

综 述

哺乳动物卵泡发育过程中组蛋白甲基化修饰的研究进展

张春娇, 王超*

中国农业大学生物学院农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094

摘要: 卵泡的正常发育涉及有序的基因转录激活和抑制等一系列复杂的生命过程, 对雌性获得生殖能力至关重要。组蛋白甲基化修饰可以改变细胞内染色质的状态, 影响基因的转录活性。现阶段的研究表明, 组蛋白甲基化等表观遗传学修饰在雌性哺乳动物卵泡发育的过程中发挥了重要的调控作用。本文总结了组蛋白赖氨酸甲基化(H3K4及H3K9)等甲基化修饰与生殖细胞发育的关系及作用机制, 包括其在卵泡发育过程中的有序动态变化规律, 以及H3K4me3等通过结合在不同基因启动子区来调控其表达, 进而影响生殖细胞表观遗传学重编程、卵母细胞转录和减数分裂等过程的进展。本综述将为开展与组蛋白甲基化修饰与性腺中实质细胞发育和成熟相关机制研究提供参考。

关键词: 表观遗传学; 组蛋白甲基化; 卵泡发育**中图分类号:** R321.1; Q492.5

Histone methylation in mammalian follicular development

ZHANG Chun-Jiao, WANG Chao*

State Key Laboratory for Agrobiotechnology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract: The normal development of follicles involves a series of complex life processes such as ordered transcriptional activation and inhibition, which is crucial for female reproductive ability. Histone methylation can change the chromatin state in cells and affect the transcription activity of genes. Current studies indicate that epigenetic modifications such as histone methylation play an important regulatory role in follicular development in female mammals. This paper summarized the relationship between H3K4, H3K9 methylation and germ cell development, their regulatory effects, including their dynamical changes during follicular development, and the progress of H3K4me3 and other histone methylation binding to promoter regions of different genes to regulate gene expression and thus affect germ cell epigenetic reprogramming, oocyte transcription, meiosis and other processes. This review will provide a reference for the study of mechanisms related to histone methylation modification and the development and maturation of gonadal parenchymal cells.

Key words: epigenetics; histone methylation; follicular development

卵泡发育是指雌性生殖细胞与卵巢体细胞共同构成功能复合体卵泡结构, 并以卵泡形式完成后期发育直至排卵的过程^[1]。该过程可分为三个阶段, 即原始卵泡形成、卵泡生长和卵泡成熟。在原始卵泡形成阶段, 原始生殖细胞 (primordial germ cells,

PGCs) 首先从卵黄囊迁移至生殖嵴, 并进行快速有丝分裂形成卵原细胞。卵原细胞因胞质不完全分裂而形成合胞体结构。随后, 启动并阻滞于第一次减数分裂双线期的单个卵母细胞被前体颗粒细胞包裹后形成原始卵泡^[2]。原始卵泡形成时处于休眠状态。

Received 2020-12-30 Accepted 2021-05-13

Research from the corresponding author's laboratory was supported by grants from the National Key Research and Developmental Program of China (No. 2018YFC1003700, 2018YFC1003801), the National Natural Science Foundation of China (No. 31872792, 32071132, 32070839) and the Institution of Higher Education Projects of Building First-class Discipline Construction in Ningxia Region (Biology) (No. NXYLXK2017B05).

*Corresponding author. Tel: +86-10-62733435; E-mail: wangcam@126.com

一旦原始卵泡被激活，便会启动生长并逐步经历初级卵泡、次级卵泡和有腔卵泡阶段。期间，卵母细胞维持减数分裂阻滞状态，但因缓慢而持续的物质储备而使得体积变大，同时颗粒细胞增殖至多层，卵泡内出现卵丘包裹卵母细胞的结构。卵泡成熟是指从有腔卵泡受到促性腺激素的作用成熟并排卵的过程。从小鼠出生开始到出生后 25 天进入初情期这段时间内，会有部分原始卵泡被激活并逐步发育为各级生长卵泡。在卵泡生长阶段，颗粒细胞增殖分化导致细胞形态和数量发生改变^[1]。当部分卵泡发育至最大时，受促性腺激素的诱导，其卵泡壁变薄，卵泡腔内卵泡液增加到最多，此时的卵泡被称为排卵前卵泡^[1]。此时，卵母细胞生发泡 (germinal vesicle, GV) 内的染色体由核仁非环绕状态 (non-surrounded nucleolus, NSN) 转变为核仁环绕状态 (surrounded nucleolus, SN)，为细胞恢复减数分裂做好了准备。随后，在促性腺激素的诱导作用下卵母细胞恢复减数分裂，生发泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD)，细胞进入并阻滞在减数第二次分裂中期继而排卵。未能顺利发育的卵泡则会闭锁^[1,3]。

近年研究发现，卵泡的发育过程除了受到经典的神经内分泌调控外 (本文不做赘述)，组蛋白乙酰化 / 去乙酰化和组蛋白甲基化 / 去甲基化等表观遗传学修饰对卵泡发育中多种基因的激活与抑制产生了重要影响^[1]。本综述旨在通过总结组蛋白甲基化对卵泡发育的影响，尤其是组蛋白赖氨酸甲基化 (H3K4 及 H3K9) 在 PGCs 发育和卵泡发育过程中的动态变化和功能来梳理相关进展，并为后续开展相

关研究提供借鉴。

1 卵泡发育过程中组蛋白甲基化的动态变化

1.1 组蛋白的主要甲基化修饰

组蛋白甲基化是细胞内常见的共价修饰，在组蛋白 H3 和 H4 的赖氨酸 (K) 侧链上可以发生单、双或者三甲基化，而在其精氨酸 (R) 侧链只能发生单甲基化和双甲基化^[4]。不同的组蛋白甲基转移酶和组蛋白去甲基化酶可以调节组蛋白甲基化的动态变化。通常，组蛋白甲基化修饰能够调节基因的转录活性，与转录激活相关的甲基化修饰主要发生在组蛋白 H3 第 4、36 和 79 位赖氨酸残基，而与转录抑制相关的甲基化修饰则通常存在于组蛋白 H3 第 9 和 27 位以及组蛋白 H4 第 20 位赖氨酸残基^[5] (图 1)。

组蛋白甲基化修饰受到多种因素的影响。首先，DNA 甲基化和 CpG 岛未甲基化区域通常与特定的组蛋白甲基化特征相关，且也会影响组蛋白甲基化的位置及对甲基转移酶的招募^[6]。其次，对蛋白的泛素化等翻译后修饰可介导多种组蛋白甲基转移酶的降解^[7,8]及磷酸化^[9,10]等过程，进而控制胞内组蛋白甲基化水平。此外，饮食、营养和代谢也会影响哺乳动物的组蛋白甲基化^[11]。

