

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720080150395

UDC _____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

脱碘酶 3 在小鼠胚胎着床和蜕膜化过程中的
表达与功能

Expression and Function of Type III Deiodinase During
Embryo Implantation and Decidualization

邓文波

指导教师姓名: 杨增明 教授、博导

专 业 名 称: 动物学

论文提交日期: 2012 年 8 月

论文答辩时间: 2012 年 9 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

中文摘要	I
ABSTRACT.....	III
1 引言.....	1
1.1 胚胎着床	1
1.1.1 胚胎着床的调节.....	1
1.1.1.1 卵巢类固醇激素及其核受体	1
1.1.1.2 Lif 与受体在着床中的作用	4
1.1.1.3 Msx1 及其靶基因在着床中的作用	4
1.1.1.4 Hand2-FGFs 信号通路在着床中的作用	5
1.1.1.5 IHH-COUP-TFII 信号通路在着床中的作用.....	6
1.1.2 蜕膜化过程的调节.....	6
1.1.2.1 PR 与蜕膜化	6
1.1.2.2 cAMP-PKA 信号途径与蜕膜化	7
1.1.2.3 ER 与蜕膜化.....	8
1.1.2.4 Bmp2-Wnt4 通路 与蜕膜化	9
1.1.2.5 DNA 损伤、多核化与蜕膜化	10
1.1.2.6 细胞周期与蜕膜化	11
1.2 Dio3 的结构与功能	12
1.2.1 脱碘酶家族的成员和结构.....	12
1.2.1.1 I 型脱碘酶.....	12
1.2.1.2 II 型脱碘酶	13
1.2.1.3 III 型脱碘酶	14
1.2.2 Dio3 与 DNA 甲基化和基因印迹	16
1.2.2.1 DNA 甲基化与基因转录	16
1.2.2.2 DNA 甲基化与基因印迹	18
1.2.2.3 Dio3 与基因印迹	18
1.2.3 T3 与代谢疾病	20
1.2.3.1 甲状腺激素与糖尿病	20

1.2.3.2 甲状腺激素与血脂代谢	21
1.2.4 T3 与生殖	22
1.3 立题背景与意义	24
2 材料与方法.....	25
2.1 实验动物	25
2.2 实验动物模型	25
2.2.1 早期妊娠.....	25
2.2.2 延迟着床与激活.....	25
2.2.3 类固醇激素处理.....	26
2.2.4 人工诱导蜕膜化.....	26
2.2.5 动物材料的收集和保存.....	26
2.3 脱碘酶相关基因的探针制备和序列分析	27
2.3.1 主要试剂和菌种.....	27
2.3.2 PCR 引物设计	27
2.3.3 组织中总 RNA 提取	28
2.3.4 DNA 消化	28
2.3.5 反转录.....	29
2.3.6 扩增及产物回收.....	29
2.3.6.1 PCR	29
2.3.6.2 胶回收.....	30
2.3.7 产物与 pGEM-T 载体的连接	31
2.3.8 感受态细胞的制备和转化.....	31
2.3.8.1 制备感受态细胞.....	31
2.3.8.2 重组质粒转化感受态细胞及鉴定.....	32
2.3.9 目的片段回收.....	33
2.3.9.1 阳性克隆质粒的提取.....	33
2.3.9.2 目的片段的 PCR 扩增和回收	34
2.3.10 地高辛标记 cRNA 探针	35
2.4 原位杂交	36

