

## 研究论文

组蛋白精氨酸甲基化酶3对人体外培养发育  
阻滞胚胎的调控作用张武文<sup>1#\*</sup> 李世峰<sup>2#</sup> 李凯<sup>1#</sup> 李丽<sup>1</sup> 尹萍<sup>1</sup> 童国庆<sup>1</sup><sup>(1)</sup>上海中医药大学附属曙光医院生殖医学中心, 上海 201203;<sup>(2)</sup>中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

**摘要** 人IVF(*in vitro* fertilization)培养的胚胎常易发生发育阻滞, 这极大地降低了IVF的治疗效率。近年来发现, 组蛋白精氨酸甲基化酶3(PRMT3)在早期胚胎发育过程中起着重要的作用, 但是其对阻滞胚胎发育的作用及机制仍不清楚。该研究利用IVF废弃的胚胎为实验材料。采用Q-PCR和Confocal检测早期不同发育时期胚胎中PRMT3的核酸和蛋白表达情况, 以及H4R3me2a甲基化水平的变化情况。另外, 在阻滞胚胎中过表达PRMT3蛋白, 观察阻滞胚胎的进一步发育。研究结果表明, 与正常发育胚胎相比, 阻滞胚胎中PRMT3核酸和蛋白的表达均呈现显著下降( $P<0.05$ ); 同时, 阻滞胚胎中H4R3me2a的甲基化水平也明显降低( $P<0.05$ )。过表达PRMT3蛋白能够挽救部分阻滞胚胎的发育, 甚至个别阻滞胚胎还能够发育到囊胚阶段。总之, 早期发育胚胎中PRMT3表达的降低或缺失可能是导致胚胎发育阻滞产生的主要原因之一, PRMT3是早期胚胎发育过程中必需且非常重要的关键因子。

**关键词** 胚胎发育; 发育阻滞; 组蛋白精氨酸甲基化酶3; 体外受精

The Role of Histone Arginine Methylase 3 on Human Developmental  
Block Embryos Cultured *in Vitro*ZHANG Wuwen<sup>1#\*</sup>, LI Shifeng<sup>2#</sup>, LI Kai<sup>1#</sup>, LI Li<sup>1</sup>, YIN Ping<sup>1</sup>, TONG Guoqing<sup>1</sup><sup>(1)</sup>Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;<sup>(2)</sup>Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** Human embryos of IVF (*in vitro* fertilization) are often susceptible to developmental block, which greatly reduces the efficiency of IVF treatment. In recent years, it has been found that PRMT3 (protein arginine methylase 3) plays an important role in the process of early embryonic development, but its role and mechanism for blocking embryonic development are still unclear. In this study, the embryos discarded by IVF were used as experimental materials. Q-PCR and Confocal were used to detect PRMT3 nucleic acid and protein expression in early embryos at different developmental stages, as well as changes in the methylation levels of H4R3me2a. In

收稿日期: 2020-04-21

接受日期: 2020-06-08

国家自然科学基金面上资助项目(批准号: 81571442)资助的课题

\*共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 13777843527, E-mail: fbzhangww@163.com

Received: April 21, 2020

Accepted: June 8, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81571442)

\*These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-13777843527, E-mail: fhzhangww@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5302>

addition, PRMT3 was overexpressed in the developmental block embryos to observe the further development of these embryos. Our results demonstrated that the nucleic acid and protein expression levels of PRMT3 in blocked embryos showed a significant decrease compared with normal embryos ( $P < 0.05$ ); meanwhile, the methylation levels of H4R3me2a in blocked embryos also decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Over-expression of PRMT3 can rescue partially developmental block embryos, and even individual developmental blocked embryos can develop into blastocyst stage. In conclusion, the reduction or deletion of PRMT3 expression in early development embryos may be one of the main reasons leading to embryonic development block defects. PRMT3 is a necessary and very important key factor in the process of human early embryo development.

**Keywords** embryonic development; developmental block; histone arginine methylase 3; *in vitro* fertilization

体外受精-胚胎移植技术(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)是目前治疗不孕症的一项常规治疗方法。随着促排卵和体外胚胎培养体系的发展,IVF-ET的妊娠率有所提高,但是IVF-ET治疗的效率仍然较低。目前,每周移植胚胎的临床妊娠率仅为30%~40%,胚胎种植率仅为20%~30%,随着女方年龄的增加,妊娠机率将更低<sup>[1-3]</sup>。造成IVF-ET治疗妊娠率低的主要原因是体外培养的胚胎囊胚形成率低,受精后第三天仅有30%~50%胚胎能够形成囊胚,而大部分胚胎发育被阻滞在4~8细胞到桑椹胚阶段<sup>[4]</sup>。有关人体外培养胚胎发育阻滞产生的分子机理一直是生殖领域关注和研究的热点,然而对其分子调控机理我们知之甚少。

以前的研究发现,小鼠早期胚胎发育阻滞发生在2细胞期,牛与羊都发生在8~16细胞期,而人发生在4~8细胞期<sup>[5-7]</sup>。人卵母细胞在从受精至第三天的发育过程中,胚胎通常依赖储存在卵母细胞内的母源RNA和蛋白质被激活并进一步启动和调节早期胚胎发育。但在4~8细胞阶段,胚胎自身的合子基因组被激活,胚胎的后续发育依赖于这些合子基因的产物。许多研究表明,在早期胚胎母源向合子调控的转变时期,组蛋白甲基化的修饰呈现出动态变化。此时,早期胚胎在组蛋白甲基化修饰酶的调控下,经历着一系列基因的激活与抑制,一旦调控出现异常则可能导致早期胚胎发育的阻滞或死亡<sup>[8-11]</sup>。近年来研究认为,组蛋白精氨酸甲基化酶(protein arginine methylase, PRMT)在早期胚胎发育的过程中呈现出越来越重要的功能<sup>[12-13]</sup>。例如:在小鼠的研究中发现,如果敲除小鼠胚胎的PRMT7基因,则83%的小鼠在出生后死亡,同时伴随着脑部积水和脑泡张大等发育缺陷<sup>[14]</sup>。有研究发现,在斑马鱼1

