

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

血癌抑制因子缺乏對鼠胚發育及鼠胚著床的影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-039-021-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中國醫藥大學醫學系

計畫主持人：李茂盛

共同主持人：葉聯舜

計畫參與人員：黃梨香

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 10 月 28 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

血癌抑制因子缺乏對期鼠胚發育及鼠胚著床的影響

The effect of development and implantation on mouse embryo of
leukemia inhibitory factor (LIF)-deficiency

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC — 92 — 2314 — B — 039 — 021

執行期間：92年8月1日至93年7月31日

計畫主持人：李茂盛

共同主持人：葉聯舜

計畫參與人員：黃梨香

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究
計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥大學 醫學系

中華民國 93 年 10 月 30 日

中文摘要

胚胎能否順利著床取決於著床前期胚胎和子宮內膜的發育狀況，血癌抑制因子(leukemia inhibitory factor)是著床及成功懷孕所必須的因子，但是血癌抑制因子在著床前期胚胎發育所扮演的角色並不十分清楚。本計畫藉由體外培養及胚胎植入模式的建立探討於雙原核時期顯微注射血癌抑制因子反意寡核苷酸(antisense)抑制胚胎內血癌抑制因子的表現，並觀察其對著床前期鼠胚發育的影響、基因表現量的變化及著床後型態的改變。注射 0.25 fmol 血癌抑制因子反意寡核苷酸後，胚胎的發育不受影響，注射 0.5、1.0 fmol 及 2.0 fmol 血癌抑制因子反意寡核苷酸後，胚胎繼續發育至桑甚胚期及囊胚期的比例則有意義的降低，注射 4.0 fmol 血癌抑制因子反意寡核苷酸則胚胎無法發育到四細胞期以上。將注射 1.0 及 2.0 fmol 血癌抑制因子反意寡核苷酸後尚未孵化的囊胚植入的子宮中，各組囊胚著床率皆顯著的降低，且具有劑量之依存性。經收集各組植入胚胎後的子宮，再以 DNA 晶片分析基因表現，經二次重複及統計比對發現對照組及控制組之子宮中基因的表現並顯著之差異。由穿透式電子顯微鏡觀察各組胚胎已著床後的子宮發現的控制組蛻膜中分泌型細胞之間隙較實驗組明顯，這是否意味不同組別的胚胎在子宮中養分的供需的情況不同，則有待更深入的研究證實。總結本研究證實血癌抑制因子會影響著床前期之胚胎發育，但並不會影響著床部分之子宮的基因表現。

關鍵詞：胚胎發生、血癌抑制因子、著床

英文摘要

Good embryo development and receptive endometrium are essential factors for embryo implantation. Leukemia inhibitory factor (LIF) is an essential factor for implantation and establishment of pregnancy. However, its role in the development of preimplantation embryos remains controversial. The aim of this study is to assess the effects of LIF on development of preimplantation mouse embryo and uterine changes after implantation. Changes in preimplantation embryos were determined after microinjection of LIF antisense oligonucleotide at the two-pronucleus stage. There was no difference on development between the 0.25-fmol treated and control groups. The 0.5-, 1.0 or 2.0-fmol treated groups had significantly lower percentages of embryos developed to the morula or blastocyst stage and the 2.0-fmol treated group had significantly lower percentages of embryos developed to the four-cell, morula, or blastocyst stage. No embryos developed to the four-cell stage in the 4.0-fmol treated group. The 1.0- or 2.0-fmol treated groups had significant lower implantation rates than their corresponding control groups. To identify gene changes by using duplicate DNA microarray from embryo transfer to uterus after injected with or without LIF antisense oligonucleotide was no statistic difference. The gaps between secretory cells of decidual cell in the control uterus were larger than LIF-antisense treated groups. If nutrients supplement was difference between these groups is need more investigation. In conclusion, we find LIF These results indicate that LIF is a critical factor for the normal development of embryos at the preimplantation stages. These results indicate that LIF is a critical factor for the normal development of embryos at the preimplantation stages but not effect on gene expression of uterus.

