

H3K4 和 H3K9 三甲基化在猪体外成熟卵母细胞和克隆胚胎中的表达分析^①

沈开元^{1,2}, 代小丽^{1,2}, 杨 婷¹,
余 春¹, 石德顺¹, 李湘萍¹

1. 广西大学 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530005;

2. 柳州市人民医院, 广西 柳州 545006

摘要: 该研究主要运用单细胞免疫荧光技术分析猪卵母细胞和克隆胚胎发育过程中, H3K4 和 H3K9 三甲基化(H3K4me3, H3K9me3)的表达情况. 收集体外成熟 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h 的猪卵母细胞; 同时通过体细胞核移植操作获得一细胞、四细胞、桑葚胚和囊胚期克隆胚胎, 经过免疫荧光染色, 在激光共聚焦显微镜下观察 H3K4me3 和 H3K9me3 修饰在卵母细胞和胚胎中的变化情况. 免疫荧光结果显示, 在不同减数分裂阶段的猪卵母细胞内均能观察到 H3K4me3 的表达, 并且呈现出逐渐下降的趋势; 在生发泡期(GV), 生发泡晚期(L-GV)和生发泡破裂(GVBD)阶段的卵母细胞中能发现明显的 H3K9me3 表达, 随着减数分裂的进行, H3K9me3 表达消失, 在第一次减数分裂中期前阶段(Pre-MI)到第二次减数分裂中期(MII)阶段卵母细胞中未发现 H3K9me3 荧光信号. H3K4me3 和 H3K9me3 在不同发育阶段的猪克隆胚胎中都有表达, 其中 H3K4me3 在不同阶段胚胎中荧光信号强度相近, H3K9me3 在四细胞胚胎中荧光强度降低, 在桑葚胚和囊胚中荧光强度出现升高的趋势. 以上结果说明, H3K4me3 参与调控猪卵母细胞体外成熟的整个过程, H3K4me3 和 H3K9me3 在猪体细胞核移植胚胎早期发育过程中可能具有调控作用.

关键词: H3K4 三甲基化; H3K9 三甲基化; 猪; 卵母细胞; 体细胞核移植胚胎

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)05-0001-06

卵母细胞体外成熟技术可为研究植入前胚胎发育和体细胞克隆等提供实验材料. 已有研究表明, 组蛋白修饰参与了哺乳动物卵母细胞成熟过程, 并且其表达模式在不同物种卵母细胞成熟过程中存在差异. 组蛋白甲基化是调控真核生物细胞内转录状态的重要修饰之一, 其生物学功能主要与转录调控、基因组完整性及表观遗传继承等有关. 组蛋白甲基化主要发生在 H3/H4 组蛋白尾部氨基酸残基位点上, 共分为单甲基化、双甲基化和三甲基化. 不同位点组蛋白 H3 氨基酸位点的甲基化可对转录产生激活或者抑制作用. 组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸(H3K4)甲基化通常富集于转录起始位点^[1], 是转录激活的标志表观修饰之一; 组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸(H3K9)甲基化是经典的基因沉默修饰^[2], 通常与异染色质的形成有关.

Kageyama 等^[3]研究表明, 在小鼠卵母细胞中 H3K4 和 H3K9 甲基化的表达随着卵泡发育而逐渐增强, 并且在生发泡期中表达信号最强. 在牛的卵母细胞体外成熟过程中, 组蛋白甲基化呈现出不断变化的状态. 在猪的初级、次级和早期窦卵泡附近均表现出显著的组蛋白甲基化修饰, 卵丘附近呈现出 H3K4 强甲基化状态. 这些研究说明, 组蛋白甲基化参与了哺乳动物卵子发生过程的基因转录调控作用. 此外, 组蛋白甲基化也是影响哺乳动物克隆胚胎发育的重要因素. H3K4 甲基化参与调控小鼠供体细胞核中多能性基因, 如 *Sox2*, *Oct4* 等基

① 收稿日期: 2016-03-22

基金项目: 国家自然科学基金(31560632); 广西自然科学基金(2014GXNSFAA118084, 2014GXNSFAA118099, 2016GXNSFDA380030).