在细胞中，H3K4 甲基化修饰 (H3K4me1/2/3) 主要与基因的转录激活相关。目前发现有 6 种主要的组蛋白甲基转移酶可催化 H3K4 甲基化，即 SETD1A/B、KMT2A/B 及 KMT3/4^[12-14]。在大多数细胞类型中，SETD1A/B 复合物是主要的 H3K4 甲基转移酶^[15,16]。H3K4 甲基化参与了卵泡发育的全过程，调控原始卵泡形成、卵泡闭锁和 GVBD 等多

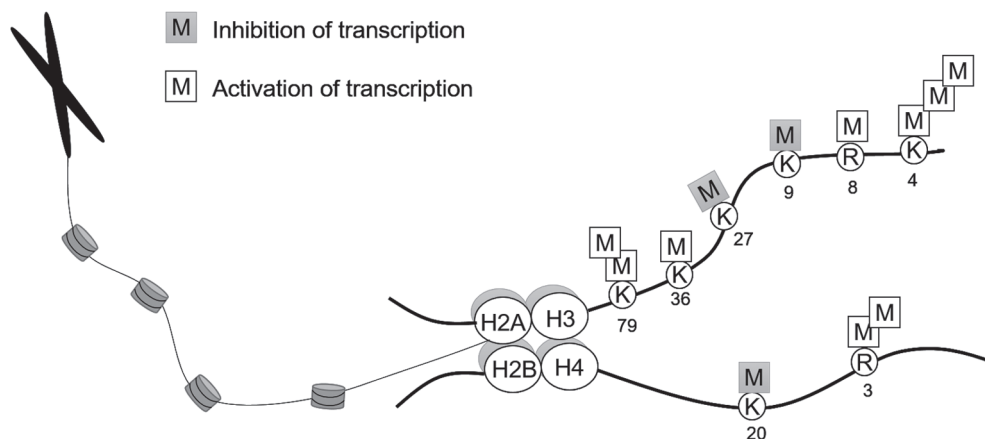


图 1. 组蛋白主要的甲基化修饰

Fig. 1. Major histone methylation modifications.

个生理过程^[17–20]。

H3K9 甲基化修饰 (H3K9me1/2/3) 对染色质形态的鉴别和改变有重要作用, 在基因转录过程中主要起抑制转录的作用^[21]。其中, H3K9me1 和 H3K9me2 存在于常染色质区, 而 H3K9me3 则主要存在于异染色质。目前认为, G9、SUV39H1、SUV39H2 和 SETDB1 是 H3K9 的主要甲基转移酶, 能够分别催化常染色质和异染色质上的 H3K9 甲基化^[22–24]。JHDM2、JHDM3A 和 LSD1 能够催化 H3K9 的去甲基化, 是 H3K9me 主要的赖氨酸去甲基化酶^[24]。H3K9 甲基化在 PGCs 的表观遗传学重编程过程和卵母细胞减数分裂成熟过程中均发挥重要作用^[25–27]。

1.2 组蛋白甲基化在原始卵泡形成阶段的动态变化

雌性哺乳动物卵泡发育具有鲜明的时空特性, 以小鼠为例, 其原始卵泡形成于出生前, 而卵泡的生长和成熟则在性成熟后周期性地。在胚胎第 6.5 天 (embryonic day 6.5, E6.5) 时, PGCs 就出现在上胚层细胞群中, 随后在 E10.5~12.5 阶段向生殖嵴迁移途中发生了表观遗传学重编程^[1, 28, 29]。PGCs 细胞内组蛋白甲基化的有序动态变化如图 2 所示。其

中, 在 E7.5~E10.5 期间, 细胞清除了组蛋白 H3K9me2 并上调了组蛋白 H3K27me3^[30]。组蛋白 H3 赖氨酸 4 甲基化 (H3K4me2, H3K4me3) 则在进入生殖嵴时 (E10.5) 短暂上调^[25, 30]。E11.5 时原本保持较高水平的 H3K9me3 和 H3K27me3 暂时性减少, 在 E12.5 又恢复到与 E10.5 的组蛋白甲基化修饰一致的水平^[31]。不过, 组蛋白 H4 和 H2A 上精氨酸 3 的对称甲基化 (H4/H2AR3me2s) 也在 E11.5 消失, 但在 E12.5 时没有恢复^[31]。可见, 在胚胎发育特定时间段不同的组蛋白甲基化波动, 提示其对 PGCs 发育的调节作用存在差异和变化。尽管现阶段无法阐明 PGCs 中组蛋白甲基化修饰动态变化的具体生理意义, 但不可否认的是, PGCs 的甲基化修饰对其增殖和迁移具有重要影响。

1.3 组蛋白甲基化在卵泡生长和成熟阶段的动态变化

在卵泡生长阶段, 卵母细胞中 H3K4/9 甲基化的变化趋势一致, 即在原始卵泡发育至次级卵泡阶段都保持较低水平。随后, 在次级向有腔卵泡转变时, H3K4/9 甲基化都出现不同程度的上调 (图 3)。虽然卵母细胞和颗粒细胞内 H3K4me3 的水平在小

