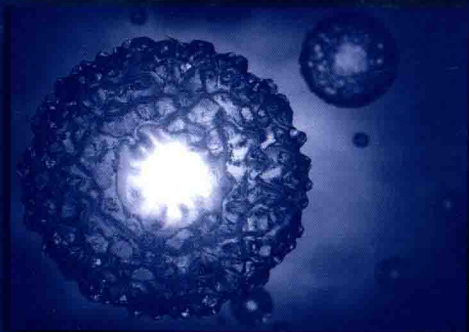
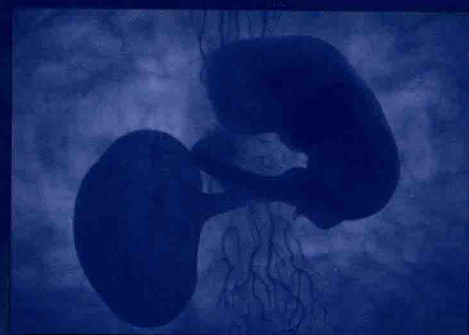


李井春 曹新燕 著

动物生殖学 理论与实践

DONGWU SHENGZHIXUE
LILUN YU SHIJIAN



化学工业出版社

李井春 曹新燕 著

动物生殖学 理论与实践

DONGWU SHENGZHI XUE
LILUN YU SHIJIAN



化学工业出版社

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

动物生殖学理论与实践/李井春, 曹新燕著. —北京:
化学工业出版社, 2016.8

ISBN 978-7-122-27488-5

I. ①动… II. ①李…②曹… III. ①动物-生殖生理
学 IV. ①Q492

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 146835 号

责任编辑: 邵桂林
责任校对: 王素芹

装帧设计: 王晓宇

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市宇新装订厂

710mm×1000mm 1/16 印张 21 $\frac{3}{4}$ 彩插 1 字数 406 千字

2016 年 9 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 98.00 元

版权所有 违者必究

本书的出版得到了以下项目的资助：

中国农业科学院科技创新工程经费资助

国家自然科学基金青年基金项目（项目编号：31501958）

国家自然科学基金青年基金项目（项目编号：31402136）

黑龙江省留学归国科学基金项目（项目编号：LC2012C12）

黑龙江省教育厅海外学人科研项目（项目编号：1252HQ010）

黑龙江八一农垦大学博士启动基金（项目编号：B2012-07）

吉林省科技发展计划项目（项目编号：20140520168JH）

在此表示感谢！

前言

FOREWORD

《动物生殖学理论与实践》一书是由黑龙江八一农垦大学李井春博士和中国农业科学院特产研究所曹新燕博士，依据承担和参加的国家和省（部）级多项科研课题取得的科研成果和发表的论文、著作，并结合多年的生产实践编著而成。

全书共分5章，从动物生殖生理、人工授精、胚胎移植、配子与胚胎生物技术等方面进行了全面论述，并对国内、外动物生殖领域研究的新进展进行了综述。

本书包含了对雌性动物卵母细胞的体外成熟、体外受精、卵母细胞的核移植等理论与技术的概述；探讨了雄性动物的精子体外保存、活力精子的筛选以及精子对生殖免疫反应影响等因素；阐述了动物胚胎体外发育的影响因素、优化胚胎体外培养条件等。本书的研究内容既有生殖调控机理的探讨，又有生殖细胞体外发育调控技术的改进和创新。本书从研究深度看，有个体到细胞（配子与胚胎），也涉及分子水平。书中主要以动物生殖细胞的研究为主，详细阐述了动物生殖生物学理论和技术，为提高动物生殖细胞在体外发育效率提供数据参考。本书重点在于研究动物生殖细胞体外发育规律和介绍提高动物生殖效率的理论和技術，对提高动物生殖效率有着重要的理论和实践指导意义。

