

早孕小鼠胚胎着床前后子宫内膜 microRNAs 差异表达

鲁之中 陈雪梅 曾 兰¹ 何俊琳 王应雄 丁裕斌 黄 玲 刘学庆*

(重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学研究室, 重庆 400016;

¹四川省妇幼保健院产前诊断中心, 成都 610031)

摘要 应用 microRNAs (miRNAs) 芯片筛选早孕小鼠胚胎着床前后子宫内膜差异表达 miRNAs, 进行实时荧光定量 PCR 验证, 运用靶基因预测数据库预测差异表达 miRNAs 调控的靶基因, 为研究其在早孕小鼠胚胎着床过程中的作用打下基础。miRNAs 芯片结果显示: 孕 6 天比孕 4 天上调 miRNAs 有 17 个; 下调 miRNAs 有 18 个。实时荧光定量 PCR 结果显示芯片数据可靠。通过 miRGen、Targetscan、Pictar 等数据库筛查, 初步获得差异表达的部分 miRNAs 多指向与凋亡和抗凋亡相关的靶基因。表明 miRNAs 可能在胚胎着床前后子宫内膜中起重要的调控作用。

关键词 microRNAs; 胚胎着床; 子宫内膜; 微阵列; 实时荧光定量 PCR

MicroRNAs (miRNAs) 是一类高度保守的非编码小 RNA (non-coding small RNA), 一般约为 20~24 nt 的单链型 RNA (少数小于 20 nt), 由一段具有发夹环结构的长度为 70~80 nt 的单链 RNA 前体 (pre-miRNA) 剪切后生成。它们广泛存在于植物、动物以及病毒中^[1]。miRNAs 通过与靶基因 mRNA 分子的 3' 端非编码区域 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 碱基完全或不完全配对引导 RNA 诱导的基因沉默复合物 (RNA-induced silencing complex, RISC) 降解目的 mRNA 片段或是阻碍其翻译^[2], 对靶基因进行转录后表达的调控, 从而参与生命过程中一系列的重要进程, 包括早期发育、细胞增殖、分化与凋亡、物质代谢等。

胚胎着床是一个复杂的生命活动过程, 子宫内膜的正常改变对于胚胎正常着床具有重要意义。而子宫内膜的一系列改变依赖于蛋白质的差异表达。如曾兰等^[3]研究发现妊娠小鼠子宫内膜组织哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 的表达较未妊娠的子宫内膜组织显著增加, 着床窗期表达最高。董艳玲等^[4]研究表明早孕小鼠子宫内膜钙网蛋白的表达明显高于未孕小鼠。根据 miRNAs 可以对基因进行转录后调控的功能, 我们推测 miRNAs 对胚胎着床前后子宫内膜蛋白差异表达有调控作用。本研究应用 miRNAs 芯片筛查了胚胎着床前后子宫内膜组织差异表达的 miRNAs, 并验证部分差异表达的 miRNAs, 预测其靶基因, 为进一步研究其在胚胎着床过程的分子机制中的作用打下基础。也为了解人类生殖过程提供了理

论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级 NIH 小鼠, 6~8 周龄, 体重 25~30 g, 雌雄兼用, 由重庆医科大学实验动物中心提供 [合格证号: SCXK(渝)20050002], 按照光照 14 h, 黑暗 10 h 饲养于实验室动物房, 严格控制温度、湿度, 自由摄食。购回后饲养 1 周, 开始实验。选择性成熟的雌鼠, 按雌: 雄为 2:1 的比例与雄鼠合笼交配, 次晨发现有阴栓者为妊娠第一天, 依次计算妊娠天数。随机将孕鼠分为 2 组 [分别记为孕 4 天 (D4) 和孕 6 天 (D6)]。每组 16 只, 脱颈处死, 无菌条件下取小鼠子宫内膜备用^[3,4]。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及完整性检测 采用 TRIzol 试剂一步法提取子宫内膜总 RNA, 异丙醇沉淀法浓缩 RNA。提取的总 RNA 用 DEPC 处理水溶解, 紫外分光光度法检测总 RNA 纯度及含量, 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.2.2 miRNAs 芯片杂交、芯片扫描及数据分析 由上海康成生物工程有限公司完成。总 RNA 用 miRCURY™