key words: embryogenesis, leukemia inhibitory factor, implantation

報告內容

前言

經初步確定血癌抑制因子(leukemia inhibitory factor; LIF)對胚胎的生成作用有影響，而胚胎中 LIF 若受損是否會影響在子宮著床的效果，雖然許多與胚胎生長的因子亦已於胚胎及母體生殖道中被確認出來，但著床時胚胎的 LIF 表現缺損，對子宮及胚胎在解剖形態及分子層面的機制的影響尚沒為有相關的報導。因此，本篇計畫將就 LIF 對胚胎著床時子宮與胚胎交互作用的細微形態及機轉做深入的探討。

研究目的

本篇計畫將依原核期胚胎受 LIF antisense 抑制後，找出 LIF 對胚胎著床時子宮與胚胎交互作用影響的未知的基因群，擬以基因晶片直接搜尋著床後胚胎與子宮組織基因表現的改變，並且採用穿透式電子顯微鏡觀察著床位置的變化。

文獻探討:

小鼠胚胎的分裂由原核期開始，依分裂的數目通常分為 2 細胞期、4 細胞期、8 細胞期、桑葚胚期及囊胚期而進入孵化，接著著床於子宮。哺乳動物的胚於著床前期之發育具有階段性的特異性的生長因子及其接受體之表現(Watson et al., 1992)，此類生長因子包括胰島素 (insulin)、類胰島素生長因子(insulin-like growth factor I ; IGF-1)、表皮生長因子(epidermal growth factor; EGF)、轉型生長因子(transforming growth factor-a ; TGF-a) 及血癌抑制因子(leukemia inhibitory factor; LIF)等。

影響著床的因子包括荷爾蒙及胚胎與母體間的免疫反應。子宮在著床時其基質細胞會因應囊胚或人工刺激而增生為蛻膜細胞，子宮內膜的蛻膜化是把纖維母間質細胞轉變為大的上皮細胞，在人類這種改變是由黃體素所主導，始於月經黃體期後期。在老鼠，黃體素和動情素可加強生殖道中胚胎著床前的發育(Roblero LS et al,1979; Dey SK et al, 1980)，著床前胚胎的完全發育及分化須要額外的旁泌因子(Bischof P, et al, 1998)。位於母體及胎兒面的胎盤細胞滋養層，藉著形成無法辨識的人類白血球抗原 HLA-G (Kovats S et al,1990)，來逃過免疫系統的排斥。此外，局部基質血管的通透性改變、前列腺素和白三烯的產生，與血液中巨噬細胞、淋巴球、中性球和嗜酸性球的浸潤，皆是母體對胚胎產生免疫反應的結果(Mcmaster M.T. et al, 1993)。而細胞動力素(Interleukin I, IL-1) 於著床階段在子宮內膜的基質細胞大量表現以調節基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinase; MMP)及膠原蛋白酶，幫助囊胚穿入子宮，(Huang HY, 1998)而囊胚上細胞動力素(IL-1)亦同樣被研究出會與子宮上皮細胞 integrin 作用(Simon C,1998)。

血癌抑制因子(Leukemia Inhibitory Factor)是一種醣蛋白，屬於 interleukin-6 蛋白家族的成員之一，分子量為 20kD，成熟的蛋白型態由 180 個胺基酸組成

(Gearing DP, et al 1987), 細胞內的具活性的接受體為 LIF receptor 及 gp130 所組成的複合體(Gearing et al 1991, 1992; IP et al. 1992; Taga and Kishimoto 1992)。目前已知血癌抑制因子廣泛的存在各種細胞中, 在心臟、肝臟、子宮內膜、中樞神經系統、腎臟、肺臟、胸腺等器官及組織也都偵測得到血癌抑制因子。血癌抑制因子和許多生理系統上的增殖、分化、細胞存活有關(Metcalf 1992, Hilton 1992)。

