

誌 謝

要突破目前臨床醫學發展的瓶頸唯有賴對基礎科學的了解，勇於假設分析及不斷地實驗操作。本人自醫學院畢業以後便一直從事臨床婦產科醫學的工作，在接受例行住院醫師訓練後，深深感到對學術探討之重要。承蒙蔡鴻德主任的提拔，使我有機會在從事臨床醫療時也可以進一步接受研究所的醫學研究訓練，學習獨立思考的能力、研究計畫的擬定和分子生物的實驗方法及認識各種研究工具。

感謝指導老師蔡鴻德教授在內分泌不孕症醫學的頃囊相授，並付予我臨床研究領域之指引。吳介信教授是基因治療學的權威，使我在這個領域產生莫大的衝擊與興趣；感謝其協助指引，開啟了我對知識探求方法的一扇門。感謝林志生教授指導及啟發我實驗方法的構思；使我對於此一基因植入有更深一層之了解。感謝徐立偉教授提供我人工合成白血病抑制因子的製劑及黃怡萍學姐不吝地指導我她的研究經驗。感謝研究所的每一位師長，因為他們的親切、熱心的教導使我在這兩年過得溫馨而充實。最後還要感謝我的父親謝居昌先生、母親蔡玉雲女士以及太太張其真醫師的支持，使我有信心完成研究所的課程。

有關 LIF 相關的研究，總共分為五個研究：「人工合成之白血病抑制因子對於新鮮鼠胚的影響」已發表於 1999 年四月份 *Fertility and Sterility* 之期刊中；「經冷凍與解凍之人類胚胎之於體外延長培養之影響」；「不同濃度 LIF 對於鼠胚分裂之影響」；「LIF 在不孕症及正常病人之不同子宮內膜位置與月經週期之表現差異」及「LIF 基因植入小鼠之子宮內膜」均發表於 2000 年及 2001 年 *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 之期刊中。這些成果都要歸功於師長及家人所賜

中文摘要

主旨

為評估人工合成之白血病抑制因子(recombinant Leukemia Inhibitory Factor, r-LIF)對於新鮮鼠胚(實驗一)與經冷凍與解凍之人類胚胎之於體外延長培養之影響(實驗二)。並進一步分析不同濃度 r-LIF 對於鼠胚分裂之影響(實驗三)。比較 LIF 在不孕症及正常病人之不同子宮內膜位置與月經週期之表現差異(實驗四)。及以 LIF 基因植入小鼠之子宮內膜(實驗五)。

實驗方法：

實驗一：(r-LIF 對於新鮮鼠胚之影響)

6至8週大之CB6F1雌鼠以10 IU之懷孕的母馬血清雌性激素(pregnant mare's serum gonadotropin)注射以刺激卵子之發育，以10 IU人類絨毛性腺激素(human chorionic gonadotropin)於腹膜下注射，然後與BDF1雄鼠進行交配。雌鼠以隨機分配之方法分配。第一組：體內發育組；第二與第三組：體外發育組。第一組之小鼠於HCG注射後116-120小時後犧牲。第二組及第三組之小鼠於HCG注射後44-48小時後犧牲並取出胚胎。

第一組之鼠胚屬於囊胚期(blastocyst stage)之胚胎，第二組及第三組之鼠胚屬於2-至4-細胞期之胚胎。第二組之鼠胚培養於培養液(human tubal fluid, HTF)及0.5%之人類血清白蛋白(human serum albumin, HSA)之培養液中，並覆蓋油。第三組之鼠胚培養於HSA及r-LIF(1000 IU/ml)之培養液中並覆蓋油。各組之不同時期胚胎之數量與比例並進一步予以記錄與比較。

實驗二：(r-LIF 對於冷凍與解凍人類胚胎之於體外延長培養之影響)

以捐贈之人類胚胎，經快速冷凍與解凍後，根據不同之培養環境區分為四組：(1). HTF + 0.5% HSA; (2). HTF +0.5% HSA + r-LIF (1000 IU/ml LIF); (3) M3TH medium (Medi-Cult); (4) M3TH medium + r-LIF (1000 IU/ml LIF). 經過五天之長期培養，四組之不同時期胚胎發育予以記錄與比較。

實驗三：(不同濃度 r-LIF 對於鼠胚分裂之影響)

如同實驗一之鼠胚於 HCG 注射後 46-48 小時後犧牲小白鼠並取出胚胎。根據不同之 r-LIF 濃度，鼠胚以隨機分配之方式分配於七組不同之培養環境之中，包括：(1) HTF + 0.5% HSA; (2) HTF + HSA + 1500 IU/ml r-LIF; (3) HTF + HSA + 1000 IU/ml r-LIF; (4) HTF + HSA + 750 IU/ml r-LIF; (5) HTF + HSA + 500 IU/ml r-LIF; (6) HTF + HSA + 250 IU/ml r-LIF; (7) HTF + HSA + 125 IU/ml r-LIF。七組不同時期之胚胎發育予以進一步記錄與比較。

實驗四：(LIF 在不孕症及正常病人之不同子宮內膜位置與月經週期之表現差異)

在不孕症及正常病人分別在濾泡期，排卵期，及黃體期接受子宮內膜細胞之取樣，我們偵測黃體期時之血清黃體素濃度，我們並分析子宮內膜上皮細胞，腺體上皮，實體細胞之 LIF immunostaining 表現差異，及其與黃體素濃度之關聯性

實驗五 (LIF 基因植入小鼠之子宮內膜)

我們使用 Expression plasmids 攜帶 LIF 及 luciferase 基因施行基因植入，將施行過超級刺激排卵之 ICR 母鼠與閹割公鼠交配後以 LIF-liposome (組 1) 及 luciferase-liposome complexes (組 2) 注射入其子宮腔中(第 0 天) 以 RT-PCR 之方式偵測第 0 天至第 4 天之子宮內膜 LIF 及 luciferase 基因表現，並使用 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 應用於基因植入後之內部控制

結果：

實驗一：(r-LIF 對於新鮮鼠胚之影響)

比較第二組及第三組之鼠胚發育，發現二組之 4-至 8-細胞期及桑椹期之鼠胚發育比率類似(4-至 8-細胞期：87.3% vs. 91.0%, $P < .05$ ；桑椹期：74.6% vs. 87.1%, $P < .05$)。進一步比較第二組及第三組之囊胚期，成熟囊胚期，孵化囊胚期之比例，發現第二組(48.1%，31.7%，18.5%， $P < .05$)之胚胎分裂與發育均較第三組(83.6%，53.7%，37.8%， $P < .05$)為差。

實驗二：(r-LIF 對於冷凍與解凍人類胚胎之於體外延長培養之影響)

比較四組之胚胎之早期發育於 2~16 細胞期，並無統計學上之差異。進一步比較第一組及第三組其 2~桑椹期，並無統計學上之差異；比較第二組及第四組，其 2~囊胚期，亦無統計學上之差異。第一組之胚胎發育成桑椹期之比例較第二，三，四組之比例為低，第一與第三組之胚胎發育成囊胚期之比例較第二與第四組之比例為低。

實驗三：(不同濃度 r-LIF 對於鼠胚分裂之影響)

七組之胚胎之早期發育於 2-16 細胞期，並無統計學上之差異。進一步比較胚胎植入前之發育(桑椹至孵化囊胚期)，第 2, 3, 4, 5 組之胚胎(HTF + r-LIF 1500, 1000, 750, 500 IU/ml) 比第 1, 6, 7 組(HTF only, HTF + r-LIF 250, 125 IU/ml)之比例為高($P < .05$)。

實驗四：(LIF 在不孕症及正常病人之不同子宮內膜位置與月經週期之表現差異)

LIF 在正常之女性之子宮內膜之表現較不孕症之女性為高，LIF 在子宮內膜之表現最高為上皮細胞，其次為腺體上皮，最低為子宮內膜實體細胞，子宮內膜上皮及腺體細胞之表現最低在濾泡期，其次為排卵期，最高為黃體期；子宮內膜實體細胞之 LIF 表現並無週期性差異；LIF 表現與黃體素之濃度並無顯著關聯性

實驗五(LIF 基因植入小鼠之子宮內膜)

LIF mRNA 及 luciferase 之活性表現最高出現在基因植入後第三天，在第一組中 LIF/GADPH 在第一至第四天之比例分別為 0.414, 1.096, 1.162, 及 0.782 在第一組中 LIF/GADPH 在第一至第四天之比例分別為 0.24, 0.22, 0.35, 及 0.32

結 論

對於早期之鼠胚與經冷凍與解凍之人類胚胎體外培養，r-LIF 並無法提供明顯胚胎發育之幫助。對於較晚期植入前之胚胎(pri-implantative stage; 桑椹至孵化囊胚期)，r-LIF 能明顯提升胚胎之生長、分化與孵化。於 HTF 溶液之中加以 r-LIF 能提供類似 M3TH 溶液之培養環境。500 IU/ml. 為 r-LIF 理想之最低濃度。

子宮內膜細胞之 LIF 表現於人類之不孕症發生有關，LIF 表現亦與人類子宮內膜之細胞位置與月經週期有關，較強之 LIF 表現於黃體期時之人類子宮內膜表皮細胞。小鼠之子宮內膜可以使用 Liposome-DNA 之混合液予以基因轉殖入，未來將可能應用此方式於人類之基因治療。

目 錄

誌謝 -----	P.1
中文摘要 -----	P.2
主旨 -----	P.2
實驗方法 -----	P.2
結果 -----	P.4
結 論 -----	P.6
目錄 -----	P.7
表目錄 -----	P.9
符號與縮寫 -----	P.10
主文 -----	P.11
前言 -----	P.11
LIF 之發展歷史 -----	P.12
LIF 的生物活性 -----	P.13
LIF 在子宮及輸卵管的表現 -----	P.14
LIF 對不同時期胚胎之影響 -----	P.16
r-LIF 之發展 -----	P.16
研究目的 -----	P.17
材料與方法 -----	P.18
Medium 之製備 -----	P.24
r-LIF 之製備 -----	P.25

統計	P.25
結果	P.26
表格	P.27, 29, 31, 33, 35-38
討論	P.39
LIF 之作用機轉	P.40
LIF 對於人胚與鼠胚之影響	P.41
LIF 對於胚胎共同培養之優點	P.41
體外培養溶液之影響	P.42
人類血清白蛋白(human serum albumin, HSA)之影響	P.42
不同 LIF 濃度對於胚胎發育之影響	P.42
LIF 不同子宮內膜位置與月經週期之表現	P.43
LIF 之基因轉殖	P.43
結論與未來研究、應用方向	P.45
參考文獻	P.47
英文摘要	P.55
作者簡歷	P.59
著作權聲明	P.55

表 目 錄

表一. 實驗一中, 三組鼠胚由 4至 8細胞期發育至囊胚期之數目與比例之比較。

表二. 實驗二中, 四組冷凍與解凍之人類胚胎於添加 1000 IU/ml r-LIF之 HIF及 MBTH培養溶液下, 體外延長培養之結果比較。

表三. 實驗三中, 七組不同之 r-LIF濃度下培養之鼠胚於體外延長培養之結果比較。

表四. 在不孕正與正常受孕之女性其子宮內膜細胞在不同月經週期與不同位置之 LIF 螢光免疫染色表現之比較

圖 5-1. 包含小鼠 LIF 與 luciferase 之表現質體

圖 5-2. Luciferase 基因轉殖後第 0, 1, 2, 3, 4 天時之相對 Relative light units/g protein 比值

圖 5-3. LIF 基因轉殖後第 1, 2, 3, 4 天時之相對 mLIF/GAPDH 比值

圖 5-4. luciferase 基因轉殖後第 1, 2, 3, 4 天時之相對 mLIF/GAPDH 比值

符 號 與 縮 寫

ART: assisted reproductive technology; 人工協助生殖技術

FSH: follicle stimulating hormone; 濾泡激素

GnRHa: gonadotrophin releasing hormone agonist (Leuprolide depot, Takeda
Chemical Industries Co. Ltd, Osaka, Japan) 性腺激素釋放素類似劑

HCG: human chorionic gonadotrophin; 人類絨毛性腺激素

HILDA: human interleukin for DA cells; 人類造血細胞生長因子

HMG: human menopausal gonadotrophin; Humegon; Organon, The Netherlands;
人類停經後性腺激素

