

冷冻胚胎印记基因 *H19* 的 DNA 甲基化状态研究*

施晓莹¹, 陈士岭², 郑海燕², 王乐乐², 吴雅琴²

(1. 贵阳市第二人民医院 妇产科, 贵州 贵阳 550081; 2. 南方医科大学南方医院 妇产科生殖中心, 广东 广州 510515)

[摘要] 目的: 比较研究常规慢速冷冻和玻璃化冷冻后的人类早期胚胎印记基因 *H19* 的 DNA 甲基化状态, 初步了解低温冷冻对胚胎基因印记的影响。方法: 收集胚胎移植术后正常受精的低质量的第3天胚胎152个, 进行冷冻、复苏, 其中常规慢速冷冻胚胎78个, 玻璃化冷冻胚胎74个, 另收集70个新鲜未冷冻胚胎作为对照; 记录3种类型单个胚胎 Bisulfite-PCR 扩增个数, 采用结合重亚硫酸盐限制性酶分析法检测胚胎印记基因 *H19* 的 DNA 甲基化状态。结果: 慢速冷冻胚胎、玻璃化冷冻胚胎及新鲜未冷冻胚胎的单个胚胎 Bisulfite-PCR 扩增分别成功40、53、58个; 慢速冷冻胚胎、玻璃化冷冻胚胎及新鲜未冷冻胚胎 *H19* 基因的平均甲基化程度分别为 $(44.8 \pm 6.4)\%$ 、 $(47.5 \pm 5.6)\%$ 及 $(46.7 \pm 6.0)\%$, 异常甲基化率分别为 10.0% (4/40)、13.2% (7/53) 及 3.4% (2/58); 3组胚胎的甲基化程度和异常甲基化率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 低温冷冻不增加人类胚胎甲基化异常的发生率。

[关键词] 胚胎研究; 胚胎移植; 甲基化; 生殖技术, 辅助; 印记基因, *H19*; 慢速冷冻; 玻璃化冷冻

[中图分类号] R714.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)05-0524-03

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.05.007

Research of DNA Methylation Status of Frozen Embryonic Imprinting *H19* Gene

SHI Xiaoyun¹, CHEN Shiling², ZHENG Haiyan², WANG Lele², WU Yaqin²

(1. Department of Gynaecology and Obstetrics, the Second People's Hospital of Guiyang, Guiyang 550081, Guizhou, China; 2. Reproductive center, Department of Gynaecology and Obstetrics, Nanfang Hospital of Southern medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the DNA methylation status of human early embryonic imprinting *H19* gene after slow-freezing or vitrification freezing, and preliminarily explore the effect of low temperature freezing on embryonic imprinting gene. **Methods:** 152 Day3-embryos (2PN, bad quality) with normal fertilization after embryo transplantation were collected and underwent freezing and resuscitation, of which 78 embryos were conducted by slow-freezing, 74 embryos by vitrification freezing. Besides, 70 fresh non-frozen embryos were collected as controls. The number of Bisulfite-PCR amplification of a single embryo was recorded in the three types. The Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) was used to determine *H19* methylation status after embryos thawing. **Results:** The number of Bisulfite-PCR amplification of a single embryo in the three groups was 40 (slow-freezing), 53 (vitrification freezing) and 58 (fresh non-frozen), respectively. The average degree of *H19* methylation in the three groups was $(44.8 \pm 6.4)\%$ (slow-freezing), $(47.5 \pm 5.6)\%$ (vitrification freezing) and $46.7\% \pm 6.0\%$ (fresh non-frozen), respectively. The rate of abnormal methylation was 10.0% (slow-freezing), 13.2% (vitrification freezing) and 3.4% (fresh non-frozen), respectively. There was no statistical difference of *H19* methylation degree and rate of abnormal methylation between three groups. **Conclusion:** The freezing technique may not increase the incidence of abnormal methylation in human embryos.

[Key words] embryo research; embryo transplantation; methylation; reproductive technology, auxiliary; imprinted genes, *H19*; slow-freezing; vitrification freezing

*[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460237)

网络出版时间: 2016-05-13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20160513.2129.048.html>

