维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号：0253-3626(2002)03-0241-02

# 子宫蜕膜白血病抑制因子基因表达研究

黎 刚，王应雄
（重庆医科大学遗传优生教研室 重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨白血病抑制因子（LIF）基因在人类妊娠早期蜕膜组织的表达情况。方法：采用半定量逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）技术，对36例正常妊娠早期妇女子宫蜕膜LIFmRNA进行检测。结果：36例蜕膜组织均有较强LIFmRNA表达，平均表达水平为1.314±0.457。结论：人LIF基因表达可能同早期胚胎发育和妊娠维持有关。

【关键词】基因表达；白血病抑制因子；蜕膜
【中国图书分类法分类号】Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-09-24

## Expression of leukemia inhibitory factor gene of decidua from normal pregnant women

*LI Gang, et al*
*(Department of Genetics, Chongqing Medical University)*

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of leukemia inhibitory factor gene in human first trimester decidua. *Methods*: By reverse transcription-polymerase chain reacion (RT-PCR), the expression of LIF gene of 36 cases of decidua from human normal pregnancy was detected. *Results*: All of the decidua specimens had strong LIF gene expression. The level of LIF mRNA expression was 1.314 ±0.457. *Conclusion*: Our findings suggested that the expression of LIF gene might play an important role in the early phase of embryo development and also in the maintenance of pregnancy.

【Key words】Gene expression; Leukemia inhibitory factor; Decidua

白血病抑制因子（Leukemia inhibitory factor, LIF）是一种具有多种功能活性的糖蛋白分子，如抑制胚胎干细胞分化，刺激肝细胞合成急性反应蛋白，促进骨吸收，参与神经系统功能等。因其能诱导髓样M1白血病细胞分化为正常细胞而得名。90年代以来，研究证实，LIF基因表达是小鼠胚泡成功着床的关键[1]，而且LIF很可能对人胚泡着床也是必须的。此外，新近的研究表明LIF基因表达对促进胚胎早期发育[2]和胚泡成功着床后胎盘的形成起着重要的作用[3]。本研究通过RT-PCR技术对孕早期子宫蜕膜LIF基因表达进行研究，拟探讨它在妊娠中可能的生物学效应。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 研究对象 系2000年10月至2001年3月到重庆医科大学临床学院妇产科门诊准备实施人工流产术的病例。年龄22～30岁，取材时妊娠完全正常，停经40～84 d。夫妇双方染色体核型正常，抗精子抗体阴性，夫妇双方RH血型一致，子宫发育正常，无中重度子宫内膜异位，生殖激素水平正常，妊娠期无病毒感染及其它疾病史，无致畸环境接触史和近期服药史，无烟酒嗜好，家族无遗传病史.

1.1.2 主要试剂 TRIZOL Reagent和M-MLV one-step RT-PCR kit均购自上海生工产品。

### 1.2 方法

1.2.1 标本收集 行人工流产后即刻取吸出物中的蜕膜组织，生理盐水洗净血液，置于-70℃保存。

1.2.2 组织总RNA提取 用1mlTRIZOL Reagent将约0.1g组织充分匀浆，加0.2ml 4%异戊醇（异戊醇:氯仿=1:24）摇匀、离心，取上清液加0.5 ml异丙醇沉淀RNA，75%乙醇-20℃保存备用。用时弃去乙醇，加经DEPC处理的纯水溶解，并用紫外分光光度计测定RNA的OD260/OD280值，判定总RNA纯度及计算其浓度。取部分RNA甲醛变性琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察。

1.2.3 引物设计

LIF引物设计参照文献[4]，上游引物：5'-CAGCATCACTGAATCACAGAGC-3'，下游引物：5'-AGTATGAAACATCCCCACAGGG-3'，拟扩增片段长度为527bp。

内对照基因β-actin引物设计参照文献[5]，由于β-actin

作者介绍：黎 刚（1975- ），男，博士生。
主要研究方向：生殖遗传。
基金项目：重庆市教委（99-61），重庆市卫生局（99-2043）。

维普资讯 http://www.cqvip.com



在各组织中呈稳定表达，很少受其它因素的影响，故选用它作为内对照。上游引物：5'-ACACCTTCTACAATGAGCTG-3'，下游引物：5'-CTGCTTGCTGATCCACATCT-3'，拟扩增片段长度为828bp。

1.2.4 RT-PCR 采用单管法，用M-MLV one-step RT-PCR kit。模板RNA先单独70℃变性5min，而后进入cDNA合成：38℃25min；95℃5min；PCR扩增35个循环：94℃46s，58℃46s，72℃ 1min。72℃再延伸10min.

