

囊胚期玻璃化二次冷冻对小鼠胚胎组蛋白表观修饰及多能性基因表达的影响

<https://doi.org/10.12307/2022.733>王建武¹, 赵艳华², 李竞宇², 王加强¹

投稿日期: 2021-10-15

采用日期: 2021-12-07

修回日期: 2021-12-30

在线日期: 2022-01-19

中图分类号:

R459.9; R318; Q813.7

文章编号:

2095-4344(2022)31-05047-06

文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点—

△通过对比小鼠胚胎在8-细胞时期及囊胚期进行二次冷冻后组蛋白表观遗传和多能性因子的表达水平, 为人类胚胎二次冷冻的临床应用提供参考。

收集小鼠2-细胞胚胎体外培养至8-细胞

8-细胞及囊胚期进行二次冷冻

囊胚期检测(组蛋白表观遗传修饰及多能性基因)

结论:

- (1) 囊胚期二次冷冻对小鼠胚胎组蛋白表观修饰H3K4me3表达的影响尤为严重;
- (2) 囊胚期二次冷冻导致小鼠胚胎多能性基因表达水平显著升高或降低;
- (3) 在8-细胞时期进行二次冷冻可能是更好的选择。

文题释义:

玻璃化冷冻: 液体介质在没有冰晶形成的情况下快速冷却的冷冻保存过程, 已获得医学界广泛的认可, 并渐渐取代传统慢速冷冻法, 成为冷冻技术的最佳选择。玻璃化冷冻目前已应用于卵母细胞、胚胎及卵巢组织的冷冻保存。

组蛋白表观修饰: 表观修饰是指在核酸序列不发生改变的情况下, 遗传物质出现了可遗传的变化, 从而导致可遗传的表型改变。蛋白质在翻译后需要经过合适的折叠及翻译后修饰才能行使正常功能, 对组蛋白而言通常是甲基和乙酰基基团的修饰, 包括组蛋白甲基化、乙酰化、泛素化等。

摘要

背景: 在辅助生殖工作中, 玻璃化二次冷冻可以有效提高胚胎利用率。课题组前期研究结果显示, 不同发育时期的玻璃化二次冷冻显著影响胚胎发育, 但其机制尚不明确。

目的: 探讨不同时期玻璃化二次冷冻影响胚胎发育潜力的可能机制。

方法: 收集ICR小鼠体内受精的2-细胞胚胎并进行体外培养, 随机分为4组: 对照组、8-细胞冷冻一次组(8C)、8-细胞冷冻一次解冻后于8-细胞期(8C-8C)或培养至囊胚期(8C-BL)再次冷冻。利用免疫荧光分析囊胚期H3K4me3、H3K9me2及H3K9AC的表达水平; 实时荧光定量PCR分析多能性基因Cdx2、Oct4及Sox2的转录水平。

结果与结论: ①免疫荧光结果显示, 一次和二次冷冻均会导致囊胚期H3K9me2 ($P < 0.01$)及H3K9AC水平显著上升 ($P < 0.0001$); ②一次冷冻不影响H3K4me3水平, 但二次冷冻组H3K4me3水平显著下降, 且在8C-BL组下降尤为严重 ($P < 0.0001$); ③实时荧光定量PCR结果显示, 一次冷冻及8-细胞期二次冷冻不会影响胚胎多能性基因Cdx2、Oct4和Sox2的表达水平, 但8C-BL组胚胎多能性基因表达水平显著改变, Oct4的表达水平显著下降 ($P < 0.01$), 而Cdx2 ($P < 0.001$)和Sox2 ($P < 0.01$)的表达水平显著上升; ④结果表明, 玻璃化二次冷冻对小鼠胚胎的表观遗传具有一定的负面影响, 且囊胚期二次冷冻显著影响H3K4me3修饰及多能性相关基因表达水平。

关键词: 早期胚胎; 二次冷冻; 小鼠; 辅助生殖; 组蛋白表观遗传; 多能性基因

Effects of re-vitrification at blastocyst stage on histone epigenetic modification and pluripotency gene expression in mouse embryos

Wang Jianwu¹, Zhao Yanhua², Li Jingyu², Wang Jiaqiang¹

¹College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China; ²Key Laboratory of Human Embryo Engineering, Chongqing Maternal and Child Health Care Hospital, Chongqing 400013, China

Wang Jianwu, Master candidate, College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China

Zhao Yanhua, Key Laboratory of Human Embryo Engineering, Chongqing Maternal and Child Health Care Hospital, Chongqing 400013, China

Wang Jianwu and Zhao Yanhua contributed equally to this article.

Corresponding author: Wang Jiaqiang, MD, Professor, College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China

Co-corresponding author: Li Jingyu, MD, Associate researcher, Key Laboratory of Human Embryo Engineering, Chongqing Maternal and Child Health Care Hospital, Chongqing 400013, China

¹东北农业大学生命科学学院, 黑龙江省哈尔滨市 150030; ²重庆市妇幼保健院人类胚胎工程重庆市重点实验室, 重庆市 400013

第一作者: 王建武, 男, 1995年生, 汉族, 东北农业大学在读硕士, 主要从事早期胚胎发育方面的研究。

并列第一作者: 赵艳华, 女, 1990年生, 2016年东北农业大学毕业, 主要从事早期胚胎发育方面的研究。

通讯作者: 王加强, 博士, 教授, 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江省哈尔滨市 150030

并列通讯作者: 李竞宇, 博士, 副研究员, 重庆市妇幼保健院人类胚胎工程重庆市重点实验室, 重庆市 400013

<https://orcid.org/0000-0002-1758-3316> (王加强)

基金资助: 国家自然科学基金面上项目(31970588), 项目负责人: 王加强; 重庆市科卫联合医学科研项目-面上项目

(2021MSXM072), 项目负责人: 李竞宇

引用本文: 王建武, 赵艳华, 李竞宇, 王加强. 囊胚期玻璃化二次冷冻对小鼠胚胎组蛋白表观修饰及多能性基因表达的影响 [J].