HSA: human serum albumin; 人類血清白蛋白

HTF: human tubal fluid; 人類輸卵管溶液

ICSI: intra-cytoplasmic sperm injection; 精子顯微注射

ISH: In-situ hybridization; 原位雜交反應

IL-6: interleukin- 6; 介質蛋白-6

IVF: in-vitro fertilization; 試管嬰兒

r-LIF: recombinant leukemia inhibitory factor; 人工合成之白血病抑制因子

M3TM medium: Medi-Cult; 人工合成之體外延長培養液

MESA: micro-surgical epididymal sperm aspiration; 副睪精蟲吸取術

mRNA: messenger RNA 訊息 RNA

PMSG: pregnant mare's serum gonadotropin 懷孕的母馬血清雌性激素

RT-PCR: reverse transcription- polymerase chain reaction; 反轉錄酶聚合酶連鎖反應

TESE: testicular sperm extraction 睪丸精蟲取出術

主 文

前言:

由於不孕症的人口日益增加，如何改進生殖科技使懷孕率提高，一直是不孕症工作者最關心之課題。近年來人工協助生殖技術(ART, assisted reproductive technology)不斷地突破，自從精子顯微注射(ICSI, intra-cytoplasmic sperm injection)發展以後，卵子(oocyte)及受精卵(embryo)的品質成為決定試管嬰兒(IVF, *in-vitro* fertilization)成功率的主要原因。此外冷凍胚胎在經歷冷凍(freezing)與解凍(thawing)的過程後使得胚胎的分裂(cleavage rate)和著床率(implantation rate)均較新鮮的胚胎為低，故如何提高冷凍胚胎的發育亦為臨床治療的重點。細胞素(cytokine)在卵泡(follicle)的發育、促使排卵(ovulation)及受精卵著床的過程中扮演一重要角色。學者嘗試以細胞共同培養(co-culture)的方法或加入各種生長因子(growth factor)來促使胚胎分裂得更好。人工合成的生長因子較細胞共同培養的優點在於方便，且無污染，而白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是一種很理想的培養液添加物。臨床實驗顯示人工合成的白血病抑制因子(r-LIF)不僅能有效地促進小鼠胚胎的分裂也能使人類冷凍胚胎的分裂和發育得到改善。

LIF之發展歷史：

白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是一種具有廣泛功能的生長因子。最早是由學者 Ichikawa 於 1969 年所發現,他是在培養小白鼠 myeloid leukemia M1 cell line 時發現,將其(LIF)加入培養基發現會誘發小白鼠 myeloid leukemia M1 cells 分化為嗜中性顆粒細胞或巨噬細胞[1]。1988 年 Smith [2]等學者發現一段人類造血細胞生長因子(HILDA; human interleukin for DA cell line)也會促進這細胞的增生,而 HILDA 即是 LIF。此後有學者在不同種的細胞發現如:它(LIF)在對初級生殖細胞(Primordial germ cells) [3], 腎臟細胞(renal cells), 周邊神經元(Peripheral neurons), 造骨細胞(osteoblasts), 肝細胞(hepatocytes), 及脂肪細胞(adipocytes)亦有促進生長或誘發分化的功能[4]。因其在不同種細胞具有不同特性而有不同之命名,目前統稱為白血病抑制因子(LIF)。

LIF 之蛋白質及核酸之序列已被定序出來[5],不同種生物之 LIF 雖不盡相同,但彼此之間有很高的同質性(homology)。人類和小白鼠的 LIF 之氨基酸序列約有 78%同質性。在 1988 年 Hilton [6]等學者實驗中發現由 Kerbs II Ascites 細胞培養基所純化得到因子的其中二段 LIF 蛋白 (LIF- α , LIF- β),可能是由相同的蛋白經過不同的糖化作用所形成,但 LIF- α 及 LIF- β 相同地具備促進 myeloid leukemic M1 細胞分化及抑制細胞增生的功能,分子量是 25KD 及 45KD。人類的 LIF 基因序列在 1988 年時由 Gough [5]等學者加以證實為一段含有一個 intron 及二個 exon 的 2840 個核苷酸(nucleotides)序列。LIF 屬於一種糖蛋白(glycoprotein)[7],其分子量依糖化的程度不同而不同,約 45-56 KD [2]. LIF 基因分別位於人類第二十二對染色體(22q12)[8]、及小鼠第十一對染色體(11A1)[9]上。

LIF的生物活性:

為提昇胚胎體外延長培養之成功率，多年來學者提出許多方法，包括以各種細胞加入培養環境之共同培養(co-culture)，如輸卵管表皮細胞(ampullary cells) [10]，子宮纖維母細胞[2]及綠猴腎細胞(Vero cells) [11]。這些細胞能分泌多種有助於於胚胎生長分化之生長因子能加速胚胎之生長[12]。這些生長因子之中包括白血病抑制因子(LIF)能促進與調節胚胎之生長[13]。

LIF的生物活性:

(I) 體外 (*in vitro*)

- 誘發: 初期生殖細胞(primordial germ cells)之增生[14]
 小鼠胚胎之發育[15,16]
 囊胚期羊胚胎之孵化
 造血細胞(hematopoietic cells)之增生[17]
 神經細胞發育[18]
 促進介質蛋白-3(IL-3)對巨核細胞(megakaryocytes)之增生作用，
 及血小板之釋放[19]
- 抑制: 胚胎幹細胞之分化 (embryonic stem cells differentiation) [20]

(2) 體內(*in vivo*)

- 誘發: 囊胚形成，囊胚著床 [16]
 骨細胞之增生，鈣離子的釋放[21]

(3) 基因突變 (homologous LIF gene mutation): 囊胚無法著床[16]

關於 LIF 能誘發初期生殖細胞(primordial germ cells)之增生[14]，因為初期生殖細胞之存

活與 LIFR 相依之細胞素(LIFR dependent cytokine)有關。在初期生殖細胞的細胞表面已證實有 LIF 接受體的存在，學者以抗 LIF 的抗血清(anti-LIF anti-serum)作用後發現將會阻止 LIF 的接合(binding)，進一步導致影響初期生殖細胞之存活率。由於初期生殖細胞之轉移(migration)乃 cAMP 相依性的，故除了 LIF 以外其他如腫瘤壞死因子(TNF- α ; tumor necrosis factor- α)、幹細胞因子(stem cell factor)亦有幫助。

LIF 在子宮及輸卵管的表現:

LIF 於胚胎植入前，由人體之子宮內膜細胞(endometrial cell)分泌。Bhatt (1991) [22]等學者發現成熟小白鼠的子宮及輸卵管在整個週期均有 LIF 的表現，尤其在受精後第四天胚胎著床時子宮內膜腺體 LIF 的表現更是大量增加。Stewart (1992)[23]以 LIF 基因突變的轉殖小鼠進行活體研究發現小鼠仍可受孕，但胚胎卻無法著床。Yang (1994) [24]指出兔子在動情期(follicular phase, proliferative phase)時的腺體(glandular epithelium)及管腔上皮(luminal epithelium)及子宮肌層有 LIF 的表現，但基質(stroma)在整個動情期及非動情期卻皆無法測得。兔子並不同於人類：人類有正常的月經週期(menstrual cycle)，兔子沒有正常且規律的月經週期變化，且兔子需陰部受到刺激或性交時才會刺激兔子進入黃體期(luteal phase)並排卵，因此子宮內膜(endometrium)變化與人類並不盡相同。

Chamock-Jones(1994) [25]等學者利用免疫化學反應(immunoreactivity)來證明在人類月經週期的分泌期(secretory phase, luteal phase)的子宮內膜上皮有 LIF 存在，並同時有大量 LIF mRNA 之表現；且進一步在利用反轉錄酶聚合酶連鎖反應(RT-PCR)來偵測到囊胚有 LIF 接受器 mRNA 之表現。Kojima(1994) [26]等學者也在人類的胎盤中測得 LIF 接受器的存在，因而推論 LIF 可能有助囊胚的生長及分化。Arichi 等學者(1995) [27]報告中則是發現人類整個月經週期的子宮內膜皆有 LIF 的表現。Nachtigall (1996) [4]等學者研究中指出人類 LIF 在子宮內膜的表現在月經週期的第 19-25 天時達最大量，而這段時間是人類胚胎著床時期，

推測 LIF 週期性地表現可能作用機制是直接參與滋養葉的功能及分化的調節而來，為影響人類胚胎著床之重要調節因子。所以 LIF 於子宮內膜細胞與胚胎之間之訊息傳遞扮演一重要之角色 [5]。

Cullinan (1996) [28] 等學者在人類子宮內膜的研究報告中指出懷孕婦女的子宮內膜可以偵測到 LIF 的表現，但局限在分泌期(secretory phase)及排卵後 (postovulatory phase) 的子宮內膜腺體；而在增生期(proliferative phase)及排卵前期(pre-ovulatory phase)無法測得 LIF 的表現。且在增生期及分泌期的管腔上皮有 LIF 接受器的表現，而 gp130 (glycoprotein 130) 這個訊息傳導次單體(transducing subunit)則在整個月經週期的管腔及腺位上皮皆有表現。因此作者推測在人類 LIF 表現與小鼠類似，可能是藉由與子宮內膜管腔上皮(luminal epithelium) 上 LIF 接受器間的自體分泌(autocrine)或旁分泌(paracrine)的相互作用扮演調節胚胎著床的角色 [28]。

根據學院兩年前蔡鴻德教授、徐立偉教授、黃怡萍學姐的研究心得 以 ^{35}S 來 labeled 的 RNA 探針來做原位雜交反應(in-situ hybridization) 結果顯示腺位或管腔上皮，或基底細胞，全部證實皆有 LIF 的表現；LIF 在基質細胞，腺體上皮，及管腔上皮的表現量似乎並不一致，在原位雜交反應實驗的結果顯示 LIF 表現量在增生初期的基質、腺體及管腔上皮似乎是均勻分佈；在增生後期至分泌初期觀察到的腺體上皮、管腔上皮觀察到 LIF 表現量較基質增加；分泌期管腔及腺體 LIF 表現更為明顯。而我們可以利用 RNase protection 的結果印證原位雜交反應：大多數的婦女子宮內膜組織中皆可測得 LIF mRNA 的存在。

LIF 對不同時期胚胎之影響：

有關 LIF 對於不同時期胚胎發育之影響仍有爭議。目前大部分學者支持 LIF 對於植入前之胚胎發育有所助益[29] Fry (1992) 等學者[30] 提出添加 LIF 於桑椹期之羊胚培養液中能提升羊胚之囊胚形成率與孵化率達四倍之多。Stewart (1994) [23] 提出主要控制植入

前之囊胚期之細胞發育與分裂。在其他之實驗中亦發現 LIF 能促進囊胚期小鼠胚胎之發育，增加滋胚外層(trophoectoderm mass)形成[15,16]。主要爭議點在 LIF 對於早期胚胎發育之影響到底是否有所助益。Michell (1994)等學者[15] 提出 r-LIF 能提升囊胚期之生長率並減少胚胎雜質之形成率。Dunlison (1996)等學者[31]進一步提出 LIF 添加於不含血清之培養環境中(serum free medium)，能明顯提升人胚之囊胚形成率(由 18.4%提高至 43.6%)。然而亦有些學者提出 LIF 對於胚胎體外培養之發育並無明顯之影響，如 Jurisicova (1995)等學者[32] 提出 LIF (1000IU/ml)並無法明顯提升人類胚胎囊胚期之生成率。

r-LIF 之發展：

Mitchel (1994)等學者 [15]第一次提出人工合成之 LIF 可以提昇鼠胚囊胚期細胞之生長與降低胚胎分裂的碎片(fragment)，他提出濃度不同的效應，並主張高劑量的 r-LIF 可以達到較好的結果。本研究採用人工合成之 LIF (r-LIF) [33]取代共同培養(co-culture)之方式，以避免細胞共同培養方式之缺點。

研究目的：

因為不孕症的罹患率日趨上升，已成為國際性的共同焦點。我們由探討白血病抑制因子對受精卵發育及胚胎著床的影響，使之應用於臨床醫學，祈提高人類生殖科技的成功率。

研究 LIF 對於人類胚胎體外培養之影響：

回顧過去文獻，極少學者提出 LIF 對於人類胚胎體外培養之影響。Dunglison (1996) 等學者[31] 第一次提出 LIF 加入不含血清之培養液中能明顯提升人類胚胎囊胚期之發育 (18.4 至 43.6%)。Jurisicova 等學者[32] 提出 LIF 並無法明顯提升人類胚胎之早期發育。此外並無其他學者提出 LIF 對於人類胚胎延長培養之大規模實驗結果。

