

H3K4me3 对猪卵母细胞体外成熟和早期胚胎发育的影响

曾毅仁, 张彩玉, 侯晗琦, 恽雪丹, 李湘萍

亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西大学, 南宁 530004

摘要: 哺乳动物卵母细胞的成熟与组蛋白甲基化修饰密切相关. CPI-455 是一种组蛋白去甲基化酶抑制剂, 可特异性抑制组蛋白去甲基转移酶 KDM5A/B 的活性, 提高 H3K4me3(组蛋白 H3 第 4 位赖氨酸三甲基化)的表达水平. 本实验在猪卵母细胞体外成熟过程中添加 CPI-455, 探究 H3K4me3 组蛋白甲基化对猪卵母细胞体外成熟和早期胚胎发育的影响. 首先, 用不同浓度 CPI-455 在不同时间处理猪卵母细胞, 发现在 0~22 h 添加 5 μmol CPI-455 的处理方法效果最佳, 卵母细胞成熟率与囊胚形成率均显著高于未处理组($p < 0.05$). 0~22 h 添加 5 μmol CPI-455 处理卵母细胞显著提高了囊胚中 H3K4me3 的表达($p < 0.05$), 降低了卵母细胞中 KDM5A 和 KDM5B 的表达($p < 0.05$), 并且显著提高了囊胚中 *Nanog*, *Oct4*, *CDX2* 等多能性基因的表达($p < 0.05$). CPI-455 处理可以通过降低卵母细胞中相关基因的表达, 上调囊胚中多能性基因的表达, 调控 H3K4me3 的甲基化水平, 从而促进猪卵母细胞体外成熟和早期胚胎发育.

关键词: 猪; 卵母细胞; CPI-455; H3K4me3; 体外成熟

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)07-0045-07

哺乳动物卵母细胞发育过程中经历了大量的表观遗传修饰. 其中, 组蛋白修饰确保了卵子发生过程中基因的正确表达, 平衡了合子基因组的转录激活. H3K4me3 精确地调控了卵子发生的起始, 动态地控制着早期胚胎的发育. 组蛋白 H3K4me3 对调控基因活化和发育功能有重要作用, 在胚胎干细胞中调控重要的多能性相关基因的表达.

我们的前期研究^[1]表明, H3K4me3 在猪卵母细胞成熟过程中均有表达, 说明 H3K4me3 在猪卵母细胞成熟阶段起到了重要的调控作用. 通过敲除 *Cxxc1* 基因降低 H3K4me3 的表达, 不利于组蛋白变体的交换, 降低了基因组的可接近性和卵母细胞中整体的转录活性^[2]. 敲除卵母细胞中编码 H3K4 甲基化酶或去甲基化酶的基因, 会导致减数分裂进程受损, 包括生发泡破裂延迟, 纺锤体组装和染色体分离错误, 极体排出率降低. 很多研究都表明环境的改变会影响表观遗传修饰. Wu 等^[3]研究表明, 小鼠 IVF(体外受精)早期胚胎中 H3K4me3 的表达模式与体内受精胚胎的十分相似, 但体内受精胚胎中 H3K4me3 的表达显著高于 IVF 胚胎, 采用 TSA(曲古抑菌素 A)处理之后, IVF 胚胎中的 H3K4me3 表达显著上调, 说明培养条件和环境不同会改变组蛋白修饰. 因此, 猪卵母细胞体外成熟效率和质量低于体内, 可能是由于表观遗传

收稿日期: 2020-10-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060754, 31560632); 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA238039).

作者简介: 曾毅仁, 硕士研究生, 主要从事动物胚胎工程研究.

通信作者: 李湘萍, 研究员, 博士研究生导师.