中国组织工程研究, 2022, 26(31):5047-5052.



Abstract

BACKGROUND: In assisted reproduction work, re-vitrification can effectively improve embryo utilization. Our previous research results show that the secondary vitrification at different developmental stages significantly affects embryo development, but the mechanism is still unclear.

OBJECTIVE: To discuss the potential mechanism of secondary vitrification in different periods affecting embryo development potential.

METHODS: These 2-cell embryos fertilized *in vivo* were collected and cultured *in vitro*, and randomly divided into four groups: control, vitrified at the 8-cell stage (8C), vitrified at the 8-cell stage, and re-vitrified at the 8-cell (8C-8C) or early blastocyst stage (8C-BL). Immunofluorescence was utilized to analyze changes in the expression levels of H3K4me3, H3K9me2, and H3K9AC at the blastocyst stage. Real-time fluorescent quantitative PCR was applied to analyze changes in the expression levels of pluripotency genes *Cdx2*, *Oct4*, and *Sox2*.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Immunofluorescence results showed that first and second freezing led to a significant increase in the levels of H3K9me2 ($P < 0.01$) and H3K9AC ($P < 0.0001$) at the blastocyst stage. (2) The first freezing did not affect the level of H3K4me3, but the level of H3K4me3 in the second freezing decreased significantly, and the decrease was more serious in the 8C-BL group ($P < 0.0001$). (3) The results of real-time fluorescent quantitative PCR showed that the first freezing and the second freezing at the 8-cell stage did not affect the expression levels of embryo pluripotency genes *Cdx2*, *Oct4* and *Sox2*, but the expression levels of embryo pluripotency genes in the 8C-BL group changed significantly. The level of *Oct4* decreased significantly ($P < 0.01$), while the expression level of *Cdx2* ($P < 0.001$) and *Sox2* ($P < 0.01$) increased significantly. (4) The results show that the secondary vitrification has a certain negative impact on the epigenetics of mouse embryos, and the secondary freezing at the blastocyst stage significantly affects the H3K4me3 modification and pluripotency-related gene expression levels.

Key words: early embryos; re-vitrification; mouse; assisted reproductive; histone epigenetics; pluripotency gene

Funding: National Natural Science Foundation of China (General Program), No. 31970588 (to WJQ); Chongqing Science and Health Joint Medical Research Project-General Project, No. 2021MSXM072 (to LJY)

How to cite this article: WANG JW, ZHAO YH, LI JY, WANG JQ. Effects of re-vitrification at blastocyst stage on histone epigenetic modification and pluripotency gene expression in mouse embryos. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(31):5047-5052.

0 引言 Introduction

胚胎玻璃化冷冻是辅助生殖中的一项重要技术。自1983年首次报道冷冻胚胎移植 (frozen embryo transfer, FET) 临床妊娠以来, 胚胎冷冻已成为人类辅助生殖领域中常见的技术手段^[1]。二次冷冻是指对解冻复苏后的胚胎进行再次冷冻。1990年, 首例二次冷冻的胚胎成功妊娠^[2]。临床中, 胚胎二次冷冻主要发生在以下几种情况: ①随着单胚胎移植的逐渐普及, 解冻胚胎数有时会多于移植胚胎数, 对解冻移植后剩余的优质胚胎会行二次冷冻; ②8-细胞期的胚胎解冻后进行囊胚培养, 但患者由于内膜等因素取消了移植周期, 获得的可移植囊胚进行二次冷冻; ③因各种原因, 胚胎解冻复苏后不能移植^[3-5]。因此, 通过二次冷冻, 可以有效提高累计活产率, 并降低多胎妊娠的风险。课题组前期的研究结果显示, 在8-细胞期和囊胚期进行二次玻璃化冷冻对胚胎发育潜力有不同的影响, 囊胚期二次冷冻显著降低活产率, 并在小鼠上进行了验证, 但其具体机制尚不明确^[6]。

胚胎发育是一个复杂的过程, 受到组蛋白表观修饰、多能性基因表达等多方面的调控。在胚胎的发育过程中, 组蛋白甲基化或乙酰化发生异常, 都会影响胚胎乃至整个个体的发育^[7-8]。胚胎的谱系分化也受到多能性基因 *Oct4*、*Sox2* 及 *Cdx2* 等的调控^[9]。然而, 目前有关二次冷冻对胚胎发育潜能的影响机制知之甚少。因此, 该研究基于小鼠这一模式动物, 探索不同时期二次冷冻对小鼠胚胎组蛋白表观遗传修饰及多能性基因表达的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外胚胎实验, 包括胚胎免疫荧光及实时荧光定量PCR实验, 单因素方差分析用于评估组间差异。

1.2 时间及地点 实验于2021年1-8月在重庆市妇幼保健院人类胚胎工程重庆市重点实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 小鼠 雄性ICR小鼠60只, 体质量36-42g, 雌性ICR小鼠230只, 体质量25-30g, 均为6-8周龄, 均购自北京维

