

# 人卵丘细胞 lncRNA ENST00000502521 的表达与胚胎发育的关系

李娟, 曹云霞, 刘婷婷, 许孝凤

**摘要** 目的 探讨体外受精(IVF)周期人卵丘细胞(CCs)中 lncRNA ENST00000502521 的表达与卵母细胞成熟及胚胎发育的关系,判断其对体外受精-胚胎移植(IVF-ET)结局的预测价值。方法 收集40例首次接受长方案超促排卵患者的卵丘细胞,根据卵丘细胞围绕的卵母细胞受精后胚胎发育情况将卵丘细胞分成两组,优质胚胎组和低质胚胎组,采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)技术检测两组卵丘细胞中 lncRNA ENST00000502521 的相对表达量,分析其与胚胎发育及妊娠结局的关系;采用受试者工作特征曲线(ROC)评价 lncRNA ENST00000502521 相对表达量对临床妊娠结局的预测价值。结果 IVF 患者低质胚胎组中 lncRNA ENST00000502521 表达较优质胚胎组明显增高( $P < 0.05$ ),且未妊娠组 lncRNA ENST00000502521 相对表达量较妊娠组增高( $P < 0.05$ ); lncRNA ENST00000502521 预测妊娠结局的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.71 ( $P < 0.05$ , 95% CI: 0.55~0.87),灵敏度为 84.2%,特异性为 61.9%。结论 lncRNA ENST00000502521 可能参与影响卵母细胞成熟及胚胎发育,可作为一个潜在的分子标志物预测胚胎质量和妊娠结局。

**关键词** 卵丘细胞; 长链非编码 RNA; ENST00000502521; 胚胎发育

中图分类号 R 714.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0569-04

人卵丘细胞与卵母细胞关系密切,通过对卵丘细胞基因表达谱的研究可以找到预测卵母细胞质量、胚胎发育潜能及妊娠结局的分子标志物<sup>[1-4]</sup>。长链非编码 RNA(long non-coding RNAs, lncRNA)是一类转录本长度超过 200nt 的 RNA 分子,参与了多种病理生理过程<sup>[5-6]</sup>。最近 Yerushalmi et al<sup>[7]</sup>采用芯片技术发现人卵丘细胞中有大量 lncRNA 产生,其中有一些可能参与了卵母成熟、受精及胚胎发育。在该实验前期的卵丘细胞芯片表达谱结果的基础

上,并结合生物信息学分析发现一个新的 lncRNA ENST00000502521 位于 3 号染色体 q22.1 上,但其是否是影响胚胎发育及妊娠结局的关键调控基因,目前还不清楚,因此需要进一步验证芯片表达谱的结果。该研究采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)技术检测不同质量卵母细胞来源的卵丘细胞中 lncRNA ENST00000502521 的相对表达量,分析其与胚胎发育及妊娠结局的关系,为进一步探讨其在卵母细胞成熟、受精及胚胎发育过程中的调控机制提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 卵丘细胞来源** 卵丘细胞来源于安徽医科大学第一附属医院生殖医学中心首次行长方案体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)治疗的 40 例不孕症患者,年龄 20~35(31.19±5.29)岁,不孕因素为女方输卵管因素,男方因素引起的不孕不纳入研究范围。

**1.1.2 主要试剂** Total RNA Isolation Kit I(美国 Omega 公司); PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit 和荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR<sup>®</sup> Premix ExTaq II kit(日本 TaKaRa 公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 卵巢刺激方案** 患者均采用常规长方案控制性促排卵。自前一个月经周期的黄体中期开始使用促性腺激素释放激素激动剂(gonadotrophin releasing hormone agonists, GnRH-a)(达菲林)降调节,月经周期第 3~5 天开始使用重组促卵泡素(果纳芬)150~300 IU/d,定期进行阴道 B 超监测卵泡发育及血清雌二醇、孕酮、黄体生成素水平的测定,当主导卵泡中有 1 个直径达到 18 mm 或 2 个达 17 mm 或 3 个达 16 mm 时,于当天停用促性腺激素,当晚约 10 时予以人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)10 000 IU 肌注,注射 HCG 后约 36 h 行取卵术。

2015-03-16 接收

基金项目: 国家重大科学研究计划(编号: 2012CB944704)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院生殖医学中心,合肥 230022

作者简介: 李娟,女,硕士研究生;

