诈丑闻<sup>[61]</sup>。人类克隆胚胎面临的一个主要问题是克隆胚胎的早期发育阻滞, 进而阻止了稳定的胚胎干细胞系的建立, 这可能是由于作为供体的成体细胞核不能激活胚胎发育的关键基因所导致, 表现为大部分的克隆胚胎在到达 8-细胞期之后就失去了进一步发育的潜能<sup>[62]</sup>。在一些极少的案例中, 即使克隆胚胎能够发育至囊胚阶段, 稳定的胚胎干细胞系依然不能被成功建立<sup>[63]</sup>。虽然早期胚胎发育阻滞的根本原因仍不清楚, 绝大多数涉及到人类卵母细胞的核移植实验, 采用的却是为非灵长类动物设计的核移植实验方法。因此, 实验技术方法的不完善也可能是造成相关人类核移植胚胎干细胞建立失败的原因之一。

2007 年, 美国俄勒冈健康与科学大学 Mitalipov 教授所领导的科研团队以恒河猴的皮肤成纤维细胞作为供核细胞, 成功建立了灵长类动物的克隆胚胎干细胞系<sup>[64]</sup>。因此, 有理由推断包括人类在内的灵长类动物的卵母细胞应该与其他哺乳类动物一样, 也具有重编程体细胞的能力。在随后几年的科学工作中, Mitalipov 教授课题组以恒河猴为实验动物模型, 探索灵长类动物核移植技术的操作方法以提高核移植后胚胎的囊胚形成率和建系效率。他们通过调整细胞融合方法、移植后胚胎激活方法以及在培养液中添加一些特殊的因子, 最终在 2013 年建立了

世界上首例人类克隆胚胎干细胞系,并发现人类体细胞重编效率与受体人类卵母细胞的质量息息相关<sup>[65]</sup>。由此,人类体细胞核移植研究迈入了一个崭新的阶段。随后研究人员利用成年人和老年人的体细胞核作为供体,成功构建了人的核移植胚胎干细胞系,并发现在核移植操作后激活之前,略微延长孵育期可以提高克隆胚胎的发育效率<sup>[66]</sup>。此后,由 I 型糖尿病患者得到的核移植胚胎干细胞也被成功建立,并被证明可以分化形成能产生胰岛素的  $\beta$  细胞<sup>[67]</sup>。以体细胞核移植技术为基础获得的克隆胚胎干细胞中,几乎所有的线粒体均来自于受体卵母细胞,在面对线粒体功能缺陷相关的疾病时,人核移植技术为患有此类疾病的患者提供了一个可能的治疗手段。然而,传统核移植方法携带的少量供体线粒体可能存在竞争优势,最终在发育过程中取代受体线粒体并发挥功能<sup>[68]</sup>。2014 年,复旦大学医学神经生物学国家重点实验室沙红英博士等利用极体作为供体 DNA,在两种不同线粒体遗传背景的小鼠之间进行了核移植研究,证明了极体移植可以极大程度防止母源性遗传疾病的发生,为阻断线粒体遗传病研究提供了思路<sup>[69]</sup>。2017 年,Mitalipov 教授课题组实现了人胚胎第一极体的核移植<sup>[70]</sup>。

## 1.5 克隆猴的诞生

在 1997 年“Dolly”羊出生后的 20 年间,体细胞核移植无论在技术还是理论、细胞还是分子水平上都取得了多项重量级成果,已有超过 20 种哺乳动物通过体细胞核移植技术,获得了可存活的克隆动物。然而,通过该技术实现非人灵长类动物的克隆却一直未能实现。早在克隆羊工作被报道当年,美国俄勒冈灵长类动物研究中心孟励博士就以恒河猴 4-细胞胚胎的卵裂球为供体细胞核,获得了第一只“克隆猴”<sup>[71]</sup>(非体细胞克隆)。2000 年,该中心利用胚胎分裂法获得了“克隆猴”Tetra<sup>[72]</sup>(非体细胞克隆)。然而,这两项工作并未获得学术界的较大关注,因为其实并非体细胞核移植!2018 年 1 月,中国科学院上海神经科学研究所孙强研究员领导的团队,利用 TSA 和 Kdm4d 的组合处理,首次真正意义上利用体细胞核移植技术完成了体细胞克隆猴(食蟹猴)的制作,两只存活的食蟹猴分别被命名为“中中”

和“华华”(均由胚胎成纤维细胞核为供体进行核移植后获得)<sup>[36]</sup>。但是,利用更为终末分化的卵丘颗粒细胞作为供体时,克隆猴出生后却未能继续存活,提示非人灵长类的体细胞核移植技术仍然有待进一步改善,更提醒人们不仅在伦理上,现在的技术瓶颈也不允许进行克隆人的尝试。

经过几十年的努力,中国科学家在体细胞核移植、灵长类动物模型研究和早期胚胎发育机制方面取得了一系列重大突破,已经处于世界领先水平。然而,动物克隆依然是一项成功率低、成本高昂的实验,其短期内转化应用的前景仍不明朗。克隆技术虽然被认为可以用于挽救濒临灭绝的动物(如前述陈大元研究员的克隆熊猫研究),甚至可能将那些已经灭绝在历史长河中的动物再度“复活”,但是目前这些尝试仍处于早期的科学研究阶段。然而,就宠物市场而言,克隆狗似乎是目前已知最好的克隆技术的商业化应用。目前,韩国多家单位已经利用该技术,将优质警犬进行克隆用于安保,而竞赛型犬的保种与克隆也具有极大市场。此外,近年来基因编辑技术的发展及其与克隆技术的逐渐结合,也将推进克隆技术的推广和应用。

## 2 从胚胎干细胞到诱导多能干细胞

干细胞是一类具有自我更新和多向分化能力的细胞,这一“干性”使它们具有巨大的应用潜力。干细胞在生物体内和发育过程中广泛存在,根据其所在的组织和功能可分为造血干细胞、肌肉干细胞和神经干细胞等;根据发育阶段可分为胚胎干细胞和成体干细胞;根据分化潜能可分为全能干细胞、多能干细胞和单能干细胞。这些细胞在组织器官发育、功能维持和损伤修复上起到重要作用。

### 2.1 早期干细胞研究

造血干细胞最早被应用于临床。早在 20 世纪 50 年代,美国华盛顿大学医学院 E. Donnall Thomas 成功地应用双胞胎间的骨髓移植治疗白血病。1969 年,经过组织配型和抗抑制剂药物的作用,首次成功地进行了异体骨髓移植。1964 年,陆道培院士成功主持完成了亚洲首例骨髓移植,用于治疗再生障碍性

