

Expression of Imprinted Genes Igf2r and RB-1 in the Endometrium of Infertile Women with Metabolic Syndrome

Junhao Wang^{1,2*}, Yu Ruan^{1,2}, Rong Li¹

¹Department of Reproductive Medicine, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen

²Shantou University Medical College, Shantou

Email: *wangjunhao1985@qq.com

Received: Nov. 2nd, 2012; revised: Nov. 10th, 2012; accepted: Nov. 25th, 2012

Abstract: Objective: To investigate expression of imprinted genes Igf2r, RB-1 in the endometrium of infertile women with metabolic syndrome (MS). **Methods:** From Jul. 2011 to Dec. 2011 in our center, 11 infertile women with metabolic abnormalities were experimental group, a matched group of 15 normal women was chosen. Collected their proliferative phase endometrial tissue, using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) to measure the expressions of Igf2r and Rb-1 in the endometrium. **Results:** Igf2r and RB-1 were both expressed in the endometrium of MS and normal women. Compared with the normal women, the expression of Igf2r in the endometrium of MS was decreased ($P = 0.0051$), while the expression of RB-1 was increased ($P = 0.0364$), significant differences were observed between experimental group and matched group. **Conclusions:** The expression of imprinted gene Igf2r in the endometrium of infertile women with MS was decreased significantly, while the expression of RB-1 was increased, the 2 imprinted genes may impair the function of endometrium of MS.

Keywords: Imprinted Genes; Igf2r; RB-1; Metabolic Syndrome

印记基因 Igf2r 和 RB-1 在代谢综合征不孕患者子宫内膜表达水平的研究

王俊豪^{1,2*}, 阮钰^{1,2}, 李蓉¹

¹北京大学深圳医院生殖医学科, 深圳

²汕头大学医学院, 汕头

Email: *wangjunhao1985@qq.com

收稿日期: 2012年11月2日; 修回日期: 2012年11月10日; 录用日期: 2012年11月25日

摘要: 目的: 研究印记基因 Igf2r 和 RB-1 在代谢综合征(MS)不孕患者子宫内膜的表达。**方法:** 选择 2011 年 7 月至 2011 年 12 月因不孕症来我院生殖中心就诊的 MS 患者 11 例作为实验组, 代谢正常女性 15 例作为对照组, 收集分泌期的子宫内膜组织, 采用实时定量聚合酶链反应方法(RT-PCR)测定子宫内膜组织 Igf2r 和 RB-1 的表达水平。**结果:** Igf2r 和 RB-1 在 MS 患者和代谢正常妇女子宫内膜中均有表达, 与正常女性相比较, MS 患者子宫内膜 Igf2r 表达水平下降($P = 0.0051$), RB-1 表达水平升高($P = 0.0364$), 具有显著性差异。**结论:** MS 不孕患者子宫内膜组织印记基因 Igf2r 表达水平明显下降, RB-1 表达水平明显升高, 两者可能影响 MS 患者的子宫内膜容受性。

关键词: 印记基因; Igf2r; RB-1; 代谢综合征

1. 引言

随着社会经济和生活方式的改变, 以肥胖和多种代谢异常为特征的代谢综合征(MS)在全球范围的患病率逐渐上升, 目前全世界大部分国家 20%~30%的

*通讯作者。

成年人患有代谢综合征, MS 已成为威胁人类健康的主要公共卫生问题。MS 指的是一组危险因素, 包括中心性肥胖及以下变量中的至少 2 个, 即血压增高、甘油三酯增高、高密度脂蛋白降低和高血糖。其必要条件是中心性肥胖, 尽管某些肥胖育龄妇女并无生殖障碍, 但研究表明育龄期肥胖影响了生育力^[1], 在辅助生殖技术中, 肥胖妇女存在低着床率、低妊娠率、高流产率^[1,2], 这些均可能与肥胖妇女子宫内膜容受性下降有关^[2-4]。内膜容受性受到基因表达的调控。Igf2r 是最早发现的母源性印迹基因, RB-1 是人类第一个分离克隆的抑癌基因^[5]。

