

· 生物技术与方法 ·

印迹基因修饰使孤雌胚胎干细胞获得四倍体补偿能力

李旭, 彭柯力, 张金鑫, 高倩, 张文豪, 滑若彤, 帅领

南开大学 药学院 药物化学生物学国家重点实验室, 天津 300350

李旭, 彭柯力, 张金鑫, 等. 印迹基因修饰使孤雌胚胎干细胞获得四倍体补偿能力. 生物工程学报, 2019, 35(5): 910–918.

Li X, Peng KL, Zhang JX, et al. Imprinting genes modified parthenogenetic embryonic stem cells produce full-term mouse *via* tetraploid complementation. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 910–918.

摘要: 孤雌胚胎干细胞 (Parthenogenetic embryonic stem cells, pESCs) 的遗传物质全部来源于母源基因组, 因缺失父源基因而不具备四倍体补偿的能力。为了使 pESCs 也具备发育到个体的能力, 呈现与受精卵来源 ESCs 类似的多能性, 文中借助 CRISPR/Cas9 系统对孤雌来源的 pESCs 中的 2 个重要母源印迹基因的差异甲基化区域 (Differentially methylated region, DMR) 进行单等位基因敲除 (*H19-DMR*, *IG-DMR*), 获得双基因敲除的 (DKO) pESCs。结果表明, pESCs 虽然来源于母源基因组, 但是其形态特征、多能干性标记分子的表达水平、体外神经分化能力与受精卵来源的 ESCs 基本一致。最后, 通过基因修饰的 DKO pESCs 可以通过四倍体补偿获得发育到期的胎儿, 表明经过印迹基因修饰的 pESCs 也具有发育到一个完整个体的多能性。从而为再生医学研究提供了一类具有主要组织相容性复合基因匹配且多能性良好的资源细胞。

关键词: 孤雌胚胎干细胞, 印迹基因, 基因编辑, 四倍体补偿

Imprinting genes modified parthenogenetic embryonic stem cells produce full-term mouse *via* tetraploid complementation

Xu Li, Keli Peng, Jinxin Zhang, Qian Gao, Wenhao Zhang, Ruotong Hua, and Ling Shuai

State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology, College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300350, China

Abstract: Parthenogenetic embryonic stem cells (pESCs) derived from bi-maternal genomes do not have competency of tetraploid complementation, due to lacking of paternal imprinting genes. To make pESCs possess fully development potentials and similar pluripotency to zygote-derived ESCs, we knocked out one allelic gene of the two essential maternal imprinting genes (*H19* and *IG*) in their differentially methylated regions (DMR) *via* CRISPR/Cas9 system and obtained double knock out (DKO) pESCs. Maternal pESCs had similar morphology, expression levels of pluripotent makers and *in vitro* neural differentiation potentials to zygotes-derived ESCs. Besides that, DKO pESCs could contribute to full-term fetuses through tetraploid complementation, proving that they held fully development potentials. Derivation of DKO pESCs provided a type of

Received: December 6, 2018; **Accepted:** March 8, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31501186, 31671538), Natural Science Foundation of Tianjin (No. 31872841).

Corresponding author: Ling Shuai. Tel/Fax: +86-22-85358245; E-mail: lshuai@nankai.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31501186, 31671538), 天津市自然科学基金 (No. 31872841) 资助。

网络出版时间: 2019-03-20

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190319.1351.003.html>

major histocompatibility complex (MHC) matched pluripotent stem cells, which would benefit research in regenerative medicine.

Keywords: parthenogenetic embryonic stem cells, imprinting genes, gene editing, tetraploid compensation

孤雌胚胎干细胞 (Parthenogenetic embryonic stem cells, pESCs) 来源于化学激活的未受精卵母细胞发育来的囊胚中的内细胞团 (Inner cell mass, ICM), 所以两套基因组均来源于母本。在之前的报道中, pESCs 已经在小鼠^[1]、兔^[2]、灵长类^[3]等物种中建立, 这些 pESCs 具备了一定的多能性, 可以体外分化为多种体细胞, 同时小鼠 pESCs 也可以贡献到嵌合动物的各种组织和器官中。此外, pESCs 的基因组来源于卵母细胞, 所以与卵供体具有很好的组织相容性, 经移植后不会产生免疫排斥^[4], 因此, pESCs 也是一类进行细胞替代疗法理想的资源细胞。在之前的报道中, pESCs 已经应用于包括帕金森综合征^[5]、心脏损伤修复^[6]和肝脏再生^[7]等小鼠动物模型的研究中。所以提高 pESCs 的多能性对于未来将其更好地应用于临床治疗中有重要意义。

