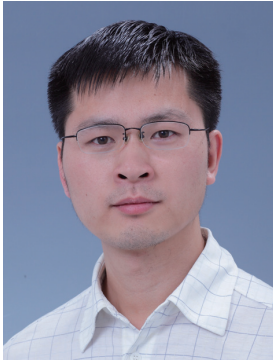


DOI: 10.13376/j.cblls/2016114

文章编号: 1004-0374(2016)08-0862-05



李伟, 博士, 研究员, 中国科学院动物研究所干细胞与细胞周期调控研究组组长。2006年毕业于武汉大学获学士学位, 2012年毕业于中国科学院动物研究所获博士学位。主要从事干细胞和基因组稳定性研究, 在干细胞的建立和应用以及基因修饰动物模型构建方面取得多项进展, 相关成果以第一或通讯作者发表在 *Nature*、*Cell*、*Nature Biotechnology* 等刊物, 共发表 SCI 论文 40 余篇。目前主要研究兴趣是干细胞基因组稳定性和倍性调控的机制与方法, 以及基因组修饰技术的开发与应用。入选“万人计划青年拔尖人才计划”、中国科学院首批“卓越青年科学家”; 曾获“日本实验动物学会国际奖”、“中国干细胞学会青年研究员奖”等奖励。

单倍体干细胞研究进展

李 伟^{1*}, 李劲松^{2*}, 周 琪^{1*}

(1 中国科学院动物研究所, 北京 100101; 2 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海200031)

摘 要: 单倍体干细胞是一种全新的人工建立的细胞类型。在中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性科技先导专项的支持下, 我国科学家在哺乳动物单倍体干细胞的建立和应用上取得了一系列重要进展, 极大地丰富了单倍体干细胞类型, 建立了多种新的基于单倍体干细胞的遗传修饰和辅助生殖技术, 展示了单倍体干细胞可能为生殖生物学、发育生物学、遗传学和进化生物学带来的重要应用前景。主要对我国科学家在单倍体干细胞领域取得的进展进行介绍。

关键词: 单倍体; 干细胞; 生殖发育研究

中图分类号: Q813 **文献标志码:** A

Progress in haploid stem cell research

LI Wei^{1*}, LI Jin-Song^{2*}, ZHOU Qi^{1*}

(1 Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 2 Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: The haploid stem cell is a novel type of artificially established cells. Supported by the Stem Cell and Regenerative Medicine Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences, Chinese scientists have made a serial of achievements on derivation and application of haploid stem cells, which enriched the haploid stem cell types, established multiple new techniques for genome modification and assisted reproduction, and brought great prospects for studies of reproduction, development, genetics and evolution. Here we review the progress on haploid stem cell research in past five years supported by the Strategic Priority Research Program.

Key words: haploid; stem cells; reproduction and development research

收稿日期: 2016-04-20

基金项目: 中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性先导科技专项(XDA01020101, XDA 01010408, XDA01010403)

*通信作者: E-mail: liwei@ioz.ac.cn(李伟); jsli@sibcb.ac.cn(李劲松); zhouqi@ioz.ac.cn(周琪)

单倍体细胞只具有一套染色体, 大大降低了基因组的复杂程度, 因而在进行遗传分析、基因功能与性状研究中具有重要的应用价值。单倍体在低等生物如细菌、真菌中存在, 结合这些物种的快速增殖能力, 成为遗传学和基因组学研究的重要工具, 大大推动了生命科学研究的进展^[1]。植物单倍体的研究起始于1972年, Gupta和Carlson^[2]利用化学试剂诱导和优化培养环境的方法首次建立了烟草单倍体细胞系。在此基础上, 单倍体细胞系在不同种类的高等植物包括许多经济作物如玉米中成功建立, 成为开展优良性状的遗传分析及作物育种的重要工具^[3-4]。相比植物, 动物单倍体细胞系的建立更加困难, 仅在几种低等动物包括美洲豹蛙、蟑螂、果蝇、青鳉鱼中建立了单倍体细胞系^[5-8]。1999年, Kotecki等^[9]和Carette等^[10]先后从人的血癌细胞中分离建立了接近单倍体的异倍体肿瘤细胞系, 并证实它们在遗传筛选中具有优势。然而, 这些癌细胞来源的近单倍体细胞在长期传代培养时非常不稳定, 会出现部分染色体丢失或加倍, 应用非常局限。综上, 相比单倍体细胞在微生物和植物研究中的应用, 哺乳动物单倍体细胞的建立和应用仍然是一个巨大的挑战。