本研究检测了因不孕症来我院生殖中心行试管助孕的 MS 患者及代谢正常女性分泌期子宫内膜中印迹基因 Igf2r 和 RB-1 的表达, 旨在初步探讨 MS 不孕患者子宫内膜印迹基因的表达水平及其与内膜容受性的相关性。

2. 材料与方法

2.1. 研究对象

选择 2011 年 7 月至 2011 年 12 月因不孕症来我院生殖中心就诊的 MS 患者 11 例作为实验组, 同期就诊的非代谢异常女性 15 例作为对照组。实验组纳入标准: BMI $\geq 23 \text{ kg/m}^2$ 且合并以下 2 项或以上血指标异常: 1) 甘油三酯(TG)水平升高: $>150 \text{ mg/dl}$ (1.7 mmol/l); 2) 高密度脂蛋白(HDL)水平降低: 女性 $<50 \text{ mg/dl}$ (1.1 mmol/l); 3) 胰岛素稳态评估模型(Homeostasis model assessment, $\text{HOMA} = [\text{空腹胰岛素}(\text{mIU/L}) \times \text{空腹血糖}(\text{mmol/L})] / 22.5$) ≥ 2.14 ; 4) 空腹血糖(FPG)升高: $\geq 100 \text{ mg/dl}$ (5.6 mmol/l), 或已诊断为 2 型糖尿病。对照组纳入标准: 1) BMI $<23 \text{ kg/m}^2$ 且无上述血指标异常; 2) 基础内分泌检测结果正常; 3) 既往无不良妊娠史。两组对象排除标准: PCOS; 年龄 >40 岁; 合并卵巢肿瘤; 腹腔镜证实盆腔子宫内膜异位症; B 超发现卵巢巧克力囊肿、输卵管积液。所有研究对象均签署知情同意书。

2.2. 方法

2.2.1. 子宫内膜标本的采集

收集所有患者分泌期的子宫内膜组织(均经病理证实), 置于 4°C RNA Later(Ambion)中, 24 h 后置于

-80°C 保存待用。

2.2.2. 总 RNA 的提取

采用液氮研磨法将组织磨成粉末, 加入 Trizol (Invitrogen 公司)混合, 按 Trizol 说明书抽提总 RNA。主要抽提步骤如下: 1) 取 -80°C 冻存的内膜组织各 50 mg , 在液氮中研磨; 2) 加入 1 ml Trizol 试剂(Invitrogen, 美国), 继续研磨成粉末状提取 RNA; 3) 用氯仿、100% 异丙醇、75%乙醇分离并洗涤 RNA 沉淀。

2.2.3. 总 RNA 纯度和完整性的测定

RNA 纯度测定: 取 RNA 水溶液 3 ul , 用 DEPC 处理水稀释至 300 ul , 用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 的吸光度, 即 OD260 和 OD280, 计算 OD260/OD280 比值。

RNA 完整性测定: 取 RNA 水溶液 7 ul , 在经 DEPC 处理去除 RNA 酶污染的电泳体系中电泳(1.5% 琼脂糖凝胶, $0.5 \times \text{TBE}$ 电泳缓冲液, 100 V 恒压恒流, 15 分钟)。电泳结束后在凝胶成像仪下观察电泳条带。

2.2.4. 总 RNA 逆转录

用紫外分光光度仪对提取的总 RNA 进行定量后, 取 1 ug 总 RNA 按照试剂盒提供的说明书(TAKARA 公司)进行逆转录。反应在 BIO-RAD(UV-2450)普通 PCR 仪上进行, 反应体系如下: $5 \times \text{PrimeScript RT Master Mix } 4 \text{ ul}$ (内含 PrimeScript RTase、RNase Inhibitor、Random 6 mers、Oligo dT Primer、dNTP Mixture、反应 Buffer), RNA 模板 $2\sim7 \text{ ul}$, 加 RNase Free dH_2O 至总体积为 20 ul , 全部过程在冰上操作。将 20 ul 反应体系至于 PCR 扩增仪完成反应, 设置反应条件为: 37°C 15 min , 85°C 5 s 。然后将逆转录的 cDNA 溶液置于 -20°C 冰箱保存备用。

