

# 多能性转录因子 OCT4 和 SOX2 在体外发育的小鼠 2-细胞胚胎 的表达与定位

郝国礼 王淑梅 刘雅贤 王海洋 于海泉\*

内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学及生物技术教育部重点实验室 呼和浩特 010070

**摘要:** 为探讨多能性转录因子 OCT4 和 SOX2 在昆明小鼠 (*Mus musculus*) 2-细胞胚胎发育过程中与 2-细胞胚胎阻滞发生的相关性, 本研究应用实时荧光定量 PCR 技术检测了小鼠卵母细胞及在 M16 培养液中培养的不同发育阶段体外受精胚 *Oct4* 和 *Sox2* 基因的表达, 并利用实时荧光定量 PCR 和免疫荧光技术比较了 2-细胞胚、2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚的 OCT4 和 SOX2 的表达与定位。采用 ANOVA 对实验所得的数据进行分析,  $P < 0.05$  被认为是具有显著性差异。研究结果显示, 2-细胞胚只有 24.8% 发育成 4-细胞胚, 75.2% 的 2-细胞胚发生了阻滞。*Sox2* 和 *Oct4* 的 mRNA 在 MII 期卵母细胞、原核胚、2-细胞胚、4-细胞胚、桑椹胚和囊胚中都有表达。*Oct4* mRNA 的表达水平在 4-细胞胚显著高于 2-细胞胚和 2-细胞阻滞胚 ( $P < 0.05$ ), *Sox2* mRNA 的表达水平在 2-细胞胚显著高于 2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚 ( $P < 0.05$ ), 而后两者之间没有差异 ( $P < 0.05$ )。OCT4 蛋白在 2-细胞胚和 4-细胞胚中与核共定位, 但在 2-细胞阻滞胚中弥散存在于胞质中。SOX2 蛋白在以上 3 类胚胎中始终定位于细胞核。上述结果提示, 转录因子 OCT4 和 SOX2 的表达和定位与小鼠 2-细胞胚胎发育阻滞相关, 母源性 SOX2 表达的维持对胚胎合子基因组激活 (ZGA) 的发生具有重要作用, 母源性 OCT4 的异常定位可能影响了合子基因组激活相关基因的激活, 而合子中 *Oct4* 的表达影响合子基因组激活后胚胎的发育。

**关键词:** 小鼠胚胎; 合子基因组激活; 2-细胞阻滞; OCT4; SOX2

**中图分类号:** Q952 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 02-176-09

## The Expression and Localization of Pluripotency Transcription Factors OCT4 and SOX2 in 2-Cell Mouse Embryos Developed *In Vitro*

HAO Guo-Li<sup>①</sup> WANG Shu-Mei<sup>①</sup> LIU Ya-Xian<sup>①</sup> WANG Hai-Yang<sup>①</sup> YU Hai-Quan<sup>①\*</sup>

*The Key Laboratory of Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Ministry of Education,*

*Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China*

**基金项目** 内蒙古自然科学基金重大项目 (No. 2012ZD04), 国家自然科学基金项目 (No. 30860185);

\* 通讯作者, E-mail: haiquan\_yu@163.com;

**第一作者介绍** 郝国礼, 男, 硕士研究生; 研究方向: 哺乳动物生殖生物学; E-mail: haoguoli123@163.com.

收稿日期: 2014-07-07, 修回日期: 2014-11-21 DOI: 10.13859/j.cjz.201502003

**Abstract:** The key scientific problem: the pluripotency transcription factors OCT4 and SOX2 are related to 2-cell block, which usually occurs in mouse (*Mus musculus*) embryos cultured *in vitro*. The main research methods: the expression of *Oct4* and *Sox2* was detected by real-time quantitative PCR in oocytes and embryos which were cultured in M16 medium. Meanwhile, the expression and localization of OCT4 and SOX2 were compared among 2-cell stage embryos, 2-cell arrested embryos and 4-cell stage embryos by real-time quantitative PCR and immunofluorescence analysis. Statistical analyses of real-time quantitative PCR results were conducted using an analysis of variance (ANOVA), and a difference of  $P < 0.05$  was considered significant. The research results: 24.8% of 2-cell embryos reached the 4-cell stage, and 75.2% of 2-cell embryos were blocked (Fig. 1). *Oct4* and *Sox2* were expressed throughout MII oocytes, pronuclear zygotes, 2-cell embryos, 4-cell embryos, morulae and blastocysts (Fig. 2a, b). *Oct4* was expressed higher in 4-cell embryos than in 2-cell embryos and 2-cell arrested embryos (Fig. 2c) ( $P < 0.05$ ). *Sox2* was expressed higher in 2-cell embryos than in 4-cell embryos and 2-cell arrested embryos ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference between 4-cell embryos and 2-cell arrested embryos (Fig. 2d) ( $P < 0.05$ ). OCT4 was co-localized with chromatin in 2-cell and 4-cell nuclei, while diffused in cytoplasm instead of in nuclei in 2-cell arrested embryos (Fig. 3a). SOX2 was co-localized with chromatin in all groups (Fig. 3b). The research conclusion: the expression and localization of OCT4 and SOX2 is related to 2-cell block in mouse embryos. The stable expression of maternal SOX2 plays an important role during zygotic genome activation (ZGA). The abnormal localization of maternal OCT4 may affect the activation of ZGA-related genes; moreover, the expression of zygotic *Oct4* may impact embryo development after ZGA.

