



十三届全国人大二次会议
全国政协十三届二次会议

特别策划
科技创新面面观

两会

体细胞克隆猴

开启新药研发「灵长类」时代

本报记者 操秀英



2019年1月24日,5只生物钟紊乱体细胞克隆猴登上中国综合英文期刊《国家科学评论》封面。视觉中国

“开始做这个项目时,我的预期是2020年能做出就很不错了。”中国科学院神经科学研究所(以下简称“中科院神经所”)所长蒲慕明告诉科技日报记者。

中科院神经所研究员孙强从蒲慕明那接到体细胞克隆猴任务时,给自己和团队的时间是十年。事实上,他们仅用了五年就做出让学术界瞩目的成果。

梦寐以求多年但无法达成的目标

遗传背景单一的灵长类动物模型是科研人员梦寐以求多年但无法达成的目标。

“用小鼠做药效检测,可以剔除遗传背景因素,更好地观察药效。”蒲慕明说。但是,由于小鼠的基因、代谢和脑组织结构与生理等方面与人类差别太大,部分药物在人类和小鼠上的效果也差别巨大,相比之下,与人类基因更接近的灵长类动物显然是更好的动物模型。

非人灵长类动物首选对象肯定是猴子。可是

野生猴的遗传背景各异、个体表征差异难统一,每次科学实验或药物检测的对照验证,需要使用大量实验猴,而且野生猴繁殖周期长、单胎数量少,验证工作常常持续很多年,时间过于漫长。所以想将其作为动物模型,最大的难题就是如何获得遗传背景相同的猴子。

“小鼠繁殖很快,自然繁殖几代后它们的遗传背景就相同了。猴子繁殖一代就要五六年,所以唯一的办法就是克隆。”蒲慕明说。

超高实验技巧完成艰难的“另一半”

剩下的“另一半”却远比想象艰难许多。

孙强分析,在体细胞克隆猴技术具体操作上,主要有两大难点。第一点,“拿掉细胞核的时候不能抽掉周围太多营养物质,否则细胞就不发育了”。此外,移植到卵细胞中的,是成熟的、只表达某些特定基因的体细胞细胞核,研究人员需要想办法让它重新变成一个未分化的全能胚胎细胞。

孙强解释道,由于猴子细胞不透明,在显微镜下看不到细胞核,需要通过偏振光才能把细胞核显示出来。在孙强团队的研究记录视频中,研究

人员注视着显微镜,在一闪一闪的偏振光下,操纵10微米左右直径的极细针头在细胞里吸取、注射,并尽可能减小对细胞的损伤,其难度远大于操纵绣花针。

除了去核要求速度快外,将体细胞核注入去核卵细胞同样要求非常快,他们的团队可以做到15秒内实现体细胞注入操作,只有精湛的技术才能保证对卵细胞损伤最小。”孙强说。

第二点,在核基因组启动前,体细胞核要经历一个回复到早期胚胎状态的过程,也就是重编程。

将构建足够数量的疾病模型猴

短短一年后,中科院神经所科研团队再次用体细胞克隆技术生成了5只遗传背景相同的模型猴——世界首批核心节律基因BMAL1敲除猕猴模型。记者在中科院神经所非人灵长类研究平台看到,一只半岁多的猴子,躲在繁育箱角落里。它就是神经所科研团队创建的世界首例生物钟紊乱猴后代之一。

生物节律的基础研究与转化干预目前亟须好的生物模型。2016年9月,张洪钧团队首次利用基因修饰方法,得到一批生物节律核心基因BMAL1缺失的猕猴。

然而,通过基因敲除方法获得的第一代模型猴,容易产生嵌合体,这成了研究的最大阻碍。由于这一批猴的生物节律紊乱严重程度不一致,无法作为理想的动物模型。随着“中中”“华华”的诞生,研究人员开始思考,能否利用克隆猴技术,构建出疾病模型猴?

孙强团队马不停蹄,在国际上首次获得5只遗传背景一致的生物节律紊乱克隆猴。

“这个成果比首例体细胞克隆猴更进一步的地方在于,上次用的是流产胚胎的体细胞,这次用的

今年1月份,孙强团队与同属于中科院神经所的张洪钧团队合作,再获佳绩:在张洪钧团队利用CRISPR/Cas9技术成功构建世界首批核心节律基因BMAL1敲除猕猴模型的基础上,孙强团队通过一只症状最明显的公猴的体细胞克隆出五只小猴。这项进展说明中国科学家已可以批量生产遗传背景均一的疾病猕猴模型。

