论著

文章编号:1000-5404(2008)14-1316-03

瘦素在着床前小鼠胚胎中的表达及其对胚胎发育的影响

高立芳,赵邦霞,谭冬梅,何明忠,谭 毅 (重庆医科大学实验动物中心,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨瘦素(leptin)在围着床期小鼠胚胎中的表达规律和分布情况以及leptin抗体对小鼠胚胎体外发育的影响。**方法** 雌性NIH小鼠超排后与雄鼠交配,分别在妊娠1~4 d上午从输卵管或子宫角冲取相应时期的胚胎,用于以下实验:①分别提取总RNA,检测胚胎中leptin mRNA表达情况。②采用免疫荧光技术,观察leptin蛋白在囊胚的表达和分布情况。③将8-细胞小鼠胚胎培养于含不同浓度leptin抗体的培养液中,观察囊胚形成及脱透明带的情况。**结果** leptin mRNA仅在囊胚期特异性表达,其余各时期胚胎未见表达;leptin蛋白在囊胚的滋养层细胞和内细胞团的细胞质和细胞膜呈阳性表达,而在细胞核无表达。一定浓度的leptin抗体可明显降低囊胚的形成率(1∶400, $P<0.05$)和脱带率(1∶1 600, $P<0.05$),且随着抗体浓度的增加,这种抑制作用更明显。**结论** leptin能促进着床前胚胎发育,同时也可能参与了胚胎着床过程。

关键词: 瘦素;胚胎发育;免疫荧光

中图法分类号: Q95-33;Q954.4 **文献标识码:** A

Leptin expression in mouse pre-implantation embryos and its effect on embryo development *in vitro*

GAO Li-fang, ZHAO Bang-xia, TAN Dong-mei, HE Ming-zhong, TAN Yi (Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and distribution of leptin in pre-implantation embryo, and its effect on mouse embryo development *in vitro*. Methods Adult NIH female mice were superovulated and then mated with fertile males of the same strain. On the morning of 1st to 4th d of pregnancy, the oviduct and horn of uterus were dissected out and flushed with DMEM/F12 medium adequately. The embryos collected were subjected to the following procedures: ①Total RNA was isolated from embryos of each stage respectively and mRNA expression of leptin was detected by RT-PCR. ②Immunofluorescence staining was performed on blastocysts to analyze the expression and the distribution of leptin protein under laser confocal microscope. ③Eight-cell embryos were cultured in medium containing leptin antibody at various concentrations to observe the formation and hatching of blastocysts. Results ①Leptin mRNA expression was only detected in blastocyst, and no expression was detected in embryos in other stages. Leptin protein was detected in cytoplasma, membrane of trophoblastic cell and inner cell mass, however no expression was detected in cell nucleus. ②Leptin polyclonal antibody significantly inhibited formation of blastocysts (1∶400, $P<0.05$) and prevented hatching of blastocysts from zona pellucida (1∶1 600, $P<0.05$) in a dose-dependent manner. Conclusion The temporal expression of leptin suggests that leptin might play an important role during embryo development and implantation process in mice.

Key words: leptin; embryo development; RT-PCR; immunofluorescence

基金项目: 国家自然科学基金(30470654)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470654)

作者简介: 高立芳,女,重庆市垫江县人,硕士,研究实习员,主要从事胚胎工程方面的研究,现在重庆市畜牧科学研究院草食性畜研究所。E-mail: glf13@163.com

通信作者: 谭 毅,电话:(023)68485997,E-mail: tanyee66@hotmail.com

收稿日期: 2007-07-02;**修回日期:** 2008-02-29

瘦素(leptin)是肥胖基因(obese gene, ob)的编码产物,主要由脂肪组织分泌,参与调节食物摄入和能量平衡,近年来研究表明,其也可以作为一种代谢信号对下丘脑-垂体-性腺(hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)轴发挥重要的生理调控作用,从而影响生殖功能[1]。

本研究拟应用分子生物学技术,检测瘦素 mRNA 和蛋白在着床前小鼠胚胎中的表达情况和分布情况,探讨瘦素对小鼠胚胎发育和着床过程的影响,从而为瘦素基因对小鼠胚胎的影响补充新的理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　NIH 小鼠 7 ~ 8 周龄,体质量 20 ~ 25 g,雌雄各半,购自重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2　主要试剂　　RNA 抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;RT-PCR 试剂盒和琼脂糖购自 TaKaRa 公司;小鼠瘦素以及 β-actin 引物由 TaKaRa 公司合成;兔抗鼠 ob 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;Tyrode's 购自美国 Sigma 公司;Hoechst33342 购自美国 Invitrogen 公司;罗丹明标记山羊抗兔 IgG(H + L) 由北京中山分装。