曹云霞,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: caoyunxia@126.com

**1.2.2 卵丘细胞的收集** 取卵后在卵母细胞-放射冠-卵丘复合物上划取部分卵丘细胞团,分别单独放入一个微量离心管,-80℃冷冻保存。卵母细胞单独受精培养,受精后第2天观察胚胎卵裂情况,第3天行卵裂球期胚胎评分。

**1.2.3 实验分组** 根据受精后第3天卵裂球数目、形态、胞质颗粒和胞浆碎片等参数行胚胎形态学评分。细胞团均匀对称,细胞数≥7个,大小一致,碎片≤20%的胚胎为优质胚胎;细胞团不对称,细胞数<7个,大小不一致,碎片>20%的胚胎为形态学差质量胚胎。优质胚胎组卵丘细胞来自于受精后评分为优质胚胎的卵母细胞,低质胚胎组卵丘细胞来自于受精后为差质量胚胎的卵母细胞。

**1.2.4 临床妊娠判定标准** 胚胎移植后第14天测尿HCG或血HCG行生化妊娠初步诊断,于移植后第35天行超声检查,宫腔内见孕囊或(和)胎心搏动者(包括宫外孕)诊断为临床妊娠。

**1.2.5 RNA提取和qRT-PCR** 使用Total RNA Isolation Kit I提取细胞总RNA后将其浓度定为200~300 ng/μl,于-80℃保存备用。根据PrimeScript® RT reagent Kit和SYBR® Premix ExTaq II kit说明书逆转录提取到的RNA后进行RT-PCR,以GAPDH为内参。lncRNA ENST00000502521上游引物:5'-GGCAGGTTTCTCTTGTGTCT-3',下游引物:5'-GGCAGGTTTCTCTTGTGTCT-3';GAPDH上游引物:5'-GGGAAACTGTGGCGTGAT-3',下游引物:5'-GAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3'。采集每个定量PCR反应的阈循环值后将定量PCR结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS 19.0进行数据统计分析。采用单样本K-S检验方法检验变量是否符合正态分布;组间正态分布资料比较采用两独立样本t检验;相关性分析采用Pearson法。采用受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic,ROC)评价lncRNA ENST00000502521相对表达量对临床妊娠结局的预测价值。

**2 结果**

**2.1 IVF患者卵丘细胞中lncRNA ENST00000502521表达** 采用qRT-PCR技术检测两组卵丘细胞中lncRNA ENST00000502521的相对表达量。85%的患者(34/40)低质胚胎组lncRNA ENST00000502521表达水平高于优质胚胎组( $P <$

0.05);优质胚胎组lncRNA ENST00000502521的表达水平为( $9.15 \pm 2.56$ ),低质胚胎组lncRNA ENST00000502521的表达量为( $7.94 \pm 2.57$ );低质胚胎组的表达量较优质胚胎组平均增高了约( $2.75 \pm 1.36$ )倍,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。lncRNA表达量采用 $\Delta Ct$ 值表示, $\Delta Ct$ 值越大则代表lncRNA表达水平越低。见图1。

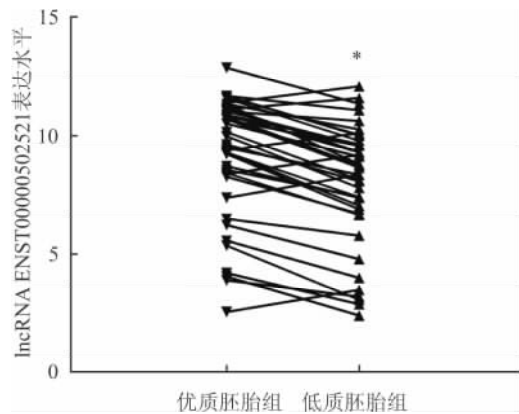


图1 IVF患者两组卵丘细胞lncRNA ENST00000502521表达量比较与优质胚胎组比较: \*  $P < 0.05$

**2.2 IVF患者一般情况和lncRNA ENST00000502521表达及妊娠结局的关系** 采用相关性分析比较患者一般情况和卵丘细胞中lncRNA ENST00000502521表达及妊娠结局的关系。结果显示:卵丘细胞中lncRNA ENST00000502521表达水平及妊娠结局与患者年龄、不孕年限、体质指数、基础性激素水平、促性腺激素(gonadotropin, Gn)用量、Gn天数等一般情况无明显相关性。

**2.3 IVF患者卵丘细胞中lncRNA ENST00000502521表达与妊娠结局的关系** 按患者妊娠结局将40例患者分为妊娠组( $n = 21$ )和未妊娠组( $n = 19$ )。妊娠组lncRNA ENST00000502521表达量低质胚胎组( $8.02 \pm 2.40$ )较优质胚胎组( $9.49 \pm 2.64$ )平均增高了( $2.23 \pm 1.07$ )倍;未妊娠组lncRNA ENST00000502521表达量低质胚胎组( $7.85 \pm 2.80$ )较优质胚胎组( $8.77 \pm 2.49$ )平均增高了( $3.21 \pm 1.44$ )倍;未妊娠组lncRNA ENST00000502521相对表达量较妊娠组增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图2。

