

大鼠胚胎干细胞遗传操作技术的研究进展

孟 姝*

(中国科学院生物物理研究所, 蛋白质科学研究平台, 北京 100101)

摘要 大鼠胚胎干细胞(ES)的成功建立使大鼠的遗传学操作成为可能, 运用同源重组原理改造 ES 细胞的基因, 为建立时空特异性的基因敲除大鼠模型提供了基础. 本文主要回顾了大鼠 ES 细胞的建立过程, 总结了大鼠 ES 的培养、鉴定技术, 分析了各种大鼠基因敲除技术的优劣势和未来前景. 在干细胞研究蓬勃发展的背景下, 作为最有效地定向修饰基因的技术手段, 基于大鼠 ES 细胞的基因敲除技术将在揭示基因的生理功能、研究人类疾病的遗传机制以及寻找新药物靶标的过程中发挥更加重要的作用.

关键词 ES 细胞, 遗传操作, 基因敲除, 干细胞

学科分类号 Q813, Q789

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00465

小鼠是当今世界上研究最为详尽的哺乳动物模型, 早在 20 世纪 80 年代已经建立了小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)以及基于 ES 细胞的基因敲除(gene knockout)技术. 但是, 小鼠动物模型有其局限性. 大鼠在生理和药理上都比小鼠更接近于人类, 是研究神经退行性疾病、心血管疾病、糖尿病、肾病、乳腺癌等人类疾病的更理想的动物模型.

2004 年, 大鼠的全基因组测序工作顺利完成, 但是仍然无法通过精细的遗传操作敲除大鼠基因组中特定的基因, 主要原因在于人们对 ES 细胞的认识严重不足, 小鼠的胚胎干细胞提取和培养方法无法套用到大鼠上. 直到近几年, 大鼠 ES 细胞的培养条件才确立, 这为建立大鼠 ES 细胞系及其基因敲除模型奠定了基础.

1 大鼠 ES 细胞系

1.1 大鼠 ES 细胞系的建立

建立能生殖系遗传的大鼠 ES 细胞株是获得大鼠基因敲除模型的关键. 2008 年底, 美国南加州大学应其龙领导的科研小组历史上首次从大鼠中获得了真正的 ES 细胞^[1], 这一突破使创建有效的基因敲除大鼠模型成为可能. 他们从 Dark Agouti (DA)、Fischer 344 (F344)、Sprague-Dawley (SD)、

Brown-Norway、Wistar 等 8 个大鼠品系的囊胚内细胞团中分离培养 ES 细胞, 获得的 DA、SD 和 Wistar 品系 ES 细胞系具有生殖系遗传能力, 但是 SD 和 Wistar 品系的生殖系遗传效率相对低, 基因打靶后的生殖系遗传能力无法维持, 最终证实只有 DA 品系 ES 细胞的两个细胞系 DA2 和 DA8 具有持续的生殖系遗传能力^[2-4].

1.2 大鼠 ES 细胞的培养

影响 ES 细胞质量和生殖遗传能力的重要因素包括培养基、饲养层细胞的质量、传代的方法和传代的次数等^[5].

1.2.1 培养基. 如何维持大鼠 ES 细胞长期体外培养的自我更新, 一直是个核心问题. 最初的小鼠 ES 细胞培养体系包含血清和维持其自我更新的有效成分 LIF, 2003 年, Ying 等^[6]发现骨形态发生蛋白(BMP)可替代血清, 并与 LIF 一起维持小鼠 ES 细胞的自我更新. 几个研究小组曾尝试用类似于小鼠 ES 细胞的培养体系从大鼠中分离 ES 细胞, 但未获成功. 应其龙想到了 ES 细胞的另一个重要性质: 多向分化潜能. 如果 ES 细胞的分化相关信号

* 通讯联系人.

