文章编号:1000-5404(2010)15-1663-04

论著

自然流产模型小鼠子宫蜕膜组织 miRNAs 的表达

谭 彬,何俊琳,刘学庆,黎 刚,丁裕斌,陈雪梅,王应雄,余秋波 (400016 重庆,重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学研究室)

【摘要】 目的 寻找自然流产模型小鼠(CBA/J × DBA/2)子宫蜕膜组织与正常妊娠小鼠(CBA/J × BALB/c)子宫蜕膜组织之间差异表达的 miRNAs。方法 建立自然流产小鼠模型和正常妊娠小鼠模型,利用 miRCURY LNA™ microRNA Arrays 10.0 检测两组孕小鼠子宫蜕膜组织 miRNAs 的表达,筛选两组小鼠子宫蜕膜组织差异表达的 miRNAs,并对其进行功能检索和靶基因预测。结果 CBA/J × DBA/2 小鼠胚胎吸收率为 30.9%,CBA/J × BALB/c 小鼠胚胎吸收率为 7.0%,两者差异有统计学意义($P<0.01$)。miRNAs 芯片数据表明流产蜕膜组织和正常蜕膜组织之间有 13 个 miRNAs 存在明显表达差异(ratios≥2.0 或≤0.5),其中表达上调 8 个,表达下调 5 个。预测软件显示 miR-21 和 miR-26a 的靶基因分别是和妊娠相关的 RECK 和 LIF 两个因子。结论 小鼠子宫蜕膜组织 miR-21 和 miR-26a 的差异性表达可能在小鼠胚胎自然流产过程中扮演重要角色。

【关键词】 自然流产;miRNAs;子宫蜕膜;小鼠
【中图法分类号】 R714.21;R322.65;R394.2 【文献标志码】 A

Expression of microRNAs in decidua of spontaneous abortion mouse model

Tan Bin, He Junlin, Liu Xueqing, Li Gang, Ding Yubin, Cheng Xuemei, Wang Yingxiong, Yu Qiubo (Laboratory of Reproductive Biology, College of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 Objective To observe the differential expression of microRNAs in decidua of spontaneous abortion mice (CBA/J × DBA/2) and normal pregnant mice (CBA/J × BALB/c). Methods A spontaneous abortion mouse model and a normal pregnant mouse model were established. Expression of miRNAs in decidua of the two models was detected by miRCURY LNA™ microRNA array 10.0. Differential expression of microRNAs was detected by function analysis and prediction of target genes. Results The embryo resorption rate was significantly higher in the CBA/J × DBA/2 group than in the CBA/J × BALB/c group (30.9% *vs* 7.0%, $P<0.01$). The data on microRNA chip showed that the expression of 13 miRNAs, including up-regulated and down-regulated expression of 8 and 5 miRNAs (ratios ≥ 2.0 or ≤ 0.5) was significantly different in decidual tissue of spontaneous abortion and normal pregnant mice. The prediction software showed that the target genes of miR-26a and miR-21 were LIF and RECK. Conclusion Differential expression of miR-26a and miR-21 in decidua may play an important role in spontaneous abortion of mice.

【Key words】 spontaneous abortion; miRNA; decidua; CBA/J × DBA/2

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500054). Corresponding author: Yu Qiubo, Tel: 86-23-68485778, E-mail: yqb76712@yahoo.com.cn