作者简介: 沈开元(1986-), 男, 广西桂林人, 博士研究生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究.

通信作者: 李湘萍, 研究员.

因的表达,进而影响供体细胞核的重编程效率^[4].通过在小鼠胚胎干细胞中短时表达去甲基化转移酶基因 *Jmjd2b*,可调节克隆胚胎中 H3K9 三甲基化表达水平,提高克隆胚胎体外发育效率^[5].

H3K4 和 H3K9 甲基化在调控哺乳动物卵母细胞和克隆胚胎发育中起到重要的作用,目前有关 H3K4 三甲基化(H3K4me3)和 H3K9 三甲基化(H3K9me3)在体外成熟猪卵母细胞和克隆胚胎中的表达模式还鲜有报道.本研究通过观察 H3K4me3 和 H3K9me3 在猪卵母细胞和体细胞克隆胚胎中的表达模式,将有助于了解体外成熟卵母细胞和克隆胚胎中基因组表达动态变化,并且为改善猪卵母细胞成熟质量,提高克隆胚胎发育效率奠定基础.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

猪卵母细胞体外成熟液(Porcine maturation medium, PM);猪胚胎体外培养液(Porcine zygote medium-3, PZM-3);一抗:组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸三甲基化位点(H3K4me3)兔源多克隆抗体(Abcam, 1:100),组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸三甲基化位点(H3K9me3)兔源多克隆抗体(Abcam, 1:200);二抗:Dylight 488 标记的山羊抗兔 IgG(Thermo, 1:400);固定液:4%多聚甲醛的 PBS 溶液;清洗液:含 0.01% Triton X-100 和 0.3% BSA 的 PBS 溶液;阻断液:含 0.3% BSA 和 0.1 mol/L 甘氨酸的 PBS 溶液.

CO₂ 培养箱(Thermo 公司);超净工作台(AIRTECH 公司);体视显微镜(NIKON 公司);显微操作仪(NIKON 公司);LSM 510 meta 激光扫描共聚焦显微镜(Leica 公司);体视镜热台、可调式恒温热台(Thermo 公司);融合仪(BLS, CF-150B);融合槽(BTX, 450-1).

1.2 卵母细胞的收集及体外成熟

猪卵巢来源于广西南宁市本地屠宰场,保存在装有 30 ℃ 双抗生理盐水的保温壶中于 2~3 h 内运回实验室.卵巢用 75% 的乙醇溶液清洗一遍,时间不超过 15 s,随后用加热至 34 ℃ 的 DPBS 清洗 3 遍,于 39 ℃ 水浴锅中待用.然后用带有 12 号针头的 10 mL 注射器抽取直径为 3~6 mm 的卵泡,卵泡液打入 10 mL 玻璃圆底试管中,39 ℃ 保温,自然沉淀 15 min. 去除三分之二上清,将剩余卵泡液打入 60 mm 玻璃平皿中,用洗卵液混匀,在体式显微镜下挑选有 3 层以上卵丘细胞的卵丘-卵母细胞复合物(Cumulus oocyte complexes, COCs),COCs 用洗卵液清洗 3 遍后每 30~50 个放入盖有矿物油并做有 150 μL 的 PM 微滴,前 22 h 置于含有激素的 PM 中,后 20 h 移入不含激素的 PM 中继续培养,培养箱条件为 38 ℃,5% CO₂,100% 湿度.

1.3 供体细胞的准备

剪取 2 个月大的猪耳部组织,剪成小块后用 70% 乙醇进行消毒清洗,随后用含有 0.25% 胰酶和 0.05% EDTA 的消化液消化 30 min,接着用 0.2% 胶原蛋白酶处理 45 min. 将分解的细胞放入含 10% FBS 的 DMEM,置于离心机内 1 500 r/min 离心 5 min,重复 3 次,最后将细胞放入装有培养液的 60 mm 培养皿中,置于 38.5 ℃,5% CO₂ 的培养箱中培养 7~10 d,收集汇合后的单层细胞用消化液进行消化传代.一般用 4~10 代的成纤维细胞作为核移植供体,每次使用前将细胞消化成独立的单个细胞.

