

核型为46, XX的雄源性完全性葡萄胎中 X染色体失活异常

Xiaojing Chen, B.S., Yuejiang Ma, M.S., Lingfang Wang, B.S., Xiaofei Zhang, M.S., Yan Yu, Ph.D., Weiguo Lü, Ph.D., Xing Xie, Ph.D., and Xiaodong Cheng, Ph.D.

摘要: 大多数完全性葡萄胎 (CHMs) 显示出细胞核基因组的雄源性特性。在正常的女性胚胎中, 2 条 X 染色体中有 1 条是失活的。然而, 雄源性 CHMs 中 X 染色体失活 (XCI, X chromosome inactivation) 的状态仍不清楚。作者收集了核型为 46, XX 的 71 例雄源性 CHMs 组织, 并分别收集正常女性和男性胚胎绒毛各 74 例作为对照。应用实时聚合酶链反应

测 XCI 标记物 (XIST、TSIX 和 XACT) 与 X 染色体连锁基因 (CDX4) 的表达情况。并检测其他 XCI 相关基因, 包括应用甲基化特异性聚合酶链反应检测人雄源性受体基因 (HUMARA) 的甲基化状态, 应用 Western blot 和免疫荧光检测 H3K27me3、USP21 和 Nanog 的表达情况。此外, 收集 126 例 CHMs 和 63 例正常女性胚胎绒毛标本进行 CDX4 免疫组织化学染色。与正常女性胚胎绒毛相比, 雄源性 CHMs 中 XIST RNA 表达显著降低, 而 TSIX RNA 表达显著升高 (均为 $P < 0.01$)。与正常男性和正常女性胚胎绒毛组织相比, 雄源性 CHMs 组织中 CDX4 mRNA 表达明显升高 (均为 $P < 0.01$), CDX4 蛋白表达也明显高于正常女性绒毛组织 ($P < 0.01$)。H3K27me3 在雄源性 CHMs 中的表达低于正常女性胚胎绒毛 ($P < 0.01$)。雄源性 CHMs 中未检测到 HUMARA 基因甲基化。雄源性 CHMs 组织中, Nanog 和 UPS21 蛋白的表达均高于正常绒毛组织 (均为 $P < 0.01$)。在核型为 46, XX 的雄源性 CHMs 中, 两条 X 染色体均为活化状态, USP21-Nanog 通路可能破坏了 XCI 进程。

关键词: 完全性葡萄胎; X 染色体失活; USP21; Nanog
(*IJGP.2021 Jul.;40(4):333-341*)

From the Key Laboratory of Women's Reproductive Health of Zhejiang Province (X. Chen, L.W., W.L., X.X., X. Cheng); Department of Gynecologic Oncology (Y.M., Y.Y., W.L., X.X., X. Cheng); and Department of Surgical Pathology (X.Z.), Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China.

The authors consider that the first 2 authors should be regarded as joint first authors: X.C. and Y.M.

This study was approved by the Ethics Committee of Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University. All patients provided written informed consent for tissue sampling used for scientific research before surgical treatment.

X. Chen, Y.M., and L.W.: designed the study, collected the samples, performed the experiments, carried out statistical analysis and drafted the manuscript. Y.Y.: participated in the sample collection and statistical analysis. X.Z. participated in the sample collection and re-reviewed all the studied specimens at the time of this study. X. Cheng, X.X., and W.L.: conceived the study, participated in its design and coordination, and revised the final manuscript.

Supported by the key research and development program of Zhejiang province, China (Grant No: 2019C03010).

The authors declare no conflict of interest.

Address correspondence to Xiaodong Cheng, PhD, Department of Gynecologic Oncology, Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Xueshi Rd No. 1, Hangzhou 310006, China. E-mail: chengxd@zju.edu.cn.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

完 全性葡萄胎 (CHM) 以绒毛水肿、滋养叶细胞增生和绒毛间质血管不成熟为特征。CHM 在西方国家并不常见, 但在亚洲女性中发病率偏高, 中国的发病率小于 5/1000 例妊娠。CHM 按遗传来源可分为雄源性 CHM 和双亲源性 CHM^[2]。雄源性 CHM 是由 1 个无核卵子和 1 或 2 个单倍体精子受精而产生, 占有 CHMs 的 90%-95%。雄源性 CHM 有两种类型, 一种是由 1 个无核卵子和 1 个单倍体精子受精形成的单精型 CHM (占比 70%); 另一种是由 1 个无核卵子和 2 个精子受精形成的双精型 CHM (占比 20%~25%)。双亲源性 CHM 非常罕见, 是起源于双亲的二倍体。CHM 的发生至今仍是个谜。基因印迹失调^[3]、血管生

成缺陷^[4]、氧化应激^[5]、异常细胞凋亡^[6]以及线粒体功能障碍^[7]可能参与了CHM的发生。然而,所有这些发现都没有确凿的证据,CHM发生的详细机制仍然不清楚。

X染色体失活(XCI)被认为是平衡男女个体性染色体含量的一种剂量补偿机制,与胚胎发育的调节以及一些疾病有关。XCI对反复流产的影响是有争议的,因为相关研究的纳入标准不同。一些研究表明,XCI异常可能与反复流产有关,而Kaare等人^[8]研究发现XCI异常并不是反复流产的原因。在妊娠滋养细胞疾病中,Djuric等人^[9]发现在双亲源性CHM中存在正常的XCI模式,虽然Siu等人^[10]认为Nanog是XCI^[11]的重要影响因素,且在妊娠相关疾病中过度表达;但核型为46,XX的雄源性CHM中XCI表达水平尚未见报道。雄源性CHM是CHM中最常见的类型,了解其X染色体失活状态有助于更好地理解该疾病的发病机制。

