

妊娠小鼠子宫内膜 LIF 基因表达的研究

翁亚光, 王应雄, 刘学庆, 何俊琳, 陈雪梅

(重庆医科大学遗传优生教研室 重庆 400016)

摘要: 本文对妊娠第 4 天 (I 组)、第 7 天 (II 组)、第 10 天 (III 组) 的小鼠 (各 20 只) 子宫内膜 LIF 基因表达进行了研究。I 组 20 只小鼠子宫内膜全部存在 LIF 基因的表达、II 组有 5 只小鼠表达、III 组仅有 1 只小鼠表达。文中对不同孕期 LIF 基因的表达程度与胚胎着床的关系进行了讨论。

关键词: 白血病抑制因子; 基因表达; 子宫内膜; 小鼠

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)02-0073-02

Expression of Leukemia Inhibitory Factor in Mouse Endometrium

WENG Ya-guang, WANG Ying-xiong, LIU Xue-qing, HE Jun-ling, CHEN Xue-mei

(Department of Genetics, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Leukemia inhibitory factor (LIF) is a glycoprotein with multiple activities and is essential for blastocyst implantation in mouse. We have examined LIF gene expression in mice endometrium on day 4 (group I), day 7 (group II), day 10 (group III) of pregnancy. In group I all had LIF gene expression, 5 mice had LIF gene expression in group II, only one mouse had LIF gene expression in group III. We discussed the relation between level of LIF gene expression and embryonic implantation.

Key words: leukemia inhibitory factor; gene expression; endometrium; mouse

白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 是一种多功能活性的分泌型糖蛋白, 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, 国外学者相继证实, 白血病抑制因子具有抑制胚胎干细胞的分化并保持其增殖能力的作用, 同时在胚胎的着床及胚胎的早期发育中起着重要的作用。本文用 RT-PCR 方法对不同孕期的小鼠子宫内膜的 LIF 基因表达进行了研究。

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, 将孕期为 4d、7d、10d 的小鼠分为 I、II、III 组, 每组 20 只。

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, 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 条件下放置 1h 以上, 12 000r/min 离心 15min, 弃上清液, 加入适量的 70%~75% 乙醇洗涤, 1%~75% 乙醇溶液内保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.3 采用 TitanTM 单管 RT-PCR 系统 (宝灵曼公司) 在同一反应管内进行 cDNA 合成和 PCR 扩增。

1.3.1 主混合物 1 10 mmol/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 NicholasmM. Gough 等设计^[1], 引物 1: 5' - cctcttcccatcaccctgta - 3'; 引物 2: 5' - agaag-gcctggaccaccact - 3', 2 μ l RNA 溶解酶 (模板 RNA, 约含 2 μ g 总 RNA), 100 mmol/L 浓度 DTT 溶液 2.5 μ l、10u 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, 含镁 10 μ l, TitanTM 酶混合物 1 μ l 加无菌蒸溜水至 25 μ l。

1.3.3 cDNA 合成和 PCR 扩增 将主混合物

收稿日期: 1999-01-08, 修回日期: 1999-04-06

基金项目: 四川省计生委资助项目

作者简介: 翁亚光 (1962-), 男, 原籍江苏, 大学毕业, 副教授, 专业方向: 医学遗传学。

主混合物 2 加入同一 PCR 反应管中,混匀,放入 PCR 仪 50℃30min 进行 cDNA 合成。再按下列条件作 40 个循环的 PCR 扩增:94℃变性 1min,55℃退火 30s,68℃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。

2 结果与讨论

实验结果表明,在妊娠第 4 天小鼠中,有 19 只子宫内膜 LIF 基因为强阳性表达,1 只为弱阳性表达;妊娠第 7 天的小鼠中,1 只为强阳性表达,4 只为弱阳性表达;而妊娠第 10 天的小鼠中,仅检出 1 只小鼠有 LIF 基因弱表达(见图 1)。

