

人二倍体化合子的 DNA 甲基化变化模式 *

陈欣洁 范 勇 龙晓林 吴学诗 孙筱放[△]

(广州医学院第三附属医院妇产科研究所 广东 广州 510150)

摘要 目的:探讨人类三原核合子及二倍体化合子中 DNA 甲基化模式的变化情况。方法:我们采用显微操作技术去除三原核合子中两个雄原核中的一个,观察恢复了二倍体状态的胚胎的发育情况,并检测了三原核和二倍体化的合子及早期胚胎中 DNA 甲基化模式的动态变化。结果:二倍体化的合子的囊胚形成率与三原核合子的囊胚形成率无显著性差异,在人三原核合子中两个雄原核发生主动地 DNA 去甲基化而雌原核在受精后的 20h 后仍保持甲基化。三原核与二倍体化合子中 DNA 甲基化模式没有差别。结论:去除一个雄原核不会影响合子和胚胎的 DNA 甲基化模式。去除多余雄原核并不能改善胚胎的发育。

关键词 DNA 甲基化 雄原核 雌原核 重编程 三原核合子

中图分类号:Q243 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)15-2863-04

DNA Methylation Patterns in Corrected Bipronuclear Human Zygotes*

CHEN Xin-jie, FAN Yong, LONG Xiao-lin, WU Xue-shi, SUN Xiao-fang[△]

(Institute of Gynecology and Obstetrics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, China)

ABSTRACT Objective: To investigate DNA Methylation Patterns in Corrected Bipronuclear (2PN) Human Zygotes. **Methods:** In this study, we removed one male pronucleus from tripronuclear zygotes. Then, development potential of correct 2PN zygotes was compared with those of tripronuclear zygotes. We also examined the dynamic DNA methylation patterns in triploid and bipronucleated zygotes and early developing embryos. **Results:** We find that actively DNA demethylation of the two male pronuclei occurs in tripronuclear human zygotes while the female pronucleus remains methylated at 20 h post-insemination. Our data show that there are no differences in the DNA methylation between tripronuclear and corrected bipronuclear human zygotes. **Conclusion:** DNA methylation embryos and zygotes are not affected by removal of a male pronucleus. Diploidization does not improve embryo development potential.

Key words: DNA methylation; Male pronucleus; Female pronucleus; Reprogramming; Tripronucleate zygotes

Chinese Library Classification: Q243 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)15-2863-04

前言

多精受精是体外受精-胚胎移植 (in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)过程中一种常见的现象,发生率约为 7%^[1]。此类受精卵早期可以正常卵裂,但晚期可导致发育停滞或形成非整倍体,因此,这样的胚胎不适于移植。2003 年,科学家报道了他们去除人多原核合子中多余的雄原核后,获得了健康的婴儿^[2]。由此可见,这些胚胎是一项宝贵的资源,但是,大多数去除多余原核的尝试显示,这种人为恢复正常 2 倍体状态的胚胎具有有限的发育潜能^[3,4]。所以在技术上二倍体化作为一种生殖技术还需要进一步的探讨。

在本研究中,我们从三原核合子移去两个雄原核中一个,观察其发育潜能,并检测了在三原核及二倍体化合子和早期胚胎中动态的 DNA 甲基化模式变化情况,还进一步观察去核是否影响其 DNA 甲基化模式。

1 材料和方法

1.1 材料

2009 年 1 月-2009 年 12 月我们共收集了 247 个三原核胚胎,所有 3 原核胚胎均来源于传统 IVF(in-vitro fertilization),经镜检确定有 3 个原核及 2 个极体。采用人三原核合子进行研究已通过广州医学院第三附属医院的伦理委员会批准。所获得的胚胎已获得病人知情同意。

