

· 基础研究 ·

分化抑制因子 Id3 对雌性小鼠生育能力的影响

文习东,张弛,何元林,李晶*

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:通过构建 Id3-Gdf9 条件性敲除(CKO)小鼠并研究雌性小鼠的表型,从而确定分化抑制因子 3(inhibitor of differentiation 3, Id3)对雌性小鼠生育能力的影响。方法:通过交配繁殖获得 Id3-Gdf9 CKO 小鼠,以 HE 染色、卵泡计数对 CKO 小鼠卵巢中的卵泡发育情况进行检测,以卵母细胞体外成熟实验和体外超排实验对卵母细胞的体外成熟进行检测,通过交配实验对生育力进行检测。结果:qPCR、Western blot 结果显示卵母细胞中 Id3 被成功敲除;对 3、8 周小鼠卵巢进行 HE 染色并对各级卵泡进行计数,结果表明 CKO 小鼠中各级卵泡发育正常;卵母细胞体外成熟以及体外超排实验显示 CKO 小鼠中卵母细胞体外成熟正常;交配实验表明 CKO 小鼠生育能力正常。结论:在正常饲养条件下,条件性敲除 Id3 不影响正常卵泡的发育以及雌性小鼠的生育能力。

[关键词] Id3;卵泡发育;卵母细胞成熟

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)07-940-05

doi: 10.7655/NYDXBNS2020702

The effects of inhibitor of differentiation 3 on female mice fertility

WEN Xidong, ZHANG Chi, HE Yuanlin, LI Jing*

State Key Laboratory of Reproductive Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** The phenotype of female mice was studied by constructing Id3-Gdf9-Cre⁺ conditional knockout (CKO) mice to further determine the effect of differentiation inhibitor Id3 on female mice fertility. **Methods:** The development of follicles was detected in the ovaries of the conditional knockout mice with Id3-Gdf9-Cre⁺ by HE staining and follicle counting. The oocyte maturation was detected by maturation experiments *in vitro* and superovulation experiments *in vitro*. And mice fertility was detected by mating experiment. **Results:** The results of qPCR and Western blot showed that we had successfully knocked out Id3 in oocytes. HE staining was performed on 3 weeks and 8 weeks mice ovaries and the follicles were counted at various levels, and the follicles developed at all levels were normal. Oocyte maturation experiments and superovulation experiments showed that oocyte maturation was normal *in vitro*. Mating experiment showed that CKO mice have normal fertility. **Conclusion:** Under normal feeding conditions, conditional knockout of Id3 does not affect normal follicles development or fertility of female mice.

[Key words] Id3; follicle development; oocyte maturation

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(07):940-944]

抑制分化因子(inhibitor of differentiation, Id)家族,包含 Id1、Id2、Id3 和 Id4,是体内细胞发育过程中的关键转录调控蛋白^[1]。Id 蛋白具有独特的螺旋-环-螺旋(HLH)结构,这种特有的结构可以通过与同样具有 HLH 结构的转录调节因子家族相关成员相互结合形成异二聚体来阻止其与 DNA 相互结合,从

而在细胞分化方向起显性负调节因子的作用。除了在细胞分化方向起负调节因子的作用外,Id 蛋白也在细胞周期的调节中起着非常重要的作用,相关研究显示 Id 蛋白可以通过与有丝分裂进程中几种关键蛋白相互作用,从而介导细胞周期进程^[2-4]。综上所述,Id 蛋白在细胞分化和细胞周期中起着特有的调节作用。因此,猜想是否 Id 蛋白可通过调控细胞分化及细胞周期进程来调节卵巢中卵泡的发育,从而影响雌性小鼠的生育能力。

[基金项目] 国家重点研发计划(2018YFC1003703)

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

卵母细胞的发育对于雌性生殖力的影响至关重要,卵母细胞发育异常也是导致卵巢早衰的重要原因之一。随着基因敲除技术的不断进步,有研究者通过cas9技术全身性敲除Id1、Id2、Id3、Id4基因进行不同方面的研究^[5]。近年来,人们发现Id蛋白的缺失会导致雷特综合征、动脉血管疾病等的发生^[6-7],同时对Id蛋白的研究也为癌症治疗提供了一些新的机会^[8]。但目前尚未有文献报道Id3对雌性小鼠的生育力是否存在影响。