辅助生殖技术 (ART) 不同于自然妊娠的过程,较多的学者关注 ART 出生后代的甲基化等表观遗传学风险。有研究认为卵细胞、早期胚胎是 DNA 甲基化易于变化的敏感时期,药物促排卵、体外培养等技术环节可能影响甲基化的擦除、重建和维持,从而诱发配子、胚胎出现印记基因甲基化异常^[1]。国外的一些流行病学研究也报道 ART 子代可能有较高的基因印记疾病发病率,例如 Beckwith-Wiedemann 综合征 (BWS) 和 Angelman 综合征 (AS)^[2]。BWS、AS 的发病涉及染色体 11p15 区域的一系列印记基因,其中 *H19* 基因研究得较为成熟^[3-4]。胚胎冷冻是辅助生殖临床常规开展的技术,主要包括慢速冷冻和玻璃化冷冻 (vitrification) 2 种方法。低温、冷冻保护剂毒性等因素一直受到各种研究的关注,而有关冷冻技术对胚胎基因印记影响的研究较少,且局限在动物实验。研究冷冻技术对人类胚胎基因印记的影响有助于评价 ART 技术的安全性。本研究收集人类第 3 天 (Day3) 冷冻胚胎和新鲜未冷冻胚胎,检测并比较印记基因 *H19* 的 DNA 甲基化状态,初步探讨冷冻技术对胚胎基因印记的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究经医院伦理委员会批准。选择常规体外受精 (IVF) 或者卵胞浆内单精子显微注射 (ICSI) 治疗的患者,经知情同意后收集患者选择丢弃的低质量 Day3 胚胎。冷冻复苏胚胎为胚胎移植术后收集正常受精 (2PN) 的低质量的 Day3 胚胎进行常规慢速冷冻或玻璃化冷冻保存,其中慢速冷冻胚胎 78 个,玻璃化冷冻胚胎 74 个,分别解冻后用于印记基因甲基化分析。收集胚胎移植术后 70 个正常受精 (2PN) 的低质量 Day3 的新鲜未冷冻胚胎作为对照。

1.2 方法

1.2.1 胚胎的冷冻和复苏 胚胎的慢速冷冻复苏采用试剂盒 Quinns Advantage Embryo Freeze Kit 和 Quinns Advantage Thaw Kit (Sage, Pasadena, CA, USA),按说明书进行操作。玻璃化冷冻复苏以冷冻环为胚胎载体,冷冻保护剂使用丙二醇和乙二醇,按照文献^[5]方案步骤进行操作。

1.2.2 *H19* 甲基化状态检测 采用结合重亚硫酸盐的限制性酶分析 (combined bisulfite restriction a-

nalysis, COBRA) 法对单个胚胎进行 DNA 甲基化分析^[6]: (1) 使用低熔点琼脂糖 (LMP), 配合 CpGenome DNA Modification Kit (Chemicon International, Temecula, CA) 对胚胎细胞 DNA 进行 Bisulfite 转化; (2) 以转化的 DNA 为模板进行 PCR 扩增 (*H19* 基因 Genbank 号为 AF125183, 起止位置为 7870~8100), 上游引物 F1 为 5'-AGGTGTTTATGTTTATGGATGATGG-3', 上游引物 F2 为 5'-TGTATAGTATATATATGGGTATTTTGGAGGTTT-3', 下游引物 R 为 5'-TCCTATAAATATCCTATTCCTAAATAACC-3'; (3) PCR 产物为 230 bp 片段 (代表母系非甲基化等位基因) 或 130 bp 和 100 bp 片段 (代表父系甲基化等位基因), 甲基化程度为 130 bp 和 100 bp 条带灰度的百分比。正常胚胎应同时具有母系和父系 *H19* 等位基因, 甲基化程度约为 50%。采用 *TaqI* 酶切后, 以 4% 琼脂糖凝胶电泳分离 (电压为 110 V, 时间 30 min), 电泳结束后采用 GAS76WL-T20 凝胶成像系统拍照。甲基化状态分析采用 Labworks image acquisition and analysis software (Ultra-violet Products, Ltd., Cambridge, UK) 对凝胶图片进行灰度扫描计算。

1.3 统计学分析

数据使用 SPSS 13.0 统计软件分析。DNA 甲基化程度以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 数据比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 *t* 检验, 甲基化异常率以百分比 (%) 表示, 数据比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单个胚胎 Bisulfite-PCR 扩增结果

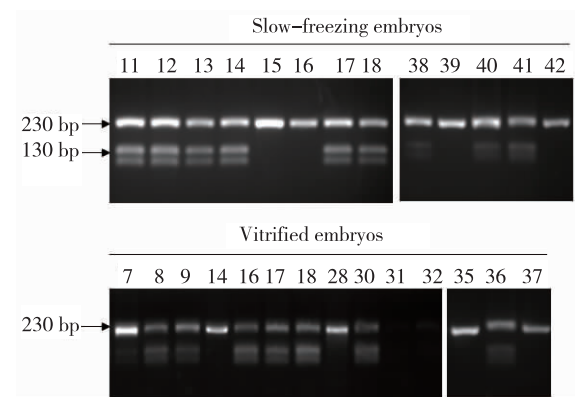
3 种类型的胚胎 PCR 成功率显著不同 ($\chi^2 = 17.58, P = 0.000$)。慢速冷冻胚胎的 PCR 成功率低于新鲜胚胎 ($\chi^2 = 16.44, P = 0.000$) 和玻璃化冷冻胚胎 ($\chi^2 = 6.61, P = 0.01$); 玻璃化冷冻胚胎与新鲜胚胎的 PCR 成功率比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 2.57, P = 0.10$)。见表 1、图 1。