**2.4 lncRNA ENST00000502521相对表达量对临床妊娠结局的预测价值** 采用ROC曲线评价lncRNA ENST00000502521相对表达量对临床妊娠结

局的预测价值。曲线下面积 (area under curve, AUC) 代表 lncRNA ENST00000502521 相对表达量对妊娠结局的预测价值。以卵丘细胞 lncRNA ENST00000502521 相对表达量为检验变量,以临床妊娠结局为状态变量(临床妊娠 = 1),建立 ROC 曲线( $P < 0.05$ , AUC = 0.71, 95% CI: 0.55 ~ 0.87),灵敏度为 84.2% 特异性为 61.9%。见图 3。

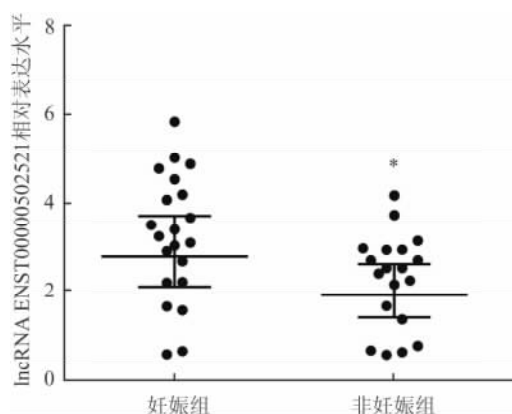


图2 IVF 患者不同妊娠结局下 lncRNA ENST00000502521 相对表达量的比较  
与妊娠组比较: \*  $P < 0.05$

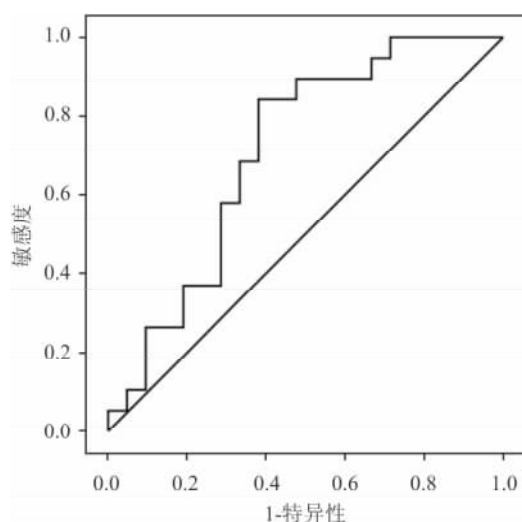


图3 lncRNA ENST00000502521 相对表达量对妊娠结局预测价值的 ROC 曲线

### 3 讨论

胚胎发育与种植潜能评估一直是人类辅助生殖领域的关键技术,选择最具发育潜能的胚胎移植并建立妊娠是人类辅助生殖技术的首要目标。胚胎质量的优劣在很大程度上取决于所获卵子的质量<sup>[8]</sup>。

有研究<sup>[9]</sup>表明胚胎质量与卵母细胞质量密切相关。人卵丘细胞与卵母细胞关系密切,前者直接影响后者的发育、成熟及胚胎质量<sup>[10-11]</sup>。通过对卵丘细胞基因表达的研究,或许能够发现可能作为卵母细胞质量、胚胎发育潜能及妊娠结局的分子标志物,并结合传统形态学评分方法可以为胚胎选择提供更加客观、准确且无创的方法。

本研究排除男方因素可能对卵母细胞受精的影响,首先比较了来自不同质量胚胎对应的卵丘细胞中 lncRNA ENST00000502521 的相对表达量,发现低质胚胎组 lncRNA ENST00000502521 表达量较优质胚胎组明显升高,说明 lncRNA ENST00000502521 参与影响卵母细胞成熟及胚胎发育。然而,尚不明确其中的调控机制。目前对 lncRNA 调控机制的研究主要是通过其位置相关或邻近的编码蛋白的基因。已有研究<sup>[12]</sup>报道低表达某一确定 lncRNA 可导致其附近某些编码蛋白基因的表达水平降低。通过基因图谱分析, lncRNA ENST00000502521 属于内在反义 lncRNA 转录本,所对应的正义转录本是位于 3 号染色体上。反义转录本认为在转录水平、基因印记、X 染色体沉默、DNA 甲基化、组蛋白修饰等多个水平上起调控作用<sup>[13]</sup>。推测该 lncRNA 可能通过对其靶基因的调控实现其生物学功能,对这一问题的阐释还需要进一步研究证实。