收稿日期: 2009-08-19 接受日期: 2009-11-20

重庆市科委自然科学基金 (CSTC, 2008BB5232)、重庆市教委自然科学基金 (KJ080318) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 023-68485001, E-mail: a68733172@online.cq.cn

Table 1 Primers used to perform real-time RT-PCR of miRNAs

Primers		Sequence (5' → 3')
miR-200b	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA
		GGTATTCGCACTGGATACGACTCATCA
	PCR primer	Forward CCCCTAATACTGCCTGGTAATGA
		Reverse GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-141	RT primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGA
		GGTATTCGCACTGGATACGACCCTTCT
	PCR primer	Forward CCGGGTAACACTGTCTGGTAAAG
		Reverse GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	Forward	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
	Reverse	CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTAT

LNA Array labeling kit (Exiqon, Denmark)使用Cy3按照说明书标记。Cy3标记的RNA用miRCURY™ LNA Arrays (Exiqon, Denmark)进行杂交。通过 Gene Pix 4000B 扫描仪和 Gene Pix 6.0 软件(Axon Instruments, Union City, CA)进行图像扫描和数据分析。

1.2.3 实时荧光定量PCR 为了验证miRNAs芯片的可靠性,进行miRNAs的实时荧光定量PCR。miRNAs的实时荧光定量PCR方法参照Chen等^[5]的方法。相应的PCR引物见表1。采用U6作为内参,进行归一化。

1.2.4 生物信息学分析 应用目前常用miRNAs靶基因预测网站 miRGen^[6]、Targetscan^[7]、Pictar^[8]来检索差异表达miRNAs的预测靶基因。

2 结果

2.1 总RNA提取及质量鉴定结果

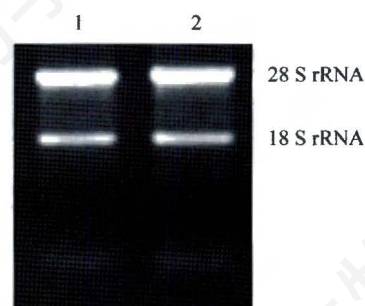
对每个样品进行总RNA浓度检测和甲醛变性凝胶电泳。样品总RNA的 A_{260}/A_{280} 比值在1.8~2.0之间。甲醛变性凝胶电泳,条带清晰,28S与18S RNA条带亮度比接近2:1, RNA完好无降解,质量符合miRNAs芯片的质量要求(图1)。

2.2 胚胎着床前后孕4天和孕6天小鼠子宫内膜差异表达miRNAs

杂交芯片经过扫描和应用 Gene Pix Pro6.0 提取数据后导入Excel中,得到miRNAs表达谱和差异表达miRNAs。结果显示孕6天和孕4天小鼠子宫内膜miRNAs相比较,下调2倍及以上的有18个;上调2倍及以上的有17个(表2)。

2.3 差异表达miRNA的实时荧光定量PCR验证结果

采用实时荧光定量PCR的方法检测了芯片中显示表达下调的mmu-miR-200b和mmu-miR-141在孕4天和孕6天小鼠子宫内膜中的表达,并采用U6进行

**Fig.1** Electrophoregram of total RNA of D6 and D4 mouse endometria

1: RNA of D4; 2: RNA of D6.

Table 2 The differentially expressed miRNAs of D6 and D4 mouse endometria

Number	miRNA	Fold change
1	mmu-miR-199b	0.4569
2	mmu-miR-293*	0.4918
3	mmu-miR-200a	0.2763
4	mmu-miR-10a	0.2529
5	mmu-miR-871	0.4863
6	mmu-miR-138	0.1632
7	mmu-let-7i	0.3696
8	mmu-miR-125b-5p	0.4612
9	mmu-let-7b	0.4116
10	mmu-miR-200b	0.4567
11	mmu-miR-106b	0.4928
12	mmu-miR-199a-5p	0.2055
13	mmu-miR-141	0.2575
14	mmu-miR-135a	0.3723
15	mmu-miR-467b	0.4597
16	mmu-miR-199b*	0.3174
17	mmu-miR-500	0.4597
18	mmu-miR-429	0.1121
19	mmu-miR-146b	11.0873
20	mmu-miR-675-5p	2.2091
21	mmu-miR-193	13.9202
22	mmu-miR-341	2.6159
23	mmu-miR-668	2.4319
24	mmu-miR-720	3.7926
25	mmu-miR-805	2.1237
26	mmu-miR-494	2.0399
27	mmu-miR-183*	2.8177
28	mmu-miR-129-5p	2.8892
29	mmu-miR-714	3.0067
30	mmu-miR-483	2.2392
31	mmu-miR-673-3p	2.1115
32	mmu-miR-9*	3.2218
33	mmu-miR-690	2.0512
34	mmu-miR-21*	2.1890
35	mmu-miR-378	4.6963