**Key words:** Mouse embryo; Zygotic genome activation (ZGA); 2-cell block; Octamer-binding transcription factor 4 (OCT4); Sex determining region Y box protein 2 (SOX2)

哺乳动物受精后胚胎的早期发育主要依赖于卵母细胞成熟过程中储存的母源性 mRNA 和蛋白质,随着母源性 mRNA 和蛋白质的消耗与降解,胚胎继续发育的维持依赖于合子基因组激活 (zygotic genome activation, ZGA) 后的转录产物,即完成母源型调控向合子型调控的转变 (Evsikov et al. 2009, Shin et al. 2010),胚胎细胞获得发育的全能性。

合子基因组激活 (ZGA) 对胚胎的正常发育至关重要,在不同种属的哺乳动物, ZGA 发生的时间有所不同,小鼠 (*Mus musculus*) 合子基因组在 1-细胞胚胎的 S/G2 转换期出现转录的次峰,而转录的主峰发生在 2-细胞胚胎的 G2 期,兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 的 ZGA 发生在 8 ~ 16-细胞期,猪 (*Sus domesticus*) 的 ZGA 则发生于 4-细胞阶段,而牛 (*Bos taurus*) 的 ZGA 发生在 8 ~ 16-细胞阶段 (Li et al.

2013)。研究表明, ZGA 受阻是造成胚胎发育阻滞的主要原因, ZGA 发生的时间与体外受精胚胎发育阻滞的时间常常是一致的。用 M16 等简单培养基体外培养近交系小鼠受精卵时,胚胎发育常停滞于 2-细胞时期,即发生“2-细胞阻滞” (Goddard et al. 1983),小鼠胚胎 2-细胞阻滞的机理还有待研究。

研究发现,合子基因组激活 (ZGA) 可能受母源因子调控,其中参与 ZGA 调控的母源因子主要有 *Mater*、*Padi6*、*Zar1*、*Npm2*、*Atg5*、*Ago2*、*Zag1*、*Zar1l*、*Oct4* 和 *Sox2* 等,这些基因编码蛋白质的缺失导致胚胎发育阻滞在卵裂阶段,这与放线菌酮抑制 ZGA 起始的结果是一致的 (Li et al. 2013)。转录因子 OCT4 和 SOX2 在胚胎干细胞基因调控网络中的作用已被广泛研究。先前的研究表明,在斑马鱼 (*Danio rerio*) 的早期胚胎发育过程中, *Nanog*、*Oct4* 和 *SoxB1*

能够调控合子基因组激活的发生, 这些多能因子直接调控数百个与胚胎发育相关基因的表达, 构成第一波合子基因转录, *Nanog*、*Oct4* 和 *SoxB1* 的缺失导致 ZGA 受阻和发育阻滞 (Lee et al. 2013)。OCT4 可以在合子基因组转录之前结合到基因的调控位点上, 其处于 ZGA 调控网络的核心位置, 并使多能性调控和 ZGA 调控联系在一起 (Leichsenring et al. 2013)。

在小鼠植入前胚胎发育过程中, OCT4 和 SOX2 的作用还不是很清楚。先前的研究表明, OCT4 可以调节 2-细胞期基因的表达 (Foygel et al. 2008), 同时多能因子 *Oct4*、*Sall4* 和 *Nanog* 基因可以形成一个严密的调控网络来调节植入前胚胎的发育 (Tan et al. 2013), 并与 *Sox2* 一起来限定囊胚谱系的建成 (Keramari et al. 2010, Frum et al. 2013)。*Sox2* 在受精卵、卵裂球、内细胞团、生殖细胞中都有表达, *Sox2* 无义突变的胚胎没有发育成外胚层的能力, 在发育 6.5 d 后死亡 (Avilion et al. 2003)。在 2-细胞期敲除 *Sox2*, 胚胎不能越过桑椹胚阶段 (Keramari et al. 2010)。

本研究通过比较昆明小鼠体外受精胚胎在 M16 培养液中不同发育阶段 *Oct4* 和 *Sox2* 基因的表达, 以及比较小鼠 2-细胞胚、2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚的 OCT4 和 SOX2 的表达与定位, 旨在探讨多能性转录因子 OCT4 和 SOX2 对小鼠胚胎发育阻滞的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

