

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00765

ES 小鼠和 ES 细胞中 *H19* 基因甲基化状态

杨荣荣, 周荣艳, 高淑敏, 温晓辉, 李相运

河北农业大学动物科技学院, 河北省牛羊胚胎工程技术研究中心, 保定 071001

摘要: 为探讨印迹基因 *H19* 的甲基化状态与 ES 小鼠胚胎发育之间的关系, 以遗传背景相同的正常成年对照小鼠、22 只成年 ES 小鼠和 8 只新生死亡的 ES 小鼠以及不同传代次数的 ES 细胞为实验材料, 利用甲基化敏感性限制性内切酶-PCR 技术分别检测了其印迹基因 *H19* 的 5' 非翻译区两个位点的甲基化状态。结果表明, 发育至成年的 ES 小鼠印迹基因 *H19* 所检测位点的甲基化状态与正常成年对照小鼠之间没有差异, 而新生死亡的 ES 小鼠印迹基因 *H19* 所检测位点的甲基化状态与成年 ES 小鼠以及正常成年对照小鼠相比则存在明显差异。推测 ES 细胞中印迹基因 *H19* 所检测位点的甲基化状态与成年 ES 小鼠以及正常成年对照小鼠之间可能存在差异。

关键词: ES 细胞; ES 小鼠; DNA 甲基化; 印迹基因 *H19*

Methylation of *H19* gene in ES mice and embryonic stem cells

YANG Rong-Rong, ZHOU Rong-Yan, GAO Shu-Min, WEN Xiao-Hui, LI Xiang-Yun

College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Cattle & Sheep Embryo Engineering Center of Hebei, Baoding 071001, China

Abstract: To investigate the relationship between the methylation status of imprinted gene *H19* and development of mice derived completely from Embryonic stem cells (ES) by tetraploid embryo complementation. The methylation status of two loci at 5' UTR region in imprinted gene *H19* in normal adult control mice, 22 adult ES mice, 8 newborn dead ES mice and embryonic stem (ES) cells with different passage number were detected by the using of methylation-sensitive restriction endonuclease-PCR technique. The results indicated that the methylation status of imprinted gene *H19* in adult ES mice were identical to that of normal adult control mice. However, some significant differences in the methylation status of imprinted gene *H19* were found among newborn dead ES mice, adult ES mice and normal adult control mice. Furthermore, the methylation status of imprinted gene *H19* in ES cells were probably different from that of adult ES mice and normal adult control mice.

Keywords: embryonic stem cells; ES mice; DNA methylation; imprinted gene *H19*

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES)是一种高度未分化的多能性细胞, 具有长期自我增殖、自我

收稿日期: 2007-11-07; 修回日期: 2008-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30571336)和河北农业大学校长基金项目资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30571336) and President Foundation of Agricultural University of Hebei]

作者简介: 杨荣荣(1982-), 女, 山东威海人, 硕士研究生, 专业方向: 动物胚胎工程。Tel: 0312-7528459; E-mail: rongrong-yang@163.com

通讯作者: 李相运(1968-), 男, 陕西西安人, 博士, 教授, 研究方向: 动物胚胎工程。Tel: 0312-7528459; E-mail: lxyun@hebau.edu.cn

致谢: 感谢河北农业大学的李世杰教授和樊宝良教授在该研究进行的过程中给予的指导和帮助。

更新和多向分化的潜能,已经成为现代生命科学领域中最前沿、最热门的研究课题之一。通过小鼠ES细胞与四倍体胚胎嵌合,可以获得完全由ES细胞发育而来的个体,即ES小鼠,该方法操作简便快捷,为研究人类基因功能和构建疾病模型动物提供了一条有效途径^[1-3]。像其他克隆动物一样,ES小鼠也有许多发育异常,如呼吸衰竭、胎儿肥大、胎盘肥大等,以致许多新生ES小鼠(~20%)并不能存活至成年。研究表明:这些发育异常与基因的正常表观遗传状态密切相关。