修饰的改变所致。Sha 等^[4]研究表明, SN(环绕核仁)染色质构型的卵母细胞比 NSN(非环绕核仁)构型的卵母细胞具有更好的发育潜能, H3K4me3 表达水平在 SN 染色质构型的卵母细胞中高于 NSN 构型^[4]。因此, 适当提高 H3K4me3 的表达有利于卵母细胞的体外成熟和早期胚胎的发育。

本试验通过在猪卵母细胞体外成熟培养液中添加 CPI-455, 调控卵母细胞组蛋白甲基化及其相关基因的表达, 以探讨组蛋白 H3K4me3 在卵母细胞体外成熟及胚胎发育过程中的重要作用。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用卵巢均来源于广西南宁本地屠宰场。试验所用胚胎为孤雌胚胎。

1.2 试验方法

1.2.1 猪 GV(生发泡)期卵母细胞的获取与体外成熟

用预热好的生理盐水将卵巢清洗干净后, 用 10 mL 注射器抽取 3~8 mm 的卵泡液, 静置 15 min 后, 在显微镜下挑选 3 层以上卵丘细胞的卵丘-卵母细胞复合体。将 COCs(卵丘-卵母细胞复合体)清洗干净后, 移入成熟培养液中培养。0~22 h 将卵母细胞放入含有激素的培养液中培养, (22~44] h 将卵母细胞移入另一个不含激素的培养液中继续培养。试验组添加不同浓度的 CPI-455 处理。

1.2.2 猪卵母细胞的孤雌激活

试验前将融合仪的参数设置为 80 μ s, 50 V/mm 和 3 次脉冲, 并在培养箱中平衡电激活液和胚胎培养液。清洗融合槽, 将卵母细胞在激活液中清洗 3 遍后在激活槽中进行电激活。激活过的卵母细胞移入平衡好的胚胎培养液中, 放入培养箱平衡 15 min, 然后移入覆盖有矿物油的胚胎培养液微滴中培养。24 h 统计胚胎分裂率, 48 h 统计 4-细胞率, 7 d 统计囊胚率。

1.2.3 囊胚细胞总数的鉴定

将囊胚细胞放入 4% 的多聚甲醛中固定 12 h, 然后移入 10 μ g/mL Hoechst33342 染色液中, 避光室温染色 10 min。用 PBS(磷酸缓冲盐溶液)将囊胚细胞清洗干净后, 移入载玻片的抗淬灭剂中, 用凡士林封片, 在荧光显微镜下进行观察并做好试验记录。

1.2.4 细胞免疫荧光

收集不同时期的卵母细胞和孤雌囊胚, 用 4% 多聚甲醛固定后在室温下用 1% Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)透化 30 min, 之后用 1% BSA(牛血清蛋白)进行非特异性位点封闭 1~2 h, 封闭后用 T-BSA-PBS(吐温 20-BSA-PBS)洗 3 次, 之后放入 H3K4me3 的一抗中 4 $^{\circ}$ C 12 h。然后将样品放入培养箱孵育 30 min, 再用 T-BSA-PBS 清洗 3 遍, 放入装有二抗的 EP(Eppendorf)管中, 避光孵育 1.5 h, 然后用清洗液清洗 3 遍, 最后用 10 μ g/mL Hoechst33342 复染 10 min, 放入滴有抗淬灭剂的玻片上, 凡士林封片镜检。

1.2.5 样品的微量反转录和 qRT-PCR(实时荧光定量聚合酶链式反应)检测

收集不同时期的猪卵母细胞和孤雌囊胚, 清洗干净后移入装有细胞裂解液的 EP 管中并于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。微量反转录按照试剂盒说明书进行操作, 反转录得到的样品存放于 -20 $^{\circ}$ C 备用。将反转录得到的产物作为模板, 进行 qRT-PCR 检测, 观察不同处理组基因的表达情况(表 1)。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 进行 5 min, 95 $^{\circ}$ C 进行 30 s, 60 $^{\circ}$ C 进行 1 min, 共 40 个循环。猪的 18S 作为内参基因, 目的基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算, 引物设计和试验方法参考文献[1]和文献[5]。

1.3 统计与分析

本试验结果均使用 SPSS 22.0 软件进行分析, 早期胚胎发育率先通过反正弦变化后再进行分析。每个试验重复至少 3 次, 每次重复试验中至少随机挑选 10 个以上卵母细胞进行试验。 $p < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $p > 0.05$ 表示差异不具有统计学意义。

