

## *Dctd* 基因缺失导致小鼠生育力降低的表型研究

丁霄 王远仙 石玉衡 周丹<sup>△</sup>

(复旦大学生物医学研究院 上海 200032)

**【摘要】** 目的 探究脱氧胞苷酸脱氨酶(deoxycytidylate deaminase, DCTD)基因(*Dctd*)缺失对小鼠胚胎发育的影响。方法 通过体外转录获得sgRNA和Cas9 mRNA,进行受精卵显微注射,构建*Dctd*敲除小鼠模型;利用*Dctd*<sup>-/-</sup>小鼠进行繁育实验,统计成活子代鼠的数量;对着床后*Dctd*<sup>-/-</sup>小鼠胚胎的发育情况进行形态学观察,并通过制作胚胎石蜡切片、HE染色进行组织学分析;于E0.5d取胚胎进行体外培养,统计发育至囊胚期的胚胎比例。结果 *Dctd*<sup>+/-</sup>基因型的父母本生育的子代数量与野生型(*Dctd*<sup>+/+</sup>)对照组基本一致。仅父本缺失*Dctd*基因的子代数量相较于对照组减少约9%,仅母本缺失*Dctd*基因的子代数量相较于对照组减少约48%。父、母本的基因型均是*Dctd*<sup>+/-</sup>时,生育子代的平均数量为野生型的40%;该繁育组60%的胚胎在着床后出现发育迟缓、败育现象。体外培养实验中,该组受精卵出现2-至4-细胞期发育阻滞现象,囊胚发育率显著低于对照组。结论 缺失*Dctd*的雌鼠生育力下降,*Dctd*对维持小鼠胚胎发育具有重要作用。

**【关键词】** 脱氧胞苷酸脱氨酶(DCTD); 小鼠; 胚胎发育; 生育力

**【中图分类号】** R-332, Q132.4 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2026.01.003

## *Dctd* deletion impairs fertility in mice: a phenotypic research

DING Xiao, WANG Yuan-xian, SHI Yu-heng, ZHOU Dan<sup>△</sup>

(Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of deoxycytidylate deaminase (DCTD) gene (*Dctd*) deletion in mouse embryonic development. **Methods** Cas9 mRNA and sgRNA were synthesized via *in vitro* transcription and microinjected into zygotes to generate a *Dctd* knockout (*Dctd*<sup>-/-</sup>) mouse model. Fertility was assessed by quantifying the number of viable offspring from various breeding combinations. Post-implantation *Dctd*<sup>-/-</sup> embryos were examined morphologically and histologically using paraffin sections stained with HE. Embryos collected at E0.5d were cultured *in vitro* to evaluate the rate of development to the blastocyst stage. **Results** Breeding between heterozygous *Dctd* (*Dctd*<sup>+/-</sup>) parents produced offspring numbers comparable to wild-type (*Dctd*<sup>+/+</sup>) controls. Crosses between *Dctd*<sup>+/-</sup> females and *Dctd*<sup>-/-</sup> males resulted in an approximately 9% reduction in average litter size compared to controls, while crosses between *Dctd*<sup>-/-</sup> females and *Dctd*<sup>+/+</sup> males showed a 48% reduction. When both parents were *Dctd*<sup>-/-</sup>, the average number of offspring declined to 40% of the wild-type level, and around 60% of post-implantation embryos exhibited developmental delays or resorption. *In vitro* culture of E0.5d embryos from this group revealed significant developmental arrest at the 2- to 4-cell stage and a markedly lower blastocyst formation rate compared to controls. **Conclusion** Loss of *Dctd* in female mice leads to reduced fertility, highlighting the critical role of *Dctd* in supporting normal embryonic development in mice.

**【Key words】** deoxycytidylate deaminase (DCTD); mouse; embryonic development; fertility

\* This work was supported by Fudan University Talent Introduction Program (IDH1340038, IDH1340045, IDH1340046, IDH1340059).

复旦大学人才引进项目 (IDH1340038, IDH1340045, IDH1340046, IDH1340059)

<sup>△</sup>Corresponding author E-mail: danzhou@fudan.edu.cn

网络首发时间:2025-12-29 09:09:24 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20251225.1724.002>

细胞内脱氧胸苷三磷酸(deoxythymidine triphosphate, dTTP)的合成分为从头合成和补救合成两种途径,从头合成途径需要由脱氧胸苷一磷酸(deoxythymidine monophosphate, dTMP)合成酶催化亚甲基四氢叶酸(methylene tetrahydrofolate, methyleneTHF)和脱氧尿苷一磷酸(deoxyuridine monophosphate, dUMP)发生反应,转化为dTTP和二氢叶酸(dihydrofolate, DHF);补救合成途径则以胸苷为原料,在胸苷激酶催化下合成dTTP,两种途径产生的dTTP进一步转化为dTTP参与维持细胞dNTP池平衡<sup>[1]</sup>。脱氧胞苷酸脱氨酶(deoxycytidylate deaminase, DCTD)由*Dctd*基因编码,其功能是催化dCMP脱氨生成dUMP, dUMP是dTTP合成的重要前体。据报道, dUMP并非完全通过DCTD反应通路生成,例如脱氧尿苷三磷酸水解酶(deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase, dUTPase)催化dUTP脱焦磷酸也可以供应dUMP来参与dTTP合成反应;DCTD对dTTP的合成非常重要,例如V79细胞内超过80%的dTTP来源于DCTD催化的脱氨反应, DCTD功能缺失会导致细胞内dTTP水平明显下降,干扰dNTP池的平衡<sup>[2-4]</sup>。在多种生物体内DCTD活性变化会导致细胞增殖异常,裂殖酵母的DCTD突变会导致细胞周期进程延缓,水稻dCMP脱氨酶缺失也会导致细胞周期阻滞、DNA损伤增加<sup>[2,5]</sup>。近年来关于DCTD的研究重点主要集中于其脱氨作用和肿瘤细胞耐药性的关系,早期的主要观点认为该酶对吉西他滨(gemcitabine)、地西他滨(decitabine)等核苷类似物的脱氨作用可能导致其无法掺入肿瘤细胞的基因组,降低药物效果;但最新研究表明DCTD会促进这类药物的毒性,抑制DCTD表达会提高细胞的耐药性<sup>[6-9]</sup>。

