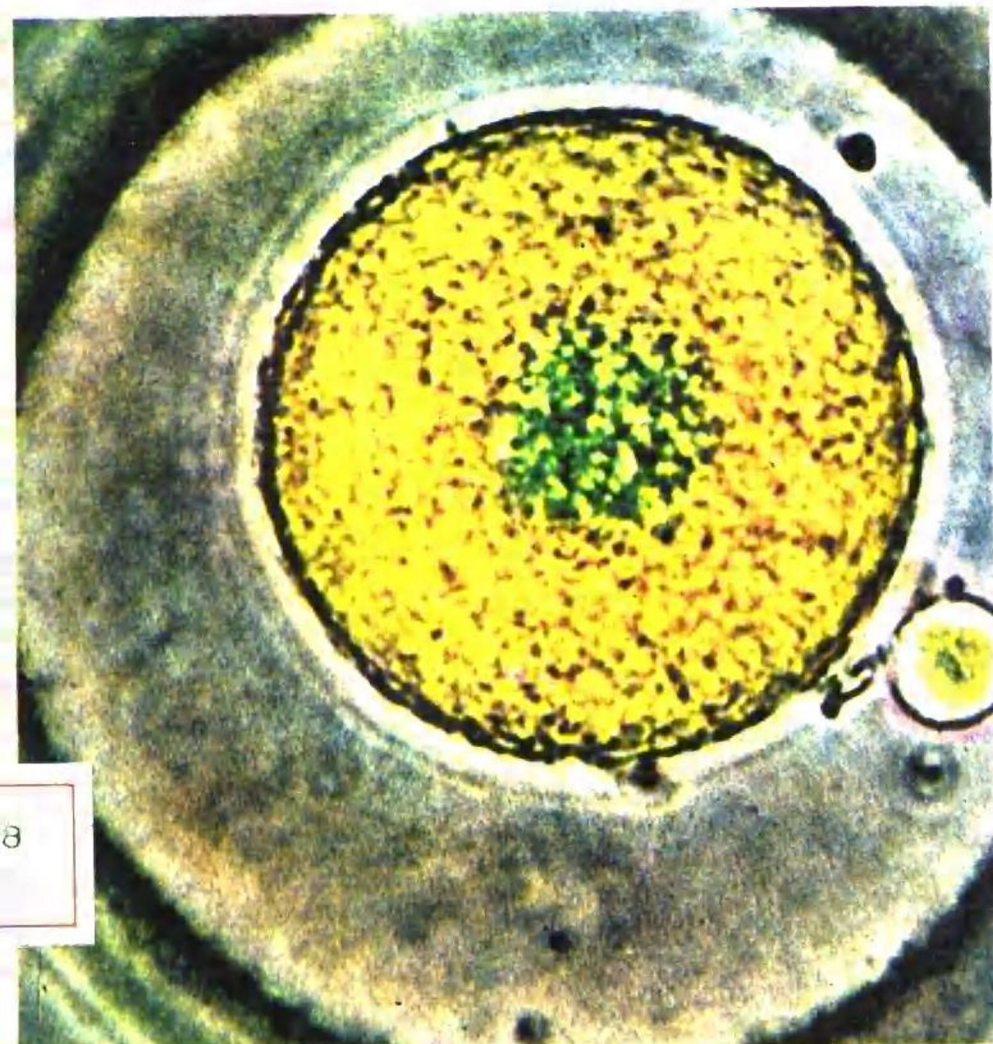


哺乳动物的发育工程〔日〕

日本 NAME 学会编 谢厚祥译 · 湖南科学技术出版社



哺乳动物的发育工程【日】

日本哺乳动物胚胎学新技术学会编

谢厚祥译 刘祖洞校

责任编辑：沙一飞

*

湖南科学技术出版社出版

(长沙市展览馆路14号)