1.2 显微操作

1.2.1 显微操作的准备 操作液采用改良的 HTF 培养液,加入 7.5 μg/ml 的细胞松弛素 B,制成微滴,盖油后放入培养箱中平衡。持卵针外径 100 μm,内径 30 μm,去核针的内径 12-15 μm。**1.2.2 显微操作去核的过程** 显微操作在受精后 10-20 小时进行。具体方法:将三原核合子放入含细胞松弛素 B 的 HTF 中作用 10-15 分钟,使细胞骨架松散便于操作。操作时,首先用持卵针将三原核合子旋转、定位至 3 个原核及 2 个极体清晰可见。然后,用负压将合子固定在持卵针上,此时 3 个原核呈品字形排列在卵子中央。判断雄原核的标准:离第二极体较远,体积略大于雌原核^[5]。采用脉冲式负压电去除透明带,然后将去核针轻轻压在目标原核的表面,调节旋钮,用负压慢慢将原核吸出。最后,将去核针慢慢从卵子中退出。去核后的二倍体化合子在

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(30871378)

作者简介:陈欣洁(1972-),女,博士,主任技师,主要研究方向:生殖医学, E-mail: lucychen23@yahoo.cn

[△] 通讯作者:孙筱放, E-mail: xiaofangsun@hotmail.com

(收稿日期:2011-10-21 接受日期:2011-11-17)

G1.5 中洗 3 次后,放入 37℃ 5% CO₂ 中继续培养。3PN 对照组经历相同的步骤,只是不进行显微操作。

1.3 囊胚培养

三原核及二倍体化的合子在 G1.5 中培养至 Day 3(以取卵当日为 Day 0),然后移入 G2.5 中继续培养至囊胚。

1.4 免疫荧光染色

用新鲜配制的 2%多聚甲醛在受精后 20、25 和 30 h 分别固定一批三原核胚胎,在受精后 25 和 30 h 分别固定一批二倍体化的胚胎。所有胚胎固定 30 min 后,用 0.1% PVP/PBS 洗 2 次,再用 0.5% Triton-100 通透 30 min。然后,用 2N HCl 37℃ 作用 1 h,再用 0.1% PVP/PBS 洗 3 次后,用 1% 牛血清白蛋白封闭 1h 后,将胚胎移入抗-5-甲基胞嘧啶抗体(1:200 稀释,购自 Epigentek 公司)中 4℃ 过夜。第二天,将胚胎在 0.1% PVP/PBS 洗 3 次后,移入山羊抗鼠 IgG-Cy3 二抗中 37℃ 作用 1h 后,用 DAPI 染核。染色完成后,将胚胎移至加了 10 μl 抗淬灭剂的玻片上,盖上盖玻片,用指甲油封片。在 NIKON C1SI 激光共聚焦

显微镜下观察,每个胚胎均以 0.5 μm/ 层的厚度对胚胎的核进行扫描。

1.5 统计学分析

采用 X² 检验对三原核及二倍体合子的发育情况进行统计学分析。

2 结果

2.1 纠正的人类双原核合子的早期发育

28 个三原核合子经显微操作后 23 个成活,经 24 小时的培养后,其中 21 个双原核胚胎发生细胞分裂(91.3%)。培养三天后,71.42%(15/21)的胚胎发育到 6-8 细胞。培养五天后,1 个合子发育到囊胚阶段(4.76%)。

二倍体化的胚胎体外发育能力与对照组相比,没有显著性差异(8 细胞期:71.42%:75.56%;囊胚期:4.76%:6.67%;P>0.05)(见表 1)。

表 1 二倍体化的合子与三原核合子胚胎发育能力的比较

Table 1 *In vitro* development of corrected bipronuclear zygotes and tripronucleated zygotes

	Number of zygotes		Embryo development (%)		
	Initial	Cultured	Cleavage	8-cell	Morula and blastocyst
Experimental group	28	23	21(91.30) ^a	15(71.42) ^a	1(4.76) ^a
Controls	45	45	45(100) ^a	34(75.56) ^a	3(6.67) ^a

Note: a Superscripts in the same line indicate no difference (P>0.05).