胚胎在生长发育过程中需要进行活跃的细胞增殖, DNA的合成和修复需要许多参与核苷酸合成的酶,有研究表明这些酶的功能与胚胎发育密切相关。例如, *dUTPase*完全敲除会导致小鼠囊胚的内细胞团和滋养层生长受阻;抑制丝氨酸羟甲基转移酶2(serine hydroxymethyltransferase 2, SHMT2)的活性会导致约50%的小鼠受精卵发生原核期阻滞,囊胚发育率仅达到约25%<sup>[10-11]</sup>。作为dTTP合成的关键酶之一, DCTD功能异常会导致细胞周期延缓,因此,缺失DCTD可能会对胚胎发育产生不利的影 响。Roth等<sup>[12]</sup>发现,一定浓度的dGMP处理

11~13体节的鸡胚会导致DCTD活性降低,同时检测到胚胎内总蛋白含量下降、胚胎生长发育受抑制;还有研究报道指出,相同条件下大鼠胚胎的肝脏或无肝脏胚胎的匀浆中脱氧胞苷一磷酸(deoxycytidine monophosphate, dCMP)及5-甲基脱氧胞苷一磷酸(5-methyldeoxycytidine monophosphate, 5mdCMP)的脱氨反应程度明显高于成年大鼠肝脏样品<sup>[13]</sup>;此外,欧洲水蛙的胚胎匀浆对dCMP的脱氨反应水平从受精卵时期到原肠胚形成阶段呈提高趋势<sup>[14]</sup>。这些发现提示DCTD可能在动物胚胎发育过程中具有重要作用。

先兆子痫是一种与妊娠有关的高血压疾病,研究人员对45例有肾脏病变或高血压的患者进行检测,发现其中19例出现先兆子痫,其中有17例血清DCTD升高;推测血浆尿酸和血清DCTD升高都是先兆子痫的早期指标<sup>[15]</sup>。在另一项研究中,210例妊娠异常的患者中有133例诊断为先兆子痫,其中124例的DCTD水平异常升高<sup>[16]</sup>。这些发现提示DCTD水平异常可能对人类生殖健康有负面影响。但相关的功能研究目前未见报道, DCTD水平失调与胚胎发育之间的内在联系未知。

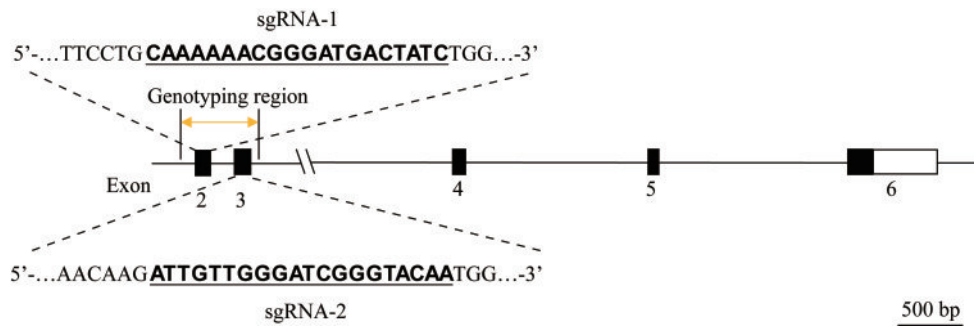
为了探究DCTD在哺乳动物胚胎发育中的具体作用,本研究构建了*Dctd*敲除的小鼠模型,通过繁育实验等探究*Dctd*缺失对小鼠胚胎发育的影响。

## 材 料 和 方 法

**实验动物** 本实验使用的小鼠由DBA/2品系与C57BL/6品系小鼠杂交获得,前述两种品系小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,在复旦大学实验动物中心(上海医学院)SPF级实验室养殖。喂养条件:12 h昼夜交替,温度22~23℃,湿度45%~55%,自由进食。本研究所涉及动物实验均已通过复旦大学实验动物科学部的伦理审查(批准号:202307021S)。

**CRISPR-Cas9介导的基因敲除** 在NCBI数据库中查询小鼠*Dctd*基因序列(Gene ID:320685),根据Exon 2及Exon 3序列设计2条sgRNA(图1)。Cas9在sgRNA引导下识别DNA的Pam位点并进行切割,靶向删除DNA片段,导致基因敲除。

**体外转录** sgRNA体外转录以pX330为模板,PCR扩增获得带T7启动子的转录模板,引物序列

图1 小鼠 *Dctd* 基因敲除策略Fig 1 Knockout strategy of *Dctd* gene in mouse

如下(下划线标注部分的是T7启动子序列,红色部分是sgRNA靶序列)。sgRNA-1-F:5'-TAATACGACTCACTATAGGGCAAAAAACGGGATGACTATCTGG...-3';sgRNA-2-F:5'-TAATACGACTCACTATAGGGATTGTTGGGATCGGGTACAAGTTT TAGAGCTAGAA-3';sgRNA-R:5'-AAAAAAGCACCGACTCGGTG-3'。使用 Thermo Fisher 公司的 MEGAshortscript Kit 进行体外转录。模板通过 PCR 扩增获得,胶回收纯化。室温下按说明书配制 20  $\mu$ L 反应体系:无酶水,10 $\times$ 反应缓冲液 2  $\mu$ L,4种NTP溶液(75 mmol/L)各 2  $\mu$ L,模板不超过 8  $\mu$ L,T7酶混合物 2  $\mu$ L。轻弹充分混匀反应体系,37 $^{\circ}$ C孵育 2 h 以上,再加入 TURBO DNase 1  $\mu$ L 去除模板 DNA,37 $^{\circ}$ C孵育 15 min。转录产物通过苯酚:氯仿萃取和酒精沉淀进行纯化,保存在-80 $^{\circ}$ C冰箱。

