

习惯性流产胚胎绒毛细胞 *LIF* 基因的表达

王应雄¹, 何俊琳¹, 翁亚光¹, 刘学庆¹,
陈雪梅¹, 杨 戎², 魏莎莉², 刘孝云²

(1. 重庆医科大学遗传优生教研室, 重庆 400016 2. 重庆医科大学生殖生理教研室, 重庆 400016)

摘要 本文采用 RT-PCR 技术对 25 例习惯性流产胚胎绒毛细胞和 25 例正常妊娠的人工流产绒毛细胞 *LIF* 基因表达进行了研究, 以探讨胚胎绒毛组织 *LIF* 基因表达与流产之病因的关系。结果发现在流产组中, 有 5 例(占 20%) 流产胚胎绒毛组织无 *LIF* 基因表达, 而正常组绒毛组织中均检测到 *LIF* 基因表达, 两组经统计学处理具有显著性差异 ($P < 0.01$)。本研究结果提示胚胎绒毛组织 *LIF* 基因表达缺陷可能是造成流产的原因之一。

关键词 白血病抑制因子; 基因表达; 胚胎绒毛; 流产

中图分类号: Q344+.13; R714.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-977X(2001)02-0111-03

Expression of Leukemia Inhibitory Factor Gene of Chorionic Tissue from Habitual Abortions

WANG Ying-xiong¹, HE Jun-lin¹, WENG Ya-guang¹,
LIU Xue-qing¹, CHEN Xue-mei¹, YANG Rong, WEI Sha-li², LIU Xiao-yun²

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

2. Department of Reproduction and Physiology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract In order to find out relationship between expression of leukemia inhibitory factor (LIF) of chorionic tissue and habitual abortion, expression of *LIF* of chorionic tissues from 25 cases habitual abortions and normal controls was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction method. The result showed there was no expression of *LIF* in 5 chorion tissue samplings from habitual abortion (20%). There is a significant difference between the two group ($P < 0.01$). The findings suggest that cause of habitual abortion might be related to no-expression of *LIF* gene.

Key words leukemia inhibitory factor; gene expression; chorionic tissue; habitual abortion

白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是一种具有多种生物学功能活性的细胞因子,最早发现其能抑制小鼠 M1 白血病细胞的增殖而得名^[1]。

习惯性流产病因机制的研究一直是学者们关注的热点,随着研究的深入,人们逐渐认识到维持正常的妊娠不仅受到神经系统、免疫系统和遗传因素的影响,而且还受到细胞因子的调节。胚胎绒毛细胞 *LIF* 基因表达对促进胚胎早期发育以及胎盘的形

有着重要的作用^[2,3]。在临床上,习惯性流产较为常见,其中相当一部分病因不清,这给临床病因诊断和治疗带来困难。这部分患者中,是否有一部分患者的病因是由于早期胚胎绒毛细胞缺乏 *LIF* 基因表达所致,尚不清楚。因此,寻找新的病因是生殖医学亟待解决的课题。我们对不明原因习惯性流产胚胎绒毛组织 *LIF* 基因表达进行了研究,以探索其病因所在。

收稿日期 2000-04-12; 修回日期 2000-08-28

基金项目: 重庆市科委资助项目(课题编号 98-202)

作者简介: 王应雄(1957-),男,汉族,重庆市人,医学硕士,教授,专业方向: 生殖遗传。电话: 023-68805788。E-mail: w68896483@ctc.cq.cn

1 材料和方法

1.1 标本选择

三次或三次以上不明原因流产孕妇的胚胎绒毛组织, 胎儿母亲生殖激素水平正常, 卵泡发育正常, 子宫发育正常。孕妇无人工流产史。孕期无感染史, 无服药史, 无致畸环境接触史。夫妇双方染色体核型正常, 抗精子抗体检查阴性。家族中无遗传病史。

1.2 标本采集

绒毛标本由刮宫术获取, 习惯性流产标本共 25 例(母亲年龄 26 ~ 35 岁)。正常人工流产绒毛标本 25 例(曾有一次正常妊娠生育史, 年龄 23 ~ 30 岁)。所采标本置 -70℃ 条件下保存待测。

1.3 总 RNA 提取、鉴定

取 100mg 绒毛组织于玻璃匀浆器中, 采用常规异硫氰酸胍 - 氯化铯法提取总 RNA。取部分 RNA 经甲醛变性 PAGE 凝胶电泳后, 在紫外观测仪下可见 5S、18S 和 28S 亚单位三条带。RNA 在波长为 260 ~ 280nm 处的吸光度保持在 1.772 ~ 1.985 之间, 符合蛋白质污染容许容量(1.7 ~ 2.0)。