在中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性科技先导专项的支持下, 我国科学家在哺乳动物的单倍体干细胞研究方面取得了一系列重要进展, 包括首次建立了能够替代精子完成生殖过程的小鼠和大鼠孤雄单倍体胚胎干细胞系, 以及猴孤雌单倍体胚胎干细胞系; 开发了基于单倍体胚胎干细胞的遗传筛选和遗传修饰技术; 将单倍体干细胞作为新的技术和工具应用于生殖发育生物学研究, 获得了来自两只雌性“同性”小鼠的后代, 首次创建了一类新型的细胞类型——哺乳动物异种杂合二倍体干细胞, 丰富了生殖发育研究理论和体系, 拓展了生殖发育研究的范畴。这些研究发表在*Nature*、*Cell*等著名刊物, 其中在高影响力期刊发表的论文数量超过国际上其他国家发表的论文数量之和, 表明我国在单倍体干细胞技术及其相关研究领域处于引领地位。

1 哺乳动物单倍体干细胞系的建立、特性与功能研究

在哺乳动物中, 单倍体细胞只在高度特化的配子细胞中存在, 因此配子是获得单倍体细胞的一个有效来源。由于卵母细胞来源的人孤雌胚胎干细胞应用于再生医学时具有较少的伦理争议, 我国科学

家曾建立了世界上较早一批的人孤雌胚胎干细胞系, 因此在配子来源的干细胞建系上积累了很好的经验。然而与前人研究发现一致, 虽然单倍体可以在早期胚胎细胞中存在, 但是在胚胎干细胞建系培养过程中快速二倍化, 因此获得的胚胎干细胞系都是二倍体形式^[11]。Elling等^[12]及Leeb和Wutz^[13]分别独立利用流式细胞分选技术, 在建系和传代过程中不断地进行单倍体细胞分选培养, 从小鼠孤雌发育的单倍体胚胎中建立了小鼠孤雌单倍体胚胎干细胞系, 并利用它的单倍性和快速增殖能力, 建立了高通量的纯合型遗传突变细胞库, 进行了正向和反向的遗传分析, 开展了有效的功能基因筛选和药物筛选。在先导专项的支持下, 我国科学家首次建立了具有替代精子能力的小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞、大鼠孤雄单倍体胚胎干细胞、猴孤雌单倍体胚胎干细胞以及小鼠上胚层单倍体干细胞系, 大大拓展了单倍体干细胞的类型, 为单倍体干细胞研究的拓展打下了基础。

1.1 具有替代精子能力的小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞

上海和北京的两支团队分别在*Cell*和*Nature*杂志报道建立了小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞系, 证实孤雄单倍体胚胎干细胞能够以单倍体的形式长期传代培养, 并且保持体内体外的三胚层分化能力^[14-15]。更重要的是, 他们证实孤雄单倍体胚胎干细胞在注射到卵胞质内后, 能够发育获得健康可育的小鼠; 利用这一方式可以对孤雄单倍体胚胎干细胞进行基因打靶等遗传修饰, 并通过卵胞质注射将遗传修饰由细胞水平传递到动物水平, 获得健康转基因小鼠, 从而提供了一种新的转基因动物生产方法。同时, 研究揭示, 孤雄单倍体胚胎干细胞保留了部分精子来源的印记修饰, 也丧失了许多精子的特性, 为研究表观遗传学与发育的关系提供了新的研究模型; 单倍体胚胎干细胞在体内体外分化时都会快速二倍化, 从而针对单倍体倍性维持机制提出了重要科学问题。孤雄单倍体干细胞的建立和研究大大拓展了单倍体胚胎干细胞研究的理论价值和应用前景。

1.2 猴孤雌单倍体胚胎干细胞系

2013年, *Cell Research*报道Yang等^[16]建立了来自食蟹猴孤雌囊胚的单倍体胚胎干细胞系, 从而获得了来自非人灵长类的单倍体胚胎干细胞系。研究人员采用了孤雌激活的方法, 即在体外通过化学刺激的方法诱导阻滞在减数分裂II期的卵母细胞重新进入细胞周期, 排除第二极体, 并在体外发育到囊胚; 继而从70枚囊胚中建立了10株孤雌来源的

细胞系,其中有2株细胞系含有单倍体细胞,并通过流式分选技术分选富集,获得了能够在体外稳定维持的单倍体细胞系。建立的食蟹猴孤雌单倍体胚胎干细胞具有典型的灵长类胚胎干细胞的基本特征,在体外能够分化成三胚层的细胞,将其注入免疫缺陷的小鼠体内能够形成含有三胚层组织的畸胎瘤。研究人员进一步证明,这些细胞能够用于稳定的遗传修饰及大规模的遗传筛选研究,从而为灵长类基因功能研究提供了新的工具。

