

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.10.007 [http://www.crter.org]
刘维强, 何文智, 曹定娅, 李洁亮, 郭丽媛, 黎青, 孙筱放. X染色体倾斜失活人胚胎干细胞的拷贝数变异[J].
中国组织工程研究, 2013, 17(10):1748-1752.

X染色体倾斜失活人胚胎干细胞的拷贝数变异**☆◆

刘维强, 何文智, 曹定娅, 李洁亮, 郭丽媛, 黎青, 孙筱放

广东省产科重大疾病重点实验室, 广州医学院第三附属医院妇产科研究所实验部, 广东省广州市 510150

文章亮点:

- 1 文章首次在全基因组水平寻找人胚胎干细胞 X 染色体倾斜性失活的潜在原因。
- 2 发现 X 染色体异常失活干细胞较正常失活干细胞存在更多拷贝数变异, 某些拷贝数变异涵盖的基因与 X 染色体异常失活可能存在关联。

关键词:

干细胞; 胚胎干细胞; 拷贝数变异; 芯片; 倾斜性 X 染色体失活; 基因; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

摘要

背景: 倾斜性与随机 X 染色体失活的人胚胎干细胞拷贝数变异是否存在差异不清楚。

目的: 在全基因组水平分析倾斜性 X 染色体失活的人胚胎干细胞的拷贝数变异情况, 分析其涵盖基因及其对细胞功能产生的影响。

方法: 3 株倾斜性 X 染色体失活细胞为研究组, 两株随机 X 染色体失活细胞为对照组。运用美国 Affymetrix 公司 Cytogenetics Whole-Genome 2.7M 芯片对其进行全基因组拷贝数变异分析, 数据经 ChAS 软件、OMIM 等工具分析, 在 3 株倾斜性 X 染色体失活细胞中寻找相同拷贝数变异区域及其涵盖基因。

结果与结论: ①研究组中大于 50 kb 的拷贝数变异数均超过 130 个, 高于对照组的平均 36 个, 两组中拷贝数变异改变均以重复为主(> 70%)。②研究组中共发现 9 个共同拷贝数变异区域, 分布于 1q22、1p34.1、6q16.3、7q31.32、11q13.1、16q12.2、19p13.12、Xp22.33 及 Xq26.2, 均为 3 个拷贝的重复, 总共涵盖 19 个基因。对照组中这些区域及基因均为正常 2 个拷贝。③拷贝数变异涵盖基因多与 DNA 及核苷酸结合等功能相关, Xq26.2 区域的 GPC3 基因突变与倾斜性 X 染色体失活可能有关联。结果表明倾斜性 X 染色体失活细胞相对随机失活细胞具有更多的微小基因组改变, 拷贝数变异涵盖的重要基因可能对人胚胎干细胞功能产生不利影响。

刘维强☆, 男, 1973 年生, 江西省赣州市人, 汉族, 在读博士, 副主任技师, 主要从事生殖与遗传研究。

liuwq06@gmail.com

通讯作者: 孙筱放, 教授, 广东省产科重大疾病重点实验室, 广州医学院第三附属医院妇产科研究所实验部, 广东省广州市

510150

xiaofangsun@hotmail.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)10-01748-05

收稿日期: 2012-06-01
修回日期: 2012-07-21
(20120501003/M · C)

Copy number variation in human embryonic stem cells with skewed X chromosome inactivation

Liu Wei-qiang, He Wen-zhi, Cao Ding-ya, Li Jie-liang, Guo Li-yuan, Li Qing, Sun Xiao-fang

Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Experimental Department of Institute of Obstetrics and Gynecology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Human embryonic stem cells have two different X chromosome inactivation patterns: skewed X chromosome inactivation and random X chromosome inactivation. Whether there is any difference in copy number variation between those cells is not clear.

OBJECTIVE: To analyze the copy number variation in human embryonic stem cells with skewed X chromosome inactivation at whole genome level, and to analyze the effect of copy number variation on the function of human embryonic stem cells with skewed X chromosome inactivation.