本书适合从事生殖生物学、发育生物学、兽医产科学、动物遗传育种与繁殖学等专业的研究生和教师参考，同时也可为本科生和从事动物胚胎生物技术研究领域的科技人员提供参考。

全书由李井春统稿。黑龙江八一农垦大学动物科技学院和中国农业科学院特产研究所对本书的著作和出版提供了大力支持和帮助，在此表示诚挚地感谢！

由于笔者学识水平有限，书中难免有不足之处，敬请广大读者批评指正。

著者

2016年5月

目 录

CONTENTS

绪论	1
参考文献	15
第一章 卵母细胞的成熟机制及实践	16
第一节 卵母细胞成熟机制概述	16
第二节 性成熟和促性腺激素对小鼠卵母细胞体外发育能力的影响	21
第三节 不同剂量激素处理对小鼠超数排卵及产仔性能的影响	60
参考文献	64
第二章 精子对生殖免疫反应的影响	73
第一节 影响动物人工授精诱导子宫免疫反应的因素	73
第二节 咖啡因、双丁酰环磷腺苷调控体外猪 PMN 对精子吞噬性的研究	77
第三节 猪精浆、卵黄调控体外牛 PMN 对精子的趋化和吞噬活性的研究	82
第四节 精子对大鼠子宫炎症反应的影响	88
参考文献	93
第三章 早期胚胎发育的影响因素	97
第一节 活性氧对哺乳动物早期胚胎体外发育阻滞的研究进展	97
第二节 小鼠胚胎培养液中 H_2O_2 浓度与胚胎体外发育的相关研究	100
第三节 微流控胚胎培养芯片对早期胚胎发育的影响	117
第四节 胚胎滞育对水貂繁殖性能的影响	122
参考文献	128
第四章 哺乳动物辅助生殖技术的理论和实践	134
第一节 人工授精技术	134
第二节 胚胎移植技术	193
第三节 优质精子的筛选技术	212

第四节	体外受精技术	223
第五节	动物体细胞核移植技术	259
参考文献		303

第五章	动物转基因、性别控制及干细胞技术	318
第一节	动物转基因概述	318
第二节	动物性别控制技术	325
第三节	胚胎干细胞技术	332
参考文献		339

绪 论

一、动物生殖学的基本概念

一般而言，动物生殖学是指以动物生殖细胞或早期胚胎为研究对象，以细胞生物学、发育生物学、生殖生物学和分子生物学的原理和技术为基础，对细胞或早期胚胎进行操作、加工或改造，研究细胞或早期胚胎的生长发育规律，以及调控其生长发育模式的一门综合性技术科学。

在自然生理状态下，不论是植物或动物，其细胞、组织或器官是在体内环境中完成其生命代谢活动的，细胞只在其既定的遗传信息的指导下，按照自身的规律生长分化，表现自身特有的生物性状和生理得以发挥其功能。

随着生命科学和技术的发展，在充分认识生殖细胞的结构、组成和生物学特性的理论基础上，动物生殖生物学技术可以在分子、亚细胞、细胞、组织或器官的不同水平上，借助专门的技术手段，于体外或体内环境条件下，对细胞进行操作或加工，研究其生长发育规律以及改造其结构或组成，进而了解其生物学功能及运用其特性，以实现人类所需动物产品的工程化生产。

二、动物生殖学的研究范畴

动物生殖学是生物科学学科的重要组成部分。然而在近 50 年来，随着动物生物学科学理论的完善和科学技术的创新，动物生殖学在理论、技术及实际应用上，已成为一个具有自身特点的系统的学科，也是生命科学基础理论和应用技术紧密结合的新型学科方向。

动物生殖学主要包括生殖器官的形态结构、生殖细胞的发生与调控机制、受

精生物学和妊娠的机制、生理以及胚胎与母体的相容性等方面的内容,本书主要从卵母细胞的成熟机制及技术、生殖免疫反应(精子和胚胎)、胚胎发育的影响因素、动物辅助生殖技术理论与实践(体外受精、核移植及优质精子的筛选技术等)及转基因技术、干细胞技术等方面进行阐述和介绍。

三、动物生殖学的发展简史

动物生殖学是在细胞学、细胞生物学、实验胚胎学、发育生物学等学科的理论 and 实验基础上逐渐发展起来的理论性和实验性很强的新型学科。生殖生物学的发展历史相当久远。

(一) 动物配子与胚胎工程

哺乳动物胚胎工程的历史可追溯到 19 世纪末。1890 年英国剑桥大学的 W. Heape 首次尝试兔的胚胎移植并获得成功。他将 4 细胞期的安哥拉兔早期胚胎移植到比利时野兔的输卵管内,结果产生了 4 只比利时仔兔和 2 只安哥拉仔兔。这个试验第一次证实了动物的受精卵在异种母体内发育的可能性。