2.2 *H19* 基因 DNA 甲基化程度与甲基化率

慢速冷冻胚胎、玻璃化冷冻胚胎及新鲜未冷冻胚胎 *H19* 基因的平均甲基化程度比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.127$), 见表 2。慢速冷冻胚胎、玻璃化冷冻胚胎及新鲜未冷冻胚胎 *H19* 基因的异常甲基化发生率比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 3.48, P = 0.175$), 见表 3。

表 1 3 种类型的单胚胎 bisulfite-PCR 的扩增结果

Tab. 1 The Results of Bisulfite-PCR for Single Frozen Embryo in three groups			
胚胎类型	胚胎总数 (<i>n</i>)	扩增成功数 (<i>n</i>)	PCR 成功 率(%)
慢速冷冻	78	40	51.3
玻璃化冷冻	74	53	71.6
新鲜未冷冻	70	58	82.9



注: Slow-freezing embryos 所示为慢速冷冻胚胎检测结果, 15、16、39 及 42 号胚胎仅出现 230 bp, 为母系非甲基化片段, 属异常低甲基化状态(甲基化程度为 0%), 其余胚胎为正常甲基化状态; Vitrified embryos 所示为玻璃化冷冻胚胎检测结果, 7 号胚胎的甲基化程度为 8.7% (甲基化片段明显弱), 为异常低甲基化; 14、28、35 及 37 号胚胎仅出现 230bp 的非甲基化片段, 为异常低甲基化状态(甲基化程度为 0%)。

图 1 慢速冷冻及玻璃化冷冻胚胎 H19 甲基化结果(COBRA)

Fig. 1 The COBRA results for frozen embryos in slow-freezing and vitrification freezing

表 2 3 种类型胚胎 H19 基因的甲基化程度($\bar{x} \pm s$)
Tab. 2 Methylation degree of H19 in three groups

胚胎类型	<i>n</i>	H19 甲基化程度(%)
慢速冷冻	36	44.8 ± 6.4
玻璃化冷冻	45	47.5 ± 5.6
新鲜未冷冻	56	46.7 ± 6.0

表 3 3 种类型胚胎 H19 基因的异常甲基化率
Tab. 3 The Rate of abnormal methylation of H19 in three groups

胚胎类型	甲基化异常类型	胚胎总数 (<i>n</i>)	异常胚胎数(<i>n</i>)	异常率 (%)
慢速冷冻	低甲基化	40	4	10.0
玻璃化冷冻	低甲基化	53	7	13.2
新鲜未冷冻	低甲基化	58	2	3.4

3 讨论

低温冷冻对早期胚胎的影响一直存在争议, 冷冻后胚胎的基因表达、细胞凋亡等方面已有较多研究。早期胚胎植入前容易发生甲基化的改变, H19 基因属于父系甲基化印记基因, 全长 3 kb, 共含有 5 个外显子, 4 个内含子。动物实验发现玻璃化冷冻后的小鼠胚胎出现 H19 基因甲基化状态异常和表达量的显著增加, 提示冷冻技术可能影响 DNA 甲基化状态^[7]。

本研究中仅有 51.3% 的慢速冷冻胚胎能成功的通过 bisulfite-PCR 扩增分析, 其原因可能是慢速冷冻产生的冰晶对细胞造成了机械性损害。玻璃化冷冻由于不产生冰晶, 对细胞的机械性破坏小, 因而 PCR 成功率与新鲜胚胎无显著差别。由于温度、pH 值以及培养液营养成分等因素, 体外培养的早期胚胎存在一定比例的甲基化异常^[8]。本研究亦发现 3.4% 的新鲜胚胎出现 H19 甲基化异常; 慢速冷冻、玻璃化冷冻胚胎 H19 基因甲基化异常率分别为 10.0%、13.2%, 与新鲜胚胎比较无显著差别($P=0.175$); 定量分析提示 3 组胚胎的 H19 基因甲基化程度亦无显著差别($P=0.127$)。

DNA 甲基化的建立和维持是依赖 DNA 甲基化转移酶类(DNA methyltransferases, Dnmts)和甲基化结合蛋白(methyl-binding domain proteins)^[8-10]。推测体外培养环境、冰晶、高浓度保护剂等因素可能影响了 Dnmts 的活性, 从而导致胚胎出现甲基化异常。冷冻胚胎与新鲜胚胎比较, 甲基化异常率无统计学差别, 初步认为冷冻操作可能不增加胚胎甲基化异常的发生率, 但冷冻胚胎的甲基化异常率有增高的趋势, 需要扩大样本量, 扩展基因种类进一步研究。

