

小鼠子宫内膜 *LIF* 基因表达与雌、孕激素的关系

翁亚光¹, 王应雄¹, 刘学庆¹, 何俊琳¹, 陈雪梅¹, 冯亚红²

(1. 重庆医科大学遗传优生教研室, 重庆 400016; 2. 重庆市第三人民医院妇产科, 重庆 400010)

摘要:白血病抑制因子(LIF)是一种多功能活性的糖蛋白,*LIF*基因在大多数妊娠第4天的小鼠子宫内膜进行着强烈的表达,然而*LIF*基因表达调控的机制目前尚不清楚。本实验对168只妊娠第4~5天的小鼠*LIF*基因表达和血清中雌、孕激素水平分别进行了检测,发现18只小鼠无*LIF*基因表达,其血清中雌、孕激素水平分别极显著($P < 0.01$)和显著($0.01 < P < 0.05$)低于其他表达的小鼠。提示:雌、孕激素对小鼠*LIF*基因表达过程中起着一定的作用,将为*LIF*基因表达调控机制的深入研究打下基础。

关键词:小鼠;白血病抑制因子;基因表达;孕酮;雌二醇

中图分类号:Q786

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2003)01-0037-03

Relationship of Expression of Leukemia Inhibitory Factor Gene with Progesterone and Estradiol in Mouse Endometrium

WENG Ya-Guang¹, WANG Ying-Xiong¹, LIU Xue-Qing¹, HE Jun-Lin¹,
CHEN Xue-Mei¹, FENG Ya-Hong²

(1. Department of Genetics, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China;

2. Department of Gynecology, Chongqing Third People's Hospital, Chongqing 400010, China)

Abstract: Leukemia inhibitory factor (LIF) is a glycoprotein with multiple activities, it expresses violently in most mice endometrium on 4~5 day of pregnancy, however the mechanism of *LIF* gene expression was not known completely. *LIF* gene expression was examined in endometrium of 168 mice and the concentrations of progesterone and estradiol were measured in their serum on 4~5 day. The expression of *LIF* gene was totally absent in 18 mice, and their concentrations of progesterone and estradiol in serum were significantly lower than the others. We discussed the relation between the expression of *LIF* gene with the concentration of two hormones. It was showed that the expression of *LIF* gene might be partly controlled by progesterone and estradiol.

Key words: mouse; leukemia inhibitory factor; gene expression; progesterone; estradiol

白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是一种多生物学功能的细胞因子,因其能诱导小鼠M1型白血病细胞分化为巨噬细胞和抑制白血病细胞增殖而命名。近年来,关于LIF在胚胎着床、妊娠维持和胚胎发育中发挥的作用越来越引起国内外学者的重视。小鼠的*LIF*基因位于染色体的11A1A2区,小鼠胚泡的成功着床*LIF*基因的表

达必不可少,并在受孕第4天(着床期)的小鼠子宫腺上皮细胞中大量转录,然而*LIF*基因表达的调控机制尚不清楚。有学者认为*LIF*基因表达受母体调控,子宫内膜*LIF*基因表达可能受到卵巢激素的调节。为此,我们对小鼠子宫内膜*LIF*基因表达与血清中雌二醇(E_2)、孕酮(P)水平的关系进行了研究。

收稿日期:2002-03-13;修回日期:2002-04-27

基金项目:四川省计生委资助项目(96-4-4)

作者简介:翁亚光(1962-),男,原籍江苏,大学本科,教授,专业方向:医学遗传学。Tel:023-68805788

1 材料和方法

1.1 实验取材

本实验用本校实验动物中心的 NIH 小鼠 168 只,取孕期为 4~5d 的小鼠子宫内膜及心脏血分别用于检测 *LIF* 基因表达和血清中雌二醇(E_2)、孕酮(P)的水平。

1.2 总 RNA 提取

将子宫内膜组织置于碾磨器内,加入 1mL RNA 提取液充分碾碎,取混合液于 1.5mL 离心管内,加入 200 μ L 氯仿,颠倒混匀,在室温下静置 15min,然后 15 000r/min 离心 15min,取上清液置于 1.5mL 离心管内,再加入等体积异丙醇混匀(此时可见管中絮状沉淀物即为总 RNA),4 $^{\circ}$ C 1h 以上,12 000r/min 离心 15min,弃上清液,加入适量 70%~75%乙醇洗涤 1~2 次,RNA 在 70%~75%乙醇溶液内保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。核酸定量仪测 RNA 含量,符合蛋白质污染容许量。