研究不同濃度 r-LIF 對於鼠胚分裂之影響：

大部分文獻之報告支持 LIF 對於植入前之胚胎發育有所助益 [13,29]。我們亦曾提出發表濃度 1000 IU/ml 之 r-LIF 能提升植入前之胚胎發育(包括囊胚期，成熟囊胚期，孵化囊胚期之胚胎)[13]。過去有關 r-LIF 之文獻多採用濃度 1000 IU/ml 之 LIF 當作標準之胚胎培養液[13,34,35]，並無其他研究仔細地探討其他濃度之 LIF 對於胚胎發育之影響。

為研究人工合成之 r-LIF 對於不同時期之鼠胚與人類胚胎於體外延長培養時之影響，本研究採用比過去文獻所提出更大規模之實驗材料與胚胎數目以進行此實驗。並針對 r-LIF 對早期胚胎與晚期植入前胚胎發育之影響作一完整之比較與評估，同時亦以添加 r-LIF 之人工合成之體外延長培養液(M3TM)與添加 r-LIF 之傳統 HIF 培養液，比較其對胚胎體外延長培養之影響。另外亦比較不同濃度之 r-LIF 對於胚胎發育之作用。

材料與方法：

實驗一：r-LIF 對於新鮮鼠胚之影響

6 至 8 週大之 CB6F1 (Charles River, Wilmington, Mass) 雌鼠以 10 IU 之懷孕的母馬血清雌性激素(pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG)注射以刺激卵子之發育，以 10 IU 人類絨毛性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG; Pregnyl; Organon) 於腹膜下注射，然後與 BDF1 雄鼠進行交配。20 小時後，檢查雌鼠之陰道栓。CB6F1 雌鼠以隨機分配之方法分配成三

組。第一組: 體內發育組(*in vivo*, 控制組); 第二與第三組: 體外發育組(*in vitro*, 實驗組)。第一組之小鼠於 HCG 注射後 116-120 小時後犧牲並取出胚胎(embryo)。第二組及第三組之小鼠於 HCG 注射後 44-48 小時後犧牲。犧牲小鼠後, 先以 70% 酒精消毒小鼠之腹部並打開腹部, 曝露出 Y 字形之子宮, 白色之輸卵管, 輸卵管旁黃色之卵巢。將輸卵管旁之腹膜與脂肪撥離, 切除輸卵管與卵巢連接之韌帶, 並於靠近子宮處將輸卵管切除。以 30 # 之空針頭以培養液(flush medium)經由輸卵管壺腹處之胚胎。將沖洗出之培養液於 100 倍之顯微鏡下觀察, 並找出及蒐集胚胎。

第一組之小鼠胚胎屬於囊胚期(blastocyst stage), 第二組及第三組之小鼠胚胎屬於 2- 至 4 細胞期。第二組(HTF + HSA)之鼠胚培養於 30 μ l 微滴之人類輸卵管液(human tubal fluid, HTF)及 0.5% 之人類血清白蛋白(human serum albumin, HSA)之培養液中, 並覆蓋礦物油(paraffin oil)。第三組(HTF + HSA + r-LIF)之鼠胚培養於含 30 μ l 微滴之 HSA 及 r-LIF (1000 IU/ml) 之培養液中, 並覆蓋以 paraffin oil。第二組與第三組之鼠胚於溫度 37°C, 5% 二氧化碳與 95% 濕度之培養箱中培養 120 小時。各組之培養溶液定期每 48 小時更換。每日以光學顯微鏡觀察並記錄胚胎之外觀與發育。第二組與第三組之不同時期胚胎[包括 4 至 8 細胞期, 桑椹期(morula-stage), 囊胚期(blastocyst-stage), 成熟囊胚期(expended blastocyst), 孵化囊胚期(hatching blastocyst)]之數量與比例, 予以計錄與比較。第一組之小鼠胚胎於胚胎期時蒐集並供作控制組予以比較。

實驗二: 經冷凍與解凍之人類胚胎之於體外延長培養之影響

從 1991 到 1995, 於中國醫藥學院附設醫院不孕生殖中心, 接受試管嬰兒與冷凍胚胎之病患, 於成功受孕與生產後, 捐贈其冷凍胚胎以供本實驗之用途。本實驗經由中國醫藥學院附設醫院之人體實驗倫理委員會審查通過, 所有參與之病患, 於捐贈冷凍胚胎前, 夫妻雙方均簽署同意書, 胚胎之取得是以性腺激素(FSH or HMG)控制卵巢刺激, 並以柳菩林 gonadotrophin releasing hormone agonist suppression (GnRH_a; Leuprolide depot, Takeda

Chemical Industries Co. Ltd, Osaka, Japan)經由長或短時間表(long or short protocol) 控制自體之內分泌反應[36]。卵子取出後，經由體外受精，再植入 4 或 5 個胚胎。進一步將剩餘之胚胎以快速冷凍(ultra-rapid cryopreservation)之方式與以冰凍保存。[37] 解凍過程亦經由快速解凍之方式解凍出我們所需要之胚胎[38]。經快速解凍後之人類胚胎，在光學顯微鏡下評估其胚胎等級與細胞品質。品質極差(第四等級)或不正常分裂(單細胞，雙原核)之胚胎均予以捨棄。

所有經快速冷凍與解凍及篩選後之人類胚胎，根據不同之培養環境區分為四組：

(1) 30 μ l 之 HTF 溶液添加 0.5% 之人類血清白蛋白(human serum albumin, HSA); (2) 30 μ l 之 HTF 溶液添加 0.5% 之人類血清白蛋白(human serum albumin, HSA)及 1000 IU/ml 之 r-LIF; (3) 30 μ l 之 M3TH medium 培養液(Medi-Cult); (4) 30 μ l 之 M3TH medium 培養液(Medi-Cult) 添加 1000 IU/ml 之 r-LIF。LIF 之製備過程是根據 Chang (1988)等學者所提出之方式[17]。所有分裂之胚胎均培養於外覆礦物油之培養液之中。所有胚胎均培養於獨立之培養液中，以便評估胚胎之生長與發育。所有胚胎均培養於溫度 37°C，5% 二氧化碳與 95% 濕度之培養箱中培養 120 小時。

經過五天之長期培養，四組之不同時期胚胎發育予以計錄與比較。各組之培養溶液每 48 小時定期更換。每日於光學顯微鏡觀察並記錄胚胎之外觀與發育。於細胞解凍後第 24，48，72，96，及 120 小時，各組之胚胎達到 5~8 細胞期，9-16 細胞期，桑椹期，囊胚期，分別予以計錄與比較。同時各組胚胎之分裂，生長，與囊胚期之發展，予以比較與評估。經由各組胚胎生長分裂之比較，添加 LIF 與否對於胚胎之影響可以進一步評估。

實驗三: 不同濃度 LIF 對於小鼠胚分裂之影響

如同實驗一之小鼠胚於 HCG 注射後 46-48 小時後犧牲並取出胚胎。所有小鼠胚均培養於 30 μ l 微滴之 HTF 溶液中，並添加不同濃度之 LIF。根據不同之 r-LIF 濃度，鼠胚以隨機分配之方式分配於七組不同之培養環境之中，包括: (1) HTF; (2) HTF 添加 1500 IU/ml r-LIF; (3) HTF 添加 1000 IU/ml r-LIF; (4) HTF 添加 750 IU/ml r-LIF; (5) HTF 添加 500 IU/ml r-LIF; (6) HTF 添加 250 IU/ml r-LIF; (7) HTF 添加 125 IU/ml r-LIF。七組之鼠胚均置於溫度 37°C, 5% 二氧化碳與 95% 濕度之培養箱中培養 120 小時。各組之培養溶液每 48 小時定期更換。於光學顯微鏡下，各組胚胎之分裂，生長，與囊胚期之發展，予以進一步比較與評估。於鼠胚取出後第 24, 48, 72, 96, 及 120 小時，七組不同時期之胚胎發育(包括 5~8 細胞期, 9~16 細胞期，桑椹期，囊胚期，孵化囊胚期)予以進一步計錄與比較。

實驗四: LIF 在不孕症及正常病人之不同子宮內膜位置與月經週期之表現差異

實驗對象區分為兩組，包括不孕症之病患與正常生育能力之女性，年紀較大之病患 (>35 歲)，精蟲活動力或數量過低之病患、月經週期過短、子宮內脈息肉、及子宮內膜下肌瘤，均排除於本實驗之對象中，所有之研究對象並不使用口服避孕藥，子宮內避孕器，於施行取樣前均簽署研究同意書

根據月經之週期長短(n)，所有之病患施行子宮內膜之取樣三次，分別於濾泡期(月經週期 第 n-22 至 n-17 日)，排卵期(月經週期 第 n-16 至 n-11 日)及黃體期(月經週期 第 n-10 至 n-5 日) 使用拋棄式子宮內膜括搔器(Zinnanti Co., Chatsworth, CA, USA) 以取樣頂部之子宮內膜細胞 所有子宮內膜細胞取樣均以 phosphate-buffered saline (PBS) 清洗並儲存於 4°C 之 30% sucrose solution (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 溶液中 以潤濕 coating buffer [1% CrK₂(SO₄)₂, 0.1% gelatin, J.T. Baker, USA] 及包含 RNase free diethyl pyrocarbonate (DEPC, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)

成分之溶液製備樣本細胞玻片 再將子宮內膜細胞包埋於包埋溶液中(O.C.T. compound; Miles Inc, Elkhart, IN, USA)再予以切片成 6 μm 之薄片, 再將此細胞薄片置放於玻片上以儲存於 70°C 下

將製備好之細胞玻片於 45°C 下加溫並以 0.1 M PBS 溶液清洗, 再置放於 0.02 N HCl 溶液中以 1% (v/v) Triton-X 100/0.1 M PBS (pH 7.4) 溶液潤濕, 並將細胞玻片區分為三組: 控制組一(DEPC water), 控制組二(β -actin 600 pg/ml, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)及實驗組(^{35}S -UTP labeled pBS hLIF 600 pg/ml) LIF pBluscript cDNA 之製備乃根據 Hsu et al. [7] 實驗組之細胞玻片以 0.1 M PBS 溶液清洗並以 0.1% Triton-X100/0.1 M PBS (pH 7.4) 潤濕, 再添加 0.01 U proteinase K/1 M PBS (pH 7.4) 溶液 當添加 ^{35}S -UTP labeled pBluscript human LIF (5x10⁶ CPM/ml) 溶液後, 細胞玻片以 70% alcohol 脫水並以 emulsion (Amersham RPN40) 溶液清洗 最後添加 D-19 溶液 (Kodak) 固定溶液(Kodak)及 2% methyl green (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 溶液後再將細胞玻片置放於顯微鏡下觀察

進一步偵測子宮內膜細胞之三個位置之 LIF 表現, 包括: 子宮內膜表皮細胞, 子宮內膜腺體細胞, 及子宮內膜實體細胞 子宮內膜細胞之 LIF messenger ribonucleic acid (mRNA) 之免疫染色將區分為三種結果: 無 LIF mRNA 表現(0% staining; score 0), 輕微之 LIF mRNA 表現(1-30% staining; score 1), 中等之 LIF mRNA 表現 (31-60% staining; score 2), 強烈之 LIF mRNA 表現(61-100% staining; score 3)

我們將進一步分析比較兩組病人位於不同位置與不同月經週期之子宮內膜之 LIF 表現, 所以研究對象均接受黃體期時之血清黃體值之偵測, 並根據黃體數值之高低區分為兩組: ≥ 10 及 < 10 ng/ml 進一步分析黃體期之子宮內膜之 LIF 表現與血清黃體值之關聯性

實驗五：LIF 基因植入小鼠之子宮內膜

小鼠之 LIF (mLIF) cDNA 由英國牛津大學之 Professor J. K. Heath 提供 [52] mLIF 之 cDNA 進一步轉殖入包含 cytomegalovirus (CMV) promoter 及 SV40 polyA 之表現載體中 (圖 5-1) 同時使用包含火蠅 (firefly) 之螢光素酶 (luciferase) 基因轉殖入另一個表現載體中以當作控制組, 進一步以 (liposome GenePorter™ transfection reagent, Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA, USA) 施行小鼠子宮內膜之基因轉殖 我們將基因植體 (5 ug/10 ul) 與 liposome (20 μl) 以 1:2 之比例充分混合, 並置於室溫下達 30 分鐘