贫血,并在 1981 年成功完成中国首例异基因骨髓移植。吴祖泽院士作为中国造血干细胞研究的奠基人,在国际上首次获得人源性干细胞生长因子,完成了世界首例胎肝造血干细胞移植治疗急性重度骨髓型放射病人,被誉为“中国造血干细胞之父”。

1981 年,英国剑桥大学 Evans 和 Kaufman<sup>[73]</sup>首次通过体外培养从囊胚期小鼠胚胎得到具有多能性的胚胎干细胞。1998 年,美国威斯康辛大学 Thomson 实验室成功建立了人胚胎干细胞<sup>[74]</sup>,使以细胞治疗为基础的再生医学得到更加广泛的关注。从 2000 年开始,在“973 计划”和“863 计划”项目的支持下,中国干细胞研究得以蓬勃发展,陆续建立起各个干细胞研究中心,培养了大批人才,并开始在国际上发声。1994 年成立的中国科学院分子发育生物学重点实验室(现分子发育生物学国家重点实验室)是中国在发育生物学领域建立最早的重点实验室,通过细胞核移植和转基因技术得到中国第一批克隆羊和转基因羊。1999 年,盛慧珍博士从美国 NIH 回国,在上海市科委和上海第二医科大学的支持下,建立了上海市发育生物学重点实验室,2003 年发表了关于异种细胞融合的文章,通过将人皮肤细胞与兔卵细胞融合,获得胚胎干细胞,首次将人类体细胞重编程,证明“治疗性克隆”的可行性<sup>[75]</sup>。2000 年,李凌松博士从美国斯坦福大学回国并创建北京大学干细胞研究中心,该中心长期从事干细胞功能基因及相关疾病应用的研究。此后,李凌松教授作为首席科学家主持了中国胚胎干细胞研究领域最早的“973 计划”项目(之一),通过该项目支持了一批目前中国胚胎干细胞研究的中坚力量(周琪院士与裴端卿研究员是该 973 项目骨干)。此后,李凌松教授还参与创建了中国第一家干细胞公司——“北科生物”。

## 2.2 诱导多能干细胞

2006 年是干细胞研究领域最振奋人心的一年。基于对胚胎干细胞基因表达模式以及其特异性基因的研究,日本京都大学 Shinya Yamanaka 实验室发现了本世纪干细胞领域最激动人心的研究之一——诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)

(图 1B)<sup>[76]</sup>。他们用 4 个转录因子——Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 成功地完成体细胞向 iPSC 的重编程。这一发现打破了多能干细胞临床应用中细胞来源和伦理问题的局限,可以有效实现病人特异性 iPSC 的建立及个性治疗,开辟了重编程和再生医学的全新领域。Yamanaka 也因为此项贡献与 John Gurdon 分享了 2012 年的诺贝尔生理学或医学奖。2007 年, Yamanaka 和 Thomson 实验室分别成功建立了人的 iPSC<sup>[77, 78]</sup>。同年,麻省理工学院怀特黑德生物医学研究所 Jaenisch 实验室将 iPSC 技术应用于镰刀型贫血的小鼠模型的治疗上,提出利用 iPSC 治疗单基因遗传疾病的策略<sup>[79]</sup>。2009 年,同济大学生命科学与技术学院高绍荣教授(时任北京生命科学研究员)课题组将这一策略应用于地中海贫血症患者来源的细胞,获得病人特异的功能恢复的造血细胞<sup>[80]</sup>。此后,大量工作报道了利用 iPSC 技术获得病人特异性多能性细胞,可应用于单基因遗传病治疗模型和患者特异性病理筛查。

作为多能性细胞, iPSC 是否真的具有多能性,是 iPSC 技术投入应用前必须回答的问题,尤其是 2006 年 Yamanaka 发表的工作中 iPSC 甚至没能产生嵌合体小鼠。2009 年,周琪院士和高绍荣教授两个课题组同时发表独立工作,通过四倍体胚胎互补得到了完全由 iPSC 来源的 iPSC 小鼠,证明 iPSC 能够具备完全多能性,至此打破了对 iPSC 质量的质疑,使 iPSC 技术的发展更进一步,该成果被美国 TIMES 评为 2009 年世界十大医学突破之一<sup>[81, 82]</sup>。2010 年,通过对具备和不具备完全多能性的小鼠 iPSC 的基因表达对比,美国哈佛医学院 Hochedlinger 和周琪院士课题组都找到了位于染色体 12qF1 区域的 Dlk1-Dio3 基因簇,该基因簇的转录产物,尤其是 Gtl2 和 Rian,在嵌合体实验中嵌合率很低,并且在不具备完全多能性的 iPSC 细胞系中被异常沉默,但在具有完全多能性的 iPSC 中则表达正常,因此该区域的表达情况有潜力作为完全多能性 iPSC 的候选标记<sup>[83, 84]</sup>。2017 年,邓宏魁教授课题组成功建立同时具有胚胎和胚外组织分化能力的 EPSC(extended pluripotent stem cells),更加拓宽了人们对多能细胞的认识和应用期望<sup>[85]</sup>。



经典的 iPSC 建立需要利用逆转录病毒将重编程因子导入体细胞使其实现过表达,而无论转基因还是逆转录病毒的使用都是阻碍 iPSC 技术走上临床的重要因素。在数年的时间里,国内外科学家进行了大量尝试,影响基因组稳定性的逆转录病毒可以用腺病毒、瞬时表达质粒甚至 mRNA 或重组蛋白来代替,而部分重编程因子也不断被发现可以被化学小分子所取代。2013 年,北京大学干细胞研究中心邓宏魁教授课题组成功实现了完全利用小分子化合物诱导小鼠体细胞重编程为 CiPSC,实现了 iPSC 技术的革命性突破<sup>[86]</sup>。结合过去研究中业已成熟的培养技术,获得临床使用标准的病人特异性多能干细胞的目标已经触手可及。

