340-341, 344

维普资讯 http://www.cqvip.com

(2)

文章编号：0253-3626(2000)04-0340-02

小鼠胚胎白血病抑制因子基因表达研究

何俊琳，毛应雄，翁亚光，刘学庆，陈雪梅

（重庆医科大学遗传优生教研室 重庆 400016）

R321.3
Q344.13

摘 要：目的 探索白血病抑制因子（LIF）基因在小鼠胚泡着床后有无表达。**方法** 采用RT-PCR技术对孕龄5d、7d、10d、12d、和15d的小鼠胚胎（共50个，每组10个）LIF基因表达进行检测。**结果** 在孕龄5d的二个胚胎和孕龄7d的一个胚胎中检测到LIF基因弱表达，而在孕龄10d以上的胚胎中均未发现有LIF基因表达。**结论** 推测LIF基因的表达在小鼠胚胎组织中受到限制。

关键词： 白血病抑制因子；小鼠胚胎；RT-PCR 胚泡着床 基因表达

中国图书分类法分类号： Q343.2；R373 **文献标识码：** A **收稿日期：** 2000-03-29

Expression of leukemia inhibitory factor during mouse embryogenesis

HE Jun-lin, et al

(Laboratory of Genetics and Eugenics, Chongqing Medical University, 400016)

Abstract: Objective Leukemia inhibitory factor(LIF) is a pleiotropic cytokine which expresses in the mouse endometrium and plays an important role in implantation. In the present study we examined whether LIF of mouse embryos would express or not after implantation (5 th-,7 th-,10 th-12 th- and 15 th-day post coitus). **Methods** LIF transcripts for 50 embryos were dectected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** LIF weak expressions in only 3 embryos (2 for 5th-day and 1 for 7th-day post coitus) were observed, but LIF expressions in the others from 10th-day to 15th-day post coitum were absent. **Conclusion** Our results suggested that LIF expression in the mouse embryo might be limited.

Key Words: Leukemia inhibitory factor; Mouse embryos; RT-PCR

白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor, LIF)是一种具有多种生物学活性的分泌性糖蛋白。1988年，Williams和Smith等相继发现LIF具有抑制胚胎干细胞的分化并保持其增殖能力的作用，从而使其在生殖生物学和生殖医学领域中的研究取得长足的进展[1,2]。特别是Bhatt等的研究表明小鼠妊娠第4天（即胚泡着床期）子宫内膜组织中存在高水平的LIF基因表达，提示子宫内膜LIF基因表达对胚泡着床有着重要的作用[3]。但对于胚泡着床后胚胎发育至胎鼠这一时段胚胎本身有无LIF基因的表达，或表达水平如何？不同学者尚有争议。鉴于此，我们采用RT-PCR技术对胚泡着床后不同发育阶段的小鼠胚胎进行了LIFmRNA检测，目的在于探索LIF基因在小鼠胚胎中的表达时间及表达水平。

1 材料和方法

基金项目： 四川省计生委资助项目（96-4-4）

作者介绍： 何俊琳（1966- ），女，讲师，硕士

1.1 实验动物及分组

选未育6～8周龄的NIH品系小鼠进行3:1（雌:雄）同笼交配，次日上午查见阴栓的雌鼠为受孕第1天。取孕龄第5天、第7天、第10天、第12天和第15天的胚胎共计50个（每一孕龄组用5只鼠，10个胚胎）。孕龄5d和7d的胚胎均在解剖镜下用平口4号针头冲洗子宫腔获得，而孕龄10天以上的鼠胚直接剖开子宫取得。同时，剖取5只受孕第4天的鼠子宫内膜作为对照（此时是LIF基因的表达高峰）。

1.2 总RNA提取

将胚胎组织和子宫内膜组织分别置于碾磨器内，加入1ml RNA提取液（宝灵曼产品）充分碾细，取匀浆液于1.5ml离心管内，加入200μl氯仿与异戊醇混合物（体积比为24:1）抽提，冰浴静置15min，15000rpm离心15min，取上清液于1.5ml离心管内，再加入500μl氯仿与异戊醇混合物抽提，15000rpm离心5min，取上清液加等体积异丙醇混匀，4℃放置1h以上，12000 rpm离心15 min，弃上清液，加入500μl 70%～75%乙醇洗涤1～2次，沉淀物（即总RNA,经电泳测定无降解）用70%～75%乙醇溶液保存于-20℃冰箱中备用。