1.3 具有替代精子能力的大鼠孤雄单倍体胚胎干细胞

2014年, Li等^[17]在 *Cell Stem Cell* 杂志报道,成功建立大鼠的孤雄和孤雌单倍体胚胎干细胞系,并证明大鼠孤雄单倍体胚胎干细胞在长期培养过程中仍可维持单倍性和多能性,并且能够在注射进大鼠囊胚后形成嵌合体并发生种系嵌合。同时,研究人员还发现,大鼠单倍体胚胎干细胞同样具有替代精子与卵母细胞“受精”并产生健康大鼠的能力。通过种系嵌合和替代精子进行卵胞质注射两种途径,该团队都成功获得了来自大鼠单倍体胚胎干细胞的子代,从而证明大鼠孤雄单倍体胚胎干细胞可以将基因修饰快速地遗传给后代。这一工作将对大鼠疾病模型的研发和大鼠功能基因组学研究起到重要的推动作用。

1.4 小鼠单倍体上胚层干细胞系

小鼠单倍体胚胎干细胞倍性不稳定,染色体自发加倍形成二倍体,因此单倍体胚胎干细胞是否能够进一步分化获得其他类型的单倍体细胞仍然未知。Shuai等^[18]成功在体外将单倍体胚胎干细胞诱导分化,获得了单倍体上胚层干细胞系,并通过一系列实验证明该单倍体上胚层干细胞与体内分离的上胚层干细胞在细胞形态、多能性基因和特异性基因表达上都非常相似,并由单倍体上胚层干细胞进一步向神经方向分化,获得了单倍体神经干细胞样细胞系,证明了哺乳动物的单倍体干细胞在单倍体状态下可以维持多能性,并能够以单倍体的形式在体外分化。这为进一步分化获得在遗传筛选中更具价值的不同类型的单倍体体细胞奠定了基础。

2 利用单倍体干细胞技术进行遗传筛选和遗传修饰

2.1 利用单倍体胚胎干细胞开展细胞水平基因敲除和筛选

胚胎干细胞可以在体外分化形成各种类型的细胞,通过基因敲除研究该基因对胚胎干细胞向特定

类型细胞分化的作用,是研究细胞命运决定的重要手段。然而,在胚胎干细胞上开展双等位基因敲除比较困难。Li等^[14]和Yang等^[15]证实,在单倍体胚胎干细胞上完成基因打靶能够获得基因敲除细胞系;利用转座技术在单倍体胚胎干细胞上进行大规模随机突变,可以快速地建立涵盖整个基因组的基因突变细胞库,从而为大规模基因筛选提供了基础。Li等^[17]还结合CRISPR/Cas基因编辑技术和单倍体干细胞技术,直接获得多基因敲除的胚胎干细胞系,并且处理后的细胞仍能维持单倍体和多能性状态。这些研究将促进利用单倍体胚胎干细胞开展遗传筛选和基因功能研究。

2.2 利用单倍体干细胞开展小鼠个体水平遗传筛选

虽然孤雄单倍体胚胎干细胞可以替代精子产生后代,但是由于其印记维持不稳定,导致效率非常低(4.5%左右)。Zhong等^[19]利用CRISPR/Cas技术在小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞上同时敲除两个印记基因H19和Gtl2的差异性甲基化区域,产生的双敲除孤雄单倍体胚胎干细胞具有很高的发育效率(20%左右),接近球形精子的发育效率。研究人员进一步将CRISPR/Cas基因突变库导入到单倍体胚胎干细胞中,构建了组成性表达基因组突变文库的单倍体干细胞突变库,其中单个细胞携带一个sgRNA和Cas9核酸酶;并证实将这些细胞注入卵子中可以批量产生携带不同突变基因的小鼠,从而使得小鼠个体水平的遗传筛选成为可能。这一研究填补了哺乳动物在个体水平进行遗传筛选的空白,为遗传发育研究提供了新的体系。

3 利用单倍体干细胞开展生殖发育研究

3.1 孤雌单倍体干细胞替代卵母细胞获得小鼠

小鼠孤雄单倍体干细胞可以替代精子,那么来自于小鼠卵母细胞的孤雌单倍体干细胞是否能够替代卵母细胞遗传物质从而完成发育?针对这一问题,Wan等^[20]建立了带有外源绿色荧光蛋白基因修饰的小鼠孤雌单倍体干细胞,通过显微操作技术,用孤雌单倍体干细胞替代卵子基因组与精子共同发育,最终形成可育的动物个体。这项研究对配子细胞来源的干细胞替代配子完成生殖过程是一个重要补充,为切除卵巢的疾病患者保存卵子和避免线粒体疾病的辅助生殖技术研发提供了新的思路。