通利华实验动物技术有限公司。实验方案经重庆市妇幼保健院实验动物福利伦理委员会批准, 批准号为2021005。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

1.3.2 胚胎冷冻、解冻试剂盒 玻璃化冷冻、解冻使用商业化的试剂盒 (Kitazato Inc, Cryotop Safety Kit, F0403)。

1.3.3 胚胎培养试剂 M2培养基 (Sigma, 货号M716); KSOM培养基 (Sigma, 货号MR-121-D)。

1.3.4 抗体 H3K4me3 (CST, 货号9727, 来源: 兔, 稀释比例: 1 : 1 000); H3K9me2 (Abcam, 货号ab32521, 来源: 兔, 稀释比例: 1 : 1 000); H3K9AC (Abcam, 货号ab32129, 来源: 兔, 稀释比例: 1 : 500); 二抗 (CST, 货号4412, 来源: 山羊, 稀释比例: 1 : 200)。

1.4 实验方法

1.4.1 胚胎培养及获取 雄性和雌性ICR小鼠在光控条件下饲养, 12h光照, 12h黑暗, 自由摄食和饮水, 温度22-24℃。超排小鼠于下午4:00腹腔注射孕马血清促性腺激素10IU, 48h后腹腔注射人绒毛膜促性腺激素10IU, 与雄鼠合笼交配, 次日早晨检查雌鼠阴栓, 见栓小鼠在注射人绒毛膜促性腺激素44h后从输卵管中收集2-细胞胚胎, 体外培养至8-细胞。将8-细胞胚胎分为4组: ①对照组: 8-细胞直接体外培养至囊胚; ②8C组: 8-细胞时期冷冻一次并解冻培养至囊胚; ③8C-8C组: 8-细胞时期冷冻解冻2次后培养至囊胚; ④8C-BL组: 8-细胞时期冷冻解冻培养至囊胚期, 再在囊胚期冷冻并解冻, 见图1。

1.4.2 胚胎冷冻 使用商业化的试剂盒 (Kitazato Inc, Cryotop Safety Kit, F0403) 进行冷冻, 先进行实验前的准备工作, 将平衡液ES和玻璃化冷冻液VS在室温下平衡15min, 在载杆上写明要冷冻的胚胎数量及信息, 将新鲜的液氮放置于冷冻架中。然后将胚胎转移至平衡液ES中平衡12-15min, 再将胚胎转移至玻璃化冷冻液中暴露45-60s, 最后用少量的玻璃化冷冻液将胚胎挪到载杆的顶端, 并立即浸入液氮中。

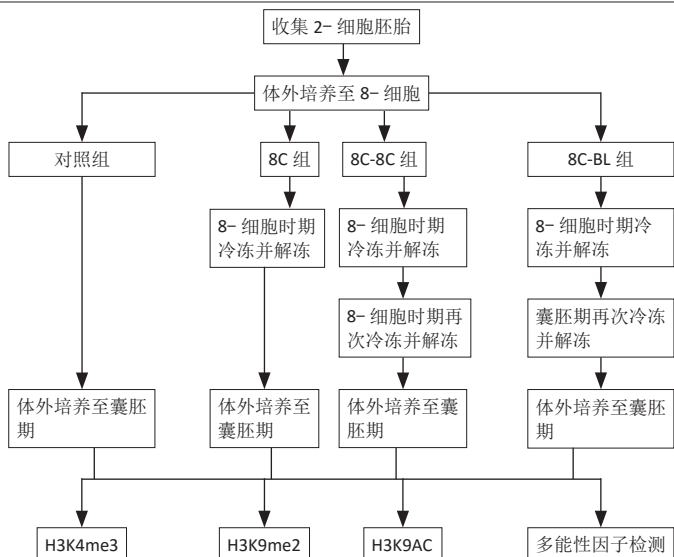


图 1 | 不同发育时期的胚胎二次冷冻流程图

Figure 1 | Flow chart of secondary freezing of embryos at different developmental stages

1.4.3 胚胎解冻 使用商业化的试剂盒 (Kitazato Inc, Cryotop Safety Kit, F0403) 进行解冻, 胚胎的解冻分为 4 个步骤: 首先, 将载杆顶端冷冻的玻璃化胚胎浸入已预热至 37 °C 的 1.0 mol/L 蔗糖溶液 (TS) 中, 保持 1 min; 第 2 步, 将胚胎悬浮于 0.5 mol/L 蔗糖溶液 (DS) 中 3 min; 第 3 步, 在清洗液 1 (WS1) 溶液中浸泡 5 min; 第 4 步, 在清洗液 2 (WS2) 溶液中浸泡 1 min。解冻完成之后在培养液中培养。

1.4.4 免疫荧光染色 收集 3.5 d 各组囊胚, 用含有 0.2% 聚乙烯醇的 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 然后置于 40 g/L 多聚甲醛中室温条件下固定 1 h; 再将胚胎转移至含有 0.1% TritonX-100 的 PBS 母液中透膜处理 30 min, 转移前洗涤 3 次, 每次 5 min; 然后将胚胎转移至封闭液 (含 3% 牛血清白蛋白) 中封闭处理, 室温下孵育 1 h; 洗涤 3 次, 每次 5 min, 4 °C 冰箱过夜进行一抗 (H3K4me3、H3K9AC 及 H3K9me2) 孵育; PBSA (含 1% 牛血清白蛋白) 洗涤 3 次, 每次 5 min, 室温下孵育二抗 2 h, 过程中要注意避光; PBSA 洗涤 3 次后, 用 hoechst 染核 15 min, 转移至载玻片上, 压片, 之后在共聚焦显微镜 (Leica TCS SP8) 下拍照, 利用 ImageJ 软件统计荧光平均强度。

