

共培养对小鼠囊胚质量及其表观遗传修饰的影响

王保垒, 赵禹, 刘军, 权富生, 华松, 张涌

西北农林科技大学动物医学院 生物工程研究所, 杨凌 712100

摘要: 本研究探讨了共培养对小鼠囊胚质量及其表观遗传修饰的影响。将小鼠的受精卵体外随机分别置于含颗粒细胞(试验组 I)、输卵管上皮细胞(试验组 II)、输卵管组织块(试验组 III)的 KSOM 培养液中作为试验组进行共培养, 同时设立对照组 A(体外培养, 仅含 KSOM)和对照组 B(体内培养)。比较各组受精卵的卵裂率和囊胚发育率; 并应用碘化丙啶和 Hoechst333258 对囊胚进行染色, 利用 ICM/TE 值评价各组胚胎体外发育的质量; 同时将囊胚进行免疫荧光染色, 观察其基因组甲基化和组蛋白乙酰化的水平。结果表明, 与对照组 A 相比, 试验组的卵裂率和囊胚发育率均有显著提高 ($P<0.05$); 同时其囊胚细胞数目及内细胞团细胞数与滋养层细胞数比值 (ICM/TE) 值均显著高于对照组 A ($P<0.05$); 各试验组囊胚基因组甲基化水平与对照组 A 差异不显著 ($P>0.05$), 但各体外培养组均与对照组 B 差异显著 ($P<0.05$); 试验组组蛋白乙酰化水平与对照组 A、B 差异均不显著 ($P>0.05$)。共培养能够有效促进小鼠胚胎的体外发育, 提高囊胚的发育质量, 但是仍不能克服由体外培养造成的基因组甲基化异常。

关键词: 小鼠, 共培养, 基因组甲基化, 组蛋白乙酰化, 表观遗传

Co-culture of mouse blastocysts and their epigenetic modification

Baolei Wang, Yu Zhao, Jun Liu, Fusheng Quan, Song Hua, and Yong Zhang

Bioengineering Institute, College of Veterinary Medicine, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China

Abstract: To discuss the effect of co-culture on the quality of mouse blastocysts and their epigenetic modification. We divided mouse zygotes into three co-culture experiment groups: with granular cells (group I), oviduct epithelium cells (group II) and oviduct tissue (group III). Meanwhile, we set up control A (cultured *in vitro*, only KSOM (KCl⁺ simplex optimized medium)) and control B (cultured *in vivo*). Then we compared cleavage rate and blastocyst rate among different groups. After that we evaluated the quality of blastocysts by using ICM/TE (Inner cell mass/Trophectoderm cells) ratio via staining with propidium iodide and Hoechst333258, and analyzed the level of genome methylation and histone acetylation by immunofluorescence. Compared with the control group A, the co-culture groups had increased cleavage rate and blastocyst rate ($P<0.05$), blastocyst cells and the ICM/TE ratio of co-culture groups were higher ($P<0.05$), the level of genome methylation and histone acetylation had no significant difference between groups *in vitro* ($P>0.05$), but the level of genome methylation *in vivo* was significantly higher than that of *in vitro* ($P<0.05$). The co-culture methods can successfully promote the development rate of embryos *in vitro*, and improve the quality of the blastocyst. However, the methods have drawbacks in changing the abnormal genome methylation with *in vitro* culture.

Received: November 11, 2008; **Accepted:** March 19, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2004AA213072).

Corresponding author: Yong Zhang. Tel: +86-29-87080092; E-mail: zhy1956@263.net

国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2004AA213072)资助。

Keywords: mouse, co-culture, genome methylation, histone acetylation, epigenetic

共培养是指把动物的胚胎置于输卵管上皮细胞或是其他类型的细胞上进行培养,从而促进胚胎的发育^[1]。国内外研究人员已经尝试利用哺乳动物的子宫内膜细胞^[2]、输卵管上皮细胞^[3]、颗粒细胞^[3]、非洲绿猴肾细胞^[4]和肝细胞^[5]作为共培养体系的辅助细胞进行胚胎体外共培养,均在不同程度上促进了小鼠早期胚胎的体外发育。相关研究表明,与其他的共培养体系相比,输卵管上皮细胞共培养体系是一种比较理想的共培养体系^[6,7]。虽然很多资料显示共培养能够明显促进动物胚胎的早期发育,但共培养对囊胚发育质量、表观遗传特征及基因表达的影响的报道却很少。