本实验室前期通过构建全身性敲除Id2的小鼠模型,发现Id2^{-/-}小鼠乳腺发育缺陷而造成雌性小鼠丧失哺乳能力以及新生胎儿发育缺陷^[9-10],同时雌性小鼠生育能力低下,造成生育力低下的具体原因还在进一步研究当中。Id3敲除是否也会对雌性小鼠生育能力造成影响?本研究通过构建Id3-Gdf9卵母细胞特异性敲除小鼠,对其表型进行分析,进一步研究Id3在卵母细胞发育过程中所起的作用,从而确定Id3对雌性生育能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

所有实验小鼠均选取C57BL/6J背景(SPF级),饲养于南京医科大学实验动物中心,所有动物实验经南京医科大学动物保护和利用委员会批准。磷酸盐缓冲液(PBS, Gibco公司,美国),RIPA裂解液(Thermo公司,美国),蛋白酶抑制剂(Amresco公司,美国),山羊抗小鼠二抗、山羊抗兔二抗(Thermo公司,美国),ECL发光液(杭州弗德生物公司),M2、M16培养基(Sigma公司,德国),PCR引物、RT-PCR引物由南京擎科生物技术有限公司合成;PCRmix、逆转录酶(南京诺维赞公司),Tublin抗体(南京翼飞雪公司),Id3抗体(Proteintech公司,美国),妊娠母马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、透明质酸酶(Sigma公司,美国),数码化学发光成像仪(上海Tanon公司),点扫描激光共聚焦显微镜(Zeiss公司,德国),PCR仪(Thermo公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 构建条件性敲除(conditional knockout, CKO)小鼠模型

通过Id3^{fl/fl}雌鼠与Gdf9-cre⁺雄鼠交配2代,获取用于实验的雌性Id3-Gdf9 CKO小鼠,并以Id3^{fl/fl}雌鼠作为对照组进行表型研究。Gdf9在原始卵母细胞的卵母细胞中特异性表达,因此CKO小鼠表现为原始卵

胞的卵母细胞中特异性敲除Id3。

1.2.2 实时荧光定量PCR(qPCR)检测Id3表达

收取21 d小鼠5~10颗生发泡(GV)期卵母细胞,利用单细胞转录体系反转成cDNA,取1 μL cDNA进行qPCR扩增。相关引物序列如下,Id3上游引物:5'-CTGTCGGAACGTAGCCTGG-3',下游引物:5'-GTGGTTCATGTCTCCAAGAG-3';β-actin上游引物:5'-CCGTAAAGACCTCTATGCC-3',下游引物:5'-CTCAGTAACAGTCCGCCTA-3';结果以2^{-ΔΔCT}表示,实验重复3次。

1.2.3 Western blot检测Id3敲除效率

收取Id3^{fl/fl}、Id3-Gdf9小鼠各100颗卵母细胞,在RIPA裂解液和PI蛋白酶抑制剂的混合溶液中裂解提取蛋白,SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。将分离的蛋白转移到PVDF膜上,用5%的脱脂奶粉-TBST封闭1 h,一抗4℃过夜。次日,二抗孵育1 h后,TBST洗膜2次再用TBS洗1次。使用ECL显色液显色,利用数码化学发光成像仪器曝光检测蛋白的表达。

1.2.4 HE染色

100%二甲苯脱蜡2次,过100%、90%、80%、70%梯度乙醇,苏木素5 min,自来水冲洗10 min,0.1% HCl漂洗,伊红20 s,70%、90%乙醇漂洗,100%乙醇1 min 2次,100%二甲苯5 min 2次,中性树脂封片。

1.2.5 卵母细胞体外培养和体外超排实验

卵母细胞体外培养:从未经HCG处理的出生后21~28 d小鼠卵巢中收集GV期卵母细胞,转移至M16培养基置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。培养4 h到生发泡破裂(GVBD)、12 h到第2次减数分裂中期(M II)。根据GVBD/GV和第一极体排出(PBE)/GV比率计算卵母细胞成熟比率。体外超排实验:向小鼠注射5 U PMSG,培养44 h,然后注射5 U HCG。16 h后,将卵-卵母细胞复合物从输卵管壶腹部取出,并用透明质酸酶消化,统计M II卵母细胞的数目。

