

老龄动物卵母细胞表观遗传修饰的改变

王丹秋 刘红林*

(南京农业大学动物科技学院 南京 210095)

摘要: 卵母细胞退化是衰老造成母源性生育力下降的主要因素。退化的卵母细胞通常表现为细胞周期阻滞、减数分裂紊乱以及一些基因的表达异常,表观遗传修饰在此过程中亦发生了显著改变。本文介绍了卵子发生过程中的表观遗传修饰调控机理,综述了卵母细胞退化的表现,着重探讨了卵母细胞退化过程中表观遗传修饰的改变。

关键词: 卵母细胞退化;表观遗传修饰;细胞周期阻滞;减数分裂紊乱;基因异常表达

中图分类号:Q952 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)03-140-05

Epigenetic Modification in Oocytes from Aged Animals

WANG Dan-Qiu LIU Hong-Lin*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Oocyte degeneration is the most important factor which causes maternal infertility in aged woman. The degenerated oocytes are usually characterized by cell cycle arrest, meiotic disruption and abnormal gene expression. Epigenetic modification is also markedly changed. This mini-review introduces the regulatory mechanism of epigenetic modification during oogenesis and epigenetic modification during oocyte degeneration.

Key words: Oocyte degeneration; Epigenetic modification; Cell cycle arrest; Meiosis; Gene expression

衰老是真核生物中普遍存在的一种现象,由于衰老而导致的卵母细胞退化是造成雌性不孕的主要因素^[1,2]。然而目前关于卵母细胞退化及其调控机制的研究仍然不够透彻,关于卵母细胞退化的原因有两种假说:一种认为细胞内外的一些因子损坏了细胞内的某些物质,促成了有害物质的产生^[3]。如退化的卵母细胞中活性氧(ROS)的累积增加,导致了包括DNA、蛋白和脂质的氧化损伤,并最终诱导了细胞周期停滞及减数分裂中非整倍体的产生^[4]。另一种假说则倾向认为基因组重序(genome-wide reprogramming)或表观遗传修饰(epigenetic modification)异常变化引起基因表达的改变导致衰老,即表观遗传修饰调控了衰老。近来的一些研究也为后一种假说提供了新证据^[5]。

1 卵子发生过程中的表观遗传修饰调控

哺乳动物的卵子发生包括三个时期,增殖期、生长期与成熟期。在哺乳动物出生后大约第5d,卵母细胞阻滞于第一次减数分裂前期的双线期。该阻滞一直维持到性成熟,直到LH刺激减数分裂的重新开始。在小鼠卵巢中,卵母细胞的第一次生长和分化几乎是同时的,这又恰好与基因组建立母源印迹的时间一致。这

基金项目 国家自然科学基金项目(No.30371034);

* 通讯作者, E-mail: liuhonglin@263.net;

第一作者介绍 王丹秋,女,硕士研究生,研究方向:动物遗传与育种, E-mail: wdaqj@tom.com

收稿日期:2006-10-12, 修回日期:2007-03-09

种表观遗传修饰能够通过非 DNA 序列的变化来影响基因的表达,并最终使哺乳动物基因组带有一个胚胎发育所必须的性别特异性的标记(即基因组印记)^[6,7]。

初级卵母细胞在生长、发育过程中积累各种营养物质,同时进行卵质分化及结构建造、合成和贮存胚胎早期发育所需各类信息。在此期间卵母细胞染色质亦发生了重构。小鼠卵母细胞中的染色质最初是去浓缩化的,称为 NSN。随着生长和分化,卵母细胞的细胞核经历了一个动力学的变化,染色质逐渐变成浓缩状态,在核仁周围形成一个异染色区,此时称为 SN,亦称核球^[6]。在人与小鼠的卵子中,染色质结构大规模的改变与卵母细胞基因组的修饰密切相关。这种染色质结构(在染色体水平上)的变化对于生长卵母细胞获得减数分裂与发育的全能性是必须的。

在哺乳动物的卵子发生过程中,基因组的表观遗传学修饰主要有 DNA 甲基化与组蛋白的各种化学修饰,这些修饰使得染色质结构发生了改变,进而影响基因的表达^[7],有利于卵子的成熟并为受精做好充分的准备。

