

缺失 PUF 家族基因的卵母细胞可以成熟和受精

陈霞,朱梦怡,苏友强,徐宇君*

(南京医科大学生殖医学国家重点实验室,江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:研究 PUF 家族基因[Pumilio1(Pum1)和 Pumilio2(Pum2)]在雌性生育能力和生殖细胞减数分裂过程中的作用。方法:在 Pum1 基因位置携带 loxP 位点的 Pum2 基因全敲鼠的基础上,利用生殖细胞特异性表达的 Cre-Vasa-Cre 介导 Pum1 基因条件性敲除,以此获得 Pum 基因双敲小鼠模型 Vasa-cre;Pum1^{EF} Pum2^{-/-}(VDKO)。同时,对 Pum 基因双敲小鼠进行生殖表型分析。结果:①交配实验结果表明,雌性 VDKO 小鼠的生育能力显著下降,但仍可以产生后代;②VDKO 小鼠卵母细胞体外成熟过程不受影响。结论:Pum 蛋白不影响小鼠卵子发生发育过程。

[关键词] Pum;VDKO;卵母细胞;育性

[中图分类号] R339.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)07-774-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160702

Effects of removal of oocyte PUF family genes on female fertility and oocyte maturation

Chen Xia, Zhu Mengyi, Su Youqiang, Xu Yujun Eugene*

(State Key Laboratory of Reproductive Medicine, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of PUF family genes [Pumilio1 (Pum1) and Pumilio2 (Pum2)] in female fertility and meiotic maturation. **Methods:** We deleted the Pum genes by breeding mice harboring loxP sites in Pum1 (Pum1^{EF} Pum2^{-/-}) with DEAD box polypeptide 4 (Vasa) promoter-mediated Cre recombinase mice (VDKO). Meanwhile, we analyzed the phenotype of VDKO mice. **Results:** Fertility test showed that female fertility of VDKO mice was reduced, but the mice could still produce offspring. However, *in vitro* meiotic maturation of VDKO oocytes was not affected. **Conclusion:** Pum proteins were not essential for mouse folliculogenesis or oocyte development.

[Key words] Pum;VDKO;oocyte;fertility

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(07):774-777]

最近研究发现, RNA 结合蛋白可能在动物发育和细胞增殖分化过程中发挥重要作用,但是多数 RNA 结合蛋白的功能尚有待发现。PUF 家族蛋白是一类高度保守的 RNA 结合蛋白家族,它们主要影响了基因表达的负性调控作用。PUF 家族蛋白广泛分布于真核生物,从酵母、线虫、果蝇到小鼠和人均存在同源基因,并对其生殖发育起着重要作用。在秀丽隐杆线虫中, PUF 蛋白可以通过调控 fem-3 来控制其精子向卵子的转变过程^[1]。与此同时, PUF 蛋白还与秀丽隐杆线虫生殖干细胞的自我更新和减数

分裂的阻滞有关^[2]。在果蝇中, Pumilio 蛋白的功能也与线虫相似^[3-5]。而在蟾蜍中, Pum 蛋白能够通过 Pumilio 同源结构域结合靶标 mRNA 3'非翻译区(3'UTR)区域上的高度特异性序列,并促进脱腺苷化和脱帽的过程,最终导致翻译减少,从而调控卵母细胞的成熟过程^[6-7]。斑马鱼中的 Pum1 蛋白主要调控 Cyclin B1 mRNA 形成 RNA 颗粒,从而进一步调控其靶标 mRNA 的翻译^[8]。在人和其他哺乳动物中主要存在两种 PUF 蛋白——Pum1 蛋白和 Pum2 蛋白。有研究报道, Pum1 蛋白可以通过 P53 通路来维持生殖细胞的稳态。在 Pum1 基因敲除小鼠中,精子数目和生育能力都显著降低,睾丸中精母细胞的凋亡明显增多^[9]。而 Pum2 突变会导致雄性小鼠睾丸减小,但其生育能力却没有明显改变^[10]。根据以上

