

环磷酰胺处理对小鼠受精卵和二细胞期胚胎组蛋白 H3K9 乙酰化修饰的影响

杨纪峰, 周靖, 孙东威, 熊隼, 董杰影

(温州医学院生命科学学院, 浙江 温州 325035)

摘要: 目的 用环磷酰胺处理雄性小鼠, 是否会对受精后的受精卵及早期胚胎的表观遗传特征组蛋白 H3K9 乙酰化修饰产生明显影响。方法 5 只性成熟 ICR 雄性小鼠用环磷酰胺注射处理 4 d 时间作为环磷酰胺处理组, 另外 5 只雄鼠注射相应体积的生理盐水作为正常对照组。雄鼠与雌鼠交配后收集原核期受精卵和二细胞期胚胎, 然后用间接免疫荧光染色技术结合激光共聚焦扫描显微镜技术检测胚胎细胞中组蛋白 H3K9 乙酰化修饰的分布和水平。结果 正常对照组中, 受精卵的雌雄原核均呈现较明显的 H3K9 乙酰化染色, 至二细胞期时, 单个核内的染色水平有所下降, H3K9 乙酰化在细胞核内除核仁外的区域相对均匀分布。在环磷酰胺处理组中, 大部分原核期受精卵和二细胞期胚胎组蛋白 H3K9 乙酰化水平和分布模式与正常对照组胚胎没有明显差异, 只有少部分 (25%) 受精卵呈现比较大的雄原核以及相对较低的乙酰化染色水平; 37% 二细胞期胚胎发生碎裂, 形成 2~3 个相对大一些的乙酰化染色水平很低的细胞以及若干小的球状体。结论 高剂量环磷酰胺处理雄鼠可以在一部分受精卵和早期卵裂胚中导致表观遗传特征和胚胎发育的异常。

关键词: 环磷酰胺; 受精卵; 胚胎; 着床前; 组蛋白乙酰化

中图分类号: R394.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)05-0330-04

Effect of cyclophosphamide on H3K9 acetylation in zygote and two-cell embryo of mice via paternal exposure

YANG Ji-feng, ZHOU Jing, SUN Dong-wei, XIONG Jun, DONG Jie-ying

(School of Life Sciences, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of cyclophosphamide on histone H3K9 acetylation, the epigenetic characteristics in zygote and two-cell embryo of mice via paternal exposure. **Methods** Ten adult male ICR mice were divided into two groups, five mice in experiment group were injected with cyclophosphamide for 4 days, another five control mice were injected with physiological saline. Then they were mated with female mice, their pronuclear zygotes and two-cell embryos were taken and fixed, meanwhile, the levels and distribution of histone H3K9 acetylation were determined by indirect immunofluorescence staining and laser scanning confocal microscope system. **Results** In control group, high levels of H3K9 acetylation could be shown in both male and female pronuclei, while in two-cell embryos H3K9 acetylation was decreased and evenly distributed in nuclei except the nucleolus. In cyclophosphamide treated group, the level and distribution of histone H3K9 acetylation in majority of the zygotes or embryos showed no obvious difference compared with the controls, only 25% zygotes showed some enlargement in paternal pronuclei and lower acetylation level, 37% two-cell embryos were broken to several small spherical bodies or cells with low level of H3K9 acetylation. **Conclusion** The results suggested that high dose paternal exposure of cyclophosphamide might induce some abnormalities in epigenetic feature and embryo development in a part of zygotes and early embryos.