**Cas9 mRNA 模板准备** 同样以 pX330 为模板进行 PCR 扩增,引物序列如下(T7启动子以下划线标注)。Cas9-F:5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGACTATAAGGACCA-3';Cas9-R:5'-TTACTTTTCTTTTGGCC-3'。使用 Thermo Fisher 公司的 mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit 进行体外转录。模板通过 PCR 扩增获得,胶回收纯化。室温下按试剂盒说明书配制 20  $\mu$ L 反应体系:无酶水,T7 2 $\times$ NTP/ARCA 10  $\mu$ L,10 $\times$ T7反应缓冲液 2  $\mu$ L,模板 0.1~0.2  $\mu$ g,T7酶混合物 2  $\mu$ L。轻弹充分混匀反应体系,37 $^{\circ}$ C孵育 2 h,再加入 TURBO DNase 1  $\mu$ L 37 $^{\circ}$ C孵育 15 min,去除模板 DNA。Poly(A)加尾:向反应体系依次加入无酶水 36  $\mu$ L,5 $\times$ E-PAP 缓冲液 20  $\mu$ L,MnCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) 10  $\mu$ L,ATP 溶液(10 mmol/L) 10  $\mu$ L;混合体系加 E-PAP 酶 4  $\mu$ L,混匀,37 $^{\circ}$ C孵育 45 min,冰上暂存。

使用 MEGAclear Kit 进行纯化,保存在-80 $^{\circ}$ C冰箱。

**显微注射** 将上述两条 sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合,每条 sgRNA 的终浓度为 26 ng/ $\mu$ L。对小鼠受精卵进行胞质显微注射。显微操作系统操作臂安装持卵针和注射针,注射臂压强平衡后更换装入 sgRNA 混合液的注射针,在显微镜观察下将两针以适宜角度探入培养基操作滴,转移适量 PN2~PN3 时期的受精卵至操作滴,调节针尖和卵在同一焦平面,并注意保证注射针通畅及针口直径适中;持卵针固定受精卵,注射针穿过透明带,并确保刺入卵内,施加适当压力完成注射,迅速撤出注射针,尽可能减少对卵的损伤。体外培养至次日,将形态正常的 2-细胞期胚胎移植至受体母鼠的输卵管。

**PCR Genotyping 检测引物设计** 根据 *Dctd* 基因 Intron 1 及 Intron 3 序列设计 PCR 鉴定引物(F:5'-CATGTTTCATGGTTTCTGCCTA-3';R:5'-T TCAATCAACAGGCTACCACAG-3')。

**PCR 模板制备** 剪取少量小鼠组织(如脚趾或尾尖)置于 1.5 mL EP 管,瞬时离心后各管加入 500  $\mu$ L 裂解液(提前加入蛋白酶 K),55 $^{\circ}$ C孵育过夜。各管样品加 500  $\mu$ L 异丙醇颠倒混匀,12 000 r/min(离心半径 8.4 cm)离心 10 min 后去上清,加入 200  $\mu$ L TE 缓冲液,55 $^{\circ}$ C孵育 1 h,溶解 DNA。

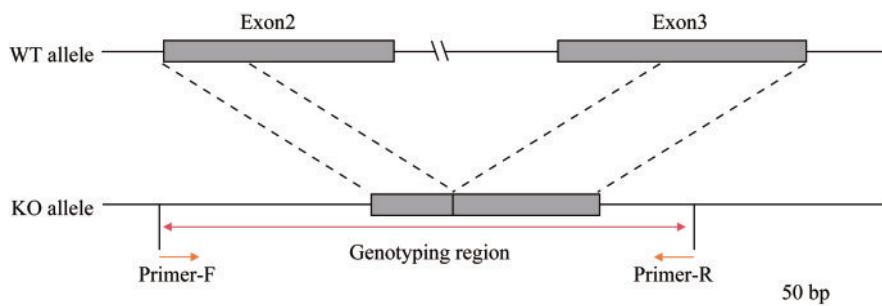
**PCR 反应体系** 实验中使用新贝(上海)生物科技有限公司的 2 $\times$ Ultra Taq PCR Mix(含 Ultra Taq Polymerase,dNTPs 等)。反应体系(20  $\mu$ L)主要成分:两端引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.4  $\mu$ L,模板 2  $\mu$ L,2 $\times$ Ultra Taq PCR Mix 10  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L,反应前振荡混匀并瞬时离心。

**PCR 反应程序** 预变性:95 $^{\circ}$ C,3 min;变性:95 $^{\circ}$ C,15 s;退火:60 $^{\circ}$ C,20 s;延伸:72 $^{\circ}$ C,30 s。循环 32 次。再延伸:72 $^{\circ}$ C,5 min。产物 4 $^{\circ}$ C保存。反应

完成后用琼脂糖凝胶电泳鉴定。

通过体外转录获得目的sgRNA和Cas9 mRNA,并对野生型(WT)小鼠受精卵进行显微注射,通过胚胎移植获得29只仔鼠。测序鉴定后获得未发生体细胞嵌合且*Dctd*基因敲除的小鼠共3只,其中1只发生移码,无法表达有功能的DCTD蛋白,而另2只小鼠

发生了整码缺失,可能表达不完整但功能未完全受损的DCTD蛋白,因此我们选取发生移码的1只小鼠(*Dctd*序列敲除314 bp)进行后续实验。通过将该*Dctd* KO小鼠和野生型C57BL/6小鼠回交2次,增强遗传稳定性,再通过扩大繁育获得后续实验使用的小鼠品系。*Dctd*基因敲除情况如图2所示。



WT: Wild-type; KO: Knockout.

图2 小鼠*Dctd*基因序列编辑情况

Fig 2 *Dctd* gene editing outcome in mouse

目的小鼠*Dctd*序列编码删除大约40个氨基酸,且出现移码,翻译过程提前终止。后续实验中所有新生小鼠均通过PCR实验鉴定基因型,以其中一批同窝出生的小鼠鉴定结果为例。结果显示(图3A)*Dctd*<sup>+/+</sup>基因型小鼠仅有1条607 bp的条带,如WT样品所示;*Dctd*<sup>-/-</sup>小鼠仅出现1条293 bp的条带,如KO样品所示;*Dctd*<sup>+/-</sup>小鼠同时出现607 bp及293 bp两个条带,如Het样品所示。存活至断乳的*Dctd*<sup>+/-</sup>小鼠、*Dctd*<sup>-/-</sup>小鼠在外形、体质量等方面与*Dctd*<sup>+/+</sup>小鼠无明显差异,进食饮水及排便等均正常。

**Western blot检测** 为确认蛋白敲除,取野生型和*Dctd*<sup>-/-</sup>小鼠骨髓细胞制样进行SDS-PAGE电泳检测。恒定电压140 V电泳70 min,使用PVDF膜200 mA恒定电流转印1 h;1×TBST清洗10 min,5%脱脂牛奶溶液封闭15 min,1×TBST清洗数次;4℃一抗孵育(Anti-DCTD购买自Proteintech公司,货号16784-1-AP,工作浓度1:1 000,过夜孵育;内参Anti-β-Actin购买自Abclonal公司,货号AC026,工作浓度1:10 000,孵育约1 h);1×TBST清洗数次后加入二抗(工作浓度1:10 000),室温孵育1 h,再用1×TBST清洗数次后显影。