1912 年 Brachet 将兔的胚泡培养于血浆凝块中,观察到了原沟和胎盘原基结构的发育。1922 年英国的 Biedl 也进行了兔的胚胎移植试验。与此同时,动物胚胎生长、发育和代谢及其环境条件等相关基础研究也全面开展。1933 年 W. H. Lewis 和 P. W. Gregory 体外培养兔早期胚胎通过了卵裂阶段。

1935 年美国的 G. Pincus 和 E. V. Enzmannn 比较了哺乳动物卵在体内和体外的行为特点。同年, W. H. Lewis 和 E. S. Wright 研究了小鼠卵的早期发育。1930 年 Pincus 用含有兔和鸡血浆及兔和鸡胚提取物的混合物悬滴培养,使兔的早期胚胎从 2 细胞或 4 细胞在体外发育到桑椹胚。从 19 世纪末到 20 世纪初,这些早期的胚胎移植试验为以后农业动物胚胎移植研究的开展奠定了基础。

1934 年美国学者 Warwick 等移植绵羊胚胎获得成功,从此拉开了家畜胚胎移植研究的序幕。Warwick (1949) 又完成了山羊的胚胎移植。同年, Chang 在培养基中添加加热失活的血清培养兔 2 细胞胚获得成功。这一成果激励了用热失活的血清作为培养基添加物开发农业动物胚胎培养系统的尝试,使以后动物胚胎的体外长期培养技术得到了长足的发展。

20 世纪 50 年代以后,相继取得了猪(Kvasnickii 等, 1951)和牛(Willett 等, 1951)的胚胎移植的成功。继之,规模性的羊胚胎移植技术体系建立了起来,并经过不断改进,使胚胎移植的妊娠率大幅提高(Hunter, 1955; Averill, 1957),为羊胚胎移植在生产中的实际应用铺平了道路。

1964 年日本的杉江等和美国的 Mutter 等创造了牛胚胎的非手术移植方法,

在胚胎移植技术上取得了重大突破,解决了牛胚胎移植因手术复杂、成本高、效率低等而难以在生产中推广的问题。1973年,英国的 Wilmut 和 Rowson 移植牛冷冻胚胎产生了犊牛。1976年,Newcomb 等建立了牛胚胎非手术采集技术。

这些关键技术的突破使动物胚胎的采集、培养、保存和移植的技术体系趋于成熟,使得农业动物的胚胎移植技术在生产中全面推广。期间,在世界许多国家成立了商业性胚胎移植机构,从事动物胚胎的销售及胚胎移植技术的培训和推广。尤其是1974年国际胚胎移植学会的成立,进一步促进了胚胎移植相关理论和技术及经验的广泛交流和深入发展。

20世纪80年代以后,胚胎移植技术在野生动物和珍稀动物的保存和繁殖上也得到了应用。胚胎移植技术的商业化在世界范围内的引种、优良品种家畜的推广、种畜的快速扩繁、低产家畜的改良、动物的遗传育种、畜牧业经济的发展方面发挥了不可估量的作用。

(二) 动物体外受精

早在1672年 de Graaf 首次描述了哺乳动物的卵泡,认为卵泡中含有卵和类似于卵的物质。1677年 Antony von Leeuwen Hoeke 首次观察到了人类和哺乳动物的精子。Carl Ernst von Bear 发现了哺乳动物真正的卵,于1872年发表了《论哺乳动物和人类卵的起源》一书,他在犬的输卵管中找到了卵子。

1876年 O. Hertwig 首先发现了动物的受精现象。2年之后,德国学者 Schenk 就进行了哺乳动物体外受精的尝试。他把排卵前的卵母细胞和取自附睾的精子于子宫液中孵育,结果发现了第二极体的释放和卵裂。但此后数十年里,体外受精的研究似乎没有显著的进展。20世纪50年代以前,虽然进行体外受精的研究,但也主要集中于无脊椎动物(如海胆)和非哺乳类脊椎动物(如蛙和鱼)。

1951年美籍华人张明觉和澳大利亚学者 Austin 同时分别发现了哺乳动物精子的获能(capacitation)现象。他们经过对兔的受精试验研究,发现精子只有在雌性生殖道内停留一定时间才具有使卵受精的能力。这一生理现象的发现对动物体外受精研究具有划时代意义。1954年, Thibault 等报道采用从家兔子宫收集到的获能精子受精获得成功,使精子获能理论得到了进一步证实。