2.2.5. 引物的设计

在 Pubmet Gennebank 的查找内参照 $\beta\text{-actin}$ 和目的基因 Igf2r 和 RB1 的 mRNA 序列, 有南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 将合成引物按说明书配置成浓度为 $20 \text{ }\mu\text{M}$ 的工作液。见表 1。

2.2.6. 实时定量 PCR, 采用 SYBR Green I 相对定量法 (SYBR Green I, TAKARA)

反应按照 RNA 定量 RT-qPCR 检测试剂盒说明书 (TAKARA 公司), 在 ABI Prism 7000 实时荧光定量

Table 1. Upstream and downstream primers of the genes
表 1. 各基因的上下游引物

| 基因 | 上游引物 | 下游引物 |
|----------------|-----------------------------|--------------------------------|
| β -actin | CCTGTGGCATC- CACGAAACTA | TGTCAGAAAGGGTGTAACG CAA |
| Igf2r | GGTATTTTGAGGGTGTA ATTGTA | AACCCCTAACACAAC- TAAACAACAT |
| RB-1 | AATGGTA- CATCTTCCAGGGTCT | GAAGTTTCTGCACAGCTGGA |

PCR 仪上完成。PCR 反应体系:总反应体系 20 μ l, SYBR Premix Ex TaqTM 10 μ l, ROX Reference Dye 0.4 μ l, 靶基因上游 0.4 μ l, 靶基因下游 0.4 μ l, 模板 cDNA 1 μ l, 无 RNase 水 7.8 μ l。反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s, PCR 反应 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s, 共 40 个循环。每个样品的目的基因表达以 β -actin 作为内参照。为减少操作误差, 重复三孔, 设置无 cDNA 样品空白管为阴性对照。反应完成后, 按照公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出 MS 患者内膜 Igf2r 和 RB-1 基因的相对表达量, $\Delta\Delta Ct = (CtIgf2r/RB-1-Ct\beta\text{-actin})$ 实验组 $-(CtIgf2r/RB-1-Ct\beta\text{-actin})$ 对照组。

2.3. 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。Igf2r, RB-1 经 K-S 检验为非正态分布, 采用非参数检验 Mann-Whitney U 法比较两组目的基因的表达差异。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 两组患者一般资料的比较

两组患者的年龄、不孕类型、不孕年限、不孕原因、基础 FSH、LH、E₂、T 均无显著性差异(P > 0.05), 实验组的 BMI 高于对照组(P < 0.01), 符合病人入选的基本特征, 见表 2。

3.2. RNA 抽提与质控

组织总 RNA 用 Trizol 法抽提, 提取后于 1.5% 琼脂糖凝胶上样电泳, 紫外照胶仪下观察, 可见 18 s、28 s 两条条带非常清晰, 而且 28 s/18 s 约 2 倍, 说明 RNA 完整性好, 见图 1。同时紫外分光光度计检测示 OD260/OD280 比值介于 1.6~2.0 之间, 表示 RNA 纯度符合要求。