湖南省新华书店发行 湖南省新华印刷二厂印刷

*

1986年11月第1版第1次印刷

开本：850×1168毫米 1/32 印张：9.375 插页：7 字数：242,000

印数：1—1,600

统一书号：13204·141 定价：3.75元

征订期号：湘科 86—7(16)

译者序

1981年初，瑞士日内瓦大学的ILLMENSEE博士用受精卵核移植技术，在哺乳类动物中首次成功地制成了无性生殖小鼠，亦即所谓的“克隆小鼠”。然后，1982年末，美国的一个研究小组把大鼠的生长激素基因，体外注入小鼠的胚泡内，这种胚泡植回养母小鼠子宫内继续发育后，最后生出体重是原小鼠的二倍，在肝脏中能分泌生长激素的人造小鼠——“超级小鼠”。这二项哺乳动物发育工程的新成果，在学术方面以及社会伦理方面激起了强烈的反应。一些人唯恐乱用这类生物技术会导致“复制人类”的危险，更多的人则认为这些研究的进展，将会对人类生活以至人类本身的发展带来重大利益。

事实上，目前发育工程的研究已开始与人类的实际生活息息相关。发育工程技术与细胞工程、基因工程等最新技术相结合，已成为探索生物发育、细胞分化等重要生命现象奥秘的有力武器。它为治疗人类遗传性疾病，攻克人类的顽敌——癌症，以及优生、衰老方面的研究提供了一个全新的基础。在制造新型的实验动物、生产优良的家畜等方面也有重要的应用前景。

本书集中了近年来日本哺乳动物发育工程研究的成果。撰稿人都是日本活跃在第一线的研究者。因此，本书较全面地反映了有关方面研究已达到的水平，研究的现状以及今后研究的方向。此外，作者们对有关研究技术作了重点介绍，是一部颇有参考价值的专著。

我国哺乳动物发育工程研究正在起步，但已引起人们的很大关注。译者希望，本书的出版能推动我国发育工程研究的展开，并为从事或即将从事这方面研究的有关人员提供可以借鉴的资料。如果本书能激起许多青年研究者的兴趣，投身到这一科学研究领域中来，那是译者的荣幸了。

承蒙刘祖洞教授对译稿提出不少修改意见，并校审了译稿，在此深表感谢。李致勋先生也为本书的翻译出版作了不少工作，在此一并致谢。限于译者水平，误译、错译之处，敬请识者指正。

谢厚祥

1986年4月26日

序

发育研究和发育工程

· 岡田節人 ·

生物技术和发育工程

本书的书名“发育工程”是一个崭新的名词，在国外还没有与此相当的名词。不过，既然基因工程或细胞工程这样的名词正在确定下来，那么使用胚胎工程或发育工程这种名词也是理所当然的。即使这一名词还没有严格的定义，它却生动形象地表现了发育研究的某个侧面。

所谓工程，按理是指对自然物体加以人工的改造，使自然物成为有用之物的学问。常识上讲，这种改造的对象只限于无机的自然界，生物之类那是怎么也不能改造的。所以取名为工程的学问，其对象是无机物体，改造时所依据的是物理学上的原理，这是历来的传统观念。往昔早已在使用的“生物工程”^{*}这一名称典型地表现了这些观念，这就是在生物所具有的性质之中选择可以还原为物理学定律的那些性质，在加以物理的说明之后，就按照

^{*} 这里是指纯物理意义上的生物工程，但目前我国使用的生物工程一词，已超越了“工程”的本来意义，而与下文的“生物技术”同义。

——译者注

这些说明对生物加以某些人工改造，并谓之“生物工程”。

但是，现在的情况已大不一样了。即使一点也不还原为物理学定律，把生物本身加以操作、改造的尝试已经开始了。这一新的领域，很多人用生物技术这样的语言来称呼它，借此与以前的生物工程相区别。因此，这里的所谓发育工程，并不试图把发育这种生命现象还原为物理学定律，它不是某种“生物工程”，而是与生物技术同义的。直接地面对发育这种活生生的生命现象，进行操作、改造的试验，这大概就是发育工程的本来意义吧。