2.4.1	冰冻切片的制备.....	36
2.4.2	原位杂交相关试剂的配制.....	36
2.4.3	原位杂交操作步骤.....	37
2.5	Real-time PCR.....	38
2.5.1	RNA 提取.....	38
2.5.2	反转录.....	38
2.5.3	Real-time PCR 引物设计.....	39
2.5.4	Real-time PCR 操作流程.....	39
2.5.5	Real-time PCR 数据分析.....	40
2.6	免疫荧光.....	40
2.7	Western blot.....	41
2.7.1	Western blot 相关试剂的配制.....	41
2.7.2	蛋白样品提取.....	43
2.7.2.1	组织蛋白的提取.....	43
2.7.2.2	培养细胞的蛋白提取.....	44
2.7.3	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳.....	44
2.7.4	Western Blot 流程.....	45
2.8	载体构建和 siRNA 合成.....	46
2.8.1	基因组 DNA 提取.....	46
2.8.2	构建 HA-CREB-pCMV 和 Myc-CREB-pCMV.....	46
2.8.3	构建 Dio3-PGL3-Basic.....	48
2.8.4	siRNA 合成.....	49
2.9	原代细胞培养和处理.....	50
2.9.1	小鼠子宫内膜基质细胞的分离和培养.....	50
2.9.2	小鼠子宫基质细胞的体外诱导蜕膜化.....	51
2.9.3	cAMP 处理小鼠基质细胞.....	52
2.9.4	P4 和 RU486 处理小鼠基质细胞.....	52
2.9.5	Dio3 和 CREB 的干涉.....	52
2.9.6	荧光酶素活性分析.....	53

2.9.6.1	CREB、Atf4、Atf5 和 ER α 对 Dio3 启动子的调节	53
2.9.6.2	p38 对 Dio3 启动子的调节	53
2.9.6.3	Dio3 启动子载体定点突变	54
2.10	游离的 T3 测定	55
2.11	胞内 cAMP 测定	56
3	结果	58
3.1	脱碘酶相关基因在小鼠子宫中的表达	58
3.1.1	脱碘酶相关基因 mRNA 的定位	58
3.1.2	脱碘酶相关基因的定量检测	58
3.1.3	Dio3 蛋白的表达	59
3.1.4	Dio3 在延迟激活小鼠子宫中的表达	59
3.1.5	Dio3 在人工诱导蜕膜化子宫中的表达	60
3.1.6	Dio3os 在小鼠子宫中的表达	60
3.2	类固醇激素对 Dio3 的调节	61
3.2.1	类固醇激素在基质细胞中对 Dio3 的调节	61
3.2.2	类固醇激素在体内对 Dio3 的调节	62
3.3	cAMP-CREB 对 Dio3 的调节	64
3.3.1	cAMP 对 Dio3 的调节	64
3.3.2	cAMP 通过 p-CREB 和 p-p38 调节 Dio3	65
3.3.2.1	cAMP 对 p-CREB 的调节	65
3.3.2.2	cAMP 对 p-p38 的调节	66
3.3.2.3	p38 调节 CREB 的磷酸化	66
3.3.2.4	cAMP 通过 PKA 和 p-p38 共同调节 CREB 的磷酸化	67
3.3.2.5	cAMP 通过 PKA 和 p-p38 共同调节 Dio3 的调节	68
3.3.2.6	CREB 对 Dio3 的调节	69
3.3.3	CREB 在转录水平调节 Dio3	69
3.3.4	CREB 通过结合在 Dio3 的启动子上调节 Dio3	71
3.4	CREB 在体内对 Dio3 的调节	73
3.4.1	p-CREB 在子宫中的定位	73

3.4.2	着床位点和非着床位点的 cAMP 水平.....	74
3.5	Dio3 在蜕膜化过程中的表达、调节和功能	75
3.5.1	Dio3 在蜕膜化过程中的表达和调节	75
3.5.2	Dio3 在蜕膜化过程中的功能	77
3.5.3	T3 对 Dio3 的反馈调节	80
4	讨论.....	82
4.1	Dio3 在早期妊娠中的功能	82
4.2	孕酮及其受体对 Dio3 的调节	83
4.3	cAMP-p-p38-p-CREB 途径对 Dio3 的调节	84
4.4	T3 对 Dio3 的正反馈调节.....	85
5	结论.....	87
致 谢	88	
参考文献	89	
图 版	115	
附录 A	122	