基因组印迹在哺乳动物发育中起到关键作用, 当胚胎缺失父源或母源任意一方基因印迹时都将无法发育到期^[8]。小鼠的孤雌胚胎由于缺失父源印迹基因最多只能发育到胚胎发育的 13.5 d (E13.5)^[9]。pESCs 由于缺失了父源基因印迹, 使得印迹基因表达呈双母源状态, 导致其无法像正常的受精卵来源的 ESCs 一样具有四倍体补偿的能力。此外, 印迹基因的表达水平与 DNA 甲基化的程度也同样会影响 pESCs 的多能性^[10]。为了提高 pESCs 的多能性, 研究者们进行了许多尝试。Hikichi 等通过将 pESCs 细胞核移植到去核卵母细胞的方式改变其 DNA 的甲基化状态^[11], 并且最终通过多次连续核移植的方式获得了发育到期的胎儿^[12]。H19 是位于小鼠 7 号染色体上的一个母源表达的基因, 编码长非编码 RNA (Long non-coding RNA, LncRNA), 在胚胎发育中起到

重要作用^[13], 其表达由一段基因内部的差异甲基化区域 (H19 differentially methylated region, H19-DMR) 控制, 当敲低 H19 后, pESCs 的多能性将得到显著提高^[14]。此外, Kono 等将敲除 H19-DMR 的未成熟卵母细胞核注入正常的卵母细胞, 此重构孤雌胚胎经激活可以发育到成年^[15]。此外, 小鼠 12 号染色体上有一簇重要的印迹基因群, 由位于 Dlk1-Gtl2 间的差异甲基化区 (Intergenic region differentially methylated region, IG-DMR) 控制多个印迹基因的表达, 该印迹基因群对于胚胎的发育也起到重要作用^[16]。在之前的报道中, Kono 等同时敲除 H19-DMR 与 IG-DMR 的一个等位基因并获得重构胚胎, 大幅度提高了孤雌胚胎发育到期的效率^[17]。之后, Li 等通过将 H19-DMR 与 IG-DMR 敲除的孤雌单倍体胚胎干细胞注入卵母细胞获得重构胚胎, 也可以大幅度提高孤雌胚胎的发育效率^[18]。之前的报道证实, 敲除 H19-DMR 与 IG-DMR 的一个等位基因并通过半克隆的方式可以提高孤雌胚胎的效率。因此推测将 H19-DMR 与 IG-DMR 的一个等位基因敲除也可以大幅度提高 pESCs 的多能性, 而四倍体补偿正是验证干细胞多能性的金标准。文中首次通过敲除 pESCs 中的 H19-DMR 与 IG-DMR 的单等位基因, 提高了 pESCs 的发育潜能, 通过四倍体补偿的方式获得了发育到期的小鼠。具备四倍体补偿能力即可证明 pESCs 可以分化到个体的任一类型细胞, 为将来 pESCs 的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所需小鼠购自北京维通利华公司, 饲养于 SPF 标准鼠房。所使用细胞培养基 DMEM/F12、N2、

B27、胰酶、限制性内切酶等均购自 Thermo 公司。定量 PCR 试剂购自 Roche 公司。所使用抗体均购自 Abcam 公司。引物合成及测序由北京奥科鼎盛生物科技公司完成。

1.2 方法

1.2.1 孤雌胚胎干细胞建系

在取卵前两天对每只 129Sv/Jae 谱系的雌鼠进行腹腔注射 5–10 U 的 PMSG 激素, 48 h 后注射 5–10 U 的 HCG 激素。注射 HCG 14–16 h 后。处死雌鼠, 划开输卵管膨大部取卵, 再将卵母细胞置于 50 μ L 的操作液中 (CZB-HEPES) 清洗 3 次, 之后在 50 μ L KSOM (石蜡油覆盖) 培养液中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 30 min, 再在含有细胞松弛素和 SrCl₂ 的激活液中培养 6 h 左右, 清洗干净后的胚胎在 KSOM 中继续培养至囊胚。将囊胚置于含 R1+2i 培养液及饲养层细胞的 4 孔板中, 静置培养 3–4 d, 可见内细胞团孵出并在饲养层上呈克隆样, 每天换液, 待克隆长大后, 挑克隆消化传代。

1.2.2 细胞培养与转染

小鼠胚胎干细胞系 ESCs、pESCs、H19-DMR^{+/−} pESCs、DKO-pESCs 培养于 R1+2i 培养液中。R1+2i 培养液成分为 DMEM/F12 (Gibco)、15% 胎牛血清(BI)、1% 的 NEAA (Millipore)、1 U/mL 白血病抑制因子(lif) (Millipore)、40 mmol/L PD0325901、120 mmol/L CHIR99021 (MCE)。每两天用胰酶 (Gibco) 传一次代, 培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中。为了获得 H19-DMR^{+/−} pESCs、DKO-pESCs, 大约 1×10^6 细胞进行转染, 共使用 8 μ g 质粒, sgRNA-cas9: 同源重组供体质粒为 1:1, 根据试剂盒说明书使用 Lipofectamine LTX kit (Invitrogen) 进行转染, 6–8 h 换液, 36 h 分选 GFP 阳性细胞 (Cas9 阳性)。分选后的细胞使用 G418 (250 μ g/mL) 筛选 7 d 获得 H19-DMR^{+/−} pESCs, 或使用嘌呤霉素 (Puromycin) (1 μ g/mL) 进行抗性筛选 3 d 获得