在生殖系統的研究方面, 人類及多種哺乳類動物的輸卵管及子宮內膜上皮中皆會分泌血癌抑制因子, 血癌抑制因子會受到月經週期的調節, 隨著月經週期而在子宮內膜細胞中有週期性增減的表現(Cullinan et al, 1996; Vogiagis et al, 1996; Yang et al, 1994; Shen and Leder 1992), 此外, 在受到基因突變導致缺乏 LIF 的老鼠, 著床無法發生(Stewart et al, 1992)。

在 1991 年 Robertson 等人的研究報告中發現 LIF 可以加強小鼠胚胎囊胚及孵化的形成(Robertson SA et al, 1991), 類似的結果在牛的胚胎也被發表了(Marquand-Le Guinne B, 1993), 而在 Fry 等人對羊的研究中則發現 LIF 可以增加胚胎的著床率(Fry RC, 1992)。但是 LIF 對人類胚胎體外培養的研究還相當少, Dunglison 等人(1996) 將 LIF (1,000IU/mL) 加入捐贈自接受試管嬰兒治療夫婦的胚胎中培養, 發現囊胚期胚胎的形成率從 18% 增加至 44% ($P < 0.025$), 而囊胚的品質也從 10% 提高至 33% ($P < 0.025$), 但是培養到第七天時則沒有囊胚再形成也沒有胚胎再孵化。Jurisicova 等人(1995) 將 463 個臨床治療後剩餘的胚胎分成五組, 這些分裂早期的胚胎, 除了 164 個胚胎為控制組外, 其於四組的數目分別為 54、78、87、80; 而於培養液中加入不同濃度的 LIF 分別為: 5、7.5、10、20ng/mL, 每天觀察每一個胚胎的胎發育狀態及型態, 直到囊胚期。就總體而言, 人類胚胎在體外發育至著床的數量相少。控制組培養至第五天時只有 28% 發育至早期的囊胚, 到了第六、七天時有 19.5% 發育至囊胚後期; 而添加 LIF 5、7.5、10、20ng/mL 於培養各組, 並沒有明顯促進胚胎發育成早期或後期囊胚的效果。只有在 7.5 及 10ng/mL 有稍微促進後期囊胚形成的比例, 其數值分別為 38% 及 36%, 但是這些差異並無統計上的意義。根據以上節錄 Dunglison 及 Jurisicova 等人對 LIF 不一致的研究結果還需要未來更深入的研究。

研究方法

1、小鼠胚胎之收集

研究所使用的動物為購自國科會動物中心純品系的 C57BL/6J 母鼠與 CBA 公鼠自行交配所生的第一子代, 參考 Hogan(1994)之方法, 利用 PMSG、HCG 以腹腔注射之方式誘發六到八週性成熟母鼠超級排卵, 並將其與公鼠交配後, 犧牲母鼠, 由輸卵管中取一細胞期之鼠胚以待後續之實驗, 詳細取胚流程茲分述如下:

選擇週齡介於六至八週性成熟之雌鼠, 以 10IU 之 PMSG 進行腹腔注射以誘發超級排卵, 48 小時後再注射 10 IU 之 HCG, 注射 10IU 之 HCG 後, 立刻將一母鼠與一公鼠置入一籠內讓其互相交配。隔天清晨觀察雌鼠

是否有陰道塞(Vaginal Plug)，作為判斷交配與否之根據，於注射 HCG 後約 12-16 時可以取得原核期之鼠胚。取胚時，先將老鼠施以頸椎脫臼(Cervical Dislocation),再以 75%酒精消毒腹部。取下兩邊的輸卵管置於預先做好酸鹼平衡的培養液之培養皿中。將培養皿置於解剖顯微鏡下，取一 30G 針之 1 cc 空針，以針頭將輸卵管割破，用鑷子夾住輸卵管，使胚胎順利洗出，再以玻璃尿酸酶去掉胚胎外面的卵丘細胞，即可得到原核期單一細胞授精卵。將取出外觀正常的單一細胞期胚胎，置於已預先做好酸鹼平衡的培養液中，並移至 CO₂ 之培養箱中培養。