DNA甲基化是真核生物基因的一种重要的表观遗传修饰方式,是调节基因组功能的重要手段,对哺乳动物的正常发育有重要的调控作用,并且这种调控很大程度上是通过CpG的甲基化与去甲基化起作用来实现的。*H19*是目前研究较多的印迹基因之一,定位于小鼠7号染色体末端区域,用RNA酶保护分析方法发现其表达方式为父系印迹,母系表达^[4]。研究表明,*H19*是一种生长调节基因,在胚胎和胎盘组织中高度表达^[5]。Angiolini等^[6,7]发现*H19* mRNA能使许多基因上调,而这些基因又与细胞迁移、血管形成和胎盘血流有关,认为*H19*在改变胎盘功能和胚胎生长、发育及个体行为发展方面起重要作用。印迹基因的异常甲基化模式可能导致其表达异常并由此引起基因组不能正常分裂,最终将导致植入后胚胎的异常发育^[8]。

鉴于印迹基因*H19*与动物胚胎发育之间存在的关系,我们选择了*H19*基因5'非翻译区的两个含有CCGG序列的甲基化位点作为研究对象,分析遗传背景相同的正常成年小鼠、成年ES小鼠和新生死亡的ES小鼠以及不同传代次数的ES细胞的甲基化状态,探讨印迹基因*H19*的甲基化状态与ES小鼠胚胎发育之间的关系。

1 材料和方法

1.1 小鼠ES细胞的分离和ES小鼠的制备

挑选处于发情期的C57BL/6J雌鼠与129/sv公鼠合笼。次日清晨检查阴道栓,以出现阴道栓为受精的第1天。在受精后第4天收集囊胚。移入预先接种了新鲜饲养层细胞的四孔板中,分离ES细胞。按照我们以前报道的方法制备ES小鼠,即挑选生长状态良好的ES细胞集落,消化并用微管吹打成20个细胞左右的团块。然后在培养皿底部做30 μ L的微滴,并用缝衣针在每个微滴底部做10个凹陷,石蜡

油覆盖,将去掉透明带的四倍体胚胎用M₂液洗涤3次后,置1~2枚于培养皿底部的凹陷内。之后,再在每个凹陷内放置一个ES细胞团块,过夜培养至囊胚阶段后移植假孕2.5天的小鼠两侧子宫角,17天后即可分娩。对照组小鼠来自C57BL/6J \times 129/sv自然交配分娩。

1.2 基因组DNA的提取

1.2.1 组织DNA的提取

剪取1 cm左右的鼠尾于1.5 mL的离心管中,用眼科剪子剪碎,加入裂解液600 μ L,蛋白酶K 20 μ L后,于55 $^{\circ}$ C摇床消化过夜。次日上午取出消化好的离心管,自然冷却至室温,加等体积Tris平衡酚(pH>7.5),颠倒混匀至两相充分混合。6 000~8 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心10 min。小心取出离心管,用大口径Tip头小心吸出上层水相,转移至另一离心管中,再同上用等体积酚:氯仿:异戊醇重复抽提两次。小心转移上清至另一离心管中,加等体积的异丙醇缓慢颠倒摇动,至沉淀出现并聚集成团,6 000~8 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心10 min。小心弃去上清,用适量70%乙醇吹洗两次后,弃乙醇并于超净台上自然干燥10~30 min。加入适量TE至DNA全部溶解,4 $^{\circ}$ C冰箱保存。

1.2.2 细胞DNA的提取

挑选生长状态良好的ES细胞集落,纯化后用冰预冷的PBS洗两次,4 $^{\circ}$ C下1 500 r/min离心10 min,弃上清后用适量TE重悬。吹吸混匀后加入600 μ L裂解液和20 μ L蛋白酶K,于55 $^{\circ}$ C摇床消化过夜。此后操作同组织DNA的提取。

1.3 DNA限制性内切酶酶切

1 μ g DNA加*Hpa* 10 U(或*Msp* 10 U)和10 \times buffer 2 μ L补水至20 μ L,充分混匀置37 $^{\circ}$ C过夜。次日取出酶切产物,加入50 μ L冰乙醇静置沉淀15 min,1 200 r/min离心5 min,弃上清后加5 μ L蒸馏水溶解酶切后的DNA。

1.4 PCR扩增及琼脂糖凝胶电泳检测

我们所选择检测的两个甲基化位点分别是DNA甲基化数据库中序列号为3 949的第22个碱基(*H19*-1)和第230个碱基(*H19*-5)。两个待测甲基化位点的上下游引物序列分别为5'-CATAGGTGAGA-ACCACTGCTGA-3'和5'-GTGATAGAATGGGGAC-AGGA-3';5'-CCTGATTGTGGATGCTGAC-3'和5'-