Table 2. General characteristics of the experimental and control groups
表 2. 实验组与对照组基本情况

| | 实验组(n = 15) | 对照组(n = 11) | P |
|-------------------------|-------------------|-------------------|-------|
| 年龄(y) | 30.45 \pm 4.37 | 31.47 \pm 4.03 | NS |
| BMI(kg/m ²) | 26.46 \pm 2.24 | 19.69 \pm 1.45 | <0.01 |
| 不孕类型 | | | NS |
| 原发不孕(%) | 46.31 | 39.42 | |
| 继发不孕(%) | 53.69 | 60.58 | |
| 不孕年限(y) | 4.66 \pm 2.43 | 3.67 \pm 4.02 | NS |
| 不孕原因 | | | NS |
| 盆腔或输卵管因素(%) | 76.42 | 69.36 | |
| 男方因素(%) | 23.58 | 30.64 | |
| 基础 FSH(U/L) | 6.58 \pm 1.33 | 5.75 \pm 2.02 | NS |
| LH (U/L) | 4.19 \pm 2.48 | 4.57 \pm 4.34 | NS |
| E ₂ (pg/ml) | 38.45 \pm 19.28 | 47.97 \pm 27.28 | NS |
| T (ng/ml) | 0.60 \pm 0.22 | 0.68 \pm 0.22 | NS |

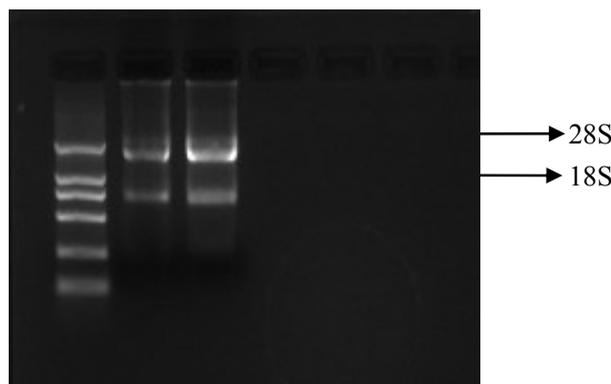


Figure 1. Two obvious bands of 28 s and 18 s could be seen in the 1.5% agarose gel electrophoresis for the detection of RNA integrity
图 1. 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性如图可见明亮的 28 s、18 s 条带

3.3. RT-qPCR 检测实验组和对照组子宫内膜组织 Igf2r, RB-1 的表达

Igf2r, RB-1 在所有研究对象子宫内膜组织均有表达, 经 Mann-Whitney U 法分析得出: 实验组的 Igf2r 表达水平低于对照组, RB-1 表达水平高于对照组, 均具有显著性差异(P < 0.05)。见图 2。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出实验组 Igf2r 和 RB-1 基因的相对表达量: 对照组平均 Igf2r 表达约为实验组 4.92 倍, 实验组平均 RB-1 表达约为对照组 3.25 倍。