Tel: 010-64887318, E-mail: mengshu@moon.ibp.ac.cn

收稿日期: 2011-10-19, 接受日期: 2011-10-23

通路被抑制了，它是否就能维持 ES 细胞生长？基于这样的想法，他建立了大鼠 ES 细胞 3i/2i 培养体系，3i 培养基即是指加入了 3 个抑制因子 CHIR99021、PD184352 和 SU5402 的无血清 N2B27 培养基。CHIR99021 特异地抑制糖原合成酶激酶 3 (GSK3)，PD184352 和 SU5402 抑制丝裂原活化激酶 MAPK 和成纤维细胞生长因子受体 FGFR 酪氨酸激酶。进一步研究发现，PD0325901 是一种可以替代 PD184352 和 SU5402 的更强的 MAPK 抑制剂，由此建立了比 3i 更有效的 2i 培养基。这两种培养基通过抑制最初导致 ES 细胞分化的信号通路

FGF/MAPK/ERK，从而一直维持其自我更新状态，在此基础上抑制 GSK3 可增强 ES 细胞的生物合成，进一步抑制其分化(图 1)。因此认为，ES 细胞默认的状态是自我更新而非传统观点认为的自发分化，只有在分化诱导信号的作用下才进行分化。2i/3i 培养体系能高效地建立起大鼠 ES 细胞系，但是却不适合建立其他物种的 ES 细胞，包括兔、猪、牛、羊、斑马鱼和人类，其原因还有待研究，因此，如要建立其他物种的 ES 细胞仍然需要寻找新的培养体系^[1-2, 7-8]。

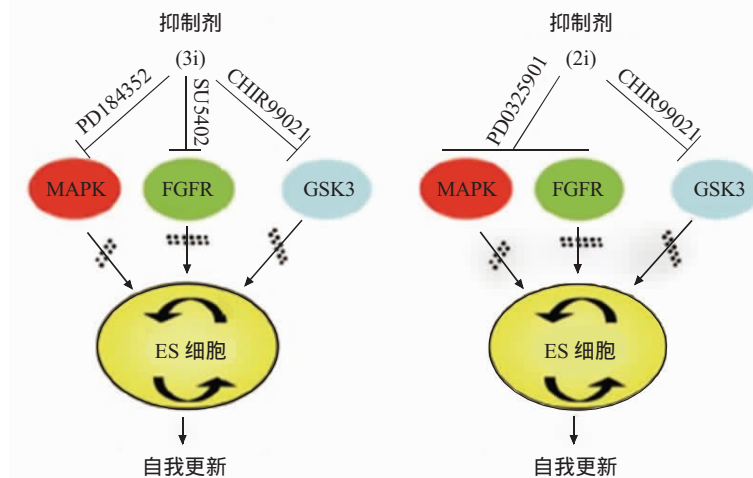


Fig. 1 The ground state of rat ES cell self-renewal under N2B27 medium supplemented with small inhibitor^[8]

图 1 在添加小分子抑制因子的 N2B27 培养基中的大鼠 ES 细胞自我更新的基础^[8]

MAPK: 丝裂原活化激酶; FGFR: 成纤维细胞生长因子受体酪氨酸激酶; GSK3: 糖原合成酶激酶 3.

1.2.2 饲养层细胞和传代.

在 3i 培养条件下的大鼠 ES 细胞贴壁不牢，往往形成小的集落，易与滋养层细胞分离。其附着能力主要受整合素(integrin)受体家族调控，在大鼠 ES 细胞中大多数 integrin 表达水平低或者缺失，但 integrin α 7 和 α 6 表达量却很高，因此认为细胞外基质可能是提升大鼠 ES 细胞附着能力的重要因素。研究发现，来自于 C3H/An 品系成年雄性小鼠的皮下结缔组织中 L 细胞能有效地支持未分化大鼠 ES 细胞的贴壁生长，L 细胞与 2i 培养基的组合比 MEF/3i 培养基更有利于维持大鼠 ES 细胞的生长和不分化，并能形成贴壁较牢的大个克隆^[2]。