细胞胚胎中抑制PRMT1/PRMT8基因的表达,则会导致早期胚胎原肠运动的发育缺陷以及后期的胚胎发育阻滞<sup>[15-17]</sup>。在小鼠胚胎干细胞的研究中发现,PRMT6对于胚胎干细胞多能性的维持十分重要。如果抑制PRMT6表达,将会导致胚层分化因子的过度表达,使胚胎干细胞加速分化<sup>[18]</sup>。我们的前期研究也表明,PRMT7可通过调节其下游分子2-OST和Syntenin的信号通路来调节斑马鱼早期胚胎的原肠外包运动<sup>[7,19]</sup>。PRMT3作为PRMT家族的成员之一,它通常使下游目的基因发生H4R3me2a甲基化来调控基因的转录,而H4R3me2a甲基化水平高低通常与基因的激活有关。有研究发现,PRMT3<sup>-/-</sup>小鼠显示小鼠早期胚胎发育延迟<sup>[20]</sup>。因此,我们推测在人类IVF培养的阻滞胚胎中,PRMT3表达的降低或缺失可能是胚胎阻滞产生的重要原因之一,目前尚无相关的研究报告。

本实验目的是观察PRMT3在人早期胚胎不同发育阶段的时空表达情况和H4R3me2a甲基化水平的变化,以及过表达PRMT3蛋白是否能够拯救人体外培养发育阻滞胚胎使之能进一步发育。探讨PRMT3在人类IVF培养胚胎发育过程中可能的分子生物学功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 胚胎收集与培养

实验用的胚胎均来自于2016年1月到2019年6月在上海中医药大学附属曙光医院生殖医学中心行IVF-ET治疗的患者体外培养废弃的胚胎。分别为培养第三天发育阻滞废弃的胚胎(胚胎细胞数 $\leq 5$ ,此类胚胎定义为发育阻滞胚胎),多精受精的第三天正常发育胚胎(3P, 胚胎细胞数 $> 5$ )以及多精受精第五

天废弃的囊胚。发育第三天的胚胎培养在G1胚胎培养液中, 第五天的囊胚培养在G2培养液中。所有的胚胎操作均得到上海中医药大学附属曙光医院伦理委员会的批准。

1.2 试剂耗材

PicoPure™ RNA Isolation Kit购自Applied Biosystems公司; High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit购自Applied Biosystems公司; ABI Step One Plus实时荧光定量PCR购自Applied Biosystems公司; SYBR Green Real-time PCR Master Mix购自TOYOBO公司; antibody anti-PRMT3购自Abcam公司; antibody anti-H4R3me2a购自Abcam公司; DAPI购自Roche公司。

1.3 Q-PCR检测不同发育时期胚胎中PRMT3 mRNA的表达

收集体外培养废弃的胚胎。利用PicoPure™ RNA Isolation Kit试剂盒提取总RNA(每个样本5枚胚胎), 用High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit试剂盒将RNA反转录成cDNA, 37℃水浴60 min, 85℃水浴5 min, 4℃水浴5 min, -20℃冰箱保存。Q-PCR实验条件为: 50℃ 2 min, 95℃ 5 min, 1个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 40个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 95℃ 15 s, 1个循环。扩增体系为: 5 μL SYBR Green Mix, 0.2 μL ROX reference dye (50×), 上游引物和下游引物各0.5 μL, 2.8 μL ddH<sub>2</sub>O, 1 μL cDNA模板, 总体积为10 μL。各组设3个复孔。以GAPDH为内参, 数据分析以2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算各目的基因的相对表达量。每组实验重复3次。引物序列见表1。

1.4 免疫荧光共聚焦(Confocal)检测不同发育时期胚胎中PRMT3蛋白和H4R3me2a甲基化水平的变化

收集不同发育时期的胚胎。先用4%的多聚甲醛(paraformaldehyde, PFA)固定胚胎, 室温1 h或者4℃过夜。然后, 在35 mm培养皿中, 用PBS洗涤胚胎10 min。再用0.5% Triton X-100(PBS配制)洗涤30 min。再用PBS洗涤胚胎10 min, 然后用3% BSA封闭30 min。再加入用1% BSA稀释的一抗(PRMT3和H4R3me2a抗体, 1:100稀释)。用阻水笔在载玻片上画一个圆圈, 把25 μL抗体加到圆圈中, 将胚胎转移到抗体中, 4℃孵育过夜。在12孔板中, 用1 mL PBS洗涤胚胎10 min, 加入二抗(1:500), 再将胚胎转移到抗体中, 室温孵育1.5 h。然后用PBS洗涤胚胎10 min, 加入DAPI液染色5 min(1:1 000稀释), 用PBS洗涤胚胎10 min。最后封片, 用Olympus FLV1200激光共聚焦显微镜观察。