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973)计划(2013CB945201);
国家自然科学基金(81270737)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xuyujun@njmu.edu.cn

研究报道可以发现,PUF 蛋白在生殖细胞发育过程中扮演了重要角色。但 PUF 蛋白在雌性哺乳动物中的功能还不是很清楚。鉴于 Pum 基因在蟾蜍卵细胞和斑马鱼卵细胞中都具有重要作用,以及我们前期研究也发现 $Pum1^{-/-}$ 、 $Pum2^{-/-}$ 雌性小鼠的生育能力均下降,并结合 Pum 蛋白在卵母细胞、卵丘细胞和壁层颗粒细胞中的表达情况,都提示需要构建 Pum 基因双敲小鼠来系统地研究 Pum 蛋白在雌性生育能力及卵母细胞发育过程中的生理作用。

1 材料和方法

1.1 材料

Vasa-cre 小鼠购自美国 Jackson 实验室; $Pum1^{F/F}$ $Pum2^{-/-}$ 由本课题组构建,野生型雄鼠购于南京医科大学医药实验动物中心,均为 FVB、C57BL/6 和 129svj 杂交品系。所有实验小鼠均在稳定的环境中饲养,温度 20~22℃;湿度 50%~70%;光照周期 12 h/12 h;食物和水不限量供应。动物使用经南京医科大学伦理委员会同意。

1.2 方法

1.2.1 Pum 基因双敲小鼠构建

在胚胎期利用 Vasa-cre^[11],在 $Pum2$ 基因全身

性敲除背景上条件性地敲除 $Pum1$ 基因。为了得到 Pum 基因双敲小鼠,进行如下交配,F0 代用 Vasa-cre/+ 雄鼠与 $Pum1^{F/F}$ $Pum2^{-/-}$ 雌鼠交配,得到 F1 代 Vasa-cre/+ $Pum1^{F/+}$ $Pum2^{+/-}$ 再与 $Pum1^{F/F}$ $Pum2^{-/-}$ 回交,得到 Vasa-cre/+ $Pum1^{F/-}$ $Pum2^{-/-}$ (VDKO),同时以同窝 Vasa-cre/+ $Pum1^{F/+}$ $Pum2^{+/-}$ 为对照。

1.2.2 育性实验

取成年 VDKO 或对照雌鼠(6 周龄)分别各与 1 只雄鼠(8 周龄以上)进行合笼,并在合笼后跟踪检栓,自见栓之日起开始计时,持续交配 4 个月,记录产仔窝数及每窝小仔数。

1.2.3 子代基因型鉴定确定 $Pum1$ 已在基因组水平敲除

取小鼠脚趾或鼠尾,加入 200 μ L 50 mmol/L 氢氧化钠在沸水中水浴 30 min,水浴结束后,加入 20 μ L 1 mol/L Tris-HCl (pH0.8),取 1 μ L DNA 进行 PCR 扩增。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,根据对应片段长度鉴别基因型。 $Pum1$ 基因型鉴定使用 KOF1、KOR1 和 LOXGTR 3 种引物同时反应, $Pum2$ 使用 XE7GT149、XE7GT131R 和 XEGT308 3 种引物同时反应。鉴定用引物见表 1,由苏州金唯智生物科技公司合成。

表 1 基因型鉴定引物

Table 1 Primers for genotype identification

基因	引物(名称)		序列(5'→3')	产物长度(bp)
Vasa-cre	Vasa-cre-F	F	CACGTCAGCCGTTTAAGCCGCGT	250
	Vasa-cre-R	R	TTCCCATTTCTAAACAACACCCTGAA	
Pum1	KOF1	F	CATGAGTTTGGGAGGCATTT	
	KOR1	R	GTGGCTAACAACTGCTGCAA	Delet:557
	LOXGTR	R	GTCTTGTGGCAACTAGGGTA	WT:361;Flox:453
Pum2	XE7GT131R	F	AAATGGCACCCATCATTGTT	
	XE7GT149	R	ACCAGCGTTTCTGGGTGA	WT:460
	XEGT308	R	CCGTTGTCTGCAGTGTCTGT	Mut:280