现已证实,LIF 是胚胎着床及胚胎早期发育所必需的重要细胞因子,哺乳动物受孕过程中一个关键的步骤就是胚泡着床,胚泡成功的植入有赖于发育中胚泡和子宫内膜的相互作用。尽管植入的机制尚未详细阐明,但越来越多的证据证明,LIF 在早期妊娠中的母胎界面发挥着重要的作用。LIF 基因在小鼠子宫内膜的表达具有极强的时段性。Bahrt 曾用 LIF 基因探针印迹杂交分析,未检测到 LIF 基因表达,而在受孕第 4 天(着床期)的小鼠子宫腺上皮细胞中检测到大量的 LIF mRNA 转录,当胚泡着床延迟时,LIF mRNA 转录的峰值也随之延迟,并与着床

时间保持高度一致^[2]。

我们的实验结果表明,在所检测的 20 只妊娠第 4 天的小鼠子宫内膜中,有 19 例的 LIF 基因表达为强阳性,与其他学者的研究报道一致,仅 1 例为弱阳性表达,Shenmm Leder P 曾利用 RNA 酶保护法及免疫组化技术检测到非孕鼠的动情期和动情后期 I 是 LIF 表达的高峰,而这两个时期恰是卵巢合成 17 β 雌激素和孕激素的峰值期,这揭示 LIF 在子宫内膜表达的峰值与卵巢激素合成峰值相关^[3]。对本实验妊娠第 4 天 LIF 基因本该强阳性表达但却弱表达的现象我们作如下解释:一是由于个体差异使其卵巢 17 β 雌激素和孕激素未达到正常的峰值而影响了 LIF 基因的表达强度,也可能是胚泡着床延迟造成 LIF 基因表达峰值的延后。

有学者对妊娠第 5 天的小鼠子宫内膜 LIF 基因表达进行了 Northern blot 杂交分析,未检测到杂交信号,他们认为 LIF 基因表达终止^[2,4]。但我们的实验却发现在 20 只妊娠第 7 天的小鼠中,有 1 只小鼠 LIF 基因为强阳性表达,4 只为弱阳性表达,我们认为这可能仍然与个体体内 17 β 雌激素和孕激素表达水平或胚泡着床时间差异有关,这也从另一个侧面反映了小鼠胚泡着床的时间和卵巢 17 β 雌激素和孕激素合成的峰值期在不同的个体中存在差异,从而造成小鼠子宫内膜 LIF 基因表达时间的差异。至于本研究在妊娠第 10 天的 1 只小鼠子宫内膜中检测到 LIF 基因的弱表达,这可能与个体之间的差异有关。

综上所述,本研究进一步说明小鼠子宫内膜 LIF 基因表达的高峰在妊娠第 4 天,与小鼠胚泡着床时间高度一致,提示 LIF 与胚泡着床密切相关。我们认为,LIF 基因在这一时间高强度表达可能是 LIF 能造成一种适宜胚泡着床的子宫内膜环境。人们是否可从子宫内膜 LIF 基因表达的时限来获取生殖调控的手段尚有待更深入的研究。

参考文献:

- [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] Bhatt H, et al. Uterine expression of leukaemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991,88:11408.
- [3] Shen MM, et al. Leukemia-inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation *in vitro*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992,89:8240.
- [4] Smeth AG, et al. Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development[J]. Developmental Biol, 1992,151:339.

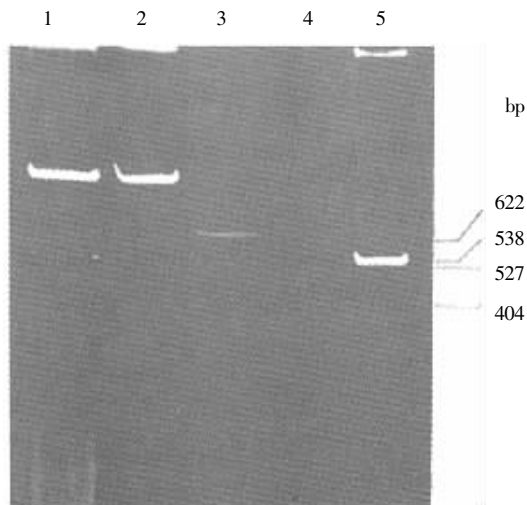


图 1 小鼠子宫内膜 RT-PCR 聚丙烯酰胺凝胶电泳
1 和 2. 显示 538bp 处弱阳性带; 3. Mark (pBR322 MSP1);
4. 显示 538bp 处阴性带; 5. 显示 538bp 处强阳性带。