我們使用 100 隻雌性 ICR 小鼠 (6-8 週大), 並以 10 IU 之 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) 施行腹膜下注射 48 小時後與閹割公鼠交配 交配後 12 小時觀察期陰道栓 (plug) 以確定其假性受孕 (day-0) 進一步將雌鼠區分為兩組, 每組各 50 隻雌鼠: 第一組: LIF 轉殖; 第二組: luciferase 轉殖 在 day-0 這一日, 將雌鼠施行手術以將 DNA-liposome 混合液 (25 μl) 注射入其兩側子宮腔中 接著將雌鼠個別飼養直到犧牲為止

我們將實驗組與控制組母鼠進一步區分為五小組, 每小組各 10 隻個別在 day-0 至 day-4 時分批犧牲 day-0 為基因植入之當日, day-1 為基因植入後 20-24 小時, day-2 為基因植入後 44-48 小時, day-3 為基因植入後 68-72 小時, day-4 為基因植入後 92-96 小時 將小鼠以斷頸之方式犧牲後切開其 Y 字型子宮括除其子宮內膜以進一步施行蛋白質與 mRNA 抽取

經由 luciferase 基因轉殖之子宮內膜蛋白被抽取出後即以 Luminometer (TD20/20, Promega, USA) 進行 luciferase 活性之偵測, 以進一步決定 luciferase 基因轉殖之效率, 小鼠子宮內膜之 LIF 及 luciferase mRNAs 之表現將進一步以 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 決定其表現活性; 我們使用

TRIzol reagent (Life Technologies, USA) 抽取 0.1 g 小鼠子宮內膜之 RNA，用於決定 mLIF mRNA 之 RT-PCR primer 序列為：forward, 5'-GTGCCCTTACTGCTGCTGGTT-3' (25-45 nt of coding region); reverse, 5'-GGCTTGTGGTCAGAGTGGTCG-3' (534-513 nt of coding region). 1 ug 之 RNA 使用 2.5 μ M oligo dT primers (Promega, USA), 1 mM dNTP, 20 U ribonuclease inhibitor (HT Biotechnology), 及 5 U reverse transcriptase (RT) (HT Biotechnology) 於 RT buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM DTT, and 5 mM MgCl₂) 以達全部容積 20 μ l, 39 $^{\circ}$ C 下作用 60 min 而予以反轉錄

在每次 PCR 反應中, 3 μ l 之 RT 產物被添加於含 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% Triton X-100, 0.001% gelatin, 200 μ M dNTP, 0.5 unit of Taq DNA polymerase (HT Biotechnology), 及 0.2 μ M of each primer pair 以達共 50 μ l 之容積, PCR 之 protocol 為: 30 seconds denaturation at 94 $^{\circ}$ C, 45 seconds annealing at 60 $^{\circ}$ C, and 45 seconds extension at 72 $^{\circ}$ C for 30 cycles in a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer/Cetus)

GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 使用於 LIF mRNA 分析之內部定量控制, GAPDH 之 primers 序列為: forward, 5'-CTCTACCCACGGCAAGTTCAA-3' (144-164 nt of coding region); reverse, 5'-GGCAGTTTCTCCAGGCGG-3' (753-735 nt of coding region). 兩組於基因轉殖後第 1, 2, 3, 4 天後之 PCR 產物於電泳跑膠後以 densitometer analysis (Molecular Dynamics, Model: PD486-010, USA) 決定其含量, 各組之 mLIF/GAPDH 比例用於評估小鼠子宮內膜之 mLIF 表現

Medium 之置備:

Stock A 100 ml:

NaCl 5.931g, KCl 0.35g, MgSO₄ 0.024g, KH₂PO₄ 0.05g, Na Lactate 3.7 ml, Glucose
0.500g, Pencillin 0.060g

Stock B 50ml:

NaHCO₃ 1.050g, Phenol red 0.005g

Stock C 10 ml:

Na pyruvate 0.051g

Stock D 10ml:

CaCl₂·2H₂O 0.262g

Stock E 50 ml:

Hepes-Na salt 3.254g, Phenol red 0.005g

(1).HIF (human tubal fluid)之含量:

欲置備 Biocarbonate-buffered medium 100 ml

Stock A 10ml + Stock B 10 ml + Stock C 0.71 ml + Stock D 1.15 ml + H₂O 78.14 ml

以 1N HCl 調整酸鹼度至 PH 7.5

(2).Flush medium (Hepes-buffered medium):

Stock A 10 ml + Stock B 50ml + Stock C 0.71 ml + Stock D 1.15 ml + Stock E 8.4 ml + H₂O 78.14 ml

(3).M3TH medium

0.2% HSA, Phenol Red, NaHCO₃, SSR₂, Antibiotics (pencillin 25000IU/L, streptomycin

25 mg/L), MCDB 302 (modified Ham`s F10)

r-LIF 之置備 :

The rhLIF was prepared as the previous report [33] The cDNA encoding the mature human LIF was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction and subcloned into pET29(b) vector (Novagen). The rhLIF expressing vector was transformed into BL21(DE3). For preparation of the rhLIF, the transformant was grown in LB medium and IPTG was added to a final concentration of 1mM when the OD₆₀₀ value reached to 0.6. The cells were harvested at three hours after induction. A homogeneity of His-tagged rhLIF with molecular weight of 23kd can be obtained after passing through S-Tag and His-Tag resin. The biological activity was determined by cell proliferation assay on erythroleukemic TF-1 cells.

統計

本研究之各實驗之統計分析採用 SAS 統計軟體進行統計分析。統計方式採用 χ^2 test 與 logistic regression model test 進行各實驗中各組之統計分析。當 p -value < 0.05 則視為具備統計學上之差異。

結果:

實驗一: r-LIF 對於新鮮鼠胚之影響

於表一列出各組之 4 至 8 細胞期，桑椹期，囊胚期，成熟囊胚期，孵化囊胚期之發育比率。比較第二組及第三組之鼠胚發育，發現兩組之 4 至 8 細胞期及桑椹期之鼠胚發育比率類似(4 至 8 細胞期: 87.3% 比 91.0%; 桑椹期: 74.6% 比 87.1%)($p < .05$)。進一步比較第二組及第三組之囊胚期，成熟囊胚期，孵化囊胚期之比例，發現第二組(48.1%, 31.7%, 18.5%)之胚胎分裂與發育均較第三組(83.6%, 53.7%, 37.8%, $p < .05$)為差。第一組(控制組)及第三組之囊胚期鼠胚比率並無統計學上之差異(85.6% 比 93.6%, $p < .05$)。

表一. 實驗一中，三組鼠胚由 4 至 8 細胞期發育至囊胚期之數目與比例之比較。

	2-cells embryo No.	4-8 cells embryo No.	Morula No.	Blastocyst	Expanded blastocyst	Hatching blastocyst
Group 1 (Control)	146			125/146 (85.6%)*†		
Group 2 (HTF + HSA)	189	165/189	141/189	91/189	60/189	35/189

		(87.3%)	(74.6%)	(48.1%)	(31.7%)	(18.5%)
Group 3 (HTF + r-LIF)	201	183/201	175/201	168/201	108/201	76/201
		(91.0%)*	(87.1%)	(83.6%)*†	(53.7%)	(37.8%)
<i>p</i> -value (Group 2 and 3)*		NS	NS	<.05	<.05	<.05

* χ^2 test;

† 比較第一組與第三組並無統計學上之差異;

HTF: human tubal fluid; HSA: human serum albumin; NS: non significant;

r-LIF: recombinant LIF.

實驗二: 經冷凍與解凍之人類胚胎之於體外延長培養之影響

經快速解凍後之人類胚胎，分配於各組之胚胎品質與胚胎之細胞數目並無統計學上之差異。於表二(Table 2)列出各組之培養結果。比較四組之胚胎之早期發育於 2-4 細胞期至 9-16 細胞期，並無統計學上之差異，進一步比較第一組及第三組其 2-4 細胞期至桑椹期，並無統計學上之差異；比較第二組及第四組，其 2-4 細胞期至囊胚期，亦無統計學上之差異，第一組之胚胎發育成桑椹期之比例較第二，三，四組之比例為低，第一與第三組之胚胎發育成囊胚期之比例較第二與第四組之比例為低

進一步比較第二，三，四組，添加 HTF 與 LIF (第二組) 能提供與 M3TH培養溶液(第三，四組)相同甚至更佳之培養環境。於 M3TH培養溶液之培養環境中，添加 LIF 並無法提供明顯之刺激效果。第四組胚胎由 2-4 細胞期發育至 5-8 細胞期，9-16 細胞期，桑椹期，及囊胚期之比例(分別為 45.8%, 12.5%, 12.5%, 0%)，較第三組之比例(分別為 39.1%, 4.3%, 4.3%, 0%)為高，但卻無明顯統計學上之差異($p < .05$) (Table 2).

表二. 實驗二中，四組冷凍與解凍之人類胚胎於添加 1000 IU/ml r-LIF 之 HTF 及 M3TH培養溶液下，體外延長培養之結果比較

	2~4 cells embryo	5-8 cells embryo*	9-16 cells embryo*	Morula §	Blastocyst
Group 1 (HTF + HSA) †	72	31 (43.1%)	26 (36.1%)	9 (12.5%)	0
Group 2 (HTF + HAS + r-LIF) ‡	82	40 (48.8%)	33 (40.2%)	19 (23.2%)	9 (11.0%)
Group 3 (M3) †	76	34 (44.7%)	29 (38.2%)	15 (19.7%)	0
Group 4 (M3 + r-LIF) ‡	78	36 (46.2%)	32 (41.0%)	18 (23.1%)	10 (12.8%)

*比較各組之胚胎之早期發育於 2-4 細胞期至 9-16 細胞期，並無統計學上之差異;

† 比較第一組及第三組其 2-4 細胞期至桑椹期，並無統計學上之差異

‡ 比較第二組及第四組，其 2-4 細胞期至囊胚期，並無統計學上之差異.

§ 第一組之胚胎發育成桑椹期之比例較第其他組之比例為低 ($p < 0.05$).

第一與第三組之胚胎發育成囊胚期之比例較第二與第四組之比例為低 ($p < 0.05$).

HTF: human tubal fluid; HSA: human serum albumin; NS: non significant;

r-LIF: recombinant leukemia inhibitory factor.

實驗三: 不同濃度 LIF 對於鼠胚分裂之影響

於表三列出各組之培養結果，七組之胚胎之早期發育(2-4 細胞期至 6-16 細胞期)，並無統計學上之差異。各組之胚胎由 2-4 細胞期至 5-8 細胞期，6-16 細胞期之比例並無統計學上之差異(Table 3)。進一步比較胚胎植入前之發育(桑椹，囊胚期，孵化囊胚期)，各組之胚胎比例分別為第 2 組(77.1%, 65.6%, 33.6%)，第 3 組(76.6%, 67.6%, 35.9%)，第 4 組(74.1%, 63.3%, 33.8%)，第 5 組(75.4%, 68.1%, 32.5%)，均較第 1 組(52.7%, 33.0%, 14.3%)，第 6 組(66.4%, 51.7%, 21.7%)，第 7 組(54.5%, 35.2%, 16.7%)之比例為高。第 2, 3, 4, 5 組之桑椹，囊胚期，孵化囊胚期比例並無統計學上之差異。而比較第 1, 6, 7 組之桑椹，囊胚期，孵化囊胚期比例，各組之胚胎比例分別為第 6 組(66.4%, 51.7%, 21.7%)，第 7 組(54.5%, 35.2%, 16.7%)與第一組(52.7%, 33.0%, 14.3%)之比例並無統計學上之差異。

表三. 實驗三中，七組不同之 r-LIF 濃度下培養之鼠胚於體外延長培養之結果比較。

	2-4 cells embryo*	5-8 cells embryo*	9-16 cells embryo*	Morula †	Blastocyst †	Hatching blastocyst †
Group 1 (Control, HTF) ‡	112	98 (87.5%)	82 (73.2%)	59 (52.7%)	37 (33.0%)	16 (14.3%)
Group 2 (1500 IU/ml r-LIF+ HTF) §	131	116 (88.5%)	105 (80.2%)	101 (77.1%)	86 (65.6%)	44 (33.6%)
Group 3 (1000 IU/ml r-LIF+ HTF) §	145	130 (89.7%)	119 (82.1%)	111 (76.6%)	98 (67.6%)	52 (35.9%)
Group 4 (750 IU/ml r-LIF+ HTF) §	139	122 (87.8%)	110 (79.1%)	103 (74.1%)	88 (63.3%)	47 (33.8%)
Group 5 (500 IU/ml r-LIF+ HTF) §	191	174 (91.1%)	153 (80.1%)	144 (75.4%)	130 (68.1%)	62 (32.5%)
Group 6 (250 IU/ml r-LIF+ HTF) ‡	143	129 (90.2%)	109 (76.2%)	95 (66.4%)	74 (51.7%)	31 (21.7%)
Group 7 (125 IU/ml r-LIF+ HTF) ‡	156	140 (89.7%)	116 (74.4%)	85 (54.5%)	55 (35.2%)	26 (16.7%)

* 七組之胚胎之早期發育於 2-4 細胞期至 6-16 細胞期，並無統計學上之差異；

† 第 2, 3, 4, 5 組之胚胎發育(桑椹至孵化囊胚期)比第 1, 6, 7 組之比例為高。 $P < 0.05$

‡: 第 1, 6, 7 組之桑椹，囊胚期，孵化囊胚期比例，並無統計學上之差異。

§: 第 2, 3, 4, 5 組之桑椹，囊胚期，孵化囊胚期比例並無統計學上之差異。

HTF: human tubal fluid; LIF: leukemia inhibitory factor.

