

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2008)02-0113-03

## 小鼠着床前胚胎 miR-125a, miR-295 和 miR-181b 的表达

张平, 杨艳红\*, 王晓红, 王珺, 姜峰, 罗亚宁, 姚元庆 (第四军医大学唐都医院妇产科, 陕西 西安 710038)

## Expression of miR-125a, miR-295 and miR-181b in mouse preimplantation embryos

ZHANG Ping, YANG Yan-Hong\*, WANG Xiao-Hong, WANG Jun, JIANG Feng, LUO Ya-Ning, YAO Yuan-Qing

Department of Obstetrics &amp; Gynecology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

**【Abstract】**AIM: To investigate the expression of miRNAs in mouse preimplantation embryos to further elucidate the functions of miRNA on mouse embryo development. **METHODS:** Mouse preimplantation embryos were collected after superovulation. miRNA specific RT primers were used to reversely transcribe the miRNAs, including miR-125a, miR-295, and miR-181b, then miRNAs were amplified by SYBR Green real-time PCR. **RESULTS:** miR-125a, miR-295, and miR-181b were all expressed in mouse preimplantation embryos. With the embryo development, the expression of miR-295 was increased sharply and the expression of miR-125a was waved in differential stages of embryo development. **CONCLUSION:** Mouse preimplantation embryos express miRNAs. These miRNAs might influence the developmental and/or differential processes of mouse embryos preimplantation.

**【Keywords】** micro RNAs; mice; embryonic development

**【摘要】**目的: 研究小鼠着床前胚胎发育过程中 miRNA 表达水平的变化, 探讨 miRNA 对着床前胚胎发育过程的作用。方法: 建立小鼠超排、交配系统, 收集着床前胚胎, 提取 small RNA, 采用 miRNA 特异 RT 引物进行反转录, 采用 SYBR Green 实时定量 PCR 技术, 研究 miR-125a, miR-295 和 miR-181b 在小鼠着床前胚胎发育过程中表达水平的变化。结果: 着床前胚胎发育的各阶段均表达 miR-125a, miR-295 和 miR-181b, 随着胚胎发育进程, miR-295 的表达呈逐渐上升的趋势, miR-125a 在卵母细胞到 2 细胞发育阶段呈下降趋势, 以后随发育进程呈逐渐上升趋势。结论: 小鼠着床前胚胎中表达 miRNA, 着床前胚胎的发育和分化过程可能受到 miRNA 的调控。

**【关键词】** 微 RNAs, 小鼠, 胚胎发育

**【中图分类号】** R321 **【文献标识码】** A

收稿日期 2007-11-06; 接受日期 2007-11-29

通讯作者 姚元庆. Tel: (029) 84777751 Email: yqy@hotmail.com

作者简介: 张平, 硕士生(导师姚元庆), 主治医师. Tel: (029)

85021568 Email: dwzpz@163.com; 杨艳红, 博士, 主治医师. Tel:

(029) 84777690 Email: yangyh701110@yahoo.com \* 同为第一作者

## 0 引言

微小 RNA (miRNAs) 是一类由大约 22 个核苷酸组成的单链非编码 RNA, 在个体发育不同时期有不同的表达模式<sup>[1]</sup>, miRNAs 的特定功能与其表达水平高低及其对下游靶基因的调控作用有关, 研究特定组织和发育的特定阶段 miRNA 的时空表达模式, 是理解其作用的关键步骤, 也是目前分子生物学研究的前沿和热点问题。本研究采用 miRNA 特异的 RT 引物进行反转录, SYBR Green 实时定量 PCR 技术, 研究 miR-125a, miR-295 和 miR-181b 在小鼠着床前胚胎发育过程中表达水平的变化, 探讨了 miRNA 在哺乳动物着床前胚胎发育过程中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 昆白系健康小白鼠, 雌雄兼用, 购自中国人民解放军第四军医大学实验动物中心, 饲养于本院妇产科动物房, 光照、黑暗各 12 h, 严格控制温、湿度, 自由摄食。昆白系 6 wk 雌鼠 (22 ~ 25 g) 购回后饲养 1 wk, 开始实验。昆白系 8 ~ 9 周龄成年雄鼠购回后单笼单放饲养 3 ~ 4 d 后用于交配, 每 2 mo 更换一批。mir Vana™ miRNA Isolation Kit, 购自 Ambion 公司。miR-125a, miR-295 和 miR-181b 特异反转录引物和 PCR 引物以及内参照 5S rRNA 的引物均购自 Ambion 公司的 mirVana™ qRT-PCR Primer Set。定量 PCR 试剂盒 (SYBR Green 染料) 及 Light Cycler 3 定量 PCR 仪为 Roche 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 小鼠着床前胚胎的收集** 挑选发情前期的雌性小鼠于 16:30 腹腔注射 PMSG (7.5 U/只), 注射 PMSG 48 h 腹腔注射 HCG (7.5 U/只), 当晚雌、雄鼠 1:1 合笼交配, 次日清晨看阴栓。于交配后 0.5, 1.5, 2.5, 4.5 d, 分别收集卵母细胞和各发育阶段着床前胚胎<sup>[2]</sup>放入裂解液, -80℃ 保存待用。