3.2 利用单倍体干细胞开展胚胎发育中的雌雄染色体互作研究

早期胚胎发育是终末分化的配子通过重编程开

发育程序的必由之路。受精卵是最高全能性的细胞。在小鼠八细胞胚胎时期之前, 细胞核内的雌源染色质组与雄源染色质组在空间上是独立的。已经证明二细胞胚胎时期前的重编程过程是不需要雌源与雄源染色质组进行互作的。但二细胞胚胎时期之后, 雌雄源染色质的互作是否是发育必需的是发育生物学领域关注的问题之一, 但由于技术限制, 一直不能得到很好的回答。Li 等^[21]通过细胞融合技术获得了小鼠孤雌和孤雄单倍体融合的胚胎干细胞系, 其是一种没有经过囊胚前雌雄源染色质组互作的二倍体胚胎干细胞系; 进一步研究发现, 该细胞系可通过四倍体补偿技术获得正常可育小鼠, 从而证明至少囊胚发育期之前的雌雄染色质组互作对胚胎发育不是必需的。

3.3 利用单倍体干细胞技术获取双雌性“同性”小鼠后代及印记基因功能研究

印记基因是在父源和母源染色体上具有不同表达模式的基因。印记基因的紊乱可以造成多种个体异常, 其中主要包括胎儿的生长和发育、个体行为异常以及激素与代谢异常三类。在这些异常中, 很多与严重的疾病表型相关联, 因此, 印记基因是具有重要价值的研究对象。单倍体干细胞有来自于父源或母源单方面的遗传物质, 同时具备胚胎干细胞在基因操作上的优势, 是合适的印记基因研究平台。利用孤雌胚胎干细胞为平台, 研究人员通过敲除两个父源甲基化的印记调控区, 发现可以修复该区域的印记基因表达模式。进一步通过将敲除的孤雌单倍体干细胞注射到卵母细胞中, 获得了具有两个母亲的孤雌胚胎。将这些孤雌胚胎移植到代孕鼠的子宫中, 能够以较高的效率获得孤雌来源的小鼠。这一研究给哺乳动物的孤雌生殖提供了新的途径, 为动物繁殖和育种的相关研究提供了新的思路, 同时也为印记异常和治疗方式的探索提供了新的研究方法^[22-23]。

4 哺乳动物异种杂合二倍体胚胎干细胞的创建和应用

种间杂交在进化生物学、发育生物学和遗传学领域备受关注。种间杂交个体具有独特的杂合遗传背景和性状, 是研究物种形成、基因调控进化和 X 染色体失活的重要模型。然而, 由于物种间存在生殖隔离, 哺乳动物远亲物种间的配子无法受精和发育, 因此种间杂交只在近亲物种间发生, 如马和驴杂交产生骡子。为了生物学研究的便利, 人们创造

出各类远亲物种间的杂合细胞, 如小鼠 - 大鼠、人 - 啮齿类、人 - 牛等杂交细胞, 但由于这些细胞都是由体细胞融合产生, 因而都是四倍体并且基因组不稳定, 往往出现大量的染色体丢失, 而且几乎没有分化能力。那么, 能否绕开生殖隔离的屏障, 创造出哺乳动物远亲物种间的二倍体杂合细胞? Li 等^[24]在 *Cell* 报道, 通过细胞融合技术将小鼠孤雄(雌)和大鼠孤雌(雄)单倍体干细胞融合, 能够绕开小鼠和大鼠的精卵融合后无法发育的生殖隔离障碍, 获得了异种杂合二倍体胚胎干细胞。这类杂交细胞具有胚胎干细胞的三胚层分化能力, 甚至能够分化形成早期的生殖细胞, 并且在培养和分化过程中保持异种二倍体基因组的稳定性。这是首例人工创建的、以稳定二倍体形式存在的哺乳动物异种杂合胚胎干细胞系。基因表达分析发现, 异种杂合二倍体细胞展现出“高亲”、“低亲”等独特的基因表达模式以及独特的生物学性状, 对两者结合进行分析能够有效地挖掘出物种间性状差异的分子调控机制。同时, 杂合细胞的 X 染色体失活也不采用哺乳动物常见的“随机失活”模式, 而是采用小鼠 X 染色体特异失活模式。利用这一特性, 该研究系统鉴定了小鼠 X 染色体失活逃逸基因。这一研究为从天然存在生殖隔离的物种制备包含稳定二倍体基因组的杂交干细胞提供了新方法。这些具有胚胎干细胞特性的异种二倍体杂合干细胞将为进化生物学、发育生物学和遗传学等研究提供新的模型和工具, 尤其对于研究进化上不同物种间性状差异的分子机制和 X 染色体失活具有重要意义。

