动物克隆的历史发展、原理、应用前景及存在问题

郎 颀博, 陈静雯, 张 丽, 张 瑶

(北京师范大学生命科学学院, 北京 100875)

摘 要: 哺乳动物体细胞克隆是 20 世纪末生命科学领域最引人注目的高新技术之一, 该技术在农业、生物学和医药等方面具有广泛的应用前景。本文对动物克隆的发展、原理、应用和存在的一些实际问题进行了综述。

关键词: 动物克隆; 历史; 原理; 应用

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A

On the Process of Development, Principle, Application and Existent Problems of Mammal Cloning

LANG Zhaobo, CHEN Jingwen, ZHANG Li, ZHANG Yao

(Beijing Normal University College of Life Science, Beijing 100875, China)

Abstract: Mammal cloning is a most remarkable high-technique in the end of 20th century in life science field. It is very promising in agriculture, biology and pharmacology. In the paper, sum up the history, principle, application, and some existent problems of animal cloning.

Key words: animal cloning; history; principle; application

1 动物克隆的发展历史

1938 年, 诺贝尔奖获得者、德国胚胎学家提出了动物克隆的最早设想。经过近百年的发展, 动物克隆技术已实现并取得了许多突破性的成果。据报道, 动物克隆研究可分为 3 个主要发展阶段^[1]。

1.1 胚胎细胞克隆阶段

胚胎细胞克隆是指所用供核细胞为发育至不同阶段的胚胎细胞进行克隆的技术。1952 年, 美国研究所的科学家将分化程度较高的囊胚细胞注入去核的卵中, 得到重构胚卵裂并发育到蝌蚪, 后证明经变态变成幼蛙, 这是较早的成果之一。但直到 1983 年, 美国科学家利用核移植技术结合细胞融合方法获得了克隆小鼠才真正拉开了哺乳动物克隆的序幕。此后, 其他科学家也相继成功地克隆出小鼠、绵羊、牛、兔等。

1.2 同种体细胞克隆阶段

在此阶段, 所用供核细胞均属同物种的高度分化的体细胞。1997 年 2 月, 英国罗斯林研究所用成年羊高度分化的乳腺细胞进行了核移植获得

了克隆羊“多莉”。这是第一次用成年体细胞作为供核细胞, 说明高度分化的成年动物的体细胞可在适当条件下发生逆转恢复全能性, 是生物技术史上具划时代意义的重大突破, 是克隆技术的一个里程碑。

1.3 异种体细胞克隆阶段

濒危物种数量日益减少, 很难提供用于克隆的卵母细胞和代孕受体, 促使科学家提出了异种克隆的设想: 将一种动物的体细胞核移植到另一种动物的去核(遗传物质)卵母细胞中, 来得以实现克隆的技术。但此阶段技术还处在实验探究阶段, 还没有完全成熟。

2 动物克隆的原理

2.1 动物克隆的理论依据

克隆技术所依赖的理论基础是细胞潜在全能性。细胞的全能性是指细胞包含个体的全套遗传信息, 在特定环境因素的调节下, 可回到受精卵一样的状态, 从头开始发育成一个完整的生物个体。只有具备全能性的动物组织细胞, 才可用作克隆

收稿日期: 2008-06-28

作者简介: 郎颀博(1986-), 女, 满族, 吉林省长春市人, 大学本科, 从事生物技术方面的研究。

动物^[3]。

2.2 动物克隆技术的核心

克隆是指由一个细胞或个体以无性方式重复分裂或繁殖体所形成的一群个体。克隆动物即动物的无性繁殖。就是将供体细胞核移入去核的卵母细胞中,使后者不经精子穿透等有性过程即可被激活、分裂并发育成个体,使得核供体的基因得到完全复制。目前动物克隆的技术的核心就是核移植,根据供体的来源不同,可以分为胚胎细胞克隆和体细胞克隆^[3]。

2.2.1 胚胎细胞克隆 胚胎干细胞是从早期胚胎内细胞团和附植后原始生殖细胞分离出来的一种细胞,它具有全能性或多能性,可以发育为任何一种组织或器官的前体细胞,再由该前体细胞发育成功能细胞。胚胎干细胞像正常的体细胞一样可以在体外进行增殖、克隆、冷冻、保存而保持不分化。这样就可以为人们提供大量的可利用的胚胎干细胞。1980年,Willadsen 将从绵羊八细胞胚胎中分离的胚胎细胞,移入已经去核的同种绵羊卵细胞中,经培养获得胚胎,再将胚胎植入代理母羊子宫中,首次获得了胚胎细胞克隆羊。现在人们可将胚胎干细胞体外培养传至 40~60 代而不分化,而这样大量的细胞就为我们利用它奠定了基础。胚胎干细胞具有可操作性。在体外人们可以对其进行遗传操作选择,如转基因、基因打靶、配合基因诱捕等一系列技术,再结合核移植技术,生产出人们所希望的动物^[4-9]。

