

围产医学

DOI: 10.11699/cyxb20131011

Dicer 基因在早孕小鼠子宫内膜中的表达

陈 培, 刘尚静, 耿艳清, 何俊琳, 陈雪梅, 丁裕斌, 王应雄, 刘学庆

(重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室, 重庆 400016)

【摘要】目的:检测 Dicer 基因在早孕小鼠子宫内膜组织中的表达规律,为阐明其在胚胎着床中的作用打下基础。**方法:**利用实时荧光定量 PCR、免疫组化和 Western blot 分别检测未孕、假孕及孕 d1~d7 小鼠子宫内膜中 Dicer 基因 mRNA 和蛋白质的表达。**结果:**在小鼠着床窗期及着床后(d4~d7),小鼠子宫内膜中 Dicer 基因 mRNA 和蛋白质表达均明显升高,d5 达到高峰($P_{\text{mRNA}}=0.000$, $P_{\text{蛋白}}=0.000$);且 Dicer 表达主要定位于子宫内膜基质细胞。**结论:**Dicer 基因在早孕小鼠子宫内膜组织中的表达存在时间与空间差异,这种规律性表达所调控的细胞生长、增殖和分化可能是胚胎正常着床的分子机制之一。

【关键词】胚胎着床;子宫内膜;Dicer**【中国图书分类法分类号】**R714.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-3-25

Expression of Dicer in the endometrium of early pregnant mouse

CHEN Pei, LIU Shangjing, GENG Yanqing, HE Junlin, CHEN Xuemei, DING Yubin,

WANG Yingxiong, LIU Xueqing

(Teaching and Research Section of Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression rules of Dicer in the endometrium of early pregnant mouse and to clarify its role in embryo implantation. **Methods:** Real-time fluorescence quantitative PCR, immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expressions of Dicer mRNA and protein in the mouse endometrium from unpregnant, pseudopregnant and pregnant mouse from d1 to d7. **Results:** During the implantation window and after the implantation(d4~d7), expression of Dicer mRNA and protein was significantly higher than that before implantation and expression of d5 was the highest ($P_{\text{mRNA}}=0.000$, $P_{\text{protein}}=0.000$). Moreover, Dicer was demonstrated in endometrial stromal cells. **Conclusions:** There are differences in the time and location of the expression of Dicer in endometrium of early pregnant mouse. Expression rule of Dicer in endometrial stromal cell by regulating cell growth, proliferation and differentiation may be one of the implantation mechanisms.

【Key words】embryo implantation; endometrium; Dicer

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类内源性非编码单链 RNA 分子,它通过与靶 mRNA 的 3' 端非编码区域特异性的碱基互补结合,引起靶 mRNA 的降解或抑制其翻译,参与转录后的基因表达调控^[1]。miRNAs 的表达具有时序性和组织特异性,在生物体发育、细胞生长、凋亡及多种肿瘤疾病中起着重要的调控作用^[2-3]。miRNA 的产生过程首先是 pri-miRNA 在细胞核内被 Drosha-DGCR8 复合体切割成 60~70 nt 的 pre-miRNA,然后再被细胞质中的 Dicer-TRBP 复合体切割成为 20~22 nt 的成熟 miRNAs,进

而调节基因表达。Dicer 酶不仅能催化产生 miRNA,同时也是 miRNA 成功装载进 RNA 诱导沉默复合体的关键^[4]。

胚胎着床是人类和哺乳动物生殖过程中决定着妊娠成功与否的关键环节,成功的胚胎植入受到子宫内膜容受性、囊胚以及母胎同步对话的建立等多因素影响^[5]。在早孕小鼠中,孕 d1~d5 至关重要,其中妊娠 d4、d5 被视为植入期^[6],在此期间,子宫内膜发生相当大的变化,包括细胞快速增殖,血管生成、分化和组织重塑。在子宫内膜和胚泡的同步协调过程中,子宫内膜的改变对于胚胎正常着床具有重要意义。这些变化除受基因自身表达影响外,还与精确的基因表达调控,如 miRNA 有着密切关系。

作者介绍:陈 培,Email:perimini@126.com,

研究方向:胚胎着床的分子机制。

通信作者:刘学庆,Email:a68733172@online.cq.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:31271545)。

在植入前阶段(即从受精至囊胚植入这一发育阶段),作为 miRNA 成熟的关键因子,Dicer 基因在胚胎发育和分化中起重要作用,但在植入过程中,Dicer 基因对子宫内膜作用的研究,目前仍未见报道。