昆明系小鼠雌性 4~5 周龄、雄性 8 周龄, 由内蒙古大学实验动物中心提供。在控光 (光照 14 h, 6:00~20:00 时; 黑暗 10 h, 20:00~翌日 6:00 时) 条件下常规饲养, 雄鼠单笼饲养。

### 1.2 实验试剂

主要化学试剂为 Sigma 公司产品; D-PBS (Hyclone); RNAiso Reagent (TaKaRa); 反转录试剂盒 (TaKaRa); 实时定量 PCR 试剂盒 (TaKaRa); M16 培养液 (Sigma); 孕马血清

激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)、人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) (宁波第二激素厂); SOX2 抗体 (Millipore); OCT4 抗体 (SanTa); FITC 标记的驴抗兔 IgG (Invitrogen)。

### 1.3 小鼠超排处理及卵母细胞和胚胎的获得

**1.3.1 MII 期卵母细胞的获得** 雌鼠腹腔先注射 PMSG 48 h 后, 再注射 hCG, 注射 hCG 14~16 h 后, 颈椎脱臼处死小鼠, 打开腹腔取输卵管膨大部, 置于 MEM-PVP 体外操作液中, 并用眼科镊将膨大部撕开, 卵丘卵母细胞复合体会自行流出。将卵丘卵母细胞复合体置于 MEM-PVP 稀释的透明质酸酶中, 避光脱卵丘细胞, 清洗数次, 移入 M16 培养液中, 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱恢复 30 min, 即可收集。

**1.3.2 体外受精胚胎的获得** 颈椎脱臼法处死雄鼠, 用针挑取精子, 置于获能滴中, 37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 1.5~2.0 h。之后, 颈椎脱臼处死雌鼠, 打开腹腔取输卵管膨大部, 用眼科镊将膨大部撕开, 将卵丘卵母细胞复合体置于受精滴中, 加入孵育好的精子。37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6 h 后更换到平衡好的 M16 滴中。培养微滴内挑取形态良好的原核期 (pronuclear stage, PN 期) 细胞、2-细胞、4-细胞胚、桑椹胚和囊胚, 用于提取 RNA 或免疫荧光染色。

### 1.4 实时荧光定量 PCR

本实验收集小鼠不同时期胚胎各 100 枚, 使用 RNA 提取试剂盒 RNA isolation kit (TaKaRa) 参照说明书提取总 RNA, 之后采用反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) 合成 cDNA, 然后分别使用 *Oct4* 和 *Sox2* 特异性引物进行 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (TaKaRa) 荧光定量 PCR, 以 *Gapdh* 为内参基因 (表 1)。本实验使用两步法进行 PCR, 其反应过程为 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 5 s、60°C 退火 31 s, 扩增 40 个循环。每个样本 3 个平行, 对照组表达量视为 1, 计算出目的基因相对于对照组的表达量。

### 1.5 免疫荧光染色及观察

胚胎经 PBS (含 3% BSA) 清洗 3 次后, 在室温条件下用含 1% PFA 和 0.2% TritonX-100 的 PBS 同时固定和渗透处理 1 h, 再移入 PBS (含 3% BSA) 中 4℃ 过夜; 用 PBS (含 3% BSA) 清洗 6 次, 每次 5 min, 置于用 PBS (含 3% BSA) 稀释的抗兔 OCT4 和 SOX2 一抗中, 4℃ 孵育过夜; 次日用 PBS (含 0.3% BSA) 清洗胚胎 6 次, 每次 5 min, 置于用 PBS (含 0.3% BSA) 稀释的荧光二抗驴抗兔 IgG (H+L) (1:1000, Invitrogen) 中, 室温处理 1 h; 用 PBS (含 0.3% BSA) 清洗 6 次, 每次 5 min, 之后用 DAPI (2.5 μg/ml) 复染核 20 min; 最后封片, 在激光共聚焦显微镜下观察染色情况, 并拍照。同时用荧光二抗代替一抗作为对照。

### 1.6 统计学分析

每组实验均至少重复 3 次, 采用 ANOVA 和 Student's *t*-test 对实验所得的数据进行分析,  $P < 0.05$  被认为是具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 小鼠胚胎 2-细胞发育阻滞的观察

在 M16 培养液培养条件下, 昆明小鼠胚胎体外受精卵从 2-细胞胚发育至 4-细胞胚时出现了明显的发育阻滞现象。一般情况下, 小鼠胚胎发育到 2-细胞胚和 4-细胞胚的时间分别为受精后的 20~22 h 和 37~38 h。实验 24 h 统计的 2-细胞胚只有 24.8% 在 48 h 后发育成 4-细胞胚, 75.2% 的 2-细胞胚发生了阻滞, 形成了 2-细胞阻滞胚 (图 1)。