1.4.5 总 RNA 提取 使用 Thermo Fisher 公司 RNA 提取试剂盒 Arcturus PicoPure RNA isolation Kit (Thermo, KIT0214), 具体操作如下: 取出在囊胚期冻存的胚胎 (100 枚); 先加入 350 μL Lysis Buffer, 用移液枪轻轻吹匀; 再加入 350 μL 体积分数为 70% 乙醇, 再次用移液枪轻轻吹匀; 将混合后样品转移至吸附柱中, 12 000 r/min 离心 20 s, 弃废液; 在吸附柱中加入 80 μL DNA 酶, 避光消化 15 min; 加入 350 μL Wash Buffer 1, 12 000 r/min 离心 20 s, 弃废液; 随后加入 500 μL Wash Buffer 2, 12 000 r/min 离心 20 s, 弃废液; 再加入 500 μL Wash Buffer 2, 12 000 r/min 离心 20 s, 弃废液; 13 000 r/min 空离 2 min, 更换收集管; 在吸附柱中加入 20 μL DEPC 水洗脱。

1.4.6 总 RNA 反转录 使用 Takara 反转录试剂盒 PrimeScript RT Master Mix (Takara, 货号 RR036A), 具体操作如下: 准备 2×RT Master Mix 2.0 μL 的 10×RT Buffer, 0.8 μL 的 25×dNTP Mix (100 mol/L), 2.0 μL 的 10×RT Random Primers, 1.0 μL 的 MultiScribe Reverse Transcriptase, 4.2 μL 的 Nuclease-free H₂O; 将 2×RT Master Mix 与洗脱得到 RNA 混合均匀, 反应条件: 25 °C 10 min, 37 °C 2 h, 85 °C 5 min, 经反转得到 cDNA。

1.4.7 Real-time PCR 实验 基因表达模式检测均采用 SYBR real-time PCR, 反应体系如下: 1 μL 模板 cDNA, 10 μL 2×SYBR ExTaq Mix, 引物 F/R (10 μmol/L) 各 0.5 μL (2×1 μL), 8 μL dH₂O。在 CFX96 Real-Time System 上按以下条件作 PCR 反应, 95 °C 30 s, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min (检测信号), 40 个循环, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min (检测信号), 95 °C 15 s。Real-time PCR 结果分析采用经典 2^{-ΔΔCt} 法。相对基因表达归一化处理以 Hprt mRNA 水平为内参。基因引物序列见表 1。

表 1 | RT-PCR 引物信息 (小鼠)

Table 1 | Primer sequences for RT-PCR (mouse)

基因	引物序列	退火温度 (°C)
Cdx2	F: 5'-CAG CAA CAA CAG CCT CCA CAG C-3'	56.9
	R: 5'-GAG GAT TCT CGC AGC GTC CAT AC-3'	
Sox2	F: 5'-TTT GTC CGA GAC CGA GAA GC-3'	57.5
	R: 5'-CTC CGG GAA GCG TGT ACT TA-3'	
Oct4	F: 5'-GCA GAT CAC TCA CAT CGC CAA T-3'	62
	R: 5'-CCT GGG AAA GGT GTC CCT GTA G-3'	
Hprt	F: 5'-GGC TTC CTC CTC AGA CCG CTT T-3'	62.4
	R: 5'-CAC TTT TTC CAA ATC CTC GGC ATA A-3'	

1.5 主要观察指标 新鲜组胚胎体外培养至囊胚期、在 8- 细胞时期冷冻并解冻后培养至囊胚期、在 8- 细胞时期冷冻并解冻 2 次后培养至囊胚期以及 8- 细胞时期冷冻解冻培养至囊胚期, 再在囊胚期冷冻并解冻后进行免疫荧光染色, 观察统计 H3K4me3、H3K9me2 和 H3K9AC 的荧光强度变化, RT-PCR 检测多能性基因 Oct4、Sox2 及 Cdx2 的表达水平。

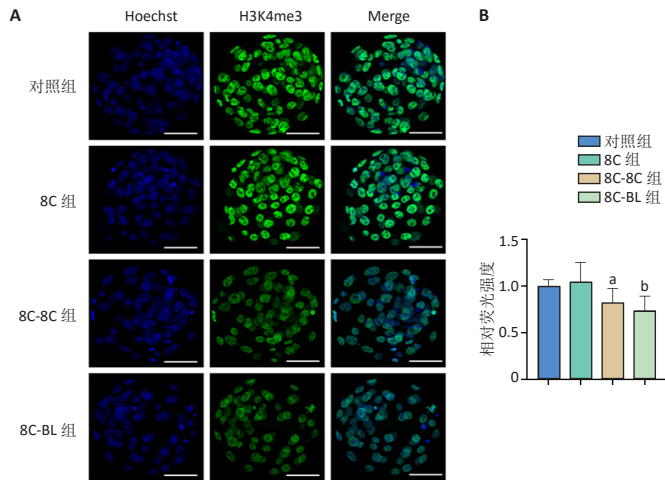
1.6 统计学分析 使用 SPSS 23.0 软件统计分析。数据以平均值 ± 标准误表示, 单因素方差分析用于评估组间差异。利用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。文章统计学方法已经通过东北农业大学生命科学学院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 二次冷冻导致囊胚期 H3K4me3 表达水平下降 对各组囊胚进行 H3K4me3 免疫荧光染色, 见图 2A, 并对荧光的平均强度进行分析, 结果表明, 对照组 (n=16) 相对荧光强度为 1.000±0.068, 8C 组 (n=14) 相对荧光强度为 1.045±0.207, 8C-8C 组 (n=16) 相对荧光强度为 0.818±0.155, 8C-BL 组 (n=17) 相对荧光强度为 0.738±0.154, 相较于对照组, 一次冷冻组 (8C 组) H3K4me3 的表达水平无显著变化, 但是二次冷冻组 (8C-8C 组和 8C-BL 组) H3K4me3 的水平显著降低, 其中 8C-BL 组降低尤为明显 (P < 0.001), 见图 2B。