自然流产的原因除已明确的遗传、免疫、感染及内分泌等影响因素外,尚有许多不确定因素,其关键的调节因子仍不清楚。CBA/J 和 DBA/2 是 2 种常用的小鼠近交品系,与 DBA/2 雄鼠交配的 CBA/J 雌鼠具有自然流产的特点,可以作为一种较为理想、稳定的自然流产小鼠模型[1]。微小 RNAs(microRNAs, miRNAs)是一组生物体基因组编码的内源性非编码小分子 RNA,是一类在生物体中新发现的基因表达调控因子[2]。哺乳动物细胞成熟的 miRNA 长为 22 bp 左右,通过与靶基因 mRNA 的 3′-UTR 非完全配对结合,降解靶 mRNA 或抑制靶 mRNA 翻译两种方式实现对基因表达的转录后调控。本研究以 CBA/J × DBA/2 作为自然流产小鼠模型组,CBA/J × BALB/c 作为对照组,通过 miRNAs 表达谱芯片检测两组小鼠子宫蜕膜组织 miRNAs,以获得差异表达的 miRNAs,并探讨这些差异表达的 miRNAs 对妊娠结局的影响,从小分子 miRNAs 角度揭示自然流产的发病机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 CBA/J 小鼠 20 只、雄性 DBA/2 和 BALB/c 小鼠各 10 只,清洁级,体质量 25 ~ 30 g,8 ~ 10 周龄。购于重庆医科大学

【基金项目】 国家自然科学基金(30500054)
【通信作者】 余秋波,电话:(023)68485778,E-mail:yqb76712@yahoo.com.cn

实验动物中心。

1.2 模型鼠建立

模型鼠的建立参照Jiang等[3]的方法。雌性CBA/J小鼠分别与雄性DBA/2和BALB/c小鼠按雌雄1∶1合笼交配,次日清晨检出阴栓时计为妊娠第1天,分别建立自然流产模型小鼠和正常妊娠小鼠各10只。于妊娠第13天处死CBA/J孕鼠,取胎盘计算胚胎吸收率。

1.3 标本收集

采集子宫蜕膜组织(采集的组织均来自吸收胚胎邻近的正常子宫蜕膜组织),用生理盐水漂洗去掉血液,立即进行下一步总RNA提取。

1.4 总RNA提取

各标本取50~100 mg新鲜子宫蜕膜组织,参照Trizol试剂盒(Invitrogen)说明抽提总RNA;测定总RNA在260、280 nm的光密度值,并进行变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA的纯度和完整性。分别将自然流产组和正常对照组每只小鼠质量合格的总RNA进行组内等量混合,送往上海康成生物公司完成miRNAs的检测。miRNAs芯片为丹麦Exiqon公司的miRCURY LNA™ microRNA Arrays 10.0,该芯片涵盖了小鼠578个miRNAs探针。

1.5 芯片质量控制和数据处理

①芯片内设阴、阳性对照;②每个miRNA设4个重复的检测点,通过标准化方法去除弱信号点,并对每个miRNA的信号值取均值;③进行片间校正;④去除背景干扰;⑤采用Lowess标准化方法标准化信号值,以去除染料强度依赖偏差;⑥对标准化后的miRNA数据,根据ratio(ratios≥2.0或≤0.5)进行差异表达miRNA的筛选。

1.6 结果验证

选取小鼠自然流产蜕膜组织miRNAs芯片检测结果中表达上调的miRNA和表达下调的miRNA各一个进行Real-time RT-PCR和Northern blot验证。Real-time RT-PCR方法参照文献[4]的方法,使用的引物见表1。用内标为snRNA的U6 RNA进行相对定量,采用Roche的FastStart DNA Master SYBR Green Ⅰ Real-time PCR系统。miRNA的Real-time RT-PCR主要步骤为:提取总RNA,加入带茎环结构的逆转录引物对目的miRNA进行逆转录,然后进行Real-time PCR,反应条件:95 ℃10 min,95 ℃10 s、60 ℃35 s(35个循环)。Northern blot参照mirVana™ miRNAIsolationKit (Ambion,Am1560)说明进行操作,U6 RNA作为上样内标。

表1 miR-26a和miR-21的Real-time RT-PCR引物

引物名称	引物序列(5′→3′)
miR-26a	
逆转录引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACATCCGA
Real-time PCR引物	正义链:GCGCTTCAAGTAATCCAGGA
	反义链:GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-21	
逆转录引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAACT
Real-time PCR引物	正义链:GCGCTAGCTTATCAGACTGA
	反义链:GTGCAGGGTCCGAGGT
U6(内标)	
Real-time PCR引物	正义链:CTCGCTTCGGCAGCACA
	反义链:AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.7 差异表达miRNAs功能检索和靶基因预测