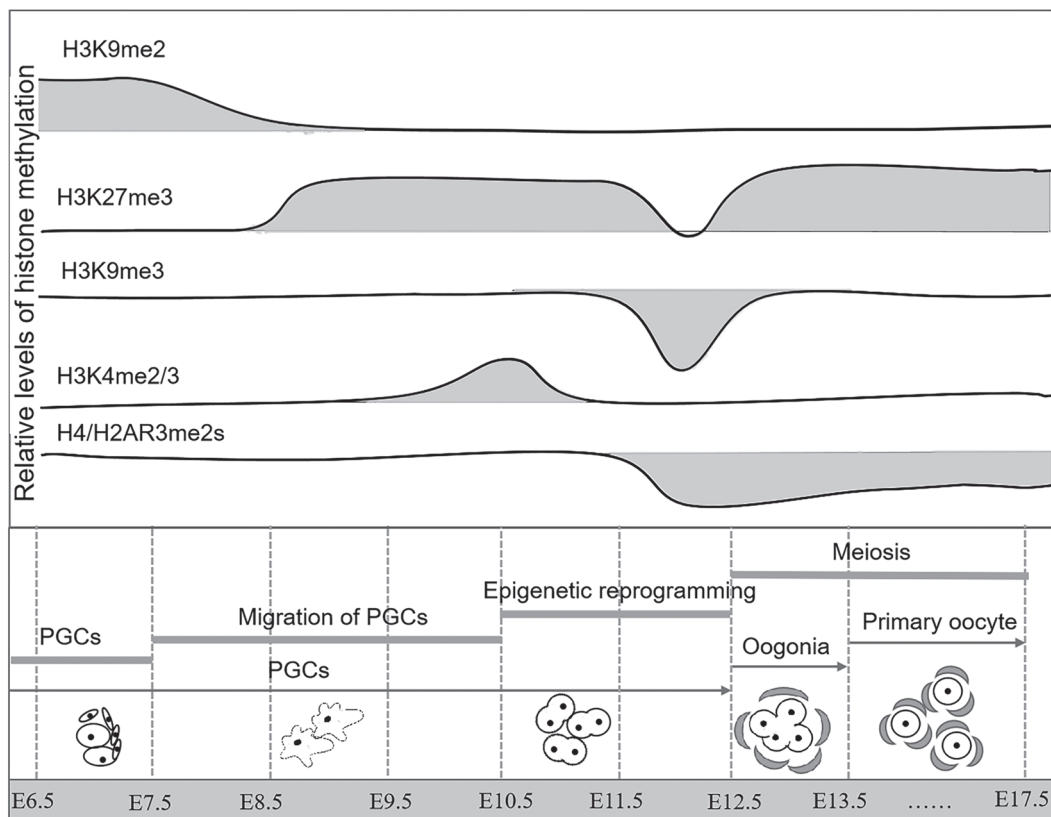


图 2. 原始卵泡形成过程中主要的组蛋白甲基化修饰动态

Fig. 2. Major histone modifications during primordial follicular formation. E: embryonic day; PGCs: primordial germ cells.

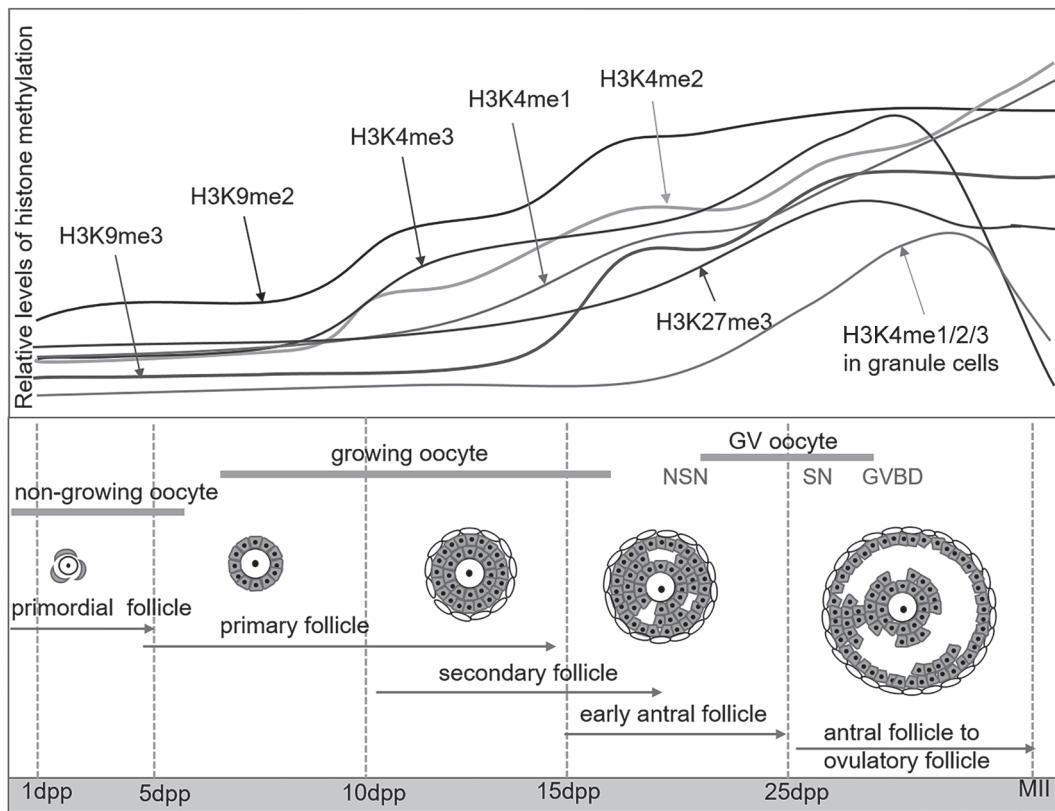


图 3. 卵泡生长和成熟过程中组蛋白甲基化的变化

Fig. 3. Dynamic changes of histone methylation during follicular growth and maturation. dpp: days post parturition; NSN: non-surrounded nucleolus; SN: surrounded nucleolus; GVBD: germinal vesicle breakdown; MII: second meiosis; GV: germinal vesicle.

鼠原始卵泡激活发育至次级卵泡时均保持相近且稳定，但到了次级和有腔卵泡阶段，仅卵母细胞中的 H3K4me3 逐渐增加，而在颗粒细胞中保持不变^[17, 18]。在猪早期生长卵泡颗粒细胞中检测不到明显的 H4K3-me1/2/3 信号，仅在卵丘细胞中出现 H3K4me1/2/3 信号显著上调。后期，卵泡中卵丘细胞的 H3K4 甲基化信号明显变强，尤其壁层颗粒细胞^[32]。除了 H3K4，小鼠卵母细胞中的 H3K9me2 水平在卵泡从初级向有腔转变时显著升高，而 H3K9me3 在有腔卵泡形成前一直处于较低水平^[33]。此外，H3K9me3、H3K27me3 在牛卵丘细胞中也有明显表达^[34]。

值得注意的是，H3K4 和 H3K9 的单、双、三甲基化在卵泡受促性腺激素诱导成熟的后期表现出不同的表达模式（图 3）。例如，H3K4me1/2/3 在生长期的小鼠 NSN 卵母细胞中含量均较低，但在 SN 卵母细胞中含量显著增加^[17]。随着 GV 卵母细胞的生长，H3K4me2/3 和 H3K9me2/3 的表达水平均上升，其中 H3K9me3 的变化最强烈^[33]；而 H3K4me3 水平在 GVBD 后逐渐下降，并在减数第一次分裂后

期达到最低点；相反，H3K4me1/2 水平在减数分裂成熟过程中增加^[35]。鉴于本实验室近期发现颗粒细胞中组蛋白去乙酰化酶 HDAC3 通过影响 H3K4 的乙酰化水平在促黄体生成素 (luteotropic hormone, LH) 诱导卵母细胞减数分裂恢复的过程中发挥了关键性开关作用^[36]，我们猜测以上组蛋白甲基化的变化很可能也与卵母细胞的成熟有密切关系，相关研究值得深入开展。