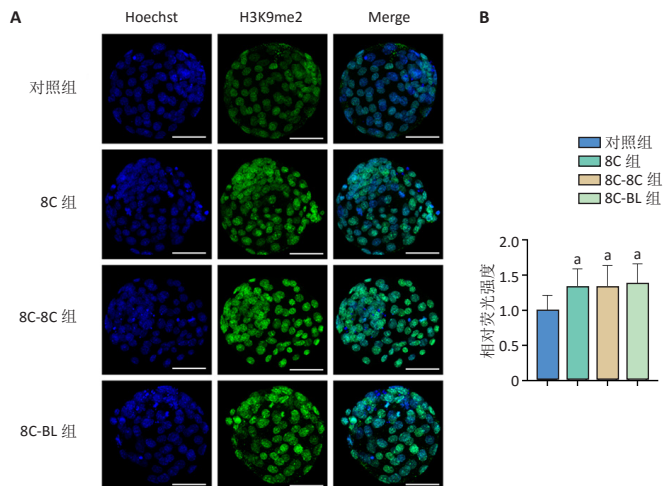
2.2 冷冻导致囊胚期 H3K9me2 表达水平上升 对各组囊胚进行 H3K9me2 免疫荧光染色, 见图 3A, 并对荧光的平

均强度进行分析, 结果表明, 对照组 ($n=13$) 相对荧光强度为 1.000 ± 0.213 , 8C 组 ($n=5$) 相对荧光强度为 1.335 ± 0.225 , 8C-8C 组 ($n=11$) 相对荧光强度为 1.341 ± 0.297 , 8C-BL 组 ($n=14$) 相对荧光强度为 1.382 ± 0.28 , 相较于对照组, 一次冷冻组 (8C 组) 及二次冷冻组 (8C-8C 组和 8C-BL 组) H3K9me2 表达水平均有显著升高 ($P < 0.01$), 但二次冷冻组 (8C-8C 组和 8C-BL 组) 与一次冷冻组 (8C 组) 之间无显著差异, 见图 3B。



图注: 图 A 为免疫荧光染色 (标尺为 $50\ \mu\text{m}$); B 为荧光平均强度分析 (与对照组比较, $^aP < 0.01$, $^bP < 0.0001$)。对照组: 8-细胞直接体外培养至囊胚; 8C 组: 8-细胞时期冷冻 1 次并解冻培养至囊胚; 8C-8C 组: 8-细胞时期冷冻解冻 2 次后培养至囊胚; 8C-BL 组: 8-细胞时期冷冻解冻培养至囊胚期, 再在囊胚期冷冻并解冻

图 2 | 各组囊胚 H3K4me3 免疫荧光染色及荧光强度分析
Figure 2 | H3K4me3 immunofluorescence staining and fluorescence intensity of blastocysts in each group

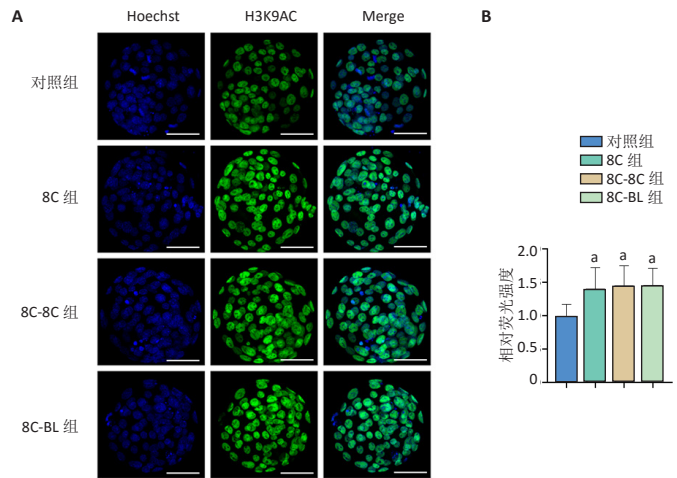


图注: 图 A 为免疫荧光染色 (标尺为 $50\ \mu\text{m}$); B 为荧光强度分析 (与对照组比较, $^aP < 0.01$)。对照组: 8-细胞直接体外培养至囊胚; 8C 组: 8-细胞时期冷冻 1 次并解冻培养至囊胚; 8C-8C 组: 8-细胞时期冷冻解冻 2 次后培养至囊胚; 8C-BL 组: 8-细胞时期冷冻解冻培养至囊胚期, 再在囊胚期冷冻并解冻

