

小鼠植入前胚胎 *MuERV-L* 基因表达特征研究

邵根宝, 高爱民, 徐银学, 丁红梅, 贾超, 刘红林*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 利用实时定量 RT-PCR 技术, 对体外培养的小鼠植入前胚胎发育过程中鼠内源逆转录病毒样基因 (*MuERV-L*) 的表达进行研究, 并通过 appdicolin (DNA 复制抑制剂)、TSA (组蛋白去乙酰化酶特异性抑制剂) 分别抑制 1-细胞期 DNA 的复制和合子基因组激活 (ZGA) 过程中组蛋白去乙酰化, 探索 *MuERV-L* 基因表达的变化。结果表明: *MuERV-L* 基因的转录在受精后 9~11 h 快速启动, 并在 2-细胞阶段出现瞬时高表达。抑制试验显示: 1-细胞期 DNA 的复制受抑制后, *MuERV-L* 基因的转录也被显著抑制 ($P < 0.05$); 在 TSA 处理的 4-细胞胚胎中, *MuERV-L* 基因显著高表达 ($P < 0.01$), 且其水平达到正常 2-细胞的转录水平。提示: 该基因可能对小鼠胚胎 ZGA 过程起重要作用。

关键词: 小鼠; 胚胎; 鼠内源逆转录病毒样基因 (*MuERV-L*); 实时定量 RT-PCR; 基因表达

中图分类号: S826.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2007) 04-0087-05

Expression of *MuERV-L* mRNA in the preimplantation mouse development

SHAO Gen-bao, GAO Ai-min, XU Yin-xue, DING Hong-mei, JIA Chao, LIU Hong-lin*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The pattern of murine endogenous retrovirus-like gene (*MuERV-L*) mRNA expression was examined in the early preimplantation development of mice, using real-time RT-PCR technique. Effect of DNA replication and histone deacetylation on the zygotic genome activation (ZGA) of mouse *in vitro* fertilization (IVF) embryos was also investigated using 1-cell embryos treated with appdicolin and TSA, which inhibit DNA replication and the activities of histone deacetylase, respectively. The results indicated that transcription of the *MuERV-L* gene was rapidly activated from 9 to 11 h after IVF, then transiently increased during the 2-cell stage. In the inhibition experiment, *MuERV-L* gene transcription was downregulated significantly following DNA replication repressed in the 1-cell stage. Moreover, high expression of *MuERV-L* mRNA was observed in 4-cell embryos treated with TSA, and the transcriptional level of *MuERV-L* gene in 4-cell embryos achieved the same that in the normal 2-cell embryos. Conclusion: *MuERV-L* plays an important role in the ZGA of mouse embryos.

Key words: mouse; embryo; murine endogenous retrovirus-like gene (*MuERV-L*); real-time RT-PCR; gene expression

哺乳动物植入前胚胎的发育经历了受精卵的卵裂、合子基因组激活 (zygotic genome activation, ZGA)、紧密化 (compaction) 以及囊胚形成等阶段。基因在植入前胚胎发育过程中正确和恰当的时空表达是胚胎正常发育的前提^[1]。研究植入前胚胎在不同发育阶段的基因表达模式不仅可以提供胚胎正常发育相关的重要基因信息, 而且还有助于深入了解由于基因异常表达所致各种疾病的分子机制^[2]。

鼠内源逆转录病毒样基因 (murine endogenous retrovirus-like gene, *MuERV-L*) 最早在鼠胎盘中被发现^[3], 随后在其他哺乳动物胎盘中也发现有 *MuERV-L* 或其同系物的存在^[4]。*MuERV-L* 属内源逆转录病毒 (endogenous retrovirus, ERV) 基因家族, 其对小鼠胚胎植入前、植入过程中, 以及植入后的早期发育起着重要的作用^[3]。对 *MuERV-L* 基因结构的研究发现, 该基因内部缺乏一种形成包膜 (envelope, env) 的结构, 导致其基因产物不能形成病毒颗粒而穿过细胞膜, 因此, *MuERV-L* 的功能仅限于胞内发挥作用^[5-6]。