實驗四：LIF 在不孕症及正常病人之不同子宮內膜位置與月經週期之表現差異

共有 41 名不孕症之病患與 35 名正常女性被歸納於本研究中，兩組之平均年齡並無統計學差異，我們發現 LIF 之螢光免疫染色均可發現於各個月經週期與不同位置之子宮內膜細胞；於濾泡期中，子宮內膜細胞之 LIF 之螢光免疫染色表現於兩組病患中並無差異；於排卵期與黃體期中，正常女性之 LIF 之螢光免疫染色表現明顯高於不孕症之女性 (表四)

在正常女性之子宮內膜上皮細胞與腺體細胞之 LIF 螢光免疫染色表現，在濾泡期最低，其次為排卵期，最高為黃體期 相對的，在不孕症之女性，子宮內膜上皮細胞與腺體細胞之 LIF 螢光免疫染色表現在不同之月經週期並無明顯差異 (表四) 在子宮內膜實體細胞方面，兩組病患之 LIF 螢光免疫染色均無明顯週期性差異 在濾泡期中，兩組病患之 LIF 螢光免疫染色在不同位置之子宮內膜細胞並無明顯差異，在排卵期及黃體期中，LIF 螢光免疫染色最強的出現於子宮內膜上皮細胞，其次為腺體細胞，最弱為子宮內膜實體細胞 (表四) 在黃體期中，LIF 螢光免疫染色之表現與黃體素之高低並無顯著關聯性

表四. 在不孕正與正常受孕之女性其子宮內膜細胞在不同月經週期與不同位置之 LIF 螢光免疫染色表現之比較

	Fertile	Infertile
Patients No.	35	41
Age ¹	33.8 ± 4.1	34.6 ± 3.9
Follicular phase		
Luminal epithelium ¹	1.7 ± 0.7 ^{3,9}	1.6 ± 0.7 ^{6,10}
Glandular epithelium ¹	1.5 ± 0.7 ^{4,9}	1.5 ± 0.7 ^{7,10}
Stroma ¹	1.4 ± 0.6 ^{5,9}	1.3 ± 0.5 ^{8,10}
Periovulatory phase		
Luminal epithelium ²	2.4 ± 0.7 ^{3,12}	1.7 ± 0.8 ^{6,11}
Glandular epithelium ²	1.9 ± 0.7 ^{4,12}	1.4 ± 0.7 ^{7,11}
Stroma ²	1.5 ± 0.7 ^{5,12}	1.2 ± 0.5 ^{8,11}
Luteal phase		
Luminal epithelium ²	2.7 ± 0.6 ^{3,13}	1.8 ± 0.8 ^{6,14}
Glandular epithelium ²	2.3 ± 0.7 ^{4,13}	1.4 ± 0.7 ^{7,14}
Stroma ²	1.6 ± 0.6 ^{5,13}	1.2 ± 0.5 ^{8,14}

Score of LIF immunostaining: score 0 (0% staining); score 1 (1-30% staining); score 2 (31-60% staining); score 3 (61-100% staining).

¹Non-difference between fertile and infertile women.

² Higher LIF score of the fertile women than that of the infertile women.

^{3,4}: Different score between different phase.

^{5,6,7,8}: Non-difference between different phase.

^{9,10,11}: Non-difference between different locations.

^{12,13,14}: Highest LIF score in the luminal epithelium, moderate in the glandular epithelium, and lowest in the stroma.

實驗五： L I F 基因植入小鼠之子宮內膜

我們使用 luciferase 之活性用於評估 liposome 之基因轉殖之效率，我們發現小鼠子宮內膜細胞可使用 liposome 將 DNA 有效轉殖 於基因轉殖後第 0, 1, 2, 3, 4 天之

luciferase 活性(light unit per gram of protein)分別為 61 ± 25 , 407 ± 77 , 2714 ± 438 , 3267 ± 448 , and 1211 ± 400 units (圖 5-2) mLIF 之基因表現於基因轉殖後第 2 天明顯上升, 並於第 3 天達到最高峰 (圖 5-3) 相對的, 內生性 mLIF 之表現於 luciferase 轉殖後只出現輕微之上升 (圖 5-4)

於不同時間下之基因轉殖, 我們以 mLIF 表現相對於 GAPDH amplicons 之數值比較, 以達到均等量之 RNA 之 RT-PCR 過程, 於 mLIF 基因轉殖後第 1, 2, 3, 4 天之 mLIF 相對於 GAPDH 之比值分別為 0.41 ± 0.10 , 1.10 ± 0.13 , 1.16 ± 0.23 , 0.78 ± 0.12 (圖 5-3) 相對之下, 在無 mLIF 基因轉殖後第 1, 2, 3, 4 天之內生性 mLIF 相對於 GAPDH 之比值分別: 0.24 ± 0.04 , 0.22 ± 0.05 , 0.35 ± 0.03 , 0.32 ± 0.06 (圖 5-4) 兩組小鼠之子宮內膜 mLIF 有顯著差異 ($p < 0.0001$)