在本研究中,我们检测了XCI标志物(XIST、TSIX和XACT)与X染色体连锁基因(CDX4)的表达情况,并检测了其他XCI相关因素,包括人雄源性受体基因(HUMARA)的甲基化状态,以及H3K27me3、USP21和Nanog在核型为46,XX的雄源性CHM中的表达。研究目的旨在确认CHM组织中XCI的状态,进而探讨其与CHM发生的可能性。

材料和方法

样本采集

葡萄胎组织样本来自浙江大学医学院附属妇产科医院治疗的患者。选择正常早孕患者的绒毛组织标本作为对照。所有正常的绒毛组织都是由因意外怀孕而行清宫术的患者捐献的。全部样品经液氮快速冷冻后保存在-80°C低温冰箱,以备进行聚合酶链反应和Western blot分析。每例标本均由我院资深病理学家进行诊断,按先前的方法^[12]进行p57免疫组化染色,以明确CHM的诊断。然后,以基于PCR检测到的性别相关基因(SRY)进行性别鉴定^[13],再去除核型为46,XY的CHM病例,性别鉴定后,利用多态标记HUMARA排除双亲源性CHMs,参照之前的方法进行HUMARA分析^[14]。共有219个新鲜组织经鉴定符合这项研究的条件,包括核型为46,XX的雄源CHM 71例,核型为46,XX和46,XY的正常绒毛各74例。对2012年4月至2014年6月收集的27例核型为46,XX的CHMs、30例核型为46,XX的正常绒毛和30例核型为46,XY的正常绒毛进行XIST、TSIX和CDX4的检测。2015年5月至2017年12月收集的样本用于检测USP21、Nanog、H3K27me3

表达以及进行HUMARA-MSP分析。另外,对2010年1月至2012年3月收集的126例CHMs和63例核型为46,XX的正常绒毛组织石蜡包埋标本进行CDX4免疫组织化学检测。

样本收集获得每名患者的知情同意,并得到了医院机构伦理审查委员会的批准。

实时聚合酶链式反应(RT-PCR)

用PBS清洗绒毛组织两次以去除血液和其他杂质。使用Trizol试剂提取总RNA,按照试剂盒说明书(Invitrogen, Paisley, UK)进行。按照之前的方法^[15],应用SYBR Premix Ex Taq PCR试剂盒(Takara Bio, Shiga, Japan)进行实时聚合酶链反应。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算RNA相对表达量。使用的引物如表1所示。

Western blotting分析

绒毛组织在RIPA缓冲液中裂解。依据试剂盒说明书,使用Bradford蛋白分析试剂盒(Beyotime,上海,中国)测量蛋白质浓度。Western blot分析按照之前的方法^[16]。将硝酸纤维素膜与一抗H3K27me3(ab192985, 1:1000)、USP21(ab38864, 1:200)、Nanog(abcam, ab109250, 1:1000)和GAPDH(abcam, ab8245, 1:10000)一起孵育(所用一抗均来自Abcam, Cambridge, UK)。加入FDbio-Dura ECL发光液(FUDE, Zhejiang, China),应用Imagequant LAS400 mini化学发光成像仪(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)检测条带。用ImageJ软件(NIH, Bethesda, MD)测定各条带的灰度值。比较灰度前,同一膜上以GAPDH信号作为内参对各条带的信号进行标准化。

免疫组织化学染色

按照先前文献中的方法进行^[12]免疫组织化学染色,同时用兔IgG替代一抗作为阴性对照。每个样本按着色范围分成四个类别:0(0%-4%)、1(5%-24%)、2(25%-49%)、3(50%-74%)或4(75%-100%)。免疫染色强度分级为:0,阴性;1+,弱;2+,中度或3+,强。将着色范围与染色强度相乘得到最终得分。0~4分为“低表达”,5~8分为“中度表达”,9~12分为“高表达”。

免疫荧光分析

正常绒毛组织和CHM组织均由清宫术患者自愿捐献。性别鉴

表1. 引物序列

基因	正向引物	反向引物
SRY	5'AGAGAATCCCAGAATGCGAAAC3'	5'CTTCCGACGAGGTCGATACTT3'
XIST	5'CCATTGAAGATACCACGCTGC3'	5'GTCCTCAGGCTCATGCTCA3'
TSIX	5'GTGATCCTCACAGGACTGCAACA3'	5'AGCTGAGTCTTCAGCAGGTCCAA3'
XACT	5'TGCTGATGATGTCTTAAACCTG3'	5'AGGAGGTTTGAGATAGGCA3'
USP21	5'GAGCTCACTGAAGCCTTTG3'	5'CCATGAGGAGCTTCAGAAC3'
Nanog	5'AAGGTCCCGTCAAGAAACAG3'	5'CTTCTGCGTCACACCATTGC3'
CDX4	5'CGAGAAGACTGGAGCGTGA3'	5'CTGTAGTCGGTCGAGCAGAA3'
GAPDH	5'GCACCGTCAAGGCTGAGAAC3'	5'TGGTGAAGACGCCAGTGA3'
HUMARA	5'GCTGTGAAGTTGCTGTTCTCAT3'	5'TCCAGAATCTGTCCAGAGCGTGC3'
HUMARA-M	5'GCGAGCGTAGTATTTTTGCGC3'	5'AACCAAATAACCTATAAACCTCTACG3'
HUMARA-U	5'GTTGTGAGTGTAGTATTTTTGCT3'	5'CAAATAACCTATAAACCTCTACA3'