### 2.2 Oct4 和 Sox2 基因在植入前各时期的表达

实验收集 MII 期卵母细胞、原核胚、2-细胞胚、4-细胞胚、桑椹胚、囊胚各 100 枚, 采用实时定量 PCR 检测 *Oct4* 和 *Sox2* 的 mRNA 的表达。*Oct4* 的 mRNA 在 MII 期卵母细胞、原核胚、2-细胞胚中稳定表达, 且没有显著性差异, 而在 4-细胞期胚 *Oct4* 的 mRNA 高表达, 与其他组相比具有显著性差异, 之后在桑椹胚和囊胚阶段显著下降, 与 4-细胞胚相比具有显著性差异。*Sox2* 的 mRNA 在原核胚的表达量显著高于 MII 期卵母细胞的表达量, 2-细胞胚的表达量又显著高于原核胚的表达量, 从 4-细胞胚开始其表达量降低, 与 2-细胞胚和原核胚相比具有显著性差异, 与 MII 期卵母细胞相比没有差异 (图 2)。

### 2.3 Oct4 和 Sox2 基因在 2-细胞胚、2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚中的表达

本实验在受精 24 h 后收集 2-细胞胚 100 枚, 48 h 后收集 2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚各 100 枚。采用实时定量 PCR 检测 *Oct4* 和 *Sox2* mRNA 的表达情况。4-细胞胚的 *Oct4* 表达水平显著高于 2-细胞胚和 2-细胞阻滞胚的表达水平, *Oct4* mRNA 在 2-细胞胚中的表达量显著高于 2-细胞阻滞胚中的表达量。*Sox2* 的 mRNA 在 2-细胞胚中的表达量显著高于在 2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚中的表达量, 而 2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚之间没有显著性差异 (图 2)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 The primer sequence of real-time PCR

基因名称 Gene name	引物序列 5' - 3' Primers sequence 5' - 3'	产物大小 (bp) Product length
<i>Oct4 F</i>	CAGACCACCATCTGTCGCTTC	185
<i>Oct4 R</i>	CTCACACGGTCTCAATGCTAGTTC	
<i>Sox2 F</i>	GTCAGCGCCCTGCAGTACAA	82
<i>Sox2 R</i>	GCGAGTAGGACATGCTGTAGGTG	
<i>Gapdh F</i>	TGACGTGCCGCTGGAGAAA	119
<i>Gapdh R</i>	AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG	

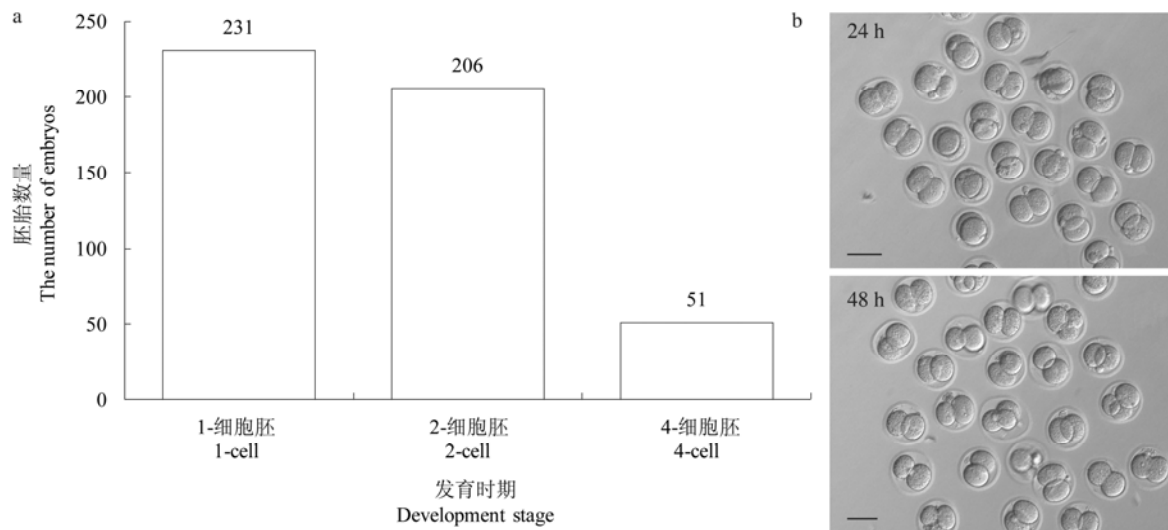


图 1 M16 培养液中小鼠体外受精胚胎的发育率及形态

Fig. 1 The number and morphology of mouse embryos cultured in M16 medium

a. M16 培养液中受精卵的发育情况; b. 体外培养 24 h 和 48 h 后胚胎的形态。标尺 = 100 μm。

a. The development of mouse embryos cultured in M16 medium; b. The morphology of mouse embryos cultured *in vitro* after 24 h and 48 h. Bar = 100 μm.