1.4 核移植、融合以及激活

核移植操作参考之前报道的步骤^[6]并进行了一些改变.在直径为 60 mm 培养皿盖中央做 4 个 60 μL 左右的操作滴,并在 4 个滴正上方做 2 个 15 μL 液滴,一个为显微操作液,另一个为胰酶消化液,再用矿物油覆盖.将成熟卵母细胞转入不含钙离子的显微操作液.在显微镜下利用盲吸法去核,用直径为 25 μmol/L 的操作针从 3 点钟方向进针并吸取 1/5 包含有第一极体和卵母细胞核的胞质.挑选合适的供体细胞,用注核针吸取注入受体卵周隙,点压透明带,使供体细胞与受体卵的胞膜接触紧密,随后将注核的卵母细胞转移到 PZM-3 中,在 38.5 ℃,5% CO₂,100% 湿度培养箱中恢复 1~1.5 h.随后将注入细胞核的卵母细胞用融合/激活液洗涤 3 遍并在其中平衡 2 min,每 10 个放入铺满融合/激活液的融合槽(电极间距为 500 μmol/L)内,用拉制的玻璃钝头针(直径 100 μmol/L)拨动重组卵,使供体细胞-受体卵细胞膜接触面与电极平行.用 83 V/mm,100 μs,1 次直流脉冲的参数进行融合并且激活.1 h 后在显微镜下判定融合,重构胚用 PZM-3 清洗 3 遍置于 PZM-3 微滴后移入培养箱培养.48 h 统计卵裂率,168 h 统计囊胚率.

1.5 单细胞免疫荧光分析

分别收集不同时期猪卵母细胞和核移植胚胎,用 4% 多聚甲醛 4 ℃ 固定过夜(8~12 h),固定后样品用阻

断液阻断 3 次, 每次 5 min; 室温条件下用 1% Triton X-100 透化 30 min, 随后用阻断液阻断 2 次, 每次 5 min; 处理好的样品用 1% BSA 封闭 1 h, 随后样品分别移入 H3K4me3 和 H3K4me9 一抗中进行孵育, 4 ℃ 过夜; 样品取出后用清洗液清洗 3 次, 每次 5 min; 随后放入装有相应二抗的离心管中避光作用 1.5 h; 最后用 5 μg/mL 碘化丙啶(PI)复染 DNA 10 min, 取出清洗液洗涤 2 次; 样品放置于载玻片上, 加入抗淬灭剂并用凡士林封片, 使用相同拍照参数在激光共聚焦显微镜下拍摄荧光图片, 使用 Image Pro-plus 6.0 软件计算荧光强度值. 每组样品至少进行 3 次重复, 每次至少检测 5 个囊胚, 10 个卵母细胞和其他阶段的胚胎, 将 GV 期卵母细胞荧光强度值校正为 1, 随后进行相对荧光强度分析.

2 结果与分析

2.1 体外成熟猪卵母细胞和克隆胚胎中 H3K4me3 和 H3K9me3 的分布

分别收集体外成熟不同发育阶段猪卵母细胞和克隆胚胎进行免疫荧光染色, 得到 H3K4me3 和 H3K9me3 在猪卵母细胞体外成熟过程中的分布情况. 结果显示, H3K4me3 在 GV 至 M II 阶段卵母细胞中均有表达, 并且呈现出较强的荧光信号(图 1); H3K9me3 只在 GV, L-GV 和 M II 阶段卵母细胞中检测到明显的荧光信号, 在其他阶段的卵母细胞中未检测到 H3K9me3 荧光信号(图 2); 而在一细胞、四细胞、桑椹胚和囊胚期的体细胞克隆胚胎中均能检测到 H3K4me3 和 H3K9me3 荧光信号(图 3).