定后, 按照之前的免疫荧光染色方法^[17], 用一抗 (H3K27me3, Abcam, ab192985, 1: 1000; USP21, Abcam, ab38864, 1: 200; Nanog, Abcam, ab109250, 1: 1000) 对绒毛组织切片进行染色, 并用共聚焦显微镜 (Olympus, Tokyo, Japan) 鉴定。

HUMARA-MSP分析

甲基化特异性聚合酶链反应 (HUMARA-MSP) 分析雄源性 CHM 中 XCI 状态。使用 TIANamp 基因组 DNA 试剂盒 (Tiangen, Beijing, China) 从绒毛组织中提取基因组 DNA。根据制造商的操作流程, 使用 EpiTect 亚硫酸氢盐试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany) 对基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐转化。然后, 如文献所述^[18], 用表 1 中列出的两套引物通过聚合酶链反应扩增经亚硫酸氢盐处理的 DNA。扩增产物用 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。

统计学方法

采用 SPSS19.0 软件包 (IBM, Armonk, NY) 进行统计学分析。所有实验重复 3 次。组间差异分析采用单因素方差分析。然后使用 LSD t 检验进一步分析两组之间的差异。用 Wilcoxon 秩和检验法分析 CHMs 与正常绒毛中 CDX4 的表达情况。P<0.05 具有统计学意义。

结果

CHM 中的 XCI 状态

核型为 46, XX 的雄源性 CHMs 中存在 XIST 低表达和 TSIX

高表达

实时聚合酶链反应显示, 与正常女性胚胎绒毛相比, 核型为 46, XX 的雄源性 CHMs 中 XIST RNA 的表达明显降低, 而 TSIX RNA 的表达明显增加 (均为 $P<0.01$), 而 XIST RNA 和 TSIX RNA 在雄源性 CHMs 中的表达与正常男性胚胎绒毛相似 (图 1)。我们还检测到了另一种非编码 RNA-XACT 的表达, 该 RNA 在人类早期发育过程中可以与 XIST 竞争性控制 XCI。虽然 XACT 在雄源性 CHMs 中的表达高于正常绒毛, 但与正常男性胚胎绒毛以及正常女性胚胎绒毛两组的表达水平之间无显著差异【 $P1$ (CHMs 与正常女性胚胎绒毛 = 0.488; $P2$ (CHMs 与正常男性胚胎绒毛 = 0.381)】。

CDX4 在核型为 46, XX 的雄源性 CHMs 中高表达

通过 qPCR 方法检测核型为 46, XX 的雄源性 CHMs (n=27)、46, XX 正常绒毛 (n=30) 和 46, XY 正常绒毛 (n=30) 中 CDX4 mRNA 的表达情况, 发现雄源性 CHMs 中的 CDX4 mRNA 表达显著高于正常男性、女性胚胎绒毛 (均为 $P<0.01$), 如图 1D 所示。我们进一步应用免疫组织化学方法检测石蜡包埋的 126 例 CHMs 和 63 例正常女性胚胎绒毛组织中 CDX4 蛋白表达, 发现 CDX4 蛋白在 CHMs 中的表达明显高于正常女性胚胎绒毛 ($z=-7.75$, $P<0.01$), 如图 1E-G 和表 2 所示。