CCTTTTCTGGGTGAGTCGT-3。扩增片段长度分别为 232 bp 和 265 bp, 反应体系为 25 μ L, 总体积包含有酶切后 DNA 1 μ g, 2.5 mmol/L dNTP, 10 pmol/ μ L 上下游引物, 1 U *Taq* DNA 多聚酶, 10 \times PCR buffer(Mg^{2+})和 ddH₂O, 充分混匀后进行循环扩增。循环参数分别为 95 预变性 5 min, 94 变性 1 min, 52 复性 1 min, 72 延伸 30 s, 33 次循环, 72 平衡 10 min, 4 停止; 95 预变性 5 min, 94 变性 1 min, 57 复性 1 min, 72 延伸 30 s, 33 次循环, 72 平衡 10 min, 4 停止。取 4 μ L PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外透射检测电泳带并拍照。

2 结果与分析

甲基化敏感性限制性内切酶(Methylation-sensitive restriction endonuclease, MS-RE)-PCR 技术常使用的限制性内切酶是 *Hpa* -*Msp* (识别序列 CCGG)。*Hpa* 是甲基化敏感限制性内切酶, 如果 DNA 中 CCGG 序列第二位胞嘧啶发生甲基化则不被识别, *Msp* 是甲基化不敏感限制性内切酶, DNA 中 CCGG 序列第二位胞嘧啶发生甲基化与否均可被识别, 从而明确待测位点的甲基化状态。以分别经甲基化敏感和非敏感的核酸内切酶酶切后的基因组 DNA 为模板, 用待检甲基化位点外侧序列为引物进行 PCR 扩增。甲基化敏感的内切酶酶切后的 DNA 若存在甲基化, 会扩增出包含有甲基化 CpG 位点的片段; 若不存在则不会有任何片段扩增出来。当用甲基化非敏感的内切酶酶切后的基因组 DNA 为模板时, 不论该部位是否甲基化都不应有片段扩出。

2.1 印迹基因 *H19* 待测甲基化位点 *H19-1* 的甲基化状态

利用设计的引物分别对未经过酶切和酶切处理后的 DNA 进行 PCR 扩增, PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分离检测。结果发现, 所检测的 22 只成年 ES 小鼠印迹基因 *H19* 待测位点 *H19-1* 的甲基化状态与正常成年对照组小鼠相比差异并不明显, 所有的实验组待测甲基化位点 *H19-1* 经甲基化敏感的内切酶酶切处理后进行 PCR 扩增, 结果均出现了大小为 232 bp 的目的条带, 而经甲基化非敏感的内切酶酶切处理和 PCR 扩增后均没有扩增出目的条带(图 1, A-I)。从研究结果来看, 22 只成年 ES 小鼠印迹基因

H19 待测甲基化位点 *H19-1* 与正常成年对照组小鼠的一样, 应该都是处于甲基化状态。

对 8 只新生死亡的 ES 小鼠的研究结果显示, 仅有 3 只实验小鼠印迹基因 *H19* 待测甲基化位点 *H19-1* 经甲基化敏感的内切酶酶切处理和 PCR 扩增后出现了大小为 232 bp 的目的条带, 而经甲基化非敏感的内切酶酶切处理和 PCR 扩增后均没有出现目的条带(图 1, J-L)。由此看来, 大部分新生死亡的 ES 小鼠印迹基因 *H19* 待测甲基化位点 *H19-1* 的甲基化状态是非甲基化的, 与正常成年对照小鼠和成年 ES 小鼠相比存在明显差异。

检测了传代次数分别为 10 代、15 代、26 代和 33 代的 ES 细胞中印迹基因 *H19* 待测甲基化位点 *H19-1* 的甲基化状态, 发现印迹基因 *H19* 两个待测甲基化位点 *H19-1* 在未经限制性内切酶酶切处理的前提下, 所有的实验组均扩增出了相应的目的条带(232 bp); 而经过限制性内切酶酶切处理之后, 虽仍可以明显分辨出目的条带, 但 PCR 扩增的特异性明显下降, 出现了很多非目的条带(图 1, M-N)。