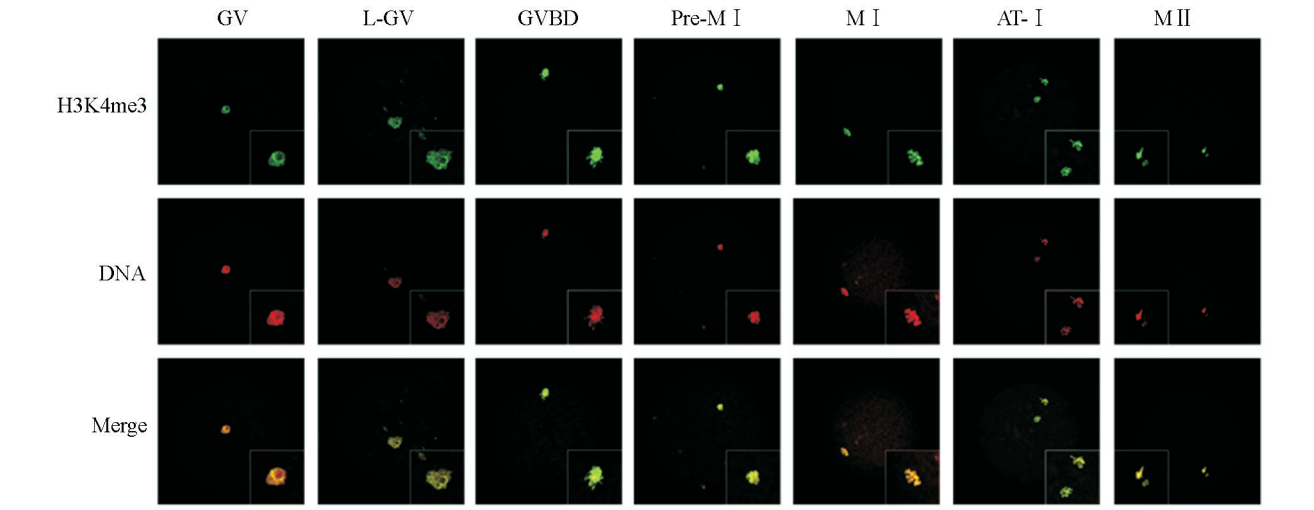


图 1 不同成熟阶段猪卵母细胞 H3K4 三甲基化分布

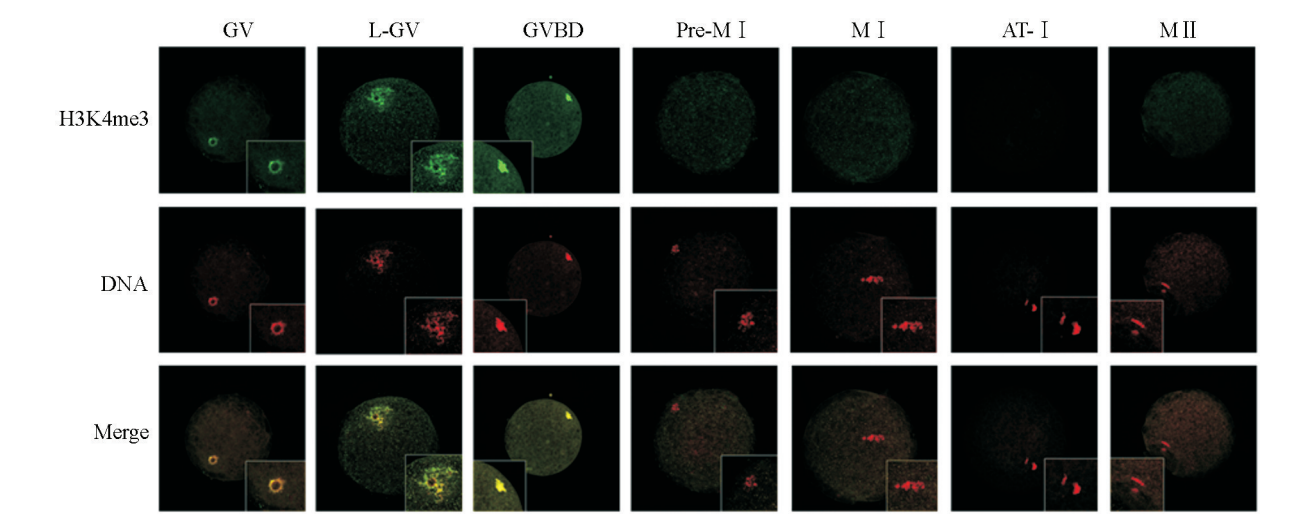
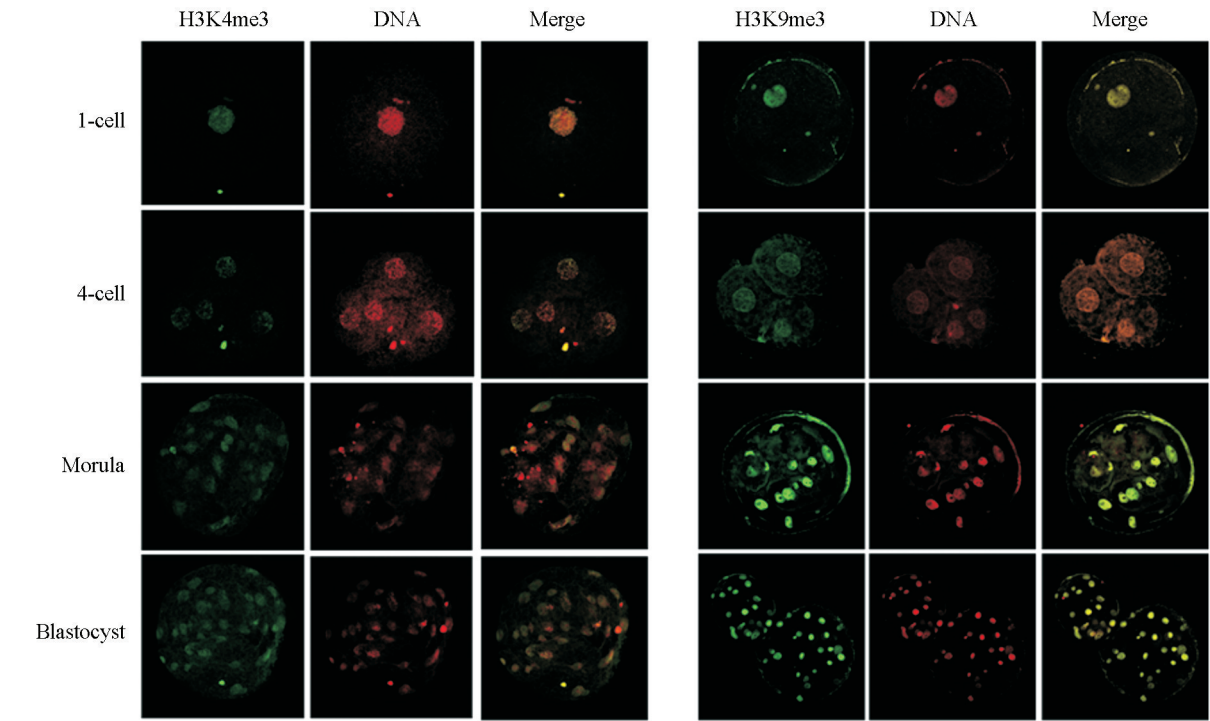


图 2 不同成熟阶段猪卵母细胞 H3K9 三甲基化分布



GV: 生发泡期; L-GV: 生发泡晚期; GVBD: 生发泡破裂; Pre-M I: 第一次减数分裂中期前阶段; M I: 第一次减数分裂中期; AT-I: 第一次减数分裂终末期; M II: 第二次减数分裂中期; 1-cell: 一细胞胚胎; 4-cell: 四细胞胚胎; Morula: 桑椹胚; Blastocyst: 囊胚.