H3K27me3 在核型为 46, XX 的雄源性 CHMs 中的表达降低

我们用 Western blot 方法检测核型为 46, XX 的雄源性 CHMs (n=44)、正常男性胚胎绒毛 (n=44) 和女性胚胎绒毛

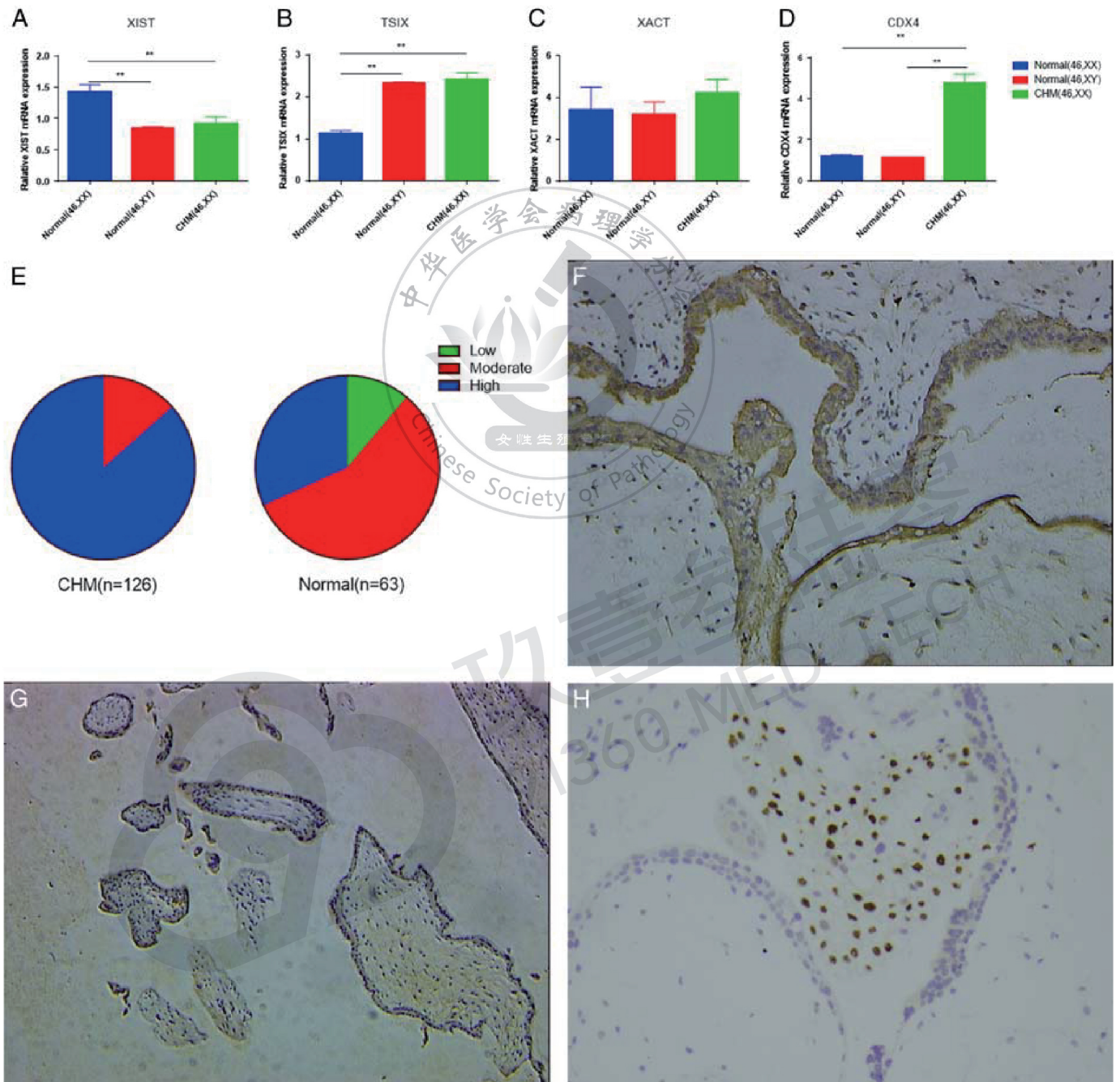


图1. XIST、TSIX、XACT 和 CDX4 的表达情况。(A) 雄源性完全性葡萄胎 (CHMs) 中 XIST RNA 表达显著低于正常女性胚胎绒毛 ($P<0.01$), 但与正常男性胚胎绒毛组织中的表达相似 (差异无统计学意义, $P=0.573$)。 (B) 雄源性 CHMs 组织中 TSIX RNA 水平显著升高 ($P<0.01$), 但与正常男性绒毛组织中的表达相似 ($P=0.641$)。 (C) 与正常绒毛相比, 雄源性 CHMs 组织中 XACT RNA 表达增加, 但差异无统计学意义 ($F=0.431$, $P=0.651$, $P1=0.488$, $P2=0.381$, $P3=0.854$)。 (D) CDX4 mRNA 在雄源性 CHMs 绒毛中的表达显著高于正常男性胚胎和女性胚胎绒毛 (均为 $P<0.01$)。 (E) CDX4 蛋白在 CHMs 和正常绒毛中免疫表达强度对比。(F) CDX4 蛋白在 CHMs 中的表达 (200 \times)。 (G) CDX4 蛋白在正常女性胚胎绒毛中的表达 (200 \times)。 (H) p57 蛋白在 CHMs 中的表达 (200 \times)。数据以平均值 \pm SEM 表示, ** $P<0.01$, $P1$: 雄源性 CHMs 与正常女性胚胎绒毛, $P2$: 雄源性 CHMs 与正常男性胚胎绒毛, $P3$: 正常女性胚胎绒毛与正常男性胚胎绒毛。

表2. CDX4在CHMs和正常绒毛中的免疫染色强度

CDX4表达	低	中	高	合计
CHMs	0	17	109*	126
正常绒毛	7	36	20	63
合计	7	53	129	189

*与正常绒毛比较 ($z = -7.75$, $P = 0.000$)。CHM 表示完全性葡萄胎。

($n = 44$) 组织中 H3K27me3 的表达水平。结果显示, 雄源性 CHMs 组织中 H3K27me3 的表达水平显著低于正常女性绒毛组织 ($P < 0.01$), 但与正常男性胚胎绒毛组织无显著差异 (图 2A)。

进一步用免疫荧光分析 H3K27me3 的表达和定位。我们观察到 H3K27me3 主要定位于细胞核 (图 2B), 与雄源性 CHMs 和正常男性胚胎绒毛组织相比, 正常女性胚胎绒毛组织中 H3K27me3 的荧光强度增强, 与 Western blot 结果一致。