Liu Wei-qiang☆, Studying for doctorate, Associate chief technician, Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Experimental Department of Institute of Obstetrics and Gynecology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China
liuwq06@gmail.com

Corresponding author: Sun Xiao-fang, Professor, Key Laboratory for Major Obstetric Diseases of Guangdong Province, Experimental Department of Institute of Obstetrics and Gynecology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China
xiaofangsun@hotmail.com

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 31171229*; Medical Research Foundation of Guangdong Province, No. A2011280*

Received: 2012-06-01
Accepted: 2012-07-21

METHODS: Three skewed X chromosome inactivation cell strains were included in the research group, and two random skewed X chromosome inactivation cell strains were included in the control group. The copy number variation was analyzed with Cytogenetics Whole-Genome 2.7M array produced by Affymetrix, USA. The data were analyzed using ChAS software and OMIM software. The same copy number variation regions and genes were found in the three skewed X chromosome inactivation cell strains.

RESULTS AND CONCLUSION: More than 130 copy number variation (> 50 kb) were found in the research group, which was higher than that of 36 copy number variation in the control group, the changes of copy number variation in the two groups were mainly repeated (> 70%). Nine gain copy number variation regions were found in the research group, distributed on 1q22, 1p34.1, 6q16.3, 7q31.32, 11q13.1, 16q12.2, 19p13.12, Xp22.33 and Xq26.2, respectively, all were repeated for three copy number variation. Nineteen genes were found within those copy number variation. All of those above copy number variation regions and genes in the control group were normal two copies. Genes within the copy number variation were closely related to the function of binding of DNA and nucleotide. GPC3 gene mutation on the Xq26.2 was found to be correlated with the skewed X chromosome inactivation. Micro-genomic variation in human embryonic stem cells with skewed X chromosome inactivation was higher than that in the random skewed X chromosome inactivation human embryonic stem cells. Key genes within copy number variation may have disadvantage to the function of human embryonic stem cells.

Key Words: stem cells; embryo-derived stem cells; copy number variation; array; skewed X chromosome inactivation; gene; National Natural Science Foundation of China; stem cell photographs-containing paper

Liu WQ, He WZ, Cao DY, Li JL, Guo LY, Li Q, Sun XF. Copy number variation in human embryonic stem cells with skewed X chromosome inactivation. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(10):1748-1752.

0 引言

基于G显带的核型分析证实人胚胎干细胞存在遗传物质的不稳定性, 在培养过程中可产生12, 17及X等染色体的非整倍体及其他基因组结构的明显异常^[1]。目前, 全基因组芯片分析对发现数千碱基的微小遗传物质改变提供了可能。有研究证实核型正常的人胚胎干细胞的确存在大量的拷贝数变异等微小基因组改变^[2]。另一方面, 表观遗传学研究发现人胚胎干细胞存在X染色体倾斜性失活及随机性失活两种模式^[3-4]。人胚胎干细胞发生X染色体倾斜性失活的机制并不清楚, 拷贝数变异数量及分布是否与随机X染色体失活细胞存在差异也没有相关报道。因此作者拟利用高通量芯片在微小基因组水平研究具X染色体倾斜性失活的人胚胎干细胞遗传物质稳定性情况, 寻找其热点拷贝数变异区域及其涵盖基因和相互作用网络。

1 材料和方法

设计: 对不同X染色体失活模式的人胚胎干细胞进行全基因组芯片分析。

时间及地点: 2011年1至12月在广州医学院第三附属医院广东省产科重大疾病重点实验室进行人胚胎干细胞培养及DNA收集。

材料: 利用美国Affymetrix公司Cytogenetics Whole-Genome 2.7M芯片对3株X染色体倾斜性失活及2株X染色体随机失活的人胚胎干细胞进行全基因组拷贝数变异分析。实验所用5株人胚胎干细胞均为本实验室建立, 前期已对所有细胞进行X染色体失活分析。3株X染色体倾斜性失活细胞为FY-hES-5, -8, -11, 2株随机X染色体失活细胞为FY-hES-7及-10^[5]。FY-hES-5核型为46, XX, t13, der(13;13)(q10;q10), 其余细胞均为46, XX正常核型^[6]。

