

# DNA甲基化与哺乳动物生殖

田 臻<sup>1,2</sup> 张昌军<sup>1,2,3</sup> 刁红录<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>湖北医药学院附属人民医院生殖医学中心, 十堰 442000; <sup>2</sup>湖北医药学院生物医学工程学院, 十堰 442000;

<sup>3</sup>胚胎干细胞湖北省重点实验室, 十堰 442000)

**摘要** DNA甲基化是表观遗传水平基因表达调控的重要方式之一, 对哺乳动物的生长发育具有重要作用。原始生殖细胞的甲基化水平、胚胎发育过程中甲基化的重排以及胎盘发育过程中异常甲基化都与生殖过程密切相关。男性不育、女性自然流产及辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)的应用也与DNA甲基化有关, 通过引起DNA甲基化变化从而影响表观遗传调控的变化。该文对DNA甲基化与哺乳动物生殖作一综述, 并阐述DNA甲基化与男性不育、自然流产及ART过程的关系。

**关键词** DNA甲基化; 表观遗传; 哺乳动物; 生殖

## DNA Methylation In Mammalian Reproduction

Tian Liu<sup>1,2</sup>, Zhang Changjun<sup>1,2,3</sup>, Diao Honglu<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Reproductive Medicine Center, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; <sup>2</sup>College of Bioengineering, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; <sup>3</sup>Hubei Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Shiyan 442000, China)

**Abstract** DNA methylation is one of the major modifications in epigenetic level, and plays an important role in mammalian growth and development. The DNA methylation level of primordial germ cells and methylation rearrangement during embryonic development, and placental abnormal methylation is closely related to the reproductive process. Otherwise, DNA methylation also related to male infertility, spontaneous abortion and ART application, which affects the epigenetic process. In this paper, DNA methylation in mammalian reproductive was reviewed and expounded with the relationship between male infertility, spontaneous abortion and the ART process and DNA methylation relationship.

**Keywords** DNA methylation; epigenetic; mammalian; reproduction

表观遗传修饰是通过对基因的修饰调控基因的表达, 而不是改变DNA的碱基序列<sup>[1]</sup>。DNA甲基化是表观遗传调控中的重要方式之一。它是指DNA甲基转移酶催化DNA碱基, 使之发生甲基化反应。DNA甲基化位于基因的启动子区域, 抑制基因的转录, 因此它可能对哺乳动物的发育包括基因组印记、基因失活以及癌症的形成过程都有重要的作用。DNA甲基化发生在CpG岛密集的区域, 即至少200 bp、GC含

量大于50%。据估计, 大约有2 900个CpG岛位于启动子、管家基因的转录结合位点和调控因子等重要基因的附近, 这些区域的甲基化水平达到60%~80%, 同时该区域基因的功能状态是失活的或受到抑制的<sup>[2]</sup>。

DNA甲基化主要是通过DNA甲基转移酶实现的。真核生物中DNA甲基化转移酶分为两类, 一类是参与维持甲基化状态的Dnmt1, 另一类是参与重新甲基化的酶——Dnmt3a、Dnmt3b及Dnmt3L<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2017-03-07 接受日期: 2017-06-26

湖北省自然科学基金(批准号: 2015CFB543)、湖北医药学院创新团队(批准号: 2014CXX03、FDFR201604)和湖北医药学院重点学科建设项目资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0719-8637211, E-mail: hldiao1976@hotmail.com

Received: March 7, 2017 Accepted: June 26, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of Hubei Province of China (Grant No.2015CFB543), the Foundation for Innovative Research Team of Hubei University of Medicine (Grant No.2014CXX03, FDFR201604) and the Leading Academic Discipline Project of Hubei University of Medicine

\*Corresponding author. Tel: +86-719-8637211, E-mail: hldiao1976@hotmail.com

网络出版时间: 2017-09-15 11:19:04

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170915.1119.002.html>

在人类中也发现两种甲基化转移酶<sup>[4]</sup>: 只存在于卵母细胞和植入前分裂期胚胎中的Dnmt1o和体细胞中的Dnmt1s, 这两者的区别是前者利用卵母细胞特有的5'外显子使N-端截短蛋白质形成而发挥作用。