重编程过程实现了两种完全不同的细胞类型的转变以及多能性的重新建立,深入探究该过程的机制对于理解“细胞命运如何决定”这一细胞生物学关键科学问题具有重要意义。在十几年的发展中,本领域科学家从基因表达模式、细胞分群分期、动力学模型、信号通路调控、表观遗传变化特点和调控等方面对 iPSC 建立过程中的分子机制进行了大量深入探究。在此期间,中国科学家也做出了卓越贡献。2010 年,裴端卿研究员课题组首次发现维生素 C 可以大幅提高 iPSC 的诱导效率<sup>[87]</sup>,该方法在国际上受到广泛认可和应用;同年,该课题组又与加拿大 Wrana 实验室同时发表独立文章,首次发现重编程早期的 MET 现象<sup>[88]</sup>。之后,裴端卿研究员课题组和中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所徐国良研究员课题组合作发表两篇论文,深入阐述了在维生素 C 大幅提高 iPSC 诱导效率和重编程 MET 过程中表观修饰蛋白 TET、TDG 发挥的重要功能<sup>[89,90]</sup>。2013 年,裴端卿研究员课题组又发现表观修饰 H3K9 甲基化是完全重编程的屏障之一<sup>[91]</sup>。同年,高绍荣教授课题组首次揭示了 TET1 及 5hmC 参与了细胞多能性的获取和整体表观体系的重建<sup>[92]</sup>。邓宏魁教授课题组发现促进分化的关键基因可以替代多能性关键基因,实现体细胞重编程,为研究细胞命运决定提供了全新的视角<sup>[93]</sup>。2017 年和 2018 年,裴端卿研究员课题组利用 ATAC (Assay for Transposase-Accessible Chromatin)测序分别阐述了经典重编程和小分子药物诱导重编程过程中的染色

质开放状态的动态变化特点<sup>[94,95]</sup>。2018 年,利用单细胞 RNA 测序,邓宏魁教授课题组发现小分子药物诱导重编程过程中存在早期胚胎特点,为理解该过程提供新的线索<sup>[96]</sup>。

虽然 iPSC 的机制并未完全解析,多能干细胞的分化方法也没有完全成熟,但基于未来 iPSC 在临床上获得大量应用的预期前景,中国与日本、英国都开始建立临床级的 HLA 配型的人 iPSC 细胞库,以期在技术和政策都成熟以后,获得迅速广泛的临床应用。

### 3 为应用而生的单倍体多能干细胞

所有哺乳动物的体细胞都具有来自双亲的两套基因组,只有一套染色体的单倍性只存在于配子(gamete)中。自然界中很少有单倍体动物,只在少数非脊椎动物中存在单倍体动物,如螨虫(*Sarcoptes scabiei*)、黄蜂(*Wasp*)。在脊椎动物中,单倍体动物仅存在于实验研究中。例如,单倍体的斑马鱼胚胎能发育到器官形成但不能发育到成熟阶段<sup>[97]</sup>。在哺乳动物中,通过激活成熟卵母细胞或者将精子注入到去核卵母细胞中能够分别得到孤雌或者孤雄的单倍体胚胎<sup>[98,99]</sup>,然而小鼠单倍体胚胎发育到囊胚的效率较低,胚胎植入之后出现明显的发育缺陷,只能发育到卵圆柱期(egg cylinder stage)<sup>[100]</sup>。2009 年,Yi 等<sup>[101]</sup>首次获得青鳉鱼(*Oryzias latipes*)的单倍体胚胎干细胞。2011 年,Elling 和 Leeb 等研究小组同时报道了小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞的建立和体外维持并用于遗传筛选<sup>[102-104]</sup>。随后,李劲松研究员和周琪院士课题组同时报道了两种建立孤雄单倍体胚胎干细胞的方法,并突破性地将该孤雄单倍体胚胎干细胞注入到成熟的卵母细胞,成功制作了可发育至成年并具有生殖系传递能力的半克隆小鼠(图 1C)<sup>[105,106]</sup>。此外,李劲松研究员课题组还发现同时敲除 *H19* 和 *Gtl2* 差异甲基化区域,可显著提高制作半克隆小鼠的效率<sup>[107]</sup>。随后,李劲松研究员和周琪院士课题组又分别成功建立了食蟹猴<sup>[108]</sup>和大鼠<sup>[109]</sup>的孤雄单倍体胚胎干细胞系。2016 年,人孤雌单倍体胚胎干细胞也终于被成功建立<sup>[110,111]</sup>。单倍体胚胎干细胞具有干细胞的多能性、多分化潜能和单倍性,通过与基因组编辑系统的联合,具有巨大的基因功



能研究和表型筛选的意义, 在生物医学研究和隐性基因功能研究方面具有二倍体研究工具不能相比的优势。

#### 4 单细胞测序技术支持下的胚胎早期发育研究

早期胚胎发育经历了从全能性受精卵到多能性囊胚的过程, 是胚胎干细胞的来源, 也是理解细胞命运决定的重要生物过程, 其分子基础是基因转录及表观遗传修饰的精确调控。DNA 甲基化、组蛋白修饰、核小体定位及染色质高级结构等表观遗传状态, 在这些命运转变过程中均扮演着重要角色。尽管国内外科学家已经取得了一系列进展, 但目前国际上对于该类命运转变过程中细胞间表观遗传信息的差异、相互作用及其与细胞命运关联的研究仍然比较初步。传统方式使用大量细胞产生的表观遗传组学数据掩盖了细胞间非对称性信息, 仅能得到众多细胞的平均信号。因此, 近几年单细胞测序技术的长足发展极大地促进了胚胎早期发育的研究。

近几年, 基于第三代测序技术的单细胞技术, 特别是以多重退火和成环循环扩增(multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)技术为代表的单细胞全基因组测序技术, 以及以 SMART-seq 技术为代表的单细胞 mRNA 测序技术等得到了快速的发展, 并被广泛地应用于稀缺材料或细胞个体差异巨大的研究领域中, 极大地扩展了人们对于发育、生殖以及癌症等相关领域的了解。无论是技术还是科研成果, 中国多家研究单位已在该领域达到了国际顶尖水平。2013 年, 北京大学汤富酬教授课题组和同济大学范国平教授课题组, 率先利用微量 RNA-seq 技术, 分别报道了人和鼠胚胎发育过程中转录组的动态变化<sup>[112, 113]</sup>。2014 年, 北京大学谢晓亮教授课题组、汤富酬教授课题组和北京大学第三医院乔杰院士课题组联合利用单细胞 DNA 检测技术, 在不破坏卵和胚胎本身结构的情况下, 建立了母源性遗传病胚胎诊断的新方法, 世界上第一例“MALBAC 婴儿”在北医三院诞生, 标志着中国胚胎植入前遗传诊断技术处于世界领先水