表 1 qRT-PCR 反应引物序列

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp	序列号
KDM5A	F: GAAGAGGAGACACGCTTA	158	XM_005664094.1
	R: CGCTCAGGATTACAGGAA		
KDM5B	F: GCAGCATCAAGCAAGAAG	196	XM_005668019.1
	R: ATCAGGCAGAAGGTATGG		
Nanog	F: TCCTCTTCCTTCCTCCAT	108	NM_001129971.1
	R: TCCTTCTCTGTGCTCTTC		
Oct4	F: TCAGCCAAACGACCATCT	96	NM_001113060
	R: CTTCTCCACCCACTTCT		
CDX2	F: CTGTCTGCTCACTGTTCT	193	XM_003483674.3
	R: GGTCCAGGTTTCCATCTT		
18S	F: GATGGGCGGCGGAAAATTG	79	NM_022551.3
	R: TCCTCAACACCACATGAGCA		

2 试验结果

2.1 0~22 h CPI-455 处理对猪卵母细胞体外成熟及早期胚胎发育的影响

如表 2 所示,在猪卵母细胞体外成熟 0~22 h 过程中添加不同浓度的 CPI-455 处理,发现 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的第一极体排出率显著高于未处理组、1 $\mu\text{mol/L}$ 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 组(88.80% vs 78.88%,79.23%,78.91%, $p<0.05$). 各组之间的胚胎分裂率、4-细胞率均无显著差异($p>0.05$). 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的囊胚率显著高于未处理组(41.44% vs 28.35%, $p<0.05$),与 1 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 组之间差异不具有统计学意义($p>0.05$). 各组之间囊胚细胞总数差异不具有统计学意义($p>0.05$).

表 2 体外成熟 0~22 h 过程中添加 CPI-455 对猪卵母细胞体外成熟和胚胎发育的影响

处理组	卵子数	第一极体排出率/%	胚胎分裂率/%	4-细胞率/%	囊胚率/%	囊胚细胞数/个
0 $\mu\text{mol/L}$	161	127(78.88 $\pm$ 2.30) ^a	97(76.38 $\pm$ 2.48) ^a	92(72.44 $\pm$ 1.58) ^a	36(28.35 $\pm$ 2.32) ^a	42.28 ^a $\pm$ 1.49
1 $\mu\text{mol/L}$	130	103(79.23 $\pm$ 3.22) ^a	77(74.75 $\pm$ 3.78) ^a	75(72.81 $\pm$ 3.68) ^a	33(32.04 $\pm$ 4.18) ^{ab}	45.30 ^a $\pm$ 2.03
5 $\mu\text{mol/L}$	125	111(88.80 $\pm$ 2.08) ^b	90(81.08 $\pm$ 4.42) ^a	82(73.87 $\pm$ 2.89) ^a	46(41.44 $\pm$ 3.58) ^b	40.33 ^a $\pm$ 3.00
10 $\mu\text{mol/L}$	128	101(78.91 $\pm$ 1.81) ^a	71(70.30 $\pm$ 5.88) ^a	68(67.33 $\pm$ 4.00) ^a	27(26.73 $\pm$ 3.11) ^{ab}	40.52 ^a $\pm$ 2.85

注:上标不同字母表示差异具有统计学意义($p<0.05$);括号中数字为平均值+标准误;试验重复数 $n=4$.

2.2 (22~44] h 与 0~44 h 采用 CPI-455 处理对猪卵母细胞体外成熟和早期胚胎发育的影响

如表 3 所示,在猪卵母细胞体外成熟(22~44] h 过程中添加不同浓度的 CPI-455 处理,发现各组之间第一极体排出率、4-细胞率和囊胚细胞总数差异不具有统计学意义($p>0.05$). 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的胚胎分裂率显著低于未处理组和 1 $\mu\text{mol/L}$ 处理组(74.51% vs 84.62%,85.87%, $p<0.05$). 如表 4 所示,猪卵母细胞体外成熟 0~44 h 添加不同浓度的 CPI-455 处理时,发现各组之间的第一极体排出率、胚胎分裂率、4-细胞率、囊胚率和囊胚细胞数差异均不具有统计学意义($p>0.05$).