2.2 DNA 甲基化在人类的三原核胚胎中的模式

我们检测了从中期到末期的人类三原核胚胎的 DNA 甲基化模式。在受精后的 20h 左右,我们用抗 5-甲基胞嘧啶抗体标记了 35 个三原核合子,以观察其 DNA 甲基化状况。

图 1 显示了典型的 5-甲基胞嘧啶染色模式。所有被检测的合子中有 30 个合子,其两个较大的原核(雄原核)发生了一定程度的主动地去甲基化,而雌原核则保持甲基化状态不变(见图 1A);有 3 个合子的所有三个原核的未发生甲基化程度的变化,表现为 5-Mc 一致深染(见图 1B),还有 2 个合子染色失败。

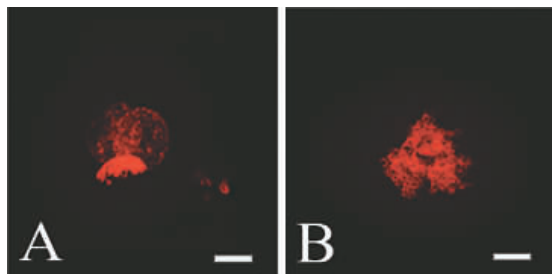


图 1 人类三原核合子的甲基化状态

A 多数三原核合子表现出的典型的 5-甲基胞嘧啶染色模式

B 少数三原核合子三个原核显示出相同的甲基化程度

Fig. 1 DNA methylation in tripronuclear human zygotes

A The typical staining patterns of 5-methylcytosine (5-Mc) in tripronuclear human zygotes

B The three pronuclei showing roughly the same intensity of labeling in a small proportion of tripronuclear zygotes.

2.3 人类三原核合子早期发育时期 DNA 甲基化的动态变化

受精后 25 h, 人类的三原核合子发育到以下三个不同时期:第一组,合子的三个原核依然清晰可见(占 46.15% 18/39, 见图 2A);第二组,合子的原核的细胞膜破裂,染色体固缩并准备进行有丝分裂(占 33.3% 13/39, 见图 2B 和 2C);第三组,胚胎已经分裂发育到二细胞时期(占 20.51% 8/39, 见图 2D)。由此推测,人类的三原核胚胎第一次有丝分裂发生在受精后 25 小时左右。

在第一组中,有 15 个合子(占 83.33% 15/18)可观察到,两个较大的原核(雄原核)去甲基化,而雌原核保持甲基化状态。

在其他两组中,合子及胚胎的 5-Mc 水平没有差异。这表明,在这些合子和胚胎中父源的 5-Mc 水平已恢复正常。

受精后的 30 小时,合子发育到三个不同时期:第一组,合子的染色体固缩准备进行有丝分裂(占 16.22% 6/37, 见图 2C);第二组,胚胎已分裂为 2 及 4 细胞(占 83.78% 31/37, 见图 2D-F)。在这两组中,合子和胚胎的 5-Mc 水平没有显著差异。