#### 2.4 OCT4 和 SOX2 在 2-细胞胚、2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚中定位的观察

在小鼠 2-细胞胚中, OCT4 与核共定位, 而在 4-细胞胚中, OCT4 在细胞核和细胞质中都有定位, 且大部分 OCT4 定位于细胞核中。在 2-细胞阻滞胚中, OCT4 不与核共定位, 而是弥散的存在于细胞质中, 且荧光信号变弱。在小鼠 2-细胞胚中, SOX2 定位于细胞核。2-细胞胚中 SOX2 主要存在于细胞核, 4-细胞胚中 SOX2 仍然与细胞核共定位, 且 SOX2 的荧光强度变强。在 2-细胞阻滞胚中, SOX2 也是与核共定位, 而且定位模式与 4-细胞胚相类似 (图 3)。

### 3 讨论

受精过程中, 小鼠 1-细胞胚胎在母源物质调控下发育到 2-细胞阶段, 此时, 母源 mRNA 几乎完全降解, 合子基因组则在 1-细胞胚胎晚期和 2-细胞胚胎早期阶段被激活, 完成母源调控向合子调控转变的过程 (Minami et al. 2007), 因此, 2-细胞阶段是小鼠胚胎植入前发

育的关键时期。近年来, 随着大规模的基因芯片技术和转录组学的应用, 研究人员已经在合子基因组激活 (ZGA) 过程中系统地建立了各种哺乳动物全基因组基因表达数据库。2-细胞时期瞬时表达的基因参与核糖体的合成和组装, 以及蛋白质的合成、RNA 的代谢和转录等过程 (Zeng et al. 2004, 2005)。

OCT4 和 SOX2 在胚胎干细胞的基因表达中起重要调控作用, 通过组合性转染 *Oct4* 和 *Sox2* 及相关转录因子的基因可以诱导体细胞形成多能性干细胞 (Chen et al. 2008, Yamanaka 2009)。OCT4 和 SOX2 等多能因子不仅在胚胎干细胞和诱导多能性干细胞中具有重要的作用, 对植入前胚胎发育过程的调控也是不可或缺的 (Vassena et al. 2011)。在概念和机制上, 母源调控向合子调控的转变与诱导多能性干细胞的细胞重编程存在许多相似之处 (Giraldez 2010)。*Oct4* 和 *Sox2* 参与细胞表观遗传重编程, 而胚胎转录能力的激活恰好与表观遗传修饰状态发生改变时间一致 (Jiang et al. 2013, Potok et al. 2013), 因此, 早期胚胎合子转录激活的能