图 3 | 各组囊胚 H3K9me2 免疫荧光染色及荧光强度分析
Figure 3 | H3K9me2 immunofluorescence staining and fluorescence intensity of blastocysts in each group

2.3 冷冻导致囊胚期 H3K9AC 表达水平上升 对各组囊胚进行 H3K9AC 免疫荧光染色, 见图 4A, 并对染色的结果进行荧光平均强度分析, 结果显示, 对照组 ($n=21$) 相对荧光强度

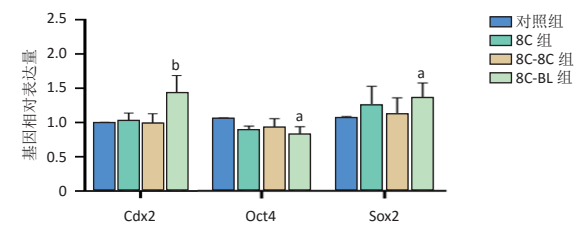
为 0.994 ± 0.175 , 8C 组 ($n=20$) 相对荧光强度为 1.404 ± 0.315 , 8C-8C 组 ($n=16$) 相对荧光强度为 1.450 ± 0.299 , 8C-BL 组 ($n=13$) 相对荧光强度为 1.457 ± 0.253 , 与对照组相比, 一次冷冻组 (8C 组, $P < 0.0001$) 及二次冷冻组 (8C-8C 组和 8C-BL 组, $P < 0.0001$) H3K9AC 表达水平均有显著升高, 但二次冷冻组 (8C-8C 组和 8C-BL 组) 与一次冷冻组 (8C 组) 之间无显著差异, 见图 4B。



图注: 图 A 为免疫荧光染色 (标尺为 $50\ \mu\text{m}$); B 为荧光强度分析 (与对照组比较, $^aP < 0.0001$)。对照组: 8-细胞直接体外培养至囊胚; 8C 组: 8-细胞时期冷冻 1 次并解冻培养至囊胚; 8C-8C 组: 8-细胞时期冷冻解冻 2 次后培养至囊胚; 8C-BL 组: 8-细胞时期冷冻解冻培养至囊胚期, 再在囊胚期冷冻并解冻

图 4 | 各组囊胚 H3K9AC 免疫荧光染色及荧光强度分析
Figure 4 | H3K9AC immunofluorescence staining and fluorescence intensity of blastocysts in each group

2.4 囊胚期二次冷冻影响多能性基因的表达水平 实时荧光定量 PCR 结果显示, Cdx2 在对照组、8C 组、8C-8C 组及 8C-BL 组的相对表达量分别为 1, 1.03 ± 0.11 , 1.00 ± 0.13 , 1.44 ± 0.25 , Oct4 在对照组、8C 组、8C-8C 组及 8C-BL 组的相对表达量分别为 1, 0.85 ± 0.05 , 0.79 ± 0.05 , 0.76 ± 0.13 , Sox2 在对照组、8C 组、8C-8C 组及 8C-BL 组的相对表达量分别为 1.00 ± 0.01 , 1.18 ± 0.2 , 1.02 ± 0.19 , 1.26 ± 0.19 , 与对照组相比, 一次冷冻组 (8C 组) 及 8C-8C 组中 Oct4、Cdx2 和 Sox2 基因表达水平均无显著差异。然而, 8C-BL 组中 Cdx2 ($P < 0.001$)、Sox2 ($P < 0.01$) 表达水平显著上升, Oct4 ($P < 0.01$) 的表达水平显著下降, 见图 5。



图注: 与对照组比较, $^aP < 0.01$, $^bP < 0.001$ 。对照组: 8-细胞直接体外培养至囊胚; 8C 组: 8-细胞时期冷冻 1 次并解冻培养至囊胚; 8C-8C 组: 8-细胞时期冷冻解冻 2 次后培养至囊胚; 8C-BL 组: 8-细胞时期冷冻解冻培养至囊胚期, 再在囊胚期冷冻并解冻

图 5 | 各组囊胚多能性基因相对表达量
Figure 5 | Relative expression of pluripotency genes in blastocysts of each group

3 讨论 Discussion

在辅助生殖助孕中,存在胚胎二次冷冻的情况,其可以提高胚胎利用率,从而提高累计活产率。课题组之前的研究结果表明,不同时期的胚胎二次冷冻会影响发育潜能,其中囊胚期二次冷冻会导致妊娠率显著降低,但其机制尚不明确。该研究通过对不同时期胚胎冷冻,发现相较于对照组,囊胚期二次冷冻会显著改变组蛋白 H3K4me3 的修饰及多能性相关基因 Oct4、Cdx2 和 Sox2 的表达水平,为阐明二次冷冻对胚胎发育潜力的可能影响提供了依据。

目前,胚胎冷冻保存技术在辅助生殖中广泛应用,玻璃化冷冻保存的胚胎数量迅速增加。在某些情况下,胚胎在移植前需要经历 2 次冷冻^[10]。EL-GAYAR 等^[11] 研究发现有一部分胚胎不能忍受 3 次冷冻。VITALE 等^[12] 在解冻后的每个周期之间重复冷冻小鼠胚胎,且不进行培养时间干预,其孵化时的平均细胞数低于新鲜胚胎,表明连续的冷冻过程影响了胚胎发育。NOHALEZ 等^[13] 对猪的胚胎进行玻璃化二次冷冻研究发现,尽管二次冷冻会降低囊胚存活率及孵化率,但仍有一部分胚胎可用于移植。MAJIDI GHARENANZ 等^[14] 对小鼠胚胎在桑椹期进行玻璃化二次冷冻,会显著降低囊胚发育率。临床研究方面,ZHENG 等^[15] 对人类囊胚期二次冷冻胚胎与新鲜胚胎比较发现,二次冷冻胚胎妊娠率显著降低。MURAKAMI 等^[16] 研究发现,与一次冷冻胚胎相比,囊胚期二次冷冻胚胎流产率显著增加。作者之前对小鼠和人的胚胎研究表明,与新鲜胚胎相比,8-细胞期二次冷冻不影响妊娠率,但囊胚期二次冷冻导致妊娠率显著降低,为此对其机制进行了探索。