主要试剂与仪器: Knockout-DMEM, serum replacement, MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 2-Mercaptoethanol, GlutaMAX™ I, bFGF(GIBCO), 胎牛血清(Hyclone), Cytogenetics Whole-Genome 2.7M芯片Kit, Affymetrix 7G芯片工作站(美国Affymetrix), Qiagen DNeasy Tissue Kit(德国Qiagen)。

实验方法:

细胞培养: 人胚胎干细胞培养液均购自 GIBCO 公司, 培养方法详见本实验室已发表的文章^[6]。

DNA 提取与鉴定: 各细胞株均挑取第 20 代细胞 20-30 个未分化的克隆, 利用 Qiagen DNeasy Tissue Kit (Qiagen 公司)试剂盒提取基因组 DNA。DNA 经质量测定, 浓度大于 50 mg/L, $A_{260/280}$ 比值均介于 1.8-2.0 间, $A_{260/230}$ 均大于 1.5, 符合芯片测定要求。

全基因组拷贝数变异芯片实验: 各标本均取 100 ng DNA 进行芯片实验, 整个实验用时 3 d。具体操作步骤详见美国 Affymetrix 网站 Cytogenetic Assay 操作手册 (<http://www.affymetrix.com/>)。芯片结果使用 Affymetrix Chromosome Analysis Suite 软件进行分析(ChAS1.2.1 版本, Affymetrix, USA)。

主要观察指标: 芯片扫描数据经 ChAS 软件比对 X 染色体倾斜性失活及随机 X 染色体失活细胞间拷贝数变异数量、分布及其涵盖基因的异同, 运用 OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)、DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)等在线工具进行基因功能及基因本体论(Gene Ontology, GO)、相互作用网络分析, 明确拷贝数变异及其涵盖基因的功能。

2 结果

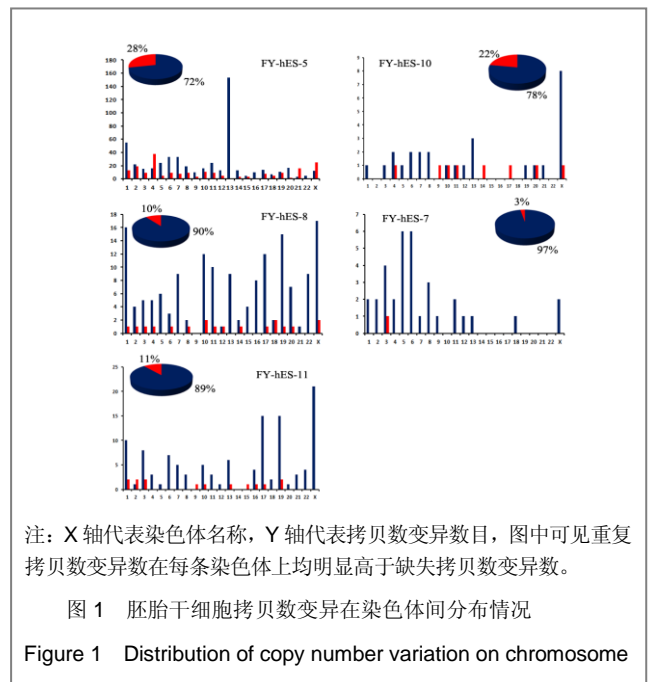
2.1 各细胞拷贝数变异总数、重复及缺失拷贝数变异数情况 设置拷贝数变异分析参数为最小包含 50 个 Marker, 检测阈值为 50 kb。以此判断标准在研究组 FY-hES-5, -8, -11 三株 X 染色体倾斜性失活干细胞中分别发现拷贝数变异数为 740, 177 及 133 个, 而对照组 FY-hES-7 中拷贝数变异数量为 35 个, FY-hES-10 中拷贝数变异数量为 36。虽然研究组中拷贝数变异数量明显高于对照组, 但因两组间样本数较少, 无法进行相关统计学分析, 见表 1。

表 1 人胚胎干细胞拷贝数变异情况

Table 1 Total and gain/loss number of copy number variation in human embryonic stem cells