DNA甲基化与哺乳动物生殖过程之间的关系如何? 以下将对其与胚胎发育、着床、胎盘发育、生殖细胞之间的关系作一阐述。

## 1 DNA甲基化与胚胎发育

生殖细胞对于维持种系的延续和遗传物质的传递是非常重要的。在哺乳动物分化体细胞基因组中的表观遗传信息是相对稳定的, 但原始生殖细胞和早期胚胎的全基因组是需要进行去甲基化和重新甲基化的, 这就包括了DNA甲基化的消除及大量的组蛋白修饰和变异的重排<sup>[5]</sup>。去甲基化的机制可能是由TET3(ten-eleven translocation 3)催化胞嘧啶羟甲基化来的。TET3介导雄原核的去甲基化过程, 然而在小鼠早期胚胎中TET3只对去甲基化的范围有调节作用<sup>[6]</sup>。在受精以后, 大量DNA去甲基化直到囊胚阶段, 这一过程部分是由TET酶介导的羟甲基化作用促进的, 待胚泡植入子宫内膜, 全基因组发生重新甲基化<sup>[7]</sup>。基因组DNA去甲基化在迁移的过程中开始, 在迁移到性腺内后停止, CpG甲基化水平从E6.5的70%减少到E13.5的约10%<sup>[8]</sup>。这种大量的去甲基化对性别特异的印记基因的表达水平是非常重要的, 并且它会影响到后续胎儿的发育。在出生时, 男性精母细胞重新获得甲基化; 但在女性中, DNA甲基化没有完全重建直至成年后卵母细胞发育成熟。一旦甲基化建立以后, 在受精卵形成的基础上印记就传递给下一代并且在早期胚胎中通过动态的表观遗传的重排得到维持。

早期胚胎中, DNA甲基化的逐渐丢失归因于一种抑制机制即胚胎细胞核内Dnmt1和Np95的抑制。而在卵母细胞中, 这种甲基化丢失的比例也受到受精卵亲本基因组激活机制的影响。近期的研究表明, 被动的去甲基也是确保原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs)甲基化的基础: 甲基化水平的逐步减少与细胞数增加、Np95转录下调、Dnmt1从复制点的移除以及核内蛋白质的丢失有对应关系<sup>[9]</sup>。这些都说明, DNA甲基化过程具有时空性, 存在于原始生殖细胞发育的整个过程中并调控基因的表达。

DNA甲基化是决定染色体结构表观遗传标志

的调控方式之一。在原始生殖细胞和胚胎发育的整个过程中, 会发生全基因组范围内的DNA甲基化模式重排, 而这种改变引起的染色体功能状态等一系列变化会决定细胞的分化方向。有研究指出, 哺乳动物胚胎基因组的甲基化水平建立在配子形成期间, 并且在发育的过程中发生改变。这种改变包括基因组广泛的甲基化和再甲基化, 也有与调控因子活性程度平行的选择性的甲基化<sup>[10]</sup>。有研究指出, 哺乳动物的甲基化对胚胎的发育、基因组的稳定和X染色体的失活是非常重要的<sup>[11]</sup>。已有研究阐明了小鼠全基因组甲基化模式的异常与异常的胚胎发育及植入失败之间的相关性<sup>[12]</sup>。

## 2 DNA甲基化和胚胎着床

子宫是受激素控制的周期性变化的器官, 雌激素、孕激素的协同作用能够使子宫内膜细胞发生增殖和分化。环境内分泌干扰物如植物性激素、毒素及其他激素, 将会导致异常的DNA甲基化且会增加异常发育的风险, 如癌症和不育等生殖障碍<sup>[13]</sup>。病理情况下的子宫包括子宫内膜异位症、子宫内膜癌、子宫腺肌症、子宫平滑肌瘤等会导致整个基因组或者特异位点甲基化的不规律<sup>[14]</sup>。已有研究表明, DNMT3a和DNMT3b受女性类固醇激素的调控, 说明DNA甲基化也可能受类固醇激素的调节<sup>[15]</sup>。另一方面, DNA甲基化也能影响雌激素受体、乳腺及子宫肌层, 它们之间也可能存在相互作用<sup>[15]</sup>。

