

未成熟卵母细胞的形态与成熟能力、染色质构型和H3K27三甲基化水平的相关性研究

刘勇¹ 张领¹ 贾二腾¹ 花学洋¹ 李漫漫¹ 张贺¹ 丁彪¹ 吴风瑞¹ 王慧利² 李文雍^{1*}

(¹胚胎发育与生殖调节安徽省重点实验室, 阜阳师范学院, 阜阳 236037;

²江苏省农业科学院畜牧研究所, 南京 210014)

摘要 该文研究未成熟卵母细胞的形态指标与成熟能力、染色质构型和表观遗传模式的相关性, 为家畜繁育和人医辅助生殖选卵标准提供参考。以经不同激素处理(N组、P组、H组)的小鼠未成熟卵母细胞作为实验材料, 利用滴中孔技术进行体外跟踪培养检测不同形态未成熟卵母细胞的成熟能力, Hoechst33342标记DNA AT双键研究染色质构型, H3K27三甲基化抗体检测全基因组H3K27三甲基化水平差异。结果表明, H组小鼠卵母细胞中, 细胞质直径较小的更适合在滴中孔系统内培养成熟[(71.63±1.02) μm, A形态 vs (68.33±0.97) μm, B形态, $P<0.05$], 核仁直径和透明带厚度与卵母细胞成熟能力无关。A形态卵母细胞NSN型(non-surround nucleolus)比例高于SN型(surround nucleolus)(78.57% vs 21.43%), B形态卵母细胞SN构型比例高于NSN构型(65.12% vs 34.88%)。N、P、H三组小鼠卵母细胞H3K27三甲基化水平差异不显著, 但N组小鼠中, A形态未成熟卵母细胞H3K27三甲基化水平显著低于B形态组($P<0.05$)。P组和H组小鼠中, A形态卵母细胞与B形态卵母细胞H3K27三甲基化水平差异不显著。如果不考虑激素处理分组, 则A形态卵母细胞H3K27三甲基化水平显著低于B形态卵母细胞H3K27三甲基化水平($P<0.05$)。综上所述, 卵母细胞形态可以反映其成熟能力、染色质构型和H3K27三甲基化水平, 激素处理影响H3K27三甲基化水平。

关键词 卵母细胞形态; 体外培养; 染色质构型; H3K27me3

Study of Relationship between Morphology and Mature Ability, Chromatin Configuration, H3K27me3 in Immature Oocytes

Liu Yong¹, Zhang Ling¹, Jia Erteng¹, Hua Xueyang¹, Li Manman¹, Zhang He¹, Ding Biao¹,

Wu Fengrui¹, Wang Huili², Li Wenyong^{1*}

(¹Key Laboratory of Embryo Development and Reproductive Regulation of Anhui Province, Fuyang Teachers College, Fuyang 236037, China; ²Institute of Livestock Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract This research is engaged in studying the correlation of morphology index with mature ability, chromatin configuration and the epigenetic patterns of immature oocyte, providing the reference for oocyte selec-

收稿日期: 2014-06-18 接受日期: 2014-07-28

国家自然科学基金(批准号: 31201789、31372273、31101715)、安徽省自然科学基金项目(批准号: 1408085QC65)、安徽省教育厅自然科学基金(批准号: KJ2012B132、KJ2013A202)和省级科研机构校级委托专项(批准号: 2013PTFY05ZD)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0558-2593601, E-mail: liwenyong@aliyun.com

Received: June 18, 2014 Accepted: July 28, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31201789, 31372273 and 31101715), the Natural Science Fund Project in Anhui province (Grant No.1408085QC65), the Natural Science Research Program of Anhui Higher Education Institutions of China (Grant No.KJ2012B132, KJ2013A202), and the Research Program of Provincial Scientific Research Institutions (Grant No.2013PTFY05ZD)

