维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)04－0365－03

小鼠动情周期子宫内膜 LIF 基因表达研究

杨　戎,王应雄,魏莎莉,刘孝云

(重庆医科大学计划生育医学系　重庆　400016)

【摘　要】目的:探索白血病抑制因子(LIF)基因在小鼠动情周期子宫内膜的表达情况。方法:采用 RT－PRC 技术对小鼠动情周期各个时期 LIF 基因表达进行检测。结果:动情周期、动情前期和动情期均未检测到 LIF 基因表达,而动情后期子宫内膜检测到 LIF 基因强表达。结论:推测 LIF 基因表达受母体自身激素水平改变的调控,且主要涉及孕激素,而与雌激素关系不大。

【关键词】白血病液抑制因子;动情周期;小鼠;RT－PCR

【中国图书分类法分类号】Q343.2;R373　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2000－02－13

Expression of leukaemia inhibitory factor from endometria of estrus cycle in mouse

YANG Rong, *et al*

(Department of Family Planning, Chongqing Medical University)

【Abstract】 ***Objective***: In the present study we exemined the expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) from endometrium of estrus cycle in mice. ***Methods***: LIF transcripts from endometrium of estrus cycle in mice were dectected by reverse trsnscripition－polymerase chain reaction (RT－PCR). ***Results***: Expression of LIF was not observed in endometria of diestrus, proestrus and estrus; Expressions of LIF were seen in endometria of metestrus. ***Conclusion***: It suggested that expression of LIF might relate to progesterone level of mother.

【Key words】 Leukaemia inhibitory factor; Estrus cycle; Mouse; RT－PCR

白血病抑制因子(Leukaemia inhibitor factor, LIF)是一种具有多种生物学活性的分泌性糖蛋白。许多研究已证实,小鼠妊娠第四天的子宫内膜中,其 LIF 基因突发性地表达增强,在人类子宫内膜中 LIF 基因的强表达高峰期也是发生在黄体期[1,2],这种子宫内膜 LIF 基因强表达高峰期与胚泡着床时间的一致性现象提示了 LIF 基因表达在胚泡着床中可能起着重要作用。

有实验研究表明,小鼠妊娠发生后的胚泡期其子宫内膜出现 LIF 基因强表达,但此期 LIF 基因的强表达是受胚泡进入子宫所产生的刺激而引起,还是受母体本身体内激素水平的改变而诱发,尚不十分清楚。对此,我们对小鼠动情间期(雌、孕激素水平低)、动情前期和动情期(雌激素水平高)以及动情后期(孕激素水平高)子宫内膜 LIF 基因表达进行了检测,以探讨在无胚泡刺激子宫状态下,其 LIF 基因在雌、孕激素水平改变时是否存在表达。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

选未孕 6～8 周龄的 NIH 品系成年小鼠 18 只,分四组即动情间期(3 只)、动情前期(4 只)、动情期(5 只)和动情后期(6 只)。各期的鉴别标准参照医学动物实验分组[3]。

1.2　总 RNA 提取

将子宫内膜组织置于碾磨器内,加入 1mlRNA 提取液(宝灵曼产品)充分碾细,将匀浆液置 1.5ml 离心管内,加入 200μl 氯仿与异戊醇混合物(体积比 24:1)抽提,冰浴静置 15min,15000r/min 离心 15min,取上清液于 1.5ml 离心管内,再加入 500μl 氯仿与异戊醇混合液抽提,15000 转/min 离心 5min,取上清液加等体积异丙醇混匀,4℃ 放置 1h 以上,12000r/min 离心 15min,弃上清液,加入 500μl 70%～75%乙醇洗涤 1～2 次,沉淀物即(总 RNA)用 70%～75%乙

作者介绍:杨 戎(1962－　),女,副教授,重庆人,主要研究方向:生殖遗传。

基金项目:四川省计生委资助项目(96－4－4)