结果表明,人类三原核合子在原核期这个短暂的窗口期经历主动去甲基化及重新甲基化的过程。

2.4 二倍体化合子的 DNA 甲基化模式

受精后的大约 20 h 移去雄原核,将二倍体化的合子进一步培养,在 25 小时和 30 小时将它们固定,然后用抗 5-Mc 抗体进行标记。

受精后 25 小时,二倍体化的合子发育到三个不同阶段:第一组,合子的两个原核依然清晰可见(占 46.88% 15/32, 见图

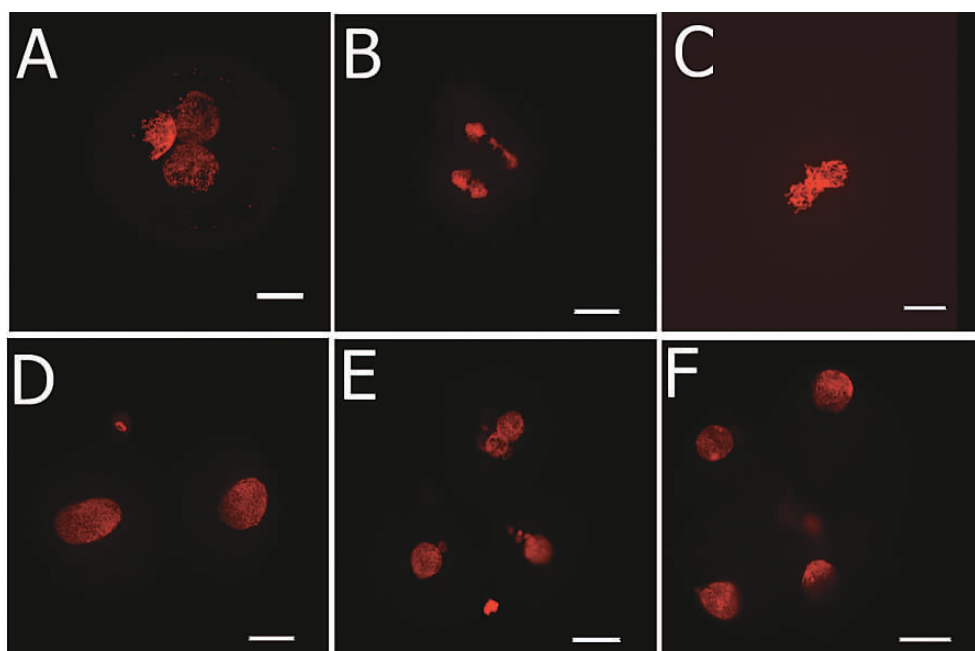


图2 人类三原核合子及早期胚胎中动态的 DNA 甲基化状态
A-D 受精 25h 后, 抗-5MeC 抗体标记的 DNA 甲基化情况
B-F 受精 30h 后, 抗-5MeC 抗体标记的 DNA 甲基化情况
(A)原核期 (B,C) M 期 (D) 2 细胞期 (E) 3 细胞期 (F) 4 细胞期
标尺 =20 μ m

Fig. 2 Dynamic DNA methylation patterns in tripronuclear human zygotes and subsequent early cleavage
(A-D) DNA methylation patterns in 3PN human zygotes at 25 hours post-insemination
(B-F) DNA methylation patterns in 3PN human zygotes at 30 hours post-insemination
(A)pronucleus stage; (B,C) M phase; (D) 2-cell stage; (E) 3-cell stage; (F) 4-cell stage
Scale bar=20 μ m

3A);第二组,合子的染色体固缩准备进行有丝分裂(占 50%, 16/32, 见图 3B);第三组的胚胎已分裂为 2 细胞(占 3.13%, 1/32, 见图 3C)。

在第一组中,12 个合子(占 80%, 12/15)的雄原核去甲基化,而雌原核则保持甲基化状态。第二组和第三组中,合子和胚胎的 5-MeC 水平没有差异。

受精后 30 小时,二倍体化的合子发育到三个不同的阶段:第一组,合子的染色体固缩准备进行有丝分裂(占 22.58%, 7/31, 见图 3B);第二组,胚胎发育到 2 或 4 细胞期(占 77.42%, 24/31, 见图 3B)。在这两组中,合子和胚胎 5-MeC 水平没有显著差异。由此可见,去除多余雄原核的二倍体合子在受精后 25-30 小时发生第一次有丝分裂。

我们的研究表明,原核的去除不会影响二倍体化合子和早期胚胎的 DNA 甲基化模式。与三原核合子相似,在原核时期的较短窗口期内,二倍体化合子也经历了主动的 DNA 去甲基化及重新甲基化的过程。

3 讨论

由于来源有限,很难获得人类卵母细胞和胚胎用于科学研究。人卵母细胞在体外受精后约 7%为三原核。经患者知情同意,这些合子是进行诊断与治疗的重要资源^[2],也可提供胚胎发育的相关信息。先前的研究已证实,从三原核的合子中去除多

余的原核是可行的^[245]。但是,三原核的合子的发育潜能有限。可能的原因之一,就是胚胎的发育严格受倍性和父母双方遗传的影响。本研究也发现去除多余的雄原核不能改善胚胎的发育。

本研究中,我们在胚胎发育的早期阶段,比较了三原核及二倍体化合子的 DNA 甲基化状态的动态变化。我们所用的三原核合子来源于常规 IVF,可见其第二极体排出,通常认为所见的额外的原核是由于多余的精子进入卵母细胞造成的^[9]。结果表明,在三原核及二倍体化合子中, DNA 的甲基化状态没有明显差异。去除多余的原核不会影响合子和早期胚胎中 DNA 甲基化状态。由此可见,三原核及二倍体化合子是研究胚胎早期发育相关信息的良好资源。