1959年张明觉应用体外受精技术首次在世界上产生了试管兔,推动了动物体外受精研究的广泛开展。1964年 Yanagimachi 和 Chang 采用体外获能和体外受精技术获得了试管仓鼠。这项研究极大地简化了以前精子获能所经历的许多繁琐而经验性的程序。这一技术的诞生促使体外受精进入了快速发展的轨道。

1965年 Edwards 等首次进行了牛排卵前卵母细胞的体外培养。1978年,英

国的 Steptoe 和 Edwards 首次用体外受精技术获得了试管婴儿，在人类的辅助生殖治疗不孕领域取得了重大突破，也标志着这一技术开始造福于人类。进入 20 世纪 80 年代以后，开始考虑将体外受精技术应用于农业动物的繁殖生产。

1982 年 Brackett 等报道用体内成熟的卵母细胞经体外受精产生试管犊牛。随后，试管山羊（花田章等，1984）、绵羊（花田章等，1985）、猪（Cheng 等，1986）、水牛（卢克焕等，1987）和马（Palmer 等，1991）应运而生。同时，体外受精技术在部分灵长类动物中应用并获得了试管后代，如恒河猴（Bavister 等，1984）、狒狒（Clayton 和 Kuehl，1984）、绒猴（Lopata 等，1988）、美洲虎（Miller，1990）。

在体外受精研究的同时，开展对与其相关的配子的采集、配子的培养、培养液的配比、培养条件等各环节技术进行研究并改进，使体外受精技术体系日臻完善，并商业化应用于农业动物的繁殖生产。我国从 20 世纪 80 年代以后，先后完成了各种家畜的体外受精研究，并获得了一批试管家畜，广泛应用于家畜的改良育种。

对于某些动物，由于其卵母细胞成熟和精子体外穿透透明带的特殊性，阻碍了体外受精的实际应用，在 20 世纪 80 年代，成功开发出了啮齿动物和家畜显微受精技术，如透明带切口（Talansky，1986）、透明带下显微直接注射（Mann，1988）、卵胞质内精子注射（Hosoi 等，1988）。此项技术已在家畜和野生哺乳动物得到了应用，尤其是在人的辅助生殖及不孕不育临床治疗方面作出了巨大的贡献。

（三）动物克隆技术

1. 胚胎细胞克隆动物

1875 年 Van Beneden 首次报道了兔的受精过程。1895 年 Sobotta 首次报道了小鼠卵成熟、受精和卵裂的过程。1880 年 Wilhelm His 发表了第一部《人体胚胎学》，描述了早期胚胎卵裂球的发育能力。1887 年德国胚胎学家 W. Roux 将蛙的 2 细胞胚刺死其中的一个卵裂球，但未取出，另一个活的卵裂球发育成具有半个身体的胚胎。

此后，德国胚胎学家和解剖学家 O. Hertwig 也将蛙的 2-细胞胚的卵裂球刺死一个并取出，剩下的另一个活的卵裂球发育成一个完整的胚胎。1892 年 Driesch 将海胆 2 细胞胚振荡分离成两个卵裂球，各自单独培养后，均发育成正常的幼虫，只是个体较小。进一步研究还发现 2 细胞到 4 细胞胚胎阶段的每个分裂球都有能力发育成完整的幼体，该结果首次证明了早期胚胎细胞的全能性。这也是最早进行人工胚胎分割的实验。

同年, Wilson 分离文昌鱼 2 细胞胚, 每个分裂球均能独立地发育成正常的个体。在此后的 30 年中, 有关动物克隆的研究没有什么新的进展。直到 1933 年 Conklin 通过振荡将文昌鱼的 2 细胞和 4 细胞胚分离成单个的卵裂球, 沿分裂面分开的左右两个卵裂球能发育成两个完整的幼虫, 动物克隆的技术体系逐渐建立起来。

1938 年德国胚胎学家 H. Spemann 进行了极其有趣的实验, 他用婴儿的头发将蝾螈的受精卵结扎成两部分, 一部分含有细胞核, 另一部分只含有细胞质, 经过培养, 有核的部分发生了卵裂, 而无核的细胞质未能卵裂。待有核的卵增殖到多个卵裂球时, 松动结扎, 将每一个卵裂球释放到无核的胞质部分, 结果重新获得细胞核的半胚均能发育成正常的胚胎。Spemann 的实验证明了桑椹胚的每个卵裂球均具有发育全能性, 也从此拉开了动物细胞核移植研究的序幕。