通过PUBMED(http://www.ncbi.nlm.nih.gov)对获得的差异表达miRNAs进行功能检索;使用Targetscan、miRanda等预测差异表达miRNAs的靶基因。

1.8 统计学方法

统计自然流产组和正常组小鼠胚胎吸收数,总胚胎数,并计算胚胎吸收率,胚胎吸收率(R)=(被吸收胚胎数/胚胎总数)×100%。采用Excel 2003软件行χ^2检验,计算两者胚胎吸收数是否有显著差异($P<0.01$),以评价模型建立成功与否。

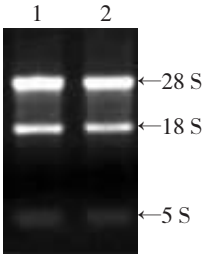
2 结果

2.1 小鼠胚胎吸收率

自然流产组CBA/J×DBA/2小鼠胚胎吸收数21,总胚胎数68,胚胎吸收率为30.9%,显著高于正常组(CBA/J×BALB/c小鼠胚胎吸收数5,总胚胎数71,胚胎吸收率7.0%),两组差异有统计学意义($P<0.01$),表明自然流产小鼠模型建立成功。

2.2 子宫蜕膜总RNA的质量控制

子宫蜕膜组织总RNA的变性琼脂糖凝胶电泳见图1,经分析,RNA完整性好、纯度高,可用于后续研究。



1:自然流产组 2:正常组

图1 两组小鼠子宫蜕膜组织总RNA琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 自然流产子宫蜕膜组织差异表达的miRNAs

miRNAs芯片检测结果显示:相对于正常子宫蜕膜组织,小鼠自然流产子宫蜕膜组织中差异表达的miRNAs(ratios≥2.0或≤0.5)有13个,其中上调表达有8个,下调表达有5个。见表2、3。

表2 自然流产小鼠子宫蜕膜组织中表达上调的miRNAs

序号	miRNAs名称	比值(流产组/正常组)
1	miR-26a	7.363 3
2	miR-200c	6.048 3
3	miR-517a	5.503 8
4	miR-585	5.469 3
5	miR-51b	5.382 5
6	miR-22	4.855 8
7	miR-26b	3.547 2
8	miR-141	2.537 3

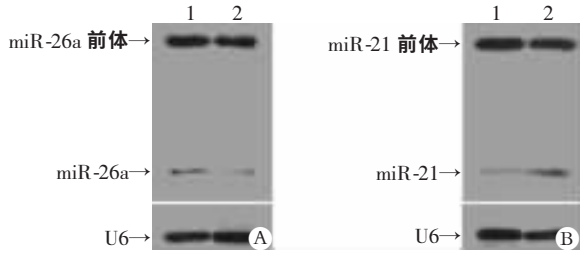
表3 自然流产小鼠子宫蜕膜组织中表达下调的miRNAs

序号	miRNAs名称	比值(流产组/正常组)
1	miR-21	0.104 6
2	miR-106a	0.216 4
3	miR-143	0.351 5
4	miR-500	0.387 8
5	miR-144	0.418 5

2.4 芯片结果验证

我们选取了在自然流产子宫蜕膜中上调表达的miR-26a(Accession:MIMAT0000533)和下调表达的miR-21(Accession:

MIMAT0000530)进行了 Real-time RT-PCR 和 Northern blot 验证。Real-time RT-PCR 结果显示相较于正常组,自然流产组小鼠子宫蜕膜组织中 miR-26a 上调 7.633 倍,miR-21 下调 0.087 倍。Real-time RT-PCR 和 Northern blot(图 2)验证结果与 miRNAs 芯片检测结果基本一致,表明 miRNAs 芯片检测结果是可靠的。



