

# 基因组印记重组与胚胎发育

陈琦, 张立岭<sup>1,2\*</sup>, 赵静, 马月辉, 张剑平<sup>1</sup> (1. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 内蒙古呼和浩特 010018; 2. 海南大学农学院, 海南海口 570228; 3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094; 4. 包头医学院, 内蒙古包头 014010)

摘要 介绍了基因组印记重组对动物胚胎发育的影响。

关键词 基因组印记; 胚胎发育; DNA 甲基转移酶

中图分类号 S813.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)07-03003-03

## Genomic Imprinting Reconfiguration and Embryonic Development

CHEN Q et al (College of Animal Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010018)

Abstract The effects of genomic imprinting reconfiguration on the embryonic development of animals were introduced.

Key words Genomic imprinting; Embryonic development; DNA methyltransferase

基因组印记(Genomic Imprinting) 使一个基因的2个亲本拷贝只有一个被表达, 是一种不遵循孟德尔遗传规律的亲本等位基因差异表达现象, 即DNA甲基化修饰通过启动子附近的差异甲基化区域控制等位基因的不对称表达, 不对称表达的基因称为印记基因。配子发生和早期胚胎形成过程中, 基因组印记经历了擦除和重建, 并在此后的生命过程中维持印记, 其中任何一个环节出现错误都可能导致胚胎发育缺陷, 甚至死亡。笔者就胚胎发育过程中基因印记的动态变化及其意义进行综述, 着重描述配子细胞和胚胎发育各个关键时期印记基因的各种性质, 配子细胞中印记是如何和何时形成(及何时擦掉)以及植入发育前期印记是如何保持的。

### 1 基因印记的主要执行者——DNA 甲基转移酶

基因印记的建立和维持依赖于DNA甲基转移酶(DNA Methyltransferase, DNMT)的参与, DNMT的缺失或功能异常导致的印记异常会严重阻碍正常的胚胎发育。哺乳动物的DNMT家族主要成员有: Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b和Dnmt3L等。Dnmt1、Dnmt3a和Dnmt3b能够催化甲基到CpG二核苷酸的胞5位上; Dnmt3L不具有催化活性, 但可协同Dnmt3a和Dnmt3b发挥作用, 也是印记建立的必需因子。DNMT家族的不同成员在不同的发育阶段有不同的表达谱, 分别在甲基化的维持和建立过程中发挥重要作用。

Dnmt1是哺乳动物最主要的甲基转移酶, 表达于复制状态的增殖细胞, 能够优先催化复制后半甲基化的DNA双链, 使低甲基化的子链完全甲基化, 在甲基化的维持中具有重要作用。因转录过程中第一个内含子的选择性不同, Dnmt1的转录物有3种亚型, Dnmt1s、Dnmt1o、Dnmt1p。Dnmt1o表达于卵母细胞和植入前的胚胎细胞, 直至胚泡期被其他亚型所取代。研究发现干预Dnmt1o的表达对胚胎印记的影响远远大于卵母细胞印记。母鼠卵母细胞Dnmt1o的启动子和第一个外显子敲除后, 卵母细胞印记不受影响, 后代于妊娠晚期死亡。死亡胚胎的基因印记出现错误, H19、Snrpn呈异常双等位基因表达。同样, 胚胎死亡也可以来自于Dnmt1基因过度表达引起的基因组DNA超甲基化和印记丢失。最近有学者

以基因芯片大范围研究发现, 体外培养的小鼠胚胎与自然状态没有明显的基因表达差别, 但其中Dnmt1的表达有增加现象, 其原因和对胚胎发育可能的远期影响还有待进一步研究。

Dnmt3a、Dnmt3b作用于未甲基化的DNA双链, 两者在催化功能上相互补充, Dnmt3a优先使核小体之外裸露部分的DNA甲基化, 而Dnmt3b使核心区甲基化。胚胎发育过程中两者的表达部位也有所不同, Dnmt3a在胚胎外胚层中度表达、中胚层弱表达(7.5 d胚胎), 而Dnmt3b高表达于胚胎的外胚层、神经外胚层和滋养层。Dnmt3a<sup>-/-</sup>小鼠出生时无明显异常, 之后发育迟缓、体型矮小, 于4周龄死亡。Dnmt3b<sup>-/-</sup>小鼠宫内死亡, 伴有多种孕晚期发育缺陷。Dnmt3a、Dnmt3b同时缺失的胚胎没有体节, 发育和表型停滞于原肠胚后期。