表观遗传是指在基因的 DNA 序列没有发生改变的情况下,基因功能发生了可遗传的变化,并最终导致表型的变化。表观遗传涉及的内容较多,基因组的甲基化和组蛋白的乙酰化常作为检测表观遗传特性的 2 个主要的指标。已有的研究显示,异常的基因组甲基化和组蛋白乙酰化模式可能是导致胚胎发育失败的原因之一。通过核移植技术生产的克隆胚胎就存在明显异常的基因组甲基化和组蛋白乙酰化模式^[8-13]。而且,体外培养的早期桑椹胚也存在基因组甲基化的异常^[14]。这说明体外培养的胚胎本身存在异常的表观遗传模式。本试验通过免疫荧光染色的方法检测体外共培养囊胚的质量及其基因组甲基化和组蛋白乙酰化水平,探讨共培养能否提高胚胎质量和克服由体外培养造成的表观遗传的异常。

1 材料方法

1.1 试验动物

6~7 周龄昆明小鼠,由西安第四军医大学试验动物中心提供,体重 20~25 g,雌雄分笼饲养,人工控制饲养温度 20°C~22°C,相对湿度 50%~60%,人工光照 12 h/d,自由饮水采食,质量合格证号:医动字第 05236 号。

1.2 试剂

孕马血清促性腺激素(Pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(Human chorionic gonadotropin, hCG)购自宁波第二激素厂;

鼠抗 5-甲基胞嘧啶单克隆抗体(Calbiochem); FITC 标记羊抗鼠 IgG 二抗(Sigma); 兔抗组蛋白 H₃K₁₈ 多克隆抗体(Abcam); FITC 标记羊抗兔 IgG 二抗(Southern biotech); 其他试剂未经特殊标明均购自 Sigma 公司。

1.3 胚胎收集

取雌性小鼠,每只腹腔注射 PMSG 10 IU, 48 h 后每只腹腔注射 hCG 10 IU,与公鼠合笼过夜,于 hCG 注射后 23~25 h 用颈椎脱臼法处死母鼠,无菌取出输卵管并除去其上附着的脂肪,放入 Hepes-KSOM(H-KSOM)操作液^[15]中,用异物针撕开输卵管膨大部放出原核胚团,移入含 0.1%(W/V)透明质酸酶的 PBS 液中,除去卵丘细胞,捞出原核胚用 H-KSOM 液清洗 3 次后置于 KSOM^[16]中;体内正常囊胚于 hCG 注射后的 96~100 h 内处死见栓雌鼠,无菌取出子宫并清洗干净,用装有 H-KSOM 液的 1 mL 注射器从子宫颈开口进针冲洗子宫腔,使囊胚随着液体流到玻璃皿内,捞出囊胚。

1.4 培养基的制备与受精卵的体外培养

在原核胚收集过程中,透明质酸酶消化下来的颗粒细胞用 H-KSOM 液稀释后移入到 1.5 mL 的离心管中,并以 1000 r/min 离心 5 min,倒去上清液并用 KSOM 培养液悬浮,备用。原代输卵管上皮细胞为实验室保存。输卵管组织块采自膨大部,组织块大小为 1~2 mm³。每批受精卵随机分组,在 KSOM 中洗 3 次,置于铺有不同细胞的 KSOM 微滴中,5% CO₂、37.5°C 饱和湿度下培养,每 48 h 半量换液。