1.2　方法

1.2.1　超排卵　　将成熟雌性 NIH 小鼠超排卵,与雄鼠于下午 17:00 按 1∶1比例合笼,次晨发现阴栓者记为妊娠 1 d 孕鼠。

1.2.2　胚胎收集及总 RNA 提取　　分别在妊娠 1 ~ 4 d 上午脱臼处死小鼠,取其输卵管或子宫角,冲取相应时期的胚胎,收集于含 RNA 裂解液的 EP 管(事先用 DEPC 处理)中,按照试剂盒说明书提取总 RNA,保存于 -80 ℃备用。

1.2.3　RT-PCR 反应　　将提取的各时期胚胎总 RNA 用紫外分光光度计测定 RNA 的 $D(260)/D(280)$ 比值,取部分 RNA 进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,证实 RNA 的完整性。将完整的 RNA 先进行逆转录,然后用设计的瘦素引物进行 cDNA 片段扩增,上游:5′-TTCACACACGCAGTCGGTAT-3′,下游:5′-CTCAAAGCCACCACCTCTGT-3′,扩增产物大小为 309 bp。选择 β-actin 作为内对照,其上游和下游引物序列分别为:5′-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3′ 和 5′-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3′,扩增产物大小为 228 bp。RT-PCR 操作参考一步法(TaKaRa 公司的说明书)进行,将 mRNA 逆转录为 cDNA,再将所得的 cDNA 进行 PCR 扩增。其循环条件:94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 30 s,74 ℃延伸 60 s,进行 38 个循环。

1.2.4　电泳　　分别取瘦素的 PCR 扩增产物 9 μl 加 10 × 上样缓冲液 1 μl,β-actin 的扩增产物 4.5 μl 加 10 × 上样缓冲液 0.5 μl,在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,然后用凝胶成像系统成像。

1.2.5　囊胚的免疫荧光　　参照文献[2 - 5]的方法,结合本实验室的具体条件作一些改进,具体步骤如下:妊娠 4 d 上午从子宫中冲取囊胚,1% PBS/BSA 彻底冲洗,然后用 Tyrode's 液脱去透明带,中性 PBS 冲洗,4 ℃条件下在 4% 多聚甲醛固定 1 h,0.1% PBS/Tween20 室温渗透 30 min,10% 正常绵羊血清室温下封闭 30 min,然后加兔抗鼠 ob 多克隆抗体(1∶100)孵育,4 ℃过夜。次日先用 PBS 冲洗,然后加罗丹明标记山羊抗兔 IgG(1∶100),4 ℃避光孵育 1 h,PBS 冲洗,Hoechst33342(10 μg/ml)室温进行核染 15 ~ 20 min,PBS 冲洗,滴加甘油-PBS(等体积混合)封片,在荧光显微镜或激光共聚焦显微镜下观察,拍照。

1.2.6　胚胎体外培养　　采用微滴培养法,用 DMEM/Ham's F12 + 10% 胎牛血清的培养液将 ob 多克隆抗体按 1∶200、1∶400、1∶800 和 1∶1 600 稀释,以不加抗体的培养液作为对照,将各组培养液分别吸取 50 μl 加入 96 孔培养板的不同孔中,每孔培养液上加入 30 μl 灭菌液体石蜡覆盖,放入 37 ℃,5% CO_2 培养箱中平衡 2 h。将形态良好的 8 细胞胚胎移入平衡好的各组培养液中(10 ~ 15 枚/孔),放入 CO_2 培养箱中,间隔 12 h 观察 1 次,记录囊胚形成数及脱带数,每个剂量组重复 5 次。