基于以上结果,后续试验均采用体外成熟 0~22 h 添加 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理的方法.

表 3 体外成熟(22~44] h 中添加 CPI-455 对猪卵母细胞体外成熟和胚胎发育的影响

处理组	卵子数	第一极体排出率/%	胚胎分裂率/%	4-细胞率/%	囊胚率/%	囊胚细胞数/个
0 $\mu\text{mol/L}$	160	117(73.13 $\pm$ 2.04) ^a	99(84.62 $\pm$ 0.50) ^a	98(83.76 $\pm$ 1.79) ^a	43(36.75 $\pm$ 3.02) ^a	43.20 ^a $\pm$ 2.23
1 $\mu\text{mol/L}$	127	92(72.44 $\pm$ 3.48) ^a	79(85.87 $\pm$ 2.94) ^a	77(83.70 $\pm$ 3.86) ^a	40(43.48 $\pm$ 6.09) ^a	41.14 ^a $\pm$ 3.10
5 $\mu\text{mol/L}$	129	102(79.07 $\pm$ 4.62) ^a	76(74.51 $\pm$ 2.82) ^b	80(78.43 $\pm$ 0.97) ^a	35(34.31 $\pm$ 5.34) ^a	40.93 ^a $\pm$ 1.48
10 $\mu\text{mol/L}$	128	97(75.78 $\pm$ 2.30) ^a	76(78.35 $\pm$ 3.52) ^{ab}	81(83.51 $\pm$ 2.51) ^a	29(29.90 $\pm$ 6.70) ^a	39.72 ^a $\pm$ 2.66

注:上标不同字母表示差异具有统计学意义($p<0.05$);括号中数字为平均值+标准误;试验重复数 $n=4$.

表 4 体外成熟 0~44 h 中添加 CPI-455 对猪卵母细胞体外成熟和胚胎发育的影响

处理组	卵子数	第一极体排出率/%	胚胎分裂率/%	4-细胞率/%	囊胚率/%	囊胚细胞数/个
0 $\mu\text{mol/L}$	129	97(75.19 $\pm$ 3.77) ^a	76(78.35 $\pm$ 1.36) ^a	77(79.38 $\pm$ 0.73) ^a	34(35.05 $\pm$ 0.80) ^a	41.25 ^a $\pm$ 1.78
1 $\mu\text{mol/L}$	94	71(75.53 $\pm$ 5.73) ^a	54(76.06 $\pm$ 5.50) ^a	53(74.65 $\pm$ 4.87) ^a	24(33.80 $\pm$ 3.87) ^a	40.16 ^a $\pm$ 0.89
5 $\mu\text{mol/L}$	127	92(72.44 $\pm$ 4.81) ^a	74(80.43 $\pm$ 3.86) ^a	78(84.78 $\pm$ 5.91) ^a	33(35.87 $\pm$ 4.11) ^a	38.60 ^a $\pm$ 2.73
10 $\mu\text{mol/L}$	93	70(75.27 $\pm$ 3.38) ^a	55(78.57 $\pm$ 0.30) ^a	52(74.29 $\pm$ 2.54) ^a	23(32.86 $\pm$ 5.55) ^a	40.53 ^a $\pm$ 1.54

注：上标不同字母表示差异具有统计学意义($p<0.05$)；括号中数字为平均值+标准误；试验重复数 $n=3$ 。

2.3 CPI-455 处理对猪卵母细胞和早期胚胎中组蛋白 H3K4me3 表达的影响

采用免疫荧光技术检测未处理组和 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的 GV 期、22 h 和 MII 期(成熟)卵母细胞及囊胚中 H3K4me3 的表达情况。如图 1、图 2 所示，GV 期卵母细胞中 H3K4me3 有表达，两组中 22 h 和 MII 期卵母细胞中未检测到 H3K4me3 表达信号。与未处理组相比，5 $\mu\text{mol/L}$ CPI-455 处理组的囊胚中 H3K4me3 表达显著提高($p<0.05$)。