Key words: cyclophosphamide; zygote; embryo; preimplantation; histone acetylation

环磷酰胺是临床常用的广谱抗肿瘤药, 能抑制肿瘤细胞生长与增殖, 但也会影响到人体正常细胞的生长和发育。男性长期应用该药物, 对雄性生殖系统有一定的毒副作用, 能引起精子减少、不育, 有些不良影响还会通过精子遗传给后代^[1]。以往有关该药毒

副作用的影响研究主要集中在生理代谢和细胞遗传方面, 目前有关这种药物在生殖发育方面毒副作用的分子机制研究还很少, 特别是对表观遗传特征的影响还不是很清楚。哺乳动物在生殖细胞发生和受精后早期胚胎发育过程中, DNA 甲基化和组蛋白修饰等表观遗传修饰会发生全基因组水平的大规模重编程, 比较容易受到环境和药物因素的影响。本研究以 ICR 小鼠为实验动物, 用环磷酰胺处理雄鼠, 然后与雌鼠交配, 取得受精卵和早期卵裂胚胎, 观察其细胞核中组蛋白 H3K9 乙酰化修饰水平和分布是否受到影响。

收稿日期: 2011-05-10; 修回日期: 2011-08-19

基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y2080996); 温州医学院科研启动基金 (QTJ07018)

作者简介: 杨纪峰 (1977—), 男, 讲师, 研究方向: 哺乳动物早期胚胎发育。

通讯作者: 董杰影, E-mail: djy@wzmc.edu.cn.

1 材料与方法

1.1 动物分组

性成熟的 ICR 小鼠购自温州医学院实验动物中心, 在普通级动物房内饲养, 光照周期为 7: 00—17: 00。雄鼠 10 只, 雌鼠 20 只。实验组随机分配 5 只 ICR 雄鼠, 第 1 天腹腔注射环磷酰胺 100 mg/kg, 第 2~4 天每天腹腔注射环磷酰胺 50 mg/kg。另设 5 只雄鼠为空白对照, 注射生理盐水, 注射 2 周后与雌鼠合笼。

1.2 实验试剂

孕马血清促性腺激素 (PMSG), 人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 购自 Prospecc Tany TechnGene Ltd 公司; PBS 缓冲液, 免疫染色固定液, Triton X-400、Tween-20, 防淬灭剂, 均购自江苏海门市碧云天生物技术研究所; 兔来源的组蛋白 H3K9 乙酰化抗体购自 Upstate 公司; Dylight 488 荧光标记驴抗兔二抗购自 Jackson 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 着床前胚胎的收集 选择阴门呈淡粉红色将要发情的雌性小鼠, 每只腹腔注射 10 IU 孕马血清促性腺激素 (PMSG), 48 h 后腹腔注射 10 IU 人绒毛膜促性腺激素 (hCG)。当晚与雄鼠按 1:1 比例合笼, 第 2 天早晨检查雌鼠有无阴栓以确定是否交配, 交配的雌鼠在下午 13: 00~14: 00 处死取受精卵或第 3 天早晨处死取二细胞期胚胎, 胚胎采集参照小鼠实验操作手册的程序进行。胚胎取出后, 用 PBS 清洗, 然后放在含 0.2 ml 免疫染色固定液 (4% 多聚甲醛) 的离心管里, 在 4℃ 冰箱内保存, 待收集足够的胚胎数量后, 进行免疫荧光染色。

1.3.2 间接免疫荧光染色 染色步骤采用 Santos 等人的方法^[2], 并稍加修改。所有的染色步骤都在室温下进行。在体视镜下, 把处理组和对照组胚胎从保存的离心管中取出来, 放在平皿的液滴中。先用 0.5 ml PBS 缓冲液洗 2 次, 再用含 0.2% Triton X-400 的 PBS 液透膜处理胚胎 1 h。用含 0.05% Tween-20 的 PBS 液洗 3 次后, 用 4 mol/L HCl 处理 10 min, 然后用 0.05% Tween-20 的 PBS 液洗 3 次。用封闭液 (含 1% BSA 和 0.05% Tween-20 的 PBS 液) 在室温下封闭 1 h。封闭处理后, 用兔来源的组蛋白 H3K9 乙酰化抗体孵育 1 h (稀释 1:100), 用封闭液洗 3 次后, 用 Dylight 488 荧光标记驴抗兔二抗孵育 1 h, 用封闭液洗 3 次。最后, 用防淬灭剂将胚胎封片。

1.3.3 激光共聚焦扫描显微镜观察 封片后的胚胎用激光共聚焦显微镜 (Olympus Fluoview 1000) 进行检测。对于每次实验, 所有的样品用同样的参数扫描

(detector gain, amplifier offset and pinhole parameters)。使用图像处理软件 Olympus Fluoview Version. 2.0a Viewer 和 ImageJ v. 1.34 s 对图像进行处理以展现染色模式胚胎细胞核荧光染色强度, 用 ImageJ 1.41 软件进行相对定量, 用 *t* 检验对环磷酰胺组和正常对照组进行统计学分析 ($P < 0.05$)。

2 结果

2.1 组蛋白 H3K9 乙酰化修饰在小鼠受精卵和二细胞期胚胎内的分布

在受精后 14 h 取得的原核期小鼠受精卵里可见雌雄两个原核, 面积比较大的是雄原核, 此时两个原核已经靠近即将融合 (图 1, A1, 见封三)。在两个原核中, 组蛋白 H3 第 9 位赖氨酸 (H3K9) 乙酰化修饰均表现出较高水平的染色强度 (图 1, A2, 见封三), 核仁区域几乎没有染色, 细胞质内也有较高水平的均匀着色, 说明有很多乙酰化修饰的组蛋白储存在卵细胞质中。在受精后 24 h 左右, 发生第一次卵裂进入二细胞期 (图 1, B1, 见封三), 每个细胞核内有两个核仁。图 1B2 显示染成绿色的两个细胞核, 大部分区域都有组蛋白乙酰化的绿色染色分布, 而且呈现较高的水平, 但较原核期水平已有所下降, 核仁区域也同样没有染色。

2.2 环磷酰胺处理组小鼠受精卵和二细胞期胚胎内组蛋白 H3K9 乙酰化修饰水平和分布

用环磷酰胺高剂量处理雄鼠的实验组, 大部分受精卵 (图 2, A2, 见封三) 的雌雄原核和二细胞期胚胎 (图 2, B2, 见封三) 的两个细胞核都呈现明显的 H3K9 乙酰化染色。与对照组显著差异表现为 25% 受精卵其雄原核面积明显大于对照组, 且乙酰化染色水平较低, 说明药物处理可能影响了部分受精卵胚胎的表观遗传特征。另外, 在二细胞期时, 有 37% 的胚胎出现碎化 (图 2, C1, 见封三), 呈现 2~3 个较大的乙酰化染色水平很低的细胞 (图 2, C2, 见封三), 以及若干个小的球状体, 这说明正常的卵裂活动在部分小鼠胚胎中受到了影响。

3 讨论

环磷酰胺是临床上常用的烷化剂类抗肿瘤药物, 它能引起 DNA 与 DNA、DNA 与蛋白质发生交联, 单链断裂, 这很可能会影响到精子发生过程染色质特有的结构和组织, 从而最终影响胚胎的发育^[3]。在临床和动物实验中都观察到, 孕前男性或雄性动物接受环磷酰胺治疗或处理后, 能引起精子减少, 甚至不育, 其后代胚胎的早期妊娠流产率、畸胎率和后代行为缺陷发生率都明显增高。这种由雄性生殖细胞传递

的发育毒性,其具体作用机制还不是很清楚。已有初步的研究表明^[4],环磷酰胺处理对大鼠精子的染色质结构和蛋白表达、组成都有影响,而且在着床前胚胎中引起了 DNA 损伤和改变 DNA 损伤修复相关基因的表达。Barton 等人^[5]研究发现,雄性大鼠用环磷酰胺处理后,与雌鼠交配受精后得到的受精卵胚胎发育进程加快,原核增大;父母本基因组的表观遗传重编程受到影响,二细胞期的组蛋白 H4K5 乙酰化修饰也出现异常。本研究以小鼠为对象,实验结果表明,环磷酰胺处理雄鼠可以导致部分受精卵和二细胞期胚胎中组蛋白 H3K9 乙酰化修饰水平的显著下降,以及第一次卵裂异常发生率增高。以上研究表明,雄性动物经环磷酰胺处理能够导致受精后的部分早期胚胎表观遗传重编程的异常,其影响的具体情况和机制还有待进一步研究。这些异常很可能是由于环磷酰胺以及类似药物影响了精子发生某个阶段的事件,从而导致部分精子的表观遗传特征发生改变,进而影响到受精后受精卵和早期胚胎的表观遗传特征及其正常发育。在 Barton 等^[5]的研究和本实验研究中环磷酰胺处理组的部分受精卵和二细胞期胚胎呈现异常的组蛋白乙酰化

修饰,很可能会影响到合子基因组的启动和着床前胚胎发育过程中的其他表观遗传重编程过程。

综上所述,环磷酰胺及类似抗肿瘤药物的处理和治疗,对男性或雄性动物生殖系统和精子发生的毒副作用,有一部分可能是通过表观遗传机制产生的,并且会传递到受精卵和卵裂期胚胎中引起某些表观遗传特征的异常,有关这种影响的具体细节需要深入的研究。

参考文献:

- [1] Dohle G R. Male infertility in cancer patients: Review of the literature [J]. *Int J Urol*, 2010, 17 (4): 327-331.
- [2] Santos F, Zakhartchenko V, Stojkovic M, et al. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos [J]. *Curr Biol*, 2003, 13 (13): 1116-1121.
- [3] Colvin O M. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications [J]. *Curr Pharm Des*, 1999, 5 (8): 555-560.
- [4] Hammoud S S, Nix D A, Zhang H, et al. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development [J]. *Nature*, 2009, 460 (7254): 473-478.
- [5] Barton T S, Robaire B, Hales B F. Epigenetic programming in the preimplantation rat embryo is disrupted by chronic paternal cyclophosphamide exposure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (22): 7865-7870.

• 短篇报道 •

急性乙醇中毒致低血糖昏迷15例报告

王群

(沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024)

2003—2009 年, 我院收治急性乙醇中毒致低血糖昏迷患者 15 例, 因及时诊治而康复, 现报告如下。

1 临床资料

一般资料: 15 例患者中男性 13 人、女性 2 人, 年龄 20 ~ 48 岁; 1 例有糖尿病病史; 其中 5 例曾有饮酒昏迷史; 间断饮酒者 9 例, 长期饮酒者 6 人; 主要饮白酒 (42 ~ 56 度), 饮酒量大多数在 500 ~ 750 ml。

临床表现: 15 例患者均有大量饮酒史, 从昏迷到就诊的时间 2 ~ 6 h, 均因家属或陪同人员认为“醉酒”而未及时就诊。就诊时呈浅昏迷至深昏迷, 患者呼气有乙醇气味, 8 例患者有抽搐, 6 例患者有尿、便失禁。体征: 血压增高 8 例, 呼吸急促 5 例, 肺部湿啰音 4 例, 心率增快 10 例, 病理反射阳性 4 例。

辅助检查: 头部 CT 未见异常, 血糖 1.1 ~ 2.3 mol/L。

治疗及预后: 检测血糖后立即给予静脉注射 50% GS 50 ~ 150 ml, 纳络酮 0.4 ~ 1.6 mg 肌肉注射或加入静脉滴注, 其中 13 例维持静脉滴注 10% GS 2 ~ 12 h; 同时予补钾、护肝、保护胃黏膜等治疗; 15 例患者均康复出院。

2 讨论

本组病例大多数为年轻男性, 既往身体健康, 经常饮酒, 饮酒后曾多次出现昏睡不醒, 考虑可能出现低血糖。但由于病情

轻, 未出现昏迷, 第 2 天自行苏醒, 未引起重视。当患者出现意识不清, 呼之不应, 家人误认为熟睡, 对低血糖引起的心悸、多汗、饥饿、面色苍白、眼睑震颤等交感神经兴奋症状未察觉, 从而延误了就诊。本组中 2 例认为是脑卒中复发, 经头 CT 检查后除外脑血管疾病。乙醇中毒性低血糖昏迷是急诊室经常遇到的内科危重症, 主要表现有多汗、低体温、脉快有力、意识不清、嗜睡、昏迷、木僵、牙关紧闭或四肢痉挛、双眼同侧偏斜、呼气有乙醇气味等, 昏迷时易诊断为脑血管病。本组急性乙醇中毒病例通过详细查体和及时测定血糖, 经头 CT 检查除外脑血管疾病后, 即做出了低血糖昏迷的正确诊断。一经确诊, 立即静脉注射高渗葡萄糖, 在较短时间内患者意识转清, 大多数立即清醒, 未恢复者可反复注射直至清醒。意识恢复后注意继续观察, 因其降糖作用仍在继续, 患者再度昏迷的可能性较大, 宜继续静脉滴注 5% ~ 10% 的 GS, 并根据病情需要观察数小时至数天, 直至病情完全稳定为止。

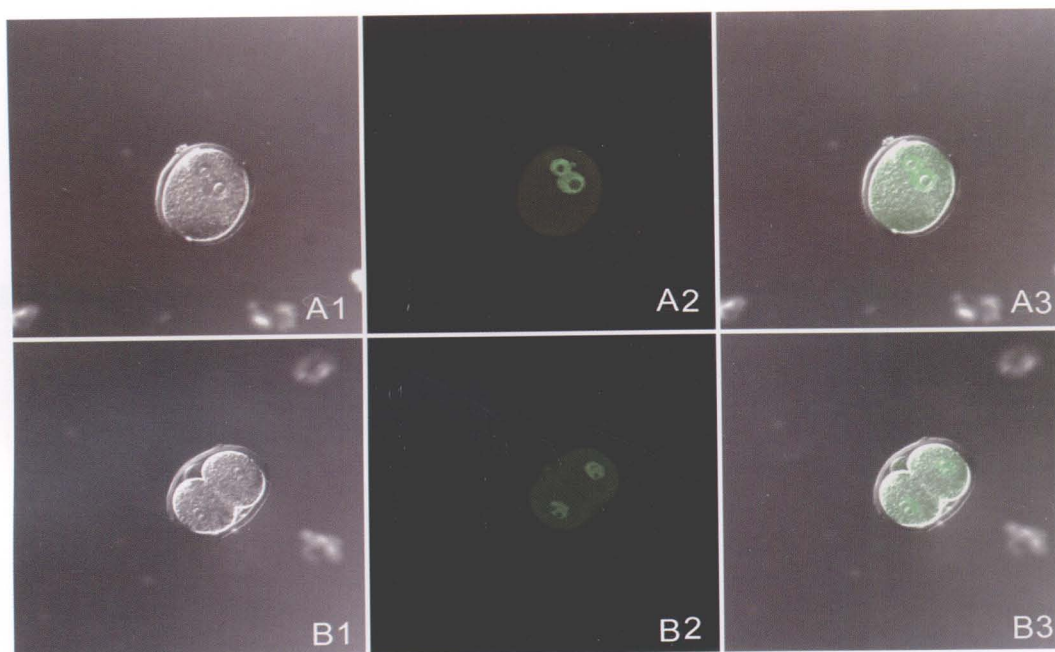
由乙醇中毒引起的低血糖症有两种情况, 一种为餐后乙醇性低血糖症, 发生于饮酒后 3 ~ 4 h, 由于乙醇刺激胰岛素分泌增多, 过多的胰岛素造成血糖下降; 另一种为空腹大量饮酒, 发生在饮酒后 8 ~ 16 h, 主要为乙醇阻碍能量代谢, 抑制肝脏糖原异生, 导致血糖降低^[1]。长时间低血糖可导致脑水肿、中枢神经系统点状缺血及脱髓鞘改变, 遗留不同程度的神经功能损害, 严重者甚至可引起死亡。此类患者容易被单纯乙醇中毒所致的昏迷所掩盖, 忽略低血糖的问题, 若延误治疗可引起不可逆性脑损害, 故针对昏迷的患者应详细全面检查, 并强调病史的重要性, 把血糖列为昏迷者常规检查项目, 避免误诊误治, 造成不可挽救的损害。

参考文献:

- [1] 武天明, 李镭, 王兰香, 等. 酒精中毒性低血糖昏迷 26 例临床分析 [J]. *内科急危重症杂志*, 2005, 11 (1): 40.

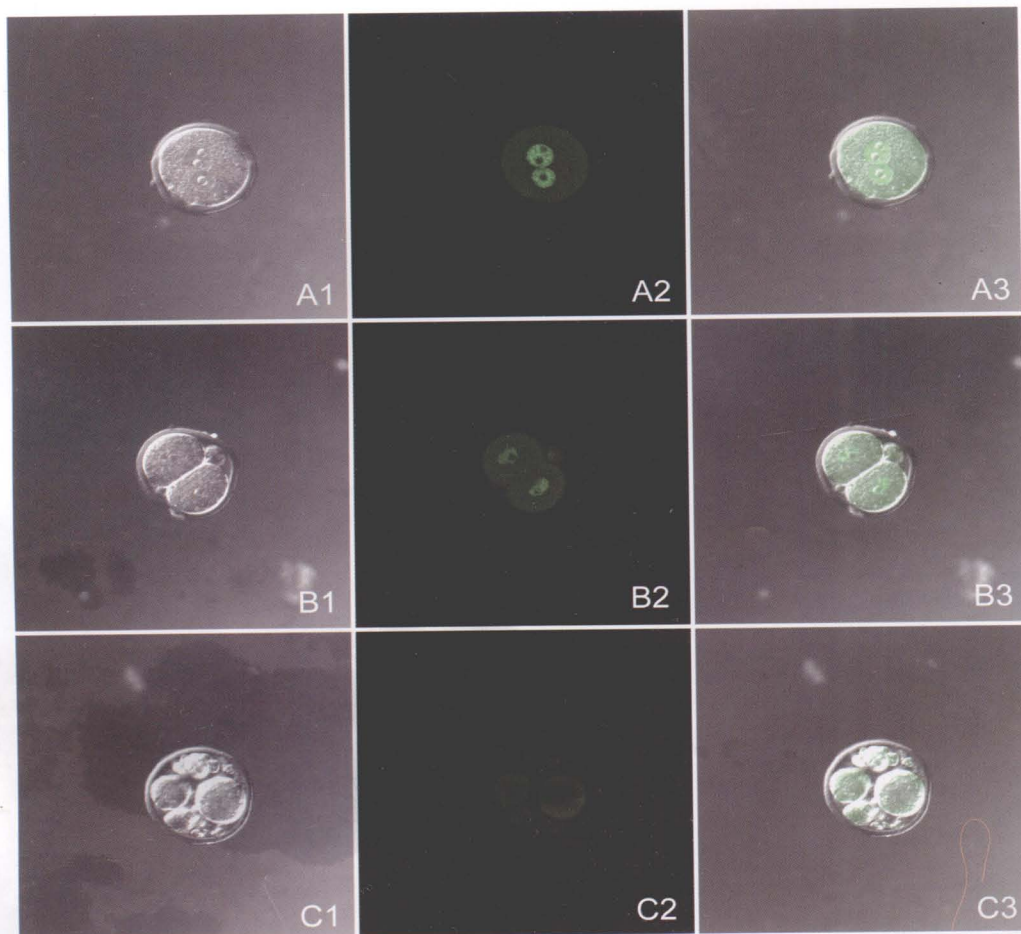
收稿日期: 2009-08-15

环磷酰胺处理对小鼠受精卵和二细胞期胚胎组蛋白 H3K9 乙酰化修饰的影响 (正文见 330~332)



A1-A3: 原核期受精卵胚胎, B1-B3: 二细胞期胚胎

图1 组蛋白 H3K9 乙酰化修饰 (绿) 在小鼠原核期受精卵和二细胞期胚胎中的分布 ($\times 200$)



A1-A3: 原核期受精卵, B1-B3: 二细胞期胚胎, C1-C3: 碎化的二细胞期胚胎

图2 环磷酰胺处理组中组蛋白 H3K9 乙酰化在小鼠原核期和二细胞期胚胎中的分布 ($\times 200$)