DKO pESCs。对挑取的亚克隆进行基因型鉴定, 各引物序列见表 3。

1.2.3 免疫荧光染色

待细胞长出克隆后, 用 4% 多聚甲醛室温固定 10 min, PBS 清洗 3 次, 加入 0.3% Triton X-100 对细胞进行处理 (30 min), 之后进行 3 次 PBS 清洗, 再加入含 3% BSA 的 PBS 进行封闭, 室温处理 1 h, 加入一抗 (1:200) 4 $^{\circ}$ C 过夜, 之后 PBS 清洗 3 次, 加入二抗 (1:200), 室温 1 h, PBS 清洗 3 次, 加入 DAPI (1:200), 室温孵育 10–15 min, PBS 清洗后, 加防荧光淬灭剂封片。使用激光共聚焦显微镜收集图片。文中所用一抗均购自 Abcam 公司, 二抗购自天津三箭生物有限公司。

1.2.4 质粒构建

在 MIT CRISPR Design 网站上设计基因编辑 sgRNAs, sgRNAs 单链 DNA 片段合成后, 加磷退火成双链, 连入 *Bbs* I 线性化的 PX461 (AddGene) 质粒中, 测序后进行大提。为了构建同源重组质粒, 首先通过 PCR 的方式获得同源臂 DNA 片段与抗性片段, 之后一步步连接入 pEasy-Blunt Simple Vector (TransGene) 中, 经测序验证成功后大提, 准备转染。sgRNA 序列见表 1。

1.2.5 定量 PCR

按照试剂使用说明用 Trizol 提取细胞中的总 RNA。之后取 1 μ g RNA 用 cDNA 反转录试剂盒

表 1 sgRNAs 序列

Table 1 Sequence of sgRNA

Primer name	Primer sequence (5'–3')
H19 DMR sGRNA1	TGCACGTGCAACCAGTTCGA
H19-DMR sGRNA2	GGCATCCACCATGAGCCGGT
H19-DMR sGRNA3	GTTCGATGGCCTCCCACCCC
H19-DMR sGRNA4	CTACCCGTGGGCGAGGCTCT
IG-DMR sGRNA1	TACGGCAACCAACGCTATAG
IG-DMR sGRNA2	AGGAGAAACCACTATAGCGT
IG-DMR sGRNA3	ACACACGGTCCGTTACAGCC
IG-DMR sGRNA4	TGCTGCACATCCGGTGTACC

(TaKaRa) 进行反转录, 稀释 10 倍后进行定量 PCR。定量 PCR 试剂盒购自 Roche 公司。反应条件为: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参, 使用定量 PCR 仪 (Thermo) 收集数据, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法来表示实验组和对照组中目的基因的表达倍数比。各引物序列见表 2。

1.2.6 亚硫酸氰盐 DNA 甲基化测序

提取细胞基因组, 按照亚硫酸氰盐 DNA 甲基化试剂盒 (Qiagen) 说明进行 DNA 的亚硫酸氰盐修饰, 回收修饰过后的 DNA, 进行巢式 PCR 扩增目的片段, PCR 产物连接入 pEASY-Blunt Simple

Vector 中, 挑细菌单克隆送测序。获得测序结果后将数据导入 <http://quma.cdb.riken.jp/> 进行分析, 引物见表 2。

1.2.7 四倍体补偿

取见栓第 2 天的雌鼠输卵管冲出 2 细胞胚胎, 之后将 2 细胞置于融合液中清洗 3 次, 融合液为 0.3 mol/L 甘露醇、0.1 mmol/L $MgSO_4$ 、3 mg/mL BSA 和 0.1 mg/mL PVA。最后转移至融合槽两极间进行融合。融合后的胚胎继续采用 KSOM 进行培养, 1 h 后观察, 去除未融合的胚胎。继续培养胚胎至 4 细胞胚胎, 此时注入 8–10 个胚胎干细胞于卵周隙中。重构胚胎在 KSOM 培养液中平衡 30 min 后移植到 ICR 假孕雌鼠的输卵管中。

表 2 qPCR 及 DNA 甲基化引物序列

Table 2 Primers for qPCR and detection of DNA methylation

Primer name	Primer sequence (5'–3')
Gapdh F	TCTTCCTGGTCCCCACAGTTT
Gapdh R	GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA
Oct4 F	GGATGGCATACTGTGGACCTC
Oct4 R	TTTCATGTCCTGGGACTCCTCG
Nanog F	CCAGGGCTATCTGGTGAACG
Nanog R	CCCGAAGTTATGGAGCGGAG
H19 F	GAACAGAAGCATTCTAGGCTGG
H19 R	TTCTAAGTGAATTACGGTGGGTG
H19-DMR BS F1	TGTAAGGAGATTATGTTTATTTT TGG
H19-DMR BS R1	CCCTAACCTCATAAAACCCATAA CTAT
H19-DMR BS F2	TATGAGTATTTAGGAGGTATAAG AATT
H19-DMR BS R2	TTTTATCAAAAATAACATAAAC CCCT
Snrpn BS F1	AATTTGTGTGATGTTTGTAATTAT TTGG
Snrpn BS R1	ATAAAAATACACTTTCACACTA CTAAAAAT
Snrpn BS F2	TATGTAATATGATATAGTTTAGAA ATTAGT
Snrpn BS R2	AATAAACCCAAATCTAAAATATT TTAATCA