1939 年法国学者 Commandon 和 de Fonbrune 获得了具有分裂生殖能力的核移植变形虫, 在单细胞生物上证明了核的发育全能性。1952 年 Briggs 和 King 将蛙原肠期胚的细胞核移植到同种蛙的去核卵子中发育成了蝌蚪。1958 年 Tung 用玻璃针将文昌鱼的 2 细胞和 4 细胞胚剥离分成完全分离的卵裂球, 经过培养, 每个卵裂球均具有发育成为正常成体的能力, 验证了 Conklin 的实验结果。

1962 年 Gurden 将蝌蚪的上皮细胞核移植到用紫外线照射去核的爪蟾卵内, 获得了体细胞克隆蛙, 并获得了连续核移植成蛙 (Kobel 等, 1973)。1965 年 Smith 移植蛙的原生殖细胞 (primordial germ cells, PGCs), 移植胚也发育到了蝌蚪期。

我国开展核移植研究始于 20 世纪 60 年代, 1963 年童第周等首次进行了鱼的核移植实验, 获得了核移植鱼。这些研究结果证明了部分分化的体细胞在合适的条件下, 能恢复其全能性而发育成成体。这些实验虽然是在两栖类动物上进行的, 但这是哺乳动物克隆或核移植技术诞生和快速发展的理论基础。

Mülin 于 1970 年将小鼠的 2 细胞胚分离成 2 个卵裂球培养, 移植后产生了两个子代小鼠。这是首次进行哺乳动物克隆成功的尝试。1979 年 S. M. Willadsen 将绵羊的卵裂胚分离成多个独立的卵裂球, 培养移植产生了多个同质的子代羔羊。

1981 年 Illmensee 和 Hoppe 报道了小鼠囊胚内细胞团细胞注入合子后, 产生了 3 只核移植小鼠。但很长时间未能重复获得这一结果。

1983 年 McGrath 和 Solter 改进了核移植技术, 建立了显微注射和细胞融合构建重组胚的技术路线。以后经过逐步完善, 广泛应用于动物的核移植。相继诞生了胚胎细胞核移植兔 (Stice 等, 1988; 陆德裕等, 1990)、山羊 (张勇等, 1991)、牛 (Prather 等, 1987)、猪 (Prather 等, 1989)、猴 (Meng Li 等,

1997)。Willadsen (1986) 通过透明带切口移植法, 获得了核移植绵羊。

20 世纪 90 年代以后, 以胚胎干细胞为核供体的核移植牛 (Sims 等, 1993)、以胚胎胚盘细胞为核供体的核移植绵羊 (Campbell 等, 1995) 以及继代或连续核移植牛 (Stice, 1993) 和山羊 (邹贤刚等, 1995; 张涌等, 1996) 相继问世。现在, 胚胎细胞的核移植技术基本实现了产业化。

2. 体细胞克隆动物

成年体细胞克隆动物技术虽然在鱼类和两栖类早已成功, 但其真正的突破是英国学者 Wilmut 等 (1997) 用绵羊乳腺上皮细胞为核供体, 诞生了世界第一只体细胞克隆绵羊 “Dolly”。克隆绵羊的出生标志着哺乳动物的克隆技术进入了一个新的发展阶段。

1998 年 Wakayama 改变了技术路线, 将小鼠的卵丘颗粒细胞直接注射到去核的小鼠卵母细胞的胞质内, 产生了 30 多只体细胞克隆小鼠。继之, 以卵丘颗粒细胞为核供体的克隆牛 (Kato 等, 1998; Wells 等, 1998)、山羊 (Baguisi 等, 1999; 王玉阁等, 1999; 张涌等, 2000)、猪 (Polejaeva, 2000) 相继产生。

以子宫上皮细胞和肌肉细胞为核供体的克隆牛 (Kato 等, 1998)、来自自体皮肤细胞的克隆马 (Galli 等, 2003)、以耳部皮肤细胞为核供体的克隆水牛 (石德顺等, 2005) 降生。但到目前为止, 体细胞克隆动物的成功率仍然较低, 尚有待于进一步研究。

异种间动物核移植研究始于 20 世纪 70 年代。1977 年 De Roeper 等将 Hela 细胞注入非洲蟾蜍卵内以探索核质相互作用和 DNA 的表达行为, 发现重构胚可以发育到囊胚期。在此之后的十余年间, 异种动物核移植的进展似乎不大。