1.5 囊胚细胞差异性染色

试验所得囊胚用 0.5%链霉蛋白酶溶液除去透明带,在含有 10%兔抗山羊全血清的 PBS 中处理 15 min, PBS 充分洗涤后,移入含有 10%豚鼠补体的 PBS 中 1 h,室温下用每毫升含有 10 μg 碘化丙啶和 5 μg Hoechst 333258 的 PBS 染色 20 min,将胚胎移到载玻片上,滴加抗免疫荧光衰减剂,小心地以盖玻片压片,在荧光显微镜下记录滋养层细胞(TE, 粉色)和内细胞团(ICM, 蓝色)的细胞数目,并计算 ICM/TE 值^[17]。

1.6 免疫荧光染色^[18,19]

胚胎用 0.5%链霉蛋白酶溶液除去透明带,放入 4%多聚甲醛中于 4°C 固定 1~7 d,固定好的胚胎用

含有 0.3% BSA 的 PBS 多次洗涤, 在室温下 0.5% TritonX-100 中透化 45 min。甲基化染色的囊胚, 再用 4 mol/L HCl 在 37°C 下处理 1 h, 然后在含 2% BSA 的 PBS 中封闭过夜。囊胚分别在一抗(鼠抗 5-甲基胞嘧啶单克隆抗体; 兔抗组蛋白 H₃K₁₈ 多克隆抗体)中孵育 1 h, 充分洗涤后, 再分别与二抗(FITC 标记羊抗鼠 IgG; FITC 标记羊抗兔 IgG)孵育 1 h, 再用 20 µg/mL 碘化丙锭(Propidium Iodide, PI)染色 20 min, 然后将胚胎固定在载玻片进行观察。在激光共聚焦显微镜(Confocol, Bio-Rad MRC1024ES)下观察染色的胚胎, 激发波长为 488 nm (FITC)和 568 nm (PI), 注意使用相同的 Confocol 参数观察每一个胚胎, 捕获的图像利用 Confocal Assistant Software 保存为 Tiff 文件格式, 随后的图像处理使 Photoshop7.0 软件。

每组随机抽 5 枚囊胚图像, 用生物学图像分析软件 Image pro-plus(IPP) 测量出各组囊胚的平均光密度, 后绘制柱状图进行比较。

1.7 试验设计

为了分析共培养对囊胚质量的影响, 探讨囊胚 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化水平的差异性, 设计了以下 3 个试验组和 2 个对照组, 分别为:

试验组 I: 受精卵在含颗粒细胞的 KSOM 培养

液中共培养;

试验组 II: 受精卵在含输卵管上皮细胞的 KSOM 培养液中共培养;

试验组 III: 受精卵在含输卵管组织块的 KSOM 培养液中共培养;

对照组 A: 为空白对照组, 受精卵仅在 KSOM 培养液中培养;

对照组 B: 体内培养, 注射 hCG 后 96~100 h 回收胚胎。

1.8 数据统计与分析

为了减小试验误差, 试验重复 3 次以上, 试验所用囊胚均为注射 hCG 后 96~100 h 的胚胎, 每组随机抽 5 枚清晰囊胚图片进行分析。试验所得的数据用(χ^2)方差分析法进行数据处理。

2 结果和分析

2.1 共培养对小鼠胚胎早期发育的影响

从表 1 可以看出, 试验组的囊胚发育率分别为 77.0%、78.3%和 77.8%, 与对照组 A (62.3%)差异显著($P<0.05$), 各试验组之间差异不显著($P>0.05$)。结果表明, 共培养可以提高胚胎的体外发育率, 并且组织块共培养与细胞共培养的效果相当, 但操作简单、方便。

表 1 共培养对小鼠胚胎早期发育的影响
Table1 1 Effect of co-culture on early embryos development of mouse

Group	Development rate (%)				
	Zygote	2-cell	4-cell	8-cell	Blastocyst
Expriment I	122	93.4(114/122) ^a	89.3(109/122) ^a	86.8(106/122) ^a	77.0(94/122) ^a
Expriment II	148	94.6(140/148) ^a	91.2(135/148) ^a	87.1(129/148) ^a	78.3(116/148) ^a
Expriment III	135	95.6(129/135) ^a	91.8(124/135) ^a	87.4(118/135) ^a	77.8(105/135) ^a
Control A	130	87.0(113/130) ^a	82.3(107/130) ^a	71.5(93/130) ^b	62.3(81/130) ^b

Note: within a column, means without a common superscript differ significantly ($P<0.05$).