圖 5-1. 包含小鼠 LIF 與 luciferase 之表現質體

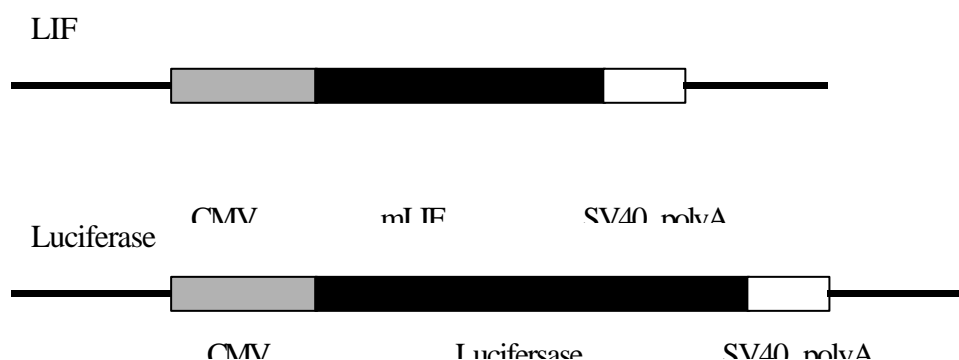


圖 5-2. Luciferase 基因轉殖後第 0, 1, 2, 3, 4 天時之相對 Relative light units/g protein 比值

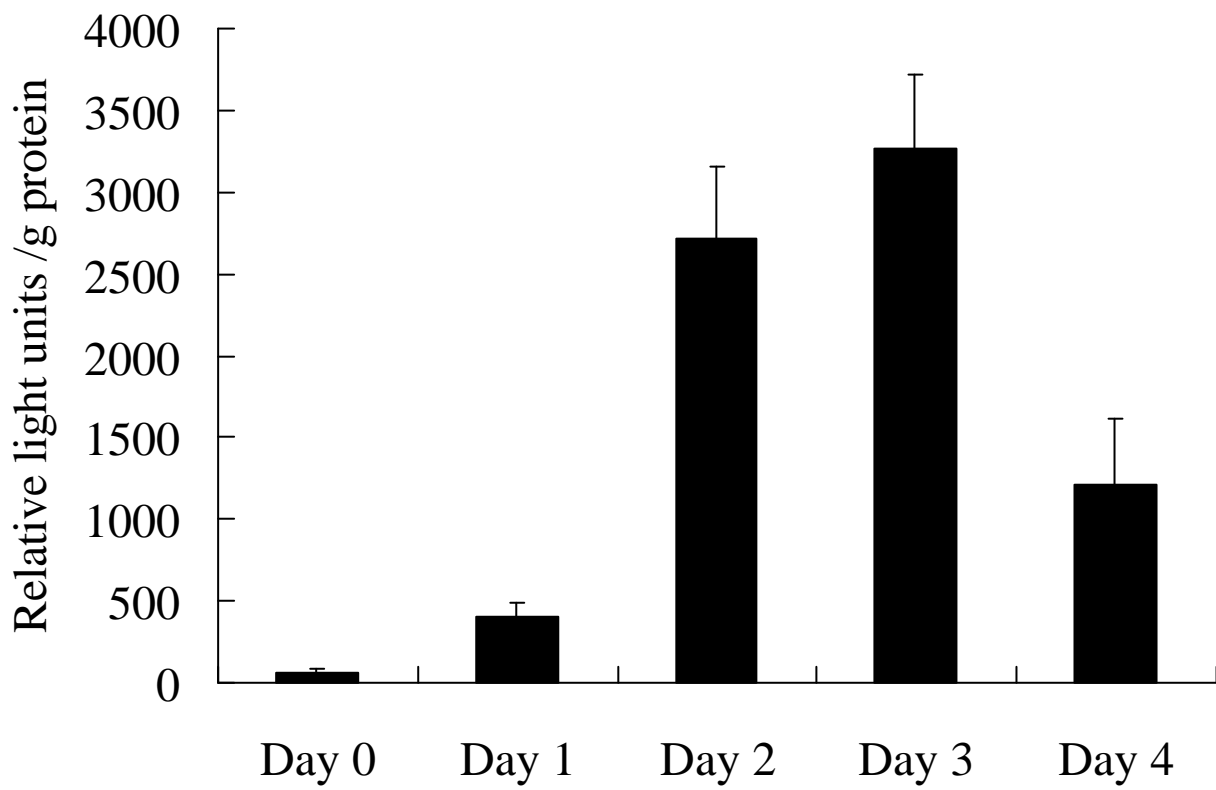


圖 5-3. LIF 基因轉殖後第 1, 2, 3, 4 天時之相對 mLIF/GAPDH 比值

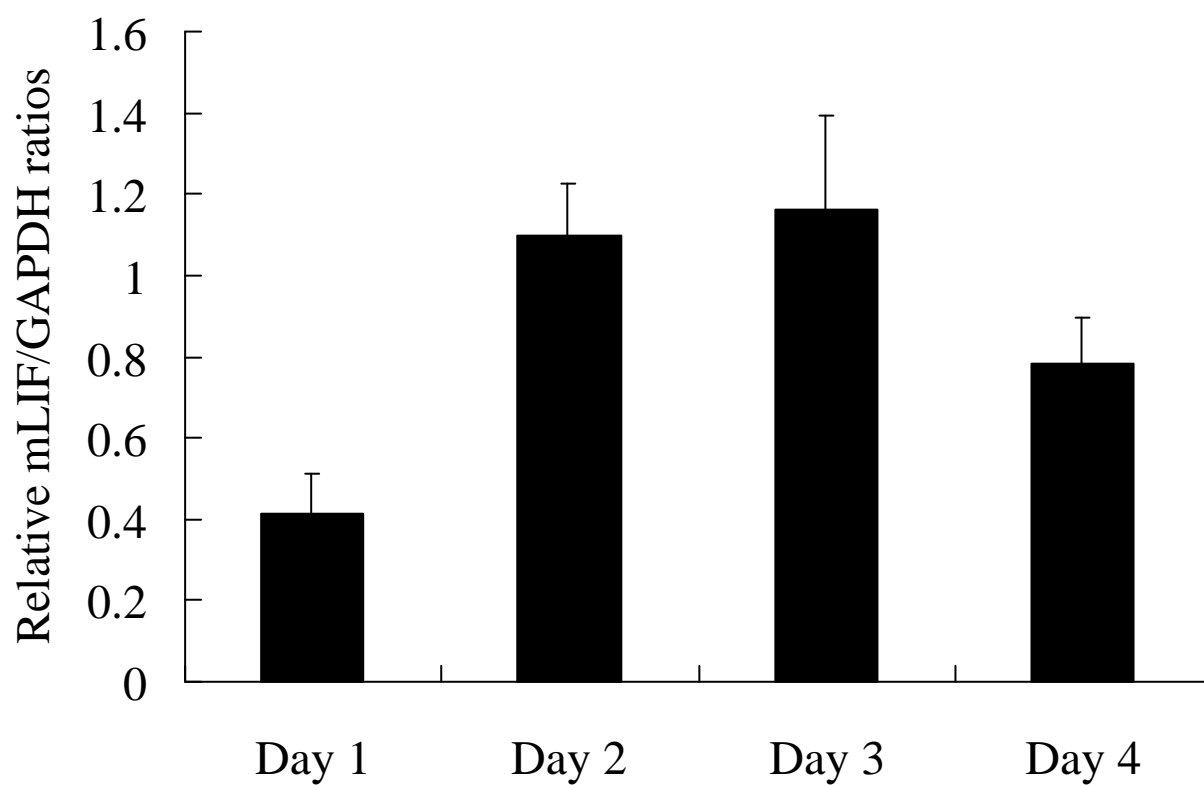
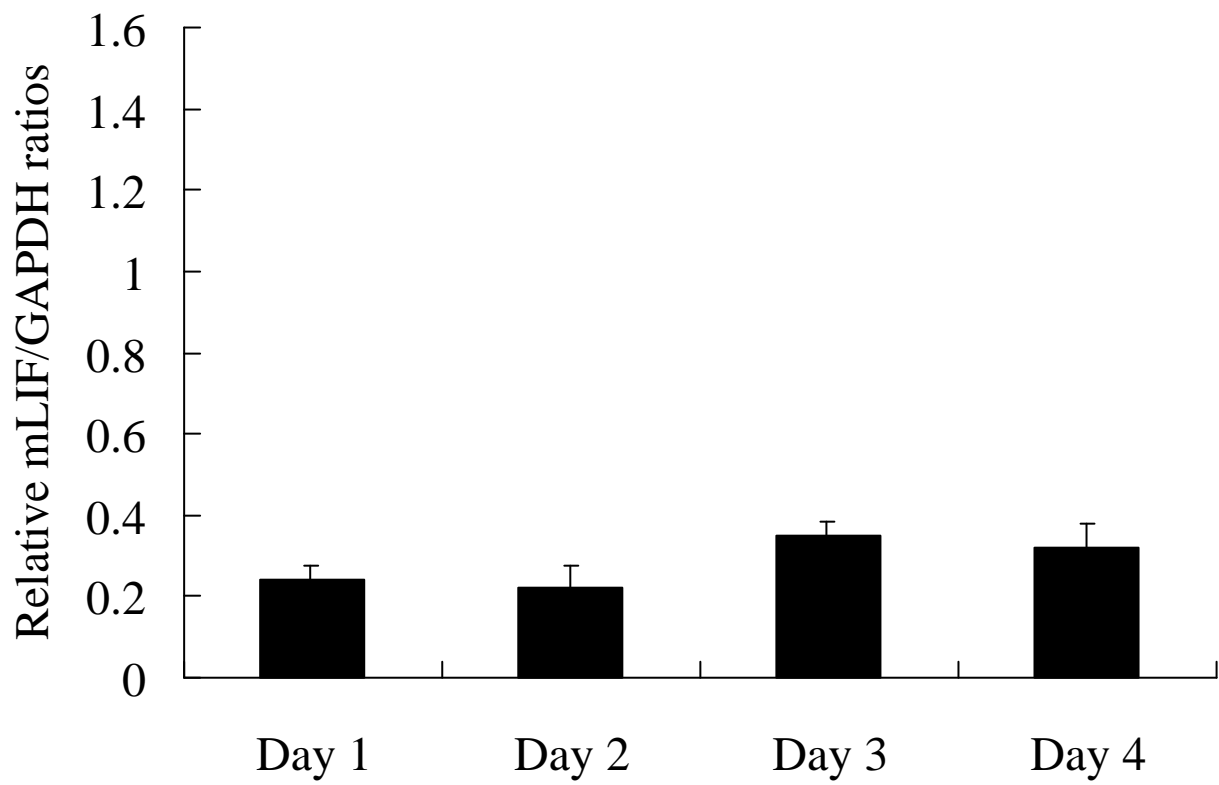


圖 5-4. Luciferase 基因轉殖後第 1, 2, 3, 4 天時之相對 mLIF/GAPDH 比值



討 論

近年來人工協助生殖技術不斷地創新，男性不孕症自從睪丸精蟲取出術(TESE, testicular sperm extraction) 副睪精蟲吸取術(MESA, micro-surgical epididymal sperm aspiration)及精子顯微注射(ICSI, intracytoplasmic sperm injection)的發展達到劃時代的突破。因而卵子、受精卵的品質及子宮內膜(endometrium)的接受度則成為決定不孕症治療成功率的主要因素。尤其是冷凍胚胎(embryo cryopreservation)經歷冷凍與解凍的過程使得胚胎的分裂和著床率均較新鮮的胚胎為低，故如何提高冷凍胚胎的發育亦為臨床治療的重點。為提昇胚胎體外延長培養(prolonged culture)之成功率，細胞共同培養(cell co-culture)應運而生，如輸卵管表皮細胞(ampullary cells) [10]，子宮纖維母細胞[2]及綠猴腎細胞(Vero cells) [11]。

有些學者提出細胞共同培養的優點在於這些細胞會釋放出一些生長因子[12]，尤其是白血病抑制因子。細胞素(cytokine)在卵泡(follicle)的發育、促使排卵(ovulation)及受精卵著床的過程中扮演一重要角色。根據目前的研究發現與生殖有關的細胞素如上皮生長因子(EGF; epidermal growth factor)、介質蛋白(IL; interleukin)、腫瘤壞死因子(TNF- α ; tumor necrosis factor- α)及白血病抑制因子(LIF)等等。於是嘗試在培養液中加入各種生長因子來促使胚胎分裂亦引起廣泛地討論。人工合成的生長因子較細胞共同培養的優點在於使用方便，且無污染的顧慮。而白血病抑制因子便是一種很理想的培養液添加物。臨床實驗顯示人工合成的白血病抑制因子的確能有效地促進小鼠胚胎(實驗一，三)及人類冷凍胚胎(實驗二)的分裂和發育。

細胞素及生長因子

促使胚胎分裂及受精卵著床。大多數的研究支持上皮生長因子(EGF)可以促進胚胎早期的發育，而白血病抑制因子(LIF)則對著床前胚胎的發育有幫助[39]。缺乏 LIF 表現的子宮內膜將不利於胚胎著床。因此假如能順利的將 LIF 的基因殖入表現不足的組織將可能是未來不孕症治療的新里程碑。

LIF之作用機轉:

許多學者提出 LIF 之可能機轉在於 LIF 與子宮內膜之交互作用(*autocrine and paracrine*)。許多人體細胞包括免疫細胞與實質細胞均可分泌 LIF，然而 LIF 之主要表現與製造在於子宮內膜之表皮細胞[22]。Bhatt 等學者[32] 提出子宮內膜中 LIF mRNA 之表現亦與囊胚期胚胎之著床率息息相關。許多學者提出囊胚期之胚胎內含針對 LIF 接受體之 messenger RNA，其可能作用於胚胎與子宮內膜間之訊號傳遞[40]。Kojima 等學者[26] 提出於懷孕過程中子宮內膜細胞之 LIF 濃度亦維持較高之濃度。Chamok-Jones 等學者[41]提出於正常之月經週期中，黃體期中期之子宮內膜表現出最高濃度之 LIF。Stewart 等學者[16]提出 LIF 表現於胚胎著床時期之子宮內膜細胞對於胚胎之著床具有絕對之影響，缺乏 LIF 表現之子宮內膜細胞將無法讓胚胎順利著床。Stewart 等學者 [16] 亦提出母鼠若缺乏 LIF 基因會導致不孕，其原因在於缺乏 LIF 之製造導致囊胚期之胚胎無法順利著床於子宮內膜上。相對而言，卵子細胞或早期之胚胎細胞並無針對 LIF 接受體之 messenger RNA[41]，此發現進一步提示 LIF 對早期胚胎細胞之不明顯作用之可能機轉。

LIF對於人胚與鼠胚之影響

於本研究中，實驗一，二及三之結果均進一步確認 r-LIF 對於植入前之人胚或鼠胚發育的確有所助益，此與我們先前發表之文獻與其他學者之研究結果一致[13]。於實驗一中，添加 r-LIF 之體外培養環境能達到類似體內培養生長之效果。同時我們亦無法發現 r-LIF 對於早期胚胎(2 細胞至桑椹期階段)之明顯刺激或抑制效果。造成此種差異之主要原因可能在於不同階段之胚胎對於生長因子與營養需求之差異。當胚胎逐漸生長分裂，胚胎對於環境所提供之生長因子與營養需求可能也逐漸增加。於實驗二中，我們亦注意到 LIF 添加於 HTF 之溶液中對於早期人類胚胎之發育並無太大之助益。添加 LIF 於 M3 溶液中，LIF 對於早期及晚期之人類胚胎發育並無太大之助益。進一步比較 HTF 及 M3^{HT} 培養溶液，添加 LIF 能提供 HTF 溶液與 M3^{HT} 培養溶液類甚至更佳之培養效果。然而胚胎於四組之發育仍不盡理想，其原因可能在於經由冷凍與解凍之過程中，胚胎內形成之微小冰晶可能對於胚胎之傷害並進一步影響其最後之培養結果。

LIF對於胚胎共同培養之優點

許多學者提出共同培養對於培養胚胎之幫助可能在於共同培養細胞所釋放出之 LIF [22]。 Virginia 等學者[42] 提出以綠猴腎細胞及胎兒纖維母細胞作為共同培養細胞能釋放出 LIF 至培養溶液中。然而共同培養細胞之操作具有耗費時間，勞力，金錢及容易造成污染之缺點。本研究之各實驗，我們採用人工合成之白血病抑制因子(r-LIF)以取代共同培養之方式。r-LIF 之優點在於節省時間，勞力，金錢，容易取得，品質恆定，及避免共同培養細胞所造成之污染。r-LIF 提供一較安全，簡單方便之途徑於以提升人類胚胎體外培養之成功率。

體外培養溶液之影響:

傳統之胚胎培養溶液，並無法提供胚胎細胞體外長期培養所需要之養份與生長因子 [43,44]。目前一般實驗室常用之胚胎培養溶液，如 Earle's 培養液 [45] 及 HTF (human tubal fluid) [46]，並無法提供胚胎細胞由 6-至 8-細胞期至囊胚期這段長時間中所需要之營養。Jones 等學者 [47] 提出不含血清與細胞之培養液 (Gardner's G1 及 G2 培養液) 能使 52% 之早期胚胎細胞成長至囊胚期。既然傳統之胚胎培養溶液無法完全適用於胚胎細胞之體外長期培養，本研究之實驗二採用較複雜與營養成份較高之 M3™ 培養液作為細胞延長培養，並進一步與 HTF 添加 r-LIF 之培養液作一比較 [48,49]。然而我們發現，經由添加 r-LIF 後之 HTF 培養液能提供類似 M3™ 培養液所能達到之胚胎培養成長率。

人類血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 之影響:

有關於人類血清白蛋白 (HSA) 對於胚胎體外培養溶液之影響仍然具有爭議性。Dunglison 等學者 [31] 提出血清對於胚胎體外培養並無明顯之助益。Gardner 等學者 [50] 提出不含血清之人造複合式培養溶液能達到比傳統 Ham's F-10 添加共同培養細胞更佳之囊胚期胚胎生成率。本研究之實驗三中，因為人胚數目之限制，我們並沒有比較添加人類血清白蛋白與否對於胚胎體外培養之影響。因為 M3™ 培養液中含有 HSA 之成份，我們添加 HSA 於第一組與第二組之 HTF 培養液中以減少 HSA 對於四組之人胚發育之影響差異，並進一步比較 LIF 之真實影響。

不同 LIF 濃度對於胚胎發育之影響

目前所有 r-LIF 之文獻所採用之 LIF 濃度均為 1000 IU/ml [13,34,35]。並無學者提出其他不同濃度之 LIF 對於胚胎發育之影響。亦無文獻提出 LIF 之理想最低濃度為何。本研究之實驗三中，我們第一次比較不同之 r-LIF 濃度對於胚胎體外培養之影響，並提出 r-LIF 之理想最低濃度為 500 IU/ml。其他較低之 r-LIF 濃度，如 250 或 125 IU/ml，雖可達到比不添加 r-LIF 環境之略佳之囊胚期胚胎之生成率，但卻無法達到統計學上之差異。