*Corresponding author. Tel: +86-558-2593601, E-mail: liwenyong@aliyun.com

网络出版时间: 2014-10-30 15:21 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.11.0209.html>

tion in livestock breeding and medical assisted reproduction. Experimental materials are immature oocytes which are from the mice treated with different hormone (N, P, H group). Homemade perforated culture dish (HPCD) is used to track and test the maturation ability of immature oocytes. Chromatin configuration and H3K27me3 level were detected with Hoechst33342 and antibody, respectively. The results showed that the oocyte with smaller cytoplasm in diameter was more suitable for maturation in the HPCD system $[(71.63 \pm 1.02) \mu\text{m}$ (A form) vs $(68.33 \pm 0.97) \mu\text{m}$ (B form), $P < 0.05$] in the group H. Nucleolus' diameter and the thickness of the zona pellucida have nothing to do with maturation ability. Non-surround nucleolus (NSN) configuration ratio was higher than that of surround nucleolus (SN) (78.57% vs 21.43%) in A form oocytes, and SN configuration ratio was higher than that of NSN (65.12% vs 34.88%) in B form oocytes. H3K27 methylation had no significant differences in oocytes which were from N, P and H groups, but H3K27 methylation of immature oocyte in A form was significantly lower than B form in group N ($P < 0.05$). There were no significant differences of H3K27 methylation between A form and B form in group P and group H. H3K27 methylation level of A form was significantly lower than that of B form ($P < 0.05$) despite hormone treatment. In conclusion, the oocyte morphology could reflect its maturational ability, chromatin configuration and H3K27 methylation of oocytes while levels of hormones affected the H3K27me3 level.

Key words oocyte morphology; *in vitro* culture; chromatin configuration; H3K27me3

随着辅助生殖技术的广泛应用和动物克隆胚胎的大量生产,越来越多的领域需要优质卵母细胞。非侵袭性卵母细胞质量评定技术可以无损伤挑选优质卵母细胞,受到越来越多医务和科研人员的青睐^[1]。目前,非侵袭性检测方法主要采用相差显微镜、偏振光显微镜等仪器观测卵丘细胞、透明带、纺锤体等部位,推测卵母细胞成熟和发育的能力^[2]。这些检测方法一定程度上解决了优选卵母细胞的难题,但仍有改进空间。

侵袭性检测方法可以更多地反映卵母细胞的质量。染色质构型是代表染色质凝集程度和空间分布的指标,卵母细胞染色质构型可以反映未成熟卵母细胞成熟的能力和支持胚胎发育的能力^[3-4]。表观遗传是指DNA序列不发生变化,但基因表达却发生了可遗传的改变。表观遗传修饰主要包括DNA甲基化、组蛋白乙酰化和甲基化等。表观遗传修饰可以反映卵母细胞的质量^[5],尤其是H3K27三甲基化会导致染色质凝集,这种表观遗传修饰受PRC1复合体限制,与基因转录翻译密切相关^[6]。但H3K27三甲基化在未成熟卵母细胞中尚未见详细的研究。

本研究采用激光共聚焦显微镜逐层扫描未成熟卵母细胞,对卵母细胞的细胞直径、细胞核直径、透明带厚度、核仁直径进行准确测量,然后结合滴中孔技术建立卵母细胞形态分析系统,跟踪检测不同形态指标卵母细胞的体外成熟能力,并检测不同

形态类型卵母细胞的染色质构型、全基因组H3K27三甲基化水平。从成熟能力、染色质构型、表观遗传模式等方面验证不同形态指标是否能够反映卵母细胞的质量,有机结合非侵袭性检测方法和侵袭性检测方法的优点,为相关领域的应用和研究提供新的思路 and 基础数据。

1 材料与方法

1.1 研究对象及分组

本实验采用6~8周龄昆明雌鼠。N组小鼠不注射激素,P组小鼠每只注射10 IU PMSG,42~48 h后杀鼠取卵巢,H组小鼠每只注射10 IU PMSG 48 h后再每只注射10 IU hCG,并于注射hCG后12~14 h杀鼠取卵巢。将卵巢用HCZB清洗几次后,转移到盛有预热HCZB液体的培养皿中,刺破卵泡,用自制口吸管在体式显微镜下拣取卵丘卵母细胞复合体。

1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 Leica SP5 II激光共聚焦显微镜、Thermo3111 CO₂培养箱及Nikon SMZ745体式显微镜。

1.2.2 主要试剂 超排激素: PMSG、hCG(宁波第二激素厂); 操作液: HCZB(使用Sigma公司的试剂进行配制); 成熟培养液: TCM199(Gibco公司1211575)+10% FCS(Hyclone公司)+100 IU/mL PMSG+抗生素(Gibco公司15140-122); DNA染色液: Hoechst33342(Sigma公司B2261); H3K27me3