最近, Costas^[7]通过对 GenBank 中 dbEST 数据库的 cDNA 序列分析发现, *MuERV-L* 基因的转录起始

收稿日期: 2006-06-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371034)

作者简介: 邵根宝, 博士研究生。* 通讯作者: 刘红林, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物发育遗传学研究,

E-mail: liuhonglin@263.net。

于 1-细胞期。但是, *MuERV-L* 基因在小鼠植入前胚胎中的表达情况仍不清楚。本试验通过实时定量 RT-PCR 技术, 对 *MuERV-L* 基因在小鼠植入前胚胎中的表达进行研究, 以建立小鼠体外培养胚胎在早期发育各阶段特异性基因表达的模式, 为哺乳动物胚胎发育的分子调控机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

昆明白鼠品系 (体重 16 ~ 19 g) 购自南京市青龙山动物繁殖中心。雌雄分笼饲养在人工控温室 (22 ~ 25 °C) 和人工光照 (14 L/10 D) 条件下, 自由饮水和采食。饲养 3 ~ 5 d, 调节生理周期, 使其适应环境。

1.2 试验方法

1.2.1 体外受精和胚胎的收集 挑选生长健康的 3 周龄雌性昆明小白鼠, 于腹腔内每只注射 10 IU 孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG), 间隔 48 h 每只再注射人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotrophin, hCG) 10 IU。注射 hCG 后 14 ~ 16 h 从输卵管膨大部取卵置于 200 μ L 的 mWM (modified Whitten medium) 培养液中培养。从体重为 40 g 左右成熟雄鼠的附睾尾部挑取一小滴浓密的精子, 放入 400 μ L 的 mWM 中获能培养 1 ~ 1.5 h。获能培养结束后, 将适量的精子悬液缓慢加入含有卵子的微小液滴中 (精子含量保持在 2×10^6 mL⁻¹ 左右)。受精 5 h 后, 用 CZB (Chatot-Ziomek-Bavister) 培养液洗 3 次, 再移入 100 μ L 新鲜 CZB 培养液中, 于 5% CO₂ 培养箱 37 °C 进行发育培养。

分别从受精后 6、9、11、13、15、17 和 19 h 的培养液中收集胚胎; 在 15、36、46、64 和 96 h 分别获取 1-、2-、4-、8- 细胞期阶段和囊胚期胚胎; 在 23 h 收集 trichostatin A (TSA, 组蛋白去乙酰化酶特异性抑制剂)、aphidicolin (DNA 复制抑制剂)、 α -amanitin (RNA 合成抑制剂, Sigma, USA) 处理的胚胎。具体方法见参考文献 [8]。

1.2.2 mRNA 分离提纯 取小鼠卵子和各发育阶段胚胎各 30 枚, 参照黄琼晓等^[9]的方法, 用 TRIzol (Invitrogen, USA) 试剂分离 mRNA, 然后用分光光度计定量, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 实时定量 RT-PCR 参照 Zeng 等^[10]的方法, 确定 RT-PCR 反应体系的最佳条件。RT 反应体系 (20 μ L): 0.5 μ g \cdot μ L⁻¹ oligo-dT 随机引物 (Promega, USA)、10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 混合物 (Promega, USA)、1 \times RT Buffer、0.1 mol \cdot L⁻¹ DTT、40 U MMLV-RT 酶 (GIBCO, USA) 和 20 U RNasin (Sigma, USA)。反应程序: 42 °C 60 min, 52 °C 30 min, 94 °C 3 min。实时定量 PCR 方法参考文献 [9], 使用 Light Cycler PCR 仪 (MJ ResearchTM, USA), 试剂为 SYBR Green I (Invitrogen, USA)。PCR 反应体系 (25 μ L): 1.25 μ L 10 \times SYBR Green I、1.2 μ L 第 1 链 cDNA、2.5 μ L Buffer、0.3 μ L MgCl₂ (250 mmol \cdot L⁻¹)、1 U *Taq* DNA 聚合酶 (Promega, USA)、0.75 μ L dNTPs (10 mmol \cdot L⁻¹) 和 0.2 μ mol \cdot L⁻¹ 上、下游引物 (上海博亚公司合成, 序列见表 1)。反应程序: 95 °C 变性 1 min; 94 °C 30 s, 52 ~ 58 °C 30 s, 72 °C 40 s, 45 个循环; 68 ~ 94 °C 绘制溶解曲线。电泳检测 PCR 扩增情况。