组蛋白甲基化在猪卵泡受促性腺激素诱导成熟阶段的变化也很有特点。例如，用 eCG-hCG 处理卵泡 0、24 和 38 h 模拟排卵过程，其壁层颗粒细胞中 H3K4me1/2/3 水平随着处理时间增加而降低^[32]。在早期有腔卵泡中，H3K9 甲基化荧光信号在卵母细胞染色质上首次出现，并且在卵母细胞减数分裂成熟和激活期间保持稳定的高水平^[37]。其他类型的组蛋白甲基化修饰在卵泡成熟期的研究较少，高水平的 H3K27me3 存在于完全发育的牛卵母细胞中，而在卵母细胞成熟期间 H3K27me3 水平略有下降^[38]。

总的来说，有关组蛋白甲基化修饰在卵泡生长

和成熟阶段的研究较少且分散。卵母细胞中组蛋白甲基化水平在卵泡发育的关键时期出现了显著性的变化：其在卵母细胞从 NSN 向 SN 转变时出现明显波动；而在 GVBD 后又发生显著性上调或下调。这些结果提示组蛋白甲基化对卵泡成熟和卵母细胞减数分裂恢复都有重要意义。有关组蛋白甲基化在卵泡成熟过程的生理作用和调控机制在下文中详细介绍。

2 H3K4甲基化对卵泡发育的作用及机制

2.1 H3K4甲基化下调延迟卵泡发育并引起卵泡闭锁

现有研究表明，不同组蛋白甲基转移酶催化的 H3K4 甲基化修饰在小鼠卵泡发育中发挥了重要的调控作用 (表 1)。在原始卵泡库形成阶段，LSD1

水平升高降低了卵母细胞中 H3K4me2 水平，抑制细胞自噬调节因子 P62，从而控制孕期小鼠卵巢卵母细胞中的自噬水平所致生殖细胞死亡^[39]。由小鼠 *Cxxc1* 基因编码的 CXXC 手指蛋白 -1 (CFP1) 作为 SETD1 复合物的关键组成部分，可调控细胞中 H3K4me3 的积累^[17, 40]。特异性敲除卵母细胞 *Cxxc1* 基因不影响原始卵泡激活，但延迟卵泡从初级向后发育，导致颗粒细胞的 PI3K 信号受损、凋亡增加而增殖受阻，闭锁卵泡增多^[18]。此外，KMT2B (又称 MLL2) 介导的 H3K4me3 可能通过调节卵母细胞中 *Bax* 及 *Cdkn1a* 等促凋亡基因异常表达，从而促进卵母细胞凋亡，引起卵泡闭锁^[20]。尽管已明确 H3K4 甲基化在卵泡中受到 SETD1 和 MLL2 的调控，但 H3K4 甲基化下调在卵泡发育延迟和卵泡闭锁中

表1. H3K4甲基化对卵泡发育的作用及机制

Table 1. The effect and mechanism of H3K4 methylation on follicular development

Histone methylation	The stage of follicular development	Function and mechanism
H3K4me2	Establishment of primordial follicular pool	LSD1 reduces the level of H3K4me2 and inhibits the expression of autophagy regulator P62, thus controlling oocyte death caused by ovarian autophagy in mice during pregnancy ^[39]
H3K4me3	Primary follicles to antral follicle	Cumulative reduction of H3K4me3 may delay follicular development, but the regulatory mechanism remains unclear ^[18]
	Cellular communication	H3K4me3 binds to the promoter region of paracrine factors such as <i>Gdf9</i> , <i>Bmp15</i> , <i>Fgf8</i> , <i>C-Kit</i> and <i>Oosp1</i> to regulate its normal expression ^[18]
	Follicular atresia	H3K4me3 activates <i>Gja4</i> , which is essential for cellular communication between an oocyte and surrounding granulosa cells ^[18] CFP1-dependent H3K4me3 in oocytes may affect the activation of PI3K signaling pathway, leading to granulosa cell apoptosis and follicular atresia, but the regulatory mechanism remains unclear ^[18]
	GVBD	MLL2-dependent H3K4me3 in oocytes regulates the abnormal expression of pro-apoptotic genes such as <i>Bax</i> and <i>Cdkn1a</i> , leading to the apoptosis of oocytes ^[20] CFP1-dependent H3K4me3 reverses the expression pattern of NPPC-NPR2-CGMP pathway related genes in COCs ^[18]
	Meiosis	Abrogation of CFP1-dependent H3K4me3 makes insufficient phosphorylation of histone H3 at threonine-3, leading to defective spindle assembly and chromosome misalignment, and ultimately leading to failure to meiotic resumption ^[35]
	Ovulation	H3K4me3 binds to the promoter region of ovulation-inducing factors to control their expression, such as GDF9, BMP15 and FGF8 ^[18] . H3K4me3 affects the responses of granulocyte cells to FSH and LH ^[18]

GVBD: germinal vesicle breakdown; LSD1: lysine-specific demethylase 1; COCs: cumulus-oocytes complexes; FSH: follicle-stimulating hormone; LH: luteotropic hormone.

究竟如何发挥作用尚不清楚。H3K4 甲基化在 PI3K 信号受损和促凋亡基因异常表达的过程中究竟扮演什么角色仍需要进一步探究。此外, 组蛋白变体 H3.3 的缺失也会阻止卵泡向次级卵泡的发育^[41], 而 H3.3 也具有翻译后修饰的偏好性, 即含有 H3K4me3^[44], 但 H3.3 对卵泡发育的影响是否因缺乏 H3K4me3 导致仍待证明。

2.2 H3K4三甲基化影响卵母细胞转录活性

卵母细胞中基因的正常转录和沉默对卵母细胞获得恢复减数分裂的能力和实现正常的胞间交流至关重要。研究表明, 缺失 CFP1 会降低卵母细胞的转录活性^[23]。卵泡正常发育的维持需要大量卵母细胞的旁分泌因子, 包括与卵丘扩展相关的 GDF9、BMP15 和 FGF8 等。这些分子参与了对 *Has2*、*Ptgs2*、*Ptx3* 和 *Tnfaip6* 等基因的表达调控^[42]。研究显示, CFP1 介导的 H3K4me3 是维持卵母细胞与周围颗粒细胞间通讯的关键旁分泌因子正常表达的必要条件, 其机制可能与 *Gdf9*、*Bmp15*、*Fgf8*、*c-Kit* 及 *Oosp1* 等编码卵母细胞旁分泌因子基因启动子区域 H3K4me3 水平的下调影响了其正常的转录激活, 从而导致转录下调有关^[18]。此外, MLL2 的缺失会导致 GV 卵母细胞不能在减数分裂恢复前进行正常的全基因组沉默^[20]。但在 GV 卵母细胞发育阶段, MLL2 介导的 H3K4me3 富集于未转录的启动子和 CGI 区域, 几乎不影响基因的转录^[19]。因此, MLL2 介导的 H3K4me3 在基因远端富集可能作为增强子或以其他方式调控卵母细胞全基因组沉默进而影响卵泡的正常发育, 但是其具体的调控机制仍需要进一步探索。