2 老龄动物卵母细胞的退化及其表观遗传修饰的改变

女性的生育能力随着年龄的增长而下降, Hassold 等^[8]研究认为其主要原因是卵母细胞的质量低下、数量下降,即发生了与年龄相关的卵母细胞的退化。由于老龄动物的卵母细胞恢复减数分裂前在卵巢内停滞很长时间,在这漫长的时间里,各种各样内在的、外源的因素可以引起与正常卵母细胞不同的表观遗传修饰调控,进而诱发细胞周期阻滞、减数分裂紊乱及基因表达异常等^[8,9]。

2.1 细胞周期阻滞及其表观遗传修饰调控

细胞周期停滞是细胞退化的主要特征,导致细胞周期停滞的因素有很多,可集中为两个方面:首先,衰老的卵母细胞缺少一些细胞周期的检验点^[2]。研究发现衰老细胞停滞于 G1 期,而不能顺利进入 S 期。卵母细胞也是一样,

Semsei^[10]等研究发现衰老的卵母细胞可能缺少 G0-G1 与 G1-M 期的检验点。Ryan 等^[11]在研究与衰老相关的组蛋白乙酰化时发现,组蛋白的乙酰化在老化个体的细胞中下降,而组蛋白与 DNA 的比率却没有随着年龄的改变而发生变化。其次,一些细胞因子参与了细胞周期的调控,直接或间接导致了周期阻滞。衰老细胞中多分子的改变表明细胞存在多层次的生长调控,以至于任一途径受阻,可能引起其他途径的开放,单个基因并不能诱使衰老细胞的细胞周期阻滞,表观遗传修饰在其中发挥重要而复杂的作用。如细胞周期蛋白 Cyclin A,它的表达受到 P53、P21、CDKs、Rb、E2F 等上游因子的多重调控,在正常情况下,CDKs 促进 Rb 蛋白的磷酸化,进而调控一种转录因子 E2F,并调控 Cyclin A 的表达。P53(一种抑癌基因,它的表达受到 DNA 甲基化的影响)正调控 P21,抑制 CDKs 的表达,进而阻断下游通路^[12]。

组蛋白修饰贯穿了整个细胞周期。在有丝分裂中,细胞周期信号激活组蛋白 H3 激酶,使得组蛋白 H3 丝氨酸 10 位点 N 端磷酸化,促成染色体浓缩。四膜虫(Tetrahymena)中组蛋白 H3 丝氨酸 10 位点的突变引起异常的染色体分离,表明 H3 磷酸化在减数分裂与有丝分裂中十分重要。此外,在细胞周期的不同时期,组蛋白的乙酰化与甲基化受到不同的调节^[13]。譬如,酵母中组蛋白乙酰化的机制在细胞周期的不同时期发生改变,有丝分裂中 GCN5(一种组蛋白乙酰转移酶)的活性需要 SWI/SNF 染色体重塑蛋白,而间期 GCN5 对基因表达的调控却不依赖于该蛋白。

2.2 卵母细胞的减数分裂异常及其表观遗传修饰的改变

2.2.1 卵母细胞的减数分裂异常 减数分裂异常是卵母细胞退化的另一显著特征。低质量的卵母细胞影响减数分裂中染色体的分离,导致胚胎在附植前后丢失或产生三倍体,进而影响人类及其他哺乳动物的生育。在人类,现在已经很清楚地认识到随着年龄的增加,卵母细胞及胚胎的非整倍体亦显著增加,多数与母亲

年龄有关的非整倍体被认为来源于染色体的不分离^[14]。

首先, 老龄动物的卵母细胞在第一次减数分裂(M I)时出现异常。Liu 等^[15]将卵母细胞体外培养时发现, 在相同的培养条件下, 老龄鼠的卵母细胞在第一次减数分裂时染色体错误分离的频率要比年轻鼠高。此外, Liu 等^[16]发现, 体外培养的老龄动物卵母细胞比年轻动物的卵母细胞更快地到达第一次减数分裂的后期。造成第一次减数分裂异常的原因很多。其一, 同源染色体的联会异常。有研究发现, 含非整倍体的小鼠雌性生殖细胞中缺失减数分裂特异性蛋白 SCP3, 该蛋白对于减数分裂过程中染色体结构的完整性与染色体交叉是必需的^[17]。其二, 着丝粒的分离出现偏差。Angell^[18]发现高龄妇女的卵母细胞在 M I 期时着丝粒经历了过早的成熟分离。而且, Watanabe 等^[19]在酵母中也发现, Rec8 蛋白的一种隐性突变体使姐妹染色单体在 M I 期就发生分离。