1:自然流产组 2:正常组

图 2　子宫蜕膜组织中 miR-26a(A)和 miR-21(B)Northern blot 结果

2.5　差异表达的 miR-26a、miR-21 调控的可疑靶基因

我们通过 Targetscan、miRanda 等生物学软件对所获得的所有差异表达 miRNAs 进行了靶基因预测,在和妊娠相关的差异表达 miRNAs 中 miR-26a 的种子序列 3′-AUGAACUU-5′可能与白血病抑制因子(leukaemia inhibitory factor,LIF)的 3′-UTR 5′-UACUUGAA-3′配对结合、miR-21 的种子序列 3′-UAUUCGAU-5′可能和回复引导半胱氨酸丰富蛋白 Kazal 基元(RECK)的 3′-UTR 5′-AUAAGCUA-3′配对结合,提示 miR-26a 和 miR-21 的靶基因可能分别是 LIF 和 RECK。

3　讨论

本研究应用 miRNAs 芯片技术检测了自然流产模型小鼠子宫蜕膜组织中的 miRNAs 表达情况,并对 miRNAs 调控的靶基因进行了预测。通过对这些差异表达 miRNAs 及其可疑靶基因的功能分析,我们推测在这些差异表达 miRNAs 中,miR-26a、miR-21 可能在小鼠自然流产过程中扮演了重要角色。

人的 miR-26a 在正常的子宫内膜中有表达,而在异位的子宫内膜不表达,卵巢激素可调节 miR-26a 的表达[5]。miR-26a 还可调节白细胞介素-6(IL-6)的表达,IL-6 是妊娠免疫调节的重要因子,这一过程受到 Zcchc11(zinc-finger,CCHC domain-containing protein 11)的调节[6]。靶基因预测发现,LIF 可能为 miR-26a 所调节的靶基因,miR-26a 的种子序列 3′-AUGAACUU-5′可能与 LIF 基因 3′-UTR 5′-UACUUGAA-3′配对结合,实现对 LIF 的转录后调控。相关研究表明:LIF 为胚胎着床所必需,LIF 基因出现无义突变的雌鼠,其胚胎不能着床[7];LIF 在人自然流产和习惯性流产绒毛组织中均表达下调,提示 LIF 是维持正常妊娠的重要因子[8,9]。在子宫上皮细胞的 LIF 可以活化信号转导与转录激活因子 3(STAT3),并使其发生核易位[10]。子宫内膜的 STAT3 的活性受到抑制后会导致妊娠失败[11],可能的机制是 STAT3 的激活可调节抗凋亡相关蛋白如 Survivin、Bcl-2 和 Mcl-1 的高表达[12-15],而 STAT3 的失活则导致这些蛋白表达下降,蜕膜组织细胞凋亡增加,可能导致自然流产[16]。LIF 还可能调节另一小分子 miR-21 的表达,而 miR-21 调控的靶基因 RECK 与 miR-21 的表达模式相反,即在妊娠第 5 天小鼠子宫着床旁的表达显著高于着床点的表达。RECK 的一个重要功能是抑制基质金属蛋白酶 9(MMP9)的活性,后者在胚胎着床和维持过程中发挥降解细胞外基质、促进胚泡侵袭、促进血管生成等作用,miR-21 的上游增强子内含有两个高度保守的 STAT3 结合位点,有趣的是,通过 Targetscan 预测发现 STAT3 本身也可能为 miR-21 所调控的靶基因[17]。

本研究发现在自然流产小鼠子宫蜕膜组织中 miR-26a 表达增强高,miR-21 表达下调,我们推测 miR-26a 和 miR-21 可能是导致小鼠发生流产的重要调节因子,其可能的机制是:miR-26a 上调表达可使 IL-6 的表达下调,母体对胚胎的容受性下降、免疫排斥增强而导致胚胎流产。此外 miR-26a 的高表达还会引起 LIF 表达下调,进而使 STAT3 活性降低,导致抗凋亡相关蛋白如 Bcl-2 的表达下调,促进蜕膜细胞凋亡增强而导致胚胎流产。同时 STAT3 的下调还会使 miR-21 表达下调,进而引起 RECK 的表达上调,MMP9 表达下调等连锁反应,结果使胚胎侵袭子宫内膜深度受限,胎盘新生血管不足,胚胎正常发育受到影响而可能导致流产。在自然流产小鼠的蜕膜组织中,LIF 是否为 miR-26a 所调控的靶基因,LIF 是否通过 STAT3 途径来调控 miR-21 及 MMP9 的表达,尚需进一步实验研究来证实。