4. 讨论

印记基因是父源或母源特异等位基因的差异表

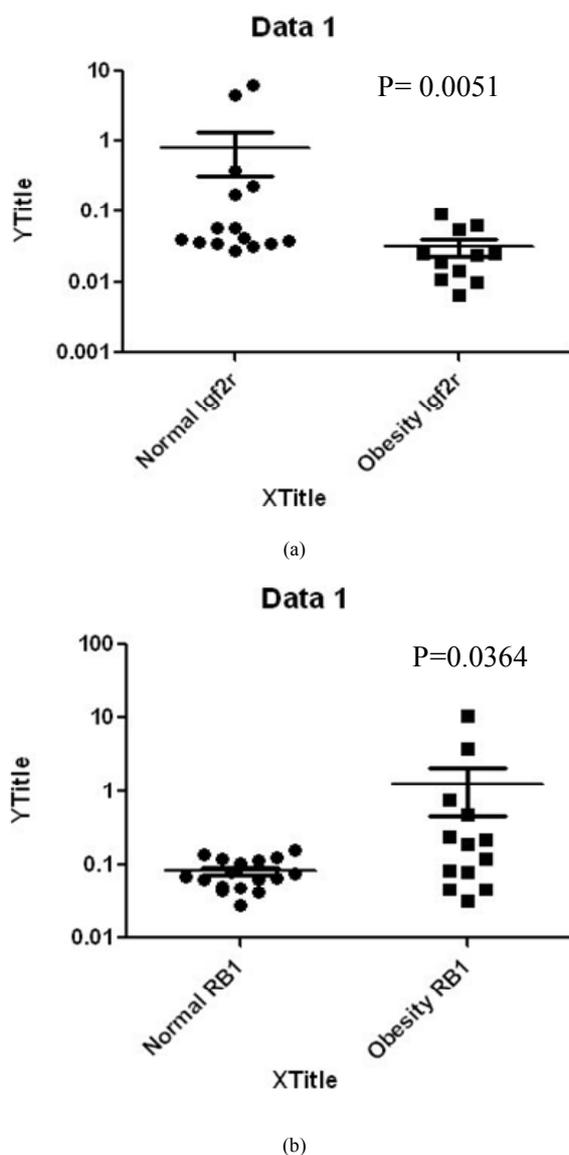


Figure 2. Graphs show the relative expression of the 2 target genes, the horizontal lines indicate the average number. Datas are non-normal through the Kolmogorov-Smirnov test, nonparametric Mann-Whitney U tests are used for comparison of the expression differences of target genes. $P < 0.05$ makes the significant differences

图 2. 图中所示的是各目的基因相对表达量, 横线表示均数。RB-1, *Igf2r* 经 K-S 检验为非正态分布, 采用非参数检验 Mann-Whitney U 法比较各组目的基因的表达差异。P < 0.05 为显著性差异

达, 两个等位基因呈不同的活性状态, 不符合孟德尔所提出的双亲来源的两个等位基因需同等表达的经典遗传学。基因印迹现象最初源于 1984 年小鼠的单亲生殖胚胎学实验^[6], 虽然其只占基因组很小的部分, 但其适度表达对胚胎正常生长、发育及生物行为发展是必要的。DNA 甲基化是基因印迹发生和维持的主要机制, 由于各种原因引起的印迹基因异常表达如过

高、过低、缺失或甲基化异常均可导致疾病的发生。

Igf2r 位于小鼠 17 号染色体, 从妊娠后平均 6.5 天时开始进行母源表达^[7], 其表达产物是胰岛素生长因子的负调控因子。Barlow DP 等^[8]首先证明 *Igf2r* 在胚胎生长和发育中起作用, *Igf2r* 功能缺失的小鼠出现过度生长。羊胚体外培养显示 *Igf2r* 印迹缺失, 导致胚胎羊过度生长、病死率增加^[9]。本研究利用 RT-PCR 技术测定不孕症中 MS 患者和代谢正常患者子宫内膜中 *Igf2r* mRNA 和 *RB-1* mRNA 的表达, 发现与代谢正常妇女相比, MS 患者子宫内膜组织 *Igf2r* mRNA 表达水平明显下降。*Igf2r* 表达的下降可能与 *Dnmt1* 的下降有关。*Dnmt1* 具有维持细胞在分裂增生中 DNA 甲基化稳定的作用。MS 患者可能由于体内内分泌紊乱、慢性炎症累积影响了 *Dnmt1* 的活性。*Dnmt1* 下降使 *Igf2r* 中 DMR 区域的甲基化水平下降, 而 DRM 区的甲基化水平下降会导致 *Igf2r* 的表达下降^[10]。文献表明肥胖与子宫内膜增生和子宫内膜癌有明显的相关性, 肥胖患者的激素紊乱、高胰岛素血症和胰岛素抵抗是影响子宫内膜增生、子宫内膜癌的重要因素^[11], 而 *Igf2r* 下降可能是此环节中的重要影响因子。*Igf2r* 的下降又进一步促进 MS 患者子宫内膜的炎症化, 从而形成恶性循环影响 MS 患者子宫内膜功能。