ES 细胞的多次传代容易引起染色体异常，这也是 ES 细胞不能生殖系遗传的主要原因之一。在 2i 培养基中，经多次传代的一些大鼠 ES 细胞开始附着在饲养层上生长并形成扁平的克隆，这种扁平

形态的克隆不能用来基因打靶，因为其染色体很可能已经发生畸变^[4]。因此，传代过程中对大鼠 ES 细胞的全能性进行多方位的鉴定就显得尤为重要。

1.3 大鼠 ES 的鉴定

ES 的鉴定主要包括克隆及细胞的形态观察、碱性磷酸酶(AKP)染色、核型分析、多能性标志的免疫荧光染色、体外分化形成拟胚体(embryoid body, EB)、体内分化形成嵌合体。未分化的 ES 细胞碱性磷酸酶染色呈阳性，具有二倍体核型，并能够表达多能性细胞转录因子 oct4、Sox2 和 Nanog，以及特异性细胞表面标志 SSEA-1，但不能表达 SSEA-2 和 TRA-1-60、TRA-1-81，这与小鼠 ES 细胞相似，与人不同(表 1)。在不存在饲养层细胞和分化抑制因子的情况下，大鼠 ES 细胞能够发生分化，形成有内、中、外 3 个胚层细胞组成的拟胚体(embryonic body, EB)，通过免疫荧光染

色可检测到神经元标志 β -tubulin、心肌细胞标志 myosin 以及原始内胚层标志 Gata4 的特异性抗原^[7]。将获得的 DA 品系 ES 细胞显微注射到 F344 的囊

胚后，只有 DA2 和 DA8 ES 细胞系能够高效地形成生殖系遗传的嵌合体，这也是检测大鼠 ES 细胞在体内发育全能性的黄金标准^[5,9]。

Table 1 Difference in the common markers of human, mouse, and rat ES cells

表 1 常用的人、小鼠、大鼠 ES 细胞标志比较

标志名称	性质	分布	hES	mES	rES
SSEA-1	糖脂	胞膜	-	+	+
SSEA-3	糖脂	胞膜	-	+	N/A
SSEA-4	糖脂	胞膜	+	-	-
TRA-1-60	硫酸角质素	胞膜	+	-	-
TRA-1-81	硫酸角质素	胞膜	+	-	N/A
Oct4	转录因子	胞核	+	+	+
Sox2	转录因子	胞核	+	+	+
Nanog	转录因子	胞核	+	+	+
AP	碱性磷酸酶	胞膜	+	+	+

+ : 表达 ; - : 不表达 ; N/A : 未知.

2 大鼠基因敲除研究进展

基因敲除动物模型是在活体内研究基因功能和调控的重要手段。多年以来，应用于大鼠基因遗传操作的方法通常都借鉴了小鼠遗传操作手段，包括 ENU 突变、转座突变等，以及可实现定点基因敲除的 ZFN 技术和基于大鼠 ES 细胞的特定基因敲除技术。这些方法各有利弊，但是建立时空组织特异性的基因敲除大鼠模型仍需要依赖于大鼠 ES 细胞的基因敲除技术。

2.1 利用 ENU 化学诱变研制基因敲除大鼠

2003 年，Zan 等^[10]利用乙烷亚硝基尿(ENU)创建了第一个非定点基因敲除大鼠。ENU 可诱导大鼠生殖系突变，通过对子代大鼠乳腺癌相关基因 Brca1 和 Brca2 上的功能突变进行筛选，最终获得这两种抑癌基因的基因敲除大鼠。2007 年，Homberg 等^[11]在 ENU 诱导的大鼠生殖系突变体中筛选到一种 5-羟色胺转运蛋白的基因敲除大鼠，揭示了该蛋白质在维持 5-羟色胺稳态中的作用。ENU 诱变造成突变的效率高，不需要引入外源 DNA 就可获得基因敲除大鼠。但是这种突变是随机的，筛选耗时耗力，基因组背景突变也可能会导致假的基因敲除表型出现。

