

基因印记与胚胎发育

尹丽君, 黄荷凤 综述

(浙江大学医学院 附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006)

[摘要] 基因印记的擦除、建立和维持是正常胚胎发育的基础, 这一过程的实现主要有赖于各种DNA甲基转移酶的准确表达和密切合作, 多种遗传综合征和胚胎发育缺陷与基因印记异常有关。基因印记对原始生殖细胞胞核全能性、配子成熟、胚胎生长发育、胎盘结构和功能, 以及出生后个体的生长发育均有重要意义。

[关键词] 基因印记; DNA甲基化; 胚胎发育; DNA修饰甲基酶类; 综合征; 基因

[中图分类号] R 321 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2007)05-0509-06

Genetic imprinting and embryonic development

YIN Li-jun, HUANG He-feng (*The Affiliated Obstetrics and Gynecology Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China*)

[Abstract] Erasure, establishment and maintenance of genetic imprinting are indispensable for normal embryonic development. All these processes depend on accurate expression and intimate cooperation of kinds of DNA methyltransferases. Many genetic syndromes and embryo developmental anomalies are caused by abnormality of genetic imprinting. Genetic imprinting is important for the nucleus totipotential of primordial germ cell, maturation of gamete, growth and development of embryo, structure and function of placenta as well as postnatal growth and development of individuals.

[Key words] Genetic imprinting; DNA Methylation; Embryonic development; DNA Modification methylases; Syndrome; Genes

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2007, 36(5):509-514.]

基因组印记(genomic imprinting)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(imprinting gene), 如母系印记、父系表达的Ig12和父系印记、母系表达的H19。目前已证实的人类印记基因有51个, 小鼠印记基因有82个(<http://igc>。

收稿日期: 2007-06-06 修回日期: 2007-07-11

基金项目: 国家973项目子项目(2006CB504004)。

作者简介: 尹丽君(1983—), 女, 硕士生, 医学生殖内分泌专业。

通讯作者: 黄荷凤(1957—), 女, 教授, 博士生导师, 从事人类生殖学研究; E-mail: huanghefg@hotmail.com。

otago.ac.nz/home.html)。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。现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。

1 印记重组的主要执行者——DNA 甲基转移酶

基因印记的建立和维持依赖DNA甲基转移酶(DNA methylation transferase, 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二核苷酸的胞嘧啶5位上; Dnmt3L不具有催化活性,但可协同Dnmt3a和Dnmt3b发挥功能,也是印记建立的必需因子。DNMT家族的各个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^[1]。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,直至胚胎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^[2]。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^[3]。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^[4],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^[5]。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^{-/-}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^{-/-}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^[6]。人类的DNMT3B异常已经证实与免疫缺陷、着丝粒不稳定、面部异常综合征(immunodeficiency, centromeric region instability, and facial abnormalities, ICF综合征)有关系。ICF综合征是目前已知的唯一与基因组甲基化模式组成性异常有关的遗传病^[7]。患者易得感染性疾病,面部出现五官间距过宽、低位耳、内眦赘皮、巨舌等畸形。

Dnmt3L (DNA methyltransferase 3-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甲基化活性而发挥功能^[8]。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^[9]。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^[10]。另外, Dnmt3L的缺失也会引起胎盘的发育异常。Dnmt3L^{mut/-}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(ectoplacental cone)之间连接减少^[11]。

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。基因印记的完整性是原始生殖细胞(primitive 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 印记的擦除与PGC细胞核的全能性 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在一天(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^[12]。基因印记的完整性与胚胎发育的关系在PGC的体细胞克隆实验中得到充分体现。Lee^[13]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克隆实验发现,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^[14]。

2.2 印记的重建与配子的成熟和胚胎发育 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。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 μm 时,到达65 μm 时甲基化基本完成^[15]。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实验中,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IVF-ET观察胚胎的发育情况,结果只有大于60~69 μm 的幼鼠卵母细胞和大于50~59 μm 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^[16]。

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时间(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^[17]。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^[18]。这一实验中移植的生殖细胞正好处于基因组印记动态改变的关键时期,印记基因的表达状况在这一现象中的机制还需要进一步的深入研究。从另一方面来看,精子的数量和活力异常也与基因印记缺陷存在相关性。临床常规精液分析诊断为中、重度精子减少的患者其精子的基因印记错误率高于正常精子^[19]。

3 基因印记与胚胎、胎盘发育

受精后,正常体细胞二倍体遗传物质得到恢复;同时,重建的基因印记也相互补充,组合成了后代发育所必需的亲本等位基因差异表达模式。基因组印记的维持对胚胎的正常发育具有重要意义。印记基因通过调节细胞增殖、细胞凋亡、细胞外结构的构建来影响胚胎组织的生长。例如,IGF-2蛋白可能作为一种内分泌因子,通过影响胎鼠细胞的寿命和增殖而直接控

制胚胎组织的生长。与正常小鼠相比,Igf2 父系等位基因特异性敲除胚胎的细胞死亡率在9.25~9.75 d 相对增加,细胞总数从9.5 d 开始下降,出生体重只有正常的60%^[20]。