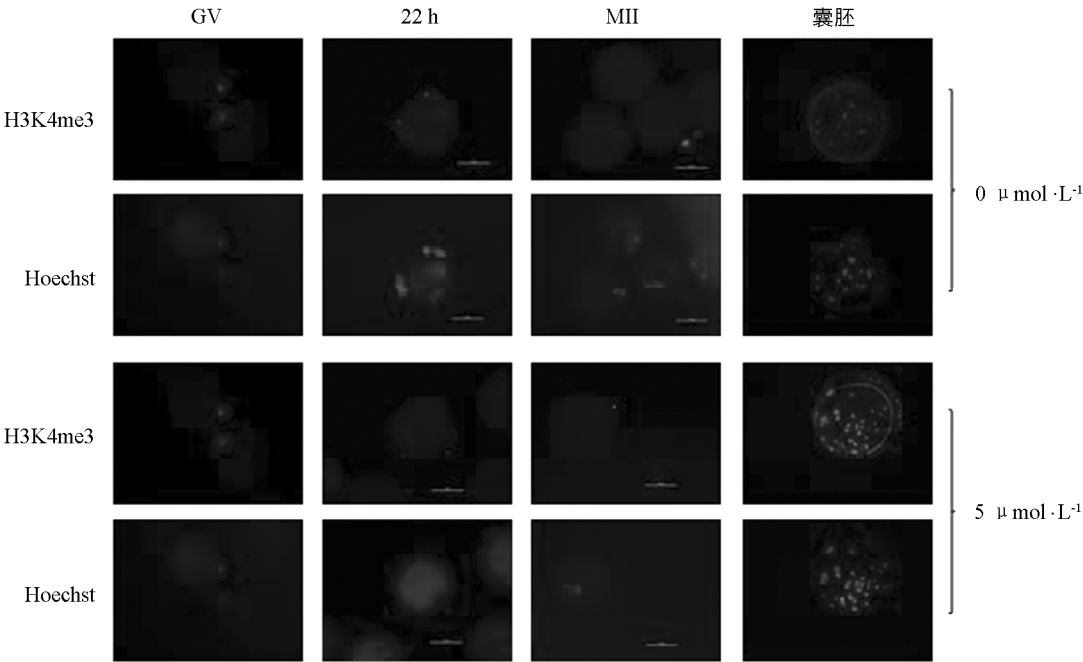
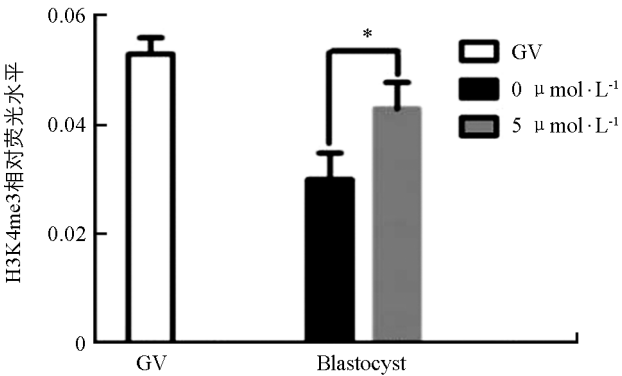