1.2.4 卵母细胞体外成熟

21~23 日龄实验用雌鼠腹腔注射 5 U 的孕马血清促性腺激素(PMSG),46~48 h 后人性化颈椎脱臼法处死小鼠,取出卵巢置于加有抑制剂米力农的培养液中。小心用针刺破卵巢使卵丘卵母细胞复合体流出后用口吸管吹打,使卵丘细胞从卵母细胞上分离,获得完整的形态较好的卵母细胞。用不含米力农的培养液清洗除去卵细胞上的米力农,最后同时将 VDKO 组和对照组卵细胞置于培养液中培养,并每隔 15 min 观察计数生发泡破裂率 (germinal vesicle breakdown,GVBD),每隔 1 h 计数第一极体排出率 (polar body extrusion,PBE)。

1.3 统计学方法

所有结果均采用 GraphPad Prism 统计软件进行分析。育性实验的计数以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,资料服从近似正态分布,指标间的比较采用成组 t 检验分析,率的比较采用卡方检验。 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VDKO 雌性小鼠可育但生育能力显著下降

为了明确在卵母细胞中缺失 Pum 基因是否对小鼠有影响,首先进行 VDKO 雌鼠交配实验。6 只实验鼠及 4 只同背景对照小鼠于 6 周龄时分别与

成年野生型雄鼠进行交配,连续交配 4 个月后进行统计。研究发现虽然 VDKO 小鼠可育,但生育能力显著下降,每窝产仔数比对照组减少 52.29% ($P < 0.01$,图 1),不过产仔周期没有明显变化。育性实验结果表明,VDKO 雌性小鼠不能完全阻断子代,胚胎正常发育,但是后代数目显著减少。

2.2 基因组水平验证 Pum1 基因是否被敲除

在 Pum1 基因的第 8 号和第 11 号外显子之间设计 1 对引物。在野生型小鼠中,由于 DNA 片段过长而无法检测到。当 Pum1 基因被敲除时,由于第 9 号和第 10 号外显子的缺失,可以鉴定到 1 条 557 bp 左右的 DNA 条带,即敲除条带。对 VDKO 雌鼠与野生型雄鼠交配后得到的子代进行基因型鉴定,发现子

代 ($n=21$) 小鼠中均检测到敲除条带,其基因型为 $Pum1^{+/-}$,表明在基因组水平 VDKO 雌鼠的 Pum1 基因确实已经被敲除(图 2)。

2.3 VDKO 雌性小鼠的卵母细胞体外成熟不受影响

在蟾蜍中,由于 Pum 蛋白与卵细胞成熟相关,且在前期实验中发现,敲除 Pum1 基因可以影响小鼠卵母细胞的成熟。为了在双敲小鼠中验证 Pum 基因是否也对卵细胞成熟有影响,对 VDKO 和同背景对照小鼠进行了卵母细胞体外成熟实验。研究结果表明,VDKO 雌性小鼠 GVBD、PBE 与对照相比均没有显著差异(图 3)。

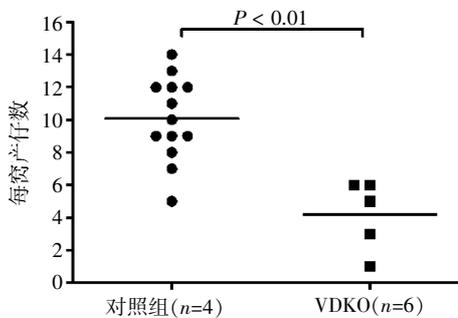
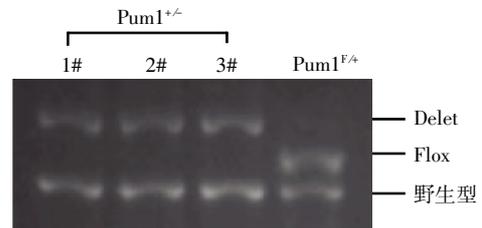