2.2.2 体细胞克隆 对于体细胞克隆来说,在细胞分化过程中,细胞核全能性的潜能受到限制。尽管细胞核内的 DNA 序列没有改变,但基因在特定的细胞内所表达的蛋白质成分有限。这主要是由于染色体组织改变和稳定阻遏核蛋白复合体阻遏以及相应转录激活的缘故。对于成功的核移植来说,供体核必须像正常受精卵细胞核一样进行细胞周期活动,才能发育成新个体,那么作为受体的细胞质就要求必须有再程序化供体核的能力。在启动供体核的再程序化过程中, Ca^{2+} 起到了至关重要的作用^[7],细胞周期调节因子(如 MPF)也有着重要作用^[8-9]。此外,一些无机离子、DNA 的甲基化以及核质互作都会影响到细胞全能性的发挥^[10-11]。

3 动物克隆的实践意义

3.1 繁育优良品种及生产实验动物

在畜牧业生产中,动物克隆技术的应用可以准确繁殖大量的优良品种。哺乳动物的克隆技术费时少,选育的种畜性状稳定,通过克隆胚胎的方法能大量繁殖畜群中特别优秀的个体,而且易于优良性状的保存,克服了某些动物(如牛、羊)世代间隔长、繁育率低的问题^[12]。在育种方面,动物克隆技术可以避免在自然条件下受动物育种周期和生育效率的限制,可缩短育种年限,提高育种效率。同时,由于克隆是从细胞开始的,这将使不同地区之间的物种交流很便利,因此通过克隆,可迅速对优良畜禽的基因进行整合,培养出优良的畜种^[3]。在动物资源的保存方面,可以用较少的保存数量获得很好的保存效果^[13-14]。此外,通过动物克隆技术可以建立数目可观的具有相同遗传背景的与基因病相关的实验动物^[3],用于医学及药理学研究。

3.2 保护珍稀濒危动物及创造新物种

珍稀濒危动物一般都是由于受环境或内在因素影响繁殖力,因此个体数减少,但随着克隆技术的发展,将突破这些限制,大量无性繁殖个体将有利于它们种群的壮大和延续^[3]。在我国,被有关国际组织列为世界 20 大濒危灭绝物种之一的大熊猫,以及现存数量也不多的金丝猴、东北虎、扬子鳄等国宝级保护动物,均有希望通过动物克隆技术得到挽救和保护^[15]。中国科学院动物研究所陈大元研究员提出并研究用异种动物克隆技术来拯救大熊猫,如果这项工作能成功,将十分有利于繁殖能力低的濒危动物的保护。此外,用异种动物细胞核移植和异种动物胚胎嵌合的方法可以获得具有新性状的克隆动物或异种动物的嵌合体,这样就能克服种间繁殖障碍,创造出新物种,获得用传统交配方法无法得到的新性状^[16-17]。

3.3 应用于器官移植

据报道,全世界每天每 18 分钟就会增加一个等待器官移植的新病人^[18],虽然现代医学几乎能对所有人人类器官和组织实施移植术,但排斥反应和供体缺乏仍是难题。排斥反应的原因是 HLA 的多态性导致组织相容性差,而动物克隆技术与基因工程技术相结合,可以通过改变动物器官组织相容性基因属性,从而降低由动物提供的供体器官与人类免疫系统的排斥反应^[3]。也可以考虑用患者本人细胞核作供体克隆出新的“订做”的组织、器官,用于治疗糖尿病、癌症、老年痴呆以及肌

肉等组织的损伤和疾病^[13]。目前这一领域的研究与开发正处于起步阶段, 现已有两家美国公司开始研究利用克隆技术培育人胚胎, 希望能大批量生产出治疗疾病的干细胞^[18]。