2、顯微注射法

本實驗所設計之 LIF gene 的反意寡核苷酸是委託 Gene tool (U.S.A.) 公司以其特殊之軟體設計障礙效率最高的一段序列為模板，抑制的序列為 Anti LIF: GACCTTCATTATGGGCTGGACTCTA (156~180)，另外為了對照注射時的傷害又設計了一段無意義的序列(Nonsense Control): ATCAGGATTGGTGG CATC TTCCCAG 此二序列皆經基因庫的比對，前者只專一性的抑制小鼠的 LIF 基因，後者在小鼠則無顯抗的基因。為了抵抗細胞內存在之核酸酶此段序列之骨架部分也已經特殊處理，此外為了確定期注入的位置及劑量，在已設計好的核苷酸序列後標定 FITC 螢光物質以利於螢光顯微鏡下觀察顯微注射的效果。

血癌抑制因子之反意寡核苷酸以生理食鹽水配置成 0.5mM、0.25mM 等濃度，無意義的反意寡核苷酸序列配成 0.5mM 的濃度分別於小鼠胚胎原核期時注射至胚胎核中，操作時全部在相位差倒立顯微鏡下進行，並以 Narishige 之顯微操作器操作，在顯微操作培養皿中滴入十滴已平衡過酸鹼值的 HTF 培養液，然後以礦物油覆蓋，再將十個一組的原核期鼠胚置於油滴下的培養液中，以事先用拉針儀及斷針機製備之平口固定針管固定胚胎，再以事先製備並預先注入血癌抑制因子之反意寡核苷酸的顯微注射管，經油壓調整後注入鼠胚的核中，注入的體積約 2pl。注射後將各組放回二氧化碳培養箱培養，並每日定時觀察。

3. 囊胚期胚胎植入子宮

在雙原核形成的同一天下午，以購自國科會的 ICR 母鼠與輸精管切除二週以上之公鼠進行假交配，隔天清晨確認是否有陰道栓塞，若有則於三日後囊胚形成時進行子宮胚胎植入，植入的方法須先將假懷孕母鼠麻醉，由已消毒過的剪刀及鑷子將背部剪一個小裂縫，再以鑷子將子宮上方之肌肉撕開，把子宮拉出來以玻璃毛細管拉製的針將囊胚植入子宮裡，縫合傷口並消毒。兩天後將母鼠犧牲紀錄著床情形，並將子宮剪下，一部分固定於電顯固定液中待觀察，一部份留待晶片分析。

4. 電子顯微鏡觀察

將子宮檢體浸於戊二醛及四氧化鐵配製之固定液，再經由一系列濃度 (50%、70%、80%、90%、95%、100%) 的酒精脫水各 10 至 15 分鐘後以環氧樹脂包埋檢體，最後切片找出著床的位置觀察其型態化。

5. DNA 晶片分析基因表現

收集各組著床及未著床的子宮，分別萃取 RNA，再以 DNA 晶片分析基因表現。合成 first-strand cDNA，加入 Total RNAs (0.5 mg) 與 CDS primer mix (1 mL; Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) 混合並加入含有 AMV reverse transcriptase (18.5 units; Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) 的 Dig cDNA master buffer 進行反轉錄 (15 uL in total volume)。First-strand cDNA 的反轉錄在 48°C 進行 50 分鐘，最後加入 stop solution (1 mL) 結束反應。使用安結倫公司的小鼠 cDNA 基因晶片，總共分析約 10000 種小鼠基因。經過反應及洗滌後的晶片以 Dig Luminescent Detection Kit (Roche Molecular Biochemicals) 檢測。由 CDP-Star substrate 轉變而來的訊號光點可以用 Fluor-S MAZ Multi-Imager System (Bio-Rad, Hercules, CA) 掃描獲得各組基因表現的結果，再加以分析判斷。

結果與討論 (含結論與建議)