妊娠使得内分泌信号发生巨大的变化, 着床是胚胎与母体子宫相互作用的过程, 需要胚泡与接受态的子宫同步激活, 而这种接受态的状态有赖于激素及其下游分子调控网络。通过抑制DNA甲基化或者抑制DNMTs发现, 其与用于维持子宫内膜上皮细胞黏附能力的E-钙黏蛋白的下调有关<sup>[16]</sup>。相反, 对人体外受精(*in vitro fertilization*, IVF)的临床研究结果表明, DNMTs的表达增加与子宫内膜接受态呈正相关。对小鼠模型的研究表明, DNA甲基化抑制剂对小鼠胚胎黏附及植入位点的数量影响较小, 而局部基质细胞的增殖却暂时减缓, 提示其对子宫接受态的作用主要体现在胚胎植入的后期<sup>[17]</sup>。

在人和啮齿类动物中, 胚胎植入后子宫内膜基质细胞发生广泛的增殖并分化成蜕膜细胞, 而蜕膜化是一个非常复杂的过程, 它不仅与转录调控有关也受表观遗传的控制, 如DNA甲基化<sup>[18]</sup>。研究

表明, 体外诱导小鼠子宫内膜基质细胞蜕膜化的过程中, 增加Dnmt1和Dnmt3a的表达后, 5-aza-dC(5-aza-2'-deoxycytidine, 一种甲基化抑制剂)能有效地阻止蜕膜化且两种高度甲基化的基因[*Bcl3*(B-cell lymphoma 3-encoded protein)和*Slc16a3*(solute carrier family 16 member 3)]明显下调, 有力地说明了这种表观遗传水平的调控对植入成功后蜕膜的发育具有重要作用<sup>[19]</sup>。

### 3 DNA甲基化与胎盘发育

胎盘是维持子宫内胚胎生长和生存的一个暂时性的器官。基因组广泛的表观遗传修饰参与胎盘发育的各个方面, 包括子宫蜕膜化、滋养层细胞黏附和侵袭、血管形成及胎盘印记基因的表达。妊娠期间的环境因素, 如重金属、化学物质、辅助生殖技术和营养状态, 都可能导致胎盘表观遗传异常<sup>[20]</sup>。在哺乳动物中, 印记基因调节胎盘发育和胚胎的生长, 并且这种调节作用与胎盘的形成功能协调。比较胎盘和躯体组织常染色体上基因启动子甲基化水平的分布水平后发现, DNA甲基化通常维持在重复的和X连锁序列之外的胎盘组织中<sup>[21]</sup>。在哺乳动物中, 胎盘组织也有显著的印记基因的高表达, 其中父亲来源的特异基因的表达受到DNA甲基化水平的调控, 而这些基因都专一地印记在胎盘中<sup>[22]</sup>。

胎盘中DNA甲基化水平的异常与一些疾病的发生有关, 如胎儿宫内生长受限及先兆子痫等。有研究表明, 11 $\beta$ -HSG2受DNA甲基化的调控, 且与出生后新生儿低体重有关<sup>[23]</sup>。

人中胚层特异转录基因*MEST*(mesoderm specific transcript gene)是一种重要的调节人胚胎和胎盘生长的基因。无论是人还是小鼠, *MEST*基因印记区域的异常甲基化或者在胎盘中不平衡的表达与异常的胚胎发育有关<sup>[24]</sup>。总之, 胎盘中DNA甲基化改变与胎儿发育、妊娠期疾病有关。

### 4 DNA甲基化与男性不育

男性不育是现今全球最大的关注热点之一。男性不育有很多原因, 包括射精功能障碍、精索静脉曲张和感染等。除此以外, 精子的运动、精子获能、破膜、受精和早期胚胎发育都是男性生育力的先决条件, 遗传和表观遗传的改变, 其中的任何一种因素和条件都可能导致男性生育力的变化<sup>[25]</sup>。精细胞有

许多表观遗传的特点, 在单倍体精细胞中, 大部分的DNA结合组蛋白替换成鱼精蛋白, 这个过程被认为是精子特异的表观遗传机制<sup>[26]</sup>。Meta分析研究表明, 异常组蛋白和鱼精蛋白转换导致的鱼精蛋白缺陷与精子DNA损伤增加和男性生育力下降有关<sup>[27]</sup>。干细胞的高度甲基化影响男性的生育力。例如, 在精子细胞中启动子区域的高度甲基化使鱼精蛋白1和2的比例失衡、精子核染色质压缩不完全, 从而减少精子的能动性和男性生育力; 而在IVF中, 精子DNA的高度甲基化与妊娠失败有关<sup>[28]</sup>。精子表观遗传的出现有助于精子和卵子的结合。近期研究表明, 成熟精子中组蛋白定位、修饰及DNA甲基化水平可能会影响早期胚胎事件、胚胎发育甚至后代的健康和疾病的易感性<sup>[29]</sup>。事实上, 父源的生殖细胞系中表观遗传的改变已经用动物模型显示出来并且这些变化会遗传给后代, 导致表型的异常。随着年龄的增长, DNA甲基化的异常会增加后代患病的风险。简言之, 精子表观遗传不仅与正常精子功能有关, 而且对胚胎发育和自身健康有重要作用<sup>[30]</sup>。