表 3 基因鉴定引物序列

Table 3 Primers for genotype

Primer name	Primer sequence (5'–3')
H19 F1	CTCCTTCCCTGCACAGTATTGG
H19 R1	TCTCATGCTGGAGTTCTTCGCC
H19 F2	CTTCTGGAATAGCTCAGAGGCAGAG
H19 R2	GGAGTCTTCTGGATAGGCCAAG
H19 F3	GAGGGGTTTGGGTGTGTGAG
H19 R3	CTCCTCAAGCCACTCCTGTG
IG F1	ATTCAAGTTTCCGCCCCACTGC
IG R1	CTTCCACACCCTAACTGACACA
IG F2	CCGCAACCTCCCCTTCTAC
IG R2	AGAAGATGATGGGGGAGGCA
IG F3	CTGGGTGGTAGTACACGGAC
IG R3	CCTGAATCTGTGCCACGGTAA
D1Mit46F	AGTCAGTCAGGGCTACATGATG
D1Mit46R	CACGGGTGCTCTATTTGGAA
D14Mit5F	CACATGAACAGAGGGGCAG
D14Mit5R	GTCATGAAGTGCCACCTTT
D2Mit102F	TATTTCCCTGTCACTCCTCCC
D2Mit102R	TGTCTTTATGCTCAGACATACACA

2 结果与分析

2.1 pESCs 的获得

为了获得 pESCs, 对雌鼠进行了超排取卵, 经 SrCl_2 激活, 经细胞松弛素 B (CB) 处理后, 获得孤雌二倍体胚胎。孤雌二倍体胚胎可以正常发育至囊胚 (图 1A), 孤雌囊胚形态良好, 可以清晰观察到囊胚腔、内细胞团 (ICM)、滋养层外胚层细胞 (TE) 结构 (图 1B)。将状态良好的囊胚种植于 R1+2i 的培养液中, 内细胞团孵出, 经扩增传代后, 可见穹窿状的 pESCs 克隆 (图 1C)。进一步检测了印记基因 *H19-DMR* 和 *Snrpn* 在 pESCs

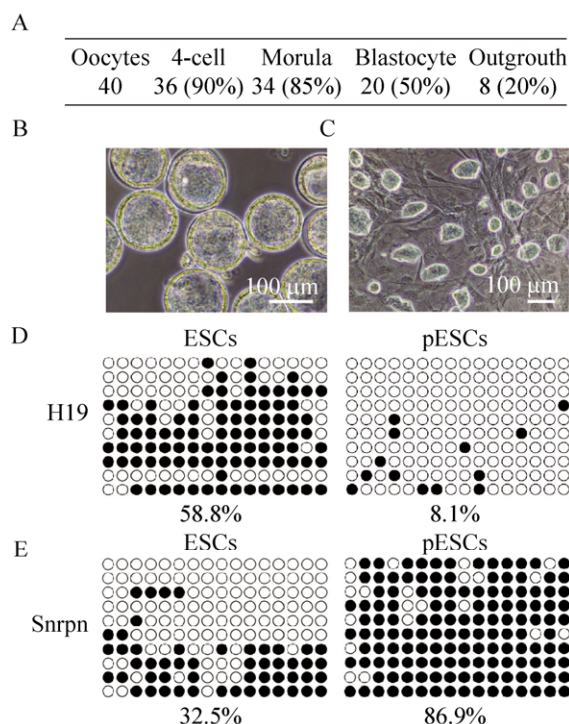


图 1 通过化学激活卵母细胞获得 pESCs 并进行相关印记基因的 DNA 甲基化检测

Fig. 1 Derivation of pESCs from chemically activated oocytes and detection of relate imprinting genes DNA methylation in pESCs. (A) Development of parthenogenetic embryos. (B) Parthenogenetic blastocysts in bright field (BF). (C) Established parthenogenetic embryonic stem cell lines in BF. (D) Schematic of *H19-DMR* DNA methylation by bisulfite analysis. (E) Schematic of *Snrpn* DNA methylation by bisulfite analysis.