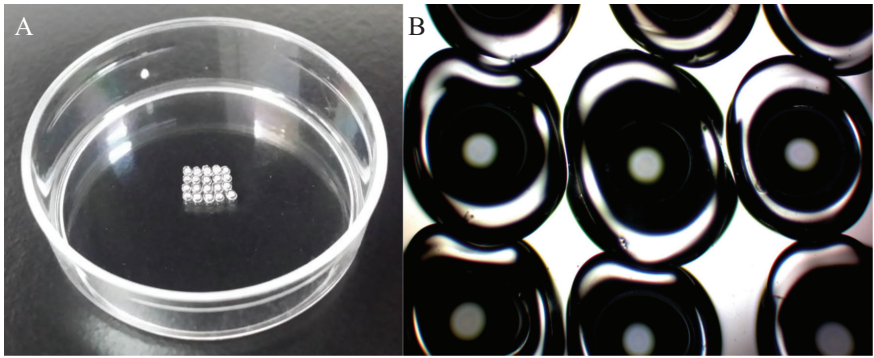
抗体：H3K27三甲基化抗体(Epigentek Group Inc 公司 A-4039); FITC标记的羊抗兔 IgG(Abcam公司 ab6717)。

1.2.3 自制滴中孔培养皿 用灼烧红热的玻璃针扎Corning 35 mm培养皿底部, 控制好温度和力度, 每个培养皿底部50 μ L覆盖范围内扎20个小孔, 每个

小孔中可放一个卵母细胞(图1)。

1.3 研究方法

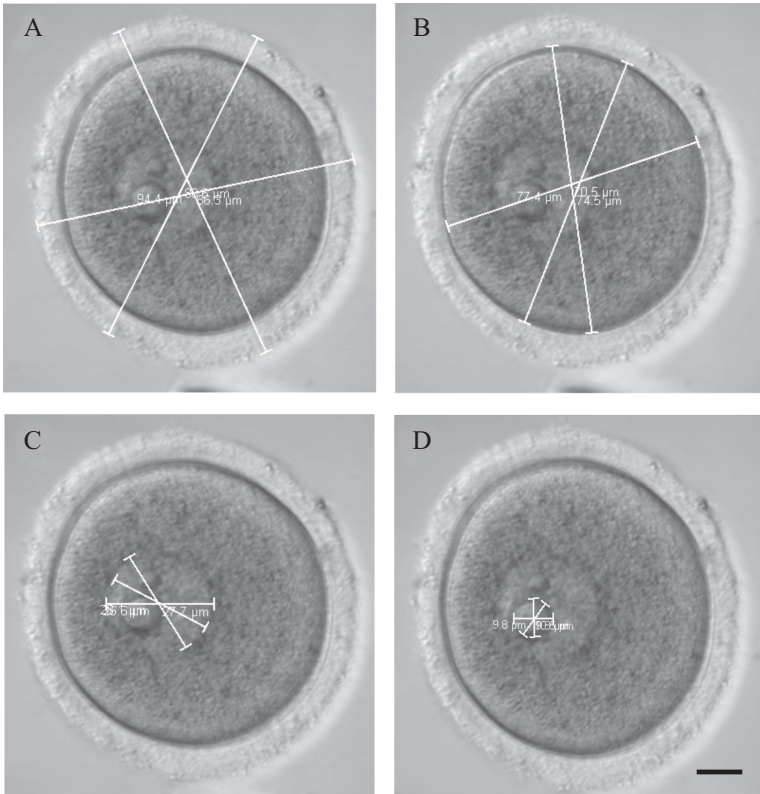
1.3.1 不同形态卵母细胞体外成熟追踪方法 取自制滴中孔培养皿一个, 用50 μ L培养液做滴覆盖小孔, 覆盖石蜡油后放入5% CO₂、100%湿度、37 $^{\circ}$ C培养箱中预平衡2 h, 然后每孔放入1枚未成熟卵母



A: 自制滴中孔培养皿外观; B: 滴中孔局部特写(400 $\times$).
A: appearance of homemade perforated culture dish; B: perforated local features (400 $\times$).

图1 自制带孔培养皿

Fig.1 Homemade perforated culture dish



A: 卵母细胞直径测量; B: 细胞质直径测量; C: 细胞核直径测量; D: 核仁直径测量。标尺=10 μ m。
A: oocyte diameter measurement; B: cytoplasm diameter measurement; C: nucleus diameter measurement; D: nucleolus diameter measurement. Bar=10 μ m.