### 5 DNA甲基化与自然流产

在育龄期妇女中, 约15%妊娠在孕20周以前会发生自然流产, 而在快进入更年期的女性中这种比例会更高。随着妇女年龄的增长, 染色体数量和结构的异常被认为是自然流产最主要的原因, 特别是50%自然流产的妇女都有整倍体丢失的现象。一方面, 一些母源性的因素被指出与流产有关, 如免疫性因素、解剖结构的异常、内分泌紊乱、感染性因素等<sup>[31]</sup>。另一方面, 一些表观遗传学标记也可能是造成流产的原因。DNA甲基化就是一种表观遗传学标记, 在胚胎发育过程中, 甲基化与细胞稳定地由一个具有全能性的受精卵分化成胚胎和胚胎以外的组织有关。而在胚胎发育和配子形成的过程中, 一些微环境的改变可能会破坏已经设定好的甲基化程度<sup>[32]</sup>。

有研究指出, 在自然流产组织中的一些印记点的DNA甲基化极值比人工流产组织中出现得更为频繁<sup>[33]</sup>。此外, 母体绒毛膜促性腺激素 $\beta$ 肽链5(chorionic gonadotropin-beta polypeptide 5, CGB5)等位基因的表达和异常的半甲基化只出现在2例复发性流产和1例选择性终止妊娠的病例中, 而在正常的妊娠组织中并无发现<sup>[34]</sup>。DNA甲基转移酶对DNA的甲基化至关重要, 也有研究发现, 在自然流产绒毛

组织中有DNA甲基化水平降低的现象,而这种降低可能是由于DNMT1和DNMT3A共同作用的结果,说明其可能是自然流产发病的一种原因<sup>[35]</sup>。在小鼠模型中,通过DNMT1抑制剂抑制甲基化,能够引起整个DNA甲基化水平的减少,从而影响胚胎的发育,抑制体外子宫内膜细胞的生长<sup>[36]</sup>。因此,我们可以推测,改变印记基因甲基化可能使自然流产易感性增加。

## 6 DNA甲基化与ART

已有研究表明,与辅助生殖技术相关的程序可能对生殖细胞和植入前胚胎的表观遗传的建立产生影响<sup>[37-38]</sup>。因辅助生殖技术绕过了自身的一些选择机制,暴露了配子和胚胎,且直接受到激素、培养基和物理应力刺激,可能会干扰正常印记的过程。在发育期间,DNA甲基化的重排可能是胚胎源性疾病发生的一种重要机制。

精子分离一般用于辅助生殖技术如宫腔内人工授精(intrauterine insemination, IUI),体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)等,通过密度梯度离心将形态和运动较好的精子从精浆中筛选出来。在这个过程中,表观遗传的程序包括组蛋白的保留及DNA甲基化可能被改变,而通过助孕技术出生的小孩患印记障碍疾病的风险更高<sup>[39]</sup>。在精子形成过程中,组蛋白转变成鱼精蛋白被认为是建立稳定表观遗传的关键步骤。研究表明,组蛋白转变的异常及鱼精蛋白表达异常与ART助孕失败有关,而DNA甲基化也能影响ART的临床妊娠率并与胚胎发育有关<sup>[40]</sup>。ART中促排卵过程对卵巢的刺激扰乱了后代印记基因的表达水平和甲基化的状态,而这种影响可能会持续到第二胎<sup>[41]</sup>。在ART与非ART对象的研究中发现,一些基因的甲基化水平具有统计学差异,这说明ART或者其他与不孕相关的因素可能会影响下一代的表观遗传基因组。但到目前为止,仍然没有清晰的图谱来解释医学上这种ART诱导的表观基因组变异的相关性。