细胞	获得拷贝数变异	损失拷贝数变异	拷贝数变异总数
FY-hES-5	530	210	740
FY-hES-8	159	18	177
FY-hES-11	118	14	132
FY-hES-7	34	1	35
FY-hES-10	28	8	36

2.2 拷贝数变异在 23 对染色体具体分布情况 两组所有细胞均以重复拷贝数变异为主, 占拷贝数变异总数 70% 以上。因本实验室前期研究证实 FY-hES-5 为 13 三体罗伯逊易位核型^[6], 其在 13 号染色体上拷贝数变异数量明显高于其他染色体, 共有 153 个重复拷贝数变异, 其中 1 Mb 至 3 Mb 的大片段连续拷贝数变异 13 个, 与核型分析相符。在研究组中各染色体间的分布规律发现 1 号染色体上拷贝数变异数量相对其他染色体上拷贝数变异数量明显增多。对照组由于整体拷贝数变异数量不多, 其在各染色体间分布规律不好判断, 见图 1。



2.3 X 染色体倾斜性失活细胞共性拷贝数变异区域及其涵盖基因 研究组 3 株细胞中均存在的共性拷贝数变异区域有 9 个, 分布于 1q22、1p34.1、6q16.3、7q31.32、11q13.1、16q12.2、19p13.12、Xp22.33 及 Xq26.2, 均为 3 个拷贝的重复。运用 ChAS 软件在 9 个拷贝数变异区域中共发现涵盖 19 个基因, 其中 13 个基因经 OMIM 在线分析证实与疾病密切相关(基因名称及 MIM 基因号见表 2)。对照组中这些区域及基因均为正常 2 个拷贝。

2.4 基因功能及其与染色体倾斜性失活关联分析 对 19 个基因运用在线工具分析后发现, 拷贝数变异涵盖基因多与蛋白结合、桥连、DNA 及核苷酸结合等功能密切相关, 见表 3。对 19 个基因的相互间作用网络分析发现, 1q22 上的 ARHGEF2 与 11q13.1 上的 MARK2 基因存在非常密切的相互调控作用。对基因与染色体倾斜性失活的关联分析发现, Xq26.2 区域的 GPC3 基因突变与染色体倾斜性失活存在一定的关联性^[7], 其主要调控糖蛋

白结合、硫酸肝素蛋白多糖结合、肽基-二肽酶抑制因子活性。并且GPC3还与调控有丝分裂、血管形成FGF2基因及调控生长发育的重要印迹基因IGF2间存在密切的基因相互作用, 见图2。

表 2 X 染色体倾斜性失活的人胚胎干细胞中共同拷贝数变异区域及其涵盖基因

Table 2 Hot copy number variation regions and genes in skewed X chromosome inactivated human embryonic stem cells

拷贝数变异区域	拷贝数变异模式	基因名称及 MIM 基因号
1q22	Gain	ARHGEF2 (607560), MEX3A (611007), RAB25(612942), ROBLD3, SSR2(600867), UBQLN4 (605440)
1p34.1	Gain	TESK2 (604746)
6q16.3	Gain	ASSC3
7q31.32	Gain	CADPS2 (609978)
11q13.1	Gain	MARK2(600526), COX8(123870), NAA40, OTUB1 (608337), RCOR2
16q12.2	Gain	CDH9(609974)
19p13.12	Gain	HSH2D, RAB8A(165040)
Xp22.33	Gain	DHRX
Xq26.2	Gain	GPC3(300037)

注: 运用 ChAS 软件在 9 个拷贝数变异区域中共发现涵盖 19 个基因, 其中 13 个基因经 OMIM 在线分析证实与疾病密切相关。

表 3 部分基因功能注释及 Gene-Ontology(GO)编号

Table 3 Gene function and Gene-Ontology number

基因	功能	基因本体论(GO)编号
GPC3	糖蛋白结合	GO: 0001948
	硫酸肝素蛋白多糖结合	GO: 0043395
	肽基-二肽酶抑制因子活性	GO: 0060422
HSH2D	蛋白质结合、桥连	GO: 0030674
ARHGEF2	核苷三磷酸酶调控活性	GO: 0060589
MARK2	核酸结合	GO: 0000166
	蛋白酶活性	GO: 0004672
RCOR2	DNA 结合	GO: 0003677
ASCC3	核酸结合	GO: 0000166