图2 卵母细胞形态指标测量方法

Fig.2 Measuring method of oocyte morphology index

细胞, 分别编号1~20, 体外培养14~16 h后观察, 以卵母细胞有无第一极体为标准。

1.3.2 非侵袭性卵母细胞形态分析方法 放入带孔培养皿的卵母细胞, 逐个在激光共聚焦显微镜下快速拍摄卵母细胞赤道面、核仁赤道面等焦平面的照片, 全部拍摄完毕后放回CO₂培养箱。然后对所拍1~20号卵母细胞的图片, 利用激光共聚焦自带软件进行测量, 测量指标为卵母细胞直径、细胞质直径、细胞核直径和核仁直径, 具体如图2所示, 每个指标测3次, 取平均值, 得到各指标数据。

1.3.3 卵母细胞染色质构型分类标准 卵母细胞染色质构型分类标准主要依据Liu等^[7]的研究结果, 用含10 µg/mL Hoechst33342的HCZB避光孵育2 min, 标记DNA A-T键, 然后在倒置荧光显微镜下观察, 依据核仁周围是否有凝集的染色质环, 将卵母细胞分为NSN和SN两种染色质构型。

1.3.4 全基因组H3K27三甲基化研究方法 卵母细胞H3K27三甲基化研究方法主要依据王彩红等^[8]研究所用的方法, 卵母细胞分组采用4%多聚甲醛固定以后, 采用0.2% TritonX-100通透, 1% BSA封闭。一抗(Epigenetek Group IncA-4039) 1:100稀释孵育过夜, 充分洗涤后二抗(ab6717, Abcam)孵育3 h, 再用10 mg/L DAPI复染后进行激光共聚焦检测。最后, 采用IPP软件分析共聚焦图像, 获得IOD值后统计分析荧光强度差异。

1.4 数据统计

实验至少重复3次, 每组不少于20枚卵母细胞, 数据采用SPSS软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 卵母细胞形态指标与卵母细胞成熟能力的相关性

H组小鼠卵巢表面卵泡较少, 所取卵母细胞放入滴中孔培养系统中培养, 能够成熟的卵母细胞与不能够成熟的卵母细胞相比较, 卵母细胞直径(加透明带)差异不显著, 但细胞质直径明显较小 $[(68.33 \pm 0.97) \mu\text{m} \text{ vs } (71.63 \pm 1.02) \mu\text{m}, P < 0.05]$, 未成熟卵母细胞的细胞核直径较大, 但与成熟组细胞核直径差异不显著。两组核仁直径差异不显著, 成熟组透明带厚度较大, 但与未成熟组差异不显著, 具体结果如图3所示。根据上述研究结果, 我们将不能够

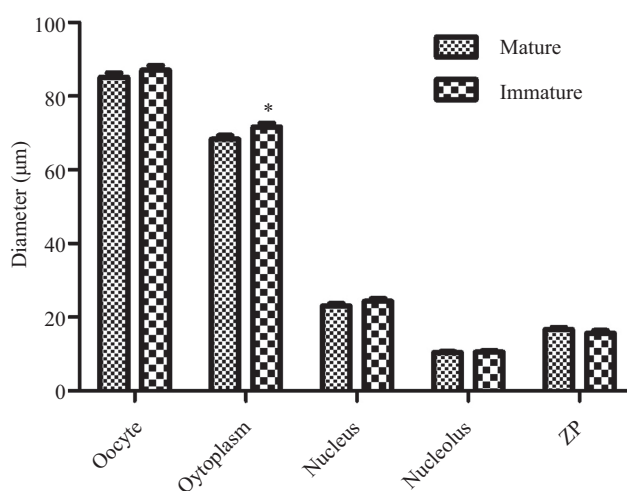
成熟卵母细胞的形态指标定为A形态, 将能够成熟卵母细胞的形态指标定为B形态。

2.2 卵母细胞形态指标与染色质构型的相关性

进一步研究H组卵泡内获得的卵母细胞发现, A形态卵母细胞中, SN构型比例高于NSN构型比例(65.12% vs 34.88%), B形态卵母细胞中, NSN构型比例高于SN构型比例(78.57% vs 21.43%), 如图4所示。

2.3 卵母细胞形态指标与H3K27三甲基化的相关性

我们对N、P、H三组卵母细胞分别进行H3K27

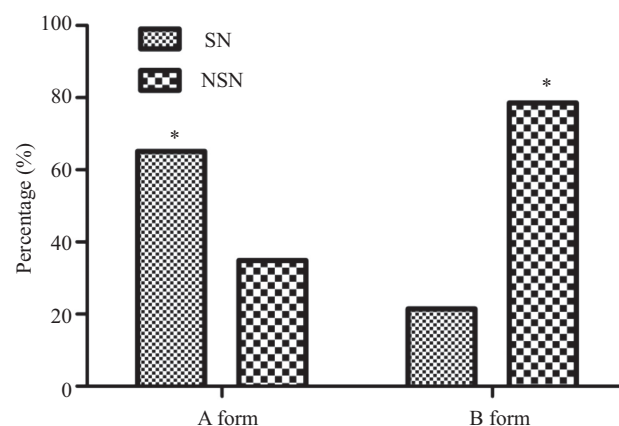


* $P < 0.05$, 与Mature组相比较。

* $P < 0.05$ indicates that the data has significant difference with mature group.