平<sup>[114]</sup>。此外, 汤富酬教授课题组首次建立了单细胞 RRBS (reduced representation bisulfite sequencing) 方法<sup>[115]</sup>, 并利用微量甲基化测定技术, 研究了人类早期胚胎发育和原始生殖细胞发育中的甲基化组改变<sup>[116, 117]</sup>。中国科学院北京基因组研究所刘江研究员使用斑马鱼<sup>[118]</sup>和小鼠<sup>[119]</sup>为模型, 揭示了子代甲基化图谱继承和重编程的规律, 研究成果首次证明除了基因组 DNA 外, 表观遗传信息也可以遗传到子代。2016 年, 高绍荣教授课题组和清华大学颀伟教授课题组同时发表论文, 利用微量细胞 ChIP-seq 技术, 从全基因组水平上揭示了小鼠从配子到植入前胚胎发育过程中组蛋白修饰 H3K4me3 和 H3K27me3 遗传和重编程的模式和分子机制<sup>[120, 121]</sup>。2018 年, 高绍荣教授课题组的研究进一步揭示了异染色质的标志组蛋白修饰 H3K9me3 在配子细胞以及受精后和早期胚胎发育过程中的重编程与其在逆转座子沉默中的作用及调控机制<sup>[122]</sup>。2017 年, 刘江研究员课题组和颀伟教授课题组同时发表文章, 揭示染色体 3D 高级结构在配子中的特殊状态以及如何在胚胎发育过程中变化而影响胚胎的发育<sup>[123, 124]</sup>。同年, 汤富酬教授课题组又开发出单细胞多组学测序技术, 首次在单细胞分辨率, 解析了人类着床前胚胎发育过程中 DNA 甲基化组和染色质状态组的重编程过程, 以及染色质状态与 DNA 甲基化之间的相互关系等关键生物学特征<sup>[125]</sup>。

由于单细胞测序技术的简化和成本大幅降低, 对组织中数以万计的细胞进行单细胞测序成为可能。2018 年, 浙江大学郭国骥教授课题组发表了里程碑式的研究成果, 利用自主开发的一套完全国产化的 Microwell-seq 高通量单细胞测序平台, 对来自小鼠近 50 种器官和组织 40 余万个细胞进行了系统性的单细胞转录组分析, 并构建了首个哺乳动物细胞图谱<sup>[126]</sup>。同年, 汤富酬教授和中国科学院生物物理研究所王晓群研究员课题组绘制了人胚胎前额皮层和消化系统发育过程的单细胞图谱<sup>[127, 128]</sup>。相信在不远的将来, 解析胚胎发育中各个谱系细胞分化过程中的表达图谱和分子机制将被解析, 并促使干细胞体外分化体系不断完善, 助力干细胞治疗真正走上临床。

## 5 结语与展望

近几十年是干细胞领域飞速发展的时期, 优秀成果不胜枚举。随着中国经济实力的发展壮大, 科研实力也在稳步增强, 加之经费和政策的支持, 干细胞研究领域达到了国际并跑甚至领跑的水平, 在体细胞核移植、诱导多能干细胞、单倍体多能干细胞和胚胎早期发育方面都做出了巨大的贡献。近年来, 单细胞多水平测序技术的发展极大地推动了人们对重编程和胚胎发育的理解, 也将对重编程和干细胞的机制做出更为细致的解读。同时, 对组织器官发育过程全细胞的单细胞测序, 对细胞谱系的产生、维持、分化以及功能形成都提供了巨大信息, 为干细胞体外分化技术的成熟起到重要的促进作用。相信在不久的将来, 干细胞将在许多临床应用方向上大放异彩, 而中国也将是其高速发展的舞台。

## 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. [\[DOI\]](#)
- [2] Obach B. Climbing Mount Efficiency--small steps, not giant leaps towards higher cloning success in farm animals. *Reprod Domest Anim*, 2008, 43(Suppl. 2): 407–416. [\[DOI\]](#)
- [3] Vajta G. Somatic cell nuclear transfer in its first and second decades: successes, setbacks, paradoxes and perspectives. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15(5): 582–590. [\[DOI\]](#)
- [4] Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 2010, 465(7299): 704–712. [\[DOI\]](#)
- [5] 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. [\[DOI\]](#)
- [6] King TJ, Briggs R. Changes in the nuclei of differentiating gastrula cells, as demonstrated by nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1955, 41(5): 321–325. [\[DOI\]](#)
- [7] Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*, 1962, 10: 622–640. [\[DOI\]](#)
- [8] Gurdon JB, Uehlinger V. "Fertile" intestine nuclei. *Nature*, 1966, 210(5042): 1240–1241. [\[DOI\]](#)
- [9] Laskey RA, Gurdon JB. Genetic content of adult somatic cells tested by nuclear transplantation from cultured cells. *Nature*, 1970, 228(5278): 1332–1334. [\[DOI\]](#)
- [10] Gurdon JB, Laskey RA, Reeves OR. The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs. *J Embryol Exp Morphol*, 1975, 34(1): 93–112. [\[DOI\]](#)
- [11] Tung TC, Tung YFY, Luh TY, Tung SM, Tu M. Transplantation of nuclei between two subfamilies of teleosts (goldfish-domesticated carassius auratus, and chinese bitterling-rhodeus sinensis). *Acta Zoologica Sinica*, 1973, 19(3): 201–212.  
童第周, 叶毓芬, 陆德裕, 童夙明, 杜森. 鱼类不同亚科间的细胞核移植. *动物学报*, 1973, 19(3): 201–212. [\[DOI\]](#)
- [12] Bromhall JD. Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature*, 1975, 258(5537): 719–722. [\[DOI\]](#)
- [13] McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J Exp Zool*, 1983, 228(2): 355–362. [\[DOI\]](#)
- [14] Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 1986, 320(6057): 63–65. [\[DOI\]](#)
- [15] Stice SL, Robl JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod*, 1988, 39(3): 657–664. [\[DOI\]](#)
- [16] Prather RS, Sims MM, First NL. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod*, 1989, 41(3): 414–418. [\[DOI\]](#)
- [17] Cheong HT, Takahashi Y, Kanagawa H. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol Reprod*, 1993, 48(5): 958–963. [\[DOI\]](#)
- [18] Sims M, First NL. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(13): 6143–6147. [\[DOI\]](#)
- [19] Meng L, Ely JJ, Stouffer RL, Wolf DP. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol Reprod*, 1997, 57(2): 454–459. [\[DOI\]](#)
- [20] Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, 380(6569): 64–66. [\[DOI\]](#)
- [21] Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385(6619): 810–813. [\[DOI\]](#)