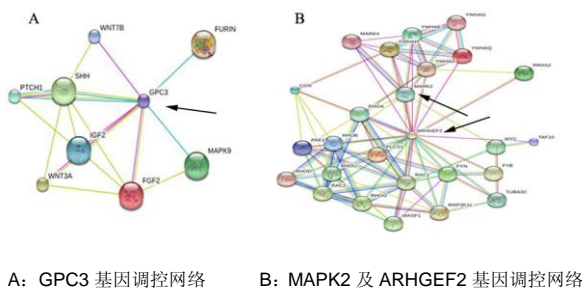


图 2 拷贝数变异涵盖基因相互作用网络

Figure 2 Interaction network of hot copy number variation gene

3 讨论

X 染色体倾斜性失活是指在 75% 甚至更多的细胞中倾斜性地只选择了母性来源或父性来源的 X 染色体进行失活^[8]。X 染色体倾斜性失活与许多疾病相关, 如卵巢功能早衰、自发流产及癌症等^[9-10]。近年来有学者发现人胚胎干细胞也存在着 X 染色体倾斜性失活模式^[3-5, 11]。由于多能干细胞本身在培养过程中存在培养适应性^[4, 12-13], 人胚胎干细胞发生 X 染色体倾斜性失活到底是先天在胚胎期就已产生还是后天在干细胞建系培养过程中产生目前并不清楚。最近有学者证实添加小分子化合物可以建立双活性 X 染色体的人胚胎干细胞^[14], 证实人胚胎干细胞产生 X 染色体失活或 X 染色体倾斜性失活可能与体外培养有关。虽然在多能性、分化能力、核型分析等方面的研究表明这种表观异常的人胚胎干细胞与正常随机失活的人胚胎干细胞并没有太大区别^[3-5, 12], 但在微小基因组结构上其是否与随机失活人胚胎干细胞存在差异、这种微小基因组的差异对人胚胎干细胞是否产生功能影响等均不清楚。

近年来, 拷贝数变异正成为干细胞遗传研究的一个热点^[2, 15]。所谓拷贝数变异是指在人类基因组中, 从 1 kb-3 Mb 甚至更大范围内的缺失、插入、重复和复杂多位点的变异^[16]。最近的研究证实, 在过去 G 带分析被认为是核型正常的人胚胎干细胞中存在许多微小的、可以对基因的表达及细胞功能产生影响的拷贝数变异^[15]。Maitra 等^[8]运用 Affymetrix 芯片对长期培养的 9 株人胚胎干细胞进行早代及晚代培养的比较, 发现了包括 17q 异常重复、13 号染色体缺失及 4 个大的拷贝数变异等基因组异常, 其中一个拷贝数变异涉及致癌基因 MYC。Narva 等^[2]对拷贝数变异的构成分析后发现相对于成体细胞, 人胚胎干细胞的拷贝数变异主要集中在 14, 20, X 等染色体, 并且拷贝数变异以重复为主 (72%), 这与本研究发现基本一致。虽然本实验因选用细胞株数量偏少而无法对两组间拷贝数变异数量是否存在显著性差异进行统计学分析, 但实验结果还是提醒大家在未来的临床应用时应该对这种 X 染色体倾斜性失活的人胚胎干细胞持更谨慎的态度。

拷贝数变异可以影响其涵盖基因表达, 导致转录异常, 并与许多疾病密切相关^[17-18]。研究发现人胚胎干细胞的拷贝数变异涵盖基因有 30% 发生了表达改变, 有些与癌