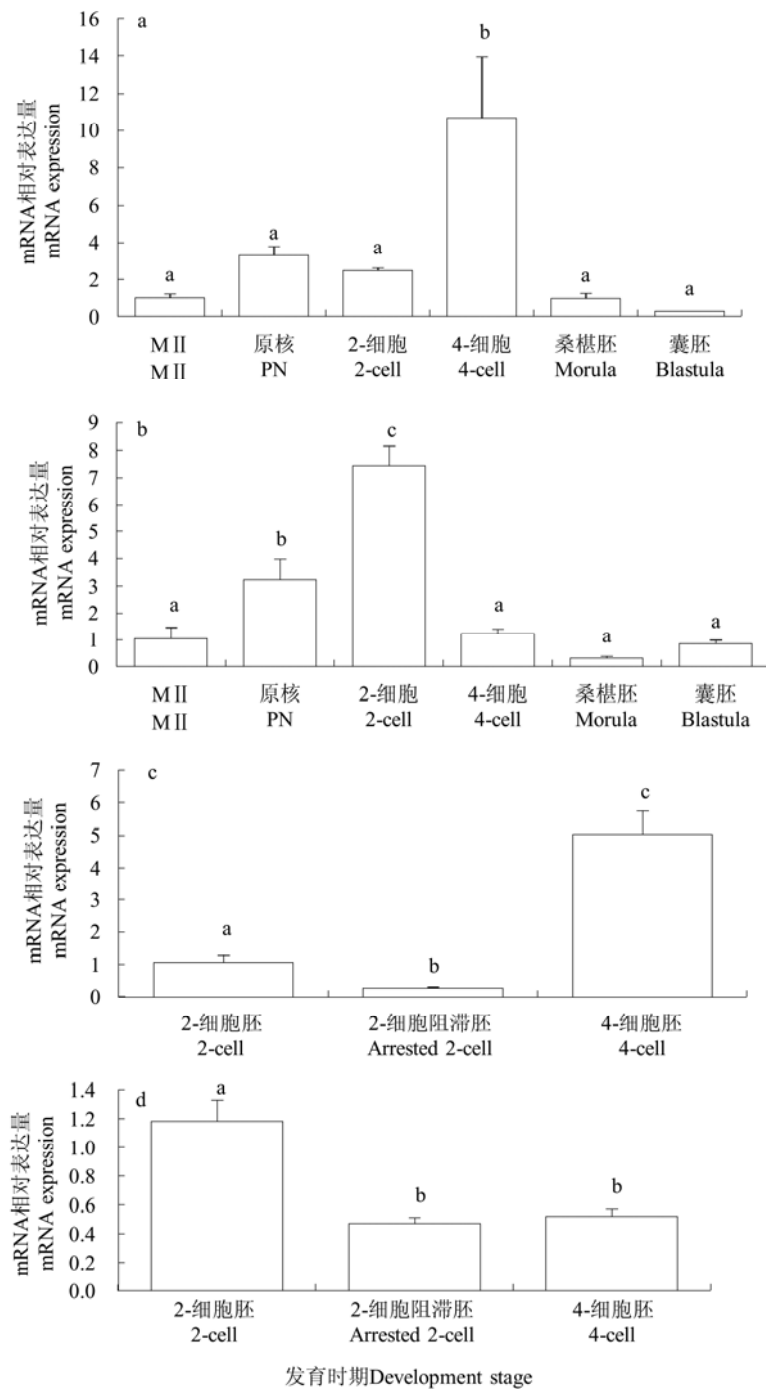


图 2 *Oct4* 和 *Sox2* 基因在胚胎不同发育时期的表达

Fig. 2 The expression of *Oct4* and *Sox2* gene at different developmental stages

a. *Oct4* 基因在卵母细胞和胚胎发育各时期的表达; b. *Sox2* 基因在卵母细胞和胚胎发育各时期的表达; c. *Oct4* 基因在 2-细胞胚、2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚中的表达; d. *Sox2* 基因在 2-细胞胚、2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚中的表达; 不同字母表示具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

a. The expression of *Oct4* in M II oocytes and all stages of embryo development; b. The expression of *Sox2* in M II oocytes and all stages of embryo development; c. The expression of *Oct4* in 2-cell stage embryos, 2-cell arrested embryos and 4-cell stage embryos; d. The expression of *Sox2* in 2-cell stage embryos, 2-cell arrested embryos and 4-cell stage embryos. Treatments with different letters were significantly different ( $P < 0.05$ ).

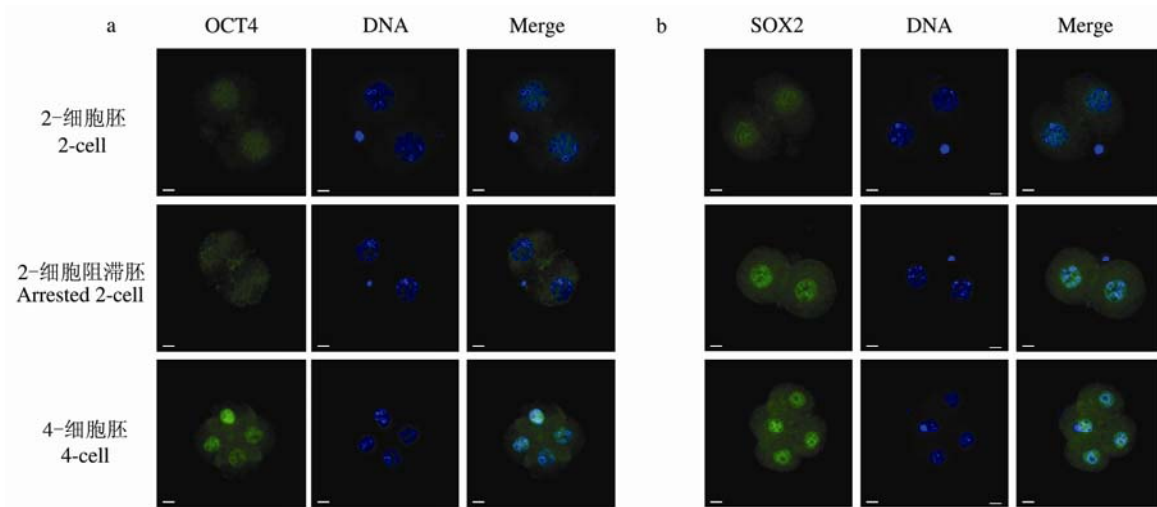


图 3 OCT4 和 SOX2 在 2-细胞胚、2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚中的表达定位

Fig. 3 The expression and localization of OCT4 and SOX2 in 2-cell stage embryos, 2-cell arrested embryos and 4-cell stage embryos

a. 激光共聚焦显微镜分析 OCT4 在 2-细胞胚、2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚中的表达与定位；b. 激光共聚焦显微镜分析 SOX2 在 2-细胞胚、2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚中的表达与定位。绿色表示 OCT4 和 SOX2，蓝色表示细胞核 DNA。标尺 = 50 μm。

a. The expression and localization of OCT4 in 2-cell stage embryos, 2-cell arrested embryos and 4-cell stage embryos was analyzed by confocal microscopy; b. The expression and localization of SOX2 in 2-cell stage embryos, 2-cell arrested embryos and 4-cell stage embryos was analyzed by confocal microscopy. Green, OCT4, SOX2; Blue, DNA; Merged, overlapping of green and blue. Bar = 50 μm.