图 1 CPI-455 处理对不同时期猪卵母细胞和囊胚中 H3K4me3 表达的影响

2.4 CPI-455 处理对猪卵母细胞和早期胚胎中重要基因表达的影响

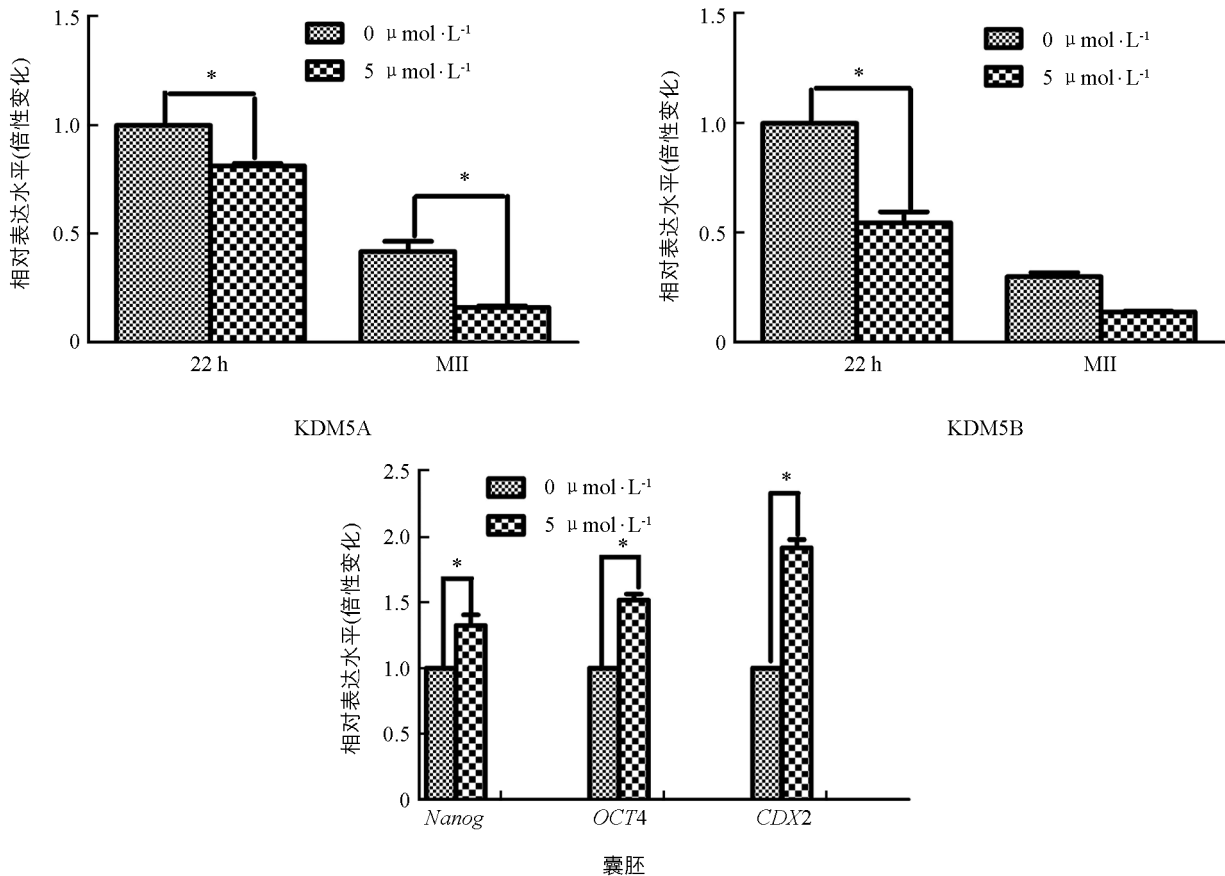
采用 qRT-PCR 方法，检测 CPI-455 处理对猪卵母细胞和早期胚胎中相关基因表达的影响，结果如图 3 所示。与未处理组相比，5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的 22 h 卵母细胞中 KDM5A 和 KDM5B 的表达均显著降低($p<0.05$)；5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的 MII 期卵母细胞中 KDM5A 的表达显著降低($p<0.05$)，KDM5B 的表达差异不具有统计学意义($p>0.05$)；5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组囊胚中多能性基因 *Nanog*、*Oct4*、*CDX2* 的表达均显著提高($p<0.05$)。



在相同时期各组之间 * 表示差异具有统计学意义($p<0.05$)。

试验重复数 $n=3$ 。

图 2 GV 期卵母细胞和囊胚中 H3K4me3 的相对荧光水平



在相同时期各组之间 * 表示差异具有统计学意义. 试验重复数 $n=3$.