本研究采用实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR,real-time PCR)、免疫组织化学和 Western blot 来定性、定量分析早孕小鼠子宫内膜 Dicer 基因 mRNA 和蛋白质的表达规律,初步探讨它在小鼠胚胎着床过程中的作用,为进一步探讨 Dicer 基因在胚胎着床过程中的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

1.1.1 动物 由重庆医科大学实验动物中心提供[合格证号:SCXK(渝)20050002]清洁级昆明(真孕)小鼠,雌、雄兼用(6~8 周龄,体质量 25~30 g),饲养于重庆医科大学实验动物中心动物房,严格控制温度、湿度,给予自由饮食和饮水,12 h 光照。1 周后选择性成熟的小鼠,按雌:雄比例 2:1 合笼交配,次日晨 8 点检查发现有阴栓者记为真孕妊娠第 1 天(d1),依次计算妊娠天数。随机将孕鼠分为真孕组,包括未孕组,真孕 d1~d7 组共 8 组,每组 16 只。另设一组假孕组:取结扎的雄鼠与雌鼠交配,依前法计算,将假孕组小鼠再分为未孕组、假孕 d1~d7 组共 8 组,每组 16 只。脱颈处死,16 组中均任选 8 只,无菌条件下刮取小鼠子宫内膜,-80 ℃保存;同时,无菌条件下取每组剩余的 8 只小鼠的子宫组织,经 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋组织,切片连续切片,厚度为 4 μm,贴片后经 56 ℃干烤 4 h,用于免疫组化。

1.1.2 试剂 Trizol 裂解液、逆转试剂盒、real-time PCR 试剂盒购自大连宝生物(大连)有限公司;Dicer、β-actin 引物由上海生工生物工程有限公司合成;RIPA 蛋白裂解液购自碧云天公司;预制胶购自文澜阁公司;Dicer 蛋白抗体购自 abcam 公司;β-actin、二抗及免疫组化试剂盒购自中杉金桥。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 采用 Trizol 裂解液抽提子宫内膜,氯仿萃取,异丙醇沉淀,乙醇洗涤,RNase-free 水溶解总 RNA 沉淀,紫外分光光度计测定 RNA 浓度及 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \geq 1.7$ 为合格,取部分 RNA 做琼脂糖凝胶电泳检测完整性,可见明显的 28S 和 18S 2 条带,-80 ℃保存备用。

1.2.2 cDNA 合成 取未降解的总 RNA,按照 TaKaRa 试剂盒说明书逆转录合成 cDNA,反应条件为:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s。

1.2.3 real-time PCR 检测 Dicer mRNA 的表达,相应的 PCR 引物见表 1。采用 β-actin 作为内参,进行归一化处理。每一实验重复 5 次,每次 3 个复孔。反应体系:SYBR green mix 5 μl,

引物上下游各 0.3 μl,cDNA 1 μl,RNase-free H₂O 3.4 μl。反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,循环 40 次,65 ℃ ~95 ℃ 的条件下检测溶解曲线。

表 1 RNA 引物序列

Tab.1 Primer sequences of RNA

引物	引物序列(5'→3')
Dicer	PCR正向引物 TAGACCACCCCTATCGTGAAAT
	PCR反向引物 TGGAAGCAGTTAGTCCCAAAT
β-actin	PCR正向引物 CCTGAGGCTCTTTTCAGCC
	PCR反向引物 TAGAGTCTTTACGGATGTCAACGT

1.2.4 免疫组织化学方法 石蜡切片二甲苯 I、二甲苯 II 脱蜡各 20 min;梯度酒精水化:100%、90%、80%、70%各 3 min,流水冲洗 5 min,蒸馏水水化 5 min;PBS 浸洗 5 min;抗原热修复;去离子水室温孵育 10 min 后 PBS 3 次,每次 3 min,加入免疫组化试剂盒 A 液(封闭用的正常血清),37 ℃孵育 30 min;Dicer 抗体 4 ℃过夜;加入免疫组化试剂盒 B 液(生物素标记羊抗兔 IgG),37 ℃孵育 30 min 后,PBS 3 次,每次 3 min;加入免疫组化试剂盒 C 液(辣根酶标记链酶卵白素工作液),37 ℃孵育 30 min 后,PBS 3 次,每次 3 min;DAB 显色。所有组织切片均在一抗浓度、显色时间一致的前提下进行。工作浓度为 1:500,显微镜下观察,细胞质染为棕黄色者为阳性细胞。