力与表观遗传状态的改变具有一定的关系。在本研究中，*Oct4* 和 *Sox2* 在 小鼠卵母细胞和胚胎发育的各个阶段都有表达，与先前对兔 (Henderson et al. 2014)、牛 (Kurosaka et al. 2004)、猪 (Xing et al. 2009) 早期胚胎的研究一致，说明母源性 *Oct4* 和 *Sox2* 对调控早期胚胎的基因表达，建立和维持短暂的多能性状态具有重要作用。

胚胎发育突破阻滞需要 *Oct4* 的参与，敲减 *Oct4* 后导致 ZGA 失败和发育阻滞，同时 *Oct4* 作为胚胎基因转录调控网络的核心调控因子，调节小鼠 2-细胞胚胎阶段的基因表达 (Foygel et al. 2008)。本研究表明，合子 *Oct4* mRNA 在 4-细胞期时开始表达，*Oct4* 的表达水平在 ZGA 后出现高峰，之后随着发育的进行，*Oct4* 表达水平下降，与之前对 *Oct4* 表达水平趋势的研究结果一致 (Yeom et al. 1996)。在本实验中，受精 48 h 后收集的 4-细胞胚 *Oct4* mRNA 水平高

于相同时间收集的 2-细胞阻滞胚中的水平，2-细胞阻滞胚的合子 *Oct4* mRNA 转录没有被激活，而 4-细胞胚中合子 *Oct4* mRNA 转录被激活，以维持后续发育的进行。因此，*Oct4* 的表达对于胚胎 ZGA 之后的发育是必须的。在 2-细胞胚中 OCT4 定位于细胞核，4-细胞胚中 OCT4 在细胞核和细胞质中都有定位，Palmieri 等 (1994) 对 OCT4 在小鼠早期胚胎发育过程中蛋白表达的定位模式进行了研究，他们发现在小鼠胚胎中，OCT4 存在于发育各个阶段的细胞核中，本研究的结果与其报道一致。而对于 2-细胞阻滞胚，OCT4 弥散存在于细胞质中，且不与核共定位，表明该定位模式阻碍了 OCT4 与靶基因的结合，从而影响了 ZGA，先前研究人员用药物处理胚胎使其阻滞在 2-细胞胚阶段，发现 OCT4 不与核共定位，只存在于细胞质中 (Chu et al. 2013)。本研究说明，母源 OCT4 的核定位模式对于 ZGA 是关键性的，其

作用还有待于进一步研究。

对于 SOX2 来说, 本研究表明 *Sox2* mRNA 的表达量在受精后开始增加, 在 2-细胞时达到峰值, 之后随着发育的进行 *Sox2* 表达水平下降, 在囊胚阶段 *Sox2* 表达水平出现小幅度的上升, *Sox2* 表达水平在胚胎发育分化过程中呈现出明显的下调趋势。而 Pan 等 (2011) 研究显示, *Sox2* mRNA 在囊胚阶段才出现高水平的表达。结果不一致的原因可能是由 RNA 模板质量、引物的设计、数据分析方法等因素引起的, 因此, *Sox2* 在胚胎发育过程中的 mRNA 表达水平还是未知的。此外, 体外实验证实, 未分化的胚胎干细胞和胚胎癌细胞中有 *Sox2* 的表达, 其表达水平随细胞分化而下调 (Yuan et al. 1995)。

在本实验中, 受精后 24 h 收集的 2-细胞胚 *Sox2* mRNA 水平高于受精 48 h 后收集的 2-细胞阻滞胚和 4-细胞胚中的水平, 而后两者之间没有差异, 说明小鼠 2-细胞胚随着发育的进行母源 *Sox2* mRNA 一直在降解, 而合子 *Sox2* mRNA 的表达量要远小于母源 *Sox2* mRNA 的表达量。在 2-细胞胚和 4-细胞胚中, SOX2 定位于细胞核, 与 Avilion 等 (2003) 对 SOX2 在小鼠早期胚胎发育过程中蛋白表达定位模式的研究一致。先前的研究表明, 过表达 *Sox2* 导致胚胎发育停滞在 2-细胞时期, 而过表达 *Oct4*、*c-Myc* 和 *Klf4* 对 2-细胞发育到 4-细胞的能力没有影响。过表达 *Sox2* 使全基因组转录水平降低了约 15%, 同时也显著抑制了 2-细胞胚合子基因的表达 (Pan et al. 2011)。而将 *Sox2* 敲减后并没有发生 2-细胞阻滞 (Keramari et al. 2010)。而对于本实验来说, 母源的 SOX2 始终与核共定位, 而且有向细胞核集聚的趋势。因此, 母源 SOX2 的表达和定位模式可能对于胚胎 ZGA 的发生具有很重要的作用。

## 参 考 文 献

Avilion A A, Nicolis S K, Pevny L H, et al. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on *Sox2* function.