基因组中的甲基化状态。经检测 *H19-DMR* 在 ESCs 基因组中的甲基化为 58.8%, 在 pESCs 基因组中的甲基化水平为 8.1% (图 1D), 符合父源印记基因 *H19-DMR* 在 pESCs 中呈现出的低甲基化状态。而 *Snrpn* 在 ESCs 基因组中甲基化水平为 32.5%, 在 pESCs 基因组中甲基化水平为 86.9% (图 1E), 结果也符合母源印记基因 *Snrpn* 在 pESCs 中呈现出的高甲基化状态。通过以上实验, 成功建立了 pES 细胞系。

2.2 pESCs 多能性鉴定

为确定 pESCs 的多能性, 对 pESCs 进行碱性磷酸酶染色, 结果显示 pESCs 具有较强的碱性磷酸酶活性 (图 2A)。进一步鉴定其多能性, 免疫荧光染色结果证明, pESCs 表达 Oct4 与 SSEA1

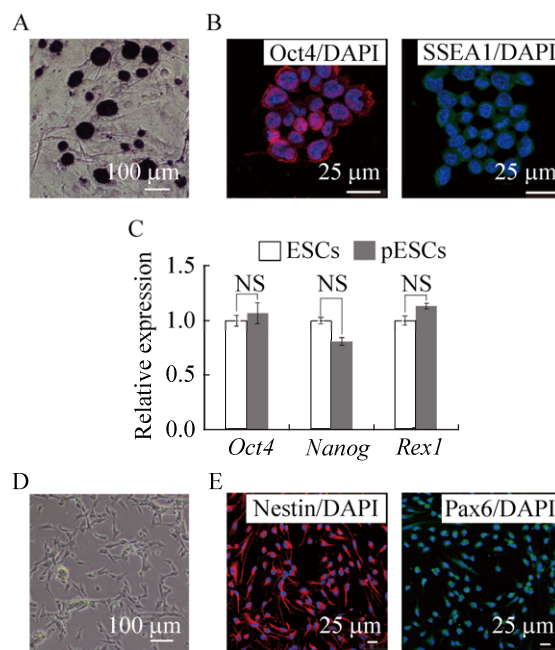


图 2 pESCs 多能性鉴定

Fig. 2 Identify the pluripotency of pESCs. (A) The AP stain of pES cells. (B) Immunofluorescence for SSEA1 and OCT4 in undifferentiated pES cells. (C) qPCR analysis the expression of the pluripotency marker gene (*Oct4*, *Nanog*, *Rex1*). (D) The NSCs differentiated from pES cells. (E) Immunofluorescence for Nestin and Pax6 in NSC derived from pES cells.

两种胚胎干细胞的标志基因 (图 2B)。同时针对 RNA 水平也进行检测, 通过定量 PCR 结果显示, pESCs 在 *Oct4*、*Nanog* 和 *Rex1* 这 3 个胚胎干细胞的标志基因的表达与受精卵来源的 ESCs 无显著差异。同时 pESCs 也有良好的神经分化能力。pESCs 来源的神经干细胞形态良好 (图 2D), 表达神经干细胞的标志基因 (图 2E)。以上结果证明 pESCs 具备良好的多能性。

2.3 获得 $H19-DMR^{+/-}$ pESC 与 DKO pESCs

虽然 pESCs 在体外分化方面展现了一定的多能性, 但是由于缺失父源基因组而导致其不具备发育成一个完整个体的能力。而有文献报道通过

修饰父源印迹基因可以提高重构孤雌胚胎的发育能力^[15]。因此尝试通过基因编辑技术修饰父源印迹 $H19-DMR$ 与 $IG-DMR$ 提高 pESCs 的多能性。为了通过 CRISPR/Cas9 敲除 $H19-DMR$, 设计敲除方案如图 3A 所示。将 sgRNA-Cas9 (Cas9 携带 GFP 标记) 质粒与供体质粒, 共转染到 pESCs 中, 之后分选 GFP 阳性细胞 (图 3B)。将分选回的细胞进行 G418 抗性筛选 7 d, 获得抗性细胞 (图 3C)。将抗性 pESCs 亚克隆传代后进行基因型鉴定, 测序结果显示为杂合子 (图 3D), 并命名为 $H19-DMR^{+/-}$ pESCs。为进一步提高 pESCs 的发育潜能, 在 $H19-DMR^{+/-}$ pESCs 进一步敲除 $IG-DMR$ 。