Western blot检测结果表明*Dctd*<sup>-/-</sup>小鼠样品中DCTD蛋白信号几乎消失(图3B)。以上结果证明*Dctd* KO小鼠模型构建成功。

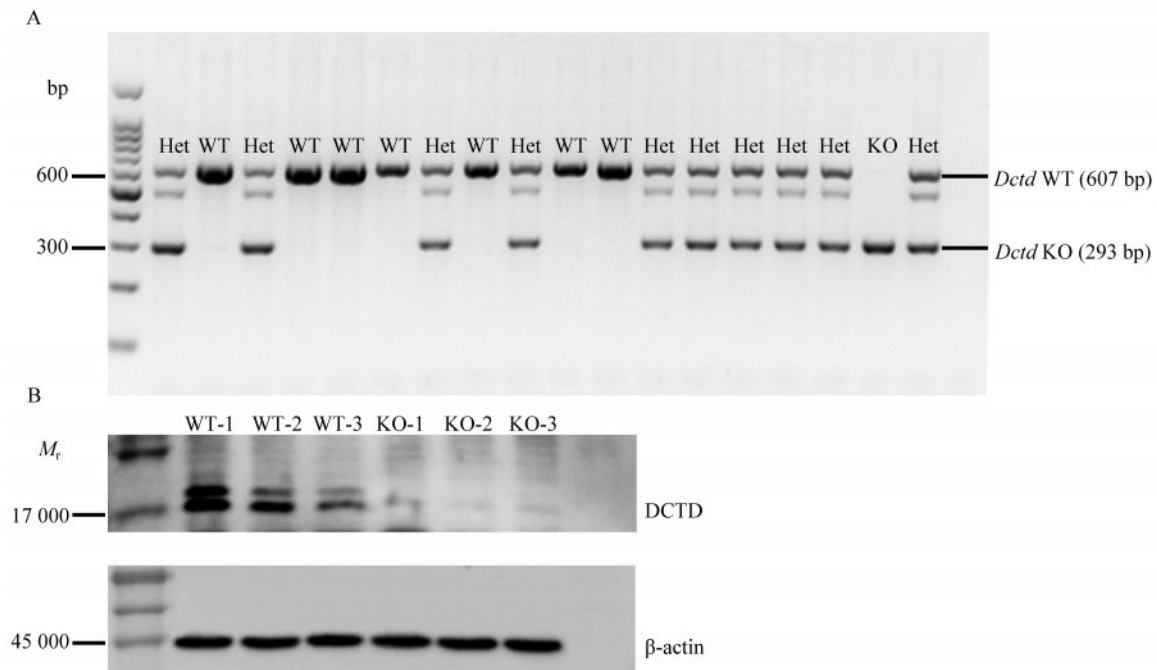
**繁育实验统计** 将各种基因型的性成熟小鼠分别合笼配繁,在子代鼠出生21日龄统计存活数

量。大约在仔鼠10日龄时剪脚趾编号。*Dctd*<sup>+/+</sup>(♀)×*Dctd*<sup>+/+</sup>(♂)组9窝,*Dctd*<sup>+/-</sup>(♀)×*Dctd*<sup>+/-</sup>(♂)组9窝,*Dctd*<sup>+/+</sup>(♀)×*Dctd*<sup>-/-</sup>(♂)组5窝,*Dctd*<sup>-/-</sup>(♀)×*Dctd*<sup>+/+</sup>(♂)组6窝,*Dctd*<sup>-/-</sup>(♀)×*Dctd*<sup>-/-</sup>(♂)组10窝。

**胚胎石蜡切片** 小鼠E7.5d胚胎连同蜕膜取出,浸泡在组织固定液(4% PFA)中,进行组织石蜡包埋。野生型胚胎及*Dctd* KO胚胎各取5~6个,制作石蜡切片,切片用黏附性载玻片捞取,并在55℃烘箱烘干6 h。

**切片HE染色** (1)脱蜡复水:脱蜡液I、II浸泡,各15 min;无水乙醇I、II、III浸泡,各5 min;75%乙醇浸泡2 min;水洗1 min。(2)高倍恒染预处理液浸泡1 min。(3)核染:苏木精染色3 min,水洗1 min。(4)分化:恒染分化液浸泡3~5 s,水洗20 s;恒染返蓝液浸泡1 min,水洗20 s。(5)95%乙醇浸泡1 min。(6)复染:伊红Y染液染色15~30 s。(7)脱水透明:无水乙醇IV、V、VI浸泡,各2 min;二甲苯I、II浸泡,各2 min。(8)中性树脂胶封片,通风橱晾5~6 h。晾干后使用光学显微镜观察,对照组和实验组分别选取1份样品拍摄。

**胚胎体外培养** 15:00~16:00取适龄雌性小鼠腹腔注射10 U孕马血清促性腺激素(pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG),48 h后腹腔注射10 U人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG),诱导超数排卵,与雄鼠合笼,



A: Genotyping of mice with different genotypes by PCR. WT: *Dctd*<sup>+/+</sup>; Het: *Dctd*<sup>+/-</sup>; KO: *Dctd*<sup>-/-</sup>. B: DCTD protein expression levels in bone marrow cells of mouse.