1.5 体外PRMT3慢病毒的构建及过表达实验

体外扩增PRMT3 cDNA片段, 克隆入pLVX-IRES-ZsGreen1质粒中, 转化至感受态大肠杆菌DH5α中, 测序获取正确的pLVX-IRES-ZsGreen1-hPRMT3重组质粒。引物序列见表2。应用Lipofectamine 2000将外源构建好的慢病毒载体和辅助质粒一起转染至293 T细胞中, 最终在293 T细胞中包装浓缩成pLVX-IRES-ZsGreen1-hPRMT3慢病毒。收集废弃的发育阻滞胚胎备用。实验取发育阻滞废弃的胚胎(2~5细胞胚胎), 显微注射慢病毒于阻滞

表1 PRMT3和GAPDH引物序列  
Table 1 Sequence of PRMT3 and GAPDH primers

| 引物<br>Primer | 序列(5'→3')<br>Sequence (5'→3')         |
|--------------|---------------------------------------|
| PRMT3        | Sense: GCC ATA CGA CGT CTA TCT CAG    |
|              | Antisense: GTG TTT TGG TGC TCT GAG GG |
| GAPDH        | Sense: AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG     |
|              | Antisense: AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC |

表2 PRMT3慢病毒引物序列  
Table 2 Sequence of PRMT3 lentiviral primers

| 引物<br>Primer         | 序列(5'→3')<br>Sequence (5'→3')                                         |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| pLVX-ZsGreen1-hPRMT3 | Sense: ATT TCC GGT GAA TTC CTC GAG GCC ACC ATG TGC TCG TTA GCG TCA GG |
|                      | Antisense: GGA GGG AGA GGG GCG GGA TCC TCA CTG GAG ACC                |
|                      | ATA AGT TTG AGT TG                                                    |

胚胎中(慢病毒滴度为 $10^8$  TU/mL, 每枚胚胎注射慢病毒3~5 nL)。注射后的胚胎放于G2培养液中培养, 于第二天、第三天及第四天分别观察胚胎的发育情况。

## 1.6 统计学分析

所有实验均重复3次。数据分析采用SPSS 19软件进行数据分析。数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 符合正态分布和方差齐性的两组间比较采用 $t$ 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同发育时期胚胎中PRMT3 mRNA的差异性表达

我们把胚胎分为三组: 正常发育胚胎组(多精受精, 3P)、发育阻滞胚胎组、囊胚组。Q-PCR实验结果表明, 在三组胚胎中, PRMT3 mRNA均有表达。与发育正常胚胎相比较, 发育阻滞胚胎中PRMT3 mRNA表达量呈现显著下降(图1,  $P<0.05$ )。当我们比较发育正常组与囊胚组时, 发现发育正常胚胎中PRMT3 mRNA表达量也明显高于囊胚(图1,  $P<0.05$ )。而与囊胚组相比, 发育阻滞组胚胎中PRMT3 mRNA的表达显著下降(图1,  $P<0.05$ )。总之, 三组不同发育时期胚胎中, 发育正常组中PRMT3 mRNA的表达量最高, 而发育阻滞组胚胎中PRMT3 mRNA的表达量显著降低。而PRMT3甲基化的修饰

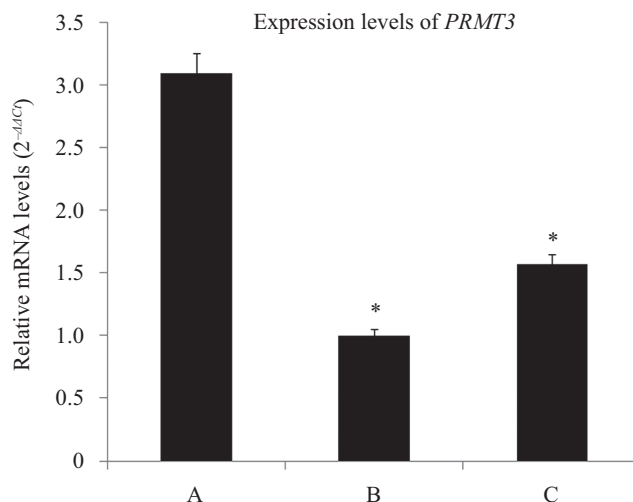
通常与基因的激活表达有关, PRMT3在阻滞胚胎的低表达是否影响了一些合子基因的激活从而导致早期胚胎阻滞的产生, 这是我们下一步需要研究的问题。

### 2.2 PRMT3蛋白在不同发育时期胚胎中的亚细胞定位与表达

通过Q-PCR实验结果, 我们发现发育阻滞胚胎中PRMT3 mRNA表达量呈现显著下降趋势。蛋白质是细胞内生理活动的最终执行者, 那么PRMT3蛋白表达在不同发育时期的胚胎中是否也存在差异性。我们利用Confocal检测了不同发育时期胚胎中PRMT3蛋白的表达情况。图2实验结果显示, 正常发育胚胎组胚胎中的PRMT3蛋白表达量很强, 而在发育阻滞胚胎组胚胎中的PRMT3蛋白表达量比较弱。当我们观察囊胚组胚胎时, 该组胚胎中PRMT3蛋白表达量比发育阻滞胚胎明显增强。通过merge图的观察, PRMT3蛋白在胚胎细胞的细胞质和细胞核中都有表达。总之, 在三组不同发育时期胚胎中, 发育正常组中PRMT3蛋白表达量最强, 而发育阻滞组胚胎中PRMT3蛋白表达最弱。PRMT3蛋白的表达常常与基因的激活有关。

### 2.3 不同发育时期胚胎中的H4R3me2a甲基化水平的差异性

H4R3me2a甲基化水平高低通常与基因的激活有关。在基因活跃转录的时期, 细胞中H4R3me2a通常呈现高水平甲基化, 且该甲基化水平常受到



A: 正常发育胚胎组(3P); B: 发育阻滞胚胎组; C: 囊胚组。\* $P<0.05$ , 与A组相比。

A: group of normal development embryo (3P); B: group of development block embryo group; C: group of blastocyst. \* $P<0.05$  vs A group.