参考文献:

[1] Dixon M E, Chien E K, Osol G, *et al*. Failure of decidual arteriolar remodeling in the CBA/J × DBA/2 murine model of recurrent pregnancy loss is linked to increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2)[J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 194(1): 113-119.

[2] Meola N, Gennarino V A, Banfi S. MicroRNAs and genetic diseases [J]. Pathogenetics, 2009, 2(1): 7.

[3] Jiang P J, Zhao A M, Bao S M, *et al*. Expression of chemokine receptors CCR3, CCR5 and CXCR3 on CD4(+) T cells in CBA/J × DBA/2 mouse model, selectively induced by IL-4 and IL-10, regulates the embryo resorption rate[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122 (16): 1917-1921.

[4] Chen C, Ridzon D A, Broomer A J, *et al*. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33 (20): e179.

[5] Pan Q, Luo X, Toloubeydokhti T, *et al*. The expression profile of micro-RNA in endometrium and endometriosis and the influence of ovarian steroids on their expression[J]. Mol Hum Reprod, 2007, 13(11): 797-806.

[6] Jones M R, Quinton L J, Blahna M T, *et al*. Zcchc11-dependent uri-

dylation of microRNA directs cytokine expression[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(9):1157-1163.
[7] Paiva P, Menkhorst E, Salamonsen L, *et al*. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11:critical regulators in the establishment of pregnancy[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(4):319-328.
[8] 王竹洁,徐键. 白血病抑制因子在自然流产绒毛组织中的表达[J].浙江医学,2005,27(7):496-498.
[9] 王应雄,何俊琳,翁亚光,等.习惯性流产胚胎绒毛细胞LIF基因的表达[J]. 遗传,2001,23(2):111-113.
[10] Cheng J G, Chen J R, Hernandez L, *et al*. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(15):8680-8685.
[11] Catalano R D, Johnson M H, Campbell E A, *et al*. Inhibition of Stat3 activation in the endometrium prevents implantation:a nonsteroidal approach to contraception[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(24):8585-8590.
[12] Isomoto H, Kobayashi S, Werneburg N W, *et al*. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells[J]. Hepatology, 2005, 42(6):1329-1338.
[13] Konnikova L, Kotecki M, Kruger M M, *et al*. Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells[J]. BMC Cancer, 2003, 3:23.
[14] Aoki Y, Feldman G M, Tosato G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases survivin expression in primary effusion lymphoma[J]. Blood, 2003, 101(4):1535-1542.
[15] Jourdan M, Veyrune J L, De-Vos J, *et al*. A major role for Mcl-1 antiapoptotic protein in the IL-6-induced survival of human myeloma cells[J]. Oncogene, 2003, 22(19):2950-2959.
[16] 米亚英,张列转. 自然流产模型小鼠绒毛滋养层细胞凋亡及相关调控蛋白的表达[J]. 生殖医学杂志,2007,16(3):177-181.
[17] Hu S J, Ren G, Liu J L, *et al*. MicroRNA expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation[J]. J Biol Chem, 2008, 283(34):23473-23484.