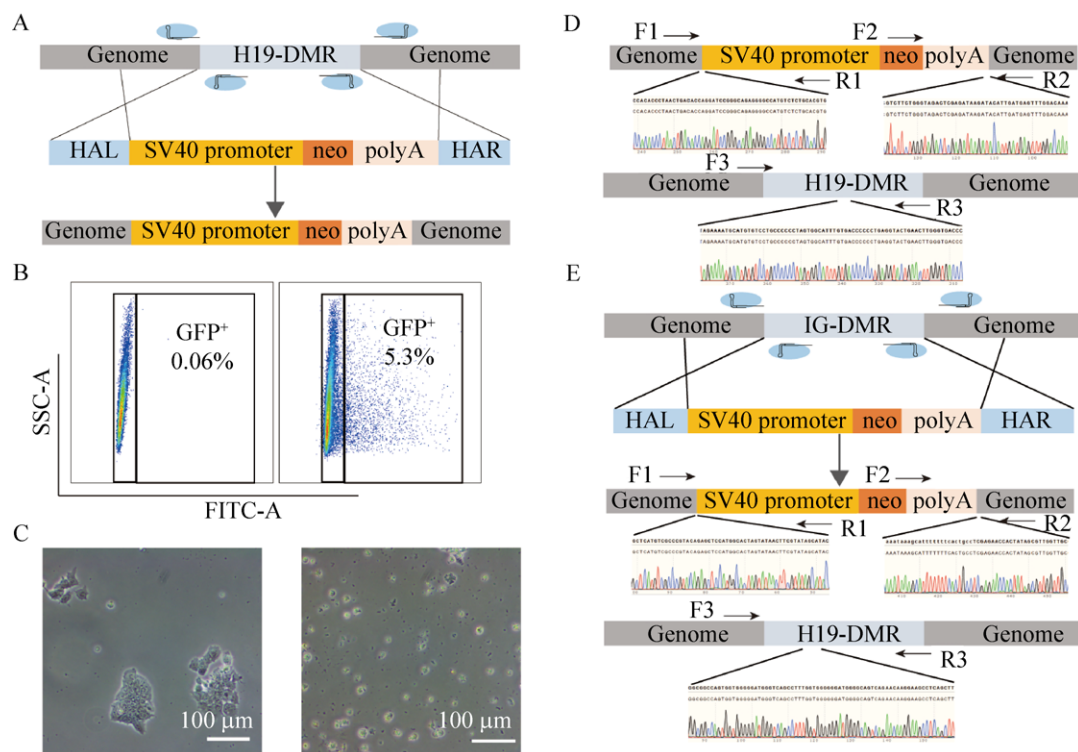


图 3 通过 CRISPR/Cas9 介导的同源重组获得 $H19-DMR^{+/-}$ 与 DKO pESCs

Fig. 3 Derivation of $H19-DMR^{+/-}$ and DKO pESCs through homologous recombination mediated by CRISPR/Cas9. (A) Schematic overview of $H19-DMR$ knockout. (B) Flow cytometry sorting of eGFP positive cells from transfected pESCs. eGFP positive indicates expression of Cas9. (C) G418 resistant results after 7 days. Right panel is the cells with transfection, left without transfection. (D) DNA sequencing of $H19-DMR$ subclones genotype. The F1/R1, F2/R2 and F3/R3 indicate the sites of the $H19-DMR$ genotype primers. (E) Schematic overview of $IG-DMR$ knockout and DNA sequencing of $IG-DMR$ subclones genotype. The F1/R1, F2/R2 and F3/R3 indicate the sites of the $IG-DMR$ knockout genotype primers.

质粒设计图如图 3E 所示。经过流式分选与嘌呤霉素抗性筛选后，对抗性亚克隆进行基因型鉴定，测序结果证明，*IG-DMR* 的单等位基因也被敲除（图 3E），获得的细胞系命名为 DKO-pESCs。

2.4 DKO pESCs 四倍体补偿获得小鼠鉴定

获得 DKO pESCs 后，首先检测了 *H19-DMR* 与 *IG-DMR* 相关基因的表达，结果表明，父源印记基因 *H19* 与 *Meg3* 的表达量显著下降，母源印记基因 *Igf2* 与 *Dlk1* 的表达量上升。为了进一步分析基因编辑后的 pESCs 的多能性，对其进行了四倍

体补偿实验。结果显示仅敲除 *H19-DMR* 无法获得四倍体补偿动物，但是 DKO-pESCs 却可以获得四倍体补偿动物，尽管效率极低 (0.29%) (图 4B)。所获得四倍体补偿小鼠虽然个体完整，但是出生后即死亡，而且与对照组同一天出生的野生型小鼠对比可以发现，小鼠个体偏小，嘴巴张大，舌头微微外吐 (图 4C)。为确定由四倍体补偿获得的小鼠是否来源于 DKO-pESCs，分别进行了 SSLP 鉴定与基因型鉴定 (图 4D-E)。结果显示，该小鼠确实为 129 DKO-pESCs 来源。以上数据说明，