其次, 老龄动物卵母细胞在第二次减数分裂时也出现异常。Liu^[16]等发现 M II 期结束时非整倍体的比率在老龄鼠中明显升高, 这表明染色体的错误分离在减数分裂的 I 和 II 期均有发生, 而且确实与母亲年龄相关。此外, Battaglia 与 Volarcik^[20,21]等发现, 与年轻女性的卵母细胞相比, 中老年妇女的 M II 期卵母细胞纺锤体更松散, 而且染色体与纺锤体在不同的位点无规则地相连。

2.2.2 组蛋白乙酰化与老龄动物卵母细胞的

减数分裂 组蛋白修饰主要包括乙酰化、甲基化及磷酸化, 三者相互作用共同调控减数分裂并能稳定维持这种调控, 乙酰化是卵母细胞中最重要的组蛋白修饰之一。ATRX 是染色质修饰蛋白 SWI/SNF 家族成员, 当它功能受阻时, 在中期赤道板上染色体排列异常。减数分裂中组蛋白的去乙酰化有利于着丝粒异染色质区与 ATRX 的结合^[22]。因此组蛋白去乙酰化对于卵母细胞的分化及染色体的分离是必需的。在整个减数分裂过程中都有组蛋白的甲基化, 而且这种甲基化的维持需要 HP1 结合在着丝粒区域。此外, 在减数分裂中组蛋白丝氨酸磷酸化与赖氨酸的甲基化相互拮抗, 共同调节一些减数分裂相关蛋白^[23]。

在退化的卵母细胞中发生了与减数分裂相关的乙酰化水平的改变, 尽管目前对卵母细胞退化中组蛋白修饰改变的研究尚不透彻, 学者们还是找到了许多相关的直接或间接证据。Akiyama 等^[24]最新发现, 老龄鼠卵母细胞在减数分裂中组蛋白去乙酰化的能力降低, 但并没有消失。此外, 在年轻鼠的卵母细胞中加入组蛋白去乙酰化酶的抑制剂 TSA, 导致胚胎非整倍体的产生。这些现象暗示, 老龄鼠卵母细胞减数分裂中组蛋白乙酰化使得产生非整倍体胚胎的可能性增大。

此外, 在我们的实验中观察到老龄鼠 GV 期卵的 H4K12 的乙酰化水平要显著低于年轻鼠, 但这种变化仅存在于某些老龄个体中(图 1)。

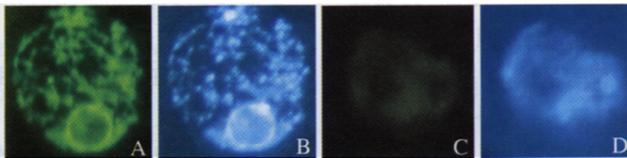


图 1 年轻鼠与老龄鼠 GV 期 H4K12 的乙酰化

Fig. 1 Ach4K12 in GV oocytes of young mouse and old mouse

A. 年轻鼠 GV 期卵母细胞中 H4K12 的乙酰化; B 和 D. DAPI 染核; C. 老龄鼠 GV 期卵母细胞中 H4K12 的乙酰化。

A. Ach4K12 in GV oocytes of young mouse; B & D. DAPI staining was used to mark

the DNA of the cells; C. Ach4K12 in GV oocytes of old mouse.

2.3 卵母细胞中基因的表达及其表观遗传修饰的改变

2.3.1 卵母细胞中基因的表达 现在发现了许多与卵母细胞退化相关的基因。这些基因包括 *GDF-9*、*Fac*、*Atr/Atm*、*Mlh1*、*Zfx*、*ER*、*Cyclin D2*、*Connexin 37*、*bcl-2*、*ob*、*c-mos*、*p27*(*kip1*)、*C/ERPbeta*、*Hook*^[2,10]等,它们的特征表现为以下几个方面:①影响卵巢发育及卵泡成熟,如 *p27*[*Kip1*]*csfmop*,敲除这些基因将导致排卵数的下降,但有关的调控机理目前尚不清楚;②调控细胞周期并影响卵母细胞的减数分裂,如 *Atr/Atm*,它们分别定位于减数分裂中联会与非联会的染色体上,将它们敲除会导致偶线期/粗线期的阻滞。而缺少 *c-mos* 的卵母细胞则会产生异常的纺锤体及错误的染色体浓缩,最终导致卵母细胞 M II 期阻滞的失败,激活孤雌生殖;③对激素调控起作用,如 *ER* 等;④与染色体分离和微管骨架有关。Hamatani 等^[25]研究发现随着母亲年龄增大,*Cggbp1* 等与染色体分离及微管骨架有关的基因转录下降。