核型为46, XX的雄源性CHMs缺乏HUMARA甲基化

我们用 HUMARA-MSP 方法检测雄源性 CHMs 组织中 HUMARA X 染色体第一外显子上的 XCI CpG 位点甲基化状态。电泳后, 每条电泳道的条带数代表了样品的遗传来源。具体地说, 1 个条带表示样品中只含有雄源性遗传物质, 而 2 个条带表明样品具有双亲源性。如果 HUMARA-M 引物扩增的产物存在, 则样品中存在失活的 X 染色体, 反之亦然。HUMARA 区 CAG 重复区的扩增产物长度为 ~ 200 bp。HUMARA-U 引物扩增的产物在正常女性绒毛组织中有 2 个条带, 而在正常男性胚胎绒毛和雄源性 CHMs 组织中只有 1 个条带。此外, 用 HUMARA-M 引物扩增的产物在正常女性绒毛组织中显示 2 个条带, 而在正常男性胚胎绒毛和雄源性 CHMs 组织中无明显的条带 (图 2C)。这些结果表明, 雄源性 CHMs 组织中没有失活的 X 染色体。也就是说, 在核型为 46, XX 的雄源性 CHMs 组织中, 两条 X 染色体都是活化的。

核型为46, XX的雄源性CHMs组织中Nanog和USP21蛋白的表达

通过 Western blot 检测核型为 46, XX 的雄源性 CHMs ($n = 44$)、正常男性胚胎绒毛 ($n = 44$) 和女性胚胎绒毛 ($n = 44$) 组织中 Nanog 和 USP21 蛋白的表达情况。结果发现, 核型为 46, XX 的雄源性 CHMs 组织中的 Nanog 和 USP21

蛋白的表达均高于正常男性、女性胚胎绒毛 (均为 $P < 0.01$) (图 3A, B)。此外, 我们通过免疫荧光分析 USP21 和 Nanog 的定位, 发现 USP21 与 Nanog 在绒毛组织中共定位 (图 3C)。而且, USP21 和 Nanog 在雄源性 CHMs 组织中的荧光强度明显高于正常绒毛。

讨论

雄源性 CHM 是 CHM 的主要类型, 容易发生恶性转化。然而, 该种类型的 CHMs 的发生机制仍不清楚。X 染色体失活是正常雌性哺乳动物胚胎发育过程中一个非常重要的过程。在胚胎植入后不久, X 染色体失活失败将阻碍胚胎的正常发育。虽然已证实双亲源性 CHM 具有正常的 XCI 模式, 但核型为 46, XX 雄源性 CHM 中 XCI 的状态尚不清楚。在本研究中, 我们首次发现 X 染色体失活的异常可能与雄源性 CHM 的发生有关。

根据失活 X 染色体的特点和 XCI 的发生机制, 已建立了多种评价 XCI 状态的方法。与活化的 X 染色体相比, 失活的 X 染色体表现出结构性异染色质的许多特征^[19], 包括在整个细胞周期中染色质处于凝聚状态, DNA 复制滞后, 组蛋白乙酰化丰度减少, 组蛋白 H3 赖氨酸 -4 甲基化水平降低, 组蛋白 H3 赖氨酸 -9 和 H3 赖氨酸 -27 甲基化水平升高。这些特征已经被用来评估 XCI 状态^[20, 21]。XIST 在 XCI 过程中的重要性也已得到证实。使用已被广泛应用于检测 XCI 状态的荧光原位杂交技术来分析 XIST RNA 的表达情况以及 XIST RNA 覆盖的顺式元件^[22]。在此, 我们观察了包括 XIST、TSIX 和 H3K27me3 在内的 XCI 标记物的表达情况, 并使用 HUMARA-MSP 来阐明 XCI 在雄源性 CHMs 组织中的状态。与正常女性胚胎绒毛相比, 雄源性 CHMs 组织的 XIST RNA 表达显著降低, 而 TSIX RNA 表达显著升高, 但 XIST 和 TSIX RNA 表达与正常男性胚胎绒毛相似。雄源性 CHMs 组织中 H3K27me3 的表达显著低于正常女性胚胎绒毛, 但与正常男性胚胎绒毛无明显差异。而且, CHMs 组织中缺乏 HUMARA 甲基化。结果表明, 核型为 46, XX 的雄源性 CHMs 组织中 X 染色体均被活化。以往的研究表明, X 连锁的 CDX4 基因通过多种途径参与绒毛的发育, 包括与 Wnt 通路的相互作用并增强 CDX2 的功能^[23, 26]。后者在滋养外胚层形成过程中, 可以与 SOX2 和 GATA3 协同作用, 进而促进滋养层细胞的增殖。本研究中, 与正常绒毛组织相比, CDX4 在雄源性 CHMs 组织中过表达。因此, 我们的结果