发育研究中的工程性质

发育生物学本身自古以来最得意的传统方法就是对发育现象进行实验操作。实际上，在整个生物科学中发育的科学，具有工程性质是显而易见的。

诚然，生理学从很早开始就进行了精密的实验，但是这时被操作、改造的只是无机的自然物，并不是生物本身。遗传学从很早就形成了其卓越的理论体系。但作为它的基础的突变，是通过自然界选择获得的。积极的操作和改造是在确立了基因重组技术的最近才开始的。发育的研究是怎样的呢？从本世纪的早期，就已经进行了例如把早期胚胎分为二份观察它们的发育这种实验了。

发育的实验操作和发育工程

那么，如今新导入的发育工程这一名称有怎样的意义呢？发育操作或改造的研究材料，从使用海胆或青蛙等到更接近于人类本身的哺乳动物，已成为可能。由此，发育现象的实验操作所具有的新奇性重新给人们以很强的影响。在应用方面被利用的可能性成了人们的话题。因此，把这种研究以特殊的语言来表现成为一种必然的愿望，于是发育工程这一语言也就应运而生了。

什么是发育工程，什么不是发育工程，要划一条界线是不可能的。但是，以哺乳动物为中心，对发育现象进行操作、改造的试验，其必然包含着生产有用的动物这一潜在的可能性，这种估计是适当的吧。

或许是我国的特殊情况，在我国取名为“工程”的学问一般容易引人注目。目前在发育研究这种重要的基础学科上集注了很大关心，在这种意义上，“发育工程”这一新词汇的出现，我想总不会是件坏事吧。

小鼠胚胎操作的过去、现在、将来

Peter C. Hoppe

在生命起源过程中，究竟是什么原因使第一只细胞形成从而繁衍出地球上数以亿万计的动植物种类呢？为了解决这一根本问题，科学家们已作了长期的努力，无疑地今后将继续作出努力。这一问题的答案中，一定包含着控制细胞的机能的技术。研究人员为了阐明细胞的形成、增殖和分化等过程，用原核生物和真核生物进行了实验研究。这些实验虽然增加了我们对胚胎发育的知识，但是还不能回答生命起源的问题。这是因为迄今为止，人们纵然能操作生命，但决不能创造生命。本文想对使用小鼠进行的基因操作、胚胎操作以及这些实验操作将来如何应用的问题，简单地作一阐述。

哺乳动物的发育和分化是从卵子的受精开始的。然后通过胚胎细胞迅速的分裂、增殖和分化产生新的个体。这些事态发生之前，卵母细胞在卵巢内以静止的不活泼的状态存在，并能保持这种状态达数十年之久（因动物种类不同而不同）。性腺激素刺激成熟前的卵母细胞促使它成熟，在二星期左右的时间内形成体积增大100倍以上的成熟卵母细胞。在试管内有关卵母细胞的生长和成熟的研究，由于液体培养液的制成使细胞在体外的生存和分裂成为可能而得到很大进展。除促性腺激素或培养液中的成份外，卵母细胞的生长和分化取决于体细胞之间的相互作用。电子显微镜已经揭示了粒层滤泡细胞与被它包围着的卵母细胞本身之间，通过间隙联结紧密相连，这种细胞与细胞之间的密切的关系在成熟过

程中始终维持着，在卵子受精前几小时内才中断。今后的研究将会更清楚地了解，使卵母细胞分化发育成胎儿作准备的这一些“滋养卵细胞” (nurse cell) 产生的细胞间连络的作用。