DNA 甲基化是重要的表观遗传修饰方式之一,它与基因的剪接和异染色质形成有一定关系^[7]。对于受精及早期胚胎发育过程中 DNA 甲基化重编程的模式有着不同的观点。早先的研究结果表明, DNA 甲基化重编程模式在哺乳动物中是非保守的^[89]。尽管在小鼠和人类的合子中,雄原核主动地去甲基化,而在兔子和羊的合子中并没有此现象^[9]。然而,最近的研究表明,兔子在原核期的晚期,发生父源染色体的 DNA 去甲基化^[10],而山羊去甲基化发生在 2 细胞期^[11]。在本研究中,我们发现,在受精 20 小时后,三原核合子的两个雄原核选择性地甲基化而雌原核保持其甲基化状态。我们所见到的雄原核主动去甲

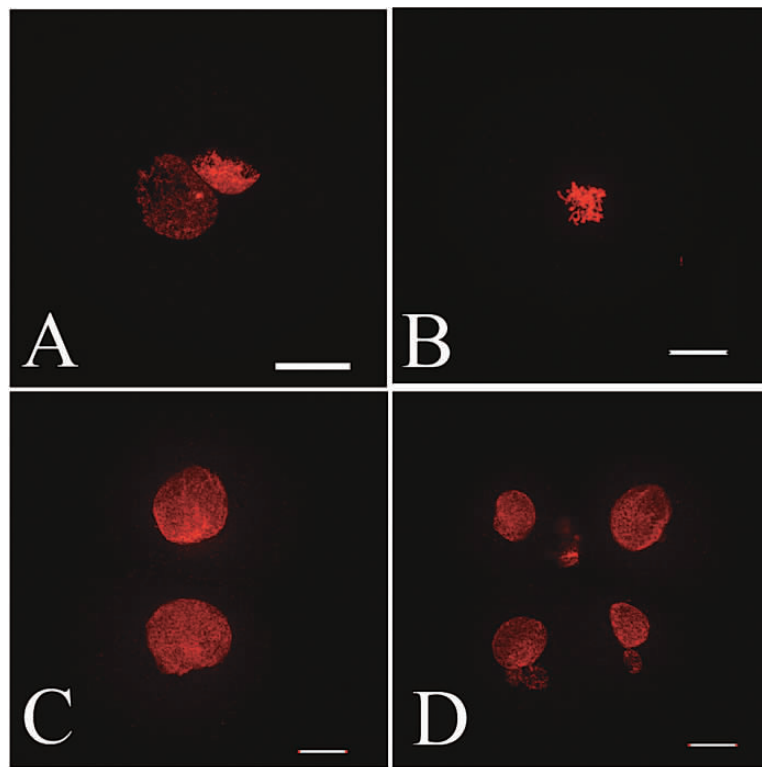


图3 人类二倍体化合子及早期胚胎中动态的 DNA 甲基化状态

A-C 受精 25h 后, 抗 -5MeC 抗体标记的 DNA 甲基化情况

B-D 受精 30h 后, 抗 -5MeC 抗体标记的 DNA 甲基化情况

(A)原核期 (B)M 期 (C) 2 细胞期 (D) 4 细胞期 标尺 =20μm

Fig. 3 Dynamic DNA methylation patterns in corrected 2PN human zygotes and subsequent cleaved embryos

(A,B,C) DNA methylation patterns in corrected 2PN human zygotes at 25 hours post-insemination

(B,C,D) DNA methylation patterns in corrected 2PN human zygotes at 30 hours post-insemination

(A) pronucleus stage; (B) M phase; (C) 2-cell stage; (D) 4-cell stage Scale bar=20μm

基化现象与早先的研究是一致的^[8,12,13]。然而,与先前的研究有所不同的是,我们发现,人类的三原核合子是在原核期这段短暂的窗口期完成主动去甲基化及重新甲基化的^[13]。

