

克隆技术及其应用*

陈大元

(中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

摘要 “克隆”的含义是无性繁殖,即由同一个祖先细胞分裂繁殖而形成的纯细胞系,这个细胞系中每个细胞的基因彼此是相同的。动物克隆,就是指通过无性繁殖由一个细胞产生一个和亲代遗传性状一致,形态非常相像的动物。随着动物克隆研究的发展,克隆技术将广泛应用于医学、畜牧业和濒危动物保护等领域。

关键词 克隆, 动物, 胚胎细胞, 体细胞



“克隆”是“clone”的音译,其含义是无性繁殖,即由同一个祖先细胞分裂繁殖而成的纯细胞系,该细胞系中每个细胞的基因彼此是相同的。动物克隆,就是指通过无性繁殖由一个细胞产生一个和亲代遗传性状一致、

形态非常相像的动物。

科学家们很早就开始了动物克隆的研究。早在 1938 年,德国胚胎学家 Spemann 即提出“奇异的实验”的设想。1952 年,英国科学家 Briggs 和 King 首次报道了蛙的核移植研究。1962 年,英国剑桥大学的 Gurdon 获得了成年蛙。我国已故科学家童第周教授在 20 世纪 60—70 年代曾用囊胚细胞进行鱼类细胞核移植工作,获得属间和种间移核鱼,使我国鱼类核移植研究居世界领先水平。

早期的动物克隆研究仅限于两栖类和鱼类,直到 20 世纪 80 年代,核移植克隆技术才开始应用于哺乳动物。根据供核细胞的不同,可将动物克隆研

究分为三个阶段:

1 胚胎细胞克隆阶段

1981 年, Illmensee 和 Hoppe 报道了他们用小鼠的正常囊胚或孤雌活化囊胚的内细胞团细胞作为核供体,直接注入去掉雌雄原核的受精卵胞质中,重构胚体外发育到桑葚胚或囊胚后移植寄母子宫,获得克隆小鼠,这是第一次用胚胎细胞对哺乳类进行核移植获得成功。1983 年,美国科学家利用核移植技术和细胞融合方法获得了克隆小鼠。1986 年,英国的 Willadsen 用绵羊的 8—16 细胞阶段的胚胎细胞作为供体进行核移植,首次应用电融合的方法克隆出一只小羊。此后,科学家们又相继克隆出小鼠、绵羊、牛、兔、猪和猴等。我国科学家也在 20 世纪 90 年代成功开展了胚胎细胞克隆兔、山羊、小鼠、牛和猪等研究。

2 同种体细胞克隆阶段

1997 年 2 月,英国罗斯林研究所 Wilmut 等人宣布,他们用 6 岁成年羊的高度分化的乳腺细胞进行了核移植,成功地获得了克隆羊“多莉”^[10]。这是第一次用成年体细胞作为供核细胞,由此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,

* 收稿日期: 2002 年 4 月 25 日

恢复全能性,这是生物技术史上具有划时代意义的重大突破,是克隆技术的一个里程碑,也改写了部分生物学的理论。1998 年 5 月,美国科学家 Robl 的研究组利用牛胎儿成纤维细胞克隆出了 3 头牛,而且携带了转移的基因。1998 年 7 月,日本科学家 Kato 等用牛的输卵管细胞克隆出了 8 头小牛^[3]。1998 年 7 月和 1999 年 6 月,美国夏威夷大学 Yanagimachi 领导的研究小组克隆小鼠成功,并打破了哺乳动物克隆研究初期人们认为只有雌性动物才能被克隆的迷信^[8,9]。此后,同种体细胞克隆出的山羊、猪、猫和兔^[6,7]也都相继诞生。1999 年和 2002 年,我国体细胞克隆山羊和克隆牛也都获得成功。

3 异种体细胞克隆阶段

异种体细胞克隆与同种体细胞克隆的差异在于供核体细胞与受体卵母细胞来源于不同的物种。即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。异种克隆研究面临着许多问题,如体细胞核能否在异种卵胞质中去分化并支持早期发育?异种核质能否相容?异种重构胚能否着床并进行全程发育等。

1999 年,中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室将成年大熊猫体细胞作为供核体细胞移植到去核(遗传物质)的日本大耳白兔卵母细胞中,成功地构建出异种重构胚,体外培养获得孵化囊胚^[1]。2001 年将重构胚移植寄母子宫,获得了着床的重大进展。

1999 年,美国 Wisconsin Madison 大学以来自绵羊、猪、猴和大鼠的皮肤成纤维细胞做为供核体细胞,移植到去核(遗传物质)牛卵母细胞中获成功,表明牛的卵母细胞质可以支持来自不同物种的细胞核进行早期发育^[2];2000 年,Lanza 等人从死亡的濒危牛上取材并培养了皮肤成纤维细胞做为供核体细胞,重构胚移植后,受体最长怀孕至 202 天流产,微卫星技术分析证明,所有克隆牛胎儿的基因型均与供体细胞一致^[4];2001 年,*Nature Biotechnology* 上报道了异种体细胞克隆濒危哺乳动物——欧洲盘羊的成功,为濒危动物的保护提供了重要的借鉴^[5]。