ABSTRACT IN CHINESE	I
ABSTRACT IN ENGLISH	III
1 INTRODUCTION	1
1.1 Embryo implantation	1
1.1.1 Regulation of embryo implantation	1
1.1.1.1 Hormone and cogante receptors	1
1.1.1.2 Function of Lif and Lifr.....	4
1.1.1.3 Function of Msx1	4
1.1.1.4 Function of Hand2-FGFs signaling pathway.....	5
1.1.1.5 Function of IHH-COUP-TFII signal pathway.....	6
1.1.2 Regulation of decidualization	6
1.1.2.1 PR.....	6
1.1.2.2 cAMP-PKA	7
1.1.2.3 ER.....	8
1.1.2.4 Bmp2-Wnt4.....	9
1.1.2.5 DNA damage and polyploid	10
1.1.2.6 Cell cycle.....	11
1.2 Structure and function of Dio3	12
1.2.1 Deiodinase family and their structure	12
1.2.1.1 Type I deiodinase.....	12
1.2.1.2 Type II deiodinase	13
1.2.1.3 Type III deiodinase	14
1.2.2 DNA methylation, gene imprinting and Dio3	16
1.2.2.1 DNA methylation and gene transcription	16
1.2.2.2 DNA methylation and gene imprinting	18
1.2.2.3 Dio3 and gene imprinting.....	18
1.2.3 T3 and metabolic disease	20
1.2.3.1 T3 and diabetes.....	20

1.2.3.2	T3 and lipid metabolism.....	21
1.2.4	T3 and reproduction.....	22
1.3	The aim and significance.....	24
2	MATERIALS AND METHEODS.....	25
2.1	Experimental Animals.....	25
2.2	Animal models.....	25
2.2.1	Early pregnancy.....	25
2.2.2	Delayed implantation and activation.....	25
2.2.3	Hormonal treatment.....	26
2.2.4	Artificial decidualization.....	26
2.2.5	Collection and storage of animal materials.....	26
2.3	cRNA probe preparation of deiodinase-related genes.....	27
2.3.1	Reagents and bacteria.....	27
2.3.2	PCR primer design.....	27
2.3.3	Total RNA extraction from tissues.....	28
2.3.4	DNA digestion.....	28
2.3.5	Reverse transcription PCR.....	29
2.3.6	PCR and purification of PCR products.....	29
2.3.6.1	PCR.....	29
2.3.6.2	Purification of PCR products.....	30
2.3.7	Ligation of PCR products with pGEM-T.....	31
2.3.8	Preparation for competent cells and transformation.....	31
2.3.8.1	Preparation for competent cells.....	31
2.3.8.2	Transformation of recombinant plasmids.....	32
2.3.9	Purification of target DNA fragments.....	33
2.3.9.1	Plasmid extraction of postive clone.....	33
2.3.9.2	Amplification of target DNA fragments and recovery.....	34
2.3.10	Labeling cRNA probes.....	35
2.4	In situ hybridization.....	36

2.4.1	Preparation of frozen sections	36
2.4.2	Reagents and solutions	36
2.4.3	Protocol for in situ hybridization.....	37
2.5	Real-time PCR.....	38
2.5.1	RNA extraction.....	38
2.5.2	Reverse transcription.....	38
2.5.3	Primer design for real-time PCR	39
2.5.4	Protocol for real-time PCR.....	39
2.5.5	Data analysis	40
2.6	Immunofluorescence.....	40
2.7	Western blot.....	41
2.7.1	Reagents and solutions	41
2.7.2	Protein sample preparation.....	43
2.7.2.1	Tissue samples.....	43
2.7.2.2	Cell cultrue samples	44
2.7.3	SDS polyacrylamide gel electrophoresis.....	44
2.7.4	Protocol for Western blot.....	45
2.8	Plasmid construction and siRNA synthesis	46
2.8.1	Genomic DNA extraction.....	46
2.8.2	Construction of HA-CREB-pCMV and Myc-CREB-pCMV	46
2.8.3	Construction of Dio3-PGL3-Basic.....	48
2.8.4	siRNA synthesis	49
2.9	Culture of primary mouse uterine stromal cells	50
2.9.1	Isolation of mouse uterine stromal cells.....	50
2.9.2	Decidualizaiton of cultured stromal cells in vitro	51
2.9.3	cAMP treatment	52
2.9.4	P4 and RU486 treatment	52
2.9.5	siDio3 and siCREB in vitro.....	52
2.9.6	Luciferase assay	53