2.2 印迹基因 *H19* 待测甲基化位点 *H19-5* 的甲基化状态

据上述相同的方法, 又检测了各组实验小鼠印迹基因 *H19* 待测甲基化位点 *H19-5* 的甲基化状态。结果发现, 22 只成年 ES 小鼠和 1 只正常成年对照小鼠印迹基因 *H19* 待测甲基化位点 *H19-5* 经甲基化敏感的内切酶酶切处理后进行 PCR 扩增, 结果也均出现了大小为 265 bp 的目的条带, 而经甲基化非敏感的内切酶酶切处理和 PCR 扩增后均没有扩增出目的条带(图 2, A-I), 实验组和对对照组相比差异并不明显。因此可以推断, 22 只成年 ES 小鼠印迹基因 *H19* 待测甲基化位点 *H19-5* 也都处于甲基化状态。

对 8 只新生死亡 ES 小鼠印迹基因 *H19* 待测甲基化位点 *H19-5* 的研究结果显示, 8 只新生死亡的 ES 小鼠中也是仅有 3 只实验小鼠印迹基因 *H19* 待测甲基化位点 *H19-5* 经甲基化敏感的内切酶酶切处理和 PCR 扩增后出现了大小为 265 bp 的目的条带, 而经甲基化非敏感的内切酶酶切处理和 PCR 扩增后均没有出现目的条带(图 2, J-L)。因此推断, 大部分新生死亡的 ES 小鼠印迹基因 *H19* 待测甲基化位点 *H19-5* 也是处于非甲基化状态的, 与正常成年对照小鼠和成年 ES 小鼠相比明显不同。

从对 ES 细胞的研究结果来看, 待测甲基化位

点 *H19-5* 在未经限制性内切酶酶切处理的前提下, 所有的实验组均扩增出了相应的目的条带(265 bp);

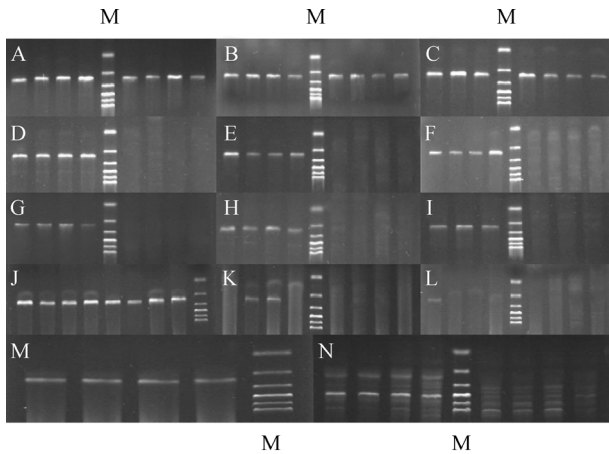


图 1 印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-1* 的甲基化状态

A~C: 22 只成年 ES 小鼠和 1 只正常成年对照小鼠印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-1* 未经过酶切处理的 PCR 扩增结果; D~I: 22 只成年 ES 小鼠和 1 只正常成年对照小鼠印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-1* 经过限制性内切酶酶切处理后的 PCR 扩增结果, 其中 marker 左边为 *Hpa* 酶切结果, 右边为 *Msp* 酶切结果; J: 8 只新生死亡的 ES 小鼠印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-1* 未经过酶切处理的 PCR 扩增结果; K~L: 8 只新生死亡的 ES 小鼠印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-1* 经过限制性内切酶酶切处理后的 PCR 扩增结果, 其中 marker 左边为 *Hpa* 酶切结果, 右边为 *Msp* 酶切结果; M: 不同传代次数的 ES 细胞中印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-1* 未经过酶切处理的 PCR 扩增结果。从左到右传代次数依次为 10 代、15 代、26 代、33 代; N: 不同传代次数的 ES 细胞中印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-1* 经过限制性内切酶酶切处理后的 PCR 扩增结果, 其中 marker 左边为 *Hpa* 酶切结果, 右边为 *Msp* 酶切结果。从左到右传代次数依次为 10 代、15 代、26 代、33 代。M: DNA marker I MD101, 参照物片段分别为 100、200、300、400、500、600 bp。