**1.2.2 低分子量 RNA 的提取** 采用 mir Vana™ miRNA Isolation Kit 提取总 RNA, 采用 PEG 6000 (购自加拿大 BBI 公司) 分离低分子量 RNA。实验步骤简述如下: 解冻 -80℃ 冰箱保存的胚胎裂解液, 震荡混匀合并同一发育时期的样品, 计算裂解液的体积, 加入

1/10体积的 homogenate additive,上下颠倒混匀,冰上放置 10 min;加入与裂解液等体积的 Acid-Phenol-Chloroform,剧烈震荡 30~60 s,室温静置 2~3 min,12 000 g低温离心 10 min。上清移入新的离心管中,加入等体积异丙醇,0.5  $\mu$ L 糖原上下颠倒混匀,室温静置 30 min,12 000 g 离心 10 min;弃上清用 750 mL/L乙醇清洗沉淀后室温干燥 2~3 min,加入 DEPC 处理过的去离子水 10~15  $\mu$ L,65 $^{\circ}$ C 恒温 5 min。取 2  $\mu$ L 样品分光光度计定量,剩余样品补水至总体积为 50  $\mu$ L 后再加入等体积的 PEG 6000 分离低分子量 RNA<sup>[3]</sup>(含 miRNA),取 20 ng 低分子量 RNA 进行实验。

1.2.3 反转录体系及反应参数 取 20 ng 低分子量 RNA,100U M-MLV(购自 Invitrogen 公司),1  $\mu$ mol/ $\mu$ L miRNA 特异反转录引物,总体系为 10  $\mu$ L 反转录合成 cDNA。先将模板、引物与 H<sub>2</sub>O 混匀后 65 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后置冰上,再加入酶、PCR Buffer 等试剂,反转录参数为 16 $^{\circ}$ C 30 min,37 $^{\circ}$ C 30 min,70 $^{\circ}$ C 10 min 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 荧光定量 PCR 反应体系及反应参数 取 2  $\mu$ L RT 产物为模板及 miRNA 特异性 PCR 引物 1  $\mu$ L,采用定量 PCR 试剂盒(SYBR Green 染料)及 Light Cycler 3 定量 PCR 仪进行 PCR 扩增,反应体系为 20  $\mu$ L,严格按照试剂盒说明书操作。PCR 反应参数 95 $^{\circ}$ C 10 min,1 个循环 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,74 $^{\circ}$ C 读板,共进行 40 个循环。

1.2.6 PCR 产物的 120 mg/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳 取 PCR 产物 4  $\mu$ L 与 2  $\mu$ L 上样缓冲液混匀点样,电泳缓冲液用 1 $\times$ TBE,120 V 电泳 20 min 后 90V 电泳 1.5 h,紫外透射仪下观察,miRNA 预期扩增产物大小均为 90 bp。

统计学处理:Real Time PCR 反应刚刚进入对数期时,原始模板浓度及体系等差异尚未被放大,扩增的目的片断的量可以近似地看作只与起始模板浓度和扩增效率有关。根据上述原理采用 Microsoft Office Excel 对实验数据进行处理,用内参照 5S rRNA 归一化,最后以待检测的 miRNA 的 Ct 值与 5S rRNA 的 Ct 值的比值表示<sup>[4-5]</sup> miRNA 表达的相对量。

## 2 结果

2.1 卵母细胞及着床前胚胎中低分子量 RNA 提取结果 收集卵母细胞约 6000 个,2 细胞胚胎约 7000 个,4~8 细胞胚胎约 6000 个,囊胚约 3000 个。提取样品的总 RNA 采用分光光度计定量,  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  值为 1.7~2.1,分别得到 2~5  $\mu$ g 总 RNA,继续分离后