图3 成熟与未成熟卵母细胞形态指标差异

Fig.3 Difference of mature and immature oocyte morphology index

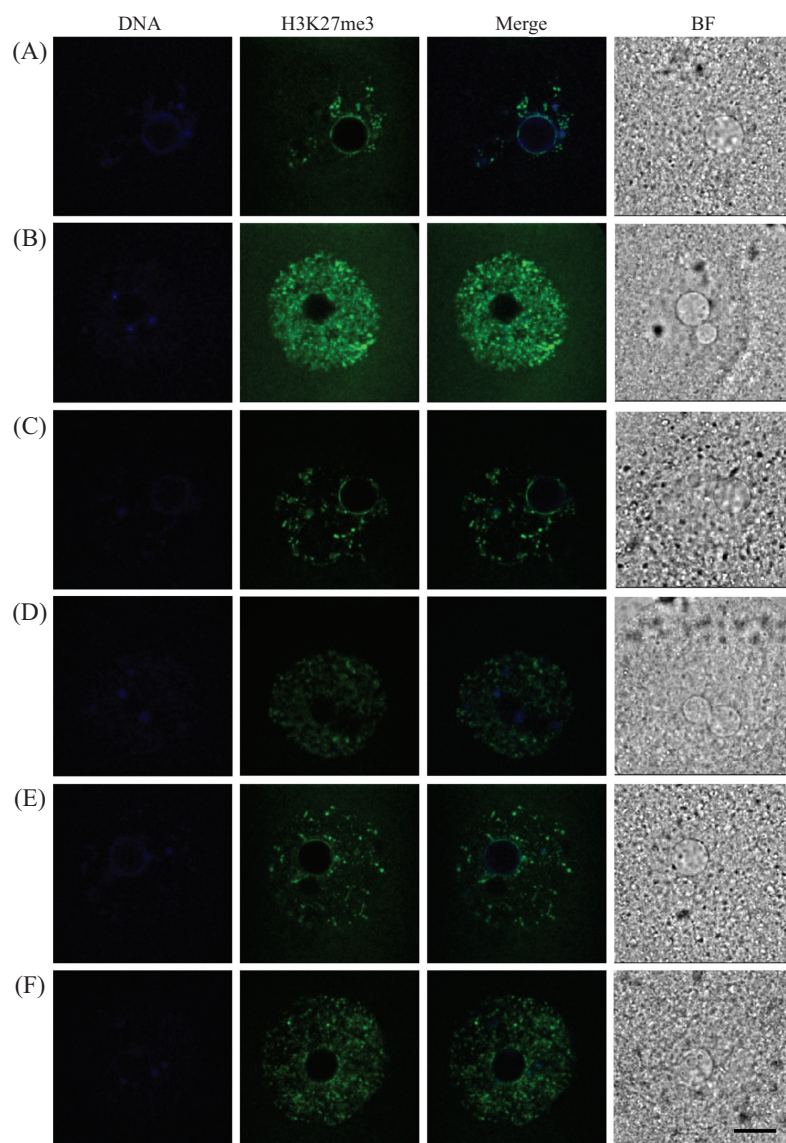


* $P < 0.05$, SN构型与NSN构型相比较。

* $P < 0.05$ indicates SN configuration has significant difference with NSN configuration.