图 1 VDKO 与对照组每窝产仔数比较

Figure 1 Size of litters sired by VDKO and control



子代基因型鉴定结果,在 $Pum1^{+/-}$ 小鼠(杂合子)中可以检测到敲除条带(557 bp)和野生型条带(361 bp),在 $Pum1^{F/F+}$ 小鼠(对照)中只检测到 FloX 条带(453 bp)和野生型条带(361 bp)。1#、2# 和 3# 代表得到的 3 只子代 $Pum1^{+/-}$ 小鼠。

图 2 Pum1 在 VDKO 雌性小鼠卵细胞的基因组水平得到有效敲除

Figure 2 Pum1 was effectively knocked out in the oocytes of VDKO female mouse at genomic level

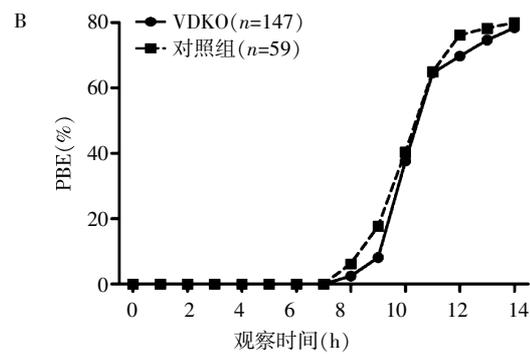
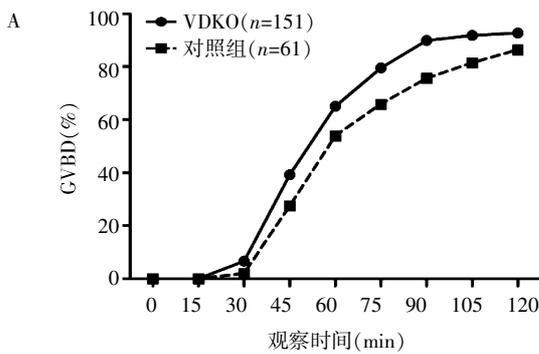


图 3 VDKO 与对照组卵母细胞体外成熟 GVBD 和 PBE

Figure 3 Comparison of the kinetics of GVBD and PBE after release from milrinone

3 讨论

在低等生物的卵母细胞中,Pum 蛋白在翻译水平参与调控。例如,在蟾蜍卵母细胞中,Pum2 蛋白通过与 RINGO/Spy mRNA 相互作用来抑制 mRNA 的翻译,从而在卵母细胞成熟过程中起到必不可少的作用^[6-7]。此外,Pum 蛋白在蟾蜍卵母细胞中也能抑制另一种靶标 mRNA——Cyclin B1 来调控卵母细胞的成熟^[12-13]。在斑马鱼中,Pum1 蛋白能够与

Cyclin B1 mRNA 特异性结合并形成一种特殊的颗粒,称之为 RNA 颗粒。RNA 颗粒的形成和解体能够调控 Cyclin B1 mRNA 翻译的起始时间,这都提示 Pum1 蛋白参与了翻译调控的重要过程^[8]。在低等动物中的很多研究都提示,Pum 蛋白在雌性生殖系统中尤其是卵母细胞的成熟过程中发挥重要作用。但是在哺乳动物中,尚无报道证实 Pum 蛋白是否影响卵子的发生过程。

前期在卵巢组织和各种不同卵巢细胞中观察

了 Pum 基因的表达水平,研究结果显示 Pum mRNA 在卵细胞中高表达,而在 GV 期卵母细胞中几乎检测不到其表达,这是因为 Pum1 和 Pum2 mRNA 的翻译在卵母细胞中完全受到抑制,因此 PUF 家族基因可能属于第二类卵母细胞翻译调控的基因,即 mRNA 在 GV 期被抑制,但翻译在 M II 被激活^[14]。因此有必要建立将 Pum1 和 Pum2 两个基因同时敲除的小鼠模型。利用生殖细胞特异性表达的 Cre,在卵母细胞中系统地研究 Pum1 基因和 Pum2 基因对卵泡发生和发育所起的作用,并尝试揭示 Pum 蛋白介导的转录后调控的分子机制。