1.2.6 卵泡计数

收集3、8周大小的卵巢并在10%福尔马林缓冲液中固定12 h,在体视镜拍摄卵巢形态大小,将卵巢包埋在石蜡中,以5 μm的厚度连续切片,通过HE染色对卵母细胞进行数目统计。各级卵母细胞的分类如下:原始卵泡(单个卵母细胞被数个扁平化的前体颗粒细胞围绕)、初级卵泡(单个卵母细胞被单层立体状的颗粒细胞包围)、次级卵泡(单个卵母细胞被2层以上立体状的颗粒细胞包围)、有腔卵泡(卵母细

胞与颗粒细胞之间出现空腔)。

1.3 统计学方法

使用SPSS20.0进行统计分析,所有实验结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

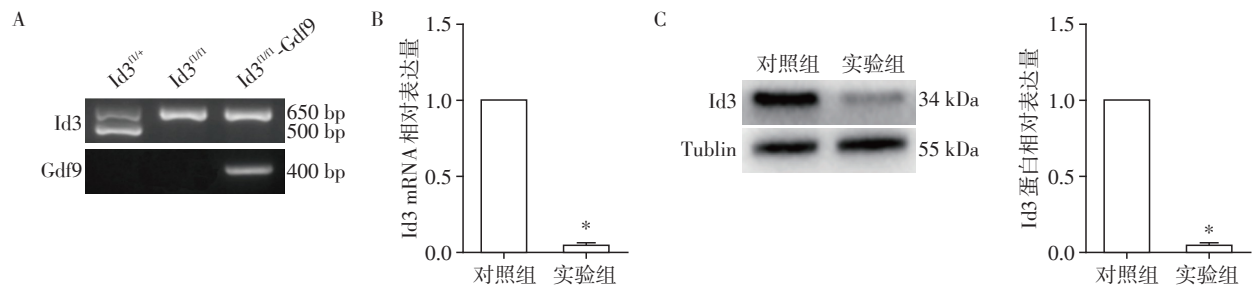
2.1 Id3-Gdf9 CKO 小鼠构建以及敲除效率的验证

首先通过 Id3^{fl/fl} 与 Gdf9-cre⁺ 工具鼠杂交 2 代,得

到 Id3-Gdf9 (Gdf9 在原始卵泡阶段特异性表达)CKO 小鼠并通过 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳进行基因型验证(图 1A)。取 21~28 d CKO 小鼠的卵母细胞进行 qPCR 以及 Western blot 验证敲除效率,发现在 21 d 的卵母细胞中 Id3 被特异性敲除(图 1B、C)。以上结果说明得到的 Id3-Gdf9 CKO 小鼠的卵母细胞中 Id3 被特异性敲除,可以进行表型研究。

2.2 CKO 小鼠中各级卵泡发育情况分析

为了观察 CKO 小鼠中各级卵泡发育的情况,分



A: 小鼠基因型的鉴定,敲除小鼠中存在 1 条非特异性条带;B: qPCR 检测 Id3 mRNA 在 GV 期卵母细胞中的表达情况;C: Western blot 检测 Id3 蛋白在 GV 卵母细胞中表达情况;与对照组比较, * $P < 0.001$, $n=3$ 。

图 1 Id3-Gdf9 小鼠的配繁以及敲除效率的检测

Figure 1 The mating and breeding of Id3-Gdf9 and the detection of knockout efficiency

别取 3、8 周的雌性小鼠的卵巢对其卵巢大小以及各级卵泡的数目进行统计。结果发现在 3 周左右 CKO 小鼠的卵巢略小于对照组,但到达 8 周卵巢大小没有明显的差异(图 2A)。卵泡计数的结果显示 CKO 小鼠中各级卵泡发育以及总卵泡数目正常(图 2B、C、D)。以上结果说明在正常生长条件下,在卵母细胞中特异性敲除 Id3 不影响卵泡的发育。

2.3 CKO 小鼠卵母细胞体外成熟及体外超排情况

为了进一步研究卵母细胞发育至排卵阶段即卵母细胞成熟过程,取 21 d 的 Id3^{fl/fl} 和 Id3-Gdf9 CKO 小鼠,注射 5 U PMSG 48 h 后取 GV 期卵母细胞,测量细胞直径,结果发现两组卵母细胞直径的差异无统计学意义(图 3A、B);对 GV 期卵母细胞进行体外进行培养,分别计算 GVBD/GV、PBE/GV,统计结果显示两组差异无统计学意义(图 3C)。对超排后的排卵数目进行统计,结果发现 CKO 小鼠中排卵数目略有下降($P < 0.05$, 图 3D)。