1.2.5 PCR产物电泳及定量分析 取PCR产物4μl，加2μl蒸馏水和6×载样缓冲液1.5μl，2%琼脂糖凝胶电泳（150V 55mA 60min）。紫外灯下观察摄像。凝胶图象分析系统（CCD）扫描各电泳带灰度值，计算LIF与灰度值的比值，作为蜕膜LIFmRNA的表达水平。

1.2.6 结果分析 计算LIFmRNA的平均表达水平。

## 2 结 果

### 2.1 RNA样品鉴定

1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳可见28S、18S和5S三条带，而且28s条带的亮度大约为18s条带的2倍，说明所提RNA基本没有降解，有较好的完整性。紫外分光光度分析OD260/OD280值在1.8～2.0之间，说明有较高纯度（符合蛋白质污染限），1μl RNA量为0.5～2.0μg。

### 2.2 RT-PCR产物定性表达与定量分析

经2%琼脂糖凝胶电泳分析，LIF与β-actin基因的RT-PCR产物与理论长度相一致。蜕膜目的基因LIF与内对照基因β-actin均有强烈表达（见图1）。利用LIF/β-actin灰度值比值作为子宫蜕膜LIF mRNA相对表达水平，计算平均表达水平为1.314±0.457。

## 3 讨 论

随着对生殖机理的深入研究，细胞因子在生殖中所起的作用日益受到学者们的关注。细胞因子是由多种细胞分泌的具有调节细胞功能的小分子多肽，包括LIF、TNF-α、CSF-1、早孕因子EPF等。新近的一些研究证明LIF是参与胚泡着床最重要的细胞因子之一。LIF基因缺失的雌鼠虽能正常排卵且受精卵能发育到胚泡阶段，但着床期胚泡游离于子宫而不能着床。但若将这种LIF基因缺陷胚泡移植到野生型假孕小鼠或在LIF基因缺失的雌鼠子宫内注射外源性LIF，则胚泡能着床并发育为成体[1]。Laird等[6]在临床中发现不明原因不孕的妇女分泌期子宫内膜LIF表达强度较正常生育妇女低，这说明LIF基因表达在人类胚胎着床中可能也是必需的。其后，随着对LIF的深入研究发现，它对早期卵母细胞发育与定时排卵也起着重要作用。它可促进小鼠原始生殖细胞（primordial germ cell，PGC）的生长，含有LIF的培养液明显促进PGC分裂增殖能力[7]。此外。LIF对早期胚胎发育也起着重要作用。Tasi[2]报道LIF提高小鼠培养胚胎的卵裂数和卵泡形成率，明显促进着床前胚胎的生长与孵出，并能促进滋养层细胞增生。

小鼠子宫内膜妊娠第4天，母羊子宫内膜妊娠第16到20天，人子宫内膜于分泌期的中晚期（19～25 d），均出现LIF爆发表达高峰，LIF基因表达的高峰期与胚泡着床期保持高度一致性提示了LIF在胚泡着床中可能起着重要的作用。人胚泡着床后，子宫内膜蜕膜化形成蜕膜，妊娠的继续是否还需要LIF基因的表达？循着这一思路，我们对妊娠早期蜕膜组织LIF基因表达进行了研究，结果表明LIF基因在蜕膜组织中仍存在较为强烈的表达，尽管表达水平可能不及着床期间的表达峰，但这仍提示维持早期妊娠可能仍然需要LIF的表达。动物实验表明，小鼠缺失一个功能性LIF受体基因时，表现出

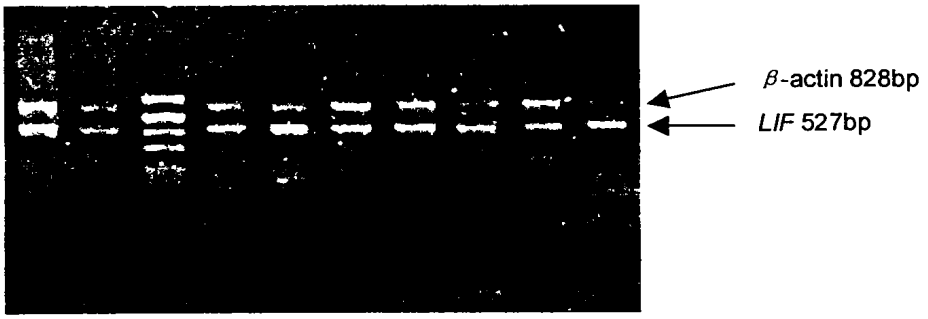



图1 蜕膜LIF RT-PCR产物电泳图(M：Marker PBR322)

（下转第246页）

维普资讯 http://www.cqvip.com



Pylori ?associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: Complete remission after curing the infection[J]. Gastroenterology, 2000; 118(5):821-828.