本研究检测的胚胎为不适合移植的低质量胚胎。低质量的胚胎一般作放弃处理, 但在临床实践中, 缺乏优质胚胎的情况下, 部分患者仍会选择质量差的胚胎进行移植。低质量胚胎获得妊娠的机率较低, 且出生子代的健康状况尚未见系统的研究报道, 根据本研究的结果可初步推测, 使用低质量胚胎可能会增加子代印记缺陷的风险。

4 参考文献

[1] Hiura H, Okae H, Chiba H, et al. Imprinting methylation errors in ART[J]. Reprod Med Biol, 2014 (4):193-202. (下转第 531 页)

- multiallelic markers; update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>) [J]. Cell Res, 2009(19): 519–523.
- [12] Zhou YH, Yao ZH, Liu FL. High prevalence of HIV, HCV, HBV and co-infection and associated risk factors among injecting drug users in Yunnan province, China [J]. PLoS One, 2012(7): e42937.
- [13] Hassan NJ, Barclay AN, Brown MH. Frontline: Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166 [J]. Eur J Immunol, 2004(34): 930–940.
- [14] Oliveira MI, Goncalves CM, Pinto M. CD6 attenuates early and late signaling events, setting thresholds for T-cell activation [J]. Eur J Immunol, 2012(42): 195–205.
- [15] Zimmerman AW, Joosten B, Torensma R. Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells [J]. Blood, 2006(107): 3212–3220.
- [16] Castro MA, Oliveira MI, Nunes RJ. Extracellular isoforms of CD6 generated by alternative splicing regulate targeting of CD6 to the immunological synapse [J]. J Immunol, 2007(178): 4351–4361.
- [17] De Jager PL, Jia X, Wang J. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci [J]. Nat Genet, 2009(41): 776–782.
- [18] Desmet FO, Hamroun D, Lalande M. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals [J]. Nucleic Acids Res, 2009(37): e67.
- [19] Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes [J]. J Med Genet, 2005(42): 737–748.
- [20] Wagner M, Bilinska M, Pokryszko-Dragan A. ALCAM and CD6-multiple sclerosis risk factors [J]. J Neuroimmunol, 2014(276): 98–103.
- [21] da Gloria VG, Martins de Araujo M, Mafalda Santos A. T cell activation regulates CD6 alternative splicing by transcription dynamics and SRSF1 [J]. J Immunol, 2014(193): 391–399.
- [22] Singer NG, Fox DA, Haqqi TM. CD6: expression during development, apoptosis and selection of human and mouse thymocytes [J]. Int Immunol, 2002(14): 585–597.
- [23] Swaminathan B, Matesanz F, Cavanillas ML. Validation of the CD6 and TNFRSF1A loci as risk factors for multiple sclerosis in Spain [J]. J Neuroimmunol, 2010(223): 100–103.
- [24] Kofler DM, Severson CA, Mousissian N. The CD6 multiple sclerosis susceptibility allele is associated with alterations in CD4 + T cell proliferation [J]. J Immunol, 2011(187): 3286–3291.
- (2016-01-06 收稿, 2016-03-25 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵毅

(上接第 526 页)

- [2] Halliday J, Oke K, Breheny S, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study [J]. Am J Hum Genet, 2004(3): 526–528.
- [3] Ishida M, Moore GE. The role of imprinted genes in humans [J]. Mol Aspects Med, 2013(4): 826–840.
- [4] Choufani S, Shuman C, Weksberg R. Molecular findings in Beckwith-Wiedemann syndrome. [J]. Am J Med Genet C Semin Med Genet, 2013(2): 131–140.
- [5] 施晓黎, 洪焱, 黄绘, 等. 不同载体和冷冻保护剂用于人胚胎玻璃化冷冻的初步研究. [J]. 中国计划生育学杂志, 2009(9): 546–549.
- [6] Chen SL, Shi XY, Zheng HY, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted H19 gene in human preimplantation embryos. [J]. Fertil Steril, 2010(6): 2356–2358.
- [7] Wang Z, Xu L, He F. Embryo vitrification affects the methylation of the H19/Igf2 differentially methylated domain and the expression of H19 and Igf2 [J]. Fertil Steril, 2010(8): 2729–2733.
- [8] Shi XY, Chen SL, Zheng HY, et al. Abnormal DNA Methylation of Imprinted Loci in Human Preimplantation Embryos [J]. Reprod Sci, 2014(8): 978–983.
- [9] Petrusa L, Van de Velde H, De Rycke M. Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies [J]. Mol Hum Reprod, 2014(9): 861–874.
- [10] Denomme MM, Mann MR. Maternal control of genomic imprint maintenance [J]. Reprod Biomed Online, 2013(6): 629–636.
- (2015-12-15 收稿, 2016-04-23 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘华