

BPA 不影响卵母细胞减数分裂相关基因 *Dazl* 的甲基化

章寒琼¹, 张西锋², 潘博¹, 沈伟¹, 李兰¹

(1. 青岛农业大学 生殖细胞生物学实验室, 山东 青岛 266109; 2. 武汉工业学院基础生物与制药工程学院)

摘要: 为了探讨环境雌激素 BPA 对小鼠卵母细胞减数分裂相关基因 *Dazl* 甲基化的影响, 本研究通过给孕鼠饮用含有 BPA 的水方式使胎鼠在发育过程中接触 BPA, 利用重亚硫酸盐测序法, 分析了胎鼠生殖细胞不同发育时期 *Dazl* 甲基化水平的变化。结果显示: *Dazl* 在减数分裂期间处于低甲基化水平, 无论对照组或处理组均低于 10%, 说明 *Dazl* 的低甲基化对维持减数分裂的正常进行有重要作用; 对照组与处理组的甲基化水平相当, 差异不显著, 说明本研究的 BPA 浓度不影响卵母细胞 *Dazl* 的甲基化水平。

关键词: 小鼠; 卵母细胞; BPA; *Dazl*; DNA 甲基化

中图分类号: Q344+.14

文献标识码: A

DOI: 10.3969/J. ISSN. 1674-148X. 2011. 02. 001

No Effecting of BPA on DNA Methylation of *Dazl* Gene in Oocyte Meiosis

ZHANG Hanqiong¹, ZHANG Xifeng², PAN Bo¹, SHEN Wei¹, LI Lan¹

(1. Laboratory of Germ Cell Biology, QAU, Qingdao 266109, China; 2. College of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University)

Abstract: To investigate the effect of BPA (BisphenolA) on methylation states of meiosis-specific gene *Dazl* (Deleted in AZoospermia-Like gene) during gametogenesis, maternal mouse were treated by adding different concentration of BPA in their water respectively. Then different developmental stages of fetal mouse oocytes were studied using bisulfite sequencing method to examine the methylation states of *Dazl*. Our results implicated the rate of methylation of *Dazl* kept a low level in both control and treated groups (< 10%), suggested hypomethylation of *Dazl* acts an important role of in maintainance of normal meiotic process. There was no significant difference between control and treated group, indicated a negative effect of BPA on the DNA methylation of *Dazl*.

Key word: mouse; oocyte; BPA; *Dazl*; DNA methylation

BisphenolA 简称 BPA, C₁₅H₁₆O₂, 分子量 288.29, 室温下为白色固体, 难溶于水, 水中最高溶解度为 300mg/ml^[1], 是聚碳酸酯塑料和环氧树脂的组成成分。经过光照、加热(温度越高释放量越高)、接触酸性物质或洗涤剂成分、或放置时间过长, BPA 都会从聚碳酸酯塑料制品中释放到周围环境中, 以各种途径被人体吸收, 其中, 99% 的 BPA 是通过饮食摄入的^[2]。实验动物已经证明, BPA 是一种内分泌干扰剂, 可以导致细胞增殖与分化、流产、乳腺癌及其他癌症、影响未成熟动物雌性和雄性生殖系统发生发育、影响成年动物雌性和雄性生殖道变化、性别分化和神经行为的改变^[3] 等等有害作用, 而焦点集中在未成熟动物雌性生殖系统发生发育等方面。

Dazl (Deleted in AZoospermia-Like gene), 是 DAZ 基因超家族成员之一, 只在生殖细胞中表达, 体细胞中由于 *Dazl* 中心启动子 T-DMR 区的胞嘧啶甲基化抑制了 *Dazl* 的转录。*Dazl* 编码高度保守性的 RNA 结合蛋白, 保证生物体配子发生的正常进行。在小鼠中, *Dazl* 基因敲除小鼠在胚胎期能观察到生殖细胞的严重缺失, 配子发生异常减数分裂异常等等^[4]。

表观遗传学是指 DNA 序列不发生变化但基因表达却发生了可遗传的改变, 它是研究基因表达调控的新领域^[5], 主要有 DNA 甲基化、组蛋白修饰、非编码 RNA 调节和染色体结构特化^[6-8]。其中 DNA 是甲基化哺乳动物基因表达调控的主要表观遗传学

收稿日期: 2010-12-28

基金项目: 国家自然科学基金(31001010); 山东省中青年科学家奖励基金(BS2010NY010) 和山东省泰山学者建设工程专项经费资助

作者简介: 章寒琼(1986-) 女, 浙江新昌人, 在读硕士, 研究方向: 生殖细胞生物学。

通讯作者: 李兰, E-mail: lilan9600@126.com

修饰形式。DNA 甲基化主要发生在 CpG 二核苷酸的胞嘧啶上,由 DNA 甲基化转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)催化 S-腺苷甲硫氨酸作为甲基供体,将胞嘧啶(C)转变为 5-甲基胞嘧啶(5mC)的一种反应。成簇的 CpG 二核苷酸称为“CpG 岛”,常见于基因的 5'端(启动子,非翻译区以及第一外显子),当其发生甲基化时,会影响基因的转录调控,使基因表达减少或沉默;反之则基因正常表达。

目前,BPA 的安全问题受到了社会各方面尤其是科学工作者的关注。关于 BPA 对人类生殖健康危害的研究主要集中在生殖系统的发育、卵母细胞减数分裂的恢复、性分化等方面,对早期卵子发生、减数分裂启动等方面研究甚少。为此,本文通过对胎鼠卵母细胞减数分裂相关基因 *Dazl* 的甲基化状态进行探讨,希望为进一步研究人类生殖健康方面提供一个理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验中使用的所有小鼠均为 CD1 品系,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,按照实验鼠饲养标准饲养在本实验室的实验动物房内。每天光照 12h,黑暗 12h 交替,温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$,湿度 $35 \pm 4\%$ 。

表 2 孕鼠喂药量

组别	12.5 dpc		13.5 dpc		14.5 dpc		15.5 dpc		16.5 dpc		17.5 dpc	
	体重(g)	喂药量(μl)										
对照组	48.6	33	52.1	35	53.9	36	57.2	38	63.1	42	65.9	44
低浓度组	48.6	33	52.1	35	53.9	36	57.2	38	63.1	42	65.9	44
中浓度组	48.6	33	52.1	35	53.9	36	57.2	38	63.1	42	65.9	44
高浓度组	48.6	33	52.1	35	53.9	36	57.2	38	63.1	42	65.9	44

1.2.3 卵母细胞的收集

在 13.5dpc、15.5dpc、17.5dpc 3 个时间点处死孕鼠取出胎鼠,分离胎鼠卵巢。得到的卵巢用胰蛋白酶和胶原蛋白酶按 20:1,在 37°C 二氧化碳培养箱消化 10min,取出用移液器轻轻吹打至显微镜下能看见单个卵母细胞。按 1.5~2 个卵巢 1ml 的量加入颗粒细胞培养液在 37°C 二氧化碳培养箱中培养 4~6h 使颗粒细胞贴壁。培养完吸取上清离心得到卵母细胞。颗粒细胞培养液配方如下:DMEM 1% 双抗,1% 丙酮酸钠,10% 胎牛血清。

1.2.4 卵母细胞 DNA 的提取

上述卵母细胞基因组 DNA 采用微量样品基因组 DNA 提取试剂盒进行提取,具体操作步骤见试剂盒说明书。最后一步操作时,向吸附膜中间位置悬

主要试剂: BPA 购自上海科丰化学试剂有限公司;微量样品基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIAN-GEN 公司; MethylampTM DNA Modification 试剂盒购自 Epigentek 公司; TaKaRa TaqTM Hot Start Version 和 TaKaRa pDM18-T Vector 试剂盒购自 TaKaRa 公司; Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒购自 Promega 公司; PCR 引物由上海生工合成;细胞培养试剂全部购自 Hyclone 公司。

1.2 方法

1.2.1 BPA 溶液的配制

BPA 溶液的配制详见表 1。

表 1 BPA 溶液配制

组别	剂量 (mg/kg)	BPA 母液		BPA 工作液	
		BPA (g)	DMSO (ml)	BPA 母液 (μl)	生理盐水 (ml)
对照组	0	0	0.0015	1.5	15
低浓度组	0.02	0.3	1.5	1.5	15
中浓度组	0.04	0.6	1.5	1.5	15
高浓度组	0.08	1.2	1.5	1.5	15

注: DMSO 浓度为 0.015%。

1.2.2 孕鼠的处理

本试验按照孕鼠体重给予不同剂量的 BPA,不同组别所用剂量见表 1。孕鼠从 12.5 dpc 开始,采用口服给药方式连续喂药,喂药量见表 2。

空滴加 $26\mu\text{l}$ 洗脱缓冲液 TB,室温放置 2~5 min,12000rpm($\sim 13400 \times g$)离心 2min,将溶液收集到离心管中。

1.2.5 亚硫酸盐序列测定

取上述卵母细胞基因组 DNA 样品 $24\mu\text{l}$,按修饰试剂盒 MethylampTM DNA Modification Kit 说明书进行重亚硫酸盐处理,具体操作步骤见试剂盒说明书。最后一步操作时,垂直加入 $12\mu\text{l}$ R6 溶液,12000rpm($\sim 13400 \times g$)离心 1min,将溶液收集到离心管中。试验中 *Dazl* 基因 PCR 扩增均采用半巢式 PCR,引物均用于经亚硫酸盐修饰处理后的 DNA 模板扩增,其 PCR 引物序列见表 3。

PCR 体系及反应条件如下:第一轮扩增的体积为 $25\mu\text{l}$,内含 $0.125\mu\text{l}$ TaKaRa Taq HS($5\text{U}/\mu\text{l}$);

表 3 *Dazl* 基因 PCR 扩增引物序列

基因	引物序列	产物大小
<i>Dazl</i>	F: 5' - GGTTTATATTAGT GAGGGTTG - 3'	442bp
	R: 5' - ACTCAAACCTCTAACTCCTCCCC - 3'	

注: F. 正向引物; R. 反向引物。

2. 5μl 10 × PCR Buffer(Mg²⁺ Plus); 2μl dNTP Mix-ture(各 2.5mM); 1μl Forward Primer (20μM); 1μl Reverse Primer(20μM) 16. 5μl dH₂O; 2μl 模板。第二轮扩增体积为 50μl ,体系同上。反应条件: 95℃ 2min; 95℃ 30s; 60℃ 30s; 72℃ 30s; 72℃ 7min; 35 个循环。

扩增的 DNA 片段利用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳分离, 并利用 Wizard SV Gel and PCR Clean - Up System 试剂盒进行纯化回收, 其操作步骤见试剂

盒说明书。得到的 DNA 溶液, 按照 TaKaRa pMD18 - T Vctor 试剂盒操作说明将纯化的目的 DNA 片段克隆到 pMD18 - T 载体上, 并转化到大肠杆菌 (DH5α) 中。挑取转化后的阳性克隆(白色菌落) 于 600ml 含有 LB 液体培养基中, 放于摇床中, 200rpm, 37℃ 培养过夜。菌液检测后送到测序公司测序。

1. 2. 6 试验数据处理

试验所得数据采用 BioEdit 软件和 Microsoft Of-fice 2003 分析处理、作图。

2 结果与分析

2. 1 *Dazl* 基因序列 CpG 位点的分析

Dazl 基因序列 CpG 位点分析见图 1。

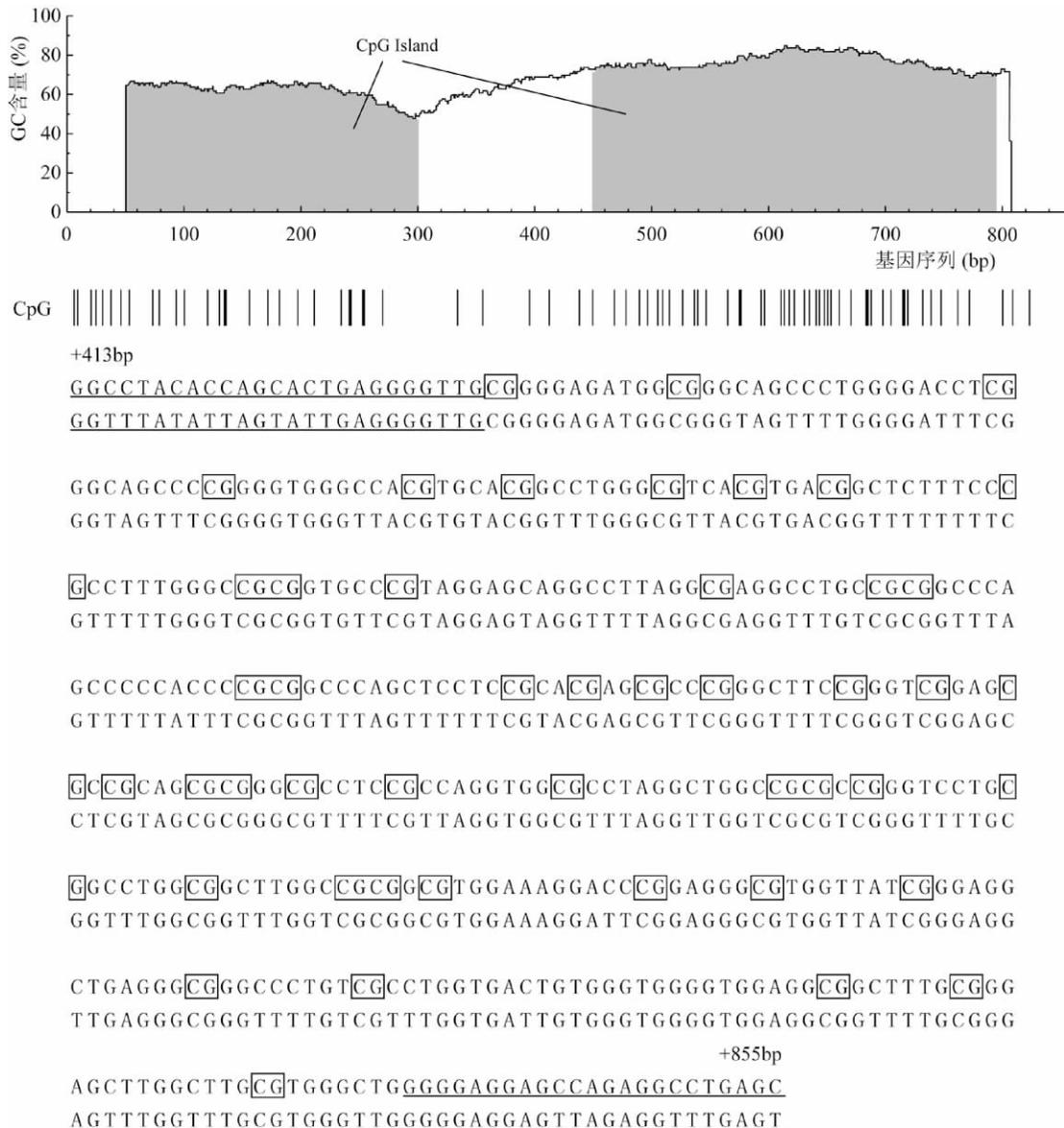


图 1 *Dazl* 基因序列 CpG 位点的分析

2.2 13.5dpc 卵母细胞 *Dazl* 基因甲基化状况

从图2可以看出,13.5dpc的卵母细胞 *Dazl* 基因处于低甲基化水平。各组甲基化均低于10%,其中对照组的甲基化水平最高为5.2%,各组间差异不显著,说明BPA对此时期的卵母细胞 *Dazl* 基因甲基化水平没有影响。

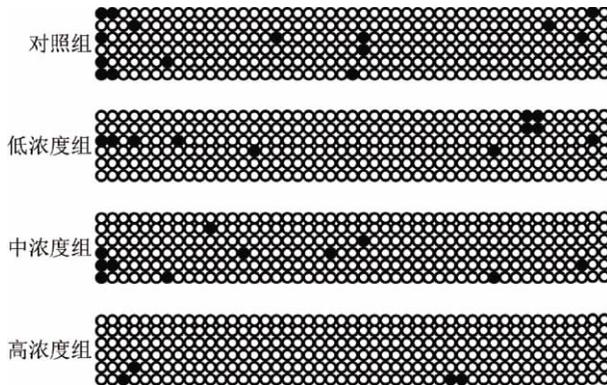


图2 13.5dpc 卵母细胞 *Dazl* 基因的甲基化

单链,一个克隆序列;圆圈,DMR内的CpG位点;实心圈,甲基化的CpG位点;空圆圈,未甲基化的CpG位点。下同。

2.3 15.5dpc 卵母细胞 *Dazl* 基因甲基化状况

从图3可以看出15.5dpc的卵母细胞 *Dazl* 基因处于低甲基化水平,与13.5dpc相同。各组甲基化均低于10%,其中0.08组的甲基化水平最高为8%,各组间差异仍然不显著,说明BPA对此时期的卵母细胞 *Dazl* 基因甲基化水平没有影响,与13.5dpc结果一致。

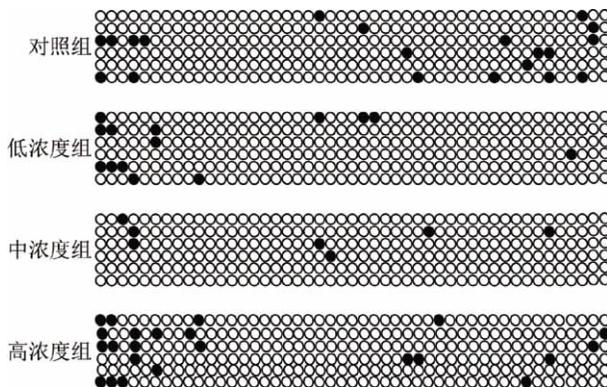


图3 15.5dpc 卵母细胞 *Dazl* 基因的甲基化

2.4 17.5dpc 卵母细胞 *Dazl* 基因甲基化状况

从图4可以看出17.5dpc的卵母细胞 *Dazl* 基因仍然处于低甲基化水平,与13.5dpc、15.5dpc相同。各组甲基化均低于10%,其中0.08组的甲基化水平最高为5.2%,各组间差异不显著,说明BPA对此时期的卵母细胞 *Dazl* 基因甲基化水平没有影响,与13.5dpc、15.5dpc结果一致。

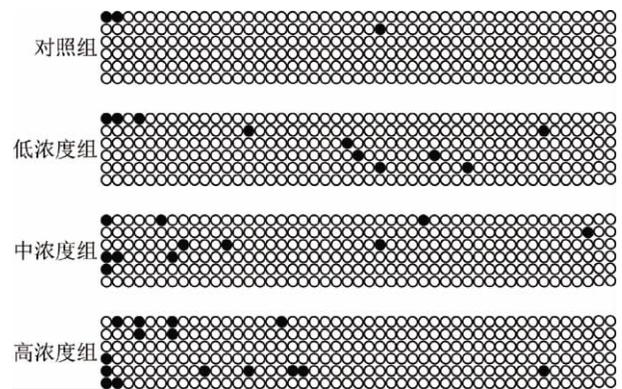


图4 17.5dpc 卵母细胞 *Dazl* 基因的甲基化

3 讨 论

在小鼠中,原始生殖细胞在10.5dpc迁移到生殖嵴,并且开始进入有丝分裂大量增殖,增殖后的卵母细胞因胞质分裂不完全仍然连在一起,形成“cyst”。而从13.5dpc开始,卵母细胞就陆续进入减数分裂,一直到出生前到达并停滞在双线期。此时的卵母细胞仍然以“cyst”的形式存在。出生2~3d后“cyst”开始大规模地解体,同时原始卵泡开始大量形成,并建立原始卵泡库。原始卵泡库一旦建立,就是该雌性生物体生殖周期过程中所有可以利用的生殖细胞。卵母细胞减数分裂异常必然会导致原始卵泡库的建立的异常,影响后续的卵母细胞发育,可能会引起一系列生殖健康问题。

Dazl 定位于脊椎动物的常染色体,其蛋白通过RNA识别基序(RRM)与mRNA结合,并以多聚体的方式参与mRNA的翻译起始,是人类生殖细胞形成所必须的调控因子^[9]。*Dazl* 在生殖细胞发育早期即开始表达,在配子生成和减数分裂过程中持续存在并发挥重要作用。Ruggiu等^[10]证实了*Dazl* 基因剔除的母鼠不具有生育能力,其生殖细胞的发育也受到严重的阻碍,减数分裂异常。Nishi等^[11]证明DAZL与女性卵泡发育相关,并且发现DAZL在成熟卵泡中表达。在本试验中,我们发现对照组的13.5dpc、15.5dpc、17.5dpc的卵母细胞中*Dazl* 均处于低甲基化水平,即在减数分裂中该基因高表达,说明*Dazl* 对维持减数分裂的正常进行有重要作用。而在处理组中,我们发现*Dazl* 的甲基化水平与对照组基本一致,差异不显著,说明本试验中BPA的浓度对该基因的甲基化没有显著影响,不会影响卵母细胞减数分裂的进行。本试验采用的移液器口服给药的方式。如果采用其他给药方式,例如饲料及饮

水添加、孕鼠皮下注射、腹腔注射、静脉注射、甚至体外培养添加等等, BPA 的吸收、代谢、作用浓度等可能会发生某些细微的变化, 进而影响 *Dazl* 的甲基化水平, 因为 BPA 的药品动力学、具体的分子作用机制和作用时间尚不清楚; 其次, BPA 是一种内分泌干扰剂, 它可以与雌激素受体、雄激素受体、甲状腺受体结合^[12], 干扰内分泌系统, 影响卵母细胞发育的微环境。近年来有些学者提出环境中可能存在某些未知的化学物质, 可以促进 BPA 的毒理学效应, 也可能影响 *Dazl* 的甲基化水平。

参考文献:

- [1] Pacchierotti F, Ranaldi R, Eichenlaub-Ritter U et al. Evaluation of aneuploid effects of bisphenol A in somatic and germ cells of the mouse[J]. Mutation Research, 2008, 651: 64-70.
- [2] National Toxicology Program. Draft NTP brief on bisphenol A[M]. U. S. Department of Health and Human Services 2008.
- [3] Laura Gioiosa, Elena Fissore, Giorgia Ghirardelli, et al. Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice[J]. Hormones and Behavior, 2007, 52: 307-316.
- [4] Kelly M Haston, Joyce Y Tung, Renee A Reijo Pera. *Dazl* Functions in Maintenance of Pluripotency and Genetic and Epigenetic Programs of Differentiation in Mouse Primordial Germ Cells In Vivo and In Vitro[J]. PLoS ONE, 2009, 4(5): 5654.
- [5] Wolffe A P, Matzke M A. Epigenetics: regulation through repression[J]. Science, 1999, 286(5439): 481-486.
- [6] Lucifero D, et al. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells[J]. Genomics, 2002, 79(4): 530-538.
- [7] Lucifero D, Chaillet JR, Trasler JM. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology[J]. Hum Reprod Update, 2004, 10(1): 3-18.
- [8] Hiura H, et al. Oocyte growth-dependent progression of maternal imprinting in mice[J]. Genes. Cells, 2006, 11(4): 353-361.
- [9] Ruggiu M, Cooke HJ. In vivo and in vitro analysis of homodimerization activity of the mouse *Dazl* protein[J]. Gene, 2000, 252(1-2): 119-126.
- [10] Ruggiu M, Speed R, Taggart M, et al. The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis[J]. Nature, 1997, 389(6646): 73-77.
- [11] Nishi S, Hoshi N, Kasahara M, et al. Existence of human *DAZL* protein in the cytoplasm of human oocytes[J]. Mol Hum Reprod, 1999, 5(6): 495-491.
- [12] Sandy Lenie, Rita Cortvrindt, Ursula Eichenlaub-Ritter, et al. Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities[J]. Mutation Research, 2008, 651: 71-81.

山东登海种业股份有限公司 在青岛农业大学设“登海种业奖学金”

由青岛农业大学农学专业 74 届校友、我国著名玉米遗传育种和栽培专家李登海创办的山东登海种业股份有限公司, 向母校捐赠 100 万元, 在农学与植物保护学院设立“登海种业奖学金”, 鼓励农学专业同学勤奋学习、锐意进取, 为国家农业科技发展做贡献。

李登海校友长期致力于玉米育种和高产栽培研究, 开创了我国紧凑型玉米育种先河, 被誉为“中国紧凑型杂交玉米之父”。他从 1973 年开始从事玉米新品种选育工作, 曾先后 7 次刷新我国夏玉米高产纪录, 2 次刷新世界夏玉米高产纪录, 是我国拥有审定品种和植物新品种权最多的农业育种家, 他选育出的紧凑型玉米杂交种在全国累计推广达 12

亿亩, 增产 1000 多亿公斤, 为国家增加社会经济效益 1000 多亿元。2009 年他被评为“百位新中国成立以来感动中国人物”和“第二届全国道德模范”, 参加了国庆观礼活动, 受到党和国家领导人的亲切接见。

为探索玉米种业出路, 他自主创新实行产业化, 自筹资金率先在我国成立了第一个民营玉米产业化的种子企业, 最终发展成为如今的农业高科技上市企业——山东登海种业股份有限公司, 位居中国种业五十强第三位, 是“国家认定企业技术中心”、“国家玉米工程技术研究中心(山东)”、“国家玉米新品种技术研究推广中心”和“国家首批创新型试点企业”。