2.3 H3K4甲基化调控生殖细胞减数分裂进程

H3K4 甲基化对卵母细胞减数分裂恢复、染色质状态和细胞骨架都有显著影响^[17, 20, 35](表 1)。壁层颗粒细胞分泌的 C 型钠肽 (natriuretic peptide precursor type C, NPPC) 与卵丘细胞上的 NPPC 受体 (natriuretic peptide receptor 2, NPR2) 结合, 刺激卵丘细胞产生 cGMP, cGMP 作用于卵母细胞, 抑制其减数分裂恢复^[43]。卵母细胞的 H3K4me3 缺陷可以逆转排卵前小鼠卵丘-卵母细胞复合体 (cumulus-oocytes complexes, COCs) 中 *Npr2* 和 *Nppc* 的表达趋势, 影响卵母细胞 GVBD 的过程^[18]。此外, H3K4me3 的下调和 CFP1 的去除对于纺锤体组装、染色体分离和减数分裂细胞周期的正常进行所需的染色质结构至关重要。CFP1 依赖性的 H3K4me3 缺失能够使

组蛋白 H3 第 3 位苏氨酸磷酸化不足, 从而引起纺锤体装配缺陷和染色体错位, 最终导致排卵前卵母细胞减数分裂不能正常恢复^[35]。而 LSD1 的缺失能促进 CDC25B (cell division cycle 25B) 上调, 从而诱导卵母细胞减数分裂提前恢复; LSD1 缺失的卵母细胞还表现出 DNA 损伤增加、转座子的抑制、纺锤体和染色体缺陷以及非整倍体, 最终导致大部分卵母细胞减数分裂异常并凋亡^[44]。但 LSD1 还可以使 p53K370me2 脱甲基从而调控细胞凋亡^[45]。因此, 有关 LSD1 究竟是通过 H3K4me2 的去甲基化来调控 CDC25B 和 DNA 损伤等一系列细胞内变化还是通过调控非组蛋白赖氨酸去甲基化来产生这一系列变化, 值得继续探索。

3 H3K9甲基化对卵泡发育的作用及机制

3.1 H3K9甲基化影响生殖细胞表观遗传学重编程

在原始卵泡形成过程中, H3K9 甲基化修饰的替换是 PGCs 重编程中一个重要变化, 因为它会影响 PGCs 的发育潜力。在雌性, 主要表现为影响出生后生殖细胞数量以及分化为有发育潜能的卵母细胞的能力^[26](表 2)。Seki 等人发现 PGCs 中 H3K9me2 水平在 E8.0 时骤减, 且这种变化与 DNA 甲基化的改变 (体现在 DNA 甲基转移酶的表达模式) 在时间上相同^[30]。而甲基化的 H3K9 能与异染色质蛋白 1 (HP1) 结合并招募 DNA 甲基化酶 DNMT1 来催化 DNA 甲基化^[26, 46]; H3K9 甲基转移酶 SUV39H1 和 ESET 也可与 DNMT3A/B 互作影响 DNA 甲基化^[46, 47]。因此, PGCs 中 H3K9 甲基化与去甲基化对调节基因转录发挥重要功能。此外, H3K9me2 骤降之后, PGCs 中 H3K27me3 的水平增加, 这种特殊的变化提示 H3K27me3 的上调可能是为了弥补 H3K9me2 的缺失, 且该变化发生在细胞分裂 G2 时期, 说明 H3K27me3 的上调可能对细胞分裂继续进行有着重要的调控作用^[25]。对这一补偿调控机制及作用的研究发现, PGCs 通过抑制组蛋白甲基转移酶 GLP 来实现 H3K9me2 的骤降, 而细胞内 H3K9 的去甲基化酶对这一变化不产生影响^[25]。因此, PGCs 通过抑制 GLP 来实现 H3K9me2 的骤降, 随后上调 H3K27me3 为细胞分裂顺利完成做准备。

3.2 H3K9甲基化调控卵泡成熟

在卵泡成熟过程中, 特别是在卵母细胞减数分裂成熟过程中, H3K9 甲基化修饰在染色质结构和基因表达的调控中起着重要作用 (表 2)。在卵母细

表2. H3K9/27/36甲基化对卵泡发育的作用及机制

Table 2. The effect and mechanism of H3K9/27/36 methylation on follicular development

Histone methylation	The stage of follicular development	Function and mechanism
H3K9	Epigenetic reprogramming	DNA methylation is catalyzed by the interaction with H3K9 histone methyltransferase and DNA methylase, so as to realize the transcriptional inhibition of H3K9me ^[30, 46, 47]
	Meiosis	EHMT2-dependent H3K9 methylation is essential for meiotic resumption, but the mechanism is unknown ^[25]
H3K27	Epigenetic reprogramming	Upregulation of H3K27me3 affects cell division, but the mechanism is unknown ^[48]
	Oocyte maturation	SALL4 regulates the expression of Kdm6a and Kdm6b, increases the level of H3K27me3 which binds to the promoter regions of <i>Gfra1</i> , <i>Pdgfa</i> , <i>Prlr</i> , <i>Mtor</i> and <i>Hoxa7</i> , and affects its transcription and promotes oocyte maturation ^[49]
H3K36	Meiosis	H3K36me3 plays an important role in the meiotic maturation, but the mechanism is unknown ^[50]

EHMT2: euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2; SALL4: Sal-like protein-4.