在胚胎发育过程中,组蛋白会经历多种翻译后修饰,包括甲基化、乙酰化等^[17]。组蛋白精确修饰确保胚胎发育过程中基因的正确表达,其中 H3K4me3 动态控制着早期胚胎发育,对调控基因活化和发育功能至关重要^[18]。以组蛋白甲基转移酶 SETD1 为核心组成的蛋白复合体是细胞中负责生成 H3K4me3 修饰的主要生物大分子,SHA 等^[19] 将该复合体中一个非常重要的亚基 CFP1 条件性敲除后发现胚胎在刚刚植入子宫即死亡,说明 CFP1 介导的 H3K4me3 修饰直接介导了卵母细胞发育潜能的建立。组蛋白去甲基化酶 KDM5B 负责介导组蛋白 H3K4me3 发生去甲基化,在小鼠受精卵中敲降 KDM5B 导致基因组上 H3K4me3 信号普遍延长及胚胎发育的阻滞^[20]。另一个卵母细胞中的甲基化酶 UHRF1 缺陷导致早期胚胎发育停滞在 2-细胞阶段,并伴随 H3K4me3 甲基化模式的显著改变^[21]。此外,组蛋白 H3K4me3 能够调节染色质处于松散状态,从而促进基因转录^[22]。ZHAO 等^[23] 研究发现,与新鲜胚胎相比,玻璃化冷冻后卵裂期胚胎的甲基化水平显著下调。在另一项研究中,BAKHTARI 等^[24] 研究发现,冷冻会显著改变早期胚胎中组蛋白表观修饰变化。然而,很少有研究评估二次冷冻对胚胎表观遗传方面的影响。该研究在 8-细胞或囊胚期对小鼠胚胎进行二次玻璃化冷冻,这与人类胚胎二次玻璃化冷冻的 2 个发育阶段相对应。作者发现在 8-

细胞或囊胚期二次冷冻均会降低激活型组蛋白修饰 H3K4me3 的水平,且在囊胚期二次冷冻降低尤为严重,表明囊胚期二次冷冻可能在全基因组水平抑制基因表达。

内细胞团和滋养外胚层的形成是哺乳动物胚胎发育命运决定的关键。转录因子 Oct4 及 Sox2 作为内细胞团标志基因,促进位于内细胞团中细胞多能性的形成和维持。滋养外胚层的标志基因 Cdx2 敲除会导致胚胎无法形成成熟滋养外胚层,滋养外胚层的缺失则会导致胚胎无法扩大成腔^[25-26]。小鼠母源 Oct4 的 mRNA 和蛋白储存于卵母细胞中,维持合子早期发育。CHOI 等^[27-28] 发现,Oct4 和 Sox2 出入细胞核的动力学在 4-细胞和 8-细胞期存在差异,并且随着合子基因组激活,在 2.5 d 桑椹胚时期和 3.5 d 囊胚期的表达上调。研究发现 Cdx2 在 8-细胞时期的部分卵裂球中表达,并逐渐向外部细胞聚集,最终只在囊胚的滋养外胚层中表达^[29-30],且 Oct4 和 Cdx2 的表达存在拮抗作用^[31]。该研究发现,一次冷冻及 8-细胞期二次冷冻对 Oct4、Sox2 及 Cdx2 的表达均无影响;有趣的是,囊胚期二次冷冻导致 Oct4 的表达水平显著降低,而 Sox2 和 Cdx2 的表达水平则显著升高,结果提示囊胚期二次冷冻导致多能性基因的异常表达可能是妊娠率下降的原因。

综上所述,玻璃化二次冷冻对小鼠胚胎的表观遗传具有一定的负面影响,且囊胚期二次冷冻显著影响 H3K4me3 修饰及多能性相关基因表达水平。因此,如果需要进行胚胎二次冷冻保存,8-细胞期二次冷冻可能是更好的选择。二次冷冻导致的组蛋白修饰水平及多能性基因表达变化的影响是复杂的,在后续的研究中,将深入分析组蛋白表观修饰直接影响的基因,更加深入探讨二次冷冻对胚胎质量的潜在影响。

致谢: 特别感谢重庆市妇幼保健院人类胚胎工程重庆市重点实验室及各位工作人员对实验的指导和帮助。

作者贡献: 所有作者均参与了文章的构思,第一作者完成了初稿,通讯作者审校。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》;文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重;文章经小同行外审专家双盲审稿,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] TROUNSON A, MOHR L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 1983;305(5936):707-709.
- [2] MACNAMEE M, WICK K, RAINSBURY P, et al. How robust are early human embryos? *Lancet*. 1990;336(8715):636.