2.2 利用转座子突变产生基因敲除大鼠

转座子插入突变是利用转座子在染色体上可以移动的特点，当它跳跃到某个功能基因时，就引起该基因的失活，并诱导产生突变体。2007 年，Kitada 等^[12]利用“睡美人”(sleeping beauty, SB)转座子获得 Robo2 基因表达缺失的突变大鼠，该研究表明，大鼠同其他哺乳动物一样可以通过 SB 标记 GFP 的突变策略产生基因敲除的突变体。2010 年，Izsvak 等^[13]利用精原干细胞的转座突变实现大鼠基因的敲除，这为大规模地构建基因敲除大鼠提供一种新方法。转座子突变事件可以通过报告基因或利用精原干细胞组织培养筛选很容易地鉴定，但是转座子突变是随机的，其插入序列被限制并集中于起始位点附近，会限制 DNA 片段的携带。

2.3 锌指核酸酶(ZFN)技术获得靶基因敲除大鼠

锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)技术是一种可诱导生物体内的 DNA 在特定位置产生双链断裂的重组蛋白。这种双链断裂刺激细胞的天然 DNA 修复路径，并导致靶基因的定点断裂，可以显著提高同源重组效率，是一种高效的新型基因打靶技术，目前已应用于果蝇、斑马鱼及人工培养的人体细胞等多种动植物的基因靶向敲除。2009 年，Geurts 等^[14]利用 ZFN 技术获得基因敲除大鼠，这

是该技术首次成功地在哺乳动物胚胎中进行的特定基因操作,即将编码特定 ZFN 的 DNA 或 mRNA 通过原核注射或胞浆内注射的方法导入大鼠的单个胚胎细胞中,从而获得了敲除特定基因的转基因大鼠,并能稳定遗传. 2010 年, Mashimo 等^[15]将编码特定 ZFN 的 mRNA 原核注射至大鼠受精卵中,敲除了 IL-2 受体 γ 链基因,从而获得了 X 连锁重症联合免疫缺陷(X-SCID)大鼠,为疾病机理研究、新药研发和治疗方案评价提供了新的动物模型. ZFN 技术创建基因敲除大鼠时间短(约 6 个月),基因敲除效率高,且不需要依赖 ES 细胞,能够运用到其他种系. 但是 ZFN 模块的筛选和组装仍是技术难题,商业化的 ZFN 模块也很昂贵,存在脱靶效应(off-target effect),最关键的是存在难以完成大片段(>1 kb)置换的缺陷^[14-15].

2.4 基于 ES 细胞的大鼠基因敲除技术

在大鼠中,一直都缺乏一种广泛可行可调控的靶基因敲除技术来研究特定的基因功能,这是由于缺乏具有生殖系遗传的大鼠 ES 细胞系,直到 2008 年,应其龙实验室获得了真正意义上大鼠 ES 细胞,此问题才得以解决. 2010 年,该实验室利用大鼠 ES 细胞成功地将与乳腺癌等多种癌症发病相关的抑癌基因 *p53* 敲除,培育了首个基于 ES 细胞的基因敲除大鼠^[1,4]. 这一成果对大鼠 ES 转基因和基因敲除技术的发展具有里程碑式的意义. 大鼠和小鼠中基因打靶载体的设计基本相同,都是利用同源重组的原理,都需要考虑加入与基因组同源的两个同源臂以及正负选择标志,但是大鼠的打靶载体需要在经典的策略上进行修改. a. 用巨噬细胞病毒早期增强子和鸡 β 肌动蛋白(CAG)启动子代替小鼠中常用磷酸激酶(PGK)启动子,以启动阳性选择标记的表达. 这是因为大鼠 ES 细胞对药物选择非常敏感,PGK 启动子活性对有效分离的药物抗性大鼠 ES 克隆的作用微弱. b. 用编码白喉毒素 A 链(DTA)的基因代替胸苷激酶基因作为负选择标记,整合入 DTA 的大鼠 ES 细胞会因产生 DTA 而死亡,因此无需用药物筛选就可富集中靶的 ES 细胞. c. 同源臂的来源不同. 目前还没有 DA 品系大鼠酵母人工染色体(BAC)序列信息,因此要从 DA 大鼠基因组 DNA 中扩增同源臂. Ying 等发现^[4],利用电转而将外源 DNA 导入大鼠 ES 细胞,可以获得有效 *p53* 基因敲除的大鼠模型(图 2).