1.3 cDNA 合成和 PCR 扩增

1.3.1 主混合物 1

10mmol/L 浓度的 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 1 μ L,0.3 μ mol/L 浓度的引物 1、引物 2、引物参照 Nicholas M. Gough 等设计^[1],引物 1:5'-cctcttccat-caccctgta-3',引物 2:5'-agaaggcctggaccaccact-3',2 μ L RNA 溶解酶(模板 RNA,约含 2 μ g 总 RNA),100mmol/L 浓度 DTT 溶液 2.5 μ L、10 μ L 的 RNase 抑制剂,加无菌重蒸水至 25 μ L。

1.3.2 主混合物 2

RT-PCR 缓冲液(宝灵曼),含镁 10 μ L, TitanTM 酶混合物 1 μ L 加无菌重蒸水至 25 μ L。

1.3.3 cDNA 合成和 PCR 扩增

将主混合物 1 和主混合物 2 加入同一 PCR 反应管中,混匀,放入 PCR 仪 50 $^{\circ}$ C 30min 进行 cDNA 合成。再按下列条件作 40 个循环的 PCR 扩增:94 $^{\circ}$ C 变性 1min、55 $^{\circ}$ C 复性 30s、68 $^{\circ}$ C 延伸 3min。在对各实验组进行检测时,均设具有 *LIF* 基因表达阳性的小鼠子宫内膜和空白管为对照,以防出现假阴性和假阳性。

1.3.4 电泳

用 6% 聚丙烯酰胺垂直电泳,150V,22mA,50min,扩增 DNA 片段为 538bp。详见图 1。

1.4 小鼠血清 E_2 、P 水平的检测

采用武汉爱康公司试剂盒用磁分离法进行检测。

2 结果

研究结果显示,在妊娠第 4~5d 的 168 只小鼠中,*LIF* 基因表达 18 只为阴性(阴性组),150 只为阳性(阳性组),详见图 1。阳性组和阴性组血清中孕酮水平分别为:1.60 \pm 0.37ng/mL 和 2.07 \pm 1.00ng/mL,雌二醇水平分别为:21.62 \pm 9.96pg/mL 和 15.93 \pm 8.92pg/mL。经统计学分析(*t* 检验),两组间孕酮水平差异显著(0.01<*P*<0.05),即阳性组孕酮水平显著高于阴性组;雌二醇水平差异极显著,即阳性组孕酮水平极显著高于阴性组(见表 1)。

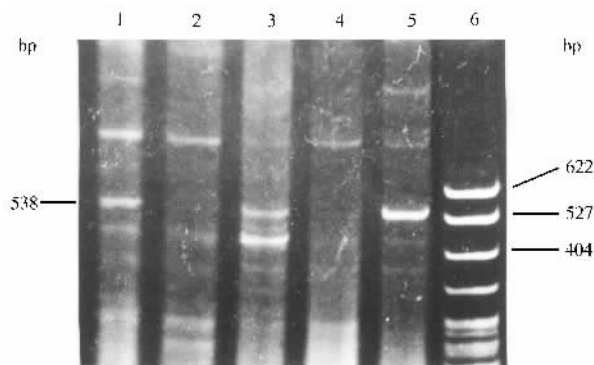


图 1 小鼠子宫内膜 *LIF* 基因的 RT-PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳

1,3,5:显示 538bp 阳性带;2,4:显示 538bp 阴性带;6:mark(pBR322MSP1)。

Fig. 1 Expression of *LIF* in mouse endometrium

1,3,5:are 538bp positive band; 2,4:are 538bp negative band; 6:is mark(pBR322MSP1).

表 1 各实验组雌二醇、孕酮含量比较表(*t* 检验)

Table 1 The content of estradiol and progesterone in different groups

| 分组 Groups | 阴性组 ($\bar{X}\pm S$) | 阳性组 ($\bar{X}\pm S$) |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| 孕酮(P)含量(ng/mL) | 1.60 \pm 0.37 | 2.08 \pm 1.00* |
| 雌二醇(E_2)含量(pg/mL) | 15.93 \pm 8.92 | 21.62 \pm 9.96** |

** 表示与阴性组比较差异极显著(*P*<0.01); * 表示与阴性组比较差异显著(0.01<*P*<0.05)。

3 讨论

大量的实验证明,*LIF* mRNA 在受孕第 4d 的小鼠和不同哺乳动物在受孕不同时期子宫内膜上皮细胞中大量转录^[2~5]。然而,关于 *LIF* 基因表达

的调控机制^[6~7],假孕小鼠子宫 LIF 基因表达与孕鼠相似,说明 LIF 基因表达受母体调控。不同物种生殖周期子宫内膜 LIF 表达的不同,提示其表达受到不同卵巢激素的调节。Hambartsoumian 根据人宫外孕子宫内膜组织中 LIF mRNA 仍然具有强烈的表达,推测 LIF 基因的表达与胚胎无关而主要是受到母体激素的调控^[8]。