图3 小鼠 *Dctd* 基因敲除及蛋白缺失情况鉴定

Fig 3 Confirmation of *Dctd* gene knockout and protein loss in mouse

次日上午检查阴道栓,取交配成功的雌鼠剖取胚胎(此时胚胎位于输卵管壶腹部),对照组及实验组胚胎分别取自2~3只雌鼠。胚胎取出后置入M2培养基中,加入透明质酸酶消化卵丘细胞,并用培养基清洗。将胚胎置于提前平衡好的KSOM培养基中,5% CO<sub>2</sub>、37℃培养。在预期设计的观察时间使用倒置显微镜拍摄,实验组及对照组胚胎各分为3个视野,分别统计视野内胚胎总数及处于某发育阶段的胚胎数。

**统计学分析** 使用Graphpad Prism 9.0.0软件对特定时间发育至不同阶段的着床前小鼠胚胎比例进行统计分析并作图。数据用中位数(范围)表示。采用Wilcoxon秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

***Dctd* 纯合敲除会导致雌鼠生育力降低** 以基因型均为 *Dctd*<sup>+/+</sup> 的父本、母本为对照组,对各实验组产生的可存活至断乳(21日龄)的子代数量进行统计。基于多次交配实验的总体结果进行统计, *Dctd*<sup>+/-</sup> (♀) × *Dctd*<sup>+/-</sup> (♂) 组平均产子数量和对照

组基本一致;对78只子代进行基因型鉴定,结果显示 *Dctd*<sup>+/+</sup>、*Dctd*<sup>+/-</sup>、*Dctd*<sup>-/-</sup> 基因型的数量分别为20、36、22,基本符合基因分离定律(表1)。提示小鼠仅敲除1个 *Dctd* 等位基因不会对生育力产生影响。

表1 各基因型交配组合产生子代数量平均值统计

Tab 1 Average numbers of offspring from different crossings

Crossing (female × male)	Number of litters	Total number of pups alive	Pups/litters
<i>Dctd</i> <sup>+/+</sup> × <i>Dctd</i> <sup>+/+</sup>	9	75	8.33
<i>Dctd</i> <sup>+/-</sup> × <i>Dctd</i> <sup>+/-</sup>	9	78	8.67
<i>Dctd</i> <sup>+/+</sup> × <i>Dctd</i> <sup>-/-</sup>	5	38	7.60
<i>Dctd</i> <sup>-/-</sup> × <i>Dctd</i> <sup>+/+</sup>	6	26	4.30
<i>Dctd</i> <sup>-/-</sup> × <i>Dctd</i> <sup>-/-</sup>	10	33	3.30

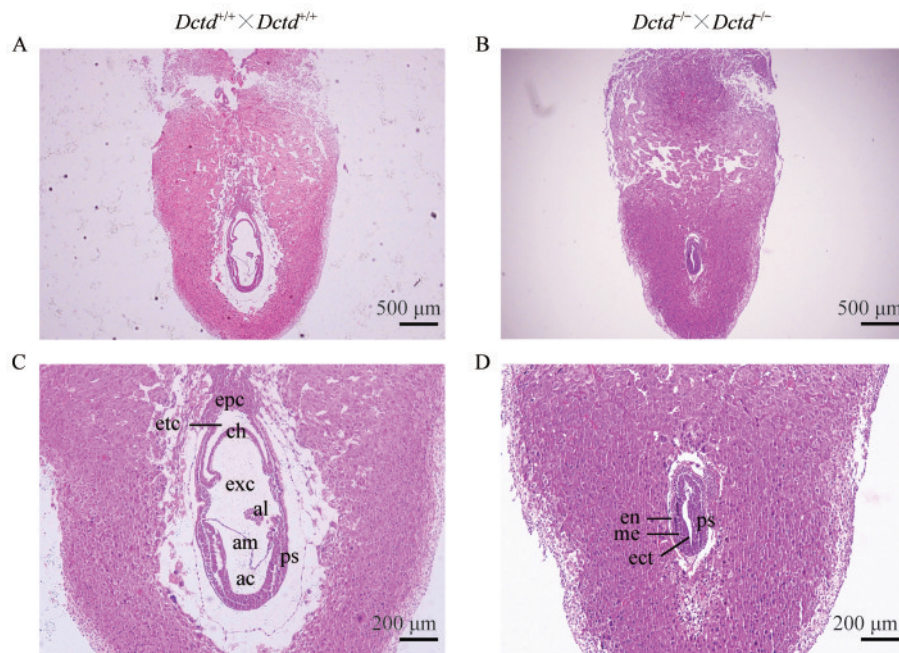
*Dctd*<sup>+/+</sup> : *Dctd*<sup>+/-</sup> : *Dctd*<sup>-/-</sup> = 20 : 36 : 22 (offspring from *Dctd*<sup>+/-</sup> × *Dctd*<sup>+/-</sup>).

父本完全缺失 *Dctd* 时, *Dctd*<sup>+/+</sup> 母本平均产子数较对照组减少 8.8%; 而母本完全缺失 *Dctd*、父本基因型是野生型时,平均产子数较对照组降低 48.4%。父本、母本均完全缺失 *Dctd* 时,平均产子数较对照组降低 60.4%(表1)。证明 DCTD 完全缺失会导致雌鼠生育力降低,提示 DCTD 的母源影响在胚胎发育过程中占据主导地位。

***Dctd*<sup>-/-</sup>父母本产生的胚胎着床后易败育** 为了分析 *Dctd*<sup>-/-</sup>基因型的父母本交配产生的胚胎出现异常的具体时期,我们对着床后胚胎进行了组织学和形态学观察。

小鼠胚胎的原肠胚形成起始于E6.5d,此时原条形成,E7.5d~E8.0d开始体节发生和神经发生,这是胚胎发育的关键阶段<sup>[17]</sup>。为了分析 *Dctd* 缺失是否对原肠胚形成产生影响,取E7.5d胚胎连同蜕膜

一起固定并制作石蜡切片,通过HE染色进行组织学观察。由 *Dctd*<sup>+/+</sup>父母本交配产生的E7.5d小鼠胚胎中已形成明显的羊膜、尿囊、绒毛膜等结构,且羊膜腔、胚外体腔及外胎盘腔均已形成(图4A、4C);相同时期,基因型都是 *Dctd*<sup>-/-</sup>的父母本产生的发育异常胚胎已形成原条,有胚层分化,但未呈现该时期应出现的其他结构,提示 *Dctd* 缺失胚胎的原肠胚形成受阻(图4B、4D)。



HE staining of embryos from *Dctd*<sup>+/+</sup>×*Dctd*<sup>+/+</sup> mating (A, C) and *Dctd*<sup>-/-</sup>×*Dctd*<sup>-/-</sup> mating (B, D). epc: Ectoplacental cone; ch: Chorion; exc: Exocoelomic cavity; etc: Ectoplacental cavity; am: Amnion; al: Allantois; ac: Amniotic cavity; ps: Primitive streak; ect: Ectoderm; en: Endoderm; me: Mesoderm.