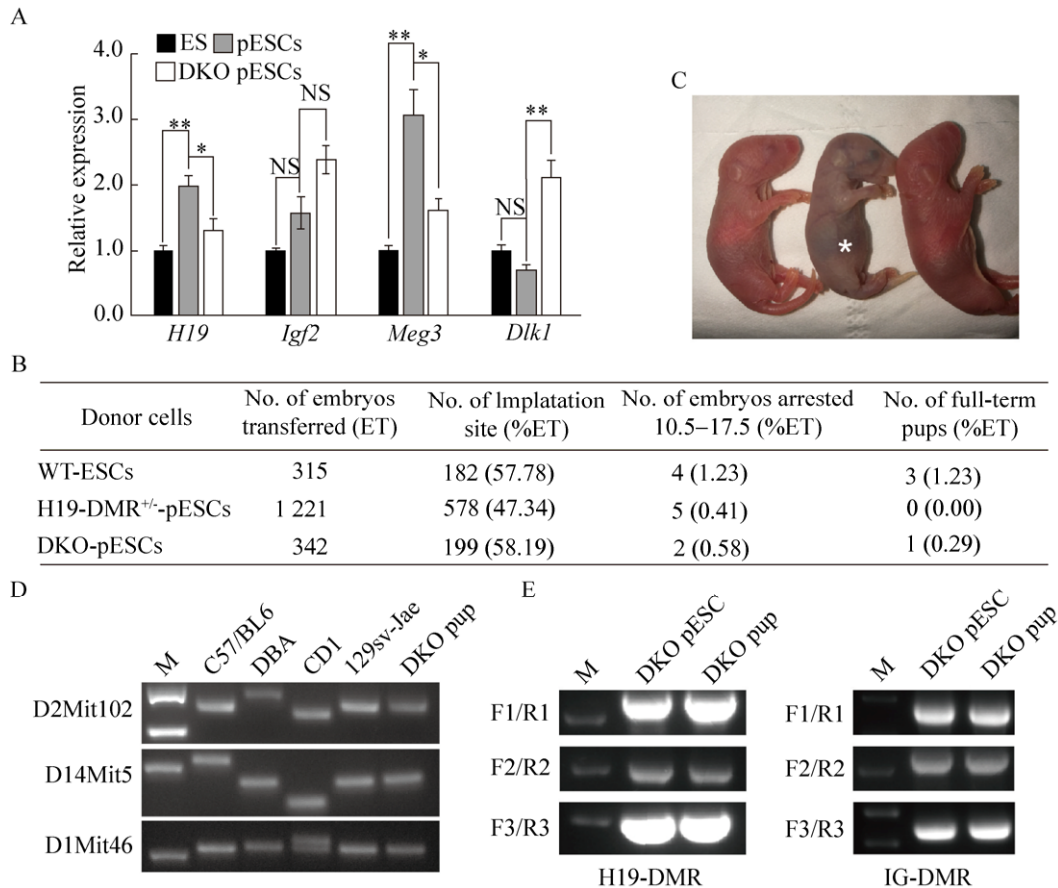


图 4 四倍体补偿获得 DKO pESCs 来源的小鼠胎儿

Fig. 4 Derivation of pup from DKO pESCs through tetraploid complementation. (A) qPCR analysis the expression of *H19-DMR* and *IG-DMR* related genes (*H19*, *Igf2*, *Meg3* and *Dlk1*), *t* test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Data are represented as mean $\bar{x} \pm s$. (B) The statistics of development efficiency. (C) The newborn pups. The star indicate the DKO pup from tetraploid complementation. The other two is the normal WT pups as the control. (D) Microsatellite analysis shows the alleles of DKO pup is identical to those of DKO pESC but completely different from the tetraploid blastocysts CD1 and others. (E) Genotype the DKO pup through tetraploid complementation.

在 pESCs 中同时敲除 *H19-DMR* 和 *IG-DMR* 的单等位基因可以使 pESCs 具备四倍体补偿能力。

3 讨论

多能性干细胞既可以自我更新又可以分化为多种体细胞类型, 所以是未来细胞替代治疗法的重要来源细胞之一。由于免疫排斥作用, 可以被应用于临床的多能干细胞只能是来源于病人自身的细胞。目前由于诱导多能干细胞的安全性尚在评估, 核移植胚胎干细胞又存在着操作复杂的问题, 因此相对安全又容易获得的 pESCs 是未来替代疗法的重要细胞资源之一。另外, pESCs 仅具备卵母细胞基因组, 所以可与卵供体 MHC 匹配^[4]。pESCs 可以通过囊胚嵌合实验贡献到各种组织器官中。此外 pESCs 也可以在体外分化为各种体细胞类型, 包括神经干细胞、心肌细胞等多种细胞类型, 并应用到疾病模型动物的治疗研究中^[5-7]。之前的研究表明, 孤雌胚胎最多可以发育至 E13.5^[9], 此外, 来源于孤雌囊胚的 pESCs 的多能性也比 ESCs 要差一些^[19]。印迹基因在胚胎发育过程中起到重要作用, 根据 Yang 等的报道, 孤雄单倍体胚胎干细胞 (Androgenetic haploid ESCs, AG-hESCs) 具备类似精子的能力, 可以通过半克隆的方式获得动物, 敲除 *H19-DMR*、*IG-DMR* 后注射到卵母细胞中可以大幅度提高半克隆效率^[20], 而将敲除 *H19-DMR*、*IG-DMR* 的孤雌单倍体胚胎干细胞 (Parthenogenetic haploid embryonic stem cells, phESCs) 注射到卵母细胞中也可以大幅度提高孤雌小鼠的发育率^[18]。因此, 为进一步提高 pESCs 的多能性, 文中首次对 pESCs 中的父源印迹基因进行了编辑。结果表明, 当印迹基因 *H19-DMR*、*IG-DMR* 的单等位基因被敲除后, pESCs 来源的小鼠可以发育到期。pESCs 通过四倍体补偿的小鼠可以观察到小鼠个体偏小、舌头外吐, 我们推测主要原因是仅仅