1990 年 Wolfe 等以家牛胚胎细胞为核供体, 分别以北美野牛、山羊和仓鼠的去核卵母细胞为核受体, 融合胚经体外培养后, 家牛和野牛、家牛和山羊的异构胚均发育到了囊胚期。1993 年梅琪等构建了小鼠胚胎细胞核与去核兔卵母细胞的鼠兔异质胚, 将其移入受体以后, 发育成了囊胚。

1999 年陈大元等分别用成年大熊猫的骨骼肌细胞、子宫上皮细胞和乳腺细胞与兔去核卵母细胞构建的异质胚均发育到了囊胚阶段。核型分析表明异质胚的遗传物质来源于大熊猫的体细胞核。这些实验说明了异种动物的细胞核与细胞质之间在胚胎的早期发育阶段没有种属特异性。

同年, Lanza 用人的体细胞为核供体, 与牛的去核卵母细胞构建的异质胚, 在体外培养条件下, 也发育到了囊胚。这一结果预示着人体细胞和动物卵母细胞异质克隆技术有可能成为解决人类胚胎干细胞来源的新的途径。体细胞异质克隆技术取得突破性进展的是以野牛的体细胞为核供体, 用家牛的去核卵母细胞为核受体, 诞生了世界首例异种动物克隆野牛 (Vogel G, 2001)。但存活 2 天后因感

染而死亡。

随之，体细胞异质克隆野生盘羊也获得成功（Loi 等，2001）。值得一提的是，分别用胎儿期骡子和成年骡子的体细胞为核供体，以马的去核卵母细胞为核受体的克隆骡子也均已诞生（Gordon 等，2003）。

异种克隆动物的出生为拯救濒危动物和逾越远缘杂交不育的壁垒提供了极其重要的思路和技术。在克隆过程中发现，核供体细胞的细胞周期是克隆胚发育启动的重要因素，当供体核和受体卵母细胞胞质的细胞周期同步时，克隆胚的发育才能进行。

（四）转基因动物技术

转基因动物研究始于 20 世纪 70 年代。1974 年，R. Jaenisch 和 B. Mintz 通过逆转录病毒转染小鼠着床前胚胎，首次获得了整合 SV40（simian virus 40）DNA 的转基因小鼠。1977 年 Gurdon 将 mRNA 和 DNA 注射到爪蟾卵内，观察到转入核酸的表达。1980 年 Brinster 等用同样的方法在小鼠的受精卵内也观察到了相似的结果（兔珠蛋白 mRNA 的翻译产物）。

这些最初的研究为转基因动物技术的发展提供了重要的启示和理论基础。Gordon 等（1980）通过质粒重组将 SV40 基因和 HSV 的 TK 基因显微注射到小鼠受精卵的原核中，也获得了转基因小鼠。1982 年 Palmiter 和 Brinster 将大鼠的生长激素显微注射到小鼠的受精卵中，获得了肝脏能分泌生长激素的“人工超级小鼠”。

这是用基因工程技术改造动物表型的第一个例证，并提出了从转基因动物中提取药物蛋白的设想。这一研究成果引起了当时学术领域的很大反响。

试图通过基因重组和转基因技术，将外源基因导入家畜的基因组以提高其生产性能或培育新的家畜品种成了生物学界极为感兴趣的课题。1985 年 Hammer 等最先将小鼠金属硫蛋白（MT-1）基因的启动子/人生长激素的重组基因（MThGH）分别注射到绵羊、兔和猪的受精卵中，结果在所获得的转基因猪和兔的血液中检出了人的生长激素。

接着，Vize 等（1988）的研究结果也表明一些转猪生长激素基因猪，其生长率比原品种高 13%，饲料利用率高 17%。然而，并非所有的转基因动物像人们所设想的那样，在某些性能上均有所提高。Ebert 等（1990）的研究就得出了相反的结果。而且，在后来的众多研究中发现许多转基因动物的生产性能不但没有提高，反而表出现了生活力减弱、代谢紊乱、畸形多发等问题。

所以，以提高农业动物经济生产性能为宗旨的转基因动物的研究逐渐降温，而以生产医学用人体蛋白或食品用蛋白的生物反应器建立的研究却方兴未艾。

细胞工程研究的物质基础是动物细胞，其产生的理论基础是细胞的生物学本质属性，即全能性、多能性、可塑性等，即不论是动物体或是植物体，构成其器官或组织的终末分化的功能细胞仍然具有重新发育为完整个体的潜能。细胞的发现迄今已逾 300 多年，并将其定义为生物有机体形态结构和生命活动的基本单位。