图1 不同发育时期胚胎中的PRMT3 mRNA的表达情况

Fig.1 The mRNA expression levels of PRMT3 in embryos at different developmental stages



PRMT3酶的调控。我们利用 Confocal 比较了不同发育时期胚胎中 H4R3me2a 甲基化水平的差异。图 3 Confocal 实验结果显示, 正常发育胚胎组胚胎中的 H4R3me2a 甲基化水平很强, 而在发育阻滞胚胎组胚

胎中的 H4R3me2a 甲基化水平比较弱, 基本观察不到。当我们观察囊胚组胚胎时, 该组胚胎中 H4R3me2a 甲基化水平比发育阻滞胚胎明显增强。通过对 merge 图的观察, 发现在胚胎细胞的细胞质和细胞核中均

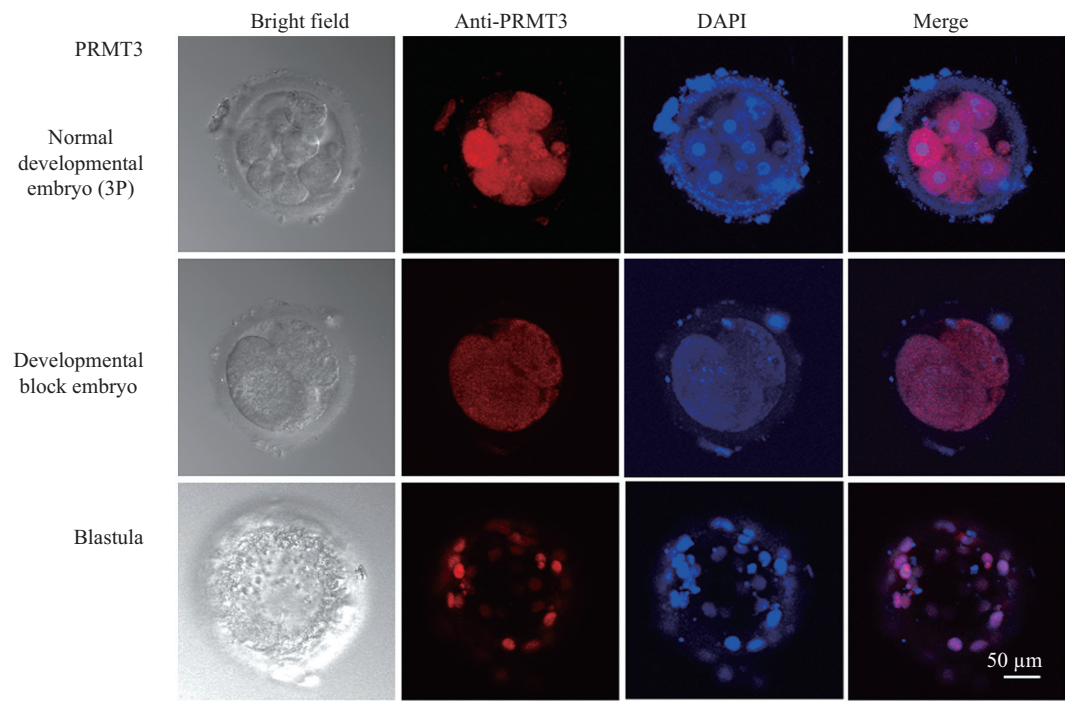


图2 不同发育时期胚胎中的PRMT3蛋白的表达情况  
Fig.2 The protein expression levels of PRMT3 in embryos at different developmental stages