- [22] Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282(5396): 2095–2098. [DOI]
- [23] Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394(6691): 369–374. [DOI]
- [24] Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, Pollock JS, Destremes MM, Cammuso C, Williams JL, Nims SD, Porter CA, Midura P, Palacios MJ, Ayres SL, Denniston RS, Hayes ML, Ziomek CA, Meade HM, Godke RA, Gavin WG, Overstrom EW, Echelard Y. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(5): 456–461. [DOI]
- [25] Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407(6800): 86–90. [DOI]
- [26] Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289(5482): 1188–1190. [DOI]
- [27] Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, Buck S, Murphy K, Lyons L, Westhusin M. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, 415(6874): 859. [DOI]
- [28] 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. [DOI]
- [29] Zhou Q, Renard JP, Le Friec G, Brochard V, Beaujean N, Cherifi Y, Fraichard A, Cozzi J. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science*, 2003, 302(5648): 1179. [DOI]
- [30] Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hossein MS, Kim JJ, Kang SK, Schatten G, Hwang WS. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*, 2005, 436(7051): 641. [DOI]
- [31] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de León FA, Robl JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 1998, 280(5367): 1256–1258. [DOI]
- [32] 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. [DOI]
- [33] Li Z, Sun X, Chen J, Liu X, Wisely SM, Zhou Q, Renard JP, Leno GH, Engelhardt JF. Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev Biol*, 2006, 293(2): 439–448. [DOI]
- [34] Shi D, Lu F, Wei Y, Cui K, Yang S, Wei J, Liu Q. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol Reprod*, 2007, 77(2): 285–291. [DOI]
- [35] Wani NA, Wernery U, Hassan FA, Wernery R, Skidmore JA. Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2010, 82(2): 373–379. [DOI]
- [36] Liu Z, Cai Y, Wang Y, Nie Y, Zhang C, Xu Y, Zhang X, Lu Y, Wang Z, Poo M, Sun Q. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2018, 172(4): 881–887, e887. [DOI]
- [37] 朱士恩. 中国动物繁殖学科 60 周年发展与展望. 北京: 中国农业大学出版社, 2010. [DOI]
- [38] Zhao ZJ, Li RC, Cao HH, Zhang QJ, Jiang MX, Ouyang YC, Nan CL, Lei ZL, Song XF, Sun QY, Chen DY. Interspecies nuclear transfer of Tibetan antelope using caprine oocyte as recipient. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(4): 412–419. [DOI]
- [39] Zhao ZJ, Ouyang YC, Nan CL, Lei ZL, Song XF, Sun QY, Chen DY. Rabbit oocyte cytoplasm supports development of nuclear transfer embryos derived from the somatic cells of the camel and Tibetan antelope. *J Reprod Dev*, 2006, 52(3): 449–459. [DOI]
- [40] Chen DY, Wen DC, Zhang YP, Sun QY, Han ZM, Liu ZH, Shi P, Li JS, Xiangyu JG, Lian L, Kou ZH, Wu YQ, Chen YC, Wang PY, Zhang HM. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol Reprod*, 2002, 67(2): 637–642. [DOI]
- [41] Wen DC, Bi CM, Xu Y, Yang CX, Zhu ZY, Sun QY, Chen DY. Hybrid embryos produced by transferring panda or cat somatic nuclei into rabbit MII oocytes can develop to blastocyst *in vitro*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*, 2005, 303(8): 689–697. [DOI]
- [42] Yan LY, Shi LH, Sheng HZ, Liu SZ, Huang JC, Zhu ZY, Ouyang YC, Lei ZL, Song XF, Sun QY, Chen DY. Dynamic changes in NuMA and microtubules in monkey-rabbit nuclear transfer embryos. *Front Biosci*, 2006, 11: 1892–1900. [DOI]
- [43] Jiang Y, Chen T, Wang K, Jiang MX, Liu SZ, Ouyang YC, Sun QY, Chen DY. Different fates of donor mitochondrial DNA in bovine-rabbit and cloned bovine-



- rabbit reconstructed embryos during preimplantation development. *Front Biosci*, 2006, 11: 1425–1432. [DOI]
- [44] Jiang Y, Chen T, Nan CL, Ouyang YC, Sun QY, Chen DY. In vitro culture and mtDNA fate of ibex-rabbit nuclear transfer embryos. *Zygote*, 2005, 13(3): 233–240. [DOI]
- [45] Liu SZ, Zhou ZM, Chen T, Zhang YL, Wen DC, Kou ZH, Li ZD, Sun QY, Chen DY. Blastocysts produced by nuclear transfer between chicken blastodermal cells and rabbit oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2004, 69(3): 296–302. [DOI]
- [46] Wen DC, Yang CX, Cheng Y, Li JS, Liu ZH, Sun QY, Zhang JX, Lei L, Wu YQ, Kou ZH, Chen DY. Comparison of developmental capacity for intra- and interspecies cloned cat (*Felis catus*) embryos. *Mol Reprod Dev*, 2003, 66(1): 38–45. [DOI]
- [47] Yang CX, Han ZM, Wen DC, Sun QY, Zhang KY, Zhang LS, Wu YQ, Kou ZH, Chen DY. In vitro development and mitochondrial fate of macaca-rabbit cloned embryos. *Mol Reprod Dev*, 2003, 65(4): 396–401. [DOI]
- [48] Sun L, Wu KL, Zhang D, Wang HY, Wang Y, Xu ZY, Huang XY, Chen ZJ, Liu HQ. Increased cleavage rate of human nuclear transfer embryos after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Reprod Biomed Online*, 2012, 25(4): 425–433. [DOI]
- [49] Peat JR, Reik W. Incomplete methylation reprogramming in SCNT embryos. *Nat genet*, 2012, 44(9): 965–966. [DOI]
- [50] Huan YJ, Zhu J, Xie BT, Wang JY, Liu SC, Zhou Y, Kong QR, He HB, Liu ZH. Treating cloned embryos, but not donor cells, with 5-aza-2'-deoxycytidine enhances the developmental competence of porcine cloned embryos. *J Reprod Dev*, 2013, 59(5): 442–449. [DOI]
- [51] 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]
- [52] Zhang M, Wang F, Kou Z, Zhang Y, Gao S. Defective chromatin structure in somatic cell cloned mouse embryos. *J Biol Chem*, 2009, 284(37): 24981–24987. [DOI]
- [53] Wang F, Kou Z, Zhang Y, Gao S. Dynamic reprogramming of histone acetylation and methylation in the first cell cycle of cloned mouse embryos. *Biol Reprod*, 2007, 77(6): 1007–1016. [DOI]
- [54] Lin J, Shi L, Zhang M, Yang H, Qin Y, Zhang J, Gong D, Zhang X, Li D, Li J. 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. [DOI]
- [55] Le R, Kou Z, Jiang Y, Li M, Huang B, Liu W, Li H, Kou X, He W, Rudolph KL, Ju Z, Gao S. Enhanced telomere rejuvenation in pluripotent cells reprogrammed via nuclear transfer relative to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(1): 27–39. [DOI]
- [56] Liu W, Yin J, Kou X, Jiang Y, Gao H, Zhao Y, Huang B, He W, Wang H, Han Z, Gao S. Asymmetric reprogramming capacity of parental pronuclei in mouse zygotes. *Cell Rep*, 2014, 6(6): 1008–1016. [DOI]
- [57] Matoba S, Liu Y, Lu F, 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. [DOI]
- [58] Liu W, Liu X, Wang C, Gao Y, Gao R, Kou X, Zhao Y, Li J, Wu Y, Xiu W, Wang S, Yin J, Liu W, Cai T, Wang H, Zhang Y, Gao S. Identification of key factors conquering developmental arrest of somatic cell cloned embryos by combining embryo biopsy and single-cell sequencing. *Cell Discov*, 2016, 2: 16010. [DOI]
- [59] Matoba S, Wang H, Jiang L, Lu F, Iwabuchi KA, Wu X, Inoue K, Yang L, Press W, Lee JT, Ogura A, Shen L, Zhang Y. Loss of H3K27me3 imprinting in somatic cell nuclear transfer embryos disrupts post-implantation development. *Cell Stem Cell*, 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.06.008. [DOI]
- [60] Gao R, Wang C, Gao Y, Xiu W, Chen J, Kou X, Zhao Y, Liao Y, Bai D, Qiao Z, Yang L, Wang M, Zang R, Liu X, Jia Y, Li Y, Zhang Y, Yin J, Wang H, Wan X, Liu W, Zhang Y, Gao S. Inhibition of aberrant DNA re-methylation improves post-implantation development of somatic cell nuclear transfer embryos. *Cell Stem Cell*, 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.07.017. [DOI]
- [61] Hwang WS, Roh SI, Lee BC, Kang SK, Kwon DK, Kim S, Kim SJ, Park SW, Kwon HS, Lee CK, Lee JB, Kim JM, Ahn C, Paek SH, Chang SS, Koo JJ, Yoon HS, Hwang JH, Hwang YY, Park YS, Oh SK, Kim HS, Park JH, Moon SY, Schatten G. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science*, 2005, 308(5729): 1777–1783. [DOI]
- [62] Noggle S, Fung HL, Gore A, Martinez H, Satriani KC, Prosser R, Oum K, Paull D, Druckenmiller S, Freeby M, Greenberg E, Zhang K, Goland R, Sauer MV, Leibel RL, Egli D. Human oocytes reprogram somatic cells to a