图 3 CPI-455 处理对猪卵母细胞和囊胚中重要基因表达的影响

3 讨论与分析

组蛋白修饰是最重要的表观遗传修饰之一, 在早期胚胎发育中发挥重要作用^[6-7]. 组蛋白修饰主要包括乙酰化、甲基化、磷酸化、泛素化等, 其中组蛋白甲基化在基因表达调控和卵母细胞生长中起重要作用^[8]. 组蛋白甲基化受组蛋白甲基化酶和去甲基化酶共同调节, 研究表明小鼠卵母细胞中 MLL2(H3K4 甲基转移酶)的缺乏会直接导致排卵停止和卵母细胞死亡; 在 MLL2 不足的卵母细胞中, H3K4me2/3 的表达降低, 导致非正常卵母细胞成熟和异常的基因表达, 表明了 H3K4me2/3 水平对小鼠卵母细胞成熟的重要性^[9]. 在小鼠和人类干细胞中, 大多数 H3K4me3 对基因表达的调节是维持基本生物学活性和干细胞多能性的关键因素^[10]. H3K4me3 在囊胚中存在大量表达, 说明 H3K4me3 对胚胎发育和囊胚形成具有重要的调控作用. 尚明保^[11]的研究表明, 小鼠体内受精胚胎从受精卵到囊胚期的 H3K4me3 表达水平均高于其在体外受精各期胚胎的表达. 众多研究结果都表明, H3K4me3 对卵母细胞成熟和早期胚胎发育具有重要的调控作用.

在人卵母细胞中 H3K4me3 呈现出动态表达, 从 GV 期到 MII 期呈现出逐渐降低的趋势, 合子期到 4-细胞期表达升高, 8-细胞期表达最低, 囊胚期急剧上升^[12]. 在猪胚胎中, H3K4me3 表达水平从受精卵时期开始下降, 到桑椹胚期至最低水平, 随后在囊胚中表达上升^[13]. 我们的研究也表明 H3K4me3 在猪卵母细胞和早期胚胎中呈现出动态表达, 但本次试验在猪卵母细胞成熟 22 h 和 MII 期并未检测到 H3K4me3 的表达, 与沈开元^[1]对猪卵母细胞的研究结果不同, 究其原因可能是由于成熟培养液成分不同, 从而影响了

H3K4me3 的表达模式.

CPI-455 是一种组蛋白去甲基化酶抑制剂,可特异性抑制 KDM5A/B 的活性,从而提高 H3K4me3 的整体表达水平. 本试验在卵母细胞成熟过程中添加 CPI-455,抑制了卵母细胞中组蛋白去甲基化酶 KDM5A 和 KDM5B 的表达,提高了囊胚中 H3K4me3 以及相关多能性基因的表达,从而提高了猪卵母细胞体外成熟率和囊胚形成率. 以往的研究也表明,在果蝇卵母细胞中,组蛋白甲基化酶 KDM5 可调控卵母细胞减数第一次分裂时期中的染色质结构,KDM5 缺失会引起 H3K4me3 表达增加^[14]. 通过表达一个显性失活的组蛋白 H3 突变体抑制 H3K4 甲基转移酶的活性,会使合子基因组激活失败,损害胚胎的发育^[15],这表明动态的组蛋白甲基化修饰 H3K4me3 对卵母细胞减数分裂和早期胚胎发育至关重要.

参考文献:

- [1] 沈开元. MG132 对猪卵母细胞体外成熟及德保黑猪核移植胚胎发育的影响初步研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2016.
- [2] YU C, FAN X Y, SHA Q Q, et al. CFP1 Regulates Histone H3K4 Trimethylation and Developmental Potential in Mouse Oocytes [J]. *Cell Reports*, 2017, 20(5): 1161-1172.
- [3] WU F R, LIU Y, SHANG M B, et al. Differences in H3K4 Trimethylation in in Vivo and in Vitro Fertilization Mouse Preimplantation Embryos [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2012, 11(2): 1099-1108.
- [4] SHA Q Q, DAI X X, JIANG J C, et al. CFP1 Coordinates Histone H3 Lysine-4 Trimethylation and Meiotic Cell Cycle Progression in Mouse Oocytes [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3477-3493.
- [5] 李海艳. 毛壳素对德保黑猪核移植胚胎体外发育潜能影响的初步研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2017.
- [6] GOPALAKRISHNAN S, VAN EMBURGH B O, ROBERTSON K D. DNA Methylation in Development and Human Disease [J]. *Mutat Res*, 2008, 647(1/2): 30-38.
- [7] SANTOS F, PETERS A H, OTTE A P, et al. Dynamic Chromatin Modifications Characterise the First Cell Cycle in Mouse Embryos [J]. *Developmental Biology*, 2005, 280(1): 225-236.
- [8] QIAO J, CHEN Y, YAN L Y, et al. Changes in Histone Methylation during Human Oocyte Maturation and IVF- or ICSI-Derived Embryo Development [J]. *Fertility and Sterility*, 2010, 93(5): 1628-1636.
- [9] ANDREU-VIEYRA C V, CHEN R H, AGNO J E, et al. MLL2 is Required in Oocytes for Bulk Histone 3 Lysine 4 Trimethylation and Transcriptional Silencing [J]. *PLoS Biology*, 2010, 8(8): e1000453.
- [10] PAN G J, TIAN S L, NIE J, et al. Whole-Genome Analysis of Histone H3 Lysine 4 and Lysine 27 Methylation in Human Embryonic Stem Cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3): 299-312.
- [11] 尚明保. 小鼠植入前胚胎 H3K4 三甲基化模式比较及甲基化酶启动子分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- [12] ZHANG A, XU B, SUN Y, et al. Dynamic Changes of Histone H3 Trimethylated at Positions K4 and K27 in Human Oocytes and Preimplantation Embryos [J]. *Fertility and Sterility*, 2012, 98(4): 1009-1016.
- [13] GAO Y, HYTTTEL P, HALL V J. Regulation of H3K27me3 and H3K4me3 during Early Porcine Embryonic Development [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2010, 77(6): 540-549.
- [14] ZHAUNOVA L, OHKURA H, BREUER MZHAUNOVA L, et al. Kdm5/Lid Regulates Chromosome Architecture in Meiotic Prophase I Independently of Its Histone Demethylase Activity [J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(8): e1006241.
- [15] AOSHIMA K, INOUE E, SAWA H, et al. Paternal H3K4 Methylation is Required for Minor Zygotic Gene Activation and Early Mouse Embryonic Development [J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(7): 803-812.

Effects of H3K4me3 on *in vitro* Maturation of Porcine Oocytes and Early Embryo Development

ZENG Yi-ren, ZHANG Cai-yu, HOU Han-qi,
YUN Xue-dan, LI Xiang-ping

State Key Laboratory of Agro-biological Resources Protection and Utilization in
Subtropical Region, Guangxi University, Nanning 530004, China

Abstract: The maturation of oocytes is closely related to histone methylation modification in mammalian species. CPI-455 is a histone demethylase inhibitor, which can specifically inhibit the activity of histone demethyltransferase KDM5A/B and improve the expression level of H3K4me3. In this study, CPI-455 was added into the *in vitro* maturation medium of porcine to investigate the effect of H3K4me3 histone methylation on *in vitro* maturation and early embryonic development of porcine oocytes. First of all, oocytes were treated with CPI-455 based on different concentrations in different times. It was found that 5 μ mol CPI-455 added in 0-22 h *in vitro* maturation significantly increased oocyte maturation rate and subsequent embryo formation rate ($p < 0.05$). Therefore, this treatment method was adopted in subsequent experiments. The results showed that the expression level of H3K4me3, KDM5A and KDM5B in oocytes were significantly increased ($p < 0.05$), the expressions of pluripotent genes, such as *Nanog*, *Oct4* and *CDX2*, in blastocysts were significantly increased in oocytes treated with CPI-455 ($p < 0.05$). In conclusion, CPI-455 treatment can reduce the expression of related genes in porcine oocytes, up-regulate the expression of pluripotent genes in the blastocysts, and regulate the methylation level of H3K4me3, so as to promote *in vitro* maturation and early embryonic development of porcine oocytes.

Key words: pig; oocyte; CPI - 455; H3K4me3; *in vitro* maturation

责任编辑 夏 娟