维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0332－02

小鼠子宫内膜胚泡着床点及旁组织白血病抑制因子基因表达研究

杨 戎，骆明勇，王应雄，魏莎莉，刘孝云

(重庆医科大学生殖医学系，重庆 400016)

【摘 要】目的：探讨白血病抑制因子(LIF)基因在小鼠胚泡着床窗口期了宫内膜表达的特定部位。方法：采用半定量逆转录聚合酶链反应(RT－PCR)，对 20 只孕期第 4 天的小鼠子宫内膜着床点和旁组织的 LIF mRNA 进行检测。结果：20 只孕期第 4 天的小鼠着床点 LIF mRNA 表达平均水平为 0.5316，旁组织 LIF mRNA 表达平均水平为 0.3711。统计处理 t 检验差异具有显著性($P<0.05$)。结论：在胚泡着床窗口期，小鼠子宫内膜胚泡着床点和旁组织 LIF 基因表达存在差异。

【关键词】白血病抑制因子；子宫内膜；着床；基因表达

【中国图书分类法分类号】R394.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－09－16

Expression of leukemia inhibitory factor gene of implantation sites and paraimplantation sites from mouse endometrium

YANG Rong, et al

(*Department of Reproductive Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investgate the definite spot of expression of leukemia inhibitory factor gene in mouse endometrium in the implantation window phase. *Methods*: By reverse transcription－polymerase chain reaction(RT－PCR), the expression of LIF gene of 20 cases of the implantation sites and the paraimplantation sites from the endometrium of the mice that were 4 days pregnant was detected. *Results*: The average level of LIF mRNA expression of the implantation sites was 0.5316. The average level of LIF mRNA expression of the paraimplantation sites was 0.3711. By the statistic t－test, the difference was significant($P<0.05$). *Conclusion*: In the implantation window phase, the LIF gene expressions of the implantation sites and the paraimplantation sites from the mouse endometrium are different.

【Key words】Leukemia inhibitory factor; Endometrium; Implantation; Gene expression

白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)是一种具有多功能的糖蛋白，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得名。近年的研究证实，LIF 基因表达在小鼠胚泡着床过程中起重要作用[1]，且在小鼠胚泡着床窗口期(即妊娠第 4 天)，子宫内膜 LIF 基因表现出突发性的强烈表达[2,3]。本研究采用 RT－PCR 技术对孕期第 4 天的小鼠子宫内膜着床点和着床旁组织 LIF 基因表达进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本实验采用重庆医科大学实验动物中心的 NIH 小鼠，受孕第 4 天的小鼠 20 只。

1.1.2 主要试剂 TRIZOL 和 dNTP 购自上海生工，M－MLV 逆转录酶购自 Promega，Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 妊娠第 4 天的小鼠从尾静脉注射 0.5% 台盼蓝 0.3ml，10min 后脱颈处死，取出子宫并将其在白色背景下自然平展，取着色点部位组织(即胚泡着床点)及其周围旁组织(未着色部位)，置于－70℃保存。

1.2.2 总 RNA 提取

用 1mlTRIZOL 将 100mg 的组织充分匀浆，加 0.2ml 异戊醇(异戊醇：氯仿三 1:24)混匀，离心，取上清液再加入与上清液等量的异丙醇，离心，沉淀用 75% 的乙醇洗涤两次，再用 75% 乙醇放－20℃保存备用。

临用时倒出乙醇，用 DEPC 处理的纯水溶解，并用紫外分光光度计测定 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 的比值，判定其纯度，

作者介绍：杨戎(1962－)，女，副教授，
主要研究方向：胚泡着床的分子机制。

维普资讯 http://www.cqvip.com

并计算其浓度。取部分 RNA 进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,判定 RNA 的完整性。

1.2.3 引物设计

β-actin 和 LIF 引物均由上海生工合成。序列见表 1。

1.2.4 cDNA 的合成和 PCR 扩增

cDNA 第一链的合成:模板 RNA 70℃ 变性 5min,再加入 dNTP、随机引物等 37℃ 孵育 5min,加入 M-MLV 逆转录酶 42℃ 60min,最后 70℃ 10min。

PCR 扩增:本实验采用单管法。94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 50s,50℃ 退火 50s,72℃ 延伸 90s,进行 32 个循环;最后 72℃ 再延伸 10min。