图4 着床后(E7.5d) *Dctd* WT和 *Dctd* KO小鼠胚胎的组织学分析

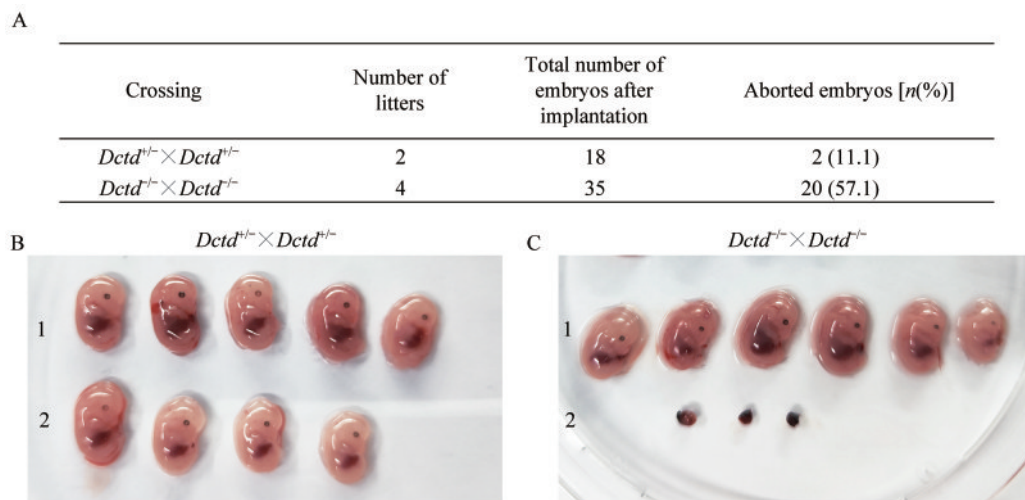
Fig 4 Histological analysis of post-implantation (E7.5d) embryos from *Dctd* WT mouse and *Dctd* KO mouse

在此基础上,取发育至更成熟阶段的胚胎进行形态学观察,并对胚胎发育情况进行统计。在后续部分实验中以 *Dctd* 杂合缺失的父母本产生的胚胎作为对照。E9.5d~E13.5d小鼠胚胎细胞数量明显增多,几乎同时发育所有主要器官系统,为器官的功能奠定重要基础<sup>[18]</sup>,因此E13.5d也是分析小鼠胚胎发育情况的重要时期。取E13.5d小鼠胚胎,探究 *Dctd* 缺失是否对器官发生时期的胚胎产生影响。图5B、5C分别是来自 *Dctd* 杂合缺失父母本和 *Dctd* 纯合缺失父母本的同窝胚胎。如图5B第1、2排及图5C第1排所示,E13.5d的正常胚胎可观察到明显的头部、眼、尾部等结构;经统计,对照组88.9%的胚胎形态正常。图5C第2排所示是由 *Dctd* 纯合缺

失父母本产生的败育胚胎,该组呈萎缩退化状态的胚胎比例达到57.1%(图5A)。

上述结果说明 *Dctd*<sup>-/-</sup>基因型父母本产生的胚胎可以发育至着床期,但相较于野生型胚胎更容易表现出发育迟滞、败育现象。进一步证明了DCTD在胚胎发育过程中具有重要的调控作用。

**体外培养条件下 *Dctd*<sup>-/-</sup>父母本交配产生的合子发育受阻** 为了进一步分析 *Dctd* 基因缺失是否影响小鼠胚胎着床前发育,在E0.5d剖取受精卵并进行体外培养。E1.5d可观察到 *Dctd*<sup>-/-</sup>(♀)×*Dctd*<sup>-/-</sup>(♂)组和 *Dctd*<sup>+/-</sup>(♀)×*Dctd*<sup>+/-</sup>(♂)对照组胚胎都基本发育至2-细胞期;E2.5d对照组发育至4-细胞期或更成熟时期的胚胎占该组总数的比例的中位



A: The statistics of aborted embryo numbers. B, C: Embryos at E13.5d from  $Dctd^{+/-} \times Dctd^{+/-}$  (B) or  $Dctd^{+/-} \times Dctd^{-/-}$  (C) matings.

图5 父母本基因型都是 *Dctd* 杂合缺失或 *Dctd* 纯和缺失时胚胎着床后 (E13.5d) 的发育情况

Fig 5 Post-implantation embryonic (E13.5d) development from *Dctd* heterozygous or homozygous knockout parental pairs

数是 85.7% (77.8%~86.7%), 部分胚胎透明带内细胞开始致密化, 而 *Dctd* KO 组胚胎仅有 12.1% (7.7%~17.2%) 达到 4-细胞期或以上 (图 6A、6B)。E3.5d~E4.5d, *Dctd* KO 组部分胚胎发育停滞在 2-至 4-细胞期, 畸形胚胎数量增加, 在 E4.5d 囊胚发育率仅有 4.8% (0~8.8%); 对照组囊胚率达到 85.7% (68.4%~92.9%), 存在显著差异 (图 6A、6C)。这些结果说明体外培养条件下 *Dctd* 对小鼠受精卵发育至 2-至 4-细胞期后有重要支持作用, *Dctd* 完全缺失会导致体外培养的胚胎发育至囊胚期的能力受损。