IVF 患者年龄、体重指数、基础性激素水平等因素可能会影响最终的妊娠结局。本研究通过相关性分析排除了患者一般情况和 lncRNA 的表达水平及妊娠结局存在相关性的可能。成功妊娠是反映移植胚胎发育潜能的重要指标。本研究证实,未妊娠组 lncRNA ENST00000502521 相对表达量较妊娠组明显增高。ROC 曲线显示该指标预测妊娠结局的灵敏度为 84.2%,特异性为 61.9%;说明卵丘细胞中 lncRNA ENST00000502521 相对表达量可以作为预测 IVF 患者妊娠结局的分子指标。

综上所述,本研究首次表明人卵丘细胞中 lncRNA ENST00000502521 的表达水平参与影响卵母细胞成熟及胚胎发育,但确切的调控机制还需要进一步研究。此外,检测 IVF 患者卵丘细胞中 lncRNA ENST00000502521 的相对表达量可能有助于预测 IVF 妊娠结局。

### 参考文献

- [1] Assidi M, Montag M, Van der Ven K, et al. Biomarkers of human

- oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study [J]. *Assist Reprod Genet*, 2011, 28(2): 173–88.
- [2] Sirard M A. Follicle environment and quality of *in vitro* matured oocytes [J]. *Assist Reprod Genet*, 2011, 28(6): 483–8.
- [3] Xu F, Stouffer R L, Müller J, et al. Dynamics of the transcriptome in the primate ovulatory follicle [J]. *Mol Hum Reprod*, 2011, 17(3): 152–65.
- [4] Borgho T, Povlsen B B, Andersen C Y, et al. Comparison of gene expression profiles in granulosa and cumulus cells after ovulation induction with either human chorionic gonadotropin or a gonadotropin-releasing hormone agonist trigger [J]. *Fertil Steril*, 2013, 100(4): 994–1001.
- [5] Wapinski O, Chang H Y. Long noncoding RNAs and human disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21(6): 354–61.
- [6] Clark M B, Mattick J S. Long noncoding RNAs in cell biology [J]. *Semin Cell Biol*, 2011, 22(4): 366–76.
- [7] Yerushalmi G M, Salmon-Divon M, Yung Y, et al. Characterization of the human cumulus cell transcriptome during final follicular maturation and ovulation [J]. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20(8): 719–35.
- [8] Hill G A, Freeman M, Bastias M C, et al. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for *in vitro* fertilization-embryo transfer [J]. *Fertil Steril*, 1989, 52(5): 801–6.
- [9] Watson A J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence [J]. *Anim Sci*, 2007, 85(13): E1–3.
- [10] Su Y Q, Sugiura K, Eppig J J. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism [J]. *Semin Reprod Med*, 2009, 27(1): 32–42.
- [11] Matzuk M M, Burns K H, Viveiros M M, et al. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation [J]. *Science*, 2002, 296(5576): 2178–80.
- [12] Ebisuya M, Yamamoto T, Nakajima M, et al. Ripples from neighbouring transcription [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(9): 1106–13.
- [13] Pasmant E, Sabbagh A, Masliah-Planchon J, et al. Role of noncoding RNA ANRIL in genesis of plexiform neurofibromas in neurofibromatosis type 1 [J]. *Natl Cancer Inst*, 2011, 103(22): 1713–22.

## The expression of lncRNA ENST00000502521 in human cumulus cells and embryo developmental competence

Li Juan, Cao Yunxia, Liu Tingting, et al

(Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To explore the expression of lncRNA ENST00000502521 in human cumulus cells of women undergoing *in vitro* fertilization (IVF) and the relationship between lncRNA ENST00000502521 and oocyte maturation and embryo development. Moreover, its predictive value of IVF outcome was also discussed. **Methods** The expression of lncRNA ENST00000502521 was measured in 40 pairs of cumulus cells from oocytes resulting in high-quality embryo and from oocytes resulting in poor-quality embryo by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR), and further associated these data with embryo developmental potential and competence to establish a pregnancy. The predictive value of the lncRNA ENST00000502521 was evaluated using a receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results** Notably elevated lncRNA ENST00000502521 expression levels were observed in the group poor-quality embryo compared to the group high-quality embryo ( $P < 0.05$ ). The relative expression levels of lncRNA ENST00000502521 in the non-pregnancy group were significantly higher than those in the pregnancy group ( $P < 0.05$ ). The area under the ROC curve (AUC) of lncRNA ENST00000502521 was 0.71 ( $P < 0.05$ , 95% CI: 0.55–0.87) and had a sensitivity of 84.2% and a specificity of 61.9% to predict embryo developmental potential. **Conclusion** The relative expression levels of lncRNA ENST00000502521 may be considered as potential biomarkers to predict embryo developmental competence and IVF outcome.

**Key words** cumulus cells; long noncoding RNAs; ENST00000502521; embryo developmental competence