1.3 cDNA合成和PCR扩增

采用TitanTM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。

维普资讯 http://www.cqvip.com

主混合物1：10mM浓度的 dATP、dCTP、dGTP和dTTP各1μl，0.3μM浓度的引物1和引物2上、下游各0.5μl，(引物参照Nicholas等设计[4]，引物1：5'-CCTCTTCCCATCACCCCTGTA-3'，引物2：5'-AGAAGGCCTGGACCACCACACT-3')2μl RNA溶解液（作模板RNA,浓度约为2μg/μl），100mM浓度DTT溶液2.5μl、10单位的Rnase抑制剂，加无菌重蒸水至25μl。

主混合物2：RT-PCR缓冲液，含Mg^{2+} 10μl（终浓度为1.5mM），5单位的TitanTM酶混合物 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 42℃ 逆转录30～60 min进行cDNA合成。再按下列条件作40个循环的PCR扩增：94℃变性 1 min、55℃退火30 s、68℃延伸 3 min。

1.4 电泳

取20μl PCR扩增产物作聚丙酰胺凝胶电泳(150V、22mA、50 min)，EB染色，紫外观察，扩增的DNA片段为538bp。

2 结 果

研究结果表明，对照组的5个子宫内膜样本均显示LIF基因强阳性表达；在孕龄5d的10个胚胎中有两个胚胎表现为LIF基因弱阳性表达，孕龄7d的10个胚胎中有一个胚胎检测到LIF基因弱表达，而在孕龄10d以上的胚胎中均未检测到LIF基因表达（见图1）。

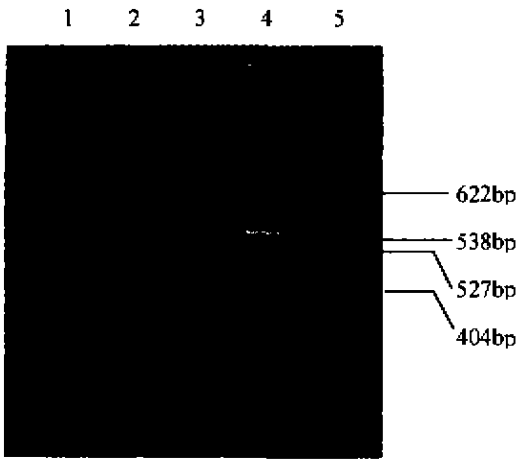


图1 小鼠LIF基因表达（RT-PCR）

1：胚胎LIF弱阳性（538bp）

2：Marker（λDNA PBR322MSPI）

3,5：胚胎LIF阴性

4：子宫内膜LIF强阳性（对照）

3 讨 论

有研究证实，小鼠LIF基因表达具有时间和部位的限制，如小鼠子宫内膜LIF基因表达的高峰期是妊娠第4天（即胚泡着床期），一旦胚泡着床后母体子宫内膜LIF基因表达迅速终止[3]，这提示LIF基因在这一时期突发性地强表达与胚泡着床有着密切的关系。我们的实验结果也证实了这一结论。对于胚胎发育阶段胚胎本身（无论是着床期，还是着床后）LIF基因是否表达，不同学者观点不一，有人认为胚胎表层存在LIF基因转录，但却没有检测到LIF mRNA的Northern Blot杂交信号。我们采用更为灵敏的RT—PCR技术对小鼠胚胎发育各阶段的胚胎组织进行了LIF基因表达的检测，结果在孕龄5d和7d的少量胚胎中（孕龄5d的2个胚胎，孕龄7d的1个胚胎）检测到有LIF基因表达，而大多数孕龄5d和7d的胚胎没有检测到LIF基因表达。在孕龄10d和10d以上的所有胚胎中也均未检测到LIFmRNA的存在。这与Smith和Shen等的研究结果一致[5,6]，至于在少数孕龄5d和7d的胚胎中检测到有LIFmRNA存在，这更有可能是来源于母体污染，而不是胚胎本身出现的LIF基因表达，因为母体子宫内膜LIF基因表达的高峰虽然在妊娠第4天（即胚泡着床期），但如果胚泡着床时间推迟，LIF基因表达的峰期也随之推迟，待胚泡着床后，LIF基因才终止表达。因此，由于小鼠个体的差异可造成胚泡着床时间的差异。一旦胚泡着床推迟2d左右，那么我们在孕龄5d或7d的胚胎中检测到的LIFmRNA就有可能来自母体子宫内膜组织。