RB-1 为母源性抑癌印迹基因, 其为细胞周期的负调控因子。通过与转录因子结合调节细胞增殖和分化所需基因的表达, 与细胞分化、细胞衰老、细胞凋亡、细胞周期和生长抑制等细胞生长发育有关^[12]。本研究中 MS 患者 *RB-1* mRNA 表达水平较代谢正常妇女明显升高, 具体原因不明, 但 MS 患者 *RB-1* 下降提示 *RB-1* 可能参与调节子宫内膜细胞周期, 抑制子宫内膜细胞的生长, 促进其衰亡。

MS 患者辅助生殖技术助孕率较低的机理尚未明确, 可能与子宫内膜容受性有关。内膜容受性可能依赖于某些特定基因定期及周期性的表达^[13], *Igf2r* 和 *RB-1* 均为可能基因。*Igf2r* 和 *RB-1* 的印迹可能与子宫内膜正常分化、蜕膜化及胚胎着床后滋养层细胞的入侵有关。本研究中 MS 患者的 *Igf2r* mRNA 表达明显升高, *RB-1* mRNA 表达明显下降, 此可能影响子宫内膜“着床窗口期”父系与母系基因产物之间的生理平衡, 继而影响子宫内膜细胞的免疫原性及内膜的容受性。

综上所述,MS 不孕患者子宫内膜中 Igf2r 和 RB-1 的基因印迹发生了改变,此可能影响子宫内膜容受性,从而导致 MS 患者辅助生殖技术助孕不良结局,但其在子宫内膜中的具体作用还有待进一步研究。此为利用分子生物学方法重建印迹来提高子宫内膜容受性提供了新思路。

参考文献 (References)

- [1] Y. Linne. Effects of obesity on women reproduction and complications during pregnancy. *Obesity Reviews*, 2004, 5(3): 137-143.
- [2] F. Hall, A. Neubert. Obesity and pregnancy. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 2005, 60(4): 253-260.
- [3] M. Mitchell, D. T. Armstrong, R. L. Robker, et al. Adipokines: Implications for female fertility and obesity. *Reproduction*, 2005, 130(5): 583-597.
- [4] J. Bellver, M. A. Melo, E. Bosch, et al. Obesity and poor reproductive outcome: The potential role of the endometrium. *Fertility and Sterility*, 2007, 88(2): 446-451
- [5] A. Naumova, C. Sapienza. The genetics of retinoblastoma, revisited. *American Journal of Human Genetics*, 1994, 54(2): 264-273.
- [6] R. G. Edwards. Genetics, epigenetics and gene silencing in differentiating mammalian embryos. *Reproductive BioMedicine Online*, 2006, 13(5): 732-753.
- [7] P. E. Szabó, J. R. Mann. Allele-specific expression and total expression levels of imprinted genes during early mouse development: Implications for imprinting mechanisms. *Genes & Development*, 1995, 9(24): 3097-108
- [8] D. Lonmann. Imprinting of the RB1 gene and parent-of-origin effects in retinoblastoma. *Medizinische Genetik*, 2010, 2: 429-433.
- [9] L. E. Young, K. Fernandes, T. G. McEvoy, S. C. Butterwith, C. G. Gutierrez, C. Carolan, P. J. Broadben, J. J. Robinson, I. Wilmut and K. D. Sinclair. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genetics*, 2001, 27(2): 153-154
- [10] S. Xie, Z. Wang, M. Okano, M. Nogami, Y. Li, W. W. He, K. Okumura and E. Li. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, 1999, 236(1): 87-95.
- [11] D. Lucifero, C. Mertineit, H. J. Clarke, T. H. Bestor and J. M. Trasler. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics*, 2002, 79(4): 530-538.
- [12] D. Lonmann. Imprinting of the RB1 gene and parent-of-origin effects in retinoblastoma. *Medizinische Genetik*, 2010, 2: 429-433.
- [13] P. Bischof, A. Meissue and A. Campana. Mechanisms of endometrial control of trophoblast invasion. *Journal of Reproductive Fertile Supple*, 2000, 55: 65-71.