在此意义上细胞亦即代表了生命的基本元素，生命学科历来是自然科学研究中最活跃、最活跃的领域，因为生命活动在自然界中具有无与伦比的意义。随着生物学理论和技术的发展，在细胞生物学研究的基础上，人们探索对细胞的操作和改造。细胞的发现真正开启了探索生命奥秘研究的大门，细胞的操作赋予了生命以创造性的意义，是人类对细胞科学研究的质的飞跃，曰之“设计生命，创造生命”并不为过。

（五）动物干细胞工程

1. 胚胎干细胞

胚胎干细胞是在小鼠畸胎瘤细胞（teratocarcinoma-derived stem cells）体外培养研究的基础上发现的。1958 年 Stevens 最早发现了畸胎瘤干细胞，并将小鼠的早期胚胎移植到睾丸或肾脏的被膜下，首先获得了畸胎瘤干细胞。继之，Brinster（1974）和 Stewart（1982）获得了畸胎瘤干细胞嵌合体。

在此基础上，Prea 等（1989）从人畸胎瘤组织中分离并建立了 ES 细胞系。令人感兴趣的是 1981 年英国剑桥大学的 Evans 和 Kaufman 成功地从小鼠延迟着床的囊胚中分离获得了小鼠的内细胞团并首次建立了小鼠胚胎干细胞系，此后 Martin（1981）、Magnuson（1982）、Axeord（1984）也取得了小鼠胚胎干细胞分离及建系的成功。

自此，研究者相继分离并建立了仓鼠（Doetschman，1988 和 Piedrahita，1990）、大鼠（Iannaccone 等，1994）的类 ES 细胞系。Petitte 等（1994）描述了鸟类 ES 细胞的培养，Park 等（2000）报道了源自鸡性腺 PGCs 的 ES 细胞的建立。目前小鼠的 ES 系的分离、克隆技术在某些品系已成熟完善，并成为研究哺乳动物早期胚胎发生、组织细胞分化和基因表达调控等研究的一个较为理想的模型系统。

20 世纪 90 年代以后，在啮齿哺乳动物 ES 细胞分离建系研究的基础上，相继分离获得了猪（Notarianni，1990；Strojek 和 Piedrahita，1990；Evans，1990）、牛（Saito 等，1992；Strelcheno 等，1994；Stice 等，1994）、兔（Grave 等，1993；Nremann 等，1994）、水貂（Sukoyan，1994）等的类 ES 细胞。然而，虽然这些动物的 ES 细胞的特性在某些方面类似于小鼠的 ES 细胞，但没有

确切的科学证据表明这些动物的 ES 细胞具有能形成嵌合体的能力, 因此, 所获得的这些细胞暂且称作类 ES 细胞。

Bongso (1994) 用人输卵管上皮饲养层培养原核期胚胎, 获得了增殖传代的 ES 细胞克隆, 初步证明了人的类 ES 细胞建系的可能性。Thomson 等 (1995, 1996) 分别从恒河猴囊胚中分离并建立了 ES 细胞系, 在胚胎干细胞研究领域首次获得了灵长类的 ES 细胞系。

取得突破性进展的是美国威斯康星大学 Thomson 等 (1998) 分离人的内细胞团细胞并成功地建立了人的 ES 细胞系, 与此同时, 霍普金斯大学的 Gearhart 等和 Shambloott 等分别从人的原始生殖细胞建立了胚胎生殖细胞系。

在哺乳动物 ES 细胞的分离取得成功以后, 研究内容集中于 ES 细胞的发育潜能方面。Stice (1994, 1996) 用 ES 细胞构建的重组胚发育到 55~66 天的器官形成期; Modlinski (1996) 获得了嵌合体羔羊; Campbell (1996) 用绵羊的 ES 细胞为核供体移植产生了后代。澳大利亚、日本、以色列、新加坡等国的科学家也先后从体外受精卵分离获得了人和猴胚胎干细胞系, 并诱导胚胎干细胞分化生成神经细胞、肌肉细胞、造血细胞和胰岛细胞等。