1.2.4 基因定量 采用 α -globin 基因作为内参照, 阴性对照以双蒸水代替模板 DNA 或 *Taq* DNA 聚合酶, 用相对标准曲线法进行基因的定量^[11]。

1.2.5 TSA、 α -amanitin 和 aphidicolin 处理 用 100 nmol \cdot L⁻¹ TSA 抑制组蛋白去乙酰化作用, TSA 溶解在 1 mmol \cdot L⁻¹ DMSO 中, -20 °C 保存; α -amanitin (11 μ g \cdot mL⁻¹) 用来抑制合子基因组中 mRNA 的合成, α -amanitin 溶解在 PBS (pH 7.2, 1 mg \cdot mL⁻¹) 中, -20 °C 保存; 采用 aphidicolin (1.5 μ g \cdot mL⁻¹) 抑制 1-细胞阶段 DNA 的复制, aphidicolin 溶解在 DMSO (1 mg \cdot mL⁻¹) 中, -20 °C 保存。

表 1 引物序列

Table 1 Oligonucleotides used as primers for PCR reaction

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	片段大小/bp Fragment size
<i>MuERV-L</i>	5'-ttctcaaggccaccaatag-3'; 5'-gacacctttttaactatgagct-3'	324
α -globin	5'-gcagccacgggtggcgagtat-3'; 5'-gtgggacaggagcttgaat-3'	257
β -actin	5'-gagggggaaatcgtgcgtgacatcaa-3'; 5'-ggaaccgctcgttgccaatagta-3'	158

2 结果与分析

2.1 体外受精胚胎的发育

本研究采用常规的体外受精方法，用 CZB 培养液进行体外培养。结果表明：95% (133/140) 的胚胎发育到 2-细胞期，82.9% (116/140) 的胚胎能发育到 4-细胞期，囊胚期的发育率达到 51.4% (72/140) (图 1)。

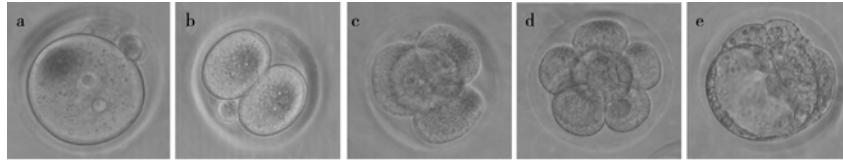


图 1 体外受精各发育阶段胚胎 (×200)

Fig. 1 Embryos at various stages in *in vitro* fertilization (IVF) (×200)

a: 雌雄原核胚 Female and male pronucleus; b: 2-细胞胚胎 Two-cell embryo; c: 4-细胞胚胎 Four-cell embryo; d: 8-细胞胚胎 Eight-cell embryo; e: 囊胚 Blastocyst

2.2 *MuERV-L* 基因在植入前小鼠胚胎中的表达

实时定量 RT-PCR 结果显示：*MuERV-L* 基因在卵子中不表达，转录起始于 1-细胞期，在 2-细胞阶段出现暂时高表达，随后急剧下降，到囊胚阶段仅有微弱表达 (图 2)。

为了进一步确定 *MuERV-L* 基因转录的起始时间，分别检测受精后 6 ~ 19 h 胚胎中 mRNA 的表达变化。结果表明：*MuERV-L* 基因的转录在受精后 9 ~ 11 h 快速启动，并在 13 ~ 15 h 出现短暂增加 (图 3)。