图4 不同形态卵母细胞染色质构型划分及所占比例

Fig.4 Chromatin configuration of different morphology oocytes

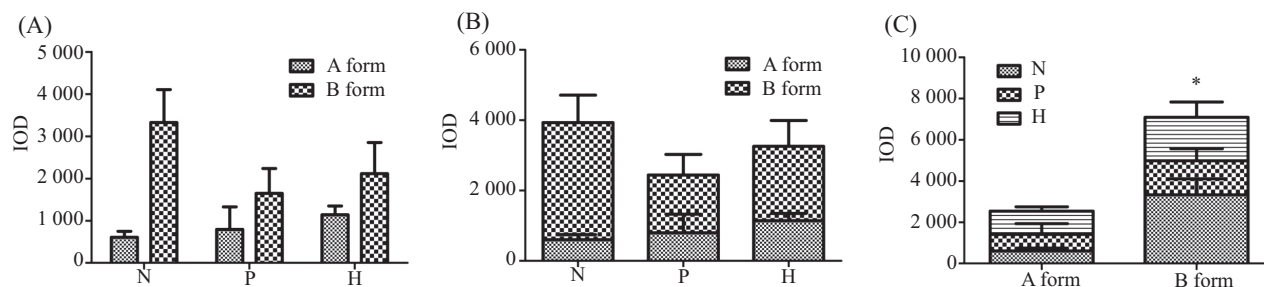


A: N组A形态卵母细胞; B: N组B形态卵母细胞; C: P组A形态卵母细胞; D: P组B形态卵母细胞; E: H组A形态卵母细胞; F: H组B形态卵母细胞。BF为明视野, 标尺=10 μ m。

A: A form oocytes in N group; B: B form oocytes in N group; C: A form oocytes in P group; D: B form oocytes in P group; E: A form oocytes in H group; F: B form oocytes in H group. BF: morphology of oocyte in bright field. Bar=10 μ m.

图5 不同形态卵母细胞H3K27me3水平

Fig.5 H3K27me3 levels in different morphology oocytes



N: 未注射激素组; P: 只注射PMSG组; H: 注射PMSG和hCG组; A form: A形态卵母细胞; B form: B形态卵母细胞。* P <0.05, 与A形态相比。

N: control; P: PMSG treated; H: PMSG and hCG treated; A form: A form oocytes; B form: B form oocytes. * P <0.05, A form vs B form.

图6 不同未成熟卵母细胞H3K27me3荧光强度分析

Fig.6 Fluorescence intensity of H3K27me3 in different immature oocytes

三甲基化研究(图5), 结果发现, N组小鼠卵母细胞中, A形态组H3K27三甲基化水平显著低于B形态组。而P组和H组小鼠卵母细胞中, A形态组与B形态组H3K27三甲基化水平差异不显著(图6A)。如果不考虑卵母细胞的形态指标, 则N、P、H三组小鼠卵母细胞H3K27三甲基化水平差异不显著, 如图6B所示。如果不考虑激素处理情况, 则A形态卵母细胞H3K27三甲基化水平显著低于B形态卵母细胞H3K27三甲基化水平(图6C)。

3 讨论

我们建立的形态指标分析体系, 成功跟踪不同形态卵母细胞成熟过程, 并将未成熟卵母细胞的成熟能力与染色质构型、表观遗传模式建立起联系, 为畜牧生产及人医选择优质卵母细胞提供了新的方法。我们利用滴中孔培养的未成熟卵母细胞取自超排后卵巢表面剩余卵泡, 直径约为65.4~77.7 μm , 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及100%湿度条件下培养16~18 h, 成熟率达到62%。Bao等^[9]对小鼠的研究表明, 卵母细胞在直径达到65~75 μm 时才获得成熟的能力, 我们所取卵母细胞满足卵母细胞成熟所需条件。刘浩等^[10]的研究结果表明, 促性腺激素会影响卵母细胞形态及发育能力。我们所用卵母细胞取自注射PMSG和hCG后的小鼠, 这可能是我们所取卵母细胞成熟率只有62%的一个原因。Cavilla等^[11]研究体外培养的未成熟卵发现, 卵母细胞直径与受精及胚胎发育潜能无关。Romo等^[12]研究也认为, 成熟卵母细胞直径与受精能力及后续的胚胎发育潜能没有明显关系。但我们的研究表明, 卵母细胞细胞质的直径, 与卵母细胞成熟能力密切相关。孙贻娟等^[13]研究表明, 人卵母细胞形态学测量的指标可预示卵子受精和胚胎发育的潜能, 发育为优质胚胎的卵母细胞比发育为劣质胚胎的卵母细胞直径更大。而我们的研究表明, 在滴中孔培养系统中能够成熟的卵母细胞胞质较小, 这个差异可能是由于我们采用超排后小鼠卵巢剩余卵泡卵母细胞和滴中孔培养系统所致, 就像Sun等^[14]研究认为, 激素刺激会影响卵母细胞恢复减数分裂的能力。透明带是由卵母细胞分泌的围绕在卵外周的糖蛋白基质, 随着卵母细胞成熟过程中的直径增加, 透明带厚度也增加^[15]。但我们的研究表明, 卵母细胞质直径为(68.33 $\pm$ 0.97) μm 和(71.63 $\pm$ 1.02) μm 的两组卵母细胞透明带厚度差异不