表 2 共培养对小鼠囊胚细胞数的影响
Table1 2 Effect of co-culture on blastocyst cells of mouse

Group	No. of blastocyst	Total cells	Inner cell mass	Trophectoderm cells	ICM/TE
Expriment I	8	45.29±7.12 ^a	13.45±3.18 ^a	31.84±6.35 ^a	0.42±0.5 ^a
Expriment II	8	43.26±10.35 ^a	12.79±1.65 ^a	30.47±9.36 ^a	0.42±0.18 ^a
Expriment III	8	45.68±7.26 ^a	13.46±3.14 ^a	32.22±5.61 ^a	0.41±0.56 ^a
Control A	8	38.26±8.14 ^b	10.24±2.14 ^b	28.02±9.14 ^b	0.37±0.23 ^b
Control B	8	50.52±10.35 ^c	16.03±3.15 ^c	34.49±8.24 ^c	0.46±0.38 ^c

Note: within a column, means without a common superscript differ significantly ($P<0.05$).

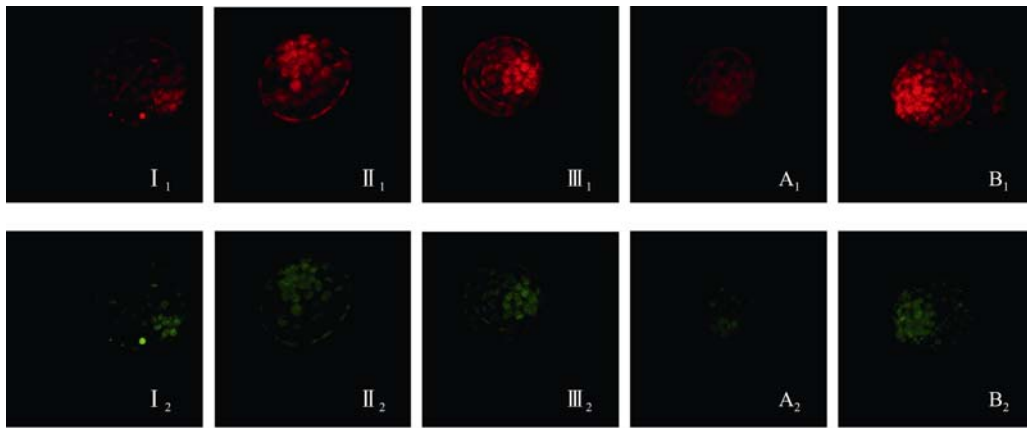


图1 小鼠囊胚基因组甲基化免疫荧光染色

Fig. 1 Confocal microscope photos of mouse blastocyst genome methylation (10×40). Group I₁-I₂ co-cultured with the granular cells; group II₁-II₂ co-cultured with the oviduct epithelium cells; group III₁-III₂ co-cultured with the oviduct tissue; group A₁-A₂ was only cultured in KSOM and group B₁-B₂ was *in vivo* embryos.

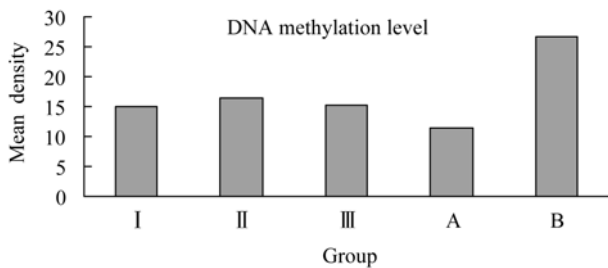


图2 小鼠囊胚基因组甲基化水平比较

Fig. 2 The contrast of blastocysts DNA methylation level. Group I co-cultured with the granular cells; group II co-cultured with the oviduct epithelium cells; group III co-cultured with the oviduct tissue; the control A was only cultured in KSOM and B was *in vivo* embryos.