2.3 植入前胚胎 *MuERV-L* 基因瞬时表达的细胞周期调控

MuERV-L 基因在 2-细胞阶段出现瞬时高表达。为证实这种表达量的增加是由 ZGA 过程中转录物的增加所引起，采用 α -amanitin 处理 1-细胞期胚胎，结果发现 *MuERV-L* 基因在 ZGA 过程中的转录被完全抑制 (图 4)。此外，在 1-细胞期的 G₁ 和 S 期分别加入 aphidicolin，发现 G₁ 和 S 期处理的胚胎中 *MuERV-L* 基因的转录均被显著抑制，但 S 期处理胚胎的转录抑制程度比 G₁ 期要低得多 (图 5)。

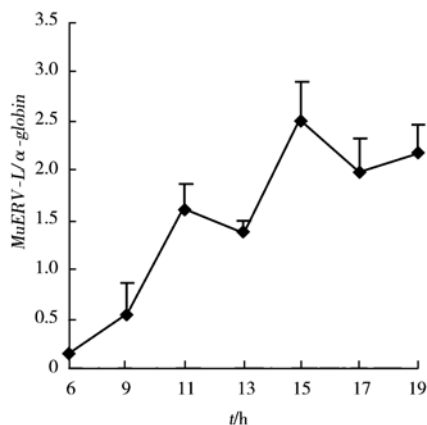


图 3 受精后 6 ~ 19 h *MuERV-L* 基因的转录
Fig. 3 Activated expression of *MuERV-L* gene from 6 to 19 h after IVF

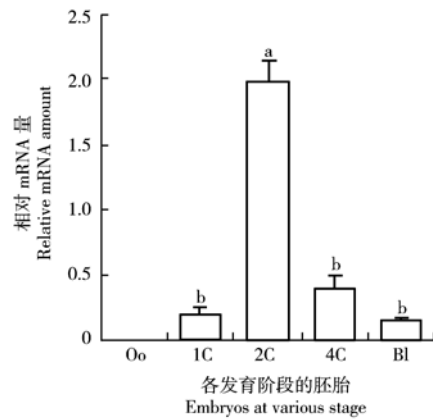


图 2 *MuERV-L* 基因在植入前胚胎中的表达

Fig. 2 Temporal pattern of *MuERV-L* mRNA expression in the preimplantation embryos

1) Oo: 卵子 Oocyte; 1C: 1-细胞胚胎 One-cell embryo; 2C: 2-细胞胚胎 Two-cell embryo; 4C: 4-细胞胚胎 Four-cell embryo; Bl: 囊胚 Blastocyst.
2) 不同字母代表不同组间差异显著 ($P < 0.05$)。Bars with different letters are significantly different. The same as follows.

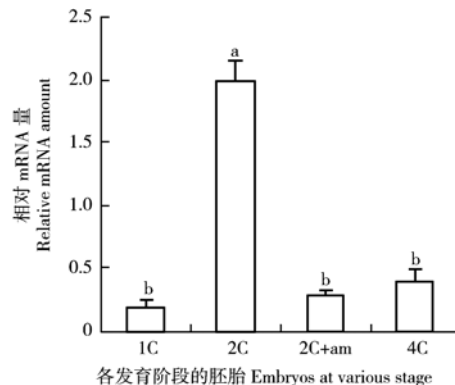


图 4 *MuERV-L* 基因表达的变化

Fig. 4 Changes in the relative amount of *MuERV-L* transcriptions

2C + am: 在 1-细胞期添加 α -amanitin ($11 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，体外培养到 2-细胞期。One-cell embryos were cultured in the addition of α -amanitin ($11 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) to the two-cell stage.