*Genes & Development*, 17(1): 126–140.

Chen X, Xu H, Yuan P, et al. 2008. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*, 133(6): 1106–1117.

Chu D P, Tian S, Qi L, et al. 2013. Abnormality of maternal-to-embryonic transition contributes to mehp-induced mouse 2-cell block. *Journal of Cellular Physiology*, 228(4): 753–763.

Evsikov A V, Marín De Evsikova C. 2009. Gene expression during the oocyte-to-embryo transition in mammals. *Molecular Reproduction and Development*, 76(9): 805–818.

Foygel K, Choi B, Jun S, et al. 2008. A novel and critical role for *Oct4* as a regulator of the maternal-embryonic transition. *PLoS One*, 3(12): e4109.

Frum T, Halbisen M A, Wang C Y, et al. 2013. *Oct4* cell-autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst. *Developmental Cell*, 25(6): 610–622.

Giraldez A J. 2010. MicroRNAs, the cell's nepenthe: clearing the past during the maternal-to-zygotic transition and cellular reprogramming. *Current Opinion in Genetics and Development*, 20(4): 369–375.

Goddard M J, Pratt H P. 1983. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: An analysis of the “2-cell block”. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 73(1): 111–133.

Henderson G R W, Brahmaasani S R, Yeliseti U M, et al. 2014. Candidate gene expression patterns in rabbit pre-implantation embryos developed *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(7): 899–911.

Jiang L, Zhang J, Wang J J, et al. 2013. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell*, 153(4): 773–784.

Keramari M, Razavi J, Ingman K A, et al. 2010. *Sox2* is essential for formation of trophectoderm in the pre-implantation embryo. *PLoS One*, 5(11): e13952.

Kurosaka S, Eckardt S, McLaughlin K J. 2004. Pluripotent lineage definition in bovine embryos by *Oct4* transcript localization. *Biology of Reproduction*, 71(5): 1578–1582.



- Lee M T, Bonneau A R, Takacs C M, et al. 2013. *Nanog*, *Pou5f1* and *Sox1* activate zygotic gene expression during the maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 503(7476): 360–364.
- Leichsenring M, Maes J, Mössner R, et al. 2013. *Pou5f1* transcription factor controls zygotic gene activation in vertebrates. *Science*, 341(6149): 1005–1009.
- Li L, Lu X K, Dean J. 2013. The maternal to zygotic transition in mammals. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(5): 919–938.
- Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S. 2007. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *Journal of Reproduction and Development*, 53(4): 707–715.
- Palmieri S L, Peter W, Hess H, et al. 1994. *Ocr4* transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Developmental Biology*, 166(1): 259–267.
- Pan H, Schultz R M. 2011. *Sox2* modulates reprogramming of gene expression in two-cell mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 85(2): 409–416.
- Potok M E, Nix D A, Parnell T J, et al. 2013. Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern. *Cell*, 153(4): 759–772.
- Shin S W, Tokoro M, Nishikawa S, et al. 2010. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system leads to delay of the onset of ZGA gene expression. *The Journal of Reproduction and Development*, 56(6): 655–663.
- Tan M H, Au K F, Leong D E, et al. 2013. An *Ocr4-Sall4-Nanog* network controls developmental progression in the pre-implantation mouse embryo. *Molecular Systems Biology*, 9(1): 632.
- Vassena R, Boué S, González-Roca E, et al. 2011. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*, 138(17): 3699–3709.
- Xing X J, Magnani L, Lee K, et al. 2009. Gene expression and development of early pig embryos produced by serial nuclear transfer. *Molecular Reproduction and Development*, 76(6): 555–563.
- Yamanaka S. 2009. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature*, 460(7251): 49–52.
- Yeom Y I, Fuhrmann G, Ovitt C E, et al. 1996. Germline regulatory element of *Ocr4* specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*, 122(3): 881–894.
- Yuan H, Corbi N, Basilico C, et al. 1995. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of *Sox2* and *Ocr3*. *Genes & Development*, 9(21): 2635–2645.
- Zeng F Y, Baldwin D A, Schultz R M. 2004. Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Developmental Biology*, 272(2): 483–496.
- Zeng F Y, Schultz R M. 2005. RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo. *Developmental Biology*, 283(1): 40–57.