在发育过程中出现的细胞和细胞之间的相互作用的另一个例子就是受精过程，亦即雌性和雄性的生殖细胞合为一体的现象。这里想重提一下，由于生物学家的研究，体外研究这些现象现在已经成为可能。精子的成熟过程，是在精子通过雌性生殖管道被输送的期间开始，一直到穿过卵子的外围为止。从精子射出体外到穿过卵子的外围的成熟过程被称为授精能的获得 (capacitation)。精子和卵膜之间的接触引起卵子的活化，减数分裂随之完成。然后配偶子的膜融合，精子进入到卵子的细胞质内。然而，我们关于受精现象中细胞间的相互作用的知识只限于精子授精能的获得，卵子的活化以及精子侵入卵细胞质等。为了弄清在受精时发生的非常重要的细胞间的相互作用，必须进行新的进一步的研究。体外受精的成功，除了它本身具有的重要的生物学意义外，也提供了一种解决人类不孕症的方法。

液体培养液的完成，使细胞离体培养成为可能，这极大地帮助了研究发育的生物学家。从小鼠受精卵到胚泡期为止的着床前的细胞增殖和分化，可以在加入能源后的非常简单的盐溶液中进行。应用这种技术，使着床前的2~3种具有不同遗传性质的胚胎细胞聚合，经过培养作成了嵌合体小鼠。即使是发育只能进行到某一阶段的疾患胚胎细胞，如果与正常的胚胎细胞之间作成嵌合体，则表现出正常的发育和分化。同样，从胚性癌细胞中得到的癌细胞，如果注入到胚泡内，作成注入嵌合体，那么也能挽救它，使它进行正常的分化。不过，这些发育异常的细胞，在作成嵌合体后得到拯救的机理，至今还不完全清楚。这些细胞在嵌合体中，因为不发生细胞间的融合，所以认为是细胞间的相互作用，使这些异常细胞或者恢复分化能力，或者继续发育。聚合嵌合体将被进一步用来研究具有不同遗传性质的细胞间的联络，以便进一步理解发育和分化过程。

如前所述，哺乳动物是从含有父方和母方基因组的合子发育而来的。然而，在自然界中也有只从单亲的基因组发育而来的动物。举二个例子说，一种进行孤雌生殖的鱼 (*Poecilia moll-ienesia formosa*)，另一种是进行单性生殖的鞭尾蜥蜴 (*Lacerta sa-civola armeniaca*)。在哺乳动物中，只带有单亲的基因组的配子能否发育呢？为了回答这一疑问，设计了下面的实验。使用遗传背景已很清楚的近交系小鼠，从受精卵的细胞质中，用玻璃微吸管吸去一个雄性前核或者一个雌性前核。光是一方的前核，也就是单倍体，是不能进行发育的。所以在卵裂时期，用细胞松弛素 B (cytochalasin B) 处理。细胞松弛素 B 是某种真菌的代谢产物，它有抑制细胞分裂但不抑制细胞核分裂的性质。因此如果在含有这种药物的培养液中培养卵裂期的单倍体的卵，卵就变成二倍体。除去细胞松弛素 B 后，卵进行分裂，这些细胞就只具有从雌性或者雄性一方而来的二倍体的核，其基因型是完全纯合的。把经这样的过程形成的胚胎加以培养，着床后得到的小鼠是只具有雌性或者雄性单方基因组，而且全部是雌性的。这些幼鼠全都是雌性 (XX) 的理由，是因为具有 Y 染色体的雄性前核的二倍体 (YY) 是不能生存的。

这样作成的小鼠，是完全纯合的。所以研究家们设想了使用这一技术，能够从并不是近交系的动物出发，更快地作成近交系动物。可是这种完全纯合型对于胚胎发育或胎儿发育是极其有害的。制作这样的完全纯合型动物所获得的近交系或许在家畜中是可能的，但一般地说是相当困难的。这是因为存在有致死的或半致死的基因，纵然是隐性性状，也要在完全纯合型中表现出来，因此，不可能获得新生儿。还有，因为这种纯合型个体的遗传性质，必定比同种内的杂合型动物低劣得多。