Table 3 The fold change of mmu-miR-200b and mmu-miR-141 from real-time RT-PCR and microarray results

miRNA name	D6 : D4 Fold change	
	Real-time RT-PCR	Microarray
mmu-miR-200b	0.2386	0.4567
mmu-miR-141	0.3434	0.2575

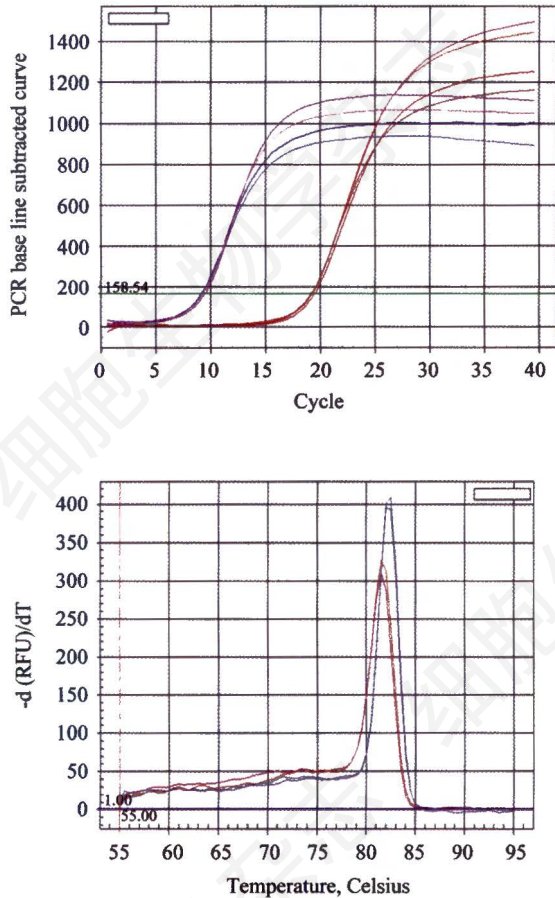


Fig.2 Real-time RT-PCR of mmu-miR-141

归一化处理。miRNAs 定量 PCR 扩增曲线和熔解曲线(图 2), 显示熔解曲线呈单峰, 引物的特异性较好。我们再将芯片结果与荧光定量 PCR 结果进行比较(表 3), 结果显示孕 6 天与孕 4 天相比, mmu-miR-200b 和 mmu-miR-141 表达下调, miRNAs 芯片与定量 PCR 的结果一致, 说明本研究芯片结果真实可靠。

2.4 数据库检索结果

通过互联网上 miRNA 靶基因预测软件(miRGen、Targetscan、Pictar), 输入差异表达 miRNAs, 得到其靶基因。根据在胚胎着床前后调控子宫内膜的基因功能, 我们只列出部分与凋亡和抗凋亡相关的基因(表 4、表 5)。

Table 4 Target genes of partial down-regulated miRNAs (anti-apoptosis associated)

miRNA name	Target gene name
mmu-miR-199b	TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)
	TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3)
	Heat shock 70kD protein 5 (Hspa5)
mmu-let-7i	Apoptosis, caspase activation inhibitor (Aven)
	Interleukin 6 (Il6)
	Interleukin 1 alpha (Il1α)
	Caspase 3 (Casp3)
	B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2)
	Neurotrophin 3 (Ntf3)
	Interleukin 10 (Il10)
mmu-miR-200b	Interleukin 17a (Il17a)
	Angiotensin II receptor, type 1b (Agtr1b)
	Neurotrophin 3 (Ntf3)
	Caspase2 (Casp 2)
	Zinc finger, C3HC type 1 (Zc3hc1)
	Heat shock protein 70kDa family member 9 (HSPA9)
	Heat shock protein 70kDa family member 13 (HSPA13)
	Synovial apoptosis inhibitor 1 (Syvn1)
	Apoptosis inhibitor 5 (Api5)
mmu-miR-141	Activating transcription factor 5 (Atf5)
	Rab6 interacting protein 2 (Rab6ip2)
	B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2)
	Zinc finger, C3HC type 1 (Zc3hc1)
	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha poly peptide (pik3ca)
	Interleukin 31 receptor A (Il31ra)
mmu-miR-135a	Neurotrophin 3 (Ntf3)