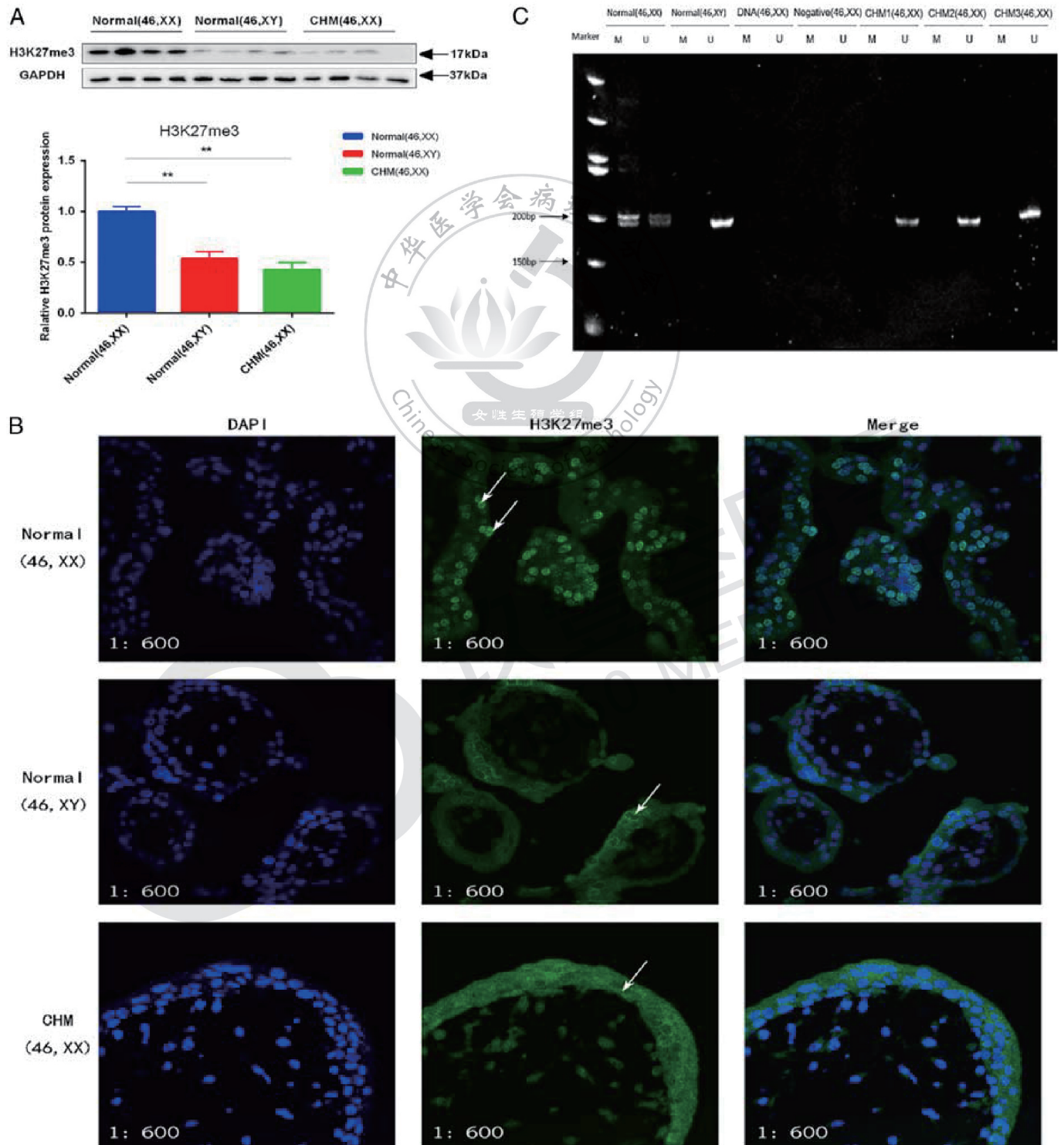


图2. H3K27me3 的表达情况和 HUMARA-MSP 的检测结果。(A) 雄性完全性葡萄胎 (CHMs) 和正常男性胚胎绒毛中 H3K27me3 的表达均低于正常女性胚胎绒毛 ($P < 0.01$)，而雄性 CHMs 和正常男性胚胎绒毛中 H3K27me3 的表达无显著性差异 ($P = 0.268$)。(B) 正常女性胚胎绒毛细胞核内 H3K27me3 染色呈强阳性 (箭头)。雄性 CHMs 和正常男性胚胎绒毛中可见 H3K27me3 呈中等强度的染色，且多位于胞浆 (箭头)；600 \times (C) HUMARA 基因扩增产物大小为 ~ 200 bp。U，用 HUMARA-U 引物扩增的 PCR 产物；M，用 HUMARA-M 引物扩增的 PCR 产物。数据以平均值 \pm SEM 表示，** $P < 0.01$ 。