2. 组织干细胞

近几年来, 研究发现干细胞不仅存在于早期胚胎内细胞团, 而且在成体各器官组织中也广泛存在。存在于成体组织中的干细胞被称为成体干细胞, 且是多能或专能性的。已证明由内胚层、中胚层和外胚层发育而来的组织均存在干细胞, 已分别从中枢神经、软骨、胰腺、视网膜、肌肉、骨髓、肝脏、脐带血、皮肤组织、性腺等组织分离获得了干细胞。

除果蝇之外, 几乎所有动物体组织 (如斑马鱼、海鞘、原口动物等) 都有组织干细胞的存在。研究表明干细胞具有横向分化的能力, 如神经干细胞和骨髓干细胞经诱导分化为神经元或肌肉细胞等。

2006 年加拿大学者 Dyce 等将猪胎儿皮肤干细胞体外诱导分化生成了类卵母细胞。德国学者体外诱导小鼠胚胎干细胞分化生成精子 (Karim Nayernia 等, 2006), 显微注入卵母细胞并移植到受体后, 成功地产生了活的后代。同年, 又诱导小鼠骨髓干细胞分化成精子细胞 (Karim Nayernia 等, 2006)。

组织专一干细胞的发育潜能已超越了胚层的界限。这是 20 世纪末和 21 世纪初干细胞研究的重大发现, 并赋予了干细胞研究以宽广的外延和新内涵。其中导致干细胞分化的诱导因子及干细胞的分化机理和干细胞的鉴定是干细胞研究领域的重要内容。研究发现不同的诱导因子会导致干细胞向不同的功能类型的细胞分化并已发现了许多种不同的诱导因子, 包括化学的、物理的和生物的因子。目前研究人员致力于干细胞的诱导模式和标志物及分化调控机制的研究。

我国开展胚胎干细胞的研究始于 20 世纪的 80 年代末,进入 90 年代小鼠胚胎干细胞的分离和建系研究取得了显著的成效。丛笑倩(1990)、柴桂萱等(1996)、徐洁(1991)成功地建立了小鼠的 ES 细胞系,并获得了嵌合体小鼠。赖良学(1995)获得了 ES 细胞的嵌合体兔。窦忠英等(1995、1996、1998)分离获得了猪、牛、山羊等的类 ES 细胞,干细胞的研究达到了世界先进水平。近年来以人的疾病治疗为目的的成体干细胞研究在我国也相继开展。

四、动物生殖学的应用及前景

动物生殖学作为一个独立的生物科学的主导领域诞生和发展的历史悠久,且已广泛地渗透到人类生产和生活的各个方面,并产生了极其深远的影响。其应用的广度和深度在医学、生物、农业等领域独树一帜,可以说已超越了本身。

随着动物生殖学在理论和技术上的不断深入和突破,其实际应用的价值之大、优势之强将是传统技术无可比拟的。根据近几十年来动物细胞工程技术在实际应用中所涉及的范围及所取得的成就,将其在各领域的应用分述于下。

(一) 医学领域

细胞工程技术在人类疾病的现代医学治疗中发挥了极其重要的作用,传统医学难以治疗的疾病却用细胞工程技术得到了有效的治疗。干细胞(包括胚胎干细胞和组织干细胞)是动物细胞工程学研究领域的重要内容,随着干细胞生物技术的开发,它在人类疾病特别是疑难病症的临床治疗中的应用,优势和地位越显突出。

近几年来,研究人员已成功地从人和鼠的胰腺组织中分离出了胰腺干细胞,经分化诱导生成了胰管细胞和胰岛细胞并能分泌胰岛素。干细胞移植技术已在人的糖尿病治疗上开始了尝试。

科学研究人员也正在考虑、尝试将干细胞移植技术应用于在过去认为不可能治愈的疾病(如帕金森病)的临床治疗或神经损伤后的修复和再生等。

除了将干细胞移植技术直接用于某些疾病的治疗外,干细胞工程结合现代分子生物学技术,通过遗传修饰,用于人类遗传疾病的基因治疗在科学和医学界也已取得了共识,使多少在过去认为是“不治之症”的顽疾被攻克。可以预见,干细胞工程在现代医学临床治疗中必将成为极其有效的技术手段,对传统医学的改造和现代医学的创新产生深远的影响。

动物生殖生物技术在人类的人工辅助生殖、不孕不育疾病的辅助治疗、计划生育及优生优育方面的应用展现了广阔的前景。少精症、无精症、精子活力差或受精能力弱是造成男性不育的常见病,患者的精子往往不能经历自然的受精过程