壹、血癌抑制因子反意寡核苷酸對鼠胚生長速率之影響

本研究分別注入 0.25 fmole、0.5 fmole、1.0 fmole 或 2.0 fmole 及 4.0 fmole 的血癌抑制因子反意寡核苷酸於鼠胚中，並逐日紀錄胚胎發育情形，各組胚胎達到雙原核期的比例是 100%，本研究結果採累積方式，將各次做的結果加總，統計於表一，並以卡方檢定來統計各組的生長速率與對照組間是否有差異。未做任何處理的空白對照組、注射溶液對照組、注射 2 fmol 及 4 fmol 無意義序列之對照組，累計的鼠胚總數為 151、171 及 146、83，達到二細胞期的比率分別為 90.7%、91.8%、92.5% 及 90.4，分別注入 0.25 fmole、0.5 fmole、1.0 fmole、2.0 fmole 及 4.0 fmole 血癌抑制因子反意寡核苷酸的各組胚胎達到二細胞期的比率分別為 93.1%、90.3%、90.3%、92.1% 及 96.4%，除了一小部分的胚胎停滯雙原核時期，大部分的二細胞期胚胎內的兩個細胞大小相同，於此時期胚胎的型態及外觀上與控制組比較並未出現異常，且生長速率與未做任何處理的空白對照組比較並無差異。

當胚胎繼續發育至四細胞期時，空白對照組、注射溶液對照組與注射 2 fmol 及 4 fmol 無意義序列之對照組，達到四細胞期的比率分別為 88.7%、88.3% 及 87.7% 及 85.5，分別注入 0.25 fmole、0.5 fmole、1.0 fmole 及 2.0 fmole 血癌抑制因子反意寡核苷酸的各組胚胎達到四細胞期的比率分別為 85.5%、88.2%、82.1%、83.9% 及 70.4%，注入血癌抑制因子反意寡核苷酸的各組胚胎達到四細胞期的能力隨著注入濃度增高而降低，注入 4.0 fmole 血癌抑制因子反意寡核苷酸已完全停滯於二細胞期不再發育了，血癌抑制因子反意寡核苷酸在四細胞期已開始對胚胎造成傷害，一部份的胚胎停滯於二細胞期，注入 2.0 fmole 血癌抑制因子反意寡核苷酸的四細胞期鼠胚小部分出現胚胎內細胞大小不一的現象。

當胚胎生長至收集胚胎後第四天時，大部分胚胎進入桑椹胚時期，

空白對照組、注射溶液對照組與注射 2 fmol 及 4 fmol 無意義序列之對照組，達到桑椹胚期的比率分別為 87.4%、86.6%及 84.9%，注入溶液的控制組與無意義序列的胚胎發育至桑椹胚為止皆與控制組鼠胚的生長數率及型態上沒有差異，但是在此時期空白控制組已有約 30%生長較快之胚胎已出現囊胚。分別注入 0.25 fmole、0.5 fmole、1.0 fmole 及 2.0 fmole 各組生長至桑椹胚期的速率分別為 84%、76.6%、72.3%及 63.8%；當注射血癌抑制因子反意寡核苷酸濃度高於 0.25fmole 時小鼠胚胎在桑椹胚時有意義的降低。2.0 fmole 的高濃度組未達桑椹胚期的胚胎除了有縐縮的情形也有一部份胚胎內出現碎片。

當胚胎生長至收集胚胎後第五天時，大部分胚胎進入囊胚時期，空白對照組、注射溶液對照組與注射 2 fmol 及 4 fmol 無意義序列之對照組，達到囊胚期的比率分別為 85.4%、79.5%及 79.5%及 78.3%，注入溶液的控制組與無意義序列的胚胎發育至分桑椹胚為止皆與控制組鼠胚的生長數率及型態上沒有差異，但是在此時期空白控制組已有約之 50%生長較快之胚胎出現孵化囊胚了。分別注入 0.25 fmole、0.5 fmole、1.0 fmole 及 2.0 fmole 各組生長至囊胚期的速率分別為 80.6%，63.5%，39.4%及 13.2%，當注射血癌抑制因子反意寡核苷酸濃度高於 0.25 fmole 時胚胎的囊胚生成率與控制組比較有顯著差異，而注射濃度高於 0.25 fmole 血癌抑制因子反意寡核苷酸後，各組胚胎由桑椹胚發育至囊胚的比例有意義的降低。注射 2.0 fmole 血癌抑制因子反意寡核苷酸的高濃度組未達桑椹胚期的胚胎除了有縐縮的情形也有一部份胚胎內出現碎片，而此組實驗所形成的囊胚較小，且胚胎內出現較多的空泡及碎片。