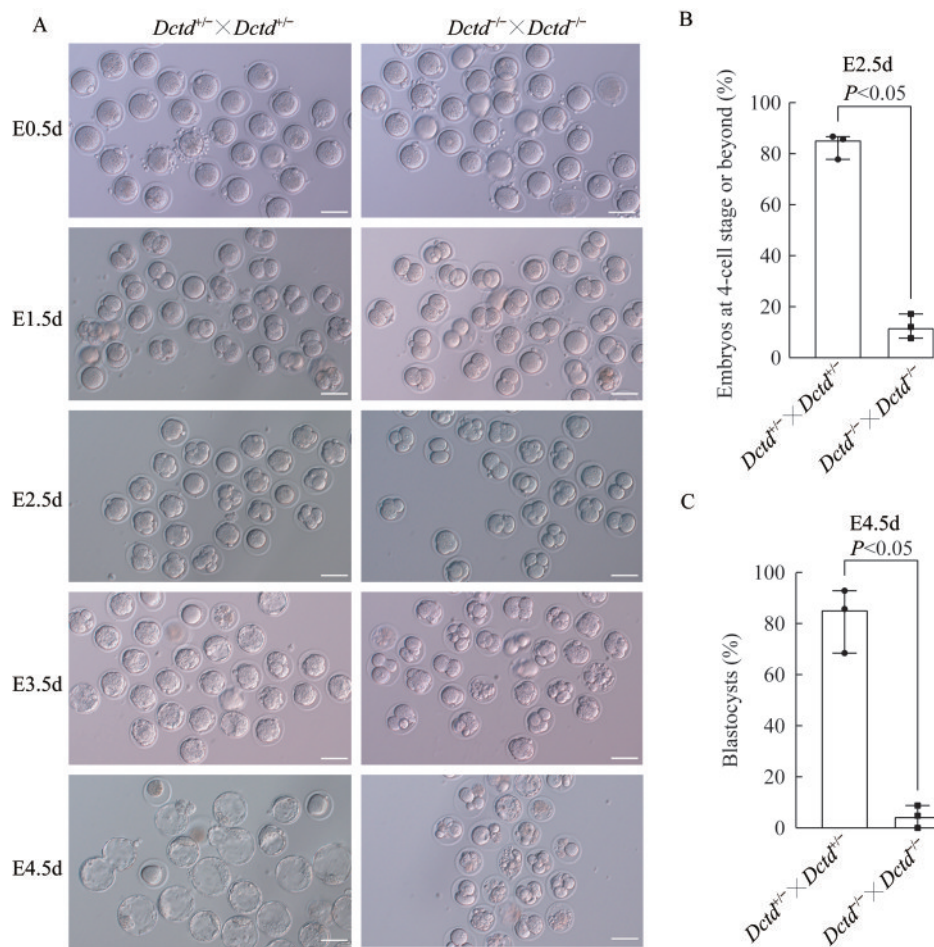
## 讨 论

由繁育实验结果可知, 母本 *Dctd* 基因纯合缺失会导致生育子代数量减少, 亲本基因型均是  $Dctd^{-/-}$  时, 生育子代数量相比于野生型减少了约 60%, 说明 DCTD 的母源影响在胚胎发育过程中起关键作用。来自  $Dctd^{-/-}$  基因型父母本的胚胎着床后发生败育的比例约为 60%, 与生育子代数量基本吻合; 来自该组的着床前胚胎在体外环境下的发育会阻滞在 2-至 4-细胞期, 提示宫内环境对 DCTD 的缺失有一定补偿作用。本研究说明 DCTD 对小鼠胚胎发育有重要的调节作用。

*Dctd* 纯合敲除降低雌鼠生育力这一现象提示卵母细胞内的 DCTD 是维持胚胎正常发育的重要因素。小鼠合子最初依靠卵母细胞累积的母源 mRNA 和蛋白质等进行生理活动, 在合子基因组激

活 (zygotic genome activation, ZGA) 后, 胚胎基因才开始表达, 母源 mRNA 和蛋白质也逐渐消耗, 实现从母体向合子的转变。根据已有研究, 小鼠成熟卵母细胞转录组可以检测到 *Dctd* 表达<sup>[19-20]</sup>, 说明雌鼠卵母细胞可以储存 DCTD。在小鼠胚胎中, 单细胞阶段 S 期开启 Minor ZGA, 只有少数基因在这时启动表达, 2-细胞中后期大量基因转录启动, 这一过程称为 Major ZGA, 抑制 Major ZGA 会导致胚胎在 2-细胞期阻滞<sup>[21-22]</sup>。鉴于杂合亲本产生的  $Dctd^{-/-}$  子代数量和生存情况正常, 我们推测卵母细胞内储存的 DCTD 可能足以支持胚胎发育至囊胚期及更成熟的阶段, 即使 ZGA 启动阶段合子基因组无法表达新的 DCTD 也不会致死。当母本有正常 *Dctd* 基因, 即使父本纯合敲除 *Dctd*, 卵母细胞提供的 DCTD 可以参与胚胎发育调节, 因此子代存活数量相比于对照组减少不明显; 反之, 在母本完全缺失 *Dctd* 基因时, 无论父本是否携带 *Dctd* 基因都无法在 ZGA 启动前为合子提供 DCTD, 胚胎存活率就会降低。

DCTD 的经典功能是催化细胞内 dCMP 脱氨生成 dUMP, 为细胞提供 dUMP 用于合成 dTTP, 这一反应途径是很多生物细胞中 dTTP 的主要来源, 由此推测 DCTD 缺失导致小鼠胚胎生长发育受阻的可能原因是: *Dctd* 缺失后无法合成功能正常的 DCTD, 导致胚胎细胞内 dCMP 累积; 同时 dUMP 水平下降, dTTP 合成受到影响而水平降低, 细胞内的 dNTP 池平衡失调, 导致 DNA 复制及损伤修复的原材料不充足, 抑制细胞周期进程, 阻碍细胞增殖。



A: *In vitro* development of embryos derived from *Dctd*<sup>+/+</sup> × *Dctd*<sup>+/+</sup> mating and *Dctd*<sup>-/-</sup> × *Dctd*<sup>-/-</sup> mating (scale bar: 100 μm); B: Proportion of embryos reaching the 4-cell stage or beyond at E2.5d (n=3); C: Proportion of embryos developing to the blastocyst stage at E4.5d (n=3).

图6 *Dctd*杂合缺失或纯合缺失父母本的胚胎体外培养发育情况

Fig 6 *In vitro* development of embryos derived from *Dctd* heterozygous (control) or homozygous knockout parents

DCTD对胚胎发育的具体调节机制仍需要深入探究。

在体外培养条件下父母本*Dctd*杂合缺失的胚胎大部分能正常发育,囊胚发育率的中位数是85.7%(68.4%~92.9%),与体内实验的结果基本一致;然而,完全敲除*Dctd*的父母本交配产生的胚胎囊胚率的中位数是4.8%(0~8.8%),相较于体内实验数据的发育成功率进一步降低。这些差异提示雌鼠体内环境对*Dctd*完全缺失胚胎的发育有一定的支持作用,可能的因素有子宫微环境或卵丘细胞的支持等。有研究指出易流产小鼠模型的免疫特性蜕膜基质细胞亚群具有炎症反应异常增加、血管生成相关功能受到干扰等特点,认为蜕膜微环境的建立与妊娠成功有密切关系<sup>[23]</sup>。体外受精后保留卵丘细胞20h或48h比7h更有利于牛胚胎发育至桑椹胚时期及更成熟的阶段;与完全去除卵丘细胞