本研究得到 VDKO 小鼠后发现,雌性 VDKO 小鼠的生育能力显著降低,而其卵母细胞的成熟却不受影响。这提示 VDKO 小鼠卵泡发生发育正常,成熟卵子能与精子正常结合且不影响子代胚胎发育。这些结果表明,Pum 蛋白可能并不是雌性生殖细胞所必须的。此外,VDKO 雌性生育能力显著下降也可能与 Vasa-cre 介导的条件性敲除在部分非生殖组织中低水平表达而导致小鼠个体减小相关^[11]。因此今后可利用没有体细胞泄漏的卵细胞特异性的 Cre,如 Gdf9-cre 进行研究,以排除体细胞泄漏带来的育性影响。总之,本研究结果提示了利用敲除动物模型来研究重要调控因子的重要性。通过建立 Pum1 基因和 Pum2 基因单敲和条件性双敲模型,为系统研究翻译调控对哺乳动物生育能力和卵泡发生发育过程的影响提供了良好的平台。

[参考文献]

- [1] Zhang B, Gallegos M, Puoti A, et al. A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line [J]. *Nature*, 1997, 390 (6659): 477-484
- [2] Kraemer B, Crittenden S, Gallegos M, et al. NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the spermatocyte switch in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(18): 1009-1018
- [3] Lin H, Spradling AC. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary [J]. *Development*, 1997, 124 (12): 2463-2476
- [4] Forbes A, Lehmann R. Nanos and pumilio have critical

roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells [J]. *Development*, 1998, 125(4): 679-690

- [5] Parisi M, Lin H. The *Drosophila* pumilio gene encodes two functional protein isoforms that play multiple roles in germline development, gonadogenesis, oogenesis and embryogenesis [J]. *Genetics*, 1999, 153(1): 235-250
- [6] Padmanabhan K, Richter JD. Regulated pumilio-2 binding controls RINGO/spy mRNA translation and CPEB activation [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(2): 199-209
- [7] Cao QP, Richter JD. Pumilio 2 controls translation by competing with eIF4E for 7-methyl guanosine cap recognition [J]. *RNA*, 2010, 16(1): 221-227
- [8] Kotani T, Yasuda K, Ota R, et al. Cyclin B1 mRNA translation is temporally controlled through formation and disassembly of RNA granules [J]. *J Cell Biol*, 2013, 202(7): 1041-1055
- [9] Chen D, Zheng W, Lin A, et al. Pumilio 1 suppresses multiple activators of p53 to safeguard spermatogenesis [J]. *Curr Biol*, 2012, 22(5): 420-425
- [10] Xu EY, Chang R, Salmon NA, et al. A gene trap mutation of a murine homolog of the *Drosophila* stem cell factor Pumilio results in smaller testes but does not affect litter size or fertility [J]. *Mol Reprod Dev*, 2007, 74(7): 912-921
- [11] Gallardo T, Shirley L, John GB, et al. Generation of a germ cell-specific mouse transgenic Cre line, Vasa-Cre [J]. *Genesis*, 2007, 45(6): 413-417
- [12] Nakahata S, Katsu Y, Mita K, et al. Biochemical identification of *Xenopus* Pumilio as a sequence-specific cyclin B1 mRNA-binding protein that physically interacts with a Nanos homolog, Xcat-2, and a cytoplasmic polyadenylation element-binding protein [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (24): 20945-20953
- [13] Nakahata S, Kotani T, Mita K, et al. Involvement of *Xenopus* Pumilio in the translational regulation that is specific to cyclin B1 mRNA during oocyte maturation [J]. *Mech Dev*, 2003, 120(8): 865-880
- [14] Chen J, Melton C, Suh N, et al. Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(7): 755-766

[收稿日期] 2016-05-05