这种技术的应用，可以使完全纯合型小鼠发生突变。从它的卵开始进行被诱发的突变的研究。这是因为如果用玻璃微吸管除去雄性前核，把二倍体化的卵作培养，那么它们除了被诱发突变的基因外，全部具有与母亲完全相同的遗传组分。或许会出现比

传统的兄弟姐妹交配所得到的更为微妙的突变。

采用微型外科手术，把已分化的胚细胞的核移植到去核的受精卵内，也能产生小鼠。如果把胚泡的内细胞团细胞，或者第7天胚胎的胚体外胚层细胞的细胞核移植到除去了核的受精卵中，那么被移入核的卵能够进行分化。在近交系小鼠中，若选择适当的遗传性状，那么由核移植产生的小鼠全都表现出只带有被移植的核所特有的遗传性状。这就表明在哺乳动物中也可能进行核移植。这里重要的是，这些胚胎细胞的核具有遗传的可逆性，亦即在分化以后核仍然保持着它的全能性。在小鼠中，到妊娠第7天，胚胎细胞已有某种程度的分化，有些只在早期表达的基因在这时已经不再表达。而一些只在后期胚胎中表达的基因发挥着它们的功能。例如，X染色体的失活已经在这时期的雌性胚胎中出现，然而这时的细胞核，当把它移植到受精卵的细胞质内，则表现出恰如早期胚胎的核的机能。虽然还没有进一步研究，但是在第7天胚胎中表达着的基因，在被移植的卵子中其表达一定是被抑制着的，否则将会给移植卵的分化产生有害的影响。这些发现表明，至少在胚细胞中存在着细胞质对核的机能的控制。核移植实验的进一步开展，若能在其他各种分化的体细胞中观察的话，细胞核与细胞质之间的相互关系的知识一定会日益增加。进一步用后期的胚胎细胞或分化了的胎儿的核进行核移植的话，或许可了解早期胚胎基因随着分化和增殖，其机能被抑制的过程吧。

如前所述，通过核移植，已能把数千个基因移入卵细胞中。最近，把单一基因注入卵，使之重组到核内，进而使移入的基因在成体小鼠中表达已经获得成功。利用重组DNA技术，已分离出编码目的蛋白质所需的几个真核生物的DNA序列。当把这些DNA注入小鼠受精卵的前核中，就能重组到新生仔的基因组中去。在一些实验中，基因已经在小鼠中表达。

分子生物学家已经设想把这一技术用于基因机能的研究，或者用于治疗侏儒症或贫血症等种种遗传病。不过，在小鼠中进行的基因注入的实验，现在还看不到应用到上述方面的现实性。

首先，向受精卵注入DNA进行转化时，那怕向一个受精卵注入几百个乃至几千个基因，其转化成功率还是极低的。提高这种转化成功率的方法或者理论现在还不存在。为了应用这种技术，有关这方面的知识是绝对不可缺少的。第二个理由是：DNA插入到受精卵的基因组中是完全随机的，现在还不能控制。这是因为现在实际上还没有把外来DNA重组到基因某一特定部位的方法，所以不能调节基因的表达。由于上述理由，在应用基因注入之前，特别是以治疗遗传疾病为目的而设想应用这一技术之前，分子生物学家必须设法控制受精卵的转化及注入DNA的整合和表达，并必须对用于这一目的的DNA碱基序列作出某些研究。

种种胚胎操作结果已经表明分化中细胞和细胞之间联络的重要性。如果我们希望了解机体发育中各种有关的细胞间相互作用，就必须作出更多的研究。还有，细胞质对细胞核机能的调节，至少已在胚细胞中观察到。这个领域的进一步研究一定会弄清在增殖和分化过程中基因的机能和核质之间的相互作用。生物学家在进行正常及异常的细胞机能的研究中，在开发细胞操作的新技术方面，将不断面临着新的挑战。