敲除两个母源表达印迹基因的单等位基因可能并不足以使得 pESCs 具备使四倍体补偿动物发育到健康个体的能力。由于在 pESCs 中仍然有许多重要的印迹基因在发育进程中起到关键作用, Li 等报道^[21], 在编辑 *H19-DMR* 和 *IG-DMR* 的基础上又编辑了 *Rasgrf1* 不仅可以提高获得孤雌小鼠的效率还获得了行为正常的成体的孤雌小鼠, 因此可能需要编辑更多的关键印迹基因才能使 pESCs 进一步提高获得四倍体补偿动物的效率, 并最终获得正常的孤雌成体动物。为了更好地研究印迹基因在个体发育中的作用和进一步提高 pESCs 的发育潜能, 可以结合印迹基因编辑的孤雌/孤雄单倍体细胞与四倍体补偿实验, 获得健康的孤雌或孤雄小鼠, 并发现更多相关的关键印迹基因, 再针对这些印迹基因在 pESCs 上进行修饰, 进一步提高 pESCs 的多能性, 获得健康的孤雌动物, 拓展 pESCs 的应用。

REFERENCES

- [1] Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, et al. Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 1983, 73: 249–261.
- [2] Fang ZF, Gai H, Huang YZ, et al. Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos. *Exp Cell Res*, 2006, 312(18): 3669–3682.
- [3] Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science*, 2002, 295(5556): 819.
- [4] Kim K, Lerou P, Yabuuchi A, et al. Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis. *Science*, 2007, 315(5811): 482–486.
- [5] Sanchez-Pernaute R, Lee H, Patterson M, et al. Parthenogenetic dopamine neurons from primate embryonic stem cells restore function in experimental Parkinson's disease. *Brain*, 2008, 131: 2127–2139.
- [6] Didié M, Christalla P, Rubart M, et al. Parthenogenetic

- stem cells for tissue-engineered heart repair. *J Clin Invest*, 2013, 123(3): 1285–1298.
- [7] Espejel S, Eckardt S, Harbell J, et al. Brief report: Parthenogenetic embryonic stem cells are an effective cell source for therapeutic liver repopulation. *Stem Cells*, 2014, 32(7): 1983–1988.
- [8] Platonov ES. Genomic imprinting and problem of parthenogenesis in mammals. *Ontogenez*, 2005, 36(4): 300–309.
- [9] Kono T, Obata Y, Yoshimzu T, et al. Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse. *Nat Genet*, 1996, 13(1): 91–94.
- [10] Li C, Chen ZS, Liu Z, et al. Correlation of expression and methylation of imprinted genes with pluripotency of parthenogenetic embryonic stem cells. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(12): 2177–2187.
- [11] Hikichi T, Kohda T, Wakayama S, et al. Nuclear transfer alters the DNA methylation status of specific genes in fertilized and parthenogenetically activated mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 2008, 26(3): 783–788.
- [12] Hikichi T, Ohta H, Wakayama S, et al. Functional full-term placentas formed from parthenogenetic embryos using serial nuclear transfer. *Development*, 2010, 137(17): 2841–2847.
- [13] Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse *H19* gene. *Nature*, 1991, 351(6322): 153–155.
- [14] Ragina NP, Schlosser K, Knott JG, et al. Downregulation of *H19* improves the differentiation potential of mouse parthenogenetic embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(7): 1134–1144.
- [15] Kono T, Obata Y, Wu Q, et al. Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, 2004, 428(6985): 860–864.
- [16] Lin SP, Youngson N, Takada S, et al. Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the *Dlk1-Gtl2* imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat Genet*, 2003, 35(1): 97–102.
- [17] Kawahara M, Wu Q, Takahashi N, et al. High-frequency generation of viable mice from engineered bi-maternal embryos. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(9): 1045–1050.
- [18] Li ZK, Wan HF, Feng GH, et al. Birth of fertile bimaternal offspring following intracytoplasmic injection of parthenogenetic haploid embryonic stem cells. *Cell Res*, 2015, 26(1): 135–138.
- [19] Thomson JA, Solter D. The developmental fate of androgenetic, parthenogenetic, and gynogenetic cells in chimeric gastrulating mouse embryos. *Genes Dev*, 1988, 2(10): 1344–1351.
- [20] 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(3): 605–617.
- [21] Li ZK, Wang LY, Wang LB, et al. Generation of bimaternal and bipaternal mice from hypomethylated haploid ESCs with imprinting region deletions. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(5): 665–676.e4.

(本文责编 郝丽芳)