2.2 共培养对小鼠囊胚细胞数的影响

共培养试验组的 ICM/TE 值分别为 0.42 ± 0.5 、 0.42 ± 0.18 和 0.41 ± 0.56 ，显著地高于体外对照组 A (0.37 ± 0.23 , $P<0.05$)，同时显著地低于体内对照组

B (0.46 ± 0.38 , $P<0.05$)，但是共培养试验组间的差异不明显 ($P>0.05$) (表 2)。说明共培养可以提高囊胚质量，但是仍低于体内发育的囊胚，且组织块共培养与细胞共培养的效果相当。

2.3 共培养对小鼠囊胚基因组甲基化水平的影响
对各级的囊胚进行抗 5-甲基胞嘧啶 (5MeC) 抗体免疫荧光染色，后用生物学图像分析软件 Image pro-plus (IPP) 测量后发现：对照组 B 囊胚的平均光密度 (26.76 ± 1.32) 高于各试验组 (14.97 ± 0.25 、 16.36 ± 0.30 和 15.28 ± 2.27)，并且差异显著 ($P<0.05$)，与对照组 A (11.36 ± 1.93) 差异极显著 ($P<0.01$)；各共培养试验组间差异不显著 ($P>0.05$)。说明体外培养可以造成囊胚基因组甲基化水平降低，而共培养不能改善这种异常 (图 1、图 2)。

2.4 共培养对小鼠囊胚组蛋白乙酰化水平的影响
如图 3 所示，对各级的囊胚进行抗组蛋白乙酰

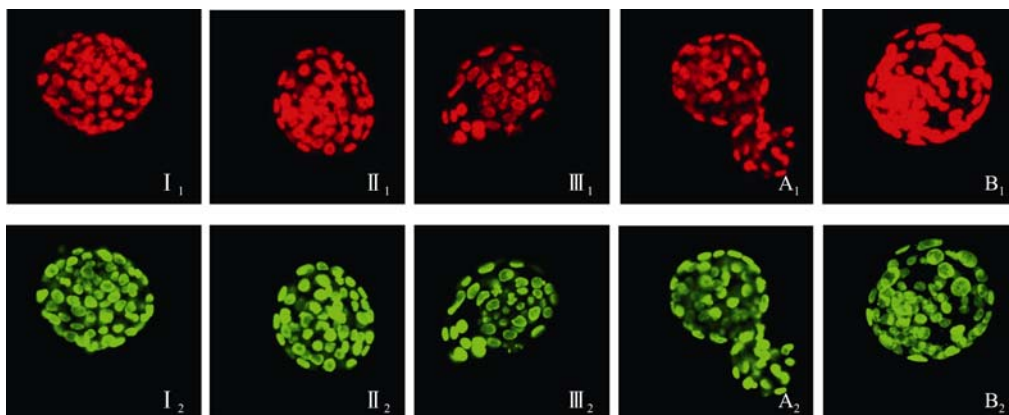


图3 小鼠囊胚组蛋白乙酰化免疫荧光染色

Fig. 3 Confocal microscope photos of mouse blastocyst histone acetylation (10×40). Group I₁-I₂ co-cultured with the granular cells; group II₁-II₂ co-cultured with the oviduct epithelium cells; group III₁-III₂ co-cultured with the oviduct tissue; group A₁-A₂ was only cultured in KSOM and group B₁-B₂ was *in vivo* embryos.

化(H₃K₁₈)抗体免疫荧光染色, 后用生物学图像分析软件 Image 测量后发现: 各组之间的组蛋白乙酰化水平差异均不显著($P>0.05$); 但从数据上可以看出对照组 B 囊胚的平均光密度(90.65 ± 1.66)低于对照组 A(114.92 ± 0.20)和各试验组(99.27 ± 0.98 、 104.90 ± 1.65 和 103.48 ± 1.46), 各试验组囊胚之间免疫荧光染色图像的平均光密度接近(图 4)。