2.4 CKO 小鼠生育能力

选取 2 月龄的 Id3^{fl/fl} 和 Id3-Gdf9 CKO 雌性小鼠各 4 只进行为期 6 个月的交配实验,结果发现两组的总体生育能力正常,不管是产仔周期、每窝产仔数目和总产仔数目的差异均无统计学意义,表明 CKO 小鼠的生育状况良好,即卵母细胞特异性敲除

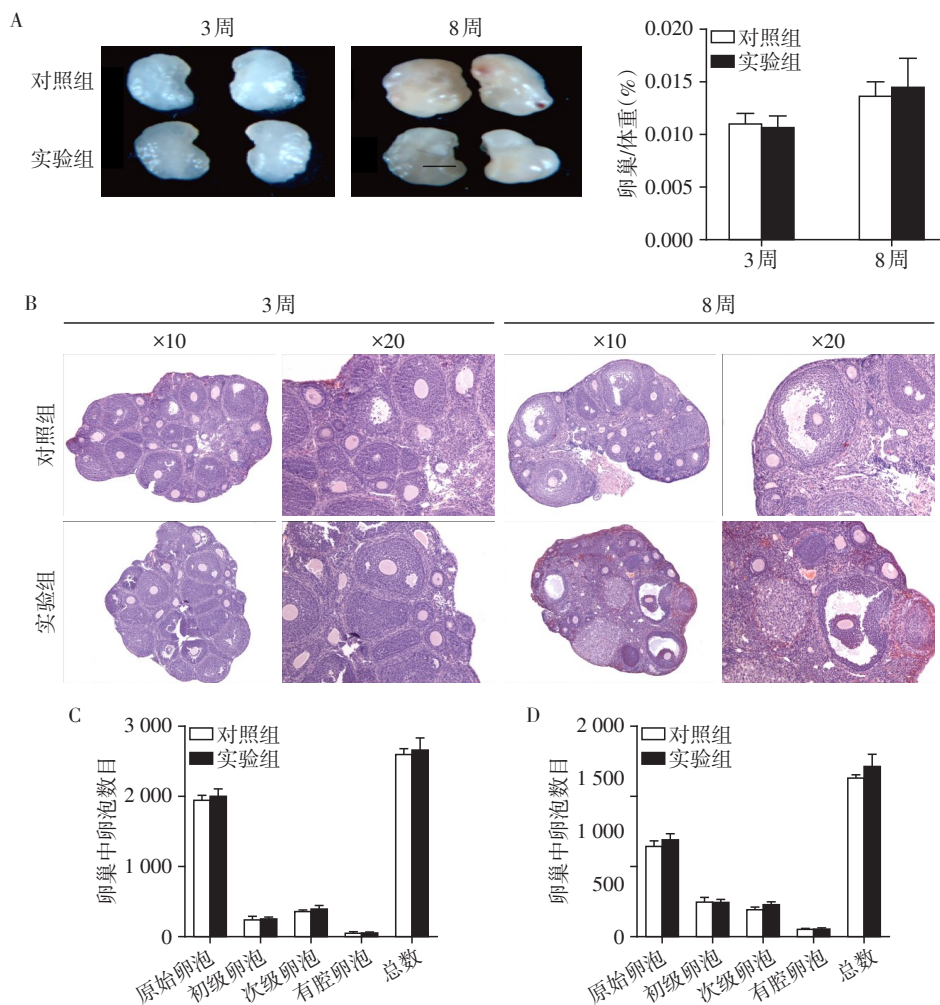
Id3 并不影响雌性小鼠的生育能力(图 4)。

3 讨论

近年来,女性不孕的发病率逐年增加。卵巢作为女性生殖器官,是卵泡发育的场所。卵泡发育是否正常直接影响排卵的数量和质量,进而影响女性的生育能力。因此,许多研究者致力于女性生殖健康的研究,近几年基因编辑技术的不断革新,也给这项研究带来了新的方向。