胞减数分裂恢复前, H3K9me 及其甲基转移酶的水平均显著升高^[33], 在 GVBD 后, H3K9 甲基化一直维持在较高水平^[37]。而常染色质组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶 2 (euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2, EHMT2) 介导的 H3K9me1/2 可以调控早期减数分裂进程^[27], 因此卵母细胞中 H3K9 甲基化的升高可能对调控卵泡成熟具有重要作用, 但其具体机制尚不清楚。最近有研究表明 JMJD1A/B 介导的 H3K9 去甲基化和 G9A 介导的 H3K9 甲基化可协同调节 H3K9 甲基化水平^[51]。但这种机制是否在卵母细胞中起作用有待证明。

另一方面, 全基因组转录沉默是卵母细胞减数分裂恢复的先决条件之一, 而卵母细胞中的 H3K9 甲基化上调是否调控了全基因组沉默仍有待证明。众所周知, 雌二醇在次级卵泡向有腔卵泡的转变以及随后的排卵等过程中都有重要的作用^[52], 而胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 则对颗粒细胞凋亡有影响^[53]。新近研究发现, KDM3B 介导的 H3K9 脱甲基化可维持循环系统中 IGF1 和雌二醇的水平^[52], 进而影响卵泡生长和排卵过程^[52–54], 但该结论仍需要进一步的验证。

4 其他组蛋白甲基化对卵泡发育的作用及机制

组蛋白其他位点的甲基化修饰也对卵泡发育产生了不同程度的影响(表 2)。例如, 在 PGCs 中, H3K27me3 受到表观遗传修饰复合物 PRC2 的 EZH1/2 催化, 在细胞中主要发挥着抑制基因转录的作用。

从 E11.5~12.5 这段时间, H3K27me3 在 PGCs 的细胞核中发生有规律的动态变化^[48], 但 EZH1/2 引起的 H3K27me3 异常并没有抑制基因的表达^[55], 这说明 PGCs 中 H3K27me3 可能通过其他途径实现转录抑制的作用。此外, EZH1/2 对成年小鼠原始卵泡、初级卵泡等的 H3K27 三甲基化也有调控作用^[55], 但 H3K27me3 在卵泡中的具体作用及调控机制仍有待探究。再比如, SALL4 介导的 H3K4me3 和 H3K27me3 对调节卵子发生中的转录组和卵母细胞成熟也至关重要。敲除 *Sall4* 的卵母细胞中 *Gfra1*、*Pdgfa*、*Prlr*、*Mtor* 和 *Hoxa7* 启动子区域, 调控转录激活的 H3K4me3 表达水平显著降低, 而与转录抑制相关的 H3K27me3 水平显著增加。向出生后 10 天小鼠卵母细胞注射 *Kdm5b* mRNA 和 *Kdm6a*、*Kdm6b* siRNA 以模拟敲除 *Sall4* 后的组蛋白甲基化水平变化, 结果发现 75% 卵母细胞不能发生 GVBD。这说明 SALL4 调节上述基因的表达进而调节 H3K4me3 和 H3K27me3 的水平, 影响卵母细胞与发育相关的关键因子的转录, 最终促进卵母细胞成熟^[49]。

同样, H3K36 的甲基化可能在卵母细胞成熟中具有重要的调控作用。甲基转移酶 SETD2 仅在猪卵母细胞的 NSN 期出现^[56], 而 STED2 能够特异性催化 H3K36 的三甲基化^[57], 因而 H3K36me3 也可能通过某种机制调控 NSN 向 SN 状态的转变, 从而使细胞获得完全发育能力。此外, 卵母细胞中缺失 SETD2 会导致动粒和微管错误的附着, 并持续激活纺锤体组装检查点 (spindle assembly checkpoint, SAC),

使染色体不能正常分离，进而导致非整倍体卵的产生^[50]。在小鼠胚胎干细胞和成纤维细胞中，SETD2介导的H3K36三甲基化可显著富集于着丝粒周围异染色质上^[58]，而缺失SETD2的卵母细胞中H3K36me3的水平显著降低^[56]，因而SETD2介导H3K36甲基化还可能影响卵母细胞减数分裂过程中染色体的运动和纺锤体的组装，从而影响卵母细胞成熟。但是目前并没有证据证明H3K36me3与染色质分离异常的直接联系，H3K36甲基化影响卵母细胞成熟的具体机制仍有待我们进一步探索。

5 小结与展望

哺乳动物卵泡发育是阶段性进行的生理事件，在此期间大量基因进行有序的转录以确保卵泡顺利发育。除了已被深入研究的内分泌因素以外，表观遗传学修饰在其中也发挥着不可忽视的作用。早期生殖细胞的组蛋白甲基化修饰异常会导致细胞凋亡，甚至影响原始卵泡的数量。而在卵泡发育期间，组蛋白H3K4甲基化的持续缺失会导致卵泡发育延迟、卵泡闭锁增加和排卵受阻等问题。一般来说，组蛋白甲基化是通过结合到基因转录子区域来调控基因的转录。但现阶段研究表明，这种方式并不是唯一的，他们也可能以调节增强子等方式控制卵母细胞转录组沉默，甚至组蛋白甲基化也可能是转录的结果。组蛋白甲基化对卵泡发育的精密调控仍需更深入的研究和探索。

多项研究已经证明，卵泡发育过程中组蛋白甲基化异常可直接影响卵母细胞排卵、受精以及形成合子后继续发育为胚胎的能力。此外，组蛋白变体也在合子基因组激活和胚胎发育的过程中扮演重要角色^[59,60]，也因此可能影响雌性生育力。在临床上，女性卵泡发生和发育的异常会导致卵巢早衰和多囊卵巢综合征等疾病的发生，最终引起生育障碍^[61]。虽然目前辅助生殖技术已经为解决女性不育问题做出了巨大的贡献，但相对正常妊娠来讲，妊娠糖尿病、前置胎盘和胎盘早剥等疾病在辅助生殖患者中发生率显著升高^[62]，这对于患者和新生儿来说都是非常不幸的。随着对表观遗传学因素的研究不断深入，人们已经意识到表观遗传学因素对雌性生殖能力有重要影响，并且展开了对患者DNA甲基化修饰、组蛋白乙酰化等表观遗传学因素的筛查，但目前对组蛋白甲基化的筛查较少。究其原因，可能与现阶段组蛋白甲基化在生殖领域的研究尚不深入和

全面有关，在组蛋白甲基化的调控非常复杂的情况下如何设计巧妙的实验来逐步揭示其精密的调控机制是今后的努力方向之一。总之，进一步探索组蛋白甲基化在卵泡发育过程中发挥作用的机制，找到潜在的关键基因靶点，不仅有助于为表观修饰如何参与生殖细胞发育调控奠定理论基础，也有助于为临床女性生殖疾病的治疗提供新方案。