貳、血癌抑制因子反意寡核苷酸對鼠胚著床率之影響

為了評估注入血癌抑制因子反意寡核苷酸之胚胎生長至囊胚期之胚胎的著床功能，本實驗設計直接將囊胚移置到假懷孕母鼠的子宮腔，此外，為了排除受胚母鼠個體差異造成的著床結果干擾，同一隻受胚母鼠的雙邊子宮，一邊植入無意義序列注入的控制組囊胚，另一邊的子宮則植入注入血癌抑制因子反意寡核苷酸而形成的囊胚。為了排除顯微注射反意寡核苷酸對形成囊胚後的著床功能可能造成傷害，我們首先比較分別植入未處理的空白組囊胚和注射無意義反意寡核苷酸囊胚的著床率，未處理的空白組囊胚和注射無意義反意寡核苷酸囊胚的著床率分別為 81.7±21.3 及 77.5±7.4，兩組之間的著床率並無顯著差異。0.5 fmole、1.0 fmole 及 2.0 fmol 血癌抑制因子反意寡核苷酸的囊胚生成率為 62.4% (63/101)、37.8%(76/201)及 15.1%(46/305)三組。這三組實驗組分別對照各組受胚母鼠之另一邊子宮植入未處理的空白對照組囊胚的著床率，1.0 fmole 及 2.0 fmole 血癌抑制因子反意寡核苷酸的著床率顯著下降，表示注入 2.0 fmole 及 1.0 fmole 血癌抑制因子反意寡核苷酸這兩組雖有囊胚形成，但是胚胎

的著床功能已經受損，而 0.5 fmole 血癌抑制因子反意寡核苷酸注入後生成的囊胚著床率不受影響。

參、血癌抑制因子反意寡核苷酸對著床後子宮基因表現之微陣列分析

經基因晶片分析各組著床後基因表現的結果，已基因表現量兩倍以上差異作為分析之標準，分別分析血癌抑制因子反意寡核苷酸處理後及控制組著床兩天後的的胚胎子攻擊胚囊部分基因表現量之比較，經二重複測試精英表現之結果，以兩倍差異量比較上調節(up-regulation)及下調節(down regulation)的基因差異(表三)，發現僅某一位知 EST 基因的表現具有差異之再現性而其他基因雖有差異但無再現性，因此判定血癌抑制因子反意寡核苷酸對著床後子宮基因表現之微陣列分析並無差異性。其可能的原因是此次分析是將著床後的子宮段減下分析其中包含子宮肌肉層，該部分基因的表現量可能遮蓋了蛻膜及胚胎部分較為量的基因表現，這部分的原因則有待進一步比較分析。

肆、以穿透式電子顯微鏡分析著床後子宮型態之變化

根據穿透式電子顯微鏡分析著床後子宮型態之變化之結果，血癌抑制因子反意寡核苷酸處理後及控制組著床兩天後之顯微切依據細胞核染色體之表現及粒線體之型態發現兩組間胚胎細胞皆呈現很年輕很活躍之狀態，並無明顯之差異，在子宮分泌型細胞間隙間則可以看出控制組的細胞間隙較實驗組明顯(圖一 A, B)，這是否代表控制組的胚胎和實驗組的胚胎對養分的需求情形不完全相同，則有待份深入的分析。

研究成果自評

本研究以顯微注射血癌抑制因子反意寡核苷酸於小鼠雙原核期胚胎，成功的證實血癌抑制因子對著床前期的鼠胚發育扮演著不可或缺的角色，此部分已完成國際期刊之發表，並刊載於 Biol. Reprod. 2004 年 70 卷 1270-1276 頁，血癌抑制因子缺乏對胚胎的發育率及著床率都會有抑制作用但是一但胚胎順利著床則由子宮繼續供應養分則胚宮的基因表現皆不受影響。

參考文獻：

Bischof P, Meisser A, Campana A (1998) Involvement of trophoblast in embryo implantation: regulation by paracrine factor. J Reprod Immunol ; 39(1-2) : 167-77.