Id 家族对于细胞的生长发育非常重要。近年来,研究者发现 Id 蛋白参与细胞的发育、骨骼肌的分化、平滑肌的增殖、胚胎的神经系统形成、骨发生和免疫系统的形成等多种生物学过程^[11-16],但在雌性生殖领域却从未有过相关文献的报道。本课题组前期研究发现,Id2 敲除后小鼠会出现生殖力下降的表型。为进一步探究 Id 家族其他成员对雌性小鼠生育能力的影响,本研究构建了卵母细胞特异性敲除 Id3 的小鼠模型来进行相关研究。

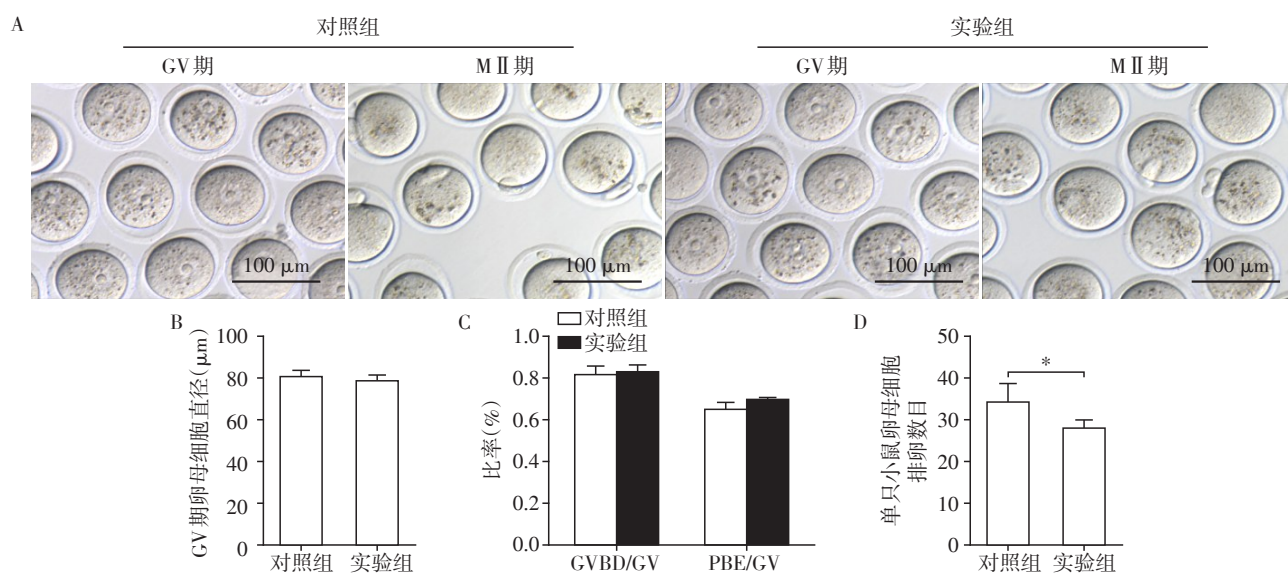
首先通过 Id3^{fl/fl} 与 Gdf9 的工具鼠交配 2 代得到所需要的 Id3-Gdf9 雌性 CKO 小鼠,通过对卵巢中卵母细胞进行 qPCR、Western blot 检测,结果显示得到的 CKO 小鼠中,Id3 在卵母细胞中被特异性敲除。卵泡的正常发育是卵巢发挥正常功能的基础,所以



A: 卵巢大小比较; B: 卵巢HE染色; C: 3周小鼠HE染色后卵泡计数结果; D: 8周小鼠HE染色后卵泡计数结果(n=3)。

图2 卵母细胞特异性敲除Id3不影响卵泡的正常发育

Figure 2 Oocyte-specific knockout Id3 does not affect the normal development of follicles



A: GV、MII时期卵母细胞形态(x20); B: GV期卵母细胞直径大小比较; C: GV期卵母细胞体外培养GVBD/GV、PBE/GV; D: 体外超排MII卵母细胞排卵数目(*P < 0.05, n=3)。

图3 卵母细胞特异性敲除Id3不影响卵母细胞的体外成熟

Figure 3 Oocyte-specific knockout Id3 does not affect oocyte maturation *in vitro*