图 3 不同发育阶段猪核移植胚胎 H3K4 和 H3K9 三甲基化分布

2.2 H3K4me3 和 H3K9me3 在猪卵母细胞和克隆胚胎中的表达模式

为了更好地分析 H3K4me3 和 H3K9me3 在猪卵母细胞和克隆胚胎中的表达模式,笔者对获得的细胞免疫荧光结果进行了相对荧光强度分析.结果显示(图 4),随着减数分裂和胚胎发育的进行, H3K4me3 的表达呈现出逐渐下降的趋势,并且在四细胞胚胎中表达最弱. H3K9me3 在 GV 至 GVBD 阶段卵母细胞中的表达呈现出上升的趋势,但是从 Pre-M I 阶段开始荧光信号消失,直到一细胞克隆胚胎中荧光信号重新出现并且持续表达至囊胚阶段.此外, H3K9me3 在卵母细胞中的相对荧光强度均低于 H3K4me3;而在不同时期克隆胚胎中的相对荧光强度均高于 H3K4me3.

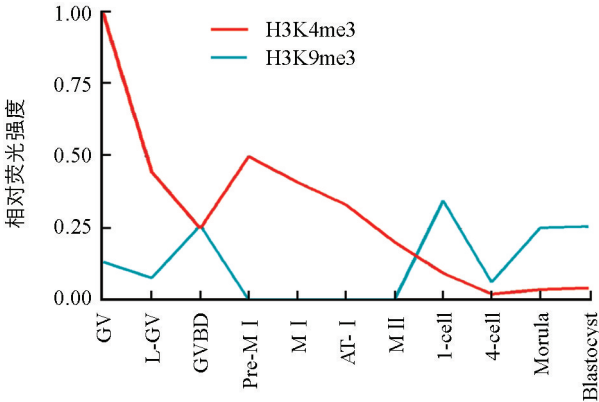


图 4 猪卵母细胞和核移植胚胎中 H3K4 和 H3K9 三甲基化相对荧光强度

3 讨 论

以往的研究者们已经对小鼠、猪、牛以及人类卵母细胞中组蛋白 H3 和 H4 中赖氨酸和精氨酸残基位点的甲基化进行了研究,结果发现这些甲基化位点都定位在哺乳动物卵母细胞染色体上. 在小鼠、猪和牛的 GV,Pre-MI 和 MII 阶段卵母细胞中均能发现 H3K4 和 H3K9 二甲基化的表达^[7-9],但鲜有研究 H3K4 和 H3K9 三甲基化在猪卵母细胞成熟过程的表达模式. 本研究结果发现,猪卵母细胞不同成熟时期, H3K 三甲基化均有表达,并且随着减数分裂进行,其呈现逐渐减弱的趋势,提示 H3K4 三甲基化调控的猪卵母细胞基因激活作用随着卵母细胞的成熟进程而不断减弱. H3K9 二甲基化在 Pre-MI 和 MII 阶段猪卵母细胞中表达^[8],本研究结果显示, H3K9 三甲基化只在 GV,L-GV 和 GVBD 卵母细胞中表达,这与牛卵母细胞的表达模式相近^[10],说明 H3K9 三甲基化可能并不直接参与猪卵母细胞 Pre-MI 及其随后成熟阶段的基因转录抑制调控.