症发生密切相关^[2]。本研究发现X染色体倾斜性失活的人胚胎干细胞在拷贝数变异数量及其涵盖基因均多于随机失活人胚胎干细胞, 预示X染色体倾斜性失活细胞有更多的基因可能因拷贝数变异而导致剂量变化。如果剂量改变的基因涉及调控细胞重要功能, 则有可能对人胚胎干细胞产生重大的影响, 导致细胞功能及表型发生变化。作者在对基因相互作用网络分析时发现调控核苷三磷酸酶活性的ARHGEF2基因与调控蛋白酶活性的MARK2间存在着非常密切的相互作用。由于这两个基因分别位于1号和11号两条不同的染色体上, 而且两个基因均处于共同基因调控作用网络的中央, 预示这两个基因的异常将导致一系列的连锁反应, 并可能对人胚胎干细胞功能产生影响。

对X染色体倾斜性失活是否与拷贝数变异存在关联性目前并不清楚。最近有学者对45例女性X染色体倾斜性失活患者及45例对照的血液标本进行分析后发现两组间在X染色体拷贝数变异发生频率上并没有明显差异^[19], 但也发现1例X染色体倾斜性失活患者在Xp22.2p22.1区域存在5.5 Mb的缺失。因此不能完全排除X染色体本身基因组结构的异常导致X染色体在启动及选择失活时期发生了倾斜性失活。

基金资助: 由国家自然科学基金(31171229)、广东省医学自然科学基金(A2011280)资助。

作者贡献: 刘维强负责实验设计、芯片实验、数据分析、论文撰写等; 何文智共同进行芯片分析; 曹定娅, 李洁亮, 郭丽媛进行细胞培养及DNA收集; 黎青参与评估, 孙筱放审校。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验经广州医学院第三附属医院医学伦理委员会批准。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol.* 2007;25(2):207-215.
- [2] Närvä E, Autio R, Rahkonen N, et al. High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity. *Nat Biotechnol.* 2010;28(4):371-377.
- [3] Shen Y, Matsuno Y, Fouse SD, et al. X-inactivation in female human embryonic stem cells is in a nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(12):4709-4714.
- [4] Silva SS, Rowntree RK, Mekhoubad S, et al. X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(12):4820-4825.
- [5] Liu W, Sun X. Skewed X chromosome inactivation in diploid and triploid female human embryonic stem cells. *Hum Reprod.* 2009;24(8):1834-1843.
- [6] Sun X, Long X, Yin Y, et al. Similar biological characteristics of human embryonic stem cell lines with normal and abnormal karyotypes. *Hum Reprod.* 2008;23(10):2185-2193.
- [7] Yano S, Baskin B, Bagheri A, et al. Familial Simpson-Golabi-Behmel syndrome: studies of X-chromosome inactivation and clinical phenotypes in two female individuals with GPC3 mutations. *Clin Genet.* 2011; 80(5):466-471.
- [8] Minks J, Robinson WP, Brown CJ. A skewed view of X chromosome inactivation. *J Clin Invest.* 2008;118(1):20-23.
- [9] Kristiansen M, Langerød A, Knudsen GP, et al. High frequency of skewed X inactivation in young breast cancer patients. *J Med Genet.* 2002;39(1):30-33.
- [10] Ozbalkan Z, Bağışlar S, Kiraz S, et al. Skewed X chromosome inactivation in blood cells of women with scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2005;52(5):1564-1570.
- [11] Dvash T, Lavon N, Fan G. Variations of X chromosome inactivation occur in early passages of female human embryonic stem cells. *PLoS One.* 2010;5(6):e11330.
- [12] Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet.* 2005; 37(10):1099-1103.
- [13] Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature.* 2011;471(7336):58-62.
- [14] Diaz Perez SV, Kim R, Li Z, et al. Derivation of new human embryonic stem cell lines reveals rapid epigenetic progression in vitro that can be prevented by chemical modification of chromatin. *Hum Mol Genet.* 2012;21(4): 751-764.
- [15] Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006;444(7118): 444-454.
- [16] Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med.* 2010;61: 437-455.
- [17] Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science.* 2007; 316(5823):445-449.
- [18] Coe BP, Girirajan S, Eichler EE. The genetic variability and commonality of neurodevelopmental disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2012;160C(2):118-29.
- [19] Jobanputra V, Levy B, Kinney A, et al. Copy Number Changes on the X Chromosome in Women with and without Highly Skewed X-Chromosome Inactivation. *Cytogenet Genome Res.* 2012;136(4):264-269.