Dnmt3L(DNA Methyltransferase3-like Protein)在PHD锌指区域与Dnmt3a和Dnmt3b有同源性, 但缺乏高度保守的转移酶基序, 因此没有催化活性, 但Dnmt3L可以直接刺激Dnmt3a和Dnmt3b的DNA甲基化活性而发挥作用。三者共同参与卵母细胞基因印记的建立、正常精子的发生、胚胎和胎盘生长发育。Dnmt3L缺陷的雌鼠虽然能产生成熟且有功能的卵子, 但是其后代出现心包积液、露脑畸形和其他神经管畸形、绒毛尿囊融合缺陷, 于妊娠中期死亡。Dnmt3L缺失的雄鼠不能生育, 精子发生停滞在精原细胞进入减数分裂的时期, 曲精小管有极少量成熟精子。另外, Dnmt3L的缺失也会引起胎盘的发育异常。Dnmt3L<sup>nat-/-</sup>小鼠的胎盘迷路层、胶质细胞层缺陷, 滋养层巨细胞增生, 绒毛膜层和外胎盘锥之间连接减少。

### 2 印记重组与胚胎发育

印记的重组包括印记的擦除与重建, 主要发生在配子的迁移和成熟过程中。基因组印记的完整性是原始生殖细胞(Prenatal Germ Cell, PGC)细胞核具有全能性的重要前提, 同时也是配子成熟过程的必需步骤。

2.1 印记的擦除 印记的擦除发生于PGC向生殖嵴迁移的过程中, 而且在生殖细胞的分化过程中起到重要作用。小鼠的PGC从胚外中胚层向生殖嵴迁移, 增殖发生在胚胎发育的10.5~13.5 d。11.5 d胚胎的PGC基因组具有与体细胞相同的高甲基化状态, 而13.5 d胚胎的PGC甲基化已处于非常低的状态。Peg3、Lit1、Snrpn(DMR1)、H19等基因印记的擦除多

基金项目 国家科技支撑计划“畜禽基因资源发掘与种质创新利用研究”(2006BAD13B08)。

作者简介 陈琦(1980-), 女, 山东蓬莱人, 博士研究生, 研究方向: 动物遗传育种。\* 通讯作者, 博士, 教授, 博士生导师。

收稿日期 2009-02-12

在1 d(11.5 ~12.5 d) 内完成,且无性别差异,以确保在配子印记建立之前具有相同的表观遗传状态。基因印记的完整性与胚胎发育的关系在PGC的体细胞克隆试验中得到充分体现。Lee等将不同时期的PGC进行体细胞克隆发现,12.5 ~13.5 d 胚胎的PGC克隆所得胚胎生长迟缓,并于9.5 d 前后死亡,胚胎表型无性别差异,两性PGC都存在相同的基因组印记缺陷,印记基因的差异表达完全消失,呈双表达或沉默状态。11.5 d 胚胎的PGC克隆胚胎发育状况明显好于上述胚胎,发育时间可维持11.5 d,胚胎基因组印记状态介于正常体细胞和完全擦除之间。随后,更大范围的PGC克隆试验发现,11.5 ~19.5 d 胚胎PGC克隆所得胚胎的大多数基因印记已被擦除,不能够支持胚胎的正常发育;而8.5 ~9.5 d PGC具有很好的基因印记完整性,移植入去核卵母细胞后能够支持胚胎的完整发育。这一试验不仅反映了印记基因的擦除时间,而且证实了基因印记在胚胎全能发育中的意义。

不同性别的生殖系,对下一代擦除由上一代传递的印记建立新的印记,有关键作用。已设想2个模型来描述这是如何发生的<sup>[1]</sup>。首先,相同性别染色体基因型外印记保持,而相反性别的印记则被取消。这可能是一个单步机制。其次,先清除2个生殖细胞系的亲本染色体中已有的非遗传修饰,然后在稍后的阶段中,以一种性别特异方式建立新的印记。在过去几年对生殖细胞系的甲基化、表达和功能的研究中,已经获得相当多的启示。这些研究使平衡开始倾向于第二种模型。

生殖细胞从外胚层的4~5细胞基础群体中发育,并在鼠胚胎发育的7.5 d 时确定。原始生殖细胞(PGCs)在E10.5~E11.5时,通过胚外区和后肠迁移到它们的最终目的地——生殖嵴中的生殖原基<sup>[2]</sup>。在E13.5,雌性生殖细胞进入减数分裂前期,而雄性生殖细胞经历有丝分裂停滞。在出生以后,精原细胞恢复有丝分裂,然后是减数分裂。卵母细胞在出生后,排卵与受精之前,经历一段时间的生长。

在生殖细胞发育早期发生的整体甲基化也包括印记基因<sup>[3]</sup>。所以,Igf2r、P57<sup>kip2</sup>、peg1、peg3、Snrpn、U2af1sl和Nnat都在E12.5时去甲基化<sup>[4]</sup>。与雌性PGCs相比,雄性的H19和Igf2并不完全去甲基,而且有稍高水平的甲基化存在。这是基于PGCs的直接测试或使用胚胎生殖(EG)细胞系推断出的。研究发现E8.5 EG细胞的Igf2r区的母体甲基化仍存在于一些细胞系中,表明去甲基化发生于E8.5~E12.5。除此而外,对E12.5以前的各时期知之甚少<sup>[5]</sup>。这个时间部分被动物功能性研究所支持。虽然用E8.5 EG细胞所构造的嵌合体发育正常<sup>[5]</sup>,但用E12.5的EG细胞(来自2个性别)所构造的嵌合体显示胎儿生长,致死性和骨骼畸形增强(这些表现型的一部分具有雄核发育嵌合体特征)<sup>[5]</sup>。在这些嵌合体中,正常母体甲基化基因中观察到次甲基化,而且Igf2r被抑制与预期的父系基因双等位基因表达一起,可能对类雄核发育表型有贡献。H19和Igf2r似乎在嵌合体中50%甲基化,表明这些印记在产生EG细胞时的E12.5时仍保持<sup>[4]</sup>。还不清楚任一时期中的雄性生殖细胞中H19的父本拷贝是否去甲基化(擦除印记)。不过,Igf2、H19、Igf2r和Snrpn从E11.5起都在2个种系中双等位基因表达<sup>[6]</sup>,表明印记确实

在这些时期中大部分被清除(或未识别)。

融合试验表明,在胸腺淋巴细胞之间的EG细胞有一显著的甲基化活动作用于印记的以及非印记的基因和重复序列<sup>[4]</sup>。迄今检测到的在早期生殖细胞中逃脱这种整体甲基化的唯一序列,似乎是Xist的5'区,此区在2个性别中都保持甲基化状态<sup>[7]</sup>,而且雄性生殖细胞中H19的父系拷贝也如前所及的保持着。

对于雌性,印记基因甲基化形成的时间是相当清楚的,但对雄性生殖细胞不太清楚。在雌性,甲基化发生于卵母细胞生长期间,处于dctyae抑制阶段的卵母细胞直到出生后,显然仍未甲基化。对于重复序列<sup>[8]</sup>,Igf2r<sup>[3]</sup>、印记转基因<sup>[9]</sup>已形成,而且由功能性研究也推测出Peg1、Peg2、Snrpn已形成。这些甲基化现象与生长中的卵母细胞检验中高水平DNA甲基转移酶(Dnmt1)的存在相一致<sup>[10]</sup>。卵母细胞中仍未甲基化的其他印记基因(例如H19)是否在这一时期特异地防止重甲基化,还不得而知。这种保护也许是必要的。这可以从下列事实中得到证实,即正常情况下父系甲基化,而且在EG细胞中去甲基化的P57<sup>kip2</sup>基因,在EG细胞嵌合体中重新甲基化<sup>[4]</sup>。正如前面指出的,雄性生殖细胞中印记基因甲基化的形式,不易清楚地确定。不过,H19和Igf2显然是在出生前后形成的<sup>[3]</sup>。这再次与精原细胞核中高水平的Dnmt1蛋白相一致<sup>[10]</sup>。H19的祖代拷贝是否在这种重新甲基化发生之前完全去甲基化还不清楚。已经提出,对雄性生殖细胞内的重新甲基化是靶特异的,而不保护雌性生殖细胞中的重新甲基化<sup>[11]</sup>。

在假定的清除阶段以及形成印记之前,2组功能性研究已经用核移植方法检验了生殖细胞,用源于未生长的卵母细胞的第二母体基因组,已制备雌核遗传胚胎<sup>[12]</sup>。当这些胚胎与雌核遗传胚胎相比时,表现了发育改进,而且表达(假定未甲基化的)Peg1、Peg3和Snrpn基因。相比之下,Igf2r和P57<sup>kip2</sup>在来自未成熟的卵母细胞基因组中被抑制,再次表明它们的激活需要甲基化。移植E15.5至E16.5的雄性生殖细胞,而且获得嵌合体,其中移植的核参与了胚胎和胚外发育至E10.5。由于未期望雄核遗传细胞对嵌合体胚胎发育有贡献(它们对胚外组织有贡献),所以这也许表明这些生殖细胞仍处于获得父系印记之前的某一阶段。

Prader-Willi/Angelman综合症(PWS/AS)印记突变的观察,已证明这种突变可能干扰生殖细胞系外基因型所需的开关,这种突变防止相反亲本性别的染色体打开外基因型,但不影响相同性别染色体的外基因型<sup>[13]</sup>。这应该表示对“同性别,无再程序设计”的假说。不过,正如以前所争论的,这些观察结果并非结论性的,而且目前还不能区别这2种模型<sup>[14]</sup>。

**2.2 印记的重建** 基因组印记的建立是生殖细胞成熟过程中的重要事件,而且这一时间段是印记建立的特异时间窗,即印记基因甲基化的获得只特异性发生于配子形成过程。印记的主要重新编程发生于发育中的胚胎生殖细胞系中。2种性别性细胞都经历整体去甲基化,包括印记的和非印记的基因。这个去甲基化集团大概发生于E8.5~E12.5。嵌合体或核移植的这一阶段生殖细胞功能研究表明,这种去甲基化

确实与印记基因的实质重新编程有关。还不清楚所有印记基因是否经历完全的重新编程。新的甲基化印记在出生后卵母细胞生长期间的雌性生殖细胞中完成, 雄性则大概于出生前后完成。除了生殖细胞系特异新生甲基化外, 可能还需要甲基化的防护。

雌、雄两性的配子分化、发育过程存在显著差异, 印记的建立雌、雄两性之间也存在显著的差异。

**2.2.1 雌性配子的印记重建。**在雌性生殖细胞的成熟过程中, 擦除的基因组印记又逐步重新建立起来。在幼鼠和成年鼠的研究中发现, 卵母细胞基因组印记的建立与卵母细胞的直径有关, 与年龄无关。卵母细胞基因组印记的建立大约起始于直径达到40  $\mu\text{m}$  时, 到达65  $\mu\text{m}$  时甲基化基本完成。卵母细胞基因组印记建立的过程是大量差异甲基化区域广泛而有序的甲基化过程, 这一过程存在基因特异性, 不同的印记基因具有其建立的特异时间窗。在探索印记建立与胚胎发育关系的试验中, 研究者将不同生长阶段的卵母细胞核移植入去核成熟卵母细胞, 经IVF2ET 观察胚胎的发育情况, 结果只有大于60~69  $\mu\text{m}$  的幼鼠卵母细胞和大于50~59  $\mu\text{m}$  的成年小鼠卵母细胞能够支持胚胎的完整发育。这与印记基因的建立时间基本吻合, 也进一步证明配子成熟过程中的印记建立对植入后的胚胎发育有重要意义。

**2.2.2 雄性配子的印记重建。**雄性生殖细胞基因组印记的建立早于雌性, 而且印记完成的过程比较漫长, 主要发生在减数分裂之前的精原细胞阶段。在小鼠二倍体精原细胞的印记建立过程中, 父系等位基因与母系等位基因明显不同步, H19 的父系等位基因印记建立约需2 d(14.5~15.5 d 胚胎), 母系等位基因的甲基控制区直到接近出生(18.5 d 胚胎) 才开始出现甲基化, 这一过程持续到出生后减数分裂起始阶段。父源印记的建立与胚胎生殖细胞的分化发育存在密切关系。12.5 d 胚胎的生殖细胞移植入成年小鼠的曲精小管后不能启动精子的发生, 而14.5 d 胚胎的生殖细胞移植却能够启动精子的发生过程。

(上接第3002 页)

型、粘度和稳定性均符合油乳剂疫苗的要求; 采用皮下注射的免疫途径, 试验鸽未见任何不良反应, 说明该疫苗易注射并且安全。用该疫苗免疫鸽后1 周就可检测到H 抗体, 3 周后H 抗体水平达到高峰, 并能持续维持较长时间, 免疫14 d 后攻毒保护率可达100%, 证明其免疫原性良好; 免疫对比试验表明, 鸽瘟油乳剂苗对鸽新城疫病毒的攻毒保护率高于鸡新城疫油乳剂苗, 表明有较长的免疫持续期; 保存期试验结果表明, 该疫苗在4 保存30、60、90 d 后, 用来免疫鸽仍能维持较高的抗体水平, 因此该疫苗能有效地预防鸽瘟的发生。

(2) 鸽瘟的病原与鸡新城疫的一样, 同属I 型副粘病毒, 只是2 个不同的适应株, 故两者既有共性又有个性。肉鸽新城疫的病原分别是鸡源新城疫病毒和鸽源新城疫病毒, 虽然应用鸽瘟疫苗及鸡新城疫疫苗接种后, 在HI 抗体产生方面两者很相似, 但这两种病毒的致病性有一定区别, 抗原性也

### 3 小结

随着对基因组印记机制研究的不断深入, 基因印记在胚胎发育中的功能逐渐被揭示。但是各个印记基因之间的相互作用机制及这种网络作用机制在胚胎发育中的影响还有待进一步的探索。在这一领域的继续研究将有助于全面解释基因组印记的奥秘以及生殖和胚胎发育过程。

### 参考文献

- [1] ROSSANT J. Immortal germ cells[J]. *Curr Biol*, 1993, 3: 47-49.
- [2] BUEHR M. The primordial germ cells of mammals: Some current perspectives[J]. *Exp Cell Res*, 1997, 232: 194-207.
- [3] BRANDIS M, KAFRI T, ARIEL M, et al. The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse[J]. *EMBO J*, 1993, 12: 3669-3677.
- [4] TADA T, TADA M, HILTON K, et al. Epigenotype switching of imprintable loci in embryonic germ cells[J]. *Dev Genes Evol*, 1998, 207: 551-561.
- [5] LABOSKY P A, BARLOW D P, HOGAN B L M. Mouse embryonic germ (EG) cell lines—transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (*IGF2R*) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines[J]. *Development*, 1994, 120: 3197-3204.
- [6] SZABO P E, MANN J R. Allelic expression of imprinted genes in the mouse germline—implications for erasure, establishment, and mechanisms of genomic imprinting[J]. *Genes & Dev*, 1995, 9: 1857-1868.
- [7] ARIEL M, ROBINSON E, MCCARREY J R, et al. Gamete-specific methylation correlates with imprinting of the murine *Xist* gene[J]. *Nature Genet*, 1995, 9: 312-315.
- [8] HOWLETT S K, REIK W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development[J]. *Development*, 1991, 113: 119-127.
- [9] CHAILLET J R, VOGT T F, BEIER D R, et al. Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis[J]. *Cell*, 1991, 66: 77-83.
- [10] MERIHN T C, YODER J A, TAKEICHI T, et al. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells[J]. *Development*, 1998, 125: 889-897.
- [11] SURAN M A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germline[J]. *Cell*, 1998, 93: 309-312.
- [12] KONO T, OBATA Y, YOSHIMIZU T, et al. Epigenetic modifications during oocyte growth correlate with extended pathogenetic development in the mouse[J]. *Nature Genet*, 1996, 13: 91-94.
- [13] HORSTHENKE B, DITTRICH B, BUTTING K. Imprinting mutations on human chromosome 15[J]. *Hum Mutat*, 1997, 10: 329-337.
- [14] KELSEY G, REIK W. Imprint switch mechanism indicated by mutations in Prader-Willi and Angelman syndromes[J]. *Boessays*, 1997, 19: 361-365.

有一定差异, 使得鸡新城疫疫苗对鸽源新城疫的保护力稍低, 这与鸽新城疫病毒与鸡新城疫病毒在抗原性上存在某些差异有关<sup>[6-7]</sup>。因此应用鸽瘟油乳剂灭活疫苗预防鸽瘟, 比使用鸡新城疫疫苗效果更好。

### 参考文献

- [1] ALEXANDER D J, HESTER S A, WILSON G W C. Avian Parainfluenza virus type 1 infection of racing pigeon; 5 continue spread in 1984[J]. *Vet Rec*, 1986, 12: 424-427.
- [2] ALEXANDER D J, RUSSELL P H, PASON E T, et al. Antigenic and biological characterization of avian parainfluenza virus type 1 isolates from pigeon: an international collaboration study[J]. *Avian Pathol*, 1985, 14: 365-376.
- [3] 徐兰芳. 从我国信鸽中分离出禽I 型副粘病毒[J]. *中国兽医科技*, 1989(6): 26-27.
- [4] 吴世仪. 鸽新城疫的诊断[J]. *中国畜禽传染病*, 1994(6): 36-37.
- [5] 王明俊. 兽医生物制品学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 111-115.
- [6] 陈予召. 鸽感染鸽源I 型副粘病毒和鸡新城疫病毒的临床和病理变化的比较[J]. *中国兽医杂志*, 1999, 25(5): 7-9.
- [7] 杨瑛. 鸽新城疫野毒株的分离及生物学特性研究[J]. *畜牧与兽医*, 1998(5): 198-199.