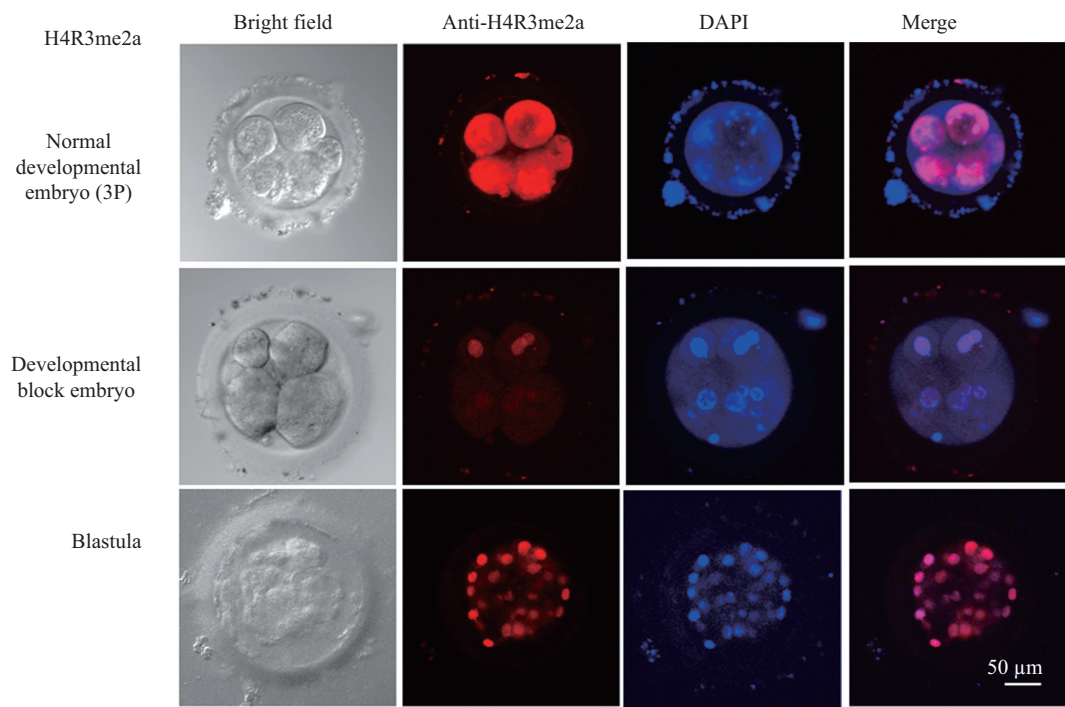


图3 不同发育时期胚胎中的H4R3me2a甲基化水平的表达  
Fig.3 The methylation levels of H4R3me2a in embryos at different developmental stages

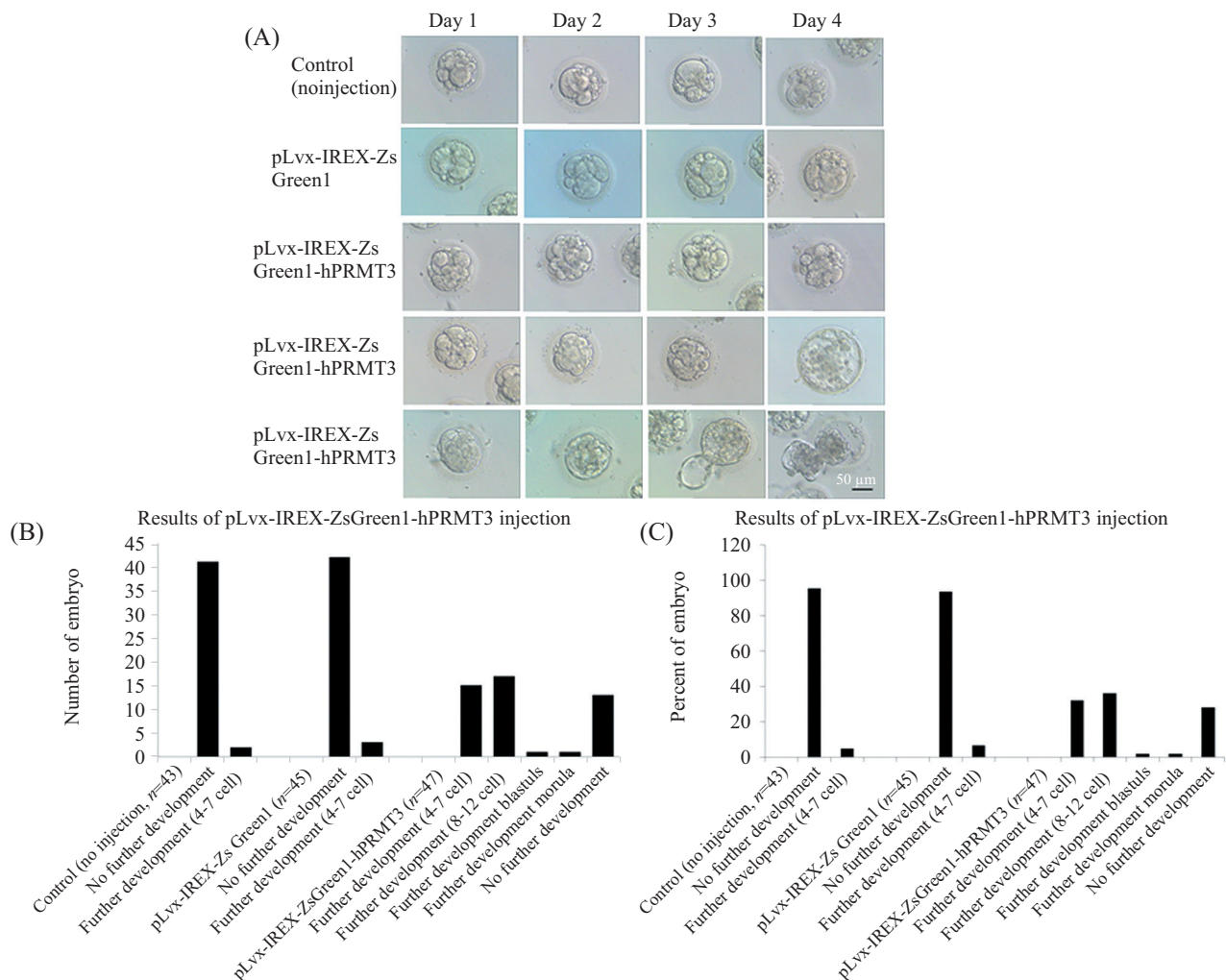
存在H4R3me2a的甲基化。总之, 三组不同发育时期胚胎中, 发育正常组中H4R3me2a甲基化水平最强, 而发育阻滞组胚胎中H4R3me2a甲基化水平很弱。H4R3me2a甲基化水平高通常与基因的激活有关。