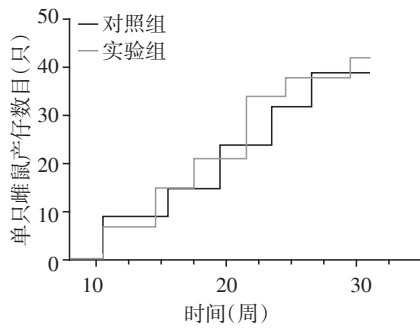


图4 卵母细胞特异性敲除Id3不影响雌性小鼠生育能力

Figure 4 Oocyte-specific knockout Id3 does not affect fertility in female mice

取3、8周两个时间点来对卵巢中卵泡的发育进行检测,通过卵巢切片的HE染色来对各级卵泡的数目进行统计,结果并没有发现各级卵母细胞差异性变化,尽管在3周时有发现卵巢大小有略微变小,但是在8周时卵巢的大小并没有发现明显的变化,说明卵巢中卵泡发育正常。同时通过对GV期卵母细胞的大小来对卵母细胞进行评估,结果发现GV期卵母细胞的大小没有明显变化,小鼠超排实验显示,尽管排卵的数目有所减少,但并没有发现产仔数目的减少,因此其排卵数目的轻微减少不影响其生育能力。先前有文章报道Id1^{-/-}/Id3^{-/-}共同敲除会导致胚胎致死率的升高^[17],因此猜想Id家族中的4个蛋白是否会通过彼此之间的协同作用来影响卵母细胞的发育,从而来影响雌性的生育能力。

[参考文献]

- [1] MURRE C. Helix-loop-helix proteins and the advent of cellular diversity: 30 years of discovery [J]. *Genes Dev*, 2019, 33(1-2):6-25
- [2] D'CRUZ L M, STRADNER M H, YANG C Y, et al. E and Id proteins influence invariant NKT cell sublineage differentiation and proliferation [J]. *J Immunol*, 2014, 192(5): 2227-2236
- [3] ROSCHGER C, CABRELE C. The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways [J]. *Cell Commun Signal*, 2017, 15(1):7
- [4] ZEBEDEE Z, HARA E. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence [J]. *Oncogene*, 2001, 20(58): 8317-8325
- [5] 徐帆,孙文博,张妍妍,等. 利用CRISPR/Cas9技术建立RelB敲除小鼠模型[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(3):313-319

- [6] BEDOGNI F, ROSSI R L, GALLI F, et al. Rett syndrome and the urge of novel approaches to study MeCP2 functions and mechanisms of action [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014, 46(2):187-201
- [7] WOJNAROWICZ P M, LIMA E S R, OHNAKA M, et al. A small-molecule pan-id antagonist inhibits pathologic ocular neovascularization [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(1):62-75
- [8] AMARAL L H P, BUFALO N E, PERES K C, et al. ID proteins may reduce aggressiveness of thyroid tumors [J]. *Endocr Pathol*, 2019, 30(1):24-30
- [9] SEONG J, KIM N S, KIM J A, et al. Side branching and luminal lineage commitment by ID2 in developing mammary glands [J]. *Development*, 2018, 145(14): dev165258.doi:10.1242/dev.165258
- [10] MIYOSHI K, MEYER B, GRUSS P, et al. Mammary epithelial cells are not able to undergo pregnancy-dependent differentiation in the absence of the helix-loop-helix inhibitor Id2 [J]. *Mol Endocrinol*, 2002, 16:2892-2901
- [11] ROY S, MOORE A J, LOVE C, et al. Id proteins suppress E2A-driven invariant natural killer T cell development prior to TCR selection [J]. *Front Immunol*, 2018, 9:42
- [12] Wang L H, Baker N E. E proteins and ID proteins: helix-loop-helix partners in development and disease [J]. *Dev Cell*, 2015, 35(3):269-280
- [13] YANG J, LI X, LI Y, et al. Id proteins are critical downstream effectors of BMP signaling in human pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(4):L312-321
- [14] BOHRER C, PFURR S, MAMMADZADA K, et al. The balance of Id3 and E47 determines neural stem/precursor cell differentiation into astrocytes [J]. *EMBO J*, 2015, 34(22):2804-2819
- [15] YANG B, SUN H, CHEN P, et al. YAP1 influences differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells through the regulation of ID1 [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 14007-14018
- [16] WEILER S, ADEMOKUN J A, NORTON J D, et al. ID helix-loop-helix proteins as determinants of cell survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells in vitro [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14:30
- [17] LASORELLA A, BENEZRA R, IAVARONE A, et al. The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(2): 77-91

[收稿日期] 2019-11-29