Fig. 1 Methylation status of methylated locus *H19-1* of imprinted gene *H19*

A~C: PCR results of methylated locus *H19-1* of imprinted gene *H19* in 22 adult ES mouse and one normal adult control mice without restriction endonuclease disposal; D~I: PCR results of methylated locus *H19-1* of imprinted gene *H19* in 22 adult ES mouse and one normal adult control mice with restriction endonuclease disposal, and on the left of marker the samples with *Hpa* disposal, and the rest with *Msp* disposal on the right of marker; J: PCR results of methylated locus *H19-1* of imprinted gene *H19* in 8 newborn dead ES mouse without restriction endonuclease disposal; K~L: PCR results of methylated locus *H19-1* of imprinted gene *H19* in 8 newborn dead ES mouse with restriction endonuclease disposal, and on the left of marker with *Hpa* disposal, and the rest with *Msp* disposal on the right of marker; M: PCR results of methylated locus *H19-1* of imprinted gene *H19* in embryonic stem cells with different passage without restriction endonuclease disposal. The passages are 10, 15, 26, 33 in turn from left to right; N: PCR results of methylated locus *H19-1* of imprinted gene *H19* in embryonic stem cells with different passage with restriction endonuclease disposal, and on the left of marker the samples with *Hpa* disposal, and the rest with *Msp* disposal on the right of marker. The passages are 10, 15, 26, 33 in turns from left to right. Mk is DNA marker I MD101, and its control bands are 100, 200, 300, 400, 500, 600 bp in turns.

而经过限制性内切酶酶切处理之后再行 PCR 扩增, 结果出现了与之前类似的情况, 目的条带清晰可辨的同时仍存在一些非目的条带(图 2, M-N)。

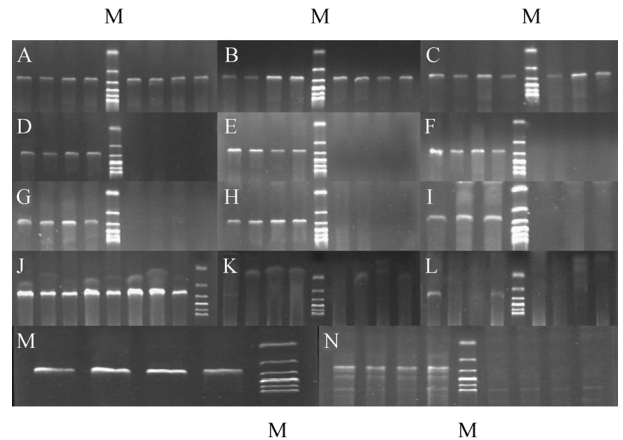


图 2 印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-5* 的甲基化状态

A~C: 22 只成年 ES 小鼠和 1 只正常成年对照小鼠印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-5* 未经过酶切处理的 PCR 扩增结果; D~I: 22 只成年 ES 小鼠和 1 只正常成年对照小鼠印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-5* 经过限制性内切酶酶切处理后的 PCR 扩增结果, 其中 marker 左边为 *Hpa* II 酶切结果, 右边为 *Msp* I 酶切结果; J: 8 只新生死亡的 ES 小鼠印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-5* 未经过酶切处理的 PCR 扩增结果; K~L: 8 只新生死亡的 ES 小鼠印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-5* 经过限制性内切酶酶切处理后的 PCR 扩增结果, 其中 marker 左边为 *Hpa* 酶切结果, 右边为 *Msp* 酶切结果; M: 不同传代次数的 ES 细胞中印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-5* 未经过酶切处理的 PCR 扩增结果。从左到右传代次数依次为 10 代、15 代、26 代、33 代; N: 不同传代次数的 ES 细胞中印迹基因 *H19* 甲基化位点 *H19-5* 经过限制性内切酶酶切处理的 PCR 扩增结果, 其中 marker 左边为 *Hpa* 酶切结果, 右边为 *Msp* 酶切结果。从左到右传代次数依次为 10 代、15 代、26 代、33 代。M 为 DNA marker I MD101, 参照物片段分别为 100、200、300、400、500、600 bp。