LIF 不同子宮內膜位置與月經週期之表現

Charnock-Jones et al. [53] 提出 LIF 之表現只出現於黃體期之子宮內膜上皮細胞，Cullinan et al. [54] 亦指出 LIF 之表現出現於黃體期之子宮內膜腺體細胞，然而在本研究中我們發現，LIF 之表現均出現於整個月經週期，包括濾泡期，排卵期與黃體期 Kojima et al. [55] 提出 LIF mRNA 在子宮內膜腺體細胞之表現高於子宮內膜實體細胞 本研究中，我們亦發現子宮內膜上皮與腺體細胞之表現亦高於子宮內膜實體細胞 同時子宮內膜實體細胞亦呈現非週期性變化，這發現亦與 Kojima et al. [55] 之發現一致

本研究中，不孕與正常受孕能力女性之子宮內膜 LIF 表現於濾泡其中並無明顯差異 在排卵期與黃體期中，正常受孕能力女性之子宮內膜 LIF 表現明顯高於不孕女性之表現，我們亦發現最高之 LIF 表現出現於黃體中期，此時正值胚胎著床期間，此說明 LIF 表現對胚胎著床亦有相當程度之關聯性，同時 LIF 之週期性表現亦顯示其對於子宮內膜之內分泌於女性之懷孕力扮演相當程度之角色 因此，LIF 之正常表現對於胚胎著床前之子宮內膜環境具有相當重要之影響

LIF 之基因轉殖

基因治療位現代醫學展開了新的一頁，目前以應用於臨床之基因治療包括：cystic fibrosis [56]，lung cancer [57]，pancreas cancer[58]，及 contraception [59] 使用於基因治療之途徑包括：氣管內植[60]，肌肉注射[61]，子宮內注射[62]，靜脈及動脈內注射[63.64] 子宮內膜與支氣管具有相似之生理特性，兩者均具有腔狀之空間，具有分泌之腺體細胞與柱狀之上皮細胞

多種基因治療之方法已被採用，包括：liposome [65]，virus-mediated transformation, calcium phosphate co-precipitation, electroporation, 及 lipofection [66] Liposomes 屬於非病毒性之載體，近年來以越來越被採用於基因治療，主因在於其方便性與低毒性[67]。在本研究中，我們亦採用 liposomes 以取代 retroviral 或 adenoviral vectors 作為基因植入之載體，亦著眼於其安全，無侵犯性，與較易為病患接受為重複基因植入之工具

臨床上極需要一有效之基因轉殖隻動物模型以研究基因植入後之子宮內膜內分泌性與功能之變化 於本研究中，我們發現小鼠之子宮內膜為一適當有效之基因植入對象 以植入 luciferase 及 LIF 植入後，我們發現小鼠之子宮內膜可有效的被基因轉殖 由於子宮內膜細胞會隨著月經週期而剝落與變化，因此重複性之基因植入在維持子宮內膜細胞之 LIF 活性上市必須的 本研究亦發現 LIF 之最高表現出現於植入後第三天，此可提供於胚胎植入後之臨床使用，再胚胎著床前三日予以基因植入將可達胚胎植入時之 LIF 最佳表現

結論與未來研究、應用方向

總結而言，本研究之系列實驗結果提出數點針對 r-LIF 對人類胚胎或鼠胚早期或晚期體外培養影響之重要實驗結論。本研究提供一最大規模之 r-LIF 對於人胚體外延長培養之實驗結果。我們證實，對於早期之鼠胚與經冷凍與解凍之人類胚胎體外培養，r-LIF 並無法提供明顯胚胎發育之幫助或妨礙。對於較晚期植入前之胚胎(桑椹至孵化囊胚期)，r-LIF 能明顯提升胚胎之生長，分化與孵化。於 HTF 溶液之中加以 r-LIF 能提供類似 M3TH 溶液之培養環境。於 M3TH 溶液之培養環境中，添加 r-LIF 對於胚胎早期或晚期培養並無明顯助益。進一步，我們第一次提出，500 IU/ml 為 r-LIF 理想之最低濃度。r-LIF 之研究對於未來，體外延長培養溶液之研發具有相當大之影響。

子宮內膜細胞之 LIF 表現與女性之懷孕能力有關，子宮內膜細胞之 LIF 表現與月經週期與子宮內膜細胞之位置有關，子宮內膜細胞之 LIF 表現呈現週期性變化，子宮內膜表皮細胞之 LIF 表現呈現最高表現於黃體期，最低表現於濾泡期，子宮內膜實體細胞之 LIF 呈現非週期性變化，LIF 表現與黃體期之黃體素無關，子宮內膜之 LIF 表現與不孕症之關聯性仍需更進一步研究 未來可經由卵泡液、胚胎培養液中 LIF 的濃度與病人血中 E₂ 濃度與卵子及胚胎品質的相關性，將 LIF 的濃度用來預測卵子及胚胎的品質 以提供 LIF 作為預測卵子及胚胎品質的指標

本研究發現小鼠之子宮內膜細胞可有效的使用 LIF-liposome 之方式予以基因轉殖 子宮內膜細胞是一有效之基因轉殖對象，這對於不明性或子宮內膜著床性不佳之不孕症病患提供另一可能之治療方法與方向，然而仍需要更進一步之研究已證實其安全性與有效性，同時以 DNA-liposome 之方式亦可應用於人工受孕時之基因植入，其他予子宮受孕力與胚胎著床性有關之 cytokines，如 epidermal growth factor 等，亦可常試用於進一步之基因轉殖 然而，以 LIF 施行基因治療法 仍進一步更大規模之實驗及合併多家醫學中心之合作，針對 LIF 對於人類胚胎或鼠胚之體外實驗，以進一步証實 LIF

對於胚胎之真實影響，這仍需要生殖醫學界更進一步之努力。

參考文獻

1. Ichikawa Y. Differentiation of a cell line of myeloid leukemia. *Journal of cellular physiology* 1969;74:223-234.
2. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 1988;366(15):688-690.
3. Murphy M, Reid K, Hilton DJ, Bartlett PF. Generation of sensory neuron is stimulated by leukemia inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*. 1991;88: 3498-3501.
4. Nachtigall MJ, Kliman HJ, Feinberg RF, Olive DL, Engin O, Arici A. The effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on trophoblast differentiation: A potential role in human implantation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996;81:801-961.
5. Gough NM, Gearing DP, Ling JA, Willson TA, Hilton DJ, Nicola NA, and Donald Metcalf. Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*. 1988;85:2623-2637.
6. Hilton DJ, Nicola NA, Gough NM, and Donald Metcalf. Resolution and purification of three distinct factors produced by Kerbs Ascites cells which have differentiation-inducing activity on murine myeloid leukemic cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988; 263(19): 9238-9243.
7. Hilton DJ, Nicola NA, Metcalf D. Specific binding of murine leukemia inhibitory factor to normal and leukemic monocytic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*. 1988;85:5971-5975.
8. Sutherland GR, Baker E, Hyland VJ, Callen DF, Stahl J, Gough NM. The gene for human leukemia inhibitory factor maps to 22q12. *Leukemia* 1989;3(1):9-13.
9. Kola I, Davey A, Gough NM. Localization of the murine leukemia inhibitory factor gene near the centromere on chromosome 11. *Growth Factors* 1990;2:235-240.

10. Wiemer KE, Huffman DI, Masxon WS, Eager S, Muhlberger B, Fiore I, Cuervo M. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following coculture on bovine oviductal epithelial cells. *Human Reproduction*. 1993;8:97-101.
11. Menezes YJR, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of Vero cells. *Biology of Reproduction*. 1990;42:301-306.
12. Watson AH, Hogan A, Hahnel A, Wiemer KE, Schultz GA. Expression of growth factor ligand and receptor genes in the preimplantation bovine embryo. *Molecular Reproduction and Development*. 1992;31:87-95.
13. Tsai HD, Chang CC, Hsieh YY, Lo HY, Hsu LW, Chang SC. Recombinant human leukemia inhibitory factor enhances the development of preimplantation mouse embryo *in vitro*. *Fertility and Sterility*. 1999;71:722-725.
14. Cheng L, Gearing DP, White LS, Compton DL, Schooly K, Donovan PJ. Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. *Development*. 1994;120:3145-3153.
15. Michell MH, Swanson RJ, Hodgen GD, Oehninger S. Enhancement of *in vitro* murine embryo development by recombinant leukemia inhibitory factor. *J Soc Gynecol Invest* 1994;1:215-219.
16. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* 1992;359:76-79.
17. Moreau JF, Donaldson DD, Bennett F, Giannotti JW, Clark SC, Wong GG. Leukemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* 1988;336(15):690-692.
18. Yamamori T, Fukada K, Aebersold R, Korsching S, Fann MJ, Patterson PH. The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor. *Science* 1989;246:1412-1416.
19. Metcalf D, Hilton D, Nicola NA. Leukemia inhibitory factor can potentiate murine megakaryocyte production *in vitro*. *Blood* 1991;77(10):2150-2153.
20. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willison TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola

- NA, Gough NM. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988;336(15):684-687.
21. Conish J, Callon K, King A, Edgar S, Reid IR. The effect of leukemia inhibitory factor on bone in vivo. *Endocrinology* 1993;132:1359-1366.
 22. Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American* 1991;88:11408-11412.
 23. Stewart CL. Leukemia inhibitory factor and the regulation of preimplantation development of the mammalian embryo. *Molecular Reproduction and Development*. 1994;39:233-238.
 24. Zeng-ming Yang, Su-ping Le, Dong-bao Chen, and Michael J.K. Harper. Temporal and Sepatial Expression of Leukemia inhibitory factor in rabbit uterus during early pregnancy. *Molecular Reproduction and Development*. 1994;38:148-152.
 25. Chamok-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. leukemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at the time. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1994;101:421-426.
 26. Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J, Mori T. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biology of Reproduction*. 1994;50:882-887.
 27. Aydin Archi, Oguz Engin, Erkut Attar, and David L. Olive. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1995;80(6):1908-1915.
 28. Emily B. Cullinan, Susan J. Abbondanzo, Patrick S. Anderson, Jeffrey W. Pollard, Bruce A. Jessey, and Colin L. Stewart. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American*. 1996;93:3115-3120.
 29. Kurzrock R, Estrov Z, Wetzler M, Gutterman JU, Talpaz M. LIF: Not just a leukemia inhibitory factor.

- Endocrine Reviews. 1991;12:208-217.
30. Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA. Human leukemia inhibitory factor improves the viability of ovine embryos. *Biology of Reproduction*. 1992; 46:470-474.
 31. Dunglison GF, Barlow DH, Sargent IL. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Human Reproduction*. 1996;11:191-196.
 32. Jurisicova A, Ben-Chetrit A, Varmuza SL, Casper RF. Recombinant human leukemia inhibitory factor does not enhance in vitro human blastocyst formation. *Fertility and Sterility*. 1995;64:999-1002.
 33. Chang SC, Wang F, Hsu LW. Expression of recombinant human leukemia inhibitory factor (rhLIF) in *Escherichia Coli*. *Medical Journal of China Medical College Hospital*. 1997;2:6-11.
 34. Lavranos TC, Rathjen PD, Seamark RF. Trophic effects of myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF) on mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1995;105:331-338.
 35. Eckert J, Tao T, Niemann H. Ratio of inner cell mass and trophoblastic cells in blastocysts derived from porcine 4- and 8-cell embryos and isolated blastomeres cultured in vitro in the presence or absence of protein and human leukemia inhibitory factor. *Biology of Reproduction*. 1997;57:552-560.
 36. Tasi HD, Chen CM, Lo HY, Chang CC. Subcutaneous low dose Leuprolide Acetate Depot Versus Leuprolide Acetate for Women Undergoing Ovarian Stimulation for in-Vitro Fertilization. *Human Reproduction*. 1995;10:2909-2912.
 37. Hsieh YY, Tsai HD, Chang CC, Chang CC, Lo HY, Andrew Lai CH. Ultra-rapid cryopreservation of human embryos---1582 embryo experience. *Fertility and Sterility* 1999, in press.
 38. Lai AC, Lin BP, Chang CC, Tsai HD, Hwang VW, Lo HY. Pregnancies after transfer of ultrarapidly frozen human embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1996;13: 625-628.
 39. Edward RG. New concepts in embryos growth and implantation. *Human Reproduction* 1998;13:supplement: 271-282.
 40. Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edward DR, Schultz GA. Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development* 1995;121:1005-1014.