1.2.5 蛋白提取及 Western blot 根据 RIPA 裂解液说明书提取组织总蛋白,用 BCA 蛋白定量法测定总蛋白浓度。预制胶恒压电泳,待分离后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,一抗 4 ℃过夜,PBST 洗 3 次,辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h 后,PBST 洗 3 次,ECL 法显影。

1.3 统计学分析

实验数据采用 Microsoft office 2003 软件录入整理,采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。real-time PCR 结果是以胚胎着床前后 Dicer 拷贝数与 β-actin 拷贝数之比值作为实验结果进行统计。用 Quantity One 软件对 Western 印迹结果图像进行灰度分析。real-time PCR 实验结果和 Western blot 结果均采用单因素方差分析,各组之间相互比较采用 LSD-*t* 法。每个实验至少重复 3 次。实验结果采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 早孕小鼠子宫内膜中 Dicer 的表达

运用 real-time PCR 方法检测了 Dicer 在未孕小鼠、假孕小鼠及真孕小鼠 d1~d7 子宫内膜组织中的表达量,并采用 β-actin 作为参照。结果显示:在真孕组中,各组 Dicer mRNA 表达均出现不同程度的改变(方差分析: $F_{\text{真孕}}=34.781$; $P=0.000$)。与 d1 相比,d4、d5、d6 组 Dicer mRNA 表达显著升高,具有统计学意义($P_{d4}=0.000$; $P_{d5}=0.000$; $P_{d6}=0.000$),其中 d5 达到高峰,d7 组表达略有升高但差异未见统计学意义($P_{d7}=$

0.086), 未孕组表达低于 d1 ($P_{\text{未孕}}=0.037$), d2、d3 组, 未见明显变化 ($P_{\text{d2}}=0.864$; $P_{\text{d3}}=0.853$); 在假孕组中 (方差分析: $F_{\text{假孕}}=24.191$; $P=0.000$), 与 d1 相比, d4、d5、d6、d7 各组 Dicer mRNA 表达出现不同程度的升高 ($P_{\text{d4}}=0.000$, $P_{\text{d5}}=0.000$, $P_{\text{d6}}=0.023$,

$P_{\text{d7}}=0.001$) (图 1、表 2)。

2.2 Dicer 免疫组化结果

运用免疫组化观察 Dicer 在未孕小鼠、假孕小鼠及真孕小鼠 d1~d7 子宫内膜组织中的表达情况。Dicer 阳性表现为

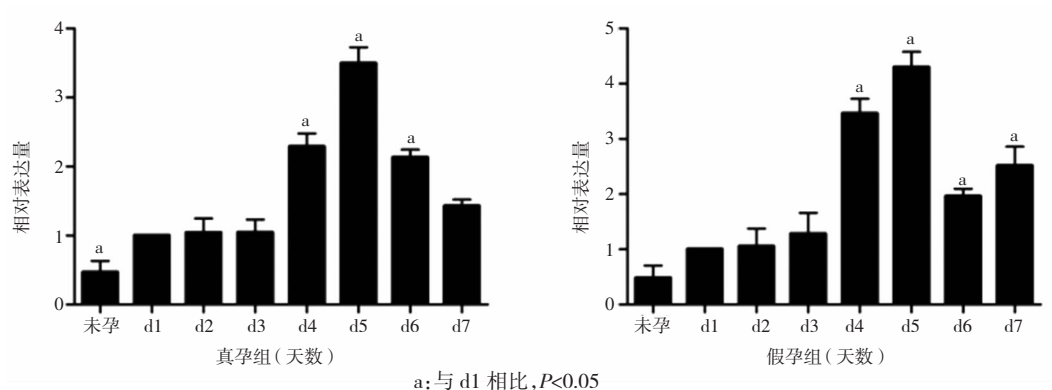


图 1 Dicer 在妊娠不同时期子宫内膜相对表达的柱状图

Fig.1 Histogram of relative expression of Dicer mRNA in the endometrium at different stages detected by real-time PCR