维普资讯 http://www.cqvip.com

醇溶液保存于－4℃冰箱中备用。

1.3 cDNA 合成和 PCR 扩增

采用 Titan™单管 RT－PCR 系统(宝灵曼产品)在同一反应管中进行 cDNA 合成和 PCR 扩增。

主混合物 1：10mmol/L 浓度的 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 1μl，0.3μmol/L 浓度的引物 1 和引物 2 各 0.5μl(引物参照 David 等设计[4]，引物 1：5′－GGGATTGTGCCCT-TACTGCTG－3′，引物 2：5′－AGAAGGCCTGGAC-CACCACACT－3′)2μlRNA 溶解液(作模板 RNA，浓度约为 2μg/μl)，100mmol/L 浓度 DTT 溶液 2.5μl，10uRNase 抑制剂，加无菌重蒸水至 25μl。

主混合物 2：RT－PCT 缓冲液，含 Mg^{2+} 10μl(终浓度为 1.5mM)，5μ 的 Titan™酶混合液 1μl，加无菌重蒸水至 25μl。

将主混合物 1 和 2 加入同一 PCR 反应管中，混匀，放入 PCR 仪中 42℃逆转录 30～60min 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。

1.4 电泳

取 20μlPCR 扩增产物作聚丙酰胺凝胶电泳(15V、22mA、50min)、EB 染色，紫外观察拍照，扩增的 DNA 片段为 593bp。

1.5 实验对照

同时做 β－action 的 RT－PCR，以检测 RNA 是否降解，保证实验的可靠性。

2 结　果

在动情间期(雌、孕激素水平低)、动情前期和动情期(雌激素水平高)子宫内膜组织中均未检测到 LIF 基因表达，而在动情后期(孕激素水平高)子宫内膜组织中检测到 LIF 基因表达(见图 1、2)；图 3 为实验对照。

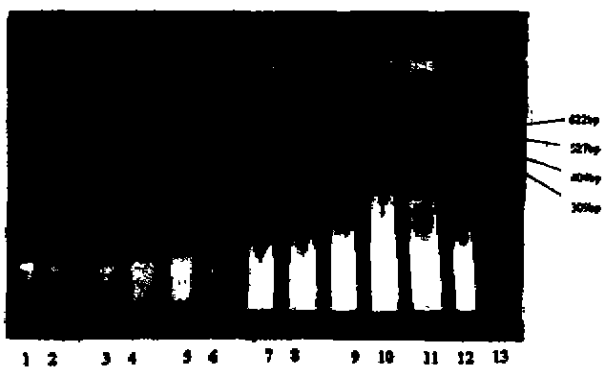


图 1　13 为 Marker PBR322MPS1；8－12 为动情期子宫内膜(未见 LIF 表达带)；4－7 为动情前期子宫内膜(未见 LIF 表达带)；1－3 为动情间期子宫内膜(未见 LIF 表达带)

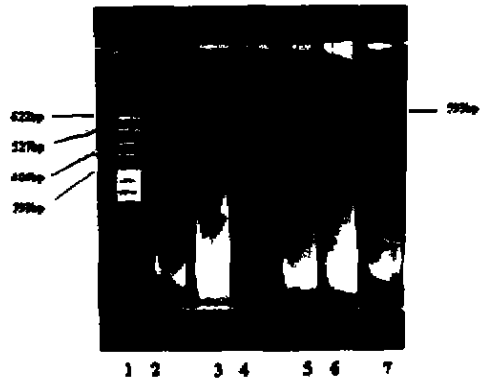


图 2　1 为 Marker PBR322MPS1.2－7 为动情后期子宫内膜(可见 LIF 表达带，593bp)。

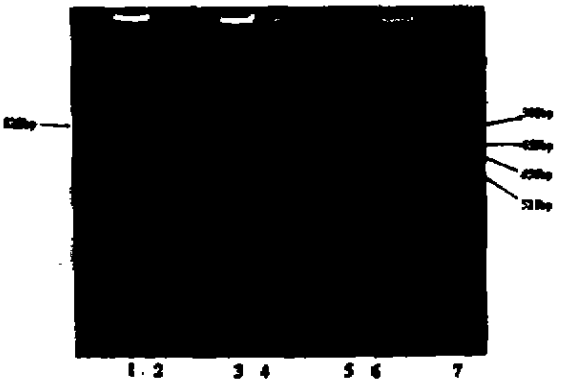


图 3　实验对照 7 为 Marker PBR322ALU；1－6 为子宫内膜 β－actin 基因表达(828bp)