2.4 组蛋白乙酰化对 *MuERV-L* 基因表达的影响

在小鼠胚胎的合子基因组激活过程中, 诱导组蛋白高度乙酰化能够减弱由于染色质结构的重塑引起的转录抑制作用。本试验采用 TSA 处理 2-细胞胚胎, 结果发现, *MuERV-L* 基因在处理的 4-细胞胚胎中显著高表达 ($P < 0.05$), 且处理的 4-细胞胚胎的转录水平达到正常 2-细胞转录水平 (图 6)。

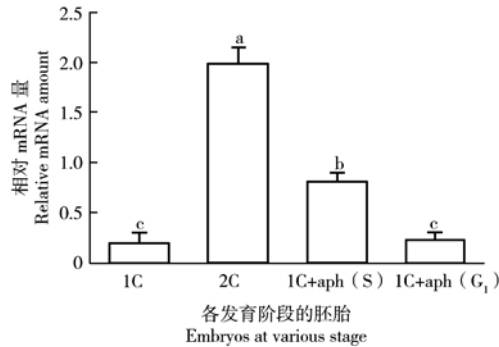


图 5 DNA 复制对 *MuERV-L* 基因表达的影响

Fig. 5 Effect of inhibiting the first round of DNA replication on expression of *MuERV-L*

1C + aph: 在注射 hCG 后 20 h (1C + aph (G₁)) 或 30 h (1C + aph (S)) 添加 aphidicolin ($1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 体外培养到 2-细胞期 (注射 hCG 后 44 h)。Aphidicolin ($1.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) was added at 20 h post-hCG (1C + aph (G₁)) or 30 h post-hCG (1C + aph (S)). The relative amount of *MuERV-L* transcript present in these treated and untreated embryos was determined 44 h post-hCG (2C).

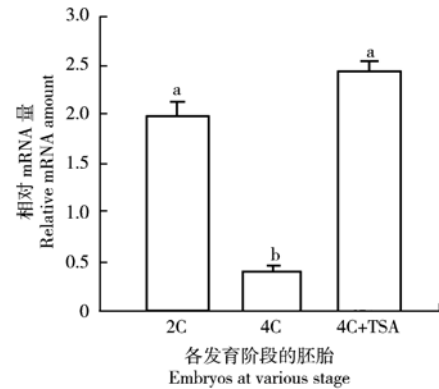


图 6 TSA 对 *MuERV-L* 基因表达的影响

Fig. 6 Effect of TSA on the expression of *MuERV-L*

4C + TSA: 在 2-细胞期添加 TSA ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 体外培养到 4-细胞期。Two-cell embryos were collected and cultured in the presence of $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TSA until the embryos were at the 4-cell stage.

3 讨论

30 年前在人类及其他哺乳动物胎盘中就发现 ERV, 然而 *MuERV-L* 基因只是最近才在鼠胎盘中被发现^[3]。Wang 等^[12]利用 GenBank 中 dbEST 数据库信息研究发现, *MuERV-L* 基因在 2-细胞阶段瞬时表达, 随后降到极低水平。本研究表明, *MuERV-L* 基因的转录在受精后 9~11 h 快速启动, 并在 2-细胞阶段出现瞬时高表达。此结果显示, *MuERV-L* 基因的转录比已报道的几种基因 (如: *HSP*_{70.1} (注射 hCG 30 h) 和 *U2afp-rs* (注射 hCG 39 h) 等) 的表达还要早^[13-14]。由此推测 *MuERV-L* 基因可能对小鼠胚胎 ZGA 过程起重要作用。

本研究采用 DNA 合成抑制剂 (aphidicolin) 抑制 1-细胞期 DNA 复制, 结果 *MuERV-L* 基因的表达显著减少。然而, Christians 等^[13]在 C57BL6 X CBA 的一代杂交鼠中发现, 在注射 hCG 后 22~24 h 采用 aphidicolin 处理受精胚, 结果对 *HSP*_{70.1} 的表达没有显著影响。