分别得到约 200~600 ng 的低分子量 RNA,取 20 ng 低分子量 RNA 进行实验。

2.2 qRT-PCR 结果 miRNA 序列短小约 22nt,不同的 miRNA 其 RT 引物及 PCR 引物都是针对特定的 miRNA 序列设计的,反转录引物为类似于 miRNA 前体的茎环结构。由于进行反转录引物带有茎环结构以及 PCR 引物设计只能与 miRNA 特定序列互补,扩增过程中可能会产生引物二聚体或非特异性扩增产物(图 1 中 5 和 6 泳道)影响定量结果。因此,首先需要对荧光定量 PCR 产物进行电泳,miRNA 特异扩增产物大小为 90 bp。PCR 产物经 120 mg/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳,5S,miR-125a 和 miR-295 均只在 90 bp 处有特异的扩增条带,miR-181b 除了在 90 bp 处有特异的扩增条带,在卵母细胞和 4~8 细胞胚胎样品中可见 60 bp 处的非特异性扩增条带,结果见图 1D。

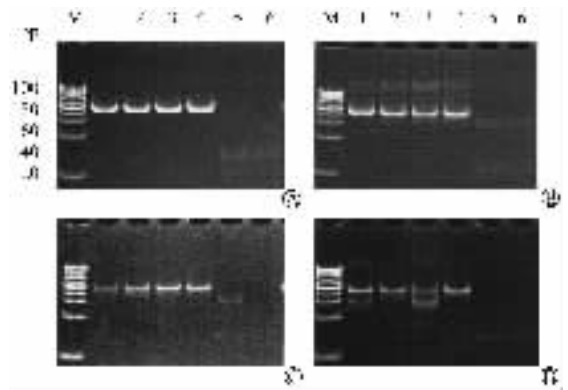


图 1 PCR 产物 120 mg/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果  
A 5S rRNA B miR-125a C miR-295 D miR-181b; M 20 bp DNA Ladder 1 卵母细胞 2 2 细胞胚胎 3 4~8 细胞胚胎 4 囊胚 5 无 RT 产物(有低分子量 RNA)对照 6 无 RT 产物(无低分子量 RNA)对照。

图 1 PCR 产物 120 mg/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

电泳结果表明着床前胚胎发育的各个阶段均表达 miR-125a, miR-295 和 miR-181b, 荧光定量 PCR 结果可以准确定量 miR-125a 和 miR-295 的表达水平。用 5S 进行数据的归一化后,用 miR-295 和 miR-125a 的 Ct 值与 5S 的 Ct 值的比值进行相对定量,得到 miR-295 和 miR-125a 在四个发育阶段的表达水平的变化(表 1);miR-295 的表达呈明显逐渐上升的趋势,miR-125a 在卵母细胞到 2 细胞发育阶段呈下降趋势,以后随发育进程呈逐渐上升趋势。

表 1 miRNA 在着床前胚胎中表达水平的比较

基因	卵母细胞	2 细胞胚胎	4~8 细胞胚胎	囊胚
miR-295/5S	0.000	0.000	0.005	0.008
miR-125a/5S	0.089	0.035	0.056	0.076

### 3 讨论

miRNA 作为基因表达调控的一个重要分子是目前研究热点。大量的研究表明<sup>[6-9]</sup>, 在小鼠着床后胚胎、小鼠胚胎干细胞、中枢神经系统及内耳的发育等过程均表达 miRNA; 在斑马鱼、果蝇和鸡的胚胎及人类胚胎干细胞中 miRNA 的表达模式不同。Krichevskv 等<sup>[10]</sup>的研究还证明哺乳动物脑发育过程与 miRNA 表达的精确调控有关。据此可以看出 miRNA 在胚胎发育、胚层形成和器官分化上起重要作用, 并可以预见 miRNA 在着床前胚胎发育过程中也一定有表达并可能发挥重要的作用。RT-PCR 方法是研究 miRNA 表达最灵敏、可靠的方法。近年来, 设计茎环结构反转录引物进行实时定量 PCR (简称 looped qRT-PCR) 检测 miRNA 表达的方法初步建立, 文献报道该方法最低检测范围可达到纳克级 RNA 样品<sup>[11]</sup>, 对于研究 miRNA 在数量有限的细胞群体 (例如原始生殖细胞等) 的作用有重要意义。