但克隆猴太难了。美国、中国、德国、日本、新加坡和韩国等世界科研机构都在攻关非人灵长类体细胞克隆,均未成功。此前,体细胞克隆猴最接近成功的一次是在2010年,美国俄勒冈灵长类研究中心在给定孕猴妈妈胚胎移植后的第81天发生流产。“只有获得遗传背景相同的克隆猴,才能最大程度发挥平台的作用,真正推进相关药物的研发。美国科学家还差一半就成功了。我们也很希望成功,但要做好剩下的一半。”蒲慕明说。

只有将这个过程中控制好,才能提高体细胞胚胎的发育率。在尝试各种调控方法效果均不理想后,2014年,孙强团队在一篇报道中看到一种新的酶处理方法,并最终用这一方法将囊胚率提升到45%,优质胚胎率升高到29%。最终,孙强团队用127枚卵母细胞,获得了109个重构胚胎,对21只猴子受体进行移植,获得了6只怀孕受体,最后只有两只在2017年顺利出生。

“这个工作证实了猕猴可以用体细胞来克隆,并且,它可以成为有用的动物模型。”蒲慕明认为。

是活猴的体细胞来克隆的,可以在两代猴之间进行对比。”蒲慕明说,更重要的是,此次克隆的是一种有疾病表型的猴,首次证实通过体细胞核移植技术可以克隆成年基因修饰猴,进一步表明克隆猴作为疾病模型的有效性。

“这些脑疾病模型克隆猴,未来将有助于解析脑重大疾病的致病机理、确立预警和早期诊断指标,进行干预和治疗等。建立基于疾病模型猴的非人灵长类平台,将成为中国脑计划的一大亮点。”蒲慕明表示。

科研人员有话说

孙强: “最难时也没想过放弃”

本报记者 操秀英



中科院神经所研究员孙强

“科研是一件非常枯燥的事情,如果不是有很强的兴趣,和对这件事的坚定信念,是很难坚持下去的。”记者本来想请他聊聊科研中的趣事,孙强却如是回答。

确切地说,小时候立志成为一名公路或桥梁工程师的孙强对动物模型的兴趣始于研究生时期,而他与猕猴结缘则要等到毕业后。

1992年,孙强进入哲里木畜牧学院(现内蒙古民族大学)畜牧专业学习,四年后他选择继续读研究生,并来到了扬州大学。

在攻读近交系小鼠形成史时,他发现,那些早期小鼠遗传学研究先驱们的事迹比电影还好看。“这些人一点不浮躁,脑子里只有科学,静得下心来。我看了很感动,希望有一天能去小鼠夏令营地朝圣。”此时,实验动物模型终于成为孙强的兴趣。

孙强与猴子相伴的日子,始于2004年。当时,中国还没有试管婴儿,而国外则在1984年就开始了。为了做出试管婴儿,孙强来到西双版纳的一座山上。上山要坐缆车,一周下山买一次菜,他坚持了近四年。给猴子打针、观察月经、冲洗猴房……2007年,孙强成功做出了中国首批试管婴儿。

但遗憾的是,他最终没有做成转基因猴。孙强说:“很懊恼,但现在想来也可能是一种幸运,如果当时做出来了,也许就没有后来的克隆猴了。”这或许正是科研的魅力所在,山穷水尽处孕育着柳暗花明。

全球首个体细胞克隆猴诞生后,无数赞誉都涌向蒲慕明和孙强团队。这固然是一个科研人员的高光时刻,但对孙强来说,在这成绩背后,14年与团队并肩作战、同猴子朝夕相处的日子才是记忆里更难忘的时光。

孙强记得,2009年,为了快速启动非人灵长类研究,中科院神经所和孙强毅然决定把猕猴平台安置在了某个猴子养殖场附近。平台地处偏僻的岛屿,周围尽是些无名路、无名河,最近的饭店在3公里外,如果想看电影,到最近的木溪镇需开车50分钟。起初那里连条像样的路都没有,更没有一盏路灯。十七八个人要轮流做饭,还要照顾猴子。

在这种环境下,人和猴子是最好的朋友。小鼠、兔子之类特别能生的小动物,排的卵本来就特别多,还可以轻松地实现成千上万只的大规模饲养,不愁卵的来源。而对于牛、羊、猴之类的大动物,事情就会麻烦一些。“我们每天都要监测猴子的月经。”孙强说,克隆需要的猴卵必须从母猴体内获取,而要让母猴排卵就必须按照猴的月经周期注射促排卵药物。

“为了保证猴子的健康,我们没有单独将一只猴子养在一个笼子里,而是将10到12只猴子养在22到28平方米的一个大笼子里,并且有充足阳光,但这就带来一个问题,那么多猴子怎么监测?”孙强说,“这就要求我们的兽医和猴子做朋友。”

