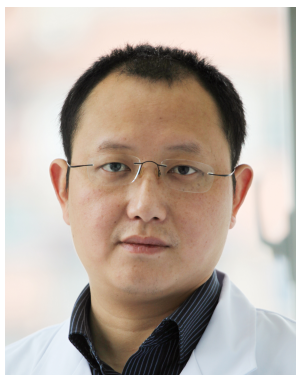


领域前沿 · 中国



薛志刚, 同济大学再生医学系干细胞研究中心研究员。2006年6月毕业于中南大学医学遗传学国家重点实验室, 获博士学位, 主要从事肿瘤的基因治疗。2006年7月~2007年11月, 任中南大学医学细胞遗传学国家重点实验室讲师, 主要负责基因治疗和干细胞相关的研究工作。2007年11月~2009年4月在美国加州大学洛杉矶分校人类遗传学系从事博士后研究, 从事干细胞和表观遗传学研究和转化医学工作。2009年5月被聘为同济大学再生医学系干细胞研究中心副教授, 主要从事发育生物学、DNA甲基化在干细胞分化中的分子和细胞学机制研究以及探讨调节神经细胞功能的具体机制。2013年, 采用单细胞RNA测序技术揭示了人类和小鼠早期胚胎的遗传程序, 研究成果发表在Nature杂志上。作为课题负责人获得国家自然科学基金资助两项, 多次作为科研骨干参与国家基金委、科技部、教育部等科研项目。

哺乳动物早期胚胎发育的遗传程序

薛志刚* 刘振山 冯 云

(同济大学医学院干细胞研究中心, 上海 200092)

哺乳动物早期胚胎发育是一个复杂的过程, 包括一系列重要的发育阶段: 卵母细胞的成熟、受精和着床前胚胎发育。在形态变化上, 可分为三个主要阶段: 卵裂(细胞数量增加)、紧密化(极化和扁平化)和囊胚形成(形成囊胚腔)。在基因表达、蛋白水平及表观遗传等方面也发生了一系列的变化: 母源RNA和蛋白质的降解以及胚胎自身的基因组激活(zygotic genome activation, ZGA)^[1-2]; 父源基因组的主动去甲基化^[3-4], 母源基因组的被动去甲基化^[5]; 组蛋白的修饰变化^[6-8]等特征。

基因表达网络决定细胞的功能及特性, 因此, 破译基因在人类胚胎发育过程中时间和空间的表达特性, 是了解早期发育过程至关重要的一步。已有研究通过定量PCR(quantitative PCR, qPCR)和基因芯片技术阐述了人类多个胚胎、单胚胎或单个卵裂球的转录谱, 确认了不同胚胎植入前阶段参与胚胎发育的重要基因。利用基因芯片技术, Dobson等^[9]检测了人类早期胚胎第二和第三天基因表达模式,

发现卵母细胞成熟和胚胎发育最初几天的转录水平显著下降, 表明与配子特性相关RNA的降解是胚胎发育所必需的, 确定了卵子-合子转变基因; Li等^[10]检测卵母细胞、4-细胞和8-细胞期基因表达模式, 发现一些合子的基因表达在4-细胞胚胎阶段就已经发生; Assou等^[11]利用数据库已有的数据和本实验室的数据, 分析发现WNT和转化生长因子- β (transforming growth factor beta, TGF- β)两种信号通路参与卵母细胞及早期胚胎发育过程, 还分析了人类5天胚囊期滋养外胚层与3天胚胎的基因表达, 发现了各自特异表达基因, 并确定胚胎-滋养层转变(embryo-trophectoderm transition)基因^[12]; Vassena等^[13]检测了人类早期胚胎基因表达, 发现胚胎基因组激活发生在2-细胞期。Wells等^[14]采用反转录和实时荧光定量PCR检测了人类早期胚胎发育过程中DNA损伤和细胞分裂相关基因的表达模式, 结果表明不同的基因表达模式能够表征胚胎的不同发育阶段。然而, 这些研究只局限于少量已知编码蛋白的相关基因。长期以来, 由于受到样本细胞数少或测序技术平台不足而无法定量分析的制约, 对哺乳动物特别是人类的早期胚胎发育基因调控知之甚少。