## 2.4 过表达PRMT3蛋白对发育阻滞胚胎发育的影响

在发育阻滞胚胎中, PRMT3核酸和蛋白水平明显低于发育正常组的胚胎, 同时PRMT3调控的H4R3me2a水平在阻滞胚胎中也呈现低甲基化。在发育阻滞胚胎中, 是否由于PRMT3不正常表达或者缺失导致发育阻滞的发生。我们在发育阻滞胚胎中过表达PRMT3蛋白, 看是否能够挽救这些发育阻滞

的胚胎。

实验的研究结果表明: 在发育阻滞胚胎中, 过表达PRMT3蛋白能够使部分发育阻滞胚胎进一步发育。作为对照组胚胎没有注射(图4A和图4B, 共43枚), 不管培养第二天还是第四天, 95.3%的阻滞胚胎均不能进一步发育(图4C); 在注射空载慢病毒组中(图4A和图4B, 共45枚), 培养第二天到第四天, 93.3%的阻滞胚胎都不能够进一步发育(图4C)。作为过表达PRMT3慢病毒组, 我们共注射47枚发育阻滞胚胎。实验结果表明: 阻滞胚胎发育到4~7细胞的胚胎数为15枚; 阻滞胚胎发育到8~12细胞的胚胎数为17枚; 阻滞胚胎发育到囊胚数为1枚; 阻滞胚胎



A: 实验的不同分组; B: 发育阻滞胚胎中注射pLvX-IREX-ZsGreen-hPRMT3慢病毒后, 胚胎进一步发育的数目情况; C: 发育阻滞胚胎中注射pLvX-IREX-ZsGreen-hPRMT3慢病毒后, 胚胎进一步发育的百分比情况。

A: different groups of experiments; B: number of embryos further developed after injection of pLvX-IREX-ZsGreen-hPRMT3 lentivirus in developmental block embryos; C: percent of embryos further developed after injection of pLvX-IREX-ZsGreen-hPRMT3 lentivirus in developmental block embryos.

图4 在阻滞胚胎中过表达PRMT3蛋白对胚胎发育的影响

Fig.4 Effect of embryo development by the overexpression of PRMT3 protein in developmental block embryos

发育到融合胚胎数为1枚; 阻滞胚胎没有进一步发育的胚胎为13枚(图4A和图4B)。我们对数据进一步分析发现, 注射过PRMT3慢病毒的大部分阻滞胚胎能够进一步发育: 32%的阻滞胚胎能发育到4~7细胞; 36%的阻滞胚胎能发育到8~12细胞; 有4%的阻滞胚胎能发育到融合期胚胎及囊胚; 但是28%左右的阻滞胚胎仍然不能够进一步发育(图4C)。

我们对胚胎的形态学观察发现, 对照组(未注射)和空载慢病毒组(注射), 大部分阻滞胚胎不能进一步发育而凋亡。而在注射PRMT3慢病毒组中(图4A), 胚胎培养第二天能够进一步发育, 胚胎细胞数目比第一天明显增多; 当培养第四天时候, 大部分胚胎发育的细胞数目没有进一步增加。当我们观察另外一组注射PRMT3慢病毒的胚胎发现(图4A), 胚胎在第二天细胞发生融合, 到培养第四天的时候, 能够观察到囊胚形成。同时, 在另外一组注射PRMT3慢病毒胚胎中(图4A), 我们能够在培养第二天的胚胎中看到小的囊胚腔, 而在第三天, 胚胎进一步发育成孵出囊胚, 第四天, 能看到孵出的囊胚。然而, 随着胚胎的进一步培养, 胚胎最终都会凋亡。总之, 在发育阻滞胚胎中过表达PRMT3蛋白, 能够挽救部分发育阻滞胚胎使它们能进一步发育。

### 3 讨论

早期胚胎发育是胚胎发育一个非常关键的时期, 也是细胞分裂与分化最为活跃的时期, 相应的基因表达调控十分复杂, 许多调控机制参与其中。近年来的研究表明, 组蛋白甲基化修饰在胚胎的早期发育过程中扮演着重要的角色<sup>[21-23]</sup>。

研究认为, 在早期胚胎发育过程中, 不管从开始的卵裂到囊胚的形成, 以及原肠胚的形成到器官的发生, 基因的表达都呈现出时空的表达模式。而在这些过程中组蛋白甲基化修饰的水平与定位也表现出动力学的变化<sup>[24-26]</sup>。PRMT是一类催化组蛋白精氨酸发生甲基化修饰的酶。PRMT家族通常分为三大类, 第一类精氨酸甲基转移酶包括PRMT1、PRMT2/3/4、PRMT6和PRMT8, 它们可催化产生单甲基化和非对称的二甲基化, 通常与基因的激活相关; 第二类精氨酸甲基转移酶包括PRMT5和PRMT9, 它们可催化产生单甲基化以及对称的二甲基化, 通常与基因的抑制有关; 第三类是PRMT7, 它通常催化产生单甲基化<sup>[27-28]</sup>。我们前期在斑马鱼中