41. Charnok-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. leukemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at the time. *Journal of Reproduction and Fertility* 1994;101:421-426.
42. Virginia R. Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (LIF) enhances mouse blastocyst development in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 1995;12:153-156.
43. Gardner DK, Lane M. Alleviation of the 2-cell block and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA, and physical factors. *Human Reproduction* 1996;11:2703-2712.
44. Lane M, Gardner DK. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *Journal of Reproduction and Fertility* 1997;109:153-164.
45. Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT. Development of spare human preimplantation embryos in vitro: An analysis of the correlation among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. *Journal of In Vitro Fertility and Embryo Transfer* 1989;6:30-35.
46. Quinn P, Kerlin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertility and Sterility* 1985;44:493-498.
47. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Human Reproduction* 1998;13:169-177.
48. Dale PO, Kjekshus E, Tanbo T, Holst N, Abyholm T. Clinical outcome of day 3 versus day 2 embryo transfer using serum-free culture media. Abstract of the 10th Annual Meeting of the ESHRE, Brussels 1994 (No. 068).
49. Forsdahl F, Bertheussen K, Bungum LJ, Bungum MH, Willumsen J, Maltau JM. A study of extended culture time with embryo replacement of the morula and blastocyst stage. Abstract of the 10th Annual Meeting of ESHRE, Brussels 1994 (No. 375).
50. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and Sterility* 1998;69:84-88.
51. M Iean, S Mirallie, P Barriere, A Godard, A Mensier, P Lopes, Aydin Arici. Leukemia inhibitory factor

- expression in human follicular fluid. *Human Reproduction* 1999;14:571-572.
52. Hsu LW, Heath JK. Identification of two elements involved in regulating expression of the murine leukaemia inhibitory factor gene. *Biochem J* 1994;302:103-10.
 53. Charnok-Jones DS, Sharkey AM, Fenwick P, Smith SK. leukemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at the time. *J Reprod Fertil* 1994;101:421-6.
 54. Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3115-20.
 55. Kojima K, Kanzaki H, Iwai M, Hatayama H, Fujimoto M, Inoue T, Horie K, Nakayama H, Fujita J, Mori T. Expression of leukemia inhibitory factor in human endometrium and placenta. *Biol Reprod* 1994;50:882-7.
 56. Alton EW, Middleton PG, Caplen NJ, Smith SN, Steel DM, Munkonge FM, Jeffery PK, Geddes DM, Hart SL, Williamson R, et al. Non-invasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis. *Nature Genet* 1993;5:135-42.
 57. Zou Y, Zong G, Ling YH, Perez-Soler R. Development of cationic liposome formulations for intratracheal gene therapy of early lung cancer. *Cancer Gene Ther* 2000;7:683-96.
 58. Schmid RM, Weidenbach H, Yamagushi H, Luhrs H, Liptay S, Adler G. Direct gene transfer into the rat pancreas using DNA-liposomes. *Eur J Clin Invest* 1998;28:220-6.
 59. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Jagers DC, Yoo HJ, Heap RB, Smith SK. In-vivo gene transfer to the uterine endometrium. *Hum Reprod* 1997;12:17-20.
 60. Tsan MF, White JE, Shepard B. Lung-specific direct in vivo gene transfer with recombinant plasmid DNA. *Am J Physiol* 1995;268(6 Pt 1):L1052-6.
 61. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990;247:1465-8.
 62. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Jagers DC, Yoo HJ, Heap RB, Smith SK. In-vivo gene transfer to

- the uterine endometrium. *Hum Reprod* 1997;12:17-20.
63. Schmid RM, Weidenbach H, Yamagushi H, Luhrs H, Liptay S, Adler G. Direct gene transfer into the rat pancreas using DNA-liposomes. *Eur J Clin Invest* 1998;28:220-6.
64. Song YK, Liu F, Chu S, Liu D. Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration. *Hum Gene Ther* 1997;8:1585-94.
65. Alton EW, Middleton PG, Caplen NJ, Smith SN, Steel DM, Munkonge FM, Jeffery PK, Geddes DM, Hart SL, Williamson R, et al. Non-invasive liposome-mediated gene delivery can correct the ion transport defect in cystic fibrosis. *Nature Genet* 1993;5:135-42.
66. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Jagers DC, Yoo HJ, Heap RB, Smith SK. In-vivo gene transfer to the uterine endometrium. *Hum Reprod* 1997;12:17-20.
67. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7413-7

英文摘要

Application of leukemia inhibitory factor (LIF) in human reproduction

Part 1. Recombinant Leukemia Inhibitory Factor (r-LIF) Enhance Pre-implantation Mouse Embryo Development In

Vitro

Objective: To assess the effect of human recombinant leukemia inhibitory factor (r-LIF) in mouse embryos.

Materials and Methods: Female CB6F1 mice that were between 6 and 8 weeks old were superovulated by 10 IU pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) and 10 IU HCG intra-peritoneally; then mated with BDF1 male mice. Mice were divided randomly into three Groups, which included 1 Group of *in vivo* (Group 1) and 2 Groups of *in vitro* study (Group 2, 3). In Group 1 (control Group), mice were killed after HCG injection 116-120 hours. In Group 2 and 3, mice were killed after HCG injection 44-48 hours. The 2-cell embryos (Group 2, 3) and blastocyst stage embryos (Group 1) were washed by flush medium from the ampulla after the excision of the oviduct. In Group 2 (HTF + HSA), embryos were co-cultured with 30 μ l microdroplets of human tubal fluid (HTF) +0.5% human serum albumin (HSA). In Group 3 (HTF + r-LIF): mouse embryos were co-cultured with HTF and r-LIF (1000 IU/ml) under paraffin oil. The embryonic numbers in different stage including 4-8 cell, morula, blastocyst, expanded blastocyst, and hatching blastocyst were recorded and compared.

Results: Similar embryos development to 4-8 cell and morula stages were noted between Group 2 and 3 (87.3% vs. 91.0%; 74.6% vs. 87.1%, respectively). However, further embryo development in blastocyst, expanded, and hatching blastocyst in Group 2 (48.1%, 31.7%, 18.5%) were lower than that of Group 3 (83.6%, 53.7%, 37.8%).

Conclusion : R-LIF does not provide the obvious stimulation upon the early development of mice embryo. However, r-LIF has positive effects on pre-implantation blastocyst growth, differentiation and hatching.

Part 2. The effect of different concentrations of Recombinant leukemia inhibitory factor (LIF) on different development stage of mouse embryo in vitro

Purpose: To assess the influence of different concentrations of recombinant human leukemia inhibitory factor (LIF) on the *in-vitro* development of mouse embryos.

Materials and methods: The 2-4 cell embryos of CB6F1 mice were culture in the human tubal fluid (HTF) media containing different concentration of LIF. Mouse embryos were divided into 7 groups: (1) HTF; (2) 1500 IU/ml LIF; (3) 1000 IU/ml LIF; (4) 750 IU/ml LIF; (5) 500 IU/ml LIF; (6) 250 IU/ml LIF; (7)

125 IU/ml LIF. The embryonic numbers of different stages including 5-8 cell, 9-16 cell, morula, blastocyst and hatching blastocyst were recorded.

Results: The percentage of early embryo stage (2-cell embryos to 6-16 cell stages) in all groups were non-significantly different. There were higher formation rates of pre-implantation embryos (morula to hatching blastocyst) in groups 2, 3, 4 and 5 than in groups 1, 6 and 7.

Conclusion : LIF has positive effects on pre-implantation embryo development and has non-significant influence upon the early embryo development. The lowest concentration of LIF which could provide the optimal embryo development is 500 IU/ml.

Part 3. Prolonged culture of human cryopreserved embryos with recombinant human leukemic inhibitory factor (rhLIF)

Purpose: To evaluate the efficiency of recombinant human leukemic inhibitory factor (LIF) in the prolonged culture of human cryopreserved-thawing embryos.

Patients and methods: After thawing, all embryos were divided into four groups: (1) Human tubal fluid (HTF); (2). HTF + LIF; (3) M3TH medium; (4) M3TH medium + LIF. In the following prolong culture, the embryo development in each groups were compared.

Result(s): About the embryo development from 2-4 cell to 9-16 cell stage, there were non-different between each group. There was lower morula formation rate in group 1 (6.9%) than those in other groups (23.2%, 19.7%, 23.1%). The lower blastocyst formation in group 1 and 3 (0%, 0%) than those in group 2 and 4 (11.0%, 12.8%) were noted.

Conclusion(s): LIF is beneficial for pre-implantation embryos. LIF does not influence the early embryo development. The LIF-supplemented HTF provided a similar culture environment for thawing embryos as M3TH medium.

Part 4. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) expression in different endometrial location between fertile and infertile women throughout different menstrual phases

Purpose: To demonstrate the leukemia inhibitory factor (LIF) expression in different endometrial locations

between fertile and infertile women throughout different menstrual phases. The relationship between progesterone level and LIF expression were evaluated.

Patients and methods: Idiopathic infertile and normal fertile women accepted the endometrial biopsies in follicular, periovulatory, and luteal phases. The luteal progesterone level was measured. Endometrial LIF immunostaining of luminal epithelium, glandular epithelium, and stroma were detected. The relationship between luteal LIF expression and progesterone level was evaluated.

Results: Significant LIF expression was noted in the endometrium of fertile women than that of infertile women. The LIF expression was highest in the luminal epithelium, moderate in the glandular epithelium, and lowest in the stroma. The luminal and glandular epithelial staining were lowest in follicular phase, moderate in periovulatory phase, and strongest in luteal phase. The stromal LIF presented with a non-cyclical manner. The LIF expression is not related with the progesterone level.

Conclusion: Endometrial LIF expression is related with human fertility. Endometrial LIF expression is dependent on cellular localizations and menstrual stages. Stronger LIF expression presents in the endometrial epithelium during luteal phase.

Part 5. In-vivo gene transfer of leukemia inhibitory factor into mouse endometrium

Objectives: Leukemia inhibitory factor (LIF) is important for embryogenesis and implantation. We aimed to transfect LIF gene into the mouse endometrium.

Patients and methods: Expression plasmids carried LIF and luciferase genes for transfer. After superovulation, 100 ICR mice were mated with vasectomized mice. Then LIF-liposome (Group 1) and luciferase-liposome complexes (Group 2) were injected into their uterine lumen (day-0). Endometrial LIF and luciferase expressions were detected by reverse RT-PCR on day-0 to 4 post gene transfer.

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control to normalize the gene transfection.

Results: LIF mRNA and luciferase activities reached the peak expression on day-3. In Group 1, the ratios of LIF/GADPH on day-1 to 4 were 0.414, 1.096, 1.162, and 0.782. In Group 2, LIF/GADPH on day-1 to 4 were 0.24, 0.22, 0.35, and 0.32

Conclusions: Mouse endometrium could be effectively transfected with liposome-DNA mixtures.

Endometrial LIF transfer via liposome may be effective in human.

Keywords: embryo, endometrium, gene transfection, LIF, leukemia inhibitory factor, coculture

作者簡歷

姓 名: 謝耀元

籍 貫: 台灣省屏東縣

出生年月日: 民國五十八年六月二十四日

聯 絡 住址: 台中市育德路 2 號

聯 絡 電話: (04)22052121 ext 1613

Electric-mail: d3531@hpd.cmch.org.tw

學 歷: 屏東縣林邊鄉仁和國小畢業(1975~1981)

台南縣麻豆鎮黎明中學初中部畢業(1981~1984)

台南縣麻豆鎮黎明中學高中部畢業(1984~1987)

中國醫藥學院醫學系畢業(1987~ 1994)

中國醫藥學院醫學研究所畢業(1999~2001)

經 歷: 中國醫藥學院附設醫院住院醫師(1994~1997)

中國醫藥學院附設醫院總醫師(1997~1998)

中國醫藥學院附設醫院研究員(1998~1999)

中國醫藥學院附設醫院主治醫師(1999~)

中國醫藥學院臨床醫學研究所

碩士論文口試委員審定書

臨床醫學研究所 謝耀元 君所提之論文

人工白血病抑制因子在人類生殖醫學的應用

經本委員會審議，認為符合碩士資格標準

論文指導教授 _____

論文共同指導教授 _____

論文共同指導教授 _____

臨床醫學研究所所長 _____

中國醫藥學院八十九年度臨床醫學研究所

碩士論文

人工白血病抑制因子在人類生殖醫學的應用

**Application of Leukemia Inhibitory Factor (LIF)
in Human Reproduction**

研 究 生：謝 耀 元

學 號：8866018

指 導 教 授：蔡鴻德

共 同 指 導 教 授：吳介信 林志生