[4] Konturek PC, Konturek SJ, Starlyska T, et al. Helicobacter Pylori? gastric link in MALT lymphoma[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2000;14(10):1311-1318.

[5] Goto T, Nishizono A, Fujioka T, et al. Local secretory immunoglobulin A and postimmunization gastritis correlated with protection against Helicobacter pylori infection after oral vaccination of mice[J]. Infect Immun,1999;67(5):2531-2539.

[6] Pounder RE, Ng D. The prevalence of Helicobacter pylori infection in different countries[J]. Aliment Pharmacol ther, 1995; 9 (s) :33-39.

[7] Tomb JF, White O, kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter Pylori [J]. Nature, 1997;388(7):739-747.

[8] Keenan J, Oliaro J, Domigan N, et al. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies Lipoprotien 20 as a Helicobacter Pylori vaccine candidate[J]. Infect Immun, 2000;68(6):3337-3343.

[9] Kotloff KL, Sztein MB, Wasserman SS, et al. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell Helicobacter pylori vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection[J]. Infect Immun, 2001;69(6):3581-3590.

[10] Michetti P, Kreiss C, Kotloff K, et al. Oral immunization with Urease and escherichia coli heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in Helicobacter pylori-infected adults[J]. Gastroenterol, 1999;116:804-812.

[11] Shiesh SJ, Sheu BY, Yang SB, et al. Serologic response to lower-molecular-weight proteins of Helicobacter pylori is related clinical outcome of Helicobacter pylori infection in Taiwmn[J]. Dig Dis Sci, 2000;45(4):781-788.

[12] Raymond J, Sauvestre C, Kalach N, et al. Immunoblotting and serology for diagnosis of Helicobacter pylori infection in children[J]. Pediatr Infect Dis J, 2000;19(2):118-121.

[13] Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, et al. Comparison of five PCR methods for detection of Helicobacter pylori DNA in gastric tissues[J]. J Clin Microbiol, 1999;37(3):772-774.

（上接第242页）

胎盘血管发育改变，致使胎盘发育不全，胎儿营养不良[3]。而纯合gp130突变体小鼠胚胎在妊娠12.5天后逐渐死亡[8]。LIF行使功能正是通过与LIF受体及gp130相作用的，这从侧面说明LIF对妊娠维持具有重要意义。本研究提示LIF是维持早期妊娠的重要细胞因子，子宫蜕膜LIF基因表达异常则可能导致妊娠异常，但子宫蜕膜LIF基因表达可否作为临床原因不明习惯性流产（或自然流产）病因诊断的检测指标之一，有待进一步研究。

## 参 考 文 献

[1] Stewart CL, Raspar P, Brunet, LJ, et al. Blastocyst implantation depends on expression of leukemia inhibitory factor [J]. Nature, 1992;359:76-79.

[2] 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.

[3] Yoshida CL, Taga T, Saito M, et al. Targeted disruption of gp 130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996;93:407-410.

[4] Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, et al. Expression of leukemia inhibitory facor in human endometrium and placenta[ J]. Biol Reprod, 1994;50:882-887.

[5] Okamoto Y, Yusuke H, Yayoik K, et al. A simple quantitative measurement of mRNA of human ? actin by reverse transcription competitive PCR wih a compact digital camera[J]. Biol Pharm Bull, 1997;20(9):1013-1014.

[6] Laird SM, Tuckerman EM, Delton CF, et al. The production of leukemia inhibitory factor by human endometrium:presence in uterine flushings and production by cells in culture[J]. Hum Reprod, 1997;12:569-574.

[7] Cheng LZ, Gearing DP, White LS, et al. Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth[J]. Development, 1994;120:3145-3153.

[8] Davis S, Aldrich TH, Stahl N, et al. LIFR and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor[J]. Science, 1993;260:1805-1808.