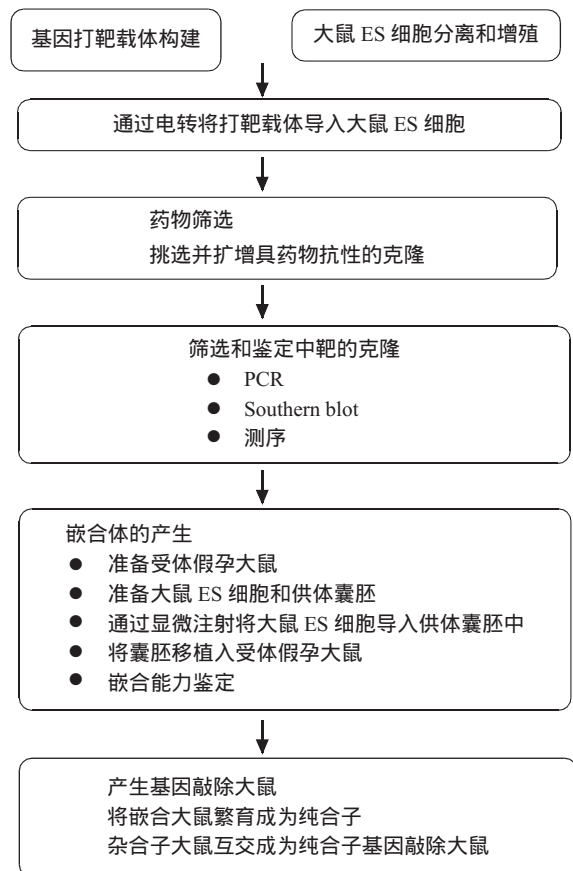


Fig. 2 Flowchart outlining how to generate gene knockout rats^[9]

图 2 创建基因敲除大鼠的流程概述图^[9]

2011 年, Huang 等^[8]报道了 *p53* 基因敲除大鼠的最新研究结果. 研究显示: *p53* 基因敲除的大鼠易患恶性肿瘤,所有的 14 个纯合子 *p53*^{-/-}大鼠或死亡,或仅能存活 120 天. 在杂合和纯合的大鼠中都没发现 *p53* 敲除小鼠易患的淋巴瘤,它们只是形成肝血管肉瘤(71%)和少数的肺血管肉瘤,6 个月中,约有 25.6%的 *p53*^{+/-}大鼠发展成肿瘤. 小鼠肿瘤质谱分析显示, *p53*^{+/-}小鼠中最常见的是形成肉瘤,绝大多数淋巴瘤存在于 *p53*^{-/-}小鼠中. 相比之下,人类往往容易发展成上皮细胞来源的癌症如乳腺癌和卵巢癌. 这些表型的不同,使利用完全基因敲除的啮齿类动物作为人类癌症模型受到限制. *p53* 基因敲除的大鼠模型属于完全性基因敲除,不具备时