(收稿:2010-03-11 修回:2010-04-19)
(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2010)15-1666-01

体外受精-胚胎移植后新生儿出生缺陷4例

俞炽阳,龙 玲,王凤英,何 畏,李玉艳,李红梅,屈宗银,李 敏 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

【关键词】 体外受精-胚胎移植;出生缺陷;新生儿结局
【中图法分类号】 R722.1 【文献标志码】 B

随着不孕症患者应用辅助生殖技术助孕治疗的人数日益增多,体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilizatim and embryo transfer,IVF-ET)技术是否增加了胎儿先天性畸形或出生缺陷的问题目前尚无定论[1,2]。我们总结2004年1月至2009年5月我院应用IVF-ET技术后290例临床妊娠患者及已分娩的250例新生儿资料(含双胎55例),结果显示流产、早产95例(其中双胎48例),共发现出生缺陷4例,发生率1.56%,现报告如下。

1 临床资料

病例1:女方35岁,原发不孕2年,月经周期正常,经量中等,因双侧输卵管原因行IVF-ET治疗。男方35岁,原发不育,弱精子症。双方血染色体核型正常,无血型不合,无解脲支原体、肺炎衣原体和病毒等感染史。2006年9月行IVF-ET治疗中给予长方案降调节控制性超排卵(COH),使用的药物包括短效曲普瑞林(达菲林)和基因重组促卵泡素(果纳芬),共获卵6枚行IVF,第3天移植优质胚胎和中等质量胚胎各1枚,14 d后查血绒毛膜促性腺激素(HCG) 355.9 U/L,2006年10月B超提示宫内单胚囊,见血管搏动,后定期产前检查正常。2007年1月孕20周行产前筛查时多维彩超和胎儿超声心动图提示胎儿多发性畸形,2007年3月行引产术,引产一死女婴(新生儿尸检病理结果主要是脊柱四肢畸形、胎儿胸部淋巴瘤、脏器异位、膈疝等),胎儿脐血染色体检查未见异常。

病例2:女方27岁,继发不孕3年,工人,既往曾足月分娩正常新生儿1胎。月经周期正常,因双侧输卵管原因行IVF-ET治疗。男方32岁,工人,弱精子症,乙肝病毒携带者。双方无血型不合和病毒等感染史。于2007年5月行IVF-ET治疗,给予长方案降调节控制性超排卵(COH),使用的药物包括达菲林和果纳芬,共获卵14枚行IVF,第3天移植优质胚胎2枚,14 d后查血HCG 664.23 U/L。2007年6月23日B超提示宫内单胚囊,见血管搏动。产前筛查发现胎儿外观唇腭裂,无胎儿心脏畸形,2008年2月手术产一男婴,体质量3 900 g,外观唇腭裂,一次手术修补成功,目前新生儿生长发育正常。

病例3:女方23岁,原发不孕5年,工人,月经周期正常,因双侧输卵管原因行IVF-ET治疗。无血型不合和病毒等感染史。男方重度少弱精子症。于2009年5月选择单精子卵细胞浆内注射术(ICSI)治疗,给予长方案降调节控制性超排卵(COH),使用的药物包括达菲林和基因重组促卵泡素(普丽康),共获卵17枚行ICSI,第3天移植优质胚胎2枚,14 d后查血HCG 185.79 U/L。2009年6月29日B超提示宫内单胚囊,见血管搏动。2009年10月产前筛查发现胎儿双肾肾窦分离,囊袋扩张畸形,于2009年12月引产一死女婴,尸检病理结果同前,胎儿脐血染色体正常。

病例4:女方24岁,原发不孕4年,因双侧输卵管原因行IVF-ET治疗。于2006年5月行IVF-ET治疗,给予长方案降调节控制性超排卵(COH),使用的药物包括达菲林和普丽康,共获卵8枚行IVF,第3天移植中等质量胚胎2枚,10 d后查血HCG 338.0 U/L。2006年6月26日B超提示宫内多胎妊娠,见血管搏动,产前筛查未发现异常。2007年1月因早产、双胎行手术产一男婴2 800 g(大)和一女婴2 030 g(小),女婴于出生后5个月因先天性心脏病死亡。

(下转1669页)

【通信作者】 俞炽阳,电话:(023)68765406,E-mail:chiyangyu@hotmail.com