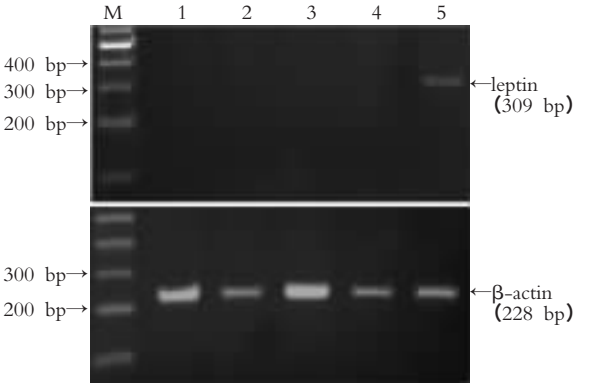
1.3　统计学处理

各组囊胚形成率和脱带率的差异比较采用 χ^2 检验,数据统计均用 SPSS 11.0 统计软件完成。

2　结果

2.1　瘦素 mRNA 在小鼠囊胚的表达

分光光度法检测提取的总 RNA 浓度,$D(260)/D(280)$ = 1.8。RT-PCR 结果见图 1 所示:瘦素 mRNA 特异性地表达于小鼠囊胚期,而在 2-细胞、4-细胞、8-细胞、桑椹胚则呈阴性表达。



1: 2-细胞胚胎; 2: 4-细胞胚胎; 3: 8-细胞胚胎; 4: 桑椹胚; 5: 囊胚

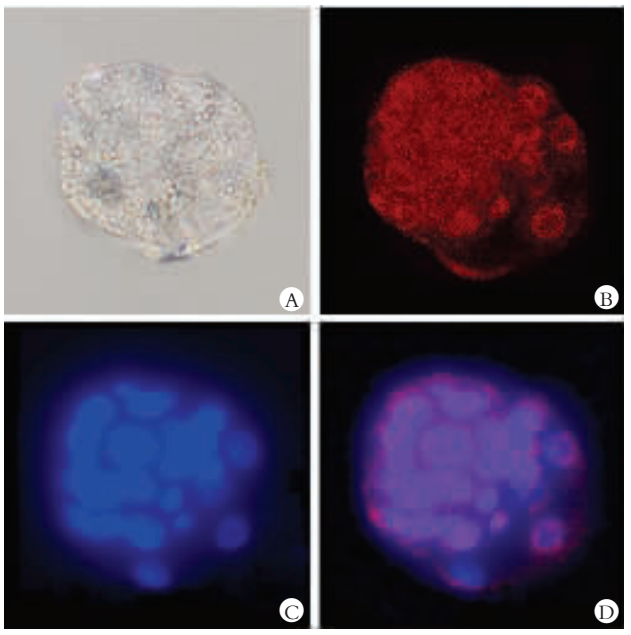
图 1　小鼠胚胎中瘦素 mRNA 表达的 RT-PCR 结果

2.2　瘦素蛋白在小鼠囊胚的表达

激光共聚焦结果显示,小鼠囊胚中有瘦素蛋白表达,阳性表达定位于滋养层细胞和内细胞团细胞的细胞质和细胞膜,而细胞核中则呈阴性表达(图 2)。

2.3　ob 多克隆抗体对小鼠胚胎体外培养的影响

不同浓度 ob 抗体组,囊胚形成率和脱带率均有显著性差异($P < 0.01$)。由表 1 可见,培养液中 ob 抗体浓度为 1∶1 600 和 1∶800 时,囊胚的形成不受影响($P > 0.05$)。ob 抗体浓度在 1∶400 和 1∶200 时,囊胚形成率明显降低($P < 0.05$),且抗体浓度增加,这种抑制作用越明显。ob 抗体浓度≥1∶1 600 时,对囊胚的脱带有显著抑制作用($P < 0.05$),且随着抗体浓度的增加,对囊胚的脱带的抑制作用更明显。



A：光学显微镜下成像；B：FITC 标记，543 nm 荧光激发成像，滋养层细胞和内细胞团细胞阳性；C：Hoechst33342 核染，352 nm 荧光激发成像；D：激光共聚焦镜下图 B 和图 C 拼合图

图 2 瘦素在小鼠囊胚的免疫荧光结果（×200）

表 1 不同浓度 ob 多克隆抗体对 8-细胞胚胎发育的影响

Ob 抗体浓度	培养胚胎数	囊胚形成数(%)	囊胚脱带数(%)
0(对照)	86	82 (95.35)	80 (93.02)
1∶1 600	86	85 (98.84)	60 (69.77)[a]
1∶800	79	78 (98.73)	43 (54.43)[a]
1∶400	99	64 (64.65)[a]	20 (20.20)[a]
1∶200	82	18 (21.95)[a]	2 (2.44)[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