随着体细胞克隆技术的发展,它与人类生产和生活的关系也就愈发密切,不同研究领域的科研人

员都认识到克隆技术在不同领域的应用前景。

4 克隆技术在医学领域中的应用

克隆技术在医学领域具有重要的应用价值。首先,人类可以利用转基因克隆动物制造各种药物,使“克隆”动物成为药物制造厂。转基因动物是基因人工操作的产物,是将外源基因直接引入或引入到受体细胞中获得表达,其细胞分化后发育成为动物个体,它可以按照人类的需要生产,被称为“活体生物反应器”。将这种昂贵的转基因动物繁衍下去的最好办法就是无性繁殖,通过克隆将携带特定基因的转基因动物“复制”下来。另外,克隆技术与基因疗法的结合,使得全面、彻底、高效地治疗遗传疾病成为可能。例如,为治疗遗传缺陷,可将修改后的基因导入早期胚胎细胞,使其具备正确的基因,然后将此正常细胞移入去核卵母细胞中,再将胚胎植入母体,即可发育成正常的胎儿。该方法比传统的基因治疗方法具有更多优势。此外,利用克隆技术可以生产人体所需的内脏器官,用于器官移植或替换体内衰老及发生病变的器官。例如正在进行的利用克隆猪提供人类器官的研究,即是将人类基因整合到猪的细胞的基因组中,或者将猪的胚胎成纤维细胞,用基因打靶的方法,把猪的 $\alpha-1,3$ -半乳糖苷转移酶基因敲除,然后把这种缺失 $\alpha-1,3$ -半乳糖苷转移酶基因的猪胚胎成纤维细胞通过核移植克隆出猪,其器官可供人类器官移植,可缓解器官捐献的严重不足,挽救千百万人的生命。同时,还可克隆出大量基因型相同的动物来进行临床实验,既可保证实验动物的供给,又可消除由于遗传基因不同给临床实验带来的混乱。

随着体细胞克隆动物的相继诞生以及人类胚胎干细胞系的建立,治疗性克隆技术逐渐成为可能的医疗方法。

5 克隆技术在畜牧业中的应用

克隆技术也给畜牧业带来了许多益处。畜牧业的效率主要来自畜禽个体的生产性能和群体的繁殖性能。如果个体生产性能好,用同样的投入可以生产出更多的产品;如果群体的繁殖性能高,则会加快育种速度和减少种畜的数量,增加工作在一线的商品畜禽的头数。畜禽的繁殖性能是由它们的遗传特性决定的,利用体细胞克隆技术可以更

好地实现大量优良品质的保存。例如,为了获得大量具有优良品质的母牛,可以取此母牛的体细胞进行体外培养,然后将体细胞或体细胞核注入到去核(遗传物质)卵母细胞中构建胚胎,待胚胎发育至一定阶段后将胚胎移植到大量非优良品系的受体母牛中,让普通的母牛替品质优良的供体母牛生产后代,从而实现优良品系种群的扩大和优良品质的保存,提高畜牧业的效率。同样,也可以通过体细胞克隆的方法获得具有优良品质的种公牛。

6 克隆技术在濒危动物保护中的应用

克隆技术是否能挽救濒危动物?这个问题一经提出即引起广泛的争论。动物灭绝的原因可以归结为种群繁殖速度降低或种群死亡速率增高而使种群处于难以逆转的萎缩状态。就目前野生动物保护现状而言,如不通过人工繁殖方法,许多动物根本无法维持其种群数量。克隆技术的成熟应用可以起到增加种群数量的目的,但大量具有相同遗传基因个体的产生是否会破坏生物多样性呢?对于濒危物种而言,保护其遗传多样性、避免其灭绝是保护生物多样性的前提,对于一个即将灭绝的物种,讨论其物种多样性或生态系统多样性是毫无意义的。通过动物克隆增加濒危动物个体的数量,对于避免该物种的灭绝具有重要意义,尤其是对于仅剩下一个或几个个体的物种,克隆的意义就更为重要。但由于濒危物种的个体数量少,很难保证实验的需要,几乎不可能提供用于克隆实验的个体。因此,科学家就提出利用异种克隆来解决这个问题。异种克隆的难度虽然很大,但已有成功的例子,相信它对挽救濒危物种将起到重要的作用。

7 关于“克隆人”

1997年“多莉”羊的诞生引发了关于“克隆人”问题的广泛争议。如果“人”只是指特定的基因组,或者指“生物学的人”,那么可以说“克隆人”与他们的父本或母本是完全相同的。但“人”不仅是在系统发育谱上属于脊椎动物门、哺乳动物纲、灵长类、人科、人属的人,而且是心理、社会的人。初生儿的神经系统是没有发育完全的,只有在出生后与他人的交往、学习,在社会环境中逐渐发育成熟,才能形成具有特殊心理、行为、社会特征的人。因此,人是生物、心理、社会的集合体,具有在特定环境下形成