的研究发现, 早期胚胎中如果抑制PRMT6/7的表达, 将会导致早期胚胎发育的阻滞或死亡<sup>[29]</sup>。PRMT是一个高度保守的蛋白酶, 那么PRMTs家族其他PRMT的异常表达是否也会导致早期胚胎阻滞的发生。我们利用Q-PCR比较了发育正常与发育阻滞的胚胎中PRMT3的核酸表达水平, 实验结果发现, 在发育阻滞胚胎中PRMT3核酸的表达量显著下降。再进一步比较正常发育胚胎与囊胚中PRMT3核酸水平时, 发现囊胚中的PRMT3核酸水平也比正常发育胚胎中低。这说明在早期胚胎发育过程中, 尤其是在母源基因向合子基因调控的过渡时期, PRMT3对一些早期胚胎发育基因的转录激活是必须的。蛋白质是细胞生理活动的最终执行者, 在阻滞胚胎中核酸水平相比正常发育胚胎中的核酸水平显著性降低。那么它们两组胚胎中PRMT3蛋白水平的表达是否存在差异。我们利用Confocal比较了不同发育时期胚胎中PRMT3蛋白表达情况。实验结果显示, 正常发育胚胎组中的PRMT3蛋白表达量最强, 而在发育阻滞胚胎组中的PRMT3蛋白表达量比较弱。同时与阻滞组胚胎相比, 囊胚组胚胎中PRMT3的蛋白表达量也明显高于阻滞组胚胎。

早期胚胎的发育是一个复杂的网络调控过程, 许多调控机制参与其中。但在诸多调控途经中, 组蛋白甲基化修饰的调控是一个非常重要的因素。尤其在早期胚胎发育过程中, 细胞处于基因活跃转录的时期, 细胞中H4R3me2a通常呈现高水平甲基化<sup>[22]</sup>。PRMT3在细胞内通常使其下游目的基因发生H4R3me2a甲基化, 进而激活下游的基因信号通路来行使生理功能<sup>[30]</sup>。我们通过Confocal实验比较了不同发育时期胚胎中H4R3me2a甲基化水平的变化情况。实验结果显示, 正常发育胚胎中H4R3me2a甲基化的水平很强, 而在发育阻滞胚胎中的H4R3me2a甲基化程度很低。另外, 我们观察到囊胚中H4R3me2a甲基化程度高于发育阻滞胚胎。在早期胚胎发育过程中, 存在大规模合子基因的激活及转录开启。此时, 胚胎内H4R3me2a甲基化水平的高低决定着早期胚胎的后续发育。我们的实验结果提示, 在阻滞胚胎中可能是H4R3me2a低甲基化水平影响了合子基因的转录激活。

我们的实验表明, 阻滞胚胎中PRMT3核酸和蛋白水平均呈现显著性的表达下降趋势。这些数据提示, 在阻滞胚胎中是否由于PRMT3表达的下降或缺



失从而导致阻滞胚胎的发生? 因此, 我们在发育阻滞胚胎中过表达PRMT3蛋白, 观察这些阻滞胚胎的发育情况。实验结果发现, 没有过表达PRMT3蛋白对照组的胚胎大部分不能够进一步发育(图4A)。同时, 注射空载慢病毒组的胚胎也同样不能够进一步发育(图4A)。而在过表达PRMT3蛋白胚胎组中(图4A), 胚胎培养第二天时部分胚胎能够进一步发育, 胚胎细胞数目比第一天明显增多; 而到培养第四天时, 大部分胚胎发育的细胞数目没有再进一步增加。然而, 另一组过表达PRMT3蛋白的胚胎组(图4A), 胚胎在第二天细胞发生融合, 到培养第四天的时候, 能够观察到囊胚形成, 虽然其胚胎的比例占注射胚胎总数的2%(图4C)。令人兴奋的是, 另外一组过表达PRMT3蛋白的阻滞胚胎在第四天发育成孵出的囊胚, 其胚胎比例占总注射数的2%(图4C)。我们对所有过表达PRMT3蛋白的阻滞胚胎的发育进行了分析, 这些阻滞胚胎大部分都能够进一步发育, 但是基本都发育到16~32细胞后不能再进一步发育而发生凋亡; 同时还有28%左右的胚胎不能再进一步发育。另外, 本研究也存在一定的局限性, 因为来源于同一个病人阻滞胚胎的数目有限, 本实验的所有阻滞胚胎是来源于不同病人之间的混和胚胎, 没有考虑到病人胚胎之间的差异性。所有的实验数据说明, 过表达PRMT3能够挽救部分早期发育阻滞的胚胎。早期胚胎发育过程是一个多因素、多分子复杂的网络调控过程, 许多调控机制参与其中。

总之, 早期胚胎的发育是遗传学与表观遗传学共同调控的结果。胚胎正常发育取决于多种调控机制准确无误地运行, 如果任何一个环节出现异常, 将会导致胚胎停顿在某个特定的发育时期。本研究发现, 在发育阻滞胚胎中PRMT3表达量显著降低使胚胎H4R3me2a总甲基化的水平下降, 可能影响了早期胚胎发育合子基因的转录激活。然而, 当我们在阻滞胚胎中过表达PRMT3时, 能够挽救部分发育阻滞胚胎使之能进一步发育。虽然我们阐明了PRMT3与IVF胚胎发育阻滞的关系, 然而PRMT3是怎么调控早期胚胎的发育, 以及PRMT3如何通过调控其下游目的分子的作用机理仍然是我们下一步研究的方向。

### 参考文献 (References)

[1] AHMED T A, AHMED S M, EL-GAMMAL Z, et al. Oocyte aging: the role of cellular and environmental factors and impact on female fertility [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, doi:

10.1007/5584\_2019\_456.

[2] SCHLIEP K C, MUMFORD S L, AHRENS K A, et al. Effect of male and female body mass index on pregnancy and live birth success after *in vitro* fertilization [J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(2): 388-95.