目前已经发现多种人类遗传综合征与印记异常有关,如BWS综合征(Beckwith-Wiedemann syndrome)、SRS综合征(Silver-Russell syndrome)、PWS综合征(Prader-Willi syndrome)和AS综合征(Angelman syndromes)^[21]。BWS综合征是一种以过度生长为特点的印记异常相关疾病,与11p15.5(11号染色体短臂15区5带)位点KCNQ1、IGF2-H19、CDKN1C的印记异常有关;SRS综合征的发病与7号染色体的母系单亲二倍体有关,可能出现异常的印记基因为7p11.2和7q32的GRB10、PEG1;PWS综合征发病原因主要是15q11-13父系等位基因缺失或母系15号染色体的双拷贝,涉及的印记基因有SNURF-SNRPN、UBE3A,另外,伴有单纯印记缺陷的病例也有少量报道^[22];相反,AS综合征则由父系等位基因双拷贝或母系等位基因缺失致病。最近,Lalande等^[23]将AS综合征病例分为5个类型:I型为15q11-13缺失,占70%;II型为单亲二倍体(UPD),占5%;III型为印记缺陷(imprinting defect,ID),占5%;IV型为UBE3A突变,占10%;V型为未知类型,占10%。甲基化修饰异常在AS综合征患者中的发生率可能比预计的要高。85例AS综合征患者中有66例没有检测到印记控制区域的缺失或点突变^[24],我们认为,这些印记缺陷可能源于配子发生过程中印记擦除不彻底所致。

胎盘是母婴之间物质交换的场所,胎盘的大小、形态、血液供应、物质转运载体的数量、合成和代谢物质的能力直接决定着胚胎和胎儿在宫内的生长。胎盘也是印记基因发挥功能的重要部位,54个表达蛋白质的小鼠印记基因中有32个在胎盘表达^[25]。

印记基因在胎盘的功能主要体现在两个方面:胎盘的结构和胎盘的营养转运功能。印记基因与胎盘中多种细胞类型的增殖有关。小鼠迷路滋养层和胶质细胞层都有印记基因的转录,如糖原细胞(Igf2)、迷路血管(Peg1)、迷路和成

胶质细胞(Peg3、Mash2)、迷路(Ipl),H19、Igf2r、P57Kip2也在胎盘各层广泛表达。Igf2、Peg1、Peg3三个母系印记基因的敲除都会引起胎盘体积缩小。相反,父系印记基因H19、Igf2r、P57Kip2、Ipl的缺失均导致胎盘各层组织异常增生^[26]。另外,胎盘的营养运输也受到基因印记调控。目前研究最多的印记基因是Igf2,Igf2被认为是营养供需平衡的主要调控者。小鼠Igf2有三个启动子P0-P3,其中P0是迷路滋养细胞特异性的启动子。特异性敲除P0启动子后,胎盘部位Igf2 mRNA表达降低,突变胎盘的被动扩散功能降低,氨基酸主动转运系统的功能代偿增加^[27]。与Igf2所有启动子完全缺失小鼠相比较,Igf2 P0^{+/-}胚胎自身的IGF-2不受影响,营养需求得到维持,胎盘营养转运载体的表达和功能发生上调。将作为营养需求信号的胚胎自身IGF-2废止后,胎盘营养转运载体上调现象也随之被废止^[28]。

因为滋养外胚层直接与外界接触而且修复能力较低,外胚层的印记基因似乎更易受到外界环境的影响。体外培养后,小鼠胎盘印记基因H19、Ascl2、Snrpn、Peg3和Xist均出现表达异常和甲基化水平改变,而胎鼠的印记基因功能大部分保留。这一试验不仅提示体外培养系统对胚胎发育存在的潜在影响,而且对于我们优化培养条件提供了新的研究课题^[29]。

目前,对于基因印记对后代发育的作用有多种不同的假说,为人们所广泛接受的是父、母系印记基因的“基因矛盾”学说(parent conflict hypothesis)。这一学说认为父、母系基因在后代发育中存在相互拮抗作用。父系表达基因主要促进子代生长,倾向于增大胎儿的体形,从而使后代具有更好的生长和适应能力。父系表达基因Igf2、Peg1/Mest、Peg3、Ins1/Ins2等的缺失导致宫内生长迟缓,Igf2的过度表达则引起胎儿的过度生长;而母系表达基因则完全相反,能够限制后代的无限生长,避免消耗过多的资源,并为其再次怀孕做好储备。母系基因Igf2r、H19等的缺失引起胎儿的过度生长^[27]。父、母系基因相互竞争,共同为物种的繁衍发挥重要作用。

综上所述,随着对基因组印记机制和印记

异常研究的不断深入,基因印记在胚胎发育中的功能逐渐被揭示,多种印记异常相关遗传综合征的发病机制也渐渐清晰。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,利用印记调控机制对生殖领域异常印记基因进行干预以直接指导临床工作的愿望还没有实现。在这一领域的继续研究将有助于全面解释基因印记的奥秘、生殖和胚胎发育过程,为人类的后代健康服务。