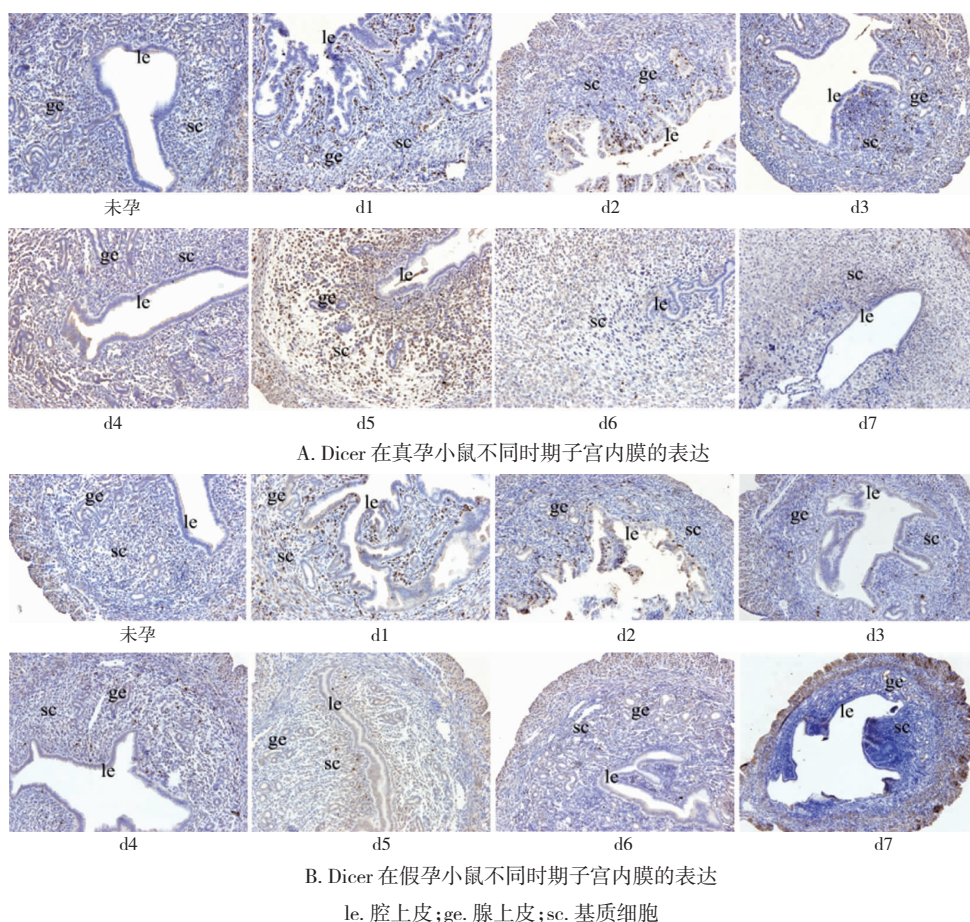


图 2 Dicer 在老鼠子宫内膜的表达 (IHC, 200 ×)

Fig.2 Expression of Dicer in the endometrium of mouse (IHC, 200 ×)

表 2 Dicer 在妊娠不同时期子宫内膜的相对表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Relative expression of Dicer mRNA in the endometrium at different stages detected by real-time PCR ($\bar{x} \pm s$)

分组	未孕	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
真孕组	0.468 ± 0.284	1	1.041 ± 0.359	1.044 ± 0.326	2.289 ± 0.329	3.494 ± 0.405	2.133 ± 0.195	1.427 ± 0.164
假孕组	0.483 ± 0.385	1	1.051 ± 0.576	1.281 ± 0.654	3.461 ± 0.463	4.299 ± 0.485	1.960 ± 0.242	2.516 ± 0.594