雌雄配子均是高度特化的终末分化细胞。受精后,它们经历广泛的重编程以重建其全能性。尽管配子具有相似的遗传功能,但父源和母源配子是以不同的方式进行重编程的。受精后,父源 DNA 去甲基化的机制和因素我们还不清楚。在卵胞质中,父源染色质的解聚有利于鱼精蛋白和组蛋白的交换,同时这种解聚为去甲基化酶和/或其他蛋白因子粘附暴露的雄性染色质提供独特的机会。我们的结果表明,在大多数的三原核合子中两个雄性原核选择性地去除甲基化。早先的研究也发现,小鼠的胞浆可令多达 5 个雄原核去甲基化^[14]。因此,在卵胞质中含有较高的浓度的参与选择性去甲基化的因子。

几个 3PN 及纠正的 2PN 合子没有表现出明显的雄性原核去甲基化的现象,其他的研究者也发现此现象^[8,12]。其原因可能是由于合子来自于不孕症患者。越来越多的证据表明,不孕症夫妇的遗传因素及环境因素(激素水平及体外培养条件等)对表观遗传重编程会产生不利的影响^[15]。即使在正常生育的小鼠合子中,有大约 10%的合子表现出异常的甲基化模式。鉴于表观遗传重编程的复杂性,体细胞核移植后,从供者细胞清除分化相关的表观遗传印迹及重置供者的表观遗传化学可能导致甲

基化模式的延滞及不完全重编程。这些表观遗传的异常很可能是导致克隆效率低、植入率低及较高的宫内死亡率和致畸率的原因。

总之,本研究首次比较了三原核及二倍体化合子和早期胚胎之间 DNA 去甲基化及重新甲基化的动态变化。结果表明,去除一个雄原核不会影响合子和胚胎的 DNA 甲基化模式。但是,二倍体化并不能改善胚胎发育潜能。我们的结果表明三原核或二倍体化胚胎的有限的发育潜能可能不是由异常的 DNA 甲基化所引起的。

参考文献(References)

- [1] Ho PC, Yeung WS, Chan YF, et al. Factors affecting the incidence of polyploidy in a human in vitro fertilization program [J]. Int J Fertil Menopausal Stud, 1994, 39(1): 14-19
- [2] Kattera S, Chen C. Normal birth after microsurgical enucleation of tripunuclear human zygotes: case report [J]. Hum Reprod, 2003, 18(6): 1319-1322
- [3] Escriba MJ, Martin J, Rubio C, et al. Heteroparental blastocyst production from microsurgically corrected tripunuclear human embryos[J]. Fertil Steril, 2006, 86(6): 1601-1607
- [4] 孔令红,刘忠,邢福祺,等.显微穿刺纠正多原核合子 31 例的临床观察[J]. 中华妇产科杂志, 2001, 36(1): 34-35

(下转第 2890 页)