小鼠的合子基因组激活 (ZGA) 出现在 2-细胞阶段, 在 ZGA 启动同时, 伴随着广泛的染色质结构重塑, 从而形成一种转录抑制环境。有研究发现, 这种转录抑制作用能够通过诱导组蛋白高度乙酰化而消除^[15]。此外, Worrad 等^[16]用 TSA 处理小鼠 2-细胞胚胎, 以此诱导组蛋白乙酰化, 结果发现组蛋白 H₄ 的乙酰化及一些转录需要复合物 (transcription requiring complex, TRC) 的表达均显著增加。在本试验中, 采用 TSA 诱导组蛋白高度乙酰化, 导致 *MuERV-L* 基因的表达也显著增加。因此, 这种表达量的增加可能是由于基因内部的重复序列或 TRC 的表达增加所引起。

本研究只建立了 *MuERV-L* 基因在小鼠植入前胚胎中的表达模式, 然而 *MuERV-L* 基因在核移植胚胎中的表达模式有待于建立, 目前正在进一步的分析和研究。此外, *MuERV-L* 基因在小鼠胚胎发育中的功能也有待于研究。

参考文献:

- [1] de Sousa P A, Caveney A, Westhusin M E, et al. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors [J]. *Theriogenology*, 1998, 49: 115-128
- [2] Ponsuksili S, Wimmers K, Adjaye J, et al. A source for expression profiling in single preimplantation bovine embryos [J]. *Theriogenolo-*

- gy, 2002, 57: 1611–1624
- [3] Benit L, de Parseval N, Casella J F, et al. Cloning of a new murine endogenous retrovirus, *MuERV-L*, with strong similarity to the human HERV-L element and with a gag coding sequence closely related to the Fv1 restriction gene [J]. *J Virol*, 1997, 71: 5652–5657
- [4] Benit L, Lallemand J B, Casella J F, et al. ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals [J]. *J Virol*, 1999, 73: 3301–3308
- [5] Harris J R. Placental endogenous retrovirus (ERV): structural, functional, and evolutionary significance [J]. *Bioessays*, 1998, 20: 307–316
- [6] Rajkovic A, Matzuk M M. Functional analysis of oocyte-expressed genes using transgenic models [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187: 5–9
- [7] Costas J. Molecular characterization of the recent intragenomic spread of the murine endogenous retrovirus *MuERV-L* [J]. *J Mol Evol*, 2003, 56: 181–186
- [8] Kim J M, Liu H L, Tazaki M, et al. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis [J]. *J Cell Biol*, 2003, 162: 37–46
- [9] 黄琼晓, 徐晨明, 金帆, 等. 小鼠植入前胚胎对输卵管上皮细胞 DNA 甲基转移酶 1 表达的影响 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2005, 22(4): 364–367
- [10] Zeng F, Baldwin D A, Schultz R M. Transcript profiling during preimplantation mouse development [J]. *Dev Biol*, 2004, 272: 483–496
- [11] Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68: 236–243
- [12] Wang Q, Chung Y G, de Vries W N, et al. Role of protein synthesis in the development of a transcriptionally permissive state in one-cell stage mouse embryos [J]. *Biol Reprod*, 2001, 65: 748–754
- [13] Christians E, Campion E, Thompson E M, et al. Expression of the *HSP_{70.1}* gene, a landmark of early zygotic activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription [J]. *Development*, 1995, 121: 113–122
- [14] Latham K E, Rambhatla L, Hayashizaki Y, et al. Stage-specific induction and regulation by genomic imprinting of the mouse *U2afbp-rs* gene during preimplantation development [J]. *Dev Biol*, 1995, 168: 670–676
- [15] Schultz R M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo [J]. *Hum Reprod Updat*, 2002, 8: 323–331
- [16] Worrall D M, Turner B M, Schultz R M. Temporally restricted spatial localization of acetylated isoforms of histone H4 and RNA polymerase II in the 2-cell mouse embryo [J]. *Development*, 1995, 121: 2949–2959

责任编辑: 周广礼