间和组织特异性，将来可以结合 Cre/LoxP 系统和诱导 Cre 基因表达系统培育出具有时间和组织特异性的基因敲除大鼠模型，但首先必须建立组织特异性表达 Cre 的转基因大鼠或报告基因 ROSA26 的基因敲入大鼠，这是实现条件基因打靶的关键。在此基础上，将可培育出大量的癌症疾病模型大鼠，如乳腺上皮细胞特异敲除 *BRCA1* 或 *BRCA2* 的条件基因敲除大鼠模型，这将为评估抗癌药物的疗效提供新的动物模型。

3 国内相关领域研究进展

ES 细胞无论在基础研究还是在临床应用上，都具有非常重要的价值，深入了解 ES 细胞的多能性维持及分化调控的分子机制，是科学家们共同关注的焦点之一。近期，来自美国和加拿大的两个研究小组在 *Cell* 上分别发表研究论文，揭示了对 ES 细胞命运起重要决定作用的因子 FOXP1^[16]和 TAF3^[17]，这为全面认识 ES 细胞的分化调控机制，了解祖细胞中调控细胞命运的转录因子网络提供了新视角。在应其龙发表成功获得大鼠 ES 细胞系的研究论文之前，国内中国科学院健康科学研究所的金颖研究员也在进行类似的研究^[18]，他们获得的大鼠多能性 ES 样细胞能够在体外分化为 3 个胚层的细胞，在体内可形成畸胎瘤，并从中获得原始内胚层细胞系，同时证明包含 BMP、Activin、mTOR 的多个信号通路共同维持着大鼠 ES 样细胞的不分化状态，这些发现增强了人们对 ES 细胞多能性的分子调控的理解。来自中国科学院动物研究所周琪研究组的赵小阳建立了 Brown Norway 品系大鼠的胚胎干细胞^[19]，并获得成年的嵌合体大鼠，这是首个在已经完成了基因组测序的 NB 品系大鼠上建成的 ES 细胞，为获得基因敲除大鼠奠定了新的基础。北京大学邓宏魁研究组^[20]从大鼠囊胚中分离得到了两种形态的 ES 克隆，即圆顶克隆和扁平克隆，分离出的两种 ES 细胞不仅表达谱有差异，而且 MAPK 和 P53 通路相关调节基因表达水平也不同，说明在 2i-LIF 培养条件下的大鼠 ES 细胞具有异质性，此项研究能促使人们更好地理解不同种类多能干细胞的起源和分子特性。杨黄恬等成功发现^[21]，大鼠 ES 细胞在体外向功能性心肌细胞分化的系统，这个独特的分化系统为研究心肌功能及其早期发育提供了新的方法，并将作为一种重要的工具应用到药理测试和细胞治疗。这些 ES 细胞研究的最终目的是治疗人类疾病，在干细胞研究向临床

转化的过程中，特定基因敲除的模式动物仍然起着很重要的作用。

4 应用前景

人类基因组及模式生物基因组的序列测定结果显示，约 2.5~3.0 万个大鼠基因中的 90% 与人类相似。下一步面临的主要挑战是要解读这些基因的功能，并研究基因调控的分子机制。目前，在不同模式生物中，基因敲除技术已被用来研究上万种基因的功能，研制成功的基因敲除小鼠也有数千种，但是对于大鼠的基因敲除研究却较少，大鼠 ES 细胞的成功建立和培养有助于通过基因敲除技术产生大量的特定基因敲除模型，使得研究者可以在活体内更深入地研究基因在大鼠胚胎发育、神经系统、心血管系统和免疫系统等复杂生物学过程和器官中的功能。与人类疾病(如癌症、心血管疾病、骨质疏松、神经退行性病变、免疫缺陷等疾病)相关的大鼠基因敲除模型的研制，可以真正地建立基因与疾病之间的因果关系，将为人类健康和疾病研究提供一个强大的平台。