的特定人格,而这个特定的人格是不能复制的,是克隆不出来的,即使克隆出来,也只是与其父本或母本相同的基因组,而不是与父本或母本一样的人。2001年11月25日,美国先进细胞技术公司(ACT)报道了利用克隆技术培育出人类早期胚胎(4、6细胞期),这一事件在世界引发轩然大波,激起了各国争议,因为它离克隆人只有一步之遥,构建成的胚胎只要移入妇女子宫,就有可能发育成个体(即克隆人),它比治疗性克隆技术要简单得多。因此,人们十分担心少数人在经济利益的诱惑下或其它情况下,会越轨硬闯克隆人的禁区。

虽然人类胚胎有可能被少数越轨者克隆人,但绝大多数科学家会将人类胚胎用于治疗性克隆,通过发展生物高科技造福人类。因此,人类胚胎研究存在双重属性,人类必须用好这把“双刃剑”,发挥其有利一面,限制其不利一面,为人类生存和幸福服务。

在动物克隆中,“克隆人”成为公众关注的伦理问题。关于克隆人,多数西方国家政府、领袖以及宗教界人士纷纷发表声明反对克隆人,也有不少国家制定了禁止克隆人的法令。在这种情况下,国际上依然还有人在克隆人。如意大利妇科专家安蒂诺利、美国专家扎沃斯,还有在美国的法国女科学家布利吉特、布瓦瑟利耶。安蒂诺利还鼓吹已用克隆技术使一名妇女怀孕8周。

克隆人与克隆动物含义是不一样的,克隆人也仅仅克隆了先天部分,不能克隆人类后天的获得。所以在不同时代、不同环境、不同条件下,要想用克隆技术复制出与前人完全一样的人是不可能的。生物的进化具有继承性和不可逆性,一旦由无性生殖进化到有性生殖,就不可能回到原始的无性生殖。人类可以用无性生殖的现代技术来优化动物为人类服务。但是,人类用克隆技术把自身的有性生殖变成无性生殖,在进化上是没有意义的,在人类生活中也是没有意义的。有人认为,克隆技术对于不育夫妇可以进行弥补,但克隆人会导致人类基因库的单一性,将会破坏家庭结构,从而造成社会混乱。因此,我国政府和科学家反对克隆人,而是希望把克隆技术用于动物、用于治疗性克隆,挽救千万人的生命,造福人类。

为此,我们呼吁我国政府及各国政府应尽快立法禁止进行克隆人试验,或制定国际公约严格禁止克隆人。对从事克隆技术和胚胎干细胞研究的科技人员也应制定出一些条例,将克隆人类胚胎控制在一定的法律和伦理范围之内。同时应加强宣传教育,让我国和全世界人民在赞成治疗性克隆、反对克隆人上达成共识。

主要参考文献

- 1 Chen D Y, Sun Q Y, Liu J L et al. The giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) somatic cell nucleus can dedifferentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg. *Science in China*, 1999, 42(4): 346– 353.
- 2 Dominko T, Mitalipova M, Haley B et al. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol. Reprod.*, 1999, 60(6): 1 496– 1 502.
- 3 Kato Y, Tani T, Sotomaru Y et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282: 1 975– 1 976.
- 4 Lanza R P, Cibelli J B, Diaz F et al. Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning*, 2000, 2(2): 79– 90.
- 5 Loi P, Ptak G, Barboni B et al. Genetic rescue of an endangered mammal by cross– species nuclear transfer using post mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19(10): 962– 964.
- 6 Onishi A, Iwamoto M, Akita T et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 2000, 289(5482): 1 188– 1 190.
- 7 Shin T, Kraemer D, Pryor J et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*, 2002, 415: 859.
- 8 Wakayama T and Yanagimachi R. Cloning of male mice from adult tail tip cells. *Nat. Genet.*, 1999, 22: 127– 128.
- 9 Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394(23): 369– 374.
- 10 Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385(6 619): 810– 813.

Cloning Technology and Its Application

Chen Dayuan

(Institute of Zoology, CAS, 100080 Beijing)

“Clone” is a term describing the production of a genetically identical cell line through schizogenesis of a cell. Animal cloning means the production of an individual that is genetically the same as the individual from which the nucleus donor is derived by asexual reproduction. With the development of animal cloning research, somatic cell cloning will be widely used in medicine, animal production and endangered wildlife conservation.

陈大元 中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室首席研究员, 博士生导师。1933 年出生。中国科学院技术协会五届和六届全委会委员, 中国动物学会理事长。1957 年毕业于山东大学生物系胚胎专业后, 师从童第周教授和张致一教授。1984 年从美国 IOWA 大学医学院回国后, 从事受精机理、显微受精和动物克隆研究, 现为动物研究所受精生物学学科带头人。国家科技部“克隆大熊猫研究”攀登专项首席科学家, 国家自科科学基金委“家畜体细胞无性繁殖研究”重点项目首席科学家, 中国科学院“异种克隆大熊猫研究”知识创新工程重大项目课题主持人和“973”项目“异种克隆中线粒体命运研究”课题负责人。曾获国家及省部委一、二等奖 11 项。发表论文 160 余篇, 主编专著《受精生物学》一部。培养硕士、博士和博士后 33 名。