参考文献

- 1 Yang ZM (杨增明), Sun QY, Xia GL. *Reproductive Biology* (2nd ed.). Beijing: Science Press, 2019 (in Chinese).
- 2 Pépin D, Vanderhyden BC, Picketts DJ, Murphy BD. ISWI chromatin remodeling in ovarian somatic and germ cells: revenge of the NURFs. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18(5): 215–224.
- 3 Pan ZX, Zhang JB, Li QF, Li YX, Shi FX, Xie Z, Liu HL. Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis. *J Genet Genomics* 2012; 39(3): 111–123.
- 4 Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128(4): 693–705.
- 5 Zhang TY, Cooper S, Brockdorff N. The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Rep* 2015; 16(11): 1467–1481.
- 6 Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839(12): 1362–1372.
- 7 Mersman DP, Du HN, Fingerman IM, South PF, Briggs SD. Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone methylation and gene expression. *Genes Dev* 2009; 23(8): 951–962.
- 8 Mallette FA, Mattioli F, Cui G, Young LC, Hendzel MJ, Mer G, Sixma TK, Richard S. RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites. *EMBO J* 2012; 31(8): 1865–1878.
- 9 Cha TL, Zhou BP, Xia W, Wu Y, Yang CC, Chen CT, Ping B, Otte AP, Hung MC. Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of Lysine 27 in histone H3. *Science* 2005; 310(5746): 306–310.
- 10 Baba A, Ohtake F, Okuno Y, Yokota K, Okada M, Imai Y, Ni M, Meyer CA, Igarashi K, Kanno J, Brown M, Kato S. PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B. *Nat Cell Biol* 2011; 13(6): 668–675.
- 11 Su XY, Wellen KE, Rabinowitz JD. Metabolic control of methylation and acetylation. *Curr Opin Chem Biol* 2016; 30:

- 52–60.
- 12 Takahashi YH, Westfield GH, Oleskie AN, Trievel RC, Shilatifard A, Skiniotis G. Structural analysis of the core COMPASS family of histone H3K4 methylases from yeast to human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(51): 20526–20531.
 - 13 Long HK, Blackledge NP, Klose RJ. ZF-CxxC domain-containing proteins, CpG islands and the chromatin connection. *Biochem Soc Trans* 2013; 41(3): 727–740.
 - 14 Sha QQ, Zhang J, Fan HY. Function and regulation of histone H3 Lysine-4 methylation during oocyte meiosis and maternal-to-zygotic transition. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 597498.
 - 15 Ardehali MB, Mei A, Zobeck KL, Caron M, Lis JT, Kusch T. *Drosophila* Set1 is the major histone H3 lysine 4 trimethyltransferase with role in transcription. *EMBO J* 2011; 30(14): 2817–2828.
 - 16 Shilatifard A. The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. *Annu Rev Biochem* 2012; 81(1): 65–95.
 - 17 Yu C, Fan XY, Sha QQ, Wang HH, Li BT, Dai XX, Shen L, Liu JP, Wang L, Liu K, Tang FC, Fan HY. CFP1 regulates histone H3K4 trimethylation and developmental potential in mouse oocytes. *Cell Rep* 2017; 20(5): 1161–1172.
 - 18 Sha QQ, Jiang Y, Yu C, Xiang YL, Dai XX, Jiang JC, Ou XH, Fan HY. CFP1-dependent histone H3K4 trimethylation in murine oocytes facilitates ovarian follicle recruitment and ovulation in a cell-nonautonomous manner. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77(15): 2997–3012.
 - 19 Hanna CW, Taudt A, Huang J, Gahurova L, Kranz A, Andrews S, Dean W, Stewart AF, Colomé-Tatché M, Kelsey G. MLL2 conveys transcription-independent H3K4 trimethylation in oocytes. *Nat Struct Mol Biol* 2018; 25(1): 73–82.
 - 20 Andreu-Vieyra CV, Chen R, Agno JE, Glaser S, Anastassiadis K, Stewart AF, Matzuk MM. MLL2 is required in oocytes for bulk histone 3 lysine 4 trimethylation and transcriptional silencing. *PLoS Biol* 2010; 8(8): e1000453.
 - 21 Keniry A, Gearing LJ, Jansz N, Liu J, Holik AZ, Hickey PF, Kinkel SA, Moore DL, Breslin K, Chen K, Liu R, Phillips C, Pakusch M, Biben C, Sheridan JM, Kile BT, Carmichael C, Ritchie ME, Hilton DJ, Blewitt ME. Setdb1-mediated H3K9 methylation is enriched on the inactive X and plays a role in its epigenetic silencing. *Epigenetics Chromatin* 2016; 9(1): 16.
 - 22 Tachibana M. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev* 2002; 16(14): 1779–1791.
 - 23 Schultz DC. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 2002; 16(8): 919–932.
 - 24 Shuai WD, Wu JX, Chen S, Liu RY, Ye ZH, Kuang CM, Fu X, Wang GY, Li YC, Peng QH, Shi W, Li YZ, Zhou QH, Huang WL. SUV39H2 promotes colorectal cancer proliferation and metastasis via tri-methylation of the SLIT1 promoter. *Cancer Lett* 2018; 422: 56–69.
 - 25 Seki Y, Yamaji M, Yabuta Y, Sano M, Shigeta M, Matsui Y, Saga Y, Tachibana M, Shinkai Y, Saitou M. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development* 2007; 134(14): 2627–2638.
 - 26 Smallwood A, Esteve PO, Pradhan S, Carey M. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev* 2007; 21(10): 1169–1178.
 - 27 Tachibana M, Nozaki M, Takeda N, Shinkai Y. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J* 2007; 26(14): 3346–3359.
 - 28 Elkouby YM, Mullins MC. Coordination of cellular differentiation, polarity, mitosis and meiosis – New findings from early vertebrate oogenesis. *Dev Biol* 2017; 430(2): 275–287.
 - 29 Chen CL, Fu XF, Wang LQ, Wang JJ, Ma HG, Cheng SF, Hou ZM, Ma JM, Quan GB, Shen W, Li L. Primordial follicle assembly was regulated by notch signaling pathway in the mice. *Mol Biol Rep* 2014; 41(3): 1891–1899.
 - 30 Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M, Matsui Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol* 2005; 278(2): 440–458.
 - 31 Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, Lee C, Almouzni G, Schneider R, Surani MA. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature* 2008; 452(7189): 877–881.
 - 32 Seneda MM, Godmann M, Murphy BD, Kimmins S, Bordignon V. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in the porcine ovary. *Reproduction* 2008; 135(6): 829–838.
 - 33 Kageyama S, Liu H, Kaneko N, Ooga M, Nagata M, Aoki F. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction* 2007; 133(1): 85–94.
 - 34 Li HB (李红波), Xu JJ, Yue Y. Effect of JARID2 on H3K-9me3a and H3K27me3 methylation in bovine cumulus cells. *Chin J Vet Sci (中国兽医学报)* 2016; 36(5): 880–884 (in Chinese).
 - 35 Sha QQ, Dai XX, Jiang JC, Yu C, Jiang Y, Liu JP, Ou XH, Zhang SY, Fan HY. CFP1 coordinates histone H3 lysine-4