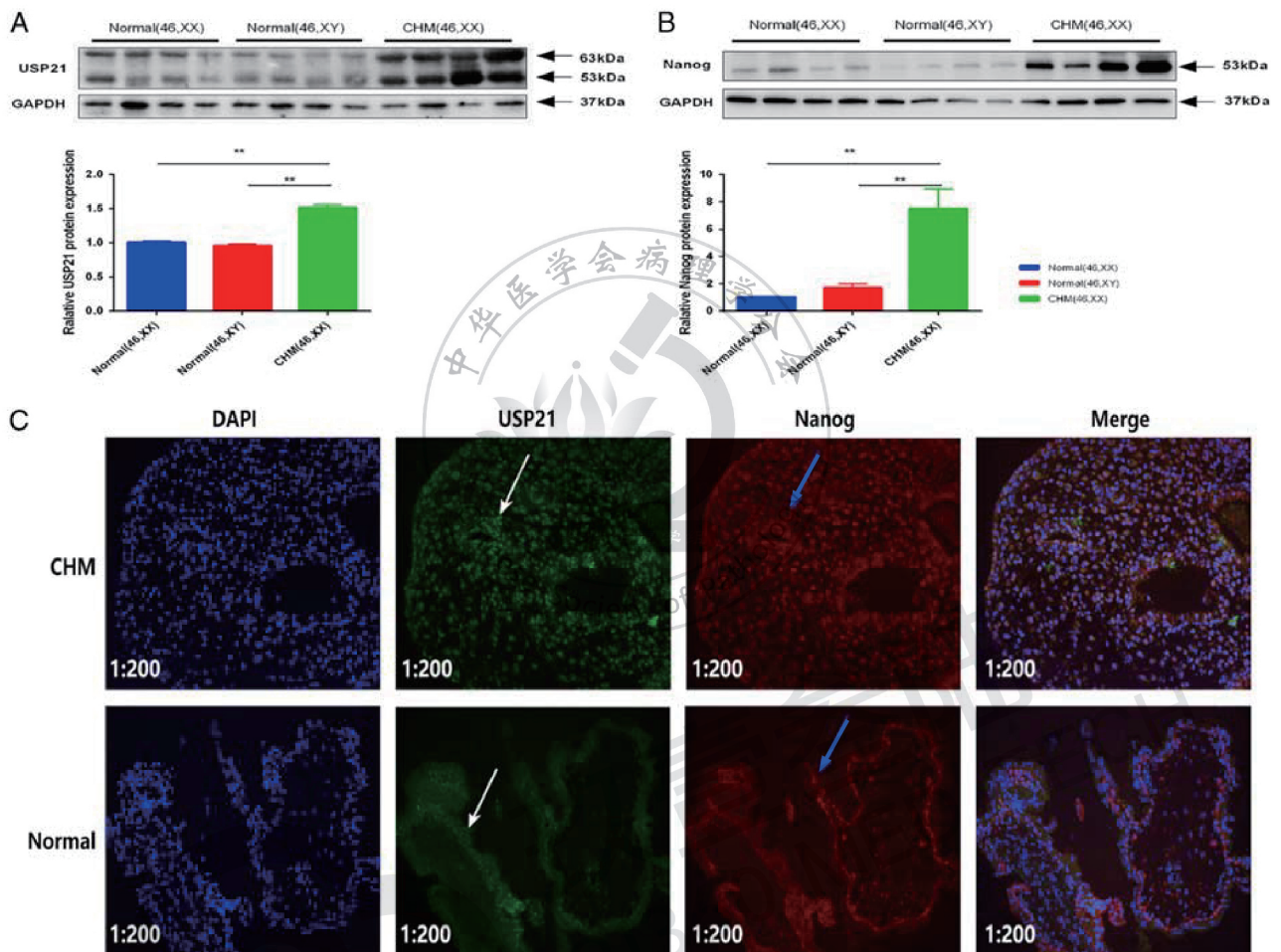


图3. USP21 和 Nanog 的表达情况。(A、B) USP21 和 Nanog 蛋白在雄源性完全性葡萄胎 (CHMs) 中均过表达, 与正常绒毛比较差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。(C) 正常绒毛中 USP21 (白色箭头) 和 Nanog (蓝色箭头) 呈中等程度表达, 主要定位于胞浆。雄源性 CHMs 中 USP21 和 Nanog 呈胞核强表达。免疫荧光分析还显示 USP21 与 Nanog 在雄源性 CHMs (200 \times) 中共定位。数据以平均值 \pm SEM 表示。** $P < 0.01$ 。

提示雄源性 CHMs 中缺乏 XCI 的正常作用机制, XCI 缺乏可能通过诱导 CDX4 过表达而参与雄源性 CHMs 的发生。

泛素化在 XCI 过程中通过稳定多种因子^[27, 28]发挥作用。USP21 是一种被广泛研究的去泛素酶, 已被证实具有去泛素化和稳定 Nanog^[29] 的能力。Nanog 是一种参与 XCI 过程的明星分子, Nanog 可以通过许多方式调节 XCI, 包括通过与 XIST 的第一内含子^[11]结合来调节 XIST 的表达; Nanog 与大约三分之一的 PRC2 结合基因共定位, 这些基因与胚胎发育密切相关^[30]; 并且 Nanog 与包括 SWI-SNF^[31] 和 NuRD^[32] 复合物在内的许多染色质重塑因子相互作用。在本研究中, Nanog 和 UPS21 蛋白在雄源性 CHMs 组织中的表达均高于正常绒毛, 这与早先关于 Nanog 在妊娠滋养细胞疾病中过表

达的描述是一致的^[10]。同时, 我们发现 USP21 与 Nanog 在绒毛组织中共定位。因此, 我们的结果提示, USP21 可能通过稳定 Nanog 而扰乱雄源性 CHMs 的 XCI 进程。

然而, 我们的研究还存在一些不足之处。首先, 早期完全性葡萄胎在刮宫标本中往往只有极少量的绒毛, 并经常与大量的妊娠子宫内混杂在一起, 因此, 无论我们多么小心, 都很难完全避免母体组织的污染, 这在一定程度上可能降低了我们所得“CHMs 中 2 条 X 染色体均为活化状态”结果的可能性。其次, 核型为 46, XX 的雄源性 CHMs 可细分为单精和双精亚型, 虽然它们都是雄源性起源, 但仍有一定的差异, 这在一定程度上影响了我们的研究结果。第三, 由于 CHM 细胞系无法获得, 我们的研究都是在组织中进行的。因此, 尽管我们已经

发现 2 条 X 染色体在雄源性 CHMs 中可能都是激活的, 并且 USP21 和 Nanog 在雄源性 CHMs 中的表达较高, 但我们仍然不知道这些事件是雄源性 CHMs 发生的原因还是雄源性 CHMs 导致的结果。为了更好地理解 CHMs 发生发展的机制, 还需要进一步的研究。