Fig. 2 Methylation status of methylated locus *H19-5* of imprinted gene *H19*

A~C: PCR results of methylated locus *H19-5* of imprinted gene *H19* in 22 adult ES mouse and one normal adult control mice without restriction endonuclease disposal; D~I: PCR results of methylated locus *H19-5* of imprinted gene *H19* in 22 adult ES mouse and one normal adult control mice with restriction endonuclease disposal, and on the left of Marker the samples with *Hpa* disposal, and the rest with *Msp* disposal on the right of marker; J: PCR results of methylated locus *H19-5* of imprinted gene *H19* in 8 newborn dead ES mouse without restriction endonuclease disposal; K~L: PCR results of methylated locus *H19-5* of imprinted gene *H19* in 8 newborn dead ES mouse with restriction endonuclease disposal, and on the left of Marker with *Hpa* disposal, and the rest with *Msp* disposal on the right of marker; M: PCR results of methylated locus *H19-5* of imprinted gene *H19* in embryonic stem cells with different passage without restriction endonuclease disposal. The passages are 10, 15, 26, 33 in turn from left to right; N: PCR results of methylated locus *H19-5* of imprinted gene *H19* in embryonic stem cells with different passage with restriction endonuclease disposal, and on the left of Marker the samples with *Hpa* disposal, and the rest with *Msp* disposal on the right of marker. The passages are 10, 15, 26, 33 in turns from left to right. Mk is DNA marker I MD101, and its control bands are 100, 200, 300, 400, 500, 600 bp in turns.

3 讨论

通过四倍体胚胎补偿技术将小鼠 ES 细胞与四倍体胚胎嵌合而获得的完全由 ES 细胞发育而来的个体,即 ES 小鼠,是一种不同于一般核移植小鼠的克隆小鼠。它本身具备一般核移植小鼠所不具备的优势。但它也属于克隆动物的一种,因此我们推测其也应该存在一般核移植克隆动物普遍存在的发育异常相关问题。本研究采用甲基化敏感性限制性内切酶-PCR 技术,利用甲基化敏感性限制性内切酶对 DNA 甲基化区的不切割的特性,将 DNA 消化为大小不同的片段后再进行分析。个体水平所获得的 DNA 样本均来自鼠尾组织,所涉及的 ES 细胞来自同一细胞系,具有相对一致的遗传背景,且事先经过纯化处理。该甲基化检测方法相对简单,所研究的甲基化位点明确,实验结果容易分析,适合于研究相对单一 DNA 样本的单一位点的甲基化状态。我们选择了遗传背景相同(C57BL/6J × 129/sv)的正常成年对照小鼠、22 只成年 ES 小鼠和 8 只新生死亡的 ES 小鼠以及不同传代次数的 ES 细胞为实验材料,分别检测了其印迹基因 *H19* 的 5'非翻译区两个 CpG 位点的甲基化状态,探讨了印迹基因 *H19* 的甲基化状态与 ES 小鼠胚胎发育之间的关系。分析的结果表明,发育至成年的 ES 小鼠印迹基因 *H19* 所检测位点的甲基化状态与正常成年对照小鼠之间没有差异,而新生死亡的 ES 小鼠印迹基因 *H19* 所检测位点的甲基化状态与成年 ES 小鼠以及正常成年对照小鼠相比则存在明显差异。此外,我们推测 ES 细胞中印迹基因 *H19* 所检测位点的甲基化状态与成年 ES 小鼠以及正常成年对照小鼠之间可能存在差异。

基因组印迹是依靠单亲传递某种遗传性状的遗传规律。印迹基因是指源自双亲的两个等位基因中一方不表达或者很少表达的基因。印迹发生在配子形成过程中,当印迹基因传递给异性后代时,甲基化方式可完全逆转。在某些病理情况下,处于印迹状态的基因也可重新表达,引起一系列的病理生理改变,称为印迹丢失。由于印迹丢失与胚胎发育及肿瘤的发生有关,因此关于基因印迹的研究也日渐活跃。在哺乳动物基因组中,只有一小部分基因属于印迹基因,印迹基因作为动物基因组的一部分,适度表达对于胚胎正常生长、发育及其行为的发展是必要的。印迹基因的异常甲基化模式可能导致其表达异常并由此引起基因组不能正常分裂,最终将导致胚胎的植入后死亡。克隆动物存在大量的表型