的情况相比,仅去除部分卵丘细胞时有更多牛胚胎发育至桑椹胚或囊胚期<sup>[24]</sup>。

目前领域内对于DCTD是否影响小鼠等哺乳动物胚胎发育的研究报道非常少。国际小鼠表型项目联盟数据库(<https://www.mousephenotype.org/>)显示*Dctd*完全敲除的小鼠会出现不育现象,但相关数据未对*Dctd*缺失小鼠胚胎的发育过程进行具体探究。我们系统性地探究了*Dctd*缺失对小鼠生育力和胚胎发育情况的调控作用,证明*Dctd*完全缺失的雌鼠生育力降低,母源缺失*Dctd*对于小鼠生育力的影响占据主导地位,为今后进一步探究DCTD在胚胎发育调控过程中的具体机制提供了前期数据基础。

**作者贡献声明** 丁霄 实验实施,结果分析,论文撰写。王远仙 实验指导和实施。石玉衡 论

文修订。周丹 实验设计,论文修订。

**利益冲突声明** 所有作者均声明不存在利益冲突。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] ANDERSON DD, QUINTERO CM, STOVER PJ. Identification of a *de novo* thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(37):15163-15168.
- [ 2 ] SANCHEZ A, SHARMA S, ROZENZHAK S, *et al.* Replication fork collapse and genome instability in a deoxycytidylate deaminase mutant[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(21):4445-4454.
- [ 3 ] MATHEWS CK. Deoxyribonucleotide metabolism, mutagenesis and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(9):528-539.
- [ 4 ] BIANCHI V, PONTIS E, REICHARD P. Regulation of pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism by substrate cycles in dCMP deaminase-deficient V79 hamster cells[J]. *Mol Cell Biol*, 1987, 7(12):4218-4224.
- [ 5 ] NIU M, WANG Y, WANG C, *et al.* ALR encoding dCMP deaminase is critical for DNA damage repair, cell cycle progression and plant development in rice[J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(21-22):5773-5786.
- [ 6 ] ZHAO YH, JIANG W, GAO H, *et al.* DCK confers sensitivity of DCTD-positive cancer cells to oxidized methylcytidines[J]. *Protein Cell*, 2023, 14(7):532-537.
- [ 7 ] CARNIE CJ, GOTZ MJ, PALMA-CHAUNDLER CS, *et al.* Decitabine cytotoxicity is promoted by dCMP deaminase DCTD and mitigated by SUMO-dependent E3 ligase TOPORS[J]. *EMBO J*, 2024, 43(12):2397-2423.
- [ 8 ] RODRIGUEZ MM, CHATTERJEE D, GUERRY J, *et al.* CDADC1 is a vertebrate-specific dCTP deaminase that metabolizes gemcitabine and decitabine to prevent cellular toxicity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2025, 122(24):e2424409122.
- [ 9 ] ZHANG P, ZHANG Z, WANG Y, *et al.* A CRISPR-Cas9 screen reveals genetic determinants of the cellular response to decitabine[J]. *EMBO Rep*, 2025, 26(6):1528-1565.
- [ 10 ] PALINKAS HL, RACZ GA, GAL Z, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated knock-out of dUTPase in mice leads to early embryonic lethality[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(4):136.
- [ 11 ] SHI M, HUAI Y, DENG T, *et al.* SHMT2 is essential for mammalian preimplantation embryonic development through *de novo* biosynthesis of nucleotide metabolites[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2025, 36(2):102499.
- [ 12 ] ROTH JS, BUCCINO G, KLEIN NW. Inhibition of growth of chick embryo by inhibition of deoxycytidylate deaminase[J]. *Science*, 1963, 142(3598):1473-1474.
- [ 13 ] SCARANO E, TALARICO M, BONADUCE L, *et al.* Enzymatic deamination of 5-deoxycytidylic acid and of 5-methyl-5'-deoxycytidylic acid in growing and in non-growing tissues[J]. *Nature*, 1960, 186(4720):237-238.
- [ 14 ] DEPETROCELLIS B, GRANT P, SCARANO E. Deoxycytidylate aminohydrolase during embryonic development of rana esculenta[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1965, 95(2):209-216.
- [ 15 ] REDMAN CW, WILLIAMS GF, JONES DD, *et al.* Plasma urate and serum deoxycytidylate deaminase measurements for the early diagnosis of pre-eclampsia[J]. *Br J Obstet Gynaecol*, 1977, 84(12):904-908.
- [ 16 ] WILLIAMS GF, JONES DD. Serum deoxycytidylate deaminase as an index of high-risk pregnancy [J]. *Br J Obstet Gynaecol*, 1982, 89(4):309-313.
- [ 17 ] CHUVA DE SOUSA LOPES SM, ROELEN BAJ, LAWSON KA, *et al.* The development of the amnion in mice and other amniotes[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2022, 377(1865):20210258.
- [ 18 ] CAO J, SPIELMANN M, QIU X, *et al.* The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis[J]. *Nature*, 2019, 566(7745):496-502.
- [ 19 ] VESELOVSKA L, SMALLWOOD SA, SAADEH H, *et al.* Deep sequencing and *de novo* assembly of the mouse oocyte transcriptome define the contribution of transcription to the DNA methylation landscape [J]. *Genome Biol*, 2015, 16(209):1-17.
- [ 20 ] ZHANG B, ZHENG H, HUANG B, *et al.* Allelic reprogramming of the histone modification H3K4me3 in early mammalian development [J]. *Nature*, 2016, 537(7621):553-557.
- [ 21 ] ABE KI, FUNAYA S, TSUKIOKA D, *et al.* Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(29):E6780-E6788.
- [ 22 ] SHEN W, GONG B, XING C, *et al.* Comprehensive maturity of nuclear pore complexes regulates zygotic genome activation[J]. *Cell*, 2022, 185(26):4954-4970.e20.
- [ 23 ] YANG M, ONG J, MENG F, *et al.* Spatiotemporal insight into early pregnancy governed by immune-featured stromal cells[J]. *Cell*, 2023, 186(20):4271-4288.e24.
- [ 24 ] ZHANG L, JIANG S, WOZNIAC PJ, *et al.* Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*[J]. *Mol Reprod Dev*, 1995, 40(3):338-344.

(收稿日期:2025-01-04; 编辑:张秀峰)