## 7 结语与展望

DNA甲基化是一种表观遗传水平重要的修饰方法,对基因的表达有重要的调控作用。受精卵结合形成胚胎和胎盘的整个生殖过程都与DNA甲基化有关,如果发生甲基化的异常,会导致植入的失

败以及胚胎发育的异常,从而造成不利的妊娠结局如流产等。人类辅助生殖技术给不孕症妇女带来了福音,但由相关技术衍生的对胚胎发育过程中DNA甲基化的影响还存在分歧。目前,有关该方面的研究尚浅,相信随着相关研究的不断深入,在不久的将来,表观遗传学的研究定会为相关疾病患者带来福音。

## 参考文献 (References)

- 1 Schübeler D. ESCI award lecture: Regulation, function and biomarker potential of DNA methylation. *Eur J Clin Invest* 2015; 45(3): 288-93.
- 2 Menezo Y JR, Silvestris E, Dale B, Elder K. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. *Reprod Biomed Online* 2016; 33(6): 668-83.
- 3 Jurkowski TP, Jeltsch A. On the evolutionary origin of eukaryotic DNA methyltransferases and Dnmt2. *PLoS One* 2011; 6(11): e28104.
- 4 Hayward BE, de Vos M, Judson H, Hodge D, Huntriss J, Picton HM, *et al.* Lack of involvement of known DNA methyltransferases in familial hydatidiform mole implies the involvement of other factors in establishment of imprinting in the human female germline. *BMC Genet* 2003; 4(1): 2-10.
- 5 Saitou M, Yamaji M. Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(11): a008375.
- 6 Zhu C, Gao Y, Guo H, Xia B, Song J, Wu X, *et al.* Single-cell 5-formylcytosine landscapes of mammalian early embryos and ESCs at single-base resolution. *Cell Stem Cell* 2017; 20(5): 720-31.
- 7 Duan L, Liu Y, Wang J, Liao J, Hu J. The dynamic changes of DNA methylation in primordial germ cell differentiation. *Gene* 2016; 591(2): 305-12.
- 8 Seisenberger S, Andrews S, Krueger F, Arand J, Walter J, Santos F, *et al.* The dynamics of genome-wide DNA methylation reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mol Cell* 2012; 48(6): 849-62.
- 9 Seisenberger S, Peat JR, Reik W. Conceptual links between DNA methylation reprogramming in the early embryo and primordial germ cells. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25(3): 281-8.
- 10 Pereira LV, Vasques LR. X-chromosome inactivation: Lessons from transgenic mice. *Gene* 2000; 255(2): 363-71.
- 11 Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293(5532): 1068-70.
- 12 Jefferson WN, Patisaul HB, Williams CJ. Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction* 2012; 143: 247-60.
- 13 Kolbe DL, DeLoia JA, Porter-Gill P, Strange M, Petrykowska HM, Guirguis A, *et al.* Differential analysis of ovarian and endometrial cancers identifies a methylator phenotype. *PLoS One* 2012; 7(3): e32941.
- 14 Logan PC, Ponnampalam AP, Steiner M, Mitchell MD. Effect of cyclic AMP and estrogen/progesterone on the transcription of DNA methyltransferases during the decidualization of human endometrial stromal cells. *Hum Reprod* 2013; 19(5): 302-12.