此外,Tatone 等^[26]研究发现老龄鼠卵母细胞中 MPF 与 MAPK 活性的降低均早于年轻鼠,这种现象对卵母细胞的退化尤其重要。其一,它可能诱导了细胞凋亡前信号通路的激活;其二,由于 Mos-MAPK 通路是调控卵母细胞减数分裂的重要途径^[27],低活性的 MAPK 与表达量下降的 *c-mos* 共同促成了异常纺锤体的产生及错误的染色体浓缩,进而导致老化卵母细胞中减数分裂的失败;其三,MPF 的活性下降使得卵细胞质不能提供充足的营养供细胞核成熟。其主要原因是,在细胞核移植中发现卵细胞质中存在的高活性的 MPF 为核重序提供了重要条件,如果将年轻鼠的 GV 期卵细胞核移植到老龄鼠的卵细胞质中,重构卵在减数分裂过程中仍然会有非整倍体产生^[28]。

2.3.2 卵母细胞基因表达中的表观遗传修饰 许多研究表明老龄动物的卵母细胞中基因的表达异常受到了表观遗传修饰的调控。DNA 甲基化改变了基因组的结构,从而直接影响了基因的表达。Zin^[29]等报道了与衰老相关的

DNA 甲基化状态的变化,随着年龄的增加,在不同品系牛的心、脑等不同组织中都会发生甲基化的降低,而且其降低程度呈年龄依赖关系。Hamatani 等^[25]通过基因芯片及 Q-PCR 的方法,发现在老龄动物的卵母细胞中 DNA 甲基转移酶相关蛋白 Dmap1 与 Dnmt3L 的表达水平下降,而 DNA 重新甲基化转移酶 Dnmt3b 的表达则上升,且组蛋白去乙酰化酶 hdac2 及与细胞衰老相关的组蛋白乙酰转移酶 Myst1 和 Mrgx 的表达也下降。这些研究表明,在老龄动物的卵母细胞中,染色质结构异常,表观遗传修饰作用不规则。

此外,卵母细胞的基因组还受到其他调控,染色质结构发生了功能性分化。研究表明,在多数细胞中,DNA 模板的活性及组蛋白的乙酰化随着年龄的增加而降低。Duncan 等^[30]在研究人的二倍体成纤维细胞时发现,所有细胞都发生了一个快速的乙酰化与去乙酰化。这种动力学变化在年轻鼠与老龄鼠中是相似的,而且核心组蛋白乙酰化的分布也相似。这些结果均表明除了组蛋白乙酰化外,还有其他的机制调控衰老细胞中染色质模板活性的变化。

3 结 语

人类以及其他高龄哺乳动物由于其卵子退化而造成流产或畸形胚的现象屡见不鲜,这也成为困扰医学界的一大难题。然而目前关于老龄动物卵母细胞表观遗传修饰改变的研究还不是很透彻,但是随着对表观遗传修饰研究的不断深入,以及衰老加速小鼠(senescence-accelerated mouse SAM)模型^[8]的建立,老龄动物卵母细胞表观遗传修饰改变的研究将逐渐透彻。最重要的是,希望能够找出导致卵母细胞退化的精确途径,结合分子生物学的手段,进而确立行之有效的方法来遏制卵母细胞的退化,从而解决高龄产妇由于其卵子退化而流产或形成畸形胚的这一医学难题。