1.2.5 电泳及结果分析 取 PCR 产物 5μl 加 6x 上样缓冲液 1μl,1.5% 琼脂糖凝胶电泳(200V,40min),然后用凝胶成像系统成像,再用 Quantity One 软件(Bio Rad)分析各条带灰度值,得 LIF/β-actin 的灰度比值,即为 LIF mRNA 的相对表达值。

1.3 统计处理

实验结果采用 t 检验处理。

2 结 果

2.1 RNA 样品的鉴定

用紫外分光光度计测 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8~2.0 之间,说明 RNA 有较高纯度。1μlRNA 的量为 0.5~1.5μg。1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳结果说明 RNA 基本没降解,较完整。

2.2 RT-PCR 产物定性及定量分析

经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,LIF 和 β-actin 基因的 RT-PCR 产物与理论长度相一致(见图 1、图 2)。用 LIF/β-actin 灰度比值作为 LIF 基因的相对表达值。20 只孕期第 4 天的小鼠着床点 LIF mRNA 表达平均水平为 0.5316,旁组织 LIF mRNA 表达平均水平为 0.3711。最后进行统计处理,$t=2.9450$,$P<0.05$,差异具有显著性。即在胚泡着床窗口期,小鼠子宫内膜胚泡着床点与旁组织 LIF 基因表达不同,着床点的 LIF 基因表达明显高于旁组织的表达。

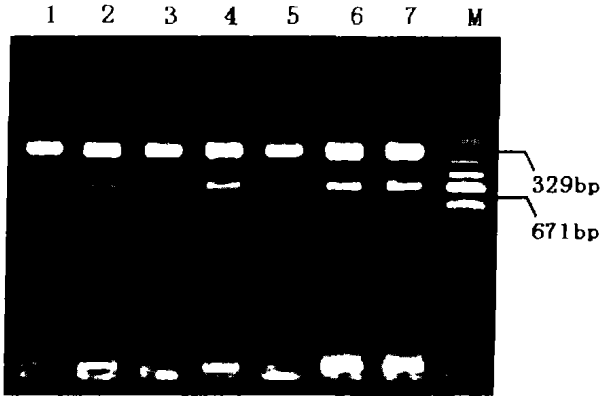


图 1 1~7 着床点 LIF RT-PCR 产物电泳图
(M pBR322AluI marker)

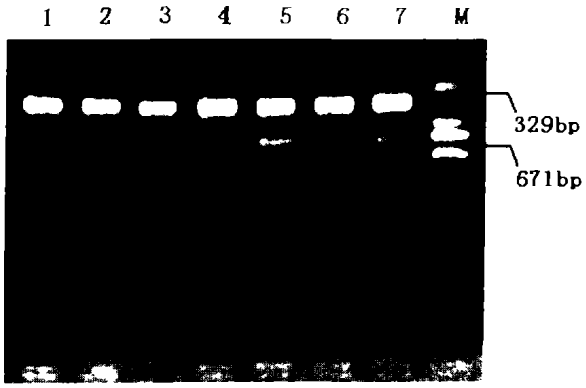


图 2 1~7 旁组织 LIF RT-PCR 产物电泳图
(M pBR322AluI marker)

表 1 引物序列

引物	引物序列	扩增片段长度
β-actin	上游 5'-AGA TCT GGC ACC ACA CCT TCT AC-3'	
	下游 5'-TCA GGA TCT TCA TGA GGT AGT CT-3'	329bp
LIF	上游 5'-AAC GGG ACA GAG AAG ACC-3'	
	下游 5'-TTC ATA CAC CCA GCA AGC-3'	671bp

3 讨 论

胚泡着床为妊娠建立的一个重要阶段,至今其机制尚不清楚。但近年来国内外学者研究已证实,LIF 在胚泡着床以及胚胎早期发育中起重要作用。Stewart[1]在对 LIF 缺失的转基因小鼠研究中发现,胚泡不能在 LIF 基因缺失的转基因小鼠子宫内着床,如果给这种转基因小鼠的子宫内注入外源性 LIF,或将胚泡移植到假孕的野生型小鼠中,胚泡便可正常着床。Tsai[3]用 LIF 提高了小鼠培养胚胎的卵裂数和胚泡形成率,并促进了滋养层细胞增生。这些都证实了 LIF 在胚泡植入过程中的重要作用。同时 LIF 基因在小鼠子宫内膜表达具 (下转第 350 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