Table 5 Target genes of partial up-regulated miRNAs (apoptosis associated)

miRNA name	Target gene name
mmu-miR-146b	Death-associated kinase 2 (Dapk)
	Bcl-associated death promoter (Bad)
	Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105 (Nfkb1)
	Cullin 7 (Cul7)
mmu-miR-378	TAO kinase 2 (Taok2)
	E2F transcription factor 2 (E2f2)
	Programmed cell death 2-like (Pdcd2l)

3 讨论

大多数的哺乳动物 miRNAs 具有调节其他基因表达的活性, 参与生命过程中一系列的重要进程, 对组织形成、细胞生长、分化、凋亡和代谢等生物学过程起时空调控的作用^[9,10]。通过生物计算和实验预测人类基因组编码大约 1 000 个 miRNAs, 调控

约 30% 的蛋白质编码基因^[7,11-13], 这个预测提示有可能所有的细胞通路都被 miRNAs 调控。最近研究表明在 miRNA 敲除的小鼠模型出现表型出现异常, 证明它们作为基因表达调节器的重要作用^[14-17]。

本研究表明在早孕小鼠胚胎着床前后子宫内膜一些 miRNAs 有着明显的差异表达。即孕 6 天和孕 4 天小鼠子宫内膜 miRNAs 相比较, 下调 2 倍及以上的有 18 个, 上调 2 倍及以上的有 17 个。说明 miRNAs 与着床前后子宫内膜改变有着密切的关系。Chakrabarty 等^[18]在研究早孕小鼠 4 天和 1 天子宫内膜 miRNAs 表达差异及调控作用中发现, 有 32 个 miRNAs 上调 1.5 倍以上, 5 个 miRNAs 下调 1.5 倍以上, 并且 miR-199a* 和 miR-101a 两个 miRNAs 共同调控靶基因 Cox-2, 可能在胚胎着床过程中起重要作用。其中上调的 miRNAs 中 miR-199b 在我们的芯片结果中也有差异表达。两者之间 miRNAs 表达存在很大差异的原因可能是由于选取的时间点不同和对差异表达设定的界限不同所致。Hu 等^[19]研究胚胎着床窗期着床点和着床旁 miRNAs 时发现 13 个 miRNAs 上调 2 倍以上, 2 个 miRNAs 下调 2 倍以上, 并且 miR-21 调控靶基因 Reck, 在胚胎着床过程中可能起重要的作用。而我们研究的是早孕小鼠胚胎着床窗期前后子宫内膜 miRNAs 差异表达, 与空间差异表达有着明显的不同。以上研究结果说明 miRNAs 在时间和空间上对早孕小鼠子宫内膜改变的调控, 对于胚胎正常着床具有重要意义。

在胚胎植入过程中子宫内膜细胞发生凋亡, 促进胚泡正常着床^[20]。本研究应用 miRGen、Targetscan、Pictar 等 miRNA 靶基因预测工具, 对从芯片得到的相关数据进行检索。初步发现部分 miRNAs 多指向与凋亡和抗凋亡相关的靶基因(表 4、表 5)。并且靶基因为抗凋亡基因的 miRNAs 孕 6 天与 4 天相比表现为明显下调, 而靶基因为凋亡基因的 miRNAs 孕 6 天与 4 天相比却明显上调。这与胚胎着床前子宫内膜发生凋亡的事实完全相符。表明子宫内膜 miRNA 对凋亡相关基因表达的转录后调控可能具有重要作用。

综上所述, 本研究以 miRNAs 芯片技术, 对胚胎着床前后子宫内膜 miRNAs 表达谱进行了研究, 发现胚胎着床前后子宫内膜一系列上调和下调的 miRNAs 对于胚胎着床可能具有重要作用。而对于专业靶点预测软件得到的与胚胎着床相关的靶基因的 miRNAs 进行进一步功能性分析, 将为今后研究 miRNAs 如何调控其靶基因从而调节胚胎正常着床打下基础。