References:

- [1] ZHAO D M, JIN F, HUANG H F (赵冬梅, 金帆, 黄荷凤). DNA methyltransferases and early embryo development [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报: 医学版), 2005, 34(3): 281-284. (in Chinese)
- [2] HOWELL C Y, BESTOR T H, DING F, et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene [J]. *Cell*, 2001, 104(6): 829-838.
- [3] BINISZKIEWICZ D, GRIBNAU J, RAMSAHOYE B, et al. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(7): 2124-2135.
- [4] WANG S, COWAN C A, CHIPPERFIELD H, et al. Gene expression in the preimplantation embryo; in-vitro developmental changes [J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 10(5): 607-616.
- [5] TAKESHIMA H, SUETAKE I, SHIMAHARA H, et al. Distinct DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b towards naked and nucleosomal DNA [J]. *J Biochem (Tokyo)*, 2006, 139(3): 503-515.
- [6] OKANO M, BELL D W, HABER D A, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development [J]. *Cell*, 1999, 99(3): 247-257.
- [7] XU G L, BESTOR T H, BOURC'HIS D, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene [J]. *Nature*, 1999, 402(6758): 187-191.
- [8] SUETAKE I, SHINOZAKI F, MIYAGAWA J, et al. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(26): 27816-27823.
- [9] BOURC'HIS D, XU G L, LIN C S, et al. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints [J]. *Science*, 2001, 294(5551): 2536-2539.
- [10] HATA K, OKANO M, LEI H, et al. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice [J]. *Development*, 2002, 129(8): 1983-1993.
- [11] ARIMA T, HATA K, TANAKA S, et al. Loss of the maternal imprint in Dnmt3Lmat-/- mice leads to a differentiation defect in the extraembryonic tissue [J]. *Dev Biol*, 2006, 297(2): 361-373.
- [12] HAJKOVA P, ERHARDT S, LANE N, et al. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells [J]. *Mech Dev*, 2002, 117(1-2): 15-23.
- [13] LEE J, INOUE K, ONO R, et al. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11. 5 primordial germ cells [J]. *Development*, 2002, 129(8): 1807-1817.
- [14] YAMAZAKI Y, LOW E W, MARIKAWA Y, et al. Adult mice cloned from migrating primordial germ cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(32): 11361-11366.
- [15] HIURA H, OBATA Y, KOMIYAMA J, et al. Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice [J]. *Genes Cells*, 2006, 11(4): 353-361.
- [16] BAO S, OBATA Y, CARROLL J, et al. Epigenetic modifications necessary for normal development are established during oocyte growth in mice [J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(3): 616-621.
- [17] DAVIS T L, YANG G J, MCCARREY J R, et al. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development [J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(19): 2885-2894.

- [18] OHTA H, WAKAYAMA T, NISHIMUNE Y. Commitment of fetal male germ cells to spermatogonial stem cells during mouse embryonic development [J]. *Biol Reprod*, 2004, 70(5):1286-1291.
- [19] MARQUES C J, CARVALHO F, SOUSA M, et al. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis [J]. *Lancet*, 2004, 363(9422): 1700-1702.
- [20] BURNS J L and HASSAN A B. Cell survival and proliferation are modified by insulin-like growth factor 2 between days 9 and 10 of mouse gestation [J]. *Development*, 2001, 128(19):3819-3830.
- [21] CONSTANCIA M, KELSEY G, REIK W. Resourceful imprinting [J]. *Nature*, 2004, 432(7013):53-57.
- [22] TORRADO M, ARAOZ V, BAIALARDO E, et al. Clinical-etiology correlation in children with Prader-Willi syndrome (PWS): an interdisciplinary study [J]. *Am J Med Genet A*, 2007, 143(5):460-468.
- [23] LALANDE M, CALCIANO M A. Molecular epigenetics of Angelman syndrome [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(7-8):947-960.
- [24] BUITING K, GROSS S, LICH C, et al. Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes; a molecular study of 136 patients with an imprinting defect [J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72(3):571-577.
- [25] FERGUSON-SMITH A C, MOORE T, DETMAR J, et al. Epigenetics and imprinting of the trophoblast—a workshop report [J]. *Placenta*, 2006, 27(Suppl A):S 122-S 126.
- [26] REIK W, CONSTANCIA M, FOWDEN A, et al. Regulation of supply and demand for maternal nutrients in mammals by imprinted genes [J]. *J Physiol*, 2003, 547(Pt 1):35-44.
- [27] CONSTANCIA M, HEMBERGER M, HUGHES J, et al. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth [J]. *Nature*, 2002, 417(6892):945-948.
- [28] CONSTANCIA M, ANGIOLINI E, SANDOVICI I, et al. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(52):19219-19224.
- [29] MANN M R, LEE S S, DOHERTY A S, et al. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture [J]. *Development*, 2004, 131(15):3727-3735.

[责任编辑 黄晓花]