[3] WEI D, LIU J Y, SUN Y, et al. Frozen versus fresh single blastocyst transfer in ovulatory women: a multicentre, randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2019, 393(10178): 1310-8.

[4] CAIRO C G. There is only one thing that is truly important in an IVF laboratory: everything' Cairo Consensus Guidelines on IVF culture conditions [J]. *Reprod Biomed*, 2020, 40(1): 33-60.

[5] BOWMAN P, MCLAREN A. Cleavage rate of mouse embryos *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Embryol Exp Morphol*, 1970, 24(1): 203-7.

[6] CHU D P, TIAN S, QI L, et al. Abnormality of maternal-to-embryonic transition contributes to MEHP-induced mouse 2-cell block [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(4): 753-63.

[7] ZHANG W W, LI K, ZHONG X F, et al. CDX2 is essential for human IVF early embryonic development [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(12): 1274-9.

[8] LIU X, WANG C, LIU W, et al. Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos [J]. *Nature*, 2016, 537(7621): 558-62.

[9] AOSHIMA K, INOUE E, SAWA H, et al. Paternal H3K4 methylation is required for minor zygotic gene activation and early mouse embryonic development [J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(7): 803-12.

[10] LIU N, ZHANG Z, WU H, et al. Recognition of H3K9 methylation by GLP is required for efficient establishment of H3K9 methylation, rapid target gene repression, and mouse viability [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(4): 379-93.

[11] ZHAO P, WANG H N, WANG H, et al. Essential roles of HDAC1 and 2 in lineage development and genome-wide DNA methylation during mouse preimplantation development [J]. *Epigenetics*, 2019, 24: 1-17.

[12] REIK W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian an development [J]. *Nature*, 2007, 447(7143): 425-32.

[13] LI X, ZHOU W, LI X, et al. SOX19b regulates the premature neuronal differentiation of neural stem cells through EZH2-mediated histone methylation in neural tube development of zebrafish [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 389.

[14] 张培准, 何化成, 梅玫, 等. 组蛋白精氨酸甲基化表观遗传修饰调控个体发育和细胞分化[J]. 全国发育生物学大会摘要集 (ZHANG P Z, HE H C, MEI M, et al. Epigenetic modification of histone arginine methylation regulates individual development and cell differentiation [J]. Summary of the National Developmental Biology Conference), 2012: 73-4.

[15] BALASUBRAMANIAN S, RAGHUNATH A, PERUMAL E. Role of epigenetics in zebrafish development [J]. *Gene*, 2019, 718: 144049.

[16] YANG H, ZHOU Y, GU J, et al. Deep mRNA sequencing analysis to capture the transcriptome landscape of zebrafish embryos and larvae [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64058.

[17] LIN Y L, TSAI Y J, LIU Y F, et al. The critical role of protein arginine methyltransferase prmt8 in zebrafish embryonic and neural development is non-redundant with its paralogue prmt1 [J].



- PLoS One, 2013, 8(3): e55221.
- [18] LEE Y H, MA H, TAN T Z, et al. Protein arginine methyltransferase 6 regulates embryonic stem cell identity [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(14): 2613-22.
- [19] ZHANG W W, ZHANG Y B, LI S F, et al. Prmt7 regulates epiboly and gastrulation cell movements by facilitating syntenin [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2018, 50(12): 1280-7.
- [20] SWIERCZ R, CHENG D, KIM D, et al. Ribosomal protein rpS2 is hypomethylated in PRMT3-deficient mice [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(23): 16917-23.
- [21] JAMBHEKAR A, DHALL A, SHI Y. Roles and regulation of histone methylation in animal development [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10): 625-41.
- [22] SHIBATA Y, OKADA M, MILLER T C, et al. Knocking out histone methyltransferase PRMT1 leads to stalled tadpole development and lethality in *Xenopus tropicalis* [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2020, 1864(3): 129482.
- [23] YANG G, ZHOU C, WANG R, et al. Base-editing-mediated R17H substitution in histone H3 reveals methylation-dependent regulation of Yap signaling and early mouse embryo development [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(2): 302-12.
- [24] HUPALOWSKA A, JEDRUSIK A, ZHU M, et al. CARM1 and paraspeckles regulate pre-implantation mouse embryo development [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1902-16.
- [25] HATANAKA Y, TSUSAKA T, SHIMIZU N, et al. Histone H3 methylated at arginine 17 is essential for reprogramming the paternal genome in zygotes [J]. *Cell Rep*, 2017, 20(12): 2756-65.
- [26] 张武文, 李逸平. 组蛋白甲基化修饰酶与早期胚胎发育[J]. *生命科学*(ZHANG W W, LI Y P. Histone methylated modification enzyme and early embryo development [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*), 2012, 24(7): 653-9.
- [27] SUN H, SU J, WU T, et al. CARM1 is heterogeneous in mouse four-cell embryo and important to blastocyst development [J]. *Reproduction*, 2020, 59(1): 91-104.
- [28] ZHU J, ZHANG D, LIU X, et al. prmt5 Zebrafish arginine methyltransferase is essential for germ cell development [J]. *Development*, 2019, doi: 10.1242/dev.179572.
- [29] ZHANG W W, ZHANG Y B, ZHAO X X, et al. Prmt7 regulates epiboly by facilitating 2-OST and modulating actin cytoskeleton [J]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7(5): 489-91.
- [30] ZHANG M, LIU X M, LI Z, et al. Asymmetrical methyltransferase PRMT3 regulates human mesenchymal stem cell osteogenesis via miR-3648 [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 581.