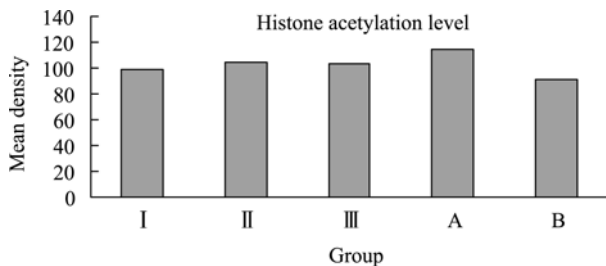


图 4 小鼠囊胚组蛋白乙酰化水平比较

Fig. 4 The contrast of mouse blastocysts histone acetylation level. Group I co-cultured with the granular cells; group II co-cultured with the oviduct epithelium cells; group III co-cultured with the oviduct tissue; the control A was only cultured in KSOM and B was *in vivo* embryos.

3 讨论

本试验在相关研究基础上, 采用输卵管组织块共培养体系, 所获试验组囊胚发育率均显著高于对照组 A, 但组织块共培养组的卵裂率、囊胚发育率、囊胚细胞总数、内细胞团细胞数、滋养层细胞数和 ICM/TE 均与其他 2 个共培养试验组无显著差异, 采用组织块共培养因操作方便、省事, 可用来取代其他共培养体系。Bigger 等指出将胚胎置于离体的输卵管中进行培养, 大部分胚胎能够顺利地发育至囊胚^[20]。这可能是因为输卵管是胚胎在体内正常受精和早期胚胎发育的场所, 其上皮细胞可以阶段性的合成和分泌一些物质从而提高了胚胎的体外发育率。试验进一步比较了共培养对囊胚基因组甲基化和组蛋白乙酰化水平的影响, 试验结果显示, 体内正常囊胚的甲基化水平显著高于各体外培养组, 同时共培养试验组囊胚的基因组甲基化和组蛋白乙酰化水平均与对照组 A 差异不显著, 这说明体外培养的胚胎本身就存在表观遗传的异常。另外, 不论是细胞共培养还是组织块共培养, 虽然能够显著提高胚胎体外发育的卵裂率、囊胚发育率及囊胚的细胞数, 但是仍不能克服由体外培养造成的表观遗传的异常现象。研究表明小鼠在受精后几小时内, 第 1

次 DNA 复制开始之前, 雄原核发生主动去甲基化, 在随后的胚胎分裂过程中雌原核发生被动去甲基化, 到桑椹期甲基化程度达到最低^[21]。在囊胚期, 内细胞团(ICM)发生特异的重甲基化, 但滋养层维持低甲基化状态^[8]。此次甲基化波动是胚胎发育所必须的。本研究在预试验中发现体外培养桑椹期甲基化程度与体内胚胎差异不显著(数据未给出)。从而可以推断体外培养囊胚甲基化水平降低是由于内细胞团(ICM)没有发生完全的重新甲基化。越来越多的学者认为细胞的整体基因组的甲基化水平升高和组蛋白乙酰化水平的降低意味着基因表达的下降^[22,23]。本试验结果显示体外培养囊胚基因组甲基化水平降低, 这可能是体外培养的不利环境阻碍了这一生物学过程, 从而造成了表观遗传的异常。本试验只是探讨了共培养对小鼠囊胚的 ICM/TE 值及基因组甲基化和组蛋白乙酰化水平的影响, 研究结果显示共培养能够显著地提高体外囊胚的发育质量, 但是获得的囊胚仍存在明显的表观遗传异常的现象, 有关共培养对囊胚何种特定基因等的影响, 有待于进一步的研究。