参考文献(References)

- [1] Cai X, Schäfer A, Lu S, *et al.* Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed, *PloS Pathog*, 2006, 2(3): e23
- [2] Stark A, Brennecke J, Bushati N, *et al.* Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3' UTR evolution, *Cell*, 2005, 123(6): 1133-1146
- [3] 曾 兰, 何俊琳, 丁裕斌, 等。早孕小鼠子宫内膜 mTOR 基因表达增高, *细胞生物学杂志*, 2008, 30(2): 211-216
- [4] 董艳玲, 何俊琳, 刘学庆, 等。早孕小鼠子宫内膜钙网蛋白的表达规律, *细胞生物学杂志*, 2008, 30(3): 372-376
- [5] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179
- [6] Megraw M, Sethupathy, Corda B, *et al.* miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function, *Nucleic Acids Res*, 2006, 35(Database issue): D149-D155
- [7] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets, *Cell*, 2005, 120(1): 15-20
- [8] Krek A, Grün D, Pov MN, *et al.* Combinatorial microRNA target predictions, *Nat Genet*, 2005, 37(5): 495-500
- [9] Quellet DL, Perron MP, Gobeil LA, *et al.* MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all, *J Biomed Biotechnol*, 2006, 2006(4): 69616
- [10] Song L, Tuan RS. MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development, *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2006, 78(2): 140-149
- [11] Berezikov E, Gurtev V, van de Belt J, *et al.* Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes, *Cell*, 2005, 120(1): 21-24
- [12] Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, *et al.* Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs, *Nat Genet*, 2005, 37(7): 766-770
- [13] Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, *et al.* Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals, *Nature*, 2005, 434(7031): 338-345
- [14] Van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, *et al.* Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA, *Science*, 2007, 316(5824): 575-579
- [15] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, *et al.* Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function, *Science*, 2007, 316(5824): 608-611
- [16] Thai TH, Calado DP, Casola S, *et al.* Regulation of the germinal center response by microRNA-155, *Science*, 2007, 316(5824): 604-608
- [17] Zhao Y, Ransom JF, Li A, *et al.* Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2, *Cell*, 2007, 129(2): 303-317
- [18] Chakrabarty A, Tranguch S, Daikoku T, *et al.* MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(38): 15144-15149
- [19] Hu SJ, Ren G, Liu JL, *et al.* MicroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation, *J Biol Chem*,

2008, 283(34): 23473-23484

epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats, *Biol Reprod*, 1987, 36(1): 211-225

[20] Parr EL, Tung HN, Parr MB. Apoptosis as the mode of uterine

The Different Expression of MicroRNAs in Endometrium of Early Pregnant Mouse during Embryo Implantation

Zhi-Zhong Lu, Xue-Mei Chen, Lan Zeng¹, Jun-Lin He, Ying-Xiong Wang,

Yu-Bin Ding, Ling Huang, Xue-Qing Liu*

(Laboratory of the Reproductive Biology, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

¹Prenatal Diagnosis Center of Sichuan Provincial Hospital for Women and Children, Chengdu 610031, China)

Abstract To explore the rule of microRNAs (miRNAs) in endometria of early pregnant mouse, miRNAs microarray was used to investigate the differentially expressed miRNAs in the mouse endometria from pregnant D4 and D6, real-time fluorescence quantitative PCR (RT-FQPCR) was used to confirm the microarray, and we predicted the possible target genes by combination anticipated algorithms. Results showed that there are 17 miRNAs up-regulated in D6 endometria, and 18 miRNAs down-regulated, compared with D4 endometria. The RT-FQPCR results confirmed the microarray results. Through miRGen, Targetscan, Pictar database, we found some target genes of differentially expressed miRNAs, which are associated with apoptosis and anti-apoptosis. This study indicated that miRNAs may play an important role in mouse endometria during embryo implantation.

Key words microRNAs; embryo implantation; endometrium; microarray; real-time fluorescence quantitative PCR

Received: August 19, 2009

Accepted: November 20, 2009

This work was supported by the Natural Science Foundation of Chongqing Science and Technology Commission (CSTC, 2008BB5232) and Natural Science Foundation of Chongqing Municipal Education Commission (KJ080318)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485001, E-mail: a68733172@online.cq.cn