2.9.6.1	Regulation of Dio3 promotor activity by CREB, Atf4, Atf5 and ER α	53
2.9.6.2	Regulation of Dio3 promotor activity by p38	53
2.9.6.3	Site-directed mutation of Dio3 promoter	54
2.10	Free T3 measurement	55
2.11	Intracellular cAMP measurement	56
3	RESULTS.....	58
3.1	Expression and localizaiton of deiodinases in mouse uterus.....	58
3.1.1	Localizaiton of deiodinase mRNA in mouse uterus	58
3.1.2	Quantitative analysis of deiodinase mRNA in mouse uterus	58
3.1.3	Localizaiton of Dio3 protein in mouse uterus	59
3.1.4	Dio3 expression in mouse uterus under delayed impantation	59
3.1.5	Expression of Dio3 in decidua	60
3.1.6	Localizaiton of Dio3os in mouse uterus.....	60
3.2	Effects of steriod hormones on Dio3 expression.....	61
3.2.1	Regulation of steriod hormones on Dio3 expression in vitro	61
3.2.2	Regulation of steriod hormones on Dio3 expression in vivo	62
3.3	Dio3 regulation by cAMP-CREB	64
3.3.1	Dio3 regulation by cAMP	64
3.3.2	cAMP regulates Dio3 expression through p-CREB and p-p38	65
3.3.2.1	cAMP phosphorylates CREB.....	65
3.3.2.2	cAMP phosphorylates p38	66
3.3.2.3	p38 regulate CREB phoshporylation.....	66
3.3.2.4	cAMP phosphorylate CREB through both PKA and p38.....	67
3.3.2.5	cAMP regulates Dio3 through both PKA and p38	68
3.3.2.6	Dio3 regulation by CREB	69
3.3.3	CREB regulates Dio3 at transcriptional level	69
3.3.4	CREB regulates Dio3 by binding to Dio3 promoter	71
3.4	CREB regulates Dio3 in vivo	73
3.4.1	Localizaiton of p-CREB in uterus.....	73

3.4.2	cAMP level at inter-implantation site and implantation site	74
3.5	Expression,regulation and funciton of Dio3 during decidualizaiton.....	75
3.5.1	Expression and regulation of Dio3	75
3.5.2	Function of Dio3	77
3.5.3	T3 regulates Dio3 in a positive feedback manner	80
4	DISCUSSION	82
4.1	Function of T3 during early pregnancy	82
4.2	Dio3 expression regulation by progesterone.....	83
4.3	Dio3 expression regulation by c AMP-p-p38-p-CREB pathway	84
4.4	T3 regulates Dio3	85
5	CONCLUSION	87
	ACKNOWLEDGEMENTS	88
	REFERENCES.....	89
	PLATES	115
	APPENDIX	122

中文摘要

具有着床潜能的胚胎与接受态的母体子宫建立紧密联系并顺利着床是哺乳动物妊娠过程中至关重要的一步。虽然已经发现一系列与着床以蜕膜化过程相关的分子，但其具体机制仍不清楚。

在哺乳动物体内存在三种对甲状腺素具有不同调节功能的脱碘酶，II型脱碘酶（Dio2）可使甲状腺素（T4）转化为具有活性的三碘甲状腺原氨酸（T3），而I型（Dio1）和III型脱碘酶（Dio3）的主要功能是将T3代谢为没有生物活性的反式T3（rT3）或者二碘甲状腺原氨酸（T2）。在我们的RNA测序结果中，与延迟着床子宫相比，Dio3在激活子宫的着床位点显著上调。然而，Dio3在小鼠早期妊娠子宫中的表达、调节和作用机制尚未见报道。

原位杂交结果显示生成T3的Dio2在妊娠第3天和第4天的子宫上皮基质中有明显定位，介导T3功能的核受体Thra和Thrb在妊娠第3天和第4天的子宫上皮表达。小鼠早期妊娠过程中，原位杂交和免疫荧光结果显示Dio3 mRNA和蛋白在第5天着床位点的腔上皮基质细胞中具有特异定位。在随后的蜕膜化过程中，Dio3主要定位在系膜对侧的次级蜕膜区。在延迟着床小鼠中，未检测到Dio3的表达，当用雌激素激活胚胎着床后，可显著增加Dio3在着床位点的表达。与对照侧的子宫相比，人工诱导的蜕膜瘤组织中Dio3的表达显著上调。免疫荧光结果显示Dio3主要定位在蜕膜细胞的质膜上。且我们通过ELISA证实，与非着床点相比，胚胎着床位点处子宫中的游离T3的水平显著降低。这些结果提示，着床后蜕膜细胞上高表达的Dio3可能通过降低子宫中的T3在蜕膜化过程行使功能。