REFERENCES

- [1] Zeng W, Feng ZC. The research of human non-serum oviduct epithelium cells model co-culture with mouse embryos. *Chin J Obstet Gynecol*, 1998, **33**(10): 604-606.
曾伟, 封志纯. 人无血清输卵管上皮细胞模型与小鼠胚胎共培养的研究. *中华妇产科杂志*, 1998, **33**(10): 604-606.
- [2] Wegner CC, Carson DD. Mouse uterine stromal cells secrete a 30-kilodalton protein in response to co-culture with uterine epithelial cells. *Endocrinology*, 1992, **131**(6): 2565-2572.
- [3] Yu JN, Zou XT, Liu JG. The effect of goat granular cells and oviduct epithelium cells co-culture with early embryos development of goat *in vitro*. *Chin J Anim Husb*, 2004, **2**: 25-27.
于建宁, 邹晓庭, 刘进国. 山羊卵泡颗粒细胞和输卵管上皮细胞共培养对山羊体外受精胚胎发育的影响. *中国畜牧杂志*, 2004, **2**: 25-27.
- [4] Kim YB, Ahn SH, Chang DY, *et al*. Vero cell co-culture counteracts the detrimental effects of hydrosalpinx fluid on the development of mouse embryos *in vitro*. *J Korean Med Sci*, 2002, **17**: 217-219.
- [5] Hu YX, Maxson WS, Eager S. Co-culture of human embryos using buffalo rat liver (BRL) cells for women with decreased prognosis in IVF. *Am J Obstet Gynecol*,

- 1997, **157**: 358–363.
- [6] Reischl J, Prella K, Schol H, *et al.* Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelia cells *in vitro*. *Cell Tissue Res*, 1999, **296**(2): 371–383.
- [7] Tan XW, Ma SF, Yu J, *et al.* Effects of species and cellular activity of oviductal epithelial cells on their dialogue with co-cultured mouse embryos. *Cell Tissue Res*, 2007, **327**(1): 55–66.
- [8] Dean W, Santos F, Stojkovic M, *et al.* Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 13734–13738.
- [9] Bourhis DL, Patin D. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation pattern in bovine cloned embryos. *Curr Biol*, 2001, **11**: 1542–1546.
- [10] Kang YK, Koo DB, Park JS, *et al.* Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*, **28**: 173–177.
- [11] Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, *et al.* Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, 2003, **13**: 1116–1121.
- [12] Beaujean N, Taylor J, Gardner J, *et al.* Effect of limited Genome methylation reprogramming in the normal sheep embryo on somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2004, **71**: 185–193.
- [13] Chen T, Zhang YL, Jiang Y, *et al.* The genome methylation events in normal and cloned rabbit embryos. *FEBS Lett*, 2004, **578**: 69–72.
- [14] Hou J, Liu L, Lei TH, *et al.* The genome methylation pattern of bovine ectogenetic impregnation embryos. *Sci China Ser C*, 2006, **36** (4): 340–345.
- 候建, 刘蕾, 雷霆华, 等. 牛体外受精胚胎的基因组甲基化模式. 2006, 中国科学 C 辑, **36**: 340–345.
- [15] Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, *et al.* Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod*, 1994, **50**: 1027–1031.
- [16] Biggers JD, McGuinnis LK, Raffin M, *et al.* Amino acids and preimplantation development of the mouse in the protein-free KSOM. *Biol Reprod*, 2000, **63**: 281–293.
- [17] Zhang L translation. The effect of oviduct secretion to embryos development. *Chin J Anim Husb*, 1988, **15**: 11–14. 张力摘译. 输卵管分泌物对胚胎发育的作用. 中国畜牧兽医, 1988, **15**: 11–14.
- [18] Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J, *et al.* Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Curr Biol*, 2004, **14**: 266–267.
- [19] Shi LH, Ai JS, OuYang YC, *et al.* Trichostatin A and nuclear reprogramming of cloned rabbit embryos. *J Anim Sci*, 2008, **86**(5): 1106–1113.
- [20] Biggers JD, Gwatkin RBL, Brinster RL. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature*, 1962, **194**: 747–749.
- [21] Mayer W, Niveleau A, Walter J, *et al.* Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 2000, **403**: 501–502.
- [22] Ohgane J, Wakayama T, Senda S, *et al.* The sall3 locus is an epigenetic hotspot of aberrant genome methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Genesis*, 2004, **9**: 253–260.
- [23] Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, *et al.* Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. *Curr Biol*, 2003, **13**: 1116–1121.