Dunglison GF, Barlow DH, Sargent IL.(1996) Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocysts formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. Hum. Reprod 11, 191-6

Huang HY, Wen Y, Irwin JC, Kruessel JS, Soong YK Polan ML(1998) Cytokine-mediated regulation of 92 kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor or metalloproteinase-1(TIMP-1) and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in

human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* ; 83(5) : 1721-9.

Kovats S et al (1990) A class I antigen, HLA-G, expressed in human troblasts. *Science* ; 48 : 220-222.

Juriscova A, Ben-Chetrit A, Varmuza SL, Casper RF. (1995) Recombinant human leukemia inhibitory factor does not enhance in vitro human blastocyst formation. *Fertil Steril* 64: 999-1002

Lapree-Delage G, Moreau JF, Taupin JL, Kadhel P, Olivennes F, Hambartsoumian E, Frydman R, Tartatovsky B, Chaouat G (1997) Abnormal endometrial reactivity to colony stimulating factor 1 and leukemia inhibitory factor dependent female infertility. *Contracept Fertil Sex* ; 25(9) : 711-6.

Marquant-Le Guinne B, Humbolt P, Guillon N, Thibier M. (1993) Murine LIF improves the development of IVF cultured bovine morulae. *J Reprod Fertil Abstr* 12:61.

Robertson SA, Larvanos TC, Seamark RF.(1991) In-vitro models of the maternal fetal interface. In: Wegmann TG, Gill TG III, Nisbet-Brown E, eds. New York: Oxford University Press, 191-206

McMaster M.T. et al (1993) Association of monocyte and neutrophils with early event of blastocyst implantation in the mouse. *J Reprod Fertil* ; 99 : 561.

Roblero L.S. et al (1979) Effect of estradiol-17 and progesterone on oviductal transport and early development of mouse embryos. *J. Reprod Fertil* ; 57 : 91-94.

Simon C, Moreno C, Remohi J, Pellicer A (1998) Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol* ; 39(1-2) : 117-31.

Stewart C.L. et al (1992) Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor. *Nature* ; 359 : 76-78.

表一、於小鼠雙原核期顯微注射血癌抑制因子反意寡核苷酸後小鼠胚胎於著床前期各階段發育的百分比

| Stage | Control | | | | LIF antisense (fmol) | | | | |
|------------|----------------------|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Untreated (n=151) | NaCl (n=171) | Nonsense (2 fmol) (n=146) | Nonsense (4 fmol) (n=83) | 0.25 (n=144) | 0.5 ^a (n=145) | 1.0 ^a (n=155) | 2.0 ^a (n=152) | 4.0 ^a (n=112) |
| Two-cell | 90.7 | 91.8 | 92.5 | 90.4 | 93.1 | 90.3 | 90.3 | 92.1 | 96.4 |
| Four-cell | 88.7 | 88.3 | 87.7 | 85.5 | 88.2 | 82.1 | 83.9 | 70.4 ^b | 0 ^b |
| Morula | 87.4 | 86.6 | 84.9 | 83.1 | 84.0 | 76.6 ^c | 72.3 ^b | 63.8 ^b | 0 ^b |
| Blastocyst | 85.4 | 79.5 | 79.5 | 78.3 | 80.6 | 63.5 ^b | 39.4 ^b | 13.2 ^b | 0 ^b |

^a Compared with the untreated group.

^b $P < 0.01$.