在卵巢切除小鼠中，孕酮可显著上调Dio3的表达。在体外培养的基质细胞中也发现了类似的结果。在体外培养的基质细胞中，cAMP以时间依赖的方式对Dio3的表达进行调节。进一步的研究表明，cAMP通过激活PKA和p38，进而通过磷酸化CREB调节Dio3的表达。干涉CREB之后Dio3的表达显著下调，表明Dio3处于CREB的下游。

通过构建Dio3的报告载体，我们发现CREB可以显著上调Dio3启动子报告载体的活性，而p38的抑制剂可以在一定程度上抑制CREB介导的Dio3启动子活性的增强。突变Dio3启动子上游-215 ~ -206 bp处的CREB结合位点之后，可显著抑制

Dio3的启动子活性，推测CREB可结合到Dio3的启动子上调节Dio3的转录活性。p-CREB和CREB在第5天着床位点处的腔上皮皮下基质中与Dio3的共定位也支持CREB对Dio3的调节。

在基质细胞诱导蜕膜化过程中，Dio3的mRNA和蛋白显著增加，且证实这一过程主要由PKA和p38激酶介导。在蜕膜化过程中激活T3的Dio2的表达却显著下调。加入脱碘酶的抑制剂IOP可以显著抑制蜕膜化过程，且干涉Dio3的表达也可以影响蜕膜化，我们推测T3过高可能抑制蜕膜化过程。

在小鼠的早期妊娠过程中，由PKA和p38调节的CREB通过在转录水平上影响Dio3的表达，通过调节子宫中的T3的水平调节蜕膜化过程。

关键词: 胚胎着床; 蜕膜化; Dio3; 子宫内膜;

Abstract

The establishment of the communication between implantation-competent embryo and receptive uterus is a critical step for successful pregnancy of mammalian reproduction. Although many genes important for implantation and decidualization have been explored, the underlying mechanism still remains unclear.

Three deiodinases regulating thyronine (T3) metabolic balance have been identified in mammals. Type II deiodinase (Dio2) converts thyroxine (T4) to T3 while type I and type III deiodinases inactivate T3 to reverse T3 (rT3) or T2, respectively. Our RNA-sequencing data indicated that Dio3 expression is significantly increased in activated uterus compare to delayed uterus. However, the expression, regulation and function of Dio3 have not been reported yet.

Dio2, an activator of T3, is strongly expressed in subluminal stroma on days 3 and 4 of pregnancy. Thra and $\text{Thr}\beta$, nuclear receptors of T3, are localized in uterine epithelium on days 3 and 4 of pregnancy. Dio3 mRNA and protein are localized in the subluminal stroma immediately surrounding the implanting blastocyst on day 5 and then in the secondary decidual zone in the anti-mesometrium. Immunofluorescent results show that Dio3 protein is mainly localized in plasma membrane. Although there was no signal in delayed uterus, Dio3 was induced in the subluminal stroma immediately surrounding the implanting blastocyst after delayed uterus was terminated by estrogen injection. Under artificial decidualization, Dio3 expression is strongly induced in secondary decidua zone in the anti-mesometrium. ELISA results reveal that there is a decreased T3 level in implantation site than inter-implantation site. These data suggest that the high level of Dio3 may play an important role during decidualization through decreasing uterine T3 level.

In ovariectomized mice, progesterone upregulates Dio3 expression rapidly in a progesterone receptor-dependent manner. Data from progesterone treatments in cultured stromal cells also show similar results. cAMP induces Dio3 expression in a time-dependent manner in cultured stromal cells. The regulation of Dio3 by cAMP is

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库