[1] 董得长. 实用肾脏病学[M]. 上海科学技术出版社, 1998;993-1224.
[2] 丁雍容,吕志勤. 尿 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶与肾脏疾病[J]. 中华肾脏病杂志,1987;3:162.
[3] 高祖华,邱夏桑. 系统性红斑狼疮肾炎患者尿白蛋白与尿 NAG 测定及意义[J]. 中国现代医学杂志,2000;10(3):16.
[4] 王东玮,廖蕴华,郭 谊. 狼疮性肾炎尿 NAG 活性的改变及其临床意义[J]. 广西医科大学学报,1999;16(4):450.
[5] Delektorskaya L, Janushkevich T, Okunev D. The significance of the assays of urinary enzymes activity in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Z Med Lab Diagn, 1990;31(7):375-379.
[6] Idasiak-Piechocka I, Krzymanski M. The role of tubulointerstitial changes in progression of kidney function failure in patients with chronic glomerulonephritis[J]. Przegl Lek, 1996;53:443-453.
[7] 杜晓刚,甘 华,谯 林. 慢性肾功能不全患者尿中 NAG、RBP 和 FDP 检测及意义[J]. 重庆医科大学学报,2001;26(3):285.
[8] Taira K, Matsunaga T, Kawahara S, et al. Fragments of urinary fibrin/fibrinogen degradation products and cross-linked fibrin degradation products in various renal diseases[J]. Thromb Res, 1989;53(4):367-377.
[9] Sakakibara K, Nagase M, Takada Y, et al. Relationship between urinary fibrinogen degradation products and various types of chronic nephritis[J]. Thromb Res, 1987;45(4):403-411.

(上接第 333 页)有很强的时段性。Bhatt[4]用 LIF 基因探针印迹杂交在小鼠胚泡着床窗口期(受孕第 4 天)检测到 LIF 基因峰值表达。翁亚光[2]等的研究表明,在胚泡着床窗口期 LIF 基因在小鼠子宫内膜呈强阳性表达。

LIF 在胚泡着床中的重要作用已经得到证实,且 LIF 基因在着床窗口期呈峰值表达。基于以上研究,循着这一思路,LIF 基因在小鼠着床窗口期子宫内膜表达是否在特定部位呢? 本研究表明,LIF 基因在胚泡着床窗口期小鼠子宫内膜的表达具有特定部位,着床点的表达值明显高于旁组织的表达值。我们认为 LIF 在着床点的这种高水平表达有利于胚泡的成功植入,也为胚胎的形成创造了有利条件,并促进了胚胎的早期发育。这都印证了 LIF 在胚泡着床以及胚胎早期发育中的重要作用。

Kojima[5]用 Northern blot 和 RT-PCR 检测了人子宫内膜 LIF 基因的表达,证实了其在月经周期和孕期中扮演了重要的角色。王应雄[6]、黎刚[7]等也对人子宫内膜的 LIF 基因表达作了深入的研究,也同样发现 LIF 在人胚泡植入以及早期孕娠中的重要作用。本研究证实了 LIF 基因在子宫内膜表达的特定部位,人们能否利用这一重要信息而获取新的生殖调控手段还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Stewart CL, Raspar P, Brunet LJ, et al. B lastocyst implantation depands on maternal expression of leukemia inhibitory factor[J]. Nature, 1992;359:76-79.
[2] 翁亚光,王应雄,刘学庆,等. 妊娠小鼠子宫内膜 LIF 基因表达的研究[J]. 遗传,2000;22(2):73-74.
[3] Tsai HD, Chang CC, Hsieh YY, et al. Recombinant human leukemia inhibitory factor enhance the development of preimplantation mouse embryo in vitro[J]. Fertil Steril, 1999;71:722-725.
[4] Bhatt H, Brunet LT, Stewart CL. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991;88:11408-11412.
[5] 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.
[6] 王应雄,翁亚光,刘学庆,等. 正常女性子宫内膜 LIF 基因表达研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2001;9(1):34-35.
[7] 黎 刚,王应雄,刘学庆,等. 原因不明性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):251-253.