Murray等曾观察到体外培养的胚泡能分泌有活性的LIF[7]，其他一些研究也证实来源于胚胎的成纤维细胞在体外培养时也有LIF基因表达，这与我们以及其他学者的体内实验研究结果相悖，这是否是由于体外培养时，培养基中某些外源因子刺激了LIF基因表达所造成的差异，有待进一步研究，弄清这一问题将有助于探索LIF基因表达的调控。

最近Nichols等[8]报道培养的具有多向生长潜能的鼠胚内细胞群（inner cell mass）没有LIF基因表达，却存在LIF一受体的表达，而胎盘等胚外组织也有不同程度的LIF表达。因此，我们推测小鼠胚胎着床后LIF基因暂停表达可能受母体调控，胚胎内细胞群产生的LIF一受体与胎盘产生的LIF发生作用，支持胚胎妊娠，从而促进早期胚胎发育。

（下转第344页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

CD44还能介导淋巴细胞与毛细血管后微静脉内皮结合而促进其特异性归巢。癌细胞也借此归巢受体而促进其转移。而通过使用抗CD44V抗体，则能有效抑制肿瘤的转移[8]。Gao Ya-Jun也证实胃肠癌患者尤其伴有癌转移者血中可溶性CD44的浓度明显增高，手术切除肿瘤或化疗后，血中CD44浓度明显降低[9]。本实验发现原发灶$CD44V_6$和CD44S阳性表达者，其淋巴结转移率高达83.3%和80%，提示$CD44V_6$和CD44S的表达与肿瘤的淋巴结转移密切相关。

本实验结果提示$CD44V_6$和CD44S在胃癌浸润和淋巴结转移中发挥了重要作用，可作为临床估计胃癌预后的指标之一。

参 考 文 献

[1] Cooper DL, Dougherty GJ. To metastasis or not? Selection of CD44 splice sites[J]. Nature Med, 1995;1:635-637.

[2] Stamenkovic-I, Aroff-A, Amiot-M, et al. The hemopoetic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronoan-bearing cells[J]. EMBO-J. 1991;10(2):343-348.

[3] Lilly Y.W.B., Zeenat G.S., Naoko iida, et al. CD44v3,8-10 is involved in cytoskeleton-mediated tumor cell migration and matrix metalloproteinase(MMP-9) association in metastatic breast cancer cells[J]. J Cell Physio, 1998;176:206-215.

[4] Wang C, Tammi M, Gao H, et al. Hyaluran distribution in normal epithelium of esophagus, stomach, and colon and their cancers[J]. Am J Path, 1996;148(6):1861-1869.

[5] Mitchell-BS, Whitehouse-A, Prehm-P, et al. CD44 exon variant 6 epitope and hyaluronate synthase are expressed on HT29 human colorectal carcinoma cells in SCID mouse model of metastasis formation[J]. Clin Exp Metasasis, 1996;14(2):107-114.

[6] Pauli-BU, Knudson-W. Tumor invasion: a consequence of destructive and compositional matrix alterations[J]. Human-Pathol, 1988;19(6):628-639.

[7] 李祖国，丁颜青，邓永键，等. $CD44V_6$在大肠癌转移中作用机理的研究[J]. 中华医学杂志，1998;78(10):729-732.

[8] Seiter S, Arch R, Reber S, et al. Prevention of tumor metastasis formation by anti-varaint CD44[J]. J Exp Med, 1993; 177: 443-455.

[9] Ya-jun Gao, Guang-luo Liu, Xiao-ning Wang, et al. Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancers [J]. Cancer Res 1994;54:422-426.

（上接第341页）

参 考 文 献

[1] Smith AG, Heath Jk, Donaldson DD et al . Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides[J]. Nature. 1988;336:688-671.

[2] Williams RL, Hilton DJ, Pease S et al. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cell[J]. Nature, 1988;336:684-688.

[3] Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukaemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation[J].Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1991;88:11408-11412.

[4] Nicholas MG, David PG, Julie AK 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;85:2623-2627.

[5] Smith AG, Nichols J, Robertson M et al. Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development[J]. Developmental Biol, 1992;151:339-351.

[6] Shen MM, Leder P. Leukemia inhibitory factor is expressed by the preimplantation uterus and selectively blocks primitive ectoderm formation in Vitro[J]. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 1992;89:8240-8244.

[7] Murray R, Lee F, Chiu CP. The genes for leukemia inhibitory factor and interleukin-6 are expressed in mouse blastocysts prior to the onset of hemopoiesis[J]. Mol Cell Biol. 1990;10:4953-4956.

[8] Nichols J, Davidson D, Taga T et al . Complementary tissue -specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis [J]. Mech Dev, 1996;57:123-131.