3.4 生产药物

通过转基因技术和动物克隆技术相结合, 可以获得表达任何特异性基因的细胞类型, 生产预期的药物蛋白。目前, 已经成功实现转基因克隆动物生产药用蛋白。DNX 公司(1988)通过将人的血红蛋白基因转入猪细胞, 实现转基因猪生产人血红蛋白; Kerr(1996)等在转基因小鼠的尿液中表达出人的生长激素; 英国鲁斯林(Roslin)研究所 Wilmut 等与英国 PPL 公司的科学家 Schnieke 等合作(1997), 用体细胞基因转移克隆技术, 获得转人凝血因子 IX 基因克隆羊, 这种羊细胞内带有外源的目的基因, 科学家们从其奶汁中获取了重组药用蛋白^[15, 19-20]。

4 目前动物克隆技术所面临的问题

目前, 动物克隆技术的核心是核移植。所谓核移植是指将胚胎或体细胞的细胞核用显微外科手术的方法移入去核的卵母细胞中, 构建重组胚, 通过体内或体外培养、胚胎移植, 产生与供体细胞基因型相同后代的技术过程。根据核供体的来源不同, 可将其分为胚胎细胞核移植、胚胎干细胞核移植、胎儿成纤维细胞核移植、体细胞核移植^[3]。

4.1 动物克隆技术上的问题

4.1.1 动物克隆的成功率 在实践中, 克隆动物的成功率还很低, 维尔穆特研究组在培育“Dolly”的实验中, 融合了 277 枚移植核的卵细胞, 仅获得了“Dolly”这一头成活羔羊, 成功率只有 0.36%, 同时进行的胎儿成纤维细胞和胚胎细胞的克隆实验的成功率也分别只有 1.7% 和 1.1%, 即使是使用“檀香山”技术, 以分化程度较低的卵丘细胞为核供体, 其成功率也只有百分之几^[3]。动物体细胞克隆的成功率很低, 目前公认成功率为 1% ~ 3%^[5]。

4.1.2 生理或免疫缺陷问题 目前大多数研究发现体细胞克隆动物有半数多有严重缺陷或是畸形, 包括心脏、肺等器官携有罕见的缺陷, 其中许多未出生就胎死腹中, 或出生后不久突然死亡(Gurdon, 1962)。日本全国已有 121 头克隆牛诞生, 但是存活的只有 64 头^[3]。虽然从理论上讲, 机体中的每一个细胞都是从受精卵分裂分化而来, 但

从一个受精卵到机体的亿万个细胞, 有些细胞的个别基因不可避免地会发生不可逆的重组或丢失。分化细胞核内遗传信息在结构上的这种不可逆的改变, 使它不可能再指导一些独特类型细胞的分化, 致使发育失败。这样的细胞就不具备了发育的全能性。这一点可能是核移植动物发生高比率的胚胎吸收、流产、出生后死亡或异常的原因之一^[6]。

4.1.3 受体细胞质与供体细胞核周期相容性问题 许多动物克隆未成功的原因就是受体细胞质与供体细胞核之间周期不相容, 而克隆羊“Dolly”之所以成功, 关键就在于 Willmut 等找到了一种使供体细胞核和受体卵母细胞更相容的方法, 供体细胞核在 DNA 复制时间上与受体卵母细胞基本同步(Gurdon 等, 1997)^[5]。

4.1.4 早衰问题 即使克隆的动物成功地出生了, 并且没有先天性疾病, 可是它们仍然面临着一个严重的问题就是早衰, 即使是正常发育的“Dolly”, 也被发现有早衰迹象。但是可以肯定的是早衰现象不一定是与染色体的端粒长度联系在一起的^[3]。

4.2 破坏了自然界的多样性

因为动物克隆技术培育出来的动物都具有同样的基因型, 这就导致了个体间没有差异, 使动物之间失去了遗传的多样性, 最终破坏了自然界的多样性。

4.3 动物克隆所产生的伦理问题

若将克隆动物应用于人类, 将会导致各种各样的伦理、法律问题。世界卫生组织于第五十次年会中做出决议, 明确指出利用克隆技术复制人类个体在理论上是不可接受的, 这一行为同人类的诚实和道德背道而驰^[9]。

参考文献:

- [1] 吴玉臣, 郭爽, 阴正兴, 等. 浅析动物克隆技术[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006(6): 55~56.
- [2] 肖红波, 胡亚平. 动物克隆的研究新进展[J]. 动物科学与动物医学, 2003, 20(5): 66~67.
- [3] 康峰, 贾清. 动物克隆机理及潜在问题[J]. 当代畜牧, 2005(6): 40~50.
- [4] 张彬彬, 张兰. 哺乳动物克隆技术的应用前景与亟待解决的几个问题[J]. 滨州师专学报, 2003, 19(4): 90~92.
- [5] 张文华, 朱红英, 黄祥辉. 克隆和动物克隆[J]. 动物学杂志, 1999(3): 34~36.