异常及不同程度的发育缺陷,主要表现为胎儿和胎盘的过度增长,发育至成年的几率很低,而这恰恰与许多印迹基因发生异常的甲基化而表达失调导致的症状相似。因此,我们就提出了一个问题:克隆胚胎中出现的某些异常表型是否由某些印迹基因的异常表达造成。在 ES 小鼠胎儿中, *H19* 的表达水平大大降低,这种双等位基因表达抑制与 *H19* 上游区域的双等位基因的甲基化是相关的^[8,9]。对胚胎干细胞核移植克隆小鼠的印迹基因的表达状况研究表明:胚胎干细胞的基因组的表观遗传状态非常不稳定,大多数克隆小鼠印迹基因的表达都出现了异常,没有一个克隆胚胎被检测的基因是全部正常表达的^[10]。2003 年, Ogawa 等^[11]也发现了胚胎干细胞克隆小鼠中 8 个印迹基因存在印迹中断的问题,他们指出 *H19* 和 *IGF2* 的异常表达以及 *H19* 和 *IGF2R* 基因的异常甲基化状态,尤其是在交配后 12.5 天和 17.5 天的克隆小鼠胎儿以及交配后 17.5 天的克隆小鼠胎盘中印迹基因 *H19* 的表达量明显降低,检测其差异甲基化区发现其甲基化水平明显升高。在克隆羊中 *H19-IGF2* 和 *IGF2R* 基因时同样发现了 *IGF2R* 第 2 个内含子的 DMR 区域和 *H19* 上游含有多个 CTCF 结合位点的 DMR 区域存在异常的甲基化状态^[12], Mann 等^[13]也发现了 *H19* 和 *IGF2* 在克隆小鼠的胚胎和胎盘中的异常表达以及 *H19* 和 *Snprn* 基因的 DMR 区域的异常甲基化状态。因此可以推断,重新编程的 DNA 序列异常,可以导致克隆胚胎的发育异常,特别是当重新甲基化与细胞核的重组和细胞分化相联系的时候^[14]。大多数克隆胚胎的发育终止于胚胎附植前后的各个阶段,即使发育至妊娠期末的胎儿也经常会出许多畸形。

本文的研究结果显示出了印迹基因 *H19* 两个待测甲基化位点在正常成年小鼠、成年 ES 小鼠、新生死亡 ES 小鼠以及 ES 细胞中的甲基化状态。就个体水平而言,导致正常成年小鼠和成年 ES 小鼠与新生死亡 ES 小鼠之间印迹基因 *H19* 甲基化状态存在差异的原因有很多, ES 细胞和小鼠附植前胚胎的体外培养和操作,体外培养时所使用操作液和培养基的成分差异以及培养过程中所产生的有害物质的不断积累,这些都有可能造成基因组印迹出现异常和胚胎发育异常,甚至死亡^[15-17]。从细胞水平来看, ES 细胞基因组在经过限制性内切酶处理后的 PCR 扩增产物中出现了很多非目的条带并不能证明目标位点的甲基化状态发生了变化。事实上,早在 2001 年研

究人员就发现ES细胞基因组极端不稳定的表观遗传状态会导致ES小鼠中印迹基因表达出现异常,最终表现出个体的发育缺陷^[18]。因此我们推断,可能是由于ES细胞本身存在的不稳定的表观遗传状态或者是其异常的甲基化模式对PCR反应过程中的引物特异性造成一定的影响,从而导致了这种结果的出现。至于ES细胞印迹基因 $H19$ 所检测位点的甲基化状态究竟变化与否还有待于我们进一步去研究探讨。ES小鼠是完全由ES细胞发育而来的个体,如果ES细胞本身就存在印迹基因表达异常的问题,那么由其发育得到的个体就极有可能保留了这种异常,那么个体最终表现出来的各种发育缺陷,甚至死亡的现象也就成为一种必然。由此看来,ES细胞基因组的表观遗传状态对ES小鼠的胚胎发育是至关重要的。ES细胞基因组本身极端不稳定的表观遗传状态导致了ES小鼠印迹基因的异常表达和胚胎发育缺陷,这一结论恰好可以作为我们关于印迹基因 $H19$ 的甲基化状态在大多数新生死亡ES小鼠(5/8)中存在异常的研究结果的一种可能的解释。