参 考 文 献

- [1] Buehr M, Meek S, Blair K, *et al.* Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell*, 2008, **135**(7): 1287-1298
- [2] Li P, Tong C, Mehrian R, *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell*, 2008, **135**(7): 1299-1310
- [3] Hirabayashi M, Kato M, Kobavashi T, *et al.* Establishment of rat embryonic stem cell lines that can participate in germline chimeras at high efficiency. *Mol Reprod Dev*, 2010, **77**(2): 94
- [4] Tong C, Li P, Wu N L, *et al.* Production of p53 gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature*, 2010, **467**(7312): 211-213
- [5] Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, *et al.* Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003
- [6] Ying Q L, Nichols J, Chambers I, *et al.* BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 2003, **115** (3): 281-292
- [7] Ying Q L, Wray J, Nichols J, *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 2008, **453**(7194): 519-523
- [8] Huang G, Tong C, Kumbhani D S, *et al.* Beyond knockout rats: New insights into finer genome manipulation in rats. *Cell Cycle*, 2011, **10**(7): 1059-1066
- [9] Tong C, Huang G, Ashton C, *et al.* Generating gene knockout rats by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature Protocols*, 2011, **6**(6): 827-844

- [10] Zan Y, Haag D J, Chen K S, *et al.* Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**(6): 645-651
- [11] Homberg J R, Olivier J D, Smits B M, *et al.* Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system. *Neuroscience*, 2007, **146**(4): 1662-1676
- [12] Kitada K, Ishishita S, *et al.* Transposon-tagged mutagenesis in the rat. *Nat Methods*, 2007, **4**(2): 131-133
- [13] Izsvak Z, Frohlich J, Grabundzija I, *et al.* Generating knockout rats by transposon mutagenesis in spermatogonial stem cells. *Nat Methods*, 2010, **7**(6): 443-445
- [14] Geurts A M, Cost G J, Freyvert Y, *et al.* Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*, 2009, **325**(5939): 433
- [15] Mashimo T, Takizawa A, Voigt B, *et al.* Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One*, 2010, **5**(1): e8870
- [16] Gabut M, Samavarchi-Tehrani P, Wang X, *et al.* An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell*, 2011, **147**(1): 132-146
- [17] Liu Z, Scannell D R, Eisen M B, *et al.* Control of embryonic stem cell lineage commitment by core promoter factor, TAF3. *Cell*, 2011, **146**(5): 720-731
- [18] Li C, Yang Y, Gu J, *et al.* Derivation and transcriptional profiling analysis of pluripotent stem cell lines from rat blastocysts. *Cell Res*, 2009, **19**(2): 173-186
- [19] Zhao X, Lv Z, Liu L, *et al.* Derivation of embryonic stem cells from brown norway rats blastocysts. *J Genet Genomics*, 2010, **37**(7): 467-473
- [20] Shen Y, Shi C, Wei W, *et al.* The heterogeneity and dynamic equilibrium of rat embryonic stem cells. *Cell Res*, 2011, **21**(7): 1143-1147
- [21] Cao N, Liao J, Liu Z, *et al.* *In vitro* differentiation of rat embryonic stem cells into functional cardiomyocytes. *Cell Res*, 2011, **21**(9): 1316-1331

Progress in The Genetic Manipulation Technology of Embryonic Stem Cells in Rats

MENG Shu*

(The Core Facility for Protein Research, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The successful establishment of rat ES cell lines enables possible genetic manipulation in rats. Using homologous recombination to modify ES cell genes provides a foundation to temporal and tissue-specific knockout rats. The author introduces the establishment process of rat ES cell, summarizes its culture and identification skills, and analyzes the weakness and strength of various rat knockout techniques. In the context of increasing research on stem cell, knockout technology based on rat ES cells, which allows the most efficient modification of specific genes, shall contribute more to elucidate gene function, dissect the genetic mechanisms of human diseases and identify potential targets for drug development.

Key words ES cell, genetic manipulation, gene knockout, stem cell

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00465

*Corresponding author.

Tel: 86-10-64887318, E-mail: mengshu@moon.ibp.ac.cn

Received: October 19, 2011 Accepted: October 23, 2011