参 考 文 献

[1] Alvin S T, Lim B S, Maurine F H, et al. Age-related decline in

- fertility: A link to degenerative oocytes? *Fertil Steril*, 1997 **68** (2): 265 ~ 271.
- [2] Eichenlaub R U. Genetics of oocyte ageing. *Maturitas*, 1998, **30**(2): 143 ~ 169.
- [3] Steuerwald N M, Steuerwald M D, Mailhes J B. Post-ovulatory aging of mouse oocytes leads to decreased MAD2 transcripts and increased frequencies of premature centromere separation and anaphase. *Mol Hum Reprod*, 2005 **11**(9): 623 ~ 630.
- [4] Agarwal A, Saleh R A, Bedaiwy M A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 2003 **79**(4): 829 ~ 843.
- [5] Stanislaw R, Burzynski. Gene silencing – a new theory of ageing. *Medical Hypotheses*, 2003 **60**(4): 578 ~ 583.
- [6] De La Fuente R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol*, 2006 **292** (1): 1 ~ 12.
- [7] Kim J M, Liu H, Tazaki M, et al. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J Cell Bio*, 2003 **162** (1): 112 ~ 123.
- [8] Hassold T, Chiu D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. *Hum Genet*, 1985 **70**(1): 11 ~ 17.
- [9] van Zonneveld P, Scheffer G J, Broekmans F J, et al. Do cycle disturbances explain the age-related decline of female fertility? Cycle characteristics of women aged over 40 years compared with a reference population of young women. *Hum Reprod*, 2003 **18**(3): 495 ~ 501.
- [10] Semsei I. On the nature of aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2000 **117**(1): 93 ~ 108.
- [11] Ryan J M, Cristofalo V J. Histone acetylation during aging of human cells in culture. *Biochem Biophys Res Comm*, 1972 **48** (4): 735 ~ 742.
- [12] 赵念玺, 陆士新. 细胞衰老与肿瘤. 癌症, 2004 **23**(10): 1 225 ~ 1 330.
- [13] Fu M, Wang C, Wang J, et al. Acetylation in hormone signaling and the cell cycle. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002 **13**(3): 259 ~ 276.
- [14] Vialard F, Petit C, Berqere M, et al. Evidence of a high proportion of premature unbalanced separation of sister chromatids in the first polar bodies of women of advanced age. *Hum Reprod*, 2006 **21**(5): 1 172 ~ 1 178.
- [15] Liu L, Keefe D L. Ageing-associated aberration in meiosis of oocytes from senescence-accelerated mice. *Hum Reprod*, 2002, **17**(10): 2 678 ~ 2 685.
- [16] Liu H, Chang H C, Zhang J, et al. Metaphase II nuclei generated by germinal vesicle transfer in mouse oocytes support embryonic development to term. *Hum Reprod*, 2003 **18**(9): 1 903 ~ 1 907.
- [17] Yuan L, Liu J G, Hoja M R, et al. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science*, 2002 **296**(10): 1 115 ~ 1 118.
- [18] Angell R. First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. *Am J Hum Genet*, 1997 **61**(2): 23 ~ 32.
- [19] Watanabe Y, Nurse P. Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature*, 1999, **400** (6 743): 461 ~ 464.
- [20] Battaqlia D E, Klein N A, Soules M R. Changes in centrosomal domains during meiotic maturation in the human oocyte. *Mol Hum Reprod*, 1996 **2**(11): 845 ~ 851.
- [21] Volarcik K, Sheehan L, Goldfarb J, et al. The meiotic competence of *in vitro* matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Hum Reprod*, 1998 **13**(1): 154 ~ 160.
- [22] Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*, 2005 **434**(7 033): 583 ~ 589.
- [23] Wei Y, Yu L, Bowen J, et al. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, 1999 **97**(1): 99 ~ 109.
- [24] Akiyama T, Nagata M, Aoki F. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *PNAS*, 2006 **103**(19): 7 339 ~ 7 344.
- [25] Hamatani T, Falco G, Carter M G, et al. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet*, 2004 **13**(19): 2 263 ~ 2 278.
- [26] Tatone C, Carbone M C, Gallo R, et al. Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory *in vitro* culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2. *Biol Reprod*, 2006 **74**(2): 395 ~ 402.
- [27] Bhatt R R, Ferrell J E Jr. The protein kinase p90 Rsk as an essential mediator of cytoskeletal factor activity. *Science*, 1999, **286**(5 443): 1 362 ~ 1 365.
- [28] Cui L B, Huang X Y. Transfer of germinal vesicle to ooplasm of young mice could not rescue ageing-associated chromosome misalignment in meiosis of oocytes from aged mice. *Hum Reprod*, 2005 **20**(6): 1 624 ~ 1 631.
- [29] Zin'kovskaia G G, Berdyshev G D, Vaniushin B F. Tissue-specific decrease and change in the character of DNA methylation in cattle with aging. *Biokhimiia*, 1978 **43**(10): 1 883 ~ 1 892.
- [30] Duncan M R, Robinson M J, Dell'Orco R T. Histone acetylation and deacetylation in senescent human diploid fibroblasts. *Mech Ageing Dev*, 1984 **27**(2): 173 ~ 182.