目 录

前 言	1
1 早期胚胎的培养方法	4
§ 1.1 试管内受精和早期胚胎培养	4
1. 研究小史	6
2. 实验操作上的要点	8
3. 小鼠以外的其他动物	14
§ 1.2 体外受精和早期胚胎培养	15
1. 体外受精	15
2. 早期胚胎的培养	22
§ 1.3 早期发育中的基因作用	27
1. 卵子发育和精子形成	27
2. 受精, 卵裂及胚泡形成	29
3. 着床及着床后的胚胎发育	31

2 哺乳动物胚胎内基因导入和实验操作

34

- § 2.1 小鼠胚胎内的基因导入(总论) 34
 - 1. 小鼠胚胎内外源基因导入技术 35
- § 2.2 小鼠胚胎内基因导入的技术 36
 - 1. 用显微注射法把基因导入小鼠早期胚胎 36
 - 2. 小鼠卵细胞上作显微注射的设备 37
- § 2.3 外源基因导入哺乳动物体细胞 44
 - 1. 研究的目的 44
 - 2. 把外源基因导入细胞的种种方法 45
 - 3. 用红血球血影融合法转移DNA 47
 - 4. 显微注射和扎刺(pricking)法 48
- § 2.4 动物细胞内基因的导入和表达 52
 - 1. 用代谢上有选择标记的DNA作性状转化 53
 - 2. 导入基因的回收 54
 - 3. 用基因导入法解析丝蛋白基因的转录机构 55
 - 4. 绢丝腺细胞内丝蛋白基因的显微注射 61
- § 2.5 哺乳动物细胞内 δ -晶体蛋白基因的导入和表达 63
 - 1. δ -晶体蛋白基因 63
 - 2. 基因导入方法的商讨 63
 - 3. 小鼠水晶体上皮细胞中注入的 δ -晶体蛋白基因的表达 64
 - 4. 基因表达的组织特异性 65
 - 5. 担负组织特异性的DNA区域 66
 - 6. 细胞方面的条件 68
- § 2.6 小鼠受精卵中外源基因的导入 69
 - 1. 作为重组DNA的实验需要提出申请 69
 - 2. 外源基因的导入技术 70

3. 以往报告的归纳 73

3 核移植和染色体组操作 76

§ 3.1 对小鼠受精卵作核移植 76

1. 胚胎细胞核的全能性 78
2. 受精卵细胞质使核活化和早期变化 81
3. 核移植的新方法 83

§ 3.2 核移植以及细胞融合中细胞核的构建和活化 85

1. 核移植 85
2. 异核体 (heterokaryon) 89
3. 杂种细胞以及重建细胞的核 93

§ 3.3 用除去前核的方法作成遗传上完全纯合型小鼠 97

1. 实验设备和器具 98
2. 实验操作 100
3. 遗传上完全纯合型小鼠制作技术的展望 102

§ 3.4 应用早期胚胎的显微手术作出哺乳动物一卵性多生仔的实验 103

1. 用2~8细胞期胚胎的实验 104
2. 用桑椹期胚胎~胚泡做的实验 108
3. 制作一卵性多仔实验的问题及展望 114

§ 3.5 哺乳动物自发的单性发育 116

1. 不会出生的自发单性发育胚胎 118
2. 自发单性发育胚 \longleftrightarrow 正常胚胎之间的嵌合体 119
3. 把自发单性发育胚的核注入到去核受精卵中 120
4. 子宫外组织环境下的自发单性发育胚: 畸胎瘤的形成 121
5. 单性发育胚胎的发育工程在应用上的展望 122

§ 3.6 老化和染色体组异常 123

1. 老化的程序学说 123

2. 一生过程和细胞中产生的异常 124
3. 老化的遗传背景 126
4. 老化和遗传性疾病 126
5. 一生中生殖细胞数目的变化 127
6. 卵巢和卵母细胞的加龄 128
7. 生殖和加龄 129
8. 老化和染色体组操作的可能性 130