显著, 但较大卵母细胞透明带厚度反而平均数值较小, 这与Marco-Jiménez等^[16]的研究类似, 他们认为在受精卵中, 透明带较厚的卵子会发育为较好的胚胎并有较高的着床率。

染色质构型可以反映卵母细胞成熟能力、转录水平及发育潜力等^[3]。我们研究的A形态卵母细胞SN染色质构型占优势(65.12%), 而B形态卵母细胞NSN染色质构型占优势(78.57%), 这与Liu等^[7]发现的较大卵母细胞SN染色质构型较多、较小卵母细胞NSN染色质构型较多的研究结果一致。Debey等^[17]的研究表明, 93.8%的SN型卵母细胞能发生生发泡破裂(geminal vesicle breakdown, GVBD), 75%的NSN型卵母细胞能发生GVBD, 二者均能成熟。我们的研究结果也表明, SN和NSN型卵母细胞均能成熟, 并且卵母细胞形态指标与染色质构型关系密切。

卵母细胞生长到最后阶段的表观遗传修饰对于卵母细胞完全成熟是至关重要的^[9]。但关于H3K27位点在未成熟卵母细胞中的三甲基化水平, 仍未见详细报道。我们将小鼠卵母细胞根据形态分为A、B两组, 结果发现, 成熟能力较强的B组H3K27三甲基化水平较高($P<0.05$)。组蛋白H3K27位点可以被甲基化、二甲基化和三甲基化^[18], 且均与基因转录抑制有关^[19]。表明B组转录可能处于抑制状态, 这与夏梦等^[20]的转录相关研究吻合。但如果采用激素处理小鼠, 会导致A、B形态未成熟卵母细胞H3K27三甲基化水平差异消失($P>0.05$), 这可能是由于激素对表观遗传模式的影响造成的^[21]。但我们的研究表明, 如果不考虑卵母细胞的形态指标, 则N、P、H三组小鼠卵母细胞H3K27三甲基化水平差异不显著, 这说明在H3K27三甲基化水平方面, 不同形态卵母细胞对激素的应答是不同的。并且, 如果不考虑激素处理情况, 则A形态卵母细胞H3K27三甲基化水平显著低于B形态卵母细胞H3K27三甲基化水平($P<0.05$), 说明卵母细胞形态对于未成熟卵母细胞H3K27三甲基化水平的影响大于激素刺激的影响。

综上, 我们发现适合在滴中孔体系中成熟的H组B形态卵母细胞, 其细胞质直径相对较小, 并且NSN构型比例高于SN构型比例, 但H3K27三甲基化水平与H组A形态卵母细胞差异不显著。由于未注射激素的N组A、B形态H3K27三甲基化水平差异显著, 而注射激素的P、H组卵母细胞H3K27三甲基化

水平差异均不显著, 因此我们认为激素水平影响了卵母细胞H3K27三甲基化的水平。

参考文献 (References)