结论

据我们所知, 这是首次表明在核型为 46, XX 的雄源性 CHMs 中, 两条 X 染色体都是激活的, 而且 USP21-Nanog 通路可能破坏了 XCI 进程。这些发现可能是雄源性 CHMs 发生的机制之一。

致谢: 作者对中国浙江省重点研发项目的资助表示感谢。

参考文献

1. Song HZ, Wu PC. Hydatidiform mole in China—a preliminary survey of incidence on more than 3 million women. *B World Health Organ* 1987;65:507–11.
2. Fisher RA, Hodges MD. Genomic imprinting in gestational trophoblastic disease—a review. *Placenta* 2003;S111–S8.
3. Fisher RA, Hodges MD, Rees HC, et al. The maternally transcribed gene p57(KIP2) (CDNK1C) is abnormally expressed in both androgenetic and biparental complete hydatidiform moles. *Hum Mol Genet* 2002;11:3267–72.
4. Lisman BAM, Boer K, Bleker OP, et al. Vasculogenesis in complete and partial hydatidiform mole pregnancies studied with CD34 immunohistochemistry. *Hum Reprod* 2005;20:2334–9.
5. Muneayrici-Delale O, Nacharaju VL, Sidell J, et al. 11betaHydroxysteroid dehydrogenase activity in pregnancies complicated by hydatidiform mole. *Am J Reprod Immunol* 2006;55:415–9.
6. Sharp AN, Heazell AEP, Crocker IP, et al. Placental apoptosis in health and disease. *Am J Reprod Immunol* 2010;64:159–69.
7. Durand S, Dumur C, Flury A, et al. Altered mitochondrial gene expression in human gestational trophoblastic diseases. *Placenta* 2001;64:220–6.
8. Kaare M, Painter JN, Ulander VM, et al. Sex chromosome characteristics and recurrent miscarriage. *Fertil Steril* 2008;90:2328–33.
9. Djuric U, El-Maarri O, Lamb B, et al. Familial molar tissues due to mutations in the inflammatory gene, NALP7, have normal postzygotic DNA methylation. *Hum Genet* 2006;120:390–5.
10. Siu MK, Wong ES, Chan HY, et al. Overexpression of NANOG in gestational trophoblastic diseases: effect on apoptosis, cell invasion, and clinical outcome. *Am J Pathol* 2008;173:1165–72.
11. Navarro P, Chambers I, Karwacki-Neisius V, et al. Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science* 2008;321:1693–5.
12. Liang Y, Zhang X, Chen X, et al. Diagnostic value of progesterone receptor, p16, p53 and pH3 expression in uterine atypical leiomyoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:7196–202.
13. Xiang J, Li Z, Wan Q, et al. A qPCR method to characterize the sex type of the cell strains from rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2016;80:1917–24.
14. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, et al. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992;51:1229–39.
15. Ye F, Jiao J, Zhou C, et al. Nucleotide excision repair gene subunit XPD is highly expressed in cervical squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2012;18:969–75.
16. Hu D, Zhou J, Wang F, et al. HPV-16 E6/E7 promotes cell migration and invasion in cervical cancer via regulating cadherin switch in vitro and in vivo. *Arch Gynecol Obstet* 2015;292:1345–54.
17. Soni S, Rath G, Prasad CP, et al. Fas-FasL system in molar pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2011;65:512–20.
18. Andoh-Noda T, Akamatsu W, Miyake K, et al. Differential X chromosome inactivation patterns during the propagation of human induced pluripotent stem cells. *Keio J Med* 2017;66:1–8.
19. Panning B, Dausman J, Jaenisch R. X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization. *Cell* 1997;90:907–16.

20. Cotton AM, Lam L, Affleck JG, et al. Chromosome-wide DNA methylation analysis predicts human tissue-specific X inactivation. *Hum Genet* 2011;130:187–201.
21. Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 2003;300:131–5.
22. Panova AV, Nekrasov ED, Lagarkova MA, et al. Late replication of the inactive X chromosome is independent of the compactness of chromosome territory in human pluripotent stem cells. *Acta Naturae* 2013;5:54–61.
23. Beck F, Erler T, Russell A, et al. Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn* 1995;204:219–27.
24. Savory JGA, Mansfield M, St Louis C, et al. Cdx4 is a Cdx2 target gene. *Mech Develop* 2011;128:41–48.
25. Keramari M, Razavi J, Ingman KA, et al. Sox2 is essential for formation of trophoctoderm in the preimplantation embryo. *Plos One* 2010;5:e13592.
26. Ralston A, Cox BJ, Nishioka N, et al. Gata3 regulates trophoblast development downstream of Tead4 and in parallel to Cdx2. *Development* 2010;137:395–403.
27. Gontan C, Achame EM, Demmers J, et al. RNF12 initiates X-chromosome inactivation by targeting REX1 for degradation. *Nature* 2012;485:386–90.
28. Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annu Rev Biochem* 2006;75:243–69.
29. Jin J, Liu J, Chen C, et al. The deubiquitinase USP21 maintains the stemness of mouse embryonic stem cells via stabilization of Nanog. *Nat Commun* 2016;7:13594.
30. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, et al. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 2006;125:301–13.
31. Fry CJ, Peterson CL. Chromatin remodeling enzymes: who's on first? *Curr Biol* 2001;11:R185–197.
32. Liang J, Wan M, Zhang Y, et al. Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2008;10:731–9.

(郑兴征 翻译 王文杰 姜彦多 审校)