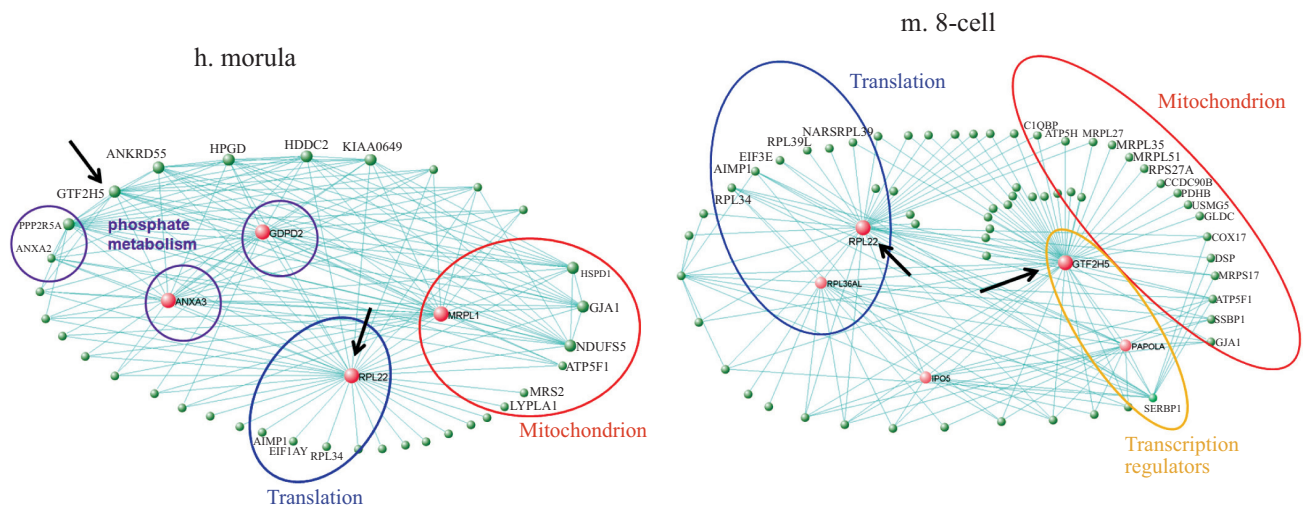
*通讯作者: Tel: 021-65982417, E-mail: xuezg@tongji.edu.cn

*Corresponding author: Tel: +86-21-65982417, E-mail: xuezg@tongji.edu.cn
网络出版时间: 2013-09-29 11:05URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130929.1105.001.html>

单细胞RNA测序(single-cell RNA-sequencing, SCRS)是分析单个细胞或微量RNA中基因组表达的一个强有力的技术。与微阵列技术相比, SCRS能检测出更多的转录组, 灵敏度更高; 既能分析同一基因的多个转录本及其对应的蛋白类型, 也能检测已知基因中新的剪接点; 还具有准确度高、噪音低等优点。因此, SCRS为以高分辨率研究早期胚胎中的基因调控提供了前所未有的机遇。Tang等^[15]利用SCRS方法, 发现小鼠囊胚细胞1 753个未知剪接点, 同时发现有8%~19%的基因在同样的卵母细胞中有两种或两种以上不同的表达, 证明了单细胞转录组的多样性和复杂性。Yan等^[16]利用SCRS方法, 发现人早期胚胎发育过程中22 687个母源表达的基因, 其中包括8 701个长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA); 还新发现了253个蛋白编码基因和2 733个lncRNA, 并且观察到不同时期表达基因的转录本以及lncRNA存在动态变化。我们利用SCRS方法, 发现原核期与受精卵胚胎聚类关系较近, 而与卵母细胞和分裂胚胎关系较远, 说明1-细胞期胚胎具有特异的转录组模式; 对人和小鼠1-细胞期与成熟卵母细胞的转录组比较分析, 发现人类和小鼠表现出保守且轻微的ZGA^[17], 而Yan等^[16]和Vassena等^[13]发现此基因组激活期发生在2-细胞期。基于单核苷酸变异(single-nucleotide variants, SNV)和单核

苷酸多态位点(SNP), 我们发现在人类早期胚胎发育各阶段中存在着父亲或母亲来源的单等位基因表达差异。加权基因共表达网络分析(weighted gene co-expression network analysis, WGCNA)显示, 胚胎早期发育各阶段中的细胞周期、基因调控、蛋白质翻译以及代谢通路的转录变化是以分步进行的方式按顺序发生。我们发现了驱动胚胎早期发育各阶段的关键候选基因, 并确认早期发育调控机制在人类和小鼠两物种间存在保守性, 仅在发育特异性和时序上有所差异, 从而证明了哺乳动物早期胚胎发育进化上的共性(图1)。

在早期胚胎发育过程中, 表观遗传信息起了重要作用。已有研究发现miRNA^[18-19]、组蛋白修饰^[7-8]和DNA甲基化^[20-21]等表观遗传标记在胚胎发育中动态变化, 并起重要作用。DNA甲基化是一种重要的表观遗传修饰方式, 能够调控基因表达、基因印记和胚胎的发育过程。在人类, 受精后几个小时内来源于精子的父源DNA发生迅速的主动去甲基化, 目前其机制知之甚少, 但研究发现多种DNA修复酶参与其过程^[22]; 而来源于卵子的母源DNA在2-细胞期后随着DNA的复制被动去甲基化。Smith等^[20]首次在基因组水平上检测了小鼠胚胎发育过程中DNA甲基化的变化, 发现精子与受精卵间以及ICM与移植后胚胎间存在两个重要的转变, 并且卵母细胞能



应用VisANT软件列举人类桑椹胚和小鼠8-细胞期胚胎各主要模块前300个连接的网络连接可视化。高度连接的模块内部枢纽基因(至少连接20个其他基因)的颜色为红色; 箭头指示为人类和小鼠网络共有的重要基因。

VisANT was used to visualize network connections of the top 300 connections for each of the major modules associated with human morula and mouse 8-cell embryo stages. Highly connected intramodular hub genes (connected to at least 20 other genes) were colored in red. Arrows indicated top genes that are found in both human and mouse networks.