目前,许多研究认为卵巢分泌的雌激素和孕激素对 LIF 基因的表达可能起到重要的调控作用。猪动情周期中 LIF 活性最高在大约 12~13d,与此期雌激素大量产生一致,可能猪 LIF 基因受雌激素调控^[9];而在羊、貂、兔的子宫内膜中,孕酮浓度升高时 LIF mRNA 或蛋白质的表达确有所升高^[10~12]。

我们采用 RT-PCR 对妊娠 4~5d 的小鼠子宫内 LIF 基因表达检测结果显示,LIF 基因表达阳性组雌激素和孕激素水平分别极显著和显著高于阴性组。由此可推测,雌激素和孕激素很可能对小鼠子宫内 LIF 基因表达在不同程度上起着一定的调控作用,其中雌激素水平在两组间的差异表现尤其明显,即对 LIF 基因的表达的影响可能更大。

黎刚等用 RT-PCR 技术对 32 例习惯性流产患者子宫蜕膜 LIF mRNA 进行的研究结果,病例组与对照组差异极显著^[13],提示 LIF 基因表达缺失或减弱,可能是导致习惯性流产的原因之一。其机制可能是激素-免疫-细胞因子网络平衡紊乱,终致流产。

参考文献(References):

[1] Nicholas M, *et al.* Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia-inhibitory factor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 2623.

[2] Stewart C L, Kasper D, Brunet L J, *et al.* Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor[J]. *Nature*, 1992, 359: 76~79.

[3] Escary J L, Perreau J P, Dumenil J, *et al.* Leukemia inhibitory factor is necessary for maintenance of haematopoietic stem cells and thymocyte stimulation[J]. *Nature*, 1993, 363: 361~364.

[4] Hirzel D J, Wang J, Das S K, *et al.* Changes in uterine expression of leukemia inhibitory factor during pregnancy in the western spotted skunk[J]. *Biol Reprod*, 1999, 60: 484~492.

[5] 翁亚光,王应雄,刘学庆,等.妊娠小鼠子宫内 LIF 基因表达的研究[J]. *遗传*, 2000, 22(2): 73~74.

[6] Bhatt H, Brunet L T, Stewart C L. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 11408~11412.

[7] Shen M M, Leder P. Leukemia inhibitory factor is expressed by preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 8240~8244.

[8] Hambartsoumia E, *et al.* Leukemia inhibitory factor(LIF) production by human decidua and its relationship with pregnancy hormones[J]. *Gynecol Endocrinol*, 1998, 12: 17~22.

[9] Anegon I, Cuturi M C, Godur A, *et al.* Presence of leukemia inhibitory factor and interleukin 6 in porcine uterine secretin prior to conceptus attachment[J]. *Cytokine*, 1994, 6: 493~499.

[10] Vogiagis D, Fry R C, Sandeman R M. Leukemia inhibitory factor in endometrium during the oestrous cycle, early pregnancy and in ovariectomized steroid treated ewes[J]. *J Reprod Fertil*, 1997, 109: 279~288.

[11] Arici A, Engin O, Attar E, *et al.* Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80(6): 1908~1915.

[12] Song J H, Houde A, Murphy B D. Cloning of Leukemia inhibitory factor(LIF) and its expression in the uterus during embryonic diapause and implantation in the mink[J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 51(1): 13~21.

[13] 黎刚,王应雄,刘学庆,等.原因不明习惯性流产患者子宫蜕膜白血病抑制因子基因表达研究[J]. *遗传*, 2002, 24(3): 250~252.

《实验动物科学与管理》征订启事

《实验动物科学与管理》是北京实验动物学会会刊,北京实验动物管理委员会和北京实验动物研究中心参加主办。中国标准刊号:ISSN 1006-6179 CN 11-3568/Q, 邮发代号:18-131。

读者对象:从事实验动物、动物实验科研及生产、应用的专业技术人员和科研管理人员、医药生产、检验工作者。

本刊为季刊,2002 年定价:每册 8.0 元,全年共 32 元(包括邮费),读者订阅可经银行汇款,或经邮局汇款。

本刊自 1993 年起尚有少量余刊,已装订成合订本,可汇款至本刊编辑部函购(1993~1994 年共计 35 元;1995~1996 年 45 元;1997~1998 年 50 元;1999 年 35 元;2000 年 40 元;2001 年 45 元)。

银行户名:北京实验动物学学会 帐号:0110000103020000297 开户银行:农业银行洼里信用社

地址:北京安定门外大羊坊甲 6 号 邮政编码:100012

联系人:胡建武 乔虹 电话/传真:010-84922374;84922666 转动 210