5 结语

许多研究的突破来自于新技术和新方法的引入和有效应用。单倍体干细胞是一种全新的人工建立的细胞类型。在“干细胞与再生医学研究”先导专项的支持下, 我国科学家在单倍体干细胞的建立和应用上做出了一系列突破性进展, 极大地丰富了单倍体干细胞类型, 建立了多种新的基于单倍体干细胞的遗传修饰和辅助生殖技术, 展示了单倍体干细胞可能为生殖生物学、发育生物学、遗传学和进化生物学带来的重要应用前景。近日, 美国科学家首次获得了人孤雌单倍体胚胎干细胞系^[25], 相信未来单倍体干细胞技术会在更多的物种中建立和应用。希望我国科学家能够继续在单倍体干细胞研究领域取得突破, 引领这一领域的发展。

[参 考 文 献]

- [1] Botstein D, Fink GR. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science*, 1988, 240: 1439-43
- [2] Gupta N, Carlson PS. Preferential growth of haploid plant cells *in vitro*. *Nat New Biol*, 1972, 239: 86
- [3] Germana MA. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 839-57
- [4] Prigge V, Melchinger AE. Production of haploids and doubled haploids in maize. *Methods Mol Biol*, 2012, 877: 161-72
- [5] Freed JJ, Mezger-Freed L. Stable haploid cultured cell lines from frog embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1970, 65: 337-44
- [6] Philippe C, Landureau JC. Culture of cockroach embryonic cells and hemocytes of parthenogenic origin. Maintenance *in vitro* of haploid and aneuploid forms. *Exp Cell Res*, 1975, 96: 287-96
- [7] Debec A. Haploid cell cultures of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 1978, 274: 255-6
- [8] Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*, 2009, 326: 430-3
- [9] Kotecki M, Reddy PS, Cochran BH. Isolation and characterization of a near-haploid human cell line. *Exp Cell Res*, 1999, 252: 273-80
- [10] Carette JE, Guimaraes CP, Varadarajan M, et al. Haploid genetic screens in human cells identify host factors used by pathogens. *Science*, 2009, 326: 1231-5
- [11] Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, et al. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 1983, 73: 249-61
- [12] Elling U, Taubenschmid J, Wirnsberger G, et al. Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, 9: 563-74
- [13] Leeb M, Wutz A. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 2011, 479: 131-4
- [14] Li W, Shuai L, Wan H, et al. Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 2012, 490: 407-11
- [15] Yang H, Shi L, Wang BA, et al. Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 2012, 149: 605-17
- [16] Yang H, Liu Z, Ma Y, et al. Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell Res*, 2013, 23: 1187-200
- [17] Li W, Li X, Li T, et al. Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 404-14
- [18] Shuai L, Wang Y, Dong M, et al. Durable pluripotency and haploidy in epiblast stem cells derived from haploid embryonic stem cells *in vitro*. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7: 326-37
- [19] Zhong C, Yin Q, Xie Z, et al. CRISPR-Cas9-mediated genetic screening in mice with haploid embryonic stem cells carrying a guide RNA library. *Cell Stem Cell*, 2015, 17: 221-32
- [20] Wan HF, He ZQ, Dong MZ, et al. Parthenogenetic haploid embryonic stem cells produce fertile mice. *Cell Res*, 2013, 23: 1330-3
- [21] Li X, Wang JQ, Wang LY, et al. Co-participation of paternal and maternal genomes before the blastocyst stage is not required for full-term development of mouse embryos. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7: 486-8
- [22] Zhong C, Xie Z, Yin Q, et al. Parthenogenetic haploid embryonic stem cells efficiently support mouse generation by oocyte injection. *Cell Res*, 2016, 26: 131-4
- [23] Li Z, Wan H, Feng G, et al. Birth of fertile bimaternal offspring following intracytoplasmic injection of parthenogenetic haploid embryonic stem cells. *Cell Res*, 2016, 26: 135-8
- [24] Li X, Cui XL, Wang JQ, et al. Generation and application of mouse-rat allodiploid embryonic stem cells. *Cell*, 2016, 164: 279-92
- [25] Sagi I, Chia G, Golan-Lev T, et al. Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells. *Nature*, 2016, 532: 107-11