图1 枢纽基因及相关功能的模块可视化

Fig.1 Module visualization of hub genes and associated function

够体现早期胚胎DNA甲基化模式。而Jiang等^[21]以斑马鱼为动物模型,发现早期胚胎选择性地继承精子DNA甲基化图谱,而卵母细胞的DNA甲基化在16-细胞期后通过细胞分裂逐渐丢弃,并重新编程为类似精子DNA甲基化的模式。这也许是因为不同物种间早期胚胎发育存在DNA甲基化变化差异。鉴于DNA甲基化在调控基因表达的作用及在基因组水平上对人类早期胚胎发育的DNA甲基化研究尚未报道,因此,在人类早期胚胎发育过程中,阐明DNA甲基化的变化将能够进一步了解基因表达的动态变化。

此外,我们的研究工作还系统分析了哺乳动物早期胚胎全能细胞的增殖、分化过程,获得了细胞分裂各阶段的重要分子标记,并证明单细胞RNA-seq技术能用于转录组定量分析,找到基因印迹等在基因调节区域上的遗传和/或表观遗传学改变所导致的表达缺陷。对该研究中发现的人类胚胎早期发育各阶段的关键候选基因的进一步研究,必将为改善人类辅助生殖技术和提高人口出生质量提供科学依据和技术支持。

参考文献 (References)

- Paynton BV, Rempel R, Bachvarova R. Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 1988; 129(2): 304-14.
- Alizadeh Z, Kageyama S, Aoki F. Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: Selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Mol Reprod Dev* 2005; 72(3): 281-90.
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, *et al.* Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 2000; 10(8): 475-8.
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000; 403(6769): 501-2.
- Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, *et al.* Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev* 1998; 12(14): 2108-13.
- Huang JC, Lei ZL, Shi LH, Miao YL, Yang JW, Ouyang YC, *et al.* Comparison of histone modifications in *in vivo* and *in vitro* fertilization mouse embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354(1): 77-83.
- Nashun B, Yukawa M, Liu H, Akiyama T, Aoki F. Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during pre-implantation development in mice. *Development* 2010; 137(22): 3785-94.
- Ooga M, Inoue A, Kageyama S, Akiyama T, Nagata M, Aoki F. Changes in H3K79 methylation during preimplantation development in mice. *Biol Reprod* 2008; 78(3): 413-24.
- Dobson AT, Raja R, Abeyta MJ, Taylor T, Shen S, Haqq C, *et al.* The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. *Hum Mol Genet* 2004; 13(14): 1461-70.
- Li SS, Liu YH, Tseng CN, Singh S. Analysis of gene expression in single human oocytes and preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 340(1): 48-53.
- Assou S, Boumela I, Haouzi D, Anahory T, Dechaud H, de Vos J, *et al.* Dynamic changes in gene expression during human early embryo development: from fundamental aspects to clinical applications. *Hum Reprod Update* 2011; 17(2): 272-90.
- Assou S, Boumela I, Haouzi D, Monzo C, Dechaud H, Kadoch IJ, *et al.* Transcriptome analysis during human trophectoderm specification suggests new roles of metabolic and epigenetic genes. *PLoS One* 2012; 7(6): e39306.
- Vassena R, Boue S, Gonzalez-Roca E, Aran B, Auer H, Veiga A, *et al.* Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development* 2011; 138(17): 3699-709.
- Wells D, Bermudez MG, Steuerwald N, Thornhill AR, Walker DL, Malter H, *et al.* Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Hum Reprod* 2005; 20(5): 1339-48.
- Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 2009; 6(5): 377-82.
- Yan L, Yang M, Guo H, Yang L, Wu J, Li R, *et al.* Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 2013.
- Xue Z, Huang K, Cai C, Cai L, Jiang CY, Feng Y, *et al.* Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 2013; 500(7464): 593-7.
- Pernaute B, Spruce T, Rodriguez TA, Manzanares M. MiRNA-mediated regulation of cell signaling and homeostasis in the early mouse embryo. *Cell Cycle* 2011; 10(4): 584-91.
- Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, *et al.* Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev* 2007; 21(6): 644-8.
- Smith ZD, Chan MM, Mikkelsen TS, Gu H, Gnirke A, Regev A, *et al.* A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 2012; 484(7394): 339-44.
- Jiang L, Zhang J, Wang JJ, Wang L, Zhang L, Li G, *et al.* Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell* 2013; 153(4): 773-84.
- Gehring M, Reik W, Henikoff S. DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet* 2009; 25(2): 82-90.