组蛋白甲基化在供体核的重编程过程中起到重要的作用, 高水平表达的组蛋白乙酰化有助于提高体细胞克隆胚胎的发育效率^[11-12]. 近来的研究发现, 体细胞克隆胚胎早期发育过程中存在组蛋白甲基化重编程异常, 例如 H3K9 甲基化、H3K36 三甲基化以及 H3K4 三甲基化等修饰在不同的哺乳动物克隆胚胎中均存在异常表达^[13-15]. GAO 等人研究发现, H3K4me3 在体内发育的一细胞和四细胞猪胚胎中有较高表达, 随着胚胎发育, 其呈现出显著下降的趋势^[16]. 猪早期胚胎一至四细胞阶段是母源向合子效应阶段转变的重要时期, 此时合子基因组需要激活, 而 H3K4me3 能够激活合子基因表达. 本研究发现, 不同发育时期猪克隆胚胎中, H3K4me3 表达水平均较弱, 推测一细胞和四细胞猪克隆胚胎中 H3K4me3 的异常表达可能影响合子基因组的激活, 从而导致克隆胚胎发育效果降低. 克隆牛胚胎中 H3K9 的过高甲基化通常伴随过高的 DNA 甲基化, 且都高于正常胚胎中的表达水平^[17], 这提示 H3K9 甲基化在克隆胚胎中存在异常表达. 在小鼠的克隆胚胎中也发现, 早期分裂阶段中过多的 H3K9me3 积累不利于供体细胞核重编程, 通过干扰 H3K9me3 的表达水平, 可以提高克隆胚胎的发育效果^[15]. 本研究结果显示, H3K9me3 在一细胞、桑葚胚和囊胚阶段猪克隆胚胎中都存在较高的表达, 推测至少在猪的克隆胚胎中, 一细胞甚至更早阶段的胚胎发育阶段中存在过多 H3K9me3 积累, 这可能是造成猪克隆胚胎发育效率低下的原因之一. 该结果提示我们可以通过修正 H3K4me3 和 H3K9me3 表达水平来提高猪卵母细胞体外成熟效果和克隆效率. H3K4me3 参与调控猪卵母细胞体外成熟发育整个过程, H3K4me3 和 H3K9me3 与猪体细胞核移植胚胎体外发育有关, 它们可能在体外成熟猪卵母细胞和体细胞克隆胚胎发育中表达异常.

参考文献:

- [1] LACHNER M, JENUWEIN T. The Many Faces of Histone Lysine Methylation [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002, 14(3): 286—298.
- [2] JACOBS S A, KHORASANIZADEH S. Structure of HP1 Chromodomain Bound to a Lysine 9-Methylated Histone H3 Tail [J]. *Science*, 2002, 295(5562): 2080—2083.
- [3] KAGEYAMA S, LIU H, KANEKO N, et al. Alterations in Epigenetic Modifications During Oocyte Growth in Mice [J]. *Reproduction*, 2007, 133(1): 85—94.
- [4] MURATA K, KOUZARIDES T, BANNISTER A J, et al. Histone H3 Lysine 4 Methylation is Associated with the Transcriptional Reprogramming Efficiency of Somatic Nuclei by Oocytes [J]. *Epigenetics & Chromatin*, 2010, 3(1): 4.
- [5] ANTONY J, OBACK F, CHAMLEY L W, et al. Transient JMJD2B-Mediated Reduction of H3K9me3 Levels Improves Reprogramming of Embryonic Stem Cells into Cloned Embryos [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2013, 33(5): 974—983.
- [6] LAI L, PRATHER R S. Production of Cloned Pigs by Using Somatic Cells as Donors [J]. *Cloning & Stem Cells*, 2003, 5(4): 233—241.
- [7] OOGA M, INOUE A, KAGEYAMA S, et al. Changes in H3K79 Methylation During Preimplantation Development in Mice [J]. *Biology of Reproduction*, 2013, 78(3): 413—424.
- [8] PARK K E, MAGNANI L, CABOT R A. Differential Remodeling of Mono-and Trimethylated H3K27 During Porcine Embryo Development [J]. *Molecular Reproduction & Development*, 2009, 76(11): 1033—1042.
- [9] RACEDO S E, WRENZYCKI C, LEPIKHOV K, et al. Epigenetic Modifications and Related mRNA Expression During Bovine Oocyte in Vitro Maturation [J]. *Reproduction Fertility & Development*, 2009, 21(6): 738—748.
- [10] ZHANG S, WANG F, FAN C, et al. Dynamic Changes of Histone H3 Lysine 9 Following Trimethylation in Bovine Oocytes and Pre-Implantation Embryos [J]. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(3): 395—402.
- [11] MALLOL A, SANTALÓ J, JBÁÑEZ E. Improved Development of Somatic Cell Cloned Mouse Embryos by Vitamin C and Latrunculin A [J]. *Plos One*, 2015, 10(3): e0120033.
- [12] SONG Y, HAI T, WANG Y, et al. Epigenetic Reprogramming, Gene Expression and in Vitro Development of Porcine SCNT Embryos Are Significantly Improved by a Histone Deacetylase Inhibitor—m-Carboxycinnamic Acid Bishydroxamide (CBHA) [J]. *Protein & Cell*, 2014, 5(5): 382—393.
- [13] HUANG J, ZHANG H, WANG X, et al. Impairment of Preimplantation Porcine Embryo Development by Histone Demethylase KDM5B Knockdown Through Disturbance of Bivalent H3K4me3-H3K27me3 Modifications1 [J]. *Biology of*