- pluripotent state. *Nature*, 2011, 478(7367): 70–75. [DOI]
- [63] Fan Y, Jiang Y, Chen X, Ou Z, Yin Y, Huang S, Kou Z, Li Q, Long X, Liu J, Luo Y, Liao B, Gao S, Sun X. Derivation of cloned human blastocysts by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer with beta-thalassemia fibroblasts. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(11): 1951–1959. [DOI]
- [64] Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, Nelson M, Sanger WG, Gokhale S, Wolf DP, Mitalipov SM. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature*, 2007, 450(7169): 497–502. [DOI]
- [65] Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sritanaudomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer RL, Wolf D, Mitalipov S. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 2013, 153(6): 1228–1238. [DOI]
- [66] Chung YG, Eum JH, Lee JE, Shim SH, Sepilian V, Hong SW, Lee Y, Treff NR, Choi YH, Kimbrel EA, Dittman RE, Lanza R, Lee DR. Human somatic cell nuclear transfer using adult cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(6): 777–780. [DOI]
- [67] Yamada M, Johannesson B, Sagi I, Burnett LC, Kort DH, Prosser RW, Paull D, Nestor MW, Freeby M, Greenberg E, Goland RS, Leibel RL, Solomon SL, Benvenisty N, Sauer MV, Egli D. Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature*, 2014, 510(7506): 533–536. [DOI]
- [68] Hyslop LA, Blakeley P, Craven L, Richardson J, Fogarty NME, Fragouli E, Lamb M, Wamaitha SE, Prathalingam N, Zhang Q, O'Keefe H, Takeda Y, Arizzi L, Alfarawati S, Tuppen HA, Irving L, Kalleas D, Choudhary M, Wells D, Murdoch AP, Turnbull DM, Niakan KK, Herbert M. Towards clinical application of pronuclear transfer to prevent mitochondrial DNA disease. *Nature*, 2016, 534(7607): 383–386. [DOI]
- [69] Wang T, Sha H, Ji D, Zhang HL, Chen D, Cao Y, Zhu J. Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases. *Cell*, 2014, 157(7): 1591–1604. [DOI]
- [70] Ma H, O'Neil RC, Marti Gutierrez N, Hariharan M, Zhang ZZ, He Y, Cinnioglu C, Kayali R, Kang E, Lee Y, Hayama T, Koski A, Nery J, Castanon R, Tippner-Hedges R, Ahmed R, Van Dyken C, Li Y, Olson S, Battaglia D, Lee DM, Wu DH, Amato P, Wolf DP, Ecker JR, Mitalipov S. Functional human oocytes generated by transfer of polar body genomes. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(1): 112–119. [DOI]
- [71] Meng L, Ely JJ, Stouffer RL, Wolf DP. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol Reprod*, 1997, 57(2): 454–459. [DOI]
- [72] Chan AWS, Dominko T, Luetjens CM, Neuber E, Martinovich C, Hewitson L, Simerly CR, Schatten GP. Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science*, 2000, 287(5451): 317–319. [DOI]
- [73] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, 292(5819): 154–156. [DOI]
- [74] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998, 282(5391): 1145–1147. [DOI]
- [75] Chen Y, He ZX, Liu A, Wang K, Mao WW, Chu JX, Lu Y, Fang ZF, Shi YT, Yang QZ, Chen DY, Wang MK, Li JS, Huang SL, Kong XY, Shi YZ, Wang ZQ, Xia JH, Long ZG, Xue ZG, Ding WX, Sheng HZ. Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Res*, 2003, 13(4): 251–263. [DOI]
- [76] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676. [DOI]
- [77] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131(5): 861–872. [DOI]
- [78] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318(5858): 1917–1920. [DOI]
- [79] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM, Jaenisch R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007, 318(5858): 1920–1923. [DOI]
- [80] Wang Y, Jiang Y, Liu S, Sun X, Gao S. Generation of induced pluripotent stem cells from human beta-thalassemia fibroblast cells. *Cell Res*, 2009, 19(9): 1120–1123. [DOI]
- [81] Kang L, Wang J, Zhang Y, Kou Z, Gao S. iPS cells can