4 嵌合体

132

§ 4.1 小鼠嵌合体 132

1. 小鼠的准备 132
2. 器具和培养液的准备 134
3. 早期胚的采取 138
4. 胚的联结和培养 139

§ 4.2 大鼠嵌合体 140

1. 大鼠和小鼠的不同点 140
2. 大鼠嵌合体制作方法 141
3. 大鼠嵌合体及其应用例子 145

§ 4.3 异种胚之间嵌合体 145

1. 异种胚嵌合体制作法 146
2. 大鼠 \longleftrightarrow 小鼠之间嵌合体胚胎 148
3. 小鼠 \longleftrightarrow 豚鼠间嵌合体胚胎 151
4. *Mus caroli* \longleftrightarrow *Mus musculus*嵌合体 152

§ 4.4 畸胎瘤细胞注入嵌合体 153

1. 畸胎瘤的诱发和它的性质 154
2. 胚泡内畸胎瘤细胞的注入 155
3. 假孕母体内的胚泡移植 156
4. 畸胎瘤细胞与细胞工程的研究 156
5. 作为注入嵌合体材料的畸胎瘤干细胞的将来及问题点 159

- § 4.5 畸胎瘤细胞聚合嵌合体 160
1. 用聚合法作成嵌合体胚一到胚泡形成 161
 2. 用聚合法作成嵌合体小鼠 165
- § 4.6 嵌合体和神经发育 167
1. 神经系统的发育 168
 2. 大脑皮质形成机构的解析 172
 3. 小脑的组织发育 175
 4. 网膜的形成 178
 5. 髓鞘形成 180
- § 4.7 嵌合体与肿瘤发生 183
1. 小鼠的卵巢性畸胎瘤特征 184
 2. 材料及方法 186
 3. 结果及考察 187
- § 4.8 嵌合体和免疫识别 190
1. 血液型嵌合体 191
 2. 自体耐受的机构与嵌合体 192
 3. 自体耐受的复杂性 193
 4. T细胞的抗原识别与MHC控制 194
 5. MHC控制和嵌合体动物 194
 6. MHC控制与MHC耐受 199
- § 4.9 嵌合体与T/t基因座位 200
1. T/t基因座位 200
 2. 用嵌合体解析T/t基因的机能 203

5 着床和胎盘

215

- § 5.1 受精卵的分化与着床前的动态 215
1. 哺乳动物受精卵的形态学特征 215

2. 受精卵的代谢 219
3. 细胞分化 221
4. 受精卵着床前的动态 222

§ 5.2 着床和胎盘 224

1. 滋养层细胞-胚上皮细胞间的细胞联结 225
2. 对异种胚着床的母体免疫系统的反应 229
3. 在着床部位的巨噬细胞的动态 231
4. 局部的免疫机构与间膜腺 233

6 后期胚胎的全胚培养和实验操作 235

§ 6.1 从着床前到早期体节期的胚胎培养 235

1. 从着床前开始的小鼠胚胎培养法 236
2. 小鼠胚胎在体外的发育 238
3. 从着床前开始的其他动物的胚胎培养 240
4. 从着床前开始的胚胎培养技术的应用 240

§ 6.2 器官形成期的全胚培养和培养下的胎仔操作 241

1. 培养法 243
2. 胎仔培养法的应用 249

7 胎仔组织的移植 256

§ 7.1 无胸腺裸鼠内人胎儿组织的移植 256

1. 无胸腺裸小鼠开发以前的历史 257
2. 人胎儿组织/无胸腺裸小鼠体系中得到的知识 258
3. 人胎儿组织移植实验的将来 260

§ 7.2 上皮、间充质相互作用与致癌——特别在消化系统中 262

1. 癌的发生机构 262
2. 上皮、间充质相互作用 264
3. 致癌与上皮、间充质相互作用 268