- [3] YOKOTA Y, YOKOTA H, YOKOTA M, et al. Birth of healthy twins from in vitro development of human refrozen embryos. *Fertil Steril*. 2001; 76(5):1063-1065.
- [4] HIRAOKA K, HIRAOKA K, HORIUCHI T, et al. Case report: successful delivery following the transfer of a human re-vitrified day-7 spontaneously hatched blastocyst developed from vitrified cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet*. 2009;26(7):405-409.
- [5] TAYLOR TH, PATRICK JL, GITLIN SA, et al. Outcomes of blastocysts biopsied and vitrified once versus those cryopreserved twice for euploid blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online*. 2014;29(1):59-64.
- [6] LI J, XIONG S, ZHAO Y, et al. Effect of the Re-Vitrification of Embryos at Different Stages on Embryonic Developmental Potential. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:653310.
- [7] BEDZHOV I, GRAHAM SJ, LEUNG CY, et al. Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2014;369(1657):20130538.
- [8] MURAI S, KATAGIRI Y, YAMASHITA S. Maturation-associated Dbf4 expression is essential for mouse zygotic DNA replication. *Dev Growth Differ*. 2014;56(9):625-639.
- [9] PUSCHECK EE, AWONUGA AO, YANG Y, et al. Molecular biology of the stress response in the early embryo and its stem cells. *Adv Exp Med Biol*. 2015;843:77-128.
- [10] MAJIDI GHARENAZ N, MOVAHEDIN M, et al. Effects of Re-Vitrification of Mouse Morula and Early Blastocyst Stages on Apoptotic Gene Expression and Developmental Potential. *Cell J*. 2018;19(4):614-619.
- [11] EL-GAYAR M, GAULY M, HOLTZ W. In vitro and in vivo survival of mouse blastocysts after repeated vitrification with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo Letters*. 2010;31(6):454-459.
- [12] VITALE NJ, MYERS MW, DENNISTON RS, et al. In-vitro development of refrozen mouse embryos. *Hum Reprod*. 1997;12(2):310-316.
- [13] NOHALEZ A, MARTINEZ CA, PARRILLA I, et al. Eventual re-vitrification or storage in liquid nitrogen vapor does not jeopardize the practical handling and transport of vitrified pig embryos. *Theriogenology*. 2018; 113:229-236.
- [14] MAJIDI GHARENAZ N, MOVAHEDIN M, MAZAHARI Z, et al. Alternation of apoptotic and implanting genes expression of mouse embryos after re-vitrification. *Int J Reprod Biomed*. 2016;14(8):511-518.
- [15] ZHENG X, CHEN Y, YAN J, et al. Effect of repeated cryopreservation on human embryo developmental potential. *Reprod Biomed Online*. 2017;35(6):627-632.
- [16] MURAKAMI M, EGASHIRA A, MURAKAMI K, et al. Perinatal outcome of twice-frozen-thawed embryo transfers: a clinical follow-up study. *Fertil Steril*. 2011;95(8):2648-2650.
- [17] RIVERA RM, ROSS JW. Epigenetics in fertilization and preimplantation embryo development. *Prog Biophys Mol Biol*. 2013;113(3):423-432.
- [18] VASTENHOUW NL, SCHIER AF. Bivalent histone modifications in early embryogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24(3):374-386.
- [19] SHA QQ, DAI XX, JIANG JC, et al. CFP1 coordinates histone H3 lysine-4 trimethylation and meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. *Nat Commun*. 2018;9(1):3477.
- [20] LIU X, WANG C, LIU W, et al. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature*. 2016;537(7621):558-562.
- [21] WU Y, DONG J, FENG S, et al. Maternal UHRF1 Is Essential for Transcription Landscapes and Repression of Repetitive Elements During the Maternal-to-Zygotic Transition. *Front Cell Dev Biol*. 2021;8:610773.
- [22] STÄUBLI A, PETERS AH. Mechanisms of maternal intergenerational epigenetic inheritance. *Curr Opin Genet Dev*. 2021;67:151-162.
- [23] ZHAO XM, DU WH, HAO HS, et al. Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 2012;79(7):445-450.
- [24] BAKHTARI A, RAHMANI HR, BONAKDAR E, et al. The interfering effects of superovulation and vitrification upon some important epigenetic biomarkers in mouse blastocyst. *Cryobiology*. 2014;69(3):419-427.
- [25] FACCIOL A, TSANG B, GERLAI R. Alcohol exposure during embryonic development: An opportunity to conduct systematic developmental time course analyses in zebrafish. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019;98: 185-193.
- [26] NICHOLS J, ZEVIK B, ANASTASSIADIS K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998;95(3):379-391.
- [27] CHOI DH, LEE KE, PARK J, et al. Cell-Permeable Oct4 Gene Delivery Enhances Stem Cell-like Properties of Mouse Embryonic Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17):9357.
- [28] TAKADA Y, IYAPPAN R, SUSOR A, et al. Posttranscriptional regulation of maternal Pou5f1/Oct4 during mouse oogenesis and early embryogenesis. *Histochem Cell Biol*. 2020;154(6):609-620.
- [29] COTICCHIO G, LAGALLA C, STURMEY R, et al. The enigmatic morula: mechanisms of development, cell fate determination, self-correction and implications for ART. *Hum Reprod Update*. 2019;25(4):422-438.
- [30] MIHAJLOVIĆ AI, BRUCE AW. The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity. *Open Biol*. 2017;7(11):170210.
- [31] NIWA H, TOYOOKA Y, SHIMOSATO D, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. *Cell*. 2005;123(5): 917-929.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)