- support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009, 5(2): 135–138. [DOI]
- [82] Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, Hao J, Guo CL, Ma QW, Wang L, Zeng F, Zhou Q. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461(7260): 86–90. [DOI]
- [83] Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2010, 465(7295): 175–181. [DOI]
- [84] Liu L, Luo GZ, Yang W, Zhao X, Zheng Q, Lv Z, Li W, Wu HJ, Wang L, Wang XJ, Zhou Q. Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *J Biol Chem*, 2010, 285(25): 19483–19490. [DOI]
- [85] Yang Y, Liu B, Xu J, Wang J, Wu J, Shi C, Xu Y, Dong J, Wang C, Lai W, Zhu J, Xiong L, Zhu D, Li X, Yang W, Yamauchi T, Sugawara A, Li Z, Sun F, Li X, Li C, He A, Du Y, Wang T, Zhao C, Li H, Chi X, Zhang H, Liu Y, Li C, Duo S, Yin M, Shen H, Belmonte JCI, Deng H. Derivation of pluripotent stem cells with *in vivo* embryonic and extraembryonic potency. *Cell*, 2017, 169(2): 243–257.e225. [DOI]
- [86] Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, Zhao T, Ye J, Yang W, Liu K, Ge J, Xu J, Zhang Q, Zhao Y, Deng H. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 2013, 341(6146): 651–654. [DOI]
- [87] Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, He W, Chen J, Li F, Zhuang Q, Qin B, Xu J, Li W, Yang J, Gan Y, Qin D, Feng S, Song H, Yang D, Zhang B, Zeng L, Lai L, Esteban MA, Pei D. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1): 51–63. [DOI]
- [88] Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, Woltjen K, Nagy A, Wrana JL. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1): 64–77. [DOI]
- [89] Chen J, Guo L, Zhang L, Wu H, Yang J, Liu H, Wang X, Hu X, Gu T, Zhou Z, Liu J, Liu J, Wu H, Mao SQ, Mo K, Li Y, Lai K, Qi J, Yao H, Pan G, Xu GL, Pei D. Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet*, 2013, 45(12): 1504–1509. [DOI]
- [90] Hu X, Zhang L, Mao SQ, Li Z, Chen J, Zhang RR, Wu HP, Gao J, Guo F, Liu W, Xu GF, Dai HQ, Shi YG, Li X, Hu B, Tang F, Pei D, Xu GL. Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(4): 512–522. [DOI]
- [91] Chen J, Liu H, Liu J, Qi J, Wei B, Yang J, Liang H, Chen Y, Chen J, Wu Y, Guo L, Zhu J, Zhao X, Peng T, Zhang Y, Chen S, Li X, Li D, Wang T, Pei D. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. *Nat Genet*, 2013, 45(1): 34–42. [DOI]
- [92] Gao Y, Chen J, Li K, Wu T, Huang B, Liu W, Kou X, Zhang Y, Huang H, Jiang Y, Yao C, Liu X, Lu Z, Xu Z, Kang L, Chen J, Wang H, Cai T, Gao S. Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(4): 453–469. [DOI]
- [93] Shu J, Wu C, Wu Y, Li Z, Shao S, Zhao W, Tang X, Yang H, Shen L, Zuo X, Yang W, Shi Y, Chi X, Zhang H, Gao G, Shu Y, Yuan K, He W, Tang C, Zhao Y, Deng H. Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers. *Cell*, 2013, 153(5): 963–975. [DOI]
- [94] Li D, Liu J, Yang X, Zhou C, Guo J, Wu C, Qin Y, Guo L, He J, Yu S, Liu H, Wang X, Wu F, Kuang J, Hutchins AP, Chen J, Pei D. Chromatin accessibility dynamics during iPSC reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(6): 819–833.e816. [DOI]
- [95] Cao S, Yu S, Li D, Ye J, Yang X, Li C, Wang X, Mai Y, Qin Y, Wu J, He J, Zhou C, Liu H, Zhao B, Shu X, Wu C, Chen R, Chan W, Pan G, Chen J, Liu J, Pei D. Chromatin accessibility dynamics during chemical induction of pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(4): 529–542.e525. [DOI]
- [96] Zhao T, Fu Y, Zhu J, Liu Y, Zhang Q, Yi Z, Chen S, Jiao Z, Xu X, Xu J, Duo S, Bai Y, Tang C, Li C, Deng H. Single-cell RNA-Seq reveals dynamic early embryonic-like programs during chemical reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(1): 31–45.e37. [DOI]
- [97] Wiellette E, Grinblat Y, Austen M, Hirsinger E, Amsterdam A, Walker C, Westerfield M, Sive H. Combined haploid and insertional mutation screen in the zebrafish. *Genesis*, 2004, 40(4): 231–240. [DOI]
- [98] Graham CF. The effect of cell size and DNA content on the cellular regulation of DNA synthesis in haploid and