- Rheum, 1998,41:171-175
- [8] Levine SA, Perin LA, Hayes D, et al. An evidence - based evaluation of percutaneous vertebroplasty. *Manag Care*, 2000, 9: 56-60, 63
- [9] 万磊, 熊小明, 高志, 等. 经皮椎体成形术和后凸成形术在多节段椎体骨折中的应用[J]. *临床骨科杂志*, 2009, 12(6):611
- Wan Dun, Xiong Xiao-ming, Gao Zhi, et al. Percutaneous vertebroplasty and balloon kyphoplasty: applications in multilevel vertebral compression fractures [J]. *Journal of Clinical Orthopaedics* 2009, Dec, 12(6):611
- [10] Steinmann J, Tingey CT, Cruz G, et al. Biomechanical comparison of unipedicular versus bipedicular kyphoplasty [J]. *Spine*, 2005, 30: 201-205
- [11] Kim AK, Jensen ME, Dion JE, et al. Unilateral transpedicular percutaneous vertebroplasty: initial experience [J]. *Radiology*, 2002, 222:737-741
- [12] Reiley MA, Wong W, Garfin S. Vertebroplasty Kyphoplasty [J]. *Journal of Women's Imaging*, 2000, 2(3):117
- [13] Barr JD, Barr MS, Lemley TJ, et al. Percutaneous vertebroplasty for pain relief and spine stabilization[J]. *Spine*, 2000, 25(10): 923-928
- [14] Belkoff M, Mathis JM, Jasper L, et al. The biomechanics of vertebroplasty: the effect of cement volume on mechanical behavior [J]. *Spine*, 2001, 26(4):1537-1541
- [15] Barr JD, Barr MS, Lemley TJ, et al. Percutaneous vertebroplasty for pain relief and spine stabilization[J]. *Spine*, 2000, 25(8):923-928
- [16] 明江华, 周建林, 方海滨, 等. 经皮椎体成形术与椎体后凸成形术治疗胸腰椎压缩性骨折的临床疗效比较[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2007, 22(5): 368-370
- Ming Jiang-hua, Zhou Jian-lin, Fang Hai-bin, et al. The comparison of clinical curative effect with PVP and PKP in the treatment with thoracic and lumbar compressing fractures [J]. *Chinese Journal of Bone and Joint Injury*, 2007, 22(5):368-370
- [17] Kim AK, Jensen ME, Dion JE, et al. Unilateral transpedicular percutaneous vertebroplasty: initial experience [J]. *Radiology*, 2002, 222(3):737
- [18] Liebschner MA, Rosenberg WS, Keaveny TM. Effects of bone cement volume and distribution on vertebral stiffness after vertebroplasty[J]. *Spine*, 2001, 26(14):1547-1155
- [19] Yang HL, Wang GL, Niu GQ, et al. Using MRI to determine painful vertebrae to be treated by kyphoplasty in multiple-level vertebral compression fractures: a prospective study [J]. *J Int Med Res*, 2008, 36(5): 1056-1063
- [20] 袁文, 谢宁. 椎体成形术与后凸成形术的临床应用及相关问题[J]. *中国骨伤*, 2010, 23(10): 727
- Yuan Wen, Xie Ning. The clinical application and related issues of the PVP and PKP[J]. *Chinese Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 2010, 23(10): 727
- [21] Belkoff SM, Mathis JM, Fenton DC, et al. An ex vivo biomechanical evaluation of an inflatable bone tamp used in the treatment of compression fracture[J]. *Spine*, 2001, 26:1512
- [22] 陆军, 张贵祥, 赵海涛. 经皮穿刺椎体成形术的影像学研究[J]. *中国医学影像学杂志*, 2001, 9:244
- Lu Jun, Zhang Gui-xiang, Zhao Hai-tao. The Medical Imaging studies of PVP[J]. *Chinese Journal of Medical Imaging*, 2001, 9:244

(上接第 2866 页)

- Kong Ling-hong, Liu Zhong, Xing Fu-qi, et al. Correction of polyploid nuclear zygotes in 31 cases by micromanipulation [J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2001, 36(1):34-35(In Chinese)
- [5] Rawlins RG, Binor Z, Radwanska E, et al. Microsurgical enucleation of triploid human zygotes[J]. *Fertil Steril*, 1988, 50(2): 266-272
- [6] Rosenbusch BE. Mechanisms giving rise to triploid zygotes during assisted reproduction[J]. *Fertil Steril*, 2008, 90(1):49-55
- [7] Abdalla H, Yoshizawa Y, Hochi S. Active demethylation of paternal genome in mammalian zygotes [J]. *J Reprod Dev*, 2009, 55(4): 356-360
- [8] Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J, et al. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(7):R266-267
- [9] Young LE, Beaujean N. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep [J]. *Anim Reprod Sci*, 2004, 82-83:61-78
- [10] Lepikhov K, Zakhartchenko V, Hao R, et al. Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes[J]. *Epigenetics Chromatin*, 2008, 1(1): 8
- [11] Park JS, Lee D, Cho S, et al. Active loss of DNA methylation in two-cell stage goat embryos[J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(8-9): 1323-1328
- [12] Xu Y, Zhang JJ, Grifo JA, et al. DNA methylation patterns in human triploid zygotes[J]. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(3):167-171
- [13] Fulka H, Mrazek M, Tepla O, et al. DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos [J]. *Reproduction*, 2004, 128(6):703-708
- [14] Santos F, Hendrich B, Reik W, et al. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo[J]. *Dev Biol*, 2002, 241(1):172-182
- [15] Katari S, Turan N, Bibikova M, et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(20):3769-3778