^c $P < 0.05$

表二、於小鼠雙原核期顯微注射血癌抑制因子反意寡核苷酸後囊胚著床率的變化

| Group | No. of recipients | Treatment ^a | Blastulation rate (%) | No. of blastocysts transferred | % of blastocysts implanted ^b |
|-------|-------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------|---|
| I | 4 | Untreated | 81.1 (30/37) | 22 | 81.7 ± 21.3 |
| | | Nonsense | 80.0 (32/40) | 22 | 77.5 ± 7.4 |
| II | 8 | LIF antisense (0.5 fmol) | 62.4 (63/101) | 52 | 67.8 ± 17.6 |
| | | Nonsense | 81.5(66/81) | 52 | 74.7 ± 32.1 |
| III | 10 | LIF antisense (1 fmol) | 37.8 (76/201) | 61 | 54.3 ± 12.2 ^c |
| | | Nonsense | 82.5 (85/103) | 61 | 86.1 ± 11.5 |
| IV | 8 | LIF antisense (2 fmol) | 15.1 (46/305) | 42 | 32.9 ± 11.6 ^d |
| | | Nonsense | 82.4 (70/85) | 42 | 81.3 ± 14.0 |

^a Blastocysts (5-7) treated with LIF antisense oligonucleotide were transferred to the right uterus horn of each recipient and the same number treated with 2 fmol nonsense oligonucleotide to the left uterus horn. The untreated blastocysts were transferred to the right uterus horn of each recipient.

^b Mean ± Standard deviation. Compared with control.

^c $P < 0.01$,

^d $P < 0.001$.

表三、血癌抑制因子反意寡核苷酸對著床後子宮基因表現之微陣列分析上調節及下調節具差異之基因

| 基因名稱 | 上調節基因 | 下調節基因 | |
|------|---|--|--|
| | lymphoid blast crisis-like 1 Mus musculus strain CD-1 K ⁺ -dependent Na/Ca exchanger (Slc24A3) mRNA, partial cds | cystatin 9 Mus musculus 10 days embryo cDNA, RIKEN full-length enriched library granzyme F | 3 DNA segment, Chr 4, Wayne State University 125, expressed RIKEN cDNA 1110033O09 gene |

| | | |
|--|--|--|
| cholesterol 25-hydroxylase deltex 1 homolog (Drosophila) myosin heavy chain 11, smooth muscle RIKEN cDNA 2310045A20 gene troponin T3, skeletal, fast RIKEN cDNA 2810425C21 gene serine protease inhibitor, Kazal type 3 RIKEN cDNA 1100001I23 gene smoothelin period homolog 3 (Drosophila) unc13 homolog (C. elegans) 1 latent transforming growth factor beta binding protein 2 | RIKEN cDNA 2210008A03 gene reduced expression 2 annexin A8 RIKEN cDNA 0610042C05 gene S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A) S100 calcium-binding protein A9 (calgranulin B) hemoglobin, beta adult major chain gamma-glutamyl transpeptidase small inducible cytokine B subfamily, member 5 small inducible cytokine B subfamily, member 5 neutrophil cytosolic factor 2 gamma-aminobutyric acid (GABA-A) transporter 2 | lipocalin 2 Public domain EST NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like heat shock protein, 110 kDa mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase 2 granzyme B RIKEN cDNA 5730406I15 gene gene rich cluster, C8 gene RIKEN cDNA 9430098E02 gene IG ALPHA CHAIN C REGION GTP cyclohydrolase 1 RIKEN cDNA 1110021D01 gene kinesin-associated protein |
|--|--|--|



圖一 為小鼠胚胎著床後兩天之子宮穿透視電子顯微鏡相片 A 為控制組子宮

B 為 2.0 fmol 血癌抑制因子反意寡核苷酸處理過之囊胚著床後之子宮切片型態，箭頭所指為細胞間隙部分，放大倍率為 3000 倍
已有論文發表者，可以 A4 紙影印，作為成果報告內容或附錄，並請註明發表刊物名稱、卷期及出版日期。

附錄

關於本計畫已發表之論文如下:

Tzu-Chun Cheng, Chun-Chia Huang, Chung-I Chen, Chung-Hsien Li, Yih-Shou Hsieh, Chih-Yang Huang³ Maw-Sheng Lee, and Jer-Yuh Liu. (2004) Leukemia Inhibitory Factor Antisense Oligonucleotide Inhibits the Development of Murine Embryos at Pre-Implantation Stages. *Biological Reproduction*.70: 1270-1276.