- diploid embryos. *Exp Cell Res*, 1966, 43(1): 13–19. [DOI]
- [99] Modliński JA. Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus. *J Embryol Exp Morphol*, 1975, 33(4): 897–905. [DOI]
- [100] Kaufman MH. Chromosome analysis of early postimplantation presumptive haploid parthenogenetic mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 1978, 45: 85–91. [DOI]
- [101] Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*, 2009, 326(5951): 430–433. [DOI]
- [102] Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, O'Malley R, Demers SP, Vanhaelen Q, Shukalyuk AI, Schmauss G, Schramek D, Schnuetgen F, von Melchner H, Ecker JR, Stanford WL, Zuber J, Stark A, Penninger JM. Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(6): 563–574. [DOI]
- [103] Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 2011, 479(7371): 131–134. [DOI]
- [104] Schimenti J. Haploid embryonic stem cells and the dominance of recessive traits. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(6): 488–489. [DOI]
- [105] Li W, Shuai L, Wan H, Dong M, Wang M, Sang L, Feng C, Luo GZ, Li T, Li X, Wang L, Zheng QY, Sheng C, Wu HJ, Liu Z, Liu L, Wang L, Wang XJ, Zhao XY, Zhou Q. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, 490(7420): 407–411. [DOI]
- [106] Yang H, Shi L, Wang BA, Liang D, Zhong C, Liu W, Nie Y, Liu J, Zhao J, Gao X, Li D, Xu GL, Li J. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 2012, 149(3): 605–617. [DOI]
- [107] Zhong C, Yin Q, Xie Z, Bai M, Dong R, Tang W, Xing YH, Zhang H, Yang S, Chen LL, Bartolomei MS, Ferguson-Smith A, Li D, Yang L, Wu Y, Li J. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2): 221–232. [DOI]
- [108] Yang H, Liu Z, Ma Y, Zhong C, Yin Q, Zhou C, Shi L, Cai Y, Zhao H, Wang H, Tang F, Wang Y, Zhang C, Liu XY, Lai D, Jin Y, Sun Q, Li J. Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell Res*, 2013, 23(10): 1187–1200. [DOI]
- [109] Li W, Li X, Li T, Jiang MG, Wan H, Luo GZ, Feng C, Cui X, Teng F, Yuan Y, Zhou Q, Gu Q, Shuai L, Sha J, Xiao Y, Wang L, Liu Z, Wang XJ, Zhao XY, Zhou Q. Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14(3): 404–414. [DOI]
- [110] Sagi I, Chia G, Golan-Lev T, Peretz M, Weissbein U, Sui L, Sauer MV, Yanuka O, Egli D, Benvenisty N. Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells. *Nature*, 2016, 532(7597): 107–111. [DOI]
- [111] Zhong C, Zhang M, Yin Q, Zhao H, Wang Y, Huang S, Tao W, Wu K, Chen ZJ, Li J. Generation of human haploid embryonic stem cells from parthenogenetic embryos obtained by microsurgical removal of male pronucleus. *Cell Res*, 2016, 26(6): 743–746. [DOI]
- [112] Yan L, Yang M, Guo H, Yang L, Wu J, Li R, Liu P, Lian Y, Zheng X, Yan J, Huang J, Li M, Wu X, Wen L, Lao K, Li R, Qiao J, Tang F. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(9): 1131–1139. [DOI]
- [113] Xue Z, Huang K, Cai C, Cai L, Jiang CY, Feng Y, Liu Z, Zeng Q, Cheng L, Sun YE, Liu JY, Horvath S, Fan G. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature*, 2013, 500(7464): 593–597. [DOI]
- [114] Huang J, Yan L, Fan W, Zhao N, Zhang Y, Tang F, Xie XS, Qiao J. Validation of multiple annealing and looping-based amplification cycle sequencing for 24-chromosome aneuploidy screening of cleavage-stage embryos. *Fertil Steril*, 2014, 102(6): 1685–1691. [DOI]
- [115] Guo H, Zhu P, Wu X, Li X, Wen L, Tang F. Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res*, 2013, 23(12): 2126–2135. [DOI]
- [116] Guo F, Yan L, Guo H, Li L, Hu B, Zhao Y, Yong J, Hu Y, Wang X, Wei Y, Wang W, Li R, Yan J, Zhi X, Zhang Y, Jin H, Zhang W, Hou Y, Zhu P, Li J, Zhang L, Liu S, Ren Y, Zhu X, Wen L, Gao YQ, Tang F, Qiao J. The transcriptome and DNA methylome landscapes of human primordial germ cells. *Cell*, 2015, 161(6): 1437–1452. [DOI]
- [117] Guo H, Zhu P, Yan L, Li R, Hu B, Lian Y, Yan J, Ren X, Lin S, Li J, Jin X, Shi X, Liu P, Wang X, Wang W, Wei Y, Li X, Guo F, Wu X, Fan X, Yong J, Wen L, Xie SX,

- Tang F, Qiao J. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature*, 2014, 511(7511): 606–610. [DOI]
- [118] Jiang L, Zhang J, Wang JJ, Wang L, Zhang L, Li G, Yang X, Ma X, Sun X, Cai J, Zhang J, Huang X, Yu M, Wang X, Liu F, Wu CI, He C, Zhang B, Ci W, Liu J. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell*, 2013, 153(4): 773–784. [DOI]
- [119] Wang L, Zhang J, Duan J, Gao X, Zhu W, Lu X, Yang L, Zhang J, Li G, Ci W, Li W, Zhou Q, Aluru N, Tang F, He C, Huang X, Liu J. Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell*, 2014, 157(4): 979–991. [DOI]
- [120] Liu X, Wang C, Liu W, Li J, Li C, Kou X, Chen J, Zhao Y, Gao H, Wang H, Zhang Y, Gao Y, Gao S. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature*, 2016, 537(7621): 558–562. [DOI]
- [121] Zhang B, Zheng H, Huang B, Li W, Xiang Y, Peng X, Ming J, Wu X, Zhang Y, Xu Q, Liu W, Kou X, Zhao Y, He W, Li C, Chen B, Li Y, Wang Q, Ma J, Yin Q, Kee K, Meng A, Gao S, Xu F, Na J, Xie W. Allelic reprogramming of the histone modification H3K4me3 in early mammalian development. *Nature*, 2016, 537(7621): 553–557. [DOI]
- [122] Wang C, Liu X, Gao Y, Yang L, Li C, Liu W, Chen C, Kou X, Zhao Y, Chen J, Wang Y, Le R, Wang H, Duan T, Zhang Y, Gao S. Reprogramming of H3K9me3-dependent heterochromatin during mammalian embryo development. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(5): 620–631. [DOI]
- [123] Ke Y, Xu Y, Chen X, Feng S, Liu Z, Sun Y, Yao X, Li F, Zhu W, Gao L, Chen H, Du Z, Xie W, Xu X, Huang X, Liu J. 3D chromatin structures of mature gametes and structural reprogramming during mammalian embryogenesis. *Cell*, 2017, 170(2): 367–381.e320. [DOI]
- [124] Du Z, Zheng H, Huang B, Ma R, Wu J, Zhang X, He J, Xiang Y, Wang Q, Li Y, Ma J, Zhang X, Zhang K, Wang Y, Zhang MQ, Gao J, Dixon JR, Wang X, Zeng J, Xie W. Allelic reprogramming of 3D chromatin architecture during early mammalian development. *Nature*, 2017, 547(7662): 232–235. [DOI]
- [125] Guo F, Li L, Li J, Wu X, Hu B, Zhu P, Wen L, Tang F. Single-cell multi-omics sequencing of mouse early embryos and embryonic stem cells. *Cell Res*, 2017, 27(8): 967–988. [DOI]
- [126] Han X, Wang R, Zhou Y, Fei L, Sun H, Lai S, Saadatpour A, Zhou Z, Chen H, Ye F, Huang D, Xu Y, Huang W, Jiang M, Jiang X, Mao J, Chen Y, Lu C, Xie J, Fang Q, Wang Y, Yue R, Li T, Huang H, Orkin SH, Yuan GC, Chen M, Guo G. Mapping the mouse cell atlas by microwell-Seq. *Cell*, 2018, 173(5): 1307. [DOI]
- [127] Zhong S, Zhang S, Fan X, Wu Q, Yan L, Dong J, Zhang H, Li L, Sun L, Pan N, Xu X, Tang F, Zhang J, Qiao J, Wang X. A single-cell RNA-seq survey of the developmental landscape of the human prefrontal cortex. *Nature*, 2018, 555(7697): 524–528. [DOI]
- [128] Gao S, Yan L, Wang R, Li J, Yong J, Zhou X, Wei Y, Wu X, Wang X, Fan X, Yan J, Zhi X, Gao Y, Guo H, Jin X, Wang W, Mao Y, Wang F, Wen L, Fu W, Ge H, Qiao J, Tang F. Tracing the temporal-spatial transcriptome landscapes of the human fetal digestive tract using single-cell RNA-sequencing. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(6): 721–734. [DOI]

(责任编辑: 王晓群)