- trimethylation and meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. *Nat Commun* 2018; 9(1): 3477.
- 36 Wang HR, Cai H, Wang X, Zhang ML, Liu BY, Chen ZQ, Yang TT, Fang JS, Zhang YH, Liu W, Han J, Guo QR, Zhang H, Wang HB, Xia GL, Wang C. HDAC3 maintains oocyte meiosis arrest by repressing amphiregulin expression before the LH surge. *Nat Commun* 2019; 10(1): 5719.
- 37 Bui H, Van Thuan N, Kishigami S, Wakayama S, Hikichi T, Ohta H, Mizutani E, Yamaoka E, Wakayama T, Miyano T. Regulation of chromatin and chromosome morphology by histone H3 modifications in pig oocytes. *Reproduction* 2007; 133(2): 371–382.
- 38 Ross PJ, Ragina NP, Rodriguez RM, Iager AE, Siripattarapratvat K, Lopez-Corrales N, Cibelli JB. Polycomb gene expression and histone H3 lysine 27 trimethylation changes during bovine preimplantation development. *Reproduction* 2008; 136(6): 777–785.
- 39 He MN, Zhang T, Zhu ZJ, Qin SG, Wang HR, Zhao LH, Zhang XR, Hu JY, Wen J, Cai H, Xin QL, Guo QR, Lin L, Zhou B, Zhang H, Xia GL, Wang C. LSD1 contributes to programmed oocyte death by regulating the transcription of autophagy adaptor SQSTM1/p62. *Aging Cell* 2020; 19(3): e13102.
- 40 Clouaire T, Webb S, Skene P, Illingworth R, Kerr A, Andrews R, Lee JH, Skalnik D, Bird A. Cfp1 integrates both CpG content and gene activity for accurate H3K4me3 deposition in embryonic stem cells. *Genes Dev* 2012; 26(15): 1714–1728.
- 41 Tang MC, Jacobs SA, Mattiske DM, Soh YM, Graham AN, Tran A, Lim SL, Hudson DF, Kalitsis P, O'Bryan MK, Wong LH, Mann JR. Contribution of the two genes encoding histone variant h3.3 to viability and fertility in mice. *PLoS Genet* 2015; 11(2): e1004964.
- 42 Yan CN, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 2001; 15(6): 854–866.
- 43 Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science* 2010; 330(6002): 366–369.
- 44 Kim J, Singh AK, Takata Y, Lin K, Shen J, Lu Y, Kerényi MA, Orkin SH, Chen T. LSD1 is essential for oocyte meiotic progression by regulating CDC25B expression in mice. *Nat Commun* 2015; 6(1): 10116.
- 45 Huang J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, Opravil S, Shiekhatter R, Bedford MT, Jenuwein T, Berger SL. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature* 2007; 449(7158): 105–108.
- 46 Fuks F. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(9): 2305–2312.
- 47 Li HW, Rauch T, Chen ZX, Szabó PE, Riggs AD, Pfeifer GP. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. *Biol Chem* 2006; 281(28): 19489–19500.
- 48 Prokopuk L, Hogg K, Western PS. Pharmacological inhibition of EZH2 disrupts the female germline epigenome. *Clin Epigenetics* 2018; 10(1): 33.
- 49 Xu K, Chen X, Yang H, Xu YW, He YL, Wang CF, Huang H, Liu BD, Liu WQ, Li JY, Kou XC, Zhao YH, Zhao K, Zhang L, Hou ZZ, Wang H, Wang HL, Li J, Fan HY, Wang FC, Gao YW, Zhang Y, Chen JY, Gao SR. Maternal Sall4 is indispensable for epigenetic maturation of mouse oocytes. *Biol Chem* 2017; 292(5): 1798–1807.
- 50 Li CL, Diao FY, Qiu DH, Jiang MX, Li XY, Han LS, Li L, Hou XJ, Ge J, Ou XH, Liu JY, Wang Q. Histone methyltransferase SETD2 is required for meiotic maturation in mouse oocyte. *J Cell Physiol* 2019; 234(1): 661–668.
- 51 Kuroki S, Nakai Y, Maeda R, Okashita N, Akiyoshi M, Yamaguchi Y, Kitano S, Miyachi H, Nakato R, Ichianagi K, Shirahige K, Kimura H, Shinkai Y, Tachibana M. Combined loss of JMJD1A and JMJD1B reveals critical roles for H3K9 demethylation in the maintenance of embryonic stem cells and early embryogenesis. *Stem Cell Reports* 2018; 10(4): 1340–1354.
- 52 Liu ZL, Chen X, Zhou SL, Liao L, Jiang R, Xu JM. The histone H3K9 demethylase Kdm3b is required for somatic growth and female reproductive function. *Int J Biol Sci* 2015; 11(5): 494–507.
- 53 Fu X, He Y, Xie C, Liu W. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy* 2008; 10(4): 353–363.
- 54 Magoffin DA. Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(7): 1344–1349.
- 55 Prokopuk L, Stringer JM, Hogg K, Elgass KD, Western PS. PRC2 is required for extensive reorganization of H3K27me3 during epigenetic reprogramming in mouse fetal germ cells. *Epigenetics Chromatin* 2017; 10(1): 7.
- 56 Diao YF, Lin T, Li XX, Oqani RK, Lee JE, Kim SY, Jin DI. Dynamic changes of SETD2, a histone H3K36 methyltransferase, in porcine oocytes, IVF and SCNT embryos. *PLoS One* 2018; 13(2): e191816.
- 57 Edmunds JW, Mahadevan LC, Clayton AL. Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO J* 2007; 27(2): 406–

- 420.
- 58 Chantalat S, Depaux A, Hery P, Barral S, Thuret JY, Dimitrov S, Gerard M. Histone H3 trimethylation at lysine 36 is associated with constitutive and facultative heterochromatin. *Genome Res* 2011; 21(9): 1426–1437.
- 59 Akiyama T, Suzuki O, Matsuda J, Aoki F. Dynamic replacement of histone H3 variants reprograms epigenetic marks in early mouse embryos. *PLoS Genet* 2011; 7(10): e1002279.
- 60 Kong Q, Banaszynski LA, Geng F, Zhang X, Zhang J, Zhang H, O'Neill CL, Yan P, Liu Z, Shido K, Palermo GD, Allis CD, Rafii S, Rosenwaks Z, Wen D. Histone variant H3.3-mediated chromatin remodeling is essential for paternal genome activation in mouse preimplantation embryos. *J Biol Chem* 2018; 293(10): 3829–3838.
- 61 Qin YY, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update* 2015; 21(6): 787–808.
- 62 Pisarska MD, Chan JL, Lawrenson K, Gonzalez TL, Wang ET. Genetics and epigenetics of infertility and treatments on outcomes. *J Clin Endocrinol Metab* 2019; 104(6): 1871–1886.