3 讨论

自从发现瘦素可以影响哺乳动物生殖系统以来，瘦素对胚胎发育以及着床过程的作用备受学者的关注。陈骞等[6]在胚胎培养液中添加不同剂量的瘦素进行体外培养小鼠 2-细胞胚胎，观察其发育情况，然后进行胚胎移植观察着床率时发现，瘦素能提高 2-细胞胚胎体外发育的质量、发育率和胚胎着床率。Kawamura 等[7]也发现瘦素能促使胚胎从 2-细胞期发育至囊胚，并能提高囊胚的孵出率，且具有剂量依赖性。Craig 等[3]在培养猪早期胚胎时发现，在培养液中添加 10 ng/ml 的瘦素，结果很大程度上提高了胚胎的卵裂率（$P<0.01$）；在体外培养7 d 后，在培养液中添加 10 ng/ml 和 100 ng/ml 的瘦素均能提高囊胚率（$P<0.01$）。文献[7]报道，将胚胎培养在含瘦素和瘦素受体抗体的培养液中，囊胚形成和孵出很大程度上被抑制，表明瘦素受体抗体在着床前胚胎发育中能封闭其自分泌机制。本实验显示，一定浓度的瘦素多克隆抗体可体外抑制囊胚的形成和脱透明带，且随着抗体浓度的增加，种抑制作用更为明显。这表明瘦素蛋白有促进早期胚胎发育及促使囊胚脱透明带的作用。同时，妊娠 1～4 d 的小鼠子宫内膜表达瘦素蛋白[8]。因此我们推测在小鼠胚胎着床前，子宫内膜细胞和胚胎表达的瘦素蛋白可能通过自分泌或旁分泌形式调节着床前胚胎的发育，能提高胚胎发育率，保证成功着床。

本研究采用 RT-PCR 方法测得瘦素 mRNA 仅在小鼠囊胚期特异性表达，与其他研究结论[7,9]一致；免疫荧光方法测定囊胚的瘦素蛋白，然后在激光共聚焦显微镜下扫描的结果显示，瘦素蛋白主要表达于扩展囊胚的滋养层细胞和内细胞团的细胞质和细胞膜，而胞核则呈阴性。这表明瘦素可能参与滋养层细胞和内细胞团的生长发育，为滋养层细胞接触、黏附、侵袭子宫内膜作准备，从而保证胚胎着床成功。

由于本研究检测到瘦素基因 mRNA 仅在小鼠囊胚期特异性表达，从而再检测了瘦素蛋白在囊胚的表达情况，那么瘦素蛋白是否在受精卵、2-细胞、4-细胞、8-细胞、桑椹胚上也有表达，还需更多实验去验证，从而完善对瘦素基因在着床前胚胎发育中作用的认识。

参考文献：

[1] Moschos S, Chan J L, Mantzoros C S. Leptin and reproduction: a review[J]. Fertil Steril, 2002, 77 (3): 433－444.

[2] Honda Y, Tanikawa H, Fukuda J, *et al*. Expression of Smac/DIABLO in mouse preimplantation embryos and its correlation to apoptosis and fragmentation[J]. Mol Hum Reprod, 2005, 11(3): 183－188.

[3] Craig J A, Zhu H, Dyce P W, *et al*. Leptin enhances porcine preimplantation embryo development *in vitro*[J]. Mol Cell Endocrinol, 2005, 229(1－2): 141－147.

[4] Fedorcsak P, Storeng R. Effects of leptin and leukemia inhibitory factor on preimplantation development and STAT3 signaling of mouse embryos in vitro[J]. Biol Reprod, 2003, 69(5): 1531－1538.

[5] Boelhauve M, Sinowatz F, Wolf E, *et al*. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of *in vitro*-produced blastocysts[J]. Biol Reprod, 2005, 73(4): 737－744.

[6] 陈 骞, 李尚为, 唐海峰, 等. 瘦素对小鼠着床前胚胎发育影响的体外研究[J]. 四川大学学报:医学版, 2004, 35(6): 806－808.

[7] Kawamura K, Sato N, Fukuda J, *et al*. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos *in vitro*[J]. Endocrinology, 2002, 143(5): 1922－1931.

[8] 高立芳, 谭冬梅, 何明忠, 等. 瘦素在围着床期小鼠子宫组织中的表达[J]. 生殖与避孕, 2007, 27(11): 695－698, 717.

[9] Cervero A, Horcajadas J A, MartIn J, *et al*. The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(5): 2442－2451.

（编辑 吴培红）