1.4 引物设计

LIF 基因引物设计参照文献^[2]。上游引物: 5' - CAGCATCACTGAATCACAGAGC - 3', 下游引物: 5' - AGTATGAAACATCCCCACAGG - 3'。扩增的 *LIF* 基因片段长度为 527bp。

1.5 内对照

由于 β -actin 在各组织中均呈稳定的表达, 因而选用 β -actin 基因表达作为实验的内对照, 其引物设计参照文献^[4]。上游引物: 5' - ACACCTTCTA-CAATGAGCTG - 3', 下游引物: 5' - CTGCTTGCT-GATCCACATCT - 3'。扩增的 β -actin 基因片段长度为 828bp。

1.6 RT-PCR

采用 Titan™ 单管 RT-PCR 系统(宝灵曼产品)在同一反应管进行 cDNA 合成和 PCR 扩增。扩增条件 94℃ 变性 45 秒, 58℃ 退火 45 秒, 72℃ 延伸 3 分钟。共 40 个循环。

1.7 电泳

取 20 μ l 扩增产物, 加入溴酚蓝 2 μ l, 在 6% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳 30 分钟(150 ~ 220V), 溴化乙锭染色 5 分钟, 紫外观测仪下观察和摄像。

2 结果与讨论

在检测的 25 例习惯性流产绒毛标本中, 20 例标本有 *LIF* 基因表达, 而 5 例标本完全缺乏 *LIF* 基因表达(占 20%), 正常对照绒毛标本 *LIF* 基因和内对照 β -actin 基因均有表达(见图 1、2、3)。流产组与正常对照组相比较, 具有显著性差异($P < 0.01$)。

近年来, *LIF* 在生殖过程中的重要作用越来越受到学者们的普遍关注。在胚到着床期, 子宫内膜 *LIF* 基因的表达是着床成功的关键^[5], 有学者对不

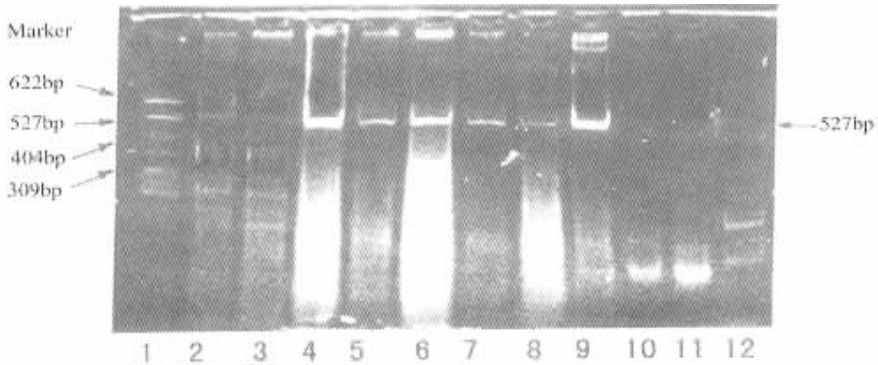


图 1 流产组 *LIF* 基因表达情况

1 为 Marker PBR322 2 ~ 3, 10 ~ 12 未见 *LIF* 基因表达带; 4 ~ 9 可见 *LIF* 基因表达带(527bp)。

Fig.1 Habitual abortion group

1 is marker PBR322 2 ~ 3 and 10 ~ 12 bands of *LIF* gene expression are not observed(527bp); 4 ~ 9 bands of *LIF* gene expression can be observed(527bp).

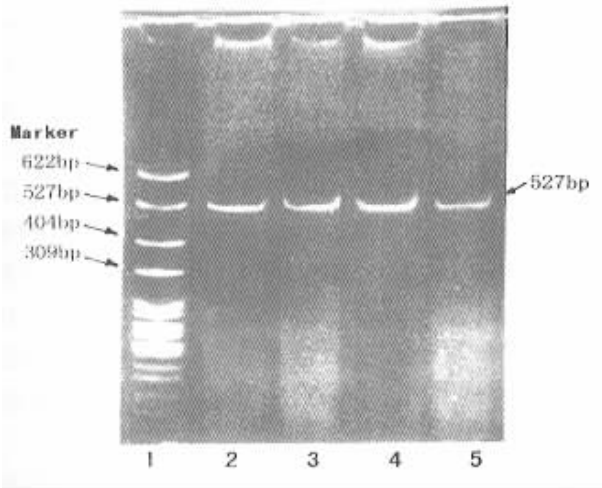


图2 正常人工流产组 LIF 基因表达情况

1 为 Marker PBR322 ;
2~5 可见 LIF 基因表达带(527bp)

Fig.2 Control group

1 is marker PBR322 2~5 bands of LIF gene
expression can be observed(527bp).