3 讨　论

不同的物种哺乳动物生殖周期子宫内膜 LIF 基因表达高峰的差异提示其表达可能受不同卵巢激素的调控，如猪子宫内膜 LIF 基因表达高峰与其雌激素水平的高峰一致，兔、牛及人子宫内膜 LIF 基因表达增强则发生在其孕激素水平的高峰期，但是貂子宫内膜 LIF 基因的表达却不受雌、孕激素的影响[2,5,6]。

对小鼠子宫内膜 LIF 基因表达的研究揭示，其表达具有时限性，表达的高峰期均在胚泡着床期[1,7]，即孕激素水平的高峰期。对妊娠小鼠胚泡着床期小鼠子宫内膜 LIF 基因表达的研究也证实了这一点(待发表资料)。但小鼠子宫内膜在孕激素升高无胚泡植入子宫时，LIF 基因是否存在表达，尚不清楚。对此，对小鼠动情周期子宫内膜 LIF 基因表达进行了研究，发现动情后期(孕激素升高)子宫内膜存在 LIF 基因表达，这提示小鼠子宫内膜 LIF 基因表达不受子宫中是否有胚泡植入的影响，而是受母体自身激素水平改变的调控，这种调控 LIF 基因表达的激素可能主要涉及孕激素，而与雌激素关

维普资讯 http://www.cqvip.com

系不大。在人类子宫内膜中,其 LIF 基因的强表达也发生在孕激素水平升高的黄体期[2,8]。如果给排卵后的女性注射孕激素受体拮抗剂 mifepristone (RU486)将会降低 LIF 基因的表达强度[9],这提示了孕激素可能是 LIF 基因表达的调控因子。我们认为子宫内膜 LIF 基因在这一时间的表达,可能有助于子宫内膜形成一种有利于胚泡着床的环境,支持胚泡着床,并促进其早期发育。

尽管目前 LIF 基因表达的激素调控分子机理尚不清楚,但对其激素调控的分子机理进行深入的研究,将为今后在分子水平上研究新的生殖调控手段提供理论和实验依据。

参 考 文 献

[1] Bhatt H, Brunt LJ, 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.

[2] Kojima K, Kanzaki H, Iwai M. Expression of leukimia inhibitory factor in human endometrum and placenta [J]. Biol Reprod, 1994; 50: 882 - 887.

[3] 日本生理学会. 生理学实验[M]. 北京: 北京人民卫生出版社, 1980; 3: 180.

[4] Jurgen Stahl, David P. Gearing, Tracy A Willson. Structural Organixation of the Genes for Murine and Human Leukaemia inhibitory factor [J]. J of Biol Chemistry, 1990; 265: 8833 - 8841.

[5] Arice A, Engin O, Attar E, et al. Presence of leukemia inhibitory factor and interleukin 6 inporcine uterine secretin prior to conceptus attachment [J]. Cytokine, 1994; 6: 493 - 499.

[6] Hirxel DJ, Wang J, Desak. Changes in uterine expression of leukimia inhibitory factor during pregnancy in the western spotted skunk [J]. Biol Reprod, 1999; 60: 484 - 492.

[7] Strwart C, Kaspar P, Brunet LJ, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor [J]. Nature, 1992; 359: 76 - 79.

[8] Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine /paracrine function in regulation embryo implantation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93: 3115 - 3120.

[9] Sharon T, Cameron MB, CH B. Effect of two antiprogestins (mifepristone and onapristone) on endometrial factors of potential importance for implantation [J]. Fertil Steril, 1997; 67: 1046 - 1053.