长期下来,大伙儿练就了辨识猴脸的本事,他们认识猴房里的每一只猴子,不用看号牌就知道谁是谁。

新生猴每2—3小时需要喂一次奶,夜里也不能间断,没有心理准备是做不好这份工作的。孙强说,他们一定要招真正喜欢这个行业的志同道合之人。在平台最困难的时候,只剩下了7个人,他们也坚持了下来。

一路走来,除了兴趣,孙强说的另一个关键词就是“坚持”。

“做科研没有什么诀窍,就是持之以恒,哪怕是困难的时候也没想过放弃,只是觉得可能以当时的条件暂时做不出来,但我相信这个方向一定是对的。”孙强说,科研这场马拉松,自己才刚刚起步。“时间不够用,要做的事情还有很多,比如提高体细胞克隆猴的成功率,构建不同的疾病模型。”

(本版图片除标注外来源于网络)

“不可能实现的突破”,中国做到了

本报记者 操秀英

中国体细胞克隆猴的一系列成果,在国际上引起了强烈轰动和巨大反响。那么,针对这项科学成就,国际同行及媒体又是如何评价的?

因发明动物克隆技术获得2012年诺贝尔奖的得主约翰·格登(John B. Gurdon)在《细胞》杂志发表评论说:“作者通过精细优化已有数十年历史的克隆技术,结合表观遗传修饰因子的运用,攻克了体细胞核移植过程中最早期的一些障碍,完成了这个里程碑式的工作……一个可定制卵母细胞的时代开启了。”

《国家地理》杂志和《大西洋月刊》写到,在过去的10多年里,欧美科学界也一直在努力通过本身就极为复杂的体细胞克隆技术实现猴子的克隆,并在这个过程中已经实现了其他一些物种(比如兔子、乌鸦和狗等)的克隆,可属于灵长类的猴子克隆尝试却屡遭失败。这两家媒体都表示,中国人的实验证明了灵

长类动物的克隆可以实现,而这是因为中国科学家不仅仅只是采用,更改良了当年克隆绵羊的技术,才令此前屡屡失败的灵长类克隆终于在这次127个克隆卵细胞中取得了2个成功的结果,诞生了“中中”和“华华”这两只活蹦乱跳的小猴子。

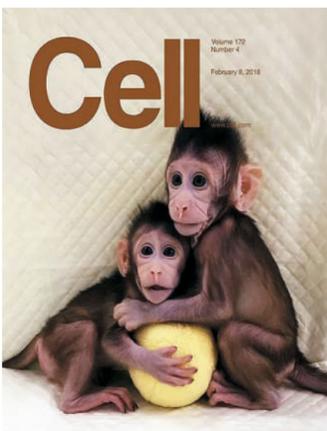
美国俄勒冈卫生科学大学的克隆专家舒克拉特·米塔利波夫在接受《自然》(Nature)杂志访问时表示,应该恭喜中国科学家,“我明白其中的难度有多大”。他在21世纪的前10年尝试克隆时,使用了1.5万个猴子卵子,虽然已做到从克隆胚胎中提取干细胞系,但是怀孕的灵长类动物最终未能诞下活胎。

国际细胞治疗协会主席、医学科学家约翰·拉斯科则评价说:“相似的技术20年前曾经用来制备多莉羊,但是这一次来自上海的科学家利用聪明的化学方法和操作技巧,攻克了多年来导致克隆猴失败的障碍。这是许多专家一直认为不可能实现的重大技术突破。”

对于这一技术突破的意义,英国肯特大学遗传学系达林·格里芬教授对该论文表示欢迎,并从技术角度称“非常令人印象深刻”。他补充说:“这种方法的优点是显而易见的。已知的、统一遗传背景的灵长类动物模型,无疑可以对人类疾病,尤其是遗传疾病的研究、理解和最终治疗,提供非常有帮助。”

路透社的报道则认为,基因型相同的动物模型对于生命医学研究是至关重要的,可以有效排除复杂基因背景对实验的干扰,并为一大批新药研究提供有效的测试模型。

《国家地理》采访的多位医学科研人员还指出,虽然目前科技已经很发达,不再像以往那样需要进行大量的动物实验,很多问题靠计算机模拟也能解决,但动物实验仍然是科研中不可取代的重要部分,特别是对于复杂的人类疾病的研究,比如帕金森和艾滋病等。



《细胞》期刊报道全球首例体细胞克隆猴中科院神经所供图

主 编 罗 冰
林莉君
副 主 编 徐 玢
徐 玢
责任编辑 郭 科
郭 科
张 琦