Reproduction, 2015, 92(3): 72.

- [14] DIAO Y F, OQANI R K, LI X X, et al. Changes in Histone H3 Lysine 36 Methylation in Porcine Oocytes and Preimplantation Embryos [J]. Plos One, 2014, 9(6): e100205.
- [15] MATOBA S, LIU Y, LU F, et al. Embryonic Development Following Somatic Cell Nuclear Transfer Impeded by Persisting Histone Methylation [J]. Cell, 2014, 159(4): 884—895.
- [16] GAO Y, HYTTEL P, HALL V J. Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 During Early Porcine Embryonic Development [J]. Molecular Reproduction & Development, 2010, 77(6): 540—549.
- [17] SANTOS F, ZAKHARTCHENKO V, STOJKOVIC M, et al. Epigenetic Marking Correlates with Developmental Potential in Cloned Bovine Preimplantation Embryos [J]. Current Biology, 2003, 13(13): 1116—1121.

Expression of Histone H3K4 and H3K9 Trimethylation in Porcine in vitro maturation Oocytes and Somatic Nuclear Transfer Embryos

SHEN Kai-yuan^{1,2}, DAI Xiao-li^{1,2}, YANG Ting¹,
SHE Chun¹, SHI De-shun¹, LI Xiang-ping¹

1. State Key Laboratory of Subtropical Agricultural Biological Resource Protection and Utilization in Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Liuzhou People's Hospital, Liuzhou Guangxi 545006, China

Abstract: This study was designed to observe the expression of histone H3K4 and H3K9 trimethylation in porcine in vitro maturation oocytes and somatic nuclear transfer (SCNT) embryos by single cell immunofluorescence. Porcine oocytes at different maturation stages (0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 30 h, 36 h, 42 h) and the SCNT embryos at 1-cell, 4-cell, morula, blastocyst periods were collected for immunostaining. The expression pattern of histone H3K4 and H3K9 trimethylation was analyzed by laser confocal microscopy. The results showed that there was significant H3K4me3 signal in oocytes of all in vitro maturation stages, decreased from GV to M II stages. The H3K9me3 signal was detected in oocytes at the GV, L-GV and GVBD periods, but it was disappeared after meiosis. Both of the H3K4me3 and H3K9 me3 expressed in SCNT embryos at 1-cell, 4-cell, morula and blastocyst stages, but there was only some weak H3K4me3 signal in embryos of different stages. The expression of H3K9me3 was decreased in 4-cell embryos, but increased in morula and blastocyst. Altogether, our study revealed that H3K4me3 participated in the regulation of porcine oocyte in vitro maturation. Both of H3K4me3 and H3K9me3 were contributed to regulate the development of porcine SCNT embryos.

Key words: H3K4 trimethylation; H3K9 trimethylation; porcine; oocyte; somatic cell nuclear transfer embryo

责任编辑 夏娟