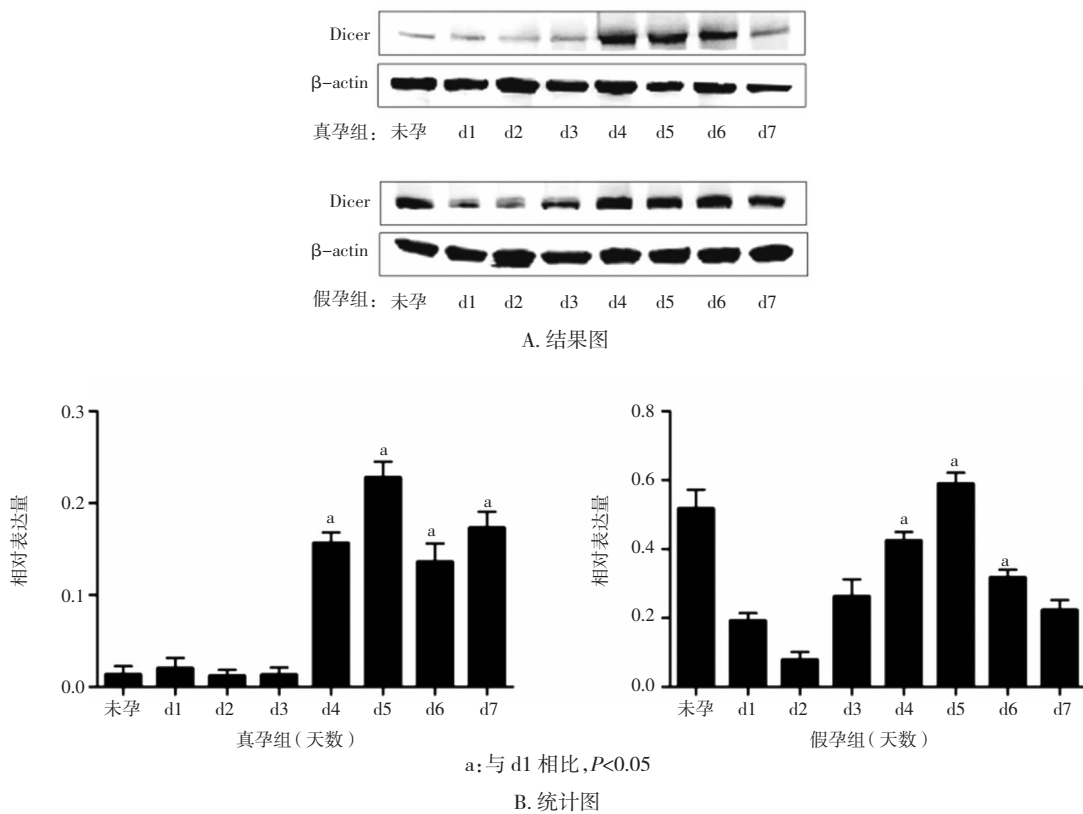


图3 Dicer在早孕小鼠子宫内皮中的表达

Fig.3 Expression of Dicer in the endometrium of early pregnancy mouse

黄褐色。结果显示:在未孕小鼠子宫内皮中,Dicer在腔上皮、腺上皮和基质细胞中均有少量表达;真孕d1子宫内皮基质开始出现Dicer的强表达,到d4、d5子宫内皮上皮及基质均可见Dicer表达显著增强且基质细胞表达强于上皮,一直持续到d6、d7子宫内皮发生蜕膜化(图2A);假孕组小鼠中,d4~d7 Dicer表达明显增强,d4、d5主要表达于基质,d6、d7则主要见于上皮(图2B)。

2.3 Western blot 结果

运用Western blot方法检测了Dicer在未孕小鼠、假孕小鼠及真孕小鼠d1~d7子宫内皮组织中的表达量,并采用 β -actin作为内参。结果显示:在真孕组中,各组Dicer蛋白表达表现出不同程度的改变(方差分析: $F_{真孕}=42.187$; $P=0.000$)。与d1相比,d4、d5、d6、d7组Dicer蛋白表达显著升高,具有统计学意义($P_{d4}=0.000$; $P_{d5}=0.000$; $P_{d6}=0.000$; $P_{d7}=0.000$),d5达到高峰,与real-time PCR结果趋势一致,未孕、d2、d3组未见明显变化($P_{未孕}=0.726$; $P_{d2}=0.674$; $P_{d3}=0.721$);在假孕组中(方差分析: $F_{假孕}=24.402$; $P=0.000$),与d1相比,d4、d5、d6各组Dicer表达出现不同程度的升高($P_{d4}=0.000$, $P_{d5}=0.000$, $P_{d6}=0.022$)(图3)。

3 讨论

胚胎着床是一个复杂的过程,涉及到胚泡与子

宫的相互作用,以及子宫基因的差异性表达。在此过程中,子宫内皮基质细胞从迅速增殖向蜕膜细胞分化,然后又随胚泡发育不断地退化和死亡,为胚胎生长提供充足空间^[7]。Dicer蛋白是参与miRNA或小干扰RNA生物合成及成熟所必须的酶,研究表明,Dicer通过产生miRNA参与细胞增殖、凋亡、分化、细胞周期、个体发育、肿瘤转移等多种事件^[8-9]。随着研究的深入,其在生殖活动中的作用受到进一步关注。在卵母细胞成熟、早期胚胎发育、胚胎干细胞分化、性激素分泌等过程中,Dicer基因发挥了重要的作用^[10-11]。当敲除Dicer时,会导致早期胚胎死亡,胚胎干细胞增殖分化停滞并伴有功能缺陷,以及女性生殖系统结构和功能异常^[12]。