参考文献(References):

- [1] Li XY, Wei W, Yong J, Jia Q, Yu YS, Di KQ. The genetic heterozygosity and fitness of tetraploid embryos and embryonic stem cells are crucial parameters influencing survival of mice derived from embryonic stem cells by tetraploid embryo aggregation. *Reproduction*, 2005, 130(1): 53–59. [\[DOI\]](#)
- [2] Li XY, Yu YS, Wei W, Yong J, Yang J, You JF, Xiong XR, Qing TT, Deng HK. Simple and efficient production of mice derived from embryonic stem cells aggregated with tetraploid embryos. *Mol Reprod Dev*, 2005, 71(2): 154–158. [\[DOI\]](#)
- [3] Eggan K, Akutsu H, Loring J, Jackson-Grusby L, Klemm M, Rideout WM 3rd, Yanagimachi R, Jaenisch R. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(11): 5949–5951. [\[DOI\]](#)
- [4] Bartolomei MS, Zemel S, Tilghmann BM. Parental imprinting of the mouse $H19$ gene. *Nature*, 1991, 351(6322): 153–155. [\[DOI\]](#)
- [5] Charalambous M, Menhenniott TR, Bennett WR, Kelly SM, Dell G, Dandolo L, Ward A. An enhancer element at the $Igf2/H19$ locus drives gene expression in both imprinted and non-imprinted tissues. *Dev Biol*, 2004, 271(2): 488–497. [\[DOI\]](#)
- [6] Angiolini E, Fowden A, Coan P, Sandovici I, Smith P, Dean W, Burton G, Tycko B, Reik W, Sibley C, Constância M. Regulation of placental efficiency for nutrient transport by imprinted genes. *Placenta*, 2006, 24: 612–615.
- [7] Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(1): 21–32. [\[DOI\]](#)
- [8] Dean W, Bowden L, Aitchison A, Klose J, Moore T, Meneses JJ, Reik W, Feil R. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. *Development*, 1998, 125(12): 2273–2282.
- [9] Deng T, Kuang Y, Zhang D, Wang L, Sun R, Xu G, Wang Z, Fei J. Disruption of imprinting and aberrant embryo development in completely inbred embryonic stem cell-derived mice. *Dev Growth Differ*, 2007, 49(7): 603–610.
- [10] Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Friedman A, Hochedlinger K, Yanagimachi R, Lander ES, Golub TR, Jaenisch R. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 12889–12894. [\[DOI\]](#)
- [11] Ogawa H, Ono Y, Shimosawa N, Sotomaru Y, Katsuzawa Y, Hiura H, Ito M, Kono T. Disruption of imprinting in cloned mouse fetuses from embryonic stem cells. *Reproduction*, 2003, 126(4): 549–557. [\[DOI\]](#)
- [12] Young LE, Schnieke AE, McCreath KJ, Wieckowski S, Konfortova G, Fernandes K, Ptak G, Kind AJ, Wilmut I, Loi P, Feil R. Conservation of $IGF2-H19$ and $IGF2R$ imprinting in sheep: effects of somatic cell nuclear transfer. *Mech Dev*, 2003, 120(12): 1433–1442. [\[DOI\]](#)
- [13] Mann MR, Chung YG, Nolen LD, Verona RI, Latham KE, Bartolomei MS. Disruption of imprinted gene methylation and expression in cloned preimplantation stage mouse embryos. *Biol Reprod*, 2003, 69(3): 902–914. [\[DOI\]](#)
- [14] Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001, 293(5532): 1089–1093. [\[DOI\]](#)
- [15] Khosla S, Dean W, Brown D, Reik W, Feil R. Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biol Reprod*, 2001, 64(3): 918–926. [\[DOI\]](#)
- [16] Baqir S, Smith LC. Growth restricted *in vitro* culture conditions alter the imprinted gene expression patterns of mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells*, 2003, 3(5): 199–212. [\[DOI\]](#)
- [17] Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM. Differential effects of culture on imprinted $H19$ expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod*, 2000, 62(6): 1526–1535. [\[DOI\]](#)
- [18] Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM 3rd, Biniszkiewicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, 2001, 293(5527): 95–97. [\[DOI\]](#)