- 15 Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, *et al.* DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen. *Hum Reprod* 2009; 24(5): 1126-32.
- 16 Fang L, Rui-Xia W, Feng-Mei M, Zhen-Gao S, Li-Hong W, Lei S. Effects of Chinese medicines for tonifying the kidney on DNMT1 protein expression in endometrium of infertile women during implantation period. *J Altern Complement Med* 2013; 19(4): 353-9.
- 17 Ding YB, Long CL, Liu XQ, Chen XM, Guo LR, Xia YY, *et al.* 5-aza-2'-deoxycytidine leads to reduced embryo implantation and reduced expression of DNA methyltransferases and essential endometrial genes. *PLoS One* 2012; 7(9): e45364.
- 18 Gao F, Ma X, Rusie A, Hemingway J, Ostmann AB, Chung D, *et al.* Epigenetic changes through DNA methylation contribute to uterine stromal cell decidualization. *Endocrinology* 2012; 153(12): 6078-90.
- 19 Cotton AM, Avila L, Penaherrera MS, Affleck JG, Robinson WP, Brown CJ. Inactive X chromosome-specific reduction in placental DNA methylation. *Hum Mol Genet* 2009; 18(19): 3544-52.
- 20 Fulin L, Jin Z, Wei Z, Hui W. Epigenetic regulation and related diseases during placental development. *Hereditas* 2017; 39(4): 263-75.
- 21 Frost JM, Moore GE. The importance of imprinting in the human placenta. *PLoS Genet* 2010; 6(7): e1001015.
- 22 Peng B, Zhu H, Ma L, Wang YL, Klausen C, Leung PC. AP-1 transcription factors c-FOS and c-JUN mediate GnRH-induced cadherin-11 expression and trophoblast cell invasion. *Endocrinology* 2015; 156(6): 2269-77.
- 23 Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Solís-Martínez MO, Romero-Gutiérrez G, Aguirre-Arzola VE, Wrobel K, Wrobel K, *et al.* 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 promoter methylation is associated with placental protein expression in small for gestational age newborns. *Steroids* 2017; 124: 60-6.
- 24 Himes KP, Young A, Koppes E, Stolz D, Barak Y, Sadovsky Y, *et al.* Loss of inherited genomic imprints in mice leads to severe disruption in placental lipid metabolism. *Placenta* 2015; 36(4): 389-96.
- 25 Brugh VM, Maduro MR, Lamb DJ. Genetic disorders and infertility. *Urol Clin North Am* 2003; 30(1): 143-52.
- 26 Brunner AM, Nanni P, Mansuy IM. Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin* 2014; 7(1): 2.
- 27 Ni K, SpiessAN, Schuppe HC, Steger K. The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology* 2016; 4(5): 789-99.
- 28 Nanassy L, Carrell DT. Abnormal methylation of the promoter of CREM is broadly associated with male factor infertility and poor sperm quality but is improved in sperm selected by density gradient centrifugation. *Fertil Steril* 2011; 95(7): 2310-4.
- 29 Jenkins TG, Aston KI, Pflueger C, Cairns BR, Carrell DT. Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility. *PLoS Genet* 2014; 10(7): e1004458.
- 30 Velker BA, Denomme MM, Mann MR. Embryo culture and epigenetics. *Methods Mol Biol* 2012: 399-421.
- 31 Hogg K, Price EM, Hanna CW, Robinson WP. Prenatal and perinatal environmental influences on the human fetal and placental epigenome. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 92(6): 716-26.
- 32 Pliushch G, Schneider E, Weise D, El Hajj N, Tresch A, Seidmann L, *et al.* Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths. *Am J Pathol* 2010; 176(3): 1084-90.
- 33 Uusküla L, Rull K, Nagirnaja L, Laan M. Methylation allelic polymorphism (MAP) in chorionic gonadotropin  $\beta$  (CG $\beta$ ) and its association with pregnancy success. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(1): E199-207.
- 34 Chao Y, Weng L, Zeng R. Correlation of genomic DNA methylation level with unexplained early spontaneous abortion. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2014; 34(10): 1498-502.
- 35 Kobayashi H, Hiura H, John RM, Sato A, Otsu E, Kobayashi N, *et al.* DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet* 2009; 17(12): 1582-91.
- 36 Le Bouc Y, Rossignol S, Azzi S, Steunou V, Netchine I, Gicquel C. Epigenetics, genomic imprinting and assisted reproductive technology. *Ann Endocrinol* 2010; 71(3): 237-8.
- 37 Hajj N, Haaf T. Epigenetic disturbances in *in vitro* cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction. *Fertil Steril* 2013; 99(3): 632-41.
- 38 Kagami M, Nagai T, Fukami M, Yamazawa K, Ogata T. Silver-Russell syndrome in a girl born after *in vitro* fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region of PEG1/MEST. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24(4): 131-6.
- 39 Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. *Andrologia* 2004; 36(3): 95-100.
- 40 Yu B, Zhou H, Liu M, Zheng T, Jiang L, Zhao M, *et al.* Epigenetic alterations in density selected human spermatozoa for assisted reproduction. *PLoS One* 2015; 10(12): e0145585.
- 41 Xu GF, Liao Y, Li JY, Huang Y, Wu YQ, Liu J, *et al.* Ovarian stimulation perturbs methylation status of placental imprinting genes and reduces blood pressure in the second generation offspring. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017; 211: 140-5.