(下转第 63 页)

技能的精深, 应尽力在有限的教育教学时间中发挥课程学习的最大效益。机械类各专业的理论课程, 包括机械设计模块、机械制造模块、机电测控模块和数控技术模块、基本技能模块^[3]。

4.3 专业技能课

专业技能课主要是培养学生的基本专业技能, 教学环节包括专业理论课的课内实验、专业技能课、教学实习、毕业实习与设计等。各实践教学环节应达到的技能要求: 钳工技能实训要求学生掌握钳工的基本技能; 金工实习(热加工)要求学生掌握热加工的基本方法、特点和作用; 机加工技能实训要求学生掌握机床操作; 数控编程与操作要求学生掌握数控编程方法及数控机床操作; 毕业实习要求学生了解生产现场的生产组织、技术管理及典型零件制造的全过程; 机械设计课程要求学生掌握常用机构和通用零件的工作原理、基本设计和计算方法, 会使用手册查阅参数; 机械制

造工艺学课程要求学生掌握典型零件工艺设计、数控编程、机床调整及维修技术, 得到较为全面的综合训练, 提高学生的解决工程实际问题 and 创新能力。

总之, 机械制造与自动化专业的教学改革, 必须紧跟机械制造行业的发展, 突出机械工程技术教育的特点, 同时要面向市场需求, 力求培养出具有良好综合素质、体现行业特色、具有创新能力的高素质应用型专业人才。

参考文献:

- [1] 刘迎春. 应用型本科机械设计制造及其自动化专业人才培养课程体系的研究[J]. 湖南工程学院学报, 2004, 14(3): 59~62.
- [2] 张全真. 高等教育培养目标和教学模式的准确定位[J]. 沈阳农业大学学报, 2005(01): 18.
- [3] 钟守炎. 机械设计制造及其自动化专业人才培养目标与课程体系改革研究[J]. 石油教育, 2004(05): 32.

(上接第 60 页)

- [6] 冯登侦, 冯梅秀. 哺乳动物克隆技术及其研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2003(10): 62~64.
- [7] Prather RS., Tao T., Machaty Z.. Development of the techniques for nuclear transfer in pigs[J]. Theriogenology, 1999(51): 487.
- [8] Kikyo N., Wolfe AP.. Reprogramming nuclei: insight from cloning nuclear transfer and heterokaryons[J]. J Cell Sci., 2000, 113: 12.
- [9] 李震, 张德福, 王英. 动物克隆的细胞学原理及技术[J]. 上海农业学报, 2000, 16(2): 94~98.
- [10] 效梅, 安立龙, 窦忠英, 等. 动物胚胎下细胞的概念及特性[J]. 黄牛杂志, 2000, 26(1): 56~58.
- [11] 锡建中, 贾青. 动物体细胞克隆机理的几个关键问题[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005(3): 46~47.
- [12] 曹宏楷. 动物克隆技术研究进展[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2005(4): 2~4.
- [13] 马玉忠, 李赞东, 沙金, 等. 供体 PGCs 在鸡一鸭嵌合体胚胎性腺外的发育[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(4): 397~398.

- [14] 李碧春, 陈国宏, 赵东伟, 等. 鸡胚 PGCs 迁移与性腺发育关系的研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2002, 23(1): 18~23.
- [15] 霍丹群, 张云茹, 范守城. 动物克隆技术及其发展新趋势[J]. 自然杂志, 2004, 26(3): 134~137.
- [16] 程乐平, 景乃禾. 动物克隆技术的研究进展[J]. 生命的化学, 2000, 20(1): 8~11.
- [17] 姚俊岩, 安靓, 李进. 建立转基因动物的方法及其进展[J]. 第一军医大学学报, 2002, 12(1): 80~81.
- [18] 李宁, 李青. 生物医药中的转基因动物研究与开发[J]. 高技术通讯, 2000(11): 106~110.
- [19] 张荣昌, 岳福杰, 李森远, 等. 哺乳动物的克隆技术—哺乳动物克隆的原理、方法、影响因素及存在的问题[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(10): 55~57.
- [20] 贾青. 动物克隆的机理及其潜在问题[J]. 当代畜牧, 2005(6): 19~22.