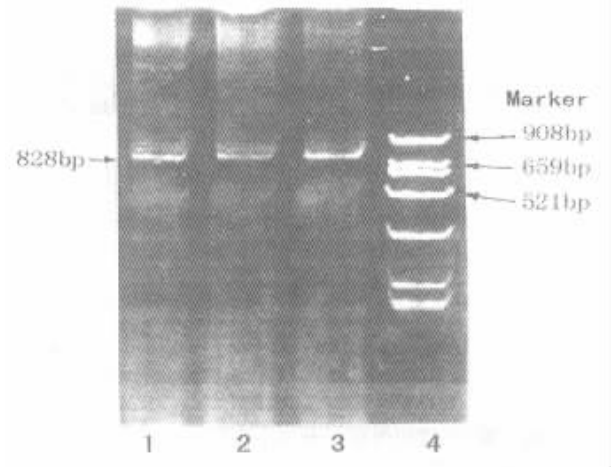


图3 内对照组 LIF 基因表达情况

1~3 可见 β -actin 基因表达
带(828bp) 4 为 Marker PBR322 ALU。

Fig.3 β -actin control

1~3 :bands of β -actin gene expression
can be observed(828bp); 4 is marker PBR322 ALU .

孕女性子宫内膜 LIF 基因表达研究显示,不孕组女性子宫内膜 LIF 基因表达的平均水平显著低于正常女性组^[6],并认为这是导致不孕的重要原因。

习惯性流产在临床上较为常见,致流产的原因涉及诸多因素,如生殖激素、宫内感染、胎盘发育异常、遗传因素等,但仍有相当部分流产的病因不明。新近一些研究表明,LIF 在促进胚泡早期发育、分化及调节胎盘功能和胎盘形成中起着至关重要的作用^[2,3,7],因而妊娠能否成功也与之密切相关。胚胎绒毛组织由胚胎滋养层细胞衍生而来,随着绒毛的进一步发育,最终成为胎盘的组成部分。而这一过程需要诸多细胞因子的参与,LIF 便是其中之一。本研究对不明原因习惯性流产胚胎绒毛细胞及正常人工流产胚胎绒毛细胞 LIF 基因表达进行了研究,结果发现正常人工流产胚胎绒毛细胞均有 LIF 基因表达,而习惯流产胚胎组中,20 例标本存在 LIF 基因表达,5 例完全缺乏 LIF 基因表达,内对照 β -actin 基因表达在两组标本中均检测到有表达(见图 1、2、3)。当然,我们不能就此断言胚胎绒毛细胞 LIF 基因表达缺乏就是流产的根本原因,但我们认为,在胚胎早期发育及胎盘形成过程中,胚胎绒毛细胞 LIF 基因表达缺陷可能是致流产的一个重要因素,其机制可能是:胚泡植入子宫后,在维持胚泡的植入以及绒毛向胎盘发育过程中,LIF 是参与这一过程的诸

多细胞因子之一,如果绒毛细胞不能产生 LIF,将影响胚泡与子宫蜕膜的联系和胎盘的发育和形成,一旦胚泡植入不牢或胎盘发育不全或形成受阻,就会造成胚胎营养不良或发育畸形而致流产。

参考文献 (References) :

- [1] 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.
- [2] Kojima K,Kanzaki H,Iwai M, et al. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta[J]. Biol Reprod,1994,50:882~887.
- [3] Yang A M,Le S P,Chen D B, et al. Leukemia inhibitory factor, LIF receptor, and gp130 in the mouse uterus during early pregnancy[J]. Mol Reprod and Develop,1995,42:407~414.
- [4] Okamoto Y,Yusuke H,Yayoi K, et al. A simple quantitative measurement of mRNA of human β -actin by reverse transcription competitive PCR with a compact digital camera[J]. Biol Pharm Bull,1997,20(9):1013~1014.
- [5] Stewart C L,Kaspar P,Brunet LJ, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor[J]. Nature,1992,359:76~9.
- [6] Hambarfousmian E. Endometrial leukemia inhibitory factor(LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation[J]. Amer J Reprod Immunol,1998,39:137~143.
- [7] Stewart C L. Leukaemia inhibitory factor and the regulation of pre-implantation development of the mammalian embryo[J]. Mol Reprod and Develop,1994,39:233~238.