- 徐盛玉, 吴 德, 王定越. 卵母细胞质量评定方法. 中国生物工程杂志(Xu Shengyu, Wu De, Wang Dingyue. Oocyte quality appraising methods. China Biotechnology) 2008; 28(7): 116-21.
- 梁 琳, 陈秀娟, 赵晓曦, 王丽岩. 卵母细胞形态及核质成熟度与体外受精结局相关性的研究进展. 中华临床医师杂志(Li-ang Bin, Chen Xiujian, Zhao Xiaoxi, Wang Liyan. Morphology and nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes and research progress of correlation between *in vitro* fertilization outcome. Chin J Clinicians) 2011; 5(12): 3567-71.
- Tan JH, Wang HL, Sun XS, Liu Y, Sui HS, Zhang J. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. Mol Hum Reprod 2009; 15(1): 1-9.
- Liu Y, Sui HS, Wang HL, Yuan JH, Luo MJ, Xia P, *et al.* Germinal vesicle chromatin configurations of bovine oocytes. Microsc Res Tech 2006; 69(10): 799-807.
- Liu Y, Ding B, Yang XX, Shang MB, Lei XH, Wang R, *et al.* Dynamic transformation of DNA methylation and chromatin configuration in porcine oocyte during follicular growth. J Anim Vet Adv 2012; 11(10): 1739-44.
- Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature 2011; 469(7330): 343-9.
- Liu Y, Ding B, Wu FR, Wang R, Yang XX, Shang MB, *et al.* A novel oocyte chromatin configuration classification method: based on the degree of aggregation and spatial distribution of germinal vesicle chromatin. J Anim Vet Adv 2012; 11(4): 531-8.
- 王彩红, 黄继昌, 刘 勇, 吴凤瑞, 丁 彪, 王 荣, 等. 小鼠孤雌胚与体内正常胚H3K27三甲基化模式的差异. 动物学杂志(Wang Caihong, Huang Jichang, Liu Yong, Wu Fengrui, Ding Biao, Wang Rong, *et al.* Different H3K27 trimethylation patterns in Parthenogenetic and *in vivo* mouse embryos. Chinese Journal of Zoology) 2014; 49(4): 103-9.
- Bao S, Obata Y, Carroll J, Domeki I, Kono T. Epigenetic modifications necessary for normal development are established during oocyte growth in mice. Biol Reprod 2000; 62(3): 616-21.
- 刘 浩, 金志魁, 耿春惠, 帅祖兵, 邱文英, 付学文. 卵巢刺激周期促性腺激素用量对卵母细胞形态及临床结局的影响. 现代妇产科进展(Liu Hao, Jin Zhikui, Geng Chunhui, Shuai Zubing, Qiu Wenying, Fu Xuwen. Impact of total gonadotropin dose on oocyte morphology and clinical outcome in ovarian stimulation cycle. Progress in Obstetrics and Gynecology) 2006; 15(4): 295-8.
- Cavilla JL, Kenedy CR, Byskov AG, Hartshorne GM. Human immature oocytes grow during culture for IVF. Hum Reprod 2008; 23(1): 37-45.
- Romão GS, Araújo MC, de Melo AS, de Albuquerque Salles Navarro PA, Ferriani RA, Dos Reis RM. Oocyte diameter as a predictor of fertilization and embryo quality in assisted reproduction cycles. Fertil Steril 2010; 93(2): 621-5.
- 孙贻娟, 谷瑞环, 陆小微, 赵 甍, 冯 云. 人卵母细胞形态学指标预测受精和胚胎发育潜能. 北京大学学报(医学版)(Sun Yijuan, Gu Ruihuan, Lu Xiaowei, Zhao Sheng, Feng Yun. Human oocyte morphology prediction potential of fertilization and embryo development. Journal of Peking University, Health Sciences) 2013; 45(6): 848-51.
- Sun QY, Lai L, Bonk A, Prather RS, Schatten H. Cytoplasmic changes in relation to nuclear maturation and early embryo developmental potential of porcine oocytes: Effects of gonadotropins, cumulus cells, follicular size, and protein synthesis inhibition. Mol Reprod Dev 2001; 59(2): 192-8.
- Greve JM, Salzmann GS, Roller RJ, Wassarman PM. Biosynthesis of the major zona pellucida glycoprotein secreted by oocytes during mammalian oogenesis. Cell 1982; 31(3 Pt 2): 749-59.
- Marco-Jiménez F, Naturil-Alfonso C, Jiménez-Trigos E, Lavara R, Vicente JS. Influence of zona pellucida thickness on fertilization, embryo implantation and birth. Anim Reprod Sci 2012; 132(1/2): 96-100.
- Debey P, Szöllösi MS, Szöllösi D, Vautier D, Girusse A, Besombes D. Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. Mol Reprod Dev 1993; 36(1): 59-74.
- Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzarini Denchi E, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. EMBO J 2004; 23(20): 4061-71.
- Trojer P, Reinberg D. Histone lysine demethylases and their impact on epigenetics. Cell 2006; 125(2): 213-7.
- 夏 梦, 刘明兮, 周 涛, 何 辉, 万 茹, 霍 然. 小鼠生发泡期卵母细胞成熟过程中转录沉默机制的探讨. 南京医科大学学报(自然科学版)(Xia Meng, Liu Mingxi, Zhou Tao, He Hui, Wan Ru, Huo Ran. Germinal vesicle stage oocytes maturation of mouse transcription silencing mechanism of discussion. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing) 2011; 31(7): 956-61.
- Chia DJ. Minireview: Mechanisms of growth hormone-mediated gene regulation. Mol Endocrinol 2014; 28(7): 1012-25.