通过系统查阅文献, 我们选择了 miR-125a, miR-295 和 miR-181b 三个基因进行研究。miR-295 是 2003 年由 Houbaviy 等<sup>[12]</sup>在小鼠的胚胎干细胞中克隆到的一簇 miRNA (miR-290 ~ miR-295) 中一个, 并发现 miR-290 ~ miR-295 该簇基因仅在干细胞特异性表达而在其他组织中不表达。小鼠胚胎干细胞来源于小鼠囊胚的内细胞团, 据此推测该簇基因可能在小鼠的着床前胚胎发育中起作用。miR-125 是 Lagos-Quintana 等<sup>[13]</sup>在小鼠脑组织中克隆到的一个与线虫 miRNA Lin-4 具有高度同源性的 miRNA。线虫 Lin-4 是第一个发现的 miRNA 而且与发育关系密切; 目前 miR-125 的靶基因在哺乳动物和果蝇中还未被确认, 但是 miR-125 在果蝇发育过程中的表达具有时序性, 仅在果蝇发育到蛹和成虫阶段表达而在胚胎和幼虫发育阶段不表达。关于 miR-181 的研究, 目前文献报道其主要参与造血细胞的分化过程, 特别是与 B 淋巴细胞的分化有关<sup>[14]</sup>。上述文献都支持 miR-125a, miR-295 和 miR-181b 在鼠类和人的细胞发育和分化中起关键作用。

我们通过采用定量 PCR 方法, 发现在小鼠着床前胚胎中均表达 miR-125a, miR-295 和 miR-181b; 其中 miR-295 在 8 细胞以后发育阶段表达水平明显升高, miR-125a 在卵母细胞到 2 细胞发育阶段呈下降趋势, 以后随发育进程呈逐渐上升趋势; miR-181b 可能由于表达丰度低未能得到定量结果, 仅在终点 PCR 产物电泳结果证实其在各个发育阶段均表达。哺乳动物着床前胚胎发育过程是与其细胞增殖、凋亡和分化相互联系的, 在卵母细胞阶段基因组主要来源

于母源型, 到 2 细胞阶段是合子型基因组的激活, 从 2 细胞到 8 细胞发育阶段主要是卵裂的过程, 而囊胚阶段开始出现细胞的向各个胚层的分化。通过我们的研究, 似乎 miRNA 的表达水平的变化是引起着床前胚胎基因组激活的一个重要方面, miRNA 在着床前胚胎中发挥了极为重要的促进发育和分化的作用, 并可能在胚胎发育过程中母型基因向合子型基因调控过渡的关键事件中起作用。经系统查阅国内外文献目前尚无相关报道, 本研究发现并提出在着床前胚胎中 miRNA 的表达及可能对着床前胚胎发育的作用, 为深入研究 miRNA 在着床前胚胎发育中的功能奠定了基础。

致谢: 衷心感谢香港中文大学韩毅冰博士、杨凌农林科技大学严兴荣博士和北京博奥公司张亮博士在实验过程中给予的热情指导和无私帮助。

#### 【参考文献】

- [1] Zhang B, Wang Q, Pan X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 210(2): 279-289.
- [2] Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, et al. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. Woodbury: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002: 643-645.
- [3] Thomson JM, Parker J, Perou CM, et al. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression [J]. *Nat Methods*, 2004, 1(1): 47-53.
- [4] Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, et al. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up [J]. *Nucleic Acids Res* 2003, 31(20): e122.
- [5] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [6] Takada S, Berezikov E, Yamashita Y, et al. Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(17): e115.
- [7] Mineno J, Okamoto S, Ando T, et al. The expression profile of microRNAs in mouse embryos [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(6): 1765-1771.
- [8] Weston MD, Pierce ML, Rocha-Sanchez S, et al. MicroRNA gene expression in the mouse inner ear [J]. *Brain Res* 2006, 1111(1): 95-104.
- [9] Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development [J]. *Science*, 2005, 309(5732): 310-311.
- [10] Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, et al. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 857-864.
- [11] Lao K, Xu NL, Yeung V, et al. Multiplexing RT-PCR for the detection of multiple miRNA species in small samples [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 343(1): 85-89.
- [12] Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs [J]. *Dev Cell*, 2003, 5(2): 351-358.
- [13] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, et al. New microRNAs from mouse and human [J]. *RNA*, 2003, 9(2): 175-179.
- [14] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [J]. *Science*, 2004, 303(5654): 83-86.