本研究为了阐明胚胎着床前后子宫内皮改变与Dicer的密切关系,利用real-time PCR对Dicer mRNA进行表达检测,结果显示孕鼠植入窗期及植入后(d4~d7)Dicer mRNA表达显著上调,且d5达到高峰。免疫组化结果表明Dicer在d1出现基质的强表达,d4、d5表达增强,且基质细胞强于上皮,一直持续到子宫发生蜕膜化(d6、d7),在表达量与胞

内定位上都存在改变。Western blot 结果显示,与妊娠 d1 相比,d2、d3 组及未孕组 Dicer 蛋白表达量没有明显改变,而 d4、d5、d6、d7 表达明显升高。这些结果说明 Dicer 的表达存在时空差异性,这可能与着床期间子宫内膜的代谢活动旺盛,基质细胞的增殖、凋亡、蜕膜化等行为相关,其作用可能是通过增强以 Dicer 为调控点的促进蛋白质合成、机体代谢及能量释放的 miRNA 表达,以促进小鼠子宫内膜细胞增殖分化,为其提供能量和物质支持。当胚胎完成着床,子宫内膜细胞由增殖向凋亡和蜕膜化转化,此时基质细胞生长增殖减慢,部分发生凋亡和蜕膜化,为胚胎的发育提供适宜的微环境。这一时期小鼠子宫内膜 Dicer 表达量也升高,提示 Dicer 的高表达水平可能与基质细胞生长与增殖减缓的调控、以及促进子宫内膜细胞凋亡的生理过程相关。假孕组小鼠也出现了 Dicer 表达的升高,其表达趋势与真孕组小鼠较为一致,这提示小鼠子宫内膜中 Dicer 表达增高可能受到体内一些生殖激素,如雌激素、孕激素的调控,而与胚胎植入行为无关。

综上所述,本研究发现了 Dicer 基因在早孕小鼠子宫内膜组织中的表达存在时间与空间差异,这种规律性表达所调控的细胞生长、增殖和分化可能是胚胎正常着床的分子机制之一。探索 Dicer 基因在胚胎着床过程中的作用及其分子机制,可为生育调控、生殖疾病及不孕症等相关理论和临床问题提供依据。

参 考 文 献

- [1] Stark A, Brennecke J, Bushati N, et al. Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution of hepatocellular carcinoma in a Turkish population: a case-control study[J]. *J Viral Hepat*, 2011, 18(7): 399-407.
- [4] Lee Y S, Nakahara K, Pham J W, et al. Distinct roles for drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways[J]. *Cell*, 2004, 117(1): 69-81.
- [5] Simon C, Martin J C, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation[J]. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2000, 14(5): 815-826.
- [6] Dey S K. Focus on implantation[J]. *Reproduction*, 2004, 128(6): 655-656.
- [7] Correia-da-Silva G, Bell S C, Pringle J H, et al. Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy[J]. *Placenta*, 2004, 25(6): 538-547.
- [8] Pan Y, Balazs L, Tigyi G, et al. Conditional deletion of Dicer in vascular smooth muscle cells leads to the developmental delay and embryonic mortality[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 408(3): 369-374.
- [9] Zhang L, Volinia S, Bonome T, et al. Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(19): 7004-7009.
- [10] Carletti M Z, Christenson L K. MicroRNA in the ovary and female reproductive tract[J]. *J Anim Sci*, 2009, 87(14s): E29-E38.
- [11] Mattiske D M, Han L, Mann J R. Meiotic maturation failure induced by DICER1 deficiency is derived from primary oocyte ooplasm[J]. *Reproduction*, 2009, 137(4): 625-632.
- [12] Gonzalez G, Behringer R R. Dicer is required for female reproductive tract development and fertility in the mouse[J]. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76(7): 678-688.

(责任编辑:唐秋姗)

《重庆医科大学